**แผนบริหารการสอนประจำบทที่ 5**

**เนื้อหาประจำบท**

- การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- การประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- พันธุวิศวกรรมพืช

**วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม**

เมื่อนักศึกษาได้ศึกษาจบบทที่ 5 แล้วนักศึกษาสามารถ

1. รู้และเข้าใจหลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2. สามารถอธิบายส่วนประกอบอาหารเพาะเลี้ยงได้

3. สามารถอธิบายหลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละชนิดได้

4. รู้และเข้าใจหลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพพืช

5. สามารถอธิบายหลักการประยุกต์ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

6. รู้และเข้าใจหลักการพันธุวิศวกรรมพืช

**วิธีการสอนและกิจกรรมการเรียนการสอนประจำบท**

1. ผู้สอนบรรยายหัวข้อต่อไปนี้พร้อมเปิดโอกาสให้นักศึกษาซักถามข้อสงสัย

- หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- ส่วนประกอบอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด

- การประยุกต์ใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- พันธุวิศวกรรมพืช

2. ให้นักศึกษาทำกิจกรรมต่อไปนี้

- ศึกษาข้อมูลทางอินเทอร์เน็ตเกี่ยวกับสารทุติยภูมิจากพืชที่สนใจ พร้อมทั้งบอกความสำคัญ

เทคนิคการเพาะเลี้ยง และแนวการนำมาใช้

- เขียนแผนภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อจุดประสงค์ในการประยุกต์ใช้ เช่นการเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อพืชเพื่อความแปรผันทางพันธุกรรม (Somaclonal variation)

- ทำแบบฝึกหัดและใบงานที่กำหนดให้

**สื่อการเรียนการสอน**

- เอกสารประกอบการสอนและตำราต่างๆ

- Slide Powerpoint Presentation

- เอกสารสื่อทางอิเล็กทรอนิกส์ เช่น อินเทอร์เน็ต ซีดีรอม แผ่นภูมิ แผนภาพ และวิดีโอที่

เกี่ยวข้อง

**การวัดผลและประเมินผล**

- สังเกตความสนใจของนักศึกษาขณะทำการสอน ความตั้งใจ การฟัง การจดบันทึก และการ

ถามตอบ

- แบบทดสอบ

- แบบฝึกหัด

- ใบงาน

- การมีส่วนร่วมในกิจกรรมกลุ่ม หรือในขณะที่ทำการเรียนการสอน

- การวิเคราะห์เนื้อหาเป็นรายบุคคล หรือรายกลุ่ม พร้อมทั้งการนำเสนอและสรุปหน้าชั้นเรียน

**บทที่ 5**

**เทคโนโลยีชีวภาพพืช**

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคสำคัญที่ทำให้เกิดการพัฒนาในด้านเทคนิค หรือเทคโนโลยีอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อพืช จากการค้นพบของ G. Herberlandt (1902) ในการแยกเซลล์พืชมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ แต่เซลล์พืชไม่มีการเจริญและไม่สามารถเปลี่ยนแปลเซลล์ไปเป็นลักษณะเฉพาะได้ (Differentiated cell) ต่อมามีการพัฒนาเทคนิคในการนำอวัยวะ (Organ) พืชมาเพาะเลี้ยง เช่น ราก ยอด โดยมีการศึกษาในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีส่วนประกอบที่แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงและยังสามารถชักนำให้เกิดชนิดเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันได้ คุณสมบัติองค์ประกอบในอาหารที่ดีทำให้มีการพัฒนาให้เกิดต้นได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนต่างๆ จากพืช เช่นละอองเรณู เซลล์ และโพรโทพลาส (Protoplast) อาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญช่วยให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตามจุดประสงค์ และสามารถพัฒนาต่อในด้านอื่นๆ เช่นพันธุวิศวกรรมพืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์สารสำคัญจากเซลล์พืช เป็นต้น

**5.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture)**

**5.1.1 พื้นฐานเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำชิ้นส่วนของพืช (Explant) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาวะปลอดเชื้อ ชิ้นส่วนพืช ได้แก่ อวัยวะ (Organs) ต้นอ่อน (Embryo) เมล็ด และเซลล์เดี่ยวเนื้อเยื่อเจริญ (Meristematic tissue) เซลล์สามารถเจริญ แบ่งเซลล์ (Divide) เพิ่มจำนวน และเปลี่ยนเป็นส่วนของพืช (Differentiation) ได้ต่อไป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีขั้นตอนที่สำคัญ ดังนี้

1. การเลือกชิ้นส่วนพืชหรือเนื้อเยื่อที่ต้องการ โดยต้องกำหนดชนิดพืช ชนิดชิ้นส่วนพืช (เช่น ละอองเรณู ใบ ราก ปลายยอด และเอ็มบริโอ เป็นต้น) อายุพืชที่จำนำมาเพาะเลี้ยง

2. การทำความสะอาดชิ้นส่วน เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยการล้างทำความสะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายฟอกฆ่าเชื้อ (Disinfectant) เช่นโซเดียมไฮโพคลอไรท์ (Sodium hypochlorite) เมคิวริก คลอไรด์ (Mercuric chloride) ตามระยะเวลา และความเข้มข้นที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อ เช่นถ้าเป็นส่วนที่มีความแข็ง ผิวขรุขระ สามารถใช้สารที่เข้มข้น ระยะเวลานานกว่าชิ้นส่วนที่บอบบาง เนื่องจากสารละลายฟอกฆ่าเชื้อมีผลให้เนื้อเยื่อเสียสภาพได้

3. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงให้มีองค์ประกอบที่สามารถเพาะเลี้ยง หรือชักนำให้เป็นชนิดเนื้อเยื่อ ตามที่ต้องการได้

4. การนำชิ้นส่วนให้มีขนาดเหมาะสมเพาะเลี้ยงบนอาหารในสภาวะปลอดเชื้อ

5. การเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มีสภาวะที่ต้องการตามจุดประสงค์การเพาะเลี้ยง เช่นอุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 50-60 แสงจากหลอดฟูออเรสเซนต์ ระยะเวลา 16 ชั่วโมง เป็นต้น

6. การย้าย เปลี่ยนอาหาร หรือการชักนำให้เกิดต้นจากเนื้อเยื่อ หรือเซลล์ เช่นการชักนำจากแคลลัส (Callus) ไปเป็นต้นอาจต้องมีการเปลี่ยนส่วนประกอบในอาหารใหม่

7. การย้ายปลูกจากในสภาวะปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการ ไปโรงเรือน

ประโยชน์การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ สามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากในห้องเพาะเลี้ยง โดยพืชมีลักษณะเหมือนต้นแบบ (Clone) เช่น ได้ลักษณะตามที่ต้องการจากต้นแบบ เช่นทนศัตรูพืช ยาปราบศัตรูพืช และได้ลักษณะทางพันธุกรรมใหม่ ได้พืชดอกจากต้นแบบที่ปลอดไวรัส (Virus free) ไม่มีไวรัสในเซลล์ นอกจากนี้มีการประยุกต์การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การปรับปรุงพันธุ์โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีข้อได้เปรียบกว่าในแปลงปลูก ดังนี้ ได้ผลลัพธ์เร็วกว่า ควบคุมสภาวะตามต้องการได้ ประหยัดพื้นที่ และแรงงาน ใช้เพาะเลี้ยงสำหรับผลิตสารที่มีประโยชน์ ได้แก่ ยา น้ำมัน และอาหารเสริม เป็นต้น

**5.1.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชใช้อาหารสังเคราะห์ที่มีส่วนประกอบตามจุดประสงค์การเพาะเลี้ยง ส่วนประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงได้แก่

1. แร่ธาตุ (Element) ได้แก่ธาตุหลักเป็นธาตุที่พืชต้องการปริมาณมาก (Macronutrient) ได้แก่คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม และกำมะถัน ส่วนธาตุที่ต้องการปริมาณน้อย (Microelement) ได้แก่ เหล็ก แมงกานีส ทองแดง สังกะสี โบรอน คลอไรด์ และโมลิบดินัม เป็นต้น แร่ธาตุแต่ละชนิดมีบทบาทต่อพืช (ตารางที่ 1)

2. วิตามิน เป็นสารอินทรีย์ที่พืชต้องการในปริมาณเล็กน้อย มีบทบาทต่อการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน (Morphogenesis) ของพืช วิตามินที่มักพบในอาหารเพาะเลี้ยง ได้แก่ วิตามิน บี 1 (Thiamine) นิยมใช้ในรูป Thiamine-HCl วิตามินบี 3 (Nicotinic acid หรือ Niacin) วิตามินบี 6 (Pyridoxine) วิตามินบี 7 (Biotin หรือ วิตามิน H) หรือ Coenzyme R หรืออาจจัดให้อยู่ในกลุ่ม B-complex vitamin วิตามินบี 5 (Panthothenic acid) วิตามิน บี 9 (Folic acid หรือ Folate) วิตามินบี 12 (Riboflavin) วิตามินซี (Ascorbic acid)

**ตารางที่ 5.1** บทบาทของแร่ธาตุบางชนิดในอาหารเพาะเลี้ยงต่อเนื้อเยื่อพืช

|  |  |
| --- | --- |
| **ธาตุ** | **หน้าที่** |
| ไนโตรเจน (N) | เป็นส่วนประกอบอยู่ในโปรตีน กรดนิวคลีอิก และโคเอนไซม์บางชนิด |
| โพแทสเซียม (K) | ช่วยปรับศักย์ออสโมซิส (Osmotic potential) |
| แคลเซียม (Ca) | สังเคราะห์ผนังเซลล์ |
| แมกนีเซียม (Mg) | เป็นโคเอนไซม์ (Enzyme cofactor) และองค์ประกอบในคลอโรฟิลล์ |
| ฟอสฟอรัส (P) | ส่วนประกอบในกรดนิวคลีอิก  ส่วนประกอบของสารมัธยันตร์ (Intermediates) ในการหายใจระดับ  เซลล์ และการสังเคราะห์แสง |
| ซัลเฟอร์ (S) | อยู่ในกรดอะมิโนบางชนิด เช่นเมไธโอนีน (Met) และซีสเทอีน  (Cys) และเป็นองค์ประกอบในโคแฟคเตอร์ |
| คลอรีน (Cl) | จำเป็นในการสังเคราะห์แสง |
| แมงกานีส (Mn) | ส่วนประกอบในโคแฟคเตอร์ |
| โคบอลต์ (Co) | ส่วนประกอบในวิตามินบางชนิด |

3. สารควบคุมการเจริญเติบโต (Plant growth regulator) เป็นสารที่มีบทบาทในการเจริญ การยับยั้งการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงลักษณะของพืช ชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ได้แก่

3.1 ออกซิน (Auxin) ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ เพิ่มการยืดของเซลล์ ออกซินที่ปลายรากยับยั้งการเจริญของรากได้ แต่เมื่อความเข้มข้นสูงจะกระตุ้นการเกิดรากแขนง ออกซินชนิดที่มีในธรรมชาติ ได้แก่ IAA และ IBA ส่วนชนิดที่สังเคราะห์ขึ้นได้ ได้แก่ IAA IBA และ 2,4-D

3.2 ไซโทไคนิน (Cytokinin) ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ การใช้ไซโทไคนินและออกซินสูงทำให้มีการชักนำเกิดตา ถ้าไซโทไคนินและออกซินสมดุลกันทำให้สร้างต้นใหม่จากแคลลัส ไซโทไคนินที่พบในธรรมชาติ ได้แก่ ซีเอติน (Zeatin) ชนิดที่สังเคราะห์ ได้แก่ BA

3.3 จิบเบอเรลลิน (Gibberenllin) กระตุ้นการเจริญ การแบ่งเซลล์ เร่งการออกดอก ชนิดที่มีในธรรมชาติ ได้แก่ Gibberenin acid (GA)

3.4 เอธิลีน (Ethylene) มักอยู่ในสถานะก๊าซ เร่งการสุกของผล ยับยั้งการยืดของต้นกล้า เร่งการหลุดร่วงของใบ ทำลายการพักตัวของเมล็ด

3.5 แอบซิซิคเอซิด (Abscisic acid) มีการพบในใบแก่ที่มีสีเขียว บางครั้งพบเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียด เช่น การขาดน้ำ ทำให้ปากใบปิด ทำให้เกิดการพักตัวของตา เร่งการหลุดร่วงของใบ ฮอร์โมนกลุ่มไซโทไคนิน ที่สังเคราะห์ในธรรมชาติ ได้แก่ Abscisic acid (ABA)

4. แหล่งคาร์บอน แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานของสิ่งมีชีวิต รวมถึงพืชด้วย แหล่งคาร์บอนมักเป็นน้ำตาล เช่น กลูโคส ซูโครส และฟรุ๊คโตส

5. ช่วยในการสร้างเนื้อเยื่อ กรดอะมิโนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น กลูตามิน(Glutamine) แอสพาราจีน (Asparagine) อะดีนีน (Adenine) และไกลซีน (Glycine)

6. สารประกอบอื่นที่ไม่ทราบองค์ประกอบแน่นอน อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจเติมสารอื่นๆ ที่ไม่ทราบปริมาณองค์ประกอบภายในแน่นอน เช่นน้ำมะพร้าว สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) น้ำต้มจากมันฝรั่ง น้ำคั้นจากมะเขือเทศ กล้วยบด มอลท์สกัด และผงถ่าน (Activated charcoal)

พีเอชอาหารเพาะเลี้ยงประมาณ 5.5-5.7 สภาวะอาหาร (ของแข็ง กึ่งแข็งกึ่งเหลว และอาหารเหลว) ต่างกันที่ปริมาณวุ้น (Agar)

ข้อควรคำนึงถึงในการเลือกอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่

1. ชนิดและสายพันธุ์พืช ซึ่งพืชต่างชนิด และต่างสายพันธุ์ต้องการอาหารไม่เหมือนกัน

2. อายุ และการพัฒนาของพืช โดยชนิดสายพันธุ์พืชเดียวกันถ้าอายุและการพัฒนาต่างกันต้องการสารอาหารต่างกัน

3. ชนิดของชิ้นส่วนพืช (Explant material) ชิ้นส่วนพืชต่างกันต้องการอาหารต่างกัน เช่น ยอด และรากต้องการอาหารสูตรต่างกัน

4. เป้าหมายการเพาะเลี้ยง (Target of culture) เป้าหมายการเพาะเลี้ยงคือเป้าหมายของเนื้อเยื่อที่ต้องการให้เกิดจากการเพาะเลี้ยง เช่น ชิ้นส่วนพืชจากต้นเดียวกัน แต่ถ้าต้องการชักนำยอด และรากจะใช้อาหารสูตรต่างกัน

5. สถานะของอาหาร (State of media) ชิ้นส่วนพืชเดียวกัน ถ้าเลี้ยงในอาหารแข็ง (Solid media) ให้ผลต่างกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (Liquid media) หรืออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (Semi-solid media)

**5.1.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ และเนื้อเยื่อพืช**

1. การเพาะเลี้ยงแคลลัส (Callus culture) ในการนำชิ้นส่วนพืชซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงตัวเองในการทำหน้าที่เฉพาะแล้ว (Differentiated cell) มาเพาะเลี้ยง สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ ซึ่งแคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์ที่ยังไม่มีการพัฒนาตัวเองไปทำหน้าที่เฉพาะอย่าง (Undifferentiated cell) แคลลัสมี 2 ชนิด ได้แก่ แคลลัสแบบแน่น (Compact callus) และแคลลัสแบบหลวม (Friable callus) ชนิดแคลลัสที่ชักนำเพื่อประโยชน์ในด้านที่ต่างกัน เช่น การชักนำให้เกิดแคลลัสแน่นเพื่อการผลิตสาร การชักนำให้เกิดแคลลัสหลวมเพื่อการเพาะเลี้ยงให้เกิดอวัยวะต่อไป โดยการชักนำให้เกิดแคลลัสเพื่อประโยชน์ด้านต่างๆ ได้แก่ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ก่อนที่จะเป็นเซลล์เฉพาะอย่าง ใช้เพื่อนำไปชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อตามที่ต้องการต่อไป และเพื่อการผลิตสารผลิตภัณฑ์

2. การเพาะเลี้ยงต้นอ่อน (Embryo culture) มักใช้ในการเพาะเลี้ยงเมื่อเอมบริโอพืชชนิดนั้นมีปัญหาในการเจริญ ได้แก่การพักตัวของเมล็ด เมล็ดเป็นหมัน ระยะเวลาการรอดอายุของต้นอ่อนที่ได้จากการผสมระหว่างพืชต่างสายพันธุ์ (Interspecific หรือ Intergeneric) ซึ่งอาจมีผลจากเอนโดสเปริ์ม (Endosperm) มีการพัฒนาน้อย

3. การเพาะเลี้ยงรังไข่ หรือ เซลล์ไข่ ของพืช (Ovary or Ovule culture) เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงให้ได้พืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว (Haploid plant) เนื่องจากสาเหตุหลายประการ ได้แก่ การสูญเสียเอมบริโอในการผสมพืชต่างสายพันธุ์ การปฏิสนธิในห้องปฏิบัติการ (*in vitro* fertilization) ในการผลิตพืชลูกผสมที่ปัญหาจากสติกมา (Stigma) มีการยับยั้งการเกิดของหลอดละอองเรณู (Pollen tube)

การเพาะเลี้ยงละอองเรณูใช้ในการผลิตพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียวได้เช่นกัน การผลิตพืชที่มีชุดโครโมโซมเป็นสองเท่า (Diploid) ได้ เช่นเมื่อ Uncovering mutation ต้องการให้ลักษณะด้อย (Recessive phenotype) แสดงออกมา ได้

4. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของพืช (Explant culture) ชิ้นส่วนพืช (Explant) เป็นสิ่งที่แยกได้จากพืช ทั้งเซลล์ เนื้อเยื่อ ซึ่งสามารถได้จากอวัยวะ หรือเนื้อเยื่อพืช เช่นเซลล์ หรือเนื้อเยื่อจากใบพืช ยอดพืช

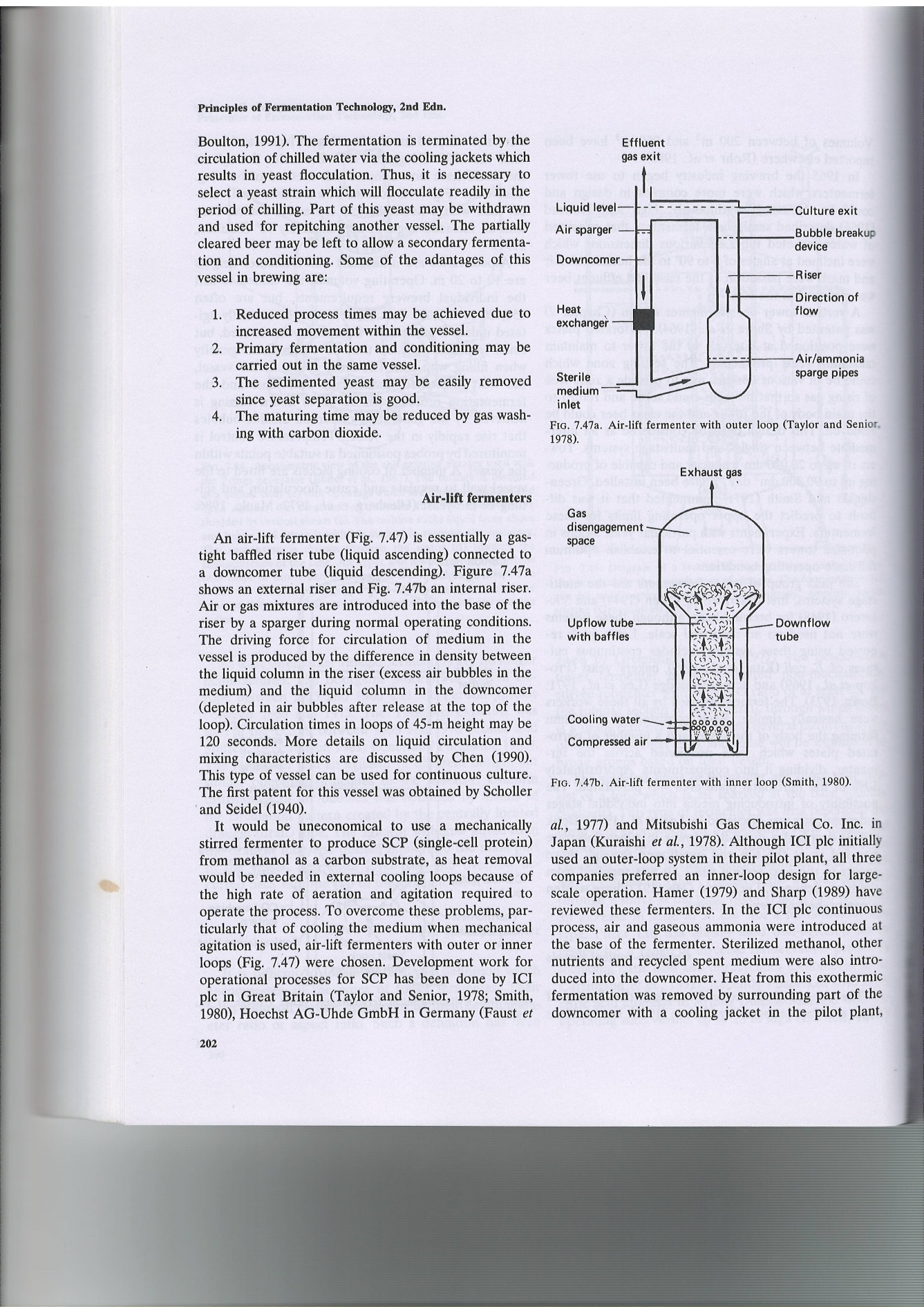
ส่วนของลำต้น ใบเลี้ยง (Cotyledon) ไฮโพคอทิล (Hypocotyl) ส่วนของราก การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเพื่อประโยชน์ต่างๆ ได้แก่การชักนำให้เกิดแคลลัส การชักนำให้เกิดเป็นต้นพืช (Whole plant หรือ Generate plant) โดยไม่ต้องผ่านการชักนำให้เกิดแคลลัสก่อน การผลิตพืชที่ปราศจากไวรัส และป้องกันการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของพืชในระหว่างการเก็บรักษาพันธุกรรม (Germplasm collection)

5. การเพาะเลี้ยงอวัยวะพืช (Organ culture) อวัยวะพืช หรือเนื้อเยื่อ อย่างเช่นราก ลำต้น ใบ เมล็ด รังไข่ ละอองเรณู ขึ้นกับชนิดอวัยวะในการนำมาเพาะเลี้ยง

6. การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาส (Protoplast) เซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์ เรียกว่าโพรโทพลาส (Protoplast) ด้วยการใช้เอนไซม์ เช่นเซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส เพคติเนส ในการสลายผนังเซลล์ เมื่อนำ โพรโทพลาสมาเลี้ยงในสภาวะเหมาะสมจะทำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาได้ใหม่ เป็นเซลล์ปกติแล้วยังสามารถเจริญเป็นต้นพืชได้ จุดประสงค์การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสเพื่อประโยชน์ต่างๆ ได้แก่ การศึกษาทางเมทาบอลิซึม และชีวเคมีด้านอื่นๆ การผลิตพืชลูกผสมด้วยการรวมโพรโทพลาสของพืชต่างชนิด หรือใช้การรวมโพรโทพลาส (Protoplast fusion) และยังใช้ในการศึกษาการถ่ายโอนสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (Electroporation) การถ่ายดีเอ็นเอ หรือการฉีด DNA เข้านิวเคลียสโพรโทพลาสได้โดยตรงด้วยเข็มขนาดเล็ก (Microinjection)

การชักนำให้เกิดต้นพืชมี 2 ชนิด ได้แก่ 1) การชักนำให้เกิดอวัยวะของพืช (Organogenesis) เป็นการชักนำให้เกิดเป็นอวัยวะอย่างยอด และรากพืช ด้วยการใช้ชิ้นส่วนพืช (Explant) ซึ่งปริมาณ หรือสัดส่วนฮอร์โมน และชิ้นส่วนพืช มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอด หรือราก อย่างเช่นการใช้ไซโทไคนินความเข้มข้นสูงสามารถทำให้เกิดยอดได้ 2) การชักนำให้เกิดเอมบริโอ (Somatic embryogenesis) โดยการเพาะเลี้ยง Vegetative cell หรือ Non-gametic cells (Somatic plant tissue นั่นเอง) การชักนำให้เกิด เอมบริโอขึ้นกับฮอร์โมนพืช โดยเฉพาะความเข้มข้นออกซิน และไซโทไคนิน การเพาะเลี้ยงจะทำให้เซลล์ เกิดเป็นไซโกต และพัฒนาต่อจนได้ต้นอ่อน (Somatic embryo) ซึ่งต้นอ่อนนี้พัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ มีคุณสมบัติเหมือนต้นอ่อนที่ได้จากเมล็ดที่เกิดจากการปฏิสนธิ ใช้ในการผลิตเมล็ดสังเคราะห์ (Artificial seed) โดยนำต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงมาหุ้มในพอลิเมอร์อย่างเช่นแคลเซียมอัลจิเนต (Calcium alginate) ซึ่งการผลิตเมล็ดสังเคราะห์สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก Somatic embryos เอมบริโอที่พัฒนาจาก

การเพาะเลี้ยงในสภาวะแขวนลอย (Suspension culture) ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ แคลลัส เนื้อเยื่อ ขนราก รวมถึงส่วนอื่นๆ ของพืช ในอาหารที่เป็นของเหลว ด้วยการเขย่าอย่างต่อเนื่อง ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตสารเมทาบอไลท์ สารทุติยภูมิ การเตรียมเมล็ดสังเคราะห์ สภาวะการเพาะเลี้ยงขึ้นกับชนิดพืช แต่โดยทั่วไปเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที 25 องศาเซลเซียส การเพาะเลี้ยงที่ขนาดใหญ่ขึ้นใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ชนิด Airlift bioreactor ซึ่งแตกต่างกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดอื่นๆ ที่การกวนจะทำให้เซลล์แตกได้



**ภาพที่ 5.1** ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช

ที่มา : Stanbury, 1995 (หน้า 202)

**5.2 การประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**

**5.2.1 Micropropagation**

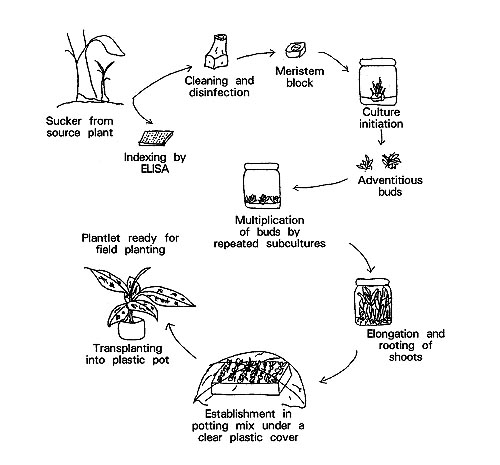
คือการขยายพันธุ์ด้วยการนำเนื้อเยื่อพืชมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ กระตุ้นให้เนื้อเยื่อเจริญไปเป็นต้นพืช (Whole plant) ช่วยให้สามารถเพิ่มปริมาณ (Multiplication) ต้นพืชได้มาก จึงนำมาใช้ประโยชน์เพิ่มเนื้อเยื่อพืชที่ถูกปรับปรุงพันธุ์ทั้งการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม (Genetically modified) และ วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิม (Conventional plant breeding) เพื่อขยายเพิ่มจำนวนต้นอ่อนเล็กๆ หรือยอดอ่อนที่มีราก (Plantlet) นอกจากทางการเกษตร ยังมีประโยชน์การเพิ่มจำนวนพืชป่า และพืชสมุนไพร โดย Micropropagation มี 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. การเริ่มต้น (Initiation) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชที่ฆ่าเชื้อ, ทำลายเชื้อที่ติดมาที่ผิวป้องกันการปนเปื้อน (Contamination) และการย้ายลงในอาหารเพาะเลี้ยง

2. การเพาะลี้ยงให้เกิดยอด และราก โดยชิ้นส่วน (Explant) ที่ใช้เพื่อชักชักนำให้เกิดยอด โดยทั่วไปใช้ส่วนเนื้อเยื่อเจริญ (Meristem) มาเพาะเลี้ยงในอาหาร ซึ่งอาหารอาจเติมฮอร์โมน ในการเพาะเลี้ยงอาจได้แคลลัส หรือ ตา (Bud) หรือยอดอ่อนที่มีราก (Plantlet) หากเกิดเป็นแคลลัสสามารถนำย้ายแคลลัสลงในอาหารชนิดใหม่เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างยอด และทำให้มีการเกิดราก

ซึ่งการเกิดยอด (Shoot initiation หรือ Shoot formation) เป็นการทำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนพืช และเพิ่มจำนวนยอด จากนั้นเป็นการเกิดราก (Root initiation หรือ Root formation) เป็นการทำให้เกิดราก และเพิ่มจำนวนราก ด้วยการย้ายยอดที่ได้ลงบนอาหารใหม่เพื่อการพัฒนาให้มีรากเกิดขึ้น

3. การย้ายปลูก เป็นการย้ายยอดที่รากงอกแล้ว (Plantlet) ลงในกระถางที่มีดินหรือทรายที่ฆ่าเชื้อ หรืออาหารอื่นๆ ในสภาวะควบคุมในห้องปฏิบัติการ หรือเรือนกระจก (Green house) เพื่อเป็นการเตรียมต้นอ่อนให้เคยชิน หรือพร้อม (Hardening) กับสภาวะในเรือนกระจกก่อนการย้ายปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก



**ภาพที่ 5.2** การขยายพันธุ์พืชขนาดเล็ก (Microproopagation)

**5.2.2 ความแปรผันของพันธุกรรม (Somaclonal variation)**

การแปรผันทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบได้จากการเพาะเลี้ยงพืชเป็นระยะเวลานาน เช่นการเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลานาน การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวนานๆ หรือการให้สภาวะเครียดบางอย่าง เพื่อให้เกิดลักษณะตามต้องการ เช่นSalt tolerance Heavy metal tolerance Insect resistance ประโยชน์เพื่อปรับปรุงลักษณะของพืชตามต้องการ เช่น ข้าวโพดต้านทางยาปราบวัชพืช ผลผลิตในข้าวบาร์เลย์ ถั่วเหลือง ได้แก่ ความสูง, การเจริญเติบโต, โปรตีน และไขมัน

Gametoclonal variation เป็นการแปรผันทางพันธุกรรม โดยเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเริ่มแรกมาจากส่วนที่เกี่ยวกับการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศของพืช (Gamete) เช่นละอองเรณู รังไข่

สาเหตุ ความแปรผันทางพันธุกรรมนี้ เป็นการกลายพันธุ์ (Mutation) การกลายพันธุ์นี้ เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของพืชที่ได้มาใหม่ ได้แก่การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมหรือ โครงสร้างในเซลล์ เช่นการจัดเรียงใหม่ของโครโมโซม, การทำซ้ำของจีน (การเพิ่ม Gene copy number) ดังนั้น พืชที่ได้จึงแตกต่างจากพืชชนิดเดิม การกลายพันธุ์ที่มีเกิดขึ้นอย่างสุ่ม จึงไม่สามารถบ่งชี้สายพันธุ์จากเนื้อเยื่อแม่ (Parent tissue) ได้

**5.2.3 สารเคมีจากพืช (Chemical from Plants)**

สารที่ได้จากการเพาะเลี้ยงพืชส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) (Secondary metabolite หรือ Phytochemical) ส่วนสารปฐมภูมิมีการสกัดจากพืชบ้าง สารเคมีที่ได้จากพืชเช่น อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน เทอร์พีน น้ำมัน เป็นพวกสารทุติยภูมิซึ่งพืชมีการสร้างขึ้นมา และทำหน้าที่เฉพาะอย่างในพืชได้ ในปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากสารดังกล่าวเป็นจำนนมาก ตัวอย่างเช่น *Lithospermum erythrorhizon*  สร้างสารสีแดง นำมาใช้ในเครื่องสำอาง และสารยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์

นอกจากนี้ ยังใช้ในการเก็บรักษาเจิร์มพลาส (Germplasm storage) Germplasm คือสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ประโยชน์ของ Germplasm storage เป็นแหล่งเก็บรักษาสารพันธุกรรมของพืชดั้งเดิม ซึ่งมีลักษณะที่ดี ที่สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้

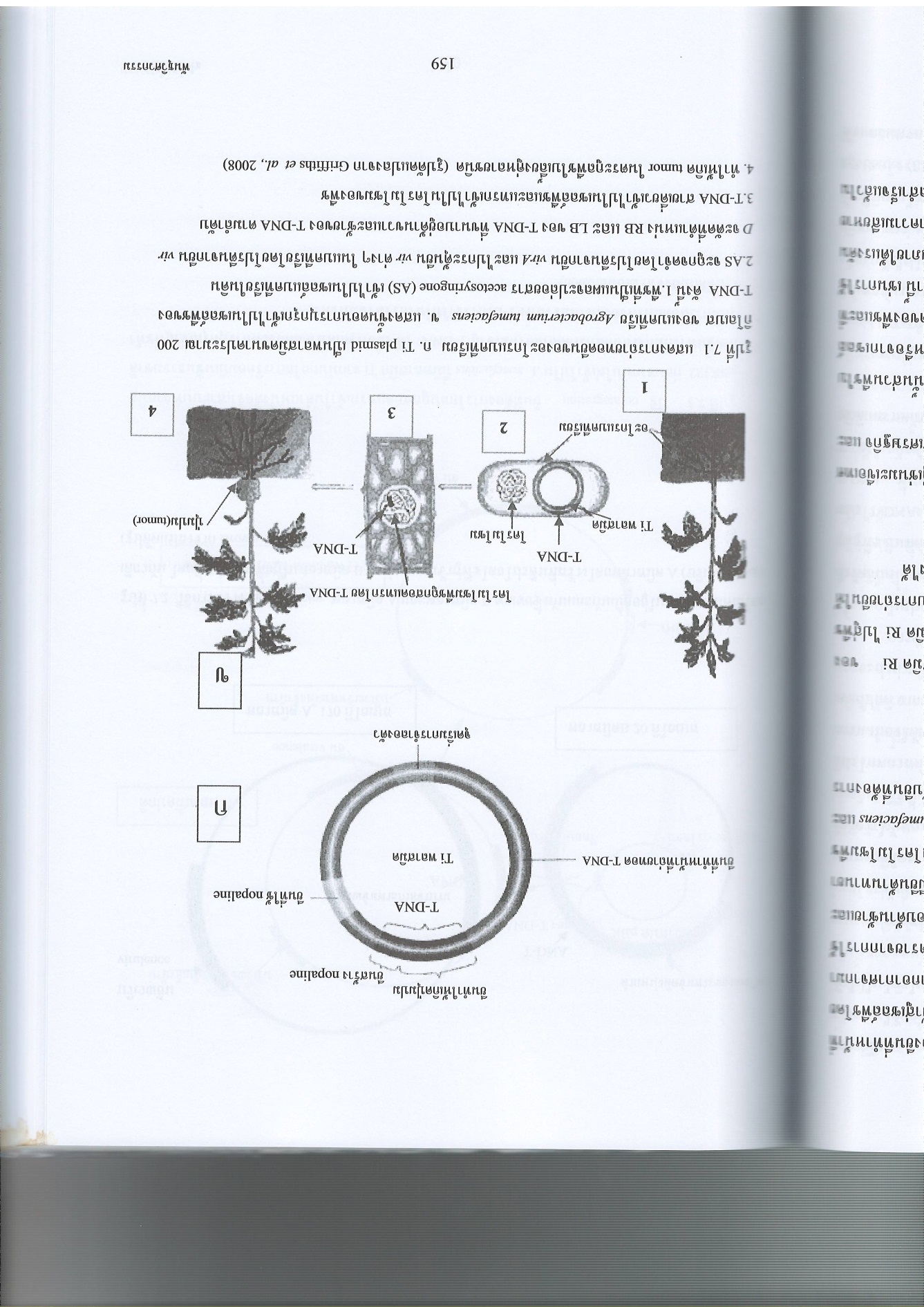
**5.3 พันธุวิศวกรรมพืช (Genetically engineered plants)**

**5.3.1 การถ่ายยีนในพืช (Plant transgenesis)**

การถ่ายยีนในพืช (Plant transgenesis) เป็นการถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่พืช ทำให้เกิดพืชที่มีลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิม จากที่กล่าวมาในเทคนิคพันธุวิศวกรรม การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าเซลล์พืชทำได้ทั้งโดยตรง และให้ไวรัสนำเข้าสู่เซลล์พืช

Ti-plasmid จาก *Agrobacterium tumefacies* บน Ti-plasmid มี T-DNA เป็นบริเวณที่เกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ สร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ยังทำให้พืชที่โดนบุกรุกเกิดการแสดงออกของโรคคือมีปุ่มปมที่บริเวณโคนรากให้เห็น ในเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม มีการนำ Ti-plasmid มาดัดแปลง ด้วยการแทรกชิ้นยีนเข้าในบริเวณที่ทำให้เกิดปุ่มปม แต่ไม่รบกวนยีนที่เกี่ยวกับการบุกรุก การให้ *A*. *tumefacies* บุกรุกเข้าเซลล์พืชได้ด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชในอาหารสังเคราะห์ หรือใช้โปรโทพลาสในอาหารเหลว และยังสามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารที่มีสารคัดแยก เพื่อเลือกเซลล์ที่ได้รับยีนที่สนใจ เมื่อคัดแยกได้แล้วจึงนำมาชักนำให้เกิดเป็นต้น (ภาพที่ 5.3) แต่วิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น *A*. *tumefacies* มีการบุกรุกเฉพาะพืชใบเลี้ยงคู่เท่านั้น การพัฒนาจากโปรโทพลาสเป็นต้นทำได้ค่อนข้างยาก จึงมีการพัฒนาวิธีการอื่นๆ เช่นการยิงดีเอ็นเอ ที่หุ้มด้วยอนุภาคทอง หรือทังสเตนภายใต้แรงดันก๊าซฮีเลียม ด้วยเครื่องยิงอนุภาค เข้าไปที่เซลล์พืช หรือเอมบริโอ

การใช้ Ti-plasmid ยังมีวิธีการที่คล้ายกันคือการใช้พลาสมิด Ri ที่ได้จาก *A. rhizogenes* มีหลักการคล้ายกัน แตกต่างกันที่การถ่ายทอด Ri plasmid ไม่ก่อให้เกิดปุ่มปมพืช แต่ทำให้เกิดรากฝอยแทน และมีข้อจำกัดเช่นเดียวกับการใช้ Ti-pasmid การถ่ายยีนในพืชมีหลายวิธีนอกจากที่กล่าวมายังมีวิธีอื่นๆ เช่น การถ่ายยีนโดยตรงด้วยเครื่องยิงอนุภาค การใช้พาหะที่มีพื้นฐานจากไวรัส การทำพันธุวิศวกรรมในคลอโรพลาสต์



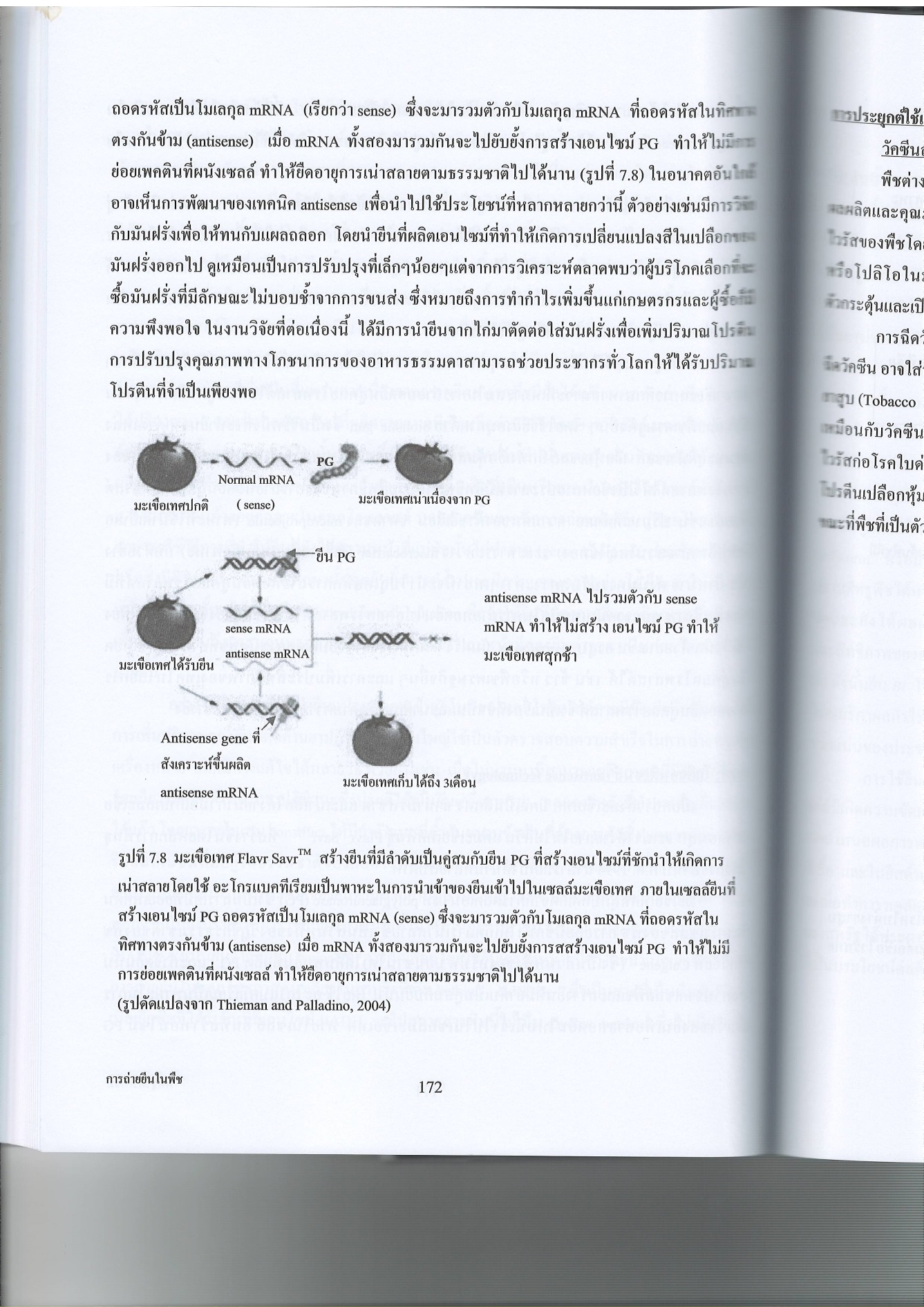
**ภาพที่ 5.3** การถ่ายทอดยีนของ *A. bacterium*

ที่มา : ศิริลักษณ์, 2552 (หน้า 159)

**5.3.2 การประยุกต์ใช้พันธุวิศวกรรมในพืช**

พันธุวิศวกรรมในพืชทำให้เกิดพืชชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติต่างไปจากพืชเดิม ปัจจุบันมีการพัฒนาเพื่อประโยชน์ในด้านการเกษตร คุณค่าทางโภชนาการ เทคโนโลยีแอนติเซนส์ (Antisense technology) เป็นเทคนิคที่ทำได้สำเร็จในมะเขือเทศ เพื่อยืดอายุให้เก็บไว้ได้นานมากขึ้น โดยปกติมะเขือมีการผลิตเอนไซม์ พอลิกาแลคทูโรเนส (Polygalacturonase; PG) เป็นเอนไซม์ทำให้เพคตินย่อยสลาย จึงนำไปสู่การเน่าเสีย การค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องดังกล่าว แล้วนำออกไปแล้วสร้างยีนที่มีเบสคู่สมกับยีนนั้นแทน จึงมีการนำยีนใหม่นี้เข้าไปในมะเขือเทศ ยีนที่สร้างเอนไซม์ดังกล่าวจะถูกถอดรหัสออกมาเป็น mRNA ซึ่งเรียกว่า Sense และจะมารวมกับอีกยีนที่ถอดรหัสได้ mRNA ในทิศทางตรงกันข้าม ซึ่งเรียกว่า Antisense ดังนั้นเมื่อ Antisense RNA จับกับ Sense mRNA จึงทำให้ไม่เกิดการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวนั่นเอง (ภาพที่ 5.4)

การใช้พันธุวิศวกรรมในด้านการสร้างวัคซีนในพืชให้ต้านทางโรคด่างวงแหวน ความต้านทานแมลง เช่นฝ้าย Bt การสร้างเส้นใยพืชให้แข็งแรง การเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เช่น ข้าวสีทอง (Golden rice) ซึ่งมีเบตาแคโรทีน ที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินเอ



**ภาพที่ 5.4** มะเขือเทศที่ได้จาก Antisense technology

ที่มา : ศิริลักษณ์, 2552 (หน้า 172)

**5.4 บทสรุป**

การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชเป็นเทคนิคในการเพาะเลี้ยงส่วนของพืช ในอาหารสังเคราะห์ ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งในทางเทคโนโลยีชีวภาพนำเทคนิคนี้มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช เพื่อประโยชน์ทั้งในแง่การผลิตผลิตภัณฑ์จากพืช และร่วมด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมด้วย อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์พืชสำคัญต่อการชักนำให้ได้ชิ้นส่วนตามต้องการ ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน วิตามิน แร่ธาตุ และฮอร์โมน หรือสารควบคุมการเจริญในพืช ซึ่งการเหนี่ยวนำให้เกิดชิ้นส่วนของพืชได้แก่ การชักนำให้เกิดยอด การชักนำให้เกิดราก การชักนำให้เกิดอวัยวะของพืช การชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่ยังไม่มีการแบ่งตัวไปทำหน้าที่เฉพาะ หรือยังไม่เป็นเนื้อเยื่อเฉพาะในพืช ส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อตามต้องการด้วยเช่นกัน การใช้ประโยชน์ในทางเทคโนโลยีชีวภาพพืช ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเซลล์พืช เพื่อการผลิตสารที่ต้องการ การชักนำให้เกิดเป็นต้น เพื่อการชักนำต้นพืชจากการถ่ายจีน การเพาะเลี้ยงแคลลัส เพื่อประโยชน์ในการสรร้างสารสำคัญจากพืช และการถ่ายจีน การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสเพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์ของพืช เป็นต้น

**คำถามท้ายบทที่ 5**

1. จงบอกปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำเนื้อเยื่อพืช

2. ท่านคิดว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์พืชกับจุลินทรีย์ต่างกันหรือไม่ อย่างไร

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชในอาหารเหลวและอาหารแข็งต่างกันหรือไม่ อย่างไร

4. ปัจจัยใดมีอิทธิพลต่อการชักนำจากแคลลัสให้เกิดยอด

5. ท่านมีหลักการอย่างไรในการเลือกผลิตสารจากจุลินทรีย์ หรือเซลล์พืช

6. จงบอกประโยชน์การเพาะเลี้ยงเซลล์พืช

7. จงอธิบายหลักการ Antisense technology

8. ท่านนำวิธีการ Micropropagation มาใช้ร่วมกับเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมพืชได้อย่างไร

**เอกสารอ้างอิง**

ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม. (2552). **พันธุวิศวกรรม:วิธีการและการประยุกต์ใช้.**

สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

Nair A.J. 2007. **Principles of Biotechnology**. Laxmi publication (P) Ltd. New Delhi. India.

Pathak R. 2007. **Introduction to Biotechnology**. Atlantic publisher & distributor (P) Ltd.

Rajouri Garden, New Delhi, India.