บทที่ 10
การเพาะเลี้ยงเซลล์และการปรับปรุงพันธุ์พืช
Plant Cell Culture and Improvement

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์พืชเป็นเทคนิคพื้นฐานที่นำมาใช้ในการสร้างพืชพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะพึงประสงค์ ซึ่งสามารถทำได้โดยใช้ร่วมกับเทคนิคต่างๆ เช่น การย้ายยีนทั้งทางตรงและทางอ้อมด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมซึ่งกำลังเป็นที่นิยมศึกษากันอย่างกว้างขวาง การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสิ่งกระตุ้นต่างๆ เช่น รังสี และสารเคมี เป็นต้น อย่างไรก็ตามหากสามารถทำการย้ายยีนที่พึงประสงค์ไปสู่เซลล์พืชที่ต้องการได้ หรือสามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนหรือโครโมโซมได้สำเร็จแต่ไม่สามารถพัฒนาเซลล์ดังกล่าวให้เกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนั้นก็ไม่มีคุณค่าใดๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาช่วยในการพัฒนาเซลล์พืชกลายพันธุ์นั้นให้พัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. การขยายสายพันธุ์พืช (clonal propagation)

สามารถเพิ่มปริมาณพันธุ์พืชจำนวนมากในโดยอาศัยสูตรอาหารที่เหมาะสม อีกทั้งยังประหยัดเวลา เนื้อที่และแรงงาน โดยไม่ต้องประสบกับปัญหาจากสภาพแวดล้อมธรรมชาติ

2. การปรับปรุงพันธุ์พืช (crop improvement)

2.1 การผลิตพืชปลอดโรค (disease free plant)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถผลิตต้นพันธุ์ที่ปราศจากเชื้อโรคจากราและแบคทีเรียรวมถึงไวรัสได้ โดยเฉพาะไวรัสซึ่งจะไม่แสดงการปนเปื้อนให้เห็นในขณะเพาะเลี้ยงแต่สามารถใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นที่มีขนาดเล็กมากๆ คือเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด (apical meristem) ขนาดประมาณ 0.01 - 0.05 มิลลิเมตร หรือเนื้อเยื่อของเอ็มบริโอ (embryonic tissue) เนื่องจากเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีส่วนของท่อลำเลียง ไวรัสจึงยังไม่สามารถเคลื่อนย้ายมาปนเปื้อนได้

2.2 การคัดเลือกลักษณะพันธุ์กลายในสภาวะควบคุม (selection pressure)

ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีผสมพันธุ์ตามวิธีมาตรฐาน (conventional breeding) เพื่อให้ได้พันธุ์ทนทาน/ต้านทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ จะทำได้ยากเนื่องจากไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมให้สม่ำเสมอได้ จึงหันมาใช้วิธีเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชในสภาวะควบคุม เช่น ต้องการสร้างสายพันธุ์พืชทนทานต่อสภาพดินเค็มสามารถทำได้โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเพาะเลี้ยงแล้วทำการคัดเลือกเซลล์ที่รอดชีวิตซึ่งก็คือเซลล์ที่มีความผันแปรทางพันธุกรรม (variant cell) ถ้านำมาเพาะเลี้ยงต่อไปแล้วเซลล์นั้นยังคงลักษณะทนทานไว้ได้แสดงว่าเป็นเซลล์ที่เกิดการกลายพันธุ์ (mutated cell) จะได้พืชพันธุ์ใหม่ ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

2.3 การคัดเลือกลักษณะที่เกิดจากความแปรปรวนทางพันธุกรรม (somaclonal variation) หรือชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation)

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือโดยขบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นเรียกว่า somaclonal variation ส่วนการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำให้เกิดโดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagens) ชนิดต่างๆ เรียกว่า induced mutation ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบครั้งแรกในพืชสวน (horticultural crops) เรียกพืชที่ได้นี้ว่า clonal variation ซึ่งอาจมีความคงตัวในการเปลี่ยนแปลง (genetic change) หรือไม่คงตัว (epigenetic change) ก็ได้

2.4 การถ่ายละอองเกสรหรือการผสมเทียม (test-tube pollination)

เพื่อแก้ปัญหาความล้มเหลวในการผสมเกสรของพืชบางชนิดในสภาพธรรมชาติ โดยนำมาเลี้ยงแล้วทำการถ่ายละอองเกสรและผสมเกสรในสภาพปลอดเชื้อซึ่งเป็นวิธีหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์พืชที่ผสมในสภาพธรรมชาติไม่ได้

2.5 การปฏิสนธิเทียม (test-tube fertilization) และการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ (embryo rescue)

การเพาะเลี้ยงไข่อ่อนที่ผสมแล้วหรือเอ็มบริโอของพืชบางชนิดซึ่งไข่เมื่อได้รับการผสมแล้วไม่สามารถเจริญได้ตลอดเนื่องจากรังไข่อาจจะร่วง ทำได้โดยการตัดเอารังไข่มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ โดยเฉพาะในพืชผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization) หรือข้ามสกุล (intergeneric hybridization)

2.6 การสร้างพืชที่มีโครโมโซมต่างจากปกติ

การสร้างพืชแฮพลอยด์ (haploid plant) จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูหรือเรณู (anther or pollen culture) หรือการเลี้ยงไข่อ่อนที่ยังไม่ได้รับการผสมเพื่อให้เกิดต้นพืชที่มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว ซึ่งจะสามารถนำไปสร้างเป็นพืชโฮโมไซกัส (homozygous) หรือการสร้างพืชที่มีโครโมโซม 3 ชุด (triploid plant) เพื่อผลิตพืชไม่มีเมล็ดหรือพืชที่มีดอกและผลขนาดใหญ่กว่าเดิมโดยการเพาะเลี้ยงเอนโดเสปิร์ม

2.7 การทำเมล็ดเทียม (artificial seed)

การผลิตเมล็ดพันธุ์พืชโดยการสร้างโซมาทิกเอ็มบริโอแล้วนำเอ็มบริโอที่ได้นี้ไปทำการเคลือบ (encapsulation) ด้วยสารที่มีคุณสมบัติเหมาะสมได้เป็นเมล็ดเทียม ซึ่งแนวความคิดนี้ประสบความสำเร็จแล้วในพืชบางชนิดและยังเป็นแนวทางในการสร้างเมล็ดเทียมของพืชที่ได้จากเทคนิคพิเศษต่างๆ อีกด้วย

2.8 การรวมโพรโทพลาสต์ (protoplast fusion)

การรวมเซลล์ร่างกาย (somatic cell) คือ การรวมโพรโทพลาสต์เพื่อรวม

สารพันธุกรรมของพืชต่างชนิดหรือต่างสกุลที่ไม่สามารถผสมพันธุ์กันตามธรรมชาติ

2.9 การถ่ายยีนเพื่อสร้างพืชจำลองพันธุ์ (Plant transformation for production of transgenic plant)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นขั้นตอนหนึ่งที่นำมาใช้เพื่อเตรียมเซลล์พืชสำหรับใช้ในการถ่ายยีนจากภายนอกเข้าสู่พืชซึ่งการถ่ายฝากยีนในพืชทำได้สำเร็จแล้วในพืชหลายชนิด เนื่องจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความก้าวหน้ามากสามารถเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืชและชักนำให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้เรียกว่า พืชแปลงพันธุ์ (transgenic plant)

3. การเก็บรักษาพันธุกรรมพืช (germplasm preservation)

สำหรับพืชที่มีคุณค่าบางชนิด เช่น พืชหายากและมีคุณค่าทางประวัติศาสตร์ เป็นแหล่งพันธุกรรมที่มีคุณค่าและใกล้จะสูญพันธุ์ สามารถเก็บรวบรวมไว้ในสภาพปลอดเชื้อและควบคุมสภาวะให้มีการเจริญเติบโตช้ามาก ๆ เพื่อคงความมีชีวิตเป็นเวลานาน หรือทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสและสามารถนำกลับมาเพิ่มปริมาณและย้ายปลูกได้เมื่อต้องการขยายพันธุ์ต่อไป

4. การผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่เป็นประโยชน์

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชสามารถกระตุ้นให้มีการผลิตสารทุติยภูมิต่าง ๆ เช่น รงควัตถุ อัลคาลอยด์ และ น้ำมันหอมระเหย เป็นต้น ที่มีประสิทธิภาพและปริมาณสูงกว่าการผลิตจากพืชในธรรมชาติ อีกทั้งในระยะยาวจะช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายรวมทั้งสามารถควบคุมปริมาณและคุณภาพของผลผลิตได้ตามต้องการ

การถ่ายเรณูและการปฏิสนธิในสภาพปลอดเชื้อ

การผสมข้ามเป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชที่มีประสิทธิภาพในการสร้างพืชพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติดีแตกต่างจากที่มีอยู่เดิม เนื่องจากพืชดอก (angiosperm) เซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (female gamete) หรือโอวุล (ovule) จะอยู่ในรังไข่ (ovary) เมื่อเรณู (pollen grain) มาสัมผัสกับยอดเกสรเพศเมีย (stigma) จะงอกหลอดเรณู (pollen tube) ผ่านก้านเกสรเพศเมีย (style) เข้าสู่รังไข่แล้วจึงเกิดการปฏิสนธิ (fertilization) โดยเสปิร์มเซลล์หนึ่งรวมกับไข่แล้วเจริญเป็นไซโกต (zygote) ดิพลอยด์ (2n) ขณะที่อีกหนึ่งเซลล์รวมกับโพลาร์นิวคลีไอ (polar nuclei) ที่บริเวณกลางเซลล์เจริญเป็นเอนโดเสปิร์ม ทริพลอยด์ (3n)

ในธรรมชาติยอดเกสรตัวเมียอาจได้รับเรณูหลากหลายแต่ไม่ใช่ทั้งหมดที่จะเข้าไปสู่รังไข่จนกระทั่งเกิดการปฏิสนธิได้ อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นได้แก่ การที่เรณูไม่สามารถสร้างหลอดเรณูได้ เกิดความล้มเหลวขณะกำลังงอกหลอดเรณูเข้าสู่รังไข่ดังนั้นรังไข่จึงร่วงไปก่อนที่เรณูจะเข้าไปถึงรังไข่ และหลอดเรณูแตกขณะอยู่ในก้านชูยอดเกสรตัวเมีย ปัจจัยเหล่านี้เป็นอุปสรรคที่เกิดขึ้นก่อนการปฏิสนธิ นอกจากนี้อาจพบมีการปฏิสนธิเกิดขึ้นแต่เอมบริโอไม่สามารถพัฒนาได้จนสมบูรณ์เนื่องจากการเข้ากันไม่ได้ของเอมบริโอและเอนโดเสปิร์ม หรือเอนโดเสปิร์มไม่สามารถพัฒนาได้ ปัจจัยเหล่านี้จัดเป็นอุปสรรคที่เกิดหลังจากการปฏิสนธิ

แนวทางแก้ปัญหาดังกล่าวที่พอจะเป็นไปได้คือ การนำเรณูเข้าสู่รังไข่โดยตรง (intra-ovarian pollination) มีรายงานที่ประสบความสำเร็จทำได้โดยการวางเรณูที่ด้านบนของรังไข่ เช่น *Papaver rhoes*, *P. somniferum*, *Eschscholtzia californica*, *Argemone mexicana*, *A. ochroleuca* จากการใช้เทคนิคนี้ Kanta และ Maheshwari สามารถผสมพันธุ์ *Argemone mexicana* และ *A. ochroleuca* ได้สำเร็จด้วยการนำเรณูมาเขย่าในน้ำกลั่นผสมกรดบอริกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้มีความหนาแน่นประมาณ 100 – 300 เรณูต่อหยด สำหรับดอกที่ใช้เป็นฝ่ายแม่จะถูกทำให้เป็นหมันแล้วคลุมด้วยถุงก่อนระยะออกดอก (anthesis) 2 วัน แล้วจึงนำดอกนี้มาฟอกฆ่าเชื้อรังไข่โดยการเช็ดด้วยสำลี

จุ่มแอลกอฮอล์จากนั้นฉีดเรณูเข้าไปในรังไข่ มีการเจาะรูที่ด้านตรงข้ามเพื่อให้อากาศออกได้เมื่อฉีดเรณูเข้าไปจนเต็มจะมีส่วนที่ไหลออกมาทางด้านตรงข้ามจึงทำการปิดรูด้วยปิโตรเลียมเจล

แม้ว่าเทคนิคดังกล่าวจะกระทำได้สำเร็จแต่ก็ไม่สามารถแก้ปัญหาได้ทั้งหมด จึงได้มีความพยายามพัฒนาเทคนิคการปฏิสนธิในสภาพปลอดเชื้อ (test-tube fertilization) ซึ่งเทคนิคนี้ทำโดยการกำจัดส่วนยอดเกสรเพศเมีย ก้านชูเกสรเพศเมีย และผนังรังไข่ออกไปแล้วปล่อยให้รังไข่สัมผัสกับเรณูโดยตรง ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อจนกระทั่งเมล็ดแก่ มีรายงานความสำเร็จครั้งแรกในพืช *Papaver somniferum* โดยเรณูจะเข้าสู่รังไข่ภายใน 15 นาที และเกิดการปฏิสนธิภายใน 1 - 2 วัน จากนั้นภายใน 5 วัน ไข่ที่เกิดการปฏิสนธิจะมีการพัฒนาเป็นโพรเอมบริโอ (proembryo) มี 4 เซลล์ เอ็มบริโอของพืชใบเลี้ยงคู่จะพัฒนาเต็มที่จะใช้เวลาประมาณ 22 วัน

นอกจากนี้มีรายงานความสำเร็จในพืชอีกหลายชนิดที่ได้จากการถ่ายเรณูและปฏิสนธิในสภาพปลอดเชื้อ ดังตารางที่ 10.1

ตารางที่ 10.1 ตัวอย่างพืชที่ประสบความสำเร็จจากการปฏิสนธิในสภาพปลอดเชื้อ (ดัดแปลงจาก Bhojwani และ Razdan, 1996)

ชนิดพืช	**อาหารเพาะเลี้ยง**		
	สูตรอาหาร	**ความเข้มข้นของน้ำตาล (%)**	**สารพิเศษ (mg/l)**
ผสมตัวเอง			
Agrostemma githago	N	5	CH (500)
Argemone mexicana	N	5	CH (500)
Brassica campestris	MS	2	-
B. napus	MS	2	-
B. oleracea	N	-	-

ตารางที่ 10.1 ตัวอย่างพืชที่ประสบความสำเร็จจากการปฏิสนธิในสภาพปลอดเชื้อ (ต่อ) (ดัดแปลงจาก Bhojwani และ Razdan, 1996)

ชนิดพืช	อาหารเพาะเลี้ยง		
	สูตรอาหาร	ความเข้มข้นของน้ำตาล (%)	สารพิเศษ (mg/l)
Dianthus caryophyllus	W	4	-
Dicranostigma franchetianum	N	4	-
Eschscholtzia californica	N	5	CH (500)
Glycine max	MS, B5	6	-
Melandrium album	W, N	2,5	-, CH (500)
M.rubrum	W	2	-
Nicotiana rustica	N	5	CH (500)
N. tabacum	N	5	CH (500)
Papaver nudicaule	N	5	CH (500)
P. somniferum	N	5	CH (500)
Petunia axillaris	RS	4	-
P. hybrid	N	4	CH (500) + IAA (0.1)
Trifolium repens	MS	3	CH (500)
Zea may	W, N, MS	17	ไข่แดง (100 หยดต่อลิตร)
	LS	15	-
	GP	5	GA_3 (10)
	MS	7	CH (500) + IAA (0.1) + IAA (1) + Kn (0.5)

ตารางที่ 10.1 ตัวอย่างพืชที่ประสบความสำเร็จจากการปฏิสนธิในสภาพปลอดเชื้อ (ต่อ)
(ดัดแปลงจาก Bhojwani และ Razdan, 1996)

ชนิดพืช	อาหารเพาะเลี้ยง		
	สูตรอาหาร	ความเข้มข้นของน้ำตาล (%)	สารพิเศษ (mg/l)
Zea may	MS	5	GA_3 (10.4)
	MS	5	CH (500)
ผสมข้าม			
Brassica napus X *B. campestris*	MS	2	-
Melandrium album X *M.rubrum*	W	2	-
M.album X *Viscaria vulgaris*	W	2	-
M.album X *Silene schafta*	W	2	-
M.rubrum X *M.album*	N, W	2	-
Nicotiana tabacum X *N.amplexicaulis*	N	4	CH (500)
N.tatacum X *N.debney*	N, MS	2	-
N.tatacum X *N.rependa*	N	4	CH (500)
N.tatacum X *N.rustica*	N	5	-
Petunia parodii X P.inflata	W	4	-
Zea may X *Z.mexicana*	GP	5	GA_3 (10)

หมายเหตุ GP = Green and Phillips (1975) LS = Linsmaier and Skoog (1965)
MS = Murashige and Skoog (1962) RS = Rangas wany and Shivanna (1971)
W = White ดัดแปลงโดย Rangaswamy (1961) N = Nitsch (1951)

CH = casein hydrolysate IAA = 3-indoleacetic acid
GA3 = gibberellic acid Kn = kinetin

