คู่มือการฝึกอบรมหลักสูตร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธุ์ไม้ป่า

Tissue Culture in Forest Tree

ณัฏฐากร เสมสันทัด

กลุ่มงานวนวัฒนวิจัย

สำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ กรมป่าไม้

2552/2009

คู่มือการฝึกอบรมหลักสูตร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธุ์ไม้ป่า

Tissue Culture in Forest Tree

ณัฏฐากร เสมสันทัด

กลุ่มงานวนวัฒนวิจัย

สำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ กรมป่าไม้

2552/2009

หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธุ์ไม้ป่า

Principle of Tissue Culture in Forest Tree

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จัดว่าเป็นวิทยาการ หรือ วิธีการสำหรับผลิตพืชปริมาณมาก ซึ่งได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ถึงขั้นจัดเป็นงานวิจัยหลักในสาขาวิชาชีววิทยา เภสัชกรรม เกษตรกรรม และ ป่าไม้ ทั้งนี้สืบเนื่องจากงานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้มีแนวโน้มที่สามารถพัฒนาไปถึงระดับอุตสาหกรรมได้

การศึกษาด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มมาเป็นเวลานาน เริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ. 1878 เมื่อ Vochting ทำการศึกษาเกี่ยวกับการปักชำและได้สังเกตพบว่า เซลที่เรียงตัวตามความยาวของลำต้นสามารถที่จะเกิดรากและยอดได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของเซลบนกิ่งชำ ซึ่งจากข้อสังเกตของ VÖchting ทำให้ Gottieb Haberlandt นักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมันหันมาสนใจศึกษาคุณสมบัติและศักยภาพของเซลพืช จึงได้พยายามแยกเซลพืชมาเลี้ยงในอาหารจนประสบความสำเร็จในปี 1889 แต่เซลที่เลี้ยงไว้นั้นมีเพียงการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเท่านั้น ไม่มีการแบ่งเซลเกิดขึ้น Haberlandt จึงให้ข้อสรุปว่าเกิดจากการขาดเอนไซม์สำหรับการเจริญเติบโต (growth enzyme) จากการค้นพบของ Haberlandt ทำให้นักวิทยาศาสตร์ต่างหันมาสนใจศึกษางานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกันมากขึ้น ทำให้การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความก้าวหน้าและพัฒนาขึ้นมาเป็นลำดับ จนมีการศึกษาวิจัยถึงขั้นการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ และการถ่ายทอดยีนส์ซึ่งเป็นงานด้านพันธุวิศวกรรม

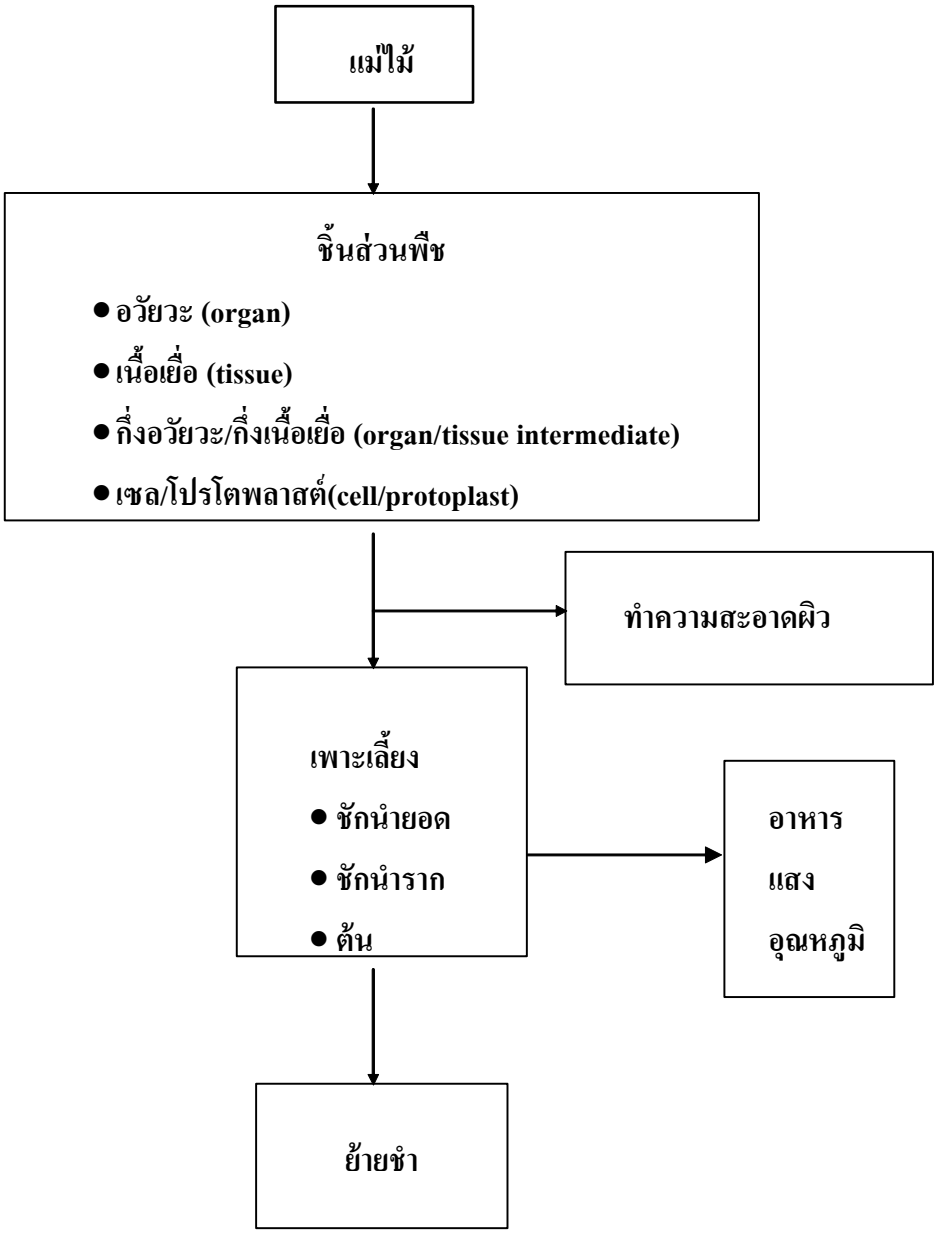
คำนิยาม (Terminology)

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีคำนิยามที่ใช้สำหรับงานด้านนี้อยู่มากมาย เพื่อให้เข้าใจและเป็นพื้นฐานในการศึกษาควรจะเข้าใจความหมายของคำต่างๆ เสียก่อน ดังนี้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) คือ การขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศประเภทหนึ่ง โดยการนำชิ้นส่วนพืช (explant) ซึ่งอาจเป็นโปรโตพลาสต์ (protoplast) เซล (cell) เนื้อเยื่อ (tissue) หรืออวัยวะ (organ) ของพืช มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ (media) ในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic condition) ภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อม อันได้แก่ แสง อุณหภูมิ และความชื้น เพื่อให้ชิ้นส่วนเหล่านั้นเจริญพัฒนาเป็นต้นใหม่ต่อไป (Bonga 1982)

การขยายพันธุ์โดยจุลวิธี (Micropropagation) คือ การนำเอาเทคนิคทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ โดยเริ่มจากชิ้นส่วนพืชที่มีขนาดเล็ก ซึ่งมีความหมายเช่นเดียวกับคำว่า tissue culture และ *In vitro* culture

หลักการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช



ชิ้นส่วนพืช (Explant) คือ ชิ้นส่วนพืชเล็กๆ ที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ อวัยวะ (organ) เนื้อเยื่อ (tissue) กึ่งอวัยวะหรือกึ่งเนื้อเยื่อ (organ/tissue intermediate) เซล (cell) แคลลัส (callus) และโปรโตพลาสต์ (protoplast) ตัวอย่างเช่น ปลายยอด (shoot tip) ปลายราก (root tip) ใบเลี้ยง (cotyledon) ใบอับเรณู (anther) คัพภะ (embryo) เมล็ด แคมเบียม (cambium) เรณู (pollen) ไข่อ่อน (ovule)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (Meristem/meristem-tip/Shoot-tip culture) คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเนื้อเยื่อเจริญ เพื่อชักนำให้เกิดเป็นยอดหรือแคลลัส เนื้อเยื่อเจริญจะประกอบด้วยเซลที่กำลังตื่นตัว (active) จะพบอยู่ในส่วนต่างๆ ของพืช คือ ปลายยอด (shoot tip) ปลายราก (root tip) เนื้อเยื่อเจริญในท่อลำเลียง (vascular cambium) และเนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ระหว่างปล้องของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

การเพาะเลี้ยงอวัยวะ (Organ culture) คือ การนำเอาอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น ยอด ข้อ ปล้อง ราก ใบ อับเรณู มาเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นต้นหรือ แคลลัส การเพาะเลี้ยงอวัยวะส่วนใดก็เรียกชื่อตามชิ้นส่วนนั้น เช่น การเพาะเลี้ยงตา (bud culture) การเพาะเลี้ยงอับเรณู (anther culture) การเพาะเลี้ยงคัพภะ (embryo culture) เป็นต้น

Axillary shoot proliferation คือ การเพาะเลี้ยงตาข้าง อาจเป็นตาที่ง่ามใบ (axillarly bud) หรือตาข้างที่กิ่ง (lateral bud) โดยกระตุ้นให้ตาแตกออกเป็นยอดเล็กๆ (shootlets/microshoot) จำนวนมากก่อน แล้วจึงตัดแยกยอดออกมาชำให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อ หรือในเรือนเพาะชำ เพื่อให้ได้กล้าที่สมบูรณ์ (plantlet/microplant)

Adventitious Shoot Induction คือ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช เช่น ใบเลี้ยง ใบอ่อน ยอดอ่อน หรือแคลลัส โดยชักนำให้ชิ้นส่วนเหล่านั้นสร้างตาเทียมหรือตาพิเศษ (adventitious bud) และเจริญเป็นยอดเล็กๆ (shootlets/microshoot) จากนั้นจึงนำไปชักนำให้เกิดรากและพัฒนาไปเป็นกล้าไม้ที่สมบูรณ์

แคลลัส (Callus) คือ กลุ่มเซลพาเรนไคมา (parenchyma) ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยธรรมชาติแคลลัสเกิดขึ้นเมื่อพืชได้รับบาดแผล พืชจะสร้างเซลพาเรนไคมาขึ้นมาเพื่อปิดบาดแผล แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมี 2 ลักษณะ คือ แคลลัสที่มีเซลเกาะกันแน่น (compact callus) และแคลลัสที่มีเซลเกาะอย่างหลวมๆ (friable callus) รูปร่างของแคลลัสไม่แน่นอน ภายในเซลมีแวคิวโอล (vacuole) จำนวนมาก ภายในเซลส่วนใหญ่จะไม่มีรงควัตถุ (pigment) แต่ก็มีพบบ้างที่มีคลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ ฟราโวนอยด์ หรือแอนโทไซยานิน

การเพาะเลี้ยงแคลลัส (Callus culture) คือ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช โดยการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสเสียก่อน จากนั้นจึงชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ โดยทั่วไปชิ้นส่วนพืชที่ยังมีชีวิตอยู่มีความสามารถที่จะสร้างแคลลัสได้ แต่จากการศึกษาพบว่าชิ้นส่วนพืชที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีคือ ส่วนของคัพภะ (embryo) ใบเลี้ยง ใบอ่อน ดอกอ่อน ลำต้น และเมล็ดที่เพิ่งงอก

การเพาะเลี้ยงเซล (Cell culture) คือ การเพาะเลี้ยงเซลเดี่ยว (single cell) หรือ กลุ่มของเซลขนาดเล็ก (aggregate cell) ให้เกิดเป็นต้นใหม่ ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเซลได้ดีที่สุดคือ แคลลัสชนิดที่เกาะกันหลวมๆ (friable callus) เพราะเซลจะแยกหรือกระจายตัวออกจากกันได้ง่าย นอกจากนี้ยังสามารถใช้ชิ้นส่วนอื่น เช่น ใบอ่อน คัพภะ หรือกล้า ซึ่งชิ้นส่วนเหล่านี้ต้องนำมาแยกเซลด้วยวิธีกลหรือเคมีเสียก่อน การ

เพาะเลี้ยงเซลมักจะเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเหลวเพื่อให้เซลมีการกระจายตัวอย่างเป็นอิสระ ซึ่งจะเรียกว่า การเพาะเลี้ยงเซลแขวนลอย (cell suspension)

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (Protoplast culture) คือ การเพาะเลี้ยงเซลที่ปราศจากผนังเซล (cell wall) ที่ยังคงมีโครงสร้างภายอยู่อย่างสมบูรณ์ ให้พัฒนาเป็นต้นต้นพืชที่สมบูรณ์ เซลพืชโดยทั่วไปจะประกอบด้วยผนังเซล 2 ชั้น คือ Cell wall และ cell membrane ผนังเซลจะทำหน้าที่ห่อหุ้มโครงสร้างภายในซึ่งประกอบด้วย cytoplasm nucleus และ organelles การแยกโปรโตพลาสต์ต้องใช้เอนไซม์ (enzyme) มาย่อยผนังเซลให้หลุดไป เนื้อเยื่อที่เหมาะในการนำมาแยกโปรโตพลาสต์ ได้แก่ แผ่นใบ แคลลัส เอนโดสเปอร์ม (endosperm) เซลที่มีผนังหนา (secondary wall) เนื่องจากการสะสมของสารจำพวก lignin suberin และ cutin นั้นจะย่อยยากไม่เหมาะที่จะนำมาแยกโปรโตพลาสต์

การรวมโปรโตพลาสต์ (Protoplast fusion) คือ การกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์ตั้งแต่ 2 เซลเข้ามารวมตัวผสมกัน ซึ่งจะหล่อหลอมรวมเอาลักษณะทางพันธุกรรมของเซลร่างกาย (somatic cell) หรือ organelle ของพืชชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันเข้าไปผสมในโปรโตพลาสต์เดิม จึงเหมาะสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ การสร้างลูกผสมพันธุ์ใหม่ และการผสมข้ามพันธุ์ในพืชต่างชนิด หรือต่างสกุล ซึ่งไม่สามารถผสมพันธุ์โดยวิธีทางธรรมชาติได้

Organogenesis คือ ขบวนการการพัฒนาของกล้าไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (plantlet) โดยการที่ชิ้นส่วนพืช ซึ่งอาจเป็นเนื้อเยื่อ หรือ เซล ถูกชักนำให้สร้างยอด/ราก/อวัยวะอื่น โดยขบวนการสร้างตาเทียมหรือตาพิเศษ (adventitious bud) หรือการกระตุ้นให้เกิดยอด/ราก (root/shoot proliferation) เช่น การชักนำให้ยอดแตกราก การชักนำให้แคลลัสสร้างยอดหรือราก เป็นต้น

Embryogenesis คือ ขบวนการเกิดคัพภะ (embryo) คัพภะที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการเกิดจากเซล แคลลัสหรือเนื้อเยื่ออื่นที่ไม่ใช่เกิดจากการปฏิสนธิของเซลสืบพันธุ์ (non-zygotic) โดยเซลที่ถูกชักนำให้เกิดเป็นคัพภะจะมีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเช่นเดียวกับการพัฒนาของ zygote ไปเป็น embryo ในเมล็ดพืชโดยทั่วไป คัพภะจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเรียกว่า embryoid หรือ adventive embryo ซึ่งมีการเกิดหลายแบบ คือ somatic embryo หรือ adventive embryo เป็นคัพภะที่เกิดจากชิ้นส่วนที่ไม่ใช่เซลสืบพันธุ์ parthenogenic embryo เป็นคัพภะที่เกิดจากไข่ที่ไม่ถูกผสม (unfertilize egg) และ androgenetic embryo เป็นคัภพะที่เกิดจากเซลสืบพันธุ์เพศผู้ คือเรณู คัพภะที่เกิดจากเซลสืบพันธุ์จะมีโครโมโซมเพียงชุดเดียว (n)

หลักการของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การผลิตกล้าโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยใช้หลักการของ “Cell totipotency” คือ เซลพืชมีลักษณะพิเศษกว่าสัตว์ในแง่ที่ว่าเซลพืชมีความสามารถทางพันธุกรรมในการสร้างอวัยวะขึ้นใหม่ทดแทนส่วนที่ขาดหายไปได้หรือมีความสามารถสร้างต้นใหม่ได้หากสภาวะภายใน (internal หรือ biological factors) และภายนอก (environmental factors) เหมาะสม จากหลักการดังกล่าวทำให้สามารถสร้างพืช

ต้นใหม่ได้จากการนำเอาชิ้นส่วนพืช (explant) ตั้งแต่ในระดับโปรโตพลาสต์ เซล แคลลัส และอวัยวะต่างๆ มาเพาะเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสม ชิ้นส่วนเหล่านั้นสามารถที่จะพัฒนาเป็นต้นพืชใหม่ที่สมบูรณ์ได้

แนวทางในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

แนวทางในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถจำแนกออกได้เป็น 2 แนวทาง คือ

1. การผลิตต้นจากเนื้อเยื่อเจริญ (Meristem culture) คือ การผลิตต้นโดยการเพาะเลี้ยงอวัยวะ (organ) ส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชที่มีเนื้อเยื่อเจริญอยู่ เช่น ยอด ตา ลำต้น ข้อ ปล้อง คัพภะ มาเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ขึ้นมา

2. การผลิตต้นจากแคลลัส เซล หรือ โปรโตพลาสต์ คือ การผลิตต้นโดยการเพาะเลี้ยงแคลลัส เซล หรือโปรโตพลาสต์ ให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ขึ้นมา

แนวทางทั้งสองมีข้อดีข้อเสียตลอดจนศักยภาพที่สนองวัตถุประสงค์ต่างกันไป กล่าวคือ การขยายพันธุ์จากเนื้อเยื่อเจริญ เช่นการเพาะเลี้ยงตายอดโดยผ่านขบวนการชักนำให้เกิดตาเทียมหรือตาพิเศษ (adventitious bud) แล้วพัฒนาเป็นยอดกระจุก (multiple shoots) จำนวนมาก จากนั้นจึงแยกยอดไปชักนำให้เกิดรากกล้าที่ได้จากวิธีนี้ยังคงมีลักษณะของต้นแม่อยู่อย่างสมบูรณ์ จึงเหมาะสำหรับงานด้านขยายพันธุ์ การผลิตพืชปราศโรค และการเก็บรักษาพันธุ์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงคัพภะ (embryo culture) จะเหมาะสำหรับงานการขยายพันธุ์พืชที่มีปัญหาในด้านการผสมพันธุ์โดยวิธีธรรมชาติ หรือการผสมพันธุ์พืชต่างสกุล ปัญหาการขาดแคลนเมล็ดและการงอกของเมล็ด นอกจากนี้ยังช่วยลดระยะเวลาของการผสมพันธุ์ (breeding cycle) ของพืชบางชนิดที่มีช่วงระยะเวลาในการพัฒนาของคัพภะยาวนาน หรือเมล็ดพืชบางชนิดมีช่วงการพักตัว (dormancy) นาน

สำหรับการผลิตต้นจากแคลลัส เซล หรือ โปรโตพลาสต์ วิธีนี้มีโอกาสกลายพันธุ์สูง ลักษณะจะแตกต่างไปจากต้นแม่ จึงมีประโยชน์ในแง่ของการสร้างสายพันธุ์ใหม่ หรือ การสร้างลูกผสม สร้างพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว (haploid) หรือโครโมโซมหลายชุด (polyploid)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ยังใช้สำหรับเป็นพื้นฐานของงานด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ซึ่งเป็นวิทยาการขั้นสูงสามารถใช้กับงานการสร้างพืชใหม่ที่มีลักษณะพิเศษ โดยวิธีการตัดต่อยีนส์ หรือ DNA ที่ต้องการเข้าไปสู่เซลพืชและสามารถถ่ายทอดลักษณะต่อไปได้ จากนั้นจึงเพาะเลี้ยงเซลเหล่านั้นให้กลายเป็นต้นใหม่ต่อไป

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

งานด้านการขยายพันธุ์ (Clonal propagation) การผลิตกล้าโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตกล้าได้เป็นปริมาณมากภายในระยะเวลาอันสั้น ต้นทุนการผลิตต่ำ ใช้พื้นที่ ตลอดจนแรงงานน้อยกว่า

การเตรียมกล้าจากเมล็ด นอกจากนี้คุณภาพของกล้าที่ผลิตได้มีความสม่ำเสมอกัน จึงทำให้เป็นที่นิยมใช้ผลิตพืชในเชิงการค้า เป็นต้นว่า การขยายพันธุ์กล้วยไม้ และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการแก้ปัญหาการขาดแคลนเมล็ด หรือการผลิตกล้าจากวิธีการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศวิธีอื่นไม่ประสบความสำเร็จหรือกระทำได้ยาก (Gavinlertvatana and Matheson, 1987)

งานด้านการปรับปรุงพันธุ์ (Crop improvement) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศวิธีหนึ่ง ที่สามารถถ่ายทอดลักษณะเดิมของแม่ไม้มายังรุ่นลูกได้ ดังนั้นจึงเหมาะในการนำมาใช้กับงานการผลิตกล้าที่ต้องการคงลักษณะเด่นของแม่ไม้ไว้ สำหรับการสร้างสวนผลิตเมล็ดพันธุ์ หรือการปลูกป่าโดยตรง การขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศให้ผลตอบแทน (gain) มากกว่าการขยายพันธุ์โดยเมล็ด ทั้งนี้เนื่องมาจากผลตอบแทนที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยเมล็ดขึ้นอยู่กับความผันแปรของ additive gene ในขณะที่การขยายพันธุ์โดยอาศัยเพศมาจากความผันแปรของ gene ทั้งหมด คือ additivegene + non-additive gene (Biondi and Thrope, 1981)

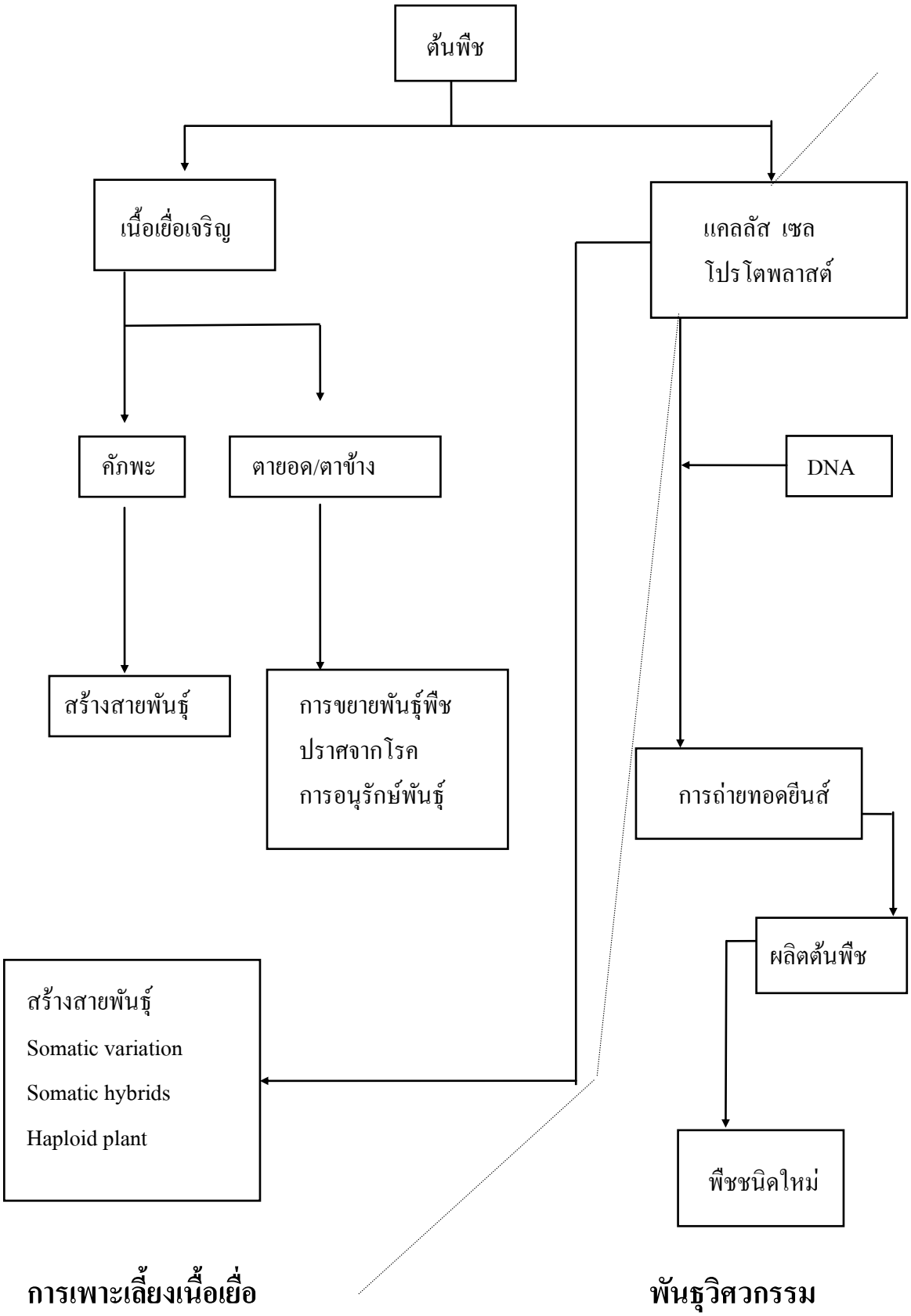
งานด้านการสร้างสายพันธุ์ (Breeding) เพื่อใช้ในการสร้างสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) การสร้างพืชที่มีจำนวนโครโมโซมชุดเดียว (haploid) หรือหลายชุด (polyploid) สร้างพืชลูกผสมทั้งในสกุลเดียวกันและต่างสกุล และยังเป็นเครื่องมือในการสร้างสายพันธุ์แท้ (pure line) ได้อีกด้วย

การคัดเลือกสายพันธุ์ (Selection) การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกสายพันธุ์ทั้งทางตรงและทางอ้อม เป็นต้นว่า การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อม เช่น สายพันธุ์ทนเค็ม สายพันธุ์ทนแล้ง สายพันธุ์ทนโรคและแมลง ได้อย่างมีประสิทธิภาพและประหยัดทั้งพื้นที่ แรงงาน ตลอดจนเงินทุน

การผลิตพืชปราศจากโรค (Disease-free plant) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิยมใช้สำหรับการผลิตพืชปราศจากโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากไวรัสซึ่งยากแก่การกำจัดให้หมดไปจากชิ้นส่วนพืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ เช่น ปลายยอด (apical meristem) หรือเนื้อเยื่อจากคัพภะ ซึ่งเป็นส่วนของพืชที่ปลอดไวรัส เนื่องจากการเคลื่อนย้ายของไวรัสไปสู่ส่วนต่างๆ ของพืชจะอาศัยทางท่อน้ำและท่ออาหาร แต่ในส่วนของปลายยอด และเนื้อเยื่อคัพภะไม่มีโครงสร้างเหล่านี้อยู่ พืชที่ปราศจากโรคนอกจากมีความแข็งแรงและให้ผลผลิตสูงขึ้นแล้ว ยังเหมาะสำหรับการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชอีกด้วย ซึ่งปัจจุบันค่อนข้างที่จะเคร่งครัดกับปัญหาโรคที่ติดมากับท่อนพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่ติดมากับเมล็ด

การเก็บรักษาพันธุ์ (Preservation) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถนำไปใช้สำหรับงานการเก็บรักษาพันธุ์พืช หรือการอนุรักษ์พันธุ์ได้เป็นอย่างดี การเก็บรักษาท่อนพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย แรงงาน และพื้นที่ได้มาก และยังสามารถใช้เก็บท่อนพันธุ์ได้ในระยะยาว โดยเก็บในสภาพอุณหภูมิต่ำที่ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งเรียกว่า cryopresevation วิธีนี้ได้รับความนิยมมากขึ้นในปัจจุบัน โดยเฉพาะการทำ gene bank

ศักยภาพของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช



การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในงานด้านป่าไม้

งานด้านป่าไม้ได้นำเอาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้กับงานการปรับปรุงพันธุ์ และงานการปลูกสร้างสวนป่า สำหรับงานการปรับปรุงพันธุ์ไม้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจัดว่าเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพอย่างมาก ช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย และลดระยะเวลาในการดำเนินงาน ทั้งนี้เนื่องจากการขยายพันธุ์โดยวิธีนี้นอกจากขยายพันธุ์พืชได้ในปริมาณมากแล้ว ยังให้ความสม่ำเสมอทั้งคุณภาพและการเจริญเติบโตอีกด้วย และเมื่อเปรียบเทียบกับขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เมล็ด ที่ต้องใช้เวลายาวนานกว่าที่จะดำเนินการจนสามารถจัดสร้างสวนผลิตเมล็ดพันธุ์ได้ โดยเฉพาะสำหรับพันธุ์ไม้ป่ากว่าที่แม่ไม้สามารถให้ผลผลิตเมล็ดได้ต้องไม่ต่ำกว่า 15 ปี สำหรับไม้โตช้า และ 3 ปี สำหรับไม้โตเร็ว นอกจากนี้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังใช้ในการสร้างสายพันธุ์ใหม่ คัดเลือกพันธุ์ และอนุรักษ์พันธุ์

การปลูกสร้างสวนป่า การผลิตกล้าไม้สำหรับการปลูกสร้างสวนป่าโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในปัจจุบันเป็นที่นิยมกันมากขึ้น โดยเฉพาะในไม้ยูคาลิปตัส และไม้สัก ทั้งนี้เนื่องจากการผลิตกล้าไม้จากวิธีการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศไม่ว่าเป็นการปักชำ ติดตา ต่อกิ่ง รวมทั้งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถผลิตกล้าไม้ที่มีลักษณะเหมือนกัน ซึ่งทำให้ง่ายต่อการจัดการ แต่วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศวิธีอื่นในแง่ที่ว่าสามารถผลิตกล้าได้ในปริมาณมาก ภายในระยะเวลาสั้น รวมทั้งยังประหยัดค่าใช้จ่าย พื้นที่ และแรงงานอีกด้วย นอกจากนี้ยังสามารถผลิตกล้าได้ตลอดทุกฤดูกาล ในขณะที่การปลูกป่าโดยอาศัยเมล็ดจะทำได้เพียงชั่วระยะหนึ่งเท่านั้น และในบางปีอาจจะประสบกับปัญหาการขาดแคลนเมล็ดอีกด้วย การผลิตกล้าโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้สำหรับงานการปลูกสร้างสวนป่าแทนกล้าที่เพาะจากเมล็ด

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ป่าที่นำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์และงานด้านการปลูกสร้างสวนป่า หลังจากที่ทำการคัดเลือกแม่ไม้ได้แล้วจะนำชิ้นส่วนของแม่ไม้ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วมาขยายพันธุ์ได้ 3 วิธี ดังต่อไปนี้ คือ

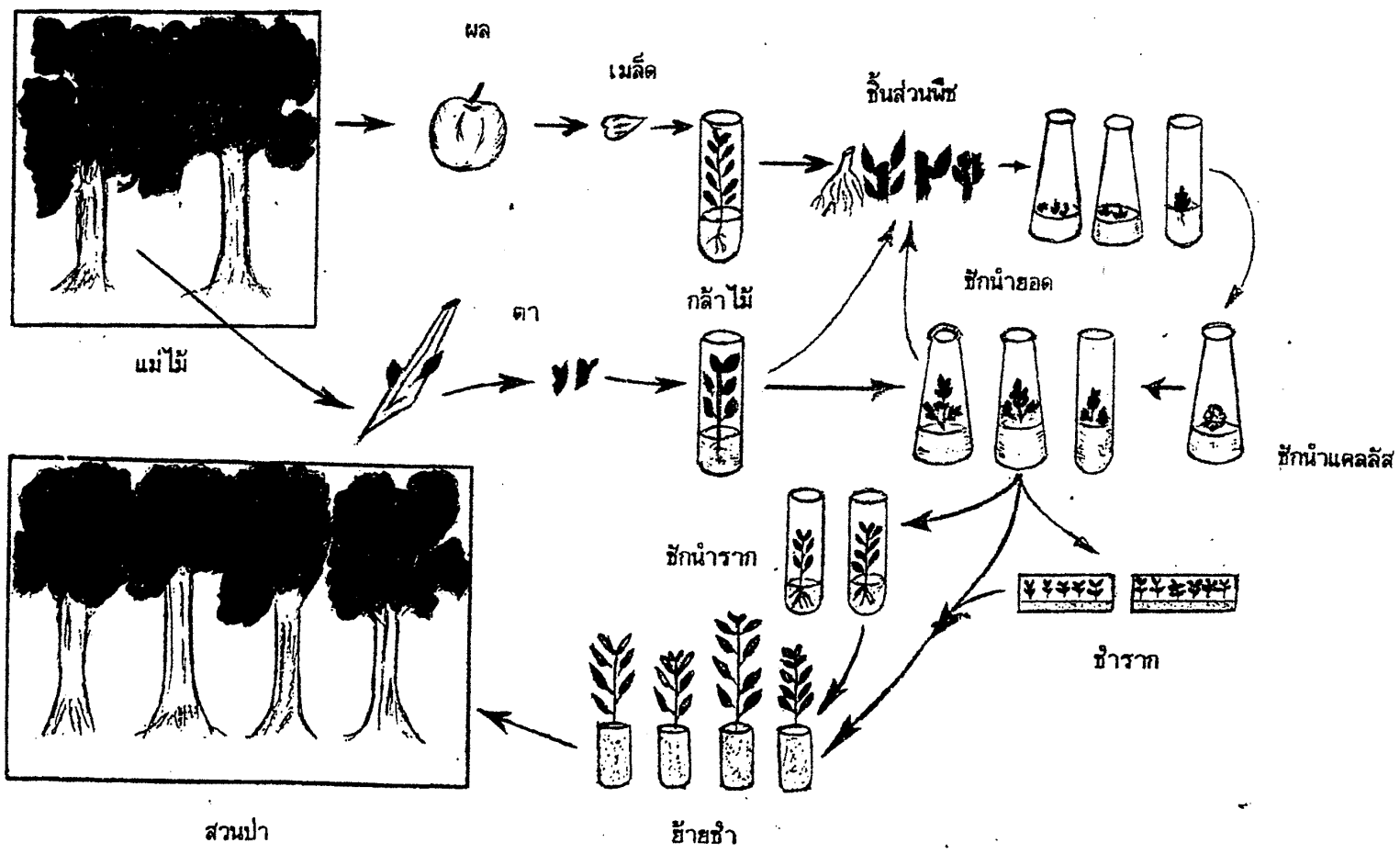
1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture/Micropropagation/*In vitro* culture) เป็นการผลิตกล้าไม้จากชิ้นส่วนของพืช ซึ่งได้แก่ เมล็ด ตายอด ตาข้าง หรือจากเนื้อเยื่ออื่น โดยชักนำให้เกิดเป็นต้นโดยตรง หรือชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส หรือเซลเดี่ยว ก่อนแล้วจึงชักนำให้เกิดต้นใหม่โดยผ่านขบวนการ organogenesis หรือขบวนการ embryogenesis กล้าที่ได้สามารถนำไปใช้ในการปลูกป่าหรือใช้ในการจัดสร้างสวนผลิตเมล็ดพันธุ์ เพื่อทำการปรับปรุงในขั้นตอนต่อไป (ฝ่ายวนวัฒนวิจัย 2529)

การดำเนินงานที่กล่าวมาเป็นเพียงวิธีการพื้นฐานของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเท่านั้นซึ่งอาจพัฒนางานไปถึงขั้นสูงต่อไปได้อีก เป็นต้นว่า การสร้างพืชลูกผสม หรือพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว (haploid) โดยการเลี้ยงเกสรตัวผู้ อับละอองเรณู (anther culture) ซึ่งมีโครโมโซมชุดเดียว (n) หรืออาจทำให้เกิดพืชที่มีโครโมโซมสองชุด (diploid) ได้โดยการผสมหรือขบวนการ chromosome doubling พืชที่เกิดใหม่จะมีชุดของโครโมโซมเหมือนกัน (homozygous diploid) แต่ความสำเร็จของวิธีการนี้ค่อนข้างต่ำ ส่วนใหญ่มัก

ประสบความสำเร็จในไม้เนื้ออ่อนและธัญญพืช สำหรับงานด้านป่าไม้ประสบความสำเร็จเพียงการสร้างแคลลัสที่มีโครโมโซมชุดเดียว (haploids callus) เท่านั้น ดังเช่น การศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของไม้สัก (Kaosa-ard and Apavatjrut, 1986)

2. การเลี้ยงเซล (cell suspension culture) การเพาะเลี้ยงเซลนั้นนอกจากสามารถย่นระยะเวลาประหยัดแรงงานและพื้นที่ในการดำเนินการแล้ว ยังสามารถผลิตต้นได้ในปริมาณมากมายอีก จึงเหมาะในการผลิตพืชในเชิงการค้า (Biondi and Thorpe, 1981) และในขณะเดียวกันยังใช้สำหรับการคัดสายพันธุ์ เช่น พืชทนแล้ง พืชทนเค็ม พืชที่มีความต้านทานโรคและแมลง โดยขั้นแรกต้องชักนำให้เซลเกิดการกลายพันธุ์ด้วยการใช้สารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ หรือรังสี จากนั้นจึงทำการคัดเลือกหาลักษณะเซลใหม่ตามวัตถุประสงค์ (cell variants) แล้วจึงนำเซลเหล่านั้นมาชักนำให้เกิดต้น ซึ่งเป็นพืชที่มีสายพันธุ์ตามความต้องการ (Kirby, 1982)

3. การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (Protoplast culture) วิธีนี้เหมาะสำหรับการสร้างสายพันธุ์ใหม่ (Evans and Bravo, 1983) งานด้าน protoplast fusion สามารถเว้นขั้นตอนการผสมพันธุ์ ทำให้ย่นระยะเวลาและยังสามารถหลอมรวมเอาลักษณะทางพันธุกรรม ซึ่งไม่สามารถทำโดยการผสมพันธุ์แบบดั้งเดิม เช่น การรวมตัวของ cytoplasm ที่เรียกว่า cybrids หรือการนำเอา organelle อื่น เข้าไปผสมในโปรโตพลาสต์ (protoplast) เดิม นอกจากนี้ยังสามารถผสมข้ามพันธุ์ในพืชต่างชนิด หรือต่างสกุลได้ (Arasu and Paranjothy, 1975)



ภาพที่ 1 การขยายพันธุ์ไม้สักโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (อภิชาต และคณะ, 2528)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(Tissue Culture Technique)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธุ์ไม้ป่า มีหลักการเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั่วไป โดยดำเนินการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารสังเคราะห์ ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งมีการเตรียมพื้นที่ในการดำเนินการ และวิธีการดังนี้

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(Tissue Culture Laboratory)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องดำเนินงานภายใต้สภาวะปลอดเชื้อและควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมสำหรับพืช ดังนั้นสถานที่และเครื่องมือที่ใช้จึงแตกต่างไปจากห้องปฏิบัติการทั่วไป การดำเนินงานต้องต่อเนื่องกันตามลำดับขั้น การจัดสถานที่และเครื่องมือจึงต้องวางแผนให้สอดคล้องและสะดวกในการปฏิบัติงาน โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควรประกอบด้วย

1. ห้องเตรียมอาหาร (Medium prepared room)
2. ห้องย้ายเนื้อเยื่อ (Transferred room)
3. ห้องเพาะเลี้ยง (Incubated room)

1 ห้องเตรียมอาหาร (Medium Prepared Room)

1.1 การจัดบริเวณห้องปฏิบัติการ

ห้องเตรียมอาหารเป็นบริเวณที่จัดไว้เพื่อใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และทำความสะอาดเครื่องมือเครื่องใช้ ภายในห้องนี้ควรจัดบริเวณให้เป็น 2 ส่วนโดยแบ่งสัดส่วนให้เหมาะสมและสะดวกในการทำงาน ดังต่อไปนี้

1. บริเวณสำหรับเตรียมอาหาร ประกอบด้วย

- โต๊ะสำหรับการเตรียมอาหารมีความสูงและพื้นที่กว้างพอที่จะวางเครื่องแก้ว และทำงานได้สะดวก
- ตู้สำหรับเก็บสารเคมี
- ตู้แช่แข็ง (Deep freeze) สำหรับเก็บ Stock solution เอ็นไซม์ และ ฮอร์โมน
- ตู้เย็น สำหรับใช้เก็บสารเคมี ตัวอย่างพืช และสารละลายซึ่งต้องการเก็บในระยะสั้นๆ
- เครื่องกลั่นน้ำ (Distilled Water Machine) พร้อมถังสำหรับสำรองน้ำกลั่น
- เครื่องชั่ง (Balance) สำหรับชั่งสารเคมี เครื่องชั่งควรมี 2 ชนิด คือ

1) เครื่องชั่งชนิดละเอียด (Analytical Balance) ซึ่งชั่งได้ละเอียดเป็นกรัมและมิลิกรัม เหมาะสำหรับการชั่งสารเคมีที่ต้องการในปริมาณเล็กน้อย เช่น ฮอร์โมน ธาตุอาหารรอง (Micro-nutrient) วิตามิน ฯลฯ
2) เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Toploading) ใช้สำหรับชั่งสารเคมีที่ต้องการในปริมาณมาก เช่น น้ำตาล วุ้น ธาตุอาหารหลัก (Macro-nutrient) ฯลฯ

เครื่องชั่งควรวางอยู่บนโต๊ะที่แข็งแรงไม่สั่นสะเทือนง่าย

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) โดยส่วนใหญ่มักจะใช้แบบไฟฟ้าเพราะมีความละเอียดและแม่นยำ แต่สำหรับงานที่ไม่ต้องความละเอียดมาก อาจจะใช้กระดาษทดสอบกรด-ด่าง หรือสารละลาย เป็นตัวทดสอบ
- เตาไฟฟ้า หรือ Stirring heating plate ไว้สำหรับละลายสารเคมี ผสมส่วนประกอบของอาหารให้เข้ากัน และใช้ละลายวุ้น ในการละลายวุ้นอาจใช้เตาอบไมโครเวฟแทนเตาไฟฟ้าได้
- หม้อนึ่ง (Autoclave) สำหรับนึ่งฆ่าเชื้อโรคในอาหารและเครื่องมือต่าง ๆ หม้อนึ่งอาจเป็นแบบอัตโนมัติ (Automatic) หรือแบบไม่อัตโนมัติ (Manual) ซึ่งอาจใช้ไฟฟ้าหรือแก๊สหากหม้อนึ่งแบบใช้แก๊สต้องมีเตาแก๊สและถังแก๊สเป็นองค์ประกอบด้วย
- เครื่องดูดอากาศ (Vacaum Pump หรือ Aspirator) สำหรับดูดอากาศในการกรองสารเคมีซึ่งไม่สามารถฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนได้ เช่น เอ็นไซม์ ฮอร์โมน ฯลฯ

2. **บริเวณสำหรับทำความสะอาด** ประกอบด้วยอุปกรณ์และเครื่องมือ ดังต่อไปนี้

- อ่างน้ำ สำหรับล้างสิ่งสกปรก เช่น เครื่องแก้ว เครื่องมือ
- เตาอบ สำหรับอบเครื่องแก้วและเครื่องใช้ ให้แห้งและฆ่าเชื้อโรค
- ตู้สำหรับเก็บเครื่องแก้ว และเครื่องใช้ ตู้ควรปิดสนิทสามารถป้องกันฝุ่นละออง

1.2 อุปกรณ์และสารเคมี

1. **สารเคมี** การเตรียมอาหารต้องใช้สารเคมีหลายอย่าง ได้แก่

- สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร
- ฮอร์โมน
- เอ็นไซม์
- แอลกอฮอล์
- สารฆ่าเชื้อ เช่น Sodium / Calcium hypochlorite
- กรดและด่าง สำหรับปรับ pH อาหาร เช่น KOH HCI

2. **เครื่องแก้ว** ได้แก่

- Pipet ขนาดต่าง ๆ เช่น 1,2,3,5,10, และ 20 ml
- Cylinder ขนาด 10,50,100,250, และ 1,000 ml
- Beaker ขนาด 50,100,300,500, และ 1,000 ml
- Flask ขนาด 50,100,250, และ 500 ml
- ขวดใส่ Stock solution ขนาด 100,250,500, และ 1,000 ml
- หลอดหยด (Dropper)
- กรวย (Funnel)
- Petri - dish

3. **อุปกรณ์อื่นๆ** ได้แก่

- สำลี
- Aluminum foil
- กระดาษสำหรับชั่งสารเคมี
- ช้อนตักสารเคมี
- มีด และกรรไกร
- กระดาษกรองหรือกระดาษซับ (Tissue paper)

2 ห้องย้ายเนื้อเยื่อ (Transferred Room)

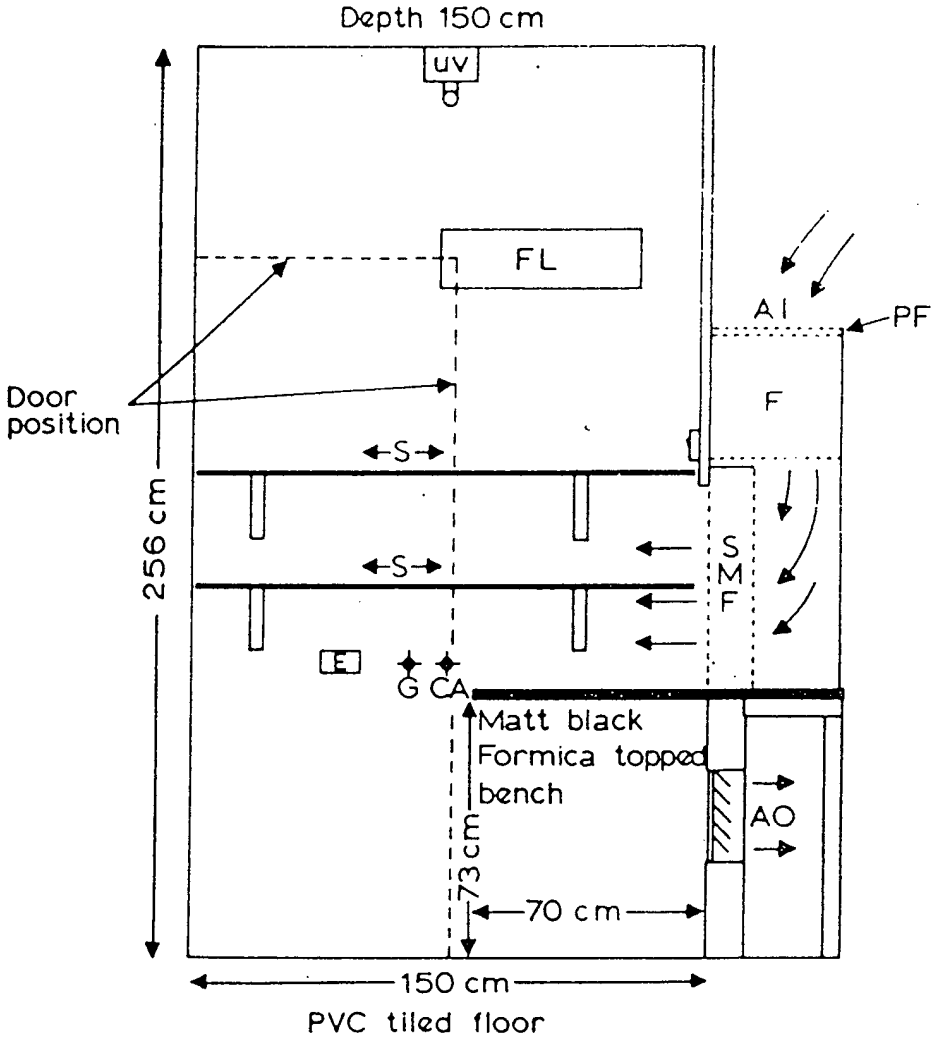
ห้องย้ายเนื้อเยื่อเป็นบริเวณที่จัดไว้สำหรับการย้ายเนื้อเยื่อพืช ซึ่งการปฏิบัติงานอยู่ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ห้องนี้จึงต้องระมัดระวังเรื่องความสะอาด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อโรค ลักษณะของห้องควรเป็นห้องที่ปิดมิดชิด มีแสงสว่างเพียงพอในการทำงาน ภายในห้องโล่งไม่รกรุงรัง ผนังห้องควรเรียบและทำความสะอาดได้ง่าย อากาศภายในห้องควรสะอาด จึงควรติดเครื่องกรอง (Sub-micron Filtter) ไว้ ภายในห้องควรมีเครื่องมือ ดังต่อไปนี้

2.1 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Transferred hood/Laminar flow/Clean Bench) ภายในตู้มีเนื้อที่ทำงานมากพอสมควร ตู้ย้ายเนื้อเยื่อมี 2 ลักษณะ คือ

1. **ตู้ที่ไม่มีการกรองอากาศ** ตู้ควรปิดมิดชิดไม่มีการหมุนเวียนของอากาศ และควรตั้งอยู่ในมุมที่ค่อนข้างสงบ ด้านหน้าตู้เป็นกระจกเพื่อที่จะมองทะลุเห็นวัตถุภายในตู้ได้ มีช่องเปิดอาจเป็นประตูเปิด-ปิดเพื่อป้องกันฝุ่น หรืออาจทำเป็นช่องเปิด 2 ช่องกว้างพอสำหรับสอดมือเข้าไปทำงานภายในได้

2. **ตู้ที่มีการกรองอากาศ** ตู้ชนิดนี้มีพัดลมดูดอากาศและเครื่องกรองอากาศซึ่งเป็นแผ่นกรองอากาศ มีทั้งชนิดหยาบสำหรับกรองฝุ่นละอองหรือเศษผงที่มีขนาดใหญ่ และแผ่นกรองชนิดละเอียด (High Efficiency Particulate Air-HEPA Filter) ที่สามารถกรองเชื้อโรคและเศษผงที่มีขนาดใหญ่

กว่า 3.3 μM ไว้ได้ พัดลมดูดอากาศจะทำหน้าที่พัดให้อากาศหมุนเวียนจากภายนอกผ่านแผ่นกรองหยาบ และแผ่นกรองละเอียด แล้วปล่อยให้อากาศที่สะอาดออกมาภายในตู้ที่ทำงาน ภายในตู้ย้ายเนื้อเยื่อต้องมีหลอดไฟฟ้าสำหรับให้แสงสว่างในการปฏิบัติงาน และ Ultra Violet ไว้สำหรับฆ่าเชื้อโรคภายในตู้ นอกจากนี้ตู้ควรจะมีปลั๊กไฟ 1-2 จุด เพื่อใช้สำหรับเครื่องใช้ไฟฟ้าภายในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ เช่น เครื่องชั่ง กล้องจุลทัศน์ การตั้งตู้ควรตั้งอยู่ที่มุมที่สามารถทำงานได้สะดวกหรือขนานไปกับผนัง ไม่ควรตั้งในที่ทิศทาง



ภาพที่ 2 แผนผังห้องสำหรับย้ายเชื้อ พื้นทำด้วย PVC ผนังฉาบด้วยปูนทาสีชนิดที่ทำความสะอาดได้ มีแผ่นกรองอากาศสำหรับกรองอากาศที่เข้ามาจากภายนอก (PF, SMF)พัดลม (F) เครื่องปรับอากาศ (CA 20 lb/in^2) ท่อแก๊ส (G) ระบบไฟ (E) หลอดไฟให้แสงสว่าง (FL) ติดไว้ที่ฝั่งตรงข้ามกับตู้ย้ายเชื้อ หลอด UV สำหรับฆ่าเชื้อ (Street,1973)

2.2 เครื่องปรับอากาศ (Air Condition) สำหรับควบคุมอุณหภูมิภายในห้องย้ายเนื้อเยื่อไม่ให้สูงเกินไป

2.3 อุปกรณ์อื่น

- พัดลมดูดอากาศ (Exhaust fan) สำหรับช่วยในการถ่ายเทอากาศภายในห้อง
- หลอดแสงอุลตราไวโอเลท ติดบนเพดาน หรือผนังห้องสำหรับฆ่าเชื้อโรคภายในห้องย้ายเนื้อเยื่อ
- ชั้นสำหรับเก็บอาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- รถเข็น
- เครื่องดับเพลิง
- กล้องจุลทัศน์ ชนิด light microscope และ Inverted microseope สำหรับใช้สังเกตผลและศึกษาลักษณะทาง morphology ของ cell และ protoplast กล้อง Stereoscope
- อุปกรณ์ที่ใช้ภายในตู้ย้ายเชื้อ เช่น ตะเกียงแอลกฮอล์/แก๊ส ปากคีบ (Forceps) ใบมีดผ่าตัด และ ด้ามมีด

3 ห้องเพาะเลี้ยง (Incubated Room)

ห้องเพาะเลี้ยงเป็นบริเวณที่ต้องควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญและการพัฒนาของเนื้อเยื่อซึ่ง ได้แก่ อุณหภูมิ แสงสว่าง และความชื้น ภายในห้องนี้ควรระมัดระวังการปนเปื้อนจากเชื้อโรค เช่น เดียวกับห้องย้ายเนื้อเยื่อ เครื่องมือที่ใช้สำหรับห้องนี้ ประกอบด้วย

3.1 เครื่องปรับอากาศ (Air Conditioner) ใช้สำหรับควบคุมอุณหภูมิภายในห้อง โดยทั่วไปจะควบคุมอุณหภูมิที่ 25 $\pm$ 1°C เครื่องปรับอากาศควรมีอย่างน้อย 2 เครื่อง เพื่อเปิดสลับกลางวันและกลางคืน ซึ่งช่วยยืดอายุการใช้งานได้นานขึ้น หากขนาดห้องใหญ่มากควรเพิ่มจำนวนเครื่องปรับอากาศเหมาะสมกับเนื้อที่

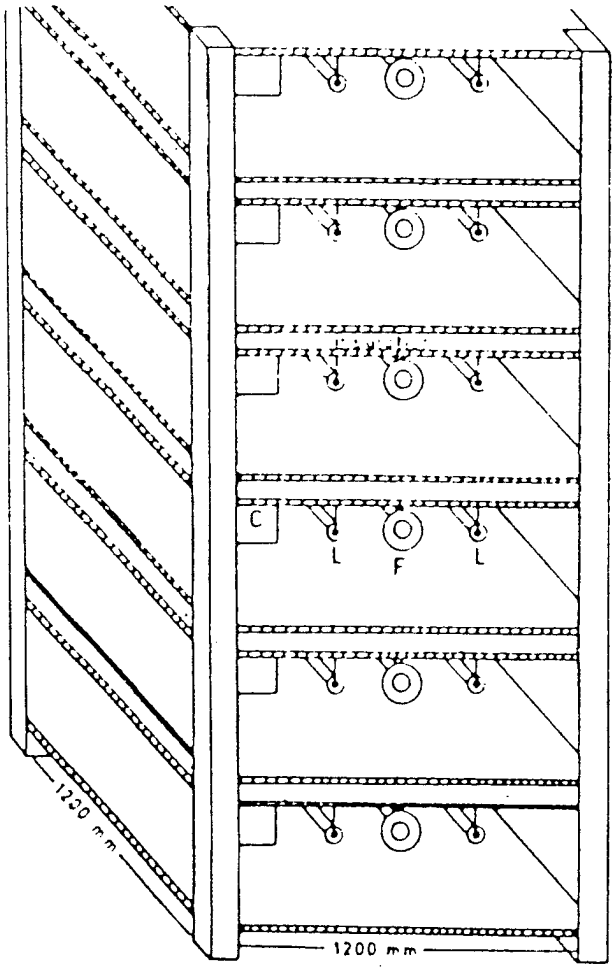
3.2 ระบบแสงสว่าง การควบคุมแสงสว่างในห้องเพาะเลี้ยงต้องคำนึงถึงคุณภาพ (Light quality) ความเข้มของแสง (Light intensity) และระยะเวลาในการให้แสงสว่าง แสงภายในห้องได้จากหลอดไฟฟ้าชนิดฟลูออเรสเซ็นต์ (Fluorescent Lamp) โดยจัดให้มีการเข็มของแสง 100-200 กำลังเทียน ซึ่งโดยปกติพืชสามารถเจริญได้ที่มีความเข้มแสงน้อยกว่า 1 K Luxes แต่พืชบ้างชนิดต้องการแสงปริมาณมากถึง 5-10 K Luxes ช่วงระยะเวลาในการให้แสงอาจแตกต่างกันไปตามชนิดพืช การเพาะเลี้ยงบางครั้งอาจต้องเก็บไว้ในที่มืด แต่โดยทั่วไปควรให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน การควบคุมการเปิดปิดไฟควรจะมีสวิซต์อัตโนมัติควบคุม อย่างไรก็ดีการให้แสงหากสามารถจัดให้ใช้แสงธรรมชาติได้จะช่วยประหยัดได้มากและให้ผลดี

3.3 ชั้นวางขวด ใช้สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารแข็ง ชั้นอาจทำด้วยกระจกไม้หรือตะแกรงลวดก็ได้ หากเป็นชั้นที่ทำด้วยไม้ควรติดหลอดไฟแยกเป็นชั้นๆ ไป แต่ละชั้นควรจะมีพัดลมตัวเล็กๆ ติดตั้งไว้เพื่อช่วยระบายความร้อนอันเกิดจากไฟ

3.4 เครื่องเขย่า (Shaker หรือ Rotator) ใช้สำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลว เครื่องเขย่ามี 2 ชนิดคือ

- Horizontal type ควรจัดให้หมุนประมาณ 100-160 รอบต่อนาที
- Rotatary type ควรจัดให้หมุน 1-4 รอบต่อนาที

3.5 เครื่องควบคุมความชื้น ภายในห้องเพาะเลี้ยง ควรจัดให้มีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 60 % เพื่อช่วยป้องกันไม่ให้อาหารแห้งเร็วเกินไป



ภาพที่ 3 ชั้นสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ภาพที่ 4 ตู้ย้ายเชื้อแบบมีกรองอากาศ

ภาพที่ 5 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

1 สำหรับใช้ในห้องทดลอง หรือเตรียมอาหารปริมาณน้อย

2 สำหรับใช้ในการเตรียมอาหารปริมาณมาก

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(Tissue Culture Media)

พืชต้องการธาตุอาหารเป็นปัจจัยหลักในขบวนการทำงานต่างๆ เพื่อเสริมสร้างการเจริญเติบโต เนื้อเยื่อพืชก็มีความต้องการธาตุอาหารในการเจริญเติบโตเช่นเดียวกัน เนื้อเยื่อของพืชมีความต้องการปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตตามชนิด หรือแม้แต่เนื้อเยื่อพืชที่มาจากส่วนที่ต่างกัน เช่น เมล็ด ใบ ลำต้น ก็มีความต้องการปริมาณธาตุอาหารที่แตกต่างกันไปเช่นกัน ดังนั้นจึงมีการศึกษาสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกันมากมาย เพื่อให้เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด เช่น สูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (MS) สูตรอาหารของ White อย่างไรก็ดีสูตรอาหารแต่ละสูตรมีองค์ประกอบดังนี้

1. สารอนินทรีย์ (Inorganic nutrient)

สารอนินทรีย์เป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นมากสำหรับการทำงานและการเจริญเติบโตของพืช เช่น แมกนีเซียม เป็นองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ ไนโตรเจน เป็นส่วนสำคัญของกรดอะมิโน เหล็ก สังกะสี และโมลิพดินัม เป็นส่วนประกอบของเอ็มไซม์ พืชมีความต้องการธาตุอาหารแต่ละชนิดในปริมาณที่แตกต่างกันไป International Association For Plant Physiology ได้กำหนดไว้ว่าแร่ธาตุที่พืชต้องการในปริมาณที่มากกว่า 0.5 m mol l^{-1} จัดเป็นแร่ธาตุอาหารหลัก (Macro หรือ Major element) ในขณะที่แร่ธาตุที่พืชต้องการเล็กน้อยในปริมาณที่น้อยกว่า 0.5 m mol^{-1} จัดเป็นแร่ธาตุอาหารรอง (Micro-element) ธาตุอาหารหลัก ได้แก่ C H O N P K S Mg และ Ca เป็นแร่ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต และธาตุอาหารรอง เป็นแร่ธาตุมีความสำคัญต่อขบวนการการทำงานของพืช ได้แก่ Fe Mn Cu Zn B และ Mo

แร่ธาตุอาหารที่นำมาใช้ในสูตรอาหารต่างๆ อยู่ในรูปของสารประกอบ แร่ธาตุที่พืชนำมาใช้อาจได้มาจากสารประกอบหลายชนิด เป็นต้นว่า ไนโตรเจน มาจากสารประกอบแอมโมเนียม และสารประกอบไนเตรต สารประกอบเหล่านี้เมื่อละลายน้ำแล้วจะแตกตัวเป็นประจุ (ions) ต่างๆ เช่น NH_4^+ NO_3^- ซึ่งประจุเหล่านี้พืชสามารถนำไปใช้ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน พืชสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของไนเตรตได้ดีกว่าแอมโมเนียม

2. สารอินทรีย์ (Organic nutrient)

สารอนินทรีย์ ได้แก่ สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) สารอินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่ม ๆ ดังนี้

2.1 วิตามิน (Vitamins)

เนื้อเยื่อพืชต้องการวิตามินในปริมาณที่เพียงพอต่อการเสริมสร้างการเจริญเติบโต วิตามินที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่

- Thiamine วิตามิน B1
- Pyridoxine วิตามิน B6
- Nicotinic acid วิตามิน B3
- calcium pantothenate วิตามิน B5
- Inosital

2.2 กรดอมิโน (Amino acid)

กรดอะมิโน ที่นิยมใช้ คือ L-glycine กรดอะมิโนอื่นใช้บ้างในบางกรณี เช่น Glutamic acid และ Aspartic acid เป็นต้น

2.3 น้ำตาล (Sugar)

น้ำตาลเป็นแหล่งที่ให้พลังงาน น้ำตาลที่นิยมใช้ คือ Sucrose พืชบางชนิดเจริญได้ดีในน้ำตาล Glucose และ Fructose นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลชนิดอื่นเช่น Sorbite, Maltose, Galactose, Mannose และ Lactose น้ำตาลที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อใช้ประมาณ 2 - 5%

2.4 สารอินทรีย์ อื่น ๆ

สารอินทรีย์อื่น ๆ เป็นสารซึ่งได้จากผลิตภัณฑ์ของพืชซึ่งไม่รู้องค์ประกอบที่แน่นอน เป็นสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโต เช่น น้ำมะพร้าว Casein hydrolysate (CH) น้ำมะเขือเทศ มันฝรั่ง กล้วย ส่วนสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) สารอนินทรีย์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ของพืชมักมีปริมาณและคุณภาพที่ไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับอายุและสายพันธุ์ ดังนั้นในการทดลองควรหลีกเลี่ยงไปใช้กรดอะมิโนอื่นที่รู้องค์ประกอบที่แน่นอนแทน เช่น L-Asparagine , L - Glutamine

3. สารควบคุมการเจริญเติบโต (Growth hormones หรือ Growth regulators)

สารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นสารอินทรีย์ที่มีผลต่อการกระตุ้นหรือยับยั้ง หรือเปลี่ยนแปลงขบวนการทางสรีระบางอย่างของพืช ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช การแบ่งเซล การขยายตัวของเซลพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

3.1 Auxin สารในกลุ่มนี้มีผลต่อการแบ่งเซล และยืดตัวของเซล กระตุ้นการร่วงของใบ ยังยั้งการเจริญของตาข้าง (Apical dominance) กระตุ้นการเกิดราก และกระตุ้นการพัฒนาของท่อน้ำ-ท่ออาหาร (Vascular tissue differentiation) สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม Auxin มีหลายชนิดด้วยกัน เช่น

ชื่อสาร	ชื่อทางการเคมี	ชื่อการค้า
NAA (Napthalene acetic acid)	2-Napthalene acetic acid	Nutons Stafast Tre-hold Strop-drop ANA Apple-set
IBA (Indolebutyric acid)	3-Indolebutyric acid Indole butyric acid	Indole butyric Hydrazine Hormodin Jiffy grow Hormed
NAD (Napthalene acetamide)	N-1-Napthylacetamide	Amid-thin w Rootnone Rosetom NAAM
PCPA	Para CHorophenoxy acetic acid	Tomato fix CPA 4-CPA Sure-set
TIBA	2,3,5- triiodobenzoic acid	Floraltone
2,4-D	2,4 - DiCHoro phenoxyacetic acid	Amoxone Aqua kleem
2,4,5-T	TriCHorophenoxyacetic acid	-

3.2 Cytokinins สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มนี้มีผลต่อการแบ่งเซล การขยายตัวของเซล (Cell enlargement) กระตุ้นให้เกิดยอดกระจุก ยับยั้งการเกิดตายอด สารในกลุ่มนี้ที่นิยมใช้ในงานด่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่

ชื่อสาร	ชื่อทางเคมี
BAP	6-Benzylamino purine
2-IP	Isonentenyl adenine
Kinetin	6- Furfurylamino purine

3.3 Gibberellins สารกลุ่มนี้มีผลต่อการขยายตัวของเซล การพัฒนาของเมล็ด การงอกของเมล็ด กระตุ้นการออกดอกและติดผล Gibberellins ที่รู้จักกันมีมากกว่า 20 ชนิด แต่ที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ GA_3 โดยปกติทั่วไปมักใช้ GA ร่วมกับ auxin และ cytokinin ชนิดอื่น

4. วุ้น

วุ้นไม่ได้ให้สารอาหารที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่เป็นเพียงส่วนที่ทำให้อาหารแข็ง หรือกึ่งแข็งพอที่จะพยุงเนื้อเยื่อพืชไม่ให้จมอยู่ในอาหารเท่านั้น วุ้นเป็น Polysaccharide ชนิดหนึ่งที่ผลิตได้จากสาหร่ายทะเล การใช้วุ้นในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประมาณ 0.8-1 % ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายระดับคือ วุ้นบริสุทธิ์ วุ้นสำหรับการค้า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตกล้าในปริมาณมากใช้วุ้นที่ขายในท้องตลาดได้ สำหรับงานทดลองควรใช้วุ้นบริสุทธิ์เหมาะกว่าการใช้วุ้นที่มีขายตามท้องตลาด เนื่องจากวุ้นทั่วไปจะมีการปนเปื้อนของแร่ธาตุอื่น เป็นต้นว่า Mg และ Ca ซึ่งมีผลต่อการทดสอบ

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(Media Preparation)

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเนื้อเยื่อและชนิดพืช สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด การเลือกสูตรอาหารมาใช้อาจต้องคำนึงถึงความเหมาะสมกับพืชและวัตถุประสงค์ในการศึกษา เป็นต้นว่า สูตรของ Murashige และ Skoog (MS) เหมาะสำหรับใช้เพาะเลี้ยงและขยายเพิ่มจำนวนพืชหลายชนิด สูตรอาหารของ Schenk และ Hildebrandt เหมาะสำหรับเลี้ยงแคลลัสของพืชทั้งใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ สูตรอาหารของ White เป็นสูตรอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงราก และสูตรอาหารของ Gambor และ B5 เหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด สูตรอาหารแต่ละสูตรมีองค์ประกอบของ สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และวิตามินในรูปของสารประกอบที่แตกต่างกันไปทั้งชนิดและปริมาณ การเตรียมอาหารสำหรับการผลิตกล้าไม้ซึ่งมีสูตรที่เหมาะสมแล้วสามารถใช้อาหารพื้นฐานสำเร็จรูปซึ่งมีขายในท้องตลาดมาใช้จะช่วยประหยัดเวลา

และเงินได้มาก แต่สำหรับงานการทดลองซึ่งต้องมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบในสูตรอาหารอยู่ควรเตรียมเอง วิธีที่สะดวกที่สุดคือการทำ Stock solution ของอาหารในแต่ละสูตรไว้

1. การเตรียม Stock solution ของธาตุอาหาร

องค์ประกอบของอาหารในแต่ละสูตร มีทั้งสารอนินทรีย์ สารอินทรีย์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งธาตุอาหารเหล่านี้มีปริมาณแตกต่างกันไป การเตรียม Stock solution จึงต้องแยกกันไปตามปริมาณของธาตุอาหาร สำหรับความเข้มข้นของ Stock แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปตามความเหมาะสมและความสะดวกในการเตรียมดังต่อไปนี้

Stock I	Macro nutrient ควรเตรียม Stock 10 เท่า
Stock II	Micro nutrient ควรเตรียม Stock 1000 เท่า
Stock III	Vitamin ควรเตรียม Stock 1000 เท่า
Stock IV	Iron ควรเตรียม Stock 100 เท่า
Stock V	Growth regulators ควรเตรียม Stock 1000 เท่า

วิธีเตรียม Stock แต่ละชนิดต้องเตรียมแยกกัน โดยชั่งสารเคมีแต่ละตัว การชั่งต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของสารเคมีในขวดด้วย ควรจะใช้ช้อนตักสารเคมีที่สะอาด หรือใช้ช้อนตักสารเคมีเฉพาะเพื่อตักสารเคมีแต่ละขวด ภาชนะที่ใช้ชั่งสารเคมีควรเป็นแก้วหรือกระดาษรองชั่งสาร เมื่อชั่งสารเคมีแต่ละตัวเสร็จนำมาละลายในน้ำคนจนละลายหมด จึงนำสารมาละลายเหล่านี้มาผสมกัน จากนั้นเติมน้ำจนได้ปริมาณที่ต้องการ คนให้เข้ากันอีกครั้งแล้วเก็บใส่ขวด ปิดฝาให้แน่น ปิดฉลาก เขียนชื่อ และวันที่ไว้ที่ข้างขวด วิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโตควรแบ่งใส่ขวดในปริมาณที่พอเหมาะต่อการใช้แต่ละครั้งแล้วแช่แข็งไว้ที่ อุณหภูมิ 2-4°C Stock solution บางตัวต้องเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิต่ำ เช่น IBA IAA และเหล็ก (Iron) สารเคมีบางอย่างเช่น Casein hydrolysate สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ควรจะชั่งเมื่อต้องการใช้ ในกรณีที่ต้องการใช้น้ำมะพร้าว ควรต้มก่อน แล้วกรองให้สะอาด จากนั้นแบ่งใส่ขวด นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง (autoclave) แล้วจึงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C การใช้ Stock solution นั้นก่อนใช้ทุกครั้งควรเขย่าขวดเบาๆ ก่อน เพื่อตรวจสอบการตกตะกอนและการปนเปื้อนของเชื้อโรค Stock solution ควรเก็บไว้ใช้เพียง 1 เดือนเท่านั้น

การเตรียม Stock solution ตามสูตรของ Murashige และ Skoog (1962)

Stock I เตรียม 10 x	**Macronutrients**	**mg/1**	**g/1**
	NH_4NO_3	1,650	
	KNO_3	1,900	
	$CaCl_2.2H_2O$	440	
	$MgSO_4.7H_2O$	370	
	KH_2PO_4	170	
Stock II เตรียม 1000 x	**Micronutrients**		
	H_3BO_3	6.2	
	$MnSO_4.4H_2O$	22.3	
	$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	
	KI	0.83	
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	
	$CuSO_4.5H_2O$	0.025	
	$CoCl_2.6\ H_2O$	0.025	
Stock III เตรียม1000 x	**Vitamin**		
	Glycine	2.0	
	Nicotinic acid	0.5	
	Pyridoxine	0.5	
	Thiamin	0.1	
Stock IV เตรียม100 x	**Iron**		
	Sodium EDTA	37.25	
	$FeSO_4.7H_2O$	27.85	
Stock V เตรียม 100 x	**Inositol**	**100.0**	
น้ำตาล 3 **%**		30	

pH 5.6-5.8

2. การเตรียม Stock solution ของสารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโต มีวิธีการเตรียม Stock solution เช่นเดียวกับ Stock solution อื่น แต่การละลายจะแตกต่างกันไป คือ

Cytokinin	ละลายด้วย	กรดหรือด่าง เช่น HCl หรือ NaOH
Auxin	ละลายด้วย	ด่าง เช่น NaOH หรือ Ethanol
Gibberellin	ละลายด้วย	น้ำ

ความเข้มข้นของ สารควบคุมการเจริญเติบโตนั้น มีหน่วยการวัดแตกต่างกันไป ดังนี้

2.1 ส่วนต่อล้าน (Part per million หรือ ppm) หมายถึง สารจำนวน 1 หน่วย ในสารละลาย 1 ล้านหน่วย เช่น

IBA เข้มข้น 1 ppm หมายถึง สารผสมของ IBA ที่มี IBA บริสุทธิ์ 1 หน่วย (กรัม) ผสมอยู่ในสารละลาย ซึ่งได้แก่ น้ำ 1 ล้านหน่วย (กรัม) นั่นคือ มี IBA 1 มิลิกรัม ผสมอยู่ในน้ำ 1 ลิตร (น้ำ 1 ลิตร = 1,000,000 = 10^6mg)

2.2 เปอร์เซ็นต์ (Percent : %) หมายถึงจำนวนสาร 1 หน่วย ในสารละลาย 100 หน่วย เช่น

2,4-D เข้มข้น 15% หมายถึง สารผสม 2,4-D ที่มี 2,4-D บริสุทธิ์หนัก 15 กรัม ผสมในสารละลาย 100 ลบ.ซม.

