เอกสารประกอบการสอน

วิชา TA 445 เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการเกษตร

(Plant Tissue Culture for Agricultural Technology)

รวบรวมโดย

ดร. เพชรรัตน์ จันทรทิณ

สาขาเทคโนโลยีการเกษตร

คณะเทคโนโลยีและนวัตกรรม

มหาวิทยาลัยกรุงเทพธนบุรี

คำนำ

เอกสารประกอบการบรรยายรายวิชา เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการเกษตร รหัสวิชา TA 445 ได้เกิดจากการค้นคว้า หนังสือ เอกสาร ตำราเรียน แนวคิดและทฤษฎีจากผู้เขียนผู้ทรงคุณวุฒิหลายท่าน รวมถึงองค์ความรู้ต่าง ๆ ที่รวบรวมขึ้นเพื่อให้เกิดความสมบูรณ์ในเนื้อหาและเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาของนักศึกษามากที่สุด

อนึ่ง เอกสารประกอบการบรรยายรายวิชา เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการเกษตร รหัสวิชา TA 445 เล่มนี้ เป็นเพียงส่วนหนึ่งที่ใช้เพื่อประกอบการเรียนการสอนเท่านั้น นักศึกษาควรศึกษาและค้นคว้าเพิ่มเติมจากแหล่งความรู้ต่างๆ ซึ่งจะทำให้นักศึกษาได้มีความเข้าใจในในเนื้อหามากยิ่งขึ้น

รวบรวมโดย ดร. เพชรรัตน์ จันทรทิณ

สาขาเทคโนโลยีการเกษตรคณะเทคโนโลยีและนวัตกรรม

มีนาคม 2556

สารบัญ

บทที่ 1	ประวัติ และความสำคัญ ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	1-6
บทที่ 2	ห้องปฏิบัติการ วัสดุอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	7-16
บทที่ 3	เทคนิคการทำให้ปลอดเชื้อจุลินทรีย์	17-25
บทที่ 4	อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการเตรียมอาหาร	26-38
บทที่ 5	เทคนิคการเตรียมชิ้นส่วนของพืชและการแยกเนื้อเยื่อพืช	39-51
บทที่ 6	ขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	52-64
บทที่ 7	การเจริญและการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชในสภาพเพาะเลี้ยง	65-79
บทที่ 8	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกับการถ่ายยีนในพืช	80-88
บทที 9	แนวทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ	89-92
บทที่ 10	ปัญหาที่พบสำหรับการผลิตพืชเพื่อการค้าด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	93-107

บทที่ 1

ความหมาย ประวัติ และความสำคัญ ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ความหมาย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือ วิธีการขยายพันธุ์พืชวิธีหนึ่ง ด้วยการนำชิ้นส่วนของพืชที่ยังมีชีวิตอยู่ ได้แก่ ปลายยอด ตาข้าง ก้านช่อดอก ใบ ก้านใบ ลำต้น อับละอองเกสร เมล็ด เป็นต้น มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อที่มีการควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิและแสง โดยชิ้นส่วนของพืชนั้นสามารถ เจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ซึ่งมีทั้งส่วนใบ ลำต้น และรากที่สามารถย้ายออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้

ประวัติ

การนำชิ้นส่วนพืชมาเพาะเลี้ยงเพื่อบังคับให้มีการเจริญเติบโตตามที่ต้องการในสภาพปลอดเชื้อ หรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จากหลักการในทฤษฎีเซล ของ Schleiden (1838)and Schwann (1839) ที่กล่าวถึงคุณสมบัติของเซลล์แต่ละเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีความสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นสิ่งมีชีวิตที่สมบูรณ์ใหม่ได้อีก เมื่ออยู่สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ความสามารถดังกล่าวของเซลล์นั้นถูกเรียกภายหลังโดย Morgan (1901) ว่า potipotency แนวคิดนี้ได้รับความสนใจมากจากนักพฤกษศาสตร์ ซึ่งได้เริ่มต้นในปี ค.ศ.1902 เมื่อ Gottieb Haberlandt นักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมัน ซึ่งต่อมาได้รับการยกย่องว่าเป็นบิดาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้นำเซลล์จากใบเลี้ยงมาเลี้ยงในอาหารเพื่อให้เซลล์มีการแบ่งตัวและสามารถที่จะเกิดต้นใหม่ที่สมบูรณ์โดยอาศัยคุณสมบัติของเซลล์ดังกล่าว แต่พบว่าเซลล์มีการขยายขนาดอย่างเดียวและไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ เนื่องจากในเวลานั้นยังไม่มีการค้นพบสารควบตุมการเจริญเติบโตของพืช ในปี ค.ศ.

1930 ได้มีการเพาะเลี้ยงเซลล์จากรากพืชหลายชนิดในสภาพปลอดเชื้อ จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1938 สามารถเพาะเลี้ยงอวัยวะและแคลลัส (Callus) ของพืชได้หลายชนิด และต่อมาได้มีการค้นพบสารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิด เช่น สารกลุ่ม cytokinin เช่น kinetin (6-furfurylamonopurine) และ BA (6-benzylaminopurine) และมีนักวิทยาศาสตร์อีกหลายท่านที่พยายามพัฒนาสูตรอาหารต่างๆ เช่น สูตรอาหาร Vacin and Went (1949) สูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962) สูตรอาหาร Gamborg และคณะ (1968) สูตรอาหารของ Chu และคณะ (1975) และสุตรอาหารของ Schenk and Hildebrandt (1972) ซึ่งเป็นสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอีกหลายชนิด ที่มีการใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน นับตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มีการพัฒนาไปอย่างกว้างขวาง มีการค้นพบเทคนิคใหม่ๆอีกมากมาย ซึ่งสามารถทำการเพาะเลี้ยงพืชเซลล์เดี่ยวและ โปรโตพลาสต์ของพืชได้หลายชนิด รวมถึงการนำเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การถ่ายยีนในพืชเข้ามาร่วมด้วยโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นพื้นฐาน จึงทำให้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื้อมีบทบาทสำคัญต่อวิทยาการแขนงอื่นๆ เช่น ชีวเคมี พันธุศาสตร์ การปรับปรุงพันธุ์พืช โรคพืช และเภสัชศาสตร์ เป็นต้น (รังสฤษดิ์, 2540; อารีย์, 2541)

ความสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่พืช

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับงานทางด้านชีววิทยาและเภสัชวิทยา เกษตรกรรม อุตสาหกรรม และการแพทย์ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีประโยชน์ดังนี้ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2556; อรดี, 2542; อารีย์, 2541)

1. การขยายพันธุ์พืช (plant propagation)

เป็นการนำชิ้นส่วนมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณ โดยมีการพัฒนาสูตรอาหารที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นเป็นทวีคูณ เริ่มต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพียง 1 ต้น และทำการย้ายเนื้อเยื่อ (subculture) เดือนละ 1 ครั้งในแต่ละเดือน ทำให้สามารถผลิตต้นพืชได้ถึง 100,000-1,000,000 ต้นในระยะเวลา 1 ปี ซึ่งเป็นการขยายพันธุ์พืชที่รวดเร็ว ปัจจุบันมีการใช้เพื่อผลิตพืชในเชิงการค้าอย่างกว้างขวาง

2. การปรับปรุงพันธุ์พืชและการคัดเลือกสายพันธุ์พืช

ในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช สามารถนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์พืชเพื่อผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน (resistant plant)โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสภาวะต่าง ๆ ก็จะสามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายได้ เช่น การสร้างพันธุ์พืชต้านทานต่อสารพิษของเชื้อสาเหตุโรค ต้านทานต่อแมลง หรือต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช เป็นต้น หรือเพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทาน (tolerance plant) โดยการคัดสายพันธุ์พืชทนทานได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารและสภาวะแวดล้อมต่างๆที่กำหนด เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็มจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดเลือกสายพันธุ์ทนต่อดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดสายพันธุ์ที่ทนร้อนโดยการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิคดังกล่าวเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ แล้วคัดเลือกเอาสายพันธุ์ดีไว้ ซึ่งอาจทำได้โดยการใช้สารเคมี การฉายรังสี การตัดต่อยีน (DNA ricombination) และการย้ายยีน (gene transformation) เพื่อสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ (transgenic plants) ที่ต้องการในพืชบางชนิด รวมทั้งในขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงในอาหาร เมื่อเนื้อเยื่อพืชถูกเลี้ยงและย้ายอาหารไประยะเวลานานอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เรียกว่า somaclonal variation สายพันธุ์เซลล์ที่กลายไปอาจจะเป็นประโยชน์ เช่น สายพันธุ์มะเขือเทศที่มีน้ำในผลน้อย จะเป็นผลดีต่ออุตสาหกรรมการผลิตซอส ซึ่งจะช่วยลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการลดปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์

3. เพื่อการผลิตพืชที่ปลอดเชื้อไวรัส (Virus-free plant propagation)

ปัญหาสำคัญของการผลิตพืช คือ โรค ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย หรือไวรัส ดังนั้นต้นพืชที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะปราศจากเชื้อราและแบคทีเรีย เป็นอันดับแรก เนื่องจากในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะแสดงอาการปนเปื้อนของเชื้อ (contamination) ดังกล่าวโดยจะแสดงกลุ่ม colony ของแบคทีเรียหรือสปอร์ของเชื้อราให้เห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งสามารถเก็บออกมาและทำการกำจัดทิ้งไป ส่วนกรณีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กมากและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ก็ต่อเมื่ออาศัยอยู่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเท่านั้น ซึ่งต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสจะไม่แสดงอาการปนเปื้อนบนอาหารให้เห็น แต่จะทราบได้ก็ต่อเมื่อเกิดอาการบนต้นพืชเท่านั้น ดังนั้นก่อนทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องมีการคัดเลือกและตรวจสอบ

เนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนของพืชเพื่อให้ปลอดจากเชื้อไวรัสมากที่สุด โดยการใช้ส่วนของ meristem ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่อยู่บริเวณปลายยอด หรือเนื้อเยื่อของคัพภะ (embryo) ที่อยู่ในเมล็ด ซึ่งเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีท่อลำเลียงน้ำ(xylem) และอาหาร(phloem) ที่จะติดต่อกับส่วนอื่น ๆ ของต้นพืช ดังนั้นอนุภาคของไวรัสจึงไม่สามารถเข้าไปได้

4. การผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite)

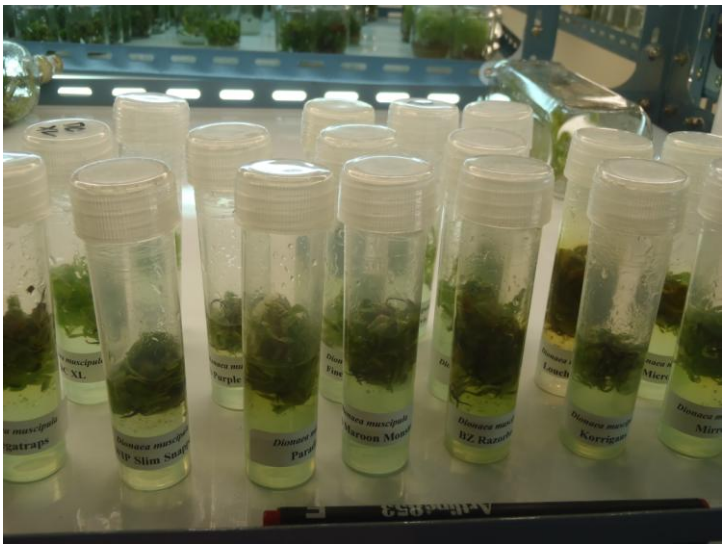
พืชบางชนิดสามารถให้สารที่มีคุณสมบัติทางยา หรือมีประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรม อุตสาหกรรม รวมทั้งการแพทย์ แต่ในบางครั้งปริมาณสารที่ต้องการมีอยู่ในปริมาณน้อยมาก และการเก็บพืชสมุนไพรออกมาจากป่าเป็นจำนวนมากและบ่อยครั้ง อาจทำให้สมุนไพรนั้นสูญพันธุ์ไป จึงต้องใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชมาช่วยในการผลิตเพื่อลดการเก็บสมุนไพรออกจากป่า โดยนำชิ้นส่วนพืชมาเลี้ยงในสภาพแวดล้อมและอาหารที่เหมาะสมก็อาจชักนำให้เกิดการสังเคราะห์สารที่ต้องการได้มากขึ้น ต้นพืชที่ได้ในหลอดทดลองนั้นสามารถนำมาศึกษาทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช เพื่อที่จะสามารถติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย เช่น การศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อพืชต่อสารฆ่าแมลง ยาปราบศัตรูพืช หรือต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และการควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ในหลอดทดลอง จะทำได้ง่ายได้กว่าต้นพืชที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ

5. เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืช (Germplasm conservation, gene bank)

ปัจจุบันมีพืชพรรณหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไปหรือกำลังจะสูญพันธุ์ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมหรือเกิดจากการทำลายของมนุษย์เอง ด้วยเหตุนี้นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงได้พยายามคิดหาวิธีที่จะเก็บรักษาพืชพรรณต่าง ๆ ไว้ในหลอดทดลอง โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของสารชะลอการเจริญเติบโตบางชนิด หรือมีสารที่ทำให้เกิดความเครียดของน้ำขึ้นในหลอดทดลอง ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามาก ๆ เพื่อเป็นการประหยัดแรงงาน เวลา และอาหารในการที่จะต้องทำการย้ายเนื้อเยื่อพืชบ่อย ๆ จนกว่าเมื่อใดที่ต้องการจะเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อนั้นสามารถย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชชนิดนั้น ๆ อีกวิธีหนึ่งก็คือ การเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชไว้ในไนโตรเจนเหลวที่ อุณหภูมิต่ำถึง -196 $^{\circ}$C ในสภาพเช่นนี้เซลล์และเนื้อเยื่อจะคงสภาพและมีชีวิตอยู่ได้ยาวนาน

6. **เพื่อการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชระหว่างประเทศ**

การเก็บรักษาสายพันธุ์พืชในรูปแบบต่างๆ เช่น เมล็ดเซลล์เพาะเลี้ยง เอ็มบริโอ หรือต้นพืชในหลอดทดลองทำให้สะดวกต่อการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชกับต่างประเทศเพราะสะอาดปราศจากเชื้อโรค นอกจากการแลกเปลี่ยนสายพันธุ์พืชแล้ว ปัจจุบันการผลิตพืชหลายชนิดเพื่อการค้าในต่างประเทศหลายบริษัทที่เปิด website ทาง internet ซึ่งเป็นอีกหนึ่งช่องทางการตลาด ได้มีการซื้อขายพืชในสภาพปลอดเชื้อในลักษณะของ tube หรือ flask ที่ทำด้วยพลาสติก และมีน้ำหนักเบาเพื่อลดค่าใช้จ่ายในการขนส่ง ซึ่งไม่ค่อยมีปัญหาในการนำเข้าพันธุ์พืช เนื่องจากต้นพืชอยู่ในสภาพที่ปลอดเชื้อแล้ว ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1.1 ต้นพืชในหลอดทดลอง (tube) ที่ใช้สำหรับแลกเปลี่ยนพันธุ์

หรือซื้อ- ขายพันธุ์พืชระหว่างประเทศ

บรรณานุกรม

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

อรดี สหวัชรินทร์. 2542. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา.

บทที่ 2

ห้องปฏิบัติการ วัสดุอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ปัจจุบันมีห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเกิดขึ้นหลายแห่งทั้งในประเทศและต่างประเทศ ซึ่งได้มีการสร้างขึ้นเพื่อทำการศึกษาวิจัยและเพื่อการพาณิชย์ ดังนั้นห้องปฏิบัติการจึงต้องมีความสะอาดและเป็นห้องที่ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด เพื่อไม่ให้เนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเกิดการตายเพราะสาเหตุจากการปนเปื้อนของเชื้อราหรือแบคทีเรีย ซึ่งจะส่งผลให้เห็นถึงความสำเร็จของงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยเฉพาะการทำเพื่อเป็นการค้า ห้องปฏิบัติการที่ออกแบบได้ดี อาจมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ไม่ถึง 1% ส่วนห้องปฏิบัติการที่ออกแบบไม่เหมาะสมอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนได้มากกว่า 50% จะทำให้สูญเสียแรงงาน เวลา และค่าใช้จ่ายไปโดยไม่จำเป็น อย่างไรก็ตามการเลือกทำเลที่จะสร้างห้องปฏิบัติการต้องคำนึงถึงสิ่งต่อไปนี้คือ

1. ควรเลือกทำเลที่มีฝุ่นละอองน้อยที่สุด และอยู่ห่างจากแหล่งปนเปื้อนได้ง่าย ไม่ควรตั้งอยู่ริมถนน หรือโรงงานอุตสาหกรรมที่ทำให้เกิดฝุ่นผงมาก

2. ควรมีระบบไฟฟ้าที่ดี และควรมีเครื่องกำเนิดไฟฟ้าสำรอง (stand by generator) รวมทั้งมีเครื่องตัดไฟฟ้าอัตโนมัติในกรณีที่ผิดปกติ เพื่อป้องกันเครื่องใช้ไฟฟ้าต่างๆเสียหาย เนื่องจากกระแสไฟฟ้าตกหรือกระชาก

3. ควรอยู่บริเวณที่มีแหล่งน้ำสะอาด มีระบบน้ำที่ดีและเพียงพอสำหรับการปฏิบัติงาน

4. ควรเลี่ยงพื้นที่ ที่มีความชื้นเกินไป เพราะความชื้นจะทำให้เกิด การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ค่อนสูงในการเพาะเลี้ยง และควรห่างไกลจากพื้นที่ที่มีการเลี้ยงสัตว์ หรือโรงเรือนเพาะเห็ด

5. ควรอยู่ในสถานที่ที่สามารถใช้ระบบควบคุมอุณหภูมิได้

6. ควรห่างจากจุดที่มีการสัญจรไปมาคับคั่ง

การออกแบบห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การวางผังห้องปฏิบัติการให้เหมาะสมนั้น ผู้ออกแบบควรคำนึงถึงวิถีการปฏิบัติงานโดยทั่วไปของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งสามารถแบ่งพื้นที่ออกเป็นส่วนๆ ได้ดังนี้

1. ห้องสำหรับศึกษาวิจัย จะใช้เป็นห้องที่มีตำรา หรือเอกสารทางวิชาการสำหรับการค้นคว้าวิจัยและเขียนผลงาน ภายในห้องอาจมีคอมพิวเตอร์หรือเครื่องพิมพ์ เพื่อเก็บข้อมูล

2. ห้องสำหรับเตรียมอาหารและล้างวัสดุอุปกรณ์ จะแบ่งพื้นที่สำหรับการปฏิบัติงานดังนี้

2.1 พื้นที่สำหรับล้างวัสดุอุปกรณ์ ซึ่งจะเป็นบริเวณที่ใช้สำหรับล้างเครื่องมือ เครื่องใช้และเครื่องแก้วต่างๆที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ส่วนนี้ไม่จำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิและควรเป็นพื้นที่โล่ง อุปกรณ์หลักสำหรับบริเวณนี้คือ อ่างซิงค์สำหรับล้างภาชนะต่างๆ และมีตะแกรงตากสำหรับภาชนะหรือเครื่องแก้วที่ล้างเรียบร้อยแล้ว ในส่วนนี้อาจใช้วางหม้อนึ่งความดัน (autoclave) สำหรับนึ่งอาหารเพาะเลี้ยงได้ และหม้อนึ่งความดันสำหรับขวดหรือภาชนะที่มีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ ก่อนที่จะนำไปล้างทำความสะอาด ดังนั้นพื้นและผนังควรใช้วัสดุที่ทนต่อการเปียกชื้นสามารถล้างทำความสะอาดง่าย พื้นไม่ควรใช้วัสดุที่มีลักษณะลื่นเพราะอาจเกิดอันตรายได้ ที่สำคัญต้องมีทางระบายน้ำที่ต่อเชื่อมลงกับระบบบำบัดน้ำเสีย

2.2 พื้นที่สำหรับเก็บสารเคมีและเครื่องแก้วต่างๆ ซึ่งต้องเป็นพื้นที่แห้ง มีระบบระบายอากาศดี เนื่องจากสารเคมีบางชนิดอาจมีกลิ่นรบกวนผู้ปฏิบัติงาน หรือสารเคมีบางชนิดอาจเกิดความชื้นได้ ควรมีตู้สำหรับเก็บสารเคมีให้เป็นหมวดหมู่ ทำให้หยิบใช้ได้ง่าย โดยตู้อาจวางกับพื้นหรือติดผนังก็ได้ พื้นที่ส่วนนี้ไม่จำเป็นต้องปรับอุณหภูมิเนื่องจากสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใหญ่สามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องปกติได้แต่ไม่ควรให้แสงแดดส่องผ่านเข้ามาโดยตรงเนื่องจากสารเคมีบางชนิดเสื่อมสภาพง่ายเมื่อโดนแสง สำหรับสารเคมีบางชนิดที่ต้องเก็บอุณหภูมิต่ำอาจใช้ตู้เย็นแทนได้

2.3 พื้นที่สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ควรเป็นที่แห้งเช่นกัน แต่อาจมีอ่างซิงค์ขนาดเล็กได้ เพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงาน เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ต้องใช้มีทั้งเครื่องมือที่มีความจำเป็นมาก ได้แก่ อุปกรณ์สำหรับตวงปริมาตร ภาชนะสำหรับเตรียมและตักแบ่งอาหาร อุปกรณ์ที่ให้ความร้อนสำหรับต้มวุ้นให้ละลาย อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ตู้เย็น และเครื่องมือที่ช่วยในการอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงาน ได้แก่ ตู้อบความร้อน เครื่องกรองน้ำ ชุดกรองพร้อมแผ่นกรอง และอาจจะมีโต๊ะขนาดใหญ่สำหรับเตรียมอาหารและเตรียมสารละลาย stock solution (ภาพที่ 2.1)

ภาพที่ 2.1 พื้นที่สำหรับการเตรียมอาหาร

3. ห้องสำหรับย้ายเนื้อเยื่อพืช

พื้นที่ส่วนนี้ต้องแห้ง มีความสะอาด และปลอดเชื้อมากที่สุด ไม่ควรมีลมโกรก ดังนั้นควรจะปิดกั้นห้องให้สนิท และให้มีคนผ่านเข้าออกน้อยที่สุดเท่าที่จำเป็น การปฏิบัติงานในพื้นที่ส่วนนี้จะเป็นการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น หรือการย้ายเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งต้องมีเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆที่จำเป็นมาก เช่น ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ อุปกรณ์ประจำตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ส่วนอุปกรณ์ที่ช่วยในการอำนวยความสะดวก เช่น กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบเซลล์และเนื้อเยื่อ และเครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บรวมเซลล์สำหรับวัดปริมาณเซลล์ (ภาพที่ 2.2)

ภาพที่ 2.2 ห้องย้ายเนื้อเยื่อพืช (บริษัทแอร์ออร์คิด)

4. ห้องสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในการออกแบบห้องนี้ควรคำนึงถึงอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ สภาพแสง และลักษณะชั้นวางต่างๆ ซึ่งสิ่งต่างๆเหล่านี้ขึ้นอยู่กับขนาดของห้อง ตำแหน่งที่ตั้งของห้อง และชนิดของเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยง ถ้าเป็นห้องปฏิบัติการที่ไม่ใหญ่นัก ห้องนี้อาจจัดอยู่ร่วมกับห้องย้ายเนื้อเยื่อได้ ในทำนองเดียวกันห้องนี้ต้องมีความปลอดเชื้อสูงมากเช่นกัน และรักษาความสะอาดเป็นพิเศษ จึงควรเป็นห้องที่มีคนผ่านน้อยที่สุด โดยทั่วไปแล้วห้องเพาะเลี้ยงควรเป็นห้องที่ปิดสนิทสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ อาจออกแบบโดยให้มีช่องแสงธรรมชาติผ่านได้บ้าง แต่ไม่ควรมีแสงแดดส่องตรงมายังชั้นวางเนื้อเยื่อ เพราะแสงแดดจะทำให้อุณหภูมิในขวดเพาะเลี้ยงสูงจนถึงขั้นเป็นอันตรายกับพืชได้ (ภาพที่ 2.3)

ภาพที่ 2.3 ห้องปฏิบัติการที่ออกแบบโดยการให้มีแสงจากธรรมชาติผ่านได้บ้าง

อุปกรณ์และเครื่องมือที่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ห้องเตรียมอาหาร ควรมีอุปกรณ์และเครื่องมือ ดังนี้

- เครื่องชั่ง มีทั้งแบบอย่างหยาบ คือ ชั่งน้ำหนักต่ำสุด 0.01 กรัม และอย่างละเอียดชั่งได้ต่ำถึง 0.001 กรัม หรือ 0.0001 กรัม

- ช้อนตักสารเคมี มีทั้งแบบที่เป็นโลหะและที่เป็นพลาสติก

- เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง

- เตาอุ่นความร้อนและเครื่องคน ใช้สำหรับอุ่นหรือหลอมอาหารพร้อมด้วยตัวคนระบบแม่เหล็ก

- เตาอบไมโครเวฟ ใช้สำหรับเคี่ยวหรือหลอมอาหาร นอกจากนี้สามารถใช้เตาลวดความร้อนหรือเตาแก๊สแทนได้ ในกรณีที่เตรียมอาหารคราวละมากๆ เตาแก๊สจะเหมาะสมกว่า

- ตู้เย็น สารเคมีบางตัวมีความจำเป็นที่จะต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เพราะมิฉะนั้นแล้วจะทำให้เสื่อมคุณสมบัติ ได้ เช่น ฮอร์โมน วิตามิน รวมทั้งสารละลายเข้มข้นของอาหาร

- เตาอบความร้อน ใช้สำหรับอบฆ่าเชื้อที่ติดมากับเครื่องมือ หรืออุปกรณ์ที่สามารถทนต่อความร้อนสูงๆ ได้ เช่น พวกที่เป็นเครื่องแก้วและโลหะ โดยอาศัยความร้อนที่ใช้ คือ ประมาณ 180 เวลา ^{o}C นานประมาณ 3 ชั่งโมง

- หม้อนึ่งความดัน ใช้สำหรับนึ่งฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเครื่องมือที่ไม่สามารถทนต่อความร้อนของเตาอบความร้อนได้ ความดันที่ใช้ประมาณ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลานานประมาณ 15 นาที (ภาพที่ 2.4)

ก. ข.

ภาพที่ 2.4 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

ก. แบบใช้แก๊ส ข. แบบใช้ไฟฟ้า

- เยื่อกรอง เนื่องจากมีสารเคมีบางชนิดที่ไม่สามารถผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันได้ ทำให้เสื่อมคุณภาพได้ จึงต้องกรองโดยมีรูกว้างประมาณ 0.22 ไมครอน ซึ่งสามารถกรองเอาอนุภาคของแบคทีเรียและสปอร์ของราได้

- เครื่องแก้วต่างๆ เช่น หลอดทดลอง ขวด ขวดรูปชมพู่ ปิเปต กรวยแก้ว แท่งแก้วคนสาร

2. ห้องย้ายเนื้อเยื่อพืช ควรมีอุปกรณ์และเครื่องมือ ดังนี้

- ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ เป็นตู้กรองอากาศให้บริสุทธิ์ปลอดจากอนุภาคของราและแบคทีเรีย

- ตะเกียง ใช้ตะเกียงแอลกอฮอล์ หรือแก๊ส

- กระดาษกรอง

- จานแก้ว

- มีดผ่าตัดแบบต่างๆ พร้อมใบมีด

- ปากคีบ

3. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ควรมีอุปกรณ์และเครื่องมือ ดังนี้

- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ ภายในห้องจะต้องมีอุณหภูมิประมาณ 25-27 ^{o}C

- ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งมีขนาดที่เหมาะสมสะดวกต่อการทำงานหรือติดตามการปนเปื้อนและการเจริญเติบโต ชั้นต้องไม่สูงเกินไป ขนาดความสูงของแต่ละชั้นควรสูงประมาณ 18 นิ้ว และชั้นล่างสุดควรอยู่สูงจากพื้นประมาณ 4 นิ้ว และต้องมีหลอดไฟให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่ให้ความสว่างประมาณ 1000-3,000 ลักซ์

- เครื่องตั้งเวลา ใช้สำหรับตั้งเวลาในการปิดเปิดไฟ เพื่อกำหนดความยาวของช่วงแสง

- เครื่องเขย่า สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพอาหารเหลว เพื่อให้ชิ้นส่วนพืชได้รับอากาศบ้าง เครื่องเขย่ามีหลายแบบ และหลายขนาดให้เลือกใช้งาน มีทั้งที่เป็นการเขย่าแบบแนวราบ (horizontal shaker) และแบบแนวนอน (vertical shaker) (ภาพที่ 2.5)

ภาพที่ 2.5 เครื่องเย่า

ในการออกแบบห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้ประสบความสำเร็จ และเหมาะสม สามารถใช้ในการปฏิบัติงานได้จริงนั้นยังต้องคำนึงถึงเงินทุนที่ใช้ด้วย ซึ่งการออกแบบห้องปฏิบัติการเพื่อเชิงการค้ากับห้องปฏิบัติการเพื่องานวิจัยนั้นมีความแตกต่างกันมาก ดังนั้นผู้ออกแบบต้องทำความเข้าใจกับจุดนี้ให้ดีเสียก่อน

กิจกรรม

นักศึกษาฝึกปฏิบัติออกแบบห้องปฏิบัติการ โดยวาดแผนผัง แสดงการแบ่งห้องภายในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทีช

บรรณานุกรม

คำนูญ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 162 หน้า.

สนธิชัย จันทร์เปรม และ เสริมศิริ จันทร์เปรม. 2549. เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการเกษตร. ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ. คณะเกษตร กำแพงแสน ร่วมกับศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

บทที่ 3

เทคนิคการทำให้ปลอดเชื้อจุลินทรีย์

เทคนิคการทำให้ปลอดเชื้อจุลิทรีย์ (Aseptic Technique) เป็นเทคนิคที่มีความสำคัญอย่างมากสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เริ่มตั้งแต่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะห้องย้ายเนื้อเยื่อและห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งต้องมีความสะอาดอยู่ตลอดเวลา มีรองเท้าและเสื้อกราวด์ที่สะอาดสำหรับเปลี่ยนก่อนที่จะเข้าไปทำงานเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์จากภายนอกมาเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ ประตูหรือหน้าต่างควรปิดสนิทเพื่อป้องกันฝุ่ละอองเข้ามา อุปกรณ์ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควรเก็บอยู่ในตู้ที่มีประตูปิดเพื่อป้องกันฝุ่นละอองเช่นกัน

อุปกรณ์ที่สำคัญและมีความจำเป็นมากที่สุดสำหรับห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือตู้ปลอเชื้อ ซึ่งมีหลายแบบและมีราคาแตกต่างกันไปตั้งแต่ชนิดที่ราคาถูกสามารถใช้งานได้ในระดับหนึ่ง จนถึงชนิดที่มีราคาแพงมากและใช้กับงานบางประเภทที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง ตู้ปลอดเชื้อที่นิยมใช้กันในปัจจุบันเป็นแบบ larminar air flow cabinet เนื่องจากราคาถูกและง่ายต่อการติดตั้ง แต่อย่างไรก็ตามหลักการทั่วไปสำหรับตู้ปลอดเชื้อคือ การเป่าอากาศผ่านแผ่นกรองซึ่งมี 2 ชนิดคือ แผ่นกรองหยาบ และแผ่นกรองละเอียดที่มีขนาดช่องเปิดเล็กกว่าขนาดของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งแผ่นกรองละเอียดที่นิยมใช้มากในปัจจุบันคือ HEPA filter (High Efficiency Particulate Air) มีขนาด 0.2 ไมโครเมตร ดังนั้นอากาศที่ได้จึงสะอาดปราศจากเชื้อโรค 99.97% ความเร็วลมที่ใช้เป่าอากาศผ่านแผ่นกรองจะอยู่ที่ประมาณ 90 ฟุตต่อนาที ภายในตู้ย้ายเนื้อเยื่อจะมีการติดตั้งหลอด UV เพื่อใช้สำหรับฆ่า เชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นก่อนเข้าปฏิบัติงานภายในตู้ ต้องเช็ดทำความสะอาดตู้ปลอดเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% และเปิด UV ก่อนประมาณ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ให้หมดไป และเปิดเครื่องเป่าอากาศไว้ 15-30 นาที เพื่อไล่อากาศเก่าที่ค้างอยู่ภายในตู้ให้หมด เมื่อปฏิบัติงานเสร็

แล้วก็ต้องเช็ดทำความสะอาดและเปิด UV ทิ้งไว้ 30 นาทีเช่นกัน (คำนูณ, 2542; สนธิชัยและเสริมศิริ, 2549)

วิธีการทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์

1. การฆ่าเชื้ออาหารและภาชนะที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยง

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงนั้นจำเป็นต้องปลอเชื้อ เพราะในอาหารมีส่วนประกอบของสารอาหารและน้ำตาลที่ช่วยให้เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้ดี และเจริญเร็วกว่าเนื้อเยื่อพืช ซึ่งอาจจะไปทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช โดยการปล่อยสารพิษออกมาในอาหาร ดังนั้นอาหารจึงต้องมีความปลอดเชื้อก่อนการนำไปใช้ โดยใช้วิธีการฆ่าเชื้อดังนี้

1.1 การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้น (Moist heat sterilization)

แบบไม่ใช้ความดันไอน้ำ (Sterilization by stream)

เป็นการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำเดือด เหมาะสำหรับการฆ่าเชื้อของเหลว เช่น อาหารเลี้ยงเพาะเลี้ยงที่ไม่ต้องการให้สารอาหารสูญเสียคุณค่า โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการฆ่าเชื้อเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส นาน 1-1.5 ชั่วโมง ซึ่งมีงานวิจัยกับการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้พบว่า การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารด้วยหม้อนึ่งไอน้ำเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง อาหารจะปลอดเชื้อจุลินทรีย์ได้เหมือนกับการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำเป็นเวลา 20 นาที โดยที่อัตราการติดเชื้อจุลินทรีย์ไม่มีความแตกต่างกัน กล้วยไม้เอื้องพร้าวที่เลี้ยงในอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำนาน 1 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตดีที่สุดเนื่องจากคุณค่าอาหารที่เสื่อมไปด้วยความร้อนมีน้อยกว่า ดังนั้นการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยหม้อนึ่งไอน้ำสามารถใช้ทดแทนการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับประชาชนทั่วไปที่อยากจะทำการขยายพันธุ์กล้วยไม้ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างง่าย (จักรกริชและคณะ, 2554)หรือพืชชนิดอื่นที่สนใจ โดยไม่ต้องใช้เงินลงทุนที่สูง

แบบใช้ความดันไอน้ำ (Sterilization by stream under pressure)

การฆ่าเชื้อแบบนี้ไม่เหมาะที่จะใช้กับภาชนะหรือวัตถุที่สลายหรือเสียหายได้ง่าย เนื่องจากใช้อุณหภูมิสูงโดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ใช้แก๊สจะต้องเริ่มจับเวลาเมื่ออุณหภูมิและความดันถึงจุดที่ต้องการ เมื่อครบเวลาแล้วจึงปล่อยให้ความดันลดลงเองจนถึงระดับบรรยากาศปกติ ถ้ารีบร้อนในการลดความดันอาจทำให้ของเหลวต่างๆกระเด็นออกนอกภาชนะได้ วิธีการฆ่าเชื้อด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ประหยัดต้นทุนที่สุด แต่ถ้าใช้หม้อนึ่งไฟฟ้าจะมีระบบทำงานอัตโนมัติ ซึ่งไม่ต้องเสียเวลาในการเฝ้าดูเพื่อจับเวลา สามารถไปปฏิบัติงานอย่างอื่นก่อนได้ แต่หม้อนึ่งแบบนี้มีราคาค่อนข้างสูง

ถ้าไม่มีต้นทุนสำหรับการซื้อหม้อนึ่งความดันไอน้ำไม่ว่าจะแบบธรรมดาหรือแบบใช้ไฟฟ้า อาจใช้หม้อตุ๋นหรือหม้อนึ่งอาหารแบบธรรมดาก็ได้ เพียงแต่เพิ่มระยะเวลาในการฆ่าเชื้อให้นานขึ้น

ข้อควรระวังของการนึ่งอาหารด้วยวิธีการใช้ความร้อนชื้นคือ สารบางชนิด เช่น ฮอร์โมนพืช อาจจะสลายตัวได้เมื่อใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไป วิธีแก้ไขอาจต้องฆ่าเชื้อด้วยวิธีการกรองแล้วค่อยนำมาผสมกับอาหารที่อุณหภูมิไม่สูงมาก หรือสารบางชนิดมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้เมื่อนึ่งปนกับสารชนิดอื่น วิธีแก้ไขทำได้โดยการนึ่งแยกต่างหากแล้วค่อยนำมาผสมกัน

ข้อเสียของการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

1. อาจทำให้ค่า pH ของอาหารเปลี่ยนแปลงได้
2. อาหารจะมีสีน้ำตาล ถ้าใช้เวลาในการนึ่งนานเกินไป และอาจเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยง
3. การใช้ระยะเวลานานอาจทำให้เกลือตกตะกอน

4. สารบางชนิดจะถูกทำลาย เช่น GA_3 ยาปฏิชีวนะ เอ็นไซม์

1.2 การทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธีการกรอง (Sterilization by Filtration)

เป็นวิธีการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลายที่สามารถเสื่อมสภาพได้ง่ายเมื่อได้รับความร้อนสูง โดยเฉพาะสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดที่ใช้กับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้แก่ GA_3 zeatin ABA หรือวิตามินบางชนิด ซึ่งวิธีการกรองจะอาศัยหลักการกรองผ่านแผ่นกรอง (Filter) ที่มีรูขนาดเล็กมากและสามารถยึดจับเซลล์ หรือสปอร์ของเชื้อราและแบคทีเรียไม่ให้ผ่านออกไปได้ ยกเว้น เชื้อไวรัสที่ไม่สามารถใช้วิธีการนี้ได้เนื่องจากมีขนาดเล็กกว่า ขนาดของรู (Pore sizes) ของแผ่นกรองที่ใช้คือ 0.22 ไมโครเมตร ซึ่งมีชุดกรองแบบที่ใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้งกับชุดกรองที่ใช้ซ้ำและเปลี่ยนแผ่นกรองซึ่งต้องนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้

ในกรณีที่ต้องเตรียมอาหารปริมาณมากและต้องกำจัดเชื้อโดยการกรอง ต้องใช้ชุดกรองขนาดใหญ่ทำให้มีต้นทุนสูง ดังนั้นอาจจะต้องมีการเตรียมอาหารที่ยังไม่ได้ใส่สารที่สลายตัวง่ายลงไปแล้วนึ่งฆ่าเชื้อปกติ แล้วจึงละลายสารดังกล่าวในตัวทำละลายที่เหมาะสมจากนั้นจึงกรองด้วยแผ่นกรองก่อนที่จะตวงให้ได้ปริมาตรตามต้องการ แล้วเติมลงในอาหารที่ยังอุ่นอยู่ได้โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ

2. การฆ่าเชื้อเครื่องมือและอุปกรณ์

นอกจากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้องปลอดเชื้อแล้ว อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆที่ใช้ในการปฏิบัติงานต้องปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเช่นกัน อุปกรณ์เหล่านี้ได้แก่ จานแก้ว ใบมีด ด้ามมีด ปากคีบ ตะแกรงกรอง ที่วางอุปกรณ์ กระดาษ (ใช้แทนจานแก้ว) กระดาษทิชชู ผ้าสะอาดสำหรับเช็ดภายในตู้ เป็นต้น ซึ่งสามารถนำมาฆ่าเชื้อได้ดังนี้

2.1 การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนความร้อนแห้ง (Dry heat sterilization)

การฆ่าเชื้อด้วยวิธีนี้สามารถใช้กับอุปกรณ์ที่เป็นแก้วหรือโลหะ สำหรับจานเลี้ยงเชื้ออาจห่อด้วยกระดาษฟอยด์ก่อนเข้าอบ ซึ่งใช้อุณหภูมิประมาณ 160-180 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3 ชั่วโมง สำหรับกระดาษ สำลี หรือพลาสติกชนิดที่ทนอุณหภูมิสูงเกิน 100 องศาเซลเซียส ไม่ควรฆ่าเชื้อโดยการอบแห้งแต่สามารถนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนชื้นได้

หลักการทำงานของการฆ่าเชื้อโดยวิธีนี้คือ ความร้อนจะไปทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ของโปรตีนของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งความร้อนจะถูกส่งผ่านอากาศเข้าไปโดยตรง ดังนั้นจึงต้องใช้ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อนาน 2-3 ชั่วโมง

2.2 การฆ่าเชื้อโดยใช้รังสี (Sterilization by Radiation)

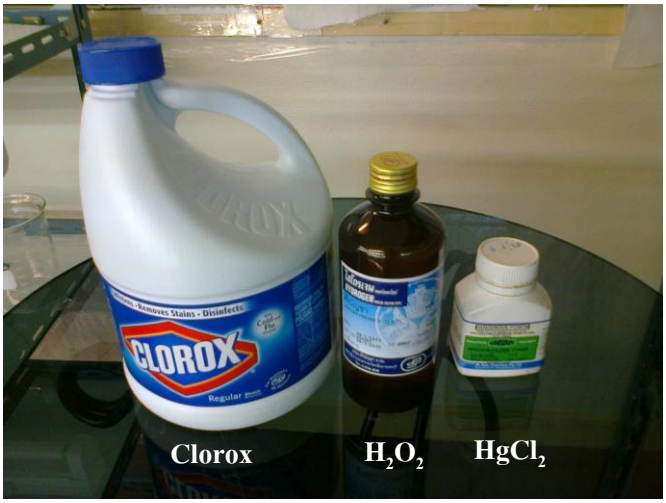
ส่วนใหญ่ไม่เป็นที่นิยมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากค่าใช้จ่ายสูงมากเมื่อเทียบกับการใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อ การใช้รังสี เช่น UV ซึ่งมีอำนาจทะลุทะลวงต่ำ สามารถฆ่าเชื้อได้เฉพาะที่บริเวณผิวเท่านั้น ก่อนเข้าปฏิบัติงานในตู้ปลอดเชื้อมักจะเปิด UV เพื่อฆ่าเชื้อก่อน 30 นาที

3. การฆ่าเชื้อที่ผิวพืช

สิ่งที่สำคัญสำหรับการฆ่าเชื้อที่ผิวพืชคือ ต้องทำให้เซลล์พืชยังมีชีวิตอยู่ ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ความร้อนกับเนื้อเยื่อพืชได้ ยกเว้นเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการนั้นถูกห่อหุ้มด้วยเปลือกชั้นนอกที่มีความหนาพอสมควร เช่น ฝักกล้วยไม้ มะเขือเทศ สามารถใช้วิธีการจุ่มแอลกอฮอล์และผ่านเปลวไฟได้ แล้วจึงนำมาผ่าเอาเฉพาะเมล็ดที่อยู่ข้างในได้ อย่างไรก็ตามยังมีวิธีการอื่นที่ดีกว่าคือการใช้สารเคมีชนิดต่างๆ ทีนิยมใช้กันมากคือ sodium hypochlorite 6% ซึ่งซื้อได้ทั่วไปในรูปของน้ำยาซักผ้าขาว เช่น คลอรอกซ์ หรือไฮเตอร์ โดยนำมาผสมกับน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 5-20% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อพืช ถ้าเป็นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะอ่อนและบอบบาง เช่น ใบ อาจ

ใช้ความเข้มข้นที่น้อยลงและใช้ระยะเวลาน้อยกว่าเนื้อเยื่อที่แข็งแรงทนทาน เช่น เมล็ดพืชที่มีขนาดใหญ่ หรือหน่อกล้วย เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีสารฟอกฆ่าเชื้อชนิดอื่นๆอีก ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซิลเวอร์ไนเตรท($AgNO_3$) เมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$)เป็นต้น ซึ่งสารแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพและคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อต่างกัน ดังนั้นความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้จึงต้องพิจารณาตามความเหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดพืชและชิ้นส่วนพืช (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างสารที่ใช้สำหรับฟอกฆ่าเชื้อ

ข้อควรระวังในการปฏิบัติงาน

เนื่องจากการปฏิบัติงานทางด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่ต้องกระทำภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อดังนั้น ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความระมัดระวังในเรื่องต่างๆ ดังต่อไปนี้

1.ควรใช้สารเคมีทุกชนิดด้วยความระมัดระวัง โดยเฉพาะขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ ที่ต้องใช้สารละลายคลอรอกซ์ ซึ่งอาจมีผลต่อหลอดลมและเส้นเลือด และอาจเกิดอาการคันเมื่อถูกผิวหนัง

ห้ามใช้สารนี้ภายใต้แสง UV เพราะจะทำให้คลอรีนแตกตัวระเหยออกมา ส่วนสารเมอคิวริกคลอไรด์ สามารถระเหยเป็นไอได้ที่อุณหภูมิห้อง มีพิษร้ายแรง เป็นอัตรายต่อสุขภาพ

2. แสง UV เป็นอันตรายต่อสายตาและผิวหนัง รวมทั้งอาจทำให้เกิดโอโซนซึ่งเป็นแก๊สพิษ เนื่องจาก UV มีการทำปฏิกิริยากับสารเคมีบางตัว ทำให้มีผลต่อระบบหายใจและตาเกิดการระคายเคืองได้ดังนั้นจึงไม่ควรทำงานขณะที่เปิด UV

2. การปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับการใช้ไฟหรือความร้อน ต้องไม่ประมาทและมีความระมัดระวังสูงมาก โดยเฉพาะการลนไฟเผาอุปกรณ์ เช่น มีด ปากคีบ ไม่ควรจุ่มลงในขวดใส่แอลกอฮอล์ทันที เพราะทำให้ติดไฟได้ สำหรับการทำงานที่เกี่ยวกับการนึ่งฆ่าเชื้ออาหารด้วยแก๊สต้องระมัดระวังอย่างยิ่งและต้องคอยเฝ้าอยู่ตลอดเวลา เพื่อไม่ให้ความดันเกินกำหนดเพราะจะเกิดอัตรายได้ รวมทั้งการทำงานที่เกี่ยวข้องกับการใช้เครื่องไมโครเวฟ ต้องปฏิบัติตามคำแนะนำอย่าเคร่งครัด เนื่องจากการใช้วัสดุบางชนิด เช่น กระดาษฟรอยด์หุ้ม อาจทำให้เกิดการระเบิดและกระจกแก้วแตกได้ อาจเป็นอันตรายกับตัวเราหรือบุคคลที่อยู่ใกล้เครื่องไมโครเวฟ

3. ก่อนการทำงานทุกครั้งควรล้างมือและแขนให้สะอาดทุกครั้งด้วยสบู่ เช็ดด้วยผ้าสะอาดและใช้แอลกอฮอล์ 70% ฉีดพ่นฆ่าเชื้อที่มือและแขน

กิจกรรม

นักศึกษาฝึกปฏิบัติในการเลือกและแยกชนิดของวัสดุอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อทำให้ปลอดเชื้อจุลินทรีย์

บรรณานุกรม

คำนูญ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 162 หน้า.

จักรกริช อนันตศรัณย์ รียะ ปังเตะและอัศรา อิหมำหมาด. 2554 ผลของเทคนิคการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเอื้องพร้าว. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. 4(1):1- 9.

สนธิชัย จันทร์เปรม และ เสริมศิริ จันทร์เปรม. 2549. เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการเกษตร. ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ. คณะเกษตร กำแพงแสน ร่วมกับศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.สงขลา. 127 หน้า.

บทที่ 4

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการเตรียมอาหาร

อาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายสูตร จะเลือกใช้สูตรใดขึ้นอยู่กับพันธุ์พืช ชนิดและสภาพของชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยง รวมทั้งวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น อย่างไรก็ตามอาหารที่นิยมใช้มากที่สุด คือ อาหารที่ดัดแปลงที่ประกอบด้วยเกลือของธาตุอาหารที่ต้องการครบถ้วน คือ สารประกอบอนินทรีย์ และสารประกอบอินทรีย์ ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง แม้พืชทั้งต้นจะมีความต้องการขั้นพื้นฐานในการเจริญเติบโตไม่ซับซ้อนมากนักก็ตาม แต่การนำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นั้น มีความต้องการธาตุอาหารและสารบางอย่างที่จำเป็นที่มีความซับซ้อนมากกว่า คือ ต้องการทั้งธาตุอาหารหลัก (macro-elements/nutrients) และธาตุอาหารรอง (micro-elements/nutrients นอกจากนี้ยังต้องการธาตุอาหารอื่น ๆ เช่น แหล่งของธาตุคาร์บอน และวิตามินอย่างมาก ปกติแล้วเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่แยกมาเลี้ยงจะต้องการวิตามินและ สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ต่าง ๆ ซึ่งปกติสังเคราะห์ได้เองจากส่วนหนึ่งของต้นเพื่อไปสะสมไว้ยังอีกส่วนหนึ่งของต้นพืช แล้วเคลื่อนย้ายไปยังส่วนอื่นๆ เพื่อใช้ในกระบวนการเมตาโบลิซึม อย่างไรก็ตาม ผลของแต่ละสารประกอบที่จำเป็นนี้ยังไม่เป็นที่ทราบชัดสมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของสารที่ได้จากกระบวนการเมตาโบลิซึม (secondary metabolites) เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารที่ใช้มักถูกดัดแปลงไปตามความมุ่งหมาย เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) และ/หรือ การกำเนิดคัพภะ (embyogenesis) จึงทำให้ยากต่อการหาข้อสรุปพื้นฐานที่สอดคล้องไปในทางเดียวกันได้โดยง่าย

ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. อาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium) เทคนิคที่ใช้ในยุคแรก ๆ นั้น ใช้วุ้น (agar) เพื่อปรับสารละลายอาหารให้มีสภาพเป็นของแข็งมากขึ้น โดยนึ่งในหม้อนึ่งความดันเพื่อหลอมละลายอาหารแล้วเทใส่ภาชนะและทิ้งให้แข็งตัวอยู่ในสภาพอาหารกึ่งแข็ง แต่มักพบว่าคุณสมบัติต่าง ๆ ของสารประกอบเคมีในอาหารอาจไม่ได้รับสูงสุดเท่ากับอาหารเหลว (liquid medium) แต่วุ้นยังคงถูกนำมาใช้แต่จำเป็นต้องดัดแปลงให้เหมาะสม และต้องแน่ใจว่ามีความบริสุทธิ์จริง ๆ ความเข้มข้นของวุ้นที่พอเหมาะสำหรับอาหารแต่ละชนิดจะต้องมีการทดสอบเสียก่อน อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของวุ้นที่ใช้กันแพร่หลายและได้ผลดีคือ 0.7-0.8 % ส่วนสารสังเคราะห์พวก gelatin และ silica gel ได้เคยมีการใช้ และในปัจจุบันมี การพัฒนาสารประกอบพวก acrylamide gels เช่นเดียวกับ starch co-polymers ก็มีการแนะนำมาใช้แทนวุ้น สารเหล่านี้มีข้อดีที่ไม่จำเป็นต้องต้มให้เดือดเพื่อช่วยให้ละลายน้ำได้ แต่ยังมีปัญหาในเรื่องการปรับค่า pH สำหรับสารที่เป็นผงถ่าน (charcoal) จะถูกเติมในอาหารหลายสูตร เพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตเนื่องจากสามารถดูดซับสารพิษพวก toxic metabolites ที่เกิดจากเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงได้ดี

2. อาหารเหลว (liquid medium) อาหารเหลวเป็นที่นิยมใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเนื้อเยื่อจะจมหรือแขวนลอยอยู่บนกระดาษกรองที่จุ่มในอาหารเหลวตลอดเวลา ในทางปฏิบัติอาจใช้ glass wool ช่วยพยุงเนื้อเยื่อที่เลี้ยงได้เช่นกัน เช่นเดียวกับการใช้ fabric support (100 % polyester) ที่อิ่มตัวด้วยอาหารเหลว ซึ่งจะช่วยในการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานเกิดได้ดีขึ้น เนื้อเยื่อที่จมอยู่ในอาหารเหลวอาจต้องใช้ความเร็วที่ 1 - 150 รอบต่อนาที (rpm) เพื่อช่วยในการหายใจ

ส่วนประกอบของอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (สนธิชัยและเสริมศิริ, 2549)

โดยทั่วไปแล้วอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะประกอบด้วย น้ำ ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังอาจมีสารอื่นๆ เพิ่มเติมได้อีก เช่น กรดอะมิโนชนิดต่างๆ ยาปฏิชีวนะ antioxidant adsorbent ต่างๆ สารอาหารที่ทำให้แข็งตัว เช่น วุ้น และสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว (ซึ่งสารเหล่านี้ไม่สามารถระบุองค์ประกอบที่ชัดเจน) สารต่างๆที่เติมลงไปในอาหารเหล่านี้จะช่วยให้ชิ้นส่วนของพืชมีการเจริญเติบโตและพัฒนาไปในแนวทางที่ต้องการได้ โดยมีส่วนประกอบของอาหารดังต่อไปนี้

1. น้ำ (water)

ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะประกอบด้วยน้ำประมาณ 95 % ในการทำงานวิจัยควรใช้น้ำที่บริสุทธิ์สะอาด เช่น น้ำกลั่น หรือน้ำกรองระบบ reverse osmosis การใช้น้ำประปาที่ไม่ผ่านการกรองจะมาตุต่างๆปนอยู่มาก ซึ่งจะไปรบกวนองค์ประกอบทางเคมีของสิ่งต่างๆที่ใส่เข้าไปในอาหารได้

2. วุ้น (agar)

เนื้อเยื่อพืชส่วนมากจะเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีวุ้นซึ่งหน้าที่ช่วยพยุงเนื้อเยื่อให้ตั้งอยู่ได้บนอาหาร ในกรณีที่เลี้ยงในอาหารเหลวจะวางบนเครื่องเขย่า หรือเลี้ยงบนสะพานกระดาษกรอง (filter paper bridge) เพื่อให้เนื้อเยื่อได้รับอากาศเพียงพอ วุ้นเป็นส่วนประกอบแพงที่สุด ในอาหารผลิตจากสาหร่ายทะเลทำให้อาหารแข็งตัว วุ้นเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) มีโมเลกุลใหญ่ วุ้นที่มีคุณภาพสูง เช่น difcoitek Agar มีราคาแพงมากปราศจากสิ่งเจือปน ในห้องปฏิบัติการบางแห่งใช้วุ้นประกอบอาหารแทนได้ วุ้นจาก Difco Bacto มักใช้ในปริมาณ 0.6 - 1.0 % เหมาะสำหรับการเลี้ยงแคลลัส ส่วนอะกาโรสเจล (agarose gel) หรือวุ้นสังเคราะห์ใช้เลี้ยงเซลล์เดี่ยวหรือโพรโทพลาสต์ วุ้นสังเคราะห์เหล่านี้จะทำให้เกิดปัญหาการฉ่ำน้ำ (vitrification) ของเนื้อเยื่อพืช

ผลิตภัณฑ์ใหม่ของบริษัทซิกมา (Sigma) ชื่อ อะการ์เจล (Agargel) ช่วยลดปัญหานี้ได้ การใช้วุ้นในปริมาณที่ต่ำ (0.5 %) จะทำให้อาหารไม่แข็งตัวไหลไปมาได้ โดยเฉพาะเมื่อมีpHต่ำจึงไม่สามารถพยุงเนื้อเยื่อพืชไว้ได้ แต่ถ้าใช้วุ้นในปริมาณที่สูง (1.0 %) จะทำให้อาหารแข็งมากจนไม่สามารถให้น้ำเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของพืช และยังทำให้พืชดูดอาหารไปใช้ได้ยาก

3. แหล่งคาร์บอน (carbon sources)

เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารทุกสูตร เป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นมากต่อการเจริญเติบโต เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชยังไม่มีการสังเคราะห์แสงในสภาพหลอดทดลอง หรือมีการสังเคราะห์แสงในอัตราที่ต่ำเนื่องจากได้รับแสงน้อย และมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์จำกัด น้ำตาลที่นิยมใช้ คือ ซูโครส (sucrose) ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่พืชสังเคราะห์ได้เอง และ มีความจำเป็นอย่างมากต่อเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิด โดยปกติมักใช้ในปริมาณ 3 - 5 % และมีหลักฐานชี้ว่าการสร้างสารเมตาโบไลท์บางชนิดในเนื้อเยื่อที่เลี้ยง เป็นผลมาจากความเข้มข้นของซูโครส สำหรับน้ำตาลชนิดอื่น เช่น กลูโคส (glucose) และฟรุคโตส (fructose) มีการใช้บ้างปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของพืช โดยทั่วไปพืชจะเจริญเติบโตดีขึ้นเมื่อได้รับปริมาณ น้ำตาลเพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่ง จากนั้นการเพิ่มปริมาณน้ำตาลมากขึ้นอีกจะลดการเจริญเติบโตลง น้ำตาลอาจเปลี่ยนรูปได้เมื่อถูกนึ่งฆ่าเชื้อ นอกจากนี้น้ำตาลพอลิแซ็คคาไรด์อาจเปลี่ยนเป็น มอโนแซ็ดคาไรด์ เมื่อเกิดการแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolysis)

4. เกลืออนินทรีย์ (inorganic salt)

ธาตุอาหารมีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชรองลงมาจากน้ำตาล แยกออกได้เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการมาก (macro nutrients) ได้แก่ ธาตุอาหารหลัก 6 ชนิด คือ N P K Ca Mg S และธาตุอาหารที่พืชต้องการน้อย (micro nutrients) หรือธาตุอาหารรอง ได้แก่ Fe Cu Zn Mo B กรณีของ Fe นั้นมักจะใช้ในรูปของ NaFeEDTA แม้ว่าสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในระยะแรกจะเหมาะสมต่อการเลี้ยงเซลล์และ แคลลัส แต่ในระยะต่อมา เช่น สูตรของ Murashige

and Skoog (MS), Gamborg B-5 และของ Miller ได้รับการพัฒนาให้เหมาะต่อการเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืชได้กว้างขวางมากขึ้น ทั้งยังมีผลดีอย่างมากในการกระตุ้นการกำเนิดอวัยวะ โดยมีการกำหนดปริมาณเกลืออนินทรีย์ให้เหมาะต่อการเจริญของเซลล์ที่เลี้ยง ในแต่ละพืช และในบางกรณีเฉพาะต่อแต่ละพันธุ์ โดยปกติสารละลายเกลืออนินทรีย์ของ Murashige and Skoog (MS-salt solution) ถูกใช้เป็นส่วนผสมหลักเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เลี้ยง สาเหตุหนึ่งคือ เกลือสูตรนี้มีความเข้มข้นสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง NH^{4+} อิออน และ ธาตุอื่น ๆ บางชนิดมีปริมาณที่สูงมาก ซึ่งจำเป็นต่อเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิดที่จะพัฒนา ทั้งยังพบว่า $NaH_2PO_4.2H_2O$ ในสูตรอาหาร MS ยังให้ผลดีแก่เนื้อเยื่อพืชบางชนิด ธาตุอาหารรองที่ใช้ในสูตรอาหารโดยปกติมีการเจือปนของธาตุอื่นและให้ ธาตุอาหารหลัก N, P และ K เพิ่มเติมในปริมาณที่น้อยมาก แต่คุณภาพของธาตุอาหารรองเองก็มีส่วนสำคัญไม่น้อย ในเกลือสูตร MS นั้น มีปริมาณธาตุอาหารรองค่อนข้างสูงเป็นพิเศษเมื่อเทียบกับสูตรอื่น โดยเฉพาะการมีสาร chelating agents เช่น EDTA ยังเป็นหลักประกันว่า ธาตุเหล็กจะมีประโยชน์ในปริมาณที่มากพอ แม้ว่าจะมี pH เปลี่ยนแปลงไปอย่างมากก็ตาม

5. วิตามิน (Vitamins)

พืชสามารถสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตได้ทุกชนิด แต่เซลล์พืชที่เลี้ยงในสภาพหลอดทดลองต้องการวิตามินเพิ่ม โดยเฉพาะวิตามินบี 1 เพื่อช่วยในการพัฒนา ให้เป็นปกติ วิตามินที่ใช้ เช่น วิตามินบี 1 (thiamine) วิตามินบี 2 (riboflavin) วิตามินบี 5 (pantothenic acid) วิตามินบี 6 (pyridoxine)วิตามินเอ็ม (folic acid) วิตามินเอช (biotin) และวิตามินอี (tocopherol) วิตามินเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่างๆในเซลล์พืช วิตามินเหล่านี้มีความจำเป็นมากสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีจำนวนน้อยๆ อย่างไรก็ตาม วิตามินในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ใช้กันนั้นมักจะใช้ตามกันมากกว่าจะมีการพิสูจน์หรือทดสอบก่อนว่ามีความจำเป็น อย่างแท้จริงหรือไม่ มีเพียง thiamine-HCl เท่านั้นที่มีความจำเป็น และเป็นที่ต้องการในการเจริญเติบโตหรือการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน (morphogenesis)

6. ค่าความเป็นกรดและด่างของอาหาร (pH of nutrient medium)

pH ที่เหมาะสมของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 5.0 - 6.5 ถ้าต่ำมากไป (<4.5) หรือสูงมากเกินไป (>7.6) จะทำให้พืชหยุดการเจริญเติบโต ถ้า pH สูงกว่า 6 จะทำให้อาหารแข็งมาก ถ้า pH ต่ำกว่า 5 อาหารวุ้นจะอ่อนตัว ไม่เหมาะในการพยุงเนื้อเยื่อพืช นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและ การเลือกกระตุ้นของอาหารที่ใช้เลี้ยงนั้นจะขึ้นอยู่กับ pH ด้วย ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงอาหารที่มีค่า pH สูงหรือต่ำเกิน เนื่องจากจะไปขัดขวางการนำธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ไปใช้ ตัวอย่าง pH ที่เป็นด่าง (>7.0) หรือเป็นกรดจัด (<4.0) ทำให้กรดจิบเบอเรลลินไม่เป็นประโยชน์ได้ การเติมสารประกอบ EDTA ลงในอาหารอาจมีความสำคัญในการรักษาความเป็นประโยชน์ของธาตุเหล็กและธาตุ โลหะอื่น ๆ เนื่องจาก pH จะเปลี่ยแปลงไปตลอดเวลาขณะเพาะเลี้ยง

7. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulators)

ฮอร์โมนที่สร้างขึ้นในต้นพืช (plant hormones) ทำหน้าที่กระตุ้นและมีส่วนร่วม ในกระบวนการต่าง ๆ ที่นำไปสู่การพัฒนาของต้นที่เป็นปกติการเจริญเติบโตตลอดจน การเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ เนื้อเยื่อ และ secondary metabolism เป็นผลมาจากฮอร์โมนเหล่านี้ทั้งสิ้น การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารจึงอาจไม่จำเป็นเสมอไปโดยเฉพาะในการเลี้ยงแคลลัส อย่างไรก็ตามโดยปกติจะมีส่วนช่วยในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและ/หรือการกำเนิดอวัยวะ และมีเนื้อเยื่อพืชไม่กี่ชนิดที่สร้างแคลลัสได้ในอาหารที่ปราศจาก สารควบคุมการเจริญเติบโต

ฮอร์โมนกลุ่มออกซินและไซโทไคนินมีความสำคัญที่สุด พืชบางชนิดสร้างสารเหล่านี้อยู่แล้ว แต่ควรเพิ่มเข้าไปในอาหารเพื่อช่วยให้การเจริญดีขึ้น บางครั้งอาจต้องใช้จิบเบอเรลลิน หรือเอทิลีน การเก็บฮอร์โมนพืชมักเก็บในตู้เย็นในรูปสารละลายเข้มข้น การนำฮอร์โมนพืชไปใช้อาจมีปัญหาการทำละลายของฮอร์โมนพืชในน้ำ การละลายออกซินควรทำในด่าง เช่น 0.1 KOH ไซโท

ไคนินก็เช่นเดียวกัน แต่จิบเบอเรลลินละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ ออกซินและไซโทไคนินที่เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นควรเก็บไว้ในที่มืด หรือใส่ขวดสีชาเพราะจะเสื่อมสภาพเมื่อได้รับแสง

ฮอร์โมนกลุ่มออกซิน (auxin) จะช่วยเพิ่มขนาดของเซลล์ มักใช้ร่วมกับไซโทไคนินเพื่อช่วยใน การแบ่งเซลล์ การสร้างราก แต่การเจริญของรากจะถูกยับยั้งถ้ามีออกซินในปริมาณที่สูง ฮอร์โมนกลุ่มนี้ ได้แก่ IAA (indole acetic acid) IBA (indole butyric acid) NAA (naphthalene acetic acid) 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) ใช้ในช่วง 0.01- 10 มก/ล.

ฮอร์โมนกลุ่มไซโทไคนิน (cytokinin) ไซโทไคนินที่สังเคราะห์ได้ในธรรมชาติ คือ ซีอะทิน (zeatin) ใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโต ไซโทไคนินที่ใช้กันมากคือ ไคเนทิน (kinetin) 2iP (N6-isopentenyl adenine) BAP (benzyl aminopurine) มีหน้าที่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์โดยเฉพาะถ้าใช้ร่วมกับออกซิน ถ้าใช้ในความเข้มข้นสูงขึ้นจะช่วยในสร้างราก แต่ยับยั้งการเจริญของรากส่งเสริมการสร้างยอดโดยลดผลจากการที่ตายอดข่มตาข้าง มีบทบาทในการเปลี่ยน สภาพเซลล์เป็นอวัยวะได้และชักนำให้เกิดเป็นต้น ไซโทไคนินทนความร้อนได้ดีจึงมักเติมในอาหารก่อนฆ่าเชื้อ บทบาทของออกซินและไซโทไคนินในพืชทั้งต้นและในสภาพหลอดแก้วอาจจะเหมือนกันหรือไม่เหมือนกันก็ได้

จิบเบอเรลลิน (gibberellin) ฮอร์โมนพืชกลุ่มนี้มี 60 กว่าชนิด แต่ GA3 เป็นชนิดที่ใช้มากที่สุด จิบเบอเรลลินไมค่อยใช้กันมากนักในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีบทบาทในการชักนำให้ปล้องยาวขึ้นหลังจากการสร้างยอด ช่วยให้เนื้อเยื่อเจริญมีการเจริญเติบโตและช่วยในการงอกของเมล็ด ไม่ควรนำฮอร์โมนชนิดนี้มาฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน เพราะจิบเบอเรลลินส่วนหนึ่งจะเสื่อมสลายไปเมื่อได้รับความร้อน ควรทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้เครื่องกรองเมมเบรน

แอบซาซิกแอซิค (ABA; abscisic acid) มักยับยั้งการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อแต่ในบางครั้งพบว่า ABA ส่งเสริมการเจริญของแคลลัส และการเกิด เป็นต้นใหม่ และการเกิดเป็นต้น

ใหม่ ควรทำให้สารนี้ปลอดเชื้อโดยใช้เครื่องกรองเมมเบรน เอบีเอมีบทบาทเกี่ยวกับ การสังเคราะห์ไซโทไคนินและเป็นตัวต่อต้านการทำงานของ จิบเบอเรลลิน

เอทิลีน (ethylene) อวัยวะพืช แคลลัส หรือเซลล์ในสภาพหลอดแก้วมีการผลิตเอทิลีน จึงไม่ควรปิดหลอดแก้วแน่นเกินไปเพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของแก๊สนี้ ผลของเอทิลีนมีทั้งส่งเสริมและยับยั้งการเจริญเติบโต การเลี้ยงเนื้อเยื่อในที่มีแสง จะมีการสะสมเอทิลีนมากกว่า ในที่มืด ถ้ามีมากเกินไปจะทำให้เกิดการฉ่ำน้ำของพืชได้ แก๊สนี้ยังเป็นสาเหตุของการแก่ของเนื้อเยื่อพืช

8. สารอินทรีย์ (organic salt)

สารอินทรีย์จากผักหรือผลไม้ที่สำคัญมากคือ น้ำมะพร้าว น้ำส้ม น้ำมะเขือเทศ สารสกัดจากยีสต์ น้ำแอปเปิล กล้วยบด สารเหล่านี้ไม่ควรใช้ในงานวิจัย เนื่องจากไม่ทราบส่วนประกอบแน่นอน และระยะที่นำมาใช้

สารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ เช่น กรดอะมิโน ช่วยส่งเสริม การเจริญเติบโต และทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงพร้อมที่จะเกิดเป็นต้นได้ เช่น แคซีนไฮโดรไลเซท (casein hydrolysate) 0.1 - 1.0 มก/ล. ทริพโทน (tryptone) 0.25 - 2.00 มก/ล. และสารสกัดจากมอลท์ (malt extrat) 0.5 - 10 มก/ล. สารเหล่านี้ประกอบด้วยวิตามินและกรดอะมิโน ส่วนสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ซึ่งมีวิตามินบีสูงมักใช้ในปริมาณ 0.25 - 2.00 มก/ล. ดังตารางที่ 3

9. อะดีนิน (adenine)

การใส่อะดีนินในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประโยชน์คือ ช่วยในการเพิ่มปริมาณยอด

10. ผงถ่าน (activated charcoal)

มักใช้ในความเข้มข้น 0.2 - 3.0 % ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ผงถ่านมี ความสามารถในการดูดซับสารบางตัวออกจากอาหารได้ เนื่องจากผงถ่านมีช่องว่างที่ ละเอียดมาก มีพื้นที่ผิวในช่องว่างสูง

จึงใช้ผงถ่านในการดูดซับสารพิษ เช่น สารประกอบฟีนอล (phenol) เอทิลีน ทำให้ปริมาณสารดังกล่าวในอาหารลดลง เช่น การดูดซับฮอร์โมนหรือ สารประกอบฟีนอล ซึ่งเป็นพิษกับเซลล์ นอกจากนี้อาจใช้ผงถ่านในระยะที่เกิดรากเพื่อลดแสงบริเวณราก และทำให้รากเจริญเติบโตได้ดี ผงถ่านจึงสำคัญต่อการสร้างเป็นต้นใหม่ สารที่มีคุณสมบัติเหมือนกันกับผงถ่าน คือ PVP (polyvinyl pyrolidone) ก็สามารถดูดซับสาร ฟีนอลได้ หรือการเติม diethyl-dithiocarbonate (DIECA) จะช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นได้

ปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง

นอกจากสูตรอาหารซึ่งเป็นปัจจัยทางเคมีในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว ยังมีปัจจัยทางเคมีที่ถูกมองข้ามไปคือ ปัจจัยทางเคมีที่อยู่ในช่องว่างอากาศในภาชนะที่เพาะเลี้ยง ปัจจัยเหล่านี้ระบุได้ไม่ชัดเจน และควบคุมได้ไม่ง่ายนัก แต่จากการวิจัยในระหลังพบว่าสิ่งเหล่านี้มีผลมากมายต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ปัจจัยที่ต้องคำนึงคือ

1. ความชื้น

ความชื้นในภาชนะปิดของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะอยู่ประมาณ 95-100% ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งการคายน้ำ การลำเลียงแร่ธาตุอาหารของพืช ถ้ามีการเพิ่มปริมาณวุ้นในอาหารมากขึ้นจะมีผลทำให้ความชื้นสัมพัทธ์ลดลง ซึ่งมักใช้ในกรณีที่ต้องการเตรียมพืชออกปลูกในสภาพธรรมชาติ เป็นการกระตุ้นให้พืชมีการคายน้ำมากขึ้น และเร่งการดึงดูดธาตุอาหารผ่านระบบท่อลำเลียงตามธรรมชาติ

2. ก๊าซต่างๆ

เกิดขึ้นเนื่องจากระบบ metabolism ของพืชเอง และการแลกเปลี่ยนก๊าซระหว่างภาชนะและห้องเพาะเลี้ยง ถ้าไม่พันฝาให้แน่นด้วยพลาสติก ระบบเพาะเลี้ยงจะไม่เป็นระบบปิด 100% จะมีการแลกเปลี่ยนก๊าซเกิดขึ้นได้บ้าง อย่างไรก็ตามพบว่ามีการสะสมของก๊าซเอธิลีน และก๊าซอื่นใน

ภาชนะเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งถ้ามีก๊าซเอธิลีนมากเกินไปจะยับยั้งการเจริญและการพัฒนาของต้นพืช ต่อมาภายหลังมีหลายบริษัทพยายามที่จะออกแบบภาชนะเพาะเลี้ยงให้มีรูระบายอากาศเพื่อลดการสะสมของก๊าซดังกล่าว

3. ภาชนะเพาะเลี้ยง

จะใช้เป็นเครื่องป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอก รูปทรงปิดของภาชนะจะเป็นตัวกันสิ่งที่อยู่ด้านในจากระบบภายนอกก่อให้เกิดเป็นสภาพแวดล้อมพิเศษขึ้นภายในภาชนะ ซึ่งมีผลโดยตรงต่อพืชที่จะเลี้ยง คุณสมบัติที่เหมาะสมของภาชนะเพาะเลี้ยงมีดังนี้

- ทำด้วยวัสดุที่แสงส่องผ่านได้ดี
- ป้องกันการสูญเสียน้ำของเนื้อเยื่อพืชที่อยู่ด้านในได้
- ป้องกันการติดเชื้อปนเปื้อนจากภายนอก
- มีการระบายอากาศได้เหมาะสม
- สามารถนึ่งฆ่าเชื้อได้ หรือเป็นภาชนะที่ใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง (disposable) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาก่อนแล้ว

ด้วยคุณสมบัติหลักเหล่านี้ทำให้ภาชนะที่ใช้กันอยู่ทั่วไปมีความแตกต่างกันอย่างมากในแง่ของรูปทรง ความกว้างหรือความแคบของปากภาชนะ และภาชนะที่เห็นได้ชัดเจนจะเป็นวัสดุที่อาจเป็นแก้ว polystyrene polycarbonate หรืออื่นๆ ซึ่งแต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันออกไป รูปแบบของภาชนะที่เลือกใช้จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการถ่ายเทอากาศภายในขวดบริเวณเหนือเนื้อเยื่อ กับอากาศเพาะเลี้ยง ซึ่งอาจเป็นได้ตั้งแต่ไม่มีการแลกเปลี่ยนก๊าซเลยในภาชนะที่ปิดแน่นสนิท หรือมีการแลกเปลี่ยนก๊าซได้อย่างอิสระโดยใช้ภาชนะที่ออกแบบเป็นพิเศษให้มีรูระบายอากาศ

การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะมีธาตุอาหารที่เป็นสารอนินทรีย์หลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดใช้ในปริมาณน้อย โดยเฉพาะธาตุอาหารรองที่เป็น micronutrients ทำให้การชั่งสารเพื่อเตรียมอาหารในแต่ละครั้งทำได้ยากและมีความคลาดเคลื่อน ดังนั้นการเตรียม stock solution จะช่วยแก้ปัญหานี้ได้ โดยการเตรียมให้มีความเข้มข้นมากกว่าสูตรจริง 10-100 เท่า

สูตรอาหารที่นิยมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การที่จะตัดสินใจว่าจะเลือกอาหารสูตรใด เพื่อมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ต้องคำนึงถึงสายพันธุ์ อายุพืช ชิ้นส่วนที่ใช้ โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยง แต่ถ้ามีวัตถุประสงค์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ จะใช้สูตรอาหารที่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปกติ เพื่อให้ต้นที่ได้มีลักษณะเหมือนต้นแม่ ตัวอย่างสูตรอาหารที่เป็นที่นิยม และใช้ได้ผลดีมี

1. สูตร VW (Vacin and Went, 1949) ใช้กับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

2. สูตร MS (Murashige and Skoog; 1962) สามารถใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้เกือบทุกชนิด

3. สูตร Hidebrandt (1962) ใช้เพาะเลี้ยงแคลลัสยาสูบ

4. สูตร White (1963) ใช้เพาะเลี้ยงส่วนราก

5. สูตร Miller (1963) ใช้เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าว

6. สูตร Y 3 (Eeuwens; 1967) ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตระกูลปาล์ม เช่น มะพร้าวกะทิ อินทผาลัม ปาล์มน้ำมัน

7. สูตร B5 (Gamborg; 1970) ใช้เพาะเลี้ยงพืชสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ถั่วเหลือง เป็นต้น

8. สูตร WPM (Lloyd and McCown: 1980) ใช้เพาะเลี้ยงพืชที่เป็นไม้เนื้อแข็ง (Woody species)

กิจกรรม

นักศึกษาฝึกปฏิบัติเกี่ยวกับการเตรียม stock solution และเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

พร้อมอภิปรายผลร่วมกัน

บรรณานุกรม

บุญยืม กิจวิธารณ์. 2540. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.165 หน้า.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

สถาบันวิจัยและฝึกอบรมเกษตรลำปาง. 2556. ความรู้ทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/Tissue Culture (วันที่ค้นข้อมูล : 22 มีนาคม 2556).

สนธิชัย จันทร์เปรม และ เสริมศิริ จันทร์เปรม. 2549. เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการเกษตร. ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ. คณะเกษตร กำแพงแสน ร่วมกับศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

บทที่ 5

เทคนิคการเตรียมชิ้นส่วนพืชและการแยกเนื้อเยื่อพืช

ปัจจัยสำคัญที่สุดปัจจัยหนึ่งที่มีบทบาทต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือ การเตรียมชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาพาะเลี้ยง สภาพทางพันธุกรรมพืชหรือ genotype ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อพฤติกรรมการเจริญเติบโต กล่าวคือ พืชที่มีการเติบโตช้าหรือขยายพันธุ์ได้ง่ายในธรรมชาติ จะยังคงมีการเจริญเติบโตช้าและออกรากยากในสภาพปลอดเชื้อเช่นกัน เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวเป็นเพียงแค่เพิ่มประสิทธิภาพของความสามารถต่างๆที่มีอยู่ในพืชเท่านั้น ไม่อาจสร้างความสามารถใหม่ที่พืชนั้นไม่มีในสภาพธรรมชาติได้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีพันธุกรรมต่างกันจะให้ผลต่างกันเสมอ (สุรวิช, 2533) ในการเตรียมเนื้อเยื่อพืชจะพิจารณาดูส่วนต่างๆของพืชที่สามารถจะนำมาใช้ได้ เช่น ดอก ใบ ตายอด ตาข้าง ราก ลำต้น เมล็ด หรือไหล (rhizome) เป็นต้น ซึ่งแต่ละอาจจะต้องใช้วิธีการเตรียมที่ต่างกัน เมื่อเลือกชิ้นส่วนของพืชได้แล้ว ขั้นต่อไปก็คือ การนำมาทำความสะอาดหลายๆครั้งและตัดบริเวณที่ไม่ต้องการออกไป เลือกเฉพาะส่วนที่ดีไม่มีโรค

อิทธิพลของสภาพเนื้อเยื่อก่อนการเพาะเลี้ยง (Pre-conditioning effects)

(สถาบันวิจัยและฝึกอบรมเกษตรลำปาง. 2556)

สภาพของเนื้อเยื่อพืชก่อนที่จะนำมาเพาะเลี้ยงนั้นอาจมีผลต่อการเจริญและการพัฒนาการไปเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

1. ฤดูกาล

ช่วงแสง อุณหภูมิ และปัจจัยสภาพแวดล้อมอื่น ๆ ที่แตกต่างกันในการเพาะเลี้ยงจะมีผลต่อการเกิดอวัยวะ ช่วงระยะเวลาการดูแลรักษา ตลอดจนการให้ปุ๋ย และสารเคมีที่ใช้ รวมทั้ง ตำแหน่งของเนื้อเยื่อที่แยกออกมาจากต้นในแต่ละฤดูกาลมาใช้ก็มีผลเช่นเดียวกัน

2. ธาตุอาหาร

ความอุดมสมบูรณ์ของดิน และธาตุอาหารที่พืชได้รับ อาจมีผลต่อความแข็งแรง สุขภาพ และศักยภาพของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาใช้ โดยเฉพาะการใส่ปุ๋ยในช่วงก่อนแยกเอาเนื้อเยื่อมาใช้ อาจมีผลทำให้การตอบสนองของเนื้อเยื่อเปลี่ยนแปลงได้

3. แสง

ความเข้มแสงที่พืชได้รับน้น อาจทำให้การตอบสนองของเนื้อเยื่อและเซลล์พืชเปลี่ยนแปลงไปได้ ตัวอย่างในยาสูบ ความเข้มข้นแสงที่เพิ่มมากขึ้นทำให้มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ขณะที่การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชบางชนิด โดยเฉพาะ โพรโทพลาสมีความต้องการแสงน้อยลงหรือต้องการสภาพมืด

4. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

การให้สารควบคุมการเจริญเติบโตก่อนแยกเนื้อเยื่อพืชมาใช้ มักช่วยกระตุ้นการตอบสนองให้ดีขึ้น ตัวอย่างใช้กรดจิบเบอเรลลิก (GA3) เพื่อชักนำให้เกิด juvenile tissues ที่ง่ายต่อการเพาะเลี้ยงในยาสูบ และส้ม หรือใช้สารชะลอการเจริญเติบโต (growth retardants) เช่น CCC (B-chloroethyl-trimethyl ammonium chloride) ในใบมะเขือเทศ ทำให้ความแข็งแรงของเนื้อเยื่อลดลง

5. การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

การลดปริมาณจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยง โดยใช้สารเคมีต่าง ๆ เช่น สารกำจัดเชื้อรา (fungicides) สารปฏิชีวนะ (antibiotics) เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย สารกำจัดไวรัส (antiviral agents เช่น virozol) การใช้ความร้อน (heating) หรือการอบแห้ง (drying out) อาจทำให้ความชีวิตและความแข็งแรงของเนื้อเยื่อลดลงได้ โดยปกติแล้ว พืชทีปลูกในเรือนควบคุมสภาพแวดล้อม (growth chamber หรือ controlled room) มักให้ชิ้นส่วนพืชที่สะอาดและปลอดโรค จึงเหมาะต่อการใช้เพาะเลี้ยงมากกว่าพืชที่ปลูกในเรือนปลูกพืชทดลอง หรือในสภาพไร่ ซึ่งยากต่อการหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจาก จุลินทรีย์และเชื้อโรค

การคัดเลือกต้นแม่พันธุ์เพื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. พันธุ์พืช เมื่อเลือกชนิดพืชที่ต้องการทำได้แล้ว ควรพิจารณาเลือกสายพันธุ์พืชไว้หลายๆสายพันธุ์ เนื่องจากความแตกต่างกันของพันธุกรรมคือ บางพันธุ์อาจขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อง่ายกว่าพันธุ์อื่น ซึ่งโดยทั่วไปพืชที่สามารถขยายพันธุ์ง่ายด้วยวิธีการปักชำ มักจะขยายพันธุ์ได้ง่ายด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเช่นกัน

2. สภาพของต้นแม่พันธุ์ ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นควรนำมาจากต้นแม่ที่แข็งแรง ไม่มีโรคเข้าทำลาย จะทำให้ประสบความสำเร็จมากกว่าการนำชิ้นส่วนพืชมาจากต้นพันธุ์ที่อ่อนแอ แต่ในกรณีที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ อาจจะต้องทำการดูแลต้นแม่พันธุ์ในโรงเรือนก่อน โดยมีการฉีดสารเคมีป้องกันกำจัดโรค จนกระทั่งต้นแม่พันธุ์มีความแข็งแรงดี และมีการแตกยอดหรือใบใหม่ จึงนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนพืชได้

การพิจารณาเลือกชิ้นส่วนของพืชมาเพาะเลี้ยง

1. ขนาดของชิ้นส่วนพืช

เนื้อเยื่อพืชที่มีขนาดใหญ่จะมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ต่าง ๆได้ง่าย ขณะที่เนื้อเยื่อขนาดเล็กมีโอกาสหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนได้มากขึ้น อย่างไรก็ตาม ขนาดของเนื้อเยื่อที่เล็กที่สุดที่มีประสิทธิภาพ เป็นสิ่งที่ควรพิจารณา เนื่องจากเนื้อเยื่อเจริญที่มีขนาดเล็กเกินไปอาจโตช้า และไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเท่ากับเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ ในทางปฏิบัตินิยมเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีขนาดเล็กหลาย ๆ ชิ้นรวมกันในขวดเดียวกัน เพื่อกระตุ้นให้มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงมากขึ้น โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสซึ่งจะโตเร็วกว่าการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเพียงชิ้นเดียว แต่อาจต้องย้ายเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้งขึ้น ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองทั้งเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่าย รวมทั้งมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มากขึ้นด้วย

2. ชนิดของชิ้นส่วนของพืช

ทุกส่วนของพืชประกอบด้วยเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่สามารถนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ แต่ความสามารถในการเจริญเติบโตนั้นอาจแตกต่างกันไป เนื่องจากเซลล์แต่ละชนิดมีความตื่นตัว

(active) ไม่เท่ากัน เนื้อเยื่อพืชที่มีเซลล์ตื่นตัวมากที่สุดคือเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ซึ่งพบได้ในส่วนต่าง ๆ ดังนี้

2.1 ส่วนปลายยอด (shoot apex) เป็นบริเวณที่เซลล์มีการแบ่งตัวมากที่สุด ส่วนนี้นับจากปลายยอดสุดลงมาไม่เกิน 5 มิลลิเมตร

2.2 ส่วนปลายราก (root apex) ถัดจากส่วนของหมวกราก ก็จะมีส่วนที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญคล้ายกับส่วนของปลายยอด

2.3 เนื้อเยื่อเจริญในท่อลำเลียง (vascular cambium) เป็นเนื้อเยื่อเจริญที่พบในส่วนของลำต้นและราก ซึ่งอยู่ระหว่างกลุ่มของท่ออาหาร และท่อน้ำ

2.4 เนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ระหว่างปล้อง (intercalary meristem) ซึ่งจะพบในพืชพวก ใบเลี้ยงเดี่ยว ทำหน้าที่ในการเพิ่มความยาวของปล้อง

2.5 เนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ ที่สามารถนำทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่

- ส่วนของเปลือกชั้นใน (inner bark) ซึ่งส่วนนี้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อของชั้น phloem และ cortex

- ส่วนไส้ (pith) เป็นส่วนที่ในใจกลางสุดของลำต้นซึ่งประกอบด้วยเซลล์พวก parenchyma

- ใบ (leaf) ในส่วนของใบมีเซลล์ของแผ่นใบที่เรียกว่า palisade parenchyma และ spongy parenchyma อยู่จำนวนมาก ซึ่งนิยมใช้สำหรับแยกโพรโทพลาสต์

- ดอก (flower) ส่วนของดอกส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์พวก parenchyma ยกเว้นในส่วนของก้านดอก (peduncle) และฐานรองดอก (receptacle) ซึ่งอาจมีเนื้อเยื่อเจริญอยู่ด้วย ยกตัวอย่างในฐานรองดอกของเยอบีร่าและ เบญจมาศที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดี

- ผล (fruit) เนื้อเยื่อของผลส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์พวก parenchyma โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลสด (fleshy fruit) ชนิดที่ผลมีเปลือกหุ้มผลนิ่มทั้งผล มักมีเมล็ดมากมาย (berry) เช่น กล้วย มะละกอ ละมุด ส่วนผลมีผนังชั้นนอกของเปลือกหุ้มผล พัฒนามาจากฐานรองดอก เมื่อผลแก่ผนัง

นี้จะแข็งและเหนียวแน่น ภายในผลนิ่มทั้งผล (pepo) เช่น พืชตระกูลแตง เป็นต้น และผลที่มีเปลือกหนาคล้ายหนังและมีต่อมน้ำมันจำนวนมาก ข้างในผลแยกเป็นส่วนๆ ชัดเจน (hesperidium) เช่น พืชตระกูลส้ม เป็นต้น

- เมล็ด (seed) ในส่วนของเมล็ดซึ่งประกอบด้วยคัพภะ (embryo) ใบเลี้ยง (cotyledon) และ endosperm ทั้งสามส่วนนี้ให้ความสำเร็จสูงในการเพาะเลี้ยง

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช

ชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงจะต้องผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจมีติดอยู่ที่บริเวณผิวของเนื้อเยื่อออกไปก่อนด้วยสารฆ่าฟอกฆ่าเชื้อ (sterilizing agent) ซึ่งมีอยู่หลายชนิด การเลือกชนิดของสารดังกล่าวรวมทั้งระยะเวลาในการฟอกที่เหมาะสม สำหรับเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงและอาจจะต้องมีการทำการทดลอง สารเคมีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการใช้คือ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorte) แคลเซียมไฮโปคลอไรต์ (calcium hypochlorite) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) เป็นต้น สำหรับเมอร์คิวริกคลอไรด์ ก็สามารถใช้ได้ดี แต่มีอันตรายมากกว่าสารข้างต้น

ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้น้ำยาฟอกผ้าขาวที่มีชื่อการค้าคือ Clorox ซึ่งมีโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 5.25 % อัตราที่ใช้ คือ 10-20 % สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์จะทำงานได้ไม่ดีเมื่อมี pH มากกว่า 8 และจะมีประสิทธิภาพสูงที่สุดเมื่อสารละลายมี pH 6 และเพื่อให้การทำงานของคลอรีนมีประสิทธิภาพมากขึ้นในการฆ่าเชื้อบริเวณผิวพืช ควรเติมน้ำยาล้างจานหรือสบู่เหลวเข้าไปในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ เช่น Tween20 2 - 3 หยด ในขณะที่ทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวพืช ต้องเขย่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ตลอดเวลาหรืออาจวางบนเครื่องเขย่าได้ เวลาในการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ว่าทนต่อสารละลายคลอรีนนานแค่ไหน ถ้ามีความทนทานมากก็ใช้เวลานานขึ้นได้ มีสารเคมีหลายชนิดและวิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการทำความสะอาดตัวอย่างพืชให้มีความปลอดเชื้อ ซึ่งอยู่ที่ดุลยพินิจในการเลือกใช้ให้เกิดความเหมาะสม กับเนื้อเยื่อพืชและประสิทธิภาพที่จะได้รับ ซึ่งมีแนวทางในการเลือกใช้ ดังนี้

1. สารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพดี ให้เปอร์เซ็นต์ความปลอดเชื้อสูง

2. ราคาไม่แพง และหาซื้อได้ง่าย

3. เตรียมได้ง่าย ไม่มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก

4. ไม่เป็นอันตราย หรือมีอันตรายน้อยที่สุดต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคนและชิ้นตัวอย่างพืช

ตัวอย่างการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนต่างๆของพืช

ชิ้นส่วนปลายยอดและตาข้าง

ตายอดและตาข้างเป็นชิ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) ที่มีการตื่นตัว (active) อยู่ตลอดเวลา เหมาะแก่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งจะมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูง มีขั้นตอนดังนี้

1. ตัดส่วนของปลายยอดหรือตาข้างมาทำการแยกเอาใบและก้านใบออกให้หมด หรือถ้ามีกาบใบที่ห่อหุ้มตาอยู่ก็ให้แกะออกจนสังเกตเห็นส่วนของตา กรณีที่เป็นพืชมีขน ต้องขูดขนออกเบาๆ จากนั้นล้างชิ้นส่วนพืชด้วยสบู่เหลวและล้างน้ำสะอาดหลายๆครั้ง

2. แช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10 % หรือสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 2 % ที่เติม tween-20 ในอัตราส่วน 1-2 หยด ต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร หรือประมาณ 0.01 % เพื่อลดแรงตึงผิวและช่วยให้สารละลายสามารถจับกับผิวพืชได้ดี

3. ทำการเขย่าเป็นระยะ ๆ หรือวางไว้บนเครื่องเขย่าเป็นเวลาประมาณ 10-15 นาที

4. ล้างเอาสารละลายออกด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที

5. ย้ายตัวอย่างไปวางผึ่งบนจานแก้วให้แห้งพอหมาด ๆ แล้วทำการตัดแต่งพืชตัวอย่าง เพื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารต่อไป

ภาพที่ 5.1 ตัวอย่างชิ้นส่วนปลายยอดของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงบนอาหารสังเคราะห์

ชิ้นส่วนของแผ่นใบ

ใบพืชเป็นอวัยวะที่ค่อนข้างจะบอบบางและช้ำง่าย เนื่องจากประกอบด้วยเนื้อเยื่อเพียงไม่กี่ชั้นเซลล์ โอกาสที่เนื้อเยื่อจะตายหรือได้รับอันตราย จากสารเคมีที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อ นั้นมีมาก จึงมีความจำเป็นที่ต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ มีขั้นตอนดังนี้

1. เลือกใบพืชที่มีความสมบูรณ์ ไม่มีโรค มาทำความสะอาดด้วยสบู่เหลวและน้ำสะอาดหลายๆครั้ง เพื่อขจัดคราบฝุ่นและเศษซากของแมลงที่อาจติดอยู่กับใบ และเป็นการช่วยลดแรงตึงผิวของใบด้วย

2. แช่ใบในสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 5 % เวลาประมาณ 5- 10 นาที ทำการเขย่าเป็นระยะ ๆ หรือวางบนเครื่องเขย่า

3. ล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ ประมาณ 5 นาที

4. ย้ายตัวอย่างลงในจานแก้ว เพื่อทำการตัดแต่งตัวอย่าง และทิ้งไว้ให้แห้ง พอหมาด ๆ จึงย้ายลงเลี้ยงในอาหาร

ภาพที่ 5.2 ตัวอย่างชิ้นส่วนใบของต้นกาบหอยแครงบนอาหารสังเคราะห์

ชิ้นส่วนพืชที่เป็นเมล็ด

เมล็ดพืชเป็นอวัยวะที่มีความแข็งแรงทนทานกว่าส่วนอื่น ๆ สามารถทนต่อสารเคมีที่มีความเข้มข้นสูง ๆ ได้ดี จึงเป็นการสะดวกในการฟอกฆ่าเชื้อ ประกอบกับเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเมล็ด คือ คัพภะ และใบเลี้ยง มีสภาพที่มีความปลอดเชื้อสูง จึงเหมาะแก่การใช้ในการเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากเมล็ดพืชมีความแตกต่างกันมาก จึงมีเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อแตกต่างกันด้วยดังนี้

1. การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่มีลักษณะแข็ง มีขั้นตอนดังนี้

1.1 แช่เมล็ดในแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95 % นานประมาณ 5 นาที เพื่อการฆ่าเชื้อที่ติดมากับเมล็ด และช่วยขจัดคราบไขมันบริเวณผิวเมล็ด

1.2 ถ่ายเอาแอลกอฮอล์ออก ผึ่งเมล็ดไว้ให้แห้ง

1.3 แช่เมล็ดในสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 20 % เติม tween-20 ประมาณ 0.01 % ทิ้วไว้ประมาณ 20 นาที

1.4 ทำการล้างเมล็ดด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ ประมาณ 5 นาที

1.5 ย้ายเมล็ดลงเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

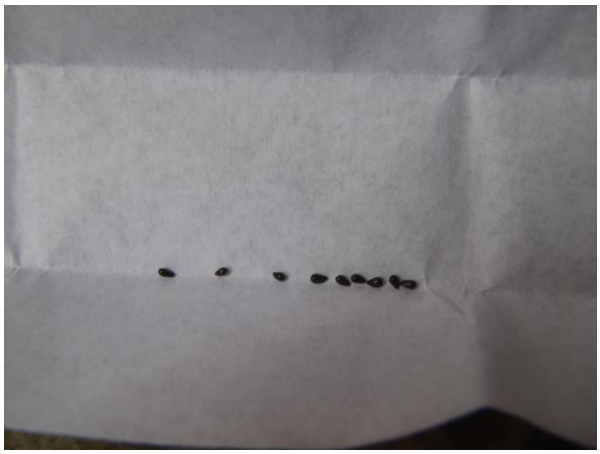
2. การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่มีความอ่อนนุ่มหรือเมล็ดที่ยังไม่แก่เต็มที่ (immature seed) มีขั้นตอนดังนี้

2.1 ถ้าเมล็ดมีเยื่อห่อหุ้ม เช่น เมล็ดมะเขือเทศจะมีลักษณะคล้ายวุ้น หรือเมล็ดมะละกอที่มีผนังเมล็ดที่เป็นเยื่อใส ๆ และสารละลายเหลว ๆ ห่อหุ้มอยู่ ก็ให้ทำการกำจัดออกเสียก่อน เพราะสิ่งดังกล่าวเหล่านั้นเป็นตัวยับยั้งการงอกของเมล็ด

2.2 แช่เมล็ดในสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 15 % เติม tween-20 ประมาณ 0.01 % ทิ้วไว้ประมาณ 15 นาที

2.3 ทำการล้างเมล็ดด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ ประมาณ 5 นาที

2.4 ย้ายเมล็ดลงเลี้ยงในอาหาร



ภาพที่ 5.3 ตัวอย่างชิ้นส่วนเมล็ดของกาบหอยแครง

ชิ้นส่วนพืชที่เป็นกิ่งไม้

ส่วนของกิ่งไม้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่ยังมีชีวิตที่จะใช้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ ก็คือ กลุ่มเนื้อเยื่อของท่อลำเลียงอาหาร เนื้อเยื่อแคมเบียม และเนื้อเยื่อตรงใจกลางของ ลำต้น ซึ่งเนื้อเยื่อดังกล่าวอยู่ในส่วนภายในของกิ่งหรือลำต้น ซึ่งมีสภาพที่ปลอดเชื้ออยู่แล้ว ฉะนั้นการฟอกฆ่าเชื้อจึงทำเฉพาะผิวนอกเท่านั้น ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. นำส่วนของกิ่งหรือลำต้นมาลนไฟ หรือจุ่มแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 % ก่อนแล้วเผาไฟ ก็จะสามารถฆ่าเชื้อที่ติดมากับผิวของตัวอย่างได้

2. ใช้มีดผ่าและตัดแยกเอาเฉพาะเนื้อเยื่อที่ยังมีชีวิตอยู่ดังกล่าวข้างต้นลงเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง

ชิ้นส่วนพืชที่เป็นดอก

การเพาะเลี้ยงอับเรณูมีวัตถุประสงค์เพื่อการผลิตพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว (haploid plant) จากเซลล์สร้างสปอร์ (microspore mother cell) ที่อยู่ภายในอับเรณู มีขั้นตอนดังนี้

1. เลือกดอกที่ยังตูม โดยที่กลีบเลี้ยงและกลีบดอกยังไม่เปิดออก มาทำการฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 % ทิ้วไว้ให้แห้งพอหมาด ๆ

2. แช่ดอกสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10 % เติม tween-20 ประมาณ 1 - 2 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที โดยเขย่าเป็นระยะ ๆ

3. ล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ ประมาณ 5 นาที

4. ย้ายดอกลงในจานแก้ว ผึ่งให้แห้งพอหมาด ๆ แล้วทำการแกะดอกแยกเอาเฉพาะอับเรณูลงเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง

ภาพที่ 5.3 ตัวอย่างชิ้นส่วนดอกของหยาดน้ำค้าง

กิจกรรม

นักศึกษาฝึกปฏิบัติในการเตรียมตัวอย่างพืชและเลือกชนิดและชิ้นส่วนของพืชเพื่อนำมาเพาะเลี้ยง พร้อมอภิปรายผลร่วมกัน

บรรณานุกรม

สถาบันวิจัยและฝึกอบรมเกษตรลำปาง. 2556. ความรู้ทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/Tissue Culture (วันที่ค้นข้อมูล : 22 มีนาคม 2556).

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2533. เอกสารประกอบการสอนวิชาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กำแพงแสน. นครปฐม

บทที่ 6

ขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

วิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีหลายวิธี (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมเกษตรลำปาง, 2556)

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (shoot tip culture)

บริเวณปลายยอดของพืชจะมีกลุ่มของเนื้อเยื่อเจริญที่สามารถแบ่งตัวตลอดเวลา ดังนั้น การนำเอาเฉพาะเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดไปเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์ เรียกว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (meristem culture) ถ้านำเอาเฉพาะปลายยอดไปเพาะเลี้ยงเรียกว่า การเพาะเลี้ยงปลายยอด หรือถ้ามีจุดกำเนิดของใบติดมาด้วย เรียกว่า shoot tip culture หรือ shoot apex culture

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อธรรมดาสามารถป้องกันและ กำจัดได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราเท่านั้น ส่วนเชื้อไวรัสไม่สามารถกำจัดได้ แต่สามารถเลี้ยงกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสได้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อ เยื่อเจริญ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของพืชจึงเป็นเทคนิคที่ใช้ผลิตต้นพืชปลอดไวรัสได้ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของพืชสามารถทำได้กับพืชเกือบทุกชนิด เนื่องจาก เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดมีขนาดเล็ก จึงจำเป็นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา ช่วยในการตัดเอาเนื้อเยื่อ วิธีการนำเอาเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของพืชแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันไปบ้าง

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบ (leaf culture)

ใบพืชจะประกอบไปด้วยแผ่นใบ และก้านใบ การเจริญเติบโตของใบในระยะเริ่มแรกอยู่ใกล้กับปลายยอด โดยมีจุดกำเนิดของใบเจริญและพัฒนามาเป็นใบ จุดกำเนิดของใบประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญ สามารถแบ่งตัวได้จนถึงระยะหนึ่ง จากนั้นจึงมีการเปลี่ยนแปลงไปเนื้อเยื่อถาวรปฐมภูมิ แผ่นใบประกอบด้วยเนื้อเยื่อเอนปิเดอมิส ทั้งทางด้านบนและด้านล่าง ส่วนระหว่างกลางเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อของเมโซฟิล วิธีการเพาะเลี้ยงใบหรือเนื้อเยื่อจากใบนั้นจะมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่

กับชนิดของใบพืช ส่วนใหญ่ใบที่นำมาเพาะเลี้ยงมักจะใช้ใบที่ยังอ่อนอยู่ ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ เมื่อนำชิ้นส่วนใบมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตไปเป็นแคลลัสหรือเจริญเติบโตเป็นต้นเล็กๆตามบริเวณรอยตัดหรือบนผิวของใบ (ภาพที่ 6.1)

ภาพที่ 6.1 ใบจากต้นกาบหอยแครงที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์

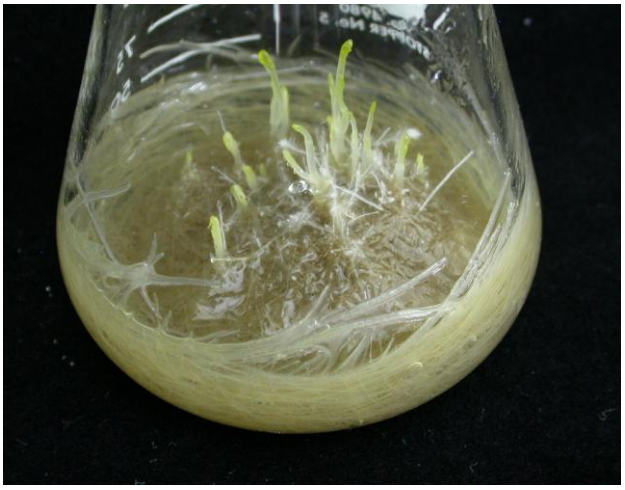
3. การเพาะเลี้ยงราก (Root culture)

การเพาะเลี้ยงรากของพืชเพื่อให้สามารถพัฒนาให้เป็นต้น ซึ่งจะทำได้หรือไม่นั้นไม่สามารถที่จะกำหนดลงไปได้ ถึงแม้ว่าความสำเร็จส่วนใหญ่ที่รายงานได้ทำการเพาะเลี้ยงรากของพืชใบเลี้ยงคู่ที่เป็นไม้เนื้ออ่อนเท่านั้น จึงทำให้เกิดความเข้าใจผิดว่ารากของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหรือพืชไม้เนื้อแข็ง เพาะเลี้ยงยาก แม้แต่พันธุ์ที่อยู่ในสปีชีส์เดี่ยวกันก็มีความแตกต่างกัน

อาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงรากนั้นต้องใส่น้ำตาลซูโครสเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ถ้าเป็นรากของธัญญพืชอาจใช้กูลโคสได้ดี ความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสำหรับของเจริญของรากคือ 5.0 - 5.5 ส่วนความเป็นกรด-ด่าง 6.0 - 6.5 เหมาะสำหรับทำให้เกิดรากแขนงได้ดี ความเข้มของแสงในระดับต่ำ ๆ สามารถทำให้การเจริญได้ดีในรากของพืชบางชนิด รากของพืชบางชนิดอาจถูกยับยั้งการเจริญเติบโตเมื่อได้รับแสง อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25 - 27 องศาเซลเซียส

การนำเอารากของพืชที่ปลูกอยู่ในเรือนเพาะชำหรือในแปลงปลูก มาทำการเพาะเลี้ยงนั้นจะมีปัญหาในการทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อรา และแบคทีเรียจะอาศัยอยู่ตามรอยแตกของรากและบางทีก็อาศัยอยู่ระหว่างเซลล์ของพืช การกำจัดเชื้อจุลิน ทรีย์จึงอาจทำอันตรายแก่รากได้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงรากที่นิยมปฏิบัติส่วนใหญ่ควรนำมาจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดพืชในสภาพปลอดเชื้อ แล้วตัดรากไปเพาะในอาหาร วิธีการที่จะช่วยให้ปราศจากเชื้อได้ดีก็โดยลอกเอาส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดออก การเพาะเมล็ดในที่มืดจะช่วยในรากเจริญได้ดี รากเล็กๆที่เจริญมาจากแคลลัสหรือส่วนของอวัยวะอื่น ๆ ก็สามารถนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนได้

ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงรากพืชที่เกิดจากการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้เช่นกัน การเลี้ยงโดยวิธีนี้เหมาะสำหรับพืชสมุนไพรที่ใช้ประโยชน์ทางยาหรือการผลิตสารทุติยภูมิ (วราภรณ์, 2551) (ภาพที่ 6.2)



ภาพที่ 6.2 ราก hairy roots ของเจตมูลเพลิงแดงที่เลี้ยงในอาหารเหลวและสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้

4. การเพาะเลี้ยงคัพภะ (Embryo culture)

คัพภะของพืชที่อยู่ในระยะรูปร่างกลม (globular stage) ประกอบด้วยเซลล์ 50 เซลล์ เป็นคัพภะขนาดเล็กที่สามารถแยกและนำมาเพาะเลี้ยงให้ เจริญเติบโตได้ ความพยายามที่จะแยกเอาไซโกต (zygote) ของพืชชั้นสูงและเพาะเลี้ยงให้เจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นคัพภะในหลอดแก้วนั้นยังไม่สำเร็จ เมื่อนำคัพภะที่เจริญเต็มที่แล้วแต่มีขนาดเล็กกว่าปกติไปเลี้ยงในอาหาร สังเคราะห์ คัพภะสามารถเจริญเติบโตได้ ในทางตรงข้ามคัพภะที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไป เป็นส่วนต่าง ๆ นั้นมี ความต้องการอาหารมากขึ้น อาจต้องเติมอาหารเสริม เช่น น้ำมะพร้าว ในบางกรณีก็ต้องให้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเพิ่มเป็น 8 - 12 % การให้ฮอร์โมนพวกออกซินและไซโตไคนินในปริมาณที่เหมาะสมก็ช่วยให้คัพภะเจริญ ได้ดีขึ้น

5. การเพาะเลี้ยงรังไข่ (Ovary culture)

การเพาะเลี้ยงรังไข่ได้รับความสำเร็จในพืชบางชนิด ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรังไข่แบบง่าย ๆ และผลแก่เร็ว ผลที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่จะมีขนาดเล็กกว่าผลที่เจริญมาจากต้นโดยตรง การเจริญของรังไข่ก็คล้ายคลึงกับรังไข่ที่เจริญอยู่บนต้น ผลที่สุดก็ไม่มีลักษณะที่ผิดปกติ การเพาะเลี้ยงรังไข่ซึ่งได้รับการผสมแล้ว จะมีเมล็ดที่สมบูรณ์ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ แต่จะมีจำนวนของเมล็ดน้อยกว่าผลที่แก่จากต้น

จุดมุ่งหมายของการเพาะเลี้ยงรังไข่ส่วนใหญ่ก็เพื่อศึกษาการเกิดผลประโยชน์ ที่น่าสนใจของการเพาะเลี้ยงรังไข่อีกอย่างหนึ่งก็คือในแง่ของการผสมพันธุ์ พืช เนื่องจากการผสมพันธุ์พืชบางชนิดผลมักจะร่วงไปก่อนที่จะแก่เต็มที่ ดังนั้นถ้านำเอารังไข่ที่ผสมแล้วมาเพาะเลี้ยงก็แน่ใจว่าจะได้เมล็ด

ความต้องการสำหรับการเลี้ยงรังไข่ การเลี้ยงรังไข่ควรดึงเอากลีบเลี้ยงออกเสียก่อนจะช่วยให้การเจริญของรังไข่ดีขึ้น สำหรับรังไข่ที่เอามาจากดอกซึ่งได้รับการผสมแล้ว 2 - 3 วัน อาหารที่ใช้เลี้ยงไม่ต้องใส่ฮอร์โมน ตรงข้ามกับรังไข่ที่เอามาจากดอกที่ไม่ได้รับการผสมต้องให้ออกซินและบางกรณีให้ไซโตไคนินหรือจิบเบอเรนลินหรือทั้ง 2 อย่าง

6. การเพาะเลี้ยงโอวูล (Ovule culture)

การเพาะเลี้ยงโอวูลได้ดัดแปลงมาเพื่อใช้เลี้ยงคัพภะ ซึ่งจะเพาะเลี้ยงโอวูลก่อนที่จะเกิดมีคัพภะในขนาดที่เหมาะสม จนกว่าคัพภะมีขนาดโตพอที่สามารถแยกและเพาะเลี้ยงได้ โอวูลสามารถแยกมาเพาะเลี้ยงได้หลังจากเกิดการถ่ายละอองเกสรแล้ว 2 - 3 วัน แต่ไซโกต ยังไม่แบ่งตัว

7. การเพาะเลี้ยงตาดอก (Flower bud culture)

มีประโยชน์ในการศึกษาสภาวะแวดล้อมที่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่าง ๆ ของดอก เช่น เกสรตัวผู้ เกสรตัวเมีย กลีบดอกและส่วนอื่น ๆ ได้อย่างไร นอกจากนั้นยังเป็นประโยชน์ในการศึกษาเกี่ยวกับการกำหนดเพศ (sex expression) และ ปรากฏการณ์ของการสืบพันธุ์อื่น ๆ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ออกดอกในหลอดแก้วอาจทำได้ 3 วิธี คือ

1. ตัดตาดอกนำไปเพาะเลี้ยงโดยตรง

2. กระตุ้นให้ปลายยอดที่เลี้ยงออกดอก

3. ดอกเกิดจากส่วนอื่น ๆ ที่นำไปเพาะเลี้ยง เช่น ลำต้น ใบ รากและส่วนอื่น ๆ

ภาพที่ 6.3 ต้นหยาดน้ำค้างที่เลี้ยงในอาหารและสามารถออกดอกได้ในสภาพปลอดเชื้อ

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไม่ว่าจะมีวิธีการเลี้ยงแบบใดดังที่กล่าวข้างต้น ซึ่งทุกวิธีการเลี้ยงจะต้องผ่านขั้นตอนหลักที่สำคัญ 4 ขั้นตอน คือ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประกอบด้วยขั้นตอนหลักที่สำคัญ 4 ขั้นตอนคือ

1. การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช
2. การขยายพันธุ์พืชเพื่อเพิ่มปริมาณ
3. การยืดต้นและการชักนำให้ออกราก
4. การย้ายออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

ขั้นตอนการฟอกฆ่าชิ้นส่วนพืช

ส่วนใญ่แล้วการติดเชื้อจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นเกิดจากพืช (เชื้ออยู่ภายในพืชหรือภายนอกพืช) เกิดจากอาหารซึ่งฆ่าเชื้อไม่หมดหรือมีแมลง มด ตัวเล็กๆเดินเข้าไป เกิดจากอากาศไม่สะอาด และผู้ปฏิบัติงาน

ในขั้นตอนการฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชนั้น จะนำพืชมาตัดหรือลอกกาบที่หุ้มออก ล้างด้วยสบู่เหลวหรือน้ำยาล้างจาน แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆครั้ง ก่อนที่จะนำเข้าห้องปฏิบัติการย้ายเนื้อเยื่อพืช เพื่อทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อต่อไป ซึ่งวิธีการฆ่าเชื้อเริ่มจากการแช่ชิ้นส่วนพืชในสาปฏิชีวนะเพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย แล้วจึงนำไปจุ่มแอลกอฮอล์ 70% ประมาณ 1 นาที จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 10-20% ขึ้นอยู่กับขนาดและชนิดของชิ้นส่วนพืช ทำการล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 3-4 ครั้ง แล้วตัดเนื้อเยื่อบางส่วนที่ถูกทำลายด้วยสารฆ่าเชื้อออกไป นำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์

วิธีการดูแลรักษาพืชในสภาพปลอดเชื้อ

สภาพแวดล้อมที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ แสง และอุณหภูมิ ส่วนความชื้นนั้นจะถูกควบคุมอยู่แล้วเมื่อเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยมากจะเลี้ยงที่อุณหภูมิ

ประมาณ 20 – 25 ^{o}C ใช้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยให้มีความเข้มข้นของแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ แสงเท่านี้ก็เพียงพอในการให้พืชเจริญอยู่ได้ปกติ แต่ไม่เพียงพอต่อการสังเคราะห์แสง ซึ่งไม่จำเป็นในระยะนี้เนื่องจากมีน้ำตาลอยู่ในอาหารแล้ว ช่วงแสงให้ประมาณ 12 - 16 ชั่วโมง บางครั้งให้ได้รับแสงตลอด 24 ชั่วโมง

นอกจากนี้เนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงทั้งบนอาหารกึ่งแข็งหรือในอาหารเหลวจะต้องมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ตามเวลาอันเหมาะสม การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไว้ในอาหารเดิมเป็นเวลานาน จะทำให้เกิดการขาดธาตุอาหารและมีของเสียที่เนื้อเยื่อพืชถ่ายออกมาสะสมอยู่ เป็นผลให้เนื้อเยื่อหยุดเจริญเติบโตและตายได้ โดยทั่วไปถ้าเป็นอาหารแข็งจะย้ายอาหารเพาะเลี้ยงทุก 4 - 6 สัปดาห์ และอาหารเหลวจะทำทุก 2 - 4 สัปดาห์ แล้วแต่ชนิดของพืช การถ่ายเนื้อเยื่อในระยะแรกควรนำเนื้อเยื่อที่ได้ทั้งหมดถ่ายลงอาหารใหม่จนกระทั่งได้เนื้อเยื่อที่อยู่ในสภาพที่แข็งแรงสมบูรณ์ ชิ้นส่วนพืชที่พอเหมาะจะทำให้เนื้อเยื่อมีโอกาสรอดชีวิตได้ดี แสงสว่างมีส่วนช่วยให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตได้เร็วขึ้น สิ่งสำคัญที่ต้องระวังในการถ่ายเนื้อเยื่อจะต้องใช้เทคนิคที่ปราศจากเชื้อ

ขั้นตอนการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณ

เมื่อเนื้อเยื่อพืชหรือชิ้นส่วนพืชสมารถเจริญเติบโตได้ในสภาพปลอดเชื้อ จุดประสงค์ต่อไป คือ การเพิ่มจำนวนยอด พืชบางชนิดจะเกิดรากในอาหารพื้นฐานเช่นเดียวกับกิ่งปักชำเล็ก ๆ ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการเนื่องจากว่าควรมีการเจริญเพิ่มปริมาณยอดก่อน พืชบางชนิดผลิตยอดจำนวนมากโดยไม่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต ดังนั้นการใช้อาหารจึงควรพิจารณาระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่พืชต้องการ การเพิ่มจำนวนทำได้หลายวิธี

- ปลายยอดมีการเจริญยืดยาวเป็นข้อและปล้อง ตัดแต่ละข้อไปขยายพันธุ์ได้

- ตาข้างผลิตยอด ยอดดังกล่าวผลิตจากตาบริเวณซอกใบ ทำให้ได้ยอดจำนวนมาก

- พืชหลายชนิดสร้างราก ยอด หัวจากชิ้นส่วนพืชซึ่งปกติไม่สร้างอวัยวะดังกล่าววิธีการนี้เรียกว่า organogenesis เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพกว่า 2 แบบแรก ตัวอย่าง เช่น ใบ 1 ใบ สามารถผลิตตาและยอดใหม่ได้เป็นจำนวนมาก แต่ละต้นจะมีลักษณะเหมือนต้นแม่ทุกประการ

- การสร้างเอ็มบริออยด์ (somatic embryogenesis) เป็นวิธีที่มีศักยภาพมากที่สุดในการขยายพันธุ์ โดยขั้นแรกเซลล์เดี่ยวจะผลิตเอ็มบริออยด์ และพัฒนาไปเป็นต้น การสร้าง เอ็มบิรออยด์เกิดได้ทั้งในเซลล์แขวนลอยหรือการเลี้ยงแคลลัส การชักนำให้เกิดเป็นเอ็มบริออยด์ต้องใช้อาหารที่มีไนโตรเจนต่ำกว่าปกติ

โดยทั่ว ๆ ไปอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงปกติแล้ว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำการเกิดยอด (shoot initiation) และเพิ่มจำนวนยอด (shoot multiplication) สามารถใช้อาหารที่มีส่วนประกอบหรืออาจใช้สูตรอาหารที่ใกล้เคียงกันได้ แต่เนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนมีความต้องการกระตุ้นจากสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน พืชส่วนมากเปลี่ยนแปลงพัฒนาเป็นอวัยวะถ้าได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม คือ ออกซิน และ ไซโตไคนิน ทั้งนี้ผันแปรขึ้นกับชนิดของพืช ระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน และระดับหรือสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต ทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ในสูตรอาหาร มีข้อสังเกตสำคัญคือ

- ถ้าสัดส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินสูงขึ้น (ไซโตไคนิน > ออกซิน) จะกระตุ้นการเกิดยอด (shoot formation)

- ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงขึ้น (ออกซิน >ไซโตไคนิน) จะกระตุ้นการเกิดราก (root induction)

อย่างไรก็ตามในกรณีการสร้างยอดและกระตุ้นการแตกกิ่งข้าง สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 ชนิดนี้จะต้องมีอยู่ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ยกเว้นในพืชบางชนิดที่อาจต้องการไซโตไคนินเพียงอย่างเดียวเท่านั้น ในทางปฏิบัติต้องมีการทดสอบหาสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม

นอกจากนี้หลังจากผลิตยอดได้จำนวนมากพอแล้ว จำเป็นต้องให้ยอดเหล่านี้ได้รับสภาพที่เหมาะสมเพื่อเกิดการยืดตัวของยอด โดยเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต การเติมจิบเบอเรลลินในอาหารมีผลช่วยทำให้ปล้องยืดยาวขึ้นได้ ถ้ายอดมีการผลิตได้มีปล้อง ยาวพอแล้วก็ไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนนี้ จำนวนพืชที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะแตกต่างไปตามสภาพที่เลี้ยง และ ชนิดของพืช ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืชเพียงชิ้นเดียวต่อปี ขึ้นอยู่กับอัตราการขยายพันธุ์และจำนวนครั้งที่มีการถ่ายเนื้อเยื่อ

อัตราการทวีคูณจำนวนต้นสามารถคำนวณได้เมื่อทราบสิ่งสำคัญ 2 ประการ คือ

1. อัตราการขยายพันธุ์ (ยอดต่อชิ้นส่วน)

2. ระยะเวลาในการย้ายถ่ายเนื้อเยื่อ (สัปดาห์ต่อครั้ง)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนต้น

1. อาหารเพาะเลี้ยง (culture media)

การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนยอดสามารถใช้อาหารที่มี ส่วนประกอบของเกลือสูตร MS-salts ได้ผลดีและอาจใช้สูตรอาหารที่ใกล้เคียงกันได้ อย่างไรก็ตามในบางพืชความเข้มข้นของเกลือดังกล่าวอาจสูงเกินไปหรือสูงเกินความจำเป็น ความต้องการสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อผันแปรขึ้นกับระบบที่ใช้ใน การเพาะเลี้ยง และวิธีการขยายหรือเพิ่มจำนวนยอด

2. ฮอร์โมน (hormones)

พืชส่วนมากเปลี่ยนแปลงพัฒนาเป็นอวัยวะถ้าได้รับฮอร์โมน 2 กลุ่ม คือ ออกซิน และไซโตไคนิน ทั้งนี้ผันแปรขึ้นกับชนิดพืช ระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืช และระดับหรือสัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิด ที่ใช้ในสูตรอาหาร ซึ่งมีข้อสังเกตสำคัญคือ

- ถ้าสัดส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินสูงขึ้น (ไซโตไคนิน > ออกซิน) จะกระตุ้นการเกิดยอด (shoot formation)

- ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงขึ้น (ออกซิน > ไซโตไคนิน) จะกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิดราก (root differentiation)

อย่างไรก็ตามในกรณีการสร้างยอด (adventitious shoot formation) และกระตุ้น การแตกกิ่งข้าง (enhanced axillary branching) ฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิด นี้จะต้องมีอยู่ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ยกเว้นในพืชบางชนิดที่อาจต้องการไซโตไคนินเพียงอย่างเดียวเท่านั้น

3. แสงและอุณหภูมิ (light and temperature)

โดยปกติแล้วการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารสังเคราะห์ไม่ต้องพึ่งการสังเคราะห์แสงมากนัก แสงก็ยังมีความจำเป็นต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงพัฒนาทางด้านสัณฐานที่ถูกควบคุมด้วยพันธุกรรม โดยทั่ว ๆ ไปแล้วต้องการความเข้มแสงในช่วง 1,000 - 5,000 ลักซ์ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของ สำหรับความยาวนานของช่วงแสง (photoperiod) กล่าวได้ว่าไม่ค่อยมีข้อจำกัด และนิยมใช้แสงนาน 16/8 ชั่วโมง กลางวัน/กลางคืน สำหรับอุณหภูมิคงที่ 25 ^{o}C นิยมใช้มากที่สุด แม้ว่าในพืชบางชนิดอาจได้ผลดีกว่าหากใช้อุณหภูมิสลับที่สูงหรือต่ำกว่านี้ก็ตาม

อาการฉ่ำน้ำ (vitrification หรือ hyperhydricity)

บางครั้งอาจเกิดขึ้นได้ ถ้าหากมีการย้ายเนื้อเยื่อบ่อยครั้ง ซึ่งจะทำให้เนื้อเยื่อ ลดความแข็งแรง และผ่าเหล่าง่าย ดังนั้นในการขยายพันธุ์จึงควรรักษาแม่พันธุ์ไว้โดยที่ไม่ ย้ายเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้ง และการย้ายเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้งยังทำให้เกิดรากมากขึ้นด้วย

การชักนำการเกิดราก

หลังจากที่ได้จำนวนยอดตามต้องการแล้ว ระยะต่อไปคือ การชักนำให้ยอดเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อ หรือโดยการปักชำธรรมดา สำหรับพืชที่ออกรากง่าย การย้ายออกสู่ภายนอกเพื่อให้ออกรากจะประหยัดกว่า เพราะไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการเตรียมอาหารเพิ่มและไม่ต้องทำงานภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ถ้าเป็นพืชที่ออกรากยากควรให้ออกรากในอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตก่อนย้ายออกปลูก

การให้พืชออกรากภายนอกหลอดแก้วหรือขวด จะต้องจัดสภาพการเลี้ยงดูให้เหมาะสม ควรให้ความชื้นสูงเพื่อป้องกันการแห้ง เหี่ยวของพืช อาจจุ่มกิ่งพืชขนาดเล็กที่ผลิตได้ให้ออกรากได้ในออกซินชนิดผง หรือชนิดน้ำเหมือนการปักชำกิ่งธรรมดา ข้อดีของการให้กิ่งพืชออกรากภายนอกคือ ปกติรากที่สร้างในสภาพหลอดแก้ว จะได้รับการปรับสภาพให้เหมาะสมกับสภาพน้ำหรืออาหารที่ได้รับ แต่ไม่ได้ปรับตัวให้เข้ากับสภาพดิน ดังนั้นรากเหล่านี้อาจทำงานไม่ดีในสภาพดินปลูก และจะต้องสร้างรากใหม่ที่ปรับสภาพได้ในดินขึ้นมาแทนหลังย้ายลงดิน การย้ายลงดินเพื่อให้ออกรากทำให้พืชไม่เสียพลังงานในการสร้างรากชนิดใหม่ ในพืชบางชนิดจะเห็นรากฝอยเกิดขึ้นในระยะที่มีการเพิ่มจำนวนต้น บางชนิดสามารถสร้างรากได้ในอาหารที่ไม่มีไซโตไคนิน บางชนิดก็ต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตในการสร้างราก ทั้งนี้พืชแต่ละชนิดต้องการสภาพ

การเลี้ยง ส่วนประกอบของอาหาร และระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันไป เช่นเดียวกับระยะอื่นของการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ ปัจจัยต่าง ๆ เช่น pH และแสง เป็นต้นมีผลเกี่ยวข้อง การปรับสภาพของต้นพืชขนาดเล็กที่ผลิตได้ก่อนที่จะย้ายลงไปยังอาหารที่ออก รากก็ช่วยส่งเสริมการเกิดรากได้ เช่น การให้แสงหรือการให้ความเย็น การปรับสภาพ ดังกล่าวก็ช่วยส่งเสริมการเกิดรากได้เช่นกัน

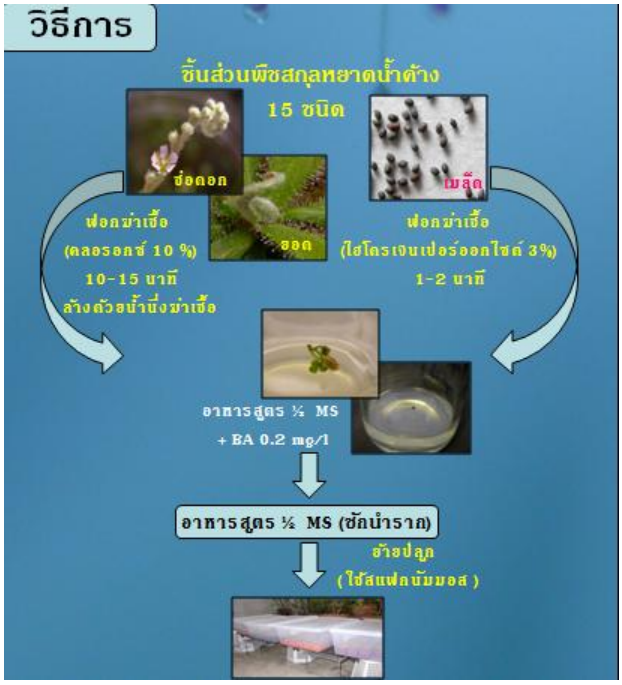
การย้ายต้นพืชออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

เมื่อจะนำต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกมาสู่สภาพแวดล้อมภายนอก ต้นพืชต้องเผชิญกับสิ่งแวดล้อมใหม่ และจะเครียดถ้าไม่มีการเตรียมป้องกันระยะนี้ ซึ่งถือว่าเป็นระยะวิกฤตที่สุดในการขยาย พันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ อัตราการตายของต้นพืชจะสูงมากถ้ามีการจัดการไม่ดีพอ เนื่องจากในสภาพปลอดเชื้อพืชได้รับความชื้นสูง ไม่มีเชื้อปนเปื้อน ได้รับอาหารและความเข้มของแสงที่เหมาะสม ดังนั้นจึงต้องให้พืชมีการปรับตัวที่ละน้อยก่อนย้ายออกปลูก เพราะถ้าพืชพบสภาพที่เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วจะตายได้ ตัวอย่างเช่น ใบที่ผลิตในสภาพหลอดแก้วภายใต้ความชื้นสูงและคายน้ำต่ำ จะมีชั้นของคิวติเคิล (cuticle) ที่บางและ ปากใบเปิดมาก และการเลี้ยงในสภาพความเข้มของแสงต่ำ ทำให้มีการสร้างคลอโรฟิลล์ต่ำ การให้พืชปรับตัวนั้นอาจจะมีการลดความชื้นในขวดก่อนโดยการคลายฝาขวด การเพิ่มปริมาณวุ้น การลดปริมาณน้ำตาล และการเพิ่มความเข้มของแสงให้ 1 สัปดาห์ก่อนที่จะมีการย้ายออกปลูก อาจช่วยให้เกิดการสร้างคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นทำให้การสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้น การดูแลต้นพืชที่ย้ายออกมาจากสภาพปลอเชื้อจะเหมือนกับการดูแลต้นอ่อนหนือกิ่งอ่อนปักชำ ซึ่งจะต้องให้ได้รับความชื้นสูงและความเข้มของแสงต่ำในตอนแรก แล้วจึงเริ่มเพิ่มความเข้มของแสง และลดความชื้นในสัปดาห์ต่อมา สำหรับเครื่องปลูกที่ใช้ในการปลูกนั้นควรเก็บความชื้นได้ดี และมีการระบายน้ำดี ดินที่ใช้ ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อ แต่ควรระวังเรื่องความสะอาดให้มากภายใต้สภาพความชื้นสูง

สิ่งที่ควรระวังในการย้ายปลูกพืช (มณฑา, 2540)

1. ต้องล้างวุ้นออกจากรากให้สะอาด เนื่องจากอาหารวุ้นเป็นอาหารที่ดีและเหมาะแก่การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
2. ควรมีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่างๆ เช่น การใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย แมลงศัตรู และหอย
3. วัสดุปลูกที่ใช้ควรละเอียดมีการระบายน้ำดี ซึ่งจะทำให้รากถูกทำลายน้อยลง
4. ควรระวังเรื่องความเค็มของวัสดุปลูก
5. พืชที่ย้ายปลูกใหม่ๆ ควรอยู่ในโรงเรือนที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูง และอุณหภูมิไม่ควรสูงเกินไป

สรุปขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชดังภาพ



ภาพที่ 6.4 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกินแมลงสกุลหยาดน้ำค้าง

บรรณานุกรม

มณฑา วงศ์มณีโรจน์. 2540. การย้ายปลูกพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. *ใน* เอกสารประชุมวิชาการ ครั้งที่ 14 เรื่อง เทคนิคของวิธีการทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ณ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม. 11-14 ธันวาคม

วราภรณ์ ภูตะลุน. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร: แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา. บริษัทขอนแก่นพิมพ์พัฒนา จำกัด. ขอนแก่น. 120 หน้า.

สถาบันวิจัยและฝึกอบรมเกษตรลำปาง. 2556. ความรู้ทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/Tissue Culture (วันที่ค้นข้อมูล : 22 มีนาคม 2556).

บทที่ 7

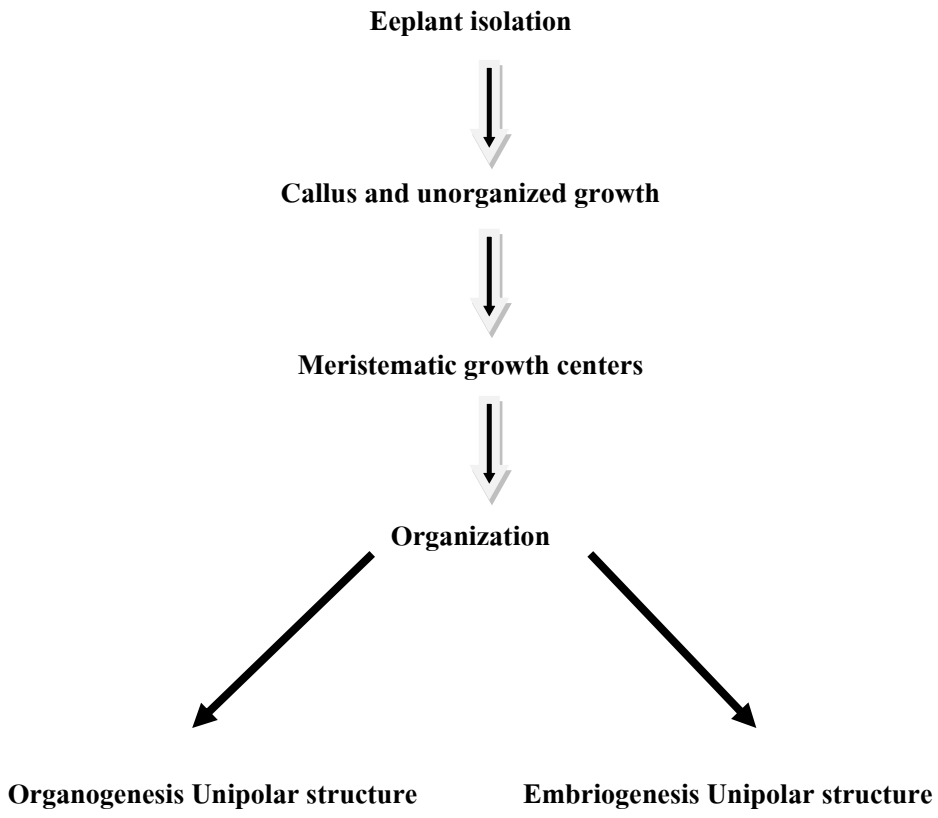
การเจริญและการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชในสภาพเพาะเลี้ยง

เมื่อนำชิ้นส่วนใดๆ ของเนื้อยื่อพืช ไปเลี้ยงบนอาหารบนอาหารสังเคราะห์เพื่อให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ จะมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงในลักษณะต่างๆจากเนื้อเยื่อธรรมดา (organized tissue) เช่น ลำต้น ใบ ราก มีการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อที่ไม่ประกอบเป็นอวัยวะ (unorganized tissue) เช่น แคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่ยังไม่พัฒนาเป็นเนื้อเยื่อ (undifferentiated cell) แต่เมื่อแคลลัสได้รับอาหารและสภาพการเลี้ยงที่เหมาะสม ก็จะสามารถพัฒนาไปเป็นยอดและรากได้ การเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะมีประโยชน์ในการศึกษาการพัฒนาการของเนื้อเยื่อ และความสัมพันธ์ระหว่างเนื้อเยื่อพืชกับ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ดังนั้นการพัฒนาไปเป็นต้นพืชจะผ่านกระบวนการ 2 กระบวนการ (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมเกษตรลำปาง, 2556 ; สมพร, 2549)

1. การเกิดออร์แกนโนเจเนซิส (organogenesis) คือ การพัฒนาเป็นอวัยวะ เช่น การเกิดยอด และราก

2. การเกิดเอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านการเกิดแคลลัส แล้วจึงมีการพัฒนาไปเป็นต้น ซึ่งการพัฒนาการของกระบวนการดังกล่าวมีดังนี้คือ เป็นรูปกลม รูปหัวใจ รูปตอร์ปิโต และต้นกล้า ตามลำดับ

การพัฒนาการของต้นพืชผ่านกระบวนการต่างๆสามารถสรุปการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาได้ดังภาพ (สมพร, 2549)



ภาพที่ 7.1 การเปลี่ยนแปลงชิ้นส่วนของพืชเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

ที่มา: Soh และ Bhojwani, 1999

การพัฒนาของเอ็มบริโอจากการเลี้ยงในสภาพปลอเชื้อ

1. การพัฒนาของเอ็มบริโอจากไข่ที่ได้รับการผสมหรือไซโกต โดยเริ่มจากไซโกต แบ่งตัวออกเป็น 2 เซลลี ที่มีขนาดไม่เท่ากัน เซลล์ที่มีขนาดเล็ก เรียกว่า apical cell ซึ่งอยู่ทางด้านบน ส่วนเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าอยู่ทางด้านล่าง เรียกว่า basal cell ส่วนที่จะพัฒนาเป็นเอ็มบริโอ ก็คือ ส่วนของ apical cell ซึ่งจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นเรื่อย ๆ จนมีลักษณะเป็นก้อนกลม และเรียกระยะนี้ว่า ระยะ globular-shaped ต่อจากนั้นก็จะเปลี่ยนเป็นรูปหัวใจ จึงเรียกระยะนี้ว่า ระยะ heart-shaped จนสุดท้ายเมื่อเอ็มบริโอพัฒนาเจริญเต็มที่จะมีรูปร่างเหมือนตอร์ปิโต จึงเรียกระยะนี้ว่า torpedo-shaped ส่วนของ basal cell จะแบ่งตัวทางด้านขนาน (periclinal division) เท่านั้น จะได้เป็นเซลล์แถวยาว ที่เรียกว่า suspensor ซึ่งทำหน้าที่ช่วยยึดตัวเอ็มบริโอให้ฝังอยู่ใน mucellus และช่วยดูดซึมอาหารให้แก่เอ็มบริโอ เซลล์ที่อยู่ตรงรอยต่อระหว่างตัวเอ็มบริโอกับ suspensor เรียกว่า hypolysis cell ซึ่งทำหน้าเป็นจุดกำเนิดของราก (radicle) เมื่อเอ็มบริโอพัฒนาเจริญเต็มที่แล้ว ส่วนของ suspensor ก็จะหมดหน้าที่และ สลายตัวไป

2. การพัฒนาของเอ็มบริโอที่ได้จากเนื้อเยื่อของแคลลัส เริ่มจากเซลล์บางเซลล์ในก้อนของแคลลัสที่มีความตื่นตัวมากกว่าเซลล์อื่น ๆ สังเกตได้จาการทดสอบด้วยสีย้อม ซึ่งจะติด สีเข้มกว่าเซลล์อื่น ๆ และเมื่อตัดผ่านเซลล์ และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า เซลล์เหล่านั้นมีไซโตพลาสซึมที่เข้มข้นและมีออร์แกนเนลหนาแน่น เซลล์ดังกล่าวนี้จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วจนได้เป็นกลุ่ม และปูดยื่นออกมามีลักษณะคล้ายระยะ globular-shaped ต่อมาก็พัฒนาเป็นระยะ heart-shaped และ torpedo-sphaped

3. การพัฒนาของเอ็มบริโอจากเซลล์ผิว (epidermis cell) เซลล์ผิวของพืชจะพบได้ที่ใบ ก้านใบ และลำต้นที่ยังอ่อนอยู่ แต่เซลล์ผิวที่นิยมนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ จะใช้จากส่วนของใบ เพราะใบมีลักษณะเป็นแผ่นบาง มีพื้นที่ผิวมาก มีเซลล์ผิวทั้งด้านบน (upper epidermis) และด้านล่าง (lower epidermis) การพัฒนาของเอ็มบริโอจะเริ่มจากเซลล์บางเซลล์จากเซลล์ผิว มีการตื่นตัว เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เจริญ ซึ่งมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ในขณะที่เซลล์อื่น ๆ ข้างเคียงไม่มีการแบ่งตัว จนต่อมาก็จะเกิดเป็นลักษณะ globular-shaped และพัฒนาต่อไปเป็น heart-shaped จนในที่สุดก็เป็นเอ็มบริโอที่สมบูรณ์ รูปร่างแบบ torpedo-shaped อนึ่งจาก

การศึกษาการพัฒนาของเอ็มบริโอจีนีซิสของแผ่นใบ พบว่า นอกจาก เซลล์ชั้นผิวแล้ว เซลล์ชั้นอื่น ๆ คือ palisade cell และ spongy cell ก็สามารถที่จะชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจีนีซิสได้เหมือนกัน

4. การพัฒนาของเอ็มบริโอจากการเลี้ยงเซลล์เดี่ยว (single cell culture) เซลล์เดี่ยวอาจได้มาจากการย่อยเนื้อเยื่อด้วยเอ็มไซม์ (pectinase enzyme) หรือได้จากการแยกเซลล์จากแคลลัส การเพาะเลี้ยงกระทำในอาหารเหลว จึงเรียกวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบนี้ว่าการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย การ พัฒนาของเอ็มบริโอเริ่มจากเซลล์เดี่ยว ๆ แบ่งตัวออกเป็น 2, 4 เซลล์ และทวีคูณไปเรื่อย ๆ จนได้เป็นกลุ่มเซลล์ ต่อมาพัฒนาเป็นก้อนกลม ๆ (globular-shaped) เจริญต่อไปเป็น heart-shaped และ torpedo-shaped ในที่สุด (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมเกษตรลำปาง, 2556)

ข้อแตกต่างระหว่าง organogenesis และ embryogenesis มีดังนี้คือ

1. การเชื่อมต่อระหว่างยอดและราก (shoot-root connection)

ในการเกิดออร์แกนโนเจเนซิสนั้น การเกิดยอดและรากจะเป็นอิสระต่อกัน คือ การเกิดยอดและรากอาจจะไม่ติดต่อกันก็ได้ รากอาจจะเกิดจากบริเวณหนึ่ง ส่วนยอดจะเกิดอีก บริเวณหนึ่ง แม้บนแคลลัสก้อนเดียวกัน แต่ในบางครั้งอาจจะพบว่า เนื้อเยื่อที่เกิดยอดและรากอยู่ใกล้กัน อาจจะเจริญติดกันได้ หรือเนื้อเยื่อส่วนยอดด้านโคน อาจจะสามารถเกิดรากขึ้นมาจนเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ส่วนในเอ็มบริโอเจเนซิสส่วนยอดและรากจะต้องติดต่อกัน เนื่องจากพัฒนามาจากเซลล์ ๆ เดียวกัน

2. Polarity การเกิดยอดหรือรากในแคลลัสนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกหรือสิ่งที่จะมากระตุ้นให้เกิดเป็น meristematic cell และ meristematic cell เหล่านี้จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากก็ได้ ดังนั้นจึงเชื่อว่า polarity ของออร์แกนโนเจเนซิส เสียไป หรือ ไม่มี polarity ส่วนใน เอ็มบริโอเจเนซิสนั้นจะมี polarity ซึ่งเป็นแบบ bipolar เนื่องจากการพัฒนาจากเซลล์ ๆ เดียวเป็นกลุ่มเซลล์ขึ้น ด้านหนึ่งของกลุ่มเซลล์เหล่านี้จะพัฒนาไปเป็นยอดเจริญขึ้นไปบนอากาศ อีกด้านหนึ่งพัฒนาเป็นราก เจริญลงสู่แนวดิ่ง เหมือนต้นพืชที่เจริญทั่ว ๆ ไป

3. การเชื่อมต่อระหว่างท่อน้ำท่ออาหาร (Vascular bundle connection) ท่อน้ำท่ออาหารของยอดและรากในขบวนการออร์แกนโนเจเนซิสอาจจะต่อหรือไม่ต่อกันก็ได้ แต่โดยทั่ว ๆ ไป มักจะต่อถึง

กัน โดยจะต่อผ่านเนื้อเยื่อเดิม แต่ในขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส ท่อน้ำและท่ออาหารของยอดและรากจะเชื่อมต่อกัน

การพัฒนาของแคลลัส

การพัฒนาไปเป็นยอดและ/หรือรากของแคลลัส อาจจะผ่านขบวนการ ออร์แกนโนเจเนซิส หรือ เอ็มบริโอเจเนซิส ก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์ เช่น ถ้าหากเกาะตัวเป็นกลุ่ม การพัฒนาไปเป็นต้นและ/หรือรากจะผ่านขบวนการออร์แกนโนเจเนซิส ถ้าเป็นเซลล์เดี่ยว การพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์จะผ่านขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสคล้ายกับ เอ็มบริโอ จึงเรียกว่า somatic embryogenesis

การกำหนดการพัฒนาของแคลลัส (Determination in Callus)

แคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์ที่สามารถชักนำให้เจริญเติบโตได้จากหลายทาง ขึ้นกับสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารเคมีอื่น ๆ ที่เติมลงในอาหาร พืชหลายชนิดโดยเฉพาะยาสูบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเปลี่ยนแปลงพัฒนา ของราก และ/หรือ ลำต้น ขึ้นกับสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนิน แคลลัสบางชนิดกลับไม่เป็นเช่นนี้เพราะไม่มีการตอบสนอง เชื่อกันว่าการที่เซลล์มีความสามารถแรกเริ่มที่จะเปลี่ยนแปลงไปได้เป็นสิ่ง จำเป็นอันดับแรก และอาจต้องมีการจัดสภาพเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส จากนั้นเซลล์จะมีความสามารถ (competent) ที่จะเปลี่ยนแปลงการพัฒนาหรือกำเนิดพัฒนาการอื่น ๆ กล่าวได้ว่าเซลล์มีความพร้อมและมีการกำหนดพัฒนาแล้ว กระบวนการทั้งสองนี้จำแนกได้จากเซลล์ที่มีขั้นตอนการพัฒนาอย่างใหม่เกิดขึ้น แต่ไม่ใช่แยกออกมาจากขั้นตอนการพัฒนาเดิมที่เป็นอยู่ แคลลัสของพืชบางชนิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเหล่านี้สามารถชักนำและทด สอบได้

แคลลัสในกรณีที่มีการกำหนดพัฒนา (Callus as Determined Cells)

การกำหนดพัฒนาของเซลล์เป็นสิ่งจำเป็นในการกำเนิดเป็นโครงสร้างต่าง ๆ ก็ตาม การทดลองโดยใช้แคลลัสชี้ว่าการกำหนดพัฒนาเกิดขึ้นได้ในเซลล์ที่ยังไม่มีการ พัฒนาเป็นอวัยวะ ในรากปม (crown gall) ซึ่งเซลล์จะอยู่เป็นกลุ่มคล้ายแคลลัส และไม่มีการพัฒนาเป็นอย่างอื่น หรือในกรณีเกิดสภาพเป็นกระบวนการที่แคลลัสซึ่งปกติต้องการ สารควบคุมการเจริญเติบโตบางอย่างที่

จำเพาะกลับไม่ต้องการสารดังกล่าว หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งเป็นอิสระต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ได้รับจากภาย นอก จึงสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้แม้จะไม่ได้รับสารเหล่านั้นก็ตาม ลักษณะดังกล่าวเท่าที่พบคือ ในกรณีออกซินและไซโตไคนิน สำหรับสารอื่น ๆ โดยปกติไม่จำเป็นต้องเติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง แม้ในบางกรณีอาจจำเป็นต้องเติมลงไปเพื่อยับยั้งการเกิดอวัยวะ หรือไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของคัพภะ เซลล์ที่ไม่ต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดได้ แต่ความต้องการเฉพาะเซลล์ที่ได้จากลูกผสมที่มีการสร้างรากปมจะเจริญเติบโตในอาหารที่ไม่ต้องเติมสารควบคุม การเจริญเติบโต จึงกล่าวได้ว่ามีความสามารถเกิดรากปมได้เอง แคลลัสที่สามารถสังเคราะห์ออก ซินและไซโตไคนินได้เองพบได้ในพืชหลายชนิด

การกำหนดพัฒนาของแคลลัสเพื่อกำเนิดคัพภะ (Determination in Callus : Embryogenesis)

การสร้างคัพภะจากเซลล์ร่างขณะเพาะเลี้ยง (somatic embryo หรือนิยมเรียกว่า embryoids เพื่อให้ต่างจาก zygotic embryos ที่เกิดจากการปฏิสนธิของเซลล์เพศ) เกิดขึ้นได้ในแคลลัสบางชนิดเท่านั้นกล่าวคือ เฉพาะแคลลัสและบางเซลล์เท่านั้นที่มีความสามารถสร้างคัพภะโดยไม่ต้องผ่าน กระบวนการสร้างเซลล์เพศมารวมกันตามปกติ การกำเนิดคัพภะในกรณีนี้เกิดโดยตรงจากเซลล์ที่มีความพร้อมซึ่งเรียกว่า pre-embryonic determined cells (PEDC) เมื่อเซลล์เหล่านี้เกิด dedifferentiation และเพิ่มจำนวนเป็นแคลลัสก่อนที่จะมีสภาพเป็น PEDC เรียกเซลล์เหล่านี้ว่า induced embryogenic determined cell (IEDC) สมมติฐานที่เกี่ยวข้องคือ PEDC นั้นมีความสามารถในการเกิดคัพภะ และต้องการสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมเพื่อการกำหนดพัฒนาไปเป็นเซลล์คัพภะ ขณะที่ IEDC นั้นต้องการชักนำให้มีความสามารถเสียก่อนที่จะเริ่มมีการกำหนดพัฒนาเป็นเซลล์คัพภะ เซลล์ PEDC นั้นรวมไปถึงแคลลัสที่สามารถสร้างคัพภะได้โดยตรง เช่นกรณีของ epidermis cells ของ Ranunculus celeratus และ nucellar cells ของผลส้ม (citrus) ซึ่งสามารถสร้างคัพภะได้โดยไม่ต้องใช้เพศ ข้อสังเกตที่พบเสมอคือ แคลลัสที่มีสภาพเป็นเซลล์คัพภะนั้นแรกสุดต้องได้รับออกซินสังเคราะห์ 2,4-D จากนั้นจึงย้ายไปไว้ในอาหารที่ปราศจาก 2,4-D จะชักนำให้เกิดคัพภะได้ แคลลัสดังกล่าวเชื่อว่าเป็น IEDC และการได้รับ 2,4-D ทำให้เกิดความสามารถพัฒนาเป็นคัพภะเมื่อย้ายสูงอาหารที่แตกต่างไปจากเดิม แคลลัสที่เลี้ยงจาใบถั่วอัฟฟัลฟา (Medicago sp.) และ Convolvulus sp. พบว่าความสามารถในการกำเนิด คัพภะ ถูกชักนำในอาหารชนิดหนึ่ง และการกำเนิดอวัยวะ จะเกิดขึ้นในอาหารอีกชนิดหนึ่ง

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อ

1. ปัจจัยทางด้านเคมี

1.1 ธาตุอาหาร

พืชแต่ละชนิดหรือแต่ละอวัยวะต้องการอาหารที่แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ฉะนั้นจึงมีความจำเป็นในการเลือกสูตรอาหารให้เหมาะสมกับพืชที่จะทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งผู้คิดค้นไว้มากมายหลายสูตร ต่อไปนี้จะขอกล่าวถึงธาตุอาหารบางตัวที่มีบทบาทอย่างสำคัญใน การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิสเพื่อเป็นแนวทางในการปรับใช้ควบคู่ไปกับการเลือกสูตรอาหาร

- ธาตุโพแทสเซียม (K) ช่วยส่งเสริมให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิส

- การลดปริมาณของไนโตรเจน (N) ให้ต่ำกว่าระดับปกติ ในสูตรอาหารช่วยส่งเสริมให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิสดีขึ้น

- น้ำมะพร้าวส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิส

- น้ำตาลแซคคาโรส (saccharose) ที่ระดับความเข้มข้น 2 - 3 % ช่วยส่งเสริมให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิส

- ธาตุแคลเซียม (Ca) ในปริมาณสูง จะยับยั้งการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิส

1.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators)

ซึ่งมีทั้งส่งเสริมและยับยั้งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ส่วนควบคุมการเจริญเติบโตมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิส

- 2,4-D มีความสำคัญในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิส

- จิบเบอเรลลิค แอซิด ยับยั้งการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิส

- 7 aza-indole เป็นสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์ออกซิน จึงมีผลในด้านยับยั้งต่อเอ็มบริโอเจเนซิส

- เอททีลีน ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเซลล์ในระยะเริ่มแรก

- BAP, IAA, IBA และไคนีติน ยับยั้งเอ็มบริโอเจเนซิส

- เซอิติน และ ALAR (succinic acid 2,7-methyl-hydrazide) ส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิส

2. ปัจจัยทางด้านพืช

2.1 ลักษณะทางพันธุกรรม (genetic factor)

การเจริญและพัฒนาไปเป็นและ/หรือราก ของพืชแต่ละชนิดจะมีความสามารถเจริญและพัฒนาได้ไม่เหมือนกัน พืชบางชนิดสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นและ/หรือรากได้ง่าย บางชนิดก็ยาก แม้ว่าได้เลี้ยงบนหรือในอาหารที่เหมาะสมแล้วก็ตาม พืชบางชนิดการเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นและ/หรือราก โดยผ่านขบวนออร์แกนโนเจเนซิสบางชนิดก็ผ่านขบวนการ เอ็มบริโอเจเนซิส เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบจะพัฒนาเป็นต้นยาสูบที่สมบูรณ์ได้โดยการพัฒนาผ่านออร์แกนโนเจเนซิสในขณะที่แครอทจะผ่าน เอ็มบริโอเจเนซิส ส่วนเนื้อเยื่อ รังไข่ และอับละอองเกสรพัฒนาผ่านขบวนการ เอ็มบริโอเจเนซิส มากกว่าขบวนการ ออร์แกนโนเจเนซิส

2.2 ฮอร์โมน (Hormones)

ฮอร์โมนที่มีอยู่ภายในพืช มีบทบาทอย่างมากกับขบวนการเกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง จากทฤษฎีของโฮบ ได้มีผู้พยายามพิสูจน์ว่า การเกิดลักษณะรูปร่าง ควบคุมด้วยชนิดและระดับของฮอร์โมน ดังนั้นภายในเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเลี้ยงจึงมีฮอร์โมนบางชนิดส่งเสริมการเกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง และมีฮอร์โมนอีกบางชนิดที่ยับยั้งการเกิดขบวนการนี้ นอกจากนี้พบว่าชนิด (kinds) และระดับ (levels) ของฮอร์โมนภายในชิ้นส่วนของพืชจะแตกต่างกันไปดังนี้

- ชนิดของพืช ภาย ในเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณฮอร์โมนชนิดแตกต่างกันออกไป เช่น พืชบางชนิดอาจจะมีออกซินในปริมาณที่สูง เมื่อนำเนื้อเยื่อของพืชชนิดนี้ไปเลี้ยงเนื้อเยื่อก็สามารถพัฒนาไปเป็นแค ลลัสและรากได้ดี พืชบางชนิดอาจจะมีไซโตไคนินเนื้อเยื่อของพืชชนิดนี้เมื่อนำไปเลี้ยงจะพัฒนา ไปเป็นหน่อได้ดี เป็นต้น

- ชนิดของเนื้อเยื่อ ในพืชชนิดเดียวกันหรือต้นเดียวกัน ปริมาณฮอร์โมนในแต่ละส่วนของต้นพืชจะไม่เหมือนกัน เช่น ส่วนปลายยอดจะมีออกซินปริมาณสูงกว่าส่วนต้น ในรังไข่ก็มีปริมาณออกซินค่อนข้างสูง ส่วนในเมล็ดนอกจากจะมีออกซินค่อนข้างสูงแล้ว ปริมาณของ จิบเบอริลลินด์ยังสูงด้วย เป็นต้น

ฮอร์โมนของพืชในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช เนื้อเยื่อพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างกันที่ชิ้นส่วนเช่น ยอด ใบ ราก ก็จะมีฮอร์โมนที่อยู่ ภายในแตกต่างกัน สภาพของเนื้อเยื่อ เช่น เนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตกับเนื้อเยื่อที่มีการพักตัวจะมีสารควบคุม การเจริญเติบโตที่แตกต่างกันซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชหลังจาก นำมาเพาะเลี้ยง

2.3 สภาพของเนื้อเยื่อ

เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชมีการเจริญและพัฒนาอยู่เสมอ ดังนั้นชนิดและระดับของฮอร์โมนที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อจึงมีการเปลี่ยนแปลงไป ตามสภาพของเนื้อเยื่อในระยะนั้น ๆ เป็นที่เชื่อกันว่าการเปลี่ยนแปลงชนิดและระดับของฮอร์โมนภายในเนื้อเยื่อ เป็นสาเหตุให้เนื้อเยื่อ มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระ จึงทำให้การเปลี่ยนชนิดและระดับฮอร์โมนกับการเปลี่ยนแปลงทางสรีระเกิดควบ คู่กันไปเสมอ เช่น หัวลิลี่ (lily) และซ่อมกลิ่นฝรั่ง (gladiolus) ขณะที่เก็บเกี่ยวมาใหม่จะมีสารยับยั้งการเจริญเติบโต (Inhibitor) เช่น abscissic acid (ABA) ในปริมาณค่อนข้างสูง ดังนั้นถ้านำเนื้อเยื่อในระยะนี้มาเลี้ยงจะไม่ค่อยประสบความสำเร็จในการ เกิดหัวย่อย (bulblets หรือ cormels) แต่ถ้านำหัวลิลี่ หรือซ่อนกลิ่นฝรั่งนี้เก็บไว้สักระยะหนึ่ง ปริมาณ ABA ก็จะลดลง ขณะที่จิบเบอริลลิเพิ่มขึ้นเมื่อนำหัวระยะนี้ไปเลี้ยงโอกาสที่จะประสพความสำเร็จในการเกิดหัวย่อยก็มี สูงขึ้น

3. ปัจจัยทางด้านกายภาพ

3.1 แสง (light)

แสงที่ให้กับพืชเป็นปัจจัยที่สำคัญ พืชที่เจริญในแปลงปลูกกับที่เจริญในหลอดทดลองจะมีความต้องการแสงที่แตกต่างกัน พืชที่เจริญในหลอดทดลองยังไม่มีการสังเคราะห์แสงเนื่องจากได้รับคาร์โบไฮเดรตจากน้ำตาล อย่างไรก็ตามแสงยังมีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืช

ในหลอดทดลองเช่น ช่วยในการสร้างราก การสร้างต้นใหม่จากแคลลัส เป็นต้น และต้นพืชที่อยู่ในช่วงย้ายออกจากหลอดทดลองจำเป็นต้องมีการสังเคราะห์แสงเพื่อเตรียมพร้อมออกสู่ภายนอกหลอดทดลอง แต่ถ้าความเข้มแสงมากเกินไปอาจทำให้พืชตายได้ ลักษณะของแสงที่เกี่ยวข้องได้แก่ ความเข้มแสง (light intensity) ช่วงแสง (photoperiod) และคุณภาพของแสง (light quality)

- ความเข้มแสง (light intensity) มี รายงานความเข้มแสงที่มีผลต่อ การเจริญเติบโตของพืชในสภาพหลอดแก้วมากกว่าทางด้านช่วงแสง ถ้าหากพืชในสภาพหลอดแก้วได้รับความเข้มแสงสูงเท่าในแปลงปลูกพืชอาจเป็น อันตรายได้ เนื่องจากทำให้พืชได้รับอุณหภูมิสูงไปด้วย ควรเลี้ยงภายใต้สภาพแสงประมาณ 1,000-4,000 ลักซ์ (lux) (1 ฟุตกำลังเทียน = 10.75 ลักซ์) การที่พืชต้องการความเข้มแสงต่ำ สันนิษฐานว่าการสังเคราะห์แสงในสภาพหลอดแก้วถูกจำกัดด้วยปริมาณของ คาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่ำ ในหน่อไม้ฝรั่ง เยอบีร่าและสับปะรด ความเข้มแสงที่เหมาะสมในระยะเพิ่มจำนวนคือ 1,000 ลักซ์ ส่วนในระยะที่ต้องการให้ต้นพืชเจริญเตรียมออกรากต้องการความเข้มแสงคือ 1,000-3,000 ลักซ์ โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันการให้แสงที่มีความเข้มในระดับนี้จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดตาย สูงเมื่อย้ายปลูกลงดิน

- ระยะเวลาในการให้แสง (light duration) ไม่ค่อยมีนักวิจัยทดลองด้านช่วงแสง กับการเจริญของเนื้อเยื่อในสภาพหลอดแก้ว มากนัก โดยทั่วไปมักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้รับแสง 14-16 ชั่วโมง บางครั้งได้รับตลอด 24 ชั่วโมง หรือเลี้ยงในที่มืดเช่น การเลี้ยงแคลลัส การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ โดยหลักการแล้วช่วงแสงที่เหมาะสมควรเป็นช่วงแสงที่พืชนั้นเจริญอยู่ใน ธรรมชาติ ช่วงแสงมีอิทธิพลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อ ในการเจริญเป็นรากและยอดของเนื้อเยื่อแคลลัสยาสูบและเนื้อเยื่อส่วนปลายยอด ของหน่อไม้ฝรั่ง ช่วงแสงที่เหมาะสมคือ 16 ชม.ต่อวัน โดยใช้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกะหล่ำเพื่อให้สร้างยอดจะใช้ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ โดยรับช่วงแสง 9 ชม.ต่อวัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลำต้นขององุ่นพันธุ์ที่เป็นวันสั้นจะเกิดรากเมื่อ ได้รับวันสั้น แต่ถ้าเพาะเลี้ยงองุ่นวันยาวจะออกรากเมื่อพืชได้รับวันยาว อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการให้แสงกับความเข้มของแสงจะมีความสัมพันธ์กัน เช่น ถ้าให้แสงที่มีความเข้มสูงอาจจะใช้ระยะเวลาในการให้แสงน้อยลง เป็นต้น

-.คุณภาพของแสง (light quality) จากการทดลองพบว่าแสงสีแดง (red light) และแสงสีน้ำเงิน (blue light) เป็นต้นกระตุ้นให้เกิดยอดของพืชหลายชนิด เช่น ในการเลี้ยงส่วนใบของพิทูเนีย

เนื้อเยื่อจะเกิดยอดเป็นปริมาณมากเมื่อได้รับแสงสีแดงและเนื้อเยื่อจะเกิดยอดน้อย เมื่อได้รับแสงชนิดไหนหลังสุด ก็จะมีผลตามแสงชนิดนั้น

ตัวอย่างต่อไปนี้

เนื้อเยื่อที่ไดรับ Red light จะเกิดยอดปริมาณมาก

เนื้อเยื่อที่ไดรับ F-Red light จะเกิดยอดน้อย

เนื้อเยื่อที่ไดรับ Red…….F-Red light จะเกิดยอดน้อย

เนื้อเยื่อที่ไดรับ F-Red light ……..Red light จะเกิดยอดมาก

จาก ผลอันนี้จึงได้มีสมมุติฐานว่า การเกิดลักษณะรูปร่าง ถูกควบคุมด้วยระบบ phytochrome จึงทำให้นิยมใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent lamp) เหมาะที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลอดไฟที่ให้แสงอัลตราไวโอเลต จะยับยั้งการสร้างยอด การใช้แสงสีแดงจะดีกว่าสีน้ำเงินในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อยาสูบ แสงสีแดง (660 nm.) ยังทำให้เกิดการสร้างราก มีรายงานว่าแสงสีขาวและสีน้ำเงินจะทำให้การเจริญของแคลลัสดีกว่าแสงสีเขียวและสีแดงหรือเมื่อเพาะเลี้ยงในที่มืดโดยทั่วไปแสงสีแดงและอินฟราเรดจะ กระตุ้นการเกิดยอด มีเพียงบางรายงานที่พบว่าแสงสีแดงยับยั้งการเกิดยอดในมอส (Pohlia nutans) การสร้างตายอดต้องการแสงทั้งแสงสีแดงและสีน้ำเงิน โดยถ้าได้รับแสงสีแดง 11 ชั่วโมงตามด้วยสีน้ำเงิน 6 ชั่วโมงทุกวันจะทำให้เกิดตายอดจำนวนสูงสุด แต่ถ้าให้แสงชนิดเดียวจะไม่ช่วยในการสร้างยอด จากตัวอย่างแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเป็นอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของพืช ต้องการคุณภาพแสง ความเข้มแสง และช่วงแสงที่เหมาะสม

3.2 อุณหภูมิ (temperature)

อุณหภูมิที่ใช้มักคงที่ประมาณ 24-26 o ซ ในการทดลองอาจเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 17 o ซ หรือสูงถึง 30 o ซ อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช มักต่ำกว่าในธรรมชาติจึงควรเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต่ำกว่าธรรมชาติ อุณหภูมิที่ต่ำมากเกินไปเช่นเย็นจัดถึง 4 oซ ทำให้พืชหยุดการเจริญเติบโต บางครั้งพืชต้องการอุณหภูมิต่ำสลับการอุณหภูมิสูง เช่น การสร้างรากของ

ทานตะวันจะดีขึ้นถ้าเพาะเลี้ยงให้ได้รับอุณหภูมิกลางวัน 26 ๐ซ กลางคืน 15 ๐ซ การเลี้ยงแคลลัสของพืชบางชนิดให้ผลเช่นเดียวกัน อุณหภูมิทำให้พืชเกิดการพ้นระยะการพักตัว (break dormancy) ใน gladiolus hortulans หัวหรือต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นต้นพืชที่ปลูกลงดินได้ต้องเลี้ยงที่อุณหภูมิ 2 ๐ซ นาน 4-6 สัปดาห์ก่อนการย้ายลงดินเช่นเดียวกับลิลี่ต้นจะพักตัวจึงต้องทำให้พ้นระยะ การพักตัวโดยเลี้ยงที่ในที่มืดอุณหภูมิ 5 ๐ซ นาน 4 สัปดาห์ก่อนย้ายปลูก

3.3 ความชื้น (humidity)

เนื่องจากความชื้นในหลอดแก้วค่อนข้างสูง ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงต่ำ ก็จะเกิดการสูญเสียน้ำภายในหลอดส่งผลทำให้อาหารแห้งเร็ว แต่ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงสูงเกิดไปก็จะเอื้ออำนวยให้เชื้อจุลินทรีย์ เจริญได้ดี เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย และในบางครั้งถ้าความชื้นภายในหลอดทดลองสูงมากจะทำให้พืชเกิดอาการฉ่ำน้ำ

3.4 ออกซิเจน (oxygen)

เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ การเลี้ยงบนอาหารเหลวอาจใช้วิธีเพาะเลี้ยงบนสะพานกระดาษหรือ วางบนเครื่องเขย่า

3.5 คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

แม้ว่าจะเป็นแหล่งพลังงานของพืชซึ่งเกิดการสังเคราะห์แสงแต่ถ้าเกิดการสะสมมากเกินไปก็จะเป็นอันตราย

3.6 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators)

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เติมลงในอาหารเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ เป็นอย่างมากที่จะกระตุ้นให้พืชเกิดการเจริญของเนื้อเยื่อ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เติมจากภายนอกจะต้องเกิดการสมดุลย์กับสาร ควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชจึงจะกระตุ้นให้เนื้อ เยื่อพืชเกิดการเจริญไปในทิศทางที่ต้องการ จำเป็นต้องมีการทดลองเพื่อหา จุดสมดุลย ซึ่งพอจะแยกบทบาทของสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดได้ดังนี้ คือ

สารกลุ่มออกซิน บทบาทที่มีต่อเนื้อเยื่อที่เลี้ยง ได้แก่

- ส่งเสริมให้เนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยงเกิดแคลลัส เพื่อประโยชน์ในการที่จะนำแคลลัส นี้ไปชักนำให้เป็นต้นพืชต่อไป

- กระตุ้นให้ต้นอ่อนที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดราก

สารกลุ่มไซโตไคนิน บทบาทที่มีต่อการเนื้อเยื่อที่เลี้ยง ได้แก่

- ส่งเสริมการเจริญเติบโตของใบ

- ยับยั้งการเจริญเติบโตของราก

- เร่งให้ชิ้นส่วนของพืชเกิดหน่อเป็นจำนวนมาก

บทบาทของออกซินและไซโตไคนินรวมกัน มีผลในการเลี้ยงเนื้อเยื่อถ้าหากเติม ออกซินและไซโตไคนินรวมกันจะมีผลทำให้การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อดีกว่าการ ใช้ออกซินหรือ ไซโตไคนินอย่างใดอย่างหนึ่งแต่เพียงอย่างเดียว

สารกลุ่มอื่น ๆ เช่น จิบเบอริลลิน พบว่า ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อถ้าหากในอาหารมี GA เป็นปริมาณมากจะไปยับยั้งการเกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง แต่ในพืชบางชนิด เช่น มันฝรั่ง GA มีความสำคัญมากในการที่ให้เนื้อเยื่อมันฝรั่งเกิดเป็นหน่อ ส่วนพวก ABA จะไปยับยั้งการเกิดต้นและ/ หรือราก จะไปยับยั้งการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสในแครอท และยับยั้งการงอกของสปอร์เฟิร์น สำหรับสารพวกอนุพันธ์เพียวรีน (purine derivative) เช่น adenine หรือ guanine จะมีผลคล้าย ๆ กับสารในกลุ่มไซโตไคนิน คือ ช่วยในการกระตุ้นให้เกิดหน่อ

4. ปัจจัยอื่น

4.1 **ขนาดของชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง (size of explant)**

ขนาดของชิ้นส่วนมีความสำคัญต่อการประสพความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือการเกิดการเกิดลักษณะรูปร่างมาก การใช้ชิ้นส่วนขนาดใหญ่จะมีโอกาสประสพความสำเร็จมากกว่าการใช้ชิ้นส่วนขนาดเล็ก

4.2 สภาพของการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture condition)

เป็นสภาพภายในภาชนะที่เลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น สภาพของอาหารเป็นอาหารแข็งหรืออาหารเหลว เนื้อเยื่อบางชนิดจะเกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง ได้บนอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารวุ้น แต่จะไม่เกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง ในอาหารเหลว เช่น กล้วยไม้ แต่เนื้อเยื่อบางชนิดสามารถเกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง ได้ทั้งบนอาหารกึ่งแข็ง และในอาหารเหลว หรือถ้าปริมาณออกซิเจนภายนภาชนะที่ใช้เลี้ยงมาก คาร์บอนไดออกไซด์น้อย เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นราก แต่ถ้าปริมาณออกซินน้อย คาร์บอนไดออกไซด์มากเนื้อเยื่อจะเจริญเป็นยอด

4.3 การเปลี่ยนอาหาร (subculture)

การย้ายเนื้อเยื่อจากอาหารเก่าไปยังอาหารใหม่หลาย ๆ ครั้ง จะมีผลทำให้การเกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง ลดลง ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าเกิด การเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซมขึ้น ซึ่งสาเหตุที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด

4.4 ส่วนประกอบอาหารอื่น ๆ (medium component)

นอกเหนือจากสารควบคุม- การเจริญเติบโตของพืช อาหารบางชนิดจะมีผลต่อการเกิดลักษณะรูปร่าง เช่น ถ้ามีฟอสเฟตในอาหารเป็นปริมาณสูงจะเกิดยอดได้ดีกว่าที่มีฟอสเฟตในปริมาณต่ำ ถ้าให้ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียม (NH^{4+}) ในปริมาณมาก เนื้อเยื่อจะเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสมากกว่าการเกิดออรแกนโนเจนเนซิสนอกจากนี้ ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลก็เป็นตัวควบคุมการเกิดลักษณะรูปร่างเหมือนกัน เช่น ถ้าในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยมีน้ำตาล 2 % จะช่วยให้เนื้อเยื่ออ้อยเกิดยอด ถ้า 3 % จะยับยั้งการเกิดยอด ส่วนในการเลี้ยงลิลลี่ พบว่า น้ำตาล 2 % จะทำให้เกิดท่อน้ำ ในก้อนแคลลัส และ 4 % จะทำให้เกิดท่ออาหาร ส่วนน้ำตาล 3 % จะชักนำให้เกิดทั้งท่อน้ำ และท่ออาหาร

บรรณานุกรม

สถาบันวิจัยและฝึกอบรมเกษตรลำปาง. 2556. ความรู้ทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/Tissue Culture (วันที่ค้นข้อมูล : 22 มีนาคม 2556).

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.สงขลา. 127 หน้า.

Soh, W-Y. and Bhojwani. 1999. Morphogenesis in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publisher.

บทที่ 8

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกับการถ่ายยีนในพืช

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ถูกนำมาใช้เป็นเทคนิคพื้นฐานสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยเป็นการนำยีนที่สนใจ หรือยีนที่ควบคุมลักษณะบางอย่างที่ต้องการและเป็นประโยชน์เข้าสู่โครโมโซมพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะดีตามความต้องการของเกษตรกรและผู้บริโภค ทั้ง พืชไร่ พืชสวน ไม้ดอกไม้ประดับ รวมถึงการศึกษาเพื่อให้เกิดความเข้าใจในกลไก หรือการทำงานของยีน (gene function) หรือกระบวนต่างๆ ในทางชีววิทยา(biological process) โดยเมื่อถ่ายยีนเข้าสู่พืชแล้วและยีนดังกล่าวมีการแสดงออกในต้นพืชก็จะสามารถอธิบายหรือแสดงให้เห็นถึงบทบาทของยีนและกระบวนการที่เกิดขึ้นในพืชได้ระดับหนึ่ง รวมทั้งการศึกษาในด้านปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรคด้วย (หน่วยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2556) นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชสมุนไพรเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติทางยาสูง (วราภรณ์, 2551)

ยีนเดี่ยว (a single gene) หรือ ยีนกลุ่มเล็กๆ (a small cluster of genes) ที่นำมาใช้ถ่ายเข้าสู่พืช เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชได้แก่ ยีนควบคุมแมลงศัตรูพืช ยีนต้านทานไวรัสพืช ยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืช ยีนควบคุมการสุกของผลไม้ ยีนเปลี่ยนสีกลีบดอกไม้ ยีนควบคุมคุณค่าทางโภชนาการของเมล็ดพืชและยีนควบคุมการผสมตัวเอง ส่วนพืชเศรษฐกิจชนิดต่างๆ ที่มี รายงานการถ่ายยีนให้แล้ว และยีนดังกล่าวทำงานได้เมื่อเข้าไปสอดแทรกในโครโมโซมพืช ได้แก่ มะเขือเทศ มันฝรั่ง ผักกาดหอม แคโนลา ฝ้าย ถั่วเหลือง ข้าวโพด และข้าว เป็นต้น การถ่ายยีนเข้าสู่พืชจึงเป็นการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะดีตรงตามความต้องการได้อีกวิธีหนึ่ง นอกเหนือไปจากการผสมพันธุ์พืชที่ปฏิบัติกันมานานโดยทั่วไป ทั้งนี้คาดหวังว่าการถ่ายยีนให้กับพืช จะมีข้อได้เปรียบบางประการ (หน่วยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2556)

1. สามารถผลิตพืชที่มีลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ที่ดี ที่ใช้วิธีการ ผสมพันธุ์พืชแบบทั่วไป (conventional breeding) ทำไม่ได้

2. สามารถเปลี่ยนแปลงข้อด้อยบางอย่างของพันธุ์พืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ

3. สามารถเพิ่มคุณค่าหรือคุณสมบัติในด้านที่เป็นประโยชน์ทางการค้าให้แก่พืช โดยใช้วิธีการที่ชัดเจนทำให้มีการขอสิทธิประโยชน์จากการดำเนิน

ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จของการถ่ายยีนเข้าสู่พืช (หน่วยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2556)

1.การมีระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้และพืชนั้นสามารถถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูกได้

2. การมีวิธีการที่เหมาะสมในการนำยีนจากภายนอกต้นพืชเข้าสู่โครโมโซมของเซลล์พืช

ขั้นตอนการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

1.โคลนยีน ศึกษารายละเอียดของยีนที่ต้องการถ่ายยีนเข้าสู่พืช (Gene cloning and identification) และจัดทำพลาสมิดสำหรับถ่ายยีน

2. พัฒนาระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืช ให้เป็นต้นพืช (Plant regeneration) ซึ่งจำเป็นสำหรับการพัฒนาเซลล์หรือ เนื้อเยื่อพืชที่ถ่ายยีนแล้วให้เป็นต้นพืช

3. ถ่ายยีน (หรือดีเอ็นเอ) เข้าสู่โครโมโซมพืช (Gene transfer to plant) ด้วยวิธีการที่เหมาะสมกับ explant

วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืช แบ่งเป็น 2 แบบคือ

1. การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย (Agrobacterium-mediated gene transfer)
2. การถ่ายยีนโดยตรง (direct gene transfer) โดยการใช้กระบวนการใดกระบวนการหนึ่งเข้าช่วยคือการใช้แรงดัน การใช้กระแสไฟฟ้า การใช้สารเคมี แต่วิธีที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน ได้แก่ใช้เครื่องยิงอนุภาค (Particle bombardment) และการใช้วิธี electroporation

ในการถ่ายยีนทั้ง 2 แบบนี้เป็นการถ่ายยีนเข้าสู่โครโมโซมของพืช แล้วจึงนำพืชที่ได้รับการถ่ายยีนแล้วมาเพาะเลี้ยง ชักนำและพัฒนาเซลล์พืชให้เจริญเป็นต้นพืชต้นใหม่ ซึ่งจะทำให้พืชที่เพาะเลี้ยงได้มีลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป

ในการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย ซึ่งมีพลาสมิด ซึ่งประกอบด้วย ชุดโครงสร้างของ target gene, screenable marker และ selectable marker และชุดโครงสร้างของ T-DNA ส่วน vector ที่ใช้ในการถ่ายยีนด้วยวิธี electroporation และ particle bombardment ไม่จำเป็นต้องมีชุดโครงสร้างของ T-DNA

วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียพืช (หน่วยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2556)

การถ่ายยีนด้วยวิธีนี้จัดเป็นวิธีการถ่ายยีนที่ใช้ vector เป็นตัวนำพายีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย เนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนด้วยวิธีนี้มีหลายชนิด เช่น ใบเลี้ยง (cotyledon) หรือต้นอ่อน (Hypocotyl) หรือ ใบจริง (true leaf) ของพืชซึ่งเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เติมฮอร์โมนต่างๆ ในความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วสามารถพัฒนาเป็นยอดหรือคัพภะของพืชและเจริญเติบโตเป็นต้นพืชได้ มักเรียกชื่อวิธีการถ่ายยีนว่า leaf disc transformation มีขั้นตอนสรุปได้ดังนี้

1. เพาะเลี้ยงต้นกล้าพืชหรือต้นพืชที่มีใบจริงโดยสมบูรณ์ในอาหารสังเคราะห์

2. ตัดชิ้นส่วนใบเลี้ยงหรือต้นอ่อนให้มีขนาดพอเหมาะ เพื่อให้เกิดบริเวณที่เป็นรอยตัดของเซลล์

3. เตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียซึ่งภายในเซลล์บรรจุพลาสมิด 2 ชนิด (binary vectors) คือ

3.1 helper plasmid หรือ disarmed plasmid เป็นพลาสมิดที่ประกอบด้วย trans-acting element ได้แก่ vir gene ซึ่งจำเป็นต่อการเข้าสู่เซลล์พืชของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

3.2 autonomous vector หรือ bacterial plasmid เป็นพลาสมิดที่ประกอบด้วย cis-acting element คือยีนเป้าหมายที่ต้องการถ่ายเข้าสู่พืช พร้อมด้วย promoter และ terminator โดยมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ RB (Right border) และ LB (Left border) ขนาบข้างไว้ เมื่อต้องการถ่ายยีนที่อยู่ใน

autonomous vector เข้าสู่พืชก็จะโยกย้ายพลาสมิดนี้เข้าสู่เซลล์ อะโกรแบคทีเรียที่มี helper plasmid อยู่แล้ว เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียบนอาหารแข็งให้ได้ single colony แล้วย้ายโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อนาน 16 ชั่วโมง ตกตะกอนแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหาร เติมอาหารเหลวเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลงไปทดแทน ปรับปริมาณเชื้อให้เข้มข้นประมาณ 109-1012 CFU ใส่ในขวดแก้วมีฝาปิด (บางกรณีอาจเติมสาร acetosyringone ช่วยกระตุ้นการถ่ายยีนด้วย)

4. นำชิ้นพืชที่ตัดไว้ในข้อ 2 มาใส่แช่ในเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เตรียมไว้ เขย่าเป็นครั้งคราวเป็นเวลา 10-30 นาทีพื่อให้เชื้อเกาะกับเซลล์ พืชตรงบริเวณรอยตัดของชิ้นพืช

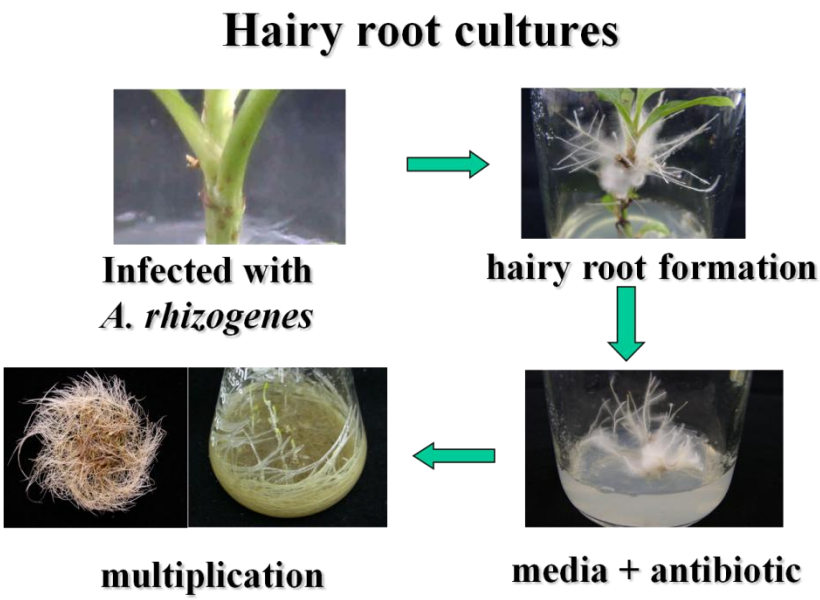
5. ย้ายชิ้นพืชและนำออกมาวางบนอาหารแข็งเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งนิยมใช้เซลล์แขวนลอยของพืชบางชนิด เช่น ยาสูบ มะเขือเทศ โรยบนผิวหน้าอาหาร วางกระดาษกรองทับด้านบนอีกหนึ่งแผ่น วางชิ้นพืชบนกระดาษกรองสารจากเซลล์แขวนลอยจะซึมผ่านกระดาษกรองขึ้นมาช่วยกระตุ้นให้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเข้าสู่เซลล์พืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ บ่มไว้ในที่มืด 2-3 วัน

6. ย้ายชิ้นพืชออกวางเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสำหรับเพาะเลี้ยงชักนำยอดหรือแคลลัส ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย เพื่อเพาะเลี้ยง explant ให้เป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไป

ในกรณีที่ plant vector มีชุดโครงสร้างยีนที่เป็น selectable marker จะเติมสารที่จำเป็นสำหรับการคัดเลือกเฉพาะซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนลงในอาหาร แพาะเลี้ยง explant ด้วย ถ้ามี screenable marker จะสามารถตรวจสอบการเกาะยึดของเซลล์แบคทีเรียกับชิ้นพืช และการแสดงออกของ marker แบบ transient expression ได้ภายใน 24-48 ชั่วโมง

เชื้อ *Agrobacterium* อีกชนิดหนึ่งที่ใช้ถ่ายยีนได้คือ *A. rhizogenes* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรค hairy root ซึ่งต้นพืชที่ได้รับเชื้อดังกล่าวจะมีการสร้างรากฝอยขึ้นมามากมายตรงบริเวณที่ถูก infect เชื้อชนิดนี้จึงเหมาะสำหรับถ่ายยีนให้กับพืชที่สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนรากให้พัฒนาเป็นต้นได้ และเหมาะแก่การชักนำให้เกิดการขยายรากปริมาณมากๆ แล้วนำไปสกัดสารที่รากสร้างขึ้นออกไปใช้ประโยชน์ เช่น พืชสมุนไพรที่ใช้รากเป็นตัวยา (สนธิชัยและเสริมศิริ, 2549) โดยมีขั้นตอนการชักนำ hairy root ดังภาพ

ความสำเร็จของการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium* นอกจากจะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อ และความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัยแล้ว การทำให้เกิดบาดแผลบริเวณเนื้อเยื่อเป้าหมายก็มีความสำคัญเช่นกัน ซึ่งเทคนิคในการทำบาดแผลและเทคนิคเสริมบางอย่างเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนนั้น ได้แก่ การทำบาดแผลโดยใช้มีดกรีด โดยใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงที่ใความถี่สูง (sonicator) โดยใช้สาร sislicon carbide รวมทั้งการใช้สุญญากาศร่วมกับการทำบาดแผล ดังนั้นการจะเลือกใช้วิธีใดต้องพิจารณาปัจจัยหลายยอ่างประกอบกัน เพื่อให้ได้วิธีการที่ดี ค่าใช้จ่ายไม่แพงมาก แต่ต้องมีประสิทธิภาพและเป็นที่ยอมรับได้ และอาจจะต้องใช้หลายวิธีร่วมกัน (สนธิชัยและเสริมศิริ, 2549)



ภาพที่ 8.1 แสดงวิธีการชักนำการเกิดราก hairy root และการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยการใช้เครื่องยิงอนุภาค

เป็นการถ่ายยีนโดยใช้อุปกรณ์ที่มีแรงดันในการขับเคลื่อนอนุภาคโลหะที่เคลือบผิวภายนอกไว้ด้วยดีเอ็นเอที่จะถ่ายเข้าสู่พืชให้เข้าไปในเซลล์เป้าหมาย โดยมีเป้าหมายภายในเซลล์เป็นนิวเคลียสหรือคลอโรพลาส หรือ ไมโตคอนเดรีย แล้วแต่วัตถุประสงค์ของการถ่ายยีน และชนิดของยีนที่ต้องการถ่ายเมื่ออนุภาคดังกล่าวเข้าไปอยู่ในเซลล์พืชแล้ว ดีเอ็นเอที่เคลือบผิวก็จะละลายออกมา และเกิดกระบวนการเชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอของเซลล์พืชเป้าหมาย ทำให้เกิดการเพิ่มยีนที่ต้องการเข้าไปในเซลล์พืชได้ เมื่อนำเซลล์เข้าสู่กระบวนการคัดเลือกและเพาะเลี้ยง และสามารถชักนำให้มีการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ ก็จะได้พืชดัดแปลงทางพันธุกรรม (transgenic plant) ที่มีลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนที่ถ่ายเข้าไปเพิ่มขึ้นมา (สนธิชัยและเสริมศิริ, 2549)

วิธีการที่ใช้ขับเคลื่อนอนุภาคมีชื่อเรียกต่างกันตามกลไกในการขับเคลื่อน ได้แก่ วิธี microprojectile และวิธี transfer impulse หรือ Biolistic การถ่ายยีนจะเกิดขึ้นเมื่ออนุภาคโลหะขนาด 1-4 ไมครอน มีแรงขับเคลื่อนที่ทำให้เกิดความเร็วประมาณ 300-600 เมตรต่อวินาที และสามารถผ่านทะลุผนังเซลล์พืชเข้าไปได้ ซึ่งกลไกของทั้ง 2 แบบสามารถนำมาใช้กับเซลล์ได้หลายชนิดทั้งพืช สัตว์ สาหร่ายเซลล์เดียวสีเขียว และยีสต์ สำหรับพืชใช้ได้กับ explant ที่อยู่ในสภาพเซลล์แขวนลอย แคลลัส เอมบริโอเจนิคแคลลัส คัพภะ ต้นอ่อน และใบเลี้ยงคู่แรกของต้นกล้าใช้ได้กับพืชใบเลี้ยงคู่ทั่วไป เช่น ฝ้าย มะละกอ ยาสูบ ถั่ว และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง (หน่วยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2556)

อนุภาคโลหะที่นิยมใช้ได้แก่ ทังสเตน และทอง นำมาเคลือบผิวภายนอกด้วยดีเอ็นเอซึ่งเป็นพลาสมิดสายผสมที่มียีนเป้าหมายสอดแทรกอยู่สารที่ช่วยแคลือบดีเอ็นเอติด กับอนุภาคได้แก่ calcium chloride และ spermidine จากนั้นอาจผสมอนุภาคกับ ethanol หรือ สารละลายชนิดอื่นตามวิธีการเฉพาะที่ระบุไว้สำหรับอุปกรณ์แต่ละแบบ อุปกรณ์ที่ใช้ทำให้เกิดแรงขับเคลื่อนอนุภาคมีชื่อเรียกต่างๆ ได้แก่ gunpowder device, microtargeting apparatus, pneumatic instrument, flowing helium instrument, biolistic device เป็นต้น ขั้นตอนการถ่ายยีนโดยทั่วไปมีดังนี้ (หน่วยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2556)

1. เตรียม explant ที่จะใช้ถ่ายยีน โดยให้ explant วางอยู่บนอาหารแข็งที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาจมีการใช้สารช่วยปรับสภาพเซลล์ เช่น สารละลายน้ำตาล

2. เคลือบดีเอ็นเอบนอนุภาคทอง หรือทังสเตน ตามวิธีการที่เหมาะสม

3. ใช้อุปกรณ์สำหรับขับเคลื่อนอนุภาคส่งอนุภาคออกไปสู่ explant ซึ่งจะทำภายในตู้ (chamber) ปลอดเชื้อขนาดเล็กที่ชื่อมต่อจากอุปกรณ์ขับเคลื่อน

4. นำ explant ไปเพาะเลี้ยงต่อให้เป็นต้นพืช และตรวจสอบผลการถ่ายยีน

การคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน

เซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนจะมี selectable marker บางชนิดที่แสดงออกได้ในเซลล์พืช และทำให้เซลล์ดังกล่าวเจริญได้อาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารบางชนิดที่สอดคล้องกับ คุณสมบัติของ marker เช่น เจริญได้ในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ กานามัยซิน ซึ่งเป็นผลจากยีน NPT II หรือ เจริญได้ในอาหารที่เติมสารเคมีกำจัดวัชพืช Bialaphos ซึ่งเป็นผลมาจากยีน bar เป็นต้น ปัจจุบัน การใช้ selectable marker ชนิดอื่นอีก เช่น ยีนควบคุมการใช้น้ำตาลบางชนิด เซลล์ที่เจริญได้จะพัฒนาเป็นลำดับเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการพัฒนาเซลล์และเนื้อเยื่อจนเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงขึ้นกับชนิดพืช ซึ่งมักจะใช้เวลาไม่น้อยกว่า 2-3 เดือน

การตรวจสอบต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีน

ต้นพืชที่พัฒนามาจากเซลล์และเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน จัดเป็น transgenic plant หรือ พืชจำลองพันธุ์รุ่นแรก (R_0) การตรวจสอบทำได้ทั้งการใช้วิธีการทาง อณูชีววิทยาและชีววิทยาการวิเคราะห์และตรวจสอบว่าพืช R_0 แต่ละต้นมียีนเป้าหมาย สอดแทรกอยู่ในโครโมโซมหรือไม่นิยมทำโดยการสกัดดีเอ็นเอจากโครโมโซมของพืช แล้วย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis แล้วใช้เทคนิค Southern transfer ย้ายดีเอ็นเอจากเจลไปสู่แผ่นเมมเบรน เพื่อตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่มียีน เป้าหมายอยู่โดยใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) นอกจากนี้อาจตรวจหายีนเป้า หมายบนโครโมโซมพืชด้วยเทคนิค พีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ได้อีกวิธีหนึ่ง

การตรวจสอบผลผลิตของยีนเป้าหมายในพืช R_0 ทำได้จากการตรวจสอบ อาร์เอ็นเอส่งข่าว (mRNA) ด้วยเทคนิค Northern hybridization หรือ เทคนิค RT-PCR และทำได้โดยการตรวจสอบโปรตีนที่เป็นผลผลิตยีนด้วยเทคนิค ELISA และ Western blot analysis หรือตรวจหาเอนไซม์ที่เป็นผลผลิตของยีนด้วยเทคนิคทางชีวเคมี ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบคุณภาพของพืชจำลองพันธุ์ที่ได้ว่ามีลักษณะทาง พันธุกรรมเปลี่ยนไปตรงตามความประสงค์อาจจำเป็นต้องใช้วิธีทดสอบทางชีววิทยา เช่น การตรวจดูความต้านทานโรค แมลงศัตรูพืช โดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืชให้กับพืชที่ได้รับการ ถ่ายยีนหรือให้แมลงดูดกิน กัดกินพืชที่ได้รับการถ่ายยีน แล้วประเมินคุณภาพพืชที่ได้รับการถ่ายยีนว่าดีกว่าพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนหรือไม่อย่างไร

สำหรับการตรวจสอยการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากรุ่น R_0 ไปสู่รุ่น R_1 และ R_2 ใช้วิธีการทางอณูชีววิทยาเช่นเดียวกับการตรวจสอบพืชรุ่น R_0 รวมทั้งการทดสอบการกระจายตัวของยีนตามกฎของเมนเดล ซึ่งอาจตรวจสอบจาก screenable marker หรือ selectable marker หรือ ตรวจคุณภาพของพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยที่พืชที่ได้รับการถ่ายยีนรุ่น R_1 และ R_2 จะต้องได้มาจากการผสมตัวเองของพืชรุ่น R_0 และ R_1 ตามลำดับ (หน่วยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2556)

บรรณานุกรม

วราภรณ์ ภูตะลุน. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร: แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา. บริษัทขอนแก่นพิมพ์พัฒนา จำกัด. ขอนแก่น. 120 หน้า.

สนธิชัย จันทร์เปรม และ เสริมศิริ จันทร์เปรม. 2549. เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการเกษตร. ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ. คณะเกษตร กำแพงแสน ร่วมกับศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

หน่วยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2556. การถ่ายยีนเข้าสู่พืช.[ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.rdi.ku.ac.th/GMOS/GMOs2/2_1/index4.htm. (วันที่ค้นข้อมูล : 22 มีนาคม 2556)

บทที่ 9

แนวทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรเพื่อผลิต

สารทุติยภูมิ

สารประกอบทุติยภูมิ (Secondary Metabolites)

พืชสร้างสารปฐมภูมิ (primary metabolite) ขึ้นมาเพื่อใช้ในการดำรงชีวิต และการเจริญเติบโต ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต น้ำตาล ไขมัน เป็นต้น สารปฐมภูมิที่พบในพืชสามารถนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับมนุษย์ นอกจากนี้ พืชยังมีคุณค่าสำหรับใช้เป็นแหล่งยารักษาโรคต่างๆ จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้ถูกนำมาใช้เป็นยา อาหารเสริม รวมถึงการนำมาใช้ในการแต่งสี กลิ่น ในเครื่องสำอาง สารที่ถูกนำมาใช้เหล่านี้จัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite)

ปกติพืชจะสร้างสารทุติยภูมิเพื่อทำหน้าที่ป้องกันตัวเองจากการบุกรุกจากเชื้อจุลินทรีย์ แมลง และสัตวืต่างๆที่มารบกวนหรือบุกรุก ทำให้พืชสามารถปรับตัวเพื่อดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมได้ โดยสารทุติยภูมิที่พบในพืชส่วนใหญ่จะพบในปริมาณที่ต่ำ สารทุติยภูมิกลุ่มต่างๆที่พบในพืช ได้แก่ alkaloid terpenoid phenolic steroid flavonoid เป็นต้น มีการศึกษาพบว่าสารทุติยภูมิในพืชเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางยาและถูกนำมาใช้ในการรักษโรค

ปัจจุบันความกาวหน้าทางเทคโนโลยีชีวภาพได้พัฒนาไปอย่างรวดเร็ว เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานการขยายพันธุ์พืชสมุนไพรเพื่อเพิ่มปริมาณ และให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางยาสูงในระยะเวลาสั้น และมีคุณภาพดีทำให้มีประโยชน์ในเชิงการค้า โดยเฉพาะสมุนไพรที่มีข้อจำกัดในการขยายพันธุ์ในธรรมชาติ หรือปัจจัยอื่นๆ ซึ่งการเพาะเลี้ยงอาจได้จากการนำชิ้นส่วนพืช (explants) หรืออวัยวะพืชที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญ

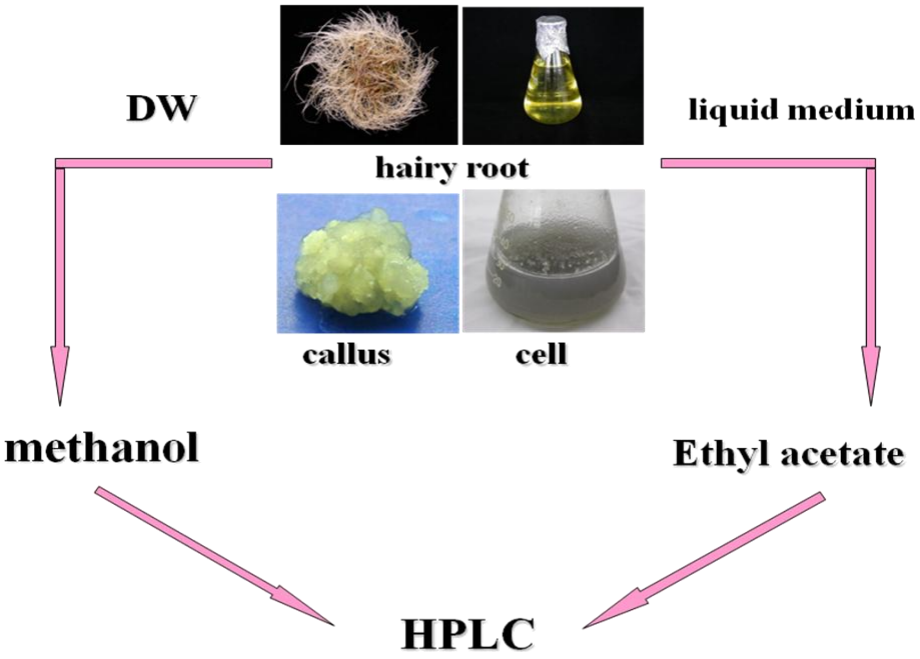
เช่น ปลายยอด (shoot tip) หรือตาข้าง (axillary bud) มาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ให้มีการเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นจำนวนมากเพื่อนำไปปลูกและขยายพันธุ์ต่อไป หรือได้จากการนำชิ้นส่วนใบ ราก และลำต้น มาชักนำให้เกิดแคลลัส และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นยอดพิเศษ (adventitious shoot) จากนั้นจึงทำให้เกิดรากเพื่อให้ได้ต้นอ่อนที่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังสามารถขยายพันธุ์โดยการชักนำให้เกิด somatic embryo จากเซลล์พืช หรือจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสได้เช่นกัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตสารทุติยภูมิจึงมีข้อดีเหนือกว่าการผลิตโดยการใช้การเพาะปลูกในธรรมชาติโดยไม่มีปัจจัยรบกวนจากภูมิประเทศ สภาพอากาศ และสภาพแวดล้อมอื่นๆ สามารถควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยเนื้อเยื่อเพื่อให้เก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตลอดเวลา ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างรุ่นการผลิต และบางวิธียังสามารถเพิ่มผลผลิตให้ได้มากกว่าตามธรรมชาติอีกด้วย ได้แก่ การตรึงเซลล์โดยกักขังเซลล์ไว้ภายในสารที่มีโครงสร้างตาข่าย เช่น อะกาโรส polyacrylamide เป็นต้น (สมพร, 2549) การพัฒนาให้เป็นอวัยวะที่เหมาะแก่การสร้างหรือสะสมสารทุติยภูมิ การเติมสารตั้งต้นของกระบวนการชีวสังเคราะห์และการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ การเติมสารซึ่งสามารถกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น การรบกวนสภาพการเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแวคิวโอเพื่อให้มีการปลดปล่อยสารทุติยภูมิออกมา รวมทั้งสร้างแหล่งสะสมเทียมในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อให้เป็นที่สะสมสารทุติยภูมิที่อาจเป็นพิษต่อเซลล์ ในทำนองเดียวกัน เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมอาจนำมาใช้ร่วมกับเทคนิคเหล่านี้เพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่ต้องการในปริมาณมากขึ้นได้ นอกจากนี้อาจผลิตสารใหม่ซึ่งไม่พบจากต้นพืชในธรรมชาติได้ด้วย ปัจจุบันได้มีการนำพืชสมุนไพรมาใช้สำหรับผลิตยาแผนปัจจุบันแล้ว และยังสามารถใช้เป็นแหล่งของการผลิตสารกึ่งสังเคราะห์ในทางอุตสาหกรรมยา และเป็นสารต้นแบบในการนำไปสู่การพัฒนายาใหม่ได้อีกทางหนึ่ง (วราภรณ์, 2551)

แนวทางการผลิตสารทุติยภูมิในพืชสมุนไพรโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การศึกษาวิจัยเพื่อเพิ่มการผลิตสารทุติยภูมิที่ได้จากพืช สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นพื้นฐาน เพื่อใช้ในการพัฒนาและปรับปรุงวิธีการต่างๆในการเพิ่มปริมาณ

การสร้างสาร รวมไปถึงการเพิ่มผลผลิตของสารที่เซลล์พืชผลิตได้ โดยทำการเพาะเลี้ยงนระดับอุตสาหกรรมในถังเพาะเลี้ยง (bioreactor) ทดแทนการเพาะปลูกพืชจากธรรมชาติ ซึ่งแนวทางการผลิตคือ การนำพืชจากธรรมชาติมาชักนำให้เกิดแคลลัส จากกนั้นนำแคลลัสที่ได้ปทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเพื่อผลิตสาร หรือการชักนำแคลลัสที่ได้ให้เกิดอวัยวะ อาจทำการกระตุ้นให้เกิดยอด แล้วทำการเพาะเลี้ยงเฉพาะส่วนยอด หรือกระตุ้นให้เกิดราก แล้วทำการเพาะเลี้ยงราก หรือชักนำให้เกิดต้นอ่อนจากแคลลัส เพื่อทำการขยายพันธุ์พืชสมุนไพร นอกจากนี้ยังสามารถทำการเพาะเลี้ยงในลักษณะ รากลอย หรือที่เรียกว่า hairy root culture ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยเชื้อแบคที่เรีย *Agrobacterium rhizogines* (วราภรณ์, 2551)

ลักษณะการเพาะเลี้ยงพืชสมุนไพรเพื่อนำมาผลิตสารทุติยภูมิสามาถสรุปได้ดังภาพที่ 9.1



ภาพที่ 9.1 การเพาะเลี้ยงราก hairy root แคลลัสและเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง เพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

บรรณานุกรม

วราภรณ์ ภูตะลุน. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร: แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา. บริษัทขอนแก่นพิมพ์พัฒนา จำกัด. ขอนแก่น. 120 หน้า.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.สงขลา. 127 หน้า.

บทที่ 10

ปัญหาที่พบสำหรับการผลิตพืชเพื่อการค้าด้วยวิธี

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์พืชหลายชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งพืชสวน พืชไร่ ป่าไม้ พืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติทางยา รวมถึงพันธุ์พืชหายากและใกล้จะสูญพันธุ์ ปัจจุบันมีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้เพื่อประโยชน์ทางการค้าและมีสร้างห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศและต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศแถบทวีปยุโรป สหรัฐอเมริกา แคนาดา และญี่ปุ่น ซึ่งในอนาคตอาจจะมีการพัฒนาการผลิตไปในเชิงอุตสาหกรรมมากขึ้น และอาจจะได้พืชสายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่มีลักษณะเด่นและมีคุณภาพดีตามต้องการ และสร้างรายได้ให้กับผู้ประกอบการธุรกิจประเภทนี้เป็นอย่างมาก

สำหรับประเทศไทยนั้นมีผู้ประกอบธุรกิจประเภทนี้มานานแล้วเช่นกัน แต่ไม่เป็นที่แพร่หลายมากนักเหมือนในต่างประเทศ โดยส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นการผลิตและการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ เนื่องจากเป็นไม้ดอกเศรษฐกิจของประเทศไทย และในเวลาต่อมาจึงได้มีการผลิตไม้ดอกและไม้ประดับใบชนิดอื่นๆ เช่น หน้าวัว ปทุมมา ฟิโลเดรนดรอน กฤษณา อะโกรนีมา เป็นต้น ซึ่งมีรายชื่อของสถานประกอบการผลิตพืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อผู้ประกอบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2556)

ลำดับที่	ชื่อ	สถานที่ติดต่อ	เบอร์โทรติดต่อ	พืชที่ทำเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
1	บริษัท ยูเซนฟลาวเวอร์ (ประเทศไทย) จำกัด	163 ชั้น 11 อาคารไทยสมุทรพาณิชย์ประกันภัย ถ.สุรวงศ์ แขวงสุริยวงศ์ เขตบางรัก กทม. 10160	02-2351076, 02-236-0075 034-391127	กล้วยไม้สกุลต่าง ๆ
2	บริษัทบางกอกฟลาวเวอร์ เซนเตอร์ จำกัด	34/19 หมู่ 7 ถ.เพชรเกษม หนองแขม กทม. 10160	02-4210020-4, แฟกซ์ : 02 421-0025	กล้วยไม้สกุลต่าง ๆ เช่น หวาย คัทลียา ฯลฯ หน้าวัว
3	BOTANICAL GARDENS BANGKOK	687 ต.ดูหาสวรรค์ ภาษีเจริญ กทม. 10160	02-4210500, 421-023,421-9506, แฟกซ์ : 02-421-1687	กล้วยไม้สกุลต่าง ๆ
4	บริษัท เอกเซลออร์คิด จำกัด	63/3 ถ.เพชรเกษม 63 หนองแขม กทม. 10160	(02)455-6974-80 แฟกซ์ : (02) 454-1781	กล้วยไม้สกุลต่าง ๆ
5	บริษัท สุภาออร์คิด จำกัด	559/77 หมู่ 3 ถ.เพชรเกษม ซ.92 บางแค ภาษีเจริญ กทม. 10160	(02)413-0784,454-0797 แฟกซ์ : (02) 420-0321	กล้วยไม้สกุลต่าง ๆ
6	บริษัท มีนบุรี ออร์คิด เนิสเซอรี่	9 หมู่ 8 ถ.รามคำแหง มีนบุรี กทม. 10510	(02)543-8298 แฟกซ์ : (02) 543-8289	กล้วยไม้สกุลต่าง ๆ
7	บริษัท ไทยออร์คิดแล็ป จำกัด	73/4 หมู่ 3 ถ.พุทธบูชา บางมด ราชบูรณะ กทม. 10140	(02)870-6267,426-3429 แฟกซ์ : (02) 870-6269	กล้วยไม้ ไม้ใบบางชนิด ไม้ดอก และอื่น ๆ
8	บริษัท TOC Lab	73/3 หมู่ 3 ซ.พุทธบูชา 39 ถ.พุทธบูชา บางมด เขตทุ่งครุ กทม. 10140	02-8748490 02-8748491	กล้วยไม้สกุลต่าง ๆ ไม้ใบ
9	ห้างหุ้นส่วนจำกัด เจ้าพระยาออร์คิด เนิสเซอรี่	63/2 หมู่ 1 ถ.สามโคก-เสนา อ.สามโคก จ.ปทุมธานี	(02)593-1389-91 แฟกซ์ : (02) 593-1392	กล้วยไม้หวาย
10	บริษัท กรุงเทพอุตสาหกรรมเมล็ดพันธุ์ จำกัด	187 หมู่ 13 ต.พัฒนานิคม อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี 15140 e-mail : cplabtc@hotmail.com	0-3649-1355-6 แฟกซ์ : 0-3649-1337	กล้วยไม้สกุลต่าง ๆ ไม้ใบต่าง ๆ หน้าวัว

11	อาร์ ออร์คิดส์ (R.ORCHIDS)	99/22 หมู่บ้าน 99 ถนนงามวงศ์วาน ลาดยาว จตุจักร กทม. 10900	(02)5611255 (01) 4904682	กล้วยไม้สกุลต่าง ๆ
12	บริษัท กฤษณะ เอ็สเซ็นท์ออล์ จำกัด	126/2050 ซ. 19/1 ถ. ติวานนท์ ต.ปากเกร็ด จ. นนทบุรี e-mail : info@thaiessential.com	(02)964-3488 (06)975-9959 แฟกซ์ : (02) 964-2684	กฤษณา
13	สวนเกษตร 32	170/1 ม.11 ต.โป่งผา อ.แม่สาย จ.เชียงราย	(01)885-7433 แฟกซ์ : (053) 646-113	หน้าวัว
14	บริษัท ปากเกร็ด ฟลอริคัลเจอร์ จำกัด	46/6 ม.1 ถ.ติวานนท์ ต.บางพูด อ..ปากเกร็ด จ. นนทบุรี 11120 e-mail : pakkretfloriculture.com	(02)961-9955 แฟกซ์:(02)961-9956	กล้วยไม้,ลัทลียา,ขิง,ไม้ใบต่างๆ
15	บริษัท สุภาออร์คิดส์ อินเตอร์แลบ จำกัด	111 ม.10 พุทธมณฑลสาย 4 ต.อ้อมน้อย อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร 74130	(02) 810-6381-9	กล้วยไม้

ปัจจุบันมีผู้สนใจทำธุกิจนี้เพิ่มมากขึ้นและมีการสร้างห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขึ้นมาเองโดยทำในลักษณะทั้งที่เป็นการค้าหรือทำเพื่อเป็นงานอดิเรก อย่างไรก็ตามในการสร้างห้องปฏิบัติการดังกล่าวโดยเฉพาะการสร้างเพื่อผลิตในเชิงการค้านั้นควรคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ต่อไปนี้

1. **ทำเลของห้องปฏิบัติการ** (สนธิชัยและเสริมศิริ, 2549)

1.1 ควรเลือกทำเลที่มีฝุ่นน้อยที่สุด และอยู่ห่างจากแหล่งปนเปื้อนได้ง่าย ไม่ควรตั้งอยู่ริมถนน หรือโรงงานอุตสาหกรรมที่ทำให้เกิดฝุ่นผงมาก

1.2 ควรมีระบบไฟฟ้าที่ดี สำหรับในสถานที่ที่มีไฟฟ้าเสียบ่อย ๆ ควรมีเครื่องกำเนิดไฟฟ้าสำรอง (stand by generator) และมีตัวตัดไฟฟ้าอัตโนมัติในกรณีผิดปกติ เพื่อป้องกันเครื่องใช้ไฟฟ้าต่างๆเสียหายอาจเนื่องจากกระแสไฟฟ้าตกหรือกระชาก

1.3 ควรมีแหล่งน้ำสะอาด และมีระบบน้ำที่ดีและเพียงพอสำหรับการปฏิบัติงาน

1.4 ควรเลี่ยงพื้นที่ ที่มีความชื้นเกินไป เพราะความชื้นจะทำให้เกิด การปนเปื้อนได้ค่อนสูงในการเพาะเลี้ยง และห่างไกลจากพื้นที่ที่มีการเลี้ยงสัตว์ หรือโรงเห็ด

1.5. ควรอยู่ในสถานที่ที่สามารถใช้ระบบควบคุมอุณหภูมิได้

1.6 ควรห่างจากจุดที่มีการสัญจรไปมาคับคั่ง

ถ้าไม่สามารถเลือกทำลของห้องปฏิบัติการตามหลักการที่กล่าวข้างต้นได้ อาจจะต้องระวังในเรื่องของการปฏิบัติงานของผู้ทำงาน โดยให้ผู้ปฏิบัติงานนั้นปลอดเชื้อมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ ซึ่งก่อนปฏิบัติงานอาจจะต้องมีอาบน้ำและสวมเสื้อสะอาดที่จัดไว้ หรือห้องปฏิบัติการอาจจะต้องมีการทำความสะอาดทุก 2-3 วัน ตรวจเช็คขวดเพาะเลี้ยงที่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ทุกวัน รวมทั้งมดหรือแมลงตัวเล็กๆที่อาจเข้าไปได้

2. ต้นทุนการผลิต

เป็นสิ่งจำเป็นที่สุดสำหรับการประกอบธุรกิจ การที่จะสร้างสถานประกอบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขึ้นมา จะต้องคิดจากค่าใช้จ่ายต่างๆ ที่เกิดขึ้นทั้งหมดในการผลิต ได้แก่ ค่าเช่าที่ดิน ค่าปรับปรุงพื้นที่ ค่าเสื่อมราคา ค่าโรงเรือน ระบบน้ำ ระบบให้ปุ๋ย บ้าน เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆที่เกี่ยวข้อง ค่าต้นพันธุ์ วัสดุปลูก แรงงาน หัวหน้าแรงงาน ปุ๋ย ยาปราบศัตรูพืช โรค และแมลง รวมถึงระบบการขนส่ง ซึ่งต้นทุนการผลิตของสถานประกอบการแต่ละแห่งจะมีความแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับว่ามีทุนมากหรือน้อย แต่การลงทุนมากก็มิได้หมายความว่าจะประสบผลสำเร็จในธุรกิจเสมอไป ถ้ามีการจัดการต่างๆไม่ดีพอ รวมทั้งไม่ได้มีการศึกษาความเป็นไปได้ของการตลาด อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปถ้าเป็นสถานประกอบการที่มีขนาดใหญ่มักจะลงทุนเป็นหลักล้านบาทขึ้นไป แต่ถ้าเป็นสถานประกอบการขนาดเล็กหรือทำเพื่อเป็นงานอดิเรกจะลงทุนขั้นต่ำประมาณ 230,000บาท ซึ่งมักจะใช้ห้องที่มีอยู่แล้ว และนำมาปรับปรุงทำเป็นห้องปฏิบัติการทั้งนี้ไม่ได้รวมค่าแรงงาน ค่าต้นพันธุ์พืช และการจัดการดูแล (ตารางที่ 2 และ 3)

ในบางครั้งผู้ประกอบการธุรกิจประเภทนี้อาจจะไม่จำเป็นต้องมีห้องปฏิบัติการเป็นของตัวเองแต่ก็สามารถประสบความสำเร็จในธุรกิจนี้ได้ ไม่ต้องลงทุนสูงมากนัก อย่างน้อยก็ลงทุนค่าต้นพันธุ์หรือค่าแรง โดยอาศัยสถานประกอบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในภาคเอกชนหรือ

ภาครัฐบาลก็ได้ ซึ่งส่วนใหญ่มักจะเป็นนักสะสมพันธุ์ไม้แปลก และมีการซื้อขายกันทางอินเตอร์เน็ตในปัจจุบัน

ตารางที่ 2 ประมาณต้นทุนการผลิตสำหรับสถานประกอบการที่มีขนาดใหญ่

รายการ	**ต้นทุน/ไร่ (บาท/ไร่)**	**ต้นทุนทั้งหมด (บาท)**
1.หมวดเงินลงทุนในที่ดิน โรงเรือนและอุปกรณ์		20 ไร่
ค่าเช่าที่ดิน	3,000	60,000
ค่าปรับปรุงพื้นที่		200,000
ค่าปลูกสร้างโรงเรือนและโต๊ะวางกล้วยไม้	135,000	2,700,000
ค่าติดตั้งระบบน้ำละอุปกรณ์	30,000	600,000
ค่าติดตั้งระบบให้ปุ๋ย	5,000	100,000
ค่าปลูกสร้างเรือนเอนกประสงค์		500,000
ค่าเครื่องมือเครื่องใช้	2,000	40,000
ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	15,000	300,000
รวมหมวดที่ 1		**4,500,000**
2.หมวดเงินลงทุนต้นพันธุ์และวัสดุปลูก		
ค่าต้นพันธุ์ ไร่ละ 16,000 ต้นๆละ 7 บาท	112,000	2,240,000
ค่าวัสดุปลูก ไร่ละ 4,000 ก้อนๆละ 7 บาท	28,000	560,000

รวมหมวดที่ 2		**2,800,000**
3.หมวดเงินลงทุนด้านแรงงาน		
ค่าแรงงานประจำ 10 คน/เดือน	4500*10คน*12ด.	540,000
ค่าแรงงานผู้บริหารสวน หรือหัวหน้าสวน 1 คน/เดือน	10,000*12ด.	120,000
รวมหมวดที่ 3		**660,000**
4.หมวด ปุ๋ย ยาฆ่าแมลง ไร่ละ 3,000 บาท/เดือน	3,000*20*12ด.	720,000
รวมหมวดที่ 4		**720,000**
เงินลงทุนเริ่มแรก 1+2+3+4		**8,680,000**
เงินสำรองเพื่อสภาพคล่อง		**500,000**
ยอดเงินลงทุนเริ่มแรก		**9,180,000**

ตารางที่ 3 ประมาณต้นทุนการผลิตสำหรับสถานประกอบการที่มีขนาดเล็ก

รายการ	จำนวน	หน่วยละ	ราคา (บาท)
1.ชั้นวางเนื้อเยื่อพืชในห้อง LAB พร้อมระบบไฟฟ้า	5 ตัว (4 ชั้น)	-	50,000
2. ค่าใช้จ่ายในการปรับปรุงห้อง LAB			20,000
3. ตู้ปลอดเชื้อ	1	35,000	35,000
4. หม้อนึ่งความดัน	1	18,000	18,000
5. เครื่องปรับอากาศ	2	35,000	70,000
6. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง	1	5,000	5,000
7. เครื่องวัด pH	1	2,000	2,000
8. อุปกรณ์ย้ายเนื้อเยื่อพืช (ด้ามมีด forcep)	10 ชุด	5,000	5,000
9. ใบมีด	5 กล่อง	700	3500
10. ตะเกียงแอลกอฮอล์	2	60	120
11. ตู้เย็น	1	5,000	5,000
12. สารเคมี		100,000	100,000
13. ขวดแก้ว	5000	4	20,000
14. หลอด UV ฆ่าเชื้อในห้อง	2	3000	6,000
15. กระถางนิ้ว วัสดุปลูก กล่องพลาสติก	10,000	3	30,000
ต้นทุนทำเฉพาะในห้องปฏิบัติการ			**229,620**

3. ช่องทางการตลาด

สิ่งที่ขาดไม่ได้สำหรับการประกอบธุรกิจเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือการศึกษาช่องทางการตลาดและอนาคตความเป็นไปได้ของการตลาดเกี่ยวกับพืชที่จะทำการผลิต เนื่องจากความนิยมของพันธุ์ไม้แต่ละชนิด ถ้าผู้ประกอบการใดสามารถผลิตพืชได้ก่อนก็จะได้เปรียบในเรื่องของการตั้งราคาสูงได้ แต่ถ้าเมื่อใดที่มีผู้ประกอบการอื่นผลิตได้หรือเกิดการแข่งขันทางการตลาดเกิดขึ้น ราคาของพันธุ์ไม้ชนิดนั้นก็จะลดลงไป ดังนั้นผู้ผลิตอาจจะต้องหาพันธุ์พืชชนิดอื่นสำรองไว้ด้วย หรือปรับปรุงพันธุ์ใหม่ๆออกมาอยู่ตลอดเวลา ก็จะทำให้ธุรกิจมีการเติบโตต่อไปได้ สำหรับพืชบางชนิด เช่น พืชกินแมลง บางครั้งมักจะเป็นที่นิยมสำหรับผู้เลี้ยงเฉพาะบางกลุ่มเท่านั้น ดังนั้นผู้ประกอบการแต่ละแห่งจะต้องมีวิธีการของตัวเองที่จะนำพาให้ธุรกิจพืชชนิดนี้สามารถไปรอดได้ โดยการหาตลาดทั้งภายในประเทศและต่างประเทศควบคู่กันไป ปัจจุบันสามารถใช้ internet หรือทำการสร้าง website ของผู้ผลิตเอง ซึ่งก็เป็นอีกหนึ่งช่องทางการตลาดที่สามารถทำรายได้ให้กับผู้ผลิตได้ ซึ่งในต่างประเทศมีการซื้อขายกันทาง internet มากมาย มีทั้งการขายต้นพืช เมล็ด หรือแม้กระทั่งพืชในหลอดแก้ว รวมทั้งการแลกเปลี่ยนสายพันธุ์พืชได้เช่นกัน

4. การสั่งซื้อและการนำเข้าต้นพันธุ์พืชจากต่างประเทศ

บางครั้งผู้ผลิตอาจจะต้องกล้าเสี่ยงที่จะลงทุนในการซื้อหรือนำเข้าต้นพันธุ์พืชจากต่างประเทศ ซึ่งอาจจะใช้วิธีการสั่งซื้อทาง internet หรืออาจฝากเพื่อนที่อยู่ต่างประเทศ หรือไปนำเข้ามาด้วยตัวเอง ซึ่งนับว่าเป็นอีกวิธีการหนึ่งเพื่อที่จะได้พันธุ์พืชชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีในประเทศได้ ซึ่งถ้าสามารถผลิตได้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ก็จะเป็นการสร้างรายได้ให้กับผู้ผลิตเอง สามารถลดการนำเข้าพันธุ์พืชจากต่างประเทศเพื่อมาขายในราคาที่สูงมากเกินไป นอกจากนี้ยังเป็นการสร้างความหลากหลายของชนิดพันธุ์พืชให้มีในประเทศไทย สำหรับการสั่งนำเข้าต้นพันธุ์พืชจากต่างประเทศนั้น พืชบางชนิดอาจมีปัญหาเรื่องของการนำเข้าติดอยู่ที่ด่านศุลกากร ดังนั้นอาจจะต้องซื้อใบปลอดโรค (phytosanitary) จากผู้ขาย แต่ถ้าเป็นเมล็ดมักจะไม่มีปัญหาสามารถส่งถึงมือของผู้รับได้โดยตรง บางครั้งการนำเข้าต้นไม้จากต่างประเทศโดยเฉพาะต้นพืชในหลอดแก้วอาจจะต้องคำนวณวันที่จะส่งมาถึงมือผู้รับด้วย เพราะเนื่องจากบางครั้งตรงกับวันหยุดยาว ทำให้ไม่สามารถออกของได้ จึงเป็นเหตุให้ต้นไม้ตายเนื่องจากอยู่ในสภาพที่อุณหภูมิสูง

ปัญหาและอุปสรรคที่พบสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2556; รังสฤษดิ์, 2540)

เมื่อมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปปฏิบัติจริง โดยเฉพาะเพื่อการขยายผลในเชิงการค้ามักจะไม่เป็นไปตามเป้าหมายที่วางไว้เนื่องจาก มีการลงทุนที่ค่อนข้างสูงอยู่พอสมควร และอาจมีปัญหาอื่นๆเกิดขึ้นตามมาภายหลังจากที่ได้มีการปฏิบัติงานไปแล้ว เช่น มีการเตรียมอาหารผิดพลาดโดยใช้ความเข้มข้นของ stock solution หรือสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่ถูกต้อง ความผิดปกติที่เกิดกับต้นพืช การปนเปื้อนของเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย ในขวดเนื้อเยื่อพืช สิ่งที่ประสบปัญหาเหมือนกันทุกสถานประกอบการที่มีการสร้างห้องปฏิบัติการ (LAB) คือการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ เชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ นับตั้งแต่เริ่มฟอกเนื้อเยื่อเข้ามาใน LAB เพราะเชื้อจุลินทรีย์อาจติดมากับชิ้นส่วนพืช อย่างไรก็ตามปัญหาที่พบเสมอสำหรับห้องปฏิบัติการทั้งในส่วนของภาคเอกชนและภาครัฐบาลพอสรุปได้ดังนี้

1. การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ (contamination)

การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เป็นปัญหาที่สำคัญที่สุดและทุกห้อง LAB ต้องพบอุปสรรคเกี่ยวกับปัญหานี้ โดยเฉพาะเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย ที่เกิดขึ้นในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเริ่มจากผู้ปฏิบัติงานอาจไม่สะอาดเพียงพอ โดยเฉพาะการเข้าไปปฏิบัติงานในสถานที่ที่ไม่สะอาดซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์ปะปนอยู่ในอากาศ เช่น แปลงเพาะปลูกพืช สถานที่มีฝุ่นผลจำนวนมาก สถานที่เปียกชื้นและสกปรก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสาเหตุมาจากเทคนิคการทำงาน ได้แก่ การนึ่งฆ่าเชื้ออาหารไม่มีประสิทธิภาพ การวางวัสดุอุปกรณ์ที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อปนกันกับพวกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว การฟอกชิ้นส่วนพืชซึ่งไม่ปลอดเชื้อเพียงพอ รวมถึงการมีมดหรือแมลงตัวเล็กๆที่สามารถเข้าไปตามเกลียวของฝาขวด โดยเดินจากขวดหนึ่งไปยังอีกขวดหนึ่ง ทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อดังกล่าวได้ (ภาพที่ 10.1)

ก. ข.

ภาพที่ 10.1 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการเพาะเลี้ยงชิ้นส่นพืช

ก. เชื้อรา

ข. เชื้อแบคทีเรีย

2. ความผิดปกติที่เกิดกับต้นพืช

จากการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อพืชไประยะเวลาหนึ่ง อาจจะแสดงลักษณะที่ผิดไปจากสภาพการเจริญเติบโตปกติ ซึ่งมีสาเหตุมาจากวิธีการดำเนินงาน ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต ในอัตราที่เข้มข้นมากเกินไปเป็นเวลานาน การที่ต้นพืชโดนแสง UV จากการติดตั้งหลอด UV เพื่อฆ่าเชื้อภายในห้องเพาะเลี้ยง อาการต่างๆที่เกิดขึ้นได้แก่

- อาการใบด่างขาว เป็นอาการที่ใบพืชจะเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นขาว มีทั้งแบบสีขาวทั้งใบ สีขาวครึ่งใบ หรือสีขาว ตามขอบใบ

- อาการฉ่ำน้ำ (Vitrification) เป็นอาการผิดปกติที่เห็นได้ชัดเจน บริเวณใบจะใสเหมือนแก้ว อาจมีสาเหตุจาก ปริมาณน้ำภายในเซลล์มากเกินไป ถ้าย้ายออกปลูก มักจะตายในที่สุด

- ต้นพืชมีการหยุดเจริญเติบโต

- ต้นพืชมีลักษณะบิดเบี้ยว ใบแคบเล็ก หรือไม่มีใบ

- ต้นพืชมีการเจริญเติบโตและพัฒนาไม่พร้อมกัน ทำให้แผนการเพิ่มปริมาณอาจผิดพลาดไปได้ เนื่องจากต้องคัดเลือกต้นที่มีความสูงมาก เข้าสู่ระยะการชักนำราก ส่วนต้นที่มีความสูงน้อย นำมาเพิ่มปริมาณยอดต่อไปได้

3. พืชที่มีปัญหาการออกรากยาก

มีพืชหลายชนิดที่สามารถขยายเพิ่มปริมาณได้มาก แต่เมื่อถึงระยะการชักนำให้ออกราก ต้นพืชนั้นไม่มีการตอบสนองต่อการเกิดราก ถึงแม้ว่าจะผ่านการทดสอบในขั้นตอนดังกล่าวแล้วก็ตาม ปัญหานี้มักจะพบกับพืชไม้เนื้อแข็ง เช่น เปล้าน้อย

4. ความนิยมของสายพันธุ์

ปัญหานี้สามารถเกิดได้ เนื่องจากความนิยมเรื่องสายพันธุ์พืช มีเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาและค่อนข้างรวดเร็ว ดังนั้นพืชที่ถูกผลิตออกมาจึงไม่เป็นที่นิยมในขณะนั้น ทำให้สูญเสียงบประมาณ แรงงานในการผลิต แม้ว่าได้สภาพการผลิตที่เหมาะสมแล้วก็ตาม ทั้งนี้อาจจะต้องแก้ปัญหาโดยการผลิตหลายๆสายพันธุ์ หรือพยายามปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะที่แตกต่างจากพันธุ์เดิมที่มีอยู่

5. การขายตัดราคากันทางการตลาด

เนื่องจากมีการแข่งขันทางตลาดสูง พันธุ์ไม้บางชนิดราคาการผลิตค่อนข้างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงทำให้ผู้ผลิตสามารถขายได้ราคาดีตลอด แต่พันธุ์ไม้บางชนิดโดยเฉพาะพืชกินแมลง ผู้ขายมักจะตัดราคากันเอง จากราคาสูงเป็นหลักพันบาท เหลือราคาเป็นหลักสิบบาท ดังนั้นผู้ประกอบธุรกิจนี้ต้องหาวิธีการที่จะทำให้พืชกินแมลงที่ถูกผลิตขึ้นมานั้นขายได้ตลอดไปแม้ว่าราคาจะลดลงไปมาก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการทำกลยุทธ์ของแต่ละสถานประกอบการ นอกจากนี้ผู้ผลิตอาจจะพบกับปัญหาการถูกกดราคาสินค้าให้ต่ำลงจากผู้ค้าคนกลางได้

6. ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นพืช (Somaclonal variation)

มักจะพบเสมอกับต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีการย้ายเปลี่ยนอาหารเป็นเวลานาน โดยเป็นลักษณะของต้นพืชที่แตกต่างไปจากเดิม อาจเป็นการเปลี่ยนแปลงโดยถาวรหรือกลับมาเป็นแบบเดิมได้

ปัญหาต่าง ๆ ดังกล่าวเมื่อเกิดขึ้นแล้วต่างส่งผลให้ต้นพืชเหล่านั้น เจริญเติบโตน้อยลง หรือตายในที่สุด การหาวิธีแก้ไขคงเป็นไปได้ยาก แต่ควรเริ่มต้นทำงานใหม่ด้วยความระมัดระวัง ในทุกลำดับขั้นตอน ตั้งแต่การฟอกฆ่าเชื้อ วิธีการตัด และวางเนื้อเยื่อพืช สูตรอาหารที่ใช้ เทคนิคปลอดเชื้อ ความสะอาดของเครื่องมือที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เป็นต้น แต่ปัญหาอุปสรรคที่เกิดกับงานขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นปัญหาที่แก้ไขได้ หากปฏิบัติตามหลักเกณฑ์และให้ความสำคัญกับเทคนิคปลอดเชื้อ ผลสำเร็จของงานผลิตและขยายพันธุ์พืชจะต้องบรรลุวัตถุประสงค์แน่นอน อย่างไรก็ตามบางครั้งความแปรปรวนทางพันธุกรรมก็ทำให้เกิดผลดี โดยได้ต้นพืชที่มีลักษณะใหม่ที่แตกต่างไปจากเดิม เช่น ใบด่าง ซึ่งงมักจะเป็นที่ต้องการของตลาดต้นไม้

วิธีการป้องกันการเกิดการผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (อภิชาติ ชิดบุรี, 2556)

การป้องกันการเกิดการผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมี 2 ปัจจัย คือ

1. ปัจจัยจากพืชเอง พืชที่เจริญเติบโตในธรรมชาติย่อมมีความปรวนแปรอันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมการ เลี้ยง การเปลี่ยนแปลงนี้อาจเกิดขึ้นกับต้นพืชทั้งต้น หรือเกิดเฉพาะส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช ดังนั้นการนำชิ้นส่วนจากต้นพืชที่มีความแปรปรวนมาทำการเพาะเลี้ยง พืชต้นใหม่ที่ได้อาจจะไม่เหมือนต้นแม่พันธุ์เดิม ดังน้น อัตราการแปรปรวนมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเซลล์เริ่มต้น ถ้าเซลล์เริ่มต้นมีความแปรปรวนในหลายลักษณะ พืชที่ชักนำได้จะมีความแปรปรวนในอัตราที่สูง

2. ปัจจัยจากสภาพแวดล้อมในการเลี้ยง โดยเฉพาะการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเช่น 2,4-D ที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดต้นพืชใหม่ สารดังกล่าวไปชักนำให้ชิ้นส่วนพืชให้มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ดังนั้นวงจรชีวิตในการแบ่งเซลล์ (cell cycle) จะถูกเร่งให้สั้นกว่าปกติ เมื่อเป็นเช่นนี้สารที่จำเป็นต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ได้แก่ เอ็นไซม์ และโปรตีน จะถูกสร้าง

อย่างรวดเร็วเช่นกันในบางครั้งอาจทำให้เกิดความบกพร่องในการสร้างสารที่จำเป็นบางชนิด เซลล์ลูกที่ได้หลังจากกระบวนการแบ่งเซลล์จึงผิดปกติ นอกจากนี้สารที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงยังไปมีผลในการแย่งที่กับเอ็นไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ ผลที่ตามมาคือ ความผิดปกติของเซลล์ลูก

บรรณานุกรม

กรมส่งเสริมการเกษตร.2556. รายชื่อผู้ประกอบการผลิตพันธุ์พืชเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเชิงพาณิชย์. กลุ่มงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนพัฒนาการเพาะเลี้ยงและจัดการพันธุ์พืช สำนักพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http//: plantpro.doae.go.th/TISSUE. (วันที่ค้นข้อมูล : 22 มีนาคม 2556).

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2556. ปัญหาและอุปสรรคที่พบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กลุ่มงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนพัฒนาการเพาะเลี้ยงและจัดการพันธุ์พืช สำนักพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http//: plantpro.doae.go.th/TISSUE. (วันที่ค้นข้อมูล : 22 มีนาคม 2556).

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

สนธิชัย จันทร์เปรม และ เสริมศิริ จันทร์เปรม. 2549. เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการเกษตร. ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ. คณะเกษตร กำแพงแสน ร่วมกับศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม.

อภิชาติ ชิดบุรี. 2556. หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์. สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา. อ้างโดย ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพเกษตร. กระบวนการผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: . http//:www.aopdt10.doae.go.th/html/data_0412.html . (วันที่ค้นข้อมูล : 22 มีนาคม 2556)