การสร้างพืชแฮพลอยด์

โอกาสในการเกิดพืชแฮพลอยด์ตามธรรมชาตินั้นมีน้อยมากประมาณ 0.001 – 0.01 เปอร์เซนต์ เท่านั้น ซึ่งการเกิดพืชแฮพลอยด์ในธรรมชาตินั้นจะได้จากกระบวนการที่เรียกว่าพาร์ทิโนเจเนซีส (parthenogenesis) คือการที่เอ็มบริโอพัฒนาจากไข่ที่ไม่ได้รับการผสม ลูกจะมีลักษณะของแม่เพียงฝ่ายเดียวปรากฏการณ์ดังกล่าวมีรายงานว่าพบในพืชหลายชนิด เช่น *Antirrhinum majus*, *Crepis tectorum*, *Hoedeum bulbosum x H. vulgare*, *Nicotiana* และ *Oenothera scaba* เป็นต้น จนกระทั่งปี ค.ศ. 1964 ได้มีความพยายามสร้างพืชแฮพลอยด์ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การผสมข้าม (distant hybridization) ชะลอการถ่ายเรณู (delayed pollination) การฉายรังสีเรณู (application of irradiated pollen) การใช้ฮอร์โมน (hormone treatments) และการใช้อุณหภูมิ (temperature shocks) อย่างไรก็ตามแต่ละวิธีมีความจำเพาะกับพืชบางชนิดเท่านั้น ต่อมาจึงพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงอับเรณูของ *Datura innoxia* ได้สำเร็จโดยนักวิทยาศาสตร์ 2 ท่าน คือ Guha และ Maheshwari ในปีค.ศ. 1964 และ 1966 นับเป็นจุดเริ่มต้นความสำเร็จในการสร้างพืชแฮพลอยด์ของพืชชั้นสูง จากนั้นเทคนิคการสร้างพืชแฮพลอยด์ด้วยการเพาะเลี้ยงอับเรณูได้มีการพัฒนาและประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิดรวมถึงพืชเศรษฐกิจจำนวนมาก เช่น ธัญพืชและพืชผักรวมทั้งพืชน้ำมันและไม้ผล (ตารางที่ 10.1) ปัจจุบันมีรายงานไว้มากกว่า 134 ชนิด และลูกผสมที่ได้จากพืชแฮพลอยด์มีการแพร่กระจายพันธุ์ไปแล้วประมาณ 25 วงศ์

ตารางที่ 10.2 พืชแฮพลอยด์ที่ประสบความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเรณู (ดัดแปลงจาก Bhojwani และ Razdan, 1996)

ชนิดพืช	รูปแบบการพัฒนา
Annonaceae	
Annona squamosa	แคลลัส
Apiaceae	
Daucus carota	เอมบริโอเจเนซีส
Asteraceae	
Catharanthus tinctorius	แคลลัส
Gerbera jamesonii	แคลลัส
Helianthus annuus	เอมบริโอเจเนซีส, แคลลัส
Brassicaceae	
Arabidopsis thaliana	แคลลัส
Brassica alba	แคลลัส
B. campestris	เอมบริโอเจเนซีส
B. carinata	เอมบริโอเจเนซีส
B. hirta	เอมบริโอเจเนซีส
B. juncea	เอมบริโอเจเนซีส
B. napus	เอมบริโอเจเนซีส
B. nigra	เอมบริโอเจเนซีส
B. oleracea	แคลลัส
B. oleracea x *B. alboglabra* (F1)	แคลลัส
Raphanus sativus	เอมบริโอเจเนซีส
Caricaceae	
Carica papaya	เอมบริโอเจเนซีส

ตารางที่ 10.2 พืชแฮพลอยด์ที่ประสบความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเรณู (ต่อ)
(ดัดแปลงจาก Bhojwani และ Razdan, 1996)

ชนิดพืช	รูปแบบการพัฒนา
Convolvulaceae	
Pharbitis nil	แคลลัส
Fabaceae	
Medicago denticulata	แคลลัส
Trifolium alexandrum	แคลลัส
Fagaceae	
Fagus sylvatica	แคลลัส
Quercus petraea	แคลลัส
Geraniaceae	
Pelargonium hortorum	แคลลัส
Gesneriaceae	
Saintpaulia ionantha	เอมบริโอเจเนซีส
Hippocastanaceae	
Aesculus hippocastanum	เอมบริโอเจเนซีส
A. carnea	เอมบริโอเจเนซีส
Liliaceae	
Asparagus officinalis	แคลลัส
Lilium longiflorum	แคลลัส
Palmaceae	
Cocos nucifera	เอมบริโอเจเนซีส
Poaceae	
Aegilops caudate x *Ae. umbellata*	แคลลัส
Agropyron intermedium	แคลลัส

ตารางที่ 10.2 พืชแฮพลอยด์ที่ประสบความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเรณู (ต่อ)
(ดัดแปลงจาก Bhojwani และ Razdan, 1996)

ชนิดพืช	รูปแบบการพัฒนา
Avena sativa	แคลลัส
Bromus inermis	แคลลัส
Hordeum vulgare	แคลลัส
Lolium multiflorum	แคลลัส
L. multiflorum x *Festuca arundinacea*	แคลลัส
Oryza sativa	เอมบริโอเจเนซีส, แคลลัส
O. perennis	แคลลัส
Saccharum spontaneum	แคลลัส
S. cereale	เอมบริโอเจเนซีส, แคลลัส
Setaria italica	แคลลัส
Sorghum bicolor	แคลลัส
Triticale	แคลลัส
Triticum aestivum	เอมบริโอเจเนซีส, แคลลัส
T. vulgare x *Agropyron glaucum*	แคลลัส
Zea mays	เอมบริโอเจเนซีส, แคลลัส
Primulaceae	
Cyclamen persicum	เอมบริโอเจเนซีส
Rannunculaceae	
Paeonia hybrida	เอมบริโอเจเนซีส
Ranunculus asiaticus	เอมบริโอเจเนซีส
Rosaceae	
Fragaria x ananassa	แคลลัส
Malus pumila	เอมบริโอเจเนซีส

ตารางที่ 10.2 พืชแฮพลอยด์ที่ประสบความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเรณู (ต่อ)
(ดัดแปลงจาก Bhojwani และ Razdan, 1996)

ชนิดพืช	รูปแบบการพัฒนา
Malus pumifolia	แคลลัส
Rutaceae	เอมบริโอเจเนซีส
Citrus aurantifolia	
C. madurensis	เอมบริโอเจเนซีส
C. microcapa	เอมบริโอเจเนซีส
Poncirus trifoliata	เอมบริโอเจเนซีส
Salicaceae	
Populus alba x *P. simonii*	แคลลัส
P. berolinensis	แคลลัส
P. berolinensis x *P. pyramidalis*	แคลลัส
P. canadensis x *P. koreara*	แคลลัส
P. euphratica	แคลลัส
P. harbinensis x *P. pyramidalis*	แคลลัส
P. maximowiczii	แคลลัส
P. nigra	แคลลัส
P. pseudosimonii	แคลลัส
P. pseudosimonii x *P. pyramidalis*	แคลลัส
P. simonii	แคลลัส
P. simonii x *P. nigra*	แคลลัส
P. simonii x *P. pyramidalis*	แคลลัส
P. ussuriensis	แคลลัส
Sapindaceae	
Dimocarpus longana	แคลลัส

ตารางที่ 10.2 พืชแฮพลอยด์ที่ประสบความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเรณู (ต่อ)
(ดัดแปลงจาก Bhojwani และ Razdan, 1996)

ชนิดพืช	รูปแบบการพัฒนา
Litchi chinensis	แคลลัส
Scrophulariaceae	
Digitalis purpurea	แคลลัส
Solanaceae	
Atropa belladonna	เอมบริโอเจเนซีส
Capsicum annuum	เอมบริโอเจเนซีส, แคลลัส
Datura innoxia	เอมบริโอเจเนซีส
D. metel	เอมบริโอเจเนซีส, แคลลัส
D. meteloides	เอมบริโอเจเนซีส
D. muricata	เอมบริโอเจเนซีส
D. stramonium	เอมบริโอเจเนซีส
D. wrightii	เอมบริโอเจเนซีส
Hyoscyamus albus	เอมบริโอเจเนซีส
H. niger	เอมบริโอเจเนซีส, แคลลัส
H. pusillus	เอมบริโอเจเนซีส
Lycium halimifolium	เอมบริโอเจเนซีส
Lycopersicon esculentum	แคลลัส
Nicotiana alata	เอมบริโอเจเนซีส
N. attenuata	เอมบริโอเจเนซีส
N. clevelandii	เอมบริโอเจเนซีส
N. glutinosa	เอมบริโอเจเนซีส
N. knightiana	เอมบริโอเจเนซีส
N. langsdorffii	เอมบริโอเจเนซีส

ตารางที่ 10.2 พืชแฮพลอยด์ที่ประสบความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเรณู (ต่อ)
(ดัดแปลงจาก Bhojwani และ Razdan, 1996)

ชนิดพืช	รูปแบบการพัฒนา
N. otophora	เอมบริโอเจเนซีส
N.paniculata	เอมบริโอเจเนซีส
N. raimondii	เอมบริโอเจเนซีส
N.rustica	เอมบริโอเจเนซีส
N. sanderae	เอมบริโอเจเนซีส
N. sylvestris	เอมบริโอเจเนซีส
N. tabacum	เอมบริโอเจเนซีส
Petunia axillaris	เอมบริโอเจเนซีส
P. axillaries x *P. hybrida*	แคลลัส
P. hybrida	แคลลัส
P. violaceae	เอมบริโอเจเนซีส
Scopolia carniolica	เอมบริโอเจเนซีส
S. lurida	เอมบริโอเจเนซีส
S. physaloides	เอมบริโอเจเนซีส
Solanum bulbocastanum	เอมบริโอเจเนซีส, แคลลัส
S. carolinensis	เอมบริโอเจเนซีส
S. chacoense	เอมบริโอเจเนซีส
S. demissum	เอมบริโอเจเนซีส, แคลลัส
S. dulcamara	เอมบริโอเจเนซีส, แคลลัส
S. fendleri	เอมบริโอเจเนซีส, แคลลัส
S. hjertingii	เอมบริโอเจเนซีส
S. melongena	แคลลัส
S. nigrum	แคลลัส

ตารางที่ 10.2 พืชแฮพลอยด์ที่ประสบความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเรณู (ต่อ)
(ดัดแปลงจาก Bhojwani และ Razdan, 1996)

ชนิดพืช	รูปแบบการพัฒนา
S. phureja	เอมบริโอเจเนซีส
S. polytrichon	เอมบริโอเจเนซีส, แคลลัส
S. stenotomum	เอมบริโอเจเนซีส
S. stoloniferum	เอมบริโอเจเนซีส
S. surattense	แคลลัส
S. tuberosum	เอมบริโอเจเนซีส, แคลลัส
S. tuberosum x *S. chacoense*	เอมบริโอเจเนซีส
S. verrucosum	เอมบริโอเจเนซีส, แคลลัส
S. verrucosum x *S. tuberosum*	เอมบริโอเจเนซีส
Theaceae	
Camellia sinensis	แคลลัส
Vitaceae	
Vitis vinifera	เอมบริโอเจเนซีส

การเพาะเลี้ยงอับเรณู

การชักนำให้เกิดการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (androgenesis) เพื่อสร้างพืชแฮพลอยด์เป็นวิธีการที่ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิดโดยการเพาะเลี้ยงอับเรณูในสภาพปลอดเชื้อซึ่งพืชที่จะนำมาใช้เป็นต้นพันธุ์จะต้องได้รับการควบคุมอุณหภูมิ แสงและความชื้น นอกจากนี้อับเรณูที่มีคุณภาพดีควรนำมาจากต้นที่มีความเยาว์วัย โดยเมื่อตัดแยกส่วนตาดอกมาแล้วจะต้องทำการฟอกฆ่าเชื้อก่อนนำลงเลี้ยงบนอาหาร ทั้งนี้ช่วงระยะเวลานับตั้งแต่ตัดดอกจากต้นแม่จนกระทั่งนำลงเลี้ยงไม่ควรนานเกิน 2 ชั่วโมง

โดยทั่วไปอาหารเพาะเลี้ยงอับเรณูประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามิน น้ำตาล และที่สำคัญคือฮอร์โมน เช่น Naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-diclorophenoxyacetic acid (2,4-D), 6-benzylamono purine (BAP) และ kinetin เป็นต้น สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอับเรณูควรมีช่วงสลับระหว่างแสง (12 – 18 ชั่วโมง ความเข้มแสงประมาณ 5,000 – 10,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และช่วงมืด (12 – 16 ชั่วโมง) 22 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของพืช แต่มีพืชบางชนิดอ่อนแอต่อแสงมาก เช่น *Brassica spp.* ดังนั้นจึงต้องเลี้ยงในสภาพมืดตลอดเวลา การตอบสนองของอับเรณูมักพบว่าเนื้อเยื่อผนังค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หลังจากนั้นประมาณ 3-8 สัปดาห์ จะปรากฏแคลลัสหรือเอ็มบริโอให้เห็น

การเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์

ภายในอับเรณูจะมีไมโครสปอร์มาเทอร์เซลล์ (microspore mother cell) เมื่อแบ่งตัวแบบไมโอซีสจะได้ไมโครสปอร์ (microspore) ซึ่งแบ่งตัวแบบไมโทซีสอีกครั้งได้ 2 นิวเคลียส มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทั้งภายนอกและภายในลักษณะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืชเรียกว่าเรณู (pollen) หรือแกมีโทไฟต์เพศผู้ (male gametophyte) โดยระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์จะมีความสำคัญต่อการสร้างพืชแฮพลอยด์ Sunderland และคณะ (1974) ได้เสนอการพัฒนาของอับเรณูไว้ 5 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 มี 4 เซลล์ ติดกันหรือไมโครสปอร์ที่ยังอ่อนอยู่ (อยู่ในระยะ G1 ของวัฏจักรเซลล์)

ระยะที่ 2 ไมโครสปอร์ในระยะกลางๆ มีการสร้างผนังชั้นนอกขึ้น แวคิวโอลยังคงมีอยู่ นิวเคลียสอยู่ในระยะ G1

ระยะที่ 3 ไมโครสปอร์ในช่วงปลาย ยังพบแวคิวโอลและนิวเคลียส อยู่ในระยะ S หรือ G2

ระยะที่ 4 ละอองเรณูที่แยกเป็นเซลล์เดี่ยวจะเริ่มมีไมโทซีสเป็นครั้งแรก

ระยะที่ 5 ละอองเรณูแบ่งออกเป็น 2 นิวเคลียส คือ เจเนอเรทิฟนิวเคลียส (generative nucleus) และทิวป์นิวเคลียส (tube nucleus)

อับเรณูทั้ง 5 ระยะ สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ในพืชหลายชนิดแต่อย่างไรก็ตามมีการพบปัญหาหลายประการ เช่น การพัฒนาของเอ็มบริโอหรือแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนอื่นที่ไม่ใช้เรณูจึงอาจพบพืชที่ไม่ใช่แฮพลอยด์ปะปนอยู่ด้วย นอกจากนี้ภายในอับเรณูมักมีเรณูที่อายุแตกต่างกันซึ่งเรณูที่มีอายุมากกว่าอาจปล่อยสารพิษออกมายับยั้งการเจริญเติบโตของเรณูที่อายุอ่อนกว่าดังเช่นที่พบใน *Brassica napus* ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว อับเรณูระยะที่เหมาะสมในการนำมาเพาะเลี้ยงคือ ระยะที่มี 1 นิวเคลียสและระยะแรกของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซีส

การสร้างพืชทริพลอยด์

เอนโดเสปิร์มเป็นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะพิเศษพบมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ของวงศ์พืชดอก เกิดจากการรวมกันของแกมีโทไฟต์เพศผู้และแกมีโทไฟต์เพศเมียมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อที่มีโครโมโซมเป็น 3 ชุด (3n) เนื้อเยื่อเอนโดเสปิร์มเป็นแหล่งอาหารสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของต้นอ่อน ดังนั้นในพืชบางชนิดเมื่อเมล็ดแก่จะไม่พบเอนโดเสปิร์ม เช่น ถั่ว (legumes) และแตง (cucurbits) หรืออาจยังคงมีเอนโดเสปิร์มอยู่เป็นจำนวนมาก เช่น ธัญพืช (cereals) ละหุ่ง มะพร้าว และ กาแฟ เป็นต้น เอนโดเสปิร์มประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมาเก็บสะสมอาหารจำนวนมากในรูปแป้ง โปรตีน และไขมัน ระหว่างกระบวนการงอกของเมล็ดสารเหล่านี้จะถูกย่อยและใช้ประโยชน์ไปเพื่อการเจริญเติบโตของต้นกล้า เนื่องจากเนื้อเยื่อ เอนโดเสปิร์มมีลักษณะเป็นทริพลอยด์ดังนั้นต้นพืชที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเอนโดเสปิร์มจึงเป็นทริพลอยด์ด้วยเช่นเดียวกัน ในช่วง 30 ปี ที่ผ่านมาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเอนโดเสปิร์มสามารถพัฒนาเป็นอวัยวะและต้นพืชทริพลอยด์ได้จำนวนมาก (ตารางที่ 10.1) โดยทั่วไปการสร้างพืชทริพลอยด์มีจุดประสงค์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการผสมกับพืชเททราพลอยด์ หรือดิพลอยด์ และสร้างพืชทริพลอยด์ที่ไม่มีเมล็ดซึ่งประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น กล้วย องุ่น แตงโม เป็นต้น

ตารางที่ 10.3 พืชที่ประสบความสำเร็จในการพัฒนาเป็นยอดหรือต้นพืชจากเอนโดเสปิร์ม (ดัดแปลงจาก Bhojwani และ Razdan, 1996)

วงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์
Actinidiaceae	*Actinidia chinensis*
	Actinidia hybrids
Annonaceae	*Annona squamosa*
Apiaceae	*Petroselinum hortense*
Euphorbiaceae	*Codiaeum variegatum*
	Jatropha panduraefolia
	Putranjiva roxburghii
Loranthaceae	*Dendrophthoe falcate*
	Scurrula pulverulenta
	Taxillus vestitus
Poaceae	*Oryza sativa*
Rosaceae	*Prunus persica*
	Pyrus malus
Rutaceae	*Citrus grandis*
	C. sinensis
Santalaceae	*Exocarpus cupressiformis*
	Santalum album
Solanaceae	*Lycium barbarum*