บทที่ 10
เทคโนโลยีชีวภาพกับการผสมพันธุ์พืช

จุดประสงค์การเรียนรู้เมื่ออ่านบทที่ 10 จบแล้วนักศึกษาสามารถ

1. อธิบายถึงประโยชน์ที่ประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการผสมพันธุ์พืชได้
2. สามารถอธิบายขั้นตอนการนำเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ปรับปรุงพันธุ์พืชได้
3. อธิบายเพาะเลี้ยงคัพภะ (เอ็มบริโอ) ของพืชพอสังเขปได้
4. อธิบายการเพาะเลี้ยงรากของพืชที่มีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชได้
5. อธิบายการเพาะเลี้ยงส่วนอวัยวะต่าง ๆ ของพืชได้

เนื้อหาในบทที่ 10 ประกอบด้วย

1. เทคโนโลยีชีวภาพ
2. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการปรับปรุงพันธุ์พืช
3. การเพาะเลี้ยงคัพภะ
4. การเพาะเลี้ยงราก
5. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและอวัยวะ
6. บทสรุป
7. แบบประเมินผลท้ายบทและเฉลย

10.1 เทคโนโลยีชีวภาพ

คำว่า "เทคโนโลยีชีวภาพ" นี้มีความหมายกว้างมาก อาจจะเกี่ยวข้องหรือครอบคลุมในวิทยาศาสตร์หลายสาขา ไม่ว่าจะเป็นทางด้านการแพทย์ วิศวกรรม การเกษตร เคมี สิ่งแวดล้อม พลังงาน อาหารและเครื่องดื่ม เป็นต้น Higgins (1985) ได้ให้ความหมายไว้ว่า "เทคโนโลยีชีวภาพ อาจจะหมายถึงเทคนิคในการนำระบบหรือกระบวนการทางชีววิทยา (biological systems or processes) มาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์แก่มวลมนุษยชาติ" เทคโนโลยีชีวภาพเป็นวิทยาการแบบสหวิชาโดยมีพื้นฐานของวิทยาศาสตร์ในสาขาชีววิทยา ชีวเคมีและจุลชีววิทยา เป็นสำคัญ ในปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในวงการอุตสาหกรรม เช่น การผลิตแอลกอฮอล์ โดยผ่านกระบวนการหมักการกำจัดน้ำเสียโดยกระบวนการของจุลินทรีย์ การผลิตฮอร์โมนและยาปฏิชีวนะ เป็นต้น สำหรับทางด้านการเกษตรนั้น ก็ได้นำเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้อย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ การขยายพันธุ์พืชและสัตว์ ตลอดจนนำมาประยุกต์ใช้ในด้านเกษตรอุตสาหกรรมชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะอาหารและเครื่องดื่ม เช่น การผลิตนมและผลิตภัณฑ์จากนม (เนย โยเกิต) การผลิตแป้งและขนมปัง การผลิตเบียร์ ไวน์ เหล้า น้ำส้มสายชู การผลิตโปรตีนจากสาหร่ายเซลล์เดียว การผลิตวิตามิน กรดอะมิโน เม็ดสี (pigments) สารปรุงแต่งกลิ่นและรสชาติของอาหาร น้ำผลไม้ ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว ตลอดจนการถนอมอาหาร เป็นต้น

10.2 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการปรับปรุงพันธุ์พืช

ในปัจจุบันได้มีความตื่นตัวเป็นอย่างมากในบทบาทของเทคโนโลยีชีวภาพ มีการพัฒนาเทคนิคและวิธีการใหม่ ๆ ซึ่งส่งผลเป็นอย่างมากทั้งด้านการเกษตร และอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ เทคโนโลยีชีวภาพเหล่านี้ มีหลายระดับตั้งแต่ขั้นพื้นฐาน เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) ไปจนถึงขั้นสูง เช่น การย้ายยีนหรือตัดต่อยีนโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เป็นต้นประโยชน์ของเทคโนโลยีชีวภาพที่นำมาประยุกต์ใช้ทางด้านการเกษตรมีมากมาย ได้แก่

10.2.1 ใช้ในการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมของพืช (plant germplasm conservation) โดยปกติแล้วนักปรับปรุงพันธุ์พืชจะเก็บรักษาหรืออนุรักษ์พันธุ์พืชไว้ในรูปของเมล็ดหรือหัว (seed genebank) ซึ่งต้องเก็บไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นได้ หรืออาจจะเก็บไว้ในสภาพแปลงรวบรวมพันธุ์พืช (field genebank) ซึ่งต้องใช้งบประมาณและแรงงานสูง ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาและอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมของพืชไว้ในสภาพหลอดแก้ว (in vitro germplasm) ได้แก่

การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมในสภาพต้นอ่อนหรือเนื้อเยื่อ (in vitro conservation) ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยที่ต้นอ่อนหรือเนื้อเยื่อของพืชยังสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้อีกเล็กน้อยวิธีอนุรักษ์แบบนี้เป็นที่นิยมใช้ตามศูนย์หรือสถาบันวิจัยพืชนานาชาติเป็นอย่างมาก ดังเช่นศูนย์วิจัยพืชเขตร้อยชื้นนานาชาติ (CAIT) ใช้อนุรักษ์พันธุ์มันสำปะหลัง ศูนย์วิจัยมันฝรั่งนานาชาติ (CIP) ใช้อนุรักษ์พันธุ์มันฝรั่งและพันธุ์มันเทศ และศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักแห่งเอเซีย (AVRDC) ใช้อนุรักษ์พันธุ์มันเทศ เป็นต้น

การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมในสภาพเนื้อเยื่อ ตายอด หรือต้นอ่อน ในสภาพเย็นจัด (cryopreservation) โดยการเก็บไว้ในก๊าซไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ -196o ซ. ซึ่งการเก็บวิธีนี้เป็นการเก็บแบบถาวร เนื้อเยื่อ ตายอด หรือต้นอ่อนจะไม่มีการเจริญเติบโตระหว่างการเก็บรักษา

10.2.2 ใช้ในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุกรรมของพืชในสภาพต้นอ่อน (in vitro plant germplasm exchange) เชื้อพันธุกรรมของพืชที่มีขนาดใหญ่ เช่น มะพร้าว อ้อย และมันชนิดต่าง ๆ ทำให้การขนส่งหรือแลกเปลี่ยนพันธุ์ทำได้ยาก และมีขีดจำกัดมาก ผลของวิทยาการทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชที่อยู่ในสภาพของต้นอ่อนในหลอดแก้วเป็นไปโดยสะดวก และประหยัดค่าขนส่งมากยิ่งขึ้น

10.2.3 ใช้ในการขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมากโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือเพาะเลี้ยงเซลล์ (in vitro micropropagation through tissue or cell cultures) วิธีการนี้สามารถขยายพันธุ์พืชได้รวดเร็วโดยใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย ต้นพืชที่ได้จะมียีโนไทป์เหมือนต้นเดิมและปลอดโรค สามารถควบคุมปริมาณการผลิตและผลิตได้ตลอดปีขึ้นกับความต้องการ นอกจากนี้แล้วยังใช้ในการขยายพันธุ์พืชที่ตามปกติจะขยายพันธุ์แบบไม่ใช่เพศได้ยากหรือไม่ได้ เช่น หน้าวัว มะพร้าวปาล์มน้ำมัน เป็นต้น

ในปัจจุบันใช้วิธีการนี้ขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจทั้งพืชไร่ ไม้ผล ไม้ดอก ไม้ประดับ และพืชผักชนิดต่าง ๆ ได้อย่างมากมาย เช่น ถั่วชนิดต่าง ๆ มันสำปะหลัง อ้อย ยาสูบ ข้าว มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน ยางพารา ต้นสัก สนชนิดต่าง ๆ ไผ่ หวาย ยูคา ลิปตัส กระถินเทพา กระถินณรงค์ หมาก กล้วย ส้ม มะละกอ กาแฟ โกโก้ เงาะ ทุเรียน มันฝรั่ง สตรอเบอรี่ ขิง เบญจมาศ
ลิลลี่ กล้วยไม้ หน้าวัว คาร์เนชั่น มะลิ เยอบีร่าและพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ เป็นต้น

10.2.4 ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชในสภาพหลอดแก้ว (in vitro plant breeding) ซึ่งในปัจจุบันได้ประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพในงานปรับปรุงพันธุ์พืชได้อย่างกว้างขวาง ได้แก่ การเพาะเลี้ยงอับเรณู (anther culture) ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมอีกวิธีหนึ่ง โดยการเพาะเลี้ยงอับเรณูที่อยู่ในสภาพการแบ่งเซลล์เป็น haploid ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเพียงครึ่งเดียว หลังจากชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชได้แล้วจึงทำการเพิ่มจำนวนโครโมโซม (doubling chromosome) โดยใช้สารคอลชิซีนเพื่อให้ได้ต้นพืชที่เป็น diploid ซึ่งพืชใหม่นี้จะมีสภาพเป็นพืชพันธุ์แท้ (homozygous) ได้ทันที ในขณะที่การคัดเลือกพันธุ์โดยวิธีปกติ (conventional breeding) จะต้องใช้เวลานานไม่ต่ำกว่า 3-5 ปี วิธีการนี้ได้ทดลองใช้ในข้าว ยางพาราและพืชอื่น ๆ อีกมากมาย

การเพาะเลี้ยงคัพภะ (embryo culture) เป็นวิะการนำเอาคัพภะจากเมล็ดพืชในสภาปลอดเชื้อโรคไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยแร่ธาตุ วิตามิน และฮอร์โมน ที่จำเป็นสำหรับพืชนั้น ๆ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพห้องที่มีอุณหภูมิ ความเข้มข้นของแสง และความยาวของช่วงแสงที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด โดยต้องมีการย้ายคัพภะที่เจริญเติบโตลงเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีฮอร์โมนเหมาะสมในแต่ละช่วงของการเจริญเติบโต เพื่อให้ได้ต้นพืชที่เจริญเติบโตทั้งลำและรากอย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้แล้ววิธีการนี้ยังใช้ช่วยชีวิตคัพภะ (embryo rescue) ได้อีกด้วย ซึ่งวิธีการหลังนี้นิยมใช่ช่วยชีวิตคัพภะของพืชที่ได้จากการผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization) เช่น ฝ้ายลูกผสม (*Gossypium davidsonii* x *G. sturtii*), มะเขือเทศลูกผสม (*Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum*), ข้าวลูกผสม (*Oryza sativa* x *O. minuta*), และปอกระเจาลูกผสม (*Corchorus capsularis* x *C. olitorius*) เป็นต้น หรือใช้ช่วยชีวิตคัพภะที่ได้จากการผสมข้ามสกุล (intergeneric hybridization) เช่น ข้าวโพด (*Tripsacum spp.* x *Zea mays*),

ข้าวบาร์เลย์ x ข้าวไรย์ (*Hordeum jubatum* x *Secale cereale*), และ ทริติกาเล (*Triticum aestivum* x *Secale cereale*) เป็นต้น นอกจากนี้แล้วยังใช้ในการขยายพันธุ์พืชที่หายาก เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของเมล็ดกล้วยป่า (*Musa bulbisiana*) ให้เกิดเป็นต้นได้ (Mantell et al., 1985) ในฟิลิปปินส์ de Guzman and del Rosario (1974) ทำการเพาะเลี้ยงคัพภะของมะพร้าวกะทิให้เป็นต้นได้สำเร็จ ซึ่งมะพร้าวกะทินี้มีราคาแพง และไม่สามารถเพาะให้งอกได้ในธรรมชาติ เพราะ Solid endosperm มีลักษณะอ่อนนุ่มและจะเน่าเสียในระยะเวลาอันสั้น ทำให้คัพภะไม่สามารถดูดซับอาหารมาใช้เลี้ยงต้นอ่อนได้จึงตายก่อนที่จะงอก

ใช้ในการสร้างเมล็ดเทียม (artificial seeds or somatic embryo genesis) โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาส (เซลล์พืชที่ถูกย่อยผนังเซลล์ออกหมดแล้ว) ในสารแขวนลอยแล้วกระตุ้นให้เซลล์ดังกล่าวกลายเป็น somatic embryoids ซึ่งมีลักษณะคล้ายคัพภะโดยใช้เอนไซม์หรือ heat shock หลังจากนั้นจึงผสมสูตรอาหารที่จำเป็นสำหรับพืชลงไปในภาชนะที่ใช้เลี้ยง เช่น sodium alginate เสร็จแล้วนำส่วนผสมทั้งหมดหยดลงใน calcium nitrate ก็จะได้เมล็ดพืชเทียมที่มีลักษณะเหมือนเม็ดสาคูโดยมี embryoid อยู่ข้างในและมี sodium alginate ทำหน้าที่เป็นเปลือกหุ้มเมล็ด ซึ่งในปัจจุบันได้ผลิตเมล็ดเทียมแบบนี้เป็นการค้าแล้ว โดยบริษัท Plant Genetic Incorporated ได้จดลิขสิทธิ์กรรมวิธีนี้ไว้แล้วสำหรับผลิตเมล็ดผักชีฝรั่งเป็นการค้า

ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์พืชที่เกิดความแปรปรวนระหว่างการขยายพันธุ์ในหลอดแก้ว (somaclonal variation) และการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำ (in vitro mutation breeding) ซึ่งในการทำ somaclonal propagation มีโอกาสเกิดความแปรปรวนของต้นพืชที่ได้ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากสารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเป็นตัวกระตุ้นทำให้สามารถคัดเลือกพันธุ์พืชใหม่ ๆ ขึ้นมาได้ นอกจากนี้แล้วยังอาจนำเนื้อเยื่อพืชไปฉายรังสีหรือแช่ในสารเคมีที่สามารถทำให้พืชเกิดการกลายพันธุ์ (mutant) เพื่อคัดเลือกยีโนไทป์ใหม่ ๆ ที่ไม่มีในธรรมชาติได้

ใช้ในการขยายพันธุ์พืชปลอดเชื้อโรค (pathogen-free plant propagation) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนยอด (meristem culture) ซึ่งพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนยอดนี้มักจะปลอดจากเชื้อโรคโดยเฉพาะไวรัส หรือถ้าไม่แน่ใจว่าปลอด

โรคก็อาจใช้ความร้อนทำลายเชื้อโรค (thermotherapy) หรือใช้สารเคมีทำลายเชื้อ (chemotherapy) บริเวณของพืชก่อนนำไปเพาะเลี้ยง วิธีการนี้นิยมทำในไม้ดอกไม้ประดับและมันฝรั่ง

ใช้ช่วยวินิจฉัยโรคระดับโมเลกุลหรือ DNA (molecular diagnosis) วิธีการนี้บางครั้งอาจเรียกว่า recombinant DNA probe หรือ nucleic acid spot hybridization (NASH) ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียและไวรัส (Baulcombe et al., 1984; Baulcombe and Fernandez-Northcote, 1988) เพราะตรวจหา strain ของไวรัสได้ ในขณะที่วิธี ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) ของ Clark and Adams (1977) ตรวจไม่ได้ และดีกว่าในกรณีที่แม้จะมีไวรัสอยู่บริเวณยอดอ่อนน้อยก็ยังตรวจพบ นอกจากนี้แล้วในขั้นตอนการเตรียมน้ำคั้น (crude sap) ของวิธี ELISA อาจเกิดการปนเปื้อนทำให้อ่านค่าผิดพลาดได้

ความรู้ทางด้าน virology และ serology ในปัจจุบันได้ทำให้เกิดแนวความคิวในการนำไปป้องกันโรคไวรัสในส้ม และโรคใบด่างของมะละกอ โดยการพยายามค้นหาสายพันธุ์ของไวรัสที่ไม่มีความรุนแรง (mild strain) เพื่อผลิตเป็นสารเหมือนวัคซีนสำหรับฉีดให้ต้นพืชสร้างภูมิต้านทานต่อเชื้อไวรัสชนิดรุนแรง (severe strain) ต้นพืชที่มีภูมิต้านทาน (pre-immunized plant) นี้สามารถขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณต่อไปได้

ใช้ในการหลอมรวมเซลล์หรือโปรโตพลาส (cell or protoplast fusion) วิธีนี้ทำได้โดยนำชิ้นส่วนของพืชไปย่อยด้วยเอ็นไซม์ เพื่อย่อยผนังเซลล์ของพืชให้เหลือเพียงโปรโตพลาสที่เมื่อผ่านการกรองและผ่านเครื่องเหวี่ยงในสารละลายที่เหมาะสม ก็สามารถแยกโปรโตพลาสบริสุทธิ์ออกมาได้ และนำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสมก็สามารถชักนำให้เป็นต้นพืชได้ วิธีการนี้มีประโยชน์มากในงานปรับปรุงพันธุ์พืช คือ ช่วยให้การผสมพันธุ์พืชข้ามชนิด (interspecific hybridization) และการผสมพันธุ์พืชข้ามสกุล (intergeneric hybridization) ประสบผลสำเร็จโดยนำโปรโตพลาสจากพืชคนละพันธุ์หรือคนละชนิดหรือคนละสกุลกัน มารวมกันโดยใช้สารเคมี PEG (polyethylene glycol) หรือใช้ไฟฟ้ากระตุ้นด้วยเครื่องรวมเซลล์ (somatic hybridizer) แล้วนำเซลล์ที่

รวมกันแล้วไปเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นต้นเล็ก ๆ ขึ้นได้ วิธีการนี้ทำได้สำเร็จในพืชมากมายหลายชนิดแล้ว เช่น มันเทศ มะเขือเทศ ข้าว มันฝรั่ง ยาสูบ ฯลฯ

การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานต่อสารเคมีควบคุมวัชพืช ต้านทานโรค ทนแล้ง ทนเค็ม ทนกรด ทนด่าง ฯลฯ ซึ่งประโยชน์อันนี้ได้มีการใช้ในพืชเศรษฐกิจต่าง ๆ มากมาย ทั้งข้าวและการปรับปรุงพันธุ์พืชไร่ให้ทนทานต่อดินเค็ม

ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม (crop improvement through genetic engineering) ซึ่งในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกได้ทำการค้นคว้าวิจัยอย่างกว้างขวางเพื่อหาทางดัดแปลงพันธุกรรมในเซลล์ (genetic manipulation or recombinant DNA technology or genetic engineering) วิธีการนี้เป็นเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูง นักวิจัยจะต้องมีความรู้และความเข้าใจอย่างลึกซึ้งในกระบวนการทางชีววิทยา ชีวเคมี และจุลชีววิทยา ขั้นตอนสำคัญ ๆ ในการทำพันธุวิศวกรรม (ปิยะศักดิ์, 2531) ได้แก่ การศึกษากลไกและการแสดงออกของยีนในลักษณะที่ต้องการจะปรับปรุง (characterization of traits) การแยก mRNA และ DNA หรือผลผลิตจาก DNA ของลักษณะที่ต้องการ (isolation of mRNA and DNA) การ clone ยีน (gene or DNA cloning) การย้ายยีน (gene transfer) การตรวจสอบและจำแนกเซลล์เจ้าบ้านที่มียีนที่ต้องการสอดแทรกอยู่ (identification of transformed recipients) เสถียรภาพในการเพิ่มจำนวนตัวเองของ DNA (stable rep;ication of DNA) การเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเป็นต้นพืช (plant regeneration) การแสดงออกของยีนในสภาพสิ่งมีชีวิต (gene expression in vivo) และการถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการไปสู่ลูกหลาน (trait transmission) ในปัจจุบันวิทยาการด้านนี้ยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก งานส่วนใหญ่อยู่ระหว่างการค้นคว้าวิจัยแต่ก็เป็นที่คาดหมายว่าเทคโนโลยีด้านนี้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมากมายในอนาคต

10.3 การเพาะเลี้ยงคัพภะ และการกำเนิดคัพภะ

(Embryo Culture and Embryogenesis)

การเพาะเลี้ยงคัพภะ (embryo culture) หมายถึงการนำคัพภะที่เกิดจากต้นพืชในสภาพธรรมชาติในถุงรังไข่ (embryo sac) มาเลี้ยงฝนอาหารสังเคราะห์ในสภาพที่ปลอดเชื้อ เพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นทั้งต้นโดยตรง หรือผ่านการเป็นแคลลัสเสียก่อน

การกำเนิดคัพภะ (embryogenesis) ในสภาพธรรมชาติหมายถึง กระบวนการพัฒนาของคัพภะที่เกิดขึ้นในต้นพืช ซึ่งเกิดได้ 2 ทางคือ

1. เกิดจากไข่ที่ได้รับการผสม (fertilized egg) แล้วเจริญเป็นไซโกต ก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นคัพภะที่เรียกว่า zygotic embryos และมีโครโมโซมที่เป็นดิพลอยด์ (2n)
2. จากไข่ที่ไม่ได้รับการผสม (unfertilized egg) หรือจากเซลล์เนื้อเยื่ออื่นๆ คัพภะในกรณีนี้มักเรียกว่า non-zygotic embryos ซึ่งส่วนใหญ่อาจเกิดได้ 3 รูปแบบคือ

- Parthenogenetic embryo หมายถึงคัพภะที่เกิดจากไข่ ที่ไม่ได้รับการผสม จึงมีโครโมโซมที่

เป็นแฮบพลอยด์

- Androgenetic embryo หมายถึงคัพภะ ที่พัฒนามาจากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ในพืชมีดอก หมายถึงจากละอองเกสรเพศผู้นั่นเอง ดังนั้นจึงมีโครโมโวมเป็นแฮบพลอยด์เช่นกัน
- Adventive embryo หมายถึง คัพภะที่เกิดมาจากเซลล์ร่างกาย เช่น เซลล์จากแผ่นใบและเซลล์แขวนลอยต่างๆ หรือเป็นเนื้อเยื่อเช่น nucellus และถุงรังไข่เป็นต้นในกรณีนี้คัพภะจะมีโครโมโซมเป็นดิพลอยด์

10.4 การกำเนิดคัพภะจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (In Vitro Embryogenesis)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถจำแนกชนิดของคัพภะได้จากเซลล์เนื้อเยื่อแรกเริ่มที่นำมาเลี้ยงดังต่อไปนี้

1. คัพภะที่ได้จากไข่ที่ได้รับการผสม ไข่ ที่ได้รับการผสมหรือไซโกตในระยะแรกที่เรียกว่า proembryo มีการแบ่งตัวที่ไม่เท่ากันได้เซลล์ 2 เซลล์คือ เซลล์ที่มีขนาดเล็กที่อยู่ด้านบน (apical cell) และเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าที่อยู่ด้านล่าง (basal cell) เซลล์ขนาด

เล็กที่อยู่ด้านบนเท่านั้นที่จะมีการพัฒนาต่อไปเป็นคัพภะ โดยมีการแบ่งตัวแบบไมโตซิส เพิ่มจำนวนเซลล์จนมีลักษณะเป็นก้อนกลม เรียกระยะนี้ว่า globular-shape stage จากนั้นกลุ่มเซลล์ที่อยู่ส่วนบนจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นรูปคล้ายหัวใจ (heart- shape) จนกระทั่งพัฒนาเต็มที่และมีรูปร่างเหมือนตอร์ปิโด (torpedo-shape)

2. คัพภะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัส เกิดจากการแบ่งเซลล์ของแคลลัสที่มีความพร้อมและเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็น adventive cells สังเกตได้จากการย้อมสีเซลล์พวกนี้จะติดสีดีกว่าเซลล์อื่นๆ มีไซโตพลาซึมและออร์กาเนลหนาแน่น และแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเกิดเป็นปุ่มก้อนที่ปูดยื่นออกมาในระยะ globular-shape stage ต่อไปจึงเจริญเต็มที่เรียกว่า somatic embryo, embryo-like structure, adventitious embryo หรือ vegetative embryo แต่ที่นิยมเรียกคือ adventive embryo หรือ embryoid

3. คัพภะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์แขวนลอย ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวที่ได้จากการย่อยเนื้อเยื่อพืชด้วยเอนไซม์ เช่น pectinase หรือจากเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการปั่นแยกแคลลัสแล้วเลี้ยงในอาหารเหลว เซลล์เหล่านี้มีการเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ และเปลี่ยนแปลงเป็นกลุ่มเซลล์ที่เกาะกันเป็นก้อน (cell aggregate) ซึ่งต่อไปจะพัฒนาเป็นก้อนกลม (globular-shape) เพื่อพัฒนาเป็นคัพภะที่เจริญเต็มที่

4. คัพภะที่ได้จากเซลล์ร่างกาย จากการศึกษาการกำเนิดคัพภะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวใบ ก้านใบ และลำต้นอ่อน พบว่าเซลล์เหล่านี้โดยเฉพาะ epidermal cells, palisade cells และ spongy cells มีลักษณะเป็นเซลล์เนื้อเยื่อเจริญที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว และมีการเปลี่แปลงพัฒนาเกิดเกิดกลุ่มเซลล์คล้าย globular-shape ซึ่งต่อไปจะพัฒนาเป็นคัพภะที่เจริญเต็มที่

10.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเพาะเลี้ยงคัพภะ

1. ชนิดชิ้นส่วนพืช (explants) พืชแต่ละชนิด แต่ละพันธุ์มีความยากง่ายในการเพาะเลี้ยงต่างกัน ชิ้นส่วนพืชที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ตาข้าง และใบอ่อน เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงเนื่องจากมีการเจริญเติบโตได้เร็ว

2. ธาตุอาหารในการเพาะเลี้ยง (nutrient medium) พืชแต่ละชนิด แต่ละพันธุ์หรือแม้

แต่ละชิ้นส่วนในพืชชนิดเดียวกัน มีความต้องการธาตุอาหารต่างกันทั้งในแง่ชนิดและปริมาณจึงจำเป็นต้องเลือกใช้สูตรอาหารให้เหมาะสม ซึ่งได้มีผู้คิดค้นสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงคัพภะหลายสูตร แต่ส่วนใหญ่ได้จากการดัดแปลงสูตรอาหารของ Murashige and Skoog (MS)(1962) โดยพิจารณาถึงบทบาทของธาตุอาหารบางชนิดที่มีความสำคัญในการชักนำให้เกิดคัพภะ เช่นธาตุโปแตสเซียมมีส่วนเสริมการกำเนิดคัพภะได้ดีขึ้น

3. สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) จากการศึกษาพบว่ามีสารบางชนิดที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดคัพภะเช่น ออกซินสังเคราะห์ 2,4-D ,Zeatin and succinic acid มีผลกระตุ้นหรือส่งเสริมการกำเนิดคัพภะ

4. ปัจจัยสภาพแวดล้อม (environmental factors)

4.1 แสงปกติต้องการความเข้มแสงต่ำ เพราะรังสีดวงอาทิตย์หรือแสงทำให้ออกซินสลายตัวได้ง่ายและไปยับยั้งการกำเนิดคัพภะ และในพืชบางชนิดก็ไม่ต้องการแสงเลย

4.2 อุณหภูมิ ปกติต้องการอุณหภูมิสูงกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออื่นๆ เล็กน้อย

4.3 ออกซิเจน คัพภะหรือเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นคัพภะ มีกิจกรรมภายในเซลล์ค่อนข้างสูงจึงต้องการออกซิเจนในปริมาณมาก เพื่อใช้ในกระบวนการหายใจเพื่อให้ได้พลังงานมาใช้

4.4 ความเป็นกรดและด่าง (pH) มีความผันแปรขึ้นกับชนิด และอายุระยะการพัฒนาของพืชที่จะนำชิ้นส่วนมาเลี้ยง

10.6 ขั้นตอนวิธีการในการเพาะเลี้ยงคัพภะ

1. การเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นเซลล์คัพภะ โดยตรง (Direct Embryogenesis) ทางตรงนั้นเกี่ยวข้องกับการสร้างคัพภะที่ไม่มีเพศ เกิดจากเซลล์เดี่ยวๆ หรือจากกลุ่มเซลล์ของชิ้นส่วนพืชโดยไม่ผ่านการพัฒนาเป็นแคลลัสพบได้ในตระกูลส้ม การกำเนิดคัพภะโดยตรงยังมีรายงานการเพาะเลี้ยงในอับเกสรและโปรโตพลาสของพืชบางชนิด

2. การเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดเป็นคัพภะ โดยทางอ้อม (Indirect Embryogenesis) การกำเนิดคัพภะทางอ้อมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช เพื่อสร้างเป็นแคลลัสจำนวนมากขึ้นก่อนกำเนิดเป็นโปรเอ็มบริโอ โดยปกติเกิดเมื่ออาหารที่ใช้มีความเข้มข้นของออกซินสูง

เช่นในกรณีที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.45-4.52 ไมโครโมลาร์ เมื่อย้ายแคลลัสไปไว้ในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม คัพภะเหล่านี้เจริญไปเป็นต้น

10.7 ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงคัพภะ

1. แก้ปัญหาในการไม่งอกของเมล็ดพืชบางชนิด ที่มีการเจริญและพัฒนาของคัพภะซึ่งได้รับการผสมแล้วมีอาหารสะสมในเมล็ดไม่เพียงพอ เช่น มะพร้าวกะทิ กล้วยไม้
2. ช่วยในการเจริญและพัฒนาของคัพภะ ที่ไม่ได้รับการผสม (parthenogenic embryo) ซึ่งในสภาพธรรมชาติแล้วคัพภะเหล่านี้มักจะสลายตัวไป
3. ลดการปนเปื้อนของเชื้อโรค คัพภะเป็นชิ้นส่วนหนึ่งที่มีความปลอดไวรัสสูง เพราะไม่มีเนื้อเยื่อท่อลำเลียงเชื่อมต่อกับอวัยวะส่วนอื่นๆ
4. สามารถขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว
5. ผลิตพืชที่มีจำนวนชุดโครโมโซมต่างๆ ทั้งที่เป็นแฮพลอยด์ (n) ดิพลอยด์ (2n) ทริพลอยด์ (3n) และพืชที่เป็นเตตราพลอยด์ (4n)
6. ย่นระยะในการปรับปรุงพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชยืนต้น ไม้ผล และพืชล้มลุกหลายชนิด ที่มีระยะการพัฒนาของคัพภะยาวนาน หรือเมล็ดที่สุกแก่แล้วมีการพักตัว
7. ใช้ในการช่วยชีวิตคัพภะลูกผสมชั่วที่ 1 (embryo rescue) ที่ได้จากการผสมข้ามชนิดหรือข้ามสกุล
8. การผลิตเมล็ดพืชเทียม หรือเมล็ดพืชสังเคราะห์ (artificial/systhetic seeds) เป็นเมล็ดพืช ที่ได้จากการนำเอาคัพภะที่เพาะเลี้ยงได้มาเคลือบหรือหุ้มด้วยสารประกอบบางชนิดที่เลียนแบบเอ็นโดสเปอร์ม

10.8 ปัญหาและข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงคัพภะ

1. มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ค่อนข้างสูง
2. ในพืชบางชนิด การชักนำให้มีการกำเนิดคัพภะทำได้ยาก
3. วิธีการและขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงค่อนข้างยุ่งยาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อน หรือการกู้ชีวิตคัพภะ
4. จำเป็นต้องมีการย้ายเนื้อเยื่อและเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้งทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อ

สูญเสียความพร้อมและความสามารถในการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงพัฒนาได้ง่าย

10.9 อุปกรณ์และสารเคมี

1. เมล็ดถั่วพุ่ม
2. ตู้ถ่ายเชื้อ
3. Hot oven
4. หม้อนึ่งความดันไอ
5. เครื่องชั่ง
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
7. เตาไฟฟ้า
8. ช้อนตักสารและแท่งแก้วคนสาร
9. ขวดรูปชมพู่
10. บีกเกอร์
11. กระบอกตวง
12. ขวดใส่อาหารและน้ำกลั่น
13. ปากคีบ
14. มีดผ่าตัด
15. จานเลี้ยงเชื้อ
16. ตะเกียงแอลกอฮอล์และไม้ขีดไฟ
17. กระดาษอลูมิเนียม (aluminum foil)
18. น้ำผงซักฟอก
19. แอลกอฮอล์
20. คลอรอกซ์ 15%
21. tween
22. อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง
23. sucrose 30 g
24. myo-inositol 100 mg

25. thiamine 1 mg

26. nicotinic acid 5 mg

27. pyridoxine 0.5 mg

28. glutamine 100 mg

29. agar 10 g

<u>หมายเหตุ</u> อุปกรณ์ในข้อ 9 - 16 ต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันก่อนนำเข้าตู้ถ่ายเชื้อ

10.9 การเพาะเลี้ยงราก (Root culture)

การทดลองเพาะเลี้ยงรากของพืชตระกูลถั่ว (Legume) และ ธัญพืช (Cereal) มีการศึกษามานาน แต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จ ผู้ที่สามารถเลี้ยงรากให้เจริญเติบโตได้สำเร็จ คือ White โดยการเพาะเลี้ยงรากของมะเขือเทศในอาหารที่มีเกลือแร่ น้ำตาลซูโครส และน้ำสกัดจากยีสต์ (yeat extract) ต่อมาสามารถเพาะเลี้ยงรากของพืชยาสูบได้หลายชนิด เช่น *Nicotiana langsdorfii* และ *N. tabaccum* รากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนั้นมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับรากของต้นพืช การเพาะเลี้ยงรากไว้เป็นเวลานานๆ นั้น White พบว่า รากบางอันเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม เช่นเมื่อเลี้ยงไว้เป็นเวลา 30 ปี รากของมะเขือเทศที่มีจำนวนโครโมโซม 2n เปลี่ยนเป็น 4n ความยากง่ายของการเพาะเลี้ยงรากของพืชในแต่ละชนิดไม่มีความแน่นอน

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงรากนั้นต้องใส่น้ำตาลซูโครสเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ถ้าเป็นรากของธัญญพืชอาจใช้กลูโคสแทนได้ ความเป็นกรดด่างที่มีความเหมาะสมสำหรับการเจริญของราก คือ 5.0-5.5 ส่วน pH 6.0-6.5 เหมาะสำหรับทำให้เกิดรากแขนงได้ดี ความเข้มของแสงในระดับต่ำๆ สามารถทำให้รากพืชบางชนิดเจริญได้ดี แต่ในรากของพืชบางชนิดอาจจะหยุดการเจริญเติบโตเมื่อได้รับแสง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรากคือ 25-27 ^{o}ซ

การนำเอารากของพืชที่ปลูกอยู่ในเรือนต้นไม้หรือในแปลงมาเพาะเลี้ยงนั้นค่อนข้างลำบากปัญหาที่สำคัญคือการทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรรีย์นั้นค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อรา และแบคทีเรียจะอาศัยอยู่ตามรอยแตกของราก หรืออาศัยอยู่ระหว่างเซลล์ การกำจัดเชื้อจุลินทรีย์จึงอาจทำให้เกิดความเสียหายแก่รากได้ การเพาะเลี้ยงรากจึง

ควรนำมาจากการเลี้ยงเมล็ดที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำเมล็ดมาฟอกฆ่าเชื้อแล้วนำไปเพาะในอาหาร วิธีการที่จะช่วยให้ปราศจากเชื้อได้ดีก็โดยการลอกเอาส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดออก การเพาะเลี้ยงเมล็ดในที่มืดจะช่วยให้เมล็ดมีการเจริญได้ดี

วิธีการศึกษา

1. เพาะเมล็ดถั่วพุ่มในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์

- นำเมล็ดถั่วพุ่มมาเพาะฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยน้ำยาคลอรอกซ์ 15 % เป็นเวลา 25 นาที
- ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละประมาณ 5 นาที เพื่อล้างคลอรอกซ์ออกให้หมด
- ใช้ช้อนหรือปากคีบ คีบเมล็ดไปเลี้ยงในขวดที่มีอาหารเตรียมไว้ 2-3 เมล็ดต่อหนึ่งขวด
- นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิ ประมาณ 27 °ซ

2 . ตัดรากเพาะในอาหารเหลวสังเคราะห์

โดยตัดเอาเฉพาะส่วนปลายสุดของรากยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใส่ลงไปในอาหารเหลวที่เตรียมไว้อาหารเหลวสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงรากให้เกิดเป็นแคลลัสเตรียมโดยใช้สูตร MS จากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยทำให้อาหารเหลวเคลื่อนที่ตลอดเวลาโดยใช้ shaker เพื่อที่จะให้ชิ้นเนื้อเยื่อได้รับออกซิเจน

10.11 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (Callus Culture)

การกระตุ้นให้เกิดแคลลัสและการเลี้ยงแคลลัส

แคลลัสประกอบด้วยกลุ่มของเซลล์พาเรงคิมาที่อยู่กันอย่างหลวมๆ และมีรูปร่างของเซลล์หลายแบบ แคลลัสจากการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อที่นำเอาไปเลี้ยงครั้งแรกตำแหน่งที่เกิดอาจเป็นบริเวณรอยแผลที่ปลายลำต้นหรือราก ส่วนใหญ่แคลลัสจะมัก

กล่าวถึงในพวก Angiosperms แต่ความจริงแล้ว แคลลัสเกิดได้ในพืชทุกพวก จิมโนสเปริม (Gymnosperms), เฟริน (Fern), มอส (Mosses), และ ลิเวอร์เวริ์ด (Liverworts)

เนื่องจากแคลลัสยังไม่มีการรวมกันเป็นอวัยวะ การเกิดแคลลัสบริเวณที่เป็นรอยแผลมีตัวกระตุ้นที่สำคัญคือ ออกซินและไซโตไคนินที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อ นอกจากนั้นแคลลัสอาจเกิดจากการรุกรานของเชื้อจุลินทรีย์เข้าไปในเนื้อเยื่อ หรือเกิดจากแมลงที่ดูดน้ำเลี้ยงเป็นอาหาร เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถกระตุ้นให้แคลลัสเกิดเป็นอวัยวะและเนื้อเยื่อจำนวนมาก การเกิดแคลลัสไม่จำเป็นต้องเป็นการตอบสนองในบริเวณที่เป็นแผล เนื้อเยื่อของพืชสามารถเลี้ยงให้เกิดเป็นแคคลัสได้ เช่น เนื้อเยื่อของแคมเบียมพาเรงคิมาที่สะสมอาหาร ใบเลี้ยง ชั้นมีโซฟิลล์ของใบ และเนื้อเยื่อที่จะเจริญเป็นเนื้อเยื่อลำเลียง ลักษณะการเจริญโดยทั่วไปของแคลลัส มีความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนระหว่างชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อ ส่วนประกอบของอาหาร และสิ่งแวดล้อม การเจริญของแคลลัสในพืชบางชนิดมีสารลิกนินสะสมมาก และผิวนอกค่อนข้างแข็ง ลักษณะของแคลลัสชนิดนี้เรียกว่า compact callus ส่วนแคลลัสบางชนิดอาจแยกออกจากกันได้ง่ายและอยู่กันอย่างหลวมๆ ลักษณะของแคลลัสชนิดนี้เรียกว่า friable callus สีของแคลลัสแตกต่างกันซึ่งอาจมีสีเหลือง ขาว เขียว การเกิดเม็ดสีอาจเกิดตลอดทั้งแคลลัสหรืออาจเกิดเฉพาะบางส่วนของแคลลัส ในแคลลัสจะเกิดกลุ่มเซลล์ที่แบ่งตัวเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่เรียกว่า meristemoids หรือ vascular nodule ซึ่งจะเป็นตำแหน่งหรือศูนย์กลางของการเกิด shoot apices, root primordia หรือ เริ่มเจริญเป็นคัพภะ

10.12 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและอวัยวะ

อวัยวะและเนื้อเยื่อของพืชประกอบด้วยเซลล์จำนวนมาก เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์จึงมีโอกาสที่จะเจริญเติบโตได้ ถ้าเป็นเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญ (meristems) โอกาสที่เนื้อเยื่อสามารถเจริญได้ก็มีมากกว่าเนื้อเยื่อถาวรปฐมภูมิ การนำอวัยวะหรือเนื้อเยื่อส่วนใดมาเลี้ยงก็ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ ความสะดวกและผลที่ควรจะได้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (Shoot tip culture) เนื้อเยื่อปลายยอดของพืชเป็นกลุ่มของเนื้อเยื่อเจริญ ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (apical

meristems) และจุดกำเนิดของใบ กลุ่มเนื้อเยื่อเหล่านี้มีเซลล์ที่อยู่กันแน่น รูปร่างค่อนข้างกลม ไม่มีช่องว่างระหว่างเซลล์ เซลล์สามารถแบ่งตัวได้เรื่อยๆ การนำเอาเนื้อเยื่อเจริญไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เรียกว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (meristem culture) หรือถ้านำเอาเฉพาะเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดไปเพาะเลี้ยงจึงเรียกว่า การเพาะเลี้ยงปลายยอด (apical bud culture) หรือถ้ามีจุดกำเนิดของใบติดมาด้วย เรียกว่า shoot tip culture หรือ shoot apex culture การนำเอาปลายยอดของพืชที่มีขนาดประมาณ 0.2-0.5 มม. ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดและจุดกำเนิดของใบ 1-4 ใบ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม สามารถเจริญและพัฒนาจนเกิดเป็นต้นและรากได้ อาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดอาจเป็นแบบง่ายๆ คือ ประกอบด้วยอนินทรีย์สารและน้ำตาล แต่ในพืชบางชนิดอาจต้องการวิตามินโดยเฉพาะอย่างยิ่งไทเอมีนและฮอร์โมนพืช (บุญยืน, 2539)

การเพาะเลี้ยงใบ (Leaf culture) ใบเป็นอวัยวะของพืชที่ประกอบด้วยแผ่นใบ (blade) และก้านใบ (petiole) การเจริญเติบโตของใบ ในระยะเริ่มแรกอยู่ใกล้กับยอด โดยมีจุดกำเนิดของใบเจริญและพัฒนามาเป็นใบ จุดกำเนิดของใบประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญสามารถแบ่งตัวได้จนถึงระยะหนึ่ง จากนั้นจึงมีการเปลี่ยนแปลง (differentiate) เป็นเนื้อเยื่อถาวรปฐมภูมิ แผ่นใบประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อของเอพิเดอร์มิส (epidermis) ทั้งทางด้านบนและด้านล่าง ส่วนระหว่างกลางเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อของมีโซฟิลล์ (mesophyll) ใบมีหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แสง การหายใจ และการคายน้ำ การนำเอาใบของพืชมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เรียกว่า การเพาะเลี้ยงใบ (leaf culture)

วิธีการเพาะเลี้ยงใบหรือเนื้อเยื่อจากใบ ใบของพืชแต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกัน ใบที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงและสามารถเจริญเติบโตได้มักเป็นใบที่ยังอ่อนอยู่ ประกอบด้วยเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ เนื้อเยื่อใบสามารถเจริญเติบโตเป็นแคลลัส หรือเจริญเติบโตเป็นหน่อขนาดเล็กตามบริเวณรอยตัดหรือบนผิวของใบ (บุญยืน, 2539)

ประวัติการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Rout, Samantaray, และ Das (1995) ศึกษา Somatic Embryogenesis และการชักนำให้เกิดต้นพืชจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Acacia catechu* ซึ่งเป็นไม้ยืนต้นที่จัด

อยู่ในวงศ์ถั่ว การชักนำให้เกิดต้นพืชใหม่ทำได้โดย Somatic Embryogenesis ที่ได้มาจากแคลลัสซึ่งเกิดจากใบเลี้ยงที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ของ *Acacia catechu* Willd. บนอาหารสูตร WPM (Woody Plant Medium) เติมไคเนติน 13.9 ไมโครโมลาร์ และ 2.7 ไมโครโมลาร์ 1-naphthaleneacetic acid และเพิ่ม L-proline 0.9-3.5 ไมโครโมลาร์ ในอาหารเพื่อเร่งการเจริญของ somatic embryo และ somatic embryo สามารถเจริญในขั้นต่อไปได้บนอาหารสูตร half-strength MS ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วน somatic embryo ที่เจริญเป็นต้นพืชแล้วจะนำไปปรับสภาพให้เคยชินกับอากาศในเรือนกระจก และจากนั้นจึงย้ายในปลูกในแปลงปลูก

Rout, Samantaray และ Das (1995) ทำการทดลองเพื่อที่จะชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงของ *Acacia catechu* ใบเลี้ยงต้องไม่มีส่วนของแกนเอ็มบริโอ สูตรอาหารที่ใช้คือ อาหารสูตร MS หรืออาหารเหลวสูตร WPM ที่ประกอบด้วยสารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และมีความเข้มข้นของ 2,4 dichlorophenoxyacetic acid อยู่ในช่วง 2.3-13.6 ไมโครโมลาร์, indole-3-acetic acid ช่วงความเข้มข้น 2.9-17.1 ไมโครโมลาร์, 1-naphthaleneacetic acid ช่วงความเข้มข้น 2.7-21.5 ไมโครโมลาร์ และ indole-3-butyric acid ช่วงความเข้มข้น 2.2-13.3 ไมโครโมลาร์ หรือไค-เนตินช่วงความเข้มข้น 2.3-18.6 ไมโครโมลาร์ และสูตรอาหารที่จะชักนำให้เกิด somatic embryo คือสูตร 1/2 MS ที่ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต แต่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

วิธีการศึกษา

ในปฏิบัติการทำการเพาะเมล็ดถั่วพุ่มบนอาหารแข็ง เมื่อถั่วงอกออกมาเป็นต้นกล้า ตัดส่วนของยอดอ่อน, hypocotyl, epicotyl, cotyledon และใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

1. Germination

การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดถั่วพุ่มทำได้ดังนี้คือ

1.1 ล้างเมล็ดถั่วพุ่มในน้ำผสมผงซักฟอก 2-3 ครั้ง

1.2 แช่เมล็ดถั่วในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนนี้ทำในตู้ถ่ายเชื้อ

1.3 ทำการฟอกเมล็ดถั่วใน clorox 15% ใส่ tween เล็กน้อย เป็นเวลา 25 นาที

1.4 ล้างเมล็ดถั่วด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

1.5 นำเมล็ดถั่วที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนอาหารแข็งสูตร Ms ที่เตรียมไว้ โดยวางเมล็ดถั่วจำนวน 3 เมล็ดต่ออาหารเลี้ยง 1 ขวด

2. การเพาะเลี้ยงแคลลัสจากอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าถั่วพุ่ม

วิธีการศึกษา

1. เตรียมอาหารสูตรแข็ง MS

2. นำต้นกล้าถั่วพุ่มออกมาวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3. นำมีดผ่าตัดลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อทิ้งไว้ให้เย็น แล้วตัดต้นกล้าออกเป็นส่วนๆ ดังนี้คือ ปลายยอดยาวประมาณ 0.5 ซม. ตัดเอาใบออก, hypocotyl ยาว 0.5 ซม., epicotyl ยาว 0.5 ซม., ใบตัดให้ได้ขนาด 0.5x0.5 ซม. และ ใบเลี้ยงตัดให้ได้ขนาด 0.5x0.5 ซม.

4.นำชิ้นส่วนพืชที่ตัดตามขนาดที่ต้องการแล้วไปเลี้ยงในขวดอาหารสูตร Ms ที่ได้เตรียมไว้แล้ว โดยทำการแยกอวัยวะส่วนต่างๆ ออกจากกัน วางชิ้นตัวอย่างขวดละ 3 ชิ้น

5.ปิดปากขวด แล้วติดฉลากชื่อชนิดพืช อวัยวะที่เพาะเลี้ยง สูตรอาหาร และวันที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยกระดาษ label

6. นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยง แล้วคอยติดตามผล

7. จดบันทึกผล ถ่ายภาพ

10.14 บทสรุป

เทคโนโลยีชีวภาพได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้และประสบความสำเร็จอย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการแพทย์ วิศวกรรมการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม การเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร โยเฉพาะด้านการผลิตอาหารและเครื่องดื่มชนิดต่าง ๆ กล่าวเฉพาะทางด้านพืชนั้น เทคโนโลยีชีวภาพได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้มีผลผลิตและคุณภาพตรงตามความต้องการของมนุษย์ ตลอดจนการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ต้านทานต่อโรค แมลง และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลปกำลังค้นคว้าวิจัยกันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน นับได้ว่าเทคโนโลยีชีวภาพเป็นศาสตร์แขนงหนึ่ง ซึ่งช่วยแก้ปัญหาของมวลมนุษยชาติในเรื่องของการขาดแคลนอาหาร พลังงานและช่วยอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมได้อย่างเหมาะสม อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีนี้มีหลายระดับซึ่งเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช นับเป็นความรู้ขั้นพื้นฐานในการที่จะนำเทคโนโลยีขั้นสูงมาประยุกต์ใช้ต่อไปได้

แบบประเมินผลท้ายบท

จงเลือกคำตอบที่ถูกที่สุดข้อเดียว

1. การใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่เก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชไว้ในหลอดแก้วเรียกว่าอะไร ?
   1) in vitro germplasm 2) Field gene bank
   3) in vivo germplasm 4) ถูกทุกข้อ
2. การเก็บรักษาเนื้อเยื่อในสภาพที่อุณหภูมิเย็นจัดนิยมใช้ร่วมกับสารใด ?
   1) Alcohol 2) Nitrous
   3) Liquid nitrogen 4) Liquid hydrogen
3. อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับรักษาเนื้อเยื่อพืชในสภาพที่เย็นจัดคือเท่าใด ?
   1) - 100 ^{o} C 2) – 196 ^{o} C
   3) - 200 ^{o} C 4) – 216 ^{o} C
4. การแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพต้นอ่อนนิยมนำมาใช้กับพืชชนิดใด ?
   1) มะพร้าว 2) อ้อย
   3) มันชนิดต่าง ๆ 4) ถูกทุกข้อ
5. การประหยัดค่าขนส่งในการเดินทางควรเลือกใช้วิธีใดในการอนุรักษ์พืช ?
   1) in vitro plant germplasm exchange
   2) in vivo germplasm
   3) field gene bank
   4) ถูกทุกข้อ
6. เนื้อเยื่อหรือต้นอ่อนของพืชที่ไม่มีการเจริญเติบโตระหว่างการเก็บรักษาคือวิธีใด ?

1) cryopreservation 2) anther culture

3) tissue culture 4) ถูกทุกข้อ

7. วิธีการใดคือการปรับปรุงพืชในสภาพหลอดแก้ว ?

1) in vitro germplasm 2) field gene bank

3) in vivo germplasm 4) anther culture

8. การผลิตเมล็ดเทียมนั้นนิยมใช้การเพาะเลี้ยงจากส่วนใดของพืช ?

1) เนื้อเยื่อพืช 2) โพรโตพลาสต์

3) ละอองเรณู 4) ออวุล

9. สารชนิดใดที่นิยมนำมาใช้ผลิตเมล็ดเทียม ?

1) calcium nitrate 2) sodium alginate

3) nitrogen 4) ถูกเฉพาะข้อ 1 และ 2

10. การสร้างเมล็ดเทียมต้องกระตุ้นให้เซลล์พืชเจริญเป็นส่วนใดก่อน ?

1) root 2) embryos

3) somatic embryos 4) leaves

เฉลยแบบประเมินผลท้ายบท

1. 1)	2. 3)	3. 2)	4. 4)	5. 1)
6. 1)	7. 4)	8. 2)	9. 4)	10. 3)

****