

ปฏิบัติการบทที่ 3

การเพาะเลี้ยงคัพภะและการกำเนิดคัพภะ

บทนำ

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

การกำเนิดคัพภะ (embryogenesis) ในสภาพธรรมชาติหมายถึงกระบวนการพัฒนาของคัพภะที่เกิดขึ้นในต้นพืช ซึ่งเกิดได้ 2 แนวทางคือ

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 จึงมีโครโมโซมที่เป็นแฮปพลอยด์
 - Androgenetic embryo หมายถึงคัพภะที่พัฒนามาจากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ในพืชมีดอก หมายถึงจากละอองเกสรเพศผู้นั่นเอง ดังนั้นจึงมีโครโมโซมเป็นแฮปพลอยด์เช่นกัน
 - Adventive embryo หมายถึงคัพภะที่เกิดมาจากเซลล์ร่างกาย เช่น เซลล์จากแผ่นใบและเซลล์แขนงลอยต่างๆ หรือเป็นเนื้อเยื่อเช่น nucellus และถุงรังไข่เป็นต้น ในกรณีนี้คัพภะจะมีโครโมโซมเป็นดิพลอยด์

การกำเนิดคัพภะจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (In Vitro Embryogenesis)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถจำแนกชนิดของคัพภะได้จากเซลล์เนื้อเยื่อแรกเริ่มที่นำมาเลี้ยงดังต่อไปนี้

1. คัพภะที่ได้จากไข่ที่ได้รับการผสม ไข่ที่ได้รับการผสมหรือไซโกตในระยะแรกๆ เรียกว่า proembryo มีการแบ่งตัวที่ไม่เท่ากันได้เซลล์ 2 เซลล์คือ เซลล์ที่มีขนาดเล็กที่อยู่ด้านบน (apical cell) และเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าที่อยู่ด้านล่าง (basal cell) เซลล์ขนาดเล็กที่อยู่ด้านบนเท่านั้นที่จะมีการพัฒนาต่อไปเป็นคัพภะ โดยมีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส เพิ่มจำนวนเซลล์จนมีลักษณะเป็นก้อนกลม เรียกระยะนี้ว่า globular-shape stage จากนั้นกลุ่มเซลล์ที่อยู่ส่วนบนจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นรูปคล้ายหัวใจ (heart-shape) จนกระทั่งพัฒนาเต็มที่และมีรูปร่างเหมือนตอร์ปิโด (torpedo-shape)

2. คัพภะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัส ที่เกิดจากการแบ่งเซลล์ของแคลลัส ที่มีความพร้อมและเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็น adventive cells สังเกตได้จากการย้อมสีเซลล์พวกนี้จะติดสีดีกว่าเซลล์อื่นๆ มีไซโทพลาซึมและออร์แกเนลหนาแน่น และแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเกิดเป็นปุ่มก่อนที่ปูดยื่นออกมาในระยะ 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 จากการศึกษาการกำเนิดคัพภะ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวใบ ก้านใบ และลำต้นอ่อน พบว่าเซลล์เหล่านี้โดยเฉพาะ epidermal cells, palisade cells และ spongy cells มีลักษณะเป็นเซลล์เนื้อเยื่อเจริญที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว และมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเกิดเกิดกลุ่มเซลล์คล้าย globular-shape ซึ่งต่อไปจะพัฒนาเป็นคัพภะที่เจริญเต็มที่

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเพาะเลี้ยงคัพภะ

1. ชนิดชิ้นส่วนพืช (explants) พืชแต่ละชนิดแต่ละพันธุ์มีความยากง่าย ในการเพาะเลี้ยงต่างกัน ชิ้นส่วนพืชที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ตาข้าง และใบอ่อน เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงเนื่องจากการเจริญเติบโตได้เร็ว

2. ธาตุอาหารในการเพาะเลี้ยง (nutrient medium) พืชแต่ละชนิด แต่ละพันธุ์หรือแม้แต่ละชิ้นส่วนในพืชชนิดเดียวกัน มีความต้องการธาตุอาหารต่างกันทั้งในแง่ชนิดและปริมาณจึงจำเป็นต้องเลือกใช้สูตรอาหารให้เหมาะสม ซึ่งได้มีผู้คิดค้นสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงคัพภะหลายสูตร แต่ส่วนใหญ่ได้จากการดัดแปลงสูตรอาหารของ Murashige and Skoog (MS)(1962) โดยพิจารณาถึงบทบาทของธาตุอาหารบางชนิดที่มีความสำคัญในการชักนำให้เกิดคัพภะ เช่นธาตุโปแตสเซียมมีส่วนเสริมการกำเนิดคัพภะได้ดีขึ้น

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

ปัจจัยสภาพแวดล้อม (environmental factors)

1.1 แสงปกติต้องการความเข้มแสงต่ำ เพราะรังสีดวงอาทิตย์หรือแสงทำให้ออกซินสลายตัวได้ง่ายและไปยับยั้งการกำเนิดคัพภะ และในพืชบางชนิดก็ไม่ต้องแสงเลย

1.2 อุณหภูมิ ปกติต้องการอุณหภูมิสูงกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออื่นๆ เล็กน้อย

1.3 ออกซิเจน คัพภะหรือเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นคัพภะมีกิจกรรมภายในเซลล์ค่อนข้างสูงจึงต้องการออกซิเจนในปริมาณมาก เพื่อใช้ในกระบวนการหายใจเพื่อให้ได้พลังงานมาใช้

1.4 ความเป็นกรดและด่าง (pH) มีความผันแปรขึ้นกับชนิดและอายุ ระยะการพัฒนาของพืชที่จะนำชิ้นส่วนมาเลี้ยง

ขั้นตอนวิธีการในการเพาะเลี้ยงคัพภะ

1. การเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นเซลล์คัพภะโดยตรง (Direct Embryogenesis) ทางตรงนั้นเกี่ยวข้องกับการสร้างคัพภะที่ไม่มีเพศ เกิดจากเซลล์เดี่ยวๆ หรือจากกลุ่มเซลล์ของชิ้นส่วนพืชโดยไม่ผ่านการพัฒนาเป็นแคลลัสพบได้ในตระกูลส้ม การกำเนิดคัพภะโดยตรงยังมีรายงานการเพาะเลี้ยงในอับเกสรและโปรโตพลาสของพืชบางชนิด

2. การเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดเป็นคัพภะโดยทางอ้อม (Indirect Embryogenesis) การกำเนิดคัพภะทางอ้อมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช เพื่อสร้างเป็นแคลลัสจำนวนมาก ขึ้นก่อนกำเนิดเป็นโปรเอ็มบริโอ โดยปกติเกิดเมื่ออาหารที่ใช้มีความเข้มข้นของออกซินสูง เช่นในกรณีที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.45-4.52 ไมโครโมลาร์ เมื่อย้ายแคลลัสไปไว้ในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม คัพภะเหล่านี้เจริญไปเป็นต้น

ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงคัพภะ

1. แก้ปัญหาในการไม่ออกของเมล็ดพืชบางชนิด ที่มีการเจริญและพัฒนาของคัพภะซึ่งได้รับการผสมแล้วมีอาหารสะสมในเมล็ดไม่เพียงพอ เช่น มะพร้าวกะทิ กล้วยไม้

2. ช่วยในการเจริญและพัฒนาของคัพภะที่ไม่ได้รับการผสม (parthenogenic embryo) ซึ่งในสภาพธรรมชาติแล้วคัพภะเหล่านี้มักจะสลายตัวไป

3. ลดการปนเปื้อนของเชื้อโรค คัพภะเป็นชิ้นส่วนหนึ่งที่มีความปลอดไวรัสสูง เพราะไม่มีเนื้อเยื่อต่อสัมผัสเชื่อมต่อกับอวัยวะส่วนอื่นๆ

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/synthetic seeds)

เป็นเมล็ดพืชที่ได้จากการนำเอาคัพภะที่เพาะเลี้ยงได้มาเคลือบหรือหุ้มด้วยสารประกอบบางชนิดที่เลียนแบบเอ็นโดสเปอเมอรั

ปัญหาและข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงคัพภะ

1. มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ค่อนข้างสูง
2. ในพืชบางชนิด การชักนำให้มีการกำเนิดคัพภะทำได้ยาก
3. วิธีการและขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงค่อนข้างยุ่งยาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อน หรือการกู้ชีวิตคัพภะ
4. จำเป็นต้องมีการย้ายเนื้อเยื่อและเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้ง ทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อสูญเสียความพร้อมและความสามารถในการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงพัฒนาได้ง่าย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เมล็ดถั่วพุ่ม
2. ตู้ถ่ายเชื้อ
3. Hot oven
4. หม้อน้ำความดันไอ
5. เครื่องชั่ง
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
7. เต้าไฟฟ้า
8. ซ้อนตักสารและแท่งแก้วคนสาร
9. ขวดรูปชมพู่
10. บีกเกอร์
11. กระจกทวง
12. ขวดใส่อาหารและน้ำกลั่น
13. ปากคืบ
14. มีดผ่าตัด
15. จานเลี้ยงเชื้อ

16. ตะเกียงแอลกอฮอล์และไม้ขีดไฟ
17. กระดาษอลูมิเนียม (aluminum foil)
18. น้ำผงซักฟอก
19. แอลกอฮอล์
20. คลอโรกซ์ 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

หมายเหตุ อุปกรณ์ในข้อ 9 - 16 ต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันก่อน
นำเข้าสู่ถ่ายเชื้อ

วิธีการศึกษา

ในปฏิบัติการทำการแกะ embryo จากเมล็ดถั่วพุ่มที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว
นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง plate ละ 3 ชั้น

ผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่า embryo ที่เพาะได้เป็นเวลา 20 วัน ได้ผลดังนี้

.....

.....

.....

.....

