บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้โดยผ่าน 2 กระบวนการ คือ การกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) หรือ การกำเนิดคัพภะ (embryogenesis)

การกำเนิดเกิดคัพภะร่างกาย (somatic embryogenesis) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไปเป็นต้นอ่อนของพืชที่มีทั้งส่วนยอดและรากอ่อนที่สมบูรณ์โดยมีแหล่งกำเนิดเดียวกัน เป็นการเจริญใน 2 ทิศทาง (bipolar) การพัฒนาแบบนี้จะคล้ายกับ zygotic embryogenesis คือ ในพืชใบเลี้ยงคู่มีระยะที่กลุ่มเซลล์มีรูปร่างแบบ globular shape, heart shape และ torpedo shape สุดท้ายได้ต้นพืชที่สมบูรณ์ (Steward and Mapes, 1971; Kohlenbach, 1977; Vajrabhaya, 1998) ส่วนพืชใบเลี้ยงเดี่ยวสามารถแบ่งกลุ่มเซลล์ออกเป็น 4 ระยะ คือ proembryo stage, globular stage, scutellar stage และ coleoptilar stage (Hartmann *et al.,* 1997: Mariani *et al.,* 1998) ในขณะที่การกำเนิดอวัยวะเป็นกระบวนการ พัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช โดยมีการเจริญเติบโตในทิศทางเดียว (unipolar)

กระบวนการการกำเนิดคัพภะร่างกายจากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1985 โดย Reinert และ Steward *et al.* (1985) ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ 2 ทาง คือ

1. เกิดขึ้นโดยตรง (direct somatic embryogenesis) คัพภะเกิดขึ้นโดยตรงจากชิ้นพืชโดยไม่ผ่านการเกิดแคลลัส
2. เกิดขึ้นโดยอ้อม (indirect somatic embryogenesis) คัพภะเกิดขึ้นโดยผ่านการเกิดแคลลัส ซึ่งเกิดจากเนื้อเยื่อของชิ้นพืชมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า “แคลลัส” (Williams and Maheswaran, 1986)

1. การเพาะเลี้ยงแคลลัส (Callus culture)

แคลลัส หมายถึง เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มและยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) เพียงอย่างเดียว มีขนาดต่างๆกัน มีขนาดไม่แน่นอน ภายในมีแวคิวโอจำนวนมาก แคลลัสส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ (chlorophylls) สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และฟลาโวทีนอยด์ (flavonoids) หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ปริมาณและชนิดของรงควัตถุ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหารและปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง (รังสฤษดิ์, 2540)

1.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าว

การเกิดแคลลัสของธัญพืชเกิดขึ้นครั้งแรกจากการเพาะเลี้ยงเอนโดสเปิร์มของข้าวโพดในปี ค.ศ. 1949 โดย La Rue ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเริ่มมีการศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงส่วนของราก (Fujiwara and Ojima, 1955) และคัพภะอ่อนของข้าว (Amemiya *et al.*, 1956) ในปี ค.ศ. 1957 Street ค้นพบว่า รากของธัญพืช เช่น ข้าวไรย์ ต้องการฮอร์โมนกลุ่มออกซินจากภายนอกเพื่อการเจริญเติบโตที่ต่อเนื่อง โดยออกซินสังเคราะห์ที่ใช้ คือ 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) ซึ่ง 2, 4-D ที่ได้รับจากภายนอกนี้กระตุ้นการเกิดแคลลัสให้มีการเจริญเติบโตอย่างไม่จำกัดจากการเพาะเลี้ยงส่วนของข้อจากต้นข้าว (Furuhashi and Yatazawa, 1964) และสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของรากจากต้นกล้า (Yatazawa *et al.*, 1967) ส่วนการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ มีรายงานว่า ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่มาจากส่วนของราก (Kawata and Ishihara, 1968) ในปีเดียวกัน ได้ต้นข้าวที่มีโครโมโซมชุดเดียว (haploid plant) จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร (anther) (Niizeki and Oono, 1968) และการชักนำให้เกิดยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของคัพภะข้าว (Tamura, 1968) ในปัจจุบันได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางโดยนำส่วนของข้าวสามารถนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ เช่น ใบ (Wernicke *et al.,* 1981) ราก (Abe and Futsuhara, 1985) ช่อดอกอ่อน (Ling *et al.,* 1983) โปรโตพลาส (Yamada *et al.,* 1986) และเมล็ดข้าว (Ilahi *et al.,* 2005) โดยทั่วไปเมล็ดเป็นแหล่งที่ดีที่สุดในการให้ชิ้นส่วนเพื่อเลี้ยงเป็นแคลลัส เพราะ

1. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยตรง โดยเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต
2. เมื่อเพาะเมล็ดให้งอกในอาหารวุ้นที่ไม่มีหรือมีสารควบคุมการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย จะชักนำให้เกิดส่วนของราก ยอด และใบที่ปลอดเชื้อ ใช้เป็นชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงแคลลัสต่อไป
3. สามารถแยกเอาเนื้อเยื่อส่วนของรากและปลายยอดออกมาจากเมล็ดได้โดยตรง (รังสฤษดิ์, 2540)

แคลลัสที่ชักนำจากเมล็ดข้าวเกิดจากบริเวณที่เรียกว่า scutellum ซึ่งอยู่บริเวณส่วนฐานที่ต้นกล้างอกขึ้นมาและแคลลัสเกิดขึ้นพร้อมกับการงอกของต้นกล้า (ประดิษฐ์ และคณะ, 2537; Tsukahara and Hirosawa, 1992; Rueb *et al.,* 1994; Tsukahara *et al.,* 1996) โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลงของ MS (Murashige and Skoog, 1962) LS (Linsmaier and Skoog, 1965) หรือ N6 (Chu *et al.,* 1975) ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช กลุ่มออกซิน คือ 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ประภาและพรทิพย์, 2537; สุริยันตร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และคณะ, 2540) โดย Rueb *et al.* (1994) ได้แบ่งแคลลัสเป็น 3 ชนิด ชนิดที่ 1 เรียกว่า embryogenic callus มีลักษณะแห้ง เซลล์เกาะกันแน่นและเป็นก้อนกลม ชนิดที่ 2 เรียกว่า non-embryogenic callus มีลักษณะของเซลล์ที่เกาะกันอย่างหลวม ใส (translucent) และค่อนข้างบาง ซึ่งแคลลัสชนิดนี้จะไม่มีการพัฒนาไปเป็นคัพภะ และชนิดที่ 3เรียกว่า rhizogenic callus ซึ่งเกือบทั้งก้อนจะประกอบด้วย root primodia

1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส

1. สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) โดยเฉพาะออกซินและไซโตไคนินซึ่งสัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 กลุ่มนี้มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ โดยทั่วไปแล้วถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง (ออกซิน>ไซโตไคนิน) แคลลัสพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนนี้ต่ำ (ออกซิน<ไซโตไคนิน) พัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น และหากสัดส่วนนี้สมดุลจะพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป โดยปริมาณและสัดส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดชิ้นส่วน และระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้

การศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส Chand and Sahrawat (2001) ทำการศึกษาการชักให้เกิดต้นในข้าวกลุ่ม Indica พันธุ์ Safari 17 และ Kasturi โดยการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนในอาหารสูตร MS ร่วมกับกรดอะมิโนและวิตามินของ Gamborg, BAP 4.4 μM, sucrose 3%, agar 0.8% และ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ เลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 24° C นาน 9 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากช่อดอกอ่อนของข้าวพันธุ์ Safari 17 คือ อาหาร MS ที่มี BAP 4.4 μM และ2,4-D 9.0 μM จะเกิดแคลลัส 72.2% ส่วนพันธุ์ Kasturi คือ MS ที่มี BAP 4.4 μM และ2,4-D 11.25 μM เกิดแคลลัส 84.7%

พิจิกา (2545) ทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมชักนำแคลลัสได้โดยใช้เมล็ดข้าว 6 พันธุ์ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105, เหลืองประทิว 123, น้ำสะกุย 19, หอมคลองหลวง 1 และหอมสุพรรณบุรี ภายใต้สภาพที่มีแสงและไม่มีแสง พบว่าสูตรที่เหมาะสมสำหรับการชักนำ แคลลัส คือ MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งสองสภาพแสง ได้จำนวนแคลลัส 72.4, 73.4, 74.6, 24.4, 10.6 และ 0 เปอร์เซ็นต์

ในปี พ.ศ. 2546 ปิติพงษ์ ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราความมีชีวิตของเมล็ดสังเคราะห์ข้าวโพดหวานโดยเปรียบเทียบการเจริญของแคลลัสในอาหาร 2 สูตร คือ MS และ N6 พบว่าอาหารสูตร N6 ที่มีน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ 2,4 –D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำและเพิ่มจำนวนแคลลัสได้ นอกจากนี้การเพิ่มสารเบนโนมิลจะทำให้เมล็ดสังเคราะห์งอกเพิ่มขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยมีอัตราการงอกอยู่ที่ 41 เปอร์เซ็นต์

2. ธาตุอาหาร (nutrients) นอกจากต้องการธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักทั่วไปของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว อาหารเสริมพวกกรดอะมิโน เช่น กลูตามิน แอสปาติน อาร์จินิน พิวรีน และไพริมิดิน สารพวกเคซินไฮโดรไลเซท สารสกัดจากมอลท์ ยีสต์ และน้ำมะพร้าว มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วยเช่นกัน
3. แหล่งของคาร์บอน (carbon sources) ที่สำคัญได้แก่ น้ำตาลซูโครส หรือแซคคาโรส ความเข้มข้น 2-4%
4. ปัจจัยสิ่งแวดล้อม (environmental factors) โดยเฉพาะแสง ซึ่งต้องการความเข้มต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25°C นอกจากนี้ยังต้องการออกซิเจนเพื่อการหายใจของเซลล์
5. สภาพอาหาร (media status) แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งมักเจริญเติบโตได้น้อยและช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า และตำแหน่งที่ชิ้นส่วนของแคลลัสสัมผัสกับอาหารมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาโบลิซึม (metabolic wastes)

ความเป็นกรด-ด่างของอาหาร (pH of nutrient medium)

ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร เรียกว่า pH ซึ่งเป็นตัวชี้วัดความเข้มข้นไอออนของไฮโดรเจนที่มีอยู่ในสารละลาย พืชชนิดต่างๆ ต้องการ pH ที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน โดย pH ของอาหารเพาะเลี้ยงดังกล่าวต้องไม่ทำลายเนื้อเยื่อพืชและมีข้อควรคำนึงในการเลือก pH (Thorpe *et al.,* 2008) ดังนี้

- ควบคุมเกลือให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้
- อิทธิพลต่อการดูดซึมธาตุอาหารและสารคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหาร
- ผลต่อปฏิกิริยาเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวเร่งปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์
- ผลต่อประสิทธิภาพในการเกิดเจลของวุ้น

โดยทั่วไปจะปรับให้มีค่าเป็น 5.0-6.0 ก่อนเติมวุ้นแล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อ เนื่อง pH ของอาหารนั้นเป็นอันตรายต่อไอออนที่เป็นประโยชน์และการดูดซึมแร่ธาตุในอาหารมากกว่าการเป็นอันตรายต่อเซลล์พืชโดยตรง ฉะนั้นควรลีกเลี่ยงค่า pH ที่สูง (>7) หรือต่ำ (<4) เกินไปเพราะจะไปขัดขวางความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหาร (รังสฤษดิ์, 2540)

การที่ pH ต่ำเกินไปอาจเกิดสิ่งต่อไปนี้ คือ (คำนูญ, 2542)

1. IAA และกรดจิบเบอเรลลิกมีความคงตัวต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. วุ้นไม่แข็งตัว
3. เกลือบางอย่าง เช่น ฟอสเฟต เหล็ก ตกตะกอน
4. วิตามินบี 1 และกรดแพนโททินิกไม่เสถียร
5. การนำเข้าของแอมโมเนียมอิออนในเซลล์เกิดได้ช้า

สอดคล้องกับการศึกษาของ Mimura *et al*., (2000) พบว่าหากค่า pH มีค่าต่ำมาก (pH<4) จะส่งผลให้ฟอสเฟตเปลี่ยนรูปจากสารอนินทรีย์เป็นสารอินทรีย์ ทำให้พลังงาน (ATPs) และการเจริญเติบโตของพืชลดลง Bhatia and Ashwath (2005) กล่าวว่าค่า pH ไม่ได้เป็นอันตรายต่อเซลล์พืชโดยตรงแต่มีผลต่อสมดุลการดูดใช้ในโตรเจน การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยงสามารถอธิบายได้จากแหล่งของไนโตรเจนที่พืชดูดไปใช้ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะมีแหล่งของไนโตรเจน 2 รูป คือ NH_4^+ (ammonium) และ NO_3^- (nitrate) (Dougall, 1980)

1. การดูดซึมไอออนและโมเลกุล

pH ของอาหารมีผลต่อความเป็นประโยชน์ของแร่ธาตุหลายตัว (Scholten and Pierik, 1998) โดยทั่วไปการดูดซึมไอออนประจุลบ (anion) เกิดได้ดีในอาหารที่ pH เป็นกรด ขณะที่ไอออนประจุบวก (cation) เกิดได้ดีในอาหารที่มี pH เพิ่มขึ้น ความสัมพันธ์ของการดูดซึมไอออนประจุบวกและประจุลบของธาตุอาหารมีผลทำให้ pH ของอาหารเปลี่ยนแปลง โดยพืชจะปลดปล่อยไอออน OH^- (hydroxyl) ออกมาเพื่อแลกเปลี่ยนไอออน NO_3^- ซึ่งมีผลทำให้อาหารเพาะเลี้ยงมีความเป็นด่างมากขึ้น ส่วน NH_4^+ (ammonium) ใช้สำหรับแลกเปลี่ยน proton (H^+) ทำให้อาหารเป็นกรดมากขึ้น ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การดูดซึมของไอออนและผลต่ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

	การดูดซึม NH_4^+	การดูดซึม NO_3^-
อัตรา	เกิดได้ดีที่สุดในสารละลายที่เป็นด่างหรือกรดอ่อน	เกิดได้ดีที่สุดในสารละลายที่ค่อนข้างเป็นกรด
ผล	พืชปลดปล่อย Proton (H^+) ออกมาทำให้อาหารเป็นกรดเพิ่มขึ้น	พืชปลดปล่อย Hydroxyl (OH^-) ออกมาโดยพืชอาหารเป็นด่างเพิ่มขึ้น

ที่มา : Thorpe *et al.* (2008)

Asher (1978) ได้ทำการศึกษาอาหารสังเคราะห์สำหรับเพาะเลี้ยงกลุ่มพืชมีเมล็ด (spermatophytes หรือ seed plants) ซึ่งอาหารมี NH_4^+ เป็นแหล่งของไนโตรเจนในอาหารเพียงอย่างเดียวเท่านั้น พบว่า ที่ pH ต่ำ มีการดูดซึม NH_4^+ ได้ไม่ดี แต่อาหารที่เพาะเลี้ยงหน่อไม้ฝรั่งและปรับให้มี pH 5.5 พบว่า มีการดูดซึม NH_4^+ ได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยที่ pH ต่ำ (4 หรือ <4) รากพืชมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความสามารถดูดซึมไอออนชนิดใดก็ได้ซึ่งอาจจะดูดซึมไอออนที่ที่สูญเสียความสามารถในการละลายน้ำ ทำให้เจริญเติบโตของพืชลดลง ในทางกลับกันการดูดซึม NO_3^- เกิดขึ้นได้ยากในอาหารที่มี pH เป็นกลางหรือสูงกว่า (Martin and Rose, 1976) ในการเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์แคลลัสของ *Rumex acetosa* (ซอร์เรล) บนอาหารที่มี NO_3^- เป็นแหล่งของไนโตรเจน พบว่า การดูดซึม NO_3^- เกิดได้ดีในอาหารที่มี pH 3.5 ซึ่งดีกว่าอาหารที่มี pH 5.0 (Nickell and Burholder, 1950) ขณะที่ Chevre *et al.,* (1983) พบว่าการทวีจำนวนตาข้างในการเพาะเลี้ยงยอดของ *Castanea* (เกาลัด) เกิดได้ดีที่สุดเมื่ออาหารสูตร MS มีค่า pH 4.0 และมีความเข้มข้นของ Ca_2^+ และMg_2^+ เป็น 2 เท่า

ในปี ค.ศ. 2002 Ramage and Williams ได้ทำการศึกษา ธาตุอาหารและการเปลี่ยนรูปร่างในการเพาะเลี้ยงยาสูบ พบว่า ในอาหารที่ NH_4^+ แหล่งของไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว มีผลให้ pH ของอาหารมีค่าลดลง แต่ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีทั้ง NH_4^+ และ NO_3^- ระดับ pH ของอาหารไม่ลดลง และพบว่าอาหารที่มี NH_4^+ ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ ชิ้นพืชไม่มีการกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) แต่ถ้าอาหารดังกล่าวเติม MES (2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid) ทำให้เนื้อเยื่อของยาสูบมีการก่อกำเนิดเนื้อเยื่อเจริญแต่ว่าไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้

ความเป็นประโยชน์และการดูดซึมไอออนของสารอินทรีย์และโมเลกุลของสารอินทรีย์นั้นอาจได้รับผลกระทบจากการปรับระดับ pH ของอาหาร โดยพบว่า การดูดซึมฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดเมื่อสารละลายอยู่ในสภาพที่เป็นกรด ซึ่งเซลล์ของพิทูเนีย สามารถนำเข้าฟอสเฟตได้อย่างรวดเร็วเมื่ออาหารมี pH 4.0 การดูดซึมฟอสเฟตของเซลล์พืชลดลงเมื่ออาหารมี pH เพิ่มขึ้น (Chin and Miller, 1982) Vacin and went (1949) พบว่าอาหารที่มี pH 6.2 หรือมากกว่า ทำให้เกิดการก่อตัวของสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก ฟอสเฟต ซึ่งเป็นรูปที่ไม่ละลายน้ำ พืชไม่สามารถดูดซึมเพื่อใช้ประโยชน์ได้ ยกเว้นในกรณีที่เพิ่มสัดส่วนของ EDTA (ethylene-diamine-tetra-acetic acid) ให้เหล็กเพิ่มขึ้น (Dalton *et al.,* 1983) การใช้เหล็กในอาหารเพาะเลี้ยงพืชต้องคำนึงถึงค่าความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารค่อนข้างมาก เนื่องจากเหล็กจะเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพืชได้ค่อนข้างง่าย ในอาหารเพาะเลี้ยงส่วนมากจึงใช้เหล็กในรูปที่เป็น chelate เช่น Fe-EDTA เพื่อรักษาให้เหล็กมีความคงตัวได้ดีในอาหารที่มี pH ที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก ซึ่งพบว่า เหล็กจะไม่ละลายในสภาพที่เป็นด่าง เนื่องจาก EDTA ไม่เป็นพิษเหมือน chelate ในรูปอื่นๆ และยังช่วยให้เหล็กอยู่ในสภาพที่เนื้อเยื่อสามารถนำไปใช้แทบทุกสภาพความเป็นกรดเป็นด่าง (ประสาทพร, 2541)

2. การเลือก pH และ pH เริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง

เซลล์และเนื้อเยื่อพืชหลายชนิดที่สามารถทนทานอยู่ในหลอดทดลอง ที่มี pH อยู่ในช่วง 4.0-7.2 แต่ถ้าอาหารปรับให้ที่มี pH 2.5-3.0 หรือ pH 8.0 มีผลทำเซลล์พืชได้ตาย (Butenko *et al.,* 1984) ซึ่งสภาพของอาหารเพาะเลี้ยงที่ให้ผลดีที่สุด คือ เป็นกรดเล็กน้อย จากการสุ่มตัวอย่างผลงานวิจัยการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขยายพันธุ์พืชจากอาหารหลายชนิด พบว่า อาหารมี pH เริ่มต้น 5.6-5.8 แต่การปรับ pH ของอาหารให้ต่ำกว่า 3.5 หรือ 7.1 ก็มีเช่นกัน

Rose and Martin (1976) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Ipomoea* sp. ที่ได้มาจากเนื้อเยื่อส่วนราก โดยปรับให้อาหารมี pH 4.8, 5.6, 6.4 และ 7.1 ซึ่งมี NH_4^+ และ NO_3^- เป็นแหล่งของไนโตรเจน พบว่า อาหารที่มีระดับ pH 4.8 และ 7.1 มีการสร้างกลุ่มเซลล์แขวนลอยได้น้อยที่สุด เนื่องจากอาหารที่ pH เริ่มต้น 7.1 เซลล์พืชไม่สามารถใช้ประโยชน์จาก NO_3^- ที่มีอยู่ในอาหารได้ ส่วนความสามารถของเซลล์ในการการดูดซึมใช้ NH_4^+ ได้ผลดีเมื่ออาหารมี pH เพิ่มขึ้นแต่การดูดซึมจะมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่ออาหารมี pH 6.4 ส่วนการทดลองของ Kartha (1981) พบว่า อาหารที่มีระดับ pH 5.6-5.8 ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อของมันสำปะหลังได้ดี สอดคล้องกับการทดลองของ Davis *et al.* (1977) ที่หา pH ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงปลายยอดของ คาร์เนชั่น บนอาหารสูตร Linsmaier and Skoog (1965) ที่มี adenine sulphate 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ casein hydrolysate 2 กรัมต่อลิตร ที่ปรับให้มีระดับ pH 5.5-6.5 พบว่า อาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงยอดคาร์เนชั่น คือ pH 5.5 ส่วนอาหารที่มี pH 6.0 และ 6.5 ทำให้การเจริญเติบโตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

3. การปรับ pH อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การปรับระดับ pH ของอาหารเป็นขั้นตอนที่ไม่ต้องการการปลอดเชื้อเป็นพิเศษ เนื่องจากต้องปรับโดยใช้ sodium hydroxide (NaOH) หรือ potassium hydroxide (KOH) กับ hydrochloric acid (HCL) โดยใช้ความเข้มข้น 0.1-1.0 โมลาร์ (คำนูญ, 2544) หยดทีละน้อยเพื่อปรับให้อาหารเพาะเลี้ยงมีระดับ pH ที่ต้องการก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อเสมอ Krieg and Gerhardt (1981) รายงานว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มี pH 6.0 หรือ น้อยกว่า เมื่อนำอาหารดังกล่าวไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันโดยใช้ความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (รังสฤษดิ์, 2540) พบว่า วุ้นบางส่วนจะถูกย่อยและทำให้อาหารไม่แข็ง เนื่องจากระดับ pH มีผลต่อการแข็งตัวของวุ้นในอาหาร โดยพบว่า ถ้าอาหารมีระดับ pH ต่ำกว่า 5 จะทำให้อาหารไม่แข็งตัว แต่ถ้าอาหารมีค่า pH มากกว่า 6 จะทำให้อาหารค่อนข้างแข็ง (Bhatia and Ashwath, 2005)

4. ผลของการนึ่งความดันที่มีผลต่อระดับ pH

การนึ่งฆ่าเชื้อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ของอาหาร โดยพบว่า อาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเมื่อผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วโดยทั่วไปจะ pH เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีน้ำตาลซูโครส ส่วนอาหารที่ใช้น้ำตาล มอลโตส กลูโคส หรือ ฟรุกโตส แทนน้ำตาลซูโครส พบว่า ระดับ pH ของอาหารหลังการนึ่งฆ่าเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Owen *et al.,* 1991) ส่วน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาหารเหลวที่เกลือตามสูตรอาหาร MS (เช่น อาหารสูตร Linsmaier and Skoog (1965) หรือ Skirvin and Chu (1979)) ที่มีน้ำตาลซูโครส 3.3-4 % พบว่า หลังการนึ่งฆ่าเชื้อ pH ลดลงจาก pH 5.7 เป็น 5.1 (Singha, 1982) หรือ pH 5.5 (Owen *et al.,* 1991) ส่วนการศึกษาของ Skirvin *et al.*, (1986) พบว่า อาหารที่ปรับให้มี pH 5.0 หลังการนึ่งฆ่าเชื้อ pH ของอาหารลดลงเหลือ 4.2 ส่วนอาหารที่ปรับให้มี pH 6.4 จะลดลงเหลือ 5.1 และอาหารที่มี pH 8.5 จะลดลงเหลือ 8.1

5. ผลของการเก็บรักษาอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ระดับ pH ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลังการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเก็บรักษาไว้มีแนวโน้มที่ลดลง โดย Vacin and Went (1949) รายงานว่าการนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันเป็นการเร่งให้ pH ของอาหารลดลง ส่วน Skirvin *et al.* (1986) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของอาหารสูตร MS แบบทั้งที่เติมวุ้นและไม่เติมวุ้นหลังผ่านการนึ่งความดัน หลังเก็บรักษาเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า มีแนวโน้มเป็นกรดเพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงระดับ pH ของอาหารสูตร MS ที่เติมวุ้นและไม่เติมวุ้น

	อาหารสูตร MS	
เวลา	อาหารเหลว	อาหารแข็งที่มีวุ้น 0.6%
pH เริ่มต้น	5.7	5.7
หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อ	4.6	4.6
หลังจากเก็บรักษา 6 สัปดาห์	4.1	4.4

เพื่อลดการเปลี่ยนแปลงจึงแนะนำให้เก็บรักษาอาหารไว้ในที่มืด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Owen *et al.* (1991) ที่พบว่า ระดับ pH ของอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 0.1 โมลาร์ และวุ้น 0.8 % พบว่า ระดับ pH ของอาหารหลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วค่อนข้างคงที่ เมื่อเก็บในที่มืดและมีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่ถ้าเก็บอาหารไว้ในที่มีแสง และมีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระดับ pH ของอาหารจะลดลง 0.8 หน่วย

2. การเพาะเลี้ยงคัพภะและการกำเนิดคัพภะ (Embryo Culture and Embryogenesis)

การเพาะเลี้ยงคัพภะ (embryo culture) หมายถึง การนำคัพภะที่เกิดจากต้นพืชในสภาพธรรมชาติในถุงรังไข่ (embryo sac) มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชทั้งต้นโดยตรง หรือโดยผ่านการเป็นแคลลัสก่อน

การกำเนิดคัพภะ (embryogenesis) ในสภาพธรรมชาติหมายถึง กระบวนการพัฒนาของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คัพภะที่เกิดขึ้นในต้นพืช ซึ่งเกิดได้ 2 ทาง คือ

1. จากไข่ที่ได้รับการผสม (fertilized egg) แล้วเจริญเป็นไซโกต ก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นคัพภะที่เรียกว่า zygotic embryos และมีโครโมโซมที่เป็นดิพลอยด์ (2n)
2. จากไข่ที่ไม่ได้รับหารผสม (unfertilized egg) จากเซลล์หรือเนื้อเยื่ออื่นๆ คัพภะในกรณีนี้เรียกว่า non-zygotic embryos

2.1 การกำเนิดคัพภะจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (*In Vitro* Embryogenesis)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในปี พ.ศ. 2541 รังสฤษดิ์ จำแนกชนิดของคัพภะได้จากเซลล์หรือเนื้อ เยื่อเริ่มแรกที่นำมาเลี้ยง ดังต่อไปนี้

1. คัพภะที่ได้จากไข่ที่ได้รับการผสม ไข่ที่ได้รับการผสมหรือไซโกตในระยะแรกที่ เรียกว่า proembryo มีการแบ่งตัวที่ไม่เท่ากันได้เซลล์ 2 เซลล์คือ เซลล์ที่มีขนาดเล็กที่อยู่ด้านบน (apical cell) และเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าที่อยู่ด้านล่าง (basal cell) เซลล์ขนาดเล็กที่อยู่ด้านบนเท่านั้นที่จะมีการพัฒนาต่อไปเป็นคัพภะ โดยมีการแบ่งตัวแบบไมโตซิสเพิ่มจำนวนเซลล์จนมีลักษณะเป็นก้อนกลม เรียกระยะนี้ว่า globular-shape stage จากนั้นกลุ่มเซลล์ที่อยู่ส่วนบนจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นรูปคล้ายหัวใจ (heart- shape) จนกระทั่งพัฒนาเต็มที่และมีรูปร่างเหมือนตอร์ปิโด (torpedo-shape)

2. คัพภะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัส ที่เกิดจากการแบ่งเซลล์ของแคลลัส ที่มีความพร้อมและเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็น adventive cells สังเกตได้จากการย้อมสีเซลล์พวกนี้จะติดสีดีกว่าเซลล์อื่นๆ มีไซโตพลาซึมและออร์กาเนลหนาแน่น และแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเกิดเป็นปุ่มก้อนที่ปูดยื่นออกมาในระยะ globular-shape stage ต่อไปจึงเจริญเต็มที่เรียกว่า somatic embryo, embryo-like structure, adventitious embryo หรือ vegetative embryo แต่ที่นิยมเรียกคือ adventive embryo หรือ embryoid

3. คัพภะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์แขวนลอย ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวที่ได้จากการย่อยเนื้อเยื่อพืชด้วยเอนไซม์ เช่น pectinase หรือจากเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการปั่นแยกแคลลัสแล้วเลี้ยงในอาหารเหลว เซลล์เหล่านี้มีการเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ และเปลี่ยนแปลงเป็นกลุ่มเซลล์ที่เกาะกันเป็นก้อน (cell aggregate) ซึ่งต่อไปจะพัฒนาเป็นก้อนกลม (globular-shape) เพื่อพัฒนาเป็นคัพภะที่เจริญเต็มที่

4. คัพภะที่ได้จากเซลล์ร่างกาย จากการศึกษาการกำเนิดคัพภะ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวใบ ก้านใบ และลำต้นอ่อน พบว่าเซลล์เหล่านี้โดยเฉพาะ epidermal cells, palisade cells และ spongy cells มีลักษณะเป็นเซลล์เนื้อเยื่อเจริญที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว และมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเกิดเกิดกลุ่มเซลล์คล้าย globular-shape ซึ่งต่อไปจะพัฒนาเป็นคัพภะที่เจริญเต็มที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การพัฒนาของเอมบริโอที่ได้จากเนื้อเยื่อของแคลลัส

เริ่มจากเซลล์บางเซลล์ในก้อนแคลลัสที่มีความตื่นตัว (active) มากกว่าเซลล์อื่นๆสังเกตได้จากการทดสอบด้วยสีย้อม ซึ่งติดสีเข้มกว่าเซลล์อื่นๆ และเมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์เหล่านั้นมีไซโทพลาซึม ที่เข้มข้นและมีออร์แกนเนล (organelle) หนาแน่น เซลล์ดังกล่าวนี้จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วจนได้เป็นกลุ่ม และปูดยื่นออกมามีลักษณะคล้ายระยะ globular-shaped ต่อมาพัฒนาเป็นระยะ heart-shaped และ torpedo-shaped ในที่สุด (ประศาสตร์, 2538) ในขั้นตอนนี้สามารถทำได้โดยนำแคลลัสมาทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (cell suspension culture)

การชักนำให้เกิด embryogenesis นั้นมีปัจจัยที่ควรคำนึงในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ชิ้นส่วนของพืช ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น แสง อุณหภูมิ ก๊าซออกซิเจน ความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น ธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งมีทั้งที่ส่งเสริมและยับยั้งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเพาะเลี้ยงคัพภะ

1. ชนิดของชิ้นชิ้นส่วนพืช พืชแต่ละชนิด แต่ะพันธุ์มีความยากง่ายในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันแม้กระทั่งในพืชชนิดเดียวกัน เซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่แตกต่างกันก็มีผลต่อการเพาะเลี้ยง

2. ธาตุอาหารในอาหารเพาะเลี้ยง พืชแต่ละชนิดมีความต้องการธาตุอาหารต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ จึงมีความจำเป็นในการเลือกสูตรอาหารให้มีความเหมาะสม ซึ่งมีผู้คิดค้นสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงคัพภะหลายสูตร แต่ส่วนใหญ่ดัดแปลงมาจากสูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1962) โดยคำนึงถึงบทบาทของธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิดคัพภะได้ดี

3. สารควบคุมการเจริญเติบโต จากการศึกษาพบว่ามีสารบางชนิดที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดคัพภะ(ประศาสาตร์, 2538) เช่น

1. 2,4-D มีความสำคัญในการชักนำให้เกิด embryo genesis
2. จิบเบอเรลลิค แอซิด (Gibberellic acid) ยับยั้งการเกิด embryo genesis
3. 7 aza-indole เป็นสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์ออกซิน จึงมีผลในด้านยับยั้งการเกิด embryo genesis
4. เอททีลีน (ethylene) ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเซลล์ในระยะเริ่มแรก
5. BAP, IAA (indole-3-acetic acid), IBA (indole-3-butyric acid) และไคนีติน (Kinetin) ยับยั้ง embryo genesis
6. เซอิติน (Zeatin) และ ALAR (succinic acid 2, 7-methyl-hydrazide) ส่งเสริมการเกิด embryo genesis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ปัจจัยสิ่งแวดล้อม ขณะการเพาะเลี้ยงที่มีผบต่อการกำเนิดคัพภะ ได้แก่
   4.1 แสง ปกติต้องการความเข้มแสงต่ำ เนื่องจากแสงทำให้ออกซินสลายตัวได้ง่ายและยับยั้งการกำเนิดคัพภะ
   4.2 อุณหภูมิ ปกติต้องการอุณหภูมิที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออื่นๆ เล็กน้อย (> 25°C)
   4.3 ออกซิเจน คัพภะหรือเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นคัพภะจะมีกิจกรรมภายในเซลล์ค่อนข้างสูง จึงต้องใช้ออกซินปริมาณมากเพื่อใช้ในการะบวนการหายใจเพื่อให้ได้พลังงามาใช้
5. ความเป็นกรดและด่าง มีความผันแปรขึ้นอยู่กับชนิด อายุ และระยะการพัฒนาของพืชที่นำชิ้นส่วนมาเพาะเลี้ยง

สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดคัพภะร่างกาย

การชักนำให้เกิดคัภพะร่างกายนั้น พบว่าฮอร์โมนที่มีความสำคัญในการกระตุ้นการกำเนิดคัพภะ คือ ออกซิน (Nolan and Rose, 2010) โดยออกซินที่ใช้ ได้แก่ Indole-3-acetic acid (IAA) หรือ Indole-3-butyric acid (IBA) ซึ่งเป็นกลุ่มที่พบในธรรมชาติ กับ Naphthalene acetic acid (NAA), 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) ที่เป็นกลุ่มสารสังเคราะห์ (ประสาทพร, 2541)

IAA เป็นออกซินที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ถูกทำลายโดยแสงและเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่ย่อย IAA คือ IAA oxidase ซึ่งพบเอนไซม์ชนิดนี้ปริมาณสูงในเนื้อเยื่อ ฉะนั้นถ้าใช้ IAA ในอาหารเพาะเลี้ยง จึงควรใช้ในความเข้มข้นสูง เช่น 1-30 มิลลิกรัมต่อลิตร

NAA เป็นออกซินสังเคราะห์ขึ้นมาจึงไม่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ ดังนั้นปริมาณที่ใช้จึงน้อย เช่น NAA 0.1-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

2,4-D เป็นออกซินที่มีฤทธิ์ค่อนข้างแรงกว่า IAA และ NAA พืชบางชนิดจึงเกิดแคลลัสได้เมื่อใช้ 2,4-D ที่มีความเข้มข้น 5-10 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่า บางครั้ง 2,4-D สามารถทำหน้าเป็นได้ทั้งออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งยังไม่ทราบว่าเป็นเพราะเหตุผลใด (คำนูญ, 2544)

ออกซินที่นิยมใช้กระตุ้นในการกำนิดคัพภะร่างกาย คือ 2,4-D และ NAA ที่เป็นสารสังเคราะห์ เนื่องจาก IAA ที่พบในธรรมชาติมีฤทธิ์อ่อนกว่าและสามารถถูกทำลายได้ง่าย (Grossmann, 2003) โดยออกซินจะกระตุ้นการเกิดรูปร่างของ proembryogenic mass (PEMs) และมีการพัฒนาไปเป็น globular stage บางครั้งพบว่า อาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีหรือมีออกซินลดลง ทำให้ PEMs พัฒนาไปเป็น somatic embryo (Zimmerman, 1993; Halperin, 1966)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของโมเลกุลและการมีคุณสมบัติของออกซิน

เนื่องจากมีสารที่เกิดในธรรมชาติและสารสังเคราะห์จำนวนมากมีคุณสมบัติของออกซิน จึงจำเป็นต้องรู้โครงสร้างของโมเลกุลที่ก่อให้เกิดคุณสมบัติของออกซินได้ ซึ่งมีการศึกษากันมาก ในขั้นต้นเข้าใจว่าสารที่จะมีคุณสมบัติของออกซินต้องประกอบด้วยวงแหวนที่ไม่อิ่มตัว มี side chain เป็นกรด ซึ่งต่อมาพบว่าไม่ใช่สาเหตุที่แท้จริง เพราะมีสารหลายชนิดที่ไม่มีลักษณะดังกล่าว แต่มีคุณสมบัติของออกซิน จากการศึกษาของ Thimann ในปี ค.ศ. 1963 ได้สรุปว่า โครงสร้างของโมเลกุลที่สำคัญของสารที่จะมีคุณสมบัติของออกซินคือ ต้องประกอบด้วยประจุลบ (strong negative charge) ซึ่งเกิดจากการแตกตัวของกลุ่มคาร์บอกซิล และประจุลบจะต้องอยู่ห่างจากประจุบวก (weaker positive charge) บนวงแหวนด้วยระยะทางประมาณ 5.5 Angstrom สมมุติฐานของ Thimann นับว่าใช้อธิบายโครงสร้างโมเลกุลของสารที่มีคุณสมบัติของออกซินได้ครบ (ดนัย, 2539)

2. บทบาทและผลของออกซินต่อการพัฒนาการและการเติบโต

1. การยืดของเซลล์ (cellular elongation) ออกซินช่วยทำให้เกิดการขยายตัวของผนังเซลล์ โดยปกติผนังเซลล์ประกอบด้วยด้วยสารประกอบพอลิเมอร์ของสารพอลิแซ็กคาไรด์พวกเซลล์ลูโลส ซึ่งเป็นสารที่มีความเหนียวและแข็ง และสารพวกเพคทิค สารเหล่านี้จะเรียงตัวเป็นชั้นๆ เรียก ไมโครไฟบริล (microfibril) ออกซินทำให้ผนังเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงโดยมีการยืดตัวแบบถาวร (plasticity) ซึ่งไม่ใช่การยืดตัวแบบกลับไปกลับมา (elasticity) ทำให้ผนังเซลล์ขยายตัวทั้งด้านยาวและด้านกว้าง การยืดตัวของผนังเซลล์ต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิด เช่น เซลลูเลส (Cellulases) ช่วยย่อยเซลลูโลส และไฮโดรลิทิกเอนไซม์ (hydrolytic enzyme) เปลี่ยนสารประกอบเพคทิคเป็นเพคทินเอนไซม์เหล่านี้ช่วยทำลายไมโครไฟบริลของผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์อ่อนตัวเกิดการยืดของผนังเซลล์

2. การกระตุ้นการแบ่งเซลล์ (cell division) ออกซินสามารถเร่งการแบ่งเซลล์โดยส่งเสริมการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีน Siberger and Skoog (1953) พบว่าจาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบปริมาณ RNA จะเพิ่มขึ้นอย่างมากหลังจากการใส่ IAA ลงในอาหารเพาะเลี้ยง และจากการใส่สารยับยั้งการสังเคราะห์ RNA หรือโปรตีน ได้แก่ แอคทิโนมัยซินดี (actinomycin D) หรือคลอแรมฟีนิคอล (chloramphenical) ทำให้การเจริญของพืชลดลง (บุญสม, 2544; ลิลี่ และคณะ, 2549)

การศึกษากระบวนการเกิด somatic embryogenesis ในพืช เช่น ถั่วอัลฟัลฟา (alfalfa) แครอท ผักชีฝรั่ง (celery) กาแฟ และธัญพืช พบว่า ส่วนใหญ่ต้องการออกซินสังเคราะห์เพื่อใช้ในกระบวน การ somatic embryogenesis ตามด้วยการย้ายไปสู้อาหารที่ไม่มีออกซินเพื่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเอมบริโอ ซึ่ง 2,4-D เป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซินที่มีการใช้มากที่สุด (Bhojwani and Razdan, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการเพาะเลี้ยง embryogenic ของแครอทเริ่มแรกนั้นจะเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.5-1 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียกอาหารที่มีออกซินนี้ว่า proliferation medium โดยกลุ่มเซลล์ที่อยู่บนอาหารดังกล่าวจะมีการเปลี่ยนแปลงเฉพาะบางส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ เรียก proembryogenic masses (PEMs) และเมื่อย้ายแคลลัสไปยังอาหารที่มีออกซินเล็กน้อยหรือไม่มีออกซินเลย เรียกอาหารนี้ว่า embryo development medium เพื่อให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นเอมบริโอ ซึ่งออกซินที่อยู่ใน proliferation medium เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับเนื้อเยื่อเพื่อพัฒนาเป็นเอมบริโอ ในอาหาร embryo development medium ส่วนเนื้อเยื่อที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีออกซินตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงจะไม่สามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอได้ ดังนั้น proliferation medium จึงถือว่า induction medium สำหรับการเกิด somatic embryogenesis (Sung and Okimoto, 1981) และ PEMs จะไม่รวมกันเป็นเอมบริโอ (Kohlenbach, 1978)

ส่วนกลุ่ม ธัญพืชและพืชตระกูลหญ้า มีรายงานการทดลองการเกิดต้นใหม่ในหลอดแก้วโดยผ่านการเกิด somatic embryogenesis (Vasil and Vasil, 1986) โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ คือ 2,4-D ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสร้าง embryogenic callus ในการเพาะลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มแรกใช้อาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อจากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้นลดลง 5-10 % เพื่อพัฒนาไปเป็นเอมบริโอ

Ling *et al*. (1983) ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยง embryogenic callus จากช่อดอกอ่อนของข้าวลูกผสมรุ่นที่ 1 ของ *Oryza sativa* x *O. latifolia* ในอาหาร HE_5 ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 1,360 มิลลิกรัมต่อลิตร และ casein hydrolyzate 300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าจะได้แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะตัวกันแน่น (compact callus) มีสีขาว โดยที่ embryogenic callus มีระยะในการพัฒนาเป็น embryoid ที่หลากหลาย เช่น ระยะ globular-shaped, heart-shaped, scuellum-shaped และเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นระยะเวลา 1 เดือน สอดคล้องกับการทดลองของ Mariani *et al.* (1998) ได้ทำการทดลองการชักนำให้เกิด somatic embryogenesis โดยตรง จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงที่มาจากคัพภะอ่อนของข้าวพันธุ์ Nipponbare ร่วมกับการใช้ประโยชน์จากกล้อง scanning electron microscopy (SEM) เพื่อใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างที่พื้นผิว somatic embryo โดยนำส่วนของใบเลี้ยงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้น embryo ย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และงอกบนอาหารที่ปราศจากฮอร์โมน พบว่า ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวสามารถแบ่งระยะการพัฒนาของ somatic embryo ออกเป็นดังนี้ proembryo, globular, scutellar และ coleoptilar ซึ่งในแต่ระยะเซลล์มีโครงสร้างพื้นผิวที่มีลักษณะเฉพาะตัว โดยเซลล์ในระยะ proembryo เซลล์ embryogenic มีรูปร่างกลมและมีผิวเรียบ ส่วนระยะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

globular เซลล์ยังคงมีรูปร่างกลมแต่พื้นผิวเซลล์มี fibrillar ปกคลุมผิวและเปลี่ยนแปลงมีลักษณะคล้ายตาข่าย ระยะต่อมา scutellar พบว่าบริเวณสันของตาข่ายจะลดต่ำลง เซลล์มีการพัฒนารูปร่างโดยมีรอยหยักคล้ายโครงสร้างของ scutellum และระยะสุดท้ายเป็น coleoptilar พบว่า coleoptile มีการยืดออกพร้อมกับการโผล่ของราก โดย coleoptile ที่ปรากฏมีพื้นผิวคล้ายผิวชั้นนอกของใบ

Chen *et al.* (2002) ทำการทอลองการชักนำให้เกิด somatic embryogenesis และการเกิดเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนของข้าว พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะเป็น compact บนอาหารสูตร LS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ โดยมี IAA และ kinetin หรือ 6-benzylaminopurine (BAP) แคลลัสจะพัฒนาเป็น somatic embryogenesis ขึ้นภายใน 10 วัน และทำการตรวจสอบโดยดู histological พบว่าบางส่วนของ embryo แสดงโครงสร้างเหมือน scutellum และการรวมกันมี 2 ขั้วของ coleoptile-coleorhiza ซึ่งต้นที่เกิดใหม่นี้มีจำนวนโครโมโซม 2n = 24

Prasart (2004) ได้ทำการทดลองการเกิดเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 และ ข้าวพันธุ์ สุพรรณบุรี 1 ในสูตรอาหารเหลวจำนวน 9 สูตร พบว่าข้าวทั้ง2 พันธุ์ ประสบความสำเร็จการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N6 ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 2 หรือ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่า เซลล์ของข้าวพันธุ์ สุพรรณบุรี 1 อัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าข้าวพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 ขณะที่ความมีชีวิตของเซลล์และ embryogenic cell ของทั้งสองพันธุ์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Ilahi *et al*. (2005) พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวสายพันธุ์ *Oryza sativa* L. cv. Swat-II เมื่อทำการเพาะเลี้ยงข้าวในอาหารสูตร MS ที่ใช้ 2,4-D และ Kinetin หลายระดับ ซึ่งอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรประสบความสำเร็จในการเพิ่มขึ้นของแคลลัสอย่างรวดเร็ว ส่วนการชักนำให้เกิด embryogenesis จะเกิดขึ้นภายใน 2 สัปดาห์ เมื่อเพิ่ม Kinetin เป็น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อนำ somatic embryoid เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เอมบริโอจะงอกและพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved