บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หมายถึง การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช (explant) หรืออาจหมายถึงการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อหรืออวัยวะในอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและปลอดเชื้อ (คำนูณ, 2544)

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว พบว่าทุกส่วนของต้นข้าวสามารถนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ เช่น เมล็ด ราก และอับละอองเรณู เป็นต้น Yoshida *et al*. (1994) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว japonica บนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) พบว่าเมล็ดข้าวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เช่นเดียวกับ Abe และ Futsufara (1984) ทำการเพาะเลี้ยงรากของข้าว japonica บนอาหารแข็งสูตร MS พบว่ารากข้าวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เช่นเดียวกัน

จากงานวิจัยจะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และหากแคลลัสที่เกิดขึ้นมีการสร้างอวัยวะขึ้นมา เช่น ราก ลำต้น ใบ หรือ ดอก จะเรียกกระบวนการนี้ว่าออร์แกโนเจเนซิส (Organogenesis) โดยยอดและรากที่เกิดขึ้นจากกระบวนการออร์แกโนเจเนซิสจะเป็นอิสระและไม่ขึ้นต่อกัน และหากเป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยผ่านการเกิดแคลลัส และบางส่วนของแคลลัสจะมีการเจริญพัฒนาคล้ายกับคัพภะ(embryo) ดังนั้นจะเรียกกระบวนการนี้ว่าเอมบริโอเจเนซิส (Embryogenesis) (สมพร, 2549)

2.2 เอมบริโอเจเนซิส

อารีย์ (2541) ได้อธิบายว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารที่เหมาะสมจะให้เนื้อเยื่อที่เป็นแคลลัสและบางส่วนจะพัฒนามีรูปร่างคล้ายๆ เอมบริโอ คือ มีส่วนที่จะกลายเป็นรากและยอด ซึ่งกระบวนการชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดเนื้อเยื่อที่เหมือนเอมบริโอนี้เรียกว่า กระบวนการเอมบริโอเจเนซิส และกระบวนการดังกล่าวเป็นการนำเนื้อเยื่อของเซลล์ร่างกายมาทำการเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงเรียกว่ากระบวนการนี้ใหม่ว่า กระบวนการโซมาติกเอมบริโอเจเนซิส และ Merkle *et al*. (1995) รายงานว่าออกซินเป็นกลุ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีบทบาทในการชักนำให้เกิดกระบวนการเอมบริโอเจเนซิส สอดคล้องกับ ศิวพงศ์ (2546) ได้รายงานว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นปัจจัยสำคัญในการช่วยกระตุ้นให้เกิดเอมบริโอ โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในการกระตุ้นให้เกิดเอมบริโอในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพวกข้าวและธัญพืชทั้งหลายในวงศ์แกรมินี ส่วนไซโตไคนินไม่ค่อยมีบทบาทในเรื่องนี้เท่าใดนักและน้ำมะพร้าวยังช่วยให้เกิดเอมบริโอได้ดีขึ้นอีกด้วย

การศึกษากระบวนการเอมบริโอเจเนซิส Nadar *et al.* (1978) ทำการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย โดยการใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MMS โดยเติม 2,4-D ที่มีความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า 2,4-D ช่วยในการสร้างเนื้อเยื่อแคลลัส แต่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นยอดหรือราก แต่เมื่อทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี 2,4-D แคลลัสจะพัฒนาต่อไปจนได้ต้นที่สมบูรณ์ การพัฒนาจากแคลลัสเป็นต้นอ้อยเป็นการพัฒนาจากกระบวนการเอมบริโอเจเนซิส และการชักนำให้เกิดโซมาติกเซลล์จะต้องการออกซินในความเข้มข้นที่สูง (2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งใกล้เคียงกับความเข้มข้นของออกซินในการพัฒนาของไซโกติกเอมบริโอของอ้อยหลังจากการผสมในธรรมชาติ

2.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัส (callus) หมายถึง เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มและยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ(ศิวพงศ์, 2546)

ชิ้นส่วนพืชเกือบทุกชนิดสามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่โดยทั่วไปแล้วเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จในการชักนำให้เกิดแคลลัสจะสูงในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนของคัพภะ ใบอ่อน ปลายยอด ดอกอ่อน และเมล็ด เมล็ดจะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด (รังสฤษฎ์, 2540) และพบว่าทุกส่วนของต้นข้าวก็สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ เช่น ราก ข้อ ใบ ช่อดอก อับละอองเรณูและเมล็ด เป็นต้น (Oono, 1983; Henke *et al.,*1978) โดย Leopold และ Kriedeman (1975) ได้ขยายความเพิ่มเติมว่าความสามารถของการเกิดเป็น compact callus และ friable callus นี้มีสาเหตุเนื่องมาจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืชและในอาหารที่ทำการเพาะเลี้ยง

Pierik (1987) ได้อธิบายถึงชนิดของแคลลัสไว้ว่าสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ดังนี้

1 compact callus จะประกอบด้วยแคลลัสชนิด embryogenic และ non-embryogenic แคลลัสชนิดนี้มีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ มีลักษณะการเกาะกันของเซลล์ที่แน่น มักพบในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม NAA

จากการทดลองของ Inoue และ Maeda (1980) มีการเพาะเลี้ยงข้าวในอาหารสูตร Maeda พบว่าอาหารที่มีอัตราความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำต่อความเข้มข้นไคเนตินที่สูง จะทำให้แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นแคลลัสชนิด compact callus

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2 friable callus จะมีลักษณะการเจริญเติบโตที่เร็วสามารถเปลี่ยนเป็น compact callus ได้ เมื่อเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสม แคลลัสแบบนี้มักจะไม่เปลี่ยนเป็นอวัยวะ มีลักษณะการเกาะกันของเซลล์แบบหลวมๆ สามารถแยกออกจากกันได้ง่าย แคลลัสแบบนี้มักจะเกิดมากขึ้นเมื่อมีออกซินในความเข้มข้นสูง หรือมีความเข้มข้นของไซโทไคนินต่ำลง มักพบในอาหารที่เติม 2,4-D friable callus นี้สามารถนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยต่อไปได้

2.4 สูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้ พืชต่างชนิดมีความต้องการธาตุอาหารต่างกัน ดังนั้นจึงมีการคิดค้นสูตรอาหารที่เหมาะสมกับพืชชนิดต่างๆขึ้นมา

จากรายงานการศึกษาพบว่าข้าวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962), LS (Linsmaier and Skoog, 1965) หรือ N_6 (Chu, 1978) ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต กลุ่มออกซิน เช่น 2,4-D (Meneses *et al*., 2005) หรือร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต กลุ่มไซโตไคนิน เช่น kinetin (Yoshida *et al*., 1994) หรือเติมสารสกัดจากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว (เผดิมและคณะ, 2532)

มีรายงานการศึกษาสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงข้าว รายงานการศึกษาของ Li *et al*. (2009) พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร LS (Linsmaier and Skoog, 1965) มีผลต่อการชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสของเมล็ด indiangrass อย่างมาก ซึ่งสูตร LS เป็นสูตรอาหารที่มีส่วนประกอบเหมือนกับอาหารสูตร MS ทุกอย่าง ยกเว้นปริมาณวิตามินที่ใส่ลงไปในอาหารนั้น และ Zhang (1995) รายงานว่า การใช้อาหารสูตร LS (Linsmaier and Skoog, 1965) ในการเพาะเลี้ยงข้าวเมล็ดยาวบางพันธุ์สามารถทำให้เกิดแคลลัสได้สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ แต่บางพันธุ์เกิดแคลลัสเพียง 1 ใน 3 เท่านั้น และ Chen *et al.*(1985) ได้ทำการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนของข้าว พบว่าอาหารสูตร LS สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากช่อดอกอ่อนของข้าวได้

ประศาสตร์ (2536) รายงานว่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะประกอบด้วยธาตุอาหารต่างๆที่พืชต้องการอย่างครบถ้วนอยู่แล้ว แต่ทั้งนี้การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่ออาจจะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณสารที่เติมเพิ่มลงไปนอกเหนือจากธาตุอาหารที่มีอยู่ในสูตรอาหารนั้นๆ เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโต สารสกัดจากธรรมชาติหรือสารเคมีอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับ Vajrabhya *et al.* (1984) พบว่า พันธุ์ข้าวไทยในแต่ละพันธุ์ สามารถตอบสนองต่ออาหารแตกต่างกันในแต่ละสูตร แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของสารควบคุมการเจริญเติมโตด้วย โดยพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เหลืองประทิว 123 ข้าวเหนียวสันป่าตองและ กข.23 เหมาะสำหรับสูตรอาหารที่ใส่ 2,4-D และไคเนติน แต่บางพันธุ์เกิดได้ดีเมื่อใช้น้ำมะพร้าวแทนไคเนติน

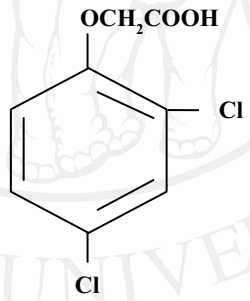
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5 สารควบคุมการเจริญเติบโต

2.5.1 ออกซิน (auxin)

ออกซินเป็นกลุ่มสารที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เนื้อเยื่อเจริญเป็นแคลลัส ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้จะอยู่ในช่วง 0.01-10.0 มก./ล. ในธัญพืชซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในวงศ์หญ้า ซึ่งการนำเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงและชักนำให้เกิดแคลลัสนี้พืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะต้องใช้ออกซินในปริมาณความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูงกว่าในพืชใบเลี้ยงคู่ในการชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดแคลลัส (Torres, 1989)

2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) เป็นออกซินชนิดหนึ่งที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ มีคุณสมบัติในการไปปิดกั้นกระบวนการกำเนิดอวัยวะ ใช้ได้ผลดีในการเพิ่มจำนวนแคลลัสและรักษาสภาพการเลี้ยงเป็นแคลลัสไว้ ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ใช้จะอยู่ในช่วง 1-10 มก./ลิตร (รังสฤษฎ์, 2540) และ Vajrabhya *et al.* (1984) ได้ระบุปริมาณความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมในข้าวไทยว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย 2,4-D มีสูตรโครงสร้างดังต่อไปนี้



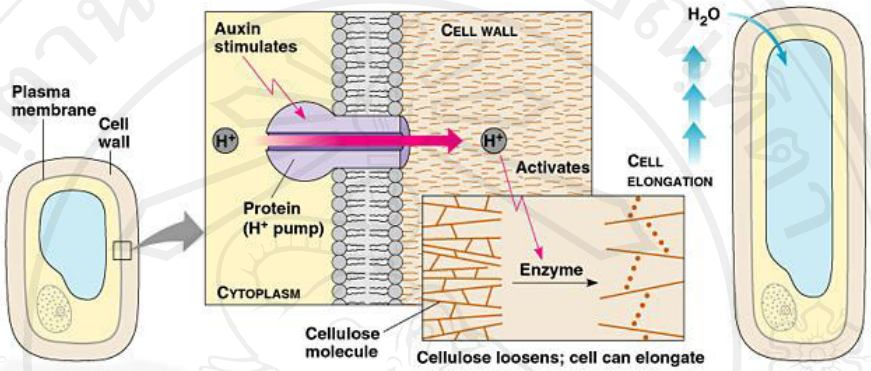
ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้าง 2,4-D (Dodds และ Roberts, 1995)

กลไกการทำงานของออกซิน

เมื่อออกซินเข้าไปภายในเซลล์ จะไปกระตุ้นการปลดปล่อย H^+ หรือโปรตอนจากเนื้อเยื่อ และ H^+ จะถูกเคลื่อนย้ายไปยังผนังเซลล์ ทำให้ pH ของผนังเซลล์ต่ำลง pH ที่ต่ำลงมีผลต่อการเปลี่ยนคุณสมบัติของผนังเซลล์ โดยแขนที่เกาะกันของผนังเซลล์นั้นจะถูกทำลายในสภาพที่ pH ต่ำ หรืออาจจะเป็น pH ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ ที่จะทำให้ผนังเซลล์มีการยืดตัวและขยายขนาดของเซลล์ ผนังเซลล์จะเกิดการยืดตัวแบบถาวรในระหว่างที่มีการขยายตัวของเซลล์นั้น ไม่เพียงแต่ผนังเซลล์ยืดตัวเท่านั้น ยังมีการเพิ่มความหนาของผนังเซลล์เพราะมีสารใหม่ๆไปเกาะ การเจริญดังกล่าวเป็นผลจากการกระตุ้นของออกซิน ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อการยืดตัวของเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หยุดลงแล้ว การเจริญของเซลล์ต้องการ RNA และโปรตีนในช่วงที่เซลล์ยืดตัว เพราะในการยืดตัวของเซลล์นั้นผนังเซลล์ไม่ได้บางลงไป แต่ยังคงหนาเท่าเดิมหรือหนาขึ้น ดังนั้นจึงต้องมีการสร้างผนังเซลล์เพิ่มขึ้นด้วย (http://www2.mcdaniel.edu/Biology/botf99/hormweb/hauxin.htm, 1999) ดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 กลไกการทำงานของออกซิน

(http://www2.mcdaniel.edu/Biology/botf99/hormweb/hauxin.htm, 1999)

จากการทดลองของ Chen *et al.*(1985) ได้ทำการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนของข้าวบนอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D ปริมาณ 1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า 2,4-D ทุกระดับความเข้มข้นที่ใช้สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากช่อดอกอ่อนของข้าวได้ เผดิมและคณะ (2532) ได้เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาติก 370 ในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ดัดแปลง 9 สูตร ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% และ เติม 2,4-D 1.0 และ 2.0 mgl^{-1} NAA 1.0 และ 2.0 mgl^{-1} kinetin 0.5 และ 1.0 mgl^{-1} เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เมล็ดข้าวที่เลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่สามารถเจริญเป็นแคลลัสและสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ในอาหารทุกสูตรที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยอาหารสูตรที่มีการเติม 2,4-D 2.0 mgl^{-1}, NAA 1.0 mgl^{-1} และ kinetin 0.5 mgl^{-1} จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากสุด คือ 50%

จากการทดลองของ Li *et al.* (2009) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ด indiangrass บนอาหาร LS เพื่อดูชักนำการเกิดแคลลัส โดยมีการเติม 2,4-D 1, 2, 3, 4 และ 5 mgl^{-1} และไคเนติน 0.0, 0.1 และ 0.2 mgl^{-1} ทำการเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2-3 วัน เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดต่ำ ยังไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดอาหารกับเปอร์เซ็นต์การงอก แต่หลังจากเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส สีเหลืองอ่อน ซึ่งสูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

LS ที่มีการเติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว โดยไม่ใส่ไคเนตินจะสามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสได้มากกว่าสูตรที่มีการเติมไคเนติน ซึ่งสูตรที่มีการเติม 2,4-D 3 mgl^{-1} จะชักนำให้เกิดเอมบริโอเจเนิกแคลลัสได้มากที่สุดคือ 54.5% และสูตรที่เติม2,4-D 2, 1 และ 4 mgl^{-1} จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 41.9%, 39.9% และ 36.3% ตามลำดับ นอกจากนี้ Islam *et al*. (2005) ได้การเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ Pajam ในอาหารสูตร MS พบว่าอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับแคลเซียมซิลิเกต 60 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ปริมาณ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด และจากการศึกษาของ พิจิกาและอารีย์ (2548) ในการชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดแคลลัส โดยนำเมล็ดข้าว 6 พันธุ์ คือ กข.27 ขาวดอกมะลิ 105 น้ำสะกุย 19 เหลืองประทิว 123 หอมคลองหลวง 1 และหอมสุพรรณบุรี มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ดัดแปลง 6 สูตร หลังจากทำการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ พบว่าพันธุ์ข้าว สูตรอาหารและสภาพการเลี้ยงมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าว โดยการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงจะทำให้เนื้อเยื่อเกิดแคลลัสได้ดีกว่าในที่มืด และพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่ที่นำมาทำการทดลองจะตอบสนองต่ออาหารที่ใส่ 2,4-D และไคเนติน ซึ่งทำให้อัตราการเกิดแคลลัสที่สูง จากการทดลองนี้สูตรอาหารที่เหมาะสำหรับพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่ที่นำมาทำการทดลอง คือ สูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่ใส่ 2,4-D 1 mgl^{-1} NAA 1 mgl^{-1} และ kinetin 0.1-1.0 mgl^{-1}

อีกทั้ง สุริยันตร์และคณะ (2540) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงคัพภะของข้าวนางมลเอส 4 พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 mgl^{-1} เลี้ยงในสภาพมืดให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดคือ 57% และแคลลัสมีสีเหลือง เกาะกันแน่นเนื่องจาก 2,4-D ยับยั้งการเกิดยอดทำให้เซลล์ขยายขนาดและเกิดการแบ่งเซลล์จำนวนมากกลายเป็นก้อนแคลลัส

จะเห็นได้ว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการเกิดและพัฒนาของแคลลัส แต่การใช้ในปริมาณที่มากเกิดไปอาจส่งผลเสีย ดังเช่น Pierik (1987) ได้ให้เหตุผลว่าปริมาณ 2,4-D ที่ใช้ถ้ามากเกินไปจะทำให้ความแปรปรวนของเซลล์ เนื่องจาก 2,4-D มีคุณสมบัติในการปิดกั้นกระบวนการกำเนิดอวัยวะและใช้ได้ผลดีในการเพิ่มจำนวนและรักษาสภาพการเลี้ยงเป็นแคลลัสไว้ และระดับความเข้มข้น 2,4-D ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม สารควบคุมการเจริญเติบโตที่พืชสร้างขึ้น ลักษณะทางพันธุกรรมของพืช อายุของพืชและองค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ดังเช่น สุริยันตร์และคณะ (2540) รายงานว่าเมล็ดข้าวนางมลเอส 4 สร้างแคลลัสได้ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ทุกระดับความเข้มข้นทั้งในที่มืดและสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ส่วนในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม 2,4-D จะไม่สร้างแคลลัสและแคลลัสจะเกิดได้ดีขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้น 2,4-D เป็น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

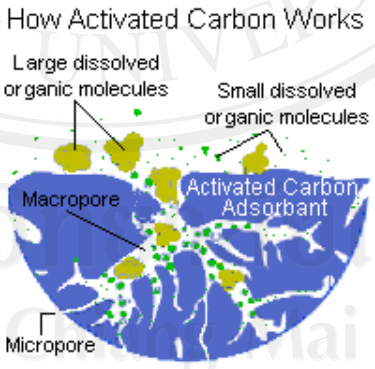
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.2 ไซโตไคนิน (cytokinin)

สำหรับไซโตไคนินจะไม่มีบทบาทในการชักนำให้เกิด somatic embryogenesis การเติมไซโตไคนินลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็เพื่อไปช่วยกระตุ้นในการแบ่งเซลล์และการขยายขนาดของเซลล์ อีกทั้งยังช่วยในการเปลี่ยนเซลล์ให้ไปเป็นหน่อเล็กๆ จากส่วนของแคลลัสหรืออวัยวะที่เพาะเลี้ยง (บุญยืน, 2544) และ Li *et al.* (2009) ได้กล่าวว่าบทบาทของไซโตไคนินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้ายังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่การใช้ไซโตไคนินในปริมาณที่ต่ำจะทำให้มีการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าการใช้ในปริมาณสูง และประศาสตร์ (2536) ได้กล่าวเพิ่มเติมว่าสัดส่วนของฮอร์โมนทั้งสองกลุ่มมีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ โดยทั่วๆไปแล้วถ้าสัดส่วนออกซินต่อไซโตไคนินสูง แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนนี้ต่ำ จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น และหากสัดส่วนนี้สมดุลจะพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป

2.6 ผงถ่านกัมมันต์

ผงถ่านกัมมันต์ได้จากการเผาไม้ด้วยความร้อนชื้น ภายใต้ความร้อนสูง และไอน้ำในสภาวะปราศจากออกซิเจน เพื่อเป็นการกำจัดสารประกอบต่างๆที่ยังหลงเหลืออยู่ให้มีเพียงคาร์บอนบริสุทธิ์อย่างเดียว และเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซับให้มากที่สุด ทำให้ผงถ่านกัมมันต์มีรูพรุนเล็กๆ จำนวนมาก ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับ จึงสามารถดูดซับแก๊ส หรือสารประกอบต่างๆ เข้าไปได้มาก ผงถ่านกัมมันต์จากพืชจะบริสุทธิ์กว่าผงถ่านกัมมันต์ที่ได้จากสัตว์



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างภายในของผงถ่านกัมมันต์

(http://www.air2water.biz/compare-water-purification-systems.html, 2005)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Pierik (1987) ได้รายงานเกี่ยวกับอิทธิพลของผงถ่านกัมมันต์ไว้ว่า เมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเป็นระยะเวลาหนึ่ง ก็จะพบว่าในอาหารนั้นมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น คือ อาหารเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลซึ่งสารที่ว่านั้นก็คือสารประกอบฟีนอลและเมลานิน(melanin) ผงถ่านกัมมันต์จะช่วยในการดูดซับสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญและช่วยดูดซับพิษของรงควัตถุสีดำสีน้ำตาล และสารพิษที่ไม่มีสี(absorption of inhibitory compound) ปริมาณที่ใช้ประมาณ 0.5-30 % และนอกจากจะดูดซับสารยับยั้งการเจริญแล้ว ยังดูดซับสารควบคุมการเจริญจากอาหาร มีคุณสมบัติในการทำให้อาหารมีสีดำ (darkening of the medium) ทำให้มีการเกิดราก ช่วยในการกระตุ้นการเกิดโซมาติกเอมบริโอ และการเติมผงถ่านกัมมันต์ลงไปในอาหารจะมีผลต่อการเกิดออร์แกโนเจเนซิสของพืชไม้เนื้อแข็ง อีกทั้งผงถ่านกัมมันต์ยังช่วยรักษาค่า pH ของอาหาร ทั้งนี้เนื่องจากสารพิษที่พืชปล่อยออกมาขณะทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะทำให้อาหารมีความเป็นกรดสูงขึ้นทำให้การเจริญของแคลลัสและการเจริญของพืชชะงัก จึงมีการใช้ผงถ่านกัมมันต์เป็นตัวบัฟเฟอร์เพื่อควบคุม pH ของอาหาร ซึ่งค่า pH ที่นิยมใช้ในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่จะใช้ pH 5.0-6.0 และเป็นไปได้ว่าผงถ่านกัมมันต์ปล่อยสารบางชนิดออกมาซึ่งช่วยในการกระตุ้นการเจริญของชิ้นพืช

จากงานทดลอง Buffard-Morel *et al*. (1995) ได้กล่าวว่าผงถ่านนอกจากจะดูดสารยับยั้งการเจริญแล้ว ผงถ่านอาจจะดูดสารควบคุมการเจริญเติบโตอีกด้วย ดังเช่นการทดลองโดยการเติม 2,4-D และผงถ่านลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อเติม 2,4-D ปริมาณ $4.5x10^{-4}$ M และผงถ่าน 3 gl^{-1} หลังจากผ่านไป 21 วัน ผงถ่านจะไปดูด 2,4-D จนมีปริมาณเหลือแค่ 0.47% ของปริมาณ 2,4-D ที่ใส่ไปทั้งหมด จากการศึกษาพบว่าผงถ่านจะดูด 2,4-D อย่างค่อยเป็นค่อยไป โดยระยะเวลาที่ใช้ในการดูด 2,4-D จนถึงระดับสมดุล ขึ้นอยู่กับปริมาณ 2,4-D และผงถ่านที่ใส่ลงไปในอาหาร การเติมผงถ่านปริมาณ 3 gl^{-1} และ 2,4-D ปริมาณ 100 mgl^{-1} ลงในอาหาร จะใช้เวลาถึง 21 วันหลังจากทำการเตรียมอาหารในการที่ผงถ่านจะดูด 2,4-D ให้ปริมาณ 2,4-D ที่ยังไม่ถูกดูดซึมมีปริมาณสมดุลกับ 2,4-D ที่ถูกดูดซึมแล้ว

Paek และ Hahn (2000) ได้ศึกษาอิทธิพลของไซโตไคนิน ออกซิน และผงถ่านกัมมันต์ที่มีต่อการสร้างอวัยวะของดอกไลซิแอนตัส พบว่า การใช้ BA และ kinetin ในระดับความเข้มข้นที่สูง (13.32-22.2 และ 13.94-23.23 μM) จะมีผลทำให้เกิดยอดได้ดี และการเพิ่มปริมาณ IAA และ IBA ในอาหารจะช่วยให้เกิดราก แต่เมื่อมีการเติมผงถ่านกัมมันต์ลงไปจะเป็นตัวไปยับยั้งการพัฒนาของยอดและราก ทำให้แคลลัสสามารถดูดสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้เต็มที่ และ Buffard-Morel *et al*. (1995) ได้รายงานว่าการเพาะเลี้ยงส่วนยอดของมะพร้าวในอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์พบว่า ผงถ่านกัมมันต์เป็นตัวส่งเสริมให้เกิด somatic embryogenesis และยังเป็นตัวช่วยดูดซับสารยับยั้งการเจริญเติบโตได้อีกด้วยโดยเฉพาะสารประกอบฟีโนลิก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.7 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย หมายถึง การนำเซลล์เดี่ยวๆ (single cell) หรือกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (aggregate cells) มาเลี้ยงในอาหารเหลว เนื้อเยื่อที่เหมาะที่สุดที่จะใช้ คือ แคลลัสที่มีการเกาะตัวของเซลล์อย่างหลวมๆ (friable callus) ซึ่งง่ายต่อการแยกหรือกระจายเซลล์ออกจากกัน โดยทั่วๆไปแล้วไม่แนะนำให้เลี้ยงเซลล์แขวนลอยเป็นเวลานาน เนื่องจากอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมได้ง่าย (รังสฤษดิ์, 2540)

ประโยชน์ของการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

1. เพื่อศึกษาเมตาโบลิซึมของเซลล์ โดยเฉพาะที่เกี่ยวกับการสร้างสาร secondary metabolites การสร้างเอ็นไซม์ สภาพของเซลล์ที่ขาดคลอโรฟิลล์และสารคาโรทีนอยด์ ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการแยกหรือสกัดเอ็นไซม์และสารเคมีที่เป็นประโยชน์

2. เพื่อศึกษาการทำงานเอ็นไซม์และการแสดงออกของยีน

3. เพื่อการผลิตเอมบริออยด์ (คัพภะ) และโปรโตพลาส เพื่อชักนำให้เป็นต้น ต้นที่ได้ในสภาพที่มีการชักนำให้ทนทาน และ/หรือ ต้านทานต่อสาเหตุต่างๆ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและศึกษาทางพันธุกรรม

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย นิยมเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจะไม่มีขั้ว ไม่ได้รับอิทธิพลจากแรงโน้มถ่วง การแบ่งเซลล์และการเจริญจะรวดเร็วกว่าเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง และจะมีการเจริญออกไปทุกทิศทุกทาง เซลล์ที่เพาะเลี้ยงไปเรื่อยๆนี้ อาจจะแย่งเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเกาะกลุ่มกันขึ้นอยู่กับธรรมชาติของแคลลัสที่นำมาเพาะเลี้ยงและองค์ประกอบของอาหาร ถ้ามีออกซินสูงเซลล์จะแยกกันได้ดีกว่ามีปริมาณออกซินต่ำ การเกิดเอมบริโอมักจะเกิดจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย เอมบริโอที่เกิดขึ้นสามารถเจริญเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ โดยผ่านขั้นตอนเช่นเดียวกับการเจริญของเอมบริโอในธรรมชาติ (ศิวพงศ์, 2546) การพัฒนาของเอมบริโอจากการเลี้ยงเซลล์เดี่ยว (single cell culture) เซลล์เดี่ยวอาจได้มาจากการย่อยเนื้อเยื่อด้วยเอนไซม์ (pectinase enzyme) หรือได้จากการแยกเซลล์จากแคลลัส การเพาะเลี้ยงกระทำในอาหารเหลว จึงมักเรียกวิธีแบบนี้ว่า การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture) การพัฒนาของเอมบริโอเริ่มจากเซลล์เดี่ยวๆ แบ่งตัวออกเป็น 2, 4 เซลล์และทวีคูณไปเรื่อยๆ จนได้เป็นกลุ่มเซลล์ (cell aggregate) ต่อมาพัฒนาเป็นก้อนกลมๆ (globular-shaped) เจริญต่อไปเป็น heart-shaped และ torpedo-shaped ในที่สุด (ประศาสตร์, 2536)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.8 เมล็ดสังเคราะห์

สิ่งสำคัญที่สุดอีกประการหนึ่งของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การเพิ่มโอกาสในการมีชีวิตรอดของเอมบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อนำมาปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกห้องปฏิบัติการ เอมบริโอที่เจริญมาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ ไม่สามารถเอาไปหว่านหรือเพาะได้เหมือนกับเมล็ดในธรรมชาติ เนื่องจากเอมบริโอไม่เกี่ยวกับเพศไม่มีเปลือกเมล็ดไว้คอยป้องกันอันตรายและไม่มีอาหารสะสมสำหรับใช้ในการงอกของเมล็ด จึงมีการคิดค้นวิธีการที่จะช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้เอมบริโอก่อนนำมาปลูกในสภาพปกติ โดยวิธีการสร้างเปลือกหุ้มเทียมให้แก่เอมบริโอหรือที่เรียกกันในปัจจุบันว่าเทคนิคการผลิตเมล็ดสังเคราะห์(ศิวพงศ์, 2546)

เมล็ดสังเคราะห์นี้เป็นเมล็ดพืชที่ได้จากการนำเอาคัพภะที่เพาะเลี้ยงได้ (จากการชักนำการกำเนิดคัพภะทั้งทางตรงและทางอ้อม) มาเคลือบ หรือหุ้มด้วยสารประกอบบางชนิดที่เลียนแบบเอนโดสเปอร์ม สารเหล่านี้ส่วนใหญ่ได้แก่ sodium alginate หรือ polyox (polyethylene oxide) นำมาผสมกับอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง แล้วเคลือบอีกชั้นด้วยสารประกอบพวก calcium alginate เพื่อทำหน้าที่คล้ายกับเปลือกหุ้มเมล็ด เพื่อป้องกันอันตรายแก่โซมาติกเอมบริโอที่อยู่ข้างใน (รังสฤษดิ์, 2540) โดยที่หลักการของเมล็ดสังเคราะห์หรือเมล็ดเทียมมีองค์ประกอบสำคัญ 3 ส่วน คือ

1 เอมบริออยด์ ซึ่งได้มาจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทำหน้าที่แทนเอมบริโอในเมล็ดพืชจริงตามธรรมชาติ

2 เอนโดสเปอร์มเทียมหรืออาหารสะสมสังเคราะห์ (artificial endosperm) เกิดจากการสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ เพื่อทำหน้าที่แทนเอนโดสเปอร์ม (endosperm) เป็นแหล่งอาหารสะสมสำหรับเอมบริออยด์ เอนโดสเปอร์มเทียมนี้ควรมีธาตุอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโตและส่วนประกอบอื่นๆ ที่จำเป็นในระยะที่เริ่มมีการงอกและเจริญ

3 เปลือกหุ้มเมล็ดพืชเทียม (artificial seed coat) ทำหน้าที่แทนเปลือกหุ้มเมล็ดป้องกันอันตรายให้กับเมล็ดพืชเทียมจากสภาวะแวดล้อมภายนอก ระหว่างการเก็บรักษาและการขนย้าย และพบว่าโซเดียมอัลจิเนต(sodium alginate) เป็นสารที่มีความเหมาะสมในการใช้ห่อหุ้มเมล็ดสังเคราะห์ เนื่องจากโซเดียมอัลจิเนต(sodium alginate) มีคุณสมบัติในการเป็น เจลลาติน (gelatin) สามารถละลายได้ที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่ต้องใช้ความร้อนในการสร้างเจล ไม่เป็นพิษต่อพืช เอมบริโอสามารถเจริญไปเป็นต้นพืชได้ดี มีผลกระทบต่อเอมบริออยด์น้อยและราคาถูก (Redenbaug *et al*., 1987)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมล็ดสังเคราะห์แบ่งได้ 2 แบบ คือ เมล็ดสังเคราะห์แบบชื้น (hydrated synthetic seed) และเมล็ดสังเคราะห์แบบแห้ง (desiccated synthetic seed) (Redenbaugh, 1993)

1. การผลิตเมล็ดสังเคราะห์แบบชื้น เป็นการศึกษาชนิดของสารเคลือบที่เหมาะสมสำหรับเป็นเปลือกหุ้มเมล็ดสังเคราะห์ พบว่าสารอัลจิเนตมีความเหมาะสมมากที่สุดในแง่ของการเกิดเป็นแคปซูลและความมีชีวิตของโซมาติกเอมบริโอมที่บรรจุอยู่ภายใน (Redenbaugh *et al.*, 1987) แต่เมล็ดสังเคราะห์แบบชื้นมีข้อด้อยหลายประการ คือ เมล็ดสังเคราะห์แบบชื้นจำเป็นต้องเก็บรักษาในสภาพที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งทำให้ยากต่อการเก็บรักษา เป็นปัญหาในการขนส่งเมล็ดสังเคราะห์จากแหล่งผลิตไปยังแปลงปลูกของเกษตรกร และมีระยะเวลาในการเก็บรักษาที่สั้น รวมทั้งมีอัตราการงอกเป็นต้นพืช (conversion rate) ที่ต่ำมาก ภายในเซลล์ชุ่มน้ำ (hydrogel) จะมีการหายใจของโซมาติกเอมบริโอที่อยู่ภายในและแห้งได้อย่างรวดเร็ว และต้องเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic state) เพราะเจลที่ทำหน้าที่เป็นเปลือกหุ้มเมล็ดนั้นมีน้ำตาลซูโครสและน้ำซึ่งเป็นแหล่งอาหารอย่างดีของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ (Redenbaugh *et al.*, 1987)

2. เมล็ดสังเคราะห์แบบแห้ง จะทำให้เอมบริโอที่อยู่ข้างในมีการพักตัวหรืออยู่ในสภาวะเงียบ (quiescence or resting state) โดยการระเหยน้ำออก ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ยาวนานขึ้นและมีประโยชน์ต่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืช (germplasm) เป็นอย่างมาก (Senaratna *et al*., 1989) พบว่าโซมาติกเอมบริโอของถั่วอัลฟัลฟา (alfalfa) ที่ผ่านการดึงน้ำออก (dehydrated) จะให้ต้นกล้าที่มีความแข็งแรงกว่าโซมาติกเอมบริโอที่ไม่ผ่านการดึงน้ำออก (Senaratna, 1990)

ในส่วนของห้องปฏิบัติการเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ก็ได้ทำการพัฒนาเทคนิคในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการผลิตเมล็ดสังเคราะห์ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และใบเลี้ยงคู่ที่เป็นพืชเศรษฐกิจได้สำเร็จ ตัวอย่างเช่น ในปี พ.ศ. 2546 ปิติพงษ์ ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราความมีชีวิตของเมล็ดสังเคราะห์ข้าวโพดหวานโดยเปรียบเทียบการเจริญของแคลลัสในอาหาร 2 สูตร คือ MS และ N6 พบว่าอาหารสูตร N6 ที่มีน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ 2,4 –D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำและเพิ่มจำนวนแคลลัสได้ นอกจากนี้การเพิ่มสารเบนโนมิลจะทำให้เมล็ดสังเคราะห์งอกเพิ่มขึ้น โดยมีอัตราการงอกอยู่ที่ 41 เปอร์เซ็นต์

ในปีเดียวกัน สราวุธ ได้ทำการผลิตเมล็ดสังเคราะห์แบบแห้งจากอ้อย โดยใช้อาหาร MS ที่มีการเติม ABA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เมล็ดสังเคราะห์เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำได้ และยังสามารถป้องกันการเกิดการงอกขณะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2°C ได้อีกด้วย โดยจะมีอัตราการงอก 60 เปอร์เซ็นต์เมื่อปลูกในอาหารวุ้น

ต่อมาในปี พ.ศ. 2548 ปิยชัย ได้ทำการศึกษาการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเมล็ดสังเคราะห์พริกหวาน โดยใช้อาหาร MS ที่เติม ABA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการดึงน้ำออกจากเมล็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สังเคราะห์ 80 เปอร์เซ็นต์ และทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 °C สามารถเก็บรักษาได้ยาวนานถึง 2 สัปดาห์ โดยไม่มีการงอกเกิดขึ้นในระหว่างเก็บรักษา เมื่อนำมาเพาะในอาหารวุ้นพบว่ายังคงมีเปอร์เซ็นต์การงอกเฉลี่ย 86 เปอร์เซ็นต์ และต้นอ่อนมีลักษณะปกติ 97 เปอร์เซ็นต์ใช้เวลาในการงอก 3 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved