

ใบความรู้ที่ 3 เรื่อง ความสำคัญของเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
หน่วยที่ 6 แผนการจัดการเรียนรู้ที่ 7 รายวิชาวิทยาศาสตร์พื้นฐาน
รหัสวิชา ว21101 ภาคเรียนที่ 1 ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 1

ประวัติความเป็นมาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช



ภาพที่ 6.7.1 แคลลัสของพืชที่ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Gottlieb Haberlandt ชาวเยอรมัน เป็นคนแรกที่เริ่มทำการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ท่านได้รับการยกย่องว่าเป็นบิดาของเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช Haberlandt (1898) ได้ทำการทดลองโดยแยกเอาเซลล์จากใบพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ และตั้งสมมุติฐานว่าเซลล์พืชเพียงเซลล์เดียวที่นำมาเลี้ยงสามารถจะแบ่งตัวและเจริญเติบโตไปเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ ทุกประการได้ เช่นเดียวกับพืชต้นเดิม แต่เขายังไม่สามารถเลี้ยงเซลล์พืชให้เป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ตามสมมุติฐาน เนื่องจากเซลล์ที่นำมาทำการทดลองนี้แก่เกินไปและสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงยังไม่เหมาะสม อย่างไรก็ตามในปี 1902 เขาก็สามารถเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้สำเร็จ และมีความเชื่อมั่นว่าจะต้องมีวิธีการทำให้เซลล์ที่เลี้ยงอยู่นั้นสามารถกลับกลายเป็นพืชทั้งต้นได้ในระยะเวลา 30 ปีต่อมา หลังจากสมัยของ Haberlandt งานด้านการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชพัฒนาไปน้อยมาก แต่ก็มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านทำการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจนกระทั่ง White (1934) ได้ทำงานด้านการเลี้ยงเนื้อเยื่อของรากเป็นผลสำเร็จ โดยทดลองใช้อาหารที่ประกอบด้วยสารอนินทรีย์ น้ำสกัดยีสต์ และน้ำตาลทราย ต่อมาในปี 1937 เข้าค้นพบว่ากลุ่มวิตามินบีมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อของราก กลุ่มนักวิทยาศาสตร์ที่ศึกษาเกี่ยวกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อของรากพืชอีกกลุ่มหนึ่ง คือกลุ่มของ Street งานของกลุ่มนี้จะช่วยอธิบายบทบาทของสารเคมีโดยเฉพาะพวกวิตามินต่าง ๆ ต่อการสร้างราก และความสัมพันธ์ของการเกิดรากและยอดได้อย่างดี

Winkler ได้ค้นพบว่าออกซิน คือ IAA (indol acetic acid) เป็นสารช่วยกระตุ้น การเจริญเติบโต ดังนั้น Gautheret (1937, 1938) จึงทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อแคมเบียมของต้นหลิว (*Salix cambium*) ใน Knop's solution โดยใส่น้ำตาลกลูโคส วิตามินบี 1 cysteine hydrochloride และ IAA ลงไปด้วย พบว่าเนื้อเยื่อของหลิวมีการแบ่งตัวและเจริญต่อไปได้ ระยะเวลาหนึ่งในอาหารที่ใช้เลี้ยง จนกระทั่งในปี 1939 เขาจึงประสบความสำเร็จในการเลี้ยง ส่วนแคมเบียมของแครอทอย่างแท้จริง ซึ่งแต่เดิมนั้นมา การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ได้ประสบความสำเร็จอย่างแท้จริงเป็นครั้งแรก นอกจากนี้ White ซึ่งเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทูเมอร์ (tumors) ของยาสูบที่ได้มาจากลูกผสมระหว่าง *Nicotiana glauca* x *N. langsdorffii* ต่างรายงานความสำเร็จ พบว่ามีกลุ่มเซลล์ฟองฟูออกมาจากเนื้อเยื่อเดิม เรียกกลุ่มเซลล์ที่เกิดใหม่ว่าแคลลัส ซึ่งแคลลัสที่ได้นี้สามารถเลี้ยงไปได้เรื่อยๆ เมื่อมีการย้ายไปยังอาหารใหม่ สาเหตุที่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประสบความสำเร็จ เนื่องจากค้นพบสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยสารควบคุมการเจริญ-เติบโตชนิดแรกที่ค้นพบคือ IAA ซึ่งเป็นออกซิน (auxin) ชนิดหนึ่งที่ทำให้การเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลองได้ผล ต่อมาภายหลังมีการค้นพบไคเนทิน (kinetin) ซึ่งเป็นไซโตไคนิน (cytokinin) ชนิดหนึ่งที่ช่วยกระตุ้นการเจริญได้ดียิ่งขึ้น นับจากนั้นมาความก้าวหน้าทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก็ได้แพร่หลายไปยังประเทศอื่น ๆ อีกทั้งยังมีการเอาหลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปประยุกต์ใช้ทางด้านการเกษตร การขยายพันธุ์พืช การปรับปรุงพันธุ์พืช ทางพฤกษศาสตร์ ชีวเคมี โรคพืช ตลอดจนทางด้านพันธุวิศวกรรม

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยใช้ชิ้นส่วนของพืช เช่น ตายอดหรือตาข้างของพืชจากต้นพืชพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ทำให้ส่วนประกอบของพืชเจริญเติบโตและพัฒนาเกิดเป็นต้นใหม่ที่มีลักษณะเหมือนต้นเดิมทุกประการ ทำให้ได้พืชจำนวนมากที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ นอกจากนั้น พืชที่ได้ยังปลอดจากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ที่อาจเป็นสาเหตุ ของโรคพืช จึงเหมาะแก่การนำไปปลูกเพื่อให้ได้ต้นที่สมบูรณ์ และมีผลผลิตสูงต่อไป พืชที่นิยมเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ กล้วย กล้วยไม้ หน่อไม้ฝรั่ง ไม้ เยอบีร่า หนั้วว เบญจมาศ กระเจียว บอนสี กุหลาบ สตรอเบอร์รี่ ขนุน ไม้สัก



ภาพที่ 6.7.2 การเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มี 2 รูปแบบภายใต้สูตรเดียวกัน แล้วแต่ผู้ปฏิบัติเห็นว่าในระยะไหนควรใช้อาหารรูปแบบใดแล้วส่งผลดีต่อการพัฒนาของชิ้นพืชได้ดีกว่า ได้แก่

1. อาหารแข็ง (Solid medium) เป็นเพียงการผสมวุ้นลงในอาหาร ประมาณ 0.7 -1 % หรือ 7-10 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร เพื่อช่วยพยุงชิ้นพืชให้สามารถเจริญเติบโตอยู่บนอาหารได้
2. อาหารเหลว (Liquid medium) เป็นอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของวุ้น ชิ้นพืชที่เลี้ยงในอาหารเหลวมักจะมีการเจริญเติบโตที่ดี และค่อนข้างรวดเร็ว แต่ต้องระวังเรื่องการถ่ายเทอากาศของชิ้นพืช ถ้าเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลว จำเป็นต้องเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (Shaker) ควบคุมกันไปเสมอ ทั้งนี้เครื่องเขย่าจะเคลื่อนไหวด้วยการหมุนในแนวขนานกับพื้นโลก อัตรา 100- 120 รอบต่อนาที การเขย่าตลอดเวลาจะช่วยให้ออกซิเจนละลายลงในอาหารส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชบนอาหารเหลวเป็นเวลานานพืชอาจมีการฉ่ำน้ำ หากพบ

อาการดังกล่าว ควรหยุดการใช้อาหารเหลว และเปลี่ยนไปใช้อาหารแข็งจะสามารถลดอาการฉ่ำน้ำของพืชลดลงได้

ชั้นส่วนพืชที่ผ่านการพอกฆ่าเชื้อและเลี้ยงบนอาหารวุ้นจะมีการพัฒนาเป็นหน่อเล็กๆ ภายใน 1-2 เดือนแรก เมื่อทำการตัดย้ายอาหารเปลี่ยนอาหาร เนื้อเยื่อเหล่านี้จะเจริญเติบโตและมีการพัฒนาเป็นหน่อเล็กๆ ภายใน 1 – 2 เดือนแรก เมื่อมีการเปลี่ยนอาหาร เนื้อเยื่อเหล่านี้จะเจริญเติบโตและมีการพัฒนาจนสามารถเพิ่มปริมาณโดยเฉลี่ย 3-5 เท่า ภายใน 30 วัน เมื่อได้ปริมาณต้นตามต้องการจึงเปลี่ยนสูตรอาหารวุ้นเพื่อชักนำการเกิดราก จนกระทั่งได้ต้นพืชที่สมบูรณ์ มีทั้งส่วนลำต้น ใบ และราก สามารถย้ายออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้

วิธีการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. นำสารละลายเข้มข้นชนิดต่าง ๆ มาผสมกัน ค่อย ๆ กวนให้เข้ากันจนหมดครบทุกชนิด
2. เติมน้ำตาล แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ ปรับ pH 5.6 – 5.7
3. นำวุ้นผสมกับอาหารที่เตรียม หลอมวุ้นให้ละลาย
4. บรรจุลงในขวดอาหารในปริมาตรเท่า ๆ กัน ปิดฝาให้สนิท

การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร นำขวดที่บรรจุอาหารแล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 – 20 นาที

การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บริเวณภายนอกชิ้นส่วนพืช

เป็นสิ่งจำเป็นและสำคัญที่จะต้องฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับบริเวณผิวนอกของชิ้นส่วนพืช เนื่องจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีธาตุอาหารและวิตามิน ที่จุลินทรีย์ต่าง ๆ เจริญได้ดีและรวดเร็วกว่าเนื้อเยื่อพืช การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำได้สะดวกและได้ผลดี โดยการใช้สารเคมีชนิดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้หมดทุกชนิด และล้างออกได้ง่าย เพราะถ้าล้างออกได้ยาก สารเคมีเหล่านี้จะมีผลทำให้เนื้อเยื่อพืชตาย หรือมีการเจริญเติบโตไม่ดีเท่าที่ควรการเติมน้ำยาซักฟอกลงไปในสารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ จะทำให้ประสิทธิภาพสารเคมีเหล่านั้นดีขึ้น เนื่องจากจะทำให้ลดแรงตึงผิวบริเวณผิวนอกของชิ้นส่วนพืช สารเคมีจะแทรกซึมเข้าไปทำลายจุลินทรีย์ตามซอกต่าง ๆ ได้ดีขึ้น การเตรียมสารเคมีฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทำโดยดวงสารให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการ แล้วเติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อและน้ำยาซักฟอกลงไป เขย่าให้เข้ากัน การเตรียมนี้ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

วิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. นำชิ้นส่วนพืชที่ต้องการมาล้างน้ำให้สะอาด
2. ตักแต่งชิ้นส่วนพืช ตัดส่วนที่ไม่ต้องการออก
3. นำชิ้นส่วนพืชจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 % เพื่อลดแรงตึงผิวบริเวณนอกชิ้นส่วนพืช
4. นำชิ้นส่วนพืชมาเขย่าในสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้นาน 10 – 15 นาที
5. ใช้ปากคีบคีบชิ้นส่วนพืช ล้างในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง
6. ตัดชิ้นส่วนพืชตามขนาดที่ต้องการแล้ววางบนอาหารสังเคราะห์
7. ลงรายละเอียด เช่น ชนิดพืช วันเดือนปี หรือรหัส ในการทำการฆ่าเชื้อที่ติดมากับผิวพืช และการนำไปเลี้ยงบนอาหารทำในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ โดยตล



ภาพที่ 6.7.3 ขั้นตอนการขยายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การดูแลเนื้อเยื่อระหว่างการเลี้ยง

1. นำขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อไปวางบนชั้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม โดยทั่วไปปรับ

อุณหภูมิภายในห้องประมาณ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ให้แสงประมาณ 12 – 16 ชั่วโมง / วัน ความเข้มของแสง 1,000 – 3,000 lux

2. เนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงควรเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ ระหว่างการเลี้ยงตรวจดู
3. การเจริญเติบโต สังเกตการเปลี่ยนแปลง บันทึกรายงานไว้เพื่อเป็นข้อมูล
4. การย้ายพืชออกจากขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อลงปลูกในกระถาง

เมื่อพืชเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์แล้ว ก็นำลงปลูกในกระถางดังนี้

1. เตรียมทราย : ถ่านแกลบ หรือ ทราย : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 ใส่กระถางหรือกระบะพลาสติก
2. ใช้ปากคีบ คีบต้นพืชออกจากขวดอย่างระมัดระวัง
3. ล้างเศษวุ้นที่ติดอยู่บริเวณรากออกให้หมด
4. จุ่มยากันรา ตามอัตราส่วนที่กำหนดในสลากยา

ปลูกในกระถางหรือกระบะ

นำไปไว้ในตู้ควบคุมความชื้น แสง อุณหภูมิ หรือนำไว้ในกระบะพ่นหมอก เมื่อพืชเจริญตั้งตัวดีแล้วจึงย้ายลงแปลงปลูกต่อไป

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. การขยายพันธุ์พืช (Micropropagation) เพื่อให้ได้ต้นพืชจำนวนมากอย่างรวดเร็ว (rapid asexual propagation)



ภาพที่ 6.7.4 การขยายพันธุ์พืชโดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. การผลิตพืชที่ปราศจากโรค เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะต้องอยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ ดังนั้น พืชที่ได้จึงเป็นพืชที่ปราศจากเชื้อใดๆ



ภาพที่ 6.7.5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาวะปลอดเชื้อ

3. การปรับปรุงพันธุ์พืช (Plant provention) ประโยชน์มหาศาลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การปรับปรุงพันธุ์พืช สามารถสร้างพันธุ์พืชต่าง ๆ ได้ตามความประสงค์



ภาพที่ 6.7.6 การปรับปรุงพืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4. การผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรต่างๆ แบบ เซลล์แขวนลอย (suspension culture) สามารถผลิตสารต่างๆ ได้ เช่น ผลิตสารใช้เป็นยาฆ่าแมลงที่ใช้ทางด้านการเกษตร ผลิตยารักษาโรคใช้ทางด้านการแพทย์ และผลิตสารที่ทำให้กึ่งลอกคราบที่ใช้ทางการประมง



ภาพที่ 6.7.7 การผลิตสารทุติยภูมิโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร

5. การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์ เนื่องจากการเลี้ยงพืชในอาหารสังเคราะห์ สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายและชัดเจน



ภาพที่ 6.7.8 การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยาและพันธุศาสตร์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

6. การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช (Germplasm conservation, gene bank) เป็นการเก็บรักษาพันธุ์พืช คือ เก็บแคลลัสของพืชที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส (cryopreservation) ควบคุมโดยใช้ไนโตรเจนเหลว สามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลานาน และไม่มีการกลายพันธุ์



ภาพที่ 6.7.9 การอนุรักษ์พันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ที่มา : <http://www.ku.ac.th>