พระสมุทรกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ฝ้ายเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลกและของประเทศ มนุษย์ใช้ฝ้ายให้เป็นประโยชน์ได้มากมายหลายประการ เช่น นำเส้นใยมาทำเสื้อผ้าเครื่องนุ่งห่ม นำเมล็ดไปสกัดน้ำมัน ส่วนเปลือกของเมล็ด สามารถใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารสัตว์ ปุ๋ย เป็นต้น ปัจจุบัน ประเทศไทยมีความต้องการเส้นใยฝ้ายเพื่อป้อนโรงงานอุตสาหกรรมปีละประมาณ 300,000 ตัน แต่ผลิตฝ้ายได้ในประเทศเพียงปีละประมาณ 2-3 หมื่นตัน ที่เหลือนอกนั้นต้องสั่งจากต่างประเทศคิดเป็นเงินตราในขณะนี้ไม่ต่ำกว่าปีละ 5-6 พันล้านบาท (กรมวิชาการเกษตร, 2535)

ปัญหาที่ไม่สามารถผลิตฝ้ายได้พอเพียงสำหรับใช้ในประเทศ มีหลายประการด้วยกัน แต่หากจะเน้นเฉพาะในแง่ของวิชาการแล้วจะมีสาเหตุเนื่องมาจากชนิดของพันธุ์ฝ้ายด้วย ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญมากต่อการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรอย่างหนึ่ง หากเลือกพันธุ์ไม่ถูกต้องย่อมให้ผลผลิตต่ำ ทั้งนี้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากดินฟ้าอากาศและสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม นอกจากนี้ ฝ้ายยังมีปัญหาอันเนื่องมาจากแมลงศัตรูและโรคระบาดมากกว่าพืชไร่อื่น ๆ ยิ่งไปกว่านั้นวัชพืชก็มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของฝ้ายอย่างมากอีกด้วย (กรมวิชาการเกษตร, 2529)

หลักการทั่วไปที่นักปรับปรุงพันธุ์ฝ้ายใช้ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่หรือพันธุ์ใหม่ ๆ ที่เหมาะกับสภาวะที่ต้องการ ทำโดยการคัดเลือก (selection) จากประชากรที่มีความแปรปรวนในลักษณะทางพันธุกรรมจนได้พันธุ์หรือสายพันธุ์ที่ดีมีคุณภาพของผลผลิต หรืออาจทำได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ฝ้ายที่มีลักษณะตามประสงค์

(hybridization) เพื่อให้สามารถคัดเลือกจนได้สายพันธุ์ในชั่วรุ่นหลานเหลน ต่อ ๆ มา เป็นผลของการรวมลักษณะที่ดีจากพ่อแม่ตามหลักการทางพันธุศาสตร์ ในทางปฏิบัติวิธีที่นิยม คือ การผสมข้าม (intervarietal mating) แล้วทำการคัด เลือกฝ้ายที่มีลักษณะตามที่ต้องการ (กรมวิชาการเกษตร, 2529) ตัวอย่าง เช่น พันธุ์ฝ้ายศรีสำโรง 2 เป็นฝ้ายที่คัดได้จากลูกผสมที่เกี่ยวข้องกับ 3 สปีชี่ (triple interspecific cross) คือฝ้าย Gossypium hirsutum, G. arboreum และ G. raimodii นอกจากนั้น ก็ยังมีการปรับปรุงพันธุ์ให้ดีขึ้นโดยนำมาผสมกับพันธุ์ Deltapine Smooth Leaf ซึ่งเป็น G. hirsutum โดยเป็นการถ่ายทอดยีน (gene) หรือพันธุกรรมควบคุมลักษณะดี เช่น ต้านทานโรคใบหงิก และเพิ่มลักษณะเด่นของ Deltapine Smooth Leaf ที่ให้ผลผลิตสูงและคุณภาพเส้นใยดี แล้วคัดเลือกให้ได้พันธุ์หรือสายพันธุ์ดี โดยกำหนดเอาลักษณะเด่น ๆ คือ ผลผลิตสูง คุณภาพเส้นใยดีและต้านทานโรคใบหงิก ฝ้ายพันธุ์นี้ได้รับการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตรว่าเป็นพันธุ์ดี อย่างไรก็ตาม ฝ้ายพันธุ์นี้ก็ยังมีข้อเสียอยู่หลายประการ คือ ไม่สามารถต้านทานโรคใบไหม้และใบจุด (กรมวิชาการเกษตร, 2530) วิธีการคัดเลือกหลังจากผสมข้ามดังกล่าวแม้จะได้ผลดี และก่อให้เกิดพันธุ์ฝ้ายที่มีลักษณะดีมากมาย แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองเวลาและแรงงาน ตลอดจนเงินทุนรวมทั้งบุคคลากรสูงมาก ยิ่งไปกว่านั้น ยังไม่แน่ว่าการใช้วิธีการดังกล่าวนี้ จะประสบผลสำเร็จเสมอไป (กรมวิชาการเกษตร, 2531)

ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์สามารถขยายพันธุ์พืชมากมายหลายชนิดโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง (in vitro) เมื่อใช้อาหารสังเคราะห์ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม อาจทำให้เซลล์เกิดการแปรผันที่เรียกว่า somaclonal variation ด้วยวิธีดังกล่าวนี้ทำให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ขึ้นได้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังมีประโยชน์ในการใช้เป็นเครื่องมือในการขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมาก ยิ่งไปกว่านั้น การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชโดยวิธีมาตรฐาน

อาจช่วยให้สามารถทำการปรับปรุงเซลล์ของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงให้ได้ลักษณะ-ตามต้องการ เช่น มีความต้านทานต่อโรคและแมลง มีอายุสั้นง่ายต่อการเก็บผลผลิต คุณภาพเส้นใยดี ทนต่อสภาวะแวดล้อม (ความเค็มของดิน, อุณหภูมิสูง ๆ ฯ) เป็นต้น ดังนั้น เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเหมาะสมในการนำมาใช้พัฒนาพืชสายพันธุ์ใหม่ ๆ ทั้งที่เป็นพืชหลักที่ให้ผลผลิตเชิงพาณิชย์ต่าง ๆ เช่น พืชไร่ คือ ฝ้าย (Mauney และ Stewart, 1986) ข้าว, ถั่วเหลือง (กรมวิชาการเกษตร, 2532) รวมไปถึงพืชสวนหลายชนิดด้วย

การตรวจเอกสาร

กรมวิชาการเกษตร (2529) ได้กล่าวถึงการแยกประเภทและลำดับทางพฤกษศาสตร์ของฝ้ายไว้ ดังนี้คือ

Division	:	Spermatophyta
Sub-division	:	Angiospermae
Class	:	Dicotyledones
Order	:	Malvales
Family	:	Malvaceae
Genus	:	Gossypium

เมื่อจำแนกชนิดของฝ้าย (Gossypium spp.) โดยใช้ลักษณะ (characteristic) ทางพฤกษศาสตร์ตลอดจนจำนวนโครโมโซมและแหล่งกำเนิดเป็นหลัก พบว่า พันธุ์ฝ้ายทั้งชนิดที่นำมาเพาะปลูก (cultivated) และพันธุ์ป่า (wild) สามารถจัดได้เป็น 20 ชนิด (ตารางที่ 1)

ฝ้ายเป็นพืชไร่ที่ขึ้นได้ในดินเกือบทุกชนิด ยกเว้นดินที่เป็นดินทรายจัดหรือดินลูกรัง ลำต้นฝ้ายจะตั้งตรงและมีกิ่งก้านสาขาแตกออกจากลำต้น ความสูงของลำต้นจะแปรเปลี่ยนไปขึ้นอยู่กับพันธุกรรม ฤดูกาล และวิธีการปลูก ลำต้นส่วนล่างมีลักษณะคล้ายกิ่งกระโดง (vegetative branch or monopodia) ซึ่งมีใบและกิ่งแต่ไม่มีดอก ส่วนบนหรือส่วนยอดของลำต้นบนกิ่งกระโดง จะเป็นที่เกิดของกิ่งผล (reproductive branch or sympodia) ตาที่เกิดบนกิ่งผลจะเจริญเป็นดอก (ดังรูปในภาคผนวกที่ 1) ใบมีตั้งแต่สีเขียวเข้มถึงสีเขียวอ่อนขึ้นอยู่กับพันธุ์ ดอกเป็นพวกดอกสมบูรณ์ (complete flower) และสมบูรณ์เพศ (perfect flower) ผลของฝ้ายเรียกว่า สมอ (boll) มีลักษณะกลมหรือรูปไข่แล้วแต่พันธุ์ มีต่อมน้ำมันซึ่งนอกจากเป็นต่อมน้ำมันแล้ว ยังมีสารจำพวก

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อฝ้ายชนิดต่าง ๆ ตลอดจนจำนวน ลักษณะโครโมโซม แหล่งกำเนิด และการใช้ประโยชน์ (กรมวิชาการเกษตร, 2529)

ชนิด	โครโมโซม จำนวน	ขนาด	แหล่งกำเนิด	การใช้ประโยชน์
กลุ่มโลกเก่า(โครโมโซม 2 ชุด)				
G. herbaceum	26	ใหญ่	เอเชีย	ฝ้ายที่ใช้เพาะปลูก
G. arboreum	26	ใหญ่	เอเชีย	ฝ้ายที่ใช้เพาะปลูก
G. anomalum	26	ใหญ่	เอเชีย	ฝ้ายป่า
G. sturtii	26	ใหญ่มาก	ออสเตรเลีย	ฝ้ายป่า
G. stocksii	26	ใหญ่	อินโด	ฝ้ายป่า
			อาราเบีย	ฝ้ายป่า
G. areysianum	26	ใหญ่	แอฟริกา	ฝ้ายป่า
G. rebinsonii	26	ใหญ่	ออสเตรเลีย	ฝ้ายป่า
G. semalense	26	ใหญ่	อาราเบีย	ฝ้ายป่า
			อินเดีย	
G. triphyllum	26	ใหญ่	แอฟริกา	ฝ้ายป่า
กลุ่มโลกใหม่ (โครโมโซม 2 ชุด)				
G. thurberi	26	เล็ก	อเมริกาเหนือ	ฝ้ายป่า
G. armourianum	26	เล็ก	อเมริกาเหนือ	ฝ้ายป่า
G. harknessii	26	เล็ก	อเมริกาเหนือ	ฝ้ายป่า

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิด	โครโมโซม		แหล่งกำเนิด	การใช้ประโยชน์
	จำนวน	ขนาด		
G. klotzschianum	26	เล็ก	กาลาปาโกส	ฝ้ายป่า
			อเมริกาเหนือ	
G. raimondii	26	เล็ก	อเมริกาใต้	ฝ้ายป่า
G. gossypioides	26	เล็ก	อเมริกา	ฝ้ายป่า
G. trilobum	26	เล็ก	อเมริกา	ฝ้ายป่า
กลุ่มโลกใหม่ (โครโมโซม 4 ชุด)				
G. hirsutum	52	26ใหญ่-26เล็ก	อเมริกาเหนือ	ฝ้ายที่ใช้เพาะปลูก
G. barbadense	52	26ใหญ่-26เล็ก	อเมริกาใต้	ฝ้ายที่ใช้เพาะปลูก
G. tomentosum	52	26ใหญ่-26เล็ก	ฮาไวอิ	ฝ้ายป่า

ก๊อสซิปอล(gossypols) อยู่อีกด้วย เมล็ดฝ้ายมีลักษณะกลมหรือรูปไข่ ทางด้านโคนอาจแหลมมากหรือน้อยก็ได้ ขึ้นอยู่กับพันธุ์หรือพันธุกรรม เปลือกหุ้มเมล็ดมีสีน้ำตาล บนเปลือกหุ้มเมล็ด (seed epidermis) จะมีเส้นใย โดยทั่วไปฝ้ายเป็นไม้พุ่มซึ่งอายุไม่ยาวนานมากนัก อาจเป็นได้ทั้งพืชปีเดียว (annual) หรือพืชข้ามปี (perennial) แล้วแต่พันธุกรรมของฝ้าย

<u>การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช</u> เป็นการนำส่วนหนึ่งส่วนใดของพืช ได้แก่ เซลล์ (cell) เนื้อเยื่อ (tissue) เช่น ใบ, ตาอ่อน ฯ หรือเซลล์ไร้ผนัง (protoplast) (ชิ้นส่วนของพืช (explant) ที่นำมาควรเป็นเนื้อเยื่อเจริญ) เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ และมีการควบคุมสภาวะแวดล้อม คือ อุณหภูมิ แสง ความชื้น (Murashige, 1974) การเจริญของเนื้อเยื่อพืชมีความเกี่ยวข้องกับธาตุอาหาร ประกอบด้วยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่ใช้ในการเลี้ยง ปัจจัยที่เกี่ยวข้องภายในชิ้นส่วนพืชเอง รวมทั้งปัจจัยภายนอก การพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ยังขึ้นอยู่กับความสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) (Skoog และ Miller, 1957)

คุณสมบัติของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน มีผลต่อการเกิดรากและมีความสัมพันธ์กับระดับของออกซิน ถ้าระดับออกซินภายในต้นพืชต่ำ ก็สามารถเพิ่มออกