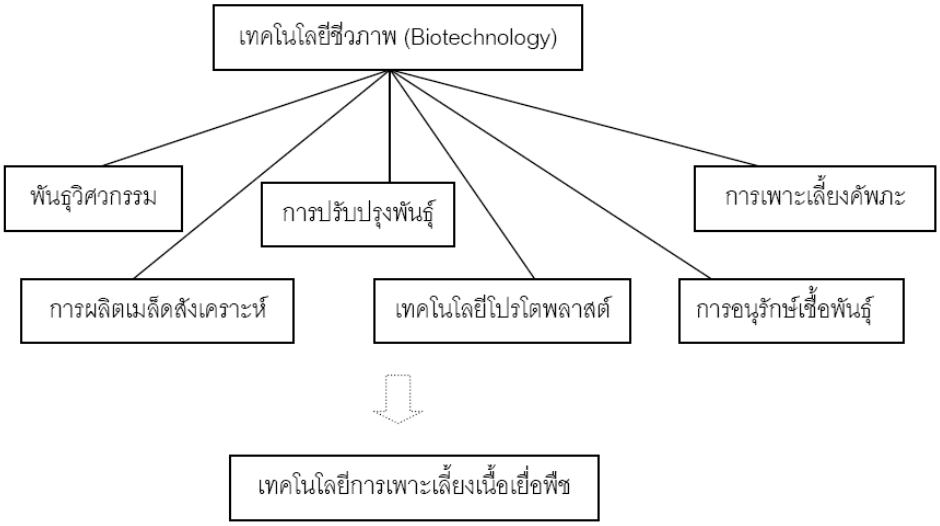
บทที่ 9
การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture หรือ micropropagation หรือ *in vitro* culture) คือ การสร้างสายต้น (clone) โดยการนำชิ้นส่วนพืช (explant) มาทำให้สะอาดปราศจากเชื้อโรค แล้ววางเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ (aseptic technique) ภายใต้สภาพแวดล้อมที่สามารถควบคุมได้ (Taji *et al*., 1997, หน้า 1)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจัดเป็นพื้นฐานอันสำคัญของเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) เป็นการเอาสิ่งมีชีวิตหรือชิ้นส่วนของสิ่งมีชีวิตมาปรับปรุง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่มีประโยชน์เพิ่มขึ้น เช่น ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคการตัดต่อ-ย้ายยีน เพื่อสร้างสายพันธุ์ใหม่ๆ จำเป็นต้องใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้สามารถมีชีวิตอยู่ได้ และเจริญเติบโตได้ดี ความสัมพันธ์ของเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเทคโนโลยีชีวภาพสรุปได้ดังภาพที่ 9.1



ภาพที่ 9.1 สรุปความสัมพันธ์ของเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเทคโนโลยีชีวภาพ
ที่มา : ดัดแปลงจาก Taji *et al*. (1997, หน้า 3)

9.1 ข้อดีและข้อเสียของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

9.1.1 ข้อดี

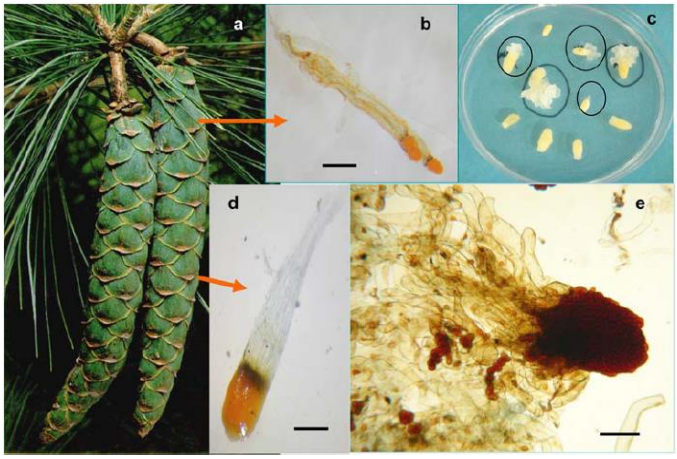
9.1.1.1 สามารถเพิ่มปริมาณพันธุ์พืชที่ต้องการได้ในเวลาอันสั้น

9.1.1.2 ต้นกล้าที่ได้มีลักษณะที่สม่ำเสมอ (genetic uniformity)

9.1.1.3 ต้นพืชที่ได้ปราศจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

9.1.1.4 ผลิตต้นกล้าได้ทั้งปี โดยไม่ต้องคำนึงถึงสภาพดินฟ้าอากาศหรือฤดูกาลในการเพาะปลูก จึงทำให้เกษตรกรมีรายได้ตลอดปี

9.1.1.5 ช่วยในการขยายพันธุ์พืชในพืชที่ขยายพันธุ์เองได้ยากในสภาพปกติในธรรมชาติ เช่น กล้วยไม้ และสน (ภาพที่ 9.2)



ภาพที่ 9.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นสน

ที่มา : Bonga (2010, หน้า 244)

9.1.1.6 ใช้ในการผลิตยาและสารเคมีจากพืช พืชบางชนิดสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติทางยาหรือมีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม เช่น ทำน้ำมันหอมระเหย โดยปกติเนื้อสารออกฤทธิ์ที่ต้องการจะมีอยู่ในปริมาณที่น้อยมาก โดยใช้ชิ้นส่วนพืชจำนวนมากนำมาสกัดแยก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเหล่านี้ในสภาพแวดล้อมและอาหารที่เหมาะสมก็อาจชักนำให้เกิดการสังเคราะห์สารที่ต้องการได้มากขึ้น

9.1.1.7 สามารถใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการปรับปรุงพันธุ์พืช คัดเลือกสายพันธุ์พืชที่ทนทาน (tolerant plants) หรือสายพันธุ์ที่ต้านทาน (resistant plants) โดยจัดเงื่อนไขของอาหารเลี้ยงและสภาพแวดล้อม หรือชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation) โดยอาจใช้สารเคมี การฉายรังสี การรวมโปรโตพลาสต์ การตัดต่อยีน และการย้ายยีน

9.1.1.8 ใช้ศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยาและพันธุศาสตร์ ต้นพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลองสามารถติดตามการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงได้ง่าย ชัดเจน และถูกต้องแม่นยำ ที่สำคัญคือเราสามารถควบคุมตัวแปรต่างๆ ในหลอดทดลองได้ง่ายกว่าปลูกในสภาพปกติในแปลงปลูก

9.1.1.9 ใช้เพื่อเก็บรักษาและรวบรวมพันธุ์พืช เพื่อการอนุรักษ์พันธุ์พืชที่หายากหรือกำลังใกล้จะสูญพันธุ์ในสภาพตามธรรมชาติ และเพื่อเก็บรวบรวมฐานทางพันธุกรรมของพืชไว้ (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2536, หน้า 4-6)

9.1.1.10 เพื่อเมล็ดเทียมหรือเมล็ดสังเคราะห์ (artificial seed หรือ synthetic seed) เมล็ดเทียมเป็นสิ่งที่มีลักษณะคล้ายเมล็ดเพื่อเลียนแบบเมล็ดพืชที่ได้จากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศตามธรรมชาติ เมล็ดเทียมอาศัยหลักการห่อหุ้มส่วนต่างๆ ของพืชด้วยวัสดุที่เหมาะสมแก่พืชในการเจริญเติบโตดังภาพที่ 9.3 (ธัญญา ทะพิงค์แก, 2554, หน้า 1)

ภาพที่ 9.3 เมล็ดเทียมหรือเมล็ดสังเคราะห์

ที่มา : ธัญญา ทะพิงค์แก (2554, หน้า 1)

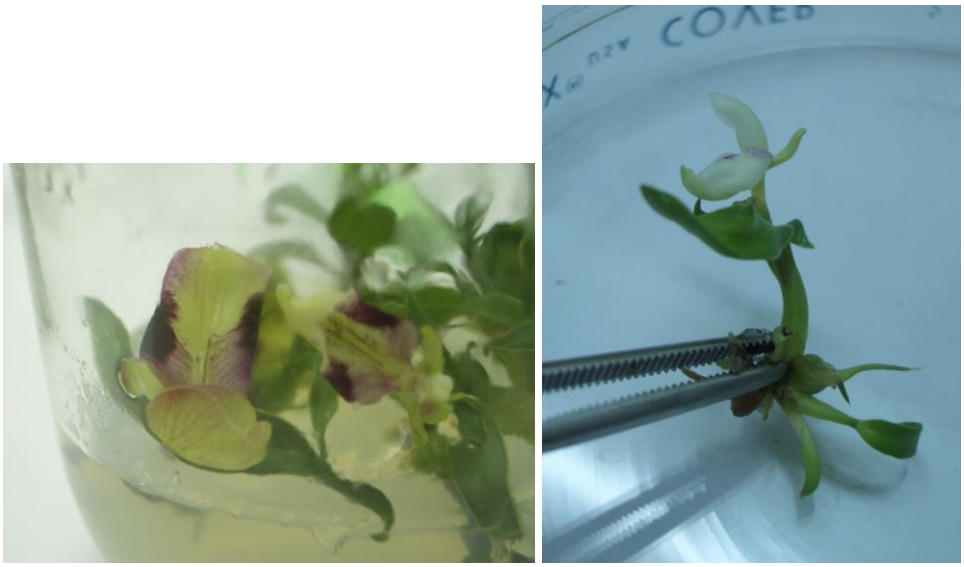
9.1.2 ข้อเสีย

9.1.2.1 มีขั้นตอนและวิธีการที่ยุ่งยาก

9.1.2.2 ต้นทุนสูงกว่าการขยายพันธุ์พืชโดยวิธีอื่น

9.1.2.3 เสี่ยงต่อความเสียหายจากศัตรูพืชเนื่องจากพืชต้นใหม่ที่ได้มีจำนวนมากและมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน ทำให้การระบาดของโรคและแมลงศัตรูพืชเกิดได้ง่าย

9.1.2.4 การแปรปรวนทางพันธุกรรม (somatic variation) อาจเกิดขึ้นได้ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งมีธาตุอาหารและฮอร์โมนอยู่สูง ต้นพืชอาจมีการแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้นได้ (บุญหงษ์ จงคิด, 2548, หน้า 125) แต่บางคราวการแปรปรวนกลับให้ผลดีทางด้านพันธุ์แปลกใหม่ เกิดการกลายพันธุ์ของไม้ดอกไม้ประดับ เช่น กล้วยไม้แคระ ดังภาพที่ 9.4



ภาพที่ 9.4 การแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นกับกล้วยไม้ทำให้ได้กล้วยไม้แคระ
ที่มา : ธัญญา ทะพิงค์แก (2554, หน้า 1)

9.2 ประเภทของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

พืชประกอบไปด้วยอวัยวะต่างๆ มากมาย ซึ่งแต่ละอวัยวะประกอบด้วยเนื้อเยื่อหลายชนิด ประเภทของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบ่งตามส่วนของพืชที่นำมาขยายพันธุ์ได้เป็น 7 ประเภท ดังนี้

9.2.1 **การเพาะเลี้ยงคัพภะ** (embryo culture)

การเพาะเลี้ยงคัพภะ หมายถึง การนำเอาคัพภะ หรือต้นอ่อนของพืช ที่เพิ่งเริ่มพัฒนาที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติจากถุงรังไข่ของพืชมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เพื่อให้เกิดเป็นแคลลัส หรือเกิดเป็นต้นพืชโดยตรง รวมทั้งการชักนำให้เกิดคัพภะจากเซลล์หรืออวัยวะอื่น เช่น ใบเลี้ยง ช่อดอกอ่อน เมล็ดอ่อน โดยชักนำให้เกิดคัพภะโดยตรง หรือชักนำให้เกิดแคลลัสแล้วพัฒนาเป็นคัพภะต่อไป การเพาะเลี้ยงคัพภะนำมาแก้ไขปัญหาอัตราความงอก ของเมล็ดที่ต่ำในเมล็ดพืชบางชนิด หรือในเมล็ดของพืชที่เกิดจากการผสมข้ามชนิด หรือข้ามสกุลที่ยากต่อการเจริญเติบโตและพัฒนา ในสภาพตามธรรมชาติ รวมทั้งแก้ไขปัญหาการพักตัวที่ยาวนานของเมล็ดพืชบางชนิด

9.2.2 **การเพาะเลี้ยงอวัยวะ** (organ culture)

การเพาะเลี้ยงส่วนต่างๆ ของอวัยวะพืชที่แยกออกมา เช่น ยอด ข้อ ปล้อง ราก ใบ ดอก และผล ในสภาพปลอดเชื้อ วิธีการเพาะเลี้ยงแบบนี้ทำได้ง่ายและรวดเร็ว

9.2.3 **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ** (meristem culture)

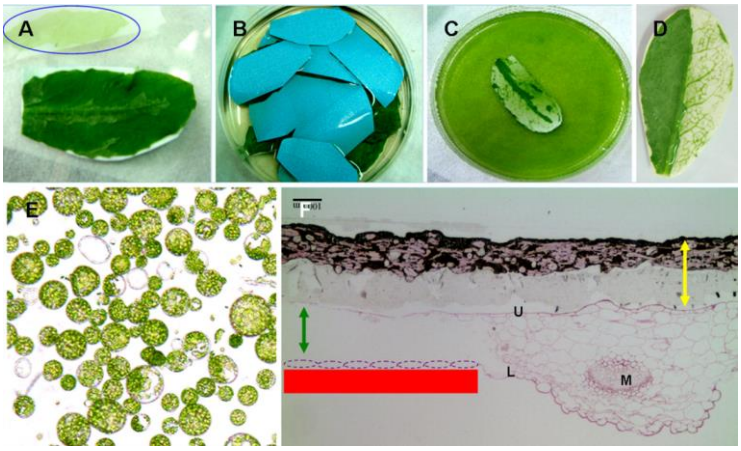
การเพาะเนื้อเยื่อเจริญเป็นการตัดเอาเนื้อเยื่อเจริญที่ปลายยอดมาเลี้ยง เนื้อเยื่อเจริญมีขนาดเล็กมากต้องทำการผ่าตัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนที่ปลอดไวรัสแล้วนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณขยายพันธุ์ต่อไป

9.2.4 **การเพาะเลี้ยงแคลลัส** (callus culture)

แคลลัสเป็นเซลล์พื้นฐานที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ยังไม่กำหนดทิศทางการเปลี่ยนแปลงหรือพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะใด เนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิดสามารถนำมาชักนำการสร้างแคลลัสได้ ซึ่งการชักนำการสร้างแคลลัสเริ่มต้นจากการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มีธาตุอาหารพืชร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับที่เหมาะสม เนื้อเยื่อพืชจะเกิดการแบ่งเซลล์พัฒนาเป็นแคลลัส แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อพื้นฐานของระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และนำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การขยายพันธุ์เพื่อชักนำให้เกิดต้นพืชปริมาณมาก ใช้ในกระบวนการผลิตเซลล์ไร้ผนัง (protoplast) การผลิตสารเคมี การผลิตพืชให้ต้านทานต่อโรคแมลงศัตรูพืช และทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม รวมทั้งการใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรม (cryopreservation)

9.2.5 **การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์** (protoplast culture)

โปรโตพลาสต์เป็นเซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์ (cell wall) เหลือแต่เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ห่อหุ้มองค์ประกอบของเซลล์เอาไว้ สำหรับวิธีการกำจัดผนังเซลล์ที่ใช้อยู่มีด้วยกัน 2 วิธี คือ วิธีกล (mechanical method) โดยการสร้างบาดแผลหรือทำให้ผนังเซลล์เกิดการฉีกขาดจากใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วทำให้เซลล์ที่เหลือหลุดออกจากผนังเซลล์ และวิธีย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic method) ดังภาพที่ 9.5 เนื้อเยื่อที่มีความเหมาะสมนำมาสกัดเซลล์ไร้ผนังได้แก่ เนื้อเยื่อที่มีอายุน้อย เช่น แคลลัส ใบอ่อน รากอ่อน และละอองเกสรตัวผู้ ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ได้แก่ การนำมาใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ และการสร้างพืชพันธุ์ใหม่จากพืชต่างสกุลโดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) รวมทั้งใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในระบบการส่งถ่ายยีน



ภาพที่ 9.5 การสกัดโปรโตพลาสต์จากใบพืช

ที่มา : Wu *et al*. (2009, หน้า 16)

9.2.6 **การเพาะเลี้ยงอับเรณูและละอองเรณู** (anther and pollen culture)

อับเรณูที่ยังเจริญไม่เต็มที่ (immature anther) หรือละอองเรณู (microspore) ซึ่งผ่านการแบ่งตัวแบบไมโอซิสมาแล้วสามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ได้ ซึ่งต้นพืชที่ได้จะมีโครโมโซมเป็นแฮพลอยด์ (n) สามารถนำมาทำการเพิ่มจำนวนโครโมโซม วิธีการนี้ทำให้เกิดพืชพันธุ์แท้ (homozygous)

9.2.7 **การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย** (cell suspension culture)

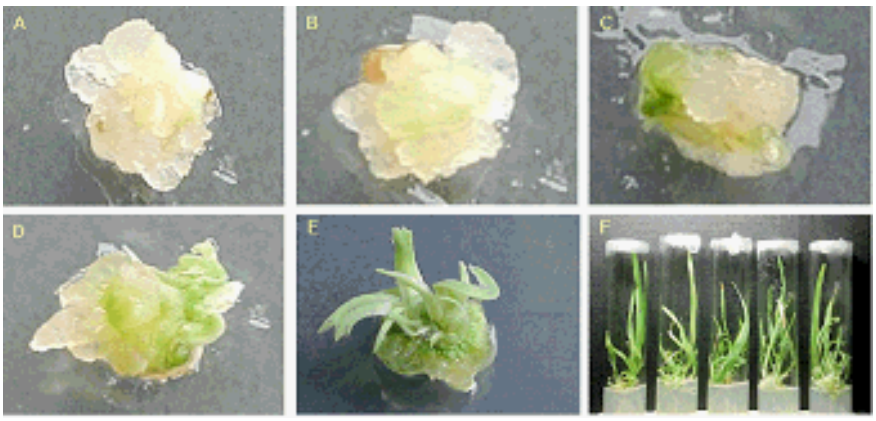
เซลล์แขวนลอยเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวบนเครื่องหมุนเหวี่ยงอาหาร เนื้อเยื่อที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอย ได้แก่ เนื้อเยื่อแคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีการเกาะตัวกันหลวมๆ ง่ายต่อการกระจายออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยถูกนำมาใช้ศึกษาถึงกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ การศึกษาการทำงานของเอนไซม์และการแสดงออกของยีน ตลอดจนเพื่อการผลิตเซลล์ไร้ผนัง และคัพภะเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป (อภิชาติ วรรณวิจิตร, 2550, หน้า 1)

9.3 **รูปแบบการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเนื้อเยื่อ**

การเจริญเติบโตและการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เพื่อให้เกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ พบว่าเนื้อเยื่อมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในลักษณะต่างๆ ได้ 3 แบบ ดังนี้

9.3.1 **เกิดแคลลัส** (callus formation)

แคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์พาเรนไคมาที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไปเป็นรากหรือลำต้น อาจจะอยู่กันหลวมๆ หรือ เกาะกันแน่น (ภาพที่ 9.6) แคลลัสอาจเกิดจากจากเซลล์หรืออวัยวะอื่น เช่น ใบเลี้ยง ช่อดอกอ่อน และเมล็ดอ่อน เป็นต้น



ภาพที่ 9.6 แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นพืช

ที่มา : Seong *et al*. (2004, หน้า 1)

9.3.2 **เกิดอวัยวะ หรือออร์แกโนจีเนซิส** (organogenesis)

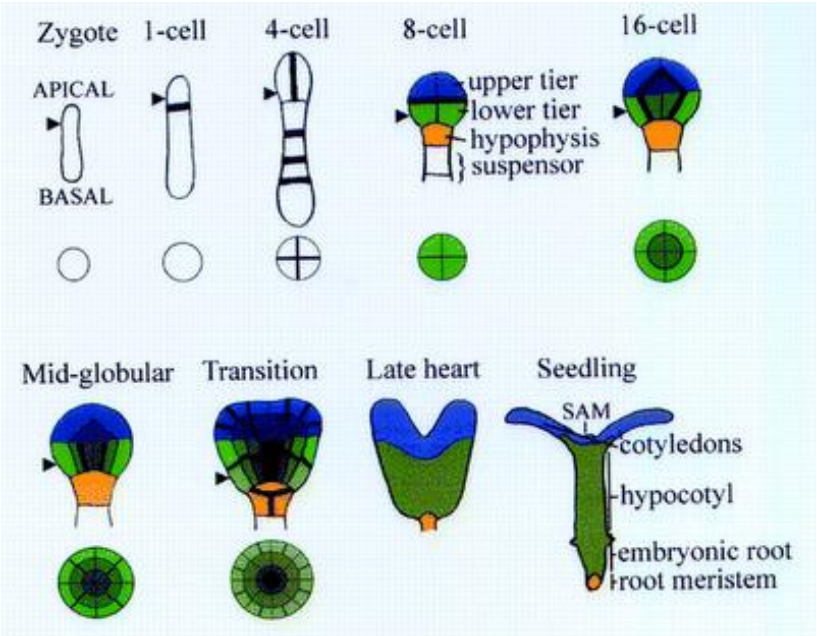
ออร์แกโนเจเนซีส (organogenesis) คือ กระบวนการเปลี่ยนแปลงจนกระทั่งได้เป็นอวัยวะหรือเป็นการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยตรง โดยการสร้างยอดหรือราก การเปลี่ยนแปลงเป็นอวัยวะต่างๆ เป็นผลของฮอร์โมนต่อกลุ่มของเซลล์ อาจเป็นอิทธิพลของฮอร์โมนชนิดเดียว หรือหลายชนิดก็ได้ เมื่อมีการผันแปรระหว่างฮอร์โมนออกซินและไซโทไคนิน พบว่าโดยถ้าสัดส่วนของออกซินมากกว่าไซโตไคนินจะชักนำให้เกิดราก ในทางกลับกันถ้ามีไซโตไคนินมากกว่าออกซินจะพัฒนาไปเป็นยอด (ภาพที่ 9.7) การเชื่อมต่อระหว่างยอดและรากในการเกิดอวัยวะเป็นขบวนการที่เป็นอิสระต่อกัน รากอาจเกิดต่างบริเวณกับที่เกิดของยอดจึงอาจไม่ติดต่อกันได้ แต่บางครั้งเกิดขึ้นใกล้เคียงกันมากจนท่อน้ำท่ออาหารเชื่อมติดกันได้ นอกจากฮอร์โมนแล้วยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเป็นยอดหรือเป็นรากของพืชได้เช่นกัน เช่น ตำแหน่งของชิ้นพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง อายุและสภาพของต้นแม่ ชนิดของพืชและอวัยวะ ตลอดจนสภาพการเพาะเลี้ยงอื่นๆ เช่น จำนวนครั้งในการถ่ายอาหาร แสง อุณหภูมิ น้ำตาล และความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยง เป็นต้น

ภาพที่ 9.7 การเกิดอวัยวะหรือออร์แกโนจีนีซิส

ที่มา : The sociey for in vitro biology (2001, หน้า 1)

9.3.3 เกิดคัพภะ หรือเอ็มบริโอจีเนซิส (embryogenesis)

คัพภะของพืชที่ขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ เอ็มบริออยด์ (embryoid) เกิดจากเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเหมือนกับการพัฒนาของไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ แต่เอ็มบริออยด์มีจุดกำเนิดจากเซลล์ร่างกาย หลังจากนั้นจะพัฒนาเป็นขั้นตอนต่างๆ เป็นต้นกล้าซึ่งมียอดและรากติดต่อกัน จึงมีท่อน้ำท่ออาหารเชื่อมต่อกัน (สมพร ประเสริฐส่งสกุล, 2549, หน้า 28-32) ดังภาพที่ 9.8



ภาพที่ 9.8 การเกิดคัพภะหรือเอ็มบริโอจีนีซิส

ที่มา : Biolaureate centre (2011, หน้า 1)

9.4 ขั้นตอนหลักในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Taji และคณะ (1997) ได้แบ่งขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็น 5 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

9.4.1 ขั้นตอนการเตรียมต้นแม่พันธุ์ (preparative stage)

การเพาะเลี้ยงต้นแม่พันธุ์ (stock plant) ที่ต้องการในสภาพแวดล้อมที่ค่อนข้างสะอาด เพื่อจะได้ต้นแม่พันธุ์ที่สะอาด และสมบูรณ์เต็มที่

9.4.2 **ขั้นตอนเริ่มต้น** (initiation stage)

การนำชิ้นส่วนของพืชที่เตรียมความพร้อมในขั้นตอนการเตรียมต้นแม่พันธุ์มาทำการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดอยู่กับผิวพืช แล้วทำการผ่าตัดเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อภายในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ เลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จนได้ต้นพืชที่ต้องการ

9.4.3 **ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ** (multiplication)

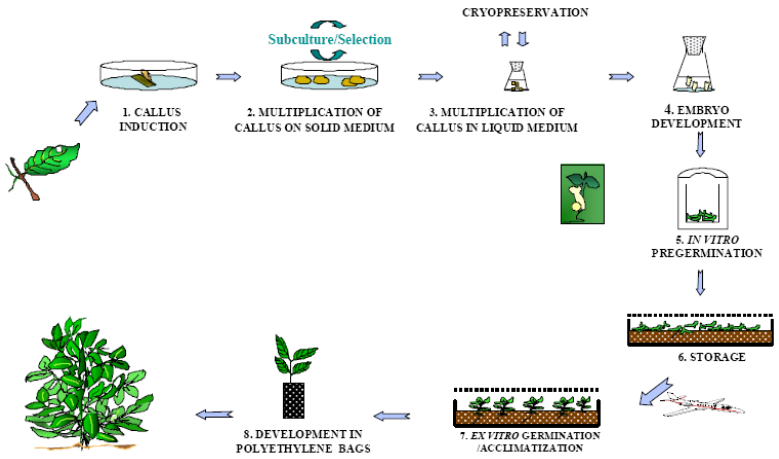
ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณทำเมื่อเนื้อเยื่อพืชในขั้นตอนที่ 2 โตพอสมควรแล้ว จะทำการเพิ่มปริมาณโดยการตัดแบ่งเนื้อเยื่อของออกเป็นชิ้น และแยกไปเลี้ยงในอาหารใหม่ เรียกว่าการตัดแบ่ง (sub cultures) ทำการตัดแบ่งไปได้เรื่อยๆ จนกว่าจะได้ปริมาณที่ต้องการ

9.4.4 **ขั้นตอนการชักนำให้เกิดราก** (root induction)

ต้นกล้ามีปริมาณตามจำนวนที่ต้องการแล้วจะทำการชักนำให้ออกราก และเลี้ยงจนเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าที่แข็งแรงสมบูรณ์

9.4.5 **ขั้นตอนการเตรียมออกขวดและการย้ายออกปลูก** (acclimatization)

ต้นกล้าในขวดที่ทำการย้ายออกสู่สภาพภายนอกขวดมักมีเปอร์เซ็นต์รอดต่ำ เพราะถูกเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และถูกเลี้ยงในสภาพที่แสงและอุณหภูมิค่อนข้างต่ำกว่าสภาพภายนอกมาก ดังนั้นก่อนการการย้ายออกนอกขวดเพาะจึงต้องมีการเพิ่มความเข้มแสง ปรับอุณหภูมิ พอต้นกล้ามีความพร้อมแล้วก็ทำการย้ายออกนอกขวดนำไปเลี้ยงในโรงเรือนต่อไป ตัวอย่างเช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกาแฟโรบัสตา (ภาพที่ 9.9)



ภาพที่ 9.9 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาแฟโรบัสต้า

ที่มา : Ducos *et al*. (2007, หน้า 9)

9.5 ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นพื้นที่ที่ประกอบด้วยการทำงานทุกขั้นตอน ตั้งแต่ การเตรียมชิ้นส่วนพืช การเตรียมอาหาร การย้ายเนื้อเยื่อ การเพาะเลี้ยง จึงต้องมีห้องปฏิบัติการที่จัดสรรไว้อย่างเหมาะสม คือ

9.5.1 **ห้องเตรียมอาหาร** (media preparation room)

ห้องเตรียมอาหารต้องมีเนื้อที่กว้างขวางพอที่จะปฏิบัติการได้อย่างสะดวก มีโต๊ะสำหรับปฏิบัติการ ตู้เย็นสำหรับเก็บสารละลายเข้มข้น หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ เครื่องชั่ง เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง เตาหลอมอาหาร อ่างน้ำ ตู้เก็บสารเคมีและอุปกรณ์

9.5.2 **ห้องย้ายเนื้อเยื่อ** (transferation or incubation room)

ห้องย้ายเนื้อเยื่อต้องสะอาดและปลอดเชื้อ ควรเป็นห้องที่สร้างอย่างมิดชิด และให้ผู้คนเข้าออกน้อยที่สุดเท่าที่จำเป็น เครื่องมือสำคัญที่มีในห้องนี้ คือ ตู้สำหรับถ่ายเนื้อเยื่อหรือย้ายเนื้อเยื่อซึ่งเป็นตู้ที่มีอากาศถ่ายเทผ่านแผ่นกรองที่สามารถกรองเชื้อจุลินทรีย์ไว้ได้ตลอดเวลา ทำให้อากาศภายในบริเวณตู้เป็นอากาศบริสุทธิ์ ลดภาวะเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอากาศลง

9.5.3 **ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ** (culture room)

ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อต้องปลอดเชื้อ อุปกรณ์ที่สำคัญในห้องนี้ ได้แก่ ชั้นวางขวดเนื้อเยื่อ เครื่องเขย่า ระบบให้แสงสว่างพร้อมเครื่องปิดเปิดไฟอัตโนมัติ และเครื่องปรับอากาศ โดยทั่วไปมักจะปรับสภาพแวดล้อมภายในห้องให้มีอุณหภูมิประมาณ 25 ± 2 องศาเซลเซียส แสง 12 - 18 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มของแสง 300 - 10,000 ลักซ์ (ภาพที่ 9.10)

ภาพที่ 9.10 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ที่มา : ธัญญา ทะพิงค์แก (2554, หน้า 1)

9.6 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญยิ่งต่อความสำเร็จในการขยายพันธุ์พืช การพิจารณาคัดเลือกอาหารเพื่อให้เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และจุดประสงค์การผลิต

9.6.1 ประเภทของอาหาร

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมี 2 ประเภท คือ อาหารแข็ง (solid medium) กับอาหารเหลว (liquid medium) อาหารแข็งใช้วุ้น (agar) ในการปรับสารละลายอาหารให้มีสภาพเป็นของแข็ง ความเข้มข้นของวุ้นที่ใช้กันแพร่หลายและได้ผลดี คือ 0.8 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารทั้งหมด ส่วนอาหารเหลวเนื้อเยื่อจะจมหรือแขวนลอยอยู่บนกระดาษกรองที่จุ่มในอาหารเหลวตลอดเวลา เนื้อเยื่อที่จมอยู่ในอาหารเหลวอาจถูกคนที่ความเร็ว 100 - 160 รอบต่อนาที เพื่อช่วยในการหายใจของพืช

9.6.2 ส่วนประกอบของอาหาร

อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอยู่ด้วยกันหลายสูตร เช่น สูตรมูราชิกิและสกูท (Murashigi and Skoog: MS) สำหรับเพาะเลี้ยงพืชทั่วไป และสูตรวาซินและเว้นซ์ (Vacin and Went: WV) เพาะเลี้ยงกล้วยไม้ เป็นต้น และมักมีชื่อเรียกตามผู้คิดค้นสูตรอาหารขึ้นมา ซึ่งผู้นำไปใช้อาจมีการดัดแปลงสูตรอาหารให้เหมาะสมกับงานต่อไป อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบไปด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ดังนี้

9.6.2.1 สารอนินทรีย์ ได้แก่ ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม ซัลเฟอร์ แคลเซียม และแมกนีเซียม ส่วนธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้ (micro nutrients) ได้แก่ เหล็ก คลอรีน แมงกานีส ทองแดง สังกะสี โบรอน และ โมลิบดีนัม

9.6.2.2 สารประกอบอินทรีย์ (organic compounds) ได้แก่ สารประกอบอินทรีย์หลายชนิดที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะน้ำตาล มีความจำเป็นต่อการเจริญของพืชอย่างมาก เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชยังไม่มีการสังเคราะห์แสงในสภาพหลอดแก้ว หรือมีการสังเคราะห์แสงในอัตราที่ต่ำ น้ำตาลที่นิยมใช้ คือ น้ำตาลซูโครส (sucrose)

9.6.2.3 วิตามิน พืชสามารถสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตได้ทุกชนิด แต่เซลล์พืชที่เลี้ยงในสภาพหลอดแก้วต้องการวิตามินเพิ่ม วิตามินที่ใช้ เช่น วิตามินบี 1 (thiamine) วิตามินบี 5 (pantothenic acid) วิตามินเอ็ม (folic acid) และวิตามินบี 2 (riboflavin)

9.6.2.4 กรดอะมิโน เช่น กลูตามีน (glutamine) แอสพาราจีน (asparagine) อะดีนีน (adenine) ไกลซีน (glycine)

9.6.2.5 สารควบคุมการเจริญเติบโต ที่ใช้กันมาก คือ ออกซิน เช่น ไอบีเอ ไอเอเอ เอ็นเอเอ และไซโตไคนิน เช่น บีเอพี ไคเนติน และ ซีเอติน (zeatin) ส่วนจิบเบอเรลลินใช้ในบางกรณี เช่น การเลี้ยงปลายยอด

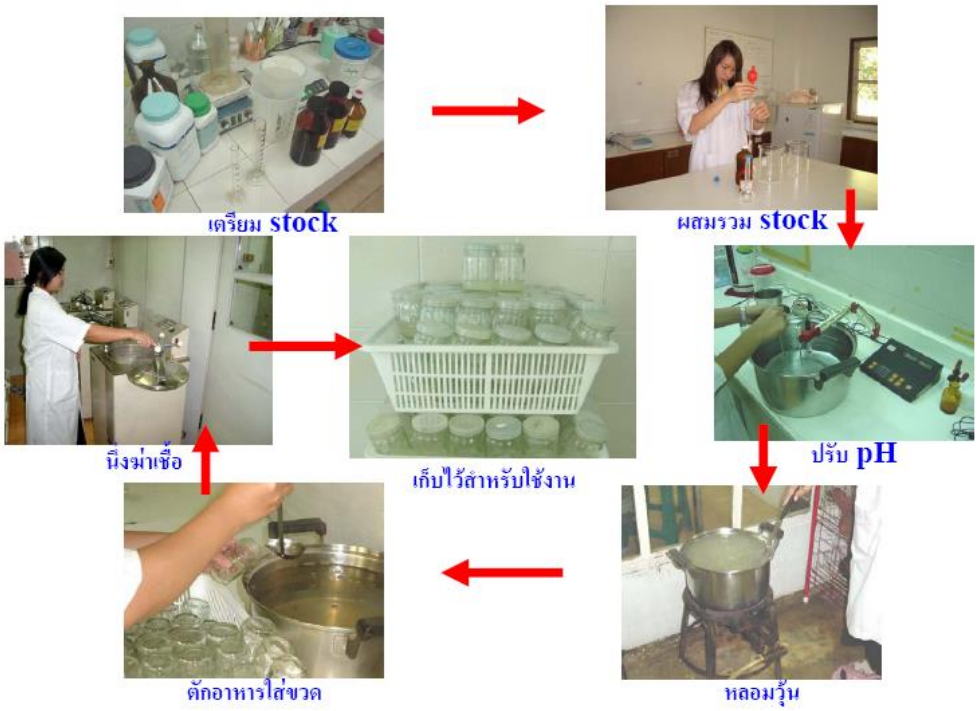
9.6.2.6 สารที่ได้จากธรรมชาติ สารที่ได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว น้ำต้มมันฝรั่ง น้ำคั้นมะเขือเทศ กล้วยหอมบด สารสกัดจากยีสต์ และสารสกัดจากมอลต์

9.6.2.7 ตัวทำให้สารแข็ง เนื้อเยื่อส่วนมากจะเลี้ยงในอาหารแข็ง ตัวทำให้สารแข็ง เช่น วุ้น และเจลไรด์ (gelrite) เจลไรด์ช่วยทำช่วยให้ต้นพืชตั้งอยู่บนอาหารได้ สำหรับสูตรอาหารที่ไม่ได้ใส่วุ้นต้องมีการเพิ่มอากาศให้ชิ้นส่วนได้สัมผัสอากาศอย่างเพียงพอ

9.6.2.8 น้ำ (จิรา ณ หนองคาย, 2551, หน้า 323-324)

9.7 วิธีการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นิยมเตรียมเป็นสารอาหารเข้มข้น (stock solution) ที่มีความเข้มข้นเป็นหลายๆ เท่าของความเข้มข้นที่ใช้จริง โดยมากมักให้มีความเข้มข้นเป็น 100 เท่า 200 เท่า หรือ 1,000 เท่า ของความเข้มข้นจริง โดยรวมสารเคมีชนิดที่ไม่มีปฏิกิริยาต่อกันไว้ด้วยกัน จากนั้นจึงนำสารอาหารเข้มข้นแต่ละชนิดมารวมกัน และเติมสารอื่นให้ครบ ปรับปริมาตรให้ได้ตามสูตรอาหาร แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เติมผงวุ้น นำไปต้ม และบรรจุขวด นำอาหารที่เตรียมได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 - 20 นาที (ภาพที่ 9.11)



ภาพที่ 9.11 ขั้นตอนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ที่มา : ธัญญา ทะพิงค์แก (2554, หน้า 1)

9.8 การเตรียมชิ้นส่วนพืช การฟอกฆ่าเชื้อ และการผ่าตัดเนื้อเยื่อ

การเตรียมชิ้นส่วนพืชและการฟอกฆ่าเชื้อ ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

9.8.1 การเลือกชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยง

ชิ้นส่วนของจะสามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้หลังจากการขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ขึ้นอยู่กับอายุหรือระยะของพืชที่นำมาเลี้ยง ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงควรเลือกที่เป็นข้อปลายยอด ตายอด ตาข้าง เนื่องจากจะสามารถชักนำยอดได้จำนวนมาก

9.8.2 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อ

การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวพืชเพื่อทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดโรค เป็นการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับชิ้นส่วนพืชไม่ให้มามีผลยับยั้งการเจริญและพัฒนาการของชิ้นส่วนพืช เมื่อเลือกส่วนของพืชที่จะนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ได้แล้วตามความต้องการ ให้ตัดแต่งชิ้นส่วนพืชให้มีขนาดที่เหมาะสม นำมาทำการล้างทำความสะอาด โดยการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของเนื้อเยื่อเพื่อให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับลักษณะของเนื้อเยื่อพืช เช่น เนื้อเยื่อพืชที่อ่อนนิ่ม

และบาง ให้แช่เนื้อเยื่อพืชลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ หรือคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10-15 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาให้ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง สำหรับเนื้อเยื่อพืชที่ผิวนอกแข็ง เช่น ไม้เนื้อแข็ง ผักกล้วยไม้ ให้นำเนื้อเยื่อไปล้างด้วยน้ำยาซักฟอกและน้ำ แล้วจุ่มเนื้อเยื่อลงใน 95 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์ และลนไฟ ส่วนเนื้อเยื่อพืชที่มีสารประเภทขี้ผึ้งหรือขนปกคลุม ให้จุ่มเนื้อเยื่อลงใน 70-95 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์ นาน 30 วินาที - 1 นาที แล้วจึงนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 0.5% หรือคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 - 15 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาให้ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

9.8.3 การผ่าตัดเนื้อเยื่อพืช

การตัดชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาเลี้ยง เริ่มจากต้องนำชิ้นส่วนพืชมาล้างน้ำให้สะอาด และตัดส่วนที่ไม่ต้องการใช้ออกให้มากที่สุด นำชิ้นส่วนพืชที่ล้างแล้วมาตัดให้มีขนาดพอประมาณ แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวตามขั้นตอน จากนั้นจึงตัดเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีขนาดตามต้องการ นำไปเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาดและรูปร่างของเนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยงขึ้นอยู่กับลักษณะวัตถุประสงค์ และความพอใจของผู้ปฏิบัติงาน ถ้าตัดเนื้อเยื่อชิ้นใหญ่เนื้อเยื่อมีโอกาสรอดชีวิตสูง แต่ก็มีโอกาสปนเปื้อนสูง ถ้าตัดเนื้อเยื่อชิ้นเล็กก็มีโอกาสรอดชีวิตต่ำแต่มีโอกาสปนเปื้อนน้อย ก่อนนำเนื้อเยื่อที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อควรเช็ดขวดอาหารเพื่อฆ่าเชื้อด้วยเอททิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำเข้าตู้ตัดเนื้อเยื่อ เมื่อจะย้ายเนื้อเยื่อลงขวดให้เปิดฝาและลนไฟที่คอขวด ใช้ปากคีบที่ลนไฟฆ่าเชื้อและทิ้งให้เย็นแล้วคีบเนื้อเยื่อใส่ขวด ควรกดเนื้อเยื่อให้จมลงในอาหารเล็กน้อยแล้วจึงปิดฝาตามเดิม (พรชัย จุฑามาศ, 2544) ดังภาพที่ 9.12

ภาพที่ 9.12 การฟอกฆ่าเชื้อและการผ่าตัดเนื้อเยื่อพืช

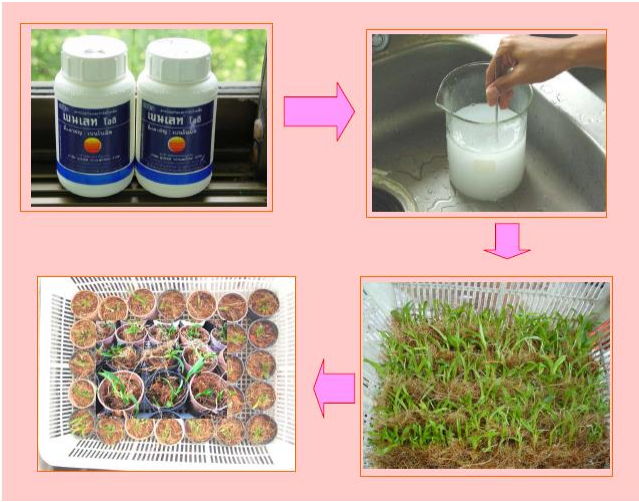
ที่มา : ธัญญา ทะพิงค์แก (2554, หน้า 1)

9.9 การดูแลเนื้อเยื่อระหว่างการเลี้ยงในขวด

ความสะอาดเป็นสิ่งจำเป็นอย่างมากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ต้องมีการหมั่นตรวจดูขวดหรือภาชนะที่เลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ถ้าพบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์เจริญขึ้นมาปะปนจะต้องรีบนำออกไปต้มฆ่าเชื้อและล้างทันทีเพื่อไม่ให้เป็นที่สะสมเชื้อ จุลินทรีย์ ซึ่งอาจจะแพร่และฟุ้งกระจายอยู่ภายในห้องได้ เนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงควรมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ (subculture) ประมาณ 2 สัปดาห์ต่อครั้ง

9.10 การย้ายพืชออกจากขวด

เมื่อพืชเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์แล้วจะทำการย้ายพืชออกจากขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปลูกในกระถาง ควรใช้วัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของทรายผสมขุยมะพร้าว หรือทรายผสมถ่านแกลบ อัตราส่วน 1 : 1 สำหรับเลี้ยงต้นกล้าในระยะแรก โดยใช้ปากคีบนำต้นออกจากขวดอย่างระมัดระวังอย่าให้รากขาดหรือเสียหาย ล้างเศษวุ้นที่ติดอยู่ที่บริเวณรากออกให้หมดเพื่อไม่ให้เป็นอาหารของจุลินทรีย์ นำต้นที่ล้างแล้วจุ่มด้วยยากันรา ก่อนปลูกลงในภาชนะที่ใส่วัสดุปลูกไว้ ในระยะแรกต้องควบคุมสภาพ แวดล้อมให้เหมาะสม เช่น ความชื้น แสง อุณหภูมิ หรือนำไปไว้ในกระบะพ่นหมอก เมื่อต้นเจริญเติบโตแข็งแรงแล้วจึงย้ายออกปลูกในสภาพปกติต่อไป ขั้นตอนการผลิตต้นกล้วยจนกระทั่งย้ายพืชออกปลูก (ภาพที่ 9.13)



ภาพที่ 9.13 การย้ายพืชออกปลูกนอกขวด

ที่มา : ธัญญา ทะพิงค์แก (2554, หน้า 1)

บทสรุป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นความเจริญก้าวหน้าในด้านการเกษตรเกี่ยวกับพืชที่มีการพัฒนาเทคนิคในการขยายพันธุ์ที่ทำให้ได้พืชต้นใหม่จำนวนมากอย่างรวดเร็วในเวลาอันจำกัด และมีคุณภาพดีเหมือนเดิม วิธีการนี้ทำโดยนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช ไม่ว่าจะเป็นอวัยวะเนื้อเยื่อ เซลล์ หรือเซลล์ไม่มีผนัง มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และอยู่ในสภาพควบคุมอุณหภูมิ แสง และความชื้นเพื่อให้เจริญเติบโตได้ดี การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถทำการเพาะได้จากทุกส่วนของพืช ได้แก่ คัพภะ อวัยวะ เนื้อเยื่อเจริญ แคลลัส โปรโตพลาสต์ เซลล์แขวนลอย อับเรณู และละอองเรณู ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาขยายพันธุ์จะมีรูปแบบการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเนื้อเยื่อได้ 3 แบบ คือ เกิดเป็นแคลลัส เกิดอวัยวะหรือออร์แกโนจีเนซิส หรือเกิดเกิดคัพภะ หรือเอ็มบริโอจีเนซิส การที่พืชจะเจริญไปเป็นแบบใดนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ

ขั้นตอนหลักในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบไปด้วยการเตรียมต้นแม่พันธุ์ให้พร้อมก่อนนำมาขยายพันธุ์ การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชที่จะเพาะเลี้ยง การเพิ่มปริมาณต้นกล้าและการชักนำให้ต้นกล้าเกิดราก แล้วจึงทำการปรับสภาพต้นกล้าเพื่อย้ายออกปลูก การเพาะเลี้ยงเนื้อจำเป็นต้องทำในห้องที่ปลอดเชื้อ อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประกอบไปด้วยธาตุอาหารต่างๆ ที่พืชต้องการ ชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงต้องมีการฟอกฆ่าเชื้อก่อนทำการผ่าตัดเนื้อเยื่อพืชนั้น ความสำเร็จในการขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช วิธีการเพาะเลี้ยง อาหารที่ใช้เลี้ยง สภาพแวดล้อม และการดูแลรักษา

คำถามทบทวน

1. จงให้คำจำกัดความของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. จงอธิบายส่วนประกอบของอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
3. จงบอกความแตกต่างระหว่างออแกโนจีนีซิส และเอ็มบริโอจีนีซิส
4. จงอธิบายวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาโดยละเอียด
5. จงอธิบายขั้นตอนการนำพืชออกขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาอย่างละเอียด

เอกสารอ้างอิง

จิรา ณ หนองคาย. (2551). **หลักและเทคนิคการขยายพันธุ์พืชในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ธัญญา ทะพิงค์แก. (2554). **ภาพประกอบวิชาหลักการขยายพันธุ์พืช**. [Online]. Available : http://www.facagri.cmru.ac.th/plant. (20 กันยายน 2554)

บุญหงษ์ จงคิด. (2548). **หลักและเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. (2536). **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรชัย จุฑามาศ. (2544). **เนื้อเยื่อพืช**. [Online]. Available : http://www.ku.ac.th/e-magazine /july44/agri/plant1.html. (2 มกราคม 2550)

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. (2549). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ: โฟร์เพซ.

อภิชาติ วรรณวิจิตร. (2550). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. [Online]. Available : http://guru.sanook.com/encyclopedia. (2 มกราคม 2550)

Biolaureate centre. (2011). **Tissue culrure-breed your plants without its partners**. [Online]. Available : http://biolaureatesociety.blogspot.com/2011_10_01_archive.html. (16 January 2011)

Bonga, J. M., Klimaszewska, K. K. and von Aderkas, P. (2010). **Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 100(3), 241-254.

Ducos, J. P., Lambot, C. and Petiard, V. (2007). **Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis**. International Journal of Plant Developmental Biology. 1(1), 1-12.

Pighin, J. (2003). **Your guide to plant cell culture**. [Online]. Available : http://www.scq.ubc.ca/your-guide-to-plant-cell-culture/. (16 July 2010)

Seong, R. C., Kim, J. Y., Haam, J. W. and Seo, Y. W. (2004). **Isolation and characterization of a gibberellin responsive Gene (HvGR) from initiated shoots from calli derived from mature embryo of barley**. [Online]. Available : http://www.cropscience.org.au/icsc2004/poster/3/2/1/554_seong.htm. (16 July 2010)

Taji, A. M., Dodd, W. A. and Williams, R. R. (1997). **Plant tissue culture practice**. Armidale, NSW: University of New England Printery.

The sociey for in vitro biology. (2001). **Educational outreach program**. [Online]. Available : http://www.sivb.org/edu_outreach.asp. (16 July 2010)

Wu, F. H., Shen, S. C., Lee, L. Y., Lee, S. H., Chan, M. T. and Lin, C. S. (2009). **Tape-*Arabidopsis* Sandwich - a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method**. Plant Methods. 5(1), 16.