บทที่ 12
12. การขยายพันธุ์พืชโดยใช้ระบบปราศจากเชื้อ (Aseptic method of micropropagation)

การที่เนื้อเยื่อเล็ก ๆ ที่แยกออกจากส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เจริญเติบโตขึ้นต่อไปได้เรื่อย ๆ และสามารถจะสร้างส่วนของรากและลำต้นจนกลายเป็นพืชต้นใหม่ขึ้นมาได้นั้น ต้องใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นแบบพิเศษ คือ จะต้องทำในที่ ๆ ปราศจากเชื้อโรค เรียกว่า Aseptic method of micropropagation วิธีการนี้ได้ทำขึ้นตั้งแต่ ค.ศ. 1902 ในประเทศเยอรมันนี และต่อมาได้ทดลองทำกันในหลายประเทศ ทำสำเร็จในพืชหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดก็จำเป็นต้องใช้วิธีการและเทคนิคที่แตกต่างกันออกไป

การขยายพันธุ์แบบนี้สามารถนำไปใช้ได้ทั้งการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจะเอาเนื้อเยื่อส่วนใดมาทำการเพาะเลี้ยง

การใช้เทคนิคของ micropropagation มาทำการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้น โดยการนำเอาต้นอ่อน (embryo) ในการเติบโตระยะใดระยะหนึ่งมาเลี้ยงในวุ้นอาหารให้เจริญเติบโตเป็นต้นกล้าได้ ในกรณีนี้ทำให้พืชที่เป็นลูกผสมระหว่าง species หรือ genus (Interspecific hybrid or intergenmic hybrid) ซึ่งพืชพวกนี้มักมีเมล็ดที่สร้างต้นอ่อนไม่ได้สมบูรณ์ (aborted embryo) เนื่องจากเมล็ดขาดอาหารสะสมที่จะนำมาเลี้ยงต้นอ่อน ตัวอย่างที่ทำกันเช่นในเมล็ดกล้วยไม้หลายชนิด เป็นการเพาะฝักอ่อน หรือฝักแก่

สำหรับเทคนิคที่นำมาใช้ในการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้น ก็โดยการใช้เนื้อเยื่อของพืชส่วนต่าง ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยง เช่น เนื้อเยื่อของราก ยอดอ่อน ใบ กิ่ง เป็นต้น

12.1 ปัจจัยที่จำเป็นในการขยายพันธุ์แบบปราศจากเชื้อ

เนื่องจากการขยายพันธุ์แบบนี้ มีเทคนิคและวิธีที่พิเศษออกไปจากแบบอื่น ดังที่ได้กล่าวแล้ว จึงจำเป็นต้องทราบถึงสภาพและเครื่องมือที่ใช้ในการทำงาน

1. Asepsis คือสภาพที่ปราศจากเชื้อโรค ทุกอย่างที่เกี่ยวข้องกับการขยายพันธุ์แบบนี้ต้องปราศจากเชื้อ (aseptic condition) เนื่องจากการทำงานต้องใช้อาหารวุ้นนำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อที่จะขยายและอาหารก็เป็นอาหารที่ดีในการเจริญเติบโตของเชื้อต่าง ๆ ดังนั้นไม่ว่าเครื่องมือที่ใช้เนื้อเยื่อที่จะทำการขยายพันธุ์จะต้องปราศจากเชื้อ

2. ห้องที่ใช้ทำงาน จะต้องเป็นห้องที่สะอาดปราศจากฝุ่นละออง และต้องไม่พลุกพล่านอันจะเป็นทางนำเอาสปอร์ของเชื้อโรคเข้ามา ในห้องจะติดหลอดอุลตราไวโอเรต เปิดไว้ในระหว่างที่ไม่ได้ทำงานทั้งนี้เพื่อการฆ่าเชื้อ นอกจากนี้ในห้องยังต้องมีตู้ (chamber) ที่จะใช้ทำงานในตู้ต้องมีอุปกรณ์ในการฆ่าเชื้อ เช่น คลอรอกซ์ แอลกอฮอร์ ตะเกียง หลอดแสงอุลตราไวโอเลตและระบบกรองอากาศเข้าตู้แบบ micro-filter เป็นตัวพัดเป่าไล่อากาศออกจากตู้ตลอดเวลา

3. เครื่องมือและภาชนะ เช่น ปากคีบ เข็ม มีด ต้องจุ่มลงในแอลกอฮอร์ แล้วรนไฟแล้วทำให้เย็นก่อน ใช้จุกและจานรอง ควรต้องเข้าอบในเตาที่ 120°ซ ก่อนทุกครั้ง

4. อาหาร (Media) หรือเครื่องปลูกที่จะเป็นวัตถุที่ใช้เพาะหรือเลี้ยงต้องประกอบไปด้วยสิ่งต่อไปนี้

1. Inorganic element เป็นแร่ธาตุสำหรับทุกพืชที่ต้องการ คือ N P K Ca Mg S และ micro element โดยใช้แหล่งที่มา ดังนี้

1.1 แหล่งที่มาของแร่ธาตุหลัก คือ

KNO_3

$Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$

$NaNO_3$

NH_4NO_3

$(NH_4)_2SO_4$

KH_2PO_4

$NaH_2PO_4.H_2O$

$FePO_4.4H_2O$

Na_2SO_4

$MgSO_4.7H_2O$

KCl

$CaCl_2.2H_2O$

1.2 แหล่งที่มาของแร่ธาตุรอง

$MnSO_4.4H_2O$

H_3BO_4

$H_3BO_3.7H_2O$

$CuSO_4.5H_2O$

$(NH_4)_2MoO_4$

2. น้ำตาล เป็นแหล่งพลังงานใช้ได้ทั้งกลูโคสและซูโครส

3. ไวตามินและสารอื่น ๆ เช่น ไฮอะมีน นิโคตินิค แอซิด และ ไพริดอกซีน

4. สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น ออกซิน ไซโตไคนิน ตัวอย่างคือ NAA, 2,4-D หรือ ไคนิติน

5. สารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ เช่น น้ำมะพร้าว น้ำต้มมันฝรั่ง อมิโนแอซิด

6. วุ้น ใส่เพื่อให้อาหารนั้นแข็งตัว

12.2 วิธีการสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประเภทต่าง ๆ ของพืช

1. **การเพาะเลี้ยงต้นอ่อน (Embryo culture)** หากในพืชที่ไม่สามารถผลิตต้นอ่อนในเมล็ดจนโตสมบูรณ์ได้ วิธีการนี้จะช่วยให้พืชนั้นขยายพันธุ์โดยเมล็ดสำเร็จ คือ นำเอาต้นอ่อนออกจากเมล็ด ในขณะที่เมล็ดนั้นยังอ่อน มักทำในพืชที่เป็นลูกผสมระหว่าง genus หรือลูกผสมระหว่าง species นำต้นอ่อนเลี้ยงในอาหาร โดยใช้เทคนิคของการปราศจากเชื้อโรค นอกจากนี้วิธีนี้ยังมีผลสำหรับเมล็ดพืชที่มีการพักตัวของต้นอ่อนนาน ทำการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนในพืชตระกูล Orchidaceae และ Rosaceae มาก

ในการทดลองพบว่าหากต้นอ่อนอยู่ในระยะเล็กหรือเริ่มพัฒนาจากใหม่ ๆ ทำสำเร็จได้ยาก ยิ่งพัฒนาขึ้นระยะสูงหรือใกล้ จะแก่เท่าใดก็ยิ่งทำได้ง่ายขึ้น หากต้นอ่อนอ่อนเกินไปต้องใช้อาหารที่มีส่วนผสมหลายอย่าง หากต้นอ่อนมีระยะที่เริ่มแก่ วุ้นอาหารนั้นสูตรธรรมดาก็ใช้ได้อาจไม่ต้องใส่น้ำตาล

วิธีการสะกัดเอาต้นอ่อนออกจากเมล็ดโดยปราศจากเชื้อ

มีวิธีการสะกัดเอาต้นอ่อนออกจากผล 2 วิธีคือ

1. ทำความสะอาดผลด้วยยาฆ่าเชื้อ เช่น คาร์โบลิก แอซิด 5% เป็นเวลา 5 นาที หรืออาจใช้แอลกอฮอร์ หรือ โซเดียม ไฮโปคลอไรด์ หลังจากนั้นตัดผลแคะเอาเมล็ดออกมา อาจใช้มีด

ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เอาปากคีบ ๆ ออกมา แล้วจึงผ่าเมล็ดแล้วนำเอาต้นอ่อนในเมล็ดออกมาใส่ลงในอาหาร การทำต้องทำในตู้ (chamber)

2. ผ่าผลเอาเมล็ดออกมาแล้วแช่ในแคลเซียมไฮโปคลอไรด์ 5-20 นาที เขย่านาน ๆ ครั้ง แล้วเอาขึ้นปลูกในอาหาร วิธีนี้ใช้สำหรับพวกที่มีเมล็ดเล็ก ๆ

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture) หมายถึงการนำเอาเนื้อเยื่อส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชมาเลี้ยงในอาหารให้เนื้อเยื่อนั้นเจริญกลายเป็นกลุ่มของเซลล์มาก ๆ (callus) ซึ่งเป็นพวกพาเรนไคม่าเซลล์ เซลล์เหล่านี้แบ่งตัวเร็วมาก ตราบใดที่มีอาหารพอ เซลล์เหล่านี้จะแบ่งตัวไปเรื่อย ๆ ต่อมากลุ่มของเซลล์นี้จะเจริญเป็นต้นโดยที่มีการเจริญเหมือนเจริญจาก zygot มาเป็น embryo ดังนั้น จึงเรียกกลุ่มเซลล์ที่จะเจริญเป็นต้นอ่อนว่า embryoid วิธีนี้เป็นการขยายพันธุ์พืชแบบ clonal propagation จะต้องทำในสภาพที่ปราศจากเชื้อตลอดเวลา ในบางครั้งพบว่าจะได้ต้นอ่อนที่เป็น Polyploidy และข้อดีคือ ต้นอ่อนที่ได้จะเป็นพืชที่แข็งแรงปราศจากเชื้อโรคและไวรัส การที่ได้ polyploid ของต้นใหม่ เช่น tetraploid (4N) จะทำให้พืชต้นดังกล่าวแก่ช้าออกดอกออกผลช้า ต้นหนา ใบใหญ่หนา ดอกทน ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นการสร้างพันธุ์ใหม่จากการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม

12.3 เทคนิคในการทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เนื้อเยื่อของพืชที่จะนำมาเลี้ยงให้ประสบผลสำเร็จนั้น มักจะต้องนำมาจากส่วนที่กำลังมีการเจริญเติบโต มีประสิทธิภาพในการแบ่งเซลล์มาก เช่น บริเวณมัดท่อน้ำท่ออาหารของรากหรือลำต้น ปลายยอด ปลายราก หรือบริเวณข้อ ปล้อง นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารสะสม ละอองเกษร นั้น สามารถนำมาเลี้ยงให้เจริญขึ้นได้ไม่ว่าจะเลือกเอาส่วนใดของเนื้อเยื่อมา สิ่งที่สำคัญคือ จะต้องนำเนื้อเยื่อส่วนนั้นไปล้างให้ปราศจากเชื้อโรค แล้วจึงนำเนื้อเยื่อนั้นใส่ในวุ้นอาหารหรืออาหารเหลว

ต่อไปนี้เป็นตัวอย่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ

1. รากสดของแครอท โดยใช้เนื้อเยื่อบริเวณ cork แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

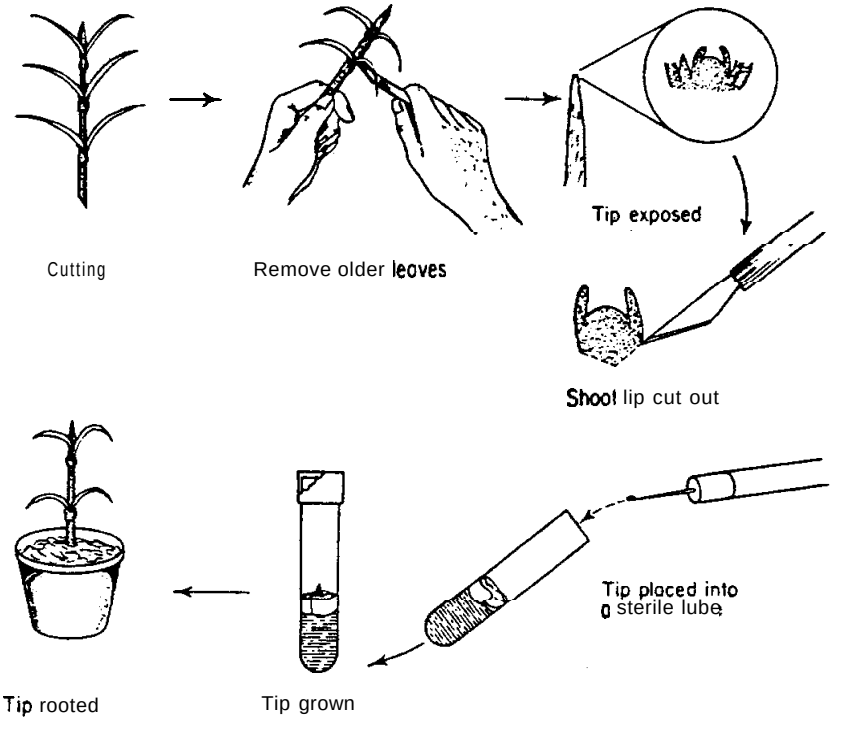
2. เนื้อเยื่อลำต้นของยาสูบ โดยตัดลำต้นยาว 15 ซม. เอาใบออกเช็ดล้างด้วยแอลกอฮอร์ 95% แล้วตัดท่อนละ 5 ซม. แล้วจึงตัดเฉพาะเนื้อส่วนในของลำต้นเลี้ยงในอาหาร

3. ลำต้นอ่อนของพืชยืนต้น โดยการตัดเป็นท่อน ๆ ยาว 10-15 ม.ม. แช่ฆ่าเชื้อโรคในคลอรอกซ์ ในอัตราส่วนกับน้ำ 1 : 9 นาน 15-20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วตัดหัวท้ายทิ้งไป นำส่วนที่เหลือมาตัดเป็นช่วงสั้น ๆ แล้วใส่ลงในวุ้นอาหาร

4. Bark หรือบริเวณเยื่อเจริญของแคมเบียมของพืชยืนต้น นำกิ่งแก่มาล้างด้วยแอลกอฮอล์เสียก่อนแล้วจึงสะกัดเนื้อเยื่อส่วนที่ต้องการใส่ในอาหาร

5. ต้นอ่อนที่กำลังเจริญเติบโต เมล็ดที่กำลังงอกหรือยอดอ่อน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหล่านี้ต้องใช้อาหารที่มีสูตรดัดแปลงต่าง ๆ เช่น เพิ่มหรือน้ำมะพร้าวและออกซิเจน เนื้อเยื่อจะเจริญได้แม้ในที่มืด แต่ขณะที่เนื้อเยื่อนั้นจะเปลี่ยน (differentiation) เป็นต้น ต้องการแสงอุณหภูมิที่เหมาะสม สำหรับการเจริญ คือ 25°ซ หากต้องการต้นจำนวนมาก ทิ้งให้ callus เพิ่มจำนวนมากต้องคอยเปลี่ยนอาหาร (transflask) บ่อย ๆ

การเพาะเลี้ยงเยื่อเจริญ (Shoot tip or meristem Culture) จุดมุ่งหมายเพื่อให้ได้พืชต้นใหม่ที่ปราศจากเชื้อโรคเป็นการเพิ่มจำนวนอย่างมีประสิทธิภาพในพืชหลายชนิด เช่น คาร์เนชั่น เบ็ญจมาศ มันฝรั่ง สตรอเบอรี่ รักเร่ แกลดิโอลส และกล้วยไม้



รูปที่ 73 ขั้นตอนของการทำ shoot-tip culture ของคาร์เนชั่น

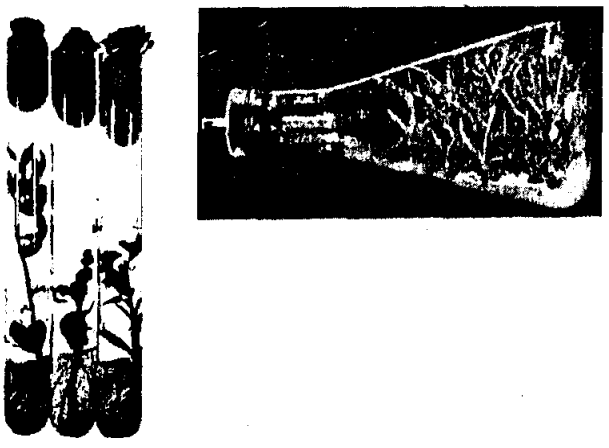
วิธีการโดยการตัดหน่อหรือต้นอ่อนที่กำลังเจริญเติบโต ลอกใบที่อยู่ภายนอกทิ้งไปแล้วแช่หน่อในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ และนำมาลอกจนกระทั่งยอดอ่อนบริเวณเยื่อเจริญพันออกมา จึงตัดเยื่อเจริญบริเวณนั้นเป็นชิ้นเล็กขนาด 2-3 มม. ใส่ลงในอาหาร เพื่อให้เนื้อเยื่อเจริญได้ แคลลัส เป็นจำนวนมากแล้ว จึงย้ายใส่ในอาหารที่มีออกซิเจนมาก เพื่อเร่งให้พัฒนาราก ต่อมาเมื่อจะให้พัฒนาเป็นต้นก็ย้ายมาใส่ในอาหารที่มีไซโตไคนินสูง เมื่อได้รากและต้นสมบูรณ์แล้วก็ย้ายลงปลูกในดินได้

ในขวดหรือภาชนะอาหารที่เลี้ยงเนื้อเยื่อต้องนำไปไว้ในห้องที่อุณหภูมิประมาณ 25°ซ และมีแสงสว่างเทียมจากหลอด ห้ามนำไปรับแสงแดดโดยตรงและห้ามนำไปไว้ในที่อุณหภูมิสูง

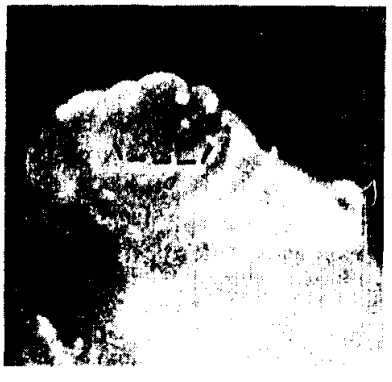
12.4 การพัฒนาให้เกิดรากและลำต้นจากแคลลัส

การขยายพันธุ์แบบนี้ จะได้จำนวนต้นพืชมากในเวลาจำกัด ก็ต่อเมื่อเนื้อเยื่อนั้นสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้รวดเร็ว และแคลลัสนั้นเติบโตเพิ่มขนาดออกไปอย่างรวดเร็วด้วย ระยะที่เนื้อเยื่อเจริญ เป็นแคลลัสนี้เรียกว่า proiferation จากนั้นเมื่อเพียงพอแล้วแคลลัสนั้นจะต้องมีความสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อน (embryoid) จำนวนมากคือ พัฒนา (differentiation) เป็นรากและลำต้น การขยายพันธุ์แบบนี้จึงจะมีประสิทธิภาพสมบูรณ์ ในการที่แคลลัสพัฒนาเป็นรากและต้นนั้น ความสมดุลย์ของออกซินและไคนิตินมีผลต่อแคลลัสมาก แคลลัสควรพัฒนาให้เกิดรากก่อนลำต้น อาหารควรมี IAA สูง เมื่อเกิดราก รากจะดูดอาหารต่อมาควรพัฒนาให้เกิดต้นในระยะนี้ควรอยู่ในอาหารที่มีไคนิติน หรืออดินีนสูง ส่วนระดับเท่าใดจะเหมาะสมนั้นต้องทดลองในแต่ละพืช

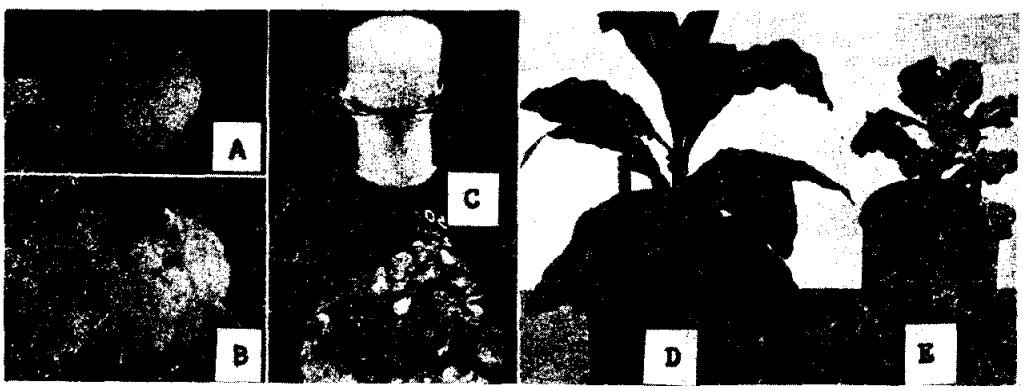
มีพืชหลายชนิดที่ไม่สามารถทำจำนวนได้มากจากการขยายพันธุ์วิธีนี้เพราะ proliferation มีน้อย และก็มีบางพืชที่มี proliferation ดีแต่ไม่มี differentiation อย่างไรก็ดี แม้ว่าจะผลิตได้จำนวนไม่มาก แต่หากทำสำเร็จก็สามารถสร้างสายพันธุ์พืชที่ปราศจากเชื้อโรคได้



รูปที่ 74 แสดงให้เห็นต้นอ่อนของพืชที่เจริญในวุ้นอาหารในขวดอยู่ในสภาพปลอดเชื้อโรค



รูปที่ 75 ยอดอ่อนของคาร์เนชั่นที่ลอกเอาใบออกหมด จะพบเยื่อเจริญที่ตายอดและตาข้าง ซึ่งสามารถตัดไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ (บริเวณเส้นลาย)



รูปที่ 76 ขั้นตอนในการพัฒนาของต้นยาสูบที่เจริญมาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว

A. แคลลัสที่เจริญมาจากหนึ่งเซลล์ในวุ้นอาหาร

B. แคลลัสที่อยู่ในวุ้นอาหารที่มี IAA ปริมาณสูงและมี kinetin ปริมาณน้อยซึ่งจะทำให้เกิดราก

C. แคลลัสที่มีรากแล้วย้ายมาอยู่ในวุ้นอาหารที่มี IAA ต่ำ มี kinetin สูง จะทำให้เกิดใบและยอด

D. ต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เป็น 4 N

E. ต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เป็น 2 N