หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ข้าวเป็นพืชอาหารหลักที่สำคัญที่สุดของคนไทยและหลาย ๆ ประเทศในโลก สำหรับประเทศไทยมี ข้าวเป็นพืชคู่บ้านคู่เมืองมาแต่โบราณดังจะเห็นได้จากหลักศิลาจารึกในสมัยพ่อขุนรามคำแหงที่กล่าวว่า "เมืองสุโขทัยนี้ดี ในน้ำมีปลาในนามีข้าว" นอกจากนี้ข้าวยังเป็นสินค้าเกษตรที่ทำเงินรายได้เข้าประเทศเป็นอันดับหนึ่งมาตลอด ปีพ.ศ. 2529 มีการส่งออกข้าวไปจำหน่ายต่างประเทศได้ทั้งสิ้น 4.32 ล้านตัน มูลค่า 1.93 หมื่นล้านบาท (ฝ่ายวิชาการธนาคารกสิกรไทย, 2530 : สำนักงานคณะกรรมการสำรองอาหารแห่งอาเซียน กรมการค้าต่างประเทศ, 2530) และเมื่อเราเปรียบเทียบผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ของประเทศไทยกับประเทศอื่น ๆ เช่น สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และเกาหลีใต้ ซึ่งเป็นแหล่งผลิตข้าวที่สำคัญของโลกเช่นกัน พบว่าประเทศดังกล่าวมีค่าของผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่สูงกว่าประเทศไทยถึง 3 เท่าทั้ง ๆ ที่เราใช้เนื้อที่เพาะปลูกมากกว่าประมาณ 6 เท่า (ศูนย์สถิติการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2529) ปีพ.ศ. 2530 มีการส่งออกข้าวไปจำหน่ายต่างประเทศได้ทั้งสิ้น 4.36 ล้านตัน มูลค่า 22.2 หมื่นล้านบาท (สำนักงานคณะกรรมการสำรองอาหารแห่งอาเซียน กรมการค้าต่างประเทศ, 2531) แสดงให้เห็นภาวะไม่คงที่ในมูลค่าทางเศรษฐกิจของข้าว

จากสภาพของปัญหาที่เกิดขึ้นเหล่านี้ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อให้ได้ข้าวลักษณะใหม่ ๆ ที่จะช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น (วีรวุฒิ กตัญญูกุล, 2526) เช่น พันธุ์ข้าวที่ต้านทานโรคและแมลงต่าง ๆ พันธุ์ข้าวที่สามารถเจริญได้ดีในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ได้แก่ ดินเค็ม ดินเปรี้ยว และในพื้นที่ที่แห้งแล้ง เป็นต้น

เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคโนโลยีชีวภาพสาขาหนึ่ง ซึ่งสามารถนำมาใช้ประยุกต์กับโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชได้เป็นอย่างดี เนื่องจากวิธีนี้ ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายกว่าวิธีปรับปรุงพันธุ์พืชแบบมาตรฐานมาก สามารถคัดเลือกพันธุ์ใหม่ได้ภายในเวลา 1-3 ปี จากพันธุ์เดิมที่มีคุณสมบัติหลายอย่างที่ดี (มนทกานติ วัชราภัย, 2527 : Evans, Sharp and Bravo, 1984) ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเราพบว่ามีการเกิด somatic variation ได้

กลุ่มเซลล์หลายร้อยล้านเซลล์ที่เลี้ยงในหลอดทดลองมีโอกาสผันแปรทางพันธุกรรมได้เองตามธรรมชาติ และแต่ละเซลล์เหล่านี้มีโอกาสที่จะเจริญไปเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ (totipotency) ดังนั้นโอกาสที่จะได้พืชต้นใหม่ที่ผันแปรไปจากเดิมก็ย่อมมีมากผิดกับเซลล์ที่อยู่ในต้นซึ่งมีจำนวนน้อยมากที่อยู่ในตำแหน่งที่จะกลายไปเป็นต้นใหม่ได้ (Murashige, 1974 : Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1974) การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเริ่มได้รับความสนใจเมื่อประมาณ 10 ปีมาแล้ว พบว่าขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของพวกธัญญพืช ได้แก่การชักนำยีนส่วนต่าง ๆ ของธัญญพืชไปเป็นแคลลัส และการชักนำให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1986) นอกจากนั้นต้นข้าวที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อจะแสดงการแปร (variation) เกิดขึ้นด้วย (Oono,1978 : Yamada and Loh, 1984)

ความรู้เกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก็มีความสำคัญมากในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีความต้องการปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญและพัฒนาการแตกต่างกัน Gamborg และ Shyluk (1981) เสนอว่าความสำเร็จในการนำวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้หรือประยุกต์อย่างกว้างขวางได้ ต้องทราบสูตรอาหารที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชนั้นต้องการเป็นอย่างดี แต่การศึกษาผลของสารออสโมติคัม (osmoticum) ที่เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีอยู่น้อยมาก ทั้ง ๆ ที่ผลของการเปลี่ยนแปลงค่าออสโมติกโพเทนเชียล (osmotic potential) ของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้มีผลต่อการเจริญและพัฒนาการของพืช (Staba, 1980)

<u>วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย</u>

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของออสโมติคัมที่มีผลต่อการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโดยศึกษาการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสข้าวในขณะที่มีสารออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กัน

การสำรวจเอกสาร

น้ำเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของพืช พืชยืนต้นมีน้ำอยู่ประมาณร้อยละ 50 ของน้ำหนักสดส่วนพืชล้มลุกค่านี้จะสูงถึงร้อยละ 80-90 การเจริญและพัฒนาการของพืชจำเป็นต้องใช้น้ำ เซลล์พืชได้รับน้ำโดยกระบวนการออสโมซิสเป็นส่วนใหญ่ การแพร่ของน้ำเข้าหรือออกจากเซลล์ขึ้นกับความแตกต่างของค่าวอเทอร์โพเทนเชียล (water potential) โดยน้ำจะแพร่จากบริเวณที่มีวอเทอร์โพเทนเชียลสูงไปยังบริเวณที่มีวอเทอร์โพเทนเชียลต่ำ สาเหตุสำคัญที่ทำให้ค่าวอเทอร์โพเทนเชียลของน้ำต่างกันมี 2 ประการคือ ประการแรก เนื่องจากมีตัวถูกละลายแทรกปะปนอยู่ เรียกส่วนของวอเทอร์โพเทนเชียลที่ลดลงเนื่องจากตัวถูกละลายว่า ออสโมติก-โพเทนเชียล (osmotic potential) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าศูนย์หรือค่าลบเสมอ และค่าออสโมติกโพเทนเชียลนี้แปรตามความเข้มข้นของตัวถูกละลาย ประการที่สอง เนื่องจากน้ำได้รับแรงดัน (pressure) หรือแรงดึง (tension) เพิ่มขึ้น เรียกส่วนของวอเทอร์โพเทนเชียลที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากแรงดันหรือลดลงเนื่องจากแรงดึงว่า เพรสเชอร์โพเทนเชียล (pressure potential) ซึ่งอาจมีค่าเป็นบวกหรือลบก็ได้ (Simpson, 1981; Street and Opik, 1984)

สำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การแพร่ของน้ำเข้าสู่เซลล์หรือเนื้อเยื่อขึ้นกับความสัมพันธ์ของค่าวอเทอร์โพเทนเชียลระหว่างของเหลวในแวคคิวโอลกับอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อเช่นเดียวกัน ปัจจัยหลักของอาหารที่มีผลต่อการใช้น้ำของเซลล์และเนื่อเยื่อพืชคือ ความเข้มข้นของวุ้น น้ำตาล และออสโมติคัมอื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาโบลิซึม ในสภาพที่วุ้นอาหารแข็งตัว อนุภาคของวุ้นอยู่ในสภาพคอลลอยด์ (colloid) กระจัดกระจายทั่วไปทำให้มีคุณสมบัติในการดูดน้ำเข้ามาในช่องว่างระหว่างอนุภาควุ้น (Levitt, 1974) ส่วนน้ำตาลนอกจากเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในกระบวนการเมตาโบลิซึมแล้วยังมีความสำคัญในการควบคุมออสโมติกโพเทนเชียลของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับสารประกอบบางชนิดที่ไม่ใช้หรือใช้บ้างในกระบวนการเมตาโบลิซึม ซึ่งเราเรียกว่า ออสโมติคัม (Brown, Leung and Thorpe, 1979; Brown and Thorpe, 1980)

ออสโมติคัม คือสารควบคุมกระบวนการเกิดออสโมซิส ซึ่งมีผลต่อค่าออสโมติกโพเทนเชียลของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือเป็นสารที่ช่วยรักษาสมดุลย์ออสโมซิสในการเลี้ยงเซลล์และโปรโตพลาสต์

เพื่อป้องกันการเกิดพลาสโมไลซีส หรือการแตกของเซลล์และโปรโตพลาสต์ (Devlin and Witham, 1983; Dodds and Roberts, 1985) ในการทดลองใช้ออสโมติคัม 3 ชนิด ได้แก่ mannitol sorbitol และ polyethylene glycol 6000 (PEG 6000)

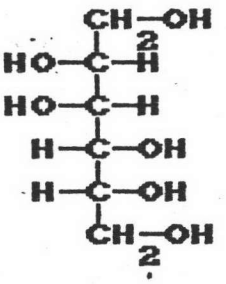
mannitol (mannite) และ sorbitol (glucitol) เป็นแอลกอฮอล์น้ำตาล (sugar alcohol) ซึ่งมีโครงสร้างแบบลูกโซ่ตรง (straight-chain) จัดอยู่ในกลุ่ม hexitols ผลึกสีขาว รสหวาน สูตรโมเลกุลคือ $C_6H_{14}O_6$ มวลโมเลกุล 182.17 แต่มีสูตรโครงสร้างต่างกัน (ภาพที่ 1) mannitol มีคุณสมบัติละลายได้ดีในน้ำ ละลายในแอลกอฮอล์และเอไมด์ ได้บ้างแต่ไม่ละลายในสารละลายอินทรีย์อื่น ๆ sorbitol มีคุณสมบัติละลายได้ดีในน้ำ กลีเซอรอล และ โพรพายลีน ไกลคอล ละลายในแอลกอฮอล์ กรดอะซีติก ฟีนอลและอะเซทตามีด แต่ไม่ละลายในสารละลายอินทรีย์อื่น ๆ เราใช้ mannitol กับ sorbitol ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอาง ลิ่งทอ และโพลีเมอร์

Polyethylene glycol มีชื่อทางการค้าว่า carbowax เป็นโพลีเมอร์ของ ethylene glycol โครงสร้างเป็นแบบลูกโซ่ตรง สูตรโมเลกุลคือ $HOCH_2(CH_2OCH_2)_xCH_2OH$ ค่า X จะแปรตามมวลโมเลกุล จึงทำให้มีมวลโมเลกุลหลายค่า สำหรับ PEG 6000 มีค่า X เริ่มจาก 135 ถึง 169 (ภาพที่ 1) ผลึกสีขาว ละลายในน้ำและสารละลายอินทรีย์หลายชนิด มีการใช้ PEG 6000 ในอุตสาหกรรมลิ่งทอ อาหาร เครื่องสำอาง ยา และเซรามิกส์ (Windholz, 1976; Gautreaux et al, 1980; Steuter et al; 1981)

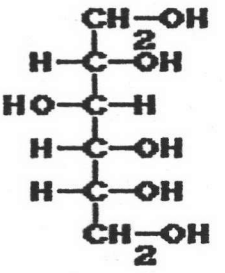
ในด้านสรีรวิทยาของพืชได้มีผู้นำออสโมติคัม มาใช้ศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับน้ำมานานแล้ว (Jackson, 1962; Stout et al, 1980) ต่อมาเมื่อเทคโนโลยีการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญขึ้น จึงมีการใช้ออสโมติคัมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งสามารถจำแนกการใช้ออสโมติคัมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดังนี้

1. <u>การศึกษาผลของค่าออสโมติกโพเทนเชียลขององค์ประกอบในสูตรอาหารต่อการเลี้ยงเนื้อเยื่อ</u>

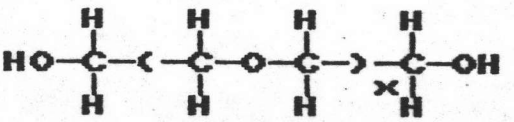
การศึกษาเกี่ยวกับผลของค่าออสโมติกโพเทนเชียลขององค์ประกอบในสูตรอาหารต่อการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้มีการใช้สารปรับค่าออสโมติกโพเทนเชียลที่เรียกว่าออสโมติคัมเติมลงในอาหาร ซึ่งจะไปมีผลทำให้ค่าออสโมติกโพเทนเชียลของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชลดต่ำลง ผลจาก



d-mannitol



d-sorbitol



Polyethylene Glycol 6000
(x = 135-169)

ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของออสโมติคัมที่ใช้ในการทดลอง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การลดค่าออสโมติกโพเทนเชียลของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้เองทำให้พบการเปลี่ยนแปลงในด้านการเจริญและกระบวนการเมตาโบลิซึมของพืช (Staba, 1980; Pence et al, 1981; Berkowitz, 1987) การปรับออสโมติกโพเทนเชียลอาจใช้ออสโมติคัมซึ่งสามารถแตกตัวเป็นไอออน (ionic osmoticum) เช่น NaCl KCl และ Na_2SO_4 หรือออสโมติคัมที่ไม่แตกตัวเป็นไอออน (non-ionic osmoticum) เช่น ซูโครส mannitol และ PEG 6000 เติมลงในอาหาร (Heyser and Nabors, 1981; Pua et al., 1985) Terao และ Inouye (1980) ทดลองศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวที่มีค่าวอเทอร์โพเทนเชียลต่ำต่อการเจริญของ mesocotyl ของต้นกล้าข้าวในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้อาหารที่ไม่มีหรือมี mannitol 10 ถึง 100 กรัมต่อลิตรเลี้ยงต้นกล้าของข้าว พบว่าการยืดตัวของ mesocotyl เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี mannitol 25 ถึง 40 กรัมต่อลิตร และมีค่าของการยืดตัวสูงสุดที่ 30 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าวอเทอร์โพเทนเชียลของอาหารวุ้นเท่ากับ -14.14 atm. แต่การยืดตัวของ coleoptile จะลดลงเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี mannitol 40 กรัมต่อลิตร การศึกษาโดยวิธีทางไมโครเทคนิคทำให้ทราบว่า การยืดตัวของ mesocotyl ของต้นกล้าข้าวในขณะที่มีค่าวอเทอร์โพเทนเชียลต่ำเป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมากมาย

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของออสโมติคัมในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์และเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด Murashige และ Skoog (1962) ปรับปรุงสูตรอาหารเพื่อเพิ่มการเจริญของแคลลัสยาสูบ เขาใช้ซูโครส 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร เติมลงในอาหาร พบว่า ซูโครส 30 กรัมต่อลิตรช่วยให้แคลลัสเจริญได้ดีกว่าที่ 20 หรือ 40 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองนี้คล้ายกับ Schenk และ Hildebrandt (1972) ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับสูตรอาหารในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่หลายชนิด ผู้วิจัยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเป็น 40 กรัมต่อลิตรหรือมากกว่าในอาหารแคลลัสมีการเจริญช้า ถ้าให้ความเข้มข้นเป็น 30 กรัมต่อลิตร แคลลัสมีการเจริญดีที่สุด เขาคาดว่าเป็นผลจากค่าออสโมติกโพเทนเชียลของอาหาร ดังนั้นถ้าต้องการเก็บรักษาหรือชะลอการเจริญของแคลลัสควรใช้ซูโครสความเข้มข้นสูง และการใช้ออสโมติคัมที่ไม่สามารถแพร่ผ่านเซลล์เมมเบรนได้อาจให้ผลดีกว่าซูโครสเนื่องจากออสโมติคัมนี้ยังคงแสดงผลตอดระยะการเจริญของแคลลัสโดยไม่ถูกนำไปใช้

ในปีต่อมา Ohira และคณะ (1973) ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการเจริญของเซลล์ข้าว เขาใช้ซูโครส์เติมลงในอาหาร 10 ถึง 50 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร น้ำหนักแห้งลดลงร้อยละ 10 ถึง 20 และที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรลดลงร้อยละ 10 เมื่อเทียบกับความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้การเจริญดีที่สุด กลูโคส์และฟรุกโตส์ ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร สามารถใช้ทดแทนซูโครส์ได้เช่นเดียวกัน อีก 2 ปีถัดมา Kimball และคณะ (1975) ศึกษาผลของออส์โมติกโพเทนเชียลต่อการเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลือง พบว่าการลดลงของออส์โมติกโพเทนเชียลด้วยการเติม mannitol sorbitol กลูโคส์หรือซูโครส์ลงในอาหารทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลงและรูปร่างกลม เมื่อเทียบกับเซลล์ที่อยู่ในอาหารที่ไม่มีออส์โมติคัม ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าและรูปร่างยาวหรือไม่แน่นอน การเติมออส์โมติคัมช่วยให้แคลลัส์เจริญดี โดยเฉพาะเมื่อใช้ mannitol และ sorbitol 73-87 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อหาค่าออส์โมติกโพเทนเชียลจะได้ประมาณ -7.89 ถึง -11.84 atm. การควบคุมออส์โมติกโพเทนเชียลของอาหารมีผลต่อการเจริญของแคลลัส์แต่ไม่มีผลต่อการเกิดหน่อใหม่ของแคลลัส์ถั่วเหลือง แต่สำหรับแคลลัส์ของยาสูบ การเติมซูโครส์ 30 กรัมต่อลิตรลงในอาหารช่วยเพิ่มการเจริญของแคลลัส์และการเกิดหน่อใหม่ด้วย (Brown et al, 1979)

ในปี 1984 Kishor และ Reddy (1984) เลี้ยงแคลลัส์ที่ได้จากรากและเอมบริโอของข้าวพันธุ์ Bala บนอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส์และ/หรือ sorbitol และ/หรือ mannitol 20 กรัมต่อลิตร พบว่าการมีซูโครส์กับ sorbitol หรือ mannitol ช่วยให้แคลลัส์ข้าวเจริญดีและแข็งแรงกว่าการใช้ซูโครส์เพียงชนิดเดียว เมื่อทดลองใช้ซูโครส์จาก 0 ถึง 100 กรัมต่อลิตร พบว่า ความเข้มข้นที่ให้การเกิดยอดดีที่สุดคือ 20 กรัมต่อลิตร อีก 2 ปีถัดมา Galiba และ Erdei (1986) ใช้ออส์โมติคัมหลายชนิดเติมลงในอาหารเลี้ยงแคลลัส์ข้าวสาลี พบว่าแคลลัส์เจริญดีที่สุดและเปลี่ยนแปลงเป็นหน่อใหม่ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีซูโครส์ 19.85 กรัมต่อลิตร การใช้ซูโครส์ความเข้มข้นสูงกว่านี้จะลดทั้งการเจริญและการเปลี่ยนแปลงเป็นหน่อใหม่ และถ้าความเข้มข้นของซูโครส์ต่ำกว่า 9.93 กรัมต่อลิตรไม่พบการเกิด greenspot และหน่อใหม่ เมื่อใช้ mannitol ร่วมกับซูโครส์ช่วยให้การเกิดหน่อใหม่ดีขึ้น การลดลงของออส์โมติกโพเทนเชียลทำให้แคลลัส์สูญเสียความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นหน่อใหม่

นอกจากการใช้ออสโมติคัมศึกษาผลต่อการเจริญและพัฒนาของแคลลัสแล้วยังมีผู้สนใจนำมาศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาเอมบริโอด้วย การศึกษาผลของออสโมติคัมต่อการเจริญและพัฒนาเอมบริโออาจทำให้เราได้คำตอบเกี่ยวกับสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอเพื่อให้สามารถจำลองภาวะที่คล้ายคลึงกับสารละลายในโอวูลของพืชชนิดนั้น ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้กับการผลิตเมล็ดพืชเทียม (artificial seed) ได้ เซลล์ของแครอทป่าที่เลี้ยงในอาหารที่มีออสโมติคัมชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรเป็นเวลา 14 วัน พบว่าการเจริญในอาหารที่มีกลูโคสฟรุกโตสและแมนโนสต่ำกว่าซูโครสและต่ำที่สุดเมื่อใช้กาแลคโตส จำนวนของเอมบริโอกับต้นพืชที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่ใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวต่ำกว่าเมื่อใช้ซูโครสแต่จำนวนของบริโอต่อน้ำหนักแห้งมากกว่า ซึ่งคาดว่าช่วงของการเจริญอาจมีผลต่อน้ำหนักแห้งและจำนวนเอมบริโอ เมื่อทดลองวัดการเจริญในช่วง 13 ถึง 27 วัน พบว่า การเจริญ (น้ำหนักแห้ง) มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับจำนวนเอมบริโอโดยไม่จำกัดต่อออสโมติคัมที่ใช้ สัดส่วนระหว่างการเจริญและจำนวนเอมบริโอไม่ขึ้นกับชนิดของออสโมติคัม ดังนั้นออสโมติคัมอาจถูกใช้เป็นสารเมตาโบลิซึมผ่านตัวกลางซึ่งสามารถสร้างได้ในอัตราที่ต่างกันจากออสโมติคัมที่ต่างกัน อัตราการเปลี่ยนออสโมติคัมไปเป็นสารตัวกลางนี้อาจควบคุมการเจริญและการสร้างเอมบริโอของแครอทป่า กาแลคโตสให้การเจริญต่ำและเอมบริโอน้อย คาดว่าเป็นเพราะมีการเปลี่ยนไปเป็นสารตัวกลางได้ช้า หรือเซลล์มีการปรับตัวเพื่อจะเจริญในออสโมติคัมชนิดนี้เป็นไปอย่างช้า (Ammirato and Steward, 1971; Verma and Dougal, 1977)

การลดค่าออสโมติกโพเทนเชียลของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยการเติมออสโมติคัม มีผลยับยั้งการเจริญและการสร้างรงควัตถุแอนโทไซยานินของเอมบริโอแครอท แต่ช่วยให้มีการเกิดเอมบริโอและการเปลี่ยนแปลงกระบวนการสังเคราะห์สารบางชนิด เช่น กรดไขมัน แวกซ์ ของ Theobroma cacao และ Simmondsia chinensis (Ammirato, 1985:1987; Wang and Janick, 1986)

ในปี 1987 Close และ Ludeman ศึกษาผลของการควบคุมค่าออสโมติกโพเทนเชียลต่อการชักนำเอมบริโอของข้าวโพด พบว่าสภาพของค่าออสโมซิสในอาหารมีผลต่อการเกิดเอมบริโอ การเติม mannitol หรือ ซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ ทำให้ความถี่ของการเกิดเอมบริโอเปลี่ยนแปลงโดยทั่วไปถ้าใช้ mannitol ร่วมกับซูโครสจะช่วยเพิ่มความถี่ของการเกิดเอมบริโอของข้าวโพด ความถี่ของการเกิดเอมบริโอมีค่าสูงสุดเมื่อใช้ซูโครสชนิดเดียว 90 -

120 กรัมต่อลิตร หรือใช้ซูโครสความเข้มข้น 30 - 60 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ mannitol 16 - 32 กรัมต่อลิตร

2. <u>การแยก การเลี้ยง และการรวมโปรโตพลาสต์</u>

การรักษาสมดุลย์ออสโมซิสเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ เนื่องจากเซลล์ซึ่งก่อให้เกิดแรงดันของผนังเซลล์ต่อโปรโตพาสต์ที่อยู่ภายในเป็นผลให้ไม่เกิดการแพร่ของน้ำเข้ามาในเซลล์มากเกินไปจนทำให้เซลล์แตก ก่อนที่จะเอาผนังเซลล์ออกจึงควรแช่เซลล์ในสารละลายที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับความเข้มข้นของโปรโตพลาสซึม การแยกโปรโตพลาสต์จึงต้องมีสารปรับค่าออสโมติกโพเทนเชียลเพื่อรักษาสมดุลย์ออสโมซิสในสารละลายเอนไซม์ในสารละลายที่มีสมดุลย์ออสโมซิสเหมาะสมโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จะมีลักษณะกลม แต่ถ้าความเข้มข้นของสารละลายภายนอกต่ำ อาจทำให้โปรโตพลาสต์แตกหรือเกิดการรวมกันของหลาย ๆ โปรโตพลาสต์เป็นโปรโตพลาสต์ที่มีหลายนิวเคลียส และถ้าความเข้มข้นของสารละลายภายนอกสูงแม้จะป้องกันการแตกของโปรโตพลาสต์หรือการออกหน่อ (budding) แต่อาจมีผลยับยั้งการแบ่งตัวในภายหลัง ค่าออสโมติกโพเทนเชียลสามารถปรับเปลี่ยนโดยการเติมออสโมติคัมชนิดต่าง ๆ ลงในสารละลาย ซึ่งอาจเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาโบลิซึม เช่น ซูโครส กลูโคส หรือเป็นสารที่ใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมบ้าง เช่น mannitol และ sorbitol ทั้ง mannitol และ sorbitol เป็นออสโมติกคัมที่นิยมใช้มาก อาจใช้เพียงชนิดเดียวหรือใช้ผสมกัน ความเข้มข้นที่ใช้โดยทั่วไปคือ 80 - 140 กรัมต่อลิตร (Burger and Hackett, 1982; Bhojwani and Razdan, 1983; Evans and Bravo, 1983 a, b; Dodds and Roberts, 1985)

โปรโตพลาสต์ที่แยกได้แล้วยังต้องการการรักษาสมดุลย์ออสโมซิสอยู่ ขณะที่เลี้ยงในอาหาร จนกระทั่งสามารถสร้างผนังเซลล์ที่แข็งแรง ออสโมติคัมที่นิยมใช้ในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์คือ mannitol sorbitol ซูโครสและกลูโคส ซึ่งอาจใช้เพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดผสมกัน (Saxena et al, 1982; Haberlach et al., 1985) โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่ใช้เวลาประมาณ 7 ถึง 10 วัน สำหรับการสร้างผนังเซลล์และเริ่มมีการแบ่งเซลล์นับจากเริ่มเลี้ยง Takeuchi และ Komanine (1982) พบว่าโปรโตพลาสต์ของ <u>Vinca rosea</u> มีการแบ่งตัวดีที่สุดเมื่อใช้ mannitol 73 กรัมต่อลิตร ถ้าให้ความเข้มข้นต่ำหรือสูงกว่า 54 หรือ 90 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โปรโตพลาสต์มีการแบ่งตัวไม่ถึงร้อยละ 10 แต่ถ้าใช้กลูโคสในการเลี้ยง

โปรโตพลาสต์ของ Malus xdomestica แล้วความเข้มข้นที่ช่วยให้มีการแบ่งเซลล์ที่ดีที่สุดคือ 60 กรัมต่อลิตร (Kouider et al., 1984) เมื่อโปรโตพลาสต์แบ่งตัวและสร้างโคโลนี ค่าร้อยละของโปรโตพลาสต์ที่เจริญเป็นโคโลนีต่อโปรโตพลาสต์เริ่มต้นเรียกว่า plating efficiency Muhlbach และ Thiele (1981) พบว่าการใช้ mannitol แทนกลูโคสในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบมะเขือเทศ ทำให้ค่า plating efficiency ลดลงจากร้อยละ 20 เหลือร้อยละ 8 แสดงให้ทราบว่าออสโมติคัมต่างชนิดกันมีผลต่อการเจริญของโปรโตพลาสต์ เซลล์ที่ได้จากโปรโตพลาสต์ของยาสูบไม่มีการแบ่งเซลล์หรือแบ่งตัวน้อยมากเมื่อใช้กาแลคโตส หรือฟรุกโตส เป็น ออสโมติคัม ทำให้ค่า plating efficiency เท่ากับหรือใกล้เคียงกับศูนย์ (Caboche, 1980; Douglas et al., 1981 a) วิธีเพิ่มการแบ่งเซลล์และช่วยให้เซลล์เจริญเป็นโคโลนีได้ดีทำได้โดยการเพิ่มค่าออสโมติกโพเทนเชียล คือการลดความเข้มข้นของออสโมติคัม เนื่องจากการมีความเข้มข้นของออสโมติคัมสูง เซลล์จะหยุดการแบ่งตัว (Jia, 1982; Bhojwani and Randan, 1983; Shekhawat and Galston, 1983)

สำหรับการรวมโปรโตพลาสต์ ปัจจุบันพบว่าวิธีที่ช่วยให้ได้รับความสำเร็จอย่างมาก คือการใช้ PEG ผสมลงในสารละลาย จึงมีการใช้ PEG เป็นสารช่วยในการรวมตัว (fusigenic agent) ของโปรโตพลาสต์อย่างกว้างขวาง PEG ช่วยให้เกิดการจับติดกันของโปรโตพลาสต์ซึ่งกลไกของสารนี้ต่อการรวมโปรโตพลาสต์ยังไม่ทราบแน่ชัดคาดว่า PEG แสดงตัวเสมือนเป็นสะพานเชื่อมระหว่างโมเลกุลซึ่งทำให้เกิดการแยกตัวของเซลล์เมนเบรน (Evans, 1983 : Dodds and Roberts, 1985) PEG ที่ใช้มีมวลโมเลกุลระหว่าง 1540 ถึง 6000 ปริมาณที่ใช้โดยทั่วไป 250 - 300 กรัมต่อลิตร PEG ช่วยในการรวมโปรโพลาสต์ของพืชทั้งชนิดเดียวกัน ต่างชนิด ต่างสกุล หรือต่างอาณาจักรกัน Douglas และคณะ (1981 b) ใช้ PEG ในการรวมโปรโตพลาสต์ยาสูบ Nicotiana tabacum กับ N. rustica สามารถรวมได้โปรโตพลาสต์ลูกผสมร้อยละ 65 การรวมโปรโตพลาสต์ของแครอทกับสาหร่ายสีเขียวสกุล Stigeclonium โดยใช้ PEG พบว่าอัตราการรวมดีที่สุดเมื่อใช้ PEG 330 - 380 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 นาที จากการทดลองที่กล่าวมาทำให้เชื่อได้ว่า โปรโตพลาสต์มีบทบาทช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยเฉพาะถ้าเป็น พืชเศรษฐกิจสำคัญที่ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ตามธรรมชาติ (ทิพยมณี ภะระตะศิลปิน, 2525 :

Fowke et al., 1981) ออสโมติคัมจึงเป็นสารสำคัญที่ช่วยในการรวมโปรโตพลาสต์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช

3. <u>การทนแล้ง</u> (Drought tolerance)

เมื่อเทคโนโลยีการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญมากขึ้น ความคิดเดิมซึ่งเชื่อกันว่าพืชที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีลักษณะเหมือนต้นต่อเดิมก็เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากผู้วิจัยหลายท่านพบว่ามีการแปรเกิดขึ้นจากการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ (Vajrabhaya 1977 ; Skirvin, 1978 Chaleff, 1981) โดยเฉพาะ Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1974) เป็นกลุ่มแรกที่ได้รายงานถึงการแปรของพีโนไทป์ในกล้วยไม้สกุล Dendrobium ซึ่งขยายพันธุ์จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อและได้ติดตามผลที่เกิดขึ้นต่อเนื่องถึงสามฤดู ส่วนใหญ่เห็นชัดจากลักษณะของดอกที่เปลี่ยนไป

ตามธรรมชาติพืชสามารถเกิดการแปร (Variation) ได้ตลอดเวลาแม้ว่าจะมีอัตราส่วนค่อนข้างต่ำแต่ก็เป็นผลที่ทำให้ได้พันธุ์พืชใหม่ ๆ เกิดขึ้น ปัจจุบันนอกจากจะปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการคัดเลือกจากการผสมพันธุ์หรือจากการแปรที่เกิดตามธรรมชาติแล้ว เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก็เป็นวิธีหนึ่งซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ทั้งนี้เพราะขณะทำการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อมีโอกาสเกิดการแปรหรือมิวเตชันได้ตลอดเวลาเช่นเดียวกับในธรรมชาติ การแปรที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชเรียกว่า somaclonal variation ซึ่งอาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือชักนำให้เกิดโดยใช้สารเคมี รังสีหรือปัจจัยทางกายภาพ ทำให้มีโอกาสได้รับพืชลักษณะใหม่ ๆ ที่อาจจะมีทั้งคุณภาพดีขึ้นหรือลดลง ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์กรรมเพื่อคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ (Vajrabhaya, 1981 : Vajrabhaya 1988)

เซลล์พืชหลายชนิดมีการปรับออสโมติกโพเทนเชียลภายในเซลล์เพื่อตอบสนองต่อการขาดน้ำ ซึ่งเป็นการพัฒนากลไกควบคุมขบวนการออสโมซิส และเพราะเหตุโพเทนเชียลให้คงที่ไม่ให้อยู่ในระดับที่จำกัดการเจริญได้ การเติมสารออสโมติคัมลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงออสโมติกโพเทนเชียลของอาหารและอาจทำให้เกิดสภาพออสโมซิสสูง ซึ่งคล้ายคลึงกับภาวะการขาดน้ำในธรรมชาติ เมื่อเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อให้เจริญบนอาหารที่มีออสโมติคัม เซลล์ที่เกิด somatic mutation จนสามารถปรับตัวต่อสภาพนี้ได้อาจจะเป็น

เซลล์ลายพันธุ์ใหม่ที่เกิดการทนแล้งในหลอดแก้ว ออสโมติคัมจึงสามารถนำมาใช้สำหรับคัดเลือกการทนแล้งในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยคัดเลือกเซลล์ที่มีอัตราการเจริญที่ต่างกันเป็นสำคัญ เช่นเดียวกับโครงการคัดเลือกลายพันธุ์ข้าวที่ทนเค็ม (salt tolerance) ที่หน่วยปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เซลล์ที่สามารถปรับตัวต่อสภาพดังกล่าวได้ย่อมมีการเจริญและพัฒนาการดีกว่าเซลล์ที่ไม่ทนต่อสภาพนั้น (Nabors, 1976 : Zimmermann, 1978 : Vajrabhaya et al., 1983 : 1984, Dykes and Nabors, 1985)

ออสโมติคัมเริ่มมีบทบาทต่อการคัดเลือกเซลล์ที่ทนต่อภาวะการขาดน้ำในหลอดแก้วประมาณ 7 ปีที่แล้ว ความทนทานที่เกิดขึ้นคาดว่ามาจากการปรับค่าออสโมติกโพเทนเชียลของเซลล์ให้สัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อมที่ขาดน้ำ ซึ่งได้แก่ ออสโมติคัมทั้งชนิดที่สามารถและไม่สามารถแพร่ผ่านเซลล์เมมเบรนได้ (Bressan et al, 1981 : 1982 : Heyser and Nabors, 1981)

ในปี 1981 Heyser และ Nabors กระตุ้นภาวะการขาดน้ำของเซลล์ยาสูบ 2 สายพันธุ์ในหลอดทดลอง ซึ่งมีความทนและไม่ทนเค็ม เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการทนแล้งกับการทนเค็มในรูปของการเจริญ เขาใช้ PEG หรือ Dextran เติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์พบว่าเมื่อความเข้มข้นของออสโมติคัมสูงขึ้นการเจริญลดลง เซลล์ที่เจริญในอาหารที่มีออสโมติคัมมีค่าออสโมติกโพเทนเชียลต่ำกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีออสโมติคัม ซึ่งคาดว่าเกิดจากการสูญเสียน้ำ การได้รับไอออนบางชนิดจากภายนอก และการสร้างสารบางชนิดภายในเซลล์

ในปีเดียวกัน Bressan และคณะ (1981) คัดเลือกเซลล์มะเขือเทศที่ทนต่อภาวะการขาดน้ำ โดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี PEG 6000 พบว่าเซลล์เจริญเป็น 14 เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ที่เจริญในอาหารที่ไม่มี PEG 6000 ภาวะการทนแล้งของเซลล์จะมีอยู่ตราบเท่าที่ยังมี PEG 6000 อยู่ในอาหารและเมื่อไม่มี PEG 6000 การเจริญลดลง และความทนทานนี้ขึ้นกับอายุของเซลล์ด้วย ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Handa และคณะ (1982 a, b) ซึ่งพบว่าเมื่อไม่มี PEG 6000 ในอาหารเซลล์มีการเจริญลดลงและปลดปล่อยสารเมตาโบลิซึมบางชนิดออกมาในอาหาร เช่น โปรตีน

การวัดการทนแล้งวิธีหนึ่งที่ใช้อยู่ในแปลงทดลองคือ การวัดระดับของโปรลีน (proline) ที่เพิ่มขึ้น การสะสมโปรลีนเป็นตัวบอกถึงระดับของการขาดน้ำภายในเซลล์เมื่อมีภาวะขาดน้ำเกิดขึ้นพืชจะตอบสนอง โดยการสร้าง โปรลีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งเพิ่มมากขึ้น

(Blum and Ebercon, 1976 : Hanson et al., 1977 : Tan and Halloran, 1982) จึงมีการประยุกต์ใช้การวัดโปรลีนเพื่อตรวจสอบการทนแล้งในการเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย Smith และคณะ (1982) เลี้ยงเซลล์ข้าวฟ่างที่ได้จากการคัดพันธุ์ทนแล้งในแปลงทดลองมาก่อน พบว่าการทนแล้งสัมพันธ์กับระยะการคัดเลือกในแปลงด้วย เมื่อมีสภาพที่มีค่าออสโมติกโพเทนเชียลต่ำ ๆ ระดับของโปรลีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ระดับของอะลานิน (alanine) ลดต่ำลง ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานของ Bhaskaran และคณะ (1985) ในแง่ที่มีการเพิ่มโปรลีนเมื่อเลี้ยงเซลล์ข้าวฟ่างในอาหารที่มี PEG และปริมาณโปรลีนจะลดลง เมื่อไม่มี PEG แต่เขาเชื่อว่าปริมาณโปรลีนที่เพิ่มขึ้นเป็นการบังเอิญมากกว่า เป็นการตอบสนองต่อภาวะการขาดน้ำ

ในปีต่อมา Handa และคณะ (1983) ศึกษาการแปรในการทนแล้งที่เกิดจากการชักนำด้วย PEG ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศ พบว่าความแตกต่างของการทนแล้งของเซลล์แต่ละกลุ่มเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ การทนแล้งนี้ขึ้นกับระยะที่เซลล์เจริญและความหนาแน่นของเซลล์ด้วย

การศึกษาการทนแล้งสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวมีน้อยมาก Kischor และ Reddy (1984 : 1985) เลี้ยงเซลล์ของข้าวพันธุ์ Tellahamsa ที่ได้จากแคลลัสซึ่งชักนำจากเอมบริโอที่เจริญเต็มที่ในอาหารเหลวที่มีและไม่มี PEG พบว่าเซลล์ที่เจริญในอาหารที่มี PEG 25 และ 50 กรัมต่อลิตร มีสีเหลืองอ่อน แข็งแรงและมีการเจริญดีกว่าเซลล์ที่เจริญในอาหารที่ไม่มี PEG การสร้างภาวะการขาดน้ำด้วยการเติม PEG ลงในอาหารช่วยให้มีการเกิดต้นใหม่ที่สมบูรณ์ดีขึ้นมากกว่าในภาพปกติซึ่งไม่มี PEG เลยโดยมีค่าร้อยละของการเกิดต้นใหม่ประมาณ 14 - 15 ดังนั้นการเติมออสโมติคัมลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อหากช่วยเพิ่มการเกิดต้นใหม่ที่สมบูรณ์มากขึ้นอาจนำมาใช้เพื่อเพิ่มโอกาสในการคัดเลือกพืชที่ทนต่อสภาพดินเค็ม ดินเปรี้ยว สภาพการขาดน้ำ และโรคต่าง ๆ ได้ดีขึ้น

<u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย</u>

คาดว่าจะได้ความรู้เกี่ยวกับการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสในขณะที่มีออสโมติคัมชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เพื่อนำไปใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญไปเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ดีขึ้น และในที่สุดอาจใช้ในการหาข้าวพันธุ์ใหม่ที่สามารถทนต่อสภาพที่มีค่าออสโมติกโพเทนเชียลต่ำ ๆ ได้