บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มีการพัฒนาค้นคว้า เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้พันธุ์พืชที่มีลักษณะดีในปริมาณที่ต้องการและในเวลาที่เหมาะสม การแยกและนำโปรโตพลาสต์ออกมาเลี้ยงนับเป็นความก้าวหน้าทางวิชาการด้านการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หากแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ได้จำนวนมาก สามารถนำไปใช้ศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ต่างๆของเซลล์ ตลอดจนปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการแบ่งเซลล์ การเจริญในระดับโปรโตพลาสต์และการพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ ความผันแปรของเซลล์ร่างกายที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ รวมทั้งการรวมโปรโตพลาสต์ โดยการรวมโปรโตพลาสต์ทั้งหมดเป็น somatic hybridization ที่นิยมนำมาใช้เมื่อต้องการลูกผสมที่ไม่สามารถผสมโดยวิธีธรรมดา หรือเมื่อต้องการนิวเคลียสของพันธุ์หนึ่งอยู่ในไซโตพลาสซึมที่ผสมกัน (cybrid)

สำหรับกล้วยไม้ซึ่งเป็นพืชส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย นำรายได้เข้าประเทศแต่ละปีเป็นจำนวนมาก ในปีพ.ศ.2531 ที่ผ่านมามีการส่งออกดอกกล้วยไม้สดและต้นกล้วยไม้ เป็นมูลค่า F.O.B. 515.8 และ 38.2 ล้านบาทตามลำดับ ประเทศที่นำเข้าดอกกล้วยไม้ที่สำคัญคือ ญี่ปุ่น โดย 45% ของดอกกล้วยไม้ส่งไปญี่ปุ่น ส่วนที่เหลือประมาณ 55% ส่งไป อิตาลี เยอรมันนี สหรัฐอเมริกา เนเธอร์แลนด์ ฝรั่งเศส สหราชอาณาจักร ฮ่องกง ฯลฯ ส่วนต้นกล้วยไม้จะส่งไปขายที่ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และสิงคโปร์ เป็นส่วนใหญ่ (ภาคผนวก ก) อย่างไรก็ตามขณะนี้ตลาดกล้วยไม้ของโลกมีการแข่งขันสูง ประกอบกับประเทศผู้สั่งซื้อมีความเข้มงวดเรื่องโรคและแมลงของพืชที่นำเข้า และสุขอนามัยของผู้บริโภคพืชผักและผลไม้ที่จะนำเข้าประเทศมาก จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาผลผลิตกล้วยไม้ไทยทั้งด้านปริมาณและคุณภาพให้เป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศยิ่งขึ้น

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ในอดีตและปัจจุบัน มีการผสมข้ามชนิด (species) ข้ามสกุล (genus) กันมาก แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นตามมาก็คือการผสมพันธุ์ไม่ติดหรือผสมติดแต่ลูกผสมที่ได้เป็นหมัน สาเหตุอาจเป็นเพียงความไม่เหมาะสมทางกาย

วิภาคในส่วนของดอกที่เกี่ยวกับการสืบพันธุ์ สรีรวิทยาที่เป็นอุปสรรคต่อการเคลื่อนที่ของ pollen tube หรือ สเปิร์ม หรือความไม่เหมาะสมทางด้านพันธุกรรมอื่นๆ การศึกษาเทคนิคต่างๆในการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง เพราะกล้วยไม้หลายชนิดผสมข้ามชนิดข้ามสกุลด้วยวิธีผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศไม่ได้เลย หากสามารถรวมโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้เหล่านี้เข้าด้วยกัน อาจได้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติอันพึงประสงค์เพิ่มขึ้น ผลการผสมเซลล์ร่างกายทำให้เกิดภาวะ polyploid ขึ้น แต่พบว่ากล้วยไม้ที่เป็น polyploid จำนวนมากกลับมีคุณสมบัติที่ต้องการเพิ่มขึ้น เช่น ดอกใหญ่ขึ้น กลีบหนาและกว้างขึ้น รวมทั้งกล้วยไม้อยู่ในสภาพที่เป็น polyploid ได้ดีไม่ค่อยเกิดอาการไม่สมดุลย์และไม่ค่อยเป็นหมันมากนัก จึงเป็นโอกาสที่จะได้พันธุ์ใหม่ที่สามารถสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศต่อไปได้ด้วย และในกรณีของ wide hybridization ระดับ diploid ของชนิดที่ต่างกันมากหรือ triploid ที่ให้ลูกผสมที่มีปัญหาเรื่องการเป็นหมันอยู่เดิม ถ้าสามารถรวมโปรโตพลาสต์ให้ได้ alloploid หรือ autoalloploid บางชนิดอาจทำให้ปัญหาเรื่องความเป็นหมันลดลงได้ ซึ่งเป็นทางนำไปสู่การสร้างพันธุ์ใหม่ที่ไม่สามารถทำได้โดยการผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศตามปกติ

ในปี ค.ศ.1982 Mr.Eric E.Young ประธานสมาคมกล้วยไม้แห่งสหราชอาณาจักรในขณะนั้นได้ตั้งรางวัลเป็นเงิน 50,000 เหรียญสหรัฐแก่ผู้ที่ประสบความสำเร็จในการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ แล้วรวมโปรโตพลาสต์ให้ได้เซลล์ลูกผสมและเลี้ยงลูกผสมนั้นจนเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ในที่สุด เพื่อเป็นการส่งเสริมให้มีการศึกษาวิจัยเรื่องนี้มากยิ่งขึ้น นอกจากนั้นความผันแปรของเซลล์ร่างกายในระดับโปรโตพลาสต์แม้ว่ามิได้ผสมกัน ก็คาดว่าจะเกิดขึ้นมากและถ่ายทอดได้ดีกว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เป็นก้อนใหญ่ซึ่งส่วนของเซลล์ที่ผันแปรมีขนาดเล็กกว่าต้นที่ผันแปรไปสามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ที่มีคุณสมบัติดีใช้เป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ต่อไป

<u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u>

เนื่องจากกล้วยไม้นับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมากชนิดหนึ่งของประเทศไทย ปัจจุบันเทคโนโลยีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยไม้ยังไม่ประสบความสำเร็จ การวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาหาความรู้พื้นฐานและเทคโนโลยี การแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้เพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในอนาคต

การสำรวจเอกสาร

ปี ค.ศ.1665 Robert Hooke ได้เรียกช่องสี่เหลี่ยมเล็กๆของไม้คอร์กว่าเซลล์ (cell) ซึ่งแปลว่าช่องหรือห้อง เซลล์ที่เขาเห็นนี้เป็นเซลล์ที่ตายแล้ว จึงมีเพียงผนังเซลล์ที่แบ่งเป็นช่องว่าง ภายหลังพบว่าที่จริงแล้วเซลล์ที่มีชีวิตจะต้องประกอบด้วยสารค่อนข้างเหลวอยู่ภายใน สารเหล่านี้ต่อมาได้ชื่อว่าโปรโตพลาสต์ (protoplast) ซึ่งนับว่าเป็นหน่วยที่เล็กที่สุดของสิ่งมีชีวิต มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ ไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสโดยไม่รวมผนังเซลล์