2.3 กรัม หรือ มิลิกรัมต่อหน่วยปริมาตร หมายถึง จำนวนสารเป็นกรัมหรือมิลิกรัมในสารละลายปริมาตร (Volum) หนึ่ง เช่น

NAA เข้มข้น 5 มิลิกรัมต่อลิตร (5 mg/l) หมายถึงสารผสม NAA ที่มี NAA บริสุทธิ์หนัก 5 มิลิกรัม ในสารละลาย 1 ลิตร

2.4 โมลาร์ (Molarity หรือ M) หมายถึง จำนวนสาร 1 กรัม-โมล (gm-mole) ในสารละลาย 1 ลิตร เช่น

BAP เข้มข้น 1 M หมายถึงสารผสม BAP 1 ลิตร มี BAP บริสุทธิ์หนัก 225.20 กรัม

Molecular weight ของ BAP = 225.20

1 M = 10^3 mM = 10^6 μM

1 M เข้มข้นเป็น 1000 เท่า ของ 1 mM

1mM เข้มข้นเป็น 1000 เท่า ของ 1 μM

วิธีการเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต เริ่มจากการชั่งสารควบคุมการเจริญเติบโตตามน้ำหนักที่ต้องการ นำมาละลายด้วยสารละลายด่าง กรด หรือ Ethanol จนหมด แล้วจึงเติมน้ำให้ได้เท่าปริมาณตามต้องการ เก็บใส่ขวดปิดฝาให้แน่น ปิดฉลากเขียนชื่อ และวันที่ แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

วิธีการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(Media Preparation)

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยอาหารพื้นฐาน (basal media) คือ ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง เหล็ก วิตามิน ตามสูตรต่างๆ นอกจากนี้ในอาหารยังมีสารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาล วุ้น และสารอื่นที่เพิ่มเติมเข้าไป เช่น ผงถ่าน (Activated charcoal) วิธีการเตรียมมีดังนี้

1.1 การคำนวณปริมาณ Stock Solution

การคำนวณปริมาณ stock solution ของอาหารพื้นฐานและสารเร่งการเจริญเติบโตตามความเข้มข้นที่ต้องการโดยใช้สูตร

$N_1 V_1 = N_2 V_2$

N_1 = ความเข้มข้นของ Stock Solution

V_1 = ปริมาตรของ Stock Solution

N_2 = ความเข้มข้นที่ต้องการ

V_2 = ปริมาตรที่ต้องการ

ตัวอย่าง เช่น ต้องการเตรียมอาหาร 300 ml จะต้องใช้ธาตุอาหารหลักจาก Stock Solution ที่มีความเข้มข้น 10 เท่า เท่าใด

จากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

N_1 = ความเข้มข้นของ Stock solution คือ 10x

V_1 = ปริมาตรของ Stock solution ที่ต้องใช้

N_1 = ความเข้มข้นของอาหารที่ต้องการ คือ 1x

V_2 = ปริมาตรของอาหารที่ต้องการ คือ 300 ml

$10 \times V_1 = 1 \times 300$

$V_1 = (1 \times 300)/10$

$V_1 = 30$ ml

นั่นคือต้องใช้ปริมาณ stock ธาตุอาหารหลักจำนวน 30 ml จาก Stock ที่มีความเข้มข้น 10 เท่า เมื่อต้องการเตรียมอาหาร 300 ml

เพื่อความสะดวกในการเตรียมอาหารควรคำนวนปริมาณของ Stock solution ของอาหารพื้นฐาน สารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาล และวุ้น แล้วบันทึกลงในตาราง ดังตัวอย่างเช่น

ตารางการเตรียมอาหาร

ชื่ออาหาร.	**ส่วนผสม**		**วันที่เตรียม**
ปริมาณการเตรียม	**วัตถุประสงค์ในการใช้**		**ผู้เตรียม**
องค์ประกอบ	**สูตร**	**ความเข้มข้นของ Stock**	**ปริมาณ**
Macro			
Micro			
Vitamin			
Iron			
Inositol			
Auxin			
Cytokinin			
น้ำตาล			
วุ้น			
อื่นๆ			
ชนิดและขนาดภาชนะ:		**pH ที่ต้องการ**:	
		pH เริ่มต้น:	
ปริมาณอาหาร/ภาชนะ		**pH ที่ปรับเสร็จเรียบร้อย**	

1.2. ผสม Stock solution และสารควบคุมการเจริญเติบโต

นำ stock solution ตามปริมาณที่คำนวณไว้ผสมเข้าด้วยกัน เติมน้ำตาลแล้วคนให้เป็นเนื้อเดียวกัน วิตามินและ Auxin บางชนิดคุณสมบัติเปลี่ยนไปเมื่อได้รับความร้อนสูง ดังนั้นการเตรียมอาหารจึงต้องเติมวิตามิน และ Auxin หลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อ ในกรณีนี้ต้องทำการกรองวิตามิน และ Auxin ซึ่งผ่านการปรับ pH ตามที่ต้องการแล้ว โดยการใช้ Microfilter ที่มีขนาดของรู 0.22 - 0.45 μM

1.3 ปรับ pH ของอาหาร

นำอาหารที่ผสมแล้วไปปรับ pH ให้ได้ตามที่ต้องการ โดยใช้

0.1 N NaOH เมื่อต้องการเพิ่ม pH

0.1 N HCl เมื่อต้องการลด pH

1.4 เติมน้ำกลั่นในอาหาร

นำอาหารที่ปรับ pH เรียบร้อยแล้วมาเติมน้ำกลั่นให้ครบตามปริมาณที่ต้องการ

1.5 การเติมวุ้น

ในกรณีที่เตรียมอาหารแข็ง ให้เติมวุ้นลงไป แล้วนำไปต้มจนวุ้นละลายหมด จากนั้นจึงเทใส่ภาชนะตามปริมาณที่ต้องการปิดฝาให้พอตึงมือ และเมื่อหลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจึงปิดฝาให้แน่นอีกครั้ง แต่ถ้าเป็นอาหารเหลวเทใส่ภาชนะได้ทันที

1.6 การฆ่าเชื้อ

นำอาหารไปฆ่าเชื้อโดยการนึ่งในหม้อนึ่งความดันสูง (auto clave) ที่อุณหภูมิ 120°C ความดัน 1.06 kg/cm^2 ประมาณ 15 - 40 นาที ขึ้นอยู่กับปริมาณอาหาร และขนาดภาชนะ ดังนี้

ระยะเวลาที่ต่ำสุดที่ควรใช้ในการนึ่งฆ่าเชื้ออาหาร ที่อุณหภูมิ 121 °C

(Biondi and Thorpe 1981)

ปริมาณอาหาร (ml.)	ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ (นาที.)
20-50	15
75	20
250-500	25
1000	30
1500	35
2000	40

ในกรณีที่ภาชนะสำหรับใส่อาหารไม่สามารถทำการฆ่าเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อได้ เป็นต้นว่า ขวด หรือ petri-dish ที่ทำด้วยพลาสติก ต้องนำเอาอาหารที่เตรียมไว้แล้ว ใส่ขวดหรือภาชนะอื่นที่มีปริมาตรและลักษณะที่เหมาะสมสะดวกในการเทอาหาร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เสร็จแล้ววางทิ้งไว้ให้อาหารเย็นลง มีอุณหภูมิประมาณ 60°C จึงเทลงในภาชนะที่ต้องการภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

1.7 การเก็บอาหาร

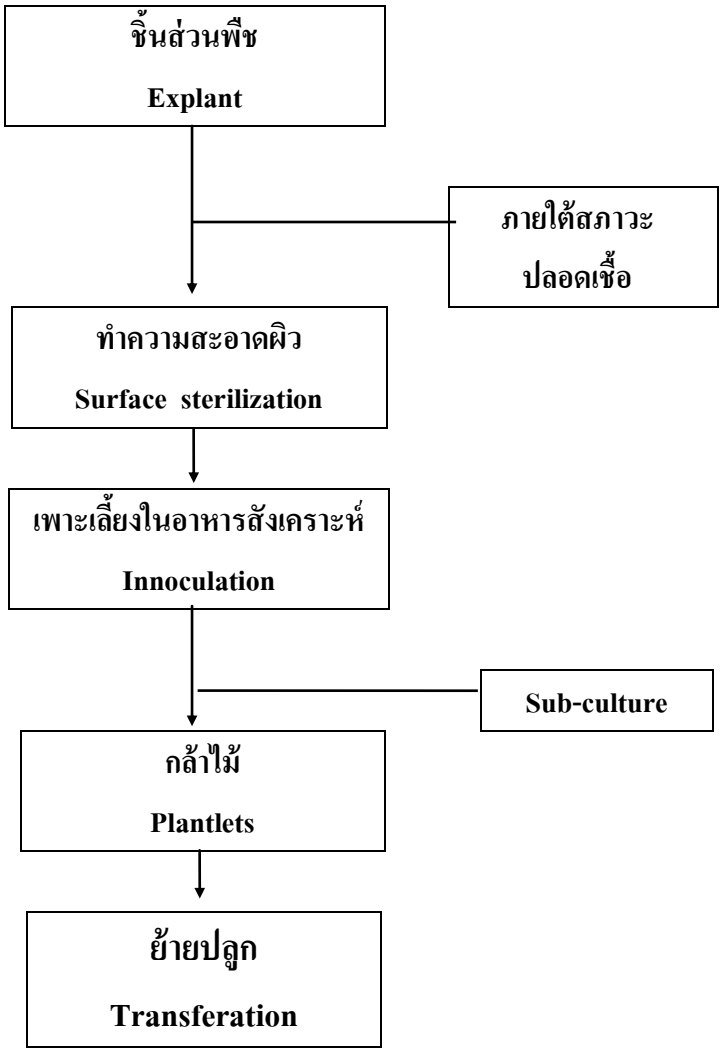
อาหารที่ฆ่าเชื้อเรียบร้อยควรจะเก็บไว้ในห้องที่สะอาด อุณหภูมิค่อนข้างต่ำ ประมาณ 4°C ก่อนนำไปใช้ควรทิ้งไว้ 2-3 วัน เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อราหรือแบคทีเรีย

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(Tissue Culture Method)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีแนวทางในการปฏิบัติได้หลายทางด้วยกัน เป็นต้นว่า การขยายพันธุ์โดยจุลวิธี (Micropropagation) วิธีนี้ใช้ตายอดหรือตาพืชมาเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นกล้าใหม่ การเพาะเลี้ยงแคลลัส (Callus culture) เป็นการนำชิ้นส่วนพืชมาเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นแคลลัส จากนั้นจึงชักนำให้เกิดขบวนการ Organogenesis หรือ Embryogenesis แล้วได้กล้าใหม่ขึ้นมา การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (Protoplast culture) เป็นการนำโปรโตพลาสต์ของเซลล์พืชมาเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นต้นใหม่ อย่างไรก็ดี ขั้นตอนการปฏิบัติงานมีลำดับขั้นตอนดังนี้ คือ

1. คัดเลือกชิ้นส่วนพืช
2. ทำความสะอาดบริเวณผิวของชิ้นส่วนพืช
3. เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ให้เกิดกล้าใหม่
4. ย้ายปลูกในเรือนเพาะชำ



1. ชิ้นส่วนพืช

ชิ้นส่วนพืชที่สามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีด้วยกันหลายชนิด โดยทั่วไปแล้วความหมายของ คำว่า “เนื้อเยื่อ” (tissue) ในงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักรวมถึงส่วนต่างๆ ของพืชในระดับ

- อวัยวะพืช (Organ) ได้แก่ ปลายยอด ปลายราก
- เนื้อเยื่อ (Tissue) ได้แก่ แคมเบียม (Cambium) Procambium Parenchyma tissue
- กึ่งอวัยวะพืชกึ่งเนื้อเยื่อ (Organ and Tissue Intermediate) ได้แก่ ส่วนของใบที่มีส่วนของท่อน้ำท่ออาหาร และ Parenchyma tissue รวมอยู่ด้วย
- เซลและโปรโตพลาสต์ (Cell and protoplast) ได้แก่ Anther Ovule และ Parenchyma cell ที่แยกออกมาเดี่ยวๆ โปรโตพลาสต์ที่แยกออกมาเดี่ยวๆ

การคัดเลือกชิ้นส่วนพืช

ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชแต่ละชนิดไม่เท่ากัน เนื้อเยื่อของพืชบางชนิดสามารถนำมาเลี้ยงให้สำเร็จได้โดยง่าย แต่ในขณะที่เนื้อเยื่อบางชนิดไม่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้สำเร็จได้ การคัดเลือกเนื้อเยื่อที่เหมาะสมและถูกต้องจึงมีความสำคัญยิ่งต่อการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้การคัดเลือกเนื้อเยื่อยังต้องคำนึงถึงวัตถุประสงค์ของการศึกษาเป็นหลักด้วย ปัจจุบันงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้นำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านเกษตรกรรมเพื่อวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน คือ เพื่อขยายสายพันธุ์ (Clonal propagation) เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ (Crop improvement) เพื่อผลิตต้นพืชที่ปราศจากโรค (Apparent disease-free plants) และเพื่อเก็บรักษาพันธุ์ (Germplasm preservation) ดังนั้นการคัดเลือกเนื้อเยื่อให้เหมาะสมและสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ มีแนวทางในการคัดเลือกดังต่อไปนี้ คือ

1. การเลือกเนื้อเยื่อเพื่อขยายสายพันธุ์ มีหลักเกณฑ์ดังนี้

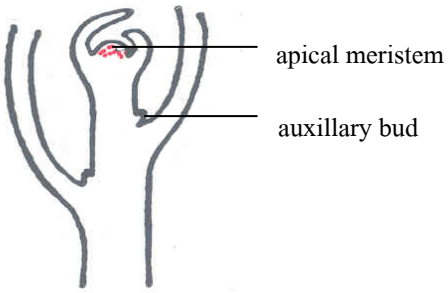
1.1 เลือกเนื้อเยื่อที่ปกติ ตรงตามพันธุ์โดยไม่มีการปรวนแปรใดๆ เกิดขึ้น เช่น หลีกเลี่ยงการใช้ชิ้นส่วนพืชที่มีเนื้อเยื่อ 2 ชนิดอยู่ด้วยกัน ซึ่งเรียกว่า Chimera หลีกเลี่ยงการใช้ตาที่ผ่าเหล่า (Bud sport) ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดความปรวนแปรในต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ตัวอย่าง เช่น การเอาใบสับประรดด่างมาเพาะเลี้ยงซึ่งในใบจะมีเนื้อเยื่อที่เป็นสีเขียวและสีแดงอยู่ใกล้ชิดกัน เมื่อได้ต้นใหม่เกิดขึ้นต้นใหม่ที่ได้ จะมีทั้งต้นที่มีใบด่าง เช่น ต้นเดิม ต้นสีเขียวล้วน และต้นที่มีสีแดงล้วน เป็นต้น

1.2 ใช้แต่เฉพาะ Somatic tissue เพื่อให้ได้ต้นใหม่ที่มีจำนวนโครโมโซมเท่าเนื้อเยื่อปกติ

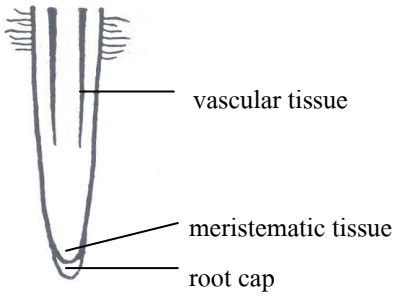
1.3 ใช้เนื้อเยื่อที่เป็น Meristematic cell มีโอกาสประสบความสำเร็จได้มาก ทั้งนี้เพราะ Cell สามารถแบ่งตัวและเจริญต่อไปได้ทันที การใช้ Cell ที่หยุดแบ่งตัวและเปลี่ยนไปทำหน้าที่เฉพาะแล้ว

(Differentiate) มาเพาะเลี้ยงต้องมีการชักนำให้ Cell เหล่านั้นกลับมาเป็น Meristamatic cell ใหม่อีกครั้ง ซึ่งอาจสำเร็จหรือไม่ก็ได้

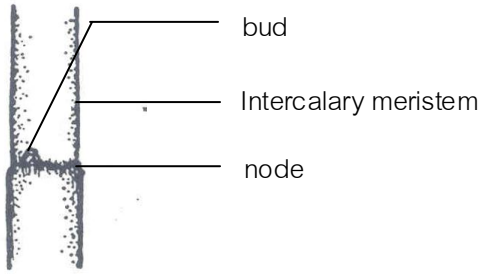
การคัดเลือกชิ้นส่วนพืชเพื่อการขยายสายพันธุ์ที่นิยมใช้กันทั่วไป คือ ปลายยอด (Shoot meristem) ปลายราก (Root meristem) ซึ่งมี Meristematic cells อยู่



ปลายยอดและเนื้อเยื่อเจริญ

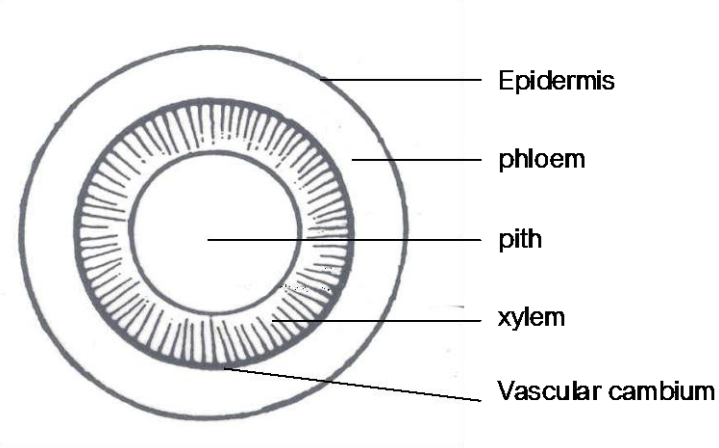


ปลายรากและเนื้อเยื่อเจริญ

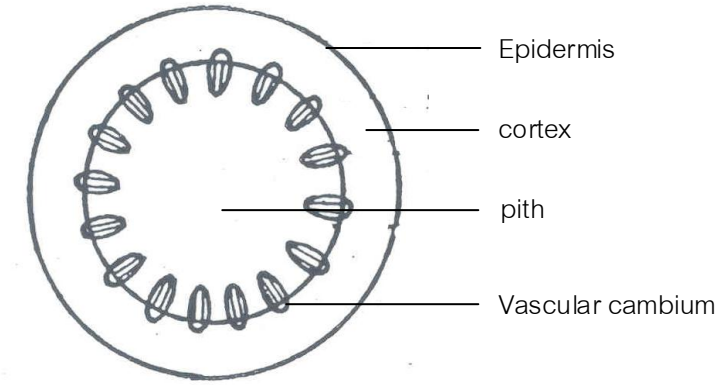


ข้อและตาของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

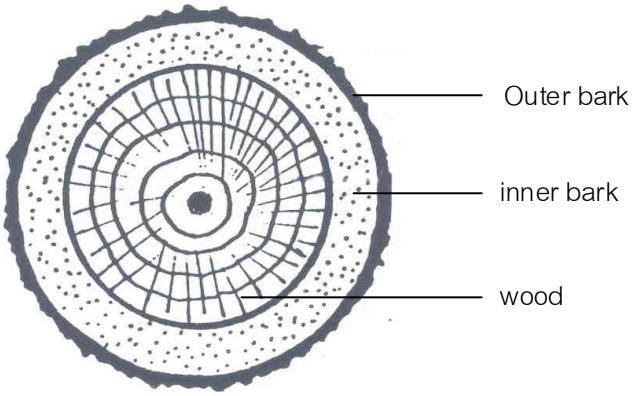
ภาพที่ 6 ชิ้นส่วนพืชที่มีลักษณะเป็นอวัยวะพืช (Organ) เช่น ปลายยอด ปลายราก



(1) ภาพตัดขวางของลำต้นพืชใบเลี้ยงคู่



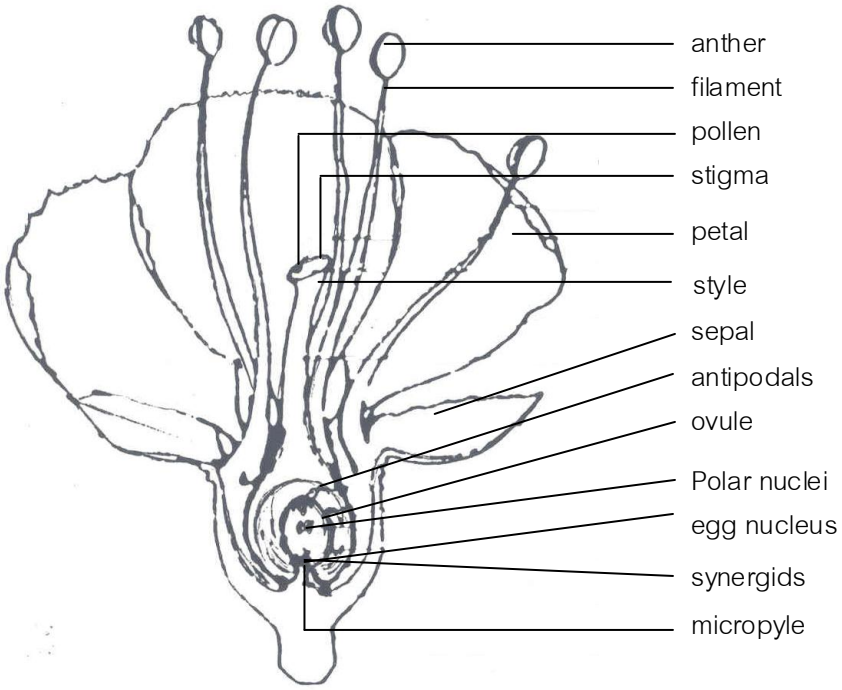
(2) ภาพตัดขวางของ Pith พืชใบเลี้ยงคู่



3 ภาพตัดขวางของเปลือกพืชใบเลี้ยงคู่

ภาพที่ 7 ชิ้นส่วนพืชที่มีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อ (Tissue) ได้แก่ cambium Procambium และ Parenchyma tissue ซึ่งอยู่ใน (1) ลำต้นของพืชใบเลี้ยงคู่ (2) pith ของพืชใบเลี้ยงคู่ และ (3) เปลือกของพืชใบเลี้ยงคู่

ภาพที่ 8 ชิ้นส่วนพืชที่มีลักษณะเป็นกึ่งอวัยวะพืชกึ่งเนื้อเยื่อ (Organ and Tissue Intermediate) ได้แก่ ส่วนของใบที่มีส่วนของท่อน้ำท่ออาหาร และ Parenchyma tissue รวมอยู่ด้วย



ภาพที่ 9 ชิ้นส่วนพืชที่มีลักษณะเป็นเซลและโปรโตพลาสต์ (Cell and protoplast) ได้แก่ Anther และ Ovule ที่แยกออกมาเป็นเซลเดี่ยว เช่น pollen egg

2. การเลือกเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์

2.1 การสร้างพืชที่มีจำนวนโครโมโซมชุดเดียว (Haploid plant) เนื้อเยื่อที่นำมาใช้ควรเป็นเนื้อเยื่อที่มีจำนวนโครโมโซมครึ่งหนึ่งของเนื้อเยื่อปกติ (n) ได้แก่ เซลล์สืบพันธุ์ เช่น Pollen หรือ Ovule ที่ยังไม่ได้รับการผสม (fertilization)

2.2 การสร้างพืชที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นสามชุด (Triploid plant) เนื้อเยื่อที่นำมาใช้ คือ Endosperm ซึ่งมีจำนวนโครโมโซม 3 ชุด (3n)

2.3 การสร้างพืชพันธุ์ใหม่โดยการผสมของเซลปกติ (Somatic cell hybridization) คือการนำเซลทั่วไปของพืชต่างชนิดมาเพาะเลี้ยงแล้วชักนำให้เกิดการผสมกันโดยใช้วิธีการรวมตัวของโปรโตพลาส (Protoplast fusion)

3. การเลือกเนื้อเยื่อเพื่อผลิตต้นพืชที่ปราศจากโรค

การผลิตต้นพืชที่ปราศจากโรค ต้องใช้เนื้อเยื่อพืชซึ่งปลอดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส การนำเอาเนื้อเยื่อที่ปลอดโรคมาใช้โดยทั่วไป คือ Shoot meristem ที่มีขนาดเล็กมากประมาณ 0.1-0.2 มิลิเมตร มาเพาะเลี้ยง และต้องใช้ความร้อน โดยการปลูกพืชในอุณหภูมิสูงประมาณ 35-40 °C เพื่อหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัส ปล่อยให้พืชเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมเช่นนี้เป็นเวลา 2-4 อาทิตย์ จึงสามารถตัดและนำเอาชิ้นส่วนพืชมาเพาะเลี้ยงต่อไป

4. การเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเก็บรักษาพันธุ์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถใช้ในการเก็บรักษาพันธุ์พืชได้ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว โดยใช้วิธีการที่ทำให้ในระหว่างการเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชมีการเจริญเติบโตต่ำสุดและทำการ Sub-culture น้อยครั้งที่สุด การเก็บรักษามี 2 วิธี คือ

4.1 Cold storage เก็บเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิต่ำ ประมาณ 1-9 °C ซึ่งอุณหภูมิช่วงนี้สามารถช่วยชะลอความแก่ของชิ้นส่วนพืชให้ช้าลง และช่วยยืดระยะเวลาในการ Sub-culture ให้นานขึ้น การเก็บรักษาโดยใช้อุณหภูมิต่ำ เป็นวิธีการที่ง่ายและอัตราการรอดตายของพืชค่อนข้างสูง จึงนิยมนำมาประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษากล้าไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในช่วงที่ความต้องการกล้าไม้ในตลาดมีน้อย ชิ้นส่วนที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ ยอดหรือต้นพืช

4.2 Freeze preservation เก็บรักษาเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิต่ำประมาณ –190°C เช่น การเก็บไนโตรเจนเหลว วิธีการนี้สามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานาน ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงได้ส่วนใหญ่เป็น อวัยวะพืช (Organ) เช่น Shoot apices Embryo และต้นพืช เนื่องจากอวัยวะพืชเหล่านี้มีการ

พัฒนาเช่นเดียวกับพืชปกติ (True-to-type) ความสามารถในการขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว และพืชยังสามารถรักษาลักษณะทางพันธุกรรมเดิมไว้ได้ไม่เปลี่ยนแปลง สำหรับการเพาะเลี้ยง Cell ไม่นิยมเก็บรักษาโดยวิธีนี้ เนื่องจากอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางพันธุกรรม (Genetic instability) ได้ง่ายระหว่างการเก็บรักษาที่มีระยะเวลายาวนาน นอกจากนี้ศักยะภาพในการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูญเสียไประหว่างการเก็บรักษา

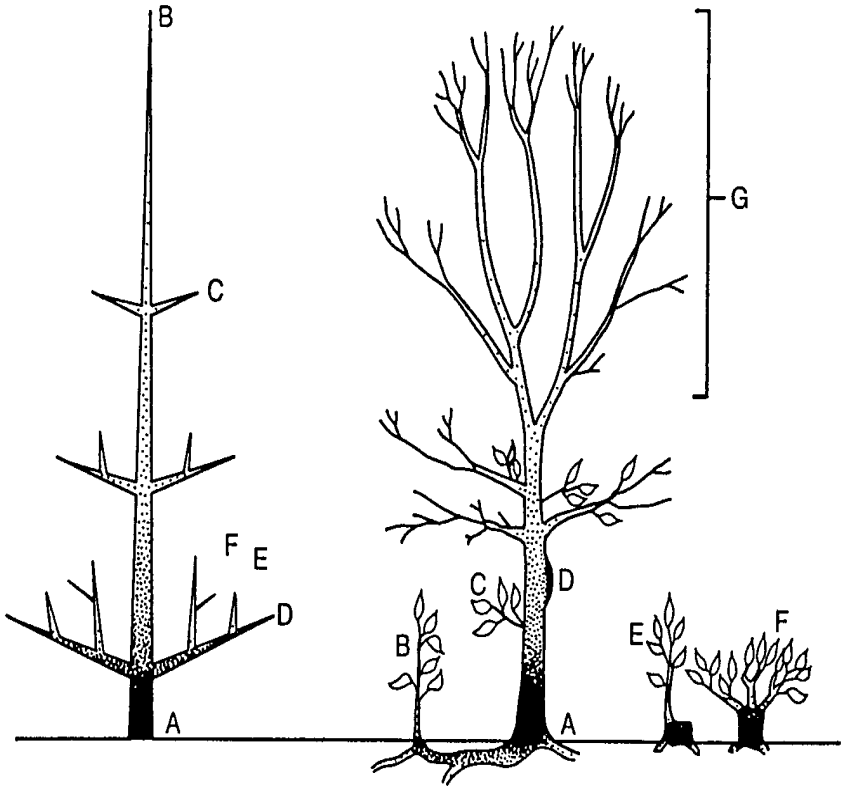
การเก็บชิ้นส่วนพืช

ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นอยู่กับปัจจัยทั้งภายในและภายนอกของพืชเอง เป็นต้นว่า อายุของเนื้อเยื่อ ปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในพืชและจากภายนอกที่เสริมเข้าไป สภาพแวดล้อม และฤดูกาล

อายุของชิ้นส่วนพืชเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งในการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ ชิ้นส่วนพืชที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) เช่น ปลายยอด ปลายราก แคมเบียมในราก หรือลำต้น เมล็ด ซึ่งชิ้นส่วนเหล่านี้ยังประกอบด้วยเซลที่ยังไม่มีการพัฒนาไปทำหน้าที่เฉพาะอย่าง จึงง่ายต่อการชักนำโดยปัจจัยภายนอกให้เปลี่ยนแปลงหน้าที่ไป

ความสามารถในการขยายพันธุ์จะเกี่ยวข้องกับอายุ (Stage) ของชิ้นส่วนพืช พืชซึ่งยังอยู่ในระยะที่เป็นไม้วัยอ่อน (Juvenile) สามารถที่จะนำมาเพาะเลี้ยงได้ง่ายกว่าพืชที่อยู่ในระยะที่เป็นไม้แก่ หรือไม้โตเต็มวัยสามารถออกดอกออกผลแล้ว (Mature) ทั้งนี้สืบเนื่องมากจากพืชที่อยู่ในระยะที่เป็นไม้วัยอ่อนยังประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) ซึ่งสามารถจะเพาะเลี้ยงให้เกิดต้นใหม่ได้ง่ายกว่าและพืชต้นใหม่ยังรักษาลักษณะเดิมของต้นแม่ (True-to-type) ได้ แต่พืชซึ่งอยู่ในระยะที่โตเต็มวัยเนื้อเยื่อเจริญส่วนใหญ่จะมีการพัฒนาเปลี่ยนไปทำหน้าเฉพาะแล้ว การเพาะเลี้ยงให้เกิดต้นใหม่จึงทำได้ยาก ลักษณะพืชต้นใหม่ อาจมีลักษณะต่างจากต้นแม่เดิมไป เช่น อัตราการเจริญเติบโตลดลง ลำต้นเลื้อย (Plagiotropic growth)

ในต้นพืชความเป็นไม้อ่อน-แก่ของพืชมีความผันแปรไปตามระดับความสูงของต้น ในลักษณะเป็นกรวย (Cone of juvenility) กิ่งที่อยู่ด้านล่างใกล้โคนต้นจะคงความเป็นไม้วัยอ่อนมากกว่ากิ่งที่อยู่ในระดับสูงขึ้นไป (ภาพที่ 10) และที่ระดับความสูงเดียวกันความเป็นไม้อ่อน-แก่ ยังผันแปรไปตามลำดับของตาภายในกิ่งเช่นเดียวกัน ตาที่อยู่ตามปลายกิ่งจะมีความเป็นไม้แก่มากกว่าตาที่อยู่โคนกิ่ง อย่างไรก็ตามความเป็นไม้อ่อน-แก่ของกิ่งพันธุ์สามารถควบคุมได้โดยการปฏิบัติต่อต้นไม้โดยวิธีการต่างๆ เช่น การตัดสางกิ่ง (pruning) การตัดยอด (hedgeing) กิ่งที่แตกออกมาใหม่จะกลับสภาพเป็นไม้วัยอ่อน (rejuvenile) ได้ใหม่



ภาพที่ 10 ระดับความเป็นไม้อ่อน-แก่ (Juvenile-mature) ตามอายุทางสรีรวิทยาของกล้าไม้ มีลักษณะเป็นกรวย (Cone of juvenility) คือ ความเป็นไม้อ่อนจะลดลงตามระดับความสูงของต้นไม้ ภาพซ้ายมือ คือ กล้าไม้ตระกูลสน (conifer tree) ความเป็นไม้อ่อนตามระดับความสูงของกล้าไม้จากบริเวณรอยต่อระหว่างยอดและราก (A) ไปจนถึงปลายยอดซึ่งเจริญเต็มที่ (mature) มีการออกดอกก่อนระดับอื่น (B) ความเป็นไม้อ่อนมีลำดับดังนี้ A >F >E >D >C >B ภาพขวามือ คือ กล้าไม้ผลัดใบ (decidous tree) ไม้อ่อนจะอยู่ที่บริเวณรอยต่อระหว่างยอดและราก (A) ที่ระดับสูงขึ้นไปความเป็นไม้อ่อนจะลดลงเรื่อยไปจนถึงเรือนยอดของลำต้นซึ่งเจริญเต็มที่ถึงวัยออกดอก (G) ส่วนที่อื่นๆ ที่อยู่ใกล้เคียงกับโคนต้น ซึ่งจะรวมถึง (B) รากที่ทำหน้าที่พิเศษ (adventitious root: “sucker”) (C) ยอดที่แตกใหม่ (epicormic) (D) ปุ่ม-ปมตามลำต้น (sphaeroblast) สำหรับ (E) ยอดแตกใหม่จากการริดกิ่ง และ (F) กิ่งที่แตกใหม่จากการตัดยอด (hedged tree) จะรักษาความเป็นไม้อ่อนด้วยการริดกิ่งอยู่เสมอ (Bonga 1982)

การเก็บเนื้อเยื่อพืชเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงนอกจากคำนึงถึง อายุของชิ้นส่วนแล้ว ปัจจัยภายนอก เช่น สภาพแวดล้อม สภาพภูมิอากาศ ยังมีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเช่นกัน เนื้อเยื่อพืชที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ เมล็ด หรือ Embryo กิ่งไม้ กล้าไม้ ตายอด หรือตาข้าง อับละอองเกสรเรณู และไข่ การเก็บชิ้นส่วนพืชเหล่านี้ในบางครั้งต้องเก็บมาจากในแปลงทดลองซึ่งต้องขนส่งมาสู่ห้องปฏิบัติการ และบางครั้งต้องเก็บรักษาไว้ก่อนที่จะลงมือปฏิบัติงาน ในกรณีเช่นนี้การเก็บชิ้นส่วนพืชและการบรรจุห่อ จึงต้องทำอย่างระมัดระวังเพื่อรักษาความมีชีวิตของชิ้นส่วนพืชให้คงอยู่ วิธีการเก็บและเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืช มีแนวทางดังต่อไปนี้

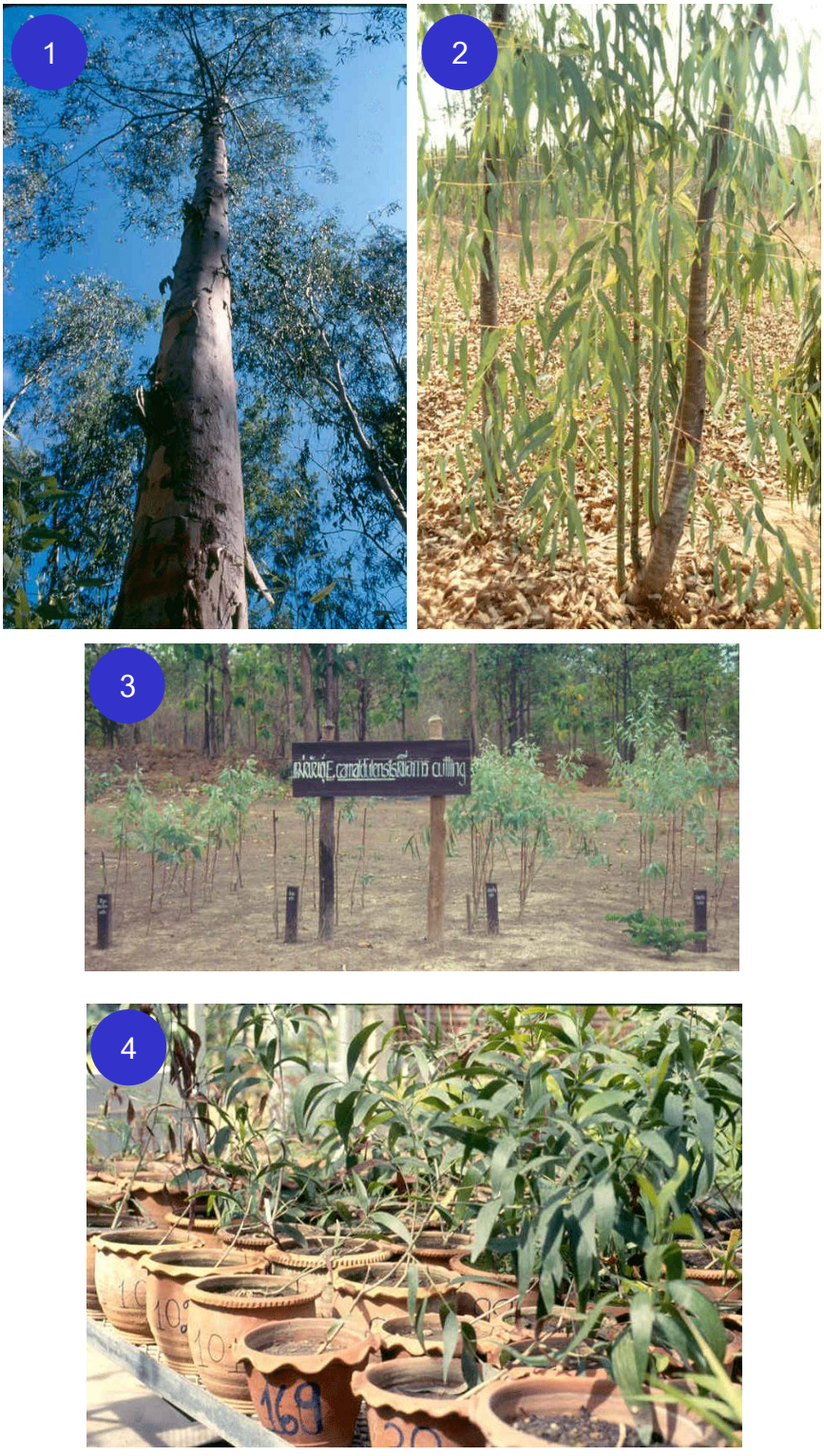
1. เมล็ด ควรเก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 3 ถึง -18 °C สามารถเก็บรักษาความมีชีวิตไว้ได้นานหลายปี

2. กิ่ง การเก็บกิ่งจากแปลงปลูกสามารถทำได้หลายวิธี คือ เก็บกิ่งสดใส่ถุงพลาสติก หรือถุงกระดาษ หรืออาจห่อด้วยกระดาษก่อนแล้วหุ้มด้วยถุงพลาสติกอีกชั้นหนึ่งก็ได้ กระดาษจะช่วยดูดซับความชื้นที่เกิดจากการคายน้ำของกิ่งทำให้การติดเชื้อจากเชื้อราลดน้อยลง ส่วนถุงพลาสติกจะช่วยให้กิ่งไม่แห้งเกินไป ในระหว่างการขนย้ายควรแช่กิ่งในถังน้ำแข็งเพื่อรักษาความสดของเนื้อเยื่อ

การเก็บกิ่งอีกวิธีหนึ่งคือเก็บกิ่งที่ค่อนข้างใหญ่ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 2 ซม. ขึ้นไป ลิดใบและกิ่งย่อยออกให้หมด ตัดเป็นท่อนสั้นๆ ประมาณ 40-50 ซม. ห่อด้วยกระดาษและใส่ถุงพลาสติก เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการแล้ว นำเอากิ่งที่เก็บมาแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อรา จากนั้นนำไปชำในกระบะทราย หรือ แช่น้ำ รดน้ำให้ชุ่มอยู่เสมอ เมื่อตาใหม่ผลิออกมาได้ขนาดจึงตัดนำไปศึกษาต่อ วิธีการนี้สะดวกในการขนย้ายตาที่นำมาใช้ ยังสดและไม่มีอันตรายจากการขนย้าย นอกจากนี้อัตราการติดเชื้อน้อยกว่าวิธีแรกเนื่องจากเป็นตาที่ผลิใหม่

การเก็บตาจากแม่ไม้เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควรเลือกฤดูกาลที่เหมาะสม เนื่องจากตามีการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงไปในรอบปี การเก็บตาควรเลือกเก็บในฤดูกาลเจริญเติบโตมากกว่าฤดูที่ตาพักตัว เพราะตาในระยะนี้เป็นระยะที่ตามีพละกำลังในการแตกยอดใหม่มาก จึงง่ายต่อการทำความสะอาด นอกจากนี้ตายังมีส่วนของเนื้อเยื่อเจริญอยู่ทำให้ง่ายต่อการเพาะเลี้ยง แต่ถ้าจำเป็นต้องเก็บตาที่ตาอยู่ในระยะพัก (dormant bud) ตัว ควรต้องมีการปฏิบัติกับต้นแม่ก่อน การเก็บตาวิธีที่นิยมปฏิบัติ การลิดกิ่ง การกานรอบโคนต้นเพียงบางส่วน หรือการตัดต้นแม่ทิ้งให้เหลือเฉพาะต่อเพื่อให้เกิดการแตกกิ่งหรือหน่อขึ้นมาใหม่ การปฏิบัติโดยวิธีนี้ทำให้สภาพตากลับไป Juvenile อีกครั้งหนึ่ง

การคัดเลือกตาเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงนอกจากคัดเลือกตาที่กำลังผลิแล้วควรเลือกตาที่ยังมีใบห่อหุ้มปิดได้มิดชิด ตาที่เปลือยมักมีอัตราการติดเชื้อสูงกว่าตาที่ยังมีใบห่อหุ้มอยู่



ภาพที่ 11 การเก็บตาจากแหล่งต่างๆ เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. แม่ไม้ 2. กิ่งที่แตกจากหน่อ

3. แปลรวมพันธุ์ (Hedging) 4 กิ่งจากแม่ไม้ที่นำมาปักชำในเรือนเพาะชำ

ภาพที่ 12 การเตรียมตัวอย่างตาสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. นำกิ่งมาปักชำในกระถางหรือแปลงเพาะชำ
2. ตาที่นำมาเพาะเลี้ยง

3. กล้าไม้ กล้าไม้ที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงอาจจะได้มาจากการเพาะเมล็ดหรือการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศวิธีอื่น เช่น การปักชำ การตอน กล้าไม้เหล่านี้ควรนำมาเพาะเลี้ยงในเรือนเพาะชำหรือในห้องควบคุมการเจริญเติบโต (Growth chamber) ซึ่งสามารถควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น แสง ความชื้น อุณหภูมิ และควรใส่ปุ๋ยเพื่อให้กล้ามีความสมบูรณ์ และสภาพทางสรีระวิทยาของกล้าไม้เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้การเก็บในเรือนเพาะชำหรือห้องควบคุมการเจริญเติบโตใกล้ห้องปฏิบัติการเป็นการสะดวกอย่างยิ่งในการเก็บชิ้นส่วนพืชมาใช้

2. การทำความสะอาดบริเวณของชิ้นส่วนพืช (Surface Sterilization)

1. การเตรียมพื้นที่และอุปกรณ์ในการทำความสะอาดผิว

ขั้นตอนการทำความสะอาดชิ้นส่วนพืชนับว่าเป็นประตูด่านแรกสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลังจากผ่านขั้นตอนการคัดเลือกชิ้นส่วนพืชเรียบร้อยแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือ การทำความสะอาดผิวให้ปลอดเชื้อก่อนจึงจะนำชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงต่อไปได้ ขั้นตอนเหล่านี้ต้องทำภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ซึ่งก่อนที่จะลงมือปฏิบัติงานควรเตรียมอุปกรณ์ อาหารสำหรับเพาะเลี้ยง ห้องย้ายเชื้อ และตู้ย้ายเชื้อ ให้เรียบร้อยเสียก่อน ดังต่อไปนี้

1. **ห้องย้ายเนื้อเยื่อ (Transferred room)** ก่อนที่จะลงมือปฏิบัติงานภายในห้องย้ายเนื้อเยื่อควรทำความสะอาดและฆ่าเชื้อภายในห้องและบริเวณที่จะทำงานเสียก่อน โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลท (UV) อย่างน้อย 30 นาที หรืออาจจะเปิดข้ามคืนก่อนใช้ ข้อควรระวังในขณะที่เปิดหลอดแสงอุลตราไวโอเลทคือ ต้องปิดห้องให้สนิทและห้ามเข้าไปในห้อง เพราะแสงอุลตราไวโอเลทเป็นอันตรายต่อมนุษย์ หลังจากที่ปิดหลอดแสงอุลตราไวโอเลทแล้วต้องทิ้งไว้อย่างน้อย 4 นาที จึงสามารถเข้าทำงานในห้องได้ หากภายในห้องย้ายเนื้อเยื่อมิได้ติดหลอดแสงอุลตาไวโอเลทการทำความสะอาดทำได้โดยใช้น้ำยา Chlorox 10-25% เช็ดบริเวณห้องให้สะอาดก่อนการใช้ห้อง และไม่ควรให้คนเดินเข้าออกพลุกพล่าน หน้าต่างควรปิดมิดชิดป้องกันการปนเปื้อนจากอากาศภายนอก บุคคลที่จะเข้ามาทำงานควรล้างมือด้วยสบู่ก่อน และควรใส่เสื้อคลุมสำหรับห้องปฏิบัติการที่ใช้เฉพาะในห้องย้ายเนื้อเยื่อ

2. **ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Transferred hood)** ตู้สำหรับย้ายเชื้อมี 2 ลักษณะ ด้วยกัน คือ ชนิดที่ไม่มีแผ่นกรองอากาศ และชนิดที่มีแผ่นกรองอากาศ ประสิทธิภาพของตู้ทั้ง 2 ลักษณะแตกต่างกันมาก อย่างไรก็ตามก่อนการปฏิบัติงานทุกครั้งต้องทำความสะอาดภายในตู้ให้เรียบร้อยก่อน ตามขั้นตอนต่อไปนี้

ตู้ที่ไม่มีเครื่องกรองอากาศ ตู้ลักษณะนี้มีประสิทธิภาพต่ำ ขั้นตอนในการทำความสะอาดตู้จึงยุ่งยากกว่า คือ ก่อนใช้ควรอบด้วยโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนตและฟอร์มาลีน (formalin) 40 % ทิ้งไว้ค้างคืน หรือหากมีหลอดแสงอุลตราไวโอเลทภายใตตู้ควรเปิดทิ้งไว้อย่างน้อย $1^{1}/_{2}$-3 ชั่วโมง

หลังจากปิดหลอดแสงอุลตราไวโอเลทแล้วควรทิ้งไว้ 15-20 นาที เพื่อให้ก๊าซโอโซนซึ่งเกิดจากแสงอุตราไวโอเลทสลายตัวไปเสียก่อน หลังจากนั้นควรเช็ดพื้นและบริเวณที่ทำงานด้วย Chlorox หรือ แอลกอฮอล์ 70-95 % และในระหว่างการทำงานควรหมั่นเช็ดพื้นด้วย Chlorox หรือ แอลกอฮอล์เสมอๆ การปฏิบัติงานในตู้ที่ไม่มีเครื่องกรองอากาศไม่ควรปฏิบัติงานติดต่อกันนานหลายชั่วโมงเกินไป เพราะภายในตู้อาจมีการปนเปื้อนจากเชื้อที่ติดไปกับชิ้นส่วนพืช อาหาร หรือมือของผู้ปฏิบัติงานเอง ที่มีการเข้า-ออกจากตู้อยู่ตลอดเวลาที่ทำงาน

ตู้ที่มีเครื่องกรองอากาศ ฆ่าเชื้อภายในตู้ด้วยแสงอุลตราไวโอเลทเช่นเดียวกับตู้ที่ไม่มีกรองอากาศ หลังจากนั้นเปิดให้มีการระบายอากาศเป็นเวลา 10-15 นาที ด้วยความเร็วของลมที่ผ่านแผ่นกรองอากาศ (HEPA filter) ในอัตรา 27 $\pm$ 3 เมตร/นาที ก่อนการทำงาน และควรทำความสะอาดพื้นที่และบริเวณที่ทำงานให้สะอาดด้วย chlorox 10% หรือ แอลกอฮอล์ 70-95% เช่นเดียวกับตู้ที่ไม่มีเครื่องกรองอากาศ

การทำงานภายในตู้ย้ายเนื้อเยื่อก่อนการลงมือปฏิบัติการผู้ปฏิบัติงานควรล้างมือให้สะอาดเสียก่อน ระหว่างการทำงานประตูตู้ควรจะเปิดเป็นช่องเพียงพอที่มือลอดเข้าไปทำงานได้ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจากภายนอก ระหว่างการปฏิบัติงานควรหมั่นทำความสะอาดพื้นที่และบริเวณที่ทำงานด้วยน้ำยา Chlorox หรือ แอลกอฮอล์ 70-95% เสมอๆ นอกจากนี้ควรล้างและทำความสะอาดภายในตู้ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อหรืออย่างน้อยสัปดาห์ละครั้ง

3. การเตรียมอุปกรณ์ อุปกรณ์สำหรับการย้ายเนื้อเยื่อต้องอบหรือนึ่งฆ่าเชื้อเสียก่อนที่จะนำไปใช้ เครื่องมือที่ใช้ภายในตู้ เช่น ปากคีบ (Forcepts) ด้ามมีดผ่าตัด ช้อนตักสารเคมี จานแก้ว (Petri-dish) บีกเกอร์ (Beaker) Filter สำหรับกรองสารละลายหรือสารควบคุมการเจริญเติบโต หลอดฉีดยา (Syringe) ลูกยางสำหรับดูด ควรห่อกระดาษหรือกระดาษอลูมิเนียมก่อนจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ น้ำกลั่น ควรใส่ในขวดปิดฝาให้แน่น นึ่งฆ่าเชื้อพร้อมการเตรียมอาหาร คือ นึ่งที่อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$C ใช้เวลาอย่างน้อย 15 นาที สำหรับ Pipet และกระบอกตวง อาจใช้วิธีการฆ่าเชื้อโดยการอบที่อุณหภูมิ 160-180 $^{\circ}$C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง Pipet ควรใส่ในกล่องอลูมิเนียมหรือกล่องสแตนเลสซึ่งมีฝาปิดมิดชิด ส่วนกระบอกตวงต้องใช้กระดาษตะกั่วปิดปากให้แน่น เครื่องแก้วที่อบแล้วควรทิ้งไว้จนเย็นจึงเอาออกจากตู้ เพื่อป้องกันการแตกและการปนเปื้อนของเครื่องแก้วจากอากาศเย็นภายนอกตู้อบ ตะเกียงแอลกอฮอล์และเครื่องมือเครื่องใช้ทุกอย่างก่อนที่จะนำเข้าไปในตู้ย้ายเนื้อเยื่อควรเช็ดให้สะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70-95% อีกครั้งหนึ่ง

2. น้ำยาทำความสะอาดผิวเชื้อบริเวณผิว

ชิ้นส่วนพืชที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายชนิด ตั้งแต่ ดอก เมล็ด กล้า ตา ลำต้น ใบ ราก ไปจนถึงระดับของ Cell เนื้อเยื่อเหล่านี้มีความแข็ง-อ่อน แตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้ความทนทาน

ต่อความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อย่อมแตกต่างกันไป น้ำยาฆ่าเชื้อที่นิยมใช้กันอยู่ทั่วไป คือ สารละลาย hypochlorite ซึ่งอยู่ในรูปของเกลือ Calcium หรือ Sodium hypocholrite น้ำยาทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน น้ำยา Calcium hypochlorite จะมีอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืชและมีความเสถียร (Stable) น้อยกว่า Sodium hypochlorite ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของสารละลาย Hypochlorite ขึ้นอยู่กับค่า pH ของสารละลาย ที่ pH 6 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี และประสิทธิภาพจะลดลงเมื่อ pH มากกว่า 8 ขึ้นไป อย่างไรก็ตามประสิทธิผลของการฆ่าเชื้อบริเวณผิวขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ คือ ชนิดของชิ้นส่วนพืช ความสกปรกของชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกันไปตามสภาพของชิ้นส่วนพืชและสภาวะแวดล้อม ชนิดและความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ ดังนั้นจึงต้องเลือกวิธีการให้เหมาะสมกับชิ้นส่วนพืชที่นำมาศึกษา

ชนิดของน้ำยาฆ่าเชื้อ (Sterilizing agent) น้ำยาที่ใช้สำหรับการทำความสะอาดบริเวณผิวมีด้วยกันหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแตกต่างกันไป (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติและประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ

ชนิด	ความเข้มข้น	การชะล้าง	ระยะเวลาที่ใช้(นาที)	ประสิทธิภาพ
Calcium hypochlorite	9-10 %	+++	5-30	ดีมาก
Sodium hypochlorite	2 %	+++	5-30	ดีมาก
Hydrogen peroxide	10-12 %	+++++	5-15	ดี
Bromine water	1-2 %	+++	2-10	ดีมาก
Silver nitrate	1 %	+	5-30	ดี
Mercuric chloride	0.1-1 %	+	2-10	พอใช้
Antibiotics	4-50 mg./l	++	30-60	ค่อนข้างดี

สารละลาย Hypochlorite ซึ่งได้แก่ Sodium หรือ Calcium hypochlorite มีประสิทธิภาพดีกว่าสารฆ่าเชื้อชนิดอื่น การใช้สารละลาย Sodium hypochlorite ที่มีความเข้มข้น 0.3-0.6 % ในระยะเวลา 15-30 นาที สามารถฆ่าเชื้อบริเวณผิวของเนื้อเยื่อหลายชนิด

สารละลาย Mercuric chloride ในน้ำหรือ แอลกอฮอล์ 50% สามารถนำมาใช้ฆ่าเชื้อบริเวณผิวของชิ้นส่วนพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ตายอด ของพืชหลายชนิด เป็นต้นว่า Sandalwood ไม้ไผ่

เมล็ดไม้สน ซึ่งในกรณีของเมล็ดไม้สน สารละลาย Mercuric chloride ยังมีประสิทธิภาพในการเร่งเร้าขบวนการ imbibition และการงอกของเมล็ดอีกด้วย การใช้สารละลาย Mercuric chloride ในการฆ่าเชื้อบริเวณผิวของเมล็ดนั้น ประจุของปรอทจะถูกดูดซับไว้ที่เปลือกหุ้มเมล็ด (Seed coad) จึงต้องล้างประจุออก การล้างประจุออกต้องล้างด้วยสารละลาย Potussium chloride สารละลาย Mercuric chloride แม้จะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ดี แต่เป็นสารที่ค่อนข้างจะอันตรายสำหรับมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงควรพยายามหลีกเลี่ยงการใช้สารชนิดนี้ หรือถ้าจำเป็นต้องใช้ควรระมัดระวังในการใช้อย่างมาก สารละลายที่เหลือจากการใช้ต้องเก็บใส่ถังมีฝาปิดแล้วนำไปทำลาย ระวังอย่างเทสารละลายที่เหลือทิ้งในอ่างล้างเครื่องมือโดยตรง เนื่องจากจะก่อให้เกิดมลพิษต่อแหล่งน้ำต่อไป

แอลกอฮอล์ ที่ใช้ในการฆ่าเชื้อมี 2 ชนิด คือ ethyl และ isopropyl วิธีการใช้แอลกอฮอล์ในการฆ่าเชื้อคือ ราดชิ้นส่วนพืชให้ทั่วด้วยแอลกอฮอล์ 70-95 % หรืออาจใช้วิธีจุ่มชิ้นส่วนพืชเป็นระยะเวลาสั้นๆ 1/2-1 นาที ชิ้นส่วนพืชบางชนิดที่มีความแข็ง เช่น เมล็ดไม้ อาจแช่ได้นานถึง 5 นาที แล้ววางทิ้งไว้ในตู้ย้ายเนื้อเยื่อจนแอลกอฮอล์ระเหยไปหมด และหากว่าชิ้นส่วนพืชค่อนข้างแข็ง เช่น กิ่งของไม้เนื้อแข็ง สามารถใช้วิธีจุ่มลงในแอลกอฮอล์แล้วลนไฟจะสามารถฆ่าเชื้อที่ผิวได้ดียิ่งขึ้น

การเตรียมสารน้ำยาฆ่าเชื้อ หลังจากที่ผสมน้ำยาลงในน้ำกลั่นที่ผ่านฆ่าเชื้อแล้ว ควรผสมสารสำหรับลดแรงตึงผิว (Surfactant) ได้แก่ Triton –x Tween-80 หรือน้ำยาล้างจาน ประมาณ 2-3 หยดในสารละลายที่เตรียมไว้ สารลดแรงตึงผิวจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อให้ดียิ่งขึ้น โดยสารลดแรงตึงผิวจะช่วยลดแรงที่จับตัวกันของโมเลกุลน้ำ ทำให้โมเลกุลน้ำกระจายเพิ่มผิวสัมผัสระหว่างโมเลกุลของน้ำและผิวของชิ้นส่วนพืชมีมากขึ้น

3 วิธีการฆ่าเชื้อบริเวณผิว

การฆ่าเชื้อบริเวณผิวของเนื้อเยื่อมีวิธีการแยกเนื้อเยื่อแตกต่างกันไปตามชนิดของเนื้อเยื่อ แต่ขั้นตอนในการฆ่าเชื้อบริเวณผิวสามารถกระทำได้ดังนี้ คือ

1. เตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อบริเวณผิว โดยเลือกชนิดและความเข้มข้นของน้ำยาให้เหมาะสมกับเนื้อเยื่อ การเตรียมน้ำยาควรเตรียมในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ เครื่องมือเครื่องแก้วและน้ำกลั่นที่ใช้ต้องผ่านการฆ่าเชื้อโดยการนึ่งหรืออบมาแล้ว

2. นำเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการฆ่าเชื้อบริเวณผิวใส่ลงไปในน้ำยา จากนั้นเขย่าขวดเพื่อให้น้ำยาฆ่าเชื้อเข้าไปสัมผัสกับเนื้อเยื่อพืชและฆ่าเชื้อโรคที่อยู่บนผิวให้หมดไป สำหรับเวลาในการฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อและความเข้มข้นของน้ำยา

3. ล้างเนื้อเยื่อพืช หลังจากทำการเขย่าฆ่าเชื้อจนครบตามกำหนดเวลาแล้ว นำเนื้อเยื่อพืชมาล้างให้สะอาด โดยการเทน้ำยาทิ้งไป แล้วเทน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปในขวด หรืออาจใช้วิธีย้ายเนื้อเยื่อพืชลงในขวดน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขวดใหม่ เขย่าชิ้นส่วนพืชในน้ำ 1/2 - 1 นาที แล้ว

เปลี่ยนน้ำใหม่ ทำเช่นนี้ประมาณ 2-3 ครั้ง จนกว่าน้ำยาฆ่าเชื้อถูกชะออกไปหมด ทั้งนี้เพราะน้ำยาฆ่าเชื้อที่ยังคงอยู่จะมีพิษต่อเนื้อเยื่อพืช เช่น สารละลาย Hypochlorite จะมีผลต่อการดูดซึมและขบวนการ Metabolism ของกรดอะมิโน

4. ย้ายเนื้อเยื่อที่ล้างเสร็จแล้วลงในจานแก้ว (Petri dish) ซึ่งในจานแก้วมีกระดาษกรองหรือกระดาษซับซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อดูดซับน้ำที่เกาะตามผิวเนื้อเยื่อพืชออก การตัดเนื้อเยื่อที่ชื้นหรือเปียกก่อนการเพาะเลี้ยงในอาหารมักทำให้การติดเชื้อสูงขึ้น เมื่อซับน้ำจนแห้งแล้วจึงย้ายไปจานแก้วใหม่ปิดฝาจานแก้วไว้เพื่อป้องกันเนื้อเยื่อแห้งตายระหว่างการย้าย

5. ย้ายเนื้อเยื่อที่ฆ่าเชื้อบริเวณผิวแล้วลงในอาหารเตรียมไว้

การฆ่าเชื้อบริเวณผิวของเนื้อเยื่อบางชนิดที่ค่อนข้างแข็ง หรือสกปรกมากอาจมีการปฏิบัติต่อเนื้อเยื่อพืชก่อนนำมาฆ่าเชื้อ โดยน้ำยาฆ่าเชื้อ เป็นต้นว่า การแช่ชิ้นส่วนพืชในน้ำไหลเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง หรือแช่ค้างคืนไว้ การจุ่มชิ้นส่วนพืชในแอลกอฮอล์ 70 - 95 % เป็นระยะเวลาสั้นๆ หรือในกรณีที่ชิ้นส่วนค่อนข้างแข็งอาจแช่ทิ้งไว้นาน 1-5 นาที และการแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลาย Cetavlon (Cetrimide, ICA) เป็นระยะเวลาสั้นๆ วิธีการปฏิบัติเช่นนี้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ดียิ่งขึ้น

4. การแยกเนื้อเยื่อ

เนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงมีหลายชนิด เช่น ตา ดอก เมล็ด รวมไปจนถึงเซล และโปรโตพลาสต์ ดังนั้นการแยกเนื้อเยื่อแต่ละชนิดจึงมีวิธีการที่แตกต่างกันออกไป ดังนี้

4.1 การแยกเนื้อเยื่อพืชระดับอวัยวะพืช เช่น ตายอด หรือตาข้าง โดยปกติมักจะตัดกิ่งหรือต้นที่มี Meristem ติดอยู่เป็นท่อนสั้นๆ ลิดใบออกนำไปฆ่าเชื้อบริเวณผิว ในกรณีที่ตามีใบห่อหุ้มอยู่ค่อยๆ ลอกกาบที่หุ้มตาออกทีละชั้นจนถึงชั้นในสุด จึงใช้มีดผ่าตัดที่คมและสะอาดตัดออกเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารต่อไป แต่สำหรับตาที่ไม่มีใบหุ้มอยู่ใช้ใบมีดตัดส่วนก้านใบที่คงเหลืออยู่ และส่วนปลายบน-ล่าง ที่เป็นรอยแผลซึ่งเกิดจากการตัดกิ่งออกทิ้งไปให้หมดแล้วจึงย้ายลงไปเพาะเลี้ยงในอาหาร

4.2 การแยกเนื้อเยื่อพืชระดับเนื้อเยื่อ การเยกส่วนของ Cambium หรือเนื้อเยื่อ Parenchyma จากส่วนลำต้น เนื้อเยื่อ Parenchyma จากหัวพืช มีวิธีการแยกเนื้อเยื่อ โดยการฆ่าเชื้อบริเวณผิวให้สะอาดลอกเปลือกหรือผิวออก จากนั้นใช้มีดผ่าตัด ตัดส่วนที่เหลือออกเป็นชิ้นเล็กๆ หรืออาจใช้ Cork borer แทงเข้าไปตรงกลางตามความยาวของลำต้น หรือหัวพืชเอาเนื้อเยื่อในส่วนข้างในออกมากับ Cork borer จากนั้นใช้มีดตัดส่วนที่เหลือออกเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารต่อไป

4.3 การแยกเนื้อเยื่อจากใบ โดยปกติมักเลือกใบที่มีอายุน้อยหรือใบอ่อนเพราะยังมีเซลที่ active และมีการแบ่งตัวอยู่ นำใบมาฆ่าเชื้อบริเวณผิวให้สะอาดแล้วใช้มีดตัดเอาบริเวณใบและขนาดใบตามที่ต้องการ ย้ายชิ้นส่วนของใบลงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง

4.4 การแยกเนื้อเยื่อพืชที่เป็นไม้เนื้อแข็ง (Hardwood tissue) สำหรับไม้เนื้อแข็งสามารถทนต่อความร้อนได้ การแยกทำความสะอาดสามารถใช้วิธีการจุ่มลงในแอลกอฮอล์ 70% แล้วลนไฟ ในกรณีที่เป็นกิ่งเล็กๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต่ำกว่า 5 มม. ใช้มีดตัดเป็นท่อนเล็กๆ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงอาหารได้ทันที แต่ในกรณีที่เป็นกิ่งใหญ่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 5 มม. และเปลือกหนา ต้องลอกเปลือกออกก่อนจึงค่อยตัดเป็นท่อนเล็กๆ

4.5 การแยกเนื้อเยื่อของราก กรณีการแยกเนื้อเยื่อจากรากที่ปลูกในดินเพราะรากมักจะมีเชื้อราและแบคทีเรียอาศัยอยู่ยากต่อการฆ่าเชื้อให้หมดไป ด้วยเหตุนี้วิธีการแยกเนื้อเยื่อรากจึงนิยมใช้เมล็ดมาเพาะในสภาพปลอดเชื้อเสียก่อน แล้วจึงตัดรากนำไปเพาะเลี้ยงต่อไป และอีกวิธีหนึ่งคือ นำเมล็ดที่ออกรากในสภาพปลอดเชื้อแล้ว มากระตุ้นให้เนื้อเยื่อส่วน Pericycle ของรากแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและพองตัวขึ้น โดยการไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของ 2,4-D ส่วนของรากที่พองตัวขึ้นนี้นำไปตัดให้ได้ขนาดตามต้องการแล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหาร

4.6 การแยกเนื้อเยื่อจากส่วนของดอก (Floral tissue) ส่วนของดอกที่นำมาเพาะเลี้ยงได้แก่ กลีบดอก อับเรณู (Anther) เรณู (Pollen) รังไข่ (Ovary) และไข่ (Ovule) ซึ่งวิธีการแยกเนื้อเยื่อแต่ละส่วนมีวิธีการดังนี้คือ

1. กลีบดอก โดยมากใช้กลีบดอกที่ยังอ่อน วิธีการแยกเนื้อเยื่อจากกลีบดอกจะใช้ดอกที่ยังตูมมาฆ่าเชื้อบริเวณผิวให้สะอาด จากนั้นลอกกลีบหุ้มดอกและกลีบดอกชั้นนอกออกให้หมด นำเอากลีบชั้นในมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ตามขนาดที่ต้องการ แต่ในกรณีที่ใช้ดอกบานแล้วต้องลอกกลีบดอกแต่ละกลีบมาฆ่าเชื้อบริเวณผิวโดยตรง ก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยง

2. **การแยกอับเรณู (Anther)** มักใช้อับเรณูที่ยังอ่อน ซึ่งกำลังมีการแบ่งตัวเป็น 2 หรือ 4 นิวเคลียส (binucliate และ tetrad stage) อับเรณูในระยะนี้เหมาะในการชักนำให้เกิดการแบ่งตัวและพัฒนา วิธีการแยกอับเรณูเช่นเดียวกับการแยกกลีบดอก คือใช้ดอกตูมมาฆ่าเชื้อบริเวณผิว จากนั้นลอกกลีบเลี้ยงและกลีบดอกออกใช้ปากคีบคีบก้านชูอับเรณู (Filament) ออกมาวางในจานเพาะ (Pitri-dish) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้มีดตัดก้านชูอับเรณูออก จากนั้นย้ายอับเรณูไปเพาะเลี้ยงในอาหาร

3. **การแยกเรณู (Pallen)** โดยปกติเรณูจะเจริญไปทำหน้าที่สืบพันธุ์แต่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้องใช้วิธีการปฏิบัติต่อเรณูให้เจริญแบบเซลปกติ ซึ่งวิธีการมีดังนี้ คือ

3.1 วิธีของ Sax ใช้อับเรณูหรือเรณูที่เริ่มมีการแบ่งตัวครั้งแรกมาช็อคด้วยอุณหภูมิโดยนำไปใส่ในตู้ที่อุณหภูมิ 3-5 $^{\circ}$C

3.2 วิธีของ Jansen ใช้การปฏิบัติต่อเรณูโดยใช้การเปลี่ยนแปลงของแรงดึงดูดโลก ซึ่งวิธีการนำเอาดอกที่เรณูอยู่ในระยะแบ่งเซลครั้งแรกไปใส่ในเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 500 g อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนที่จะตัดแยกอับเรณูและเรณูออก

3.3 วิธีของ Debergh และ Nitsch วิธีการนี้ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิด เช่น Auxin เข้าไปกระตุ้น โดยนำเรณูที่ผ่านการฆ่าเชื้อบริเวณผิวแล้วมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี Auxin ผสมอยู่

3.4 วิธีการใช้ Colchicine สาร Colchicine เป็นสารที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชุดของ Chromosome เป็น 2 เท่า ซึ่งมีจำนวนเท่า Cell ปกติ การนำเอาอับเรณูมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสาร Cochicine 0.05% และสาร Dimethyle sulfoxide 2% ผสมอยู่เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 4-12 ชั่วโมง จากนั้นนำอับเรณูมาล้างให้สะอาดตัดเอาเฉพาะเรณูออกไปเลี้ยงต่อไป

4. การแยกรังไข่ (Ovary) และไข่ (Ovule) วิธีการทำเช่นเดียวกับการแยกอับเรณูและเรณู คือ นำดอกตูมมาฆ่าเชื้อบริเวณผิวให้สะอาดแล้วลอกกลีบเลี้ยง กลีบดอกออก ตัดเฉพาะรังไข่มาเพาะเลี้ยงในอาหาร และสำหรับการแยกไข่ ทำโดยการใช้มีดผ่ารังไข่ออกแยกเฉพาะไข่ออกมาเพาะเลี้ยงต่อไป

5. การแยกต้นอ่อน (Embryo) ต้นอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ คือ ต้นอ่อนที่ไม่มีเนื้อเยื่อสะสมอาหาร หรือมีเนื้อเยื่อสะสมอาหารน้อย และต้นอ่อนที่มีเนื้อเยื่อสะสมอาหารมาก การแยกต้นอ่อนทั้ง 2 ลักษณะ ต้องทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวให้สะอาดเสียก่อน ในกรณีที่ต้นอ่อนไม่มีเนื้อเยื่อสะสมอาหารหรือมีน้อยจะใช้ทั้งเมล็ดไปเพาะเลี้ยงในอาหารได้ทันที แต่กรณีที่ต้นอ่อนมีเนื้อเยื่อสะสมอาหารมากต้องตัดเมล็ดนำเอาเฉพาะต้นอ่อนออกมาเพาะเลี้ยง

6. การแยกเนื้อเยื่อ Endosperm วิธีการแยกเช่นเดียวกับการแยกไข่ แต่ตัดเอาส่วนของ Endosperm มาเพาะเลี้ยงแทน

4.7 การแยกเนื้อเยื่อระดับ Cell

1. การแยกเซลล์เดียว (Single cell isolation) เซลล์เดียวที่นำมาเพาะเลี้ยงสามารถแยกได้จาก เนื้อเยื่อพืชสด และจาก Callus

1.1 การแยกเซลล์เดียวจากเนื้อเยื่อสด ชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาแยกเซลล์เดี่ยว ต้องผ่านการฆ่าเชื้อบริเวณผิวให้สะอาดเสียก่อน จากนั้นนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วจึงนำไปแยกเซลล์โดยวิธีกล (Mechanical method) หรือวิธีย่อยด้วย Enzyme (Enzymatic method)

การแยกด้วยวิธีกล นำเอาชิ้นส่วนพืชที่หั่นแล้วมาบดให้ละเอียด จากนั้นนำไปใส่เครื่อง Centrifuge เหวี่ยงด้วยความเร็ว 500-1000 g ทำให้เนื้อเยื่อแยกออกเป็นชิ้นๆ ตามขนาดและ

น้ำหนักของเนื้อเยื่อ ส่วนของ cell ซึ่งมีขนาดเล็กและเบาจะอยู่ชั้นบนสุด ใช้ Pipet ดูดออกมา แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อให้สะอาดก่อนนำไปเลี้ยง

การย่อยด้วย Enzyme นำเนื้อเยื่อที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ไปแช่ในสารละลาย Enzyme พวก Pectinase ที่ปราศจากเชื้อ โดยการกรองด้วย Filter membrane ขนาด 0.45 μmm. Enzyme จะช่วยทำหน้าที่ย่อยสลายรอยเชื่อมต่อระหว่าง Cell ทำให้ Cell หลุดออกมาเป็น Cell เดี่ยว นำเอาสารละลายและ Enzyme ไปทำให้ตกตะกอนโดยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 500 g เป็นเวลา 2-3 นาที จากนั้นใช้ Pipet ดูดเอาส่วนที่เป็นเศษของเนื้อเยื่อและสารละลาย Enzyme ออก ใส่น้ำกลั่นที่สะอาดหรืออาหารลงไปล้างเซลล์เดี่ยวๆ ให้ปราศจาก Enzyme โดยเมื่อเปลี่ยนน้ำหรืออาหารแล้วทำให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง Centrifuge 2-3 ครั้ง ติดต่อกัน จึงย้ายเซลเดี่ยวลงไปเพาะเลี้ยงในอาหารได้

2. **การแยกเซลเดี่ยวจาก Callus** วิธีการแยกทำได้ 2 วิธี คือ

โดยวิธีกล นำก้อน Callus ไปเลี้ยงในอาหารเหลว วางบนเครื่องเขย่า (Shaker) ด้วยความเร็ว 100-160 รอบต่อนาที Callus จะแตกออกเป็นเซลแขวนลอย (Cells suspension) นำเซลแขวนลอยไปกรองเอาเซลที่มีขนาดใหญ่และเซลที่เกาะกันออก ก็จะได้เฉพาะเซลเดี่ยวแขวนลอยอยู่ในอาหารซึ่งนำไปเลี้ยงต่อไปได้

วิธีย่อยด้วย Enzyme วิธีการทำเช่นเดียวกับการแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อสด

4.8 การแยกเนื้อเยื่อระดับ Protoplast

การแยก Protoplast มีอยู่ 2 วิธีคือ การแยกโดยวิธีกลและแยกโดยใช้ Enzyme

การแยกโดยวิธีกล นำเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการแยกโปรโตพลาสต์ไปใส่ในสารละลายน้ำตาลหรือเกลือแคลเซียม หรือโปตัสเซียม ซึ่งมีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นภายในเซล เพื่อทำให้เกิดขบวนการ Plasmolysis ซึ่ง Protoplast จะหดตัวออกจากผนัง cell จากนั้นใช้มีดที่คมตัดเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อตัดผนัง cell ออก แล้วใช้เข็มแก้ว (Glass needle) เขี่ย Protoplast ออกจาก cell โดยทำภายใต้กล้องจุลทัศน์ หรืออีกวิธีหนึ่งโดยการย้ายเนื้อเยื่อในสารละลายน้ำตาล หรือเกลือแคลเซียม หรือโปตัสเซียม ที่มีความเข้มข้นต่ำ ทำให้เกิดขบวนการ Osmosis ซึ่งมีการดูดนำเข้าเซลทำให้เซลพองตัวใหญ่ ผนังเซลฉีกขาด จากนั้นนำเอาสารละลายที่มี Protoplast และผนังเซลที่แขวนลอยอยู่ไปกรองด้วยผ้ากรองหรือตะแกรงขนาด 100 - 500 μm ตามขนาด Protoplast ของพืชแต่ละชนิด นำสารละลายที่ผ่านการกรองไปทำให้ตกตะกอนเพื่อแยก Protoplast ออกมาโดยใช้เครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วประมาณ 100 g ดูดสารละลายทิ้ง Protoplast ที่ตกตะกอนนำไปเพาะเลี้ยงได้ทันที

การแยกโดยใช้ enzyme วิธีการทำเช่นเดียวกับการแยกเซลเดี่ยวแต่ enzyme ที่ใช้คือ cellulase ซึ่งทำหน้าที่ย่อยผนังเซลอีกที่หนึ่ง

3. การเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ (Innoculation)

เนื้อเยื่อที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วควรย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เตรียมไว้ทันที เนื้อเยื่อที่ย้ายลงในอาหารแล้วนำไปไว้ในห้องเพาะเลี้ยง (Culture room) ซึ่งมีการควบคุมสภาพแวดล้อม ได้แก่ แสง อุณหภูมิ และความชื้นให้เหมาะสมกับพืช เพื่อให้พืชเจริญและพัฒนาเป็นกล้าไม้ที่สมบูรณ์ต่อไป

การเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อ

เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมที่จะเจริญเป็นพืชต้นใหม่ (Plantlet) มีรูปแบบการเจริญและพัฒนาดังต่อไปนี้

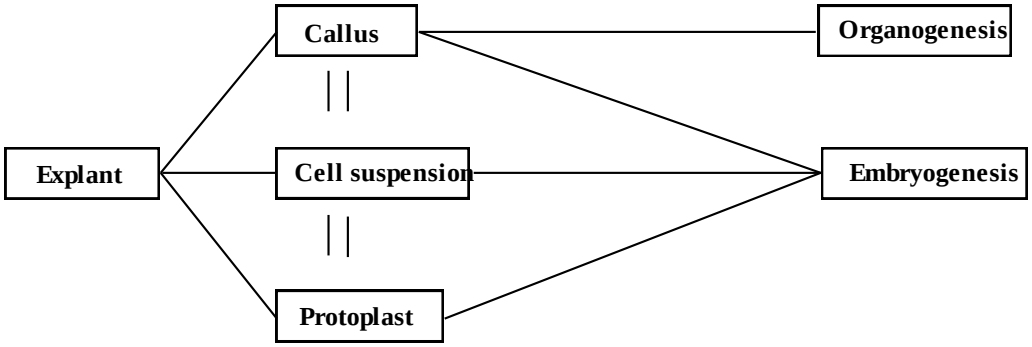
1. การยืดตัวของเนื้อเยื่อเจริญ (Meristem - tip elongation) ตายอดและตาข้างของพืชประกอบด้วย Apical meristem และ Lateral meristem ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเจริญ เมื่อนำตายอดและตาข้างไปเพาะเลี้ยงในอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจะยืดตัวออกและมีการพัฒนารากได้พืชต้นใหม่เกิดขึ้น วิธีการนี้เหมาะสำหรับผลิตต้นพืชที่ปราศจากโรค

2 การเกิดยอดกระยุก (Axilary shoot proliferation) ตาข้างซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญ (Lateral meristem) จะถูกกระตุ้นให้เกิดยอด (axillary shoot) จำนวนมากมาย ในขณะที่ตายอดถูกยับยั้ง การเกิดยอดมีจำนวนมากและสามารถขยายได้อย่างรวดเร็ว การเพิ่มจำนวนยอดให้มากขึ้นต้องทำการตัดขยายไปเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่

3. การเกิดจุดกำเนิดยอด (Adventitious shoot initiation) เนื้อเยื่อพืชในระดับอวัยวะพืช (Organ) เช่น ราก ลำต้น ใบ เมื่อเลี้ยงในอาหารและสภาพที่เหมาะสมสามารถที่ชักนำให้เกิดเป็นยอดได้โดยตรง หรืออาจเกิดเป็นแคลลัสก่อนจากนั้นจึงมียอดเกิดขึ้น

4. การเกิด Organogenesis คือ การพัฒนาของ Callus ไปเป็นยอด ราก หรืออัวยวะอื่น เกิดจากการรวมตัวของกลุ่ม Parenchyma cell ซึ่งอยู่ใกล้กัน มีการเปลี่ยนแปลงเป็น Meristematic cell ซึ่งเป็น cell ขนาดเล็ก Vacuole เล็ก และ Cytoplasm เข้มข้น มีอัตราในการแบ่งตัวสูง กลุ่มเซลเหล่านี้เรียกว่า "Meristemoids" ซึ่งจะเจริญไปเป็นจุดเริ่มต้นของยอดหรือราก (shoot/root primodia) การเกิดยอด ราก หรืออวัยวะอื่น เกิดขึ้นเป็นอิสระต่อกัน ขึ้นอยู่กับสิ่งกระตุ้นที่เนื้อเยื่อหรือ cell ได้รับ

5. การเกิด Embryoglnesis คือ การพัฒนาของ Callus ไปเป็นคัภพะ (Embryo) เรียกว่า Embryoids หรือ Somatic embryos โดย cell มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเหมือนการพัฒนาของไข่ (ovule) หลังจากที่ได้รับการผสมแล้วในพืชปกติ



ภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนพืช แคลลัส เซลแขวนลอย และโปรโตพลาสต์ ซึ่งมีความสามารถในการพัฒนาในการเกิดเป็นต้นใหม่

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ (Sub-culture) เนื่องจากเนื้อเยื่อมีการพัฒนาเพิ่มจำนวน จึงต้องมีการตัดแบ่งเนื้อเยื่อพืชไปสู่อาหารขวดใหม่ เพื่อช่วยลดการแก่งแย่งอาหารและพื้นที่ของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังช่วยให้การเจริญเติบโตดีขึ้นอีกด้วย

4. การย้ายชำ (Transferation)

การย้ายชำเป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก วัตถุประสงค์หลักของงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ การผลิตกล้าไม้ ดังนั้นหากความสำเร็จในการผลิตกล้าได้ในระดับห้องปฏิบัติการแต่ไม่สามารถย้ายชำออกมาปลูกได้ก็นับว่าเป็นความล้มเหลวได้เช่นกัน โดยทั่วไปการย้ายชำเนื้อเยื่อพืชมี 3 ลักษณะด้วยกันคือ กล้าไม้ที่สมบูรณ์ (Plantlets) ยอด (Propagules) และคัภพะ (Embryoids) วิธีการย้ายเนื้อเยื่อพืชเหล่านี้จึงแตกต่างกันไป คือ

4.1 การย้ายกล้าที่สมบูรณ์ (Plantlets) สามารถย้ายได้โดยตรงจากขวดในห้องปฏิบัติการไปสู่เรือนเพาะชำ โดยนำกล้าออกจากขวดล้างอาหารและวุ้นให้สะอาดด้วยน้ำ 2-3 ครั้งจน จากนั้นนำกล้าแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อรา แล้วจึงย้ายปลูกในวัสดุเพาะชำซึ่งผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว วัสดุเพาะชำที่ใช้กันอยู่ทั่วไปมีหลายชนิด เช่น Vermiculite ทราย ดินผสมทรายและขี้เถ้าแกลบ ในอัตราส่วน 1:1:1 ขุยมะพร้าว หลังจากย้ายชำเสร็จนำไปไว้ในเรือนเพาะชำซึ่งควบคุมความชื้น อุณหภูมิ และแสงสว่าง ในระยะแรกที่พืชกำลังปรับตัว ความชื้นและแสงสว่างเป็นปัจจัยที่สำคัญมาก ในช่วงแรกของการย้ายชำกล้าต้องการความชื้นค่อนข้างสูง ความชื้นสัมพัทธ์ 80-90% ในขณะที่ปริมาณแสงสว่างน้อยเพียง 10-20% หลังจากกล้าปรับตัวได้แล้วจึงค่อยๆ ลดความชื้นและเพิ่มแสงสว่างไปเรื่อยๆ เช่นเดียวกับกล้าในเรือนเพาะชำทั่วไป

4.2 การย้ายยอด (Propagules) สามารถย้ายได้ 2 วิธี วิธีแรกคือ ย้ายลงอาหารที่ชักนำรากในห้องปฏิบัติการก่อน เมื่อเกิดรากแล้วจึงย้ายยอดไปชำในวัสดุเพาะ วิธีที่ 2 คือ ย้ายยอดไปชำในวัสดุเพาะโดยตรง การย้ายยอดทั้ง 2 วิธีลงวัสดุเพาะมีวิธีการปฏิบัติเช่นเดียวกับการย้ายกล้าที่สมบูรณ์

4.3 การย้ายคัภพะ (Embryoids) ส่วนใหญ่การย้ายคัภพะมักย้ายลงในอาหารสำหรับให้คัภพะนั้นงอกเป็นกล้าเสียก่อน แล้วจึงย้ายลงในวัสดุเพาะชำอีกครั้งหนึ่ง

การย้ายชำกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลงวัสดุเพาะมักประสบปัญหามากมาย เนื่องจากพืชไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ได้ทัน อัตราการตายสูง ทั้งนี้มีปัจจัยมาจากกล้าไม้และสภาพแวดล้อม คือ ขนาดของเนื้อเยื่อมีผลต่ออัตราการย้ายชำ กล้ามีขนาดเล็กและไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถทนกับสภาพแวดล้อมภายนอกได้ก็จะตายไปในที่สุด สภาพแวดล้อม เช่น ความชื้น อุณหภูมิ และแสงเป็นปัจจัยสำคัญยิ่งในการย้ายชำ ความชิ้นที่แตกต่างกันอย่างมากระหว่างสภาพที่อยู่ในขวดและในเรือนเพาะชำ มีผลต่อการปรับตัวของพืชเนื้อเยื่อพืชที่อยู่ในขวดมีความชื้นค่อนข้างสูง เมื่อย้ายปลูกในเรือนเพาะชำที่มีความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศค่อนข้างต่ำ ทำให้เนื้อเยื่อแห้งตาย ประกอบกับการเคลื่อนย้ายของธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตหยุดชะงักลงเพราะระบบรากถูกกระทบกระเทือนระหว่างการย้ายชำ นอกจากนี้แสงสว่างที่จัดเกินไปมีผลต่อการสังเคราะห์แสงและคายน้ำของพืช เมื่อระบบการขนส่งน้ำและแร่ธาตุไม่ดีทำให้ความสมดุลย์ของการใช้น้ำและแร่ธาตุเสียไป พืชจึงแห้งตายไปในที่สุด ดังนั้นในการย้ายชำในระยะแรกจึงควรจัดสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับพืช กล่าวคือ ควรจัดให้มีความชื้นค่อนข้างสูง ประมาณ 80-90% ในขณะที่ความเข้มของแสงค่อนข้างต่ำเพียง 10-20 % จากนั้นจึงค่อยๆ ลดความชื้นลงพร้อมกับเพิ่มความเข้มของแสงขึ้นจนเข้าสู่ภาวะปกติของพืชโดยทั่วไป ปัญหาที่สำคัญอีกอย่างที่มีผลต่อการรอดตายของเนื้อเยื่อพืช คือ โรค ในสภาวะที่ร้อนและชื้นมักเป็นสาเหตุให้เชื้อราแพร่กระจายได้ดีขึ้น โดยเฉพาะเชื้อที่ทำให้เกิดโรคเน่าคอดิน (Damping off) ซึ่งเป็นโรคที่พบทั่วไปในการย้ายชำ ดังนั้นจึงควรป้องกันการแพร่กระจายของโรคโดยการใช้ยาฆ่าเชื้อราผสมน้ำรดกล้าที่ย้ายชำแล้วเป็นระยะๆ

การประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่า

(Application of Tissue Culture Technology to Forest Tree Improvement)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการปรับปรุงพันธุ์ (Tissue Culture and Tree Improvement)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศวิธีการหนึ่ง โดยปกติแล้วมีวัตถุประสงค์เพื่อการขยายพันธุ์พืชที่ได้คัดเลือกแล้วเพื่อให้ได้ปริมาณมาก ทั้งยังช่วยแก้ปัญหาการขาดแคลนเมล็ดอีกด้วย พืชบางชนิดให้ผลผลิตเมล็ดไม่เพียงพอและยังไม่ให้ผลผลิตเมล็ดทุกปี แต่ความต้องการเมล็ดเพื่อการขยายพันธุ์นั้นมีอยู่ทุกปี ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นวิธีการขยายพันธุ์วิธีการหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหานี้ได้ หลักการของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็คือการนำเอาชิ้นส่วนของพืชที่ยังมีชีวิตอยู่ (Explants) อันได้แก่ ส่วนต่างๆของพืช นับตั้งแต่เนื้อเยื่อ (tissue) เซลเดี่ยว (single cell) คัพภะ (Embryo) รวมทั้งส่วนอื่นๆ อีก เช่น anther megagametophyte endosperm และ cotyledon มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อและมีการควบคุมสภาวะแวดล้อมของห้องเพาะหรือปฏิบัติการ (*In Vitro* Culture) เพื่อชักนำให้ชิ้นส่วนของพืชนั้นๆ พัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไป ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในงานด้านป่าไม้กันอย่างกว้างขวาง ไม้ป่าบางชนิดสามารถทำการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้สำเร็จ แต่บางชนิดก็ยังอยู่ในระหว่างการค้นคว้าวิจัยอยู่ นอกจากการขยายพันธุ์แล้วเทคโนโลยีด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในปัจจุบันมีความก้าวหน้ามากซึ่งยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชได้อีกด้วย ตัวอย่างเช่น การเลี้ยงเซลในสภาพแขวนลอย (Cell suspension) สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ เช่น การชักนำให้เกิดการถ่ายเทของไซโตพลาสซึ่มระหว่างเซล (parasexual hybridization) การเกิดการผ่าเหล่า (mutation) หรือความผันแปรทางสายพันธุ์ (somaclonal variation) ตลอดจนการชักนำเอา organelle หรือ DNA เข้าสู่เซลล์พืชที่เลี้ยง นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของเซลพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว ทำให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ (homozygous lines) ซึ่งล้วนแต่มีประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ทั้งสิ้น อย่างไรก็ดีจะขอกล่าวถึงการใช้ประโยชน์ของเทคโนโลยีเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชเพียงบางประการดังต่อไปนี้

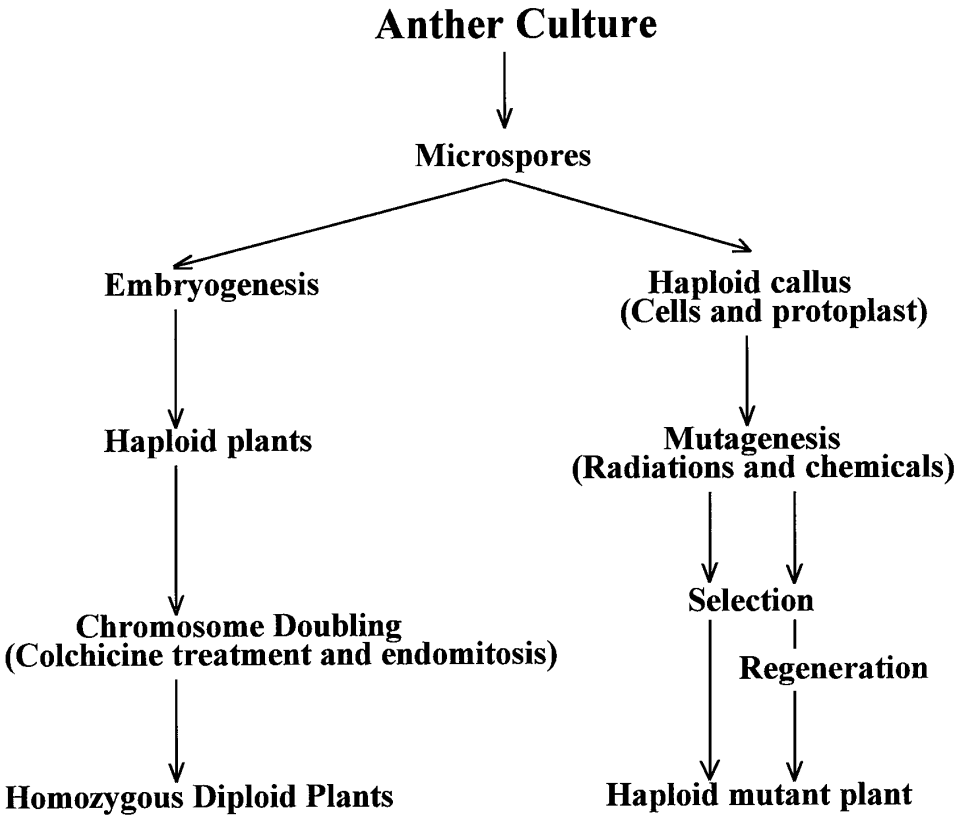
ความผันแปรในสายพันธุ์อันเกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Somaclonal Variation)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นนอกจากจะทำให้เกิดพืชที่มีลักษณะทางสายพันธุ์เดียวกันเป็นจำนวนมากแล้ว ในบางโอกาสก็ทำให้เกิดลักษณะที่แตกต่างกันขึ้นได้ในระหว่างการพัฒนาการของเซลที่เพาะเลี้ยงนั้น ปัจจัยที่ทำให้เกิดความผันแปรนี้ก็เนื่องมาจาก cytoplasmic หรือ nuclear mutation การเกิดพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด (polyploidy) หรือ โครโมโซมผิดปกติ (chromosome abnormalities)

ตลอดจนการเคลื่อนย้ายของอนุภาคในไซโตพลาสซั่ม (transposable element) ไม่สมดุลย์กันในระหว่างการแบ่งเซล อย่างไรก็ดีการเกิด somaclonal variation นับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในด้านการศึกษาทางด้านความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) และมีประโยชน์มากในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช เนื่องจากการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมทำให้มีโอกาสคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ เช่น ความต้านทานโรค ความต้านทานยาฆ่าแมลง และการทนทานต่อความแห้งแล้งของพืช ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้อาจไม่มีอยู่ในพืชที่กำลังทำการศึกษาหรือทำการขยายพันธุ์อยู่ ดังนั้นการเกิด somaclonal variation จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เปิดโอกาสให้การปรับปรุงพันธุ์พืชประสบผลยิ่งขึ้น

การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว (Use of Haploid Tissue Culture)

การเกิดพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว (haploid) ในพืชยืนต้น (woody plant) นั้นอาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติได้ในบางโอกาส แต่ไม่เกิดขึ้นเป็นปกติเหมือนในพืชล้มลุก (herbaceous) ในการผสมพันธุ์เพื่อให้ได้ลักษณะที่มีโครโมโซมที่เหมือนกันทั้งสองชุด หรือลักษณะของสายพันธุ์บริสุทธิ์ (homozygous หรือ pure line) นั้นค่อนข้างจะยุ่งยาก และต้องปฏิบัติหลายขั้นตอนรวมทั้งต้องใช้เวลาหลายช่วงอายุ (generation) ในการผสมพันธุ์ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชที่เซลมีโครโมโซมชุดเดียวจากอวัยวะของพืชที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เช่น megagametophyte อับเรณู (anther) ละอองเรณู (pollen grain) เพื่อให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์จะทำได้ง่ายกว่าและมีประโยชน์ในการปรับพันธุ์พืชมาก การใช้สารเคมีจำพวก Colchicine ช่วยทำให้พืชมีโครโมโซม 2 ชุดที่เหมือนกัน (dihaploid) สามารถนำไปผสมกับสายพันธุ์อื่นๆ ต่อไปได้ ทำให้ง่ายต่อการจัดการและย่นระยะเวลาในด้านการผสมพันธุ์ (breeding) เพื่อการปรับปรุงพันธุ์



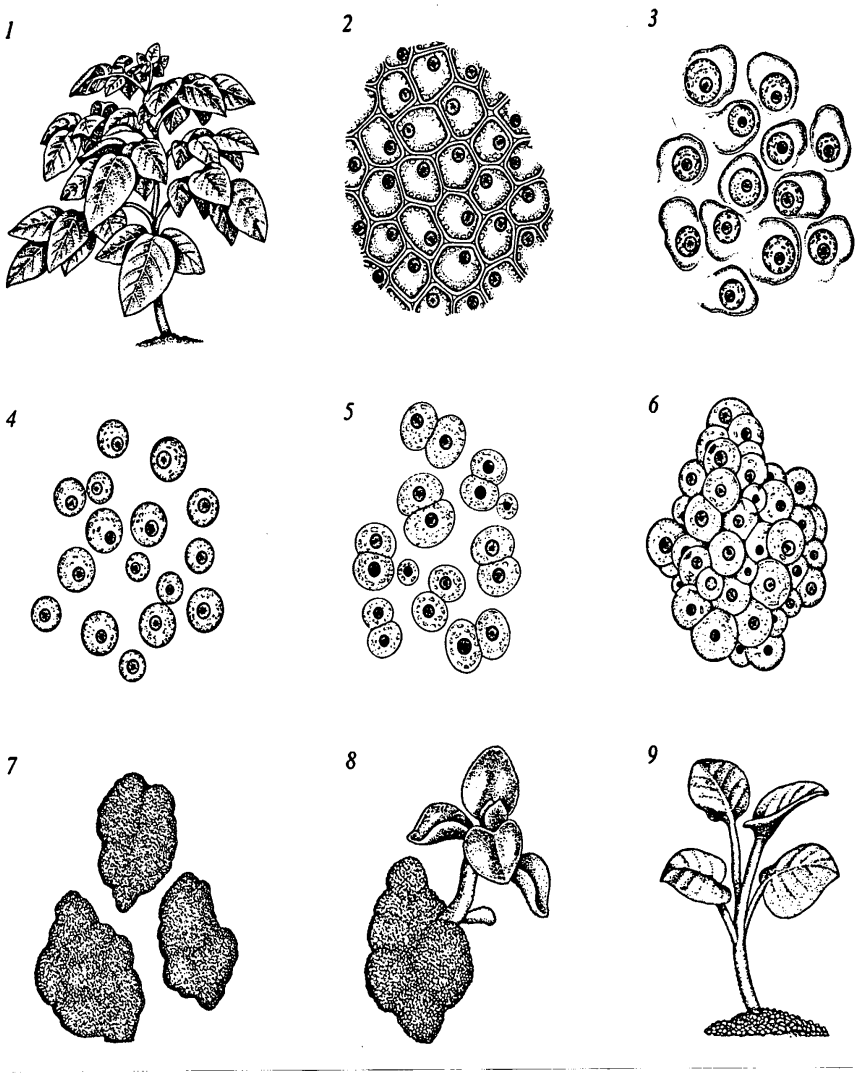
ภาพที่ 13 การชักนำให้เกิดพืช Homozygous diploid และ Haploid mutant โดยการเพาะเลี้ยงจากอับเรณู (Anther culture) (Reinert and Bajaj. 1977)

การเพาะเลี้ยงเซลในสภาพแขวนลอย (Cell Suspension)

การเพาะเลี้ยงเซลในสภาพแขวนลอยเป็นผลต่อเนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือแคลลัส แต่การเพาะเลี้ยงเซลโดยวิธีการนี้จะดีกว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพราะจะมีการพัฒนาการไปเป็นต้นอ่อนจากแต่ละเซล (individual cell) การเลี้ยงเซลในอาหารเหลวทำให้อาหารแพร่กระจายอยู่ทั่วทั้ง medium ซึ่งทำให้เซลนำไปใช้ได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังเปิดโอกาสให้ทำการคัดเลือกเซล (*In Vitro* selection) เพื่อให้ได้สายพันธุ์ (genotype) ที่มีลักษณะต่างๆ ที่ต้องการเช่น มีความต้านทานโรค ความทนทานต่อสภาพของความเค็ม ยาฆ่าแมลง หรือ ยาฆ่าวัชชพืชได้ และยังสามารถขยายพันธุ์ได้ง่าย ใช้เวลาสั้นกว่าการคัดเลือกและการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาส (Use of Protoplast)

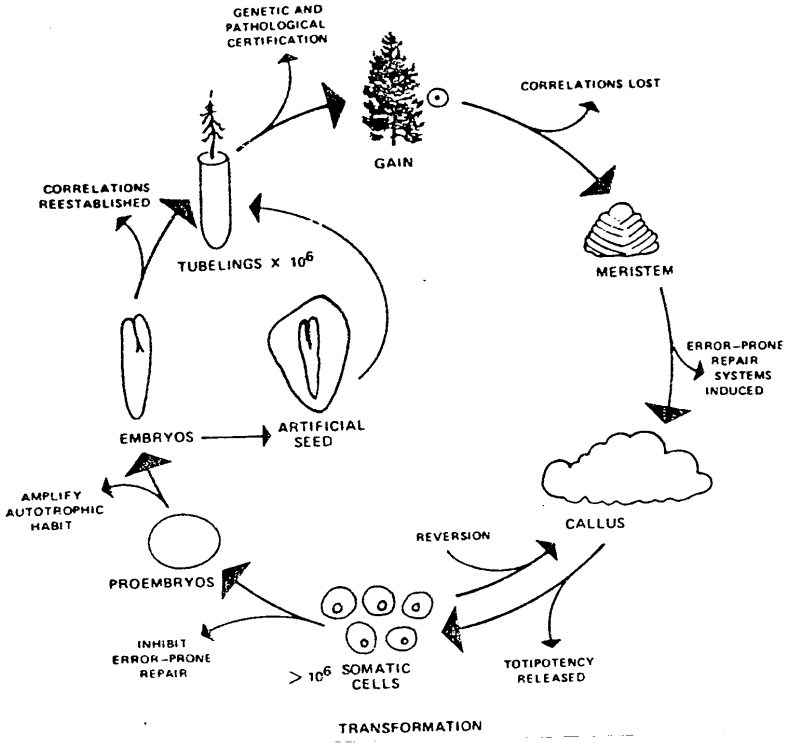
โปรโตพลาสก็คือเซลของพืชที่ได้เอาส่วนของผนังเซล (Cell wall) ออกไปโดยใช้เอนไซม์ช่วยย่อยสลาย คงเหลืออยู่แต่ส่วนของนิวเคลียส (nucleus) ไซโตพลาสซึ่ม (cytoplasm) แวคคิโอล (vacuole) และอนุภาคต่างๆ (organelles) ที่ห่อหุ้มด้วยผนังบาง (semipermeable membrane) ซึ่งยอมให้อนุภาคหรือของเหลวบางอย่างผ่านได้ เมื่อผนังเซลได้ถูกกำจัดออกไปแล้วก็ทำให้สะดวกในการเพาะเลี้ยงเซล โดยเฉพาะในสภาพแขวนลอย (cell suspension) ทำให้เกิดการแบ่งเซลและเพิ่มจำนวนเซลขึ้นมาอีกมากมาย มีการสร้างผนังเซลขึ้นมาใหม่และพัฒนาต่อไปเป็นต้นพืชได้ (ภาพที่ 14) ประโยชน์ที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสก็คือ การที่เซลไม่มีผนังเซลทำให้สะดวกในการชักนำสิ่งต่างๆ เช่น Virus เข้าสู่เซลเพื่อการศึกษาทางด้านโรคพืช หรือทำให้ดูดซับ DNA โปรตีน และอนุภาคต่างๆ (organelles) เข้าสู่เซลได้ง่าย การชักนำให้เกิดการผสมกันของโปรโตพลาส (protoplast fussion) ที่มาจากต่างสายพันธุ์ ทำให้เกิดการรวมตัวกันของนิวเคลียสซึ่งเรียกว่า Somatic or Parasexual hybridization ทำให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ และสามารถทำการเพาะเลี้ยงให้เพิ่มจำนวนและพัฒนาไปเป็นต้นพืชต่อไปได้ จากวิธีการนี้ทำให้สามารถไปประยุกต์ใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ ซึ่งความเป็นไปได้ในการนำเอาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชนั้นได้ประสบความสำเร็จกับพืชหลายชนิดทั้งพืชเกษตรและพืชป่า เช่น ยาสูบ (Tobacco) กระถินยักษ์ (*Leucaena leucocephala*) *Pinus contorta Pinus excelsa Populus tremula* และ *Pseudotsuga menziesii* เป็นต้น



ภาพที่ 14 การขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (Protoplast Culture) 1) ต้นพืช 2) การใช้เอ็นไซม์ย่อยผนังเซลของใบอ่อน 3) ใช้สารเคมีช่วยเร่งให้โปรโตพลาสต์หลุดออกจากผนังเซล 4) โปรโตพลาสต์ 5) การพัฒนาของเซล มีการสร้างผนังเซลขึ้นใหม่และมีการแบ่งเซล 6) การเกิดแคลลัส 7) ย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมชนิดใหม่เพื่อให้แคลลัสเจริญเต็มที่ (Subculture) 8) เกิดยอด (A primordial shoot) 9) เจริญเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ และย้ายปลูก (Shepard, 1982)

เมล็ดเทียม (Artificial Seed)

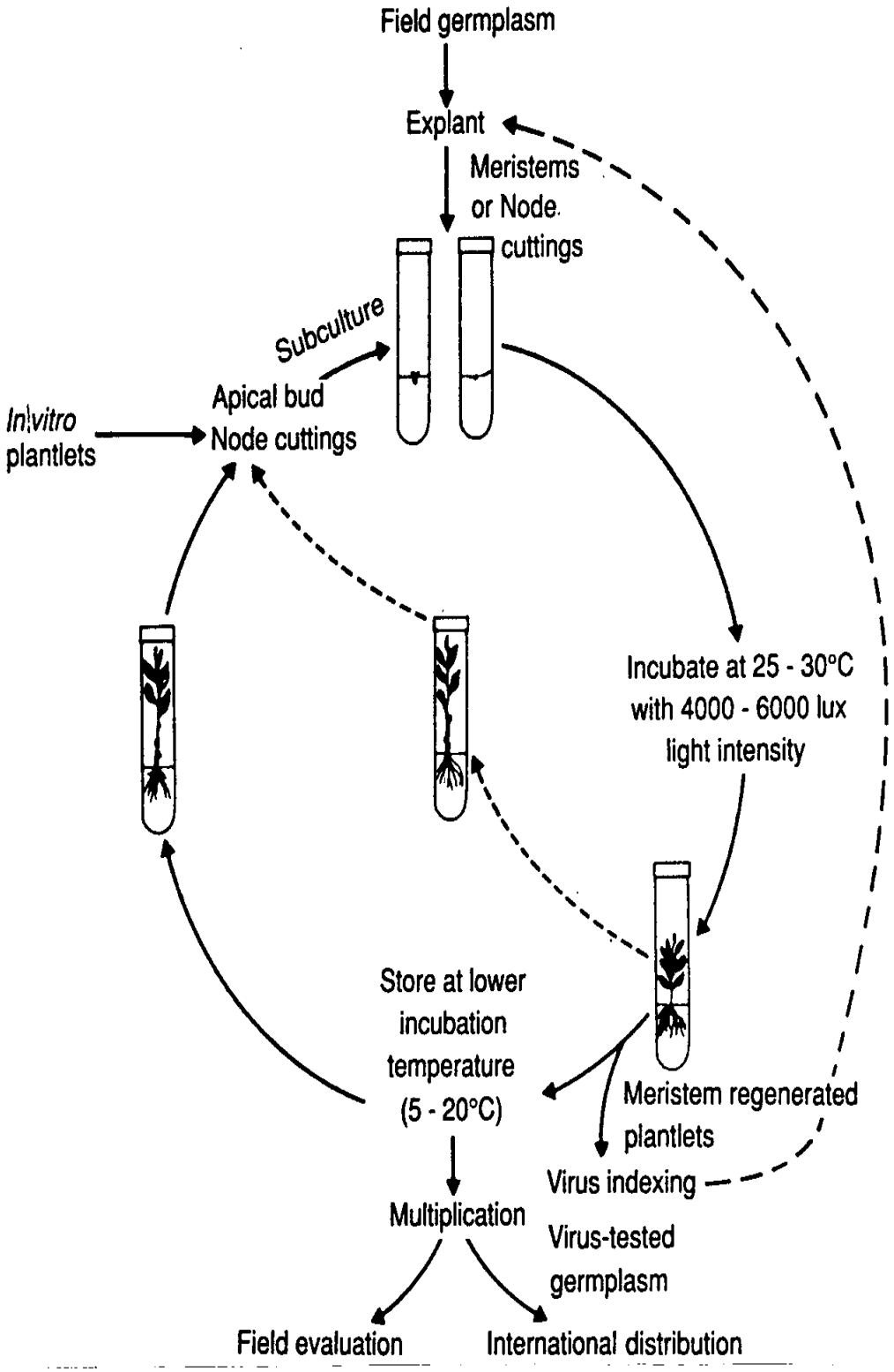
ปัญหาจากผลผลิตเมล็ดซึ่งไม่สามารถจะคาดคะเนได้หรือไม่มีเมล็ดเพียงพอเพื่อใช้ในการเพาะกล้าไม้ ส่งผลให้มีการศึกษาและพัฒนาการผลิตเมล็ดเทียม (artificial seed) ขึ้นเพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนเมล็ด การผลิตเมล็ดเทียมก็มีผลจากการใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการนำเอาส่วนของพืช เช่น นื้อเยื่อเจริญ (meristem) หรือ ส่วนอื่นๆ (explants)จากต้นแม่ที่ได้คัดเลือกหรือปรับปรุงพันธุ์แล้วมาเพาะเลี้ยงในอาหารและชักนำให้เกิด Callus จากนั้น Callus ก็จะพัฒนาต่อไปเป็นเซล คัดขนาดของเซลให้มีขนาดใกล้เคียงกัน แล้วก็นำไปเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม เซลก็จะพัฒนาต่อไปเป็นคัพภะ (Proembryo-like) จากคัพภะที่ได้ก็จะถูกนำไปเคลือบด้วยวัสดุที่เหมาะสมเพื่อป้องกันคัพภะจากสิ่งภายนอก ซึ่งจะทำให้มีลักษณะคล้ายเมล็ด (ภาพที่ 15) เมล็ดเทียมนี้สามารถนำไปเพาะให้เจริญเป็นกล้าไม้ต่อไปเหมือนเมล็ดพืชได้ หรือจะทำการเก็บรักษาไว้ใช้ในเวลาที่ต้องการได้ ในอนาคตก็คาดหวังว่าโปรโตพลาสก็จะสามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็น Proembryo ได้ ก็จะทำให้ผลิตเมล็ดเทียมได้อย่างมากมายซึ่งก็นับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง



ภาพที่ 15 การเตรียมเมล็ดเทียม (Artificial Seed) ในพืชตระกูล Conifer (Durzan, 1985)

การเก็บรักษาเยอมพลาสซั่มโดยการชลอการเจริญเติบโต (Reduced-Growth Storage of Germplasm)

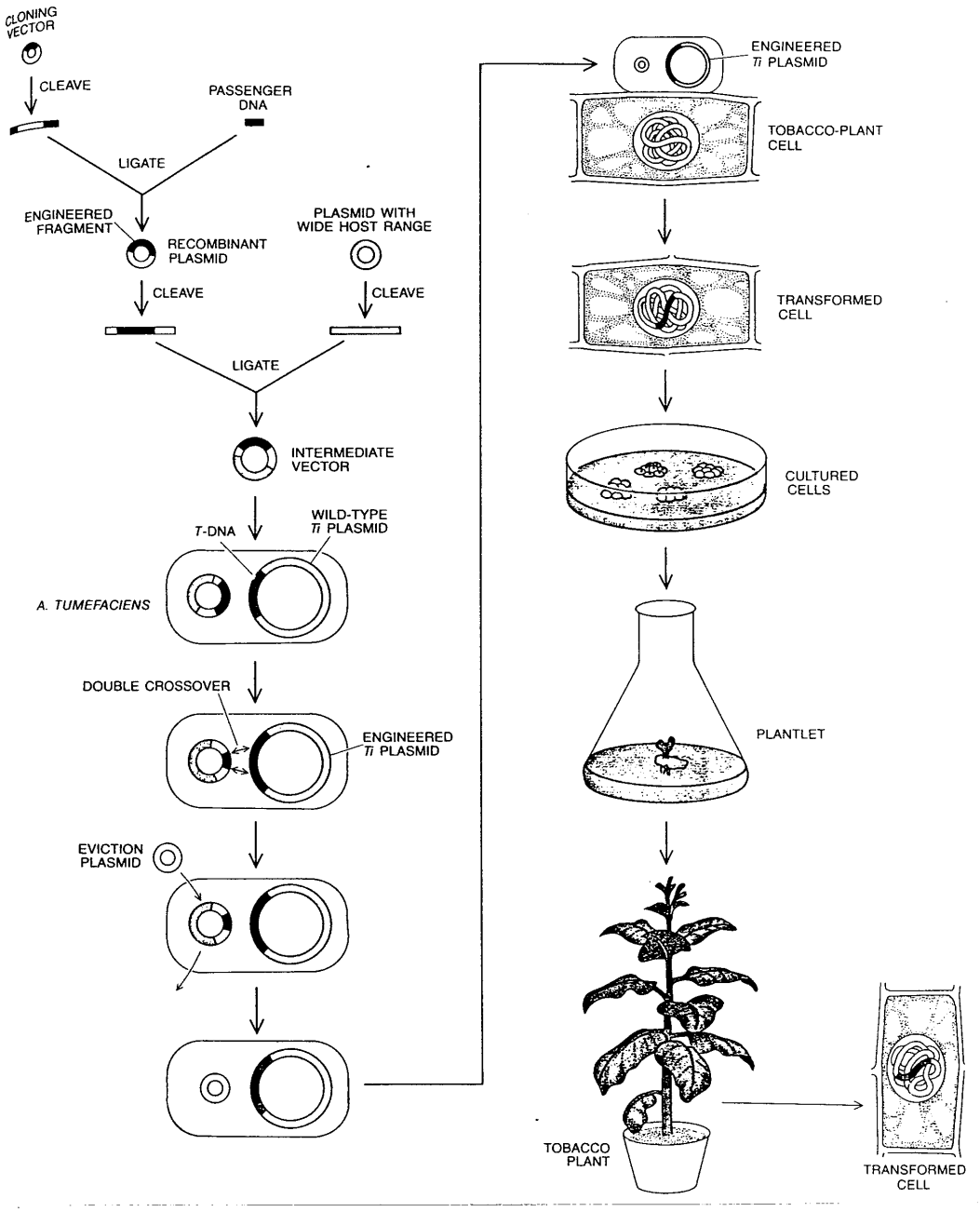
การเก็บรักษา genetic materials อีกวิธีการหนึ่งคือ การประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการนำชิ้นส่วนของพืชที่เก็บจากต้นพืชที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วและต้องการเก็บรักษาหรืออนุรักษ์เอาไว้มาเพาะเลี้ยงโดยควบคุมสภาวะแวดล้อม นับตั้งแต่ ควบคุมอุณหภูมิให้ต่ำลง ปรับปรุงสูตรอาหาร และควบคุมก๊าซ ทั้งนี้เพื่อให้การเจริญหรือการพัฒนาการของชิ้นส่วนของพืชเป็นไปอย่างช้าที่สุด (ภาพที่ 16) แต่ยังคงมีชีวิตและสามารถทำการเพาะต่อไปในสภาพปกติที่ทำให้เจริญไปเป็นต้นพืชที่มีลักษณะทางสายพันธุ์เหมือนต้นแม่ต่อไปอีกได้ การเพาะเลี้ยงวิธีนี้เปรียบเสมือนกับการจัดตั้งสวนรวมพันธุ์ (Clone bank) ไว้ในห้องปฏิบัติ การประโยชน์ของการชลอการเริญเติบโตนี้จะทำให้เก็บรักษาความมีอายุอยู่ได้ยาวนาน รวมทั้งต้องการพื้นที่เก็บรักษาน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกลงในแปลง ทั้งยังไม่เป็นอันตรายจากปัจจัยภายนอกซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ เช่น สภาพภูมิอากาศที่รุนแรง และโรคแมลง นอกจากนี้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวิธีดังกล่าวนี้ยังเหมาะที่จะนำไปใช้เพื่อการขนส่ง หรือการแลกเปลี่ยนพืชพรรณระหว่างประเทศได้



ภาพที่ 16 การเก็บรักษาชิ้นส่วนของพืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบชลอการเจริญเติบโต (Reduce-growth storage of germplasm) (Ng and NG, 1991)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับพันธุวิศวกรรม (Tissue Culture and Genetic Engineering)

ในปัจจุบันถึงแม้ว่าการศึกษาวิจัยในระดับโมเลกุล (Molecular level) จะมีความก้าวหน้าไปมาก มีการเรียนรู้ถึงองค์ประกอบต่างๆ ของเซล หน้าที่ ตลอดจนลักษณะทางด้านพันธุ์กรรม (genetics) นับตั้งแต่โครโมโซม (chromosome) ไปจนถึงยีนส์ (genes) ในอดีตเราเคยเข้าใจว่าลักษณะต่างๆ ที่แสดงออกในสิ่งมีชีวิตนั้นอยู่ภายใต้การควบคุมของยีนส์ภายในนิวเคลียส (nuclear genome) เท่านั้น แต่จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่านอกจากยีนส์ในนิวเคลียสแล้วยังมียีนส์ในคลอโรพลาส (chloroplast genome) และไมโตคอนเดรีย (mitochondrial genome) ที่มีบทบาทในการควบคุมลักษณะที่พืชแสดงออกอีกด้วย จากความก้าวหน้าอันนี้แล้ว ยังมีการศึกษาและค้นพบวิทยาการใหม่ที่เรียกว่าพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) ซึ่งเป็นการศึกษาถึงการตัดต่อยีนส์ หรือ DNA เช่น การนำยีนส์จากพืชต้นหนึ่งไปตัดต่อและนำเข้าไปในเซลของพืชอีกต้นหนึ่ง (gene transfer) ซึ่งมีวิธีการอยู่หลายวิธีนับตั้งแต่ Microinjection Particle gun Electroporation การใช้ Laser ตลอดจนการใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* เพื่อให้ลักษณะที่ยีนส์นั้นควบคุมอยู่ไปแสดงออก (gene expression) ในต้นพืชที่ต้องการ ซึ่งใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชสมัยใหม่ อย่างไรก็ดีการที่จะทำให้การศึกษานี้สำเร็จลงได้นั้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) นับว่ามีบทบาทสำคัญมากมาก การที่สามารถนำยีนส์ของพืชต้นหนึ่งไปยังเซลของพืชอีกต้นหนึ่งได้สำเร็จนั้นเป็นเพียงขั้นตอนหนึ่งเท่านั้น แต่การที่จะให้ประสบผลสำเร็จโดยสมบูรณ์จะต้องประสบความสำเร็จในการยอมรับและการแสดงออก (transformation) ของเซล (recipient) นั้น และตลอดจนความสำเร็จในการที่ทำให้เซลล์ (transient) นั้นสามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ทั้งยังสามารถทำการขยายพันธุ์ (propagation) ต่อไปได้อีกด้วย ดังนั้นการศึกษาวิจัยทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงนับว่ามีบทบาทสำคัญยิ่ง



ภาพที่ 17 การสอดใส่ยีนส์จากพืชต้นอื่น (Foreign Gene) เข้าสู่เซลของพืชอีกต้นหนึ่ง โดยใช้แบคทีเรียเป็นตัวกลาง คัดเลือกเซลที่ได้รับการสอดใส่ยีนส์เข้าไปจนสำเร็จ และอยู่รอดแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นพืชต่ไป (Chilton, 1983)

เอกสารอ้างอิง (References)

ประศาสตร์ เกื้อมณี 2538 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 158 หน้า

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524 หลักการและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช กรุงเทพฯ 133 หน้า

ฝ่ายวนวัฒนวิจัย 2529 การขยายพันธุ์ไม้ป่าโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวิทยาการใหม่ในวงการป่าไม้. เอกสารเผยแพร่ ฝ่ายวนวัฒนวิจัย กองบำรุง กรมป่าไม้

สุรนันต์ สุภัทรพันธ์ ฮอร์โมนพืช โครงการตำราชาวบ้าน ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสง, นครปฐม. 135 หน้า.

อภิชาติ ขาวสอาด พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์ และ โกวิท สมบุญ 2528 รายงานการศึกษาและวิเคราะห์สถานภาพความต้องการและการพัฒนาในงานวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้สัก ศูนย์บำรุงพันธุ์ไม้สัก กรมป่าไม้ 31 หน้า.

อรดี สหวัชรินทร์. . อาหารวิทยาศาสตร์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Arasu, N.T. and K. Paranjothy. 1975. Tissue Culture As An Aid In Crop Improvement. *In* Proceedings of The National plant Tissue Culture Symposium, Malasia. p 1-7.

Aseptic method of Micropropagation: Principle of Tissue Culture for Micropropagation. p 523-565

Bhojwani, S.S., and M.K. Razdan. 1983. Plant Tissue Culture : Theory and Practice. Elsevier, Amsterdam. 502 p.

Biondi, S. and T.A.Thorp 1981. Clonal Propagation of Forest tree spices *In* Proceedings of The International Symposium, National University of Singpore, Singapore, 28-30 April,1981. p. 197-206.

Bonga, J. M. 1982a. Tissue Culture Technique: *In.* Bonga, J. and D.J. Durzan (Eds) Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijholl / Dr. W. Junk Publishers, The Hague. p. 4-35.

Bonga, J. M. 1982b. Vegetative Propagation in Relation to Juvenility, Maturity and Rejuvenation *In.* Bonga, J. and D.J. Durzan (Eds) Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijholl / Dr. W. Junk Publishers, The Hague. p. 387-412.

Chilton, M-D. 1983. A Vector for Introducing New Genes into Plants. Scientific American. 248(6):51-59.

Durzan, D.J. 1985. Biotechnology and the Cell Culture of Woody Perennials. The Forestry Chronicle. 61(5):439-447.

Gavinlertvatana, p. and A.C. Matheson. 1987 Feasibility Study on Tissue Culture For Multipurpose Forest Tree Species. Winrock International - F/Fred, Bangkok, Thailand.

Kaosa-ard, and A. Apavatrut. 1986 Tissue Culture of Teak (*Tectona grandis)* Progress Report No. 1 TIC/CMU/USAID, Thailand 44 p.

Kirby,E.G. 1982. The Use of Techniques For Genetic Modification of Forest Tree. p.369-386.

Ng, S.Y.C. and N.Q. Ng. 1991. Reduced-Growth Storage of Germplasm. *In.* Hood,.J.H. (Ed.) *In Vitro* Methods for Conservation of Plant Genetic Resources. Chapman and Hall. pp. 11-40.

Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj. 1977. Anther Culture: Haploid Production and Its Significant. *In.* Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj, (Eds). Applied and Fundamental of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. Springer-Verlag.

Shepard, J. 1982. The Regeneration of Potato Plants from Leaf-Cell Protoplast. Scientific American. 246(5):154-167.

Street, H.E. 1973. Laboratory Organization: Plant Tissue and Cell Culture. Blackwell Scientific Publications. Oxford. p 11 -30

Thorpe, T.A. 1985. Application of Tissue Culture Technology to Forest Tree Improvement. The Forestry Chronicle. 61(5):436-438.

ภาคผนวก

GAMBORG B-5 MEDIA(1970)

สูตรอาหารนี้เหมาะสำหรับเลี้ยงพืชสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด นอกจากนี้อาจเติม Casein hydrolysate ลงในสูตรอาหารนี้ได้

Macronutrients	**mg/1**
$CaCl_2.2H_2O$	150
$NaH_2PO_4.H_2O$	150
KNO_3	2,500
$MgSO_4.7H_2O$	250
$(NH_4)_2SO_4$	134
Micronutrients	**mg/1**
H_3BO_3	3.0
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$CuSO_4$	0.025
KI	0.750
$MnSO_4.H_2O$	10.0
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$ZnSO_4.7H_2O$	2.0
Iron	**mg/1**
NaFe EDFA	28.0
Myoinositol	100.0
Nicotinic acid	1.0
Pyridoxine-HCl	1.0
Thiamin -HCl	10.0
2, 4-D	1.0
Sucrose	20 g
pH	5.5

MURASHIGE & SKOOG MEDIA (1962)

ใช้เพาะเลี้ยงและขยายเพิ่มจำนวนพืชหลายชนิด และยังใช้กับเฟิร์นได้อีกด้วย

Macronutrients	**mg/1**
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Micronutrients	**mg/1**
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.H_2O$	6.9
$ZnSO_4.H_2O$	6.14
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Iron	**mg/l**
Sodium EDTA	37.25
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
Organic componen	**mg/l**
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine	0.5
Thiamin	0.1
Inositol	100.0
Sucrose	30.0
pH	5.6

SCHENK AND HILDEBRANDT MEDIA(1972)

ใช้เลี้ยง แคลลัส" ทั้งของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ได้

Macronutrients	**mg/1**
$CaCl_2.2H_2O$	200
KNO_3	2,500
$MgSO_4.7H_2O$	400
$NH_4H_2PO_4$	300
Micronutrients	**mg/1**
H_3BO_3	0.5
$CaCl_2.6H_2O$	0.1
$CuSO_4.5H_2O$	0.2
KI	1.0
$MgSO_4.2H_2O$	10.0
$NaMoO_4.2H_2O$	0.1
$ZnSO_4.7H_2O$	1.0
Iron	**mg/1**
$FeSO_4.7H_2O$	15
Na_2EDTA	20
Organic component	**mg/1**
Myoinositol	1,000
Nicotinic acid	5.0
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamin-HCl	5.0
2,4-D	0.5
p-Chlorophenoxy-acetic acid	2.0
Kinetin	0.1
Sucrose	30
pH	5.8 - 5.9

WHITE MEDIA (1963)

สูตรอาหารนี้ได้ดัดแปลงมาจากสูตรที่คิดขึ้นในปี 1943

Macronutrients	**mg/l**
KCl	65.0
$MgSO_4.7H_2O$	720.0
$NaH_2PO_4.H_2O$	16.5
KNO_3	80.0
Na_2SO_4	200.0
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	300.0

Micronutrients	**mg/l**
$MnSO_4.4H_2O$	7.0
KI	0.75
$ZnSO_4.7H_2O$	3.0
H_3BO_3	1.5

Iron	**mg/l**
$Fe_2(SO_4)_3$	2.5

Organic component	**mg/l**
Sucrose	20,000.0
Glycine	3.0
Cysteine	1.0
Vit Bl	0.1
Vit B6	0.1
Nicotinic acid	0.5
Ca pantothenicacid	1.0
2, 4-D	6.0

VACIN & WENT MEDIA (1949)

ใช้เลี้ยงเมล็ดอ่อนและเนื้อเยื่อของกล้วยไม้

Macronutrients	**mg/l**
$Ca_3 (PO_4)_2$	200
KNO_3	525
KH_2PO_4	250
$MgSO_4.7H_2O$	250
$(NH_4)_2 SO_4$.	500
Micronutrients	**mg/l**
$MnSO_4. H_2O$	5.7
Iron **	**mg/l**
$Fe_2(C_4H_4O_6)_3. 2H_2O$ **	28
Organic component	**mg/l**
Sucrose	20,000.0
pH	4.8 - 5.0

** ในกรณีที่ $Fe_2(C_4H_4O_6)_3. 2H_2O$ หาซื้อไม่ได้ ให้ดัดแปลงธาตุเหล็ก โดยใช้

Iron **	**mg/l**
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
Na_2EDTA	37.3

สูตรอาหารอรดี สหวัชรินทร์

ใช้สำหรับผู้สมัครเล่นนำไปใช้ในการฝึกเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น การเพาะเลี้ยงแคลลัสจากผลฟักทอง การเพาะเลี้ยงเอมบริโอ หรือเมล็ดอ่อนของกล้วยไม้

สูตร OS 1987

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

ปุ๋ยทวินเฟอร์ตี้ 12-23-27	2	g.
น้ำตาลทราย	30	g.
น้ำมะพร้าว	150	ml.
วุ้น	6.2	g.
pH	5.6	

สูตร OS 1995

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

ปุ๋ยไบโฟลาน 11-8-6	1	g.
น้ำตาลทราย	30	g.
เซอไพรส์	2	mg.
วุ้น	6.2	g.
pH	5.6	

Molecular weights of the compounds commonly used in tissue culture media

Compound	Chemical Formula	Molecular weight
Macronutrients		
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	80.04
Ammonium sulphate	$(NH_4)_2\ SO_4$	132.15
Calcium vhloride	$CaCl_2.2.H_2O$	147.02
Calcium nitrate	$Ca(NO_3)\ .4H_2\ O$	236.16
Magnesium sulphate	$MgSO_4\ .7H_2\ O$	246.47
Potassium chloride	KCl	74.55
Potassium nitrate	KNO_3	101.11
Potassium dihydrogen *ortho*-phosphate	KH_2PO_4	136.09
Sodium dihydrogen *ortho*-phosphate	$NaH_2PO_4.2H_2\ O$	156.01
Micronutrients		
Boric acid	H_3BO_3	61.83
Cobalt chloride	$CoCL_2.6H_2O$	237.93
Cupric sulphate	$CuSO_4.5H_2O$	249.68
Manganous sulphate	$MnSO_4.4H_2O$	223.01
Potassium iodide	KI	166.01
Sodium molybdate	$Na_2MoO_4.2H_2O$	241.95
Zinc sulphate	$ZnSO_4.7H_2O$	287.54
Sodium EDTA	Na_2 EDTA $2H_2O$	372.25
	$(C_{10}H_{14}N_2O_5\ Na_2\ .2H_2O)$	
Ferrouys sulphate	$FeSO_4.7H_2O$	278.03
Ferric-odium EDTA	FeNa.EDTA	
	$(C_{10}H_{12}FeN_2NaO\ )$	367.07

Compound	Chemical Formula	Molecular weight
Sugars and sugar alcohols		
Fructose	$C_6H_{12}O_6$	180.15
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.15
Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	182.17
Sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	182.17
Sucrose	$C_{12}H_{22}O_{14}$	342.31
Vitamins and amino acids		
Ascorbic acid (vitamin C)	$C_6H_4O_3$	176.12
Biotin (vitamin H)	$H_{10}N_2O_1S$	244.31
Calcium pantothenate (Ca salt of vitamin B_5)	$C_3H_{13}O_{14}$	476.53
Cyanocobalamine (vitamin B_{12})	$C_4H_2O_4Cl$	1357.64
L-Cysteine JCL		157.63
Folic acid (vitamin B_c, vitamin M)	$C_4H_4O_4Cl_2$	441.40
Inositol		180.16
Nicotinic acid or Niacin (vitamin B_3)	$C_{10}H_4NO_2$	123.11
Pyridoxine HCl (vitaminB_6)	$C_{12}H_{13}NO_2$	205.64
Thiamine HCl (vitamin B_4)	$C_{12}H_{10}O_2$	337.29
Glycine		75.07
L-Glutamine	$C_{12}H_{10}O_3$	146.15

Compound	Chemical Formula	Molecular weight
Auxins		
*p*CAA (*p*-chlorophenoxyacetic acid)	$C_5H_5N_5.3H_2O$	186.59
2,4-D (2,4 dichlorophenoxyacetic acid)	$(C_5H_5N_5)_2.H_2SO_42H_2O$	221.04
IAA (indile-3-acetic acid)	$C_{12}H_{11}N_3$	175.18
IBA (3-indolebutyric acid)		203.23
NAA (a-naphthaleneacetic acid)	$C_{13}H_{20}O_4$	186.20
NOA (3-naphthoxyacetic acid)		202.20
Cytokinins/purines		
Ad (adenine)		189.13
$AdSO_4$ (adenine sulphate)		404.37
BA or BAP (6-benzyladenine or 6-benzylamino purine)		225.20
2-ip (6-r,r-dimethylallylamino purine or N-isopentenylamino purine)		203.3
Kinetin (6-furfurylamino purine)		215.21
SD8339 [16-(benzylamino)-9-(2-tetrahydropyranyl)-H-purine]		309.40
Zeatin [6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino) -purine]		219.20
Gibberellin		
GA_3 (gibberellic acid)		346.37
Other compounds		
Abscissic acid		264.31
Colchicine		399.43
Phloroglucinol		126.11

Atomic weights

Name	Symbol	Atomic weight
Aluminium	Al	26.98
Boron	B	10.82
Calcium	Ca	40.08
Carbon	C	12.011
Chlorine	Cl	35.457
Cobalt	Co	58.94
Copper	Cu	63.54
Hydrogen	H	1.008
Iodine	I	126.91
Iron	Fe	55.85
Magnesium	Mg	24.32
Manganese	Mn	54.94
Molybdenum	Mo	95.95
Nickel	Ni	58.71
Nitrogen	N	14.008
Oxygen	O	16.00
Phosphorus	P	30.975
Potassium	K	39.10
Sodium	Na	22.991
Sulphur	S	32.066
Zinc	Z	65.38

Chemical composition of Difco agars used in plant tisue culture[a]

Constituents	Bacto-agar	Noble-agar	Purified-agar
Ash	4.5%	2.6%	1.75%
Calcium	0.13%	0.23%	0.27%
Barium	0.01%	0.01%	0.01%
Silica	0.19%	0.26%	0.09%
Chloride	0.43%	0.18%	0.13%
Sulphate	2.54%	1.90%	1.32%
Nitrogen	0.17%	0.10%	0.14%
Iron	11.00 mgl^{-1}	11.00 mgl^{-1}	11.00 mgl^{-1}
Magnesium	285.00 mgl^{-1}	260.00 mgl^{-1}	695.00 mgl^{-1}
Copper	500.00 mgl^{-1}	7.50 mgl^{-1}	20.00 mgl^{-1}