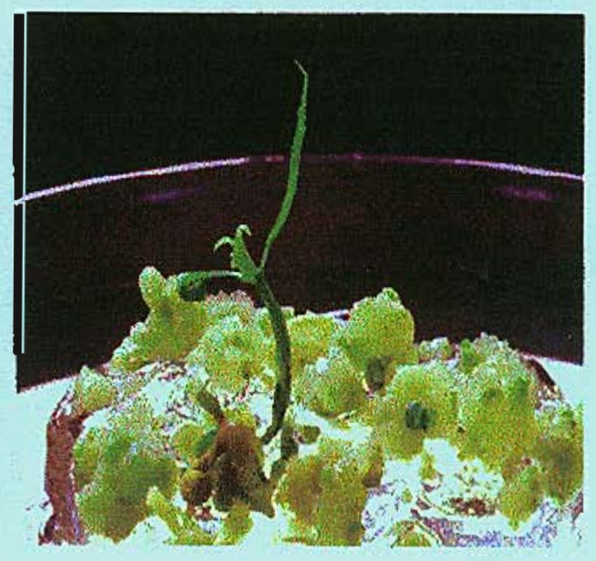
เอกสารวิชาการ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และการใช้ประโยชน์



ชยานิจ ดิษฐบรรจง

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

กรมวิชาการเกษตร

ห้องสมุด
กรมวิชาการเกษตร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และการใช้ประโยชน์

ชยานิจ ดิษฐบรรจง

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการใช้ประโยชน์

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	1
บทที่ 2 แนวทางการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช	13
บทที่ 3 การขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	18
บทที่ 4 การผลิตพืชปลอดโรค	31
บทที่ 5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการปรับปรุงพันธุ์พืช	36
บทที่ 6 การใช้รังสีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำการกลายพันธุ์	47
เอกสารอ้างอิง	66

กรมวิชาการเกษตร

1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ในปี 1838 นักวิทยาศาสตร์ชื่อ Schwann และ Schleiden ค้นพบทฤษฎีเซลล์ ซึ่งต่อมาพบว่าเซลล์พืชมีความสามารถพัฒนาขึ้นเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ เรียกความสามารถนี้ว่า totipotency จากทฤษฎีนี้เป็นพื้นฐานให้ในปี 1902 Haberlandt พยายามที่จะเพาะเลี้ยงกลุ่มของเซลล์พืชให้มีชีวิตอยู่ได้ระยะหนึ่ง ในปี 1939 Gauteret และ White ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นครั้งแรก โดยเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบ (tumoral tobacco tissue) ให้มีชีวิตรอด และพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีวิวัฒนาการขึ้นเรื่อยๆ จากนั้นเป็นต้นมา สูตรอาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จ ในปี 1957 Skoog และ Miller พบว่าการพัฒนาเป็นต้นหรือรากของเนื้อเยื่อพืชสัมพันธ์กับอัตราส่วนของ cytokinin/auxin ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ผลจากการค้นคว้าเรื่องสารกระตุ้นการเจริญเติบโตนี้ ทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จมากขึ้น และในปี 1962 Murashige และ Skoog ค้นพบสูตรอาหารสังเคราะห์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายต่อมา (รมณีย์ และ ศาลักษณ์, 2549)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ และควบคุมสภาวะแวดล้อมของการเลี้ยงพืชให้เหมาะสม เพื่อให้เนื้อเยื่อพืชนั้นมีการเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณและพัฒนาเป็นต้นพืชใหม่ที่สมบูรณ์ได้ในที่สุด การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อและให้ต้นพืชปริมาณมากได้ในระยะเวลารวดเร็ว พืชที่ได้จะมีลักษณะตรงตามพันธุ์ ปลอดโรค และมีความสม่ำเสมอของการเจริญเติบโตเหมาะสำหรับการปลูกเชิงอุตสาหกรรม และยังใช้เทคนิคนี้ร่วมกับเทคโนโลยีอื่น เพื่อผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolized) ผลิตยาหรือสารสำคัญทางการเกษตร ปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้พืชพันธุ์แปลกใหม่ เก็บรักษาพันธุ์พืชที่หายากและกำลังจะสูญพันธุ์ คัดเลือกพันธุ์พืชต้านทานโรค แมลง และสิ่งแวดล้อม ทดสอบความเป็นพิษของสารกำจัดโรค แมลง วัชพืช นอกจากนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังนำมาใช้ร่วมกับงานวิจัยสาขาอื่นๆได้อีกมากมาย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบ่งได้เป็น การเลี้ยงพืชทั้งต้น (culture of intact plant) คือ การนำเมล็ดมาเพาะในสภาพปลอดเชื้อ เช่น การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ และการเลี้ยงคัพภะ (embryo culture) โดยแยกเอาต้นอ่อนหรือคัพภะจากเมล็ดมาเลี้ยง เช่น การเลี้ยงคัพภะของมะพร้าวกะทิ และการเลี้ยงเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ ของพืช (tissue and organ culture) คือการเอาเนื้อเยื่อพืชหรือเนื้อเยื่อที่มีการพัฒนาเป็นอวัยวะแล้วมาเลี้ยง เช่น การเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (meristem culture) ตายอด ตาข้าง ราก หรือการเลี้ยงอับเรณู (anther culture) แคลลัส (callus culture) เซลล์หรือเซลล์แขวนลอย (cell culture or cell suspension culture) โปรโตพลาส (protoplast culture) เป็นต้น

ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ประโยชน์ในงานหลายด้านทั้งด้านการเกษตรและอุตสาหกรรม ได้แก่

การขยายพันธุ์พืชเพื่อปลูกเป็นการค้าหรือเพื่อการส่งออก ซึ่งจำเป็นต้องได้ต้นพันธุ์จำนวนมากที่มีความสม่ำเสมอสูง เพื่อความสะดวกในการจัดการทั้งการให้น้ำ ปุ๋ย การเก็บเกี่ยว และการใช้เครื่องจักรในการทำงาน เช่น การผลิตต้นพันธุ์กล้วยไม้เพื่อการตัดดอก การผลิตต้นพันธุ์สับปะรดในอุตสาหกรรมผลิตสับปะรดกระป๋อง การผลิตต้นพันธุ์สักเพื่ออุตสาหกรรมป่าไม้ หรือต้นพันธุ์ปอสาเพื่ออุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ

การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ในเวลาอันรวดเร็ว โดยชักนำด้วยสารเคมีให้เกิดการกลายพันธุ์ (chemical mutagen) หรือการฉายรังสีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ในเวลาที่รวดเร็วกว่าวิธีปรับปรุงพันธุ์แบบเก่าซึ่งต้องใช้เวลาในการผสมพันธุ์จนติดผลหรือเมล็ด นอกจากนี้การใช้สาร colchicine หรือการใช้รังสีทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการกลายพันธุ์ในไม้ดอกไม้ประดับ จากนั้นชักนำให้เนื้อเยื่อเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ ย้ายออกปลูก คัดเลือกต้นพันธุ์ใหม่ที่มีสีสันขนาดรูปร่างของดอก หรือลักษณะดีตามต้องการ (รมณีย์ และ ศาลักษณ์, 2549) นอกจากนั้นยังสามารถคัดเลือกต้นพันธุ์ใหม่จากการแปรปรวนของเนื้อเยื่อพืชที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (somaclonal variation) เช่น ในพืชด่างจะมีความแตกต่างของเนื้อเยื่อที่อยู่ติดกัน ซึ่งเรียกว่า chimera เมื่อนำเนื้อเยื่อดังกล่าวมาเลี้ยงจะสามารถคัดแยกและได้พันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะแตกต่างออกไปได้

การคัดเลือกพืชต้านทานโรค แมลง หรือทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีป้องกันกำจัดโรค แมลง วัชพืช สามารถใช้ประโยชน์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อคัดเลือกพืช ตามสภาพแวดล้อมที่กำหนดได้

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังสามารถช่วยในการผสมข้ามพืชต่างสายพันธุ์หรือต่างชนิดกัน ซึ่งไม่สามารถผสมกันได้โดยวิธีธรรมชาติ ด้วยการผสมโดยใช้โปรโตพลาสของพืช เช่นการผสมข้ามระหว่างมะเขือเทศกับมันฝรั่ง หรือการถ่ายยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการเข้าสู่ต้นพืช ซึ่งต้องใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นพื้นฐานในการเตรียมเนื้อเยื่อ เมื่อได้ต้นพืชพันธุ์ใหม่ หรือพืชดัดแปลงพันธุ์แล้ว ยังต้องอาศัยเทคนิคนี้เลี้ยงเนื้อเยื่อดังกล่าว เพื่อให้ได้เป็นต้นพืชพันธุ์ใหม่ที่สมบูรณ์ และเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ให้มากขึ้นตามความต้องการ (รังสฤษฎ์, 2540)

การผลิตพืชปลอดโรค เช่น สตรอเบอร์รี่ ต้นพันธุ์ที่ได้จากการขยายด้วยไหลที่ปลูกในแปลงเป็นเวลานานหลายรุ่น มักสะสมโรคอยู่ในต้น โดยเฉพาะโรคไวรัสสามารถถ่ายทอดไปยังต้นอ่อนที่ผลิตจากไหล ทำให้ต้นอ่อนแอ และผลผลิตลดลง เช่นเดียวกับกล้วยไม้ตัดดอกที่ปลูกเลี้ยงเป็นเวลานานจะสะสมโรค ทำให้การให้ดอกลดลง คุณภาพดอกต่ำ ต้นใหม่ที่ได้จากการแบ่งหน่อจะมีเชื้อไวรัสจากต้นแม่ติดไปด้วย ดังนั้นการนำต้นแม่ไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการตัดจุดเจริญ (growing point) ขนาดเล็ก สามารถผลิตต้นพันธุ์ใหม่ที่ปราศจากโรคได้ หรือในการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมา มีข้อจำกัดในเรื่องโรคแบคทีเรียที่ติดไปกับหัว การผลิตต้นพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็

สามารถช่วยได้ รวมทั้งยังเป็นที่ยอมรับกันว่าต้นพืชในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปราศจากโรคและแมลง สามารถใช้ในการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชระหว่างประเทศได้อย่างปลอดภัย (รังสฤษฎ์, 2540)

การเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอยเพื่อประโยชน์ในการผลิตยา หรือสารสกัดจากพืช ซึ่งในต่างประเทศมีการศึกษาและใช้เทคนิคในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อเพิ่มจำนวน หรือชักนำให้แคลลัส หรือเนื้อเยื่อ หรือเซลล์แขวนลอยของพืชให้มีการสังเคราะห์สารที่ต้องการในปริมาณมากขึ้น เช่น ในการผลิตสารจากรากโสม (ginseng) เป็นต้น

สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เริ่มจากการตัดชิ้นส่วนของพืชจากธรรมชาติและทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิว (surface sterilization) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ชักนำให้เกิดการเจริญเติบโต เพิ่มปริมาณต้นพืช ชักนำให้เกิดรากเพื่อย้ายออกปลูกในสภาพธรรมชาติอีกครั้ง การเลี้ยงเนื้อเยื่อจะสำเร็จได้ ชิ้นส่วนของพืชต้องปราศจากเชื้อจุลินทรีย์และเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสมทั้งด้านองค์ประกอบของอาหารและสภาพแวดล้อมในการเลี้ยง เช่น แสง อุณหภูมิ และสภาพแวดล้อม ดังนั้นขั้นตอนทั้งหมดต้องทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) เพราะการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ (contamination) แม้เพียงเล็กน้อยจะทำให้เกิดความเสียหายกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างยิ่ง ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงต้องการความสะอาดมากเป็นพิเศษ ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงโครงสร้าง และวัสดุที่ใช้ในการก่อสร้าง จะต้องสามารถควบคุมดูแลเรื่องความสะอาดได้อย่างดี เช่น วัสดุที่ใช้ไม่เป็นวัสดุที่มีพื้นผิวหยาบหรือมีรูพรุนเก็บฝุ่นและความชื้นซึ่งเป็นแหล่งของเชื้อจุลินทรีย์ การวางผังห้องปฏิบัติการก็ต้องเหมาะสมเพื่อหลีกเลี่ยงโอกาสที่จะทำให้เกิดการปนเปื้อนของฝุ่นละอองและอากาศจากภายนอก (Street, 1977)

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักแบ่งพื้นที่ตามการใช้งาน ซึ่งสามารถปรับเปลี่ยนได้ตามความเหมาะสมของสถานที่ ทั้งนี้โดยคำนึงถึงลักษณะการทำงานและข้อจำกัดของแต่ละกิจกรรมที่จะทำงานด้วย ตัวอย่างการจัดห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่

1.1 พื้นที่ในการล้างเครื่องมือ ภาชนะหรือขวดที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ

การทำความสะอาดเครื่องมืออุปกรณ์เครื่องแก้ว ขวด และภาชนะต่างๆ ที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นสิ่งสำคัญ เครื่องแก้ว ภาชนะ ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่ล้างไม่สะอาด มีคราบอาหารเก่า หรือมีผงซักฟอกหรือน้ำยาล้างตกค้างอยู่ มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช พื้นที่ในการล้างเครื่องมือและภาชนะต่างๆ ควรประกอบด้วยอ่างล้างขนาดใหญ่ มีที่คว่ำเครื่องแก้ว และที่เก็บขวดหรือภาชนะที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างพอเพียง บริเวณการทำงานนี้ไม่จำเป็นต้องมีเครื่องปรับอากาศ ในบางห้องปฏิบัติการอาจจัดที่สำหรับวางเครื่องมือที่ต้องการการระบายความร้อน เช่น หม้อนึ่งความดัน เตา

หลอมวุ้น ตู้อบความร้อนแห้ง หรืออาจติดตั้งเครื่องกลั่นหรือกรองน้ำไว้ในพื้นที่นี้ด้วยก็ได้ (รมณีย์ และ ศาลักษณ์, 2549)

1.2 พื้นที่หรือห้องสำหรับเตรียมอาหารสังเคราะห์

มีโต๊ะปฏิบัติการใช้เตรียมสารเคมีหรืออาหารสังเคราะห์ และใช้วางเครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ เช่น pH meter เครื่องชั่ง เครื่องกวนสาร เครื่องกรองน้ำหรือกลั่นน้ำ มีตู้เก็บสารเคมีหรือเครื่องแก้ว มีตู้เย็นสำหรับเก็บสารละลายเข้มข้นของสูตรอาหาร (stock solution) หรือเก็บสารเคมีที่จำเป็นต้องเก็บในอุณหภูมิต่ำ มี microwave สำหรับหลอมอาหารปริมาณน้อย อาจแบ่งพื้นที่ส่วนหนึ่งสำหรับวางเตาที่ใช้หลอมวุ้นในการเตรียมอาหารสังเคราะห์และวางหม้อนึ่งความดันที่ใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร หรือแยกพื้นที่ออกเป็นพื้นที่เฉพาะ เนื่องจากมีการใช้ความร้อนมาก

1.3 ห้องย้ายเนื้อเยื่อ (transfer room)

ควรเป็นห้องที่เป็นเอกเทศ ไม่เป็นทางผ่านของห้องอื่น ไม่อับชื้นและสามารถควบคุมความสะอาดได้อย่างดี โดยทั่วไปจะติดเครื่องปรับอากาศและมีเครื่องกรองอากาศเพื่อลดฝุ่นละอองและเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ ภายในห้องวางตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ หรือตู้ปลอดเชื้อ (sterile laminar airflow cabinet) ซึ่งใช้ในการย้ายเนื้อเยื่อ (subculture) จากขวดอาหารหนึ่งไปยังขวดอาหารใหม่ อาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้วเก็บไว้เตรียมใช้ในห้องนี้ได้เช่นกันในห้องปฏิบัติการสำหรับงานวิจัยจะมีเครื่องมืออุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้ในงานวิจัย เช่น กล้องจุลทรรศน์ ชุดกรองอาหาร อยู่ในห้องนี้ด้วย

ตู้ปลอดเชื้อที่ใช้มีหลายแบบ ปัจจุบันนิยม Lamina air-flow cabinet เพราะราคาถูกและสะดวกในการติดตั้ง ตู้ปลอดเชื้อเป็นเครื่องมือชนิดหนึ่งที่อากาศภายนอกตู้ถูกดูดเข้าไปแล้วผ่านแผ่นกรองอากาศ ซึ่งมี 2 ชนิดคือ แผ่นกรองหยาบ (pre filter) และแผ่นกรองละเอียด (absolute filter) ซึ่งเรียกว่า HEPA filter (High Efficiency Particulate Air) แผ่นกรองทั้งสองนี้อยู่ภายในตู้ ช่วยกรองอากาศให้ปราศจากเชื้อได้ถึง 99.97 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอากาศที่ผ่านแผ่นกรองนี้จะสะอาดปราศจากเชื้อแล้วเคลื่อนออกมาอย่างต่อเนื่องโดยพัดออกไปทางด้านหน้าของตู้ การที่อากาศเคลื่อนออกมาอย่างต่อเนื่อง ทำให้อากาศภายนอกไม่สามารถเคลื่อนเข้าไปข้างในได้ ปัจจุบันในห้องปลอดเชื้อที่สร้างใหม่อาจติดตั้งแผ่นกรองเชื้อแบบ built in ติดกับห้อง อากาศที่ผ่านเข้าไปในห้องจะถูกกรองก่อน ทำให้อากาศสะอาดยิ่งขึ้น ถ้าเป็นตู้ปลอดเชื้อขนาดใหญ่สามารถทำงานได้ครั้งละ 2-3 คน ข้อควรระวังคือพื้นผิวภายในตู้ต้องสะอาดอยู่เสมอ ควรทำงานอย่างรวดเร็ว อุปกรณ์ทุกอย่างที่ต้องใช้ควรเตรียมไว้ให้พร้อมเมื่อเสร็จงานแล้วต้องเช็ดทำความสะอาดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผู้ใช้คนต่อไป ก่อนใช้ตู้ควรเปิดมอเตอร์ให้ทำงานเป็นเวลา 15 นาที เพื่อไล่ฝุ่นละอองที่เกาะอยู่ภายในออกไปก่อน แผ่นกรองหยาบของตู้ปลอดเชื่อควรได้รับการทำความสะอาดบ่อย ๆ และควรเปลี่ยนใหม่ปีละครั้ง ส่วนแผ่นกรองละเอียดอาจเปลี่ยนทุก 2-3 ปี ตามแต่ความถี่ของการใช้งาน พื้นห้องที่มีตู้ปลอดเชื้อติดตั้งอยู่ควรได้รับการทำความสะอาดทุกวัน ในตู้เหล่านี้อาจติดตั้งหลอดไฟฆ่าเชื้อ (germicidal lamp) ที่ปล่อยแสง UV ออกมาเป็นการฆ่าเชื้อที่ลอยอยู่ในอากาศและที่ผิวภายในตู้

แนวทางที่ควรปฏิบัติในห้องถ่ายเชื้อ

1. ทำให้ห้องสะอาดที่สุดเท่าที่ทำได้
2. อย่านำวัสดุติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าไปในห้อง
3. นำเครื่องแก้วหรืออาหารเพาะเลี้ยงที่สงสัยว่าอาจมีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนออกจากห้องโดยเร็ว
4. ทิ้งขยะทุกวัน
5. ทำความสะอาดเครื่องแก้วด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ก่อนใช้ทุกครั้ง
6. เปิดสวิทส์ตู้ปลอดเชื้อก่อนใช้งานเป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที

ในห้องปฏิบัติการบางแห่งอาจเปิดแสง UV ตลอดคืน เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอากาศภายในห้อง

1.4 ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture room)

ควรเป็นห้องที่เป็นเอกเทศเช่นกัน ไม่เป็นทางผ่านเข้าออกและไม่ควรมีหน้าต่างหรือช่องทางให้อากาศ หรือแมลงภายนอกเล็ดลอดเข้ามาได้ ฝ้า เพดาน ผนังและพื้นห้องควรเป็นวัสดุที่ทำความสะอาดได้ง่าย ผิวเรียบ ไม่อุ้มความชื้น และสามารถควบคุมความสะอาดได้เป็นอย่างดี ในห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่ ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาจทำเป็นห้องปลอดเชื้อ โดยอากาศจะถูกดันผ่านแผ่นกรอง HEPA เพื่อกรองฝุ่นละอองและเชื้อจุลินทรีย์ ก่อนผ่านเข้าไปในห้อง โดยทั่วไปห้องนี้จำเป็นต้องติดเครื่องปรับอากาศ เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ประมาณ 25±1 องสาเซลเซียส เนื่องจากในเวลากลางวันจำเป็นต้องให้แสงสว่างแก่ต้นพืช หลอดไฟฟ้าที่ให้แสงสว่างจะทำให้อุณหภูมิในห้องสูงขึ้นโดยเฉพาะในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิจะสูงกว่าอุณหภูมิห้อง ในบ้านเราอุณหภูมิปกติจะอยู่ที่ 30-35 องสาเซลเซียส จะทำให้อุณหภูมิในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อสูงมาก อาจทำให้เนื้อเยื่อตายได้

เครื่องมืออุปกรณ์ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบด้วย ชั้นวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารกึ่งแข็ง เครื่องเขย่า (shaker) สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลว สำหรับงานวิจัยอาจมีเครื่องมืออื่นๆ อีก เช่น ถังไนโตรเจนเหลว

ผู้ที่จะเข้าไปทำงานในห้องนี้ควรปฏิบัติเช่นเดียวกับการเข้าไปทำในห้องย้ายเนื้อเยื่อ และมีห้องเล็กๆ กักอากาศเช่นเดียวกัน หรืออาจใช้ห้องย้ายเนื้อเยื่อเป็นห้องขั้นระหว่างภายนอกกับห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไม่ควรให้ประตูห้องเปิดออกสู่ทางเดิน หรือภายนอกอาคารโดยตรง ผู้ทำงานไม่ควรเปิดเข้าออกห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อบ่อยครั้งในแต่ละวัน ควรวางแผนการทำงานให้รอบคอบ เพื่อลดการเข้าออก ซึ่งอาจพาเอาฝุ่นละอองและเชื้อจุลินทรีย์เข้าไปปนเปื้อนในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในห้องปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้โดยเฉพาะจะมีโรงผึ่งเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้น อาจเป็นโรงเรือนโล่ง มีชั้นวางขวดเนื้อเยื่อ ซึ่งไม่จำเป็นต้องมีหลอดไฟฟ้า อาศัยแสงสว่างจากธรรมชาติแทน

1.5 ห้องอื่นๆ

ในห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่ อาจจัดพื้นที่ส่วนหนึ่งเป็นที่ทำงานของนักวิจัยและเจ้าหน้าที่ที่ดูแลห้องปฏิบัติการ และแบ่งพื้นที่อีกส่วนหนึ่งสำหรับเก็บเครื่องแก้วและขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งห้องปฏิบัติการที่มีการผลิตต้นพืชจำนวนมากจำเป็นต้องมีการสำรองขวดหรือภาชนะที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวนมากไว้เพื่อหมุนเวียนใช้ในแต่ละวัน ถ้าไม่มีการวางแผนจัดการพื้นที่ไว้ก่อนอาจมีปัญหาเมื่อขยายการผลิตเพิ่มขึ้น

บริเวณสำหรับล้างเครื่องมือ

บริเวณสำหรับเตรียมอาหาร ประกอบด้วยตู้เก็บสารเคมี ตาชั่ง เครื่องวัด pH เป็นต้น

ห้องย้ายเนื้อเยื่อ

ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. <u>วิธีการทำให้ปราศจากเชื้อ</u>

นอกจากจะมีห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์ต่างๆ ที่พร้อมสมบูรณ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำเป็นต้องกระทำในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic condition) ซึ่งจัดว่ามีความสำคัญมาก ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารที่มีอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงต่าง ๆ ส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี เนื่องจากองค์ประกอบอาหารสังเคราะห์เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของทั้งพืชและจุลินทรีย์ ดังนั้นการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารอาจทำให้เกิดผลเสียต่อการเจริญเติบโตและรอดชีวิตของเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากจุลินทรีย์แย่งอาหารจากพืชและเจริญเติบโตเร็วกว่าสามารถเจริญปกคลุมพืชได้ นอกจากนี้ยังปลดปล่อยสารพิษซึ่งเป็นอันตรายต่อพืช

ด้วยเหตุผลเหล่านี้จึงจำเป็นต้องมีการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ของชิ้นส่วนพืชก่อนการเพาะเลี้ยง อีกทั้งเครื่องมือ เครื่องแก้ว และอาหารเพาะเลี้ยงต้องทำให้ปลอดเชื้อก่อนการใช้เช่นกัน และขั้นสุดท้าย เมื่อลงมือเพาะเลี้ยงต้องมั่นใจว่าอุปกรณ์เหล่านั้นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์มากกว่า 99.99 เปอร์เซ็นต์ (รมณีย์ และ ศาลักษณ์, 2549)

การรักษาสภาพแวดล้อมให้สะอาดในระหว่างทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นับว่ามีความสำคัญมาก เปรียบเหมือนกับการที่โรงพยาบาลต่าง ๆ ต้องรักษาความปลอดเชื้อในระหว่างที่ทำการผ่าตัดคนไข้นั่นเอง เพราะฉะนั้นถ้าใช้ความระมัดระวังโดยทำตามกฎเกณฑ์ต่าง ๆ จะลดการปนเปื้อน (contaminate) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียเวลาไปได้มากทีเดียว (Bonga and von Aderkas, 1992)

นอกจากเทคนิคและอุปกรณ์แล้ว อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจำเป็นต้องปลอดเชื้อเช่นกัน เพราะในอาหารเพาะเลี้ยงมีสารอาหารต่าง ๆ และน้ำตาลซึ่งช่วยในการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี จึงต้องทำให้สะอาดปลอดเชื้อก่อนนำไปใช้ โดยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้คือ

2. 1. การใช้ความร้อน

2.1.1 ความร้อนเปียก (autoclave)

อาหารเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่นิยมทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave) ซึ่งใช้ทั้งระบบความดัน และไอน้ำพร้อมกัน โดยความร้อนที่ใช้ฆ่าจุลินทรีย์นั้นต้องได้จากไอน้ำซึ่งเกิดจากการต้มน้ำให้เดือดภายใต้สภาพความดันสูงถึง 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว(1.1 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร) ไอน้ำที่เกิดขึ้นจะมีอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (250 องศาฟาเรนไฮต์) หากหม้อนึ่งไอน้ำนั้นไม่มีอากาศหลงเหลืออยู่ การใช้หม้อนึ่งไอน้ำจึงต้องมั่นใจว่าไอน้ำเข้าแทนที่อากาศดีแล้ว เพราะความดันหรืออุณหภูมินั้นฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ไม่หมด การฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำนี้จะใช้เวลาราว 15 – 20 นาที เริ่มจับเวลาเมื่อทั้งอุณหภูมิและความดันถึงจุดที่ต้องการอย่างต่อเนื่อง เมื่อครบเวลาแล้วปล่อยให้ความดันค่อย ๆ ลดลงเองจึงถึงระดับบรรยากาศปกติ ถ้ารีบร้อนไปลดความดัน อาจจะทำให้ของเหลวต่าง ๆ กระเด็นออกนอกภาชนะบรรจุได้

การฆ่าเชื้อได้ดีขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น เวลา ความดัน อุณหภูมิ และปริมาณของสิ่งของที่จะทำการฆ่าเชื้อ ประโยชน์ของหม้อนึ่งอัดไอ คือ เร็ว ง่าย และสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้

หม้อนึ่งไอน้ำจัดเป็นเครื่องมือแพง ดังนั้นอาจใช้หม้อนึ่งตุ๋นอาหารแทนก็ได้ มีข้อควรระวังเกี่ยวกับการใช้วิธีนี้คือ สารบางอย่างซึ่งสามารถอบนึ่งได้เมื่ออยู่ในสภาพสารละลายที่บริสุทธิ์นั้น อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้เมื่ออบนึ่งปนกับสารอื่น วิธีแก้ทำได้โดยการอบนึ่งแยกต่างหากแล้วค่อยนำมาเทรวมกัน บางครั้งถ้าใช้เวลานึ่งนานเกินไปจะทำให้องค์ประกอบของอาหารเสีย ดังนั้นเวลาที่ใช้อบนึ่งอาหารควรเป็นไปตามกำหนด แต่การนึ่งฆ่าเชื้อของเครื่องมือหรือเครื่องแก้วอาจใช้เวลานานกว่าที่กำหนดได้ ควรใช้กระดาษตะกั่ว กระดาษสีน้ำตาล ห่อหุ้มให้เรียบร้อย หรือใส่ในกล่องโลหะที่ปิดสนิท

ข้อแนะนำทั่วไปสำหรับเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อสิ่งของด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

1. ขวดอาหาร หรือ ขวดแก้วรูปชมพู่ (flask) ที่มีอาหาร 20 – 50 มิลลิลิตร ใช้เวลา 15 – 20 นาที 121 องศาเซลเซียส
2. ขวดอาหาร หรือ flask ที่บรรจุอาหาร 50 – 500 มิลลิลิตร ใช้เวลา 25 นาที 121 องศาเซลเซียส
3. ขวดอาหาร หรือ flask ที่บรรจุอาหาร 500 – 5000 มิลลิลิตร ใช้เวลา 35 นาที 121 องศาเซลเซียส
4. หลอดทดลอง flask และกระดาษกรอง ใช้เวลา 30 นาที 121 องศาเซลเซียส

เพื่อความปลอดภัยขณะอบนึ่งฆ่าเชื้อขวดไม่ควรซ้อนกันแน่น และไม่ควรปิดฝาขวดให้แน่นเกินไป ควรให้หลวมนิดหน่อย หลังจากอบนึ่งฆ่าเชื้อเสร็จแล้วจึงค่อยปิดฝาให้แน่น

ข้อเสียของการใช้หม้อนึ่งไอน้ำ คือ

1. ความเป็นกรด- ด่าง(pH) ของอาหารอาจเปลี่ยนแปลงได้ โดยมากจะต่ำลงประมาณ 0.3 – 0.5 หน่วย
2. ถ้าใช้อุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้น้ำตาลไหม้ ซึ่งเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง
3. ถ้าอบนึ่งนานเกินไปอาจทำให้เกลือตกตะกอน วุ้นจะเหลว
4. สารระเหยบางตัว เช่น อีเทรล (ethrel) เอทิลีน (ethylene) จะถูกทำลายเช่นเดียวกับสารอื่น ๆ เช่น โคลซิซีน (colchicines) แซ็กคาโรส (saccharose) ซีเอทิน (zeatin) กรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid หรือ GA_3) ยาปฏิชีวนะ และเอ็นไซม์ เป็นต้น

อนึ่งการใช้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อต้องคำนึงถึงว่า สปอร์ของจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียสกุล Bacillus ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี

2.1.2 ความร้อนแห้ง

ความร้อนแบบแห้งอาจเป็นความร้อนที่ได้โดยตรงจากเปลวไฟ หรืออาจเป็นความร้อนที่ได้จากตู้อบแห้ง (hot-air oven) หรือหลอดเซรามิคร้อน (ceramic heating tube) การใช้เปลวไฟเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์นั้นอาจทำโดยเผาเครื่องมือจนร้อนแล้วปล่อยให้เย็นก่อนใช้ กระทำเมื่อเครื่องมือนั้นมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่เป็นจำนวนมาก วิธีนี้จะทำให้เครื่องมือเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว อีกวิธีหนึ่ง

จุ่มเครื่องมือในสารละลายแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 – 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำเครื่องมือนั้นไปผ่านเปลวไฟ เหมาะสำหรับฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนอยู่บ้างในปริมาณน้อย แต่ไม่สามารถทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากเป็นการใช้ความร้อนในระยะเวลาอันสั้นเท่านั้น อนึ่งแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นั้นอาจเป็นแหล่งสะสมของจุลินทรีย์จึงควรใช้แอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีฤทธิ์สูงเพื่อจุ่มหรือแช่เครื่องมือก่อนเผา เครื่องมือที่เผาไฟโดยตรง เช่น การเผาปากคีบ ห่วง (loop) มีดผ่าตัด เครื่องแก้ว และอุปกรณ์เป็นโลหะ สำหรับสำลี กระดาษ หรือพลาสติกไม่ควรใช้วิธีนี้ การเผาใบมีดอาจทำให้คมมีดทื่อเร็ว โดยทั่วไปวิธีใช้ความร้อนแห้งมักใช้ตู้อบที่อุณหภูมิ 160 – 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 4 ชั่วโมง เครื่องแก้ว เช่น จานอาหารเพาะเลี้ยง ควรห่อด้วยกระดาษตะกั่วก่อนเข้าอบ และควรตรวจสอบกระดาษตะกั่วที่ใช้ดูก่อนว่ามีรูรั่วหรือไม่

2.2 การใช้แสงเหนือม่วง (Ultra violet ; UV)

การฆ่าเชื้อในอาหารโดยการใช้แสง UV ไม่เป็นที่นิยมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพราะค่าใช้จ่ายแพงมากเมื่อเทียบกับการใช้หม้อนึ่งอัดไอ การใช้แสง UV มีอำนาจทะลุทะลวงน้อย มีคุณสมบัติฆ่าเซลล์ที่มีชีวิตที่บริเวณผิวเท่านั้น ทำให้สารพันธุกรรมของจุลินทรีย์เสียหาย แสง UV เดินทางเป็นเส้นตรงและผ่านเนื้อแก้วได้น้อยหรือไม่ได้เลย ถ้าจ้องดูหรือสัมผัสกับแสง UV เป็นเวลานาน จะเป็นอันตรายกับสายตาและผิวหนัง เกิดเป็นมะเร็งได้

แสงUV เป็นแหล่งกำเนิดแก๊สโอโซน (ozone) และไนตรัสออกไซด์ (nitrous oxide) แก๊สที่เกิดขึ้นช่วยฆ่าเชื้อในอากาศและบนผิววัตถุ ทำได้โดยการเปิดแสง UV เป็นเวลาอย่างน้อยครึ่งชั่วโมงก่อนใช้ และต้องปิดหลอดก่อนปฏิบัติงานอย่างน้อย 15 นาที โดยต้องเปิดให้ลมเป่าแก๊สที่สะสมอยู่ออกด้วย เนื่องจากแก๊สทั้งสองมีอันตรายอย่างมาก อนึ่งหลอด UV บรรจุไอปรอทอยู่ภายใน เมื่อหลอดหมดอายุจึงต้องกำจัดให้ถูกวิธีเพื่อป้องกันความเป็นพิษของไอปรอท

นอกจากแสง UV แล้วรังสีแกมมาจากเครื่องปฏิกรณ์ปรมาณูก็ได้ถูกใช้ฆ่าเชื้ออุปกรณ์บางอย่างที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น ใบมีผ่าตัดซึ่งจะสูญเสียความคมเมื่อได้รับอุณหภูมิสูง และอุปกรณ์พลาสติกต่าง ๆ ซึ่งจะหลอมละลายเมื่อได้รับอุณหภูมิสูง การใช้รังสีแกมมาเพื่อฆ่าเชื้อในอาหารจะทำให้คุณสมบัติของอาหารเสียไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณสมบัติของออกซิน รังสีแกมมามีอำนาจทะลุทะลวงสูงกว่าแสง UV จึงสามารถฆ่าสปอร์ของจุลินทรีย์ซึ่ง แสง UV ไม่สามารถฆ่าได้

2.3 การกรอง

องค์ประกอบอาหารบางชนิดเป็นพวกที่ไม่ทนต่อความร้อน เช่น ซีเอติน (Zeatin) จิบเบอเรลลิน และไอเอเอ (IAA) สารเคมีบางชนิด เช่น คอลชิซิน (colchicines) และเอนไซม์ (enzyme) จึงต้องใช้วิธีทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรอง จากนั้นจึงค่อยใส่ลงไปรวมกับอาหารที่ฆ่า

เชื้อแล้วด้วยปิเปตปลอดเชื้อ และใส่ในขณะที่อาหารกำลังเย็นตัวลงมีอุณหภูมิประมาณ 40 – 45 องศาเซลเซียส

เครื่องกรองมีหลายชนิด การใช้เครื่องกรองขึ้นอยู่กับความเหมาะสม บางชนิดใช้เสร็จแล้วทิ้ง ขนาดของรูที่ยอมให้สารละลายไหลผ่าน เช่น เครื่องกรองของบริษัท Millipore มีขนาดของรูกระดาษกรอง 0.22 ไมโครเมตร หรือ 0.45 ไมโครเมตร กระดาษกรองเหล่านี้ค่อนข้างบอบบาง ฉะนั้นควรใช้ปากคีบที่ปลายไม่แหลมคมในการยึดจับ

กระดาษกรองซึ่งมีรูเล็กมากนี้ช่วยขจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี ต้องใช้แรงดันจากภายนอกเพื่อผลักให้ของเหลวผ่านแผ่นกรองได้ กระบอกฉีดยาจึงถูกใช้เพื่ออัดให้สารละลายผ่านแผ่นกรองหากมีสารละลายไม่มากนัก แต่หากต้องการกรองสารละลายปริมาณมากอาจต้องใช้เครื่องสุญญากาศ (vacuum pump) ทั้งนี้ควรกรองสารละลายด้วยกระดาษกรองแบบธรรมดาเพื่อป้องกันการอุดตันของแผ่นกรอง

2.4 การใช้สารเคมี

โดยทั่วไปมักใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนพื้นผิวบริเวณทำงานด้วยเอทานอล70 เปอร์เซ็นต์หรือไอโซโพรพานอล (isopropanol) 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของชิ้นส่วนพืชนิยมใช้โซเดียมไฮโพคลอไรต์หรือแคลเซียมไฮโพคลอไรต์ $Ca(OCl)_2$ ในรูปสารละลาย จัดเป็นสารเคมีพวกสเตอริแลนต์ (sterilance) เพื่อความสะดวกอาจใช้คลอรอกซ์ หรือ พิวเรกซซ์ (purex) ซึ่งเป็นชื่อทางการค้าที่มีโซเดียมไฮโพคลอไรต์ (sodium hypochlorite) อยู่ 6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำให้เจือจางกับน้ำ (คลอรอกซ์ 1 ส่วน : น้ำ 9 ส่วน) จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของโซเดียมไฮโพคลอไรต์เป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ในการฟอกประมาณ 10 นาที หลังจากฟอกแล้วต้องล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อหลายครั้ง เนื่องจากน้ำยาเหล่านี้มีผลกระทบต่อโลหะต่าง ๆ ภายในห้อง จึงควรทิ้งทันทีหลังจากใช้เสร็จ

นอกจากโซเดียมไฮโพคลอไรต์แล้วยังมีสเตอริแลนต์ตัวอื่นๆได้แก่ ซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNO_3$) น้ำโบรมีน (bromine water) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เมอคิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) เป็นต้น สเตอริแลนต์แต่ละชนิดมีประสิทธิภาพและคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อต่างกัน ความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ต้องพิจารณาตามความเหมาะสมและชนิดของพืช โดยพบว่าโซเดียมหรือแคลเซียมไฮโพคลอไรต์ให้ผลดีที่สุด และทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืชน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับสารตัวอื่น ๆ

การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดมี 2 ขั้นตอนคือ จุ่มเมล็ดลงในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์เขย่าเป็นเวลา 1 – 2 นาที จากนั้นจุ่มในสารละลายไฮโพคลอไรต์เป็นเวลา 20 นาที ถ้าชิ้นส่วนพืชที่ฟอกฆ่าเชื้อนั้นมีคิวติน (cutin) ซูเบอริน (suberin) หรือเซลล์ขนที่ผิว ควรใส่ wetting agent เช่น ทีโพล (teepol) ลิซซาโพลเอฟ (lissapol F) ทวีน – ทเวนตี้ (tween – 20) ลงไปในน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อด้วย 1 – 2 หยด เพื่อให้สเตอริแลนต์สัมผัสกับผิวของชิ้นส่วนพืชดียิ่งขึ้น

ห้องสมุด กรมวิชาการเกษตร

2. 5 การใช้แก๊สเพื่อฆ่าจุลินทรีย์ภายในห้องเพาะเลี้ยง

การเข้า – ออกห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการนำจุลินทรีย์เข้าไปให้ปนเปื้อนในภาชนะเพาะเลี้ยง การฆ่าเชื้อภายในห้องเป็นครั้งคราวจะทำให้โอกาสที่จะเกิดความเสียหายลดลง แก๊สฟอร์มาดีฮายด์ (formaldehyde) ซึ่งเป็นผลจากการทำปฏิกิริยาระหว่างด่างทับทิม (potassium per maganate) กับสารละลายฟอร์มาลีน (formalin) เป็นแก๊สที่นิยมกันมาก โดยการอบฆ่าเชื้อนานอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ก่อนระบายแก๊สออก แก๊สนี้มีฤทธิ์กัดทำลายเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของมนุษย์ และมีฤทธิ์กัดกร่อนทำให้เกิดสนิมได้ การใช้แก๊สนี้จึงต้องกระทำอย่างระมัดระวังโดยเฉพาะสุขภาพของผู้ปฏิบัติงาน

2. 6 การใช้ยาปฏิชีวนะ

ชิ้นส่วนบางอย่างมีจุลินทรีย์เข้าอยู่ภายในแล้ว แม้จะฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวก็ไม่ได้ผล บางคนจึงใส่ยาปฏิชีวินะ เช่น เพนนิซิลิน (penicillin) สเตรฟโตมัยซิน (streptomycin) ลงในอาหาร แต่ยาเหล่านี้อาจทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้ จึงควรหลีกเลี่ยงการใช้ยาพวกนี้ นอกจากนี้ยามีความจำเพาะต่อเชื้อโดยเลือกฆ่าเชื้อบางชนิดเท่านั้น ทำให้แบคทีเรียชนิดอื่นและราบางชนิดสามารถเจริญอยู่ได้

ข้อควรระวังอันตรายต่อสุขภาพ

1. ควรใช้พวกสารละลายไฮโพคลอไรต์ด้วยความระมัดระวัง การสูดดมเอาพวกนี้เข้าไปอาจมีผลต่อหลอดลมและเส้นเลือดได้ ถ้าสัมผัสถูกผิวหนังอาจเกิดอาการคัน ห้ามใช้ปากดูดปิเปตในการดูดสารละลายไฮโพคลอไรต์ และห้ามใช้สารนี้ภายใต้แสง UV เพราะแสง UV ทำให้คลอรีนแตกตัวระเหยออกมาเป็นอันตรายกับสุขภาพได้

2. การลนไฟเผาเครื่องมือบางอย่าง เช่นปากคีบ ไม่ควรจุ่มลงในขวดใส่แอลกอฮอล์ทันที เนื่องจากอาจติดไฟได้

3. การจ้องดูแสง UV โดยตรงเป็นอันตรายต่อสายตามาก เพราะทำให้เกิดอาการ actinic keratitis คือ อาการคล้ายขนัยน์ตาถูกเผาไหม้ และทำให้ผิวหนังคันได้ อีกสาเหตุหนึ่งที่เกิดจาก UV ก็คือ โอโซน (O_3) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาเคมีระหว่างสารเคมีบางตัวกับแสง UV โอโซนจัดเป็นแก๊สพิษซึ่งเป็นออกซิไดซิ่งเอเจนต์ (oxidizing agent) ที่แรงมาก ถ้าความเข้มข้นของโอโซนสูง จะทำให้ระบบการหายใจและตาเกิดการระคายเคืองได้

4. การอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแก๊สนั้นต้องใช้ความระมัดระวังอย่างยิ่ง

5. ไลซอล (Lysol) ที่ความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สามารถฆ่าเชื้อได้ แต่จะไม่มีผลกับสปอร์ของรา ไลซอลเป็นสารที่ได้จากครีซอล (cresol) กับฟีนอล (phenol) หลังจากใช้ไลซอลแล้วมักมีแผ่นฟิล์มน้ำมันหลงเหลืออยู่บนพื้นผิว ถ้าไปสัมผัสถูกผิวหนังจะเผาไหม้ได้ ถ้ามีไลซอลเข้าไปในการอบนึ่งฆ่าเชื้ออาหาร ไลซอลจะทำปฏิกิริยากับสารเคมีในอาหารและตัวหม้อนึ่งเองได้ ไม่ควรใช้ไลซอลในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

b31.536
ช16อ
2550
17364

6. ก่อนลงมือทำงานทุกครั้ง ควรล้างมือและแขนให้สะอาดด้วยสบู่ แล้วล้างน้ำหลาย ๆ ครั้ง ผ้าที่เช็ดมือก็ควรแน่ใจว่าสะอาด อาจใช้เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ฉีดพ่นมือและแขนด้วย

7. เมอคิวริกคลอไรด์ จัดว่าเป็นสเตอริแลนต์ตัวหนึ่ง ทั้งที่เป็นยาพิษร้ายแรง สารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ระเหยเป็นไอได้ที่อุณหภูมิห้อง จึงเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

ข้อควรปฏิบัติสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. ผู้ปฏิบัติงานควรตัดเล็บสั้นอยู่เสมอ และไม่สวมเครื่องประดับใด ๆ ต่ำกว่าข้อศอก ต้องล้างมือและแขนด้วยน้ำและสบู่จนถึงข้อศอกทุกครั้งแล้วจึงใช้เอทานอล 40 – 70 เปอร์เซ็นต์ เช็ดทำความสะอาดอีกครั้ง สำหรับเอทานอลนั้นอาจใช้สเปรย์ฉีดพ่นหรือชุบเช็ดก็ได้หากจำเป็นต้องใช้มือหยิบจับเนื้อเยื่อพืชภายในสภาพปลอดเชื้อแล้ว ควรต้องมีขวดเอทานอลในตู้ย้ายเนื้อเยื่อด้วยเพื่อใช้ชโลมมือบ่อย ๆ อนึ่งผู้ปฏิบัติงานควรให้มืออยู่ด้านใต้ลมจากภาชนะเพาะเลี้ยงหรือสิ่งต่างๆ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเนื่องจากความสะอาดของมือนั้นมีจำกัดสปอร์ของจุลินทรีย์อาจซ่อนอยู่ตามนิ้วมือ หรือซอกเล็บได้

ห้องปฏิบัติการซึ่งมีผู้ปฏิบัติงานจำนวนมากอาจลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนจากเชื้อที่อาจติดมากับผู้ปฏิบัติงานได้ โดยให้ผู้ปฏิบัติงานเปลี่ยนรองเท้า สวมหมวกคลุมผมและชุดทำงานที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และสวมถุงมือ

2. ห้องย้ายเนื้อเยื่อควรได้รับการทำความสะอาดอยู่เสมอ โดยถูพื้นด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น คลอร์รอก (Clorox) และเดทตอล (Dettol) อาทิตย์ละครั้ง และอาจอบแห้งด้วยแก๊สฟอร์มาดีไฮด์ทุก ๆ 6 – 8 สัปดาห์สำหรับบริเวณย้ายเนื้อเยื่อซึ่งอาจเป็นตู้ปลอดเชื้อหรือห้องปลอดเชื้อนั้นต้องฆ่าเชื้อด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 – 80 เปอร์เซ็นต์ ควบคู่กับการใช้แสง UV บางกรณีอาจใช้แสง UV ช่วยฆ่าเชื้อที่ติดบนผิวแผ่นกรองด้วยที่อากาศถูกอัดผ่านด้วย การทำความสะอาดแผ่น Pre – filter อย่างสม่ำเสมอจะช่วยให้ประสิทธิภาพการขจัดเชื้อของแผ่นกรอง(HEPA) คงที่

การอบตู้ปลอดเชื้อด้วยเอทานอลจากการฉีดพ่นนั้นนิยมใช้กับตู้ซึ่งมีแผ่นกรองขนาดเล็ก โดยอบตู้พร้อมกับการใช้แสง UV หลังจากอบตู้แล้วต้องเปิดตู้ให้ลมเป่าเอทานอลออกให้หมดก่อนราว 15 – 20 นาที จึงเริ่มปฏิบัติงานได้ เพื่อป้องกันการระเบิดเมื่อจุดไฟในเอทานอลหรือในบรรยากาศของโอโซน

นอกจากนี้สิ่งของทุกชนิดที่จะนำเข้าสู่บริเวณปลอดเชื้อ ต้องได้รับการฉีดพ่นหรือเช็ดด้วยเอทานอลก่อนทุกครั้ง

2 แนวทางการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ก้าวหน้าไปอย่างมากในปัจจุบัน และมีบทบาทสำคัญต่อวิทยาการแขนงอื่นๆ เช่น ชีวเคมี พันธุศาสตร์ พฤกษศาสตร์ เภสัชศาสตร์ และอุตสาหกรรม สำหรับด้านการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์พืช สามารถนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ดังนี้

1. เพื่อรักษาแหล่งพันธุกรรม (Genetic conservation)

การเก็บรวบรวมเชื้อพันธุ์ที่มีคุณค่า นำมาขยายพันธุ์ ศึกษา วิเคราะห์ ประเมินผลและนำมาเก็บรักษาไว้เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์พืช เนื่องจากเชื้อพันธุ์ที่ดีได้สูญหายไปแล้วก็ไม่อาจหามาทดแทนได้อีก จะเห็นได้จากการที่พืชพันธุ์ป่า และพันธุ์คัดเลือกไว้ในสมัยก่อนถูกละเลยและสูญหายไปเป็นจำนวนมาก การเก็บรักษาพันธุ์ไว้เป็นเวลานานจะเป็นปัญหามาก เนื่องจากต้องใช้เนื้อที่ แรงงาน และทุนทรัพย์ค่อนข้างสูง จึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืช ทำให้สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ไว้ได้เป็นจำนวนมาก โดยเก็บในสภาพที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญ หรือแคลลัส หรือในสภาพที่เป็นต้นอ่อน (embryo) ในอาหารที่ใช้เลี้ยงที่มีการเติมสารยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibitor) เพื่อลดอัตราการเจริญเติบโต หรือเก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (cryopreservation) วิธีการดังกล่าวนี้ได้มีการนำไปใช้ในการเก็บรักษาพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ อ้อย และกล้วย เป็นต้น (รังสฤษดิ์, 2540)

2. การกำจัดโรคที่ติดมากับเชื้อพันธุ์และการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์ระหว่างประเทศ (Elimination of disease and international exchange of germplasm)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะทำให้ได้พืชที่ปลอดจากโรคและแมลง เนื่องจากต้องมีการฆ่าเชื้อที่ติดมากับชิ้นส่วนพืชก่อนนำมาทำการเพาะเลี้ยง ด้วยการฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้สารเคมี หรือใช้ความร้อนช่วย หรือการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของพืชที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ซึ่งสิ่งเหล่านี้สามารถช่วยในการกำจัดเชื้อโรคที่ติดมากับชิ้นส่วนของพืช ทำให้สามารถส่งพืชข้ามประเทศได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนระหว่างประเทศด้วยเนื้อเยื่อต้นพืช เช่น มันฝรั่ง อ้อย เป็นต้น (รมณีย์ และศาลักษณ์, 2549)

3. ช่วยในการขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมาก (Large scale propagation)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชที่โดยปกติไม่สามารถขยายพันธุ์ด้วยวิธีปักชำ ทาบกิ่ง หรือติดตา รวมถึงพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดแล้วมีความแปรปรวน (variation) มาก เช่นปาล์มน้ำมัน ทำให้ได้ลักษณะที่ไม่ตรงตามพันธุ์ เนื่องจากเกิดการผสมข้ามตามธรรมชาติได้ การนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนพืชได้อย่างรวดเร็ว การ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีส่วนสำคัญอย่างยิ่งในการทำให้เกิดอุตสาหกรรมการผลิตพันธุ์พืชหลายชนิด เช่น มัน ฝรั่ง กล้วยไม้ เป็นต้น (Pierik, 1987)

4. การเชื่อมโปรโตพลาสเข้าด้วยกันเพื่อใช้ในการผสมระหว่างพืชต่างชนิดและต่างสกุล

(Protoplast fusion for inter-specific and inter-generic crosses)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาส (protoplast) และเชื่อมโปรโตพลาสเข้าด้วยกัน สามารถแก้ปัญหาพืชที่ไม่สามารถผสมกันได้ในธรรมชาติ ซึ่งอาจเนื่องจากความแตกต่างระหว่างสารเคมีภายในเกสรตัวเมีย ทำให้ละอองเกสรไม่สามารถงอกลงไปถึงรังไข่ได้ หรืออาจเกิดจากความแตกต่างของลักษณะทางกายวิภาคที่เป็นอุปสรรคต่อการผสมระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ การเชื่อมโปรโตพลาสเข้าด้วยกันทำได้โดยการใช้เอ็นไซม์ช่วยย่อยสลายผนังเซลล์(cell wall) ออกเหลือแต่โปรโตพลาสแล้วใช้สาร PEG เติมลงไปในอาหารเหลวเพื่อป้องกันโปรโตพลาสแตก จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้นให้โปรโตพลาสของเซลล์ต่างชนิดกันเชื่อมกันได้ และบังคับให้เซลล์ลูกผสมเกิดเป็นต้นพืชที่มีโครโมโซมจากพ่อและแม่มาอยู่ด้วยกัน โดยไม่ต้องผสมเกสรหรือโดยอาศัยเพศ สามารถสร้างพืชชนิดใหม่ขึ้นมาได้โดยไม่เคยมีมาก่อนในธรรมชาติ วิธีนี้สามารถทำการผสมข้ามชนิด ข้ามพันธุ์ หรือสกุลได้ เช่น การผสมระหว่างทานตะวันกับถั่ว หรือระหว่างมะเขือเทศกับมันฝรั่ง เป็นต้น (Wenzel, 1998)

5. การสร้างพืชโครโมโซมชุดเดียว (Haploid production)

การเพาะเลี้ยงละอองเกสร (pollen) ไมโครสปอร์ (microspore) การเพาะเลี้ยงรังไข่หรือไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมของพืช ช่วยให้ได้พืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว (n) เมื่อนำมาเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้เป็น 2 ชุด (2n) แล้วก็จะได้พันธุ์แท้ (homozygous) ทันที เนื่องจากโครโมโซมทั้งสองจำลองมาจากชุดเดียวกัน โดยปกติการได้พันธุ์แท้เช่นนี้ต้องอาศัยการผสมตัวเองเป็นเวลา 6-7 ครั้ง ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงละอองเกสรและไมโครสปอร์ ทำให้ได้พันธุ์ออกมาเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศจีน ได้ใช้เทคนิคดังกล่าวผลิตพันธุ์พืชใหม่จากพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวสาลี ยางพารา แอบเปิ้ล เป็นต้น (Street and Henshaw, 1988) บริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ของสหรัฐอเมริกาได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์ของข้าวโพดมาใช้ในการสร้างสายพันธุ์แท้ของข้าวโพดขึ้นมา เพื่อใช้ในการผลิตลูกผสม นอกจากนี้ยังใช้เป็นเทคนิคพื้นฐานสำหรับการสร้างพันธุ์พืชชนิดใหม่โดยวิธีพันธุวิศวกรรม (Wenzel, 1998)

6. การสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Production of transgenic plant)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ แคลลัส และโปรโตพลาส เป็นเทคนิคที่มีส่วนช่วยอย่างมากในการสร้างพืชพันธุ์ใหม่โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม (genetic emgineering) พืชพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากวิธีการทางพันธุวิศวกรรมมีชื่อเรียกว่า transgenic plant หรือ transformed plant พันธุวิศวกรรม หมายถึง กระบวนการเปลี่ยนแปลงด้านสารพันธุกรรมเพื่อให้ได้สิ่งมีชีวิตใหม่ ซึ่งมีคุณสมบัติตามที่

ประสงค์โดยการนำยีนที่ต้องการจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งไปสู่สิ่งมีชีวิตหนึ่ง โดยไม่จำกัดว่าต้องเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทเดียวกัน เมื่อยีนเข้าสู่สิ่งมีชีวิตใหม่แล้วยีนยังคงแสดงลักษณะที่ควบคุมอยู่

วิธีการทางพันธุวิศวกรรม ประกอบด้วย การแยกยีนหรือสร้างยีนที่ต้องการขึ้นมาก่อน จากนั้นจึงนำยีนที่ต้องการตัดต่อเข้ากับ DNA ของพาหะ (vector) พาหะสำหรับใช้ในพันธุวิศวกรรมของพืชจัดเป็นพวกไวรัส หรือ Ti-plasmid ของแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ในการใช้ Ti-plasmid อาศัยคุณสมบัติที่แบคทีเรียชนิดนี้เมื่อเข้าทำลายกับเซลล์พืช แบคทีเรียจะปลดปล่อย T-DNA (ส่วนหนึ่งของ Ti-plasmid) เข้าไปรวมกับโครโมโซมของพืชอย่างถาวร ทำให้เซลล์พืชสร้าง phytohormones และพัฒนาเป็นก้อนเนื้องอก (tumor) ขึ้นมา การนำเอา Ti-plasmid มาใช้ต้องกำจัดยีนที่สร้าง phytohormones ออก หรือตัดยีนที่สร้างเนื้องอกออกนั่นเอง เรียกว่า disarm จากนั้นจึงนำเอา Ti-plasmid มาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในการนำยีนที่ต้องการเข้าสู่พืช นอกจากจะใช้ Ti-plasmid หรือไวรัสเป็นพาหะแล้วยังใช้วิธีการอื่นๆ เช่น

- ใช้ไมโครไปเปตนำยีนเข้าไปยังนิวเคลียสโดยตรง (microinjection)
- ใช้กระแสไฟฟ้าในระยะเวลาสั้นกระตุ้นให้เซลล์รับเอา DNA หรือยีนเข้าไปในตัวเองได้ (eletroporation)
- ยิงยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยใช้ gene gun (microprojectile หรือ biolistic) วิธีการประกอบด้วยการนำเอาพลาสมิดที่สอดใส่ยีนที่ต้องการ รวมทั้งโปรโมเตอร์ (promoter) สำหรับควบคุมการทำงานของยีนไว้เรียบร้อยแล้ว นำมาหุ้มอนุภาคทังสเตนหรือทอง แล้วยิงเข้าไปในเซลล์เพาะเลี้ยงหรืออาจเป็นเนื้อเยื่อของพืชโดยตรง พลาสมิดที่มียีนที่ต้องการจะเข้าไปรวมกับโครโมโซมของพืช สามารถทำงานโดยการสร้างเอ็นไซม์ หรือแสดงลักษณะต่างๆ ออกมาได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของยีนที่ใส่เข้าไป

7. การได้ลักษณะที่เป็นประโยชน์จากการแปรผันทางพันธุกรรมเนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ (Somaclonal variation)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลี้ยงแคลลัส ก่อให้เกิดลักษณะที่แตกต่างไปจากเดิม ความแปรปรวนที่เกิดในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง หรือในพืชที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง เรียกว่า somaclonal variation ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genetic) หรือไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (epigenetic) ก็ได้ พวกที่ไม่เกี่ยวข้องกับทางพันธุกรรม คือ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนั้นไม่ถาวรเป็นการแปรผันที่เกิดจากการปรับตัวของเซลล์ (adaptation) หรือการดัดแปลงขององค์ประกอบของเซลล์ที่ไม่ใช่ DNA (Wenzel, 1998)

ความแปรปรวนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้อาจเป็นการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางคุณภาพ (qualitative) และปริมาณ (quantitative) การเปลี่ยนแปลงนั้นเกิดขึ้นได้ในเซลล์ใดเซลล์หนึ่ง หรือในต้นพืชต้นใดต้นหนึ่ง หรืออาจกับพืชหลายต้นพร้อมกันได้

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมอาจเป็นความแตกต่างของลักษณะทางสรีรวิทยา อาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของโครโมโซม หรือเป็นการเปลี่ยนแปลงในองค์ประกอบของ DNA เป็นการเปลี่ยนแปลงของยีน หรืออาจเป็นการเปลี่ยนแปลงของไซโตพลาสซึ่ม (cytoplasmic change)

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีส่วนในการทำให้เกิด somaclonal variation

การเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง ขึ้นอยู่กับวิธีการเพาะเลี้ยง และระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายและการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน (zygotic embryo) เพื่อให้เกิดเป็นส่วนของต้นพืช โดยไม่ผ่านสภาพเป็นแคลลัสมาก่อน โอกาสเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมมีน้อย ถ้าเพาะเลี้ยงโดยผ่านแคลลัสหรือผ่านสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอย หรือการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ทำให้ได้ต้นพืชมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง ถ้าเวลาที่ใช้เลี้ยงตั้งแต่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยงจนถึงระยะเวลาที่ได้ต้นพืชนาน โอกาสเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง (Wenzel, 1998)

ความแปรปรวนที่เกิดในการเพาะเลี้ยงมี 3 แหล่ง คือ

1. ความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดอยู่แล้วในเนื้อเยื่อที่ใช้เพาะเลี้ยง
2. ความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง มีคุณสมบัติเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen)
3. ความแปรปรวนเกิดจากการตอบสนองของจีโนมพืชต่อความเครียด (stress) ต่างๆในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ลักษณะดีที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไม่มีข้อยืนยันว่าได้เปรียบหรือเสียเปรียบกว่าวิธีการใช้รังสีหรือสารเคมีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพราะทั้งสองวิธีการ คือ somaclonal variation และการชักนำให้กลายพันธุ์ (induced mutation) เป็นลักษณะที่เกิดอย่างอิสระ ไม่สามารถบังคับให้ได้ลักษณะที่ต้องการโดยเฉพาะเจาะจงได้ (สิรนุช, 2540)

8. การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อช่วยในการคัดเลือก

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอย หรือในสภาพที่เป็นแคลลัส เซลล์ทุกเซลล์มีโอกาสพัฒนาเป็นต้นพืชได้ (totipotent) หากนำเซลล์เหล่านี้มาเลี้ยงในอาหารที่ใส่สารที่ช่วยในการคัดเลือก (selective agent) เพื่อให้ได้ลักษณะโดยเฉพาะ โดยสารดังกล่าวอาจเป็นสารพิษ (toxin) สารป้องกันกำจัดวัชพืช กรด หรือเกลือ หรืออาจเป็นสภาพที่ไม่เหมาะสมต่างๆ เช่น อุณหภูมิต่ำ สภาพการขาดน้ำ เป็นต้น เซลล์ที่มีชีวิตการรอด คือ เซลล์ที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมหรือเรียกว่า variant cell เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงให้เป็นต้นพืช หากลักษณะความทนทานต่อสารที่ช่วยในการคัดเลือกยังคงอยู่ จะได้พืชใหม่ที่เป็นประโยชน์มา เช่น พืชทนความเค็ม ทนต่อโรค หรือทนต่อสารป้องกันกำจัดพืช

หากใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่เป็น haploid (n) เช่น จากการเพาะเลี้ยงละอองเกสรหรือไมโครสปอร์ในสภาพที่เป็นแคลลัส และหรือเซลล์แขวนลอย ทำให้เซลล์อยู่ในสภาพที่เป็น haploid เมื่อนำมาใช้ในการคัดเลือกลักษณะเฉพาะ โดยใส่สารช่วยการคัดเลือกลงไป ดังนั้น ยีนเด่น (dominant gene) และยีนด้อย (recessive gene) มีโอกาสแสดงลักษณะออกมาได้เท่ากัน ทำให้สามารถแยกลักษณะออกมาได้ง่าย เมื่อนำมาเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น 2n จะได้พันธุ์แท้ (homozygous, AA หรือ aa) ทันที (Bonga and von Aderkas, 1992)

9.การช่วยชีวิตคัพภะลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างชนิดและสกุล

(Embryo rescue for interspecific or intergeneric crosses)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถช่วยนักปรับปรุงพันธุ์พืชได้มากขึ้น คือ การเลี้ยงคัพภะอ่อน (embryo) ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างพืชต่างชนิดหรือต่างสกุลให้มีชีวิตรอดเจริญพัฒนาเป็นคัพภะที่สมบูรณ์ และสามารถนำออกปลูกเป็นต้นพืชและให้ลูกผสมได้ ซึ่งโดยปกติลูกผสมดังกล่าวนี้ หากทิ้งไว้ในรังไข่ของต้นแม่ คัพภะไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ ทำให้ตายในระยะเวลาต่อมา (Street, 1977)

กรมวิชาการเกษตร

3 การขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Micropropagation)

การขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นศาสตร์และศิลป์ของการเพิ่มปริมาณพืชในสภาพปลอดเชื้อ พืชหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งไม้ผลยืนต้นและไม้ดอกไม้ประดับ ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ลูกผสม มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ไม่คงตัว (heterozygous) ดังนั้นการขยายพันธุ์โดยอาศัยเพศด้วยเมล็ดจึงไม่อาจคงลักษณะทางพันธุกรรมเดิมที่ดีไว้ได้ ในทางตรงข้ามการขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เพศช่วยให้สามารถคงลักษณะพันธุกรรมเดิม (genetically identical) ไว้ได้ การเพิ่มจำนวนพืชโดยคงลักษณะเดิมต่อไปได้นี้เรียกทั่วไป ๆ ว่า clonal propagation และในกรณีที่ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์พืชนิยมเรียกว่า Micropropagation ต้นพืชที่ได้จากการขยายพันธุ์จากต้นแม่เพียงต้นเดียวนี้เรียกว่าโคลน (clone)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อเพิ่มปริมาณส่วนขยายพันธุ์พืชในเวลาสั้น พืชที่จะนำมาขยายพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณต้องมีลักษณะเด่นและมีคุณค่าคุ้มกับการลงทุนทางเศรษฐกิจ คุณลักษณะเด่นหรือดีดังกล่าว ได้แก่ การให้ผลผลิตสูง คุณภาพเป็นที่ต้องการของตลาด ต้านทานศัตรูพืช ทนทานต่อสภาพแวดล้อม สามารถปลูกได้ในหลายท้องถิ่นโดยยังคงให้ผลผลิตและคุณภาพผลผลิตคงที่ ตลอดจนนำมาทำผลิตภัณฑ์ที่ให้คุณภาพสูง

การขยายพันธุ์พืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับการขยายพันธุ์โดยวิธีปกติ (conventional propagation) ดังนี้

1. มีความรวดเร็วในการเพิ่มปริมาณ ได้ส่วนขยายพันธุ์มาก (large-scale)
2. ใช้เวลาเพิ่มปริมาณน้อยกว่า
3. ใช้ปริมาณส่วนขยายพันธุ์ตั้งต้นน้อย โดยเฉพาะในกรณีที่สายพันธุ์เหล่านั้นอยู่ในระยะแรกของโครงการปรับปรุงพันธุ์ เช่น มีจำนวนเมล็ดน้อย และมีจำนวนกิ่งพันธุ์น้อย เป็นต้น
4. ใช้ในโครงการผลิตส่วนขยายพันธุ์พืชปลอดโรค (pathogen-free propagule) เช่น ต้นพันธุ์ปลอดแบคทีเรีย ไวรัส หรือเชื้อรา
5. สะดวกในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์หรือเชื้อพันธุกรรมพืชในโครงการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุกรรมพืชระหว่างประเทศ

ความก้าวหน้าของการขยายพันธ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เริ่มมาจากงานทางด้านการขยายพันธุ์และเพาะเลี้ยงกล้วยไม้โดย G. Morel ในปี ค.ศ. 1972 (อ้างโดย รังสฤษฎ์, 2540) เนื่องจากกล้วยไม้ที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันเป็นลูกผสม บางชนิดเกิดจากการรวมจีโนมของพืชถึง 3-4 สกุล (genus) เช่น กล้วยไม้พวก *Sophrolaeliocatteya* sp. ซึ่งเป็นลูกผสมสามสายพันธุ์ (triple hybrids) ของ *Sophronitis* sp., *Lealia* sp. และ *Catteya* sp.การขยายพันธุ์โดยปกติทำได้วิธีเดียว คือใช้เทคนิค bask-bulb propagation โดยแยกเอาส่วนของ pseudobulbil ที่แก่ที่สุดออกจากซ่อดอกเพื่อกระตุ้นให้ตาข้างที่

พักตัวพัฒนาเป็นต้นอ่อน ซึ่งต้องใช้เวลานานหลายปีทั้งยังใช้ได้เฉพาะในกล้วยไม้ที่มีลักษณะเป็น sympodial ไม่ใช่เป็น monopodial branching (ซึ่งจะไม่มีตาข้าง) ในทางปฏิบัตินิยมขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดซึ่งมีอัตราการไม่คงตัวทางพันธุกรรมสูง จึงมักได้ต้นที่ไม่ต้องการจำนวนมาก ทั้งยังใช้เวลานาน 3-5 ปี จึงออกดอกได้ (Street ,1977)

เทคนิคทั่วๆ ไปในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์

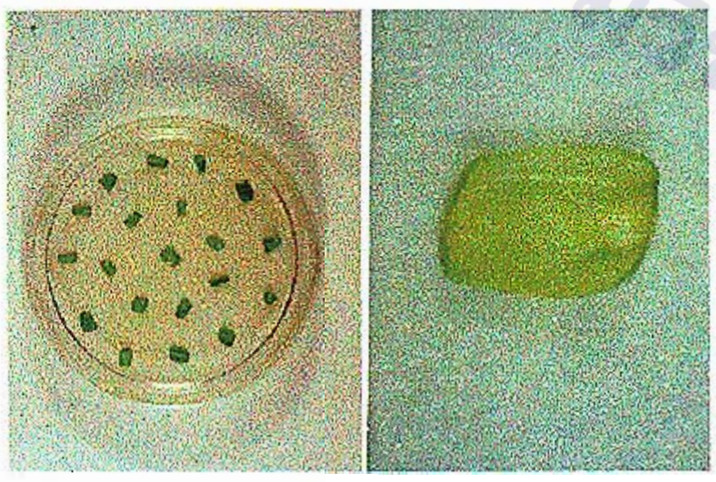
โดยทั่วไปประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 4 ขั้นตอน (Bonga and von Aderkas, 1992) คือ

1. เทคนิคปลอดเชื้อเพื่อแยกส่วนปลายยอดมาเลี้ยง (excised shoot tips)
2. การชักนำให้เพิ่มจำนวนหน่อมากขึ้น(shoot multiplication/proliferation)
3. การชักนำให้เกิดราก(root induction)
4. การย้ายต้นที่ชักนำได้ (transplant of plantlets)

และมีข้อควรพิจารณาที่สำคัญ ดังนี้

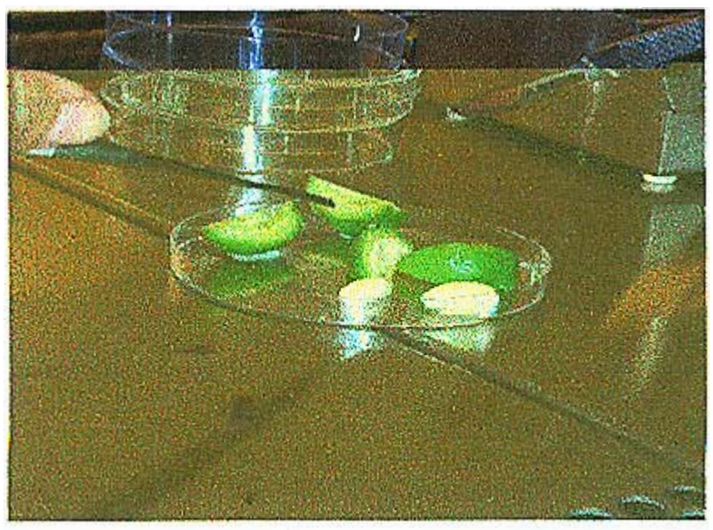
การเริ่มต้นเพาะเลี้ยง (initiation of culture) จำเป็นต้องให้ความสำคัญอย่างมากต่อ

1. **ชิ้นส่วนของพืช (explants)** ควรเลือกใช้ชิ้นส่วนที่ปลอดโรค เช่นจากตากิ่ง (vegatative buds) ในกรณีต้นพืชผ่านการทดสอบเชื้อไวรัสแล้ว ควรใช้เฉพาะจากส่วนของ nodal cutting เพื่อให้มั่นใจว่าปราศจากเชื้อไวรัสจริง หากใช้ส่วนปลายยอดที่มีขนาดเล็กเกินไป แม้ปราศจากเชื้อไวรัสแต่มักมีอัตราการอยู่รอดต่ำและมีการเจริญเติบโตในระยะเริ่มแรกช้า (Caplin, 1983) นอกจากนี้ยังมีส่วนอื่นที่สามารถนำมาใช้เพาะเลี้ยงได้เช่น ใบ ช่อดอก เมล็ดอ่อน หน่ออ่อนเป็นต้น

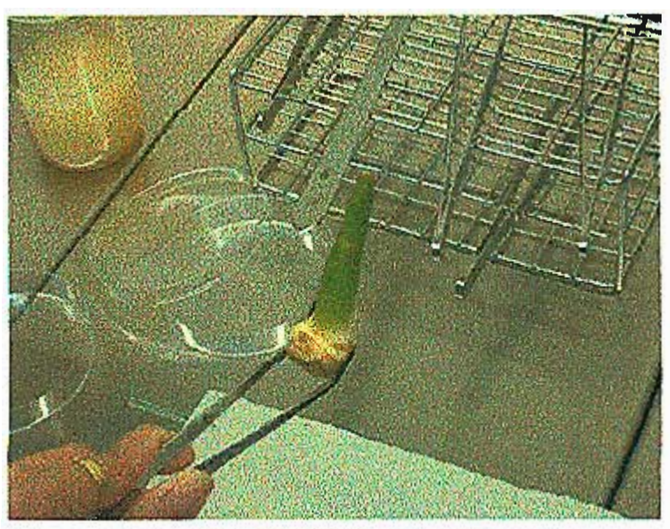


ใบ

ช่อดอก



เมล็ดอ่อน



หน่ออ่อน

ระยะการพัฒนาทางสรีรวิทยาของพืช อาจมีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ชิ้นส่วนพืชที่ได้มาจากต้นพืชที่ปลูกในช่วงต้นฤดูปลูกจะให้ผลดีที่สุด ขณะเดียวกันสภาพแวดล้อมก็มีผลเช่นเดียวกัน ชิ้นส่วนอย่างพืชบางอย่างต้องการอุณหภูมิสูงหรือต่ำ และ/หรือ ช่วงแสง เพื่อแก้ปัญหาการพักตัว

2. การฟอกกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน (surface sterillzation) ควรเลือกปฏิบัติตามความเหมาะสมตามขั้นตอนทั่วๆไป

3. การเกิดสีน้ำตาลคล้ำของอาหารที่ใช้ (browning of the medium) จัดเป็นปัญหาที่รุนแรงอย่างยิ่งในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบางชนิด เกิดจากการออกซิเดชั่นของสารประกอบพวก phenolic compounds ที่ปลดปล่อยออกมาจากบาดแผลของเนื้อเยื่อที่ถูกตัด ทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและเป็นพิษ พบมากในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ ปาล์มน้ำมันและไม้เนื้อแข็ง การแก้ไขอาจทำได้โดยเปลี่ยนอาหารให้บ่อยครั้ง หรือวางชิ้นส่วนเนื้อเยื่อไม่ให้แผลสัมผัสกับอาหารโดยตรงหรือใช้อาหารเหลวซึ่งจะช่วยขจัดผลของสาร phenolic และสารยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibitors) อื่นๆได้ หากยังไม่ได้ผลอาจใช้สารยับยั้งการออกซิเดชั่น (antioxidants) เช่น cysteine-HCl ความเข้มข้น 100 มก./ล. หรือ ascorbic acid ความเข้มข้น 50-100 มก./ล. หรือ citric acid ความเข้มข้น 150 มก./ล. หรือ polyvinyl-pyrrolidone (PVP) ซึ่งจะช่วยดูดซับสาร phenolic และลดการออกซิเดชั่น ในบางกรณีการเก็บในที่มืดอาจช่วยได้เนื่องจากแสงเป็นปัจจัยหนึ่งที่กระตุ้นกระบวนการออกซิเดชั่น (Pierik, 1987)

4. การชักนำให้เพิ่มจำนวนยอด (shoot multiplication หรือ proliferation) จัดเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด เนื่องจากการขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะประสบความสำเร็จ ขึ้นกับการขยายให้ได้จำนวนยอดที่มากพอและมีประสิทธิภาพ อาจทำได้หลายวิธี (Street and Henshaw, 1988) คือ

4.1 โดยผ่านกระบวนการชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction) เซลล์พืชมีศักยภาพในการเกิดเป็นต้นใหม่ จึงเอื้ออำนวยอย่างยิ่งต่อการขยายจำนวนยอดโดยการชักนำให้เกิดกลุ่มเซลล์หรือแคลลัสเสียก่อน เซลล์ที่ได้จะนำมาผ่านกระบวนการสร้างยอดและราก (shoot-root formation; organogenesis) หรือโดยกระบวนการกำเนิดคัพภะ (somatic embryogenesis) ทำให้ได้ต้น (plantlets) จำนวนมาก อย่างไรก็ตามมีข้อควรระวังและหลีกเลี่ยงวิธีการนี้ เนื่องจากเสี่ยงต่อการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเซลล์ เช่นในหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*) พบการเกิดโพลีพลอยด์ (polyploids) และอะนิวพลอยด์ (aneuploids) ในอัตราที่สูงพอสมควร ข้อเสียอีกประการหนึ่งคือ ไม่สามารถใช้กับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เนื่องจากความสามารถในการเกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์จะลดลงถ้าเลี้ยงไว้นานขึ้น ในปัจจุบันที่ได้ผลสำเร็จมีเพียงในส้ม (*Citrus* sp.), กาแฟ, และพืชจำพวกปาล์มเท่านั้น (รังสฤษฎ์, 2540)

4.2 โดยการสร้างตาพิเศษ (adventitious buds formation) สามารถชักนำให้เกิดตาจากส่วนอื่น ๆ ที่นอกเหนือจากตาข้าง ตาใบ หรือตายอด ในที่นี้จะหมายถึงตาที่เกิดโดยตรงจากอวัยวะ

หรือชิ้นส่วนของพืชที่ไม่ผ่านการเกิดเป็นแคลลัสมาก่อน พืชหลายชนิดสร้างตาพิเศษในสภาพธรรมชาติ (*in vivo*) จากอวัยวะต่างๆ ได้เช่น แอปเปิล, *Rubus* sp., blackberry และ raspberry สร้างจากราก และ *Begonia* sp., *Pelargonium* sp., *Peperomia* sp., *Saintpaulia* sp. และ *Streptocarpus* sp. สร้างจากใบ

นอกจากนี้ยังมีพืชกว่า 300 ชนิดซึ่งใบสามารถสร้างตาพิเศษได้ ในจำนวนนี้มีหลายชนิดที่นำมาขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ ใน *Begonia* sp. ตาชนิดนี้เกิดได้จากแผลในอาหารเพาะเลี้ยงที่ได้รับไซโตไคนิน, BAP และสารกระตุ้นการเจริญเติบโตในสัดส่วนที่เหมาะสม โดยทั่วๆ ไปแล้วตาพิเศษนี้จะชักนำให้เกิดขึ้นจากใบและลำต้นที่ถูกตัด ทั้ง ๆ ที่พืชนั้นปกติไม่สามารถขยายพันธุ์ทางด้านลำต้นได้ก็ตาม เช่น *Brassica* sp., *Chrysanthemum cinerariaefolium*, *Linum usitatissimum* และ *Lycopersicon esculenta*

ปกติแล้วการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ตาพิเศษ จะดีกว่าการใช้แคลลัสในแง่ลดความเสี่ยงจากการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตามยังมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิด chimeras (ส่วนของลำต้นหรือเซลล์พืชที่มีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน) ในพืชที่เป็นสายพันธุ์แท้ ตัวอย่างในการเลี้ยงปลายยอดของเจอราเนียม ในพืชบางชนิดอาจถูกชักนำให้เกิด clones ที่แตกต่างจากพ่อแม่ในลักษณะการเจริญเติบโต การติดผล และการสร้างรงควัตถุในผล โดยเฉพาะในแอปเปิ้ล ซึ่งมีลักษณะ chimeras ที่ซับซ้อนอยู่แล้วในสภาพธรรมชาติ (Street, 1977)

4.3 โดยการกระตุ้นให้เกิดกิ่งข้าง (axillary branching formation) ตาข้างซึ่งอยู่ตามซอกใบและพักตัวเนื่องจากอิทธิพลของตายอด(apical bud dormancy) เมื่อตายอดถูกเด็ดทิ้งไปหรือได้รับอันตราย ตาข้างจะสามารถเจริญเติบโตได้ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำได้โดยการเติมสารจำพวกไซโตไคนิน เพื่อขจัดอิทธิพลของตายอด ผลดังกล่าวนี้มีลักษณะที่ไม่ถาวรเพราะยอดข้าง (lateral shoots) จะหยุดการเจริญถ้าไม่ได้รับสารกระตุ้นการเจริญเติบโตจากภายนอก นอกจากนั้นอาหารที่เหมาะสมต้องประกอบด้วยไซโตไคนินที่ความเข้มข้นพอเหมาะ ในบางพืชแม้จะปรับสัดส่วนของไซโตไคนินแล้วก็ยังอาจไม่ได้ผล ในบางกรณีมีอัตราการเกิดยอดข้างต่ำ และต้องใช้เวลานาน อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปแล้ววิธีนี้เป็นที่นิยมมากกว่า 2 วิธีแรก (Caplin, 1983)

5. การเกิดรากจากยอดที่ชักนำได้ (rooting of *in vitro* developed shoots) ปกติแล้วตัพภะของพืชประกอบด้วยอวัยวะที่ต่อไปจะเจริญเป็นรากและยอด อย่างไรก็ตามในบางโอกาสและในพืชหลายชนิดที่ตัพภะอาจมีการพักตัวหลังการสุกแก่ และต้องแก้การพักตัวเพื่อกระตุ้นให้มีการงอก ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็เช่นกัน โดยทั่ว ๆ ไปแล้วส่วนของยอด ทั้งที่เป็นยอดที่เกิดจากตาพิเศษ (adventitious shoot) และยอดที่เกิดจากตาข้างหรือตาแขนง (axillary shoots) เกิดขึ้นเมื่อได้รับไซโตไคนิน แต่จะไม่เกิดรากจึงจำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารที่มีสารกระตุ้นการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเกิดราก (Pierik, 1987)

ปกติแล้วอาหารเพาะเลี้ยงที่มีปริมาณเกลือต่ำ (low-salt medium) เหมาะต่อการชักนำให้เกิดรากของพืชเกือบทุกชนิด ขณะที่ยอดเกิดได้ดีในอาหารที่มีปริมาณเกลือเต็มพิกัด (full-strength medium) ในทางปฏิบัตินิยมลดปริมาณเกลือลงครึ่งหนึ่ง (half-strength) ในบางกรณีเช่นใน แกลดิโอลัส และสตรอเบอรรี่ เกิดรากได้ในอาหารที่ไม่มีสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (plant growth regulator-free medium) นอกจากนี้พืชหลายชนิดต้องการออกซินในการเกิดราก(NAA หรือ IBA ในอัตราประมาณ 0.1-1.0 มก./ล.)

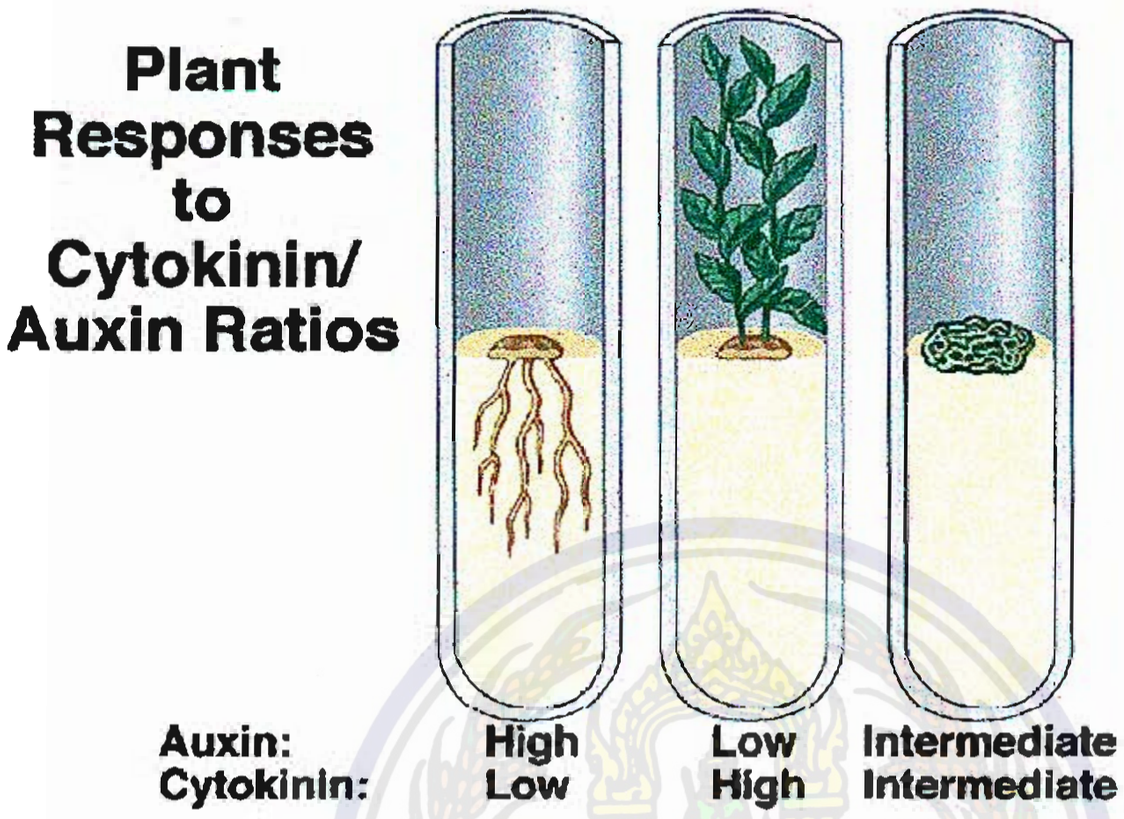
6. อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง (media used) ปกติแล้ว การเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำการกำเนิดยอด (shoot initiation) และเพิ่มจำนวนยอด (multiplication) สามารถใช้อาหารที่มีส่วนประกอบของเกลือสูตร MS-salts ได้ผลดีและอาจใช้สูตรอาหารที่ใกล้เคียงกันได้ แต่ที่สำคัญต้องประกอบด้วยเกลืออนินทรีย์ MS-inorganic salts, 170 มิลลิกรัมต่อลิตร $NaH_2PO_4.H_2O$, 80 มิลลิกรัมต่อลิตร Adenine sulphate dihydrate, 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร Thiamine HCl 100 มิลลิกรัมต่อลิตร Inositol และซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใช้ได้ผลดีกับพืชแทบทุกชนิด อย่างไรก็ตามในบางพืชความเข้มข้นของเกลือดังกล่าวอาจต่ำเกินไปหรือสูงเกินความจำเป็น เช่นในกรณีของ blueberry ควรลดลงเหลือเพียง ¼ ของปริมาณเดิม (1/4 strength) หรือชิ้นส่วนใบพืชบางชนิดที่นำมาเลี้ยง จะตายแม้จะใช้ความเข้มข้นเพียงแค่ ½ จึงควรลดลงเหลือแค่ประมาณ ¼ strength เช่นกัน สำหรับการเจริญของยอดส้มแขก จะเจริญได้ดีในอาหาร MS 1/2 strength

จะเห็นว่าความต้องการสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชผันแปรขึ้นกับระบบการเพาะเลี้ยง และวิธีขยายหรือเพิ่มจำนวนยอด อย่างไรก็ตาม Murashige และคณะ (รังสฤษฎ์, 2540) ได้พัฒนาสูตรอาหาร 2 ชนิด ที่ได้ผลดีในพืชหลายชนิด คือ Medium A เพื่อใช้กระตุ้นการแตกกิ่งข้าง (axillary branching) โดยใช้สูตรอาหารที่มีเกลือ MS และเติม 2-ip 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Medium B เพื่อใช้ชักนำการสร้างตาพิเศษ (adventitious buds) โดยใช้สูตรอาหารที่มีเกลือ MS และเติมของทั้ง IAA และไคเนตินอย่างละ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

หลักการอย่างกว้างๆ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์

1. Plant growth regulator (PGR) พืชส่วนมากเปลี่ยนแปลงพัฒนาเป็นอวัยวะถ้าได้รับ PGR 2 กลุ่ม คือ ออกซิน และไซโตไคนิน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดพืช ระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืช และระดับหรือสัดส่วนของ PGR 2 ชนิด ที่ใช้ในสูตรอาหาร ซึ่งมีข้อสังเกตสำคัญ คือ

- **ถ้าสัดส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินสูง (ไซโตไคนิน>ออกซิน) จะกระตุ้นการเกิดยอด (shoot formation)**
- **ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง (ออกซิน >ไซโตไคนิน) จะกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิดราก (root differentiation)**



ในทางปฏิบัติต้องทดสอบหาสัดส่วนของสารกระตุ้นการเจริญเติบโตที่เหมาะสม โดยทำการทดลองเป็นชุด (serie experiment) ที่นิยมใช้ในกลุ่มของไซโตไคนิน (cytokinin) ได้แก่ kinetin, BA, 2-ip และ zeatin โดยทั่วๆ ไปควรใช้ไซโตไคนินในอัตรา 0.5 - 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร) อย่างไรก็ตามมักพบว่าถ้าใช้ในอัตราที่สูง จะชักนำการสร้างตาพิเศษและอาจเกิดแคลลัสพร้อมกันด้วย ดังนั้นในกรณีที่จำเป็นต้องใช้ไซโตไคนินความเข้มข้นสูงเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากๆ อาจแก้ไขการเกิดตาพิเศษและแคลลัสนี้ได้โดยการเร่งการยืดตัวของยอดด้วยกรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) ก่อนที่จะชักนำให้เกิดราก (รังสฤษฎ์, 2540)

สำหรับออกซินนั้น เนื่องจากพืชสามารถสังเคราะห์ IAA ขึ้นเองได้ และมีปริมาณที่แตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิดแต่ละพันธุ์ จึงนิยมใช้ออกซินสังเคราะห์เช่น NAA และIBA ในความเข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แทน ส่วน 2,4-D นั้นมีผลอย่างมากต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสด้วย จึงควรหลีกเลี่ยงที่จะใช้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการชักนำให้เกิดกิ่งข้างและตาพิเศษแต่ใช้ได้ดีในกรณีที่ต้องการชักนำให้เกิดคัพภะ (somatic embryogenesis)

เนื่องจากอาหารกึ่งแข็งจะง่ายต่อการจัดการและดูแลเนื้อเยื่อที่เลี้ยง ดังนั้นโดยทั่ว ๆ ไปจึงนิยมใส่วุ้นในอัตรา 0.6-0.8 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามพืชบางชนิดจำเป็นต้องใช้อาหารเหลวเพื่อช่วยในการอยู่รอด เช่น *Cattleya* sp.โดยมีการเขย่าเพื่อให้ยอดแยกจากกันในลักษณะคล้าย ๆกับมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ไปในตัว

2. อาหารสำหรับชักนำการเกิดราก (rooting medium)

ในพืชหลายชนิด อาหารที่มีปริมาณเกลือต่ำ (1/2-1/4 strength) **ให้ผลดี เช่น ใน** *Narcisus* sp. (1/2 strength) **และบ่อยครั้งที่พบว่า** gladiolus, *Narcissus* sp. **และสตรอเบอรี่ เกิดรากได้ในอาหารที่ปราศจากสารกระตุ้นการเจริญเติบโต แต่โดยทั่วไปแล้วแนะนำให้เติมออกซิน** (NAA **หรือ** IBA) **ในอัตรา** 0.1-1.0 **มิลลิกรัมต่อลิตร**

พืชบางชนิดพบว่ามีสารบางอย่างช่วยในการเกิดรากให้ดียิ่งขึ้น เช่นยูคาลิปตัส (*Eucalyptus ficifolia*) **เมื่อใช้** riboflavin **ร่วมกับ** IBA **และไว้ในที่มีแสงความเข้มต่ำ จะช่วยให้รากยืดตัวยาวขึ้น ขณะที่ถ้าไม่มี** riboflavin **จะทำให้รากค่อนข้างสั้นและรากข้างเจริญเฉพาะบริเวณใกล้ผิวอาหารเท่านั้น**

3. แสงและอุณหภูมิ (light and temperature) **แม้ว่าโดยปกติแล้วการเพาะเลี้ยงพืชในอาหารสังเคราะห์จะไม่พึ่งการสังเคราะห์แสงมากนัก แสงก็ยังมีความจำเป็นต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงพัฒนาทางด้านสัณฐานที่ถูกควบคุมด้วยพันธุกรรม** (morphogenic process) **โดยทั่วๆ ไปแล้วต้องการความเข้มแสงในช่วง** 1,000-5,000 **ลักซ์ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของพืชด้วย ตัวอย่างยอดของเยอบีรา (** *Gerbera* sp. **) และไม้ดอกล้มลุกหลายชนิด ต้องการความเข้มแสงอย่างต่ำประมาณ** 300 **ลักซ์ และที่เหมาะสมที่สุดคือประมาณ** 1,000 **ลักซ์ ถ้าความเข้มแสงสูงเกิน** 3,000 **ลักซ์ จะมีผลในทางยับยั้งได้ สำหรับความยาวนานของช่วงแสง** (photoperiod) **กล่าวได้ว่าไม่ค่อยมีข้อจำกัด และนิยมให้แสงกลางวัน/กลางคืนนาน** 16 / 8 **ชั่วโมง สำหรับอุณหภูมินั้น อุณหภูมิคงที่** 25 **องสาเซลเซียส นิยมใช้กันมากที่สุด (รังสฤษฎ์,** 2540)

4.ชนิดของพืช (species) **ในไม้ยืนต้นที่มีอายุยาวและเกิดรากได้ยาก การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก จึงทำได้เฉพาะในพืชบางชนิดเท่านั้น ส่วนใหญ่มักพบว่าเกิดเป็นแคลลัสก่อน จึงจำเป็นต้องชักนำให้เกิดสภาพยังไม่เจริญเติบโตเต็มที่ (** juvenile **) ในชิ้นส่วนของพืชที่เลี้ยงเสียก่อนรวมทั้งการเปลี่ยนอาหารให้บ่อยครั้ง**

การใช้ประโยชน์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์

1. **เพื่อสร้าง ขยาย เก็บรักษา และเคลื่อนย้ายพันธุ์พืชที่ปลอดโรค** (pathogen-free plants) **ได้อย่างสะดวกและปลอดภัย โดยเฉพาะพืชที่ขยายพันธุ์ได้ด้วยส่วนการเจริญทางด้านลำต้น**
2. **เร่งอัตราการขยายพันธุ์โดยการสร้างยอดให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าวิธีการขยายพันธุ์ตามปกติ โดยสามารถทำได้ตลอดเวลา ในแต่ละรอบของการเพาะเลี้ยงอาจใช้เวลาสั้นประมาณ** 2-6 **สัปดาห์ และสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้อย่างทวีคูณ**
3. **ในเชิงการค้า สามารถทำได้สำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น กล้วย ยูคาลิปตัส เฟิร์น เยอบีรา กล้วยไม้ อาฟริกันไวโอเลท กรอกซิเนีย** (gloxinia) **และโรโดเด็นดรอน (** rhododendrons)

4. ในพืชพวกใบเลี้ยงคู่ (dioecious species) ส่วนใหญ่ การขยายพันธุ์ทางด้านลำต้นมีความสำคัญเพราะเมล็ดที่ได้มักให้ต้นที่มีแต่ดอกเพศผู้ (male plants) และต้นที่มีแต่ดอกเพศเมีย (female plants) แยกกันแต่มีเฉพาะเพศใดเพศหนึ่งเท่านั้นที่มีคุณค่าทางเชิงพาณิชย์ (ส่วนใหญ่คือเพศเมีย) ตัวอย่างต้นเพศผู้ของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinaris*) มีราคาสูงกว่าต้นเพศเมีย ในมะละกอ (papaya) นั้นการขยายพันธุ์โดยการตัดชำ (stem cutting) ยังไม่สามารถทำได้ ประกอบกับการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดยังมีข้อจำกัดจากการถ่ายละอองเกสรข้ามต้น ดังนั้นการขยายพันธุ์จากกส่วนต่างๆ ของต้นเพศเมียจึงมีความสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อให้ได้ต้นที่ปลอดจากโรคใบด่างจากเชื้อไวรัส

ตัวอย่างการขยายพันธุ์พืชสมุนไพรบางชนิดโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. การขยายพันธุ์บุก

บุกเป็นพืชพื้นเมืองของประเทศเขตร้อนในทวีปเอเชียและอาฟริกา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Amorphophallus* spp. อยู่ในวงศ์ Araceae จัดเป็นพืชล้มลุกพื้นเมืองของไทย ลักษณะหัวกลมแบนบางชนิดมีเปลือกสีขาวเหลือง บางชนิดสีน้ำตาลหรือน้ำตาลอมเหลือง หัวบุกบางชนิดผิวเรียบเกลี้ยง บางชนิดผิวขรุขระ หัวบุกนิยมนำมารับประทานเป็นอาหารของชาวชนบท จัดเป็นพืชอาหารและพืชสมุนไพรของไทยมาแต่โบราณ จากการค้นคว้าทางด้านโภชนาการพบว่าภายในหัวบุกประกอบด้วยแป้งประมาณร้อยละ 90 – 95 และโปรตีนร้อยละ 5 –6 สารแป้งที่อยู่ในหัวบุก ได้แก่สารกลูโคแมนแนน ซึ่งเมื่อแตกตัวจะได้กลูโคสและแมนโนส มีคุณสมบัติในการช่วยลดอัตราการดูดซึมของน้ำตาลในเลือด ลดความดันโลหิต ลดไขมันในเลือด ในประเทศญี่ปุ่นมีการปลูกบุก *A. konjac* เป็นการค้ามานานแล้ว โดยนำมาแปรรูปเป็นแป้งคอนยัค อาหารเสริมสุขภาพ และนำไปทำผลิตภัณฑ์สำหรับลดน้ำหนักโดยทำในรูปอุตสาหกรรม สำหรับประเทศไทยธุรกิจการซื้อขายหัวบุกได้เริ่มขึ้นตั้งแต่ปี 2527 อุตสาหกรรมการส่งออกและจำหน่ายบุกและผลิตภัณฑ์จากบุกในประเทศไทย มีปริมาณการซื้อขายอยู่ในระดับ 3,000 ตันต่อปีมาโดยตลอด จนในปี2541 ธุรกิจบุกที่ทวนกระแสเศรษฐกิจโลก สูงขึ้นเป็น 4,000-5,000 ตัน ถ้าความต้องการยังเป็นเช่นนี้อีกไม่นานบุกจะขาดแคลน ซึ่งจะส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมและธุรกิจเกี่ยวเนื่องมูลค่าหลายร้อยล้าน จึงควรส่งเสริมให้มีการปลูกอย่างจริงจังแทนการเก็บจากป่า โดยควรส่งเสริมให้มีการปลูกบุกพันธุ์ที่สารใยอาหารสูงถึง 8 – 10 % ของน้ำหนักบุกสด ซึ่งพบอยู่ 4 ชนิดคือ บุกเนื้อทราย บุกเขา บุกเหลือง และบุกเตียงหัวลม (มงคล, 2547)

การขยายพันธุ์บุกทำได้โดยการแยกหน่อหรือใช้เมล็ด การใช้เมล็ดจะได้ต้นบุกที่เติบโตช้ามาก ส่วนการแยกหน่อเป็นการขยายพันธุ์ที่ง่ายแต่จะต้องใช้หัวพันธุ์ที่ปลอดโรค โรคที่สำคัญของบุกที่

ทำให้ผลผลิตลดลง คือโรคหัวเน่าที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในดินและติดมากับหน่อที่เกิดจากหัวที่เป็นโรค การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์บุกจะได้ต้นบุกที่ปลอดโรคจำนวนมากในระยะเวลาสั้น

วิธีการ

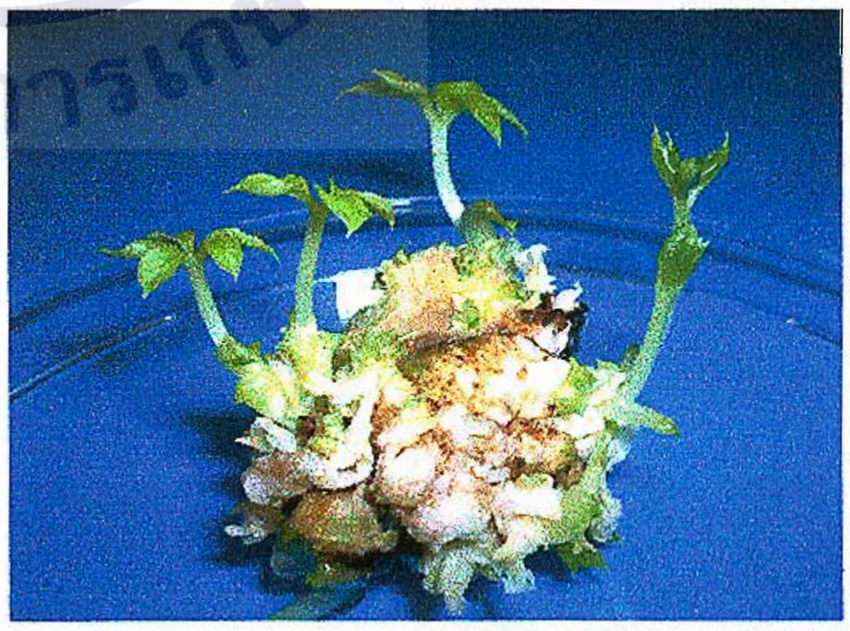
1. การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนของพืช

1. รวบรวมหัวของบุกเนื้อทราย (*Amorphophallus oncophyllus* Prain) จากจังหวัดเชียงใหม่ มาล้างให้สะอาด ใส่ไว้ในตระกร้าโดยไม่ต้องนำลงปลูกในดิน ทิ้งไว้จนกระทั่งมีการแตกหน่อหรือยอด ซึ่งตามปกติบุกจะมีการพักตัวในฤดูหนาว และจะเริ่มแตกหน่อประมาณเดือนมีนาคม – เมษายน โดยหัวของบุก 1 หัว จะแตกหน่อ 1 หน่อ

2. ตัดหน่อขนาดประมาณ 5 นิ้ว ออกจากหัว ลอกเปลือกหุ้ม นำมาล้างให้สะอาด แล้ว ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Haiter® Bleach (sodium hypochlorite as available chlorine 6% โดยน้ำหนัก หรือ w/w) ความเข้มข้น 15 % (โดยปริมาตร หรือ v/v) นาน 15 นาที

3. ล้างสารละลายฟอกฆ่าเชื้อออกด้วยน้ำกลั่น ที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง ตัดแบ่งชิ้นส่วนหน่ออ่อน โดยแบ่งหน่อหรือยอดอ่อนเป็น 2 ตำแหน่ง คือ โคนต้น และใบ นำมาเลี้ยงในอาหาร Murashige and Skoog (MS) ที่มีการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช 6-Benzylaminopurine(BA) 5-10 ไมโครโมลาร์ (µM)

การเกิดยอดจากส่วนใบ



การเกิดยอดจากส่วนโคนต้น

การนำโคนต้นมาเลี้ยง บนอาหาร MS ที่มี BA ที่ระดับ 5-10 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนยอดรวมสูงสุด คือ 5-6 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ส่วนใบให้จำนวนยอดรวมต่ำสุด คือ 1-2 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช

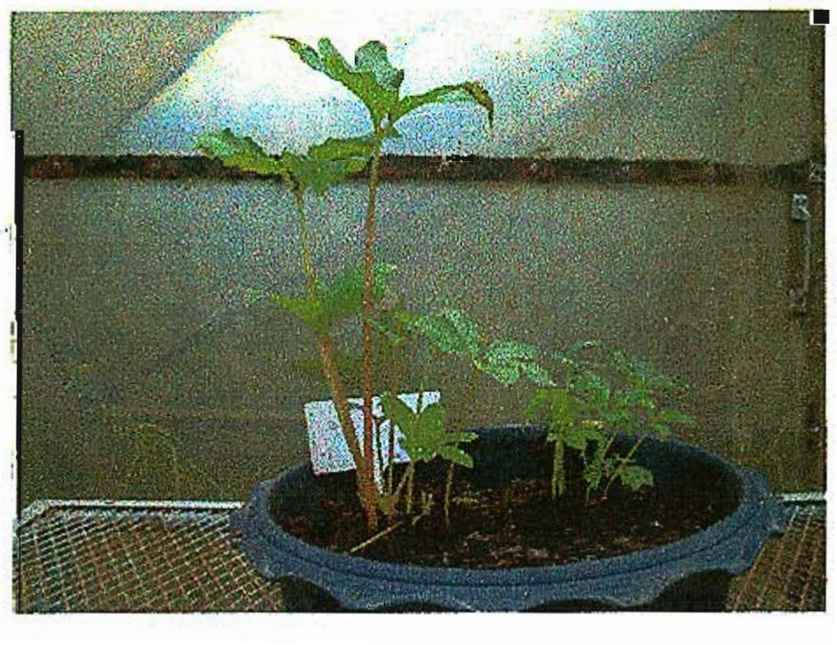
2. การเพิ่มปริมาณ *in vitro* microshoot

นำ *in vitro* microshoot ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงหน่อหรือหน่ออ่อน มาเพิ่มปริมาณ โดยนำส่วนโคน และใบ ของ *in vitro* microshoot มาเลี้ยงบนอาหาร MS +BA ที่ระดับ 5-10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ส่วนโคนต้นของ *in vitro* microshoot เกิดยอดรวมสูงสุดคือ 7-8 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ชิ้นส่วนพืชในตำแหน่งโคนใบและใบของ microshoot ให้จำนวนยอดระหว่าง 1-2 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช

การเกิดยอดรวม 7-8 ยอด จากส่วนโคนต้น

3. การย้ายปลูกต้นกล้า

ทำการปรับสภาพของพืชก่อนย้ายปลูก โดยนำขวดที่เพาะเลี้ยงบุก มาเลี้ยงไว้ในที่มีแสงที่อุณหภูมิห้อง หรือโรงเรือนที่ควบคุมความชื้น (Evaporation green house) นาน 10 วัน หลังจากนั้นจึงนำต้นบุกออกจากขวด ล้างน้ำให้อาหารวุ้นที่ติดกับรากออกให้หมด นำมาปลูกในโรงเรือนเพาะชำในกระบะขนาด 2x2 นิ้ว วัสดุปลูก ทราย แกลบ ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 2:2:1 นาน 1 เดือน แล้วย้ายปลูกลงในกระถางขนาด 10 นิ้ว ใช้ ดิน ขุยมะพร้าว ปุ๋ยคอก อัตราส่วน 2:2:1



2. การขยายพันธุ์ว่านชักมดลูก

ว่านชักมดลูก *Curcuma xanthorrhiza* Roxburg เป็นสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์เดียวกับขิงและข่า คือวงศ์ Zingiberaceae เป็นไม้ล้มลุกประเภทขิงข่า สูงได้ถึง 2 เมตร เหง้ายาวได้ถึง 10 ซม. ผิวนอกสีส้มอ่อน เนื้อในสีส้มหรือส้มแดง เหง้าใต้ดินของว่านชักมดลูกเป็นส่วนของพืชที่นำมาใช้ประโยชน์มาก มีผู้นำมาศึกษาและแยกสารที่เป็นองค์ประกอบเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่กลุ่มเบนซีนอยส์ สารสำคัญในกลุ่มคือ curcumin เป็นสารที่ให้สีเหลืองซึ่งมีฤทธิ์ลดไขมันในเลือด กลุ่มโมโนเทอร์ปีนส์ (Monoterpenes) กลุ่มเซสควิเทอร์ปีนส์ (Sesquiterpemse) กลุ่มฟีนิลโพรพานอยส์ (Phenylpropanoids) ซึ่งสารสกัดว่านชักมดลูกมีฤทธิ์ฆ่าพยาธิตัวกลม กระตุ้นการหลั่งน้ำดี ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด เพิ่มน้ำหนักมดลูก และปริมาณไกลโคเจน เหนี่ยวนำให้เกิดการหนาตัวของเยื่อบุช่องคลอด ส่งเสริมการเจริญเติบโตและเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง keratin ในเยื่อบุช่องคลอด และลดระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด

การขยายพันธุ์ว่านชักมดลูก ใช้ชิ้นส่วนของเหง้าซึ่งเป็นส่วนที่ต้องนำมาใช้ประโยชน์ ปลูกในช่วงปลายฝนในหลุมห่างกัน 60 เซนติเมตร ภายใต้สภาพร่มเงาเล็กน้อย การปลูกโดยใช้เหง้าหลักต้องใช้วัตถุดิบในปริมาณมาก แต่สามารถเก็บเกี่ยวได้หลังปลูก 8-12 เดือน ในขณะที่ทำการปลูกด้วยหน่อที่แตกออกมาเหง้า ต้องใช้เวลานานถึง 2 ปี เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถขยายพันธุ์ได้ในปริมาณมาก

วิธีการ

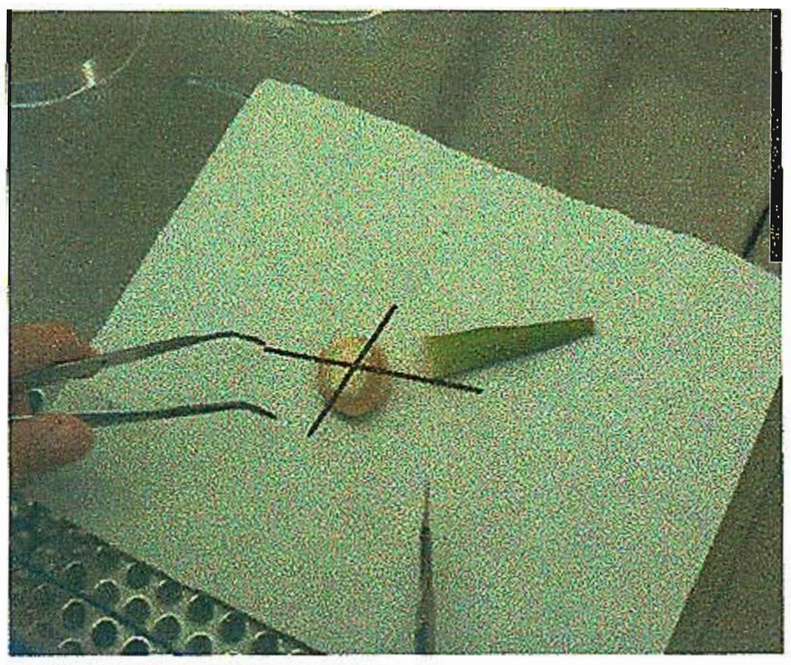
1 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนของพืช

1.1 รวบรวมเหง้าของว่านชักมดลูกจากจังหวัดมหาสารคาม และกาญจนบุรี มาล้างให้สะอาด ใส่ไว้ในตระกร้าโดยไม่ต้องนำลงปลูกในดิน ทิ้งไว้จนกระทั่งมีการแตกหน่อ ตามปกติว่านชักมดลูกจะมีการพักตัวในฤดูหนาว และจะเริ่มแตกหน่อประมาณเดือนมีนาคม - เมษายน โดยเหง้าของว่านชักมดลูก 1 เหง้า จะแตกหน่อประมาณ 2-6 หน่อ ขึ้นอยู่กับขนาดของเหง้า

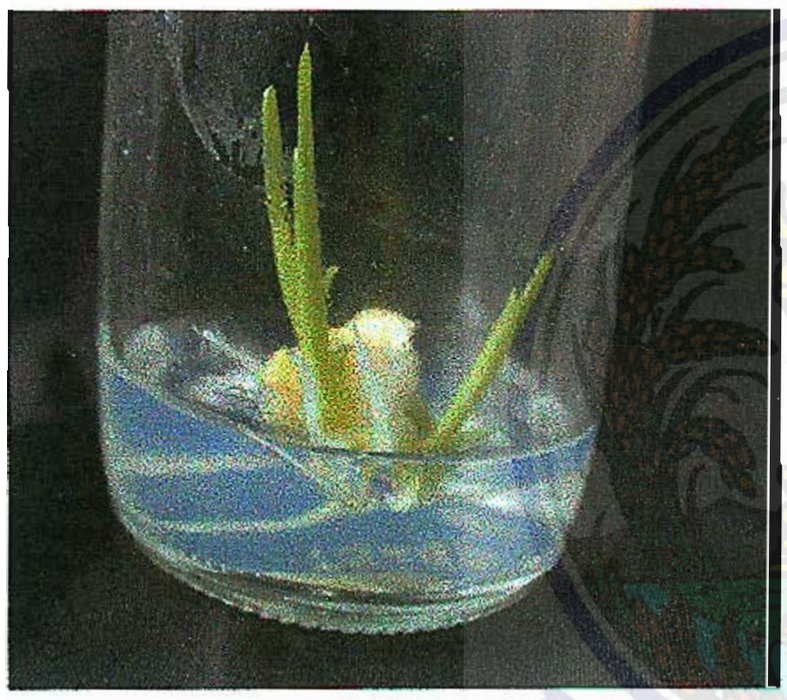
1.2 ตัดแยกหน่ออ่อนซึ่งมีตาอยู่ด้วย ที่มีขนาดยาวประมาณ 5- 10 นิ้ว ออกจากเหง้า นำมาล้างให้สะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Haiter® Bleach (sodium hypochlorite as available chlorine 6% โดยน้ำหนัก) ความเข้มข้น 20 % โดยปริมาตร นาน 15 นาที

1.3 ล้างสารละลายฟอกฆ่าเชื้อออกด้วยน้ำกลั่น ที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง

1.4 นำหน่อที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดแต่งบริเวณโคนหน่อที่เนื้อเยื่อสัมผัสกับสารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ รวมทั้งตัดส่วนกาบใบทิ้ง ตัดแบ่งโคนหน่ออ่อนออกเป็น 4 ชิ้น



การตัดแบ่งหน่ออ่อนเป็น 4 ส่วน เพื่อใช้ในการขยายพันธุ์



การชักนำให้เกิดยอดจาก 1/4 ของหน่ออ่อน ที่งอกจากหัวว่านชักมดลูก บนอาหาร MS ที่มี BA 30 ไมโครโมลาร์

การใช้ BA ที่ระดับ 30-50 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอด 3-5 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช โดย BA ที่ระดับ 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนยอดรวมสูงสุดเท่ากันที่ 4.5 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ส่วนการใช้ kinetin ในทุกระดับของความเข้มข้น ชักนำให้เกิดยอดได้น้อยกว่าการใช้ BA

การใช้หน่ออ่อนมาขยายพันธุ์นั้น พบว่ามีปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียค่อนข้างสูงถึง 30 เปอเซนต์ ซึ่งถือเป็นเรื่องปกติของชิ้นส่วนพืชที่สัมผัสอยู่กับดิน การใช้สารกระตุ้นการเจริญเติบโตในกลุ่ม cytokinin ให้ผลดีกับพืชในสกุล *Curcuma* เช่น ขมิ้นชัน (*Curcuma longar*) สามารถใช้หน่ออ่อน ซึ่งงอกจากหัวขมิ้นชันมาขยายพันธุ์ และการใช้ BA ในการขยายพันธุ์พืชที่มีเหง้า (rhizome) นี้สามารถทำได้กับขิงได้เช่นเดียวกัน (*Zingiber officinale*) (Balachandran et al., 1900)

2. การเพิ่มปริมาณ *in vitro* microshoot

2.1 นำส่วนยอดของ *in vitro* microshoot ยาวประมาณ 3-4 นิ้ว ที่เกิดจากการชักนำจากหน่ออ่อนมา ตัดแต่งส่วนกาบใบตอนบนของยอด และส่วนฐานของหน่อที่เป็นสีดำหรือเนื้อเยื่อที่ตายแล้วทิ้งไป

2.2 นำไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีสารกระตุ้นการเจริญเติบโต BA เปลี่ยนอาหารใหม่โดยใช้สูตรเดิมทุกๆ 4 สัปดาห์

3. การย้ายปลูกต้นกล้า

นำขวดที่เพาะเลี้ยงว่านชักมดลูก มาเลี้ยงไว้ในที่มีแสง และอุณหภูมิห้องนาน 10 วัน หลังจากนั้นจึงนำต้นว่านชักมดลูกออกจากขวด ล้างน้ำให้อาหารวุ้นที่ติดกับรากออกให้หมด นำมาปลูกในโรงเรือนเพาะชำ ในกระบะขนาด 2 x 2 นิ้ว วัสดุปลูก ทราย แกลบ ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 2:2:1 นาน 1 เดือน แล้วย้ายปลูกลงในกระถางขนาด 10 นิ้ว ใช้ ดิน ขุยมะพร้าว ปุ๋ยคอก อัตราส่วน 2:2:1 บันทึกข้อมูล อัตราการเลี้ยงรอด

ยอดรวมที่เกิดจาก *in vitro* microshoot บนอาหาร MS ที่มี BA 40 ไมโครโมลาร์

ต้นว่านชักมดลูกซึ่งเกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อย้ายปลูกในโรงเรือนทดลอง

BA ที่ระดับ 40 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้สูงถึง 4-6 ยอด ต่อ microshoot ภายในเวลา 2 เดือน ในการเกิดยอดรวมจะมีหน่อใหญ่ซึ่งเจริญขึ้นมาก่อน และมีหน่อเล็กๆ ที่แตกออกมาทางด้านข้างซึ่งเกิดขึ้นมาภายหลัง จะต้องแยกหน่อเหล่านั้นออกจากกัน หากทิ้งไว้การเจริญเติบโตจะช้า ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากการที่หน่อใหญ่มีการข่มการเจริญเติบโตของหน่อเล็กๆ ที่เกิดภายหลัง และเมื่อแยกหน่ออ่อนมาเลี้ยงต่อไปอีก 3 เดือน พบว่าหน่ออ่อนสามารถแตกรากได้เอง ในอาหาร MS ที่มีและไม่มีสารกระตุ้นการเจริญเติบโต แต่จะมีการแตกรากได้ดีกว่าในอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต

หลังจากย้ายปลูกต้นอ่อนว่านชักมดลูกลงกระถาง พบว่ามีอัตราการรอดตายสูงถึง 92 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีการปรับสภาพของพืชก่อนที่จะนำออกปลูก โดยนำต้นอ่อนที่อยู่ภายในขวดทั้งขวดมาไว้ในอุณหภูมิห้องและในที่มีแสงจากธรรมชาติ จึงทำให้ต้นอ่อนมีอัตราการรอดตายสูงและมีอัตราการเจริญเติบโตดี

4 การผลิตพืชปลอดโรค (Production of pathogen-free plants)

นอกจากการขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมากแล้ว การผลิตพืชปลอดโรคนับว่าเป็นประโยชน์ของการนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้เช่นกัน การติดเชื้อภายในต้นพืชที่มีสาเหตุจากไวรัส, ไมโครพลาสมา, แบคทีเรีย และเชื้อรา เป็นสิ่งที่แก้ไขลำบาก เป็นการยากที่จะกำจัดเชื้อที่อยู่ภายในต้นพืชโดยการใช้สารเคมี ในบางครั้งสามารถหยุดการแพร่กระจายของไวรัสได้ โดยใช้สารเคมีที่มีราคาสูง ซึ่งได้แก่ virazole®(ribavirine) และ vidarabive® ใส่ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในกรณีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลิลลี่ และแอบเปิ้ล สามารถใช้ virazole ได้ แต่การผลิตพืชที่ปราศจากไวรัสโดยการใช้สารเคมีกำจัดแบคทีเรียในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น สามารถทำได้ในบางพืช เนื่องจากต้องใช้สารเคมีในความเข้มข้นที่สูง และพืชส่วนใหญ่จะไม่สามารถทนทานต่อความเข้มข้นในระดับสูง เนื้อเยื่อพืชจะตายก่อนที่สามารถกำจัดแบคทีเรียได้ นอกจากนี้การใช้สารกำจัดแบคทีเรียในอัตราที่สูงจะชักนำให้แบคทีเรียเหล่านั้นพัฒนากลายเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะชนิดนั้นได้

จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคพืชหลายชนิด ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อรา สามารถติดต่อกันได้โดยการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ เช่น ทางท่อนพันธุ์ หรือส่วนขยายพันธุ์อื่นๆ ที่ไม่ใช้เพศ (vegetative propagate)ไวรัสประมาณ 600 ชนิด ได้ถูกค้นพบว่าสามารถทำอันตรายแก่พืชได้ และมีประมาณ 80 ชนิด ที่สามารถติดไปกับเมล็ดพืช ดังนั้นต้นพืชที่ได้จากการเพาะเมล็ดเหล่านี้จึงมีไวรัสแฝงติดอยู่ ต้นพืชที่ถูกทำลายโดยไวรัสจะมีผลผลิตและมีคุณภาพของผลผลิตต่ำ ดังนั้นการปลูกพืชที่ปราศจากไวรัส โดยการใช้ส่วนขยายพันธุ์พืชที่ปลอดโรคจึงเป็นหนทางหนึ่งในการแก้ปัญหาผลผลิตและคุณภาพผลผลิตต่ำ นอกจากนี้ต้นพืชที่ถูกทำลายโดยไวรัสจะไม่สามารถรักษาได้ ดังนั้นจึงต้องทำลายพืชเหล่านั้นเพื่อป้องกันการแพร่กระจายไปสู่ต้นพืชอื่นๆ ส่วนขยายพันธุ์พืชที่ปลอดไวรัส มีโอกาสติดเชื้อไวรัสได้อีก ดังนั้นจึงควรป้องกันการติดเชื้อไวรัสซ้ำ (re-infection) โดยวิธีการ ดังนี้

1. ต้นพืชควรปลูกในสภาพเรือนทดลองที่สามารถป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส และแมลงพาหะต่างๆ ได้แก่ เพลี้ยอ่อน และโรงเรือนควรตั้งอยู่ในสถานที่ที่ห่างไกลจากบริเวณที่เกิดการแพร่ระบาดของไวรัส

2. มีระบบสุขาภิบาลที่ดี ได้แก่ การทำความสะอาดมือ เสื้อผ้า เครื่องมือ ของใช้ต่างๆ ในโรงเรือน เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อโรค

3. กระถางและดินจะต้องเข้าตู้อบเพื่อฆ่าเชื้อโรค

4. เพื่อป้องกันการสูญเสียที่จะเกิดขึ้นภายหน้า ต้นพืชที่ปราศจากเชื้อโรค หรือ stock material ควรเก็บอยู่ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วิธีการที่เหมาะสมและสะดวกในขั้นตอนผลิตต้นพืชปลอดไวรัส

1. การให้ความร้อน (heat treatment)
2. การเพาะเลี้ยงเยื่อเจริญ (mertstem culture)
3. การให้ความร้อนตามด้วยการเพาะเลี้ยง เยื่อเจริญ
4. การชักนำให้เกิดยอดโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตามด้วยการเพาะเลี้ยง เยื่อเจริญ

การให้ความร้อน (heat treatment)

การให้ความร้อนในระดับที่เหมาะสมโดยไม่ทำอันตรายต่อเซลล์พืชเป็นวิธีการที่ได้ผลต่อการทำลายไวรัส โดยเฉพาะไวรัสประเภท isomatic นอกจากนี้ การให้ความร้อนสามารถทำลายโรคพืชที่เกิดจาก mycoplasma ได้ด้วย แต่การใช้ความร้อนในบางกรณีไม่ประสบผลความสำเร็จในการทำลายเชื้อไวรัส สาเหตุจากเซลล์พืชไม่สามารถทนทานต่อความร้อนที่สูง จึงเกิดจากการตายของเซลล์พืช ดังนั้น อุณหภูมิและช่วงเวลาที่เหมาะสมในการให้ความร้อนแก่ชิ้นส่วนพืช ควรเลือกใช้ให้เหมาะสมต่อพืชและชิ้นส่วนพืชชนิดนั้นๆ การให้ความร้อนในการทำลายไวรัสที่ติดมากับชิ้นส่วนพืช ซึ่งได้แก่ ไม้ผล อ้อย และมันสำปะหลัง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในไม้ผล เป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการผลิตท่อนพันธุ์ปลอดโรค

ในกรณีไม้ยืนต้นชนิดอื่นๆ การให้ความร้อนเพื่อทำลายไวรัสแก่ตาข้าง (axillary bud) ได้ผลดีกว่าการให้ความร้อนกับท่อนพันธุ์ กระทำโดย การนำตาข้างที่ได้รับการให้ความร้อนที่เหมาะสมจนแน่ใจว่าสามารถทำลายไวรัสได้แล้ว มาติดบนต้นตอ (stock) ที่ได้จากการเพาะเมล็ด ซึ่งมีอายุประมาณ 20 - 40 วัน ต้นกล้าหรือต้นตอดังกล่าว ควรเพาะและปลูกในเรือนทดลองที่อุณหภูมิ 37-38 องศาเซลเซียส วิธีการนี้สามารถผลิตต้นพันธุ์ปลอดโรคได้ในปริมาณมาก นอกจากนี้ ในการผลิตท่อนพันธุ์องุ่นปลอดไวรัส สามารถทำได้โดยนำยอดอ่อนขององุ่นมาทำการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อหรือสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน สามารถผลิตยอดอ่อนองุ่นปลอดไวรัสได้ ซึ่งยอดอ่อนในสภาพธรรมชาติไม่สามารถทนทานต่อการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

การเพาะเลี้ยงเยื่อเจริญ (meristem culture)

ในอดีตการเพาะเลี้ยงเยื่อเจริญใช้ในการผลิตพืชปลอดไวรัส เนื่องจากพบว่า Tobacco Mosaic Virus (TMV) ไม่ได้กระจายไปตามเซลล์หรือชิ้นส่วนต่างๆ ของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่ง จุดที่ไวรัสแพร่กระจายไปไม่ถึงที่ปลายยอด (shoot tip) และปลายราก (root tip) ดังนั้นบริเวณดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในกวรผลิตพืชปลอดไวรัสได้โดยกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในช่วงแรกของการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตมันฝรั่งปลอดไวรัส สามารถใช้ apical meristem ในการผลิต ต่อมามีการนำการเพาะเลี้ยงเยื่อเจริญ มาใช้ในพืชสวนและเพื่อผลิตพืชปลอดไวรัส ได้แก่ เชอรี่, องุ่น และส้ม

นอกจากนี้มีผลการทดลองหลายชิ้น พยายามที่จะหาเหตุผลในการอธิบายปรากฏการณ์ที่ส่วนยอด หรือ meristem ของพืชจะไม่มีอนุภาคของไวรัสกระจายอยู่ และสามารถสรุปได้ดังนี้ คือ ในบริเวณ meristem หรือ เยื่อเจริญของพืชไม่มี vascular elements และ plasmodesmata อนุภาคไวรัสจึงไม่สามารถแพร่กระจายไปยังบริเวณดังกล่าวได้

ขั้นตอนการผลิตพืชปลอดไวรัส

ชิ้นส่วนหรือพืชที่ติดไวรัส

↓

การให้ความร้อนเพื่อทำลายไวรัส

(heat treatment)

↙

การเพาะเลี้ยงเยื่อเจริญ

(meristem culture)

↓

ขยายเพิ่มปริมาณ

↓

ชักนำให้เกิดยอด → เพิ่มปริมาณยอด → ทดสอบไวรัส (ครั้งที่1) ในห้องปฏิบัติการ

(shoot formation) (shoot multiplication)

↓

ชักนำให้เกิดราก → ทดสอบไวรัส(ครั้งที่ 2)

(root formation)

↓

ย้ายปลูกในเรือนทดลอง

ขั้นตอนการผลิตพืชปลอดไวรัส โดยวิธีเพาะเลี้ยงเยื่อเจริญ (meristem culture)

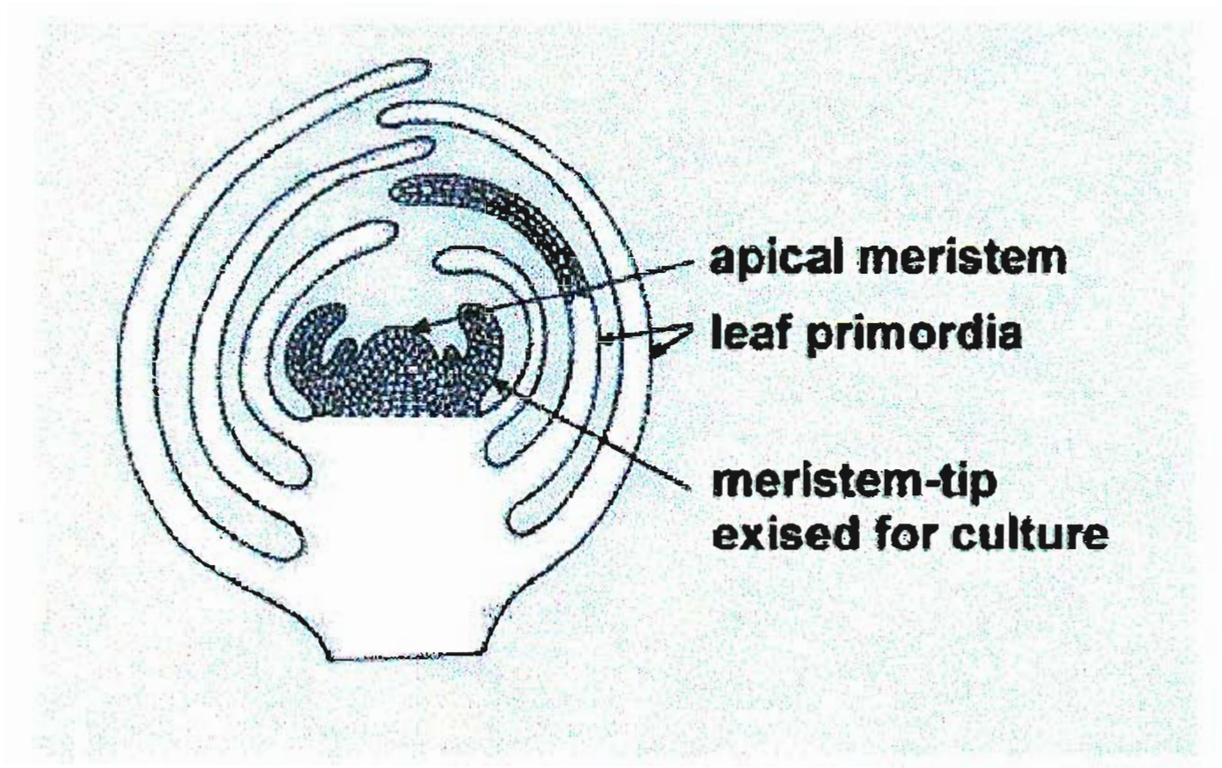
นำส่วนยอดของพืชมาทำความสะอาดภายนอกและตัดใบทิ้งให้หมด นำยอดหรือตายอด จุ่มลงใน ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 วินาที เพื่อไล่ฟองอากาศที่ติดอยู่ที่ผิวใบ จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย sodium hypochlorite และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ตามลำดับ ใบที่เหลือติดอยู่จะต้องตัดออกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 20-40 เท่า ต่อจากนั้นทำการฆ่าเชื้อภายนอกอีกครั้งโดยใช้ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อภายนอกต่ำกว่าที่ใช้ในครั้งแรก โดยไม่มีการใช้น้ำกลั่น บางครั้งอาจใช้ ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แทนการใช้ sodium hypochlorite ในการฆ่าเชื้อภายนอกครั้งที่ 2 เนื่องจากการใช้น้ำกลั่นล้างครั้งนี้จะทำให้มีหยดน้ำเกาะที่ชิ้นส่วนมากเกินไป เกิดการสะท้อนแสงของน้ำที่เกาะบนผิวใบทำให้การมองเห็นลำบาก เข็มเขี่ย และใบมีดโกนต้องแหลมคมและต้องทำการฆ่าเชื้อทุกครั้งที่เขี่ยเนื้อเยื่อพืช ใช้เข็มเขี่ยใบอ่อนที่หุ้มเยื่อเจริญ (leaf primodia) ออกจากชิ้นส่วนพืชซึ่งปกติจะประกอบด้วย 1-2 leaf primodia ทำการตัดเยื่อเจริญออก โดยใช้มีดโกนและนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงที่เตรียมไว้ทันที เพื่อป้องกันเยื่อเจริญแห้งเมื่อกระทบอากาศ นอกจากนี้เพื่อป้องกันไม่ให้ meristem แห้งเร็วเกินไป ควรใช้หลอดไฟที่ไม่ให้ความร้อน (cool light) ในการส่องใต้กล้อง ในขั้นตอนของการแยก meristem และ leaf primodia มีขนาดเล็กมาก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.1 มิลลิเมตร และมีความยาว 0.2-0.4 มิลลิเมตร ความสำเร็จของการเลี้ยง meristem ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่

1. ชนิดของตาหรือยอด (axillary หรือ terminal)
2. ตำแหน่งของตาหรือยอด (basal หรือ terminal)
3. ฤดูกาลของการทดลอง

การเพาะเลี้ยง meristem สามารถทำได้ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว ให้ pH ของอาหารอยู่ระหว่าง 5.4 - 6.0 ส่วนประกอบของอาหารที่นิยมใช้ ประกอบด้วย

1. น้ำตาล saccharose ใช้ในประมาณ 2-5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
2. วิตามิน ได้แก่ วิตามิน B pyridoxine panthothenic acid และ nicotinic acid
3. สารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) ที่ใช้ควรใช้ในอัตราที่ต่ำกว่าปกติ ได้แก่
   - auxin ช่วยชักนำให้เกิดราก
   - auxin และ cytokinin ชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์
   - GA_3 ช่วยเร่งการยืดของยอด (shoot extension)

สภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อจะใช้อุณหภูมิ 21-25 องศาเซลเซียส ยกเว้นพืชที่ผลิตหัวใต้ดิน (bulf) ต้องการอุณหภูมิที่ต่ำกว่านี้ แสงสว่างที่ใช้ควรใช้แสงจากหลอด fluorescent และให้แสงเป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง



meristem ของพืช และส่วนที่นำไปเพาะเลี้ยง

การเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยง meristem กล้วย

ในการเลี้ยง meristem บางพืช พบว่า ไม่สามารถชักนำให้ยอดเกิดรากได้ เมื่อเกิดปัญหานี้ สามารถแก้ไขโดยการ grafting ทำได้โดยนำยอดไปเลี้ยงบนต้นตอ (stock) ที่เกิดจากการเพาะเมล็ด เมื่อต้นพืชเติบโตขึ้น สามารถนำกิ่งพันธุ์นั้นๆ ไปปักชำและชักนำให้เกิดรากได้ตามปกติ

5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการปรับปรุงพันธุ์พืช

ความรู้และผลงานความก้าวหน้าด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่งผลให้เกิดสาขาวิชาต่าง อีกหลายวิชา somatic cell genetics เป็นสาขาที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ความรู้ทางด้าน somatic cell genetics ทำให้เกิดเทคนิคต่างๆ เช่น การผสมเซลล์ somatic (somatic hybridization) และการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาส (protoplast culture) การเพาะเลี้ยงเซลล์ haploid (n) จาก microspore เพื่อผลิตพืชที่มีโครโมโซม diploid (2n) ซึ่งมีความสำคัญกับการปรับปรุงพันธุ์พืชมาก ประการแรกที่จำเป็นในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืช คือ การผลิตต้นพืชพ่อและแม่ที่เป็น homozygous line แล้วนำ homozygous line ที่เป็นแม่และพ่อ มาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงเซลล์ haploid เพื่อการปรับปรุงพันธุ์นี้ ใช้ได้ผลในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าว มันฝรั่ง แอสพารากัส นอกจากนี้การนำเซลล์ไร้ผนัง (protoplast) ของพืชต่างชนิดมารวมกันโดยวิธีการ somatic hybridization เป็นอีกวิธีการหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยเฉพาะพืชที่มีข้อจำกัดเกี่ยวกับการผสมไม่ติดของเมล็ดและการที่ลูกผสมไม่สามารถงอกได้โดยวิธีปกติ (รังสฤษดิ์, 2540)

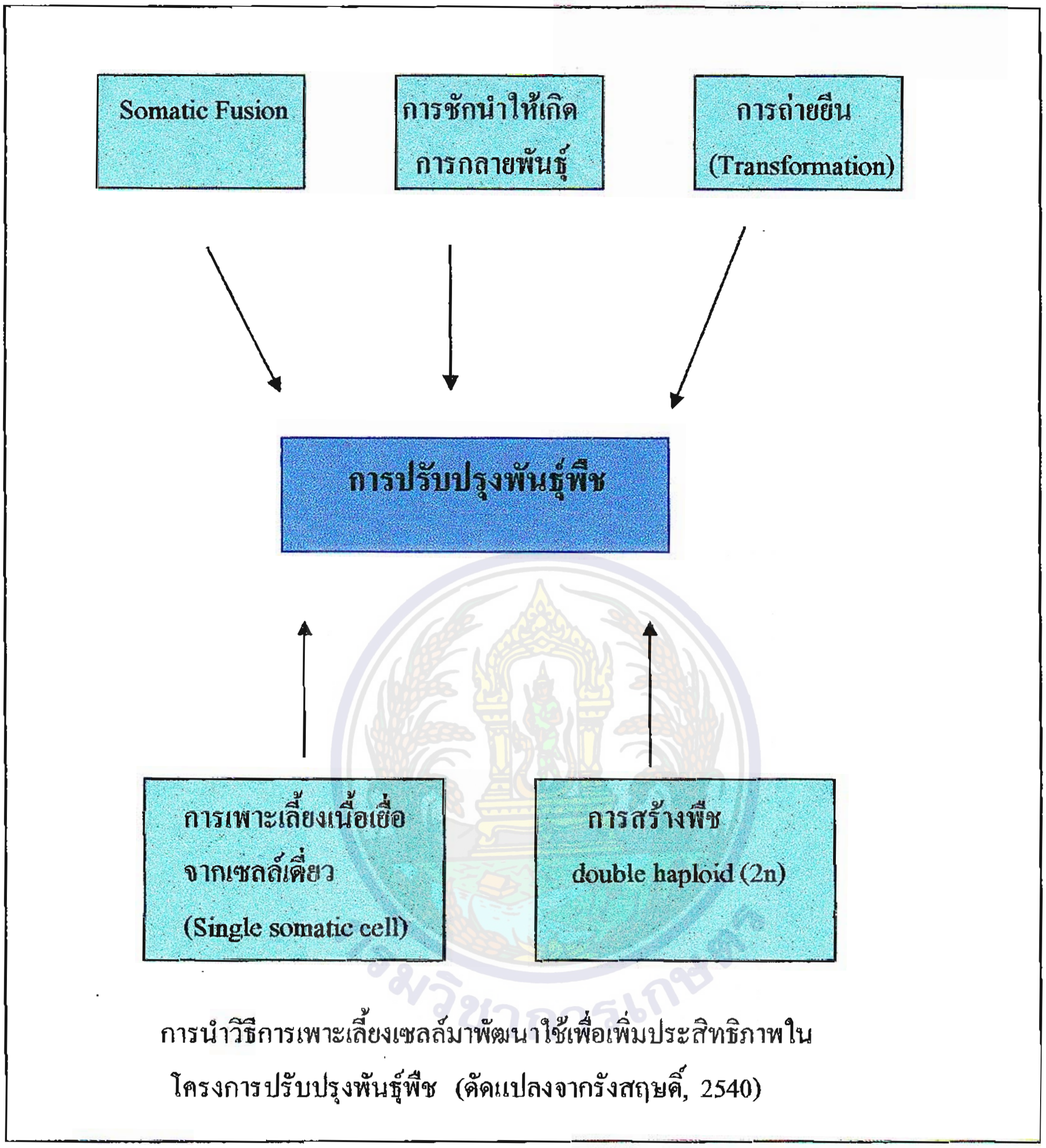
การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ สามารถนำมาพัฒนาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ พืชที่ได้จากขั้นตอนการเลี้ยงเนื้อเยื่อจะนำมาคัดเลือกเพื่อหาลักษณะที่ดีต่อไป การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาพัฒนาพันธุ์พืชมีข้อได้เปรียบ ดังนี้

1. เซลล์ร่างกาย (somatic cell) และเซลล์ไร้ผนัง หรือ โปรโตพลาส (protoplast) สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้โดยใช้พื้นที่น้อย ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับการคัดเลือกพันธุ์พืชในสภาพไร่นา

2. ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อสร้างพันธุ์ลูกผสม (hybrid) ซึ่งเกิดจากการนำสายพันธุ์แท้ (Homozygous line) 2 ชนิด มาผสมกัน สามารถประยุกต์วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการผลิตสายพันธุ์แท้ โดยนำ microspore (n) มาเพาะเลี้ยงในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนโครโมโซม (double chromosome) เพื่อให้ได้ต้นพืช 2n เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์แท้ (inbred line) พ่อหรือแม่ในการผลิตพันธุ์ลูกผสม (Bonga and von Aderkas, 1992)

3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถทำได้ตลอดปี โดยไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล ดังนั้นสามารถคัดเลือกและทดลองได้ตลอดปี

ขั้นตอนต่างๆ ของเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการพัฒนาพันธุ์พืชโดยกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ดังนี้



การนำวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์มาพัฒนาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพใน โครงการปรับปรุงพันธุ์พืช (ดัดแปลงจากรังสฤษดิ์, 2540)

การนำวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์มาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืช

สิ่งที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชต้องการเพื่อเป็นวัตถุดิบในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืช คือ ความแปรปรวนหรือความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic variability) ซึ่งความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรมพืช ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกเพื่อให้ได้ลักษณะต่างๆ ที่เป็นประโยชน์แล้วคัดเลือกลักษณะเหล่านั้นได้ ความแปรปรวนทางพันธุกรรมสามารถชักนำได้จาก การใช้สารชักนำ ได้แก่ รังสี (radiation) และสารเคมีก่อการกลายพันธุ์ (chemical mutagen)

ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์เดียว (single cell) ในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีต่างๆ ได้แก่ สารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) ส่งผลให้เซลล์ที่มีการแบ่งตัว (cell division) อย่างรวดเร็ว มีโอกาสเกิดการแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ หากต้องการให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงขึ้น สามารถชักนำโดยใช้สารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) ต่างๆ (สิรนุช, 2540) แบ่งเป็น

1. Physical mutagen ได้แก่ รังสีแกมม่า (gamma ray)
2. Chemical mutagen ได้แก่ สารเคมี ethylmethane sulfonate (EMS)

ในกรณีที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชมีความต้องการให้เกิดการแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงในเซลล์เดี่ยวที่เลี้ยงไว้ สามารถชักนำได้โดยใช้สารก่อการกลายพันธุ์เหล่านี้เพื่อให้ได้ความหลากหลายของพันธุกรรมเพื่อใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ชนิดของความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเซลล์

ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยว (single cell) สามารถเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมขึ้นได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชิ้นส่วนพืช (explant) ที่นำมาเพาะเลี้ยง สภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีส่วนสำคัญในการชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมขึ้นได้ ความแปรปรวนทางพันธุกรรมสามารถแบ่งได้ตามชนิดของเซลล์ (Bonga and von Aderkas, 1992) ได้แก่

1. Somaclonal variation เป็นความแปรปรวนที่เกิดในเซลล์ แคลลัส หรือเซลล์แขวนลอย (suspension cell)
2. Protoclonal variation เป็นความแปรปรวนที่เกิดในเซลล์ไร้ผนัง (protoplast)

1. Somaclonal variation

การเปลี่ยนแปลงหรือความแปรปรวนที่เกิดโดยธรรมชาติในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถูกค้นพบมานานแล้ว โดยพบลักษณะของต้นพืช (phenotype) ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความแตกต่างกันถึงแม้มาจากชิ้นส่วนพืชตั้งต้นเดียวกัน ลักษณะความแปรปรวนจะเกิดมากขึ้นเมื่อนำชิ้นส่วนหรือเซลล์พืชมาทำการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ในการเกษตร (negative traits) ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นนี้เป็นความแปรปรวนในระดับโครโมโซม (chromosome) และจีโนม (genome) การค้นพบความแปรปรวนทางพันธุกรรมชนิด somaclonal variation จากกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นำไปสู่การคัดเลือกสายพันธุ์พืชที่มีลักษณะแปลกๆซึ่งไม่เคยพบในประชากรนั้นๆ ดังนั้นจึงเป็นวิธีการหนึ่งในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อเพิ่มวัตถุดิบในการ

คัดเลือกพันธุ์ใหม่ การเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมสามารถทำได้โดยการชักนำให้เกิดแคลลัส เนื่องจากเซลล์แคลลัสจะมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว และมีการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วกว่าเซลล์เดี่ยวชนิดอื่นๆ ดังนั้นพืชที่พัฒนาผ่านขั้นตอนของแคลลัส จึงมีโอกาสเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงกว่าพืชที่ไม่ผ่านขั้นตอนการเกิดแคลลัส ข้อควรคำนึงในการคัดเลือกพันธุ์ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ลักษณะที่คัดเลือกได้บางลักษณะไม่คงที่ (unstable)โดยเฉพาะในสภาพไร่ อาจสืบเนื่องจากการปรับตัวของพืชต่อสภาพแวดล้อม (physiological adaptation) ลักษณะที่ว่านี้ไม่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรมพืช ซึ่งทำให้เกิดการเข้าใจผิดว่าพืชดังกล่าวเป็นพืชกลายพันธุ์ (รังสฤษดิ์, 2540) ดังนั้นจึงควรตรวจสอบพืชดังกล่าวว่ามีความแปรปรวนทางพันธุกรรมไปจากพันธุ์ดังเดิมได้โดยวิธีการทางชีวโมเลกุล การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่างๆ ได้แก่ Amplified fragment length polymorphism (AFLP) และ เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เพื่อนำมาตรวจสอบการกลายพันธุ์ สามารถทำได้และมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเป็นการตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งเล็กๆ หรือชิ้นส่วนของโครโมโซมที่สั้นๆ ซึ่งวิธีการนี้สามารถนำมาใช้ตรวจสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวได้ดี เมื่อพบความแตกต่างทางด้านโมเลกุลแล้วจึงสามารถสรุปยืนยันได้ว่าพันธุ์ดังกล่าวเป็นพันธุ์กลาย(mutant)

สาเหตุของการเกิด somaclonal variation

การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอย่างเฉียบพลัน หรือการกลายพันธุ์(mutation) ที่เกิดขึ้นเองของเซลล์ร่างกาย (somatic cells) หรือเนื้อเยื่อที่กำลังเพาะเลี้ยงก่อนการชักนำให้เกิดเป็นต้น น่าจะเป็นสาเหตุสำคัญของการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม และส่งผลให้เกิด somaclonal variation ที่แสดงออกมาให้เห็นทางฟีโนไทป์ (phenotype) และต้องเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม (genetic materials) คือ ยีนหรือดีเอ็นเอ และการเปลี่ยนแปลงกลไกการถ่ายทอดทางพันธุกรรม (Bonga and von Aderkas, 1992)

ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปเหล่านี้จะถูกถ่ายทอดไปยังรุ่นลูก โดยการสืบพันธุ์แบบมีเพศ ผ่านกระบวนการ meiosis แต่มีการเปลี่ยนแปลงบางอย่าง ที่ฟีโนไทป์ของพืชนั้นเปลี่ยนไป แต่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม และไม่สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกแล้ว การเปลี่ยนแปลงนั้นเรียกว่า epigenetic change ซึ่งหมายถึงการเปลี่ยนแปลงที่มีกลไกบางอย่างทำให้เซลล์เกิดเป็นต้นผิดปกติไป แต่มีลักษณะไม่คงที่เมื่อเทียบกับการกลายพันธุ์ ดังนั้นบ่อยครั้งเมื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นแล้ว ลักษณะดังกล่าวจะสูญหายไปในที่สุด เช่น การที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงสูญเสียความต้องการออกซินและไซโตไคนิน ไปชั่วขณะระหว่างการเพาะเลี้ยง หรือในกรณีความต้านทานของยาสูบต่อสาร cycloheximide ซึ่งเกิดขึ้นขณะเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อ เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการต่าง ๆ ทางเคมี ไปอยู่ในรูปที่ไม่ทำงาน (Wenzel, 1998)

ดังนั้นความเข้าใจถึงสาเหตุของการเกิด somaclonal variation จึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อกระตุ้นให้มีการชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมมากขึ้น และเปิดโอกาสคัดเลือกลักษณะที่ดีหรือเป็นที่ต้องการ ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากสาเหตุต่าง ๆดังนี้

1. การจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม เชื่อว่าน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญที่สุด ซึ่งอาจเป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ได้ เช่น ความแปรปรวนที่พบในต้นข้าวบาร์เลย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าเกิดจากการแตกหัก การรวมตัวใหม่ หรือการเคลื่อนย้ายชิ้นส่วนโครโมโซม เช่นเดียวกับการจับคู่กันของโครโมโซมของพืชหลายชนิดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ชี้ให้เห็นว่าเป็นผลมาจากการขาดหายไป(deletion) การกลับเปลี่ยนตำแหน่ง (inversion) การเคลื่อนย้ายและสลับย้ายของชิ้นส่วนโครโมโซมทั้งที่เป็นคู่กันและที่ไม่ได้เป็นคู่กัน (translocation/reciprocal translocation)

2. การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครมาติด (sister chromatids exchange) และการเกิด somatic crossing over ตัวอย่างในถั่วเหลืองและยาสูบที่เป็น heterozygous ความแปรปรวนมีโอกาสเกิดขึ้นได้จากการแลกเปลี่ยนยีนบน chromosome หรือ crossing over ในระยะไมโตซิส (mitosis)

3. อิทธิพลของชิ้นส่วนพันธุกรรมที่สามารถเคลื่อนย้ายได้ (transposable elements หรือ transposons) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กที่ยื่นออกมาจากดีเอ็นเอ สามารถเคลื่อนย้ายจากตำแหน่งหนึ่งในจีโนมหนึ่งไปยังอีกจีโนมหนึ่งได้อย่างอิสระ การแยกออก (excisson) และการเข้าไปเชื่อมต่อใหม่ (reinsertion) ของชิ้นส่วนเหล่านี้ ทำให้การแสดงออกของยีนหลักที่เป็นโครงสร้างทางพันธุกรรมเดิมเปลี่ยนแปลงไป อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมโดยสาเหตุดังกล่าวนี้มักไม่คงตัว (รังสฤษดิ์, 2540)

4. การเพิ่มจำนวนตัวเอง (amplification) และการลดจำนวนตัวเอง (diminution) ของยีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนที่ไม่เกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออก จะง่ายต่อการเปลี่ยนแปลงหากได้รับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น ในการคัดเลือกความต้านทานต่อสาร methotrexate ซึ่ง ไปยับยั้งการทำงาน ของเอ็นไซม์ dihydrofolate reductase

2. Protoclonal variation

Protoclonal variation เป็นความแปรปรวนทางพันธุกรรมพืชเกิดขึ้นในขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังหรือโปรโตพลาส (protoplast) เนื่องจากโปรโตพลาสมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวมีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นพืชได้ง่ายกว่าเซลล์แขวนลอย (suspention culture) (Pierik, 1987) ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสของมันฝรั่ง ความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ในต้นพืชที่พัฒนาจากโปรโตพลาส ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้เสมือนเป็นวัตถุดิบในการสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันฝรั่ง นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสของมันฝรั่ง พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในชุดของโครโมโซม โดยพบว่าเกิดพืช aneuploid และ

polyploid มากและมีอัตราการรอดตายสูงกว่า diploid ดังนั้นจึงคัดเลือกมันฝรั่งที่เป็น polyploid มาปลูกคัดเลือกต่อไป

ข้อดีของการใช้โปรโตพลาส คือ สามารถแยกได้โดยตรงเมื่อเกิดการกลายพันธุ์และได้เป็นสายพันธุ์กลายที่บริสุทธิ์ (pure clonal derived-lines) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงหรือแยกโปรโตพลาสมีความยุ่งยาก ต้องการเทคนิค และอุปกรณ์เฉพาะอย่าง และยังต้องมีการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงที่ดีอีกทั้งได้ผลในพืชน้อยชนิด เช่น มันฝรั่ง เรพสีด (rape seed) ยาสูบ แครอท และมะเขือเทศ (Bonga and von Aderkas, 1992) แต่ยังไม่ประสบผลมากนักในธัญพืชสำคัญ เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด และ ข้าว หรือในพืชตระกูลถั่วเศรษฐกิจ เช่น ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง

วิธีการแยกพันธุ์กลายจากเซลล์กลายพันธุ์ ความแปรปรวนที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถแยกได้จาก

1. การคัดเลือกโดยตรง (direct selection) เซลล์ที่ได้มีข้อได้เปรียบจากเซลล์ปกติและนิยมปฏิบัติกันมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่เกิดจากการทนทานต่อสารพิษ (toxin)
2. การคัดแยกทางอ้อม (indirect procedure) เซลล์ที่ไม่ได้ถูกคัดเลือก (ซึ่งเรียกว่า wild-type cells) สามารถแยกออกจากเซลล์กลายพันธุ์ (mutant cells) โดยดูจากการมีเมตาโบลิซึม (metabolism) เป็นปกติในสภาพอาหารเพาะเลี้ยงที่มีธาตุอาหารจำกัด (minimal medium) หรือในสภาพอุณหภูมิที่ไปจำกัดการเจริญเติบโต ซึ่งจะไปกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ เซลล์กลายพันธุ์ที่อยู่รอด (บางครั้งเรียกว่า survivors) จะถูกแยกออกมา และช่วยให้อยู่รอดต่อไปโดยนำไปเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสม เช่น ในอาหารที่เติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (supplemented medium) และอุณหภูมิที่เหมาะสม วิธีการนี้ดัดแปลงมาจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์และเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่ยังไม่มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากนัก นอกจากนี้ยังไม่สามารถกำจัดเซลล์ที่เป็น wild-type ได้ (รังสฤษดิ์, 2540)
3. การทดสอบกลุ่มเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์เดี่ยวๆ ที่คัดแยกออกมา (single-cell-derived colonies นิยมใช้กันมากในการแยกหาสายพันธุ์ auxotrophic linesจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาส

การคัดแยกเซลล์กลายพันธุ์นิยมทำในเซลล์แขวนลอย หรือนำเซลล์แขวนลอยมากระจายลงบนจานเพาะเลี้ยง มากกว่าที่จะทำในการเพาะเลี้ยงแคลลัส โปรโตพลาสจะเหมาะต่อการชักนำการกลายพันธุ์มากกว่าแคลลัสหรือเซลล์แขวนลอย เนื่องจากสามารถแยกเซลล์เดี่ยวๆ ได้ทันทีหลังการใช้สารก่อกลายพันธุ์ (mutagenic treatments) ซึ่งต่างจากกรณีแคลลัสหรือเซลล์แขวนลอยที่เซลล์มักเกาะกันอยู่เป็นกลุ่มก้อน การเชื่อมเกาะของพลาสมาทำให้ยากที่จะคัดแยกเซลล์กลายพันธุ์ออกจากเซลล์ปกติ

การนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมมาพัฒนาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

การคัดเลือกพันธุ์กลายจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ คือ สามารถแยกลักษณะกลายพันธุ์ที่มีคุณค่า เช่น การสร้างกรดอะมิโนมากกว่าปกติ ความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดวัชพืช และความทนทานต่อเกลือ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชที่การเกิดเป็นต้นจากเซลล์เดี่ยวๆ ในธรรมชาติเป็นไปไม่ได้นอกจากการเพาะเลี้ยงจากเซลล์หรือดัพภะเท่านั้น นอกจากลักษณะที่มีคุณค่าแล้ว การกลายพันธุ์ยังทำให้เกิดลักษณะที่ไม่ต้องการได้ด้วย ซึ่งไม่ถือว่าเป็นข้อเสียแต่เป็นการเปิดโอกาสให้ได้ความแปรปรวนทางพันธุกรรมเช่นกัน

ประโยชน์ของการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์มีหลายประการ เช่น การคัดเลือกพันธุ์เพื่อต้านทานโรค การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานโรคสามารถทำได้ในพืชหลายชนิด โดยเริ่มจากการชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรเซลล์พืชที่เลี้ยงไว้ แล้วคัดเลือกเซลล์เหล่านั้นบนอาหารคัดเลือกที่มีส่วนผสมของสารพิษ (toxin) ที่ผลิตจากเชื้อสาเหตุของโรค เซลล์ที่สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณบนอาหารคัดเลือกที่มีสารพิษจากเชื้อโรค แสดงถึงความทนทานหรือต้านทานต่อเชื้อสาเหตุของโรคพืชดังกล่าว จากนั้นจึงนำกลุ่มเซลล์เหล่านั้นมาชักนำให้เกิดเป็นต้นพืช เพื่อคัดเลือกและทดสอบลักษณะต่างๆตลอดจนผลผลิตในสภาพไร่นาต่อไป ตัวอย่างพันธุ์กลาย (Mutant) ที่คัดแยกได้ ได้แก่

1. ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ

มีการศึกษากันมาก ในหัวข้อของความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ streptomycin ในสภาพความเข้มข้นต่ำ (200-500 $\mu g\ ml^{-1}$) streptomycin เป็นสารมีผลยับยั้งการมีสีเขียวของเซลล์และเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง ในยาสูบ *N. tabacum* และ *N. sylvestris* สายพันธุ์กลายที่ต้านทานต่อ streptomycin เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี streptomycin เนื้อเยื่อก็ยังคงมีสีเขียว (Pierik, 1987)

นอกจากนี้ ยังพบสายพันธุ์กลายที่ต้านทานต่อ lincomycin ในยาสูบ *N. plumbaginifolia* และ *N. sylvestris* โดยคัดเลือกจากการจางสีเขียวเช่นกัน ความต้านทานนี้ถ่ายทอดผ่านเซลล์แม่ทางคลอโรพลาส ในยาสูบ *N. sylvestris* มีผู้พบสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อ kanamycin และ chloramphenicol แต่รายละเอียดและลักษณะความต้านทานยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ความต้านทานนี้จะไม่คงตัว และมีลักษณะด้อยแฝงอยู่ถ้ามีการผสมระหว่างเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ด้วยกัน

2. ความต้านทานหรือทนทานต่อสารเคมีกำจัดวัชพืช

ความต้านทานหรือความทนทานต่อสารเคมีกำจัดวัชพืชเกิดได้หลายระดับ ทั้งที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดูดซับ (uptake mechanisms) การเคลื่อนย้าย (translocation) และการทำลายความเป็นพิษของสาร (detoxification) การเลือกทำลายของสาร (selectivity) มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด และพบว่ายีนที่ควบคุมลักษณะทนทานหรือต้านทานดังกล่าว เป็นผลมาจากการปรับตัวของพืชในธรรมชาติ ซึ่งพบได้ในพืชหลายชนิด (Pierik, 1987) ซึ่งยีนที่ควบคุมนี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช สายพันธุ์ และชนิดของสารเคมีที่ใช้ เช่น ความต้านทานต่อสาร diuron ในข้าวบาร์เลย์ ถูกควบคุมด้วยยีนข่ม 3 คู่ ในข้าวโพดพบว่าเป็นยีนด้อยในนิวเคลียส 1 คู่ ขณะที่ในเรพสีด (*Brassica campestris*) ความต้านทานอยู่ในคลอโรพลาส และถ่ายทอดผ่านเซลล์แม่ (maternal inheritance) ความต้านทานต่อสาร picloram ในยาสูบควบคุมด้วยยีนข่ม 1 คู่ในนิวเคลียส ขณะที่ความต้านทานต่อ bentazone ในยาสูบที่เป็นเฮพลอยด์พบว่าควบคุมด้วยยีนด้วย 1-2 คู่ (รังสฤษดิ์, 2540)

การคัดเลือกความต้านทานและทนทานต่อสารเคมีกำจัดวัชพืชจากแหล่งพันธุกรรมโดยตรงอาจไม่พบพันธุกรรมดังกล่าว จึงจำเป็นต้องใช้วิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation) ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเปิดโอกาสให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะอื่น ๆ เหมือนต้นดั้งเดิมแต่ต่างกันที่มีความทนทานต่อสารเคมีเพิ่มขึ้นมา สายพันธุ์ที่ได้นอกจากช่วยลดค่าใช้จ่ายในการใช้สารเคมี ยังเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืช ข้อดีของการคัดเลือกพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อเทียบกับการคัดเลือกพืชในสภาพไร่ คือ สามารถกำหนดปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีในการคัดเลือก และควบคุมประสิทธิภาพได้ ขณะที่ในสภาพไร่การควบคุมความสม่ำเสมอของสารเคมีเป็นไปได้ยากมาก นอกจากนี้ สภาพดินฟ้าอากาศและการจัดการในแต่ละพื้นที่ซึ่งแตกต่างกัน อาจส่งผลต่อการคัดเลือกพืชที่มีความทนทานต่อสารเคมีที่แตกต่างกันได้

3. ความทนทานต่อเกลือและการขาดน้ำ

การคัดเซลล์กลายพันธุ์เพื่อทนทานต่อการขาดน้ำ (water stress) หรือทนทานต่อสภาพแห้งแล้ง (drought) ทำได้โดยใช้สารเคมีบางชนิด เช่น polyethylene glycol (PEG) อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่เกิดขึ้นคือ แต่ละเซลล์มีคุณสมบัติในการปรับเปลี่ยนความสามารถในการดูดน้ำที่ต่างกัน (osmoregulation adjustment) ดังนั้นวิธีคัดเลือกจะต้องมีประสิทธิภาพและเหมาะสมเพื่ออำนวยสภาพที่จะเป็นประโยชน์เฉพาะกับเซลล์ที่ทนทานและควบคุมโดยกลไกทางพันธุกรรมเท่านั้น

ความเป็นพิษของเกลือโดยเฉพาะโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เป็นปัญหาสำคัญอย่างมากในการปลูกพืชในเขตแห้งแล้งที่มีการสะสมเกลือในดินเพิ่มขึ้นทีละน้อยหลังจากการให้น้ำชลประทานอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียใต้ มีพื้นที่ดินเค็ม ประมาณ 54 ล้านเฮกตาร์ หรือกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่เพาะปลูก การคัดเลือกสายพันธุ์ทนทานดังกล่าวมีผู้

ศึกษาไว้ในพืชหลายชนิด ส่วนใหญ่แล้วพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะทนทานต่อเกลือ โซเดียมคลอไรด์นี้ ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดและพบว่าการกระจายตัวของลูกที่ได้ จะไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล

4. ความทนทานหรือต้านทานต่อโรค

โรคของพืชแต่ละชนิดเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุแตกต่างกัน เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไมโครพลาสมา ส่วนใหญ่แล้วการคัดแยกเซลล์หรือสายพันธุ์ของพืชที่ทนทานหรือต้านทานต่อโรค นิยมใช้วิธีการคัดเลือกทางอ้อมเพื่อให้ทนทานต่อสารเคมีที่เป็นพิษที่เชื้อผลิต (toxic chemicals) หรือสารพิษ (toxins) ที่เชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้นสร้างหรือปลดปล่อยออกมาทำอันตรายต่อพืช สารเหล่านี้

ได้มาจากกระบวนการเมตาโบลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของพืชและเชื้อสาเหตุและความต้านทานต่อสารเหล่านี้มักส่งผลควบคู่ไปกับความต้านทานของพืชที่มีต่อเชื้อสาเหตุ

การคัดเลือกพันธุ์พืชให้ต้านทานโรคโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีรายงานเริ่มมาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย แล้วชักนำให้เกิดเป็นต้นอ่อน พบว่า ต้นอ้อยที่ได้จากวิธีนี้มีความต้านทานต่อโรค Fiji virus และต่อมามีการคัดเลือกเซลล์ที่ต้านทานต่อเชื้อ *Helminthosporium succhari* การคัดเลือกสายพันธุ์ต้านทานโรคโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

1. การเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคพืช (pathogen) ร่วมกับพืชอาศัย (host) ในสภาพหลอดทดลองแล้วคัดเลือกพืชที่ต้านทานเพื่อทำการทดสอบลำดับต่อไป ได้แก่ การเลี้ยงพืชจำพวกองุ่น *Vitis vinifera* ร่วมกับเชื้อสาเหตุ *Plasmopara viticola* นอกจากนี้สามารถตรวจสอบยืนต้านทานโรคพืชได้

2. การเพาะเลี้ยงแคลลัสร่วมกับเชื้อสาเหตุโรคพืช วิธีการนี้มีการนำเชื้อสาเหตุที่ความเข้มข้นต่างๆ ปลูกเชื้อลงบนแคลลัสเพื่อคัดเลือกกลุ่มแคลลัสที่มีความต้านทานและอยู่รอดหลังจากการเข้าทำลายของเชื้อโรค จากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณแคลลัสพืชเพื่อชักนำให้เป็นต้นพืชต่อไป (Pierik, 1987)

3. การสกัดสารพิษ (toxin) จากเชื้อสาเหตุโรคพืชมาเลี้ยงพร้อมกับแคลลัสหรือพืชในสภาพหลอดทดลอง จากนั้นจึงทำการคัดเลือกเซลล์หรือพืชที่อยู่รอดเป็นปกติเพื่อทำการเพิ่มปริมาณต่อไป ซึ่งวิธีการนี้ใช้ได้ผลแม่นยำ และสะดวกในการทดลอง การใช้วิธีการนำสารพิษมาคัดเลือกหาพืชหรือเซลล์ต้านทานโรคพืชที่ประสบความสำเร็จ ได้แก่ มันฝรั่ง สามารถคัดเลือกสายพันธุ์มันฝรั่งที่ต้านทานต่อเชื้อ *Fusarium sulfurium* *F. coerulum* และ *Phytopthora infestans* คัดเลือกในสภาพหลอดทดลองและทำการทดสอบในสภาพไร่เพื่อการยืนยันความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อโรคในสภาพแปลงปลูก ในสภาพไร่มีปัจจัยจ่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการเข้าทำลายของเชื้อโรคสาเหตุ ซึ่งผลที่ได้จากการทดสอบในสภาพห้องปฏิบัติการและในสภาพไร่นา สามารถนำมาหาความสัมพันธ์ (correlation) ทางสถิติได้ ดังนั้นการสกัดสารพิษเพื่อใช้ในการคัดเลือกเซลล์ที่ต้านทานควรมีการศึกษาเพื่อให้แน่ชัดว่าสารพิษดังกล่าวเป็นชนิดเดียวกับที่เป็นอันตรายกับต้นพืชอาศัย (host) มิฉะนั้นจะทำให้การประเมินความต้านทานในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพแปลงปลูกแตกต่างกัน

ตัวอย่างของการคัดเลือก ได้แก่ การคัดเลือกเซลล์ต้านทานต่อสารพิษ T-toxin ที่เกิดจากเชื้อรา *Helminthosporium maydis* สาเหตุของโรคไหม้ (corn blight) ในข้าวโพด โดยเพาะเลี้ยงแคลลัสจากคัพภะในอาหารที่เติมสารพิษนี้ ต้นพ่อเป็นหมันและอ่อนแอต่อสารดังกล่าว เกิดเซลล์ที่ไม่เป็นหมันและต้านทานขึ้น ทั้งสองลักษณะนี้ถ่ายทอดพันธุกรรมผ่านทางต้นแม่ อย่างไรก็ตามมีข้อโต้แย้งถึงความไม่คงตัวของพันธุกรรมต้านทานที่ถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกด้วย ในพืชอื่น ๆ เช่น เรพลีด *(Brassica napus)* มีการคัดเลือกเซลล์ต้านทานต่อเชื้อ *Phoma lingam* โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารที่กรองได้จากเนื้อเยื่อใบที่ถูกเชื้อเข้าทำลายและพบสายพันธุ์กลายที่ต้านทาน (เกิด somaclonal variation) ในมันฝรั่ง

(*Solanum tuberosum)* ที่คัดเลือกแคลลัสให้ทนทานต่อสารพิษชนิดที่ไม่เฉพาะเจาะจงในการทำลายพืช (non-specific toxin) ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytopthora infestans* สาเหตุของโรค potato late blight ได้สำเร็จ

5.สายพันธุ์ที่มีความแปรปรวนในลักษณะพัฒนาการอันเนื่องจากสภาพของการเพาะเลี้ยง ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของแครอท สามารถชักนำให้มีการสร้างคัพภะที่ไม่ได้เกิดจากกระบวนการสืบพันธุ์โดยใช้เพศตามปกติ (somatic embryos หรือ embryoids) จำนวนมากได้ ซึ่งเปิดโอกาสให้สามารถแยกหาสายพันธุ์ที่มีความแปรปรวน โดยเฉพาะในกรณีใช้อุณหภูมิชักนำ เช่น การย้ายคัพภะจากอุณหภูมิปกติที่ 24 องศาเซลเซียส ไปไว้ที่ 32 องศาเซลเซียส จะเกิดสายพันธุ์ที่ตอบสนองต่อ 2, 4-D ต่างไปจากเดิม (รังสฤษดิ์, 2540)

กรมวิชาการเกษตร

6 การใช้รังสีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำการกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในเซลล์ อาจเกิดได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในยีน การเพิ่มหรือหายไปของยีน ที่เรียกว่าการกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) หรือเกิดจากการแลกเปลี่ยนส่วนของโครโมโซม รวมทั้งการสูญหายหรือการเพิ่มเข้ามาของโครโมโซมที่ครอบคลุมมากกว่ายีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของโครโมโซม (chromosome mutation) การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นมีบทบาทต่อวิวัฒนาการของพืช ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งมนุษย์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือก ผสมพันธุ์ สร้างพืชพันธุ์ใหม่ให้มีลักษณะตามที่ต้องการ การกลายพันธุ์เกิดขึ้นโดยไม่ทราบสาเหตุที่แน่นอน ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยภายในพืช สภาพทางสรีระ สภาพแวดล้อมต่างๆ เช่นอุณหภูมิ ธาตุอาหาร รังสีในสิ่งแวดล้อม เช่น การสลายตัวของแร่ยูเรเนียมที่กระจายทั่วไปบนในโลก หรือในขบวนการเมทาบอลิซึมในพืชเองที่ก่อให้เกิดสารเมทาบอไลต์ เช่น กรดอะมิโน อัลคาลอยด์ ควิโนน เป็นต้น การกลายพันธุ์ลักษณะเช่นนี้ เรียกว่า การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ นอกจากนี้ยังมีวิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชขึ้นได้ เช่น การใช้รังสี และสารเคมี การชักนำให้กลายพันธุ์โดยเกิด somaclonal variation จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือการสอดแทรก DNA เข้าไปในพืช หรือที่เรียกพืชไบโอเทค ซึ่งในบทนี้จะกล่าวเฉพาะการใช้รังสี

การใช้รังสีชักนำให้กลายพันธุ์

รังสีที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์มีหลายชนิด ได้แก่ รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา และรังสีนิวตรอน ทั้ง 3 ชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม ionizing radiation เนื่องจากมีคุณสมบัติทำให้เกิด ionization ในอะตอมหรือโมเลกุลที่ได้รับรังสี ส่วนรังสีอุลตราไวโอเลต มีการใช้ในพืชน้อยเนื่องจากมีอำนาจการทะลุทะลวงต่ำ

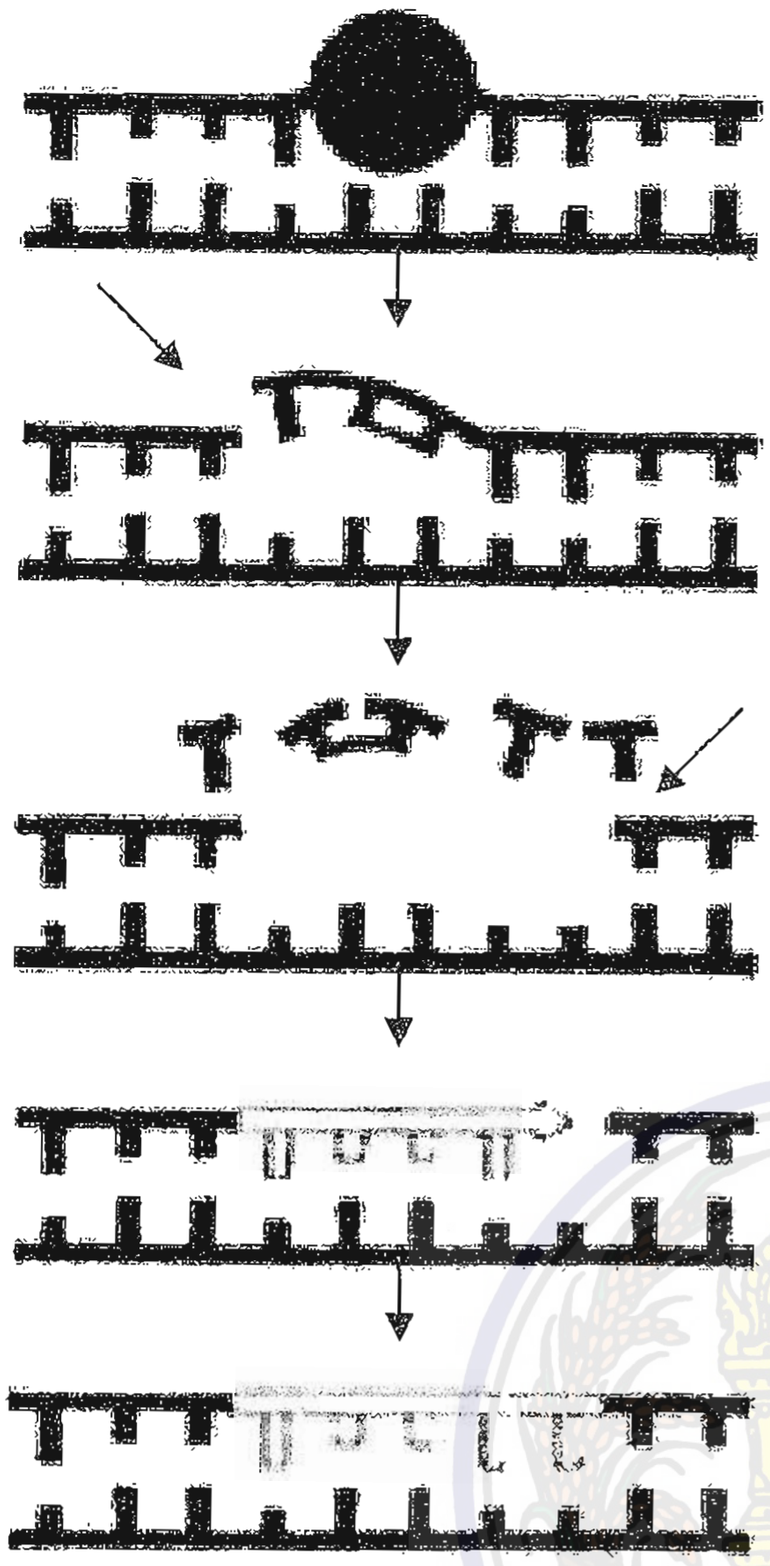
การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่อได้รับรังสี

เซลล์พืชประกอบด้วยชีวโมเลกุลต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อการเป็นโครงสร้างและการทำหน้าที่ต่างๆ ภายในเซลล์ ชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecule) ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเซลล์พืช เป็นแหล่งสะสมอาหารไว้ใช้ โปรตีนทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ เอ็นไซม์ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ในปฏิกิริยาที่สำคัญต่างๆ ภายในเซลล์ ทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนและแอนติบอดี (antibody) คอยกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามาในเซลล์ ไลพิด (lipid) มีหน้าที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างต่างๆ เช่น เป็นเยื่อหุ้มเซลล์หรือเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ (organale) ต่างๆ ภายในเซลล์ กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรมภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังมีสารอนินทรีย์ต่างๆอยู่ด้วย เช่น โซเดียม

โปแตสเซียม แมกนีเซียม เป็นต้น และโมเลกุลที่มีมากที่สุดในเซลล์ คือ น้ำมีปริมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์

เมื่อเซลล์ได้รับรังสีต่างๆ เช่น รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา หรือรังสีนิวตรอน รังสีจะถ่ายพลังงานให้กับโมเลกุลต่างๆของเซลล์ โดยโมเลกุลจะแตกตัวเป็นไอออน (ion) และฟรีเรดิคอล (free radical) ต่างๆ มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลใหม่ มีการทำปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างกัน เกิดเป็นโมเลกุลที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆไปจากเดิม รังสีสามารถถ่ายพลังงานให้กับโมเลกุลต่างๆได้โดยตรง (direct action) หรือส่งผ่านทางอ้อม (indirect action) ในการส่งผ่านโดยทางอ้อม รังสีถ่ายพลังงานให้กับโมเลกุลของน้ำในเซลล์ ทำให้โมเลกุลของน้ำแตกตัวเป็นไอออนและฟรีเรดิคอลต่างๆ เรียกรวมกันว่า radiolytic product โมเลกุลนี้จะเป็นอันตรายกับเซลล์ ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนหรือเอ็นไซม์ต่างๆ เมื่อคุณสมบัติของโมเลกุลเปลี่ยนแปลง จะส่งผลต่อเซลล์ที่โมเลกุลนั้นทำหน้าที่อยู่ เช่น การแบ่งเซลล์ช้า ถ้ารุนแรงมากเซลล์อาจตายได้ (สิรนุช, 2540)

ในเซลล์มีกระบวนการลดอันตรายจากรังสีหรือสารเคมีก่อกลายพันธุ์ (chemical mutagen) โดยการซ่อมแซม DNA (DNA repair) ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันของกลุ่มเอ็นไซม์ เช่น endonuclease โดยเริ่มตัดส่วน นิวคลิโอไทด์ (nucleotide) ที่เสียหายออก แล้ว exonuclease จะย่อยนิวคลิโอไทด์นั้น จากนั้น polymerase จะสังเคราะห์นิวคลิโอไทด์ใหม่ทดแทนส่วนที่ตัดออก ความเสียหายของ DNA ถ้ารุนแรงมาก จะทำให้ตาย นอกจากนี้ในกระบวนการซ่อมแซมยังเกิดการผิดพลาดขึ้นได้ เช่น การซ่อมแซมที่นำเอานิวคลิโอไทด์ที่ต่างจากเดิมเข้ามา หรือการเชื่อมต่อผิดพลาดทำให้เกิดการหายไปของ DNA (deletion) หรือเกิดการเชื่อมต่อสลับที่ (inversion) หรือมีการเชื่อมต่อระหว่างส่วนของ DNA ที่ต่างโมเลกุลกัน (translocation) การผิดพลาดที่เกิดขึ้นนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม เรียกว่า การกลายพันธุ์ (mutation)



Thymine dimer ทำให้
DNA molecul เปลี่ยนแปลง

Endonuclease ตัดสาย DNA ที่เสียหาย

Exonuclease ย่อยสลาย nucleotide

Polymerase สังเคราะห์ nucleotide
สายใหม่

DNA ligase เชื่อมต่อ DNA สายใหม่ เข้ากับ
DNA สายเดิม

ขั้นตอนการซ่อมแซม DNA (สิรนุช , 2540)

การกลายพันธุ์เป็นความเสียหายทางชีวเคมีที่สามารถถ่ายทอดได้โดยผ่านเซลล์ที่แบ่งตัว รังสีแกมมา รังสีนิวตรอน และรังสีเอกซ์ ทำให้เกิดความผิดปกติต่างๆขึ้นกับโครโมโซม ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ เช่น การแตกหัก (break) การเชื่อมต่อโครโมโซม (bridges) การสลับชิ้นส่วน (inversion) การย้ายตำแหน่ง (translocation) การขาดหายไป (deletion) เป็นต้น ผลจากรังสีที่เห็นได้ในลักษณะอื่นๆ เช่น การขัดขวางการสังเคราะห์ DNAใน ระยะ interphase ขัดขวางกระบวนการ oxidative phosphorylation และการทำลายโครงสร้างของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอ็นไซม์ ทำให้เกิดความล่าช้าในการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิส (mitosis) และไมโอซิส (meiosis) รวมทั้งการลดความอยู่รอดของเซลล์และกระบวนการสืบพันธุ์ของเซลล์ได้ (Wenzel, 1998)

การกลายพันธุ์ที่เกิดโดยการชักนำโดยรังสีก็เช่นเดียวกับที่เกิดตามธรรมชาติ หากการเปลี่ยนแปลงมีขอบเขตอยู่ภายในยีน เช่น การหลุดหายไป หรือเพิ่มเข้ามาของเบส หรือการเข้าแทนที่ของเบสตัวหนึ่งด้วยเบสตัวอื่น เช่น เบส purine แทนที่ด้วย pyrimidine เป็นต้น การกลาย

พันธุ์ดังกล่าวนี้ เรียกว่า การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) ส่วนการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากการหลุดหายไปของส่วนของโครโมโซมที่ครอบคลุมหลายยีน หรือเกิดการเปลี่ยนในลำดับของยีนบนโครโมโซม หรือการเพิ่มเข้ามาของส่วนของโครโมโซม หรือมีการแลกเปลี่ยนส่วนและเชื่อมต่อส่วนของโครโมโซมระหว่างโครโมโซมสองโครโมโซมหรือมากกว่า ซึ่งทั้งหมดนี้ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่เรียกว่า การกลายพันธุ์ของโครโมโซม (chromosome mutation)

การเปลี่ยนแปลงทาง phenotype เป็นสิ่งชี้ว่า สิ่งมีชีวิตนั้นมีการกลายพันธุ์ขึ้น เช่น การกลายพันธุ์ที่เกิดในพืชบางชนิดก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในรูปทรงของต้น เปลี่ยนแปลงสีของดอก จำนวนและขนาดของผล อายุการเก็บเกี่ยวเร็วขึ้นหรือช้าลง ซึ่งการกลายพันธุ์ชนิดนี้สามารถคัดเลือกนำมาใช้ประโยชน์ได้ง่าย แต่การกลายพันธุ์บางชนิดก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype เพียงเล็กน้อย ไม่ปรากฏให้เห็นชัดเจนต้องใช้วิธีการเฉพาะในการแยกพันธุ์กลายและคัดเลือกนำพันธุ์กลายที่ต้องการมาใช้ประโยชน์ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงในลักษณะปริมาณ (quantitative trait) เช่น องค์ประกอบทางเคมีต่างๆของพืช ปริมาณโปรตีน ไขมัน น้ำตาล ประสิทธิภาพในการปรุงอาหารและการเก็บสะสมอาหารของพืชและผลผลิต การแยกพันธุ์กลายจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือวิเคราะห์โดยเฉพาะ ต้องอาศัยหลักสถิติเข้าช่วยในการวิเคราะห์ และต้องใช้จำนวนพืชหลายต้นในการตรวจสอบ แต่ในปัจจุบันใช้การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ช่วยในการคัดเลือก

การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลง genotype อาจเป็นการกลายพันธุ์จากยีนเด่น (dominant gene) เป็นยีนด้อย (recessive gene) คือ จาก A เป็น a หรืออาจเป็นการกลายพันธุ์ของยีนด้อยเป็นยีนเด่น คือ จาก a เป็น A หากเป็นการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมลักษณะด้อยเกิดขึ้นในพืชที่เป็น homozygous ผลของการกลายพันธุ์ไม่แสดงออกในพืชต้นนั้นทันที สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ในรุ่นต่อไปเมื่อนำพืชจากต้นนั้นไปปลูก การกลายพันธุ์เกิดขึ้นเพียงยีนเดียวในพืชที่เป็น homozygous (AA เป็น Aa) ยีนเด่นยังคงข่มการแสดงออกของยีนด้อยไว้ ในพืชที่ผสมตัวเองเมื่อมีการสร้างเมล็ด มีการแยกตัวและการรวมตัวของยีน จะได้ต้นพืชที่เป็นพันธุ์กลาย (aa) เกิดขึ้นในรุ่นต่อไป โอกาสของการกลายพันธุ์ในส่วนคู่ยีน (AA เป็น aa) เกิดขึ้นพร้อม กันมีน้อยมาก หากเกิดขึ้นลักษณะด้อยจะแสดงออกในพืชต้นนั้นทันที ทำให้แยกพันธุ์กลายออกมาได้ สำหรับการกลายพันธุ์ของยีนด้อยเป็นยีนเด่น (a เป็น A) มีโอกาสเกิดขึ้นน้อยมาก ถ้าเกิดขึ้นก็จะแสดงลักษณะทางฟีโนไทพ์ออกมาตามลักษณะที่ยีนเด่นควบคุมอยู่

ส่วนของพืชที่นำมาฉายรังสีและวิธีการฉายรังสี

ทุกๆ ส่วนของพืชที่ใช้ขยายพันธุ์ได้ เช่น เมล็ด หัว ราก ไหล กิ่งทาบ กิ่งตอน กิ่งปักชำ พืชทั้งต้น หรือเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (tissue culture) สามารถนำมาฉายรังสีได้ทั้งสิ้น การพิจารณา

เลือกส่วนใดมาฉายรังสีขึ้นอยู่กับชนิดของพืช วิธีการขยายพันธุ์ และความสะดวกในการนำมาฉายรังสี ความสะดวกในการปลูก ดูแลรักษา เป็นต้น

1. การฉายรังสีเมล็ด

เมล็ดเป็นส่วนที่นิยมใช้กันมากที่สุดเพราะความสะดวกในขั้นตอนการฉายรังสีหรือให้ทรีตเมนต์ (treatment) เนื่องจากเมล็ดสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมได้หลายๆอย่าง สามารถให้ทรีตเมนต์กับเมล็ดได้ในหลายสภาพ เช่น สภาพแห้ง สภาพเปียก มีอ๊อกซิเจนหรือไม่มีอ๊อกซิเจนในขณะฉายรังสี วิธีการฉายรังสีเมล็ดมีขั้นตอนการดำเนินงาน ดังนี้

1.1 การตรียมเมล็ดก่อนฉายรังสี

คัดเลือกเมล็ดที่สะอาด มีความงอกดี นำไปหาความชื้นโดยวิธีการมาตรฐาน ประกอบด้วยการนำเมล็ดมาบดให้ละเอียดและชั่งน้ำหนักไว้ (เป็นน้ำหนักก่อนทำให้แห้ง) จากนั้นนำเมล็ดไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วมาทำให้เย็นในตู้ปรับความชื้น (desiccator) ที่มีสารดูดความชื้น เช่น แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) หรือแคลเซียมออกไซด์ (CaO_2) ทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที จึงนำมาชั่งน้ำหนักตัวอย่างใหม่ จดบันทึกน้ำหนักไว้ คำนวณหาความชื้นในเมล็ดได้ด้วยสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้นของเมล็ด} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างบดก่อนอบแห้} - \text{น้ำหนักตัวอย่างบดหลังอบแห้ง}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างบดก่อนอบแห้ง}}$$

จดบันทึกค่าความชื้นทุกครั้งที่ฉายรังสี เนื่องจากความชื้นมีผลทางอ้อมต่ออัตราการกลายพันธุ์และการอยู่รอดของต้นพืชภายหลังการฉายรังสี ความชื้นที่เหมาะสมของเมล็ด คือ 12-14 เปอร์เซ็นต์ ที่ความชื้นระดับนี้ช่วยลดผลข้างเคียงที่ไม่พึงปรารถนา ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างรังสีกับอ๊อกซิเจนที่มีอยู่ในเมล็ด ให้ผลที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาระหว่างรังสีกับสารพันธุกรรม หรือ DNA เป็นส่วนใหญ่ หากเมล็ดมีความชื้นต่ำมากอาจจำเป็นต้องปรับความชื้นในเมล็ดให้สูงขึ้นวิธีการปรับความชื้นในเมล็ด ทำได้โดยการนำเมล็ดไปใส่ในตู้ปรับความชื้น ที่มีส่วนผสมของน้ำและกลีเซอรอล (glycerol) ในสัดส่วนต่างๆ เพื่อให้ได้ความชื้นตามต้องการ ซึ่งอาจมีการปรับเปลี่ยนได้ตามชนิดของพืช ซึ่งนักวิจัยต้องมีตารางปรับความชื้นเฉพาะของพืชที่เกี่ยวข้อง ปริมาณเมล็ดที่ใส่ในเดซิคเคเตอร์ไม่ควรเกิน 1 ใน 3 ของปริมาตรของสารละลายกลีเซอรอล

1.2 การกำหนดปริมาณรังสีที่ใช้

พืชแต่ละชนิดมีความไวต่อรังสี (radiosensitivity) แตกต่างกันไป ความไวหรือต้านทานต่อรังสีขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ส่วนหนึ่งควบคุมโดยยีน สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ การพิจารณาใช้รังสีในปริมาณเท่าใด นักวิจัยอาจค้นคว้าจากผลงานวิจัยที่ผู้อื่นทำไว้

หรือที่แนะนำโดยทบวงการพลังงานปรมาณูระหว่างประเทศ (สิรนุช, 2540) มีข้อมูลงานวิจัยค่อนข้างมากในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยรังสี ซึ่งช่วยให้นักวิจัยได้ทราบข้อมูลก่อนทำการวิจัย นักวิจัยสามารถคาดปริมาณรังสีที่เหมาะสมได้โดยทำการทดลองเพื่อหาค่า LD_{50} (50% Lethal Dose หรือ Lethal Dose-50) หรือ GR_{50} (50% Growth Reduction) ของเมล็ดพืชที่นำมาฉายรังสีได้

วิธีการเริ่มด้วยการนำเมล็ดพืชมาฉายรังสีในปริมาณต่างๆ กัน ตั้งแต่ปริมาณต่ำ (low dose)จนถึงปริมาณรังสีที่สูงมากๆ ทำให้เกิดการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ปลูกเมล็ดในกระบะเพาะชำ โดยปลูกเป็นแถว จำนวนแถวตามปริมาณรังสี เช่น 0(ไม่ฉายรังสี) 10 20 30 40 50 กิโลแรด (krad) ฯลฯ เมื่ออายุประมาณ 30 วัน หาเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของต้นกล้าที่ปริมาณรังสีต่างๆ กัน คิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของ control (พวกที่ไม่ได้ฉายรังสี) ปรับให้จำนวนต้นที่อยู่รอดของ controlเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ หาค่าความสัมพันธ์ของปริมาณรังสีกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของต้นกล้า โดยให้ปริมาณรังสีอยู่บนแกน X เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดอยู่บนแกน Y จากจุด 50 เปอร์เซ็นต์ของแกน Y ลากเส้นออกมาตัดเส้นเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดและลากลงมาตัดค่าของปริมาณรังสีในแกน X ที่จุดตัดบนแกน X เป็นปริมาณรังสีที่ทำให้พืชอยู่รอด 50 เปอร์เซ็นต์ หรือตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เรียกปริมาณรังสีนี้ว่า ค่า LD_{50} การหาค่า GR_{50} ก็ทำได้เช่นเดียวกัน โดยเปลี่ยนจากการวัดเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของต้นกล้ามาเป็นการวัดการเจริญเติบโต เช่น วัดความสูงของต้นกล้า น้ำหนักสดของต้นกล้า หรือน้ำหนักแห้งของต้นกล้า เป็นต้น เช่น ปริมาณรังสีที่ทำให้ความสูงลดลงครึ่งหนึ่งของ control หรือค่า GR_{50} ปริมาณรังสีที่เหมาะสมที่แนะนำให้ใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ คือ ปริมาณรังสีที่ทำให้เกิดการตายกับต้นพืช 30-50เปอร์เซ็นต์ (LD_{30}-LD_{50}) ตัวอย่างในการหาค่า LD_{50} ของถั่วเขียวพันธุ์อู่ทอง 1 ได้ฉายรังสีแกมมากับเมล็ดถั่วเขียวในปริมาณรังสี 0 (control) 30, 60, 90 และ 120 กิโลแรด ใช้เมล็ดจำนวน 100 เมล็ดต่อปริมาณรังสี ทำ 3 ซ้ำ นำเมล็ดมาปลูกไว้เป็นแถวในกระบะเพาะชำ นับจำนวนต้นพืชในแต่ละปริมาณรังสีแต่ละซ้ำ เมื่ออายุ 30 วัน

LD_{50} คือปริมาณรังสีที่ทำให้เกิดการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ หรือมีอัตราการอยู่รอด 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 75 กิโลแรด ดังนั้น ปริมาณรังสีที่เหมาะสมในการปรับปรุงพันธุ์โดยการกลายพันธุ์ในถั่วเขียว คือ 40-75 กิโลแรด (สิรนุช, 2540)

1.3 จำนวนเมล็ดที่ใช้ในการฉายรังสี

ไม่สามารถกำหนดได้แน่นอนใช้เมล็ดเท่าใด ตามทฤษฎีการใช้เมล็ดมากย่อมมีโอกาสได้พันธุ์กลายในลักษณะที่พึงประสงค์มาก ยังต้องกำหนดด้วยเนื้อที่ปลูกที่มีอยู่ แรงงานที่ใช้ว่ามีอยู่มากน้อยเท่าใด เมื่อฉายรังสีแล้วนำไปปลูกได้ต้น M_1 ลักษณะที่กลายพันธุ์ส่วนใหญ่ควบคุมโดยยีนด้อย โดยมีการกลายพันธุ์ของยีนด้อย (A เป็น a) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้เป็นครั้งแรกในชั่วที่1

1.4 การฉายรังสี

เมื่อกำหนดจำนวนเมล็ดที่ต้องการฉายรังสีและปริมาณรังสีที่จะใช้แล้ว ถ้าต้องการฉายรังสีแกมมากับเมล็ดถั่วเหลือง ปริมาณรังสีที่ต้องการใช้ คือ 15,000 แรด จำนวนเมล็ดที่ใช้ 47,000 เมล็ด นำเมล็ดใส่ถุงกระดาษหรือถุงพลาสติก นำไปฉายรังสีแกมมา ที่เครื่องฉายรังสีแกมมาของภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งให้อัตรารังสี 610 แรด/นาที ต้องใช้เวลาฉายรังสีนาน 15,000 หาร 610 = 24.59 นาที เมื่อฉายรังสีแล้วนำเมล็ดไปปลูกในแปลงทดลองที่ได้เตรียมไว้ล่วงหน้าแล้ว

2. การฉายรังสีส่วนต่างๆของพืชที่ใช้ขยายพันธุ์ ที่ไม่ใช่เมล็ด

พืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิดที่ขยายพันธุ์ได้ด้วยส่วนต่างๆของต้นพืช (vegetative propagation) เช่น ไม้ผลเมืองร้อนและเขตอบอุ่นหลายชนิด พืชที่ขยายพันธุ์ด้วยหัว (tuber) และราก ไม้ดอก ไม้ประดับ หญ้าเลี้ยงสัตว์ พืชอุตสาหกรรม เป็นต้น พืชเหล่านี้ขยายพันธุ์ได้ในธรรมชาติโดยอาศัยส่วนต่างๆ เช่น ส่วนของหัวใต้ดิน (tuber) เหง้า (rhizomes) ไหล (stolon) เป็นต้น หรือโดยวิธีการทาบกิ่ง ติดตา ปักชำ หรือการตอน หรือโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

พืชที่ขยายพันธุ์ได้โดยไม่ใช้เมล็ด มีข้อได้เปรียบหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดเพียงอย่างเดียว ข้อได้เปรียบได้แก่

1. พืชที่ขยายพันธุ์โดยเนื้อเยื่อต้นพืช ให้ต้นที่มีพันธุกรรมสม่ำเสมอ และคงลักษณะของพันธุ์เดิมไว้ได้เป็นส่วนใหญ่
2. มีอายุการติดผลเร็ว เนื่องจากต้นที่เกิดจากการขยายพันธุ์โดยเนื้อเยื่อต้นพืชไม่ต้องผ่านระยะ juvenile เหมือนพืชที่เกิดจากการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด
3. พืชที่ไม่สามารถติดเมล็ดได้ หรือติดเมล็ดได้น้อย หรือมีความงอกของเมล็ดต่ำ การขยายพันธุ์ได้ด้วยเนื้อเยื่อต้นพืชได้ ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชได้มาก
4. พืชที่เป็น apomixis การขยายพันธุ์ด้วยเนื้อเยื่อต้นพืชเป็นวิธีการเดียวในการใช้เพื่อเพิ่มจำนวนต้นได้

ในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเนื้อเยื่อต้นพืช การใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์มาตรฐาน (conventional breeding) มีปัญหายุ่งยากหลายประการ ได้แก่

1. พวกที่ขยายพันธุ์ด้วยเนื้อเยื่อต้นพืช ส่วนใหญ่มีสภาพเป็น heterozygous สูง หากมีการผสมตัวเอง มีการแยกตัวของลักษณะต่างๆ ลักษณะที่เป็นของพ่อแม่มักสูญหายไปในรุ่นลูก และในการผสมข้ามพันธุ์เพื่อถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการจากพันธุ์อื่นเข้ามา เช่น ลักษณะต้านทานต่อโรค ในลูกผสมที่เกิดขึ้นจะสูญเสีย ลักษณะของพันธุ์เดิมไป แม้จะได้ลักษณะต้านทานโรคเข้ามา ทำให้ต้องใช้วิธีผสมกลับ (back cross) หลายครั้ง

2. พวกที่ขยายพันธุ์ด้วยเนื้อเยื่อต้นพืชที่เป็นพวกโพลิพลอยด์ (polyploidy) มีความซับซ้อนในกระบวนการถ่ายทอดทางพันธุกรรม จึงเป็นการยุ่งยากในการใช้วิธีการปรับปรุงตามวิธีการมาตรฐาน
3. พวกขยายพันธุ์ด้วยเนื้อเยื่อต้นพืช เช่น พวกไม้ผลต่างๆ เป็นพืชที่มีอายุยาว กว่าจะถึงระยะเวลาสืบพันธุ์ใช้เวลานานมาก มีการติดเมล็ดน้อย และเมล็ดมีความสามารถในการงอกค่อนข้างต่ำ ทำให้วิธีการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์ (hybridization) ตามวิธีการมาตรฐานไม่ได้ผล
4. พวกที่ขยายพันธุ์ด้วยเนื้อเยื่อต้นพืช เช่น ไม้ผลบางชนิดเป็น apomictic ไม่สามารถปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์ตามปกติได้

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในพืชพวกขยายพันธุ์ด้วยเนื้อเยื่อต้นพืช ได้มาจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ ซึ่งมีอัตราการเกิดต่ำมาก ดังนั้นการใช้วิธีการเหนี่ยวนำด้วยรังสีหรือสารเคมีก่อกลายพันธุ์ จึงเป็นวิธีการที่ช่วยเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมในพืชพวกขยายพันธุ์ด้วยเนื้อเยื่อต้นพืชให้มากขึ้นได้

การคัดเลือกส่วนของพืชเพื่อฉายรังสี

รังสีแกมมา รังสีเอ็กซ์ หรือรังสีนิวตรอน เหมาะสมที่จะใช้กับพืชพวกที่ขยายพันธุ์ด้วยเนื้อเยื่อต้นพืช เนื่องจากมีอำนาจในการทะลุทะลวงสูง สามารถผ่านเข้าไปในชั้นของเนื้อเยื่อที่เป็นตายอด ตาข้างได้ ซึ่งโดยปกติส่วนที่เป็นตามักมีกาบใบหรือขี้ผึ้งหุ้มอยู่ ควรเลือกส่วนที่จะนำมาฉายรังสีจากพืชพันธุ์ที่ปลูกกันอยู่ทั่วไป และมีลักษณะเป็นที่ยอมรับของตลาด เช่น มีรสชาติ มีสีสวย เป็นต้น ต้องการปรับปรุงเพียง 1 หรือ 2 ลักษณะเข้าไปในพันธุ์ที่ดีอยู่แล้ว เช่น ต้องการเพิ่มลักษณะต้านทานโรคเข้าไป

ส่วนของพืชที่ใช้ขยายพันธุ์ เช่น หัว ราก ไหล กิ่งตอน กิ่งปักชำ และกิ่งทาบ สามารถนำมาฉายรังสีได้ทั้งสิ้น การฉายรังสีในปริมาณเท่าใด มีการทดลองหาปริมาณรังสีที่เหมาะสมเช่นเดียวกับการฉายรังสีเมล็ด โดยปริมาณรังสีที่ใช้ต่ำกว่ามากเมื่อเทียบกับการที่ใช้ในการฉายรังสีเมล็ด

กลไกการเกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์เนื้อเยื่อต้นพืช (somatic mutation)

การกลายพันธุ์ของเนื้อเยื่อต้นพืช ภายหลังการฉายรังสีมีกลไกการเกิดดังต่อไปนี้

1. เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เซลล์จำนวนหนึ่ง อาจเป็น 1 เซลล์ หรือ 2-3 เซลล์ ของส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดเกิดการกลายพันธุ์
2. เกิดจากการเข้าแทนที่ของเซลล์จากต่างชั้นของปลายยอด ในพืชที่มีโครงสร้างเป็น

ไคเมริก (chimeric structure) อยู่แล้ว รังสีอาจทำอันตรายเซลล์ชั้นนอกทำให้เซลล์ชั้นนอกแบ่งตัวช้าลง และเซลล์ชั้นในเจริญเข้ามาแทนที่ หรือในทางกลับกัน เซลล์ชั้นนอกเจริญเข้าไปแทนที่เซลล์ชั้นในได้

การใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้รังสี

1. การใช้ส่วนของพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเนื้อเยื่อต้นพืช

นำส่วนของพืชที่ใช้ขยายพันธุ์ได้ เช่น cutting ,bud, tuber, bulb, scale, shoot tip และอื่นๆ มาฉายรังสีในปริมาณที่เหมาะสม ภายหลังการฉายรังสีนำชิ้นส่วนของพืชมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของตาข้าง (axillary bud) หรือตายอด (terminal bud)หรือ ตาพิเศษ (adventitious bud) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนของพืชที่ใช้เลี้ยง การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของพืชภายหลังการฉายรังสี เรียกว่า การเพาะเลี้ยงชั่ว M_1V_1 เมื่อยอดหรือหน่อมีขนาดยาวขึ้นให้ตัดแยกเฉพาะข้อ (nodal cutting) มาเลี้ยงเป็นชั่ว M_1V_2 ยอดหรือหน่อที่เจริญเติบโตในชั่ว M_1V_2 จะมีความแตกต่างกันในพันธุกรรม แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็นปกติ(normal) คือ เหมือนพันธุ์เดิม กลุ่มที่สองเป็น ไคเมรา (chimera) มีทั้งส่วนเนื้อเยื่อปกติและส่วนที่กลายพันธุ์ (mutated sector)อยู่ร่วมกัน และกลุ่มที่สาม คือ กลุ่มที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่กลายพันธุ์ทั้งหมด เรียกว่า solid mutant ตัดแยกเฉพาะข้อ หรือตัดแยกปลายยอด หรือ adventitious bud มาเลี้ยงต่อในชั่ว M_1V_3 การคัดเลือกลักษณะที่ต้องการสามารถทำได้ในขณะที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชั่ว M_1V_2 และ M_1V_3 ภายหลังการคัดเลือกนำยอดที่มีขนาดยาวมาชักนำให้เกิดราก และย้ายออกไปปลูกในแปลงทดลอง เพื่อตรวจสอบลักษณะที่กลายพันธุ์และคัดเลือกลักษณะที่ต้องการออกมาใช้ประโยชน์ต่อไป (Wenzel, 1998; สิรนุช, 2540)

2. การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแคลลัสเซลล์และโปรโตพลาสต์

การฉายรังสีทำได้กับพืชก่อนนำมาเพาะเลี้ยง หรือฉายรังสีในขณะที่เพาะเลี้ยงเป็นแคลลัส หรือในขณะที่เพาะเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนลอย หลังจากนั้นนำเซลล์ในสภาพแขวนลอยมาเลี้ยงต่อในอาหารเพื่อการคัดเลือก (selective media) ที่ใส่สารช่วยการคัดเลือกพืชที่ต้องการไว้ เช่น เกลือ กรด สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช หรือ สร้างสภาวะเพื่อช่วยในการคัดเลือกในลักษณะอื่นๆ เช่น คัดเลือกที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อลักษณะทนอากาศหนาวเย็น เป็นต้น เซลล์ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีการคัดเลือก ยกเว้นเซลล์ที่เกิดการกลายพันธุ์ที่สามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนกลายเป็นก้อนแคลลัสได้ ทำการคัดเลือกซ้ำโดยเพิ่มความเข้มข้นของสารช่วยการคัดเลือกให้มากขึ้น จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดเป็นต้นพืช นำออกทดสอบและประเมินผลต่อไปใน

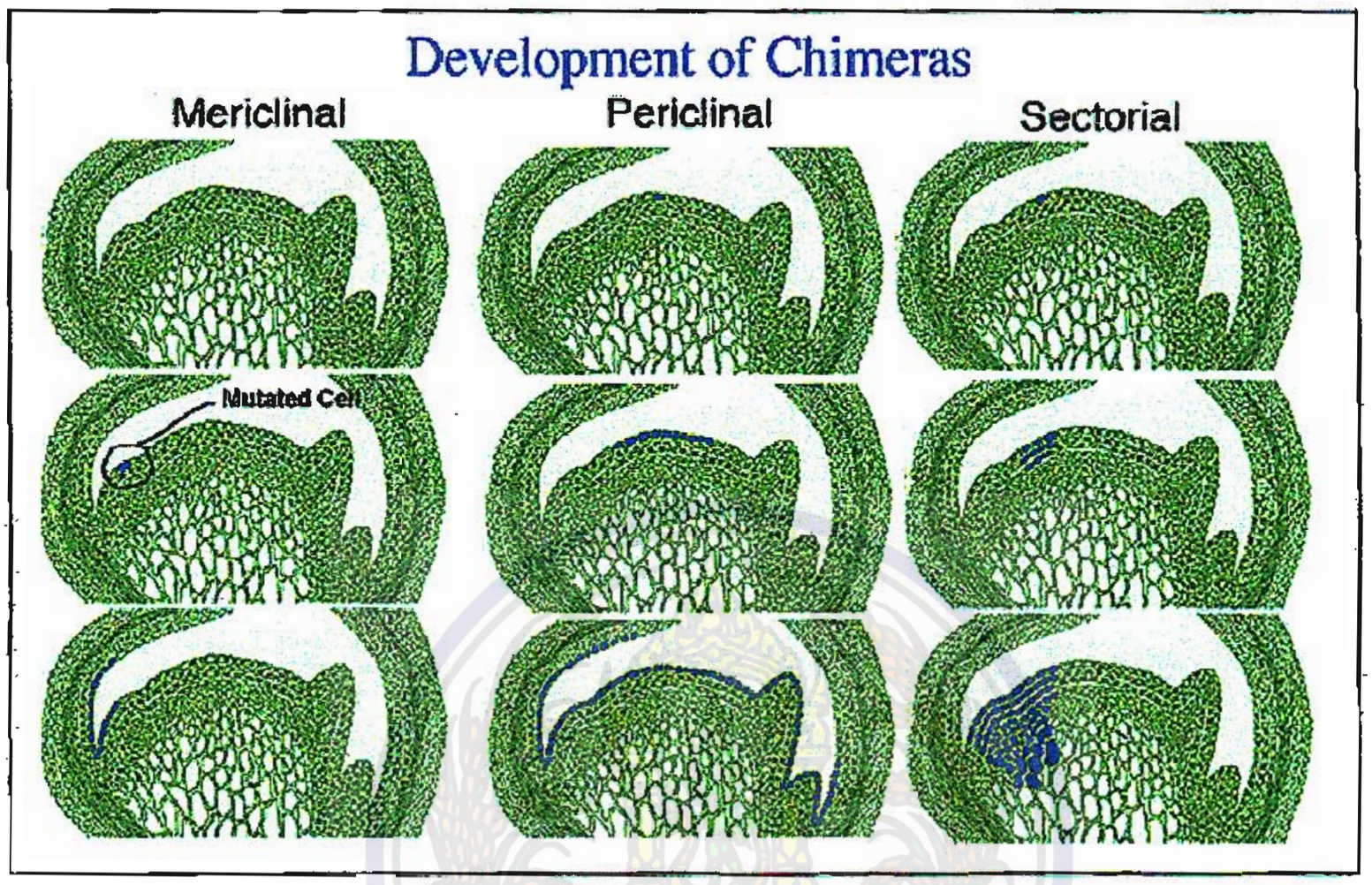
แปลงทดลองและคัดเลือกต้นที่แสดงลักษณะที่ต้องการ การทดสอบควรทำซ้ำหลายๆครั้ง ในรุ่นลูกหลานจนแน่ใจว่าได้ลักษณะที่ต้องการ

การเปลี่ยนแปลงลักษณะต่างๆที่เกิดในรุ่น M_1 เป็นผลมาจาก

1. การทำลายทางสรีระ ลักษณะนี้จะเกิดในรุ่น M_1 ไม่ถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูก เกิดจากกระบวนการ metabolism ถูกขัดขวาง ทำให้กิจกรรมในเซลล์ไม่สามารถดำเนินไปได้เป็นปกติ หรือมีประสิทธิภาพลดลง
2. gene mutation หรือ chromosome mutation สามารถถ่ายทอดจากชั่วที่ 1 ไปยังรุ่นต่อๆไปได้

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายหลังฉายรังสีไม่ว่าจะเป็นการทำลายทางสรีระ gene mutation หรือ chromosome mutation บางชนิดสามารถตรวจวัดได้ทางเซลล์วิทยา บางชนิดสามารถตรวจวัดได้ เช่น ความสูงของต้น ความกว้างของใบ หรือบางชนิดสามารถเกิดกับพืชได้ทั้งต้น เช่น ลักษณะแคระแกรน หรือการตายภายหลังเลี้ยงไปได้ระยะหนึ่ง การเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างลักษณะของพืชอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของยีนหรือโครโมโซมหรือไม่เกี่ยวข้องกับโครโมโซมก็ได้ ดังนั้นในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จำเป็นต้องใช้ปริมาณรังสีที่เหมาะสมเพื่อลดการทำลายทางสรีระลง แต่ให้มีผลทางพันธุกรรมสูงขึ้น

ในการฉายรังสีกับส่วนของพืชที่ประกอบด้วยเซลล์หลายเซลล์ เช่น เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดทำให้เกิดไคเมรา (chimera) ชนิด sectorial chimera หรือ mericlinal chimera ขึ้นก่อน และเมื่อมีการขยายใหญ่ขึ้นเป็น periclinal chimera ได้ในภายหลัง โดยปกติเนื้อเยื่อที่กลายพันธุ์มักจะอยู่บริเวณส่วนที่เป็นฐานของยอดหรือต้นที่ผ่านการฉายรังสี เรียกว่า ยอด M_1V_1 หรือต้น M_1V_1 เมื่อมีการเจริญเติบโต เพิ่มจำนวนใบขึ้นไปทางปลายยอดเรื่อยๆ โดยเซลล์ปกติมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนนำหน้าไปอย่างรวดเร็ว ส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อที่กลายพันธุ์เป็น sector ที่มีขนาดเล็กและถูกกำจัดบริเวณให้อยู่ตรงส่วนของ basal bud ของยอด M_1V_1 นั่นเอง ด้วยเหตุนี้การกลายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจากการชักนำด้วยรังสีอาจสูญหายไปได้ เนื่องจาก basal bud ของพืชที่มีการเจริญเป็นแบบ apical dominance ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ในพืชที่มีการเจริญแบบ apical dominance จำเป็นต้องทำการจัดแต่งกิ่งหรือยอด (pruning หรือ decapitation) ของ M_1V_1 เหลือไว้เฉพาะส่วนของกิ่งที่มี basal bud อยู่ประมาณ 2-3 ตา ในการตัดแต่งกิ่งทำให้ตาที่เกิดอยู่บริเวณซอกใบแรกมีการเจริญขึ้นมาเป็นส่วนของยอดและกิ่งได้ (Wenzel, 1998)



ลักษณะการเกิดไคเมราในต้น Valencia ที่ได้รับการฉายรังสี

ลักษณะต่างๆที่เกิดขึ้นจากการฉายรังสี ที่สามารถตรวจสอบได้ในระดับห้องปฏิบัติการและแปลงทดลอง ได้แก่

1. การงอกของเมล็ด
2. ความยาวราก
3. ความสูงของต้น การแตกกอ
4. อัตราการรอดชีวิต
5. รูปร่างลักษณะใบ สีใบ และขนาดใบ
6. จำนวนช่อดอกต่อต้น จำนวนดอกต่อช่อ สีดอก
7. จำนวนเมล็ดต่อช่อ / ต้น
8. จำนวนผลต่อต้น

นอกจากนี้ยังสามารถตรวจความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระดับ gene และ chromosome ได้โดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล

การคัดเลือกลักษณะต่างๆจะประสบผลสำเร็จได้ ต้องมีเงื่อนไขต่อไปนี้

1. ลักษณะที่คัดเลือกไว้นั้นต้องมีการแสดงออกได้ทั้งในระดับเซลล์ และในระดับที่เป็นเนื้อเยื่อ
2. เมื่อนำเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่คัดเลือกไว้มาเพาะเลี้ยงเป็นต้นพืช ลักษณะที่คัดเลือกไว้นั้นยังคงแสดงออกได้ในระดับที่เป็นต้นพืช
3. ลักษณะที่คัดเลือกไว้ได้นั้น ต้องสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลาน โดยการส่งผ่านลักษณะ อาจส่งผ่านโดยวงจรการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ (sexual cycle) หรือ โดยการขยายพันธุ์ด้วยเนื้อเยื่อต้นพืช (vegetative propagation)

ตัวอย่างการฉายรังสีเพื่อสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมในดาหลา

ดาหลา เป็นไม้ดอกที่กำลังได้รับความนิยมปลูกเป็นไม้ตัดดอก มีการปลูกมานานแล้วทางภาคใต้ของประเทศไทย ปัจจุบันใช้เป็นไม้ตัดดอก เนื่องจาก ดอกมีขนาดใหญ่ สีสดใส รูปทรงแปลกตา ออกดอกดกในฤดูร้อน ขณะไม้ดอกชนิดอื่นๆ ไม่ค่อยจะมีดอก เป็นที่ต้องการของตลาด ดังจะเห็นได้จากความต้องการซื้อขายดอกที่ปากคลองตลาดมีปริมาณถึง 200-500 ดอกต่อสัปดาห์ มูลค่า 5000- 7000 บาท ต่อสัปดาห์ หากรวมความต้องการของตลาดอื่นด้วยแล้วจะมีมูลค่ามากขึ้น หากมีการพัฒนาให้มีลักษณะที่หลากหลาย สีสัน ที่แปลกออกไป จะสามารถเพิ่มมูลค่าในการซื้อขาย จนสามารถพัฒนาเป็นอุตสาหกรรมไม้ตัดดอกและส่งออกต่างประเทศได้

ในการพัฒนาพันธุ์ดาหลา นอกจากจะปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกตามวิธีปกติ (conventional breeding) แล้ว การใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีเพื่อทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม มีแนวโน้มในการสร้างสายพันธุ์ใหม่ที่มีความหลากหลายเพิ่มขึ้น สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะแปลกใหม่ของสีสัน ทรงต้น ขนาดดอก ก้านดอก

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมาเรื้อรัง (cronic irradiation)

วิธีการ

1. การชักนำให้เกิดยอดอ่อนจากตาข้าง

1.1 นำตาข้างของดาหลา มาฟอกฆ่าเชื้อใน Haiter® Bleach (sodium hypochlorite as available chlorine 6 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นาน 15 นาที ล้างสารละลายฟอกฆ่าเชื้อออกด้วยน้ำกลั่น ที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 - 4 ครั้ง

1.2 ทำการเพาะเลี้ยงตาข้างดาหลาในสภาพปลอดเชื้อ ในอาหาร MS พื้นฐานที่เติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 20-30 ไมโครโมลาร์ (uM) pH ของอาหารเท่ากับ 5.7 หลังจากเลี้ยงนาน 2 เดือน จะมีหน่ออ่อนแตกออกมาจากตาข้าง ชิ้นส่วนละ 2-3 ยอด

1.3 ทำการเพิ่มปริมาณหน่ออ่อน โดยชักนำให้เกิด *in vitro* microshoot แยกหน่ออ่อนเป็นต้นเดี่ยวๆ ตัดยอดออก แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโตกลุ่ม cytokinin ได้แก่ BA ในอัตราความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ให้ยอดรวม (multiple shoot) จาก microshoot สูงสุดถึง 5 ยอด ต่อ microshoot

2. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมาเรื้อรัง

2.1 ตัดปลายยอดและรากของ microshoot ออก ให้เหลือโคนประมาณ 1 ซม. นำไปเลี้ยงในอาหาร MS + BA 10 ไมโครโมลาร์ ขวดละ 1 ชิ้น เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์

2.2 นำไปฉายรังสีแกมมาชนิดเรื้อรัง ที่ระยะ 4.5 และ 5.5 เมตร นาน 12 วัน ปริมาณ total rate 4.3 และ 2.9 กิโลแรด (k rad)

การเกิดยอดรวม (multiple shoot) จากอาหาร MS + BA 10 ไมโครโมลาร์ ภายหลังการเลี้ยง 2 เดือน

สภาพห้องฉายรังสีแกมมาเรื้อรัง

เมื่อดาหลาได้รับปริมาณรังสีแกมมาเรื้อรัง 4.3 และ 2.9 krad มาเลี้ยงในรุ่น M_1V_1 พันธุ์บัวแดงใหญ่มีอัตราการรอดชีวิต 46 และ 54 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์บานเย็นรอดชีวิต 38 และ 48 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพันธุ์แดงอินโดรอดชีวิต 32 และ 46 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในจำนวนที่รอดชีวิต เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ จะมีทั้งส่วนที่เจริญเติบโตปกติ และผิดปกติในส่วนที่ผิดปกตินั้น จะมีการแตกกอผิดปกติมากที่สุด 18 - 20 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 1)

การเจริญเติบโตของดาหลารุ่น M_1V_1 ในขวดทดลองภายหลังจากการฉายรังสีนาน 3 เดือน เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการฉายรังสี พบว่าเมื่อได้รับรังสี 4.3 และ 2.9 krad พันธุ์บัวแดงใหญ่มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากต้นปกติ 6 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เจริญเติบโตผิดปกติ 40 และ 44 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์บานเย็นเติบโตปกติ 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ เติบโตผิดปกติ 34 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพันธุ์แดงอินโดเจริญเติบโตปกติ 0 และ4 เปอร์เซ็นต์ เติบโตผิดปกติ 32 และ 44 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งลักษณะที่ปกติของดาหลาจะมีใบเขียว ในพันธุ์บัวแดงใหญ่ และบานเย็น และเขียวอมแดง ในพันธุ์แดงอินโด มีการแตกกอ ระหว่าง 4-6 หน่อ ความสูงระหว่าง 3 - 6 เซนติเมตร ส่วนลักษณะที่เจริญเติบโตผิดปกตินั้น การแตกกอ จะเกิดการแตก microshoot เล็กๆ มากกว่า 8 หน่อ หรือ แตกกอเพียง 1 - 2 หน่อ ด้านความสูงส่วนใหญ่จะแคระแกรน หรือสูงกว่าปกติ และความผิดปกติของใบจะพบใบที่ใหญ่และ บิดเบี้ยวผิดรูปร่างมากกว่าใบด่าง (ตาราง 2)

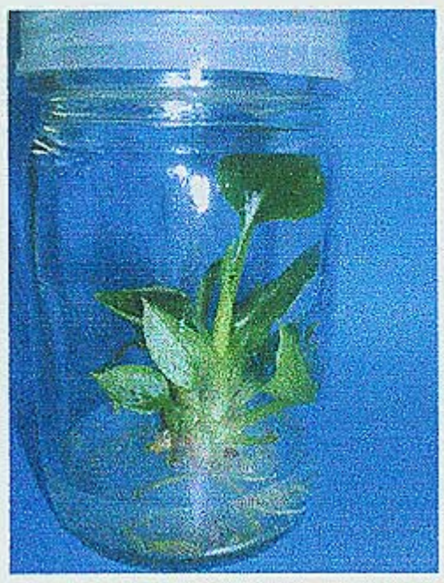
ปริมาณรังสีที่สูงขึ้นจะมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโต เนื่องจากรังสีปริมาณสูงจะหยุดการเจริญของเนื้อเยื่อ มีผลทำให้เซลล์บริเวณจุดเจริญตาย ทำลายจุดกำเนิดใบ หรือมีผลต่อการแบ่งเซลล์ การฉายรังสีต่อชิ้นส่วนพืชซึ่งมีเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวในระยะต่างๆกัน อาจทำให้เซลล์ตายทันทีที่ได้รับรังสี หรือหรือไปทำลายองค์ประกอบต่างๆของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับ metabolism มีผลทำให้เซลล์ซึ่งแบ่งตัวต่อไปได้ระยะหนึ่งหลังการฉายรังสี และจะตายในที่สุด หรือเซลล์สามารถมีชีวิตรอดได้ แต่ไม่มีการแบ่งเซลล์ เนื่องจากคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวน (proliferating power) ถูกยับยั้งหรือถูกทำลาย (Venketeswaran และ Partanen , 1966 ; สิรนุช , 2540)

ตารางที่ 1 อัตราการรอดชีวิตและลักษณะการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ ภายหลังอาบรังสี และเลี้ยงในอาหารใหม่ นาน 3 เดือน

พันธุ์	ระยะ (m)	Total dose (k-rad)	% รอดชีวิต	เจริญปกติ (%)	เจริญผิดปกติ (%)	ลักษณะการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ %		
						การแตกกอ	ความสูงต้น	ใบผิดปกติ
บัวแดงใหญ่	4.5	4.3	46	6	40	19	13	8
	5.5	2.9	54	10	44	18	16	10
บานเย็น	4.5	4.3	38	4	34	12	11	11
	5.5	2.9	48	8	40	18	14	8
แดงอินโด	4.5	4.3	32	0	32	20	6	6
	5.5	2.9	46	4	44	18	14	10

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของดาหลาทั้ง 3 พันธุ์

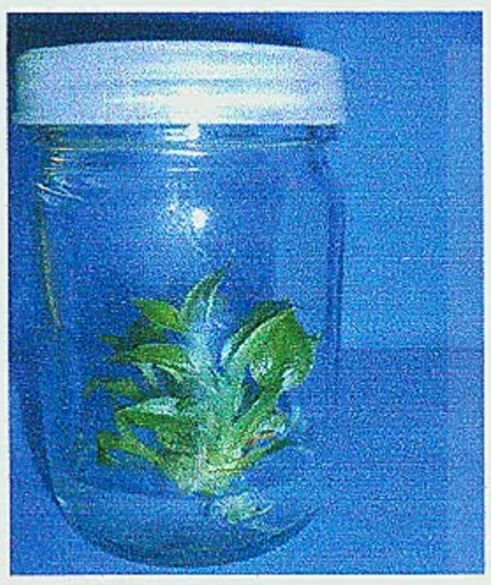
ลักษณะ	การเจริญเติบโตปกติ			การเจริญเติบโตที่ผิดปกติ
	บัวแดงใหญ่	บานเย็น	แดงอินโด	
ความสูง (ซม)	3.5 - 6	3 - 6	2.5 - 4	สูงหรือต่ำกว่าปกติแคระแกรน
การแตกกอ (หน่อ)	4 - 6	3 - 6	2 - 5	มากกว่าหรือน้อยกว่า
ขนาดใบ (ซม.)	กว้าง 1 - 1.6 ยาว 1.5 -2.2	กว้าง 0.8 – 1.5 ยาว 1.3 -1.9	กว้าง 0.7 – 1.2 ยาว 1.0- 1.6	ใหญ่หรือเล็กกว่าค่าปกติ
สีใบ	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน	เขียวเข้มอมแดง	สีเขียวเข้มกว่าเดิม สีจางลง ใบด่าง ใบบิดเบี้ยว



ต้นปกติ

ก้านใบยาว ไม่แตกกอ

ก้านใบสั้น ไม่แตกกอ

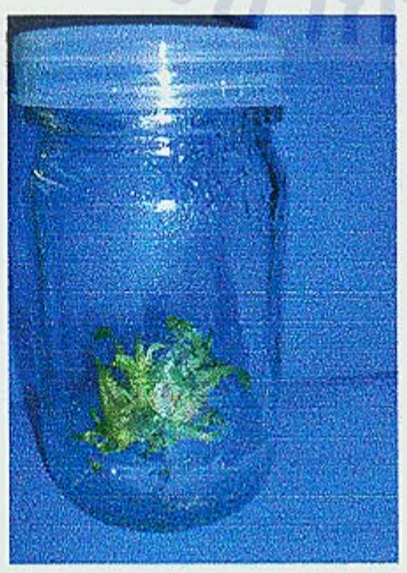


ต้นเตี้ย แตกกอปกติ

ลักษณะใบใหญ่ผิดปกติ

ใบด่าง ใบขาว

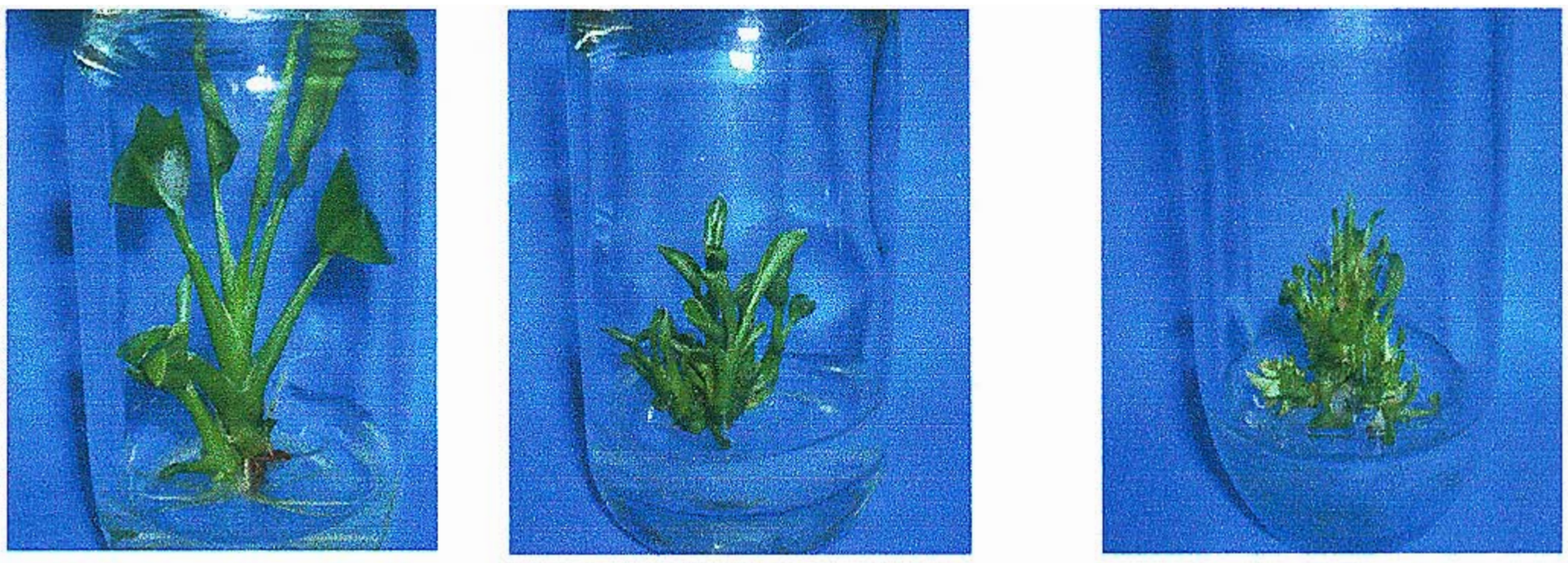
การแตกกอมากกว่าปกติ



ใบสีจางเกือบขาว

ลักษณะการเจริญเติบโตที่ผิดปกติในดาหลาพันธุ์บัวแดงใหญ่

กรมวิชาการเกษตร



ต้นปกติ ต้นเตี้ย / แตกกอมาก แตกกอผิดปกติ/ ใบเป็นฝอย

ต้นปกติ ไม่แตกกอ/ใบซีด ต้นเตี้ย/ใบเล็กแตกกอปกติ ต้น/ใบเล็ก แตกกอ

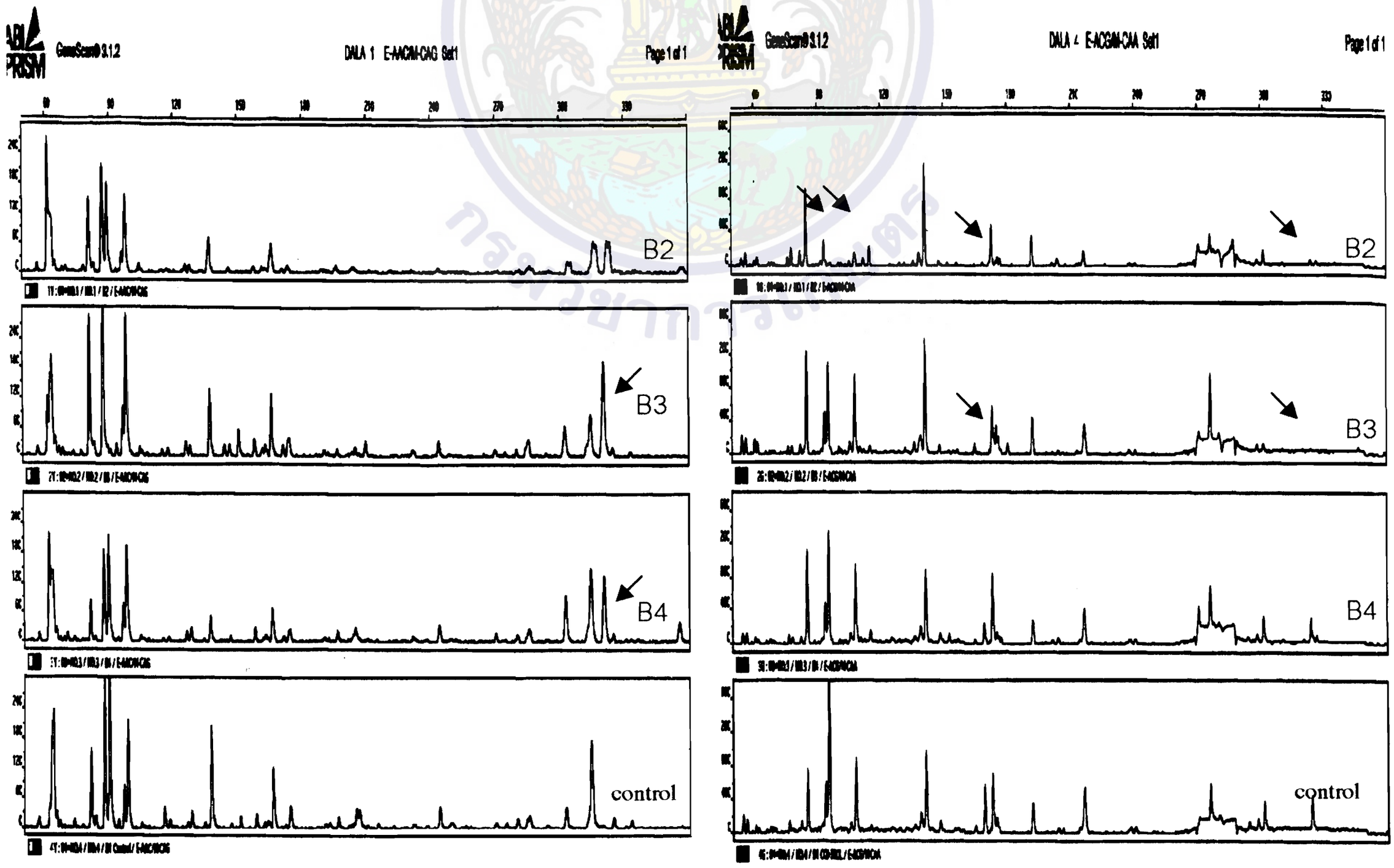
ลักษณะการเจริญเติบโตที่ผิดปกติในดาหลาพันธุ์บานเย็น (ภาพบน)

พันธุ์แดงอินโด (ภาพล่าง)

การใช้เทคนิค AFLP ในการจำแนกความแตกต่างของพันธุ์

เทคนิค Amplified fragment length polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุล ที่สามารถนำมาตรวจสอบการกลายพันธุ์ในระดับยีนที่ได้ผลดี สามารถนำมาใช้ร่วมกับการคัดเลือกลักาณะทางสัณฐานวิทยาของดาหลาที่ผ่านการฉายรังสี โดยนำเทคนิคนี้มาจำแนกความแตกต่างของดาหลาในรุ่น M_1V_3 โดยใช้ Primer คู่ที่มีความเหมาะสม พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของต้นที่ฉายรังสีออกจากต้น control ได้ รูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคนี้ จะสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะมีหลายแถบหรือหลาย peak จะพิจารณาเฉพาะแถบที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างที่วิเคราะห์ โดยดูแถบที่เพิ่มขึ้นหรือหายไปเมื่อเทียบกับ control

ตัวอย่างในพันธุ์บานเย็น Primer E-AAC/M-CAG สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่ไม่ได้ฉายรังสี (control) จากต้นฉายรังสีหมายเลข B3 และ B4 ได้ โดย B3 และ B4 มีแถบหรือ peak ขนาด 320.79 และ 321.82 คู่เบส ซึ่ง control ไม่มี ส่วน Primer E-ACG/M-CAA แยกบานเย็นหมายเลข B2 และ B3 จาก control ได้ โดย control มีแถบ 93.92 , 106.17 , 167.33 และ 320 .31 คู่เบส ในขณะที่ B2 และ B3 ไม่มี ดังภาพ



ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของดาหลาพันธุ์บานเย็น ↓ คือ จุดที่แตกต่างจาก control

ภาพซ้าย primer E-AAC/M-CAG ภาพขวา primer E-ACG/M-CAA

เอกสารอ้างอิง

กษิดิศ ดิษฐบรรจง, มงคล เกษประเสริฐ, ชยานิจ ดิษฐบรรจง และ เสาวนี เขตสกุล. 2549. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบุกเพื่อการขยายพันธุ์. หน้า184-191 . ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2548. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. ISBN 974-436-559-5.

ชยานิจ ดิษฐบรรจง, กษิดิศ ดิษฐบรรจง และ เสาวนี เขตสกุล. 2549. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านชักมดลูกเพื่อการขยายพันธุ์. หน้า 192-199. ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2548. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. ISBN 974-436-559-5.

รมณีย์ เจริญทรัพย์ และ ศาลักษณ์ พรรณศิริ. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. หน้า 27-33. ใน: เอกสารสรุปการสัมมนาเชิงปฏิบัติการคลินิกวิจัย เรื่อง การผลิตต้นกล้วยไข่พันธุ์เกษตรศาสตร์ 2 จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วันที่ 29 พฤษภาคม – 2 มิถุนายน 2549. อาคารปฏิบัติการวิจัยกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. ISBN 974-553-342-4. 219 หน้า

มงคล เกษประเสริฐ. 2547. บุกและการใช้ประโยชน์จากบุกในประเทศไทย. เอกสารวิชาการ ลำดับที่ 22/2547. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 208 หน้า

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. จตุจักร, กรุงเทพมหานคร. ISBN 974-7055-10-4. 205 หน้า

Balachandran, S.M., S.R. Bhat, and K.P.S. Chandel. 1990. *In vitro* clonal multiplication of turmeric (*Curcuma* spp.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Plant Cell Reports. 8: 521-524.

Bonga, J.M. and P. von Aderkas. 1992. In Vitro Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 335 pp.

Caplin, S.M. 1983. Effect of initial size on growth of plant tissue culture. Amer. J. Bot 50 : 91-94.

Pierik, R.L.M. 1987. In Vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 328 pp.

Street, H.E. 1977. Plant Cell and Tissue Culture. : Principle and Application. Ohio State Univ. Press, Columbus. USA. 478 pp.

Street, H.E. and G.G. Henshaw. 1988. Introduction and methods employed in plant tissue culture. In : Willmer, E.N. (ed.). The Biology of Cells and Tissue Cultire, vol. 3. Acad. Press, New York. 854 pp.

Venketeswaran, S. and C.R. Partanen , 1966 . A comparative study of the effect of gamma radiation on organized disorganized growth of tobacco. Rad. Bot. 6: 13-60.

Wenzel, G. 1998. Asexual cell genetics. In : A. Altman (ed.). Agricultural Biotechnology. Marcel Dekker, Inc. New York. 243 pp.