ในปี ค.ศ.1892 Klercker แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ของ Stratiotes aloids ด้วยวิธีกล (mechanical method) คือใช้มีดตัดเซลล์ในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงเพื่อให้โปรโตพลาสต์หดตัวออกจากผนังเซลล์(plasmolysis) นับเป็นการแยกโปรโตพลาสต์ของเซลล์พืชได้เป็นครั้งแรก แต่เนื่องจากการแยกโดยวิธีนี้ทำได้ยาก มักใช้กับพืชที่มีเซลล์ค่อนข้างใหญ่และมีช่องว่างระหว่างเซลล์อยู่มาก จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้ก็น้อยและอัตราการตายสูง จึงไม่เป็นที่นิยมและไม่มีการพัฒนามากนัก (อ้างถึงในประสาทพร สมิตะมาน,2528; Vasil,1976) จนกระทั่งปี ค.ศ.1936 Levitt (อ้างถึงใน พรทิพย์ ธนูทอง,2528) พบว่าถ้าสับเนื้อเยื่อผิวของหอมใส่ลงในสารละลายของน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซนต์ จากนั้นย้ายลงในสารละลายที่ลดความเข้มข้นของซูโครสลงครึ่งหนึ่ง โปรโตพลาสต์จะพองตัวจนหลุดออกมาจากผนังเซลล์ หลังจากนั้นในปี ค.ศ.1960 Cocking (อ้างถึงใน Vasil,1976) สามารถแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์ cellulase ซึ่งเตรียมได้จากราพวก Myrothecium verrucaria แยกโปรโตพลาสต์จากปลายรากมะเขือเทศได้เป็นจำนวนมาก และโปรโตพลาสต์มีการเจริญและสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ นับตั้งแต่ปี ค.ศ.1969 เป็นต้นมามีการค้นพบเอนไซม์ที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น cellulase เตรียมจาก Trichoderma reesei. driselase เตรียมจากราพวก Basidiomycetes macerozyme เตรียมจาก Rhizopus sp. pectinase เตรียมจาก Aspergillus niger pectolyase เตรียมจาก Aspergillus japonicus เป็นต้น ทำให้นักวิทยาศาสตร์หันมาพัฒนาเทคนิคการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์กันมากขึ้น (Bhojwani and Razdan,1983; Evans and Bravo,1983) อย่างไรก็ตามการแยกโปรโตพลาสต์ไม่ว่าโดยวิธีกลหรือใช้เอนไซม์ทำให้เกิดเศษของเซลล์ เช่น เศษของผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ย่อยไม่หมด เป็นต้น ซึ่งจะต้องแยกเศษของเซลล์ออกไปโดยเร็วด้วยวิธีการกรองผ่านผ้ากรองหรือใช้การ centrifugation นอกจากนั้นอาจจะใช้วิธี

แขวนลอยในสารละลายของซูโครส (Evans and Bravo,1983)

ในการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์นั้น ขณะที่แยกหรือย่อยผนังเซลล์ออก ทำให้ความสมดุลย์ของออสโมซิสมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากไม่มีผนังเซลล์บังคับ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องรักษาดุลยภาพของโปรโตพลาสต์โดยใช้สารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิส จะเห็นได้ว่าการอยู่รอดและการเจริญของโปรโตพลาสต์มีความสัมพันธ์กับความสมดุลย์ของออสโมซิสเป็นอย่างมาก การแยกโปรโตพลาสต์ในระยะแรกใช้สารละลายของ โปตัสเซียมคลอไรด์ และ แมกนีเซียมซัลเฟต เป็นสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิส แต่เนื่องจากสารละลายนี้มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์ และอาจทำให้เกิดความผิดปกติที่ผนังเซลล์ที่สร้างขึ้นมาใหม่ นอกจากนี้ยังซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ยุ่งยากต่อการควบคุมความสมดุลย์ของออสโมซิสให้เหมาะสม ในระหว่างการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (Eriksson,1985;Meyer and Abel,1975) ต่อมาจึงเปลี่ยนมาใช้น้ำตาลและสารประกอบประเภทน้ำตาลและแอลกอฮอล์ ร่วมกับสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นต่ำประมาณ 0.1 ถึง 0.5 mM เพียงเล็กน้อย เพื่อรักษาดุลยภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ พบว่าได้ผลดีกว่าและสามารถใช้ได้กับพืชหลายชนิด ปัจจุบันนิยมใช้สารละลาย sucrose, glucose, mannitol, sorbitol ร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) โดยที่พืชแต่ละชนิดต้องการชนิดและความเข้มข้นของสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสที่เหมาะสมแตกต่างกัน (ประสาทพร สมิตะมาน,2528;Eriksson,1985)

การพัฒนาเทคนิคการแยกโปรโตพลาสต์ การหาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ และสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสให้เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ของพืช ทำให้สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากพืชหลายๆชนิดและจากหลายๆส่วนของพืช(Chung,1987;Evans and Bravo,1983;Gamborg et al.,1981) เช่น ใบ (Canas et al.,1987;Daughty and Power,1988;Guri et al., 1987; Tan et al.,1987) ลำต้น (Puonit-Kaerlas and Eriksson, 1988) แคลลัส (Swanson et al.,1985) suspension culture (Bhat et al.,1985; Harris et al.,1988) hypocotyl (Barsby et al., 1986;Chuong et al.,1987)

เมื่อแยกโปรโตพลาสต์ได้แล้ว ก็จะเลี้ยงโปรโตพลาสต์นั้นในสารอาหารภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมให้เจริญเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไป จากการศึกษา

ในระยะแรกพบว่าโปรโตพลาสต์ไม่สามารถแบ่งตัวหรือแบ่งตัวได้แต่ไม่สามารถเจริญเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (ประสาทพร สมิตะมาน,2528) จนกระทั่ง Nagata และ Takebe (1971) แยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยาสูบ (Nicotiana tabacum) ให้เป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้สำเร็จเป็นครั้งแรก งานทางด้านการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์จึงก้าวหน้ามากขึ้นเรื่อยๆ รวมทั้งมีการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเจริญของโปรโตพลาสต์ ดังนี้

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของโปรโตพลาสต์

อาหาร

อาหารที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยเพิ่มสารประกอบบางอย่าง เพราะโปรโตพลาสต์เป็นเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ห่อหุ้ม อาหารที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชโดยทั่วไปประกอบด้วยสารอนินทรีย์ สารอินทรีย์ สารประกอบพวกฮอร์โมน และสารที่ทำให้อาหารแข็ง ดังนั้นชนิดและองค์ประกอบของสารอาหารเหล่านี้จึงเป็นสิ่งสำคัญในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์มาก

สารอนินทรีย์ ปี ค.ศ.1973 Kao และคณะ พบว่าเมื่อปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ในอาหารสูง (5.3 mM) ทำให้การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ Vicia hajastana และ Bromus inermis สูงขึ้น ปี ค.ศ.1983 Okamura และคณะเปรียบเทียบเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ Astemisia vulguris ที่เลี้ยงในอาหารต่างกัน 9 สูตร พบว่าสูตรที่ไม่มีแอมโมเนียมเลยมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์สูงที่สุด และเมื่อไม่ใส่แอมโมเนียมในอาหารทั้ง 9 สูตร ทำให้การแบ่งเซลล์สูงขึ้น ปี ค.ศ.1985 Nishimaki และ Nozue พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 100 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลทำให้เปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ Ipomoea batatas สูงที่สุด ดังนั้นการจะเลือกใช้สารอนินทรีย์จึงต้องพิจารณาให้เหมาะสม ในปัจจุบันนิยมให้ไนโตรเจนแก่โปรโตพลาสต์ในรูปของเกลือไนเตรต และ กรดอะมิโนหลายๆชนิดแทน ซึ่งพบว่าสามารถกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์เจริญได้ดีกว่าเกลือแอมโมเนียม (ประสาทพร สมิตะมาน,2528)

สารอินทรีย์ ได้แก่ วิตามิน กรดอะมิโนชนิดต่างๆ สารประกอบที่ได้จากธรรมชาติ ปี ค.ศ.1983 Shekhawat และ Galston รายงานว่า glutamine และ asparagine ช่วยให้โปรโตพลาสต์ของ Trigonella foe-

numgraccum เจริญและแบ่งเซลล์ได้ดีขึ้น ปี ค.ศ.1983 Maeda และคณะพบว่าเมื่อเติมน้ำมะพร้าวลงในอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ Lithospermum erythrorhiza ทำให้การเกิดกลุ่มเซลล์เพิ่มขึ้น

สารประกอบพวกฮอร์โมน ฮอร์โมนสามารถกระตุ้นการเจริญแบ่งเซลล์รวมทั้งช่วยในการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ ออกซิน เช่น IAA, NAA, 2,4-D ช่วยขยายตัวของเซลล์ทั้งด้านยาวและด้านกว้าง ช่วยสร้างผนังเซลล์ แบ่งเซลล์ เกิดยอดและรากในระยะแคลลัส ไซโตไคนิน เช่น kinetin, BAP, zeatin ช่วยแบ่งเซลล์สังเคราะห์สารประกอบประเภทโปรตีน สร้างยอดและรากในระยะแคลลัส จิบเบอเรลลิน เช่น GA_3 จะใช้ในช่วงที่เริ่มมีการสร้างต้นพืชแล้ว เพราะจะช่วยในการยืดตัวของพืช และการเกิดต้นอ่อน (ประสาทพร สมิตะมาน, 2528) ปี ค.ศ.1982 Burger และ Hackett พบว่า NAA และ kinetin ช่วยเพิ่มอัตราการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ โดยอัตราการแบ่งเซลล์มีค่าสูงสุดเมื่ออาหารมี NAA 2.81 มิลลิกรัม/ลิตร (15 μ M) และ kinetin 1.01 มิลลิกรัม/ลิตร (4.6 μ M) ปี ค.ศ.1982 Takeuchi และ Komamine รายงานว่า BAP และ 2,4-D มีความจำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ Vinca rosea โดย BAP 0.03-0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์สูงขึ้น แต่หากใช้เกิน 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร การแบ่งเซลล์จะลดลง และการแบ่งเซลล์มีเปอร์เซนต์สูงสุดเมื่อใช้ 2,4-D 1-3 มิลลิกรัม/ลิตร แต่ถ้าไม่ใช้ 2,4-D เลยโปรโตพลาสต์จะไม่แบ่งเซลล์ ปี ค.ศ.1985 Sticklen และคณะพบว่า 2,4-D 0.22 มิลลิกรัม/ลิตร (1 μ M) และ Zeatin 0.11 มิลลิกรัม/ลิตร (0.5 μ M) ทำให้โปรโตพลาสต์ของ Ulmus americana เกิดการแบ่งเซลล์และเกิดกลุ่มเซลล์ได้ดีที่สุด ปี ค.ศ.1985 Nishimaki และ Nozue เลี้ยงโปรโตพลาสต์ Ipomoea batatas โดยใช้ฮอร์โมนที่มีความเข้มข้นต่างกัน พบว่า 2,4-D 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร และ kinetin 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลทำให้เปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ I. batatas สูงที่สุด ปี ค.ศ.1986 Lenee และ Chupeau แสดงความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP, IPA, IBA และNAA ที่เหมาะสมในการเกิดกลุ่มเซลล์โปรโตพลาสต์ของ Helianthus annuus พบว่าความเข้มข้น BAP 3 มิลลิกรัม/ลิตร, IPA 1 มิลลิกรัม/ลิตร, IBA 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0 มิลลิกรัม/ลิตร จะทำให้เกิดการแบ่งเซลล์และเปอร์เซนต์ plating efficiency สูงที่สุด

สารที่ทำให้อาหารแข็ง วิธีเลี้ยงโปรโตพลาสต์สามารถเลี้ยง

ในอาหารเหลวหรืออาหารแข็ง ปัจจุบันมีสารที่ทำให้อาหารแข็งตัวหลายชนิด เช่น agar, agarose, gelatin, alginate, polyacrylamide ปี ค.ศ. 1983 Lorz และคณะพบว่า agarose ทำให้เปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ Nicotiana tabacum และ N. plumbaginifolia สูงกว่าการใช้สารที่ทำให้อาหารแข็งแบบอื่น ปี ค.ศ.1985 Holbrook และคณะทดลองเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ Medicago sativa ในอาหารที่มีความเข้มข้นของ agarose ต่างกัน พบว่าในอาหารที่มี agarose 0.4 เปอร์เซนต์จะมีอัตราการแบ่งเซลล์สูงที่สุด

จะเห็นได้ว่าอาหารนับเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่ง ในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืช สูตรอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์อาจดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเพิ่มสารประกอบบางอย่างลงไป เพื่อให้อาหารมีความอุดมสมบูรณ์สูง ซึ่งชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบที่เหมาะสมกับโปรโตพลาสต์ของพืชชนิดต่างๆอาจตรวจสอบได้จากเปอร์เซนต์การอยู่รอด เปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ เปอร์เซนต์ plating efficiency ที่เป็นผลมาจากชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบนั้น

ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ในอาหาร

ปี ค.ศ.1984 Galbraith และคณะ เลี้ยงโปรโตพลาสต์ Nicotiana tabacum 'Wisconsin 38' ให้มีความหนาแน่นต่างๆกัน พบว่าที่ความหนาแน่น $1\text{-}4\times10^{4}$ โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร เป็นความหนาแน่นที่เหมาะสมต่อการเจริญของโปรโตพลาสต์ทำให้มีการสร้างผนังเซลล์ ยืดตัว แบ่งเซลล์ และเกิดกลุ่มเซลล์ ปี ค.ศ.1985 Sticklen และคณะเปรียบเทียบผลความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ Ulmus x 'Homestead' ต่อการแบ่งเซลล์หลังเลี้ยง 11 วัน และการเกิดกลุ่มเซลล์หลังจากเลี้ยง 20 วัน พบว่าเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์และเกิดกลุ่มเซลล์จะมีค่าสูงสุดเมื่อความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 0.5×10^{5} โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร

ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ในอาหารนับเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โดยที่ต้องมีความหนาแน่นพอเหมาะ เนื่องจากเซลล์จะมีการขับสารบางอย่างออกมาในอาหาร สารเหล่านี้ต้องมีความเข้มข้นมากพอจึงจะสามารถกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวได้ (ประสาทพร สมิตะมาน,2528)

แสง

ปี ค.ศ.1984 Guri และ Izhar เลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ Solanum melongena ในที่มืดพบว่าโปรโตพลาสต์มีชีวิต และแบ่งเซลล์ได้ แต่ถ้าเลี้ยงในที่สว่างโปรโตพลาสต์จะขยายขนาด แต่ไม่เกิดการแบ่งเซลล์ ปี ค.ศ.1985 Wilson และคณะรายงานว่าโปรโตพลาสต์ของ Nicotiana otophora ไม่แบ่งเซลล์ถ้าเลี้ยงในที่มืด แต่โปรโตพลาสต์ของ N. medicago ต้องเลี้ยงในที่มืดจึงจะเกิดกลุ่มเซลล์

แสงนับเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โดยทั่วไปจะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไว้ในที่มีแสงสลัวหรือที่มืด หลังจากโปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์สมบูรณ์แล้ว ความต้องการแสงของเซลล์จึงเพิ่มขึ้นถึงระดับปกติ ความต้องการแสงมากน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของพืช

อุณหภูมิ

ปี ค.ศ.1981 Gamborg และคณะพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์อยู่ระหว่าง 22-28 องศาเซลเซียส

สภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ปี ค.ศ.1981 Gamborg และคณะ สรุปว่าโดยทั่วไปพืชต้องการ pH ช่วงระหว่าง 5.5-5.8 ปี ค.ศ.1983 Koop และคณะรายงานว่า pH ที่เหมาะสมในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ Datura innoxia อยู่ระหว่าง 5.0-6.0

ปัจจัยต่างๆเหล่านี้นับเป็นตัวอย่างปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชให้สามารถมีชีวิตรอด แบ่งเซลล์ และเกิดกลุ่มเซลล์ เพื่อเจริญเป็นพืชต้นใหม่ ในปัจจุบันสามารถแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชหลายชนิดให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 พืชที่สามารถแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์จนเป็นต้นสมบูรณ์

ชนิดพืช	เอกสารอ้างอิง
Beta vulgaris Linn.	Bhat et al.,1985
Brassica juncea Czern.&Coss.	Chatterjee et al.,1985
Brassica napus Linn.	Barsby et al.,1986
Brassica oleracea Linn.	Robertson and Earle,1986
Brassica carinata A.Br.	Pua,1987
Brassica carinata A.Br.	Chuong et al.,1987
Dactylis glomerata Linn.	Horn et al.,1988
Eruca sativa Linn.	Sikdar et al.,1987
Ipomoea batatas Lamk.	Sihachakr and Ducreux,1987
Lactuca saligna Linn.	Brown et al.,1988
Lycopersicon esculentum Mill.	Tan et al.,1987
Medicago sativa Linn.	Gilmour et al.,1987
Nicotiana plumbaginifolia Willd.	Barfield et al.,1985
Pelargonium aridum R.A.	Yarrow et al.,1987
Pelargonium hortorum Bailey.	Yarrow et al.,1987
Pelargonium peltatum Ait.	Yarrow et al.,1987
Petunia hybrida Hort.	Vasil and Vasil,1974
Physalis minima Linn.	Gupta and Durzan,1986
Pinus lambertiana Dougl.	Gupta and Durzan,1986
Pisum sativum Linn.	Puonti-Kaerlas and Eriksson,
Prunus avium Linn.	1988 Ochatt,1987
Psophocarpus tetragono-lobus DC.	Mehta and Ram,1981; Wilson et al.,1985
Solanum brevidens Phil.	Haberlach et al.,1985

ตารางที่ 1 ต่อ

ชนิดพืช	เอกสารอ้างอิง
Solanum demissum	Haberlach et al.,1985
Solanum etuberosum Lindl.	Haberlach et al.,1985
Solanum lycopersicum Linn.	Haberlach et al.,1985
Solanum melongena Linn.	Gleddie et al.,1984; Guri and Izhar,1984
Solanum pennellii	Haberlach et al.,1985
Solanum torvum Sw.	Guri et al.,1987
Solanum tuberosum Linn.	Haberlach et al.,1985
Stylosanthes guianeensis G.Don.	Szabados and Roca,1986
Trifolium pratense Linn.	Phillips and Collins,1979
Triticum aestivum Linn.	Harris et al.,1988
Ulmus x 'pioneer'	Sticklen et al.,1986

หลังจากการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ประสบความสำเร็จแล้ว จึงมีผู้นำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้แก่ การศึกษาทางพันธุศาสตร์ เช่น การเปรียบเทียบขั้นตอนการแบ่งเซลล์ระหว่างเซลล์และโปรโตพลาสต์ของถั่วเหลือง (Fowke et al.,1974) การศึกษาทางชีวเคมี เช่น polyamine metabolism ที่มีผลต่อ osmotic stress ในยาสูบ พริกไทย และข้าวโอ๊ต (Tiburcio et al.,1986) การรวมโปรโตพลาสต์เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การหาลูกผสมพันธุ์ใหม่ (Gamborg et al.,1981) ตลอดจนนำไปประยุกต์ใช้กับขบวนการพันธุวิศวกรรม โดยการตัดต่อ DNA เฉพาะส่วนใส่เข้าไปในโปรโตพลาสต์เพื่อให้ได้พืชที่มีคุณสมบัติตามต้องการ (Lorz et al.,1985)

สำหรับกล้วยไม้นั้นจากอดีตถึงปัจจุบัน มีการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศเพื่อหาพันธุ์ใหม่ๆมาโดยตลอด ในปี ค.ศ.1942ได้มีการนำหลักพันธุศาสตร์มาใช้ในการผสมพันธุ์กล้วยไม้ ทำให้ทราบถึงการถ่ายทอดลักษณะของกล้วยไม้

ผสมพันธุ์ให้ได้กล้วยไม้ตามที่ต้องการ (ถาวร วัชราภัย,2514) การปรับปรุงพันธุ์พืชแบบนี้แม้จะได้รับผลสำเร็จสูงแต่ก็ช้าและเสียเวลา จำเป็นต้องหาวิธีการใหม่ๆ ที่ทำให้เกิดความผันแปรทางพันธุศาสตร์มากขึ้น เพื่อนำไปใช้ในการผสมพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์รวมทั้งวิธีการที่จะเอาชนะอุปสรรคตามธรรมชาติของการสืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ (Vasil,1976) ปี ค.ศ.1960 Morel (อ้างถึงใน ถาวร วัชราภัย และ มนทกานติ วัชราภัย,2519) เลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ได้สำเร็จเป็นครั้งแรก โดยเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุล Cymbidium ให้ปราศจากโรคไวรัส และต่อมาสามารถขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลอื่นคือ Cattleya, Miltonia, Odontonia และ Phaius ได้เป็นจำนวนมาก แต่ยังทำไม่ได้ในกล้วยไม้กลุ่มกิ่งโดด (monopodial) ปี ค.ศ.1970 Vajrabhaya และ Vajrabhaya เลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลช้าง (Rhyncostylis gigantea) ซึ่งเป็นกล้วยไม้กลุ่มกิ่งโดดได้สำเร็จ จากนั้น Teo และคณะ เลี้ยงเนื้อเยื่อ Vanda ใบแบนได้ในปี ค.ศ.1973 (อ้างถึงในถาวร วัชราภัย และ มนทกานติ วัชราภัย,2519) หลังจากนั้นได้มีการพัฒนาปรับปรุงสูตรอาหาร ตลอดจนวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ทำให้สามารถขยายพันธุ์ และคัดเลือกพันธุ์กล้วยไม้ต่างๆด้วยวิธีง่ายๆ เป็นการลดต้นทุนการผลิตลงมากซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากกับอุตสาหกรรมการผลิตกล้วยไม้ในเวลาต่อมา

ปัจจุบันเทคนิคต่างๆ ในการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์นับเป็นความหวังใหม่ที่จะนำมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์กล้วยไม้ ตลอดจนการใช้โปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ 2 ชนิดมารวมกัน เพื่อสร้างลูกผสมพันธุ์ใหม่ที่ไม่สามารถผสมพันธุ์โดยวิธีธรรมชาติ การแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ มีรายงานการศึกษาในปี ค.ศ.1978 โดย Teo และ Neumann สามารถแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ Renantanda x Rosalind Cheok ให้แบ่งเซลล์และเกิดการรวมตัวเป็นกลุ่มเซลล์สีเขียวขึ้น ต่อมา Price และ Earle (1984) แยกโปรโตพลาสต์จากกล้วยไม้ได้หลายพันธุ์ คือ Dendrobium x Louis Bleriot, Den. x (Beach Girl x Louis Bleriot) และ Vanilla planifolia การแยกโปรโตพลาสต์จากส่วนต่างๆของกล้วยไม้ดังกล่าว จะได้โปรโตพลาสต์ในปริมาณที่แตกต่างกัน และบางส่วนแยกโปรโตพลาสต์ได้น้อยมากหรือไม่ได้เลย โดยโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบและกลีบดอก มีปริมาณและอัตราการอยู่รอดสูงกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากส่วนอื่น สำหรับวิธีการที่ Teo และ Neumann เคยใช้แยกโปรโตพลาสต์จาก protocorm ของ Renantanda นั้น เมื่อนำมาใช้แยก protocorm ของ Cattleya พบว่าได้โปรโตพลาสต์น้อยมากและในการติดตามการ

เจริญของโปรโตพลาสต์ โปรโตพลาสต์ที่ได้ยังไม่สามารถแบ่งตัว และไม่สามารถรวมโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ 2 ชนิดเข้าด้วยกัน ดังนั้นการศึกษาเทคนิคการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้บางชนิดนี้ จึงเป็นประโยชน์อย่างมากที่จะนำไปใช้พัฒนาวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ให้ประสบความสำเร็จต่อไปในอนาคต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เทคนิคการแยกโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ด้วยเอนไซม์
2. ได้วิธีที่เหมาะสมในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ให้มีชีวิตนานและสามารถแบ่งตัวต่อไปได้
3. ได้ทราบการเปลี่ยนแปลงของโปรโตพลาสต์ขณะที่เลี้ยง โดยการศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์
4. หากโปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์และเจริญเป็นต้นใหม่ได้ จะใช้ศึกษาความผันแปรที่เกิดจาก somatic mutation เนื่องจากความผันแปรของเซลล์ในเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นแต่เดิมหรือความผันแปรในขณะแยกโปรโตพลาสต์และเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ รวมทั้งการคัดเลือกพันธุ์ที่มีคุณสมบัติดีมาใช้ปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย