สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เทคนิคการขยายพันธุ์ส้มพันธุ์น้ำผึ้งด้วยวิธีเลี้ยงคัพภะ

นาย ศิริชัย ศรีสุวรรณ์
นาย สถิตย์ ชัยพงศ์เกษม

ปก
ศ ส152ท
2536

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน.เดือน.ปี.....

6125373 42

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2536

Technical Propagation of Honey Murcott by Embryo culture

Mister Sirichai Srisuwan
Mister Sathit Chaipongkasem

A Special Project Submitted in Partial Fulfilment of the Requirement for the
Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
1993

หัวข้อโครงงานพิเศษ เทคนิคการขยายพันธุ์ส้มพันธุ์น้ำผึ้งด้วยวิธีเลี้ยงคัพภะ

โดย นาย ศิริชัย ศรีสุวรรณ์
นายสถิตย์ ชัยพงศ์เกษม

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

_____ หัวหน้าภาควิชา

(อาจารย์ อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล)

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

_____ ประธานกรรมการ

(รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์)

_____ กรรมการ

(ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม)

_____ กรรมการ

(อาจารย์ พนา โลหะทรัพย์ทวี)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ เทคนิคการขยายพันธุ์ส้มพันธุ์น้ำผึ้งด้วยวิธีเลี้ยงคัพภะ
นักศึกษา นาย ศิริชัย ศรีสุวรรณ์
นาย สถิตย์ ชัยพงศ์เกษม
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา 2536

บทคัดย่อ

เทคนิคการขยายพันธุ์ส้มพันธุ์น้ำผึ้ง (Honey Murcott) ด้วยวิธีเลี้ยงคัพภะ โดยเปรียบเทียบปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเจริญเป็นต้นกล้า อันได้แก่ ชนิดของสูตรอาหาร โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของสูตรอาหารชนิด MS และ M_{EMB} ที่มีต่อการเจริญ เป็นต้นกล้า และอัตราส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมระหว่าง NAA และ Kinetin กับ 2,4-D และ Kinetin จากการทดลองพบว่าสูตรอาหาร M_{EMB} จะให้ผลต่อการเจริญเป็นต้นกล้าของเนื้อเยื่อคัพภะของส้มพันธุ์น้ำผึ้งที่ดีกว่าสูตรอาหาร MS โดยสูตรอาหาร M_{EMB} มีเปอร์เซ็นต์การเกิด เป็นต้นกล้าสูงถึง 30% ในขณะที่สูตรอาหาร MS จะให้ค่าที่ 10% ในการพิจารณาอัตราส่วน ของฮอร์โมนที่เหมาะสมในแต่ละสูตรอาหาร พบว่า สูตรอาหารชนิด MS จะให้ผลการเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าได้ดีที่อัตราส่วนของฮอร์โมน NAA ต่อ Kinetin เท่ากับ 0.2 ต่อ 0 แต่นัยทางสถิติทุกการทดลองไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยจะให้เปอร์เซ็นต์การเกิด เป็นต้นกล้าที่ 10% ความสูงเฉลี่ยของต้นกล้า 75 มิลลิเมตร และสูตรอาหาร M_{EMB} จะให้ผลการเจริญที่ดีที่สุดที่เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้า 30% ที่อัตราส่วนของฮอร์โมน 2,4-D ต่อ Kinetin เท่ากับ 0 ต่อ 0.02

Special Project Title	Propagation Technique of Honey Murcott by Embryo culture	
Name	Mister Sirichai	Srisuwan
	Mister Sathit	Chaipongkasem
Special Project Advisor	Asst. Prof Naowarat	Panyam
Department	Applied Biology	
Academic Year	1993	

Abstract

Various factors influencing seedling in propagation technique of honey murcott by embryo culture are compared. The result shows that the type of media used affects the response of seedling. In generally, M_{EMB} and MS media can promote cell division, shoot and root proliferation from embryo culture and especially M_{EMB} can give high growth percentage at 30% whereas the high growth percentage of MS media is 10%. Investigation of the hormone variation of each media, the variation between NAA and Kinetin is 0.2:0 but in statistically, every treatments are not different at 95% confidential levels. The M_{EMB} media can give the better rate at 30%, 2,4-D:Kinetin is 0:0.02.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเรื่อง " เทคนิคการขยายพันธุ์ส้มพันธุ์น้ำผึ้งด้วยวิธีเลี้ยงคัพภะ " สามารถสำเร็จลุล่วงได้ผลดี โดยความช่วยเหลือของบุคคล หลายท่าน หลายฝ่าย ซึ่งให้การอนุเคราะห์ด้านต่าง ๆ ทางคณะผู้จัดทำโครงงานพิเศษขอกราบขอบพระคุณทุกท่าน ดังรายนามต่อไปนี้

1. ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม อาจารย์ที่ปรึกษาควบคุมโครงงานพิเศษ ซึ่งกรุณาควบคุมดูแลในขั้นตอนต่าง ๆ ของการปฏิบัติการให้แนวคิดข้อมูล เอกสารประกอบการค้นคว้าอันเป็นประโยชน์ อีกทั้งให้ความเอื้อเฟื้ออำนวยความสะดวกทั้งในด้านสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการปฏิบัติการของโครงงาน รวมถึงให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดี

2. อาจารย์ พนา โลหะทรัพย์ทวี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมควบคุมโครงงานพิเศษ ซึ่งกรุณาช่วยเหลือให้คำแนะนำ และเป็นที่ปรึกษาช่วยแก้ไขปัญหา อุปสรรคต่าง ๆ

3. อาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ที่กรุณาช่วยเหลือในด้านการค้นคว้าหาข้อมูล และชี้แนะแนวทางในการดำเนินงาน

4. อาจารย์ทุกท่านที่ให้การสนับสนุนให้โครงงานนี้สัมฤทธิ์ผล

5. เจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือทั้งในด้านการจัดหาอุปกรณ์ และให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ

6. นักศึกษาทุกท่านและผู้มีอุปการะคุณที่ไม่อาจเอ่ยนามได้

คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2537

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
- วัตถุประสงค์	1
- ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
- ประวัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	3
- เมล็ดและเอ็มบริโอ	5
- การเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอ	6
- การเพาะเลี้ยงคัพภะ	7
- การเตรียมและส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	7
- ปัจจัยที่ควบคุมการเจริญของเนื้อเยื่อและ Morphogenesis	11
- ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ	15
- แนวทางการใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรจากเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อ	17
- การประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการปรับปรุงและขยายพันธุ์พืชในระดับอุตสาหกรรม	20
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	20
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	
1. อิทธิพลของความเข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ ของฮอร์โมน NAA และ Kinetin ในสูตรอาหาร MS	25
2. อิทธิพลของความเข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ ของฮอร์โมน 2,4-D และ Kinetin ในสูตรอาหาร M_{EMB}	28
3. การเปรียบเทียบผลของฮอร์โมน 2,4-D, NAA และ Kinetin ในสูตรอาหาร MS และ M_{EMB}	31
4. การเจริญเติบโตที่ผิดปกติ (ไม่เกิดเป็นต้นกล้าตามที่ต้องการ)	32

บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ 43
ภาคผนวก 44
เอกสารอ้างอิง 49

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4-1 เปอร์เซ็นต์การงอกของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA และ Kinetin ที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ 25

ตารางที่ 4-2 เปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นต้นกล้าของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA และ Kinetin ที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ 26

ตารางที่ 4-3 อัตราการเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA และ Kinetin ที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ 27

ตารางที่ 4-4 เปอร์เซ็นต์การงอกของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร M_{EMB} ที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมน 2,4-D และ Kinetin ที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ 28

ตารางที่ 4-5 เปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นต้นกล้าของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหาร M_{EMB} ที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมน 2,4-D และ Kinetin ที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ 29

ตารางที่ 4-6 อัตราการเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหาร M_{EMB} ที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมน 2,4-D และ Kinetin ที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ 30

ตารางที่ 4-7 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอก เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้า ความสูงเฉลี่ยของยอดในอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีฮอร์โมน NAA และ Kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และสูตร M_{EMB} ที่มีฮอร์โมน 2,4-D และ Kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ 31

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 4-1 เปอร์เซนต์การงอกของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในอาหาร MS แต่ละสูตร 33

รูปที่ 4-2 เปอร์เซนต์การเกิดเป็นต้นกล้าของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในอาหาร MS แต่ละสูตร 34

รูปที่ 4-3 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในอาหาร MS แต่ละสูตร 35

รูปที่ 4-4 เปอร์เซนต์การงอกของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในอาหาร M_{EMB} แต่ละสูตร 36

รูปที่ 4-5 เปอร์เซนต์การเกิดเป็นต้นกล้าของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในอาหาร M_{EMB} แต่ละสูตร 37

รูปที่ 4-6 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในอาหาร M_{EMB} แต่ละสูตร 38

รูปที่4-7 แสดงการเจริญเติบโตที่ผิดปกติไปในรูปของการเกิดแคลลัส 39

รูปที่ 4-8 แสดงการเจริญเติบโตที่ผิดปกติไปในรูปของการเกิดแคลลัสและมีการงอกของรากเกิดขึ้นด้วย (ภาพถ่ายจากด้านข้างของขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) 40

รูปที่ 4-9 แสดงการเจริญเติบโตที่ผิดปกติไปในรูปของการเกิดแคลลัสและมีการงอกของรากเกิดขึ้นด้วย (ภาพถ่ายจากด้านล่างของขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) 41

รูปที่ 4-10 แสดงลักษณะต้นกล้าของส้มพันธุ์น้ำผึ้งที่เจริญมาจากคัพภะ (อายุ 5 สัปดาห์) 42

บทที่ 1
บทนำ

ในปัจจุบัน ส้มชนิดต่าง ๆ มีจำนวนลดน้อยลงไปมาก ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากการถูกคุกคามจากพวกแมลง โรคพืช และศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ ส่งผลให้ส้มพันธุ์ดีมีปริมาณน้อยลง มีราคาสูงขึ้น ซึ่งไม่เป็นผลดีต่อตลาดผู้บริโภค ดังนั้น ทางคณะผู้ศึกษาจึงมีความคิดว่า เทคนิคทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ น่าที่จะนำมาพัฒนาในด้านการเพิ่มผลผลิตของส้มพันธุ์ดีนี้ให้สูงขึ้นได้แทนการเพาะปลูกในสภาพปกติ และส้มพันธุ์น้ำผึ้งก็เป็นส้มพันธุ์ดีชนิดหนึ่งที่น่าสนใจศึกษาอยู่มาก เพราะว่าเป็นพันธุ์ที่นิยมของตลาดโลก และมีราคาดี แต่เพราะในประเทศไทยเรามีส้มพันธุ์นี้ในรูปของผลเพียงอย่างเดียว ไม่มีต้น ยอด กิ่ง ก้าน หรือส่วนอื่นใดที่จะนำมาทำการขยายพันธุ์ได้ และการที่จะใช้เมล็ดจากผลส้มมาทำการเพาะปลูกโดยตรงก็เป็นการปฏิบัติที่เสี่ยงอยู่พอสมควร เพราะเมล็ดส้ม 1 เมล็ด จะสามารถให้ต้นกล้าได้เพียง 1 ต้น เท่านั้น ดังนั้น อัตราเสี่ยงจึงมีสูง คณะผู้ศึกษาจึงตัดสินใจที่จะศึกษาการขยายพันธุ์โดยใช้คัพภะแทน ทั้งนี้เพราะส้มเป็นพืชประเภทมีหลายคัพภะอยู่ในเมล็ดเดียว และแต่ละคัพภะก็ยังมีโอกาสที่จะเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าได้ จึงทำให้ได้จำนวนต้นกล้าหลายต้นต่อ 1 เมล็ด เป็นการลดอัตราการเสี่ยงให้น้อยลง และยังได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยพื้นฐานเบื้องต้น ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่จำเป็นต่อการศึกษาในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของอัตราส่วนระหว่างฮอร์โมน NAA ต่อ Kinetin ในสูตรอาหาร MS
2. เพื่อศึกษาอิทธิพลของอัตราส่วนระหว่างฮอร์โมน 2,4-D ต่อ Kinetin ในสูตรอาหาร M_{EMB}
3. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของฮอร์โมน 2,4-D , NAA และ Kinetin ในสูตรอาหาร MS และ M_{EMB} หาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถชักนำให้คัพภะเกิดเป็นต้นกล้าได้ในเปอร์เซ็นต์สูงและมีการเจริญเติบโตที่เหมาะสมที่สุด
4. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ (ไม่เกิดเป็นต้นกล้าตามที่ต้องการ)

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงปัจจัยร่วมที่เหมาะสม สามารถเลือกความเข้มข้นของฮอร์โมนและสูตรอาหารที่จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้าได้มากและดีที่สุด ในช่วงอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียสเพื่อประโยชน์ในการขยายพันธุ์ส้มพันธุ์น้ำผึ้งในประเทศไทย

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ประวัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช(History of Plant Tissue Culture)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เริ่มแรกจากการที่ Gottieb Haberlandt นักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมัน ได้ทำการแยกเซลพืชมาเลี้ยง เพื่อจะทำการศึกษาคุณสมบัติของเซล เมื่อปี ค.ศ. 1902 แต่เขาก็พบความสำเร็จเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในปี ค.ศ. 1930 ได้มีการพัฒนาการเลี้ยงเซลที่แยกมาจากรากของพืชหลายชนิด โดยเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ต่อมาในปี ค.ศ. 1938 สามารถเพาะเลี้ยงอวัยวะ (organ) และแคลลัส (callus) ของพืชได้หลายชนิด และนับตั้งแต่บัดนั้นเป็นต้นมา เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีการพัฒนาไปอย่างกว้างขวาง มีการค้นพบเทคนิคใหม่ ๆ อีกมากมาย จนกระทั่งจวบจนปัจจุบันนี้ สามารถทำการเพาะเลี้ยงเซลเดี่ยว ๆ และโปรโตพลาสต์ของพืชได้หลายชนิด รวมทั้งการใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การตัดต่อยีนส์ การถ่ายยีนส์ เข้ามาร่วมด้วย เพื่อสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ ๆ (ประศาสตร์,2536)

เมล็ดและเอ็มบริโอ (Seed and Embryo)

เมล็ดเจริญเปลี่ยนแปลงมาจากไข่ที่ได้รับการผสมจากกระบวนการถ่ายละอองเรณูภายหลังเกิดการปฏิสนธิโดยเกาะติดกับรก (placenta) ด้วยสายยึด (funiculus) อยู่ภายในผนังรังไข่ หรือเนื้อของผลชั้นใน (endocrap) เมล็ดประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่

1. เปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) เปลี่ยนแปลงมาจากเปลือกหุ้มไข่ (integument) ปกติมี 2 ชั้น

ชั้นนอก (outer integument) เปลี่ยนเป็นเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นนอก เรียกว่า testa มักจะแข็งเหนียว มีสีสันต่าง ๆ ประกอบด้วยเนื้อเยื่อพวก sclereid แต่ในเงาะเปลือกหุ้มชั้นนี้เจริญเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเงาะ (ภูวดล,2535,)

ชั้นใน (inner integument) เป็นเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นใน เรียกว่า tegmen ลักษณะเป็นเยื่อบาง ๆ แต่ในลองกองเนื้อเยื่อของ inner integument นี้เจริญเปลี่ยนแปลงเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อสะสมอาหารพวกแป้ง ทำหน้าที่เป็นอาหารสะสมในเมล็ดแทนเอ็นโดสเปิร์ม

2. เอ็มบริโอ (embryo) เกิดจากเซลสืบพันธุ์เพศผู้ผสมกับไข่ (egg) ซึ่งอยู่ภายในไข่ เจริญเป็นไซโกต (zygote) และเป็นเอ็มบริโอในเวลาต่อมา เอ็มบริโอประกอบด้วย

2.1 ใบเลี้ยง (cotyledon) ในพืชใบเลี้ยงคู่จะมี 2 ใบ ส่วนพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมี 2 ใบ ลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ เรียก scutellum พวกจิมโนสเปิร์มมีหลายใบ ใบเลี้ยงทำหน้าที่สะสมอาหารไว้เลี้ยงต้นอ่อนและช่วยป้องกันยอดอ่อนขณะงอกออกจากเมล็ด

2.2 Epicotyl เป็นส่วนที่อยู่เหนือใบเลี้ยง ส่วนปลายสุดเป็นยอดอ่อน(plumule) ซึ่งจัดเป็น apical meristem เจริญเปลี่ยนแปลงเป็นส่วนของใบและยอด ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีเนื้อเยื่อปกคลุมปลายยอดอีกชั้นหนึ่งเรียกว่า coleoptile

2.3 Hypocotyl เป็นส่วนที่อยู่ใต้ใบเลี้ยง มีส่วนปลายสุดเรียกว่า radicle ซึ่งเจริญเป็นรากต่อไป ปลายของ radicle ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะมีเนื้อเยื่อปกคลุมเรียกว่า coleorhiza

3. เอ็นโดสเปิร์ม (endosperm) เกิดจากการผสมของเซลสืบพันธุ์เพศผู้กับ polar nuclei ที่มีโครโมโซม 2 ชุด (2n) ผสมแล้วได้เอ็นโดสเปิร์มมีโครโมโซม 3 ชุด (3n) เป็นที่สะสมอาหารพวกคาร์โบไฮเดรท โปรตีน ไขมัน สำหรับเลี้ยงต้นอ่อน ในพืชใบเลี้ยงคู่จะเห็นไม่ชัดเจนหรือลดรูปไปเพราะใบเลี้ยงทั้งสองได้ดูดอาหารไปสะสมไว้แทน ทำให้ใบเลี้ยงมีขนาดใหญ่ อวบอ้วน ส่วนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเห็นได้ชัดเจน และมักใช้รับประทานได้ เช่น ส่วนของเนื้อและน้ำมะพร้าว

<u>การเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอ</u>

หลังจากไข่ผสมกับเซลสืบพันธุ์เพศผู้ และเจริญเป็นไซโกต ต่อมาไซโกตแบ่งตัวแบบไมโตซีสได้ 2 เซล ขนาดไม่เท่ากัน เซลที่มีขนาดเล็กอยู่ใกลจากรู micropyle เรียกว่า embryonal cell เจริญเป็นเอ็มบริโอที่แท้จริง โดยมีการแบ่งเซลและแผ่ขยายเซลจนมีรูปร่างเป็นแผ่นแบนคล้ายหัวใจ ปีกสองข้างเซลจะแบ่งตัวและยืดยาวออกเปลี่ยนเป็นส่วนของใบเลี้ยง บริเวณตรงกลางระหว่างใบเลี้ยงทั้งสองจะนูนออกมาเป็นส่วนของ apical meristem ต่อไปจะเจริญเป็นส่วนของ epicotyl อีกเซลหนึ่งมีขนาดใหญ่อยู่ใกล้รู micropyle เรียกว่า suspensor cell เซลนี้จะยืดยาวออกและดันให้เอ็มบริโอที่กำลังเจริญ (proembryo) ฝังเข้าไปในกลุ่มเนื้อเยื่อของถุงเอ็มบริโอ (embryo sac) เซลล่างสุดของ suspensor มีขนาดใหญ่จะดูดสารอาหารเก็บสะสมไว้ในการเจริญ ต่อมาหมดหน้าที่จึงสลายไป ส่วนเซลด้านบนสุดของ suspensor ที่ติดกับกลุ่มเซลของเอ็มบริโอ เรียกว่า hypophysis จะแบ่งตัวและเจริญเป็นส่วนปลายสุดของ radicle พร้อมที่จะแทงออกมาทางรู micropyle เมื่อเมล็ดงอก (ภูวดล,2535)

นอกจากนี้เอ็มบริโอของพืชบางชนิดไม่ได้เจริญมาจากไซโกต แต่เจริญมาจากส่วนใดส่วนหนึ่งของไข่ ซึ่งได้แก่ ส่วนของ nucellus ที่อยู่ภายในไข่ เช่น เอ็มบริโอของพวกส้ม หรือเจริญมาจากผนังด้านในของเปลือกหุ้มไข่ชั้นใน (inner integument) พบในลองกอง โดยเนื้อเยื่อเหล่านี้จัดเป็น somatic tissue ทำให้เอ็มบริโอที่ได้มีพันธุกรรมเหมือนต้นแม่และยังสามารถเกิดได้พร้อมกันหลายเอ็มบริโอภายในเมล็ดเดียว เรียกว่า polyembryo

การเพาะเลี้ยงคัพภะ (embryo)

การนำเอาส่วนของต้นอ่อน (embryo) ในเมล็ดพืชชั้นสูงมาทำการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเทคนิคหนึ่งซึ่งประสบความสำเร็จเป็นอย่างดีนับตั้งแต่ได้เริ่มมีการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเป็นต้นมา ผู้ที่เสนอแนะเทคนิคนี้เป็นคนแรกก็คือ P.R. White ซึ่งได้เขียนหนังสือเรื่องการเลี้ยงเซลของพืชและสัตว์ อธิบายปรากฏการณ์นี้ ในปี 1963 โดยพบว่า คัพภะที่แยกได้จากเมล็ดของ Shepherd's purse (Capsella bursa-pastoris) ซึ่งเป็นพืชตระกูลเดียวกับกะหล่ำและหัวผักกาดขาว สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์และเจริญเติบโตเป็นต้นได้ เช่นเดียวกับการเพาะเมล็ดในสภาพธรรมชาติ หลังจากนั้นก็ได้มีการดัดแปลงและปรับปรุงเทคนิคเพื่อให้เหมาะกับลักษณะของพืชอื่น ๆ ด้วย ในปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคนี้เพื่อการขยายพันธุ์พืชชนิดที่ขยายพันธุ์ได้ยากในสภาพปกติ เช่น ธัญญพืชพันธุ์ผสมบางชนิด ซึ่งภายในส่วนของเอ็นโดสเปิร์มหรือใบเลี้ยงมักจะมีสารยับยั้งการเจริญเติบโตของคัพภะอยู่สูง ทำให้เมล็ดไม่งอกหรือเจริญช้า นอกจากนี้ยังใช้เป็นเทคนิคช่วยในการศึกษาความสัมพันธ์ของขบวนการเมตาบอลิซึม ระหว่างคัพภะกับเอ็นโดสเปิร์ม หรือคัพภะกับใบเลี้ยงได้เป็นอย่างดี (พรทิพย์, 2528)

การเตรียมและส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การคัดเลือกหรือพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อที่จะให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จ ไม่มีอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อตัวใดตัวหนึ่งหรือสูตรใดสูตรหนึ่งที่จะสามารถทำให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลได้ทุกชนิด จึงต้องมีการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงสูตรอาหาร ให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันในพืชชนิดนั้น ๆ วัตถุประสงค์ในการพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น จะขึ้นอยู่กับจุดมุ่งหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายชนิดได้ถูกจัดไว้เป็นให้เป็นประโยชน์ในการใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาสูตรอาหารเพื่อจุดประสงค์เฉพาะที่ต้องการ ได้แก่ callus induction, somatic embryogenesis, anther culture และ shoot proliferation (Roberta, 1992)

โดยทั่วไปแล้ว อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อจะประกอบไปด้วย inorganic salt, plant growth regulators, vitamin, carbohydrate, hexitols และ gelling agent และอาจจะมี amino acids, antibiotics หรือ natural complexes เป็นองค์ประกอบด้วย

Inorganic salts:

สูตรของ inorganic salt สามารถเปลี่ยนแปลงได้ (Gamborg, Murashige, Thorpe, & Vasil, 1976) อย่างไรก็ดี สูตรของ Murashige และ Skoog (MS) (1962) ก็ได้ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง ผลเสียของ MS inorganic salts นี้ คือ จะมีปริมาณไนเตรท โพแทสเซียมและแอมโมเนียมในปริมาณสูง เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรเกลืออื่น ๆ

เกลือเหล่านี้จะถูกเตรียมเป็นสต๊อกที่มีความเข้มข้นเป็น 100 เท่าของสูตรอาหาร และจึงนำแต่ละสต๊อกมาใช้ในปริมาณ 10 มล. ต่อ 1000 มล.ของสารละลายอาหารที่เตรียม สำหรับ NaFeEDTA สต๊อกที่เตรียมไว้ควรจะป้องกันการถูกทำลายให้เสื่อมสภาพโดยแสง ควรเก็บไว้ในขวดสีชาหรือขวดที่ห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอร์ย สต๊อกของเกลือที่เข้มข้นจะให้ความถูกต้องและความรวดเร็วในการเตรียมอาหารสังเคราะห์

วิธีการจัดเก็บสต๊อกเกลือที่ดีที่สุด คือ จัดเก็บไว้ในตู้แช่ ซึ่งจะคงสภาพอยู่ได้นานหลายเดือน ทุกครั้งที่ทำการเตรียมสต๊อก ต้องใช้น้ำกลั่นหรือน้ำปราศจากแร่ธาตุ และต้องมีการติดสลากบอกวันที่เตรียมไว้อย่างชัดเจน สารเคมีที่ใช้ต้องเป็น Reagent-Grade ที่มั่นใจได้ว่า มีความบริสุทธิ์สูง เกลือหลาย ๆ ชนิด สามารถนำมารวมกันเพื่อที่จะให้ได้จำนวนของ stock solution น้อยที่สุด

ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการผสม stock solution คือ สภาพเสถียรและการรวมตัวกันตกตะกอน โดยปกติ Nitrate stock จะมีการตกตะกอน จึงต้องให้ความร้อนจนผลึกละลายอย่างสมบูรณ์ก่อนใช้ ส่วนสต๊อกอื่น ๆ ที่ขุ่นหรือมีการตกตะกอนนอนก้นไม่ควรนำมาใช้

Plant growth regulators :

ชนิดและความเข้มข้นของปัจจัยชนิดนี้ที่นำมาใช้ จะใช้ตามแต่ชนิดของเซลที่ใช้ เซลพืชส่วนใหญ่ต้องการ Auxin (IAA, NAA, 2,4-D หรือ IBA) เพื่อที่จะใช้ในการแบ่งเซล และทำให้เกิดราก ที่ Auxin ความเข้มข้นสูง ๆ สามารถระงับการเกิด morphorgenesis Auxin 2,4-D ถูกนำมาใช้สำหรับการเกิด callus induction IAA,IBA และ NAA ถูกนำมาใช้ใน root induction

โดยปกติการเตรียม stock auxin จะเตรียมโดยนำ auxin 10 มก. มาใส่ในบีกเกอร์ 200 มล. เติม 1 N NaOH หรือ KOH จนผลึก auxin ละลายหมด (ไม่ควรใช้มากกว่า 0.3 มล.) เติมน้ำที่ผ่านการกลั่น 2 ครั้ง ในปริมาณ 90 มล. ทันที และทำให้เป็น 100 มล. ใน Volumetric flask การเตรียม IAA stock ควรจะเตรียมใหม่ทุก ๆ สัปดาห์ ทั้งนี้เนื่องจากจะเกิดการสลายตัวเมื่อถูกแสงและเนื้อเยื่อพืช

Auxin จะคงสภาพอยู่ได้ทุก ๆ อุณหภูมิ อย่างไรก็ดี IAA จะถูกทำลายได้ที่ pH ต่ำ เมื่อถูกแสง และสัมผัสออกซิเจน และ peroxidase (Posthumus, 1971) NAA และ 2,4-D จะคงสภาพได้ดีกว่าฮอร์โมนตัวอื่นในกลุ่มของ auxin

Cytokinin (Kinetin, BA, Zeatin และ 2iP) จะทำให้เกิดการแบ่งเซล ชักนำให้เกิดยอด และเกิด morphorgenesis ของยอด การเตรียม stock ของ Cytokinin มีลักษณะคล้ายคลึงกันกับการเตรียม auxin stock แตกต่างกันตรงที่จะต้องเติม 1 N HCl และน้ำ 2-3 หยด ในการละลายผลึก Cytokinin พร้อมทั้งให้ความร้อนพอประมาณ เพื่อทำให้ผลึกเกิดการละลายที่สมบูรณ์ เติมน้ำกลั่น 2 ครั้งโดยเร็ว เพื่อหลีกเลี่ยงการตกตะกอนของผลึก ทำให้ได้ปริมาตรที่ต้องการโดย

Volumetric flask stock Cytokinin เมื่อนำเก็บในตู้แช่จะคงตัวอยู่ได้นาน Cytokinin (Kinetin และ Zeatin) จะคงตัวในทุกอุณหภูมิ โดยที่เราสามารถตรวจพบได้ แม้จะทิ้งไว้ที่ 120 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (Dekhuijzen, 1971) 2iP และ BA จะคงตัวอยู่ได้ที่ 100 องศาเซลเซียส นานถึง 20 นาที

GA_3 สามารถยับยั้งการเกิด callus อย่างไรก็ตาม ก็ยังสามารถนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับ morphrgenesis การเตรียม stock solution GA_3 เตรียมโดยละลายในน้ำ และปรับ pH ให้เป็น 5.7 สารละลาย GA_3 จะลดประสิทธิภาพลงมากกว่า 90% ถ้าทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 114 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (van Bragt & Pierk, 1971) ก่อนนำมาใช้ในอาหารสังเคราะห์ ควรผ่าน filter sterilization

Abscisic acid เป็นฮอร์โมนพืชที่อยู่ในใบและผล ซึ่งมีประโยชน์ใน embryo culture คงตัวอยู่ได้ แม้จะได้รับความร้อน แต่มีความไวต่อแสง stock solution เตรียมได้โดยการละลายน้ำ

Vitamin :

วิตามินจะมีหน้าที่ในการช่วยให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์โดยเอนไซม์ดำเนินไปได้ วิตามินที่เซลพืชต้องการ ได้แก่ Thiamine (B_1) ส่วนวิตามินอื่น ๆ เช่น nicotinic acid (B_3) และ pyridoxin (B_6) จะถูกนำมาเติมในอาหารสังเคราะห์ วิธีที่ดีที่สุดในการเก็บ stock วิตามิน คือ เก็บในตู้แช่แข็ง และจะใช้เพียง 10 มล. ต่ออาหารสังเคราะห์ 1 ลิตร ผู้เตรียมส่วนใหญ่จะเติมวิตามินลงในอาหารสังเคราะห์ก่อนการ autoclave ในการศึกษาเกี่ยวกับวิตามิน ก่อนนำมาใช้จะต้องผ่าน filter sterilization (Ten Ham, 1971)

Carbohydrate :

เซลสีเขียวในเนื้อเยื่อ โดยปกติจะยังไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์แสง แต่มีความต้องการธาตุคาร์บอนโดยทั่วไป จะใช้ซูโครสหรือกลูโคส 2-5% (w/v) สำหรับแหล่งคาร์โบไฮเดรทอื่น ๆ เช่น ฟรุคโตส และแป้ง ก็สามารถนำมาใช้ได้ สำหรับ protoplast culture จะใช้คาร์โบไฮเดรทในระดับต่ำ ส่วน embryo culture และ anther culture จะต้องการในปริมาณที่สูงกว่า

น้ำตาลจะเกิดเป็นคาราเมล ถ้า autoclave นานเกินไป (Peer, 1971) และจะมีผลต่อสารประกอบอะมิโน เมื่อน้ำตาลได้รับความร้อนจะเสื่อมคุณภาพลง และกลายเป็น melanoidinsซึ่งมีสีน้ำตาล เป็นสารที่มีมวลโมเลกุลสูง และยับยั้งการเติบโตของเซล

Hexitol :

Hexitol-myo-inositol ถูกค้นพบว่า มีความสำคัญต่อ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ myo-inositol เป็น Hexitol ที่น่าสนใจ ที่ถูกพบ ในการสังเคราะห์ cyclitol ในรูปของ polyhydric compound การงอกรากของเมล็ด การส่งผ่านน้ำตาล แร่ธาตุ carbohydrtae metabolism โครงสร้างของเยื่อหุ้ม องค์ประกอบของผนังเซล สภาพไม่สมดุลของฮอร์โมน และการเกิดความเครียดทาง

กายภาพ (Loewus & Loewus, 1983) myo-inositol จะนำมาใช้ในการกระตุ้นให้เกิดต้นกล้า และอาจเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรท ซึ่งบางครั้งก็ทำหน้าที่เหมือนวิตามิน Mannitol และ Sorbitol จะเป็นตัวที่ดีในการรักษาแรงดันออสโมติกให้โปรโตพลาสต์สามารถคงตัวอยู่ได้

Gelling agent :

ชนิดของวุ้นที่นำมาใช้จะมีผลต่อการทดลอง ทั้งนี้ ถ้าวุ้นไม่บริสุทธิ์เพียงพอจะทำให้เกิดการปนเปื้อนในอาหารสังเคราะห์ เพื่อเป็นการป้องกันปัญหานี้ ควรจะทำวุ้นให้บริสุทธิ์ เมื่อละลายวุ้น ควรจะเขย่าให้เข้ากันในขณะที่ให้ความร้อน ทั้งนี้เพื่อป้องกันการไหม้ ควรปล่อยให้วุ้นเกิดการละลายที่สมบูรณ์ก่อนนำไปใช้บรรจุในภาชนะ จะสังเกตได้จากการที่ไม่มีอนุภาคของวุ้นติดข้างขวด แล้วนำไป autoclave

Amino acid :

Amino acid และ amides มีความสำคัญต่อ morphorgenesis กรดอะมิโนชนิด L-from ทุกชนิดจะเป็นฟอร์มปกติที่พบได้ทั่วไปในพืช เช่น L-tyrosine สามารถชักนำให้เกิดยอด L-arginine สามารถกระตุ้นให้เกิดราก และ L-serine สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเซล microspore เพื่อที่จะสร้าง haploid embryos Amides เช่น L-glutamine และ L-asparagine ในบางครั้งจะมีผลต่อ somatic embryogenesis

ปัจจัยที่ควบคุมการเจริญของเนื้อเยื่อและ Morphogenesis

มีปัจจัยหลายอย่างที่ควบคุมการเกิดการเจริญของเนื้อเยื่อและ morphogenesis ซึ่งพอจะสรุปได้ดังนี้

1. ปัจจัยภายใน (Endogenous Factors)

ก. ลักษณะทางพันธุกรรม (Genetic Factor) การเกิดเป็นยอดและ/หรือ รากนั้นขึ้นกับชนิดของพืช พืชบางชนิดอาจจะเกิดเป็นรากและยอดได้ง่าย ในขณะเดียวกัน พืชอีกชนิดหนึ่งเกิดขึ้นได้ยากแม้จะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมขบวนการเกิดเป็นยอด และ/หรือ ราก จะผ่านกระบวนการ organogenesis หรือ embryogenesis ขึ้นกับชนิดของพืชด้วย ยกตัวอย่างเช่น ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบ การเกิดยอดหรือรากจะผ่านขบวนการ organogenesis ในขณะที่การเลี้ยงเนื่อเยื่อของแครอท การเกิดยอด และ/หรือ ราก จะผ่านขบวนการ embryogenesis ทำนองดียวกัน เนื้อเยื่อส่วนของรังไข่ (ovary) หรือ อับเรณู (anther) เมื่อนำมาเลี้ยงมักจะพัฒนาเป็น embryogenesis มากกว่า organogenesis ซึ่งเป็นตัวอย่างแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของพันธุกรรม (ไพบูลย์, 2524)

ข. สารควบคุมการเจริญเติบโตในพืช (Hormones) จากทฤษฎีของฮอร์โมน ได้พยายามอธิบายและพิสูจน์ว่าฮอร์โมนมีบทบาทอย่างมากกับขบวนการ morphogenesis ซึ่งเข้าใจว่าการเกิด

morphogenesis จะถูกควบคุมด้วยระดับและชนิดของฮอร์โมน ในชิ้นส่วนของพืชฮอร์โมนบางชนิดอาจจะช่วยส่งเสริมให้มีการเกิด morphogenesis ในขณะที่ฮอร์โมนบางตัวชะงักการเกิดขบวนการดังกล่าว

ระดับ (levels) และชนิด (kinds) ของฮอร์โมนในชิ้นส่วนของพืชมีความแตกต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดของพืช, ชนิดของเนื้อเยื่อ, สภาพของเนื้อเยื่อ และอื่น ๆ คือ

(1) ชนิดของพืช ในพืชแต่ละชนิดมีระดับและชนิดของฮอร์โมนแตกต่างกันได้ เช่น ในพืชชนิดหนึ่งอาจจะมีฮอร์โมนชนิด auxin ในปริมาณมาก แต่อีกชนิดหนึ่งอาจจะมีฮอร์โมนชนิด auxin ในปริมาณน้อย แต่มี gibberellin ในปริมาณมาก เป็นต้น

(2) ชนิดของเนื้อเยื่อ แม้ในต้นพืชต้นเดียวกันเนื้อเยื่อแต่ละชนิดก็ยังมีระดับและชนิดของฮอร์โมนแตกต่างกันออกไปได้ เช่น ที่ตายอดจะมีปริมาณของฮอร์โมนชนิด auxin มากกว่าในใบหรือต้น ส่วนในใบอ่อนก็จะมีปริมาณ auxin มากกว่าในใบแก่ ในรังไข่ (ovary) มีปริมาณ auxin ค่อนข้างสูง และในเมล็ดมีปริมาณ auxin และ/หรือ gibberellin ค่อนข้างสูง เป็นต้น

(3) สภาพของเนื้อเยื่อ เนื้อเยื่อของพืชจะมีการเจริญและพัฒนาอยู่เสมอ ฉะนั้น ระดับและชนิดของฮอร์โมนที่อยู่ในเนื้อเยื่อชนิดหนึ่ง ๆ จึงมีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพ เป็นที่เชื่อกันว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับและชนิดของฮอร์โมนเป็นสาเหตุทำให้เนื้อเยื่อมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระ มิใช่เป็นผลของการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ดี การเปลี่ยนแปลงทางสรีระของเนื้อเยื่อและการเปลี่ยนแปลงระดับและชนิดของฮอร์โมนในเนื้อเยื่อมักจะเกิดควบคู่กันไปเสมอ ยกตัวอย่างเช่น ในหัวลิลี่ (Lily)หรือซ่อนกลิ่นฝรั่ง (Gladiolus) ขณะที่เก็บมาจากแปลงปลูกใหม่ ๆ หัวของพืชเหล่านี้จะยังอยู่ในสภาพพักตัว (dormant stage) ซึ่งพบว่ามีปริมาณสารยับยั้งการเจริญเติบโต (inhibitor) เช่น abscissic acid (ABA) มาก และมี gibberellins ในปริมาณน้อย แต่เมื่อหัวของลิลี่หรือซ่อนกลิ่นฝรั่งได้รับอุณหภูมิต่ำ ปริมาณ ABA จะลดลง ในขณะที่ปริมาณ gibberellins เพิ่มขึ้นพร้อมกับระดับการพักตัวก็ลดลงด้วย จึงมีรายงานว่าการนำเนื้อเยื่อของหัวลิลี่หรือซ่อนกลิ่นฝรั่งขณะพักตัวไปเลี้ยงในอาหารเทียมมักจะประสบความสำเร็จในการเกิดหัวย่อย (bulblets หรือ cormels) น้อยกว่าการนำเนื้อเยื่อที่ไม่พักตัวไปเลี้ยง ซึ่งมีรายงานเช่นเดียวกับในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของมันฝรั่ง พบว่า หากนำเนื้อเยื่อของมันฝรั่งในเดือนธันวาคมและเดือนเมษายนไปเลี้ยงในอาหารเทียม เนื้อเยื่อจะเจริญและสร้างหัวมันฝรั่งได้ดี แต่ถ้านำเนื้อเยื่อของมันฝรั่งที่อยู่ในเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมีนาคมหรือพฤษภาคมถึงพฤศจิกายนไปเลี้ยง เนื้อเยื่อจะไม่ค่อยสร้างหัว ซึ่งมีส่วนสัมพันธ์กับระดับและชนิดฮอร์โมนในเนื้อเยื่อของมันฝรั่งขณะที่นำมาเลี้ยง

จึงเห็นได้ว่าการเกิด morphogenesis ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชมักจะมีความแปรปรวนสูง ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุมาจากความแปรปรวนของระดับและชนิดของฮอร์โมนในเนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยงนี้ได้

2. ปัจจัยภายนอก (Exogenous Factors)

ปัจจัยหลายอย่างที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับ morphogenesis ของเนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ คือ

ก. แสง (Light) พืชหลายชนิดที่ต้องการความมืดในการเกิดรากหรือยอด เมื่อนำเนื้อเยื่อของพืชเหล่านี้มาเลี้ยงในอาหารเทียม ยกตัวอย่างเช่น ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของฟรีเซีย (Freesia) เนื้อเยื่อต้องได้รับความมืดประมาณ 8 สัปดาห์ เพื่อเกิดตายอด (shoot primodia) หากได้รับแสงตายอดนี้จะไม่เกิด จึงเห็นได้ว่าแสงเป็นตัวจำกัด (limiting factor) การเกิดตายอดในทางตรงกันข้าม มีพืชอีกหลายชนิดที่จะเกิดยอดหรือรากได้ก็ต่อเมื่อได้รับแสงเท่านั้น

ในการให้แสงแก่เนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนั้น เชื่อกันว่าการให้แสงมิได้มีจุดมุ่งหมายเพื่อให้เนื้อเยื่อใช้แสงในการปรุงอาหาร (photosynthesis) แต่เพื่อช่วยการเกิด morphogenesis มากกว่า ซึ่งการให้แสงแก่เนื้อเยื่อนี้ควรพิจารณาดังนี้ คือ

(1) คุณภาพของแสง (Light Quality) จากการทดลองพบว่า แสงสีแดง (red light) และแสงสีน้ำเงิน (blue light) มีความสำคัญในการชักนำให้เกิดยอดจากเนื้อเยื่อพืชของหลายชนิดที่นำมาเลี้ยง ในขณะที่แสงฟาร์เรด (far-red light) มักจะชะงักการเกิดยอด มีผู้ทำการทดลองในการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนใบของ petunia พบว่า หากเนื้อเยื่อได้รับแสงสีแดงจะเกิดยอดบนเนื้อเยื่อมาก แต่ในทางตรงกันข้าม หากเนื้อเยื่อได้รับแสง far-red จะเกิดยอดบนเนื้อเยื่อน้อย ผลของแสงสีแดงและแสง far-red นั้นสามารถลบล้างกันได้ ขึ้นอยู่กับว่าเนื้อเยื่อได้รับแสงชนิดใดหลังสุด

Red light

เนื้อเยื่อ ——————→ ยอดเกิดบนเนื้อเยื่อมากมาย

F-Red light

เนื้อเยื่อ ——————→ ยอดเกิดบนเนื้อเยื่อน้อย

Red-- F-Red

เนื้อเยื่อ ——————→ ยอดเกิดบนเนื้อเยื่อน้อย

F-Red-- Red

เนื้อเยื่อ ——————→ ยอดเกิดบนเนื้อเยื่อมากมาย

จึงได้ตั้งสมมติฐานว่า morphogenesis ถูกควบคุมด้วยระบบ phytochrome ซึ่งการทดลองสนับสนุนสมมติฐานนี้ควรได้มีการทดลองต่อไป

ด้วยเหตุนี้หลอดฟลูออร์เรสเซนต์ (fluorescent lamp) จึงเป็นที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป อย่างไรก็ดี การให้แสงโดยมีหลอดไฟฟ้าธรรมดา (incandescent lamp) ก็จะทำให้ความสมดุลของแสงดีขึ้น

(2) ความเข้มของแสง (Light Intensity) โดยปกติในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืช เริ่มแรกจะให้แสงความเข้มข้นที่ต่ำคือ ประมาณ 100 กำลังเทียน หรือต่ำกว่าเพื่อให้เกิดตายอด (shoot primodia) หลังจากนั้นจะให้ความเข้มของแสงเพิ่มขึ้นเป็น 300-1,000 กำลังเทียน เพื่อช่วยให้ตายอดเจริญ (shoot development) ได้ดี จากการทดลองการเกิดยอดของมอสส์ (Phycomitrium turbinatum) โดยการให้แสงในระดับต่าง ๆ พบว่า การเกิดยอดแปรผันโดยตรงกับความเข้มของแสงในช่วง 30 ถึง 70 กำลังเทียน เมื่อใช้ incandescent lamp ส่วนการเกิดรากของเนื้อเยื่อช่อนกลิ่น (Helianthus tuberosus) จะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อได้รับแสง 500 กำลังเทียน

(3) ระยะเวลาให้แสง (Light Duration) โดยทั่ว ๆ ไป มักจะให้แสงแก่เนื้อเยื่อพืชประมาณ 16 ชั่วโมง และมีช่วงมืด 8 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลดีในการเกิด morphogenesis ในพืชหลายชนิด แต่มีบางพืชที่ต้องการแสงต่ำกว่า 16 ชั่วโมง จึงจะเกิด morphogenesis ได้ เช่น ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของกะหล่ำดอก ต้องได้รับแสง 9 ชั่วโมง จึงจะเกิดตายอด ส่วนเนื้อเยื่อของช่อนกลิ่น (Helianthus tuberosus) ต้องได้รับแสง 12 ชั่วโมง จึงจะเกิดรากได้ เป็นต้น

อย่างไรก็ดี ได้มีผู้เชื่อว่าปริมาณแสงชนิดใดชนิดหนึ่ง (ความเข้มข้นของแสง ระยะเวลาที่ให้แสง) มีความสำคัญมากกว่าความเข้มข้นของแสงหรือระยะเวลาในการให้แสงเพียงอย่างเดียวในการชักนำหรือควบคุมการเกิด morphogenesis

ข. อุณหภูมิ (Temperature) การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่ว ๆ ไป มักจะใช้อุณหภูมิคงที่ประมาณ 25 องศาเซลเซียส แต่ก็มีพืชอีกหลายชนิดที่ยังไม่ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่จำกัดความสำเร็จนี้ การศึกษาผลของอุณหภูมิยังมีไม่มากนัก F. Skoog (1944) รายงานว่า การเกิดยอดบนเนื้อเยื่อยาสูบจะเกิดได้ดีถ้าเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส แต่ถ้าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส หรือ 12 องศาเซลเซียส เนื้อเยื่อจะเกิดยอดจำนวนน้อย นอกจากการใช้อุณหภูมิคงที่แล้ว การใช้อุณหภูมิสูงต่ำสลับกันระหว่างกลางคืนและกลางวันก็มีส่วนทำให้เลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชบางชนิดประสบความสำเร็จ เช่น การเลี้ยงเนื้อเยื่อของช่อนกลิ่น (Helianthus tuberosus) เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิกลางวัน 26 องศาเซลเซียส สลับกับกลางคืน 15 องศาเซลเซียส จะชักนำให้เกิดรากได้ดีกว่าใช้อุณหภูมิคงที่ แต่การให้อุณหภูมิสลับกลางคืนกลางวันของการเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Chondrilla juncea จะทำให้เกิดยอดได้พอ ๆ กับการเลี้ยงที่อุณหภูมิคงที่ 25 องศาเซลเซียส

ค. สารควบคุมการเจริญเติบโต (Growth Regulators) การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นใช้กันมานานแล้วแต่เพิ่งจะนำมาใช้กันอย่างจริงจัง Miller และ Skoog (1957) ได้เสนอไว้ว่า การเกิดเป็นต้น ราก หรือ แคลลัสของพืชแต่ละชนิดนั้นขึ้นกับความสมดุลของ

ปริมาณ Auxin และ cytokinin ในอาหาร หากอัตราส่วนของ auxin ต่อ cytokinin มีอยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ แต่ถ้าอัตราส่วนของ auxin ต่อ cytokinin ไม่เหมาะสม เนื้อเยื่อจะเจริญไปเป็นยอดหรือรากมากขึ้นกับปริมาณ auxin และ cytokinin ว่ากลุ่มใดมีมากกว่ากัน หากปริมาณ auxin มาก ทำให้อัตราส่วน auxin ต่อ cytokinin สูงกว่าอัตราสมดุลย์ เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นก้อนแคลลัสและราก แต่ถ้ามีปริมาณ auxin น้อย แต่มี cytokinin มาก ทำให้อัตราส่วน auxin ต่อ cytokinin ต่ำ ก็จะทำให้เนื้อเยื่อเจริญเป็นยอดมาก จึงเห็นได้ว่าความสมดุลย์ของ auxin และ cytokinin มีความสำคัญมากในการควบคุม morphogenesis ของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารเทียม เป็นที่เชื่อกันว่าความสมดุลของ auxin และ cytokinin ที่ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับปริมาณฮอร์โมนที่อยู่ภายในชั้นเนื้อเยื่อ เช่น ชั้นเนื้อเยื่อมีฮอร์โมนชนิดใดชนิดหนึ่งมากก้อาจจะมีความต้องการสารเร่งการเจริญเติบโต (growth regulators) ชนิดนั้นในอาหารต่ำ เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความสมดุลย์ที่แท้จริงของฮอร์โมนในชั้นของเนื้อเยื่อ

นอกจาก auxin และ cytokinin แล้ว สารตัวอื่น ๆ ก็มีความสำคัญในการควบคุมการเกิด morphogenesis ด้วย เช่นเมื่อมี gibberellic acid ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อมากจะทำให้เกิดการ morphogenesis เป็นไปได้ยากขึ้น การใส่ ABA ลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนใหญ่มักจะไประงับการเกิดต้น และ/หรือราก แต่ในพืชบางชนิด การใช้ ABA จะช่วยกระตุ้นให้เกิดต้นดีขึ้น เอทิลีน (ethylene) ไม่ว่าจะใช้ในรูปแก๊สหรือรูปสารที่ปล่อยแก๊สเอทิลีนออกมา (ethylene releasing compound) เช่น ethephon จะไปชะงักการเกิด embryogenesis ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของแครอทและการงอกสปอร์ของเฟิร์น เป็นต้น

3. ปัจจัยอื่น ๆ

ก. ขนาดของชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง (Size of Explant) เป็นที่สังเกตของนักเลี้ยงเนื้อเยื่อว่าขนาดชิ้นส่วนมีความสำคัญในการเกิด morphogenesis การใช้ชิ้นส่วนขนาดใหญ่มีโอกาสเกิด morphogenesis ได้ดีกว่า การใช้ชิ้นส่วนขนาดเล็ก

ข. สภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Cultural condition) เนื้อเยื่อบางชนิดเมื่อเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งจะเกิด morphogenesis ได้ แต่ไม่เกิดเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เช่น กล้วยไม้ เป็นต้น แต่ในพืชบางชนิดสามารถเกิด morphogenesis ได้ทั้งบนอาหารกึ่งแข็งและในอาหารเหลว นอกจากนี้ปริมาณอากาสที่อยู่ในภาชนะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็มีส่วนควบคุมการเกิด morphogenesis ด้วย เช่น ปริมาณ O_2 มาก เนื้อเยื่อมักจะเกิดเป็นราก แต่ถ้าปริมาณ O_2 น้อยเนื้อเยื่อจะเกิดเป็นยอด

ค. การเปลี่ยนเนื้อเยื่อจากอาหารเก่าลงสู่อาหารใหม่ (subculture) การย้ายเนื้อเยื่อลงสู่อาหารใหม่ (subculture) หลาย ๆ ครั้ง จะทำให้ความสามารถการเกิด morphogenesis ของเนื้อเยื่อนั้นลดลงหรือหายไป ซึ่งสาเหตุยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นเพราะเหตุใด อาจจะเป็นไปได้ที่เนื้อเยื่อเกิดมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุด chromosome ขึ้น

ง. ส่วนประกอบของอาหาร (Medium Component) ส่วนประกอบของอาหารบางชนิดมีส่วนเกี่ยวข้องกับ morphogenesis เช่นการให้ไนโตรเจนในรูปของ NH_4^+ ปริมาณมากในอาหารจะทำให้เนื้อเยื่อเกิด embryogenesis มากกว่าการเกิด organogenesis การผสมสารพวก purine derivatives เช่น adenine หรือ guanine ลงในสูตรอาหารจะช่วยทำให้เนื้อเยื่อเกิดยอดได้ดีขึ้น เป็นต้น นอกจากนี้ปริมาณน้ำตาลก็มีส่วนควบคุมการเกิด morphogenesis ด้วย น้ำตาล sucrose 2% จะชักนำให้เกิดต้นในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของอ้อย แต่ที่ 3% จะไปชะงักการเกิดต้น ทำนองเดียวกัน ในการเกิดท่อน้ำ-ท่ออาหาร ในแคลลัสของ Lilac น้ำตาล 2% ชักนำให้เกิด xylem ส่วนน้ำตาล 4% ชักนำให้เกิด phloem ส่วนน้ำตาล 3% ชักนำให้เกิดทั้ง xylem และ phloem

<u>ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ</u>

ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ทั้งภายในและภายนอกของตัวอย่างพืช ซึ่งพอสรุปได้ดังนี้

1. ชนิดและชิ้นส่วนของพืช พืชแต่ละชนิดมีความยากง่ายในการเพาะเลี้ยงต่างกันและในพืชชนิดเดียวกัน แต่ต่างอวัยวะกัน การเพาะเลี้ยงก็ต่างกัน จริงอยู่แม้ว่าเซลพืชที่มีชีวิตอยู่ทุกเซล มีโอกาสที่จะเจริญไปเป็นต้นพืชได้ (totipotency) แต่โอกาสไม่เท่าเทียมกัน (ประศาสตร์, 2536)

2. ธาตุอาหาร พืชแต่ละชนิดหรือแต่ละอวัยวะต้องการอาหารที่แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ฉะนั้น จึงมีความเหมาะสมกับพืชที่จะทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีผู้คิดค้นไว้มากมายหลายสูตร ต่อไปนี้ จะขอกล่าวถึงธาตุอาหารบางตัวที่มีบทบาทอย่างสำคัญในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจีนีซีส เพื่อเป็นแนวทางในการปรับใช้ควบคู่ไปกับการเลือกสูตรอาหาร

- ธาตุโพแทสเซียม (K) ช่วยส่งเสริมให้เกิดเอ็มบริโอจีนีซีส
- การลดปริมาณของไนโตรเจน (N) ให้ต่ำกว่าระดับปกติ ในสูตรอาหารช่วยส่งเสริมให้เกิดเอ็มบริโอจีนีซีสดีขึ้น
- น้ำมะพร้าวส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอจีนีซีส
- น้ำตาลแซคคาโรส (saccharose) ที่ระดับความเข้มข้น 2-3% ช่วยส่งเสริมให้เกิดเอ็มบริโอจีนีซีส
- ธาตุแคลเซียม (Ca) ในปริมาณสูง จะยับยั้งการเกิดเอ็มบริโอจีนีซีส

3. สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators)

สารควบคุมการเจริญเติบโต หมายถึง สารเคมีที่พืชสร้างขึ้นเอง หรือมนุษย์สังเคราะห์ขึ้นมา ที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งมีทั้งส่งเสริมและยับยั้งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สาร

ควบคุมการเจริญเติบโตมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ ขอยกตัวอย่างสารเคมีบางตัวที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจีนีซีส

- 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) มีความสำคัญในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจีนีซีส

- จิบเบอเรลลิค แอซิด (Gibberllic acid) ยับยั้งการเกิดเอ็มบริโอจีนีซีส

- 7 aza-indole เป็นสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์ออกซิน จึงมีผลในด้านยับยั้งต่อเอ็มบริโอจีนีซีส

- เอทิลีน (ethylene) ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเซลในระยะเริ่มแรก

- BAP (6-benzylaminopurine), IAA (indole-3-acetic acid), IBA (indole-3-butyric acid) และไคนีติน (Kinetin) ยับยั้งเอ็มบริโอจีนีซีส

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

4. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (Environmental factors)

ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่มีบทบาทต่อกระบวนการเอ็มบริโอจีนีซีสมีดังนี้

4.1 แสง เอ็มบริโอจีนีซีสต้องการแสงที่มีความเข้มข้นค่อนข้างต่ำ ยกเว้นพืชบางชนิดที่ไม่ต้องการแสงในการเพาะเลี้ยง

4.2 อุณหภูมิ โดยทั่วไปแล้วต้องการอุณหภูมิที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั่ว ๆ ไป (25 องศาเซลเซียส) เล็กน้อย

4.3 ก๊าซออกซิเจน (O_2) เซลที่มีกิจกรรมสูงย่อมต้องการออกซิเจนเพื่อการหายใจในปริมาณที่มากด้วย

4.4 รังสี (Irradiation) เป็นตัวการทำให้ออกซินสลายตัว มีผลไปยับยั้งการเกิดเอ็มบริโอจีนีซีส

4.5 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีความผันแปรขึ้นอยู่กับชนิดของพืช

<u>ปัญหาและข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ</u> (ประศาสตร์, 2536)

1. มีเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์ค่อนข้างสูง
2. มีวิธีการและขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยาก
3. การย้ายเนื้อเยื่อ (subculture) บ่อย ๆ ทำให้สูญเสียการงอก
4. พืชบางชนิดชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจีนีซีสยากมาก

<u>แนวทางการใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรจากเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช</u> (Prospects of Agricultural Utilization of Plant Tissue Culture)

ความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเจริญก้าวหน้าขึ้นอย่างรวดเร็ว จากความสำเร็จในการเลี้ยงส่วนของอวัยวะพืช เนื้อเยื่อ เซล รวมทั้งโปรโตพลาสต์ จึงได้มีผู้สนใจที่จะนำเอาเทคนิคนี้ไปใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน ทั้งทางด้านวิทยาศาสตร์ (pure science) และ วิทยาศาสตร์ประยุกต์ (applied science) การใช้ประโยชน์จากเทคนิคนี้ นอกจากจะใช้ประโยชน์ในงานวิจัยแล้ว ยังใช้ประโยชน์ในทางการค้าอีกด้วย (ไพบูลย์, 2524)

สำหรับทางด้านการเกษตรนั้น เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางใน 4 สาขาด้วยกันคือ

1. การขยายสายพันธุ์ (Clonal Propagation) คือการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศแบบหนึ่งจากชิ้นส่วนใดชิ้นส่วนหนึ่งของพืช ทำให้ได้ต้นพืชที่ตรงตามพันธุ์เดิมทุกประการในปริมาณมากและภายในเวลาจำกัด การขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ได้นำไปประยุกต์ใช้ในเชิงการค้า โดยได้รับความสำเร็จอย่างใหญ่หลวง ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดได้แก่ การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลต่าง ๆ ในฮาวาย ประเทศไทย มาเลเซีย และ ในยุโรป ทำให้ได้กล้วยไม้ที่ดี ปริมาณมากขึ้นในช่วงระยะเวลาสั้น ในสหรัฐอเมริกา ได้ใช้วิธีนี้ในการขยายพันธุ์ไม้ดอก เช่น เยอร์บีร่า (gerbera) ทำให้สามารถได้ต้นที่เหมือนกันหมด เหมาะที่จะปลูกเป็นการค้าในปริมาณมาก ๆ และนอกจากนี้ยังใช้ในการขยายพันธุ์สับปะรดประดับ (bromeliad) ที่ได้คัดพันธุ์ไว้ให้มีจำนวนมากในระยะเวลาสั้น เป็นต้น

ปัจจุบันการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อได้มีผู้สนใจนำไปขยายพันธุ์พืชหลายร้อยชนิด รวมทั้งไม้ดอก ไม้ประดับ ผัก ไม้ผล และแม้กระทั่งไม้ยืนต้นที่ใช้ปลูกเป็นป่าไม้

2. การปรับปรุงพันธุ์ (Crop Improvement) การใช้เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชนั้นสามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นกับจุดประสงค์ของผู้ปฏิบัติการว่าต้องการจะปรับปรุงในด้านใด ดังนี้

2.1 การสร้างพืชที่มีจำนวนโครโมโซมต่างจากปกติ เช่น การเลี้ยงไข่ (ovules) อับเรณู และเรณู (anthers and pollens) ให้เกิดเป็นพืชที่มีจำนวนโครโมโซมเพียงชุดเดียว (n)ซึ่งจะมีประโยชน์มากในการสร้างสายพันธุ์พืชที่มีจำนวนโครโมโซมสองชุด (2n) ที่เหมือนกันทุกประการ (homozygous plant) โดยการใช้สารพวก colchicine ซึ่งจะเป็นประโยชน์มากในการผสมพันธุ์ หรืออาจเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนเอ็นโดสเปิร์ม (endosperm) ให้ได้ต้นพืชที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นสามชุด (3n) ซึ่งจะให้ผลที่ไม่มีเมล็ด นอกจากนั้นในพืชบางชนิด เช่น กล้วยไม้ ต้นที่มีโครโมโซมสามชุด จะให้ดอกดกกว่าต้นที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ

2.2 ในพืชบางชนิดไข่อ่อน (ovule) หรือไข่ที่ได้รับการผสมแล้ว อาจเจริญไปได้ไม่ตลอด รังไข่อาจจะร่วงหรือเกิดผสมไม่ติดได้ในธรรมชาติ การตัดเอาไข่ที่ยังอ่อนมาเลี้ยง หรือไข่ที่เพิ่งผสมมาเลี้ยงจะทำให้ประสบความสำเร็จได้

2.3 การถ่ายละอองเกสรและผสมเกสรในหลอดแก้ว ในพืชบางชนิดการถ่ายละอองเกสรและ/หรือ การผสมเกสรอาจจะประสบความล้มเหลวในธรรมชาติ หากนำมาเลี้ยงและให้กระบวนการถ่ายละอองเกสรและผสมเกสรเกิดขึ้นในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และมีความชื้นสูงในหลอดแก้ว จะทำให้เกิดความสำเร็จได้

2.4 การแยกความแปรปรวนของเซล ในพืชบางชนิด เนื้อเยื่อที่อยู่ติดกันในต้นพืชอาจมีความแตกต่างกัน ซึ่งเรียกว่า "ไคเมรา" (chimera) เมื่อนำเนื้อเยื่อเหล่านี้มาเลี้ยงจะแยกลักษณะที่แตกต่างออกจากกัน ทำให้สามารถคัดเลือกพันธุ์ใหม่ได้

2.5 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ นอกจากจะคัดเลือกพันธุ์ใหม่ได้จากความแตกต่างของเนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยงแล้ว เนื้อเยื่อในหลอดแก้วอาจจะชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้โดยการใช้รังสี เช่น X-ray หรือการใช้สารเคมี เช่น colchicine ทำให้ได้ต้นที่มีลักษณะต่างออกไปจากพันธุ์เดิม ซึ่งสามารถคัดเลือกพันธุ์ใหม่ได้

2.6 การผสมพันธุ์โดยใช้โปรโตพลาสต์ หลังจากได้ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้พยายามที่จะรวมโปรโตพลาสต์ของพืชต่างชนิดกันเข้าด้วยกัน ซึ่งทำสำเร็จแล้วในพืชบางชนิด วิธีนี้เป็นแนวทางหนึ่งที่จะได้พันธุ์ใหม่ เช่น สามารถทำให้พืชชนิดหนึ่งที่ใช้ไนโตรเจนในอากาศไม่ได้ (non-fixating crop) กลายเป็นพืชที่ใช้ไนโตรเจนในอากาศได้ (fixating crop) โดยการรวมโปรโตพลาสต์ของพืชที่ใช้ไนโตรเจนในอากาสไม่ได้เข้ากับพืชที่ใช้ไนโตรเจนในอากาศได้ เป็นต้น หรือการรวมโปรโตพลาสต์ของพืชที่ทนต่อโรค แมลง กับโปรโตพลาสต์ของพืชที่อ่อนแอแต่ให้ผลผลิตสูง อาจทำให้ได้ต้นพืชที่ทนต่อโรค แมลง และมีผลผลิตสูงได้

3. การผลิตพืชปราศจากโรค (Disease-free Plants) โดยปกติพืชที่ถูกเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อไวรัส (virus) เข้าทำลายเชื้อโรคมักจะติดไปกับเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนของพืชนั้นไปเสมอ ทำให้ไม่สามารถได้พืชที่ปลอดโรค ซึ่งอาจมีผลทำให้พืชอ่อนแอ ผลผลิตลดลง และ อื่น ๆ

การที่จะผลิตต้นพืชให้ปราศจากเชื้อไวรัสโดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นทำได้โดยการตัดส่วนยอด (meristem) ให้มีขนาดเล็กประมาณ 0.01 - 0.05 มิลลิเมตร ซึ่งเข้าใจกันว่า เชื้อไวรัสซึ่งเคลื่อนที่ไปตามท่อน้ำ และท่ออาหาร ไปไม่ถึงบริเวณดังกล่าว แต่การตัดแยกเนื้อเยื่อต้องระวังเป็นพิเศษแล้วนำไปเลี้ยง หาก meristem นั้นปลอดเชื้อโรค ต้นพืชที่ได้ก็จะปลอดโรค ใช้เป็นพ่อ-แม่พันธุ์ เพื่อขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศต่อไปได้ วิธีการนี้ทำกันมากในอุตสาหกรรมไม้ดอกในสหรัฐอเมริกาและในยุโรปที่มีการขายกิ่งปักชำเพื่อปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับกันอย่างกว้างขวาง

4. การเก็บรักษาพืช (Plant Preservation) พืชหลายชนิดได้สูญหายไปจากโลก พืชอีกหลายชนิดมีปริมาณน้อย และกำลังจะหายไปจากโลก การเก็บรักษาพืชเหล่านี้ไว้ให้อนุชนรุ่นหลังได้ดู หรือใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ ทำได้โดยการปลูกพืชเหล่านี้ไว้ในบริเวณที่ปลอดภัยจากการทำลายของคน สัตว์ เช่น ปลูกไว้ในสวนพฤกษชาติ เป็นต้น อย่างไรก็ดี หากมีภัยธรรมชาติ เช่น น้ำท่วม ไฟไหม้ และการระบาดของโรค-แมลง ความสูญเสียของพืชเหล่านี้ก็มีขึ้นได้ นอกจากนี้การเก็บรักษาพืชเหล่านี้ใช้เนื้อที่และแรงงานมาก การเก็บรักษาโดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะใช้เนื้อที่และแรงงานน้อยและปลอดภัย ซึ่งอาจทำได้โดยการเลี้ยงในหลอดแก้ว และคอยเปลี่ยนอาหารอยู่เรื่อย ๆ หรือจะเลี้ยงในอุณหภูมิต่ำเพื่อให้มีการเจริญเติบโตน้อย อันมีผลทำให้มีการเปลี่ยนอาหารน้อยลง นอกจากนี้ อาจจะเก็บเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิต่ำมาก ๆ โดยเนื้อเยื่อไม่ตาย เช่น เก็บในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ซึ่งมีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส จะทำให้เนื้อเยื่อไม่มีการเจริญเติบโต แต่มีชีวิตเมื่อต้องการปลูก ก็นำออกมาปลูกในสภาพปกติ วิธีนี้สามารถเก็บรักษาพืชได้นาน เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อยังใช้ประโยชน์ได้อีกมาก ทั้งในงานวิจัยทางเคมีการศึกษาทางด้านสรีระ และกายวิภาคของพฤกษ์อันจะทำให้มนุษย์เข้าใจพืชได้มากขึ้น และสามารถควบคุมพืชและใช้พืชให้มีประโยชน์มากขึ้นได้

<u>การประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการปรับปรุงและขยายพันธุ์พืชในระดับอุตสาหกรรม</u>

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อขยายพันธุ์พืชเป็นจำนวนมาก ได้พัฒนาจนอยู่ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งในปัจจุบัน มีห้องปฏิบัติการที่ทำงานเกี่ยวกับการขยายพันธุ์พืชในระดับอุตสาหกรรมมากกว่า 200 แห่งทั่วโลก (George EF, PD Sherrington, 1984) การเพิ่มขึ้นของมหาวิทยาลัย สถาบันวิจัยของรัฐ สถาบันวิจัยของเอกชน และสวนพฤกษศาสตร์ มีส่วนที่จะกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาเทคโนโลยีในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Irwin Y.E. Chu, 1986)

มีห้องปฏิบัติงานที่ทำงานเกี่ยวกับการขยายพันธุ์พืชในระดับอุตสาหกรรมจำนวนมากที่ได้รับความนิยมโดยการรับเพาะเลี้ยงพันธุ์ไม้สำหรับประดับบ้านและพืชชนิดอื่นอีกไม่กี่ชนิด ประมาณว่าครึ่งหนึ่งของห้องปฏิบัติงานที่ทำงานเกี่ยวกับการขยายพันธุ์พืชในระดับอุตสาหกรรมทำการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้

การเพิ่มขึ้นของห้องปฏิบัติการ ทำให้เกิดการปรับปรุงตัวในด้านศักยภาพในการผลิต รวมไปถึง การปรับปรุงทางด้านพันธุกรรมในพืชชนิดต่าง ๆ มีความพยายามที่จะพัฒนาวิธีการแบบปลอดเชื้อ ในหลายลักษณะ เช่น การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ploidy modification การปฏิบัติการเกี่ยวกับโปรโตพลาสต์ และการถ่ายทอดยีนแบบต่าง ๆ แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิคที่

ที่ล้ำสมัย เช่น การรวมโปรโตพลาสต์ และการถ่ายทอดยีน ก็ยังมีไม่มากในอุตสาหกรรมการผลิตพืช บริษัทต่าง ๆ สถาบันวิจัยของรัฐ และสถาบันวิจัยของเอกชนได้คาดหมายว่า จะได้กำไรมากมายจากการลงทุน การดำเนินงานต่าง ๆ ใกล้ที่จะบรรลุผลมากขึ้นจากเมื่อ 10 กว่าปีที่ผ่านมา แต่ก็ยังมีข้อสงสัยว่า ในอนาคต เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะพัฒนาเน้นไปทางด้านใด ซึ่งส่วนใหญ่คิดว่า จะมีการพัฒนาในด้านการผลิตพืชผักผลไม้ และมีการพัฒนาพืชเกษตรบ้างพอสมควร

การขยายพันธุ์พืชโดยวิธี micropropagation ในระดับอุตสาหกรรม

กล้วยไม้เป็นตัวอย่างที่ดีในความสำเร็จของการประยุกต์เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับการขยายพันธุ์พืชที่คัดเลือกพันธุ์แล้ว ก่อนจะมีเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเพาะเมล็ดเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการขยายพันธุ์กล้วยไม้ (Lawson RH, SD Hearon, 1973) แต่การขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ยังมีข้อเสียคือมีความแตกต่างกันสูงมากในการแสดงออก เช่น มีการออกดอกอย่างประปรายไม่ตรงตามฤดู ออกดอกไม่พร้อมกันและควบคุมไม่ได้ แต่ถ้าใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคทลียาลูกผสมที่ได้รางวัลชนะเลิศก็จะสามารถขยายพันธุ์ได้ปริมาณมาก มีมาตรฐานเดียวกัน คุณภาพสูง และสามารถกำหนดการออกดอกได้ในเวลาใกล้เคียงกัน เป็นผลทำให้เพาะกล้วยไม้ตัดดอกในอุตสาหกรรมได้ปริมาณมาก (Irwin Y.E. Chu, 1986)

การคัดเลือกชนิดของพืชที่อาจจะได้ผลตอบแทนคุ้มค่าจากการขยายพันธุ์โดยวิธี micropropagation

บริษัทต่าง ๆ ได้พิจารณาที่จะประยุกต์การยายพันธุ์โดยวิธี micropropagation ไป 2 แนวทาง คือ 1. วิธีการขยายพันธุ์

2. เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงสรีระของพืช

1. ใช้วิธี micropropagation เมื่อวิธีการขยายพันธุ์ที่มีอยู่ไม่มีประสิทธิภาพที่ดีพอ

สำหรับพืชแล้ว วิธีการขยายพันธุ์พืชโดยปกติแบบไม่อาศัยเพศนั้น ไม่สามารถทำเป็นอุตสาหกรรมได้ ซึ่งกล้วยไม้อาจเป็นบทสรุปที่ดีที่สุด แต่พืชชนิดอื่น รวมทั้งสตรอเบอรี่ที่ไม่เป็นเถาเลื้อย หน่อไม่ฝรั่งตัวผู้ คาดว่า จะได้รับผลดีอย่างมากในต้นพันธุ์ของดอกไม้และพืชที่มีแต่ต้นตัวผู้เท่านั้น เพราะพืชเหล่านี้จะไม่สามารถคงลักษณะสายพันธุ์ไว้ได้ (Irwin Y.E. Chu, 1986)

2. ใช้วิธี micropropacation เมื่อต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์เพื่อให้ได้ต้นพันธุ์จำนวนมาก

2.1 เมื่อต้องการขยายพันธุ์เพื่อผลิตต้นพันธุ์จำนวนมาก ก่อนที่จะตัดสินใจปลูกพืชชนิดใหม่ บริษัทต่าง ๆมีความสนใจการผลิตต้นพันธุ์โดยวิธี micropropagation ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถ

ขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว เพื่อสามารถผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรม และไม่เพียงแต่ผลิตในเชิงธุรกิจ แต่อาจจะทำเพื่อไว้เป็นต้นพันธุ์สำรอง (stock) ไว้สำหรับขยายพันธุ์ในเวลาต่อไป วิธี micropropagation อาจจะใช้ในการผลิตไม้ตัดดอกจำนวนมาก ไม้กระถางและไม้ตัดดอกทั่วไป

2.2 ความสำคัญของวิธี micropropagation ในแง่เศรษฐกิจ

วิธี micropropagation เป็นวิธีการที่อาจจะแพง แต่อย่างไรก็ตาม ก็เป็นเทคโนโลยีที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้มากขึ้นอีกโดยการเปลี่ยนมาใช้เครื่องจักรกล ค่าใช้จ่ายของวิธี micropropagation เมื่อเทียบกับการขยายพันธุ์แบบปกติแล้วค่าใช้จ่ายใกล้เคียงกัน หรืออาจจะน้อยกว่า เช่น การขายพันธุ์ชาพันธุ์ผสม ถ้าใช้การขยายพันธุ์แบบ micripropagation จะเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการติดตาแบบธรรมดา

3. ใช้วิธี micropropagation เพื่อเพิ่มจำนวนพืช

3.1 เมื่อต้องการพืชที่ปลอดเชื้อโรค

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตองการความสะอาดและปลอดเชื้อ ซึ่งตามปกติแล้วจะไม่มีเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราปนเปื้อน ปัญหาการปนเปื้อนที่พบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น Gypsophila เป็นไม้ตัดดอกที่มีปัญหาในการขยายพันธุ์เนื่องจากขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้ stock Gypsophila จะลดปัญหาที่เกิดขึ้น

3.2 เมื่อต้องการเพิ่มจำนวนกิ่งก้านสาขา

พืชที่มีจำนวนกิ่งก้านสาขามาก เป็นที่ต้องการอย่างสูง จากที่กล่าวมา การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะเพิ่มกิ่งก้านสาขาให้ Syngonium และเราสามารถปรับปรุงสรีระของพืชด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ ซึ่งมีการวิจัยปรับปรุงรูปแบบของพืชให้เหมาะสม

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

1. พืชทดลอง

เมล็ดส้มพันธุ์น้ำผึ้งที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นเมล็ดสด มีความชื้นอยู่ ภายนอกจะมีสีขาว และภายใน คือส่วนของเอนโดสเปิร์ม และคัพภะจะมีสีเขียว

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามสูตร MS และ M_{EMB} ในภาคผนวก

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต

NAA (napthaleneacetic acid)

2,4 - D (2,4 - dichlorophenoxyacetic acid)

Kinetin (6 - furfurylaminopurine)

2.3 สารอินทรีย์

วุ้นผง

2.4 สารที่ใช้ในการทำให้ปลอดเชื้อ

teepol

clorox (ซึ่งมี sodium hypochlorite 2.25%)

เอทิลแอลกอฮอล์ 95% และ 70%

tween-20

2.5 สารที่ใช้ในการปรับ pH ได้แก่ HCl, NaOH

3. อุปกรณ์

3.1 เครื่องแก้ว

3.1.1 บิกเกอร์ (beaker) ปริมาตร 600 ml. และ 1,000 ml.

3.1.2 กระบอกตวง (cylinder) ปริมาตร 100 ml. และ 1,000 ml.

3.1.3 ปิเปตต์ (pipette) ปริมาตร 0.1 ml., 1.0 ml., 5.0 ml., 10 ml. และ 20 ml.

3.1.4 ฟลาสก์รูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ปริมาตร 250 ml.

3.1.5 ฟลาสก์วัดปริมาตร (volumetric flask) ปริมาตร 500 ml. และ 1,000 ml.

3.1.6 ขวดสีชา ปริมาตร 500 ml. และ 1,000 ml. สำหรับเก็บ stock solution

3.1.7 ขวดหยด บรรจุกรด - ด่าง ที่ใช้ในการปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1.8 ขวดแก้วใส่อาหารพร้อมฝาพลาสติกทนความร้อน

3.1.9 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

3.1.10 ขวดแก้วทนความร้อน สำหรับบรรจุน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3.2 เครื่องมือ

3.2.1 เตาไมโครเวฟ (microwave oven) สำหรับหลอมละลายวุ้นและสารเคมี

3.2.2 เครื่องชั่งหยาบและเครื่องชั่งละเอียด

3.2.3 เครื่องวัด pH (pH meter)

3.2.4 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

3.2.5 ตู้เย็น

3.2.6 ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (laminar flow)

3.2.7 มีดตัดเนื้อเยื่อ

3.2.8 ปากคีบ

3.2.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2.10 กล้องถ่ายรูป

4. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

อุณหภูมิห้อง 20 องศาเซลเซียส

ช่วงขึ้นแสง ใช้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ชนิดความเข้มแสงประมาณ 750 ลักซ์ (ช่วงแสงสลับ ให้แสง 16 ชม. งดแสง 8 ชม.)

ช่วงไม่ให้ถูกแสง ใช้กล่องกระดาษที่ปิดมิดชิด

วิธีดำเนินการทดลอง

วิธีดำเนินการทดลอง แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ

1. วัดอัตราการเจริญเป็นต้นกล้าของคัพภะ ในสูตรอาหาร MS ภายใต้ปัจจัยควบคุมที่ได้แก่ อุณหภูมิ และสัดส่วนของฮอร์โมน NAA และ Kinetin

2. วัดอัตราการเจริญเป็นต้นกล้าของคัพภะ ในสูตรอาหาร M_{EMB} ภายใต้ปัจจัยควบคุมที่ได้แก่ อุณหภูมิ และสัดส่วนของฮอร์โมน 2,4 - D และ Kinetin

3. เปรียบเทียบการเจริญเป็นต้นกล้าของคัพภะ ระหว่างสูตรอาหาร MS และ M_{EMB} เพื่อหาปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด และให้เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นกล้าดีที่สุด

4. ตรวจหาการเจริญเติบโตที่ผิดปกติของคัพภะในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ขั้นตอนที่ 1

วัดอัตราการเจริญเป็นต้นกล้าของคัพภะในสูตรอาหาร MS ภายใต้ปัจจัยควบคุม

1. การเตรียมคัพภะที่จะนำมาใช้ทดลอง

1.1 ใช้ปากคีบอันหนึ่งจับเมล็ดไว้ แล้วใช้ปากคีบปลายแหลมฉีกเปลือกหุ้มเมล็ดออกให้หมดด้วยความระมัดระวัง

1.2 เมื่อแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกจนเห็นเอนโดสเปิร์มที่อัดตัวกันแน่นอยู่ ค่อย ๆ ใช้ปากคีบแยกให้ออกจากกันเราจะเห็นคัพภะแยกกันอยู่เดี่ยวด้วยเช่นกัน

2. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ตามภาคผนวก โดยใช้ความเข้มข้นและชนิดของฮอร์โมน ดังนี้

สูตรอาหารที่ 1	ความเข้มข้นของ NAA	0	มก./ล.
	ความเข้มข้นของ Kinetin	0	มก./ล.
สูตรอาหารที่ 2	ความเข้มข้นของ NAA	0.2	มก./ล.
	ความเข้มข้นของ Kinetin	0	มก./ล.
สูตรอาหารที่ 3	ความเข้มข้นของ NAA	0	มก./ล.
	ความเข้มข้นของ Kinetin	0.2	มก./ล.
สูตรอาหารที่ 4	ความเข้มข้นของ NAA	3.0	มก./ล.
	ความเข้มข้นของ Kinetin	0.2	มก./ล.
สูตรอาหารที่ 5	ความเข้มข้นของ NAA	0.2	มก./ล.
	ความเข้มข้นของ Kinetin	3.0	มก./ล.

สูตรอาหารที่ 6 ความเข้มข้นของ NAA 0.02 มก./ล.

ความเข้มข้นของ Kinetin 3.0 มก./ล.

3. การฟอกฆ่าเชื้อที่เนื้อเยื่อทดลอง

เนื่องจากคัพภะเป็นส่วนที่อยู่ภายในเมล็ดที่มีเปลือกหุ้มอยู่ โดยปกติแล้ว ภายในเมล็ดจึงค่อนข้างที่จะติดเชื้อได้ยาก แต่ส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดจะติดเชื้อได้ง่ายมาก เราจึงต้องทำการฟอกฆ่าเชื้อทั้งเมล็ด เพื่อเป็นการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ ซึ่งขั้นตอนมีดังนี้

3.1 นำเมล็ดส้มเทลงในบิกเกอร์ที่บรรจุน้ำกลั่นอยู่ (โดยให้ระดับน้ำกลั่นอยู่สูงกว่าระดับความสูงของเมล็ดส้มประมาณ 3 เท่า) เติม teepol 3-4 หยด เขย่าล้างให้เกิดฟองเป็นครั้งคราว เป็นเวลา 15 นาที

3.2 เทน้ำกลั่นที่ผสม teepol ออก แล้วล้างเมล็ดให้หมดฟองด้วยน้ำกลั่น

หมายเหตุ : - ตั้งแต่ขั้นตอนต่อไปนี้จะต้องทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

3.3 นำเมล็ดส้มเทลงในบีกเกอร์ที่บรรจุแอลกอฮอล์ 70%ในปริมาตรที่สามารถท่วมเมล็ดได้ แช่ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 วินาที

3.4 นำเมล็ดที่ได้จากข้อ 3.3 มาเทลงในบีกเกอร์ซึ่งบรรจุ clorox 20% ปริมาตร 100 มล. พร้อมกับหยด tween-20 ลงไปด้วย 2-3 หยด แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที ขณะแช่ให้เขย่าบีกเกอร์เป็นครั้งคราว

3.5 นำเมล็ดมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

4. การถ่ายคัพภะลงขวดอาหาร

4.1 การถ่ายเมล็ดลงในขวดอาหาร ทำในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อที่มีอากาศปลอดเชื้อจุลินทรีย์ (laminar flow) โดยใช้ปากคีบที่สะอาดชุบแอลกอฮอล์ลนไฟ แล้วคีบคัพภะที่แยกไว้แล้วปักลงในอาหารเพาะเลี้ยงให้ลึกลงไปพอที่จะคงตัวอยู่ได้ ทำการเพาะ 1 คัพภะต่อ 1 ขวด

4.2 ลนไฟบริเวณปากขวดก่อนปิดฝาขวด

5. การเก็บเนื้อเยื่อ

เก็บขวดที่ทำหารเพาะเลี้ยงเรียบร้อยแล้วทั้ง 6 สูตร สูตรละ 20 ขวด รวมทั้งหมด 120 ขวด ลงในกล่องกระดาษที่ปิดมิดชิด โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเมื่อพบว่าคัพภะใดเจริญเป็นต้นกล้าได้ ให้นำขึ้นรับแสงบนชั้นให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสงประมาณ 750 ลักซ์ ช่วงแสงสลับ (ให้แสง 16 ชม. มืด 8 ชม.)

6. การเก็บรวบรวมข้อมูลการทดลอง

ในโครงงานพิเศษนี้ได้ศึกษาถึง ลักษณะการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นกล้าของคัพภะ

ขั้นตอนที่ 2

วัดอัตราการเจริญเป็นต้นกล้าของคัพภะในสูตรอาหาร M_{EMB} ภายใต้ปัจจัยควบคุม ทำตามขั้นตอนต่าง ๆ ในลักษณะเดียวกันกับขั้นตอนที่ 1

แต่ในการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ ให้เตรียมอาหารสูตร M_{EMB} ตามภาคผนวกแทนสูตรอาหาร MS โดยใช้ความเข้มข้นและชนิดของฮอร์โมน ดังนี้

สูตรอาหารที่ 7	ความเข้มข้นของ 2,4-D	0	มก./ล.
	ความเข้มข้นของ Kinetin	0	มก./ล.
สูตรอาหารที่ 8	ความเข้มข้นของ 2,4-D	0.02	มก./ล.
	ความเข้มข้นของ Kinetin	0	มก./ล.
สูตรอาหารที่ 9	ความเข้มข้นของ 2,4-D	0	มก./ล.
	ความเข้มข้นของ Kinetin	0.02	มก./ล.
สูตรอาหารที่ 10	ความเข้มข้นของ 2,4-D	0.05	มก./ล.
	ความเข้มข้นของ Kinetin	0.02	มก./ล.
สูตรอาหารที่ 11	ความเข้มข้นของ 2,4-D	0.1	มก./ล.
	ความเข้มข้นของ Kinetin	0.2	มก./ล.
สูตรอาหารที่ 12	ความเข้มข้นของ 2,4-D	0.2	มก./ล.
	ความเข้มข้นของ Kinetin	0.1	มก./ล.

ขั้นตอนที่ 3

เปรียบเทียบผลของการเพาะเลี้ยงในแต่ละสูตรอาหาร (MS และ M_{EMB})ภายใต้ปัจจัยควบคุม นำข้อมูลในด้านของเปอร์เซ็นต์การงอก เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้า และอัตราการเจริญเติบโตของยอดมาแสดงเปรียบเทียบกัน เพื่อมองหาผลสรุปในการคัดเลือกหาสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมที่สุดในการที่จะนำมาใช้ทำการขยายพันธุ์สัมพันธุ์น้ำผึ้งให้ได้ผลดีที่สุด

ขั้นตอนที่ 4

ตรวจหาการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ (ไม่เป็นต้นกล้าตามต้องการ)

1. คัดเลือกขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการเจริญผิดปกติออกมา
2. จดบันทึกสูตรอาหารนั้น ๆ และลักษณะความผิดปกติที่เกิดขึ้นไว้เป็นข้อมูล
3. บันทึกภาพแสดงความผิดปกติไว้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. อิทธิพลของความเข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ ของฮอร์โมน NAA และ Kinetin ในสูตรอาหาร MS

1.1 <u>เปอร์เซ็นต์การงอกของคัพภะ</u> จากการทดลองเลี้ยงคัพภะในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีฮอร์โมน NAA และ Kinetin เข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ พบว่า ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเข้มข้นของ NAA และ Kinetin ใน สูตรที่ 4 จะให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด เท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ NAA และ Kinetin ใน สูตรที่ 5 จะให้เปอร์เซ็นต์การงอกที่ต่ำที่สุด เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ (ดังตารางที่ 4-1)

ตารางที่ 4-1 เปอร์เซ็นต์งอกของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA และ Kinetin ที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนคัพภะที่ทำการศึกษา	เปอร์เซ็นต์การงอกของคัพภะ				
		สัปดาห์ที่1	สัปดาห์ที่2	สัปดาห์ที่3	สัปดาห์ที่4	สัปดาห์ที่5
สูตรที่ 1	20	5	15	15	20	25
สูตรที่ 2	20	15	20	25	30	30
สูตรที่ 3	20	5	15	20	25	30
สูตรที่ 4	20	0	40	40	40	55
สูตรที่ 5	20	5	5	5	5	5
สูตรที่ 6	20	10	15	25	25	25

ในการเจริญของคัพภะนั้น แสงก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ ดังนั้น ในการเลี้ยงคัพภะในช่วงแรกต้องเลี้ยงในที่มืดเนื่องจากการเอมบริโอเจนีซีสต้องการแสงที่ความเข้มข้นต่ำ(ประศาสตร์,2536)

พบว่า คัพภะที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่ไม่ใส่ฮอร์โมน ก็สามารถงอกได้ อาจเนื่องมาจากในคัพภะมีปริมาณออกซินค่อนข้างสูงอยู่แล้ว(ไพบูลย์,2524) คัพภะที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 4 ซึ่งมี

อัตราส่วนของฮอร์โมน NAA ต่อ Kinetin เท่ากับ 3.0 ต่อ 0.2 ซึ่ง NAA นั้น เป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน สูงจะชักนำให้เกิดราก ดังนั้น จึงมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง(Miller and Skoog,1957)

1.2 <u>เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้า</u> การเจริญเป็นต้นกล้าของคัพภะที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ในอาหารสูตรที่ 2, 3 และ 6 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้าเท่ากัน คือ เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอาหารสูตรที่ 1 และ4 จะให้ได้รองลงมา คือ เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารสูตรที่ 5 พบว่าไม่มีการเจริญเป็นต้นกล้าเลย (ดังตารางที่ 4-2)

ตารางที่ 4-2 เปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นต้นกล้าของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA และ Kinetin ที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนคัพภะที่ทำการศึกษา	เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้าของคัพภะ				
		สัปดาห์ที่1	สัปดาห์ที่2	สัปดาห์ที่3	สัปดาห์ที่4	สัปดาห์ที่5
สูตรที่ 1	20	0	5	5	5	5
สูตรที่ 2	20	0	10	10	10	10
สูตรที่ 3	20	0	5	10	10	10
สูตรที่ 4	20	0	0	5	5	5
สูตรที่ 5	20	0	0	0	0	0
สูตรที่ 6	20	0	10	10	10	10

คัพภะที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่ไม่ใส่ฮอร์โมน (สูตรที่ 1) จะเกิดเป็นต้นกล้าได้ แต่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้าต่ำ อาจเนื่องมาจากมีสารยับยั้งการเจริญของคัพภะอยู่(ไพบูลย์,2524)

คัพภะที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 4 มีอัตราส่วนของฮอร์โมน NAA ต่อ Kinetin เท่ากับ 3.0 ต่อ 0.2 จะเห็นได้ว่า มีปริมาณฮอร์โมนกลุ่มออกซินสูง ทำให้ต้นกล้าพัฒนาในส่วนของรากมากกว่าส่วนของยอด(Miller and Skoog,1957) จึงทำให้เกิดเป็นต้นกล้าได้ช้าและเกิดเป็นต้นกล้าได้น้อยอีกด้วย

1.3 <u>อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า</u> อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า(ความสูงของยอด) เมื่อเลี้ยงคัพภะเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ในอาหารสูตร MS สูตรที่ 1 จะมีการเจริญเติบโตดีที่สุด คือมีความสูงของยอดเฉลี่ย 80 มิลลิเมตร และ ในอาหารสูตรที่ 4 จะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำที่สุด คือ มีความสูงของยอดเฉลี่ยเพียง 35 มิลลิเมตร (ดังตารางที่ 4-3)

ตารางที่ 4-3 อัตราการเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA และ Kinetin ที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนคัพภะที่เกิดเป็นต้นกล้า	ความสูงเฉลี่ยของต้นกล้า (มิลลิเมตร)				
		สัปดาห์ที่1	สัปดาห์ที่2	สัปดาห์ที่3	สัปดาห์ที่4	สัปดาห์ที่5
สูตรที่ 1	1	0.0	7.0	36.0	65.0	80
สูตรที่ 2	2	0.0	14.0	48.5	65.0	75
สูตรที่ 3	2	0.0	5.0	29.0	51.0	56.5
สูตรที่ 4	1	0.0	0.0	5.0	30.0	35
สูตรที่ 5	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
สูตรที่ 6	2	0.0	5.5	19.0	32.5	36.5

คัพภะที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 4 จะมีอัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องมาจากมีอัตราส่วนของฮอร์โมนออกซินสูงจึงพัฒนาส่วนรากมากกว่าส่วนยอด(Miller and Skoog,1957)

2. อิทธิพลของความเข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ ของฮอร์โมน 2,4-D และ Kinetin ในสูตรอาหาร M_{EMB}

2.1 <u>เปอร์เซ็นต์การงอกของคัพภะ</u> จากการทดลองเลี้ยงคัพภะในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร M_{EMB}ที่มีฮอร์โมน 2,4-D และ Kinetin เข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ พบว่า ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D และ Kinetin ใน สูตรที่ 9 จะให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร M_{EMB} ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D และ Kinetin ใน สูตรที่ 8 จะให้เปอร์เซ็นต์การงอกที่ต่ำที่สุดเท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ (ดังตารางที่ 4-4)

ตารางที่ 4-4 เปอร์เซ็นต์การงอกของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร M_{EMB} ที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมน 2,4-D และ Kinetin ที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนคัพภะที่ทำการศึกษา	เปอร์เซ็นต์การงอกของคัพภะ				
		สัปดาห์ที่1	สัปดาห์ที่2	สัปดาห์ที่3	สัปดาห์ที่4	สัปดาห์ที่5
สูตรที่ 7	20	20	40	40	40	40
สูตรที่ 8	20	0	10	15	15	15
สูตรที่ 9	20	25	50	55	55	55
สูตรที่ 10	20	5	20	30	30	30
สูตรที่ 11	20	5	20	20	20	20
สูตรที่ 12	20	5	20	25	30	30

เนื่องจากในคัพภะจะมีปริมาณฮอร์โมนออกซินอยู่สูง(ไพบูลย์,2524) ในอาหาร M_{EMB} ที่ไม่ใส่ฮอร์โมน (สูตรที่ 7) ก็จะสามารถงอกได้ และถ้าเติมฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินในอัตราส่วนที่เหมาะสมก็จะสามารถงอกได้ดีขึ้น(Miller and Skoog,1957)

2.2 <u>เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้า</u> การเจริญเป็นต้นกล้าของคัพภะที่เลี้ยงในอาหารสูตร M_{EMB} เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ในอาหารสูตรที่ 9 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้าสูงที่สุด คือ เท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอาหารสูตรที่ 11 จะให้ได้ต่ำที่สุด คือ เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น และในอาหารสูตรที่ 8 พบว่าไม่มีการเจริญเป็นต้นกล้าเลย (ดังตารางที่ 4-5)

ตารางที่ 4-5 เปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นต้นกล้าของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหาร M_{EMB} ที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมน 2,4-D และ Kinetin ที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนคัพภะที่ทำการศึกษา	เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้าของคัพภะ				
		สัปดาห์ที่1	สัปดาห์ที่2	สัปดาห์ที่3	สัปดาห์ที่4	สัปดาห์ที่5
สูตรที่ 7	20	0	15	20	25	25
สูตรที่ 8	20	0	0	0	0	0
สูตรที่ 9	20	0	25	30	30	30
สูตรที่ 10	20	0	15	15	15	15
สูตรที่ 11	20	0	0	5	10	10
สูตรที่ 12	20	0	5	5	20	20

คัพภะที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 7 ที่ไม่เติมฮอร์โมนก็จะมีการเกิดเป็นต้นกล้าได้ดีมาก อาจเนื่องมาจากคัพภะมีฮอร์โมนที่มีอัตราส่วนที่ดีพอต่อการเกิดเป็นต้นกล้าอยู่แล้ว(ไพบูลย์,2524)

คัพภะที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 9 มีอัตราส่วนของฮอร์โมน 2,4-D ต่อ Kinetin เท่ากับ 0 ต่อ 0.02 เกิดเป็นต้นกล้าได้ดีที่สุด อาจเนื่องมาจาก การใส่ฮอร์โมน Kinetin ในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งจะช่วยให้ต้นกล้ามีการพัฒนาส่วนยอด รวมกับฮอร์โมนที่มีอยู่ในคัพภะ ก็จะทำให้เพิ่มเปอร์เซ็นการเกิดเป็นต้นกล้าได้(ไพบูลย์,2524)

2.3 <u>อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า</u> อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (ความสูงของยอด) เมื่อเลี้ยงคัพภะเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ในอาหารสูตร M_{EMB} สูตรที่ 9 จะมีการเจริญเติบโตดีที่สุด คือมีความสูงของยอดเฉลี่ย 56.5 มิลลิเมตร และ ในอาหารสูตรที่ 12 จะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำที่สุด คือ มีความสูงของยอดเฉลี่ยเพียง 24.25 มิลลิเมตร (ดังตารางที่ 4-6)

ตารางที่ 4-6 อัตราการเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหาร M_{EMB} ที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมน 2,4-D และ Kinetin ที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนคัพภะที่เกิดเป็นต้นกล้า	ความสูงเฉลี่ยของต้นกล้า (มิลลิเมตร)				
		สัปดาห์ที่1	สัปดาห์ที่2	สัปดาห์ที่3	สัปดาห์ที่4	สัปดาห์ที่5
สูตรที่ 7	5	0.0	6.0	23.7	34.3	43.6
สูตรที่ 8	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
สูตรที่ 9	6	0.0	16.2	39.3	51.3	56.5
สูตรที่ 10	3	0.0	11.3	38.0	47.3	51.6
สูตรที่ 11	2	0.0	0.0	13	22.0	32.5
สูตรที่ 12	4	0.0	5.0	17	19.7	24.2

เมื่อดูจากผลการทดลองแล้ว คัพภะที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 10 มีอัตราส่วนฮอร์โมน 2,4-D ต่อ Kinetin เท่ากับ 0.05 ต่อ 0.02 และคัพภะที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 12 มีอัตราส่วนฮอร์โมน 2,4-D ต่อ Kinetin เท่ากับ 0.2 ต่อ 0.1 มีเปอร์เซนต์การเกิดเป็นต้นกล้าใกล้เคียงกัน แต่มีอัตราการเจริญต่างกันมาก อาจเนื่องมาจากอัตราส่วนของฮอร์โมนที่เติมในสูตรที่ 12 มีความเข้มข้นมากกว่า ซึ่งอาจจะไปชะลอการเจริญของต้นกล้าได้(Miller and Skoog,1957)

3. การเปรียบเทียบผลของฮอร์โมน 2,4-D , NAA และ Kinetin ในสูตรอาหาร MS และ M_{EMB}

เพื่อหาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถชักนำให้คัพภะเกิดเป็นต้นกล้าได้เปอร์เซ็นต์สูง และมีการเจริญเติบโตที่เหมาะสมที่สุด (ดังตารางที่ 4-7)

ตารางที่ 4-7 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอก เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้า ความสูงเฉลี่ยของยอดในอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีฮอร์โมน NAA และ Kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และสูตร M_{EMB} ที่มีฮอร์โมน 2,4-D และ Kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนคัพภะที่ทำการศึกษา	เปอร์เซ็นต์การงอก	เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้า	ความสูงเฉลี่ยของต้นกล้า (มิลลิเมตร)
สูตรที่ 1	20	25^{bcd}	5^{d}	80.0^{a}
สูตรที่ 2	20	30^{bc}	10^{cd}	75.0^{a}
สูตรที่ 3	20	30^{bc}	10^{cd}	56.5^{ab}
สูตรที่ 4	20	55^{a}	5^{d}	35.0^{ab}
สูตรที่ 5	20	5^{d}	0^{d}	0.0^{b}
สูตรที่ 6	20	25^{bcd}	10^{cd}	36.5^{ab}
สูตรที่ 7	20	40^{ab}	25^{ab}	43.6^{ab}
สูตรที่ 8	20	15^{cd}	0^{d}	0.0^{b}
สูตรที่ 9	20	55^{a}	30^{a}	56.5^{ab}
สูตรที่ 10	20	30^{bc}	15^{bc}	51.6^{ab}
สูตรที่ 11	20	20^{bcd}	10^{cd}	32.5^{ab}
สูตรที่ 12	20	30^{bc}	20^{ab}	24.2^{ab}

ค่าเฉลี่ย 2 ค่าใดที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน จะไม่ต่างกันทางสถิติ โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สูตรอาหารที่ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด ได้แก่ สูตรอาหารที่ 4 และสูตรอาหารที่ 9 สูตรอาหารที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้าได้ดีที่สุด ได้แก่ สูตรอาหารที่ 9 และสูตรอาหารที่มีอัตราการเจริญสูงที่สุด ได้แก่ สูตรอาหารที่ 1 และ 2

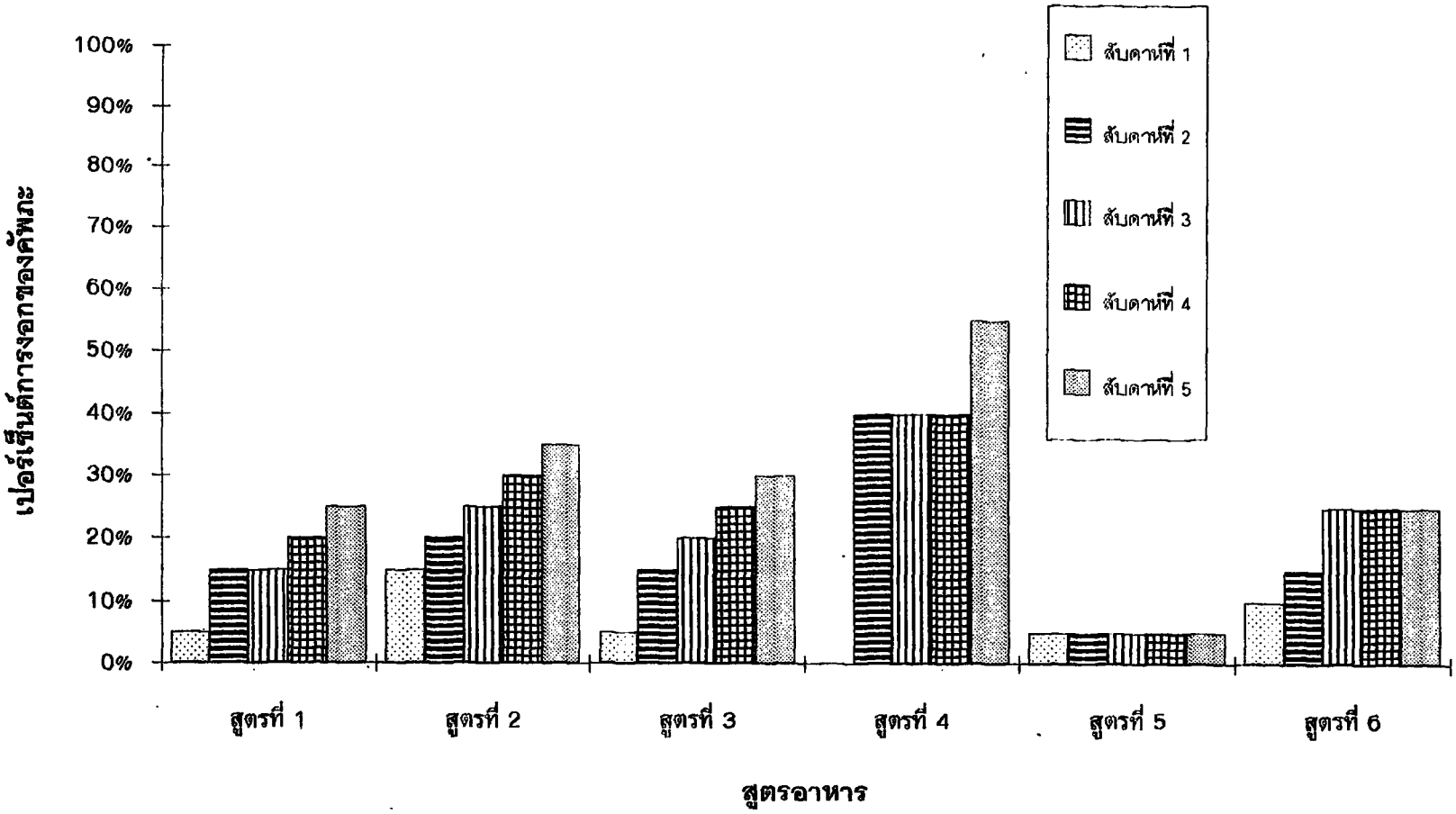
เมื่อเปรียบเทียบดูแล้ว พบว่า สูตรอาหารที่ควรจะใช้ในการขยายพันธุ์ส้มพันธุ์น้ำผึ้งได้ดีที่สุดน่าจะเป็นสูตรอาหารที่ 9 ซึ่งจะให้เปอร์เซ็นต์การงอกและเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้าได้สูงสุด แม้อัตราการเจริญเติบโตอาจจะต่ำ แต่จะให้ต้นกล้าที่มีความแข็งแรง

4. การเจริญเติบโตที่ผิดปกติ (ไม่เกิดเป็นต้นกล้าตามที่ต้องการ)

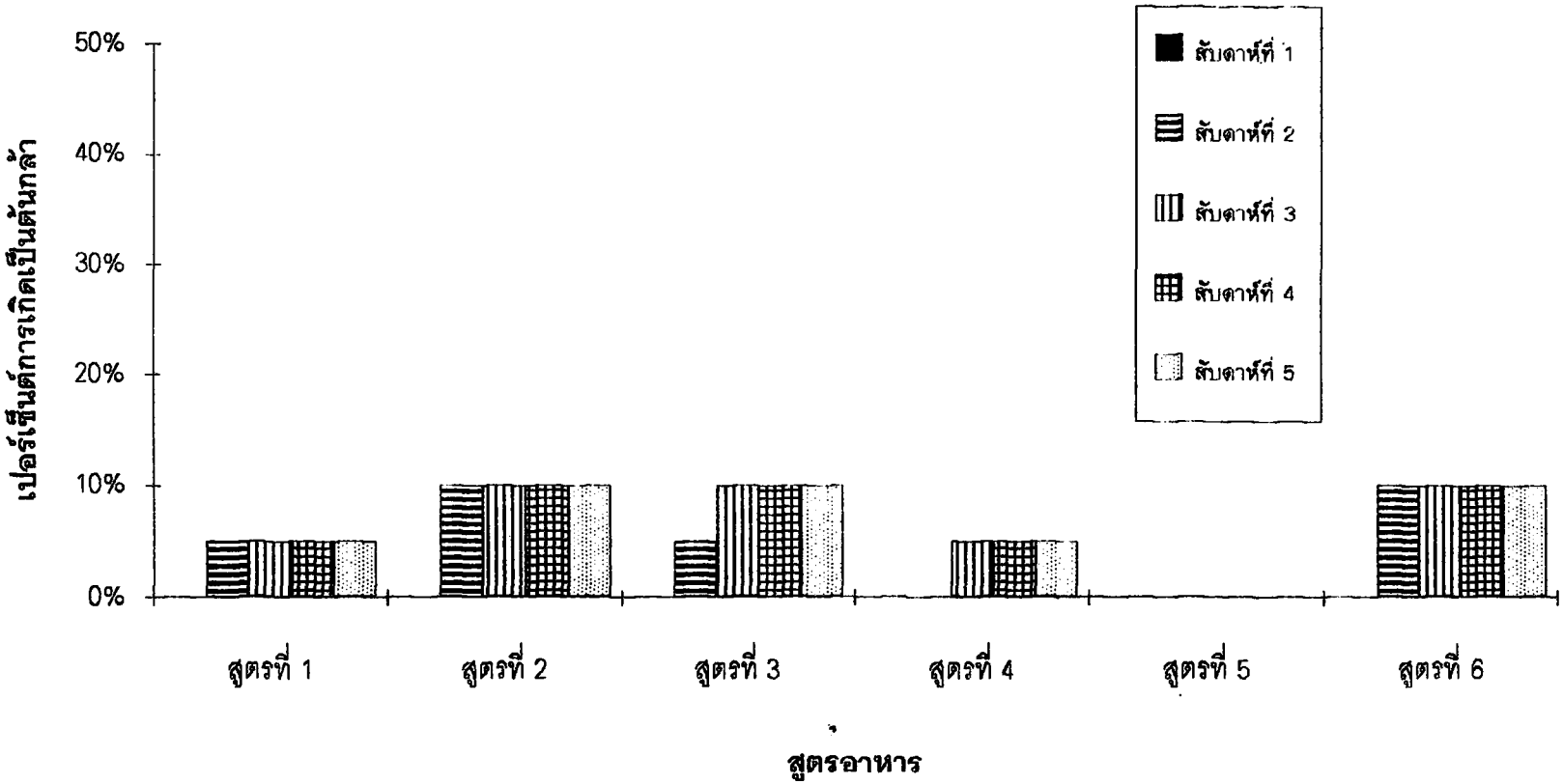
สำหรับการเจริญที่ผิดปกติไป ก็พบว่า สูตรอาหาร MS ที่อัตราส่วนของฮอร์โมน NAA ต่อ Kinetin เป็น 0.2 ต่อ 3.0 จะทำให่เกิดเป็นแคลลัส ที่มีการงอกของรากด้วยและยังสังเกตเห็นว่าสูตรอาหาร M_{EMB} ที่อัตรส่วนของฮอร์โมน 2,4-D ต่อ Kinetin เป็น 0.02 ต่อ 0 จะทำให้เกิดผลลักษณะเดียวกันกับสูตรอาหาร MS ที่มีอัตราส่วนของฮอร์โมนดังที่กล่าวมาข้างต้น (รูปที่ 4-7,4-8,4-9)

จากการที่คัพภะไม่เจริญเป็นต้นกล้า แต่เจริญเป็นแคลลัสอาจเนื่องมาจาก อัตราส่วนของฮอร์โมนที่ไม่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดยอดและราก (Miller and Skoog, 1957)

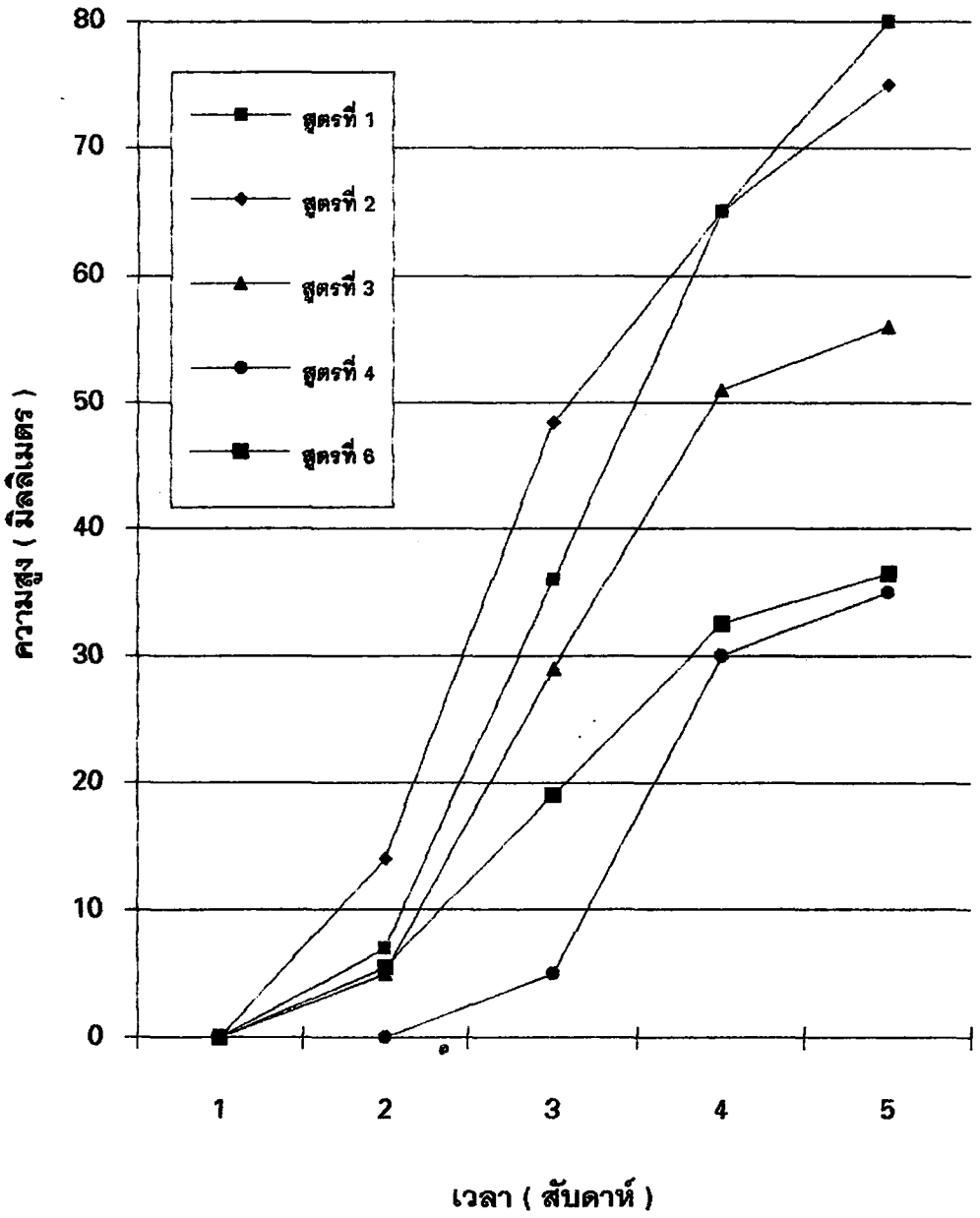
รูปที่ 4-1 เปอร์เซ็นต์การงอกของคัพภะสัมพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในอาหาร MS แต่ละสูตร



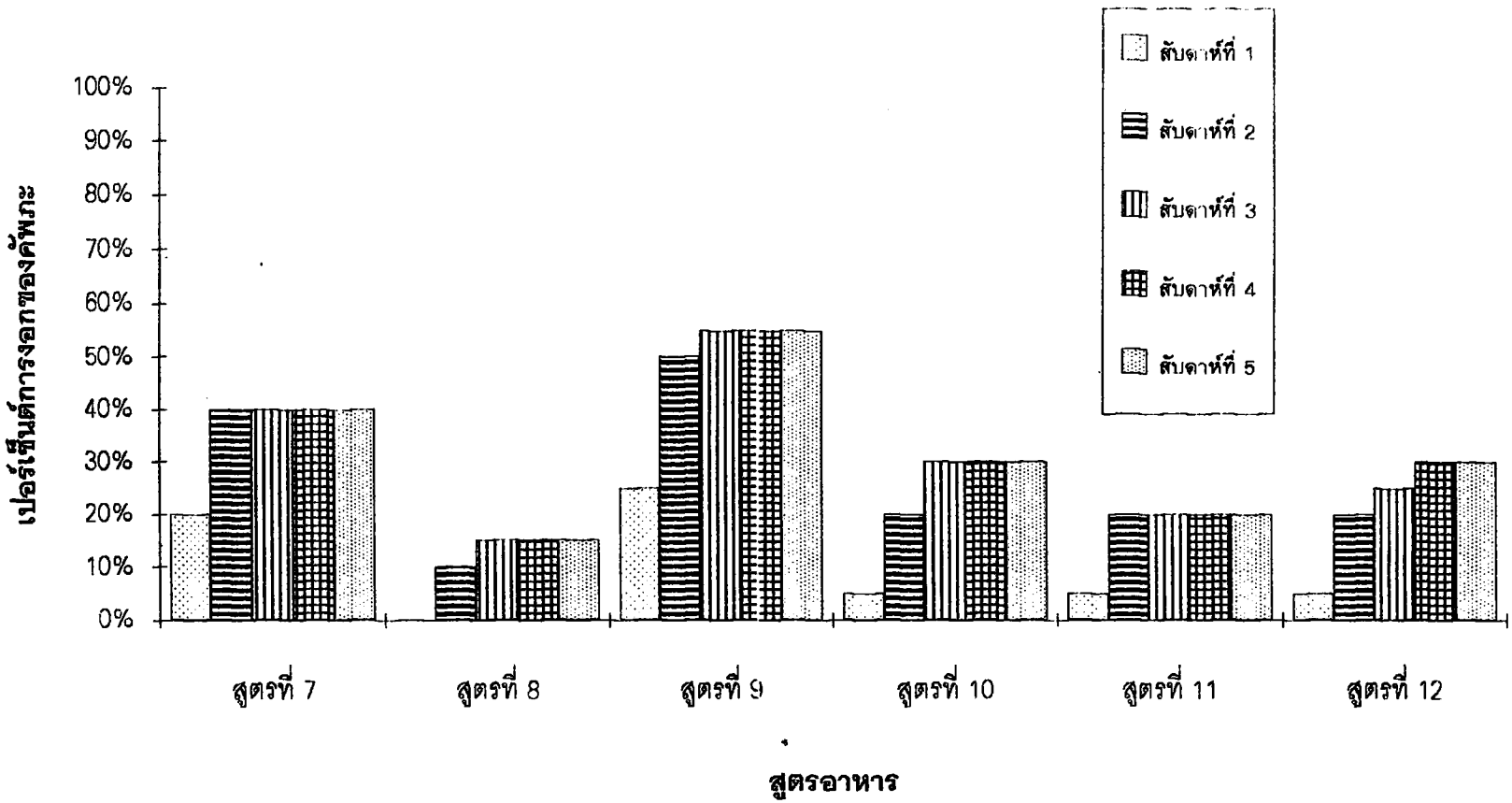
รูปที่ 4-2 เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้าของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้งเมื่อเลี้ยงในอาหาร MS แต่ละสูตร



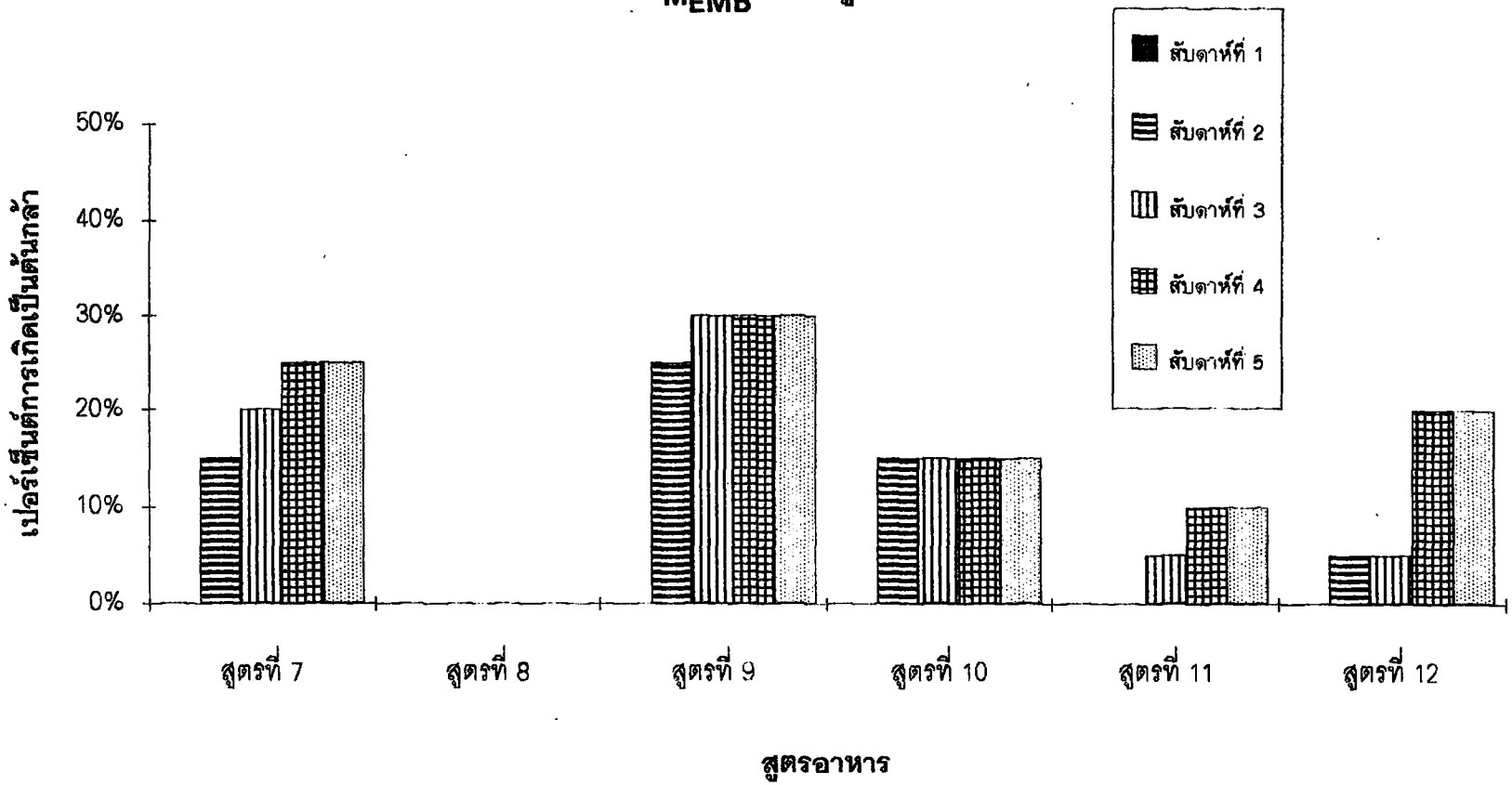
รูปที่ 4-3
กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า
ส้มพันธุ์น้ำผึ้งในอาหาร MS แต่ละสูตร



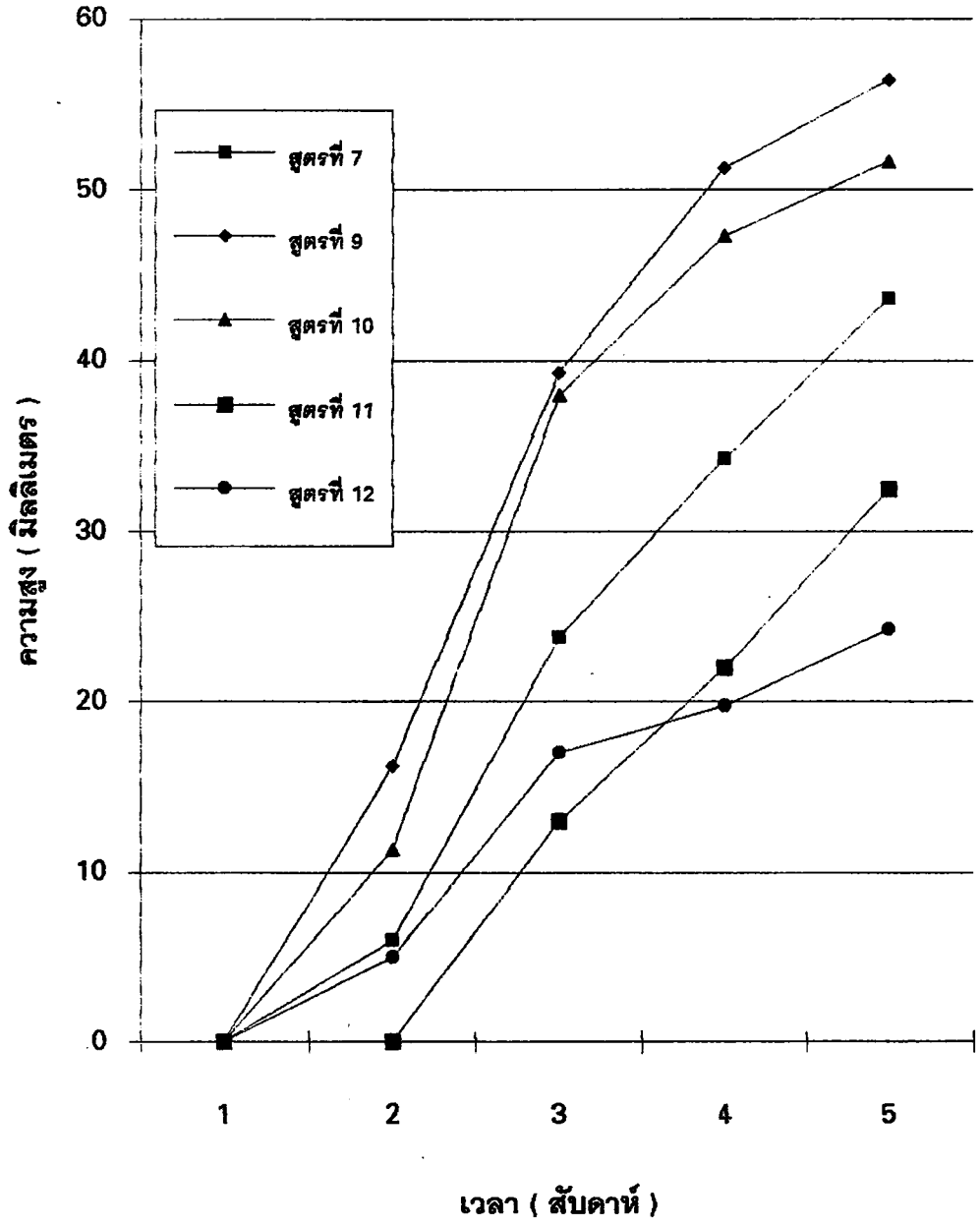
รูปที่ 4-4 เปอร์เซ็นต์การงอกของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้ง เมื่อเลี้ยงในอาหาร M_{EMB} แต่ละสูตร



รูปที่ 4-5 เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้าของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้งเมื่อเลี้ยงในอาหาร M_{EMB} แต่ละสูตร

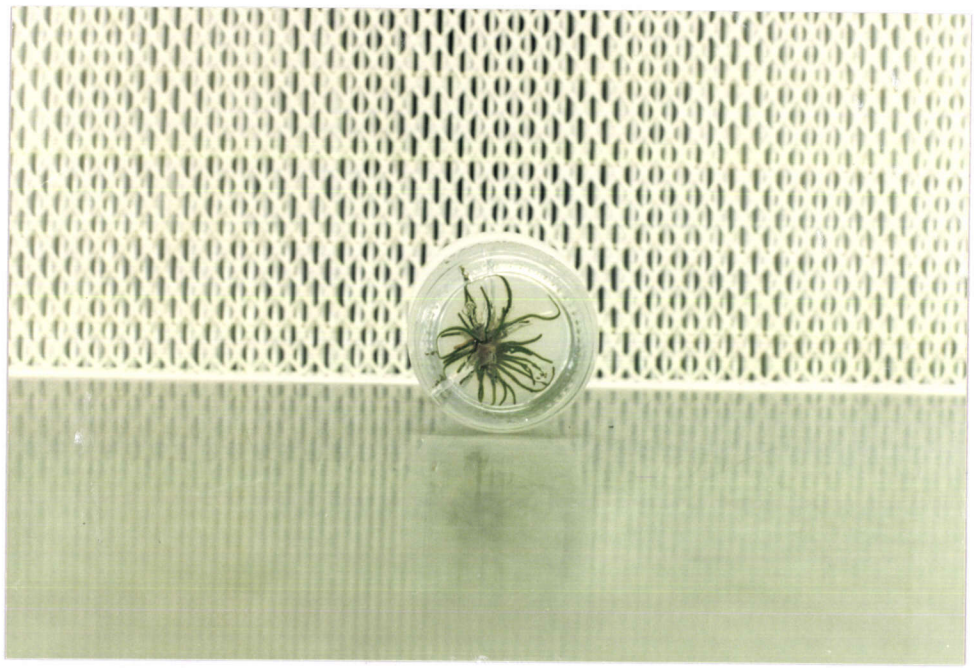


รูปที่ 4-6
กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นกล้าส้มพันธุ์น้ำผึ้ง
ในอาหาร M_{EMB} แต่ละสูตร



รูปที่ 4-7 แสดงการเจริญเติบโตที่ผิดปกติไปในรูปของการเกิดเป็นแคลลัส

รูปที่ 4-8 แสดงการเจริญเติบโตที่ผิดปกติไปในรูปของการเกิดเป็นแคลลัสและมีการงอกของรากเกิดขึ้นด้วย(ภาพถ่ายจากด้านข้างของขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ)



รูปที่ 4-9 แสดงการเจริญเติบโตที่ผิดปกติไปในรูปของการเกิดเป็นแคลลัสและมีการงอกของรากเกิดขึ้นด้วย (ภาพถ่ายจากด้านล่างของขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ)

รูปที่ 4-10 แสดงลักษณะต้นกล้าของส้มพันธุ์น้ำผึ้งที่เจริญมาจากคัพภะ (อายุ 5 สัปดาห์)

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของคัพภะส้มพันธุ์น้ำผึ้งโดยจะศึกษาเปอร์เซ็นต์การงอก เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้า และอัตราการเจริญเติบโตโดยวัดเป็นความสูงของยอด เพื่อนำมาประกอบการพิจารณาหาสูตรอาหารชนิดของฮอร์โมนและระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมในการทำการขยายพันธุ์ส้มพันธุ์น้ำผึ้งให้ได้ดีที่สุด โดยจะแยกพิจารณาดังนี้

1. อิทธิพลของความเข้มข้นของฮอร์โมน 2,4-D และ Kinetin ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร M_{EMB} โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคัพภะของส้มพันธุ์น้ำผึ้งจากการศึกษาพบว่า สูตรอาหาร M_{EMB} ที่อัตราส่วนของฮอร์โมน 2,4-D ต่อ Kinetin เป็น 0 ต่อ 0 และ 0 ต่อ 0.02 โดยจะให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด (ประมาณ 40-55%) สำหรับเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้า พบว่าสูตรอาหาร M_{EMB} ที่มีอัตราส่วนของฮอร์โมนดังกล่าวที่ 0 ต่อ 0, 0 ต่อ 0.02, 0.1 ต่อ 0.2 จะให้ค่าที่สูงที่สุด (ประมาณ 20-30%) และพบว่า ทุกๆอัตราส่วนที่ทำการทดลองให้ผลของความสูงเฉลี่ย ของยอดที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2. อิทธิพลของความเข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ ของฮอร์โมน NAA ต่อ Kinetin ในสูตรอาหาร MS ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคัพภะของส้มพันธุ์น้ำผึ้ง พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีอัตราส่วนของฮอร์โมน NAA ต่อ Kinetin เป็น 3.0 ต่อ 0.2 จะให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด คือ 55% ส่วนเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้าและความสูงเฉลี่ยของยอด พบว่า ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.เปรียบเทียบหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการนำมาขยายพันธุ์ส้มพันธุ์น้ำผึ้ง จากการนำข้อมูลที่ได้มาทั้งหมด ทั้งเปอร์เซ็นต์การงอก เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นกล้าและความสูงเฉลี่ยนำมาเปรียบเทียบกันและหาค่าความแตกต่างกันในทางสถิติ โดยวิธี DMRT แล้วก็ได้ข้อสรุปว่า สูตรอาหาร M_{EMB} ที่อัตราส่วนของฮอร์โมน 2,4-D ต่อ Kinetin เป็น 0 ต่อ 0.02 จะให้ที่ดีและเหมาะสมที่สุดในการใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคัพภะของส้มพันธุ์น้ำผึ้งเพื่อขยายพันธุ์ให้มากยิ่งขึ้น

4. สำหรับการเจริญที่ผิดปกติไป ก็พบว่า สูตรอาหาร MS ที่อัตราส่วนของฮอร์โมน NAA ต่อ Kinetin เป็น 0.2 ต่อ 3.0 จะทำให้เกิดเป็นแคลลัส ที่มีการงอกของรากด้วยและยังสังเกตเห็นว่าสูตรอาหาร M_{EMB} ที่อัตรส่วนของฮอร์โมน 2,4-D ต่อ Kinetin เป็น 0.02 ต่อ 0 จะทำให้เกิดผลลักษณะเดียวกันกับสูตรอาหาร MS ที่มีอัตราส่วนของฮอร์โมนดังที่กล่าวมาข้างต้น

ภาคผนวก

วิธีการเตรียมอาหาร

ทำเป็น stock solution คือสารละลายที่มีความเข้มข้นมากๆเป็นหลายเท่าของความเข้มข้นที่จะใช้จริงในสูตรอาหารก่อนแล้วจึงนำมาเตรียมอาหารอีกทีหนึ่ง

วิธีเตรียม stock solution ของสูตรอาหาร MS และ M_{EMB}

1) ชั่งสารเคมีสูตร MS โดยแบ่งออกเป็น 7 stock คือ

stock solution A (100X)	กรัม/ลิตร
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	165
stock solution B (50X)	
Potassium nitrate (KNO_3)	95
stock solution C (200X)	
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	34
Boric acid (H_3BO_3)	1.24
Potassium iodide (KI)	0.166
Sodium molybdate ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	0.05
Cobalt chloride ($CoCl_2.6H_2O$)	0.005
stock solution D (200X)	
Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$)	88
stock solution E (200X)	
Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)	74
Manganese sulphate ($MnSO_4.4H_2O$)	4.46
Zinc sulphate ($ZnSO_4.4H_2O$)	1.72
Copper sulphate ($CuSO_4.5H_2O$)	0.005
stock solution F (200X)	
Sodium EDTA (Na_2EDTA)	7.46
Ferrous sulphate ($FeSO_4.7H_2O$)	5.56
stock solution G (200X)	
Glycine	0.4
Nicotinic acid	0.1
Pyridoxine	0.1
Thiamine.HCl	0.02

ชั่งสารเคมีสูตร M_{EMB} โดยแบ่งออกเป็น 5 stock คือ

	กรัม/500 มล.
stock solution I (20X)	
Potassium chloride (KCl)	0.298
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0.816
Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.48
stock solution II (100X)	
Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$)	4.44
Calcium sulphate ($CaSO_4.2H_2$)	1.36
stock solution III (100X)	
Ferrous sulphate ($FeSO_4.7H_2O$)	0.1
stock solution IV (100X)	
Boric acid (H_3BO_3)	0.002
Manganese sulphate ($MnSO_4.4H_2O$)	0.1
Zinc sulphate ($ZnSO_4.4H_2O$)	0.002
Potassium iodide (KI)	0.002
Ammonium molybdate ($NH_4MoO_4.2H_2O$)	0.002
Copper sulphate ($CuSO_4.5H_2O$)	0.002
stock solution V (1000X)	
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine	0.01
Thiamine.HCl	0.01

2) เมื่อชั่งครบจำนวนแล้ว นำสารเคมีแต่ละตัวมาละลาย เมื่อละลายหมดแล้ว เทผสมรวมกันตามลำดับก่อนหลัง เติมน้ำให้ครบปริมาตรที่ต้องการ

3) จะได้ stock solution A - G และ I - V ตามลำดับ

จากนั้น นำมาใช้ในการเตรียมอาหารได้

วิธีการเตรียมอาหารสูตร MS และ M_{EMB} สูตรละ 1 ลิตร ดังนี้

1) สำหรับสูตร MS

เติม stock solution A จำนวน 10 มล.

" " B " 20 "

เติม stock solution C จำนวน 5 มล.

" " D " 5 "

" " E " 5 "

" " F " 5 "

" " G " 5 "

สำหรับสูตร M_{EMB}

เติม stock solution I จำนวน 50 มล.

" " II " 20 "

" " III " 10 "

" " IV " 10 "

" " V " 1 "

ใส่รวมกันในภาชนะที่เตรียมไว้ของแต่ละสูตรอาหาร

2) เติมน้ำตาล 3% ในสูตร MS และ 4% ในสูตร M_{EMB} คนต่อไปจนน้ำตาลละลายหมด

3) เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรตามต้องการ

4) นำสารละลายมาวัด pH โดยใช้เครื่อง pH meter ปรับ pH ให้ได้ 5.6 - 5.8

5) นำมาต้ม เมื่อเริ่มร้อนให้ใส่วุ้น 0.8% สำหรับสูตร MS และ 1% สำหรับสูตร M_{EMB} แล้วคนต่อไปจนวุ้นละลายหมด

6) นำอาหารมากรอกใส่ขวดที่เตรียมไว้ ปิดฝา

7) นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อโรคด้วยความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่ 121 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 - 20 นาที

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

	M_{EMB}	MS
Macroelement		
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	-	1,650.0
Potassium nitrate (KNO_3)	-	1,900.0
Potassium chloride (KCl)	29.8	-
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	81.6	170.0
Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)	48.0	370.0
Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$)	88.8	440.0
Calcium sulphate ($CaSO_4.2H_2$)	27.2	-
Ferrous sulphate ($FeSO_4.7H_2O$)	2.0	27.8
Sodium EDTA (Na_2EDTA)	-	37.3
Microelement		
Boric acid (H_3BO_3)	0.04	6.2
Manganese sulphate ($MnSO_4.4H_2O$)	2.0	22.3
Zinc sulphate ($ZnSO_4.4H_2O$)	0.04	8.6
Potassium iodide (KI)	0.04	0.83
Sodium molybdate ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	-	0.25
Ammonium molybdate ($NH_4MoO_4.2H_2O$)	0.04	-
Cobalt chloride ($CoCl_2.6H_2O$)	-	0.025
Copper sulphate ($CuSO_4.5H_2O$)	0.04	0.025
Organic constituents		
Sucrose	4%	3%
Inositol	-	100
Nicotinic acid	1.0	0.5
Pyridoxine	0.2	0.5
Thiamine.HCl	0.2	0.1
Glycine	-	2.0
Casein Hydrolysate	500	-

Agar	1%	0.8%
pH	5.8	5.8

ตัวอย่าง การคำนวณหาปริมาณฮอร์โมนที่จะเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร M_{EMB}ปริมาณ 200 มล. ที่มีปริมาณฮอร์โมน kinetin กับ 2,4-D ในอัตราส่วนเท่ากับ 0.02 ต่อ 0.05

หาปริมาณของ kinetin

เราต้องการ kinetin ในปริมาณ 0.02 มก./ล.

แสดงว่า ในสารละลาย 1,000 มล. จะมี kinetin อยู่ 0.02 มก.

ถ้าต้องการสารละลาย 200 มล. จะมี kinetin อยู่ $\frac{0.02 \times 200}{1,000}$ มก.

$= 0.004$ มก.

ใน stock ฮอร์โมน kinetin เราเตรียมไว้ในอัตราส่วน 100 มก./ล.

แสดงว่า ถ้าเราต้องการปริมาณ kinetin 100 มก. ต้องใช้สารละลาย stock 1,000 มล.

ถ้าเราต้องการปริมาณ kinetin 0.004 มก. ต้องใช้สารละลาย stock

$= \frac{0.004 \times 1,000}{100} = 0.04$ มล.

เพราะฉะนั้น เราต้องใช้สารละลาย stock ของ kinetin ในปริมาณ 0.04 มล.

หาปริมาณของ 2,4-D

เราต้องการ 2,4-D ในปริมาณ 0.05 มก./ล.

แสดงว่า ในสารละลาย 1,000 มล. จะมี 2,4-D อยู่ 0.05 มก.

ถ้าต้องการสารละลาย 200 มล. จะมี 2,4-D อยู่ $\frac{0.05 \times 200}{1,000}$ มก.

$= 0.01$ มก.

ใน stock ฮอร์โมน kinetin เราเตรียมไว้ในอัตราส่วน 50 มก./ล.

แสดงว่า ถ้าเราต้องการปริมาณ 2,4-D 100 มก. ต้องใช้สารละลาย stock 1,000 มล.

ถ้าเราต้องการปริมาณ 2,4-D 0.01 มก. ต้องใช้สารละลาย stock

$= \frac{0.01 \times 1,000}{50}$

$= 0.2$ มล.

เพราะฉะนั้น เราต้องใช้สารละลาย stock ของ 2,4-D ในปริมาณ 0.2 มล.

เอกสารอ้างอิง

ประศาสตร์ เกื้อมณี, 'เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช', คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2536.

พรทิพย์ ธนูทอง, "การเพาะเลี้ยงเซลและเนื้อเยื่อพืช", โครงการผลิตสิ่งตีพิมพ์ทางเกษตร คณะเกตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2528.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา, "หลักการและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช", 2524: 76-88

ภูวดล บุตรรัตน์, 'โครงสร้างของเนื้อเยื่อพืช', โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพาณิช, 2535: 52-53

Dekhuijzen, H. M. (1971). Sterilization of cytokinins. In J. van Bragt, D. A. A. Mossel, R. L. M. Pierik, & H. Veldstra (Eds.), Effects of sterilization on component in nutrient media (pp. 129-132). Wageningen, The Netherlands:Kniphorst Scientific Bookshop.

Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A., & Vasil, I. K. (1976). Plant tissue culture media. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 12, 473-478.

George EF, PD Sherrington: 1984. Plant propagation by tissue culture; handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics, Ltd., Eversley, Basingstoke, Hants, U.K.

Irwin Y.E. Chu: 1986. Tissue culture as a plant production system for horticultural crops (pp. 15- 21). Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht, The Netherlands.

Lawson RH, SD Hearon: 1973. Symptomatology of Cattleya mericlones infected with Cymbidium mosaic virus. Amer. Orchid Soc. Bull. 42:1071-1074.

Loewus, F. A., & Loewus, M. W. (1983). Myo-inositol: Its biosynthesis and metabolism. Annual Review of Plant Physiology, 34, 137-167.

Murashige T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15, 473-497.

Peer, H. G. (1971). Degradation of sugar and their reactions with amino acids. In J. van Bragt, D. A. A. Mossel, R. L. M. Pierik, & H. Veldstra (Eds.), Effects of sterilization on components in nutrient media (pp. 105-113). Wageningen, The Netherlands: Kniphorst Scientific Bookshop.

Posthumus, A. C. (1971). Auxin. In J. van Bragt, D. A. A. Mossel, R. L. M. Pierik, & H. Veldstra (Eds.), Effects of sterilization on components in nutrient media (pp. 125-128). Wageningen, The Netherlands: Kniphorst Scientific Bookshop.

Robertta H. Smith. (1992). Plant Tissue Culture Technique and Experiments. Sandiago, California: Academic Press.

Skoog, F. 1944. Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. Amer. J. bot. 31: 19-24

Skoog, F. and C. O. Miller, 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Sym. Soc. Exp. Bio. 11: 118-131

Ten Ham, E. J. (1971). Vitamins. In J. van Bragt, D. A. A. Mossel, R. L. M. Pierik, & H. Veldstra (Eds.), Effects of sterilization on components in nutrient media (pp. 121-123). Wageningen, The Netherlands: Kniphorst Scientific Bookshop.

van Bragt, J., & Pierik, R. L. M. (1971). The effect of autoclaveing on the gibberellin activity of aqueous solutions containing gibberellin A_3. In J. van Bragt, D. A. A. Mossel, R. L. M. Pierik, & H. Veldstra (Eds.), Effects of sterilization on components in nutrient media (pp. 133-137). Wageningen, The Netherlands: Kniphorst Scientific Bookshop.

White, P.R. 1931. Plant tissue culture. The history and present Status of the problem, Arch. exp. Zellf. 10: 501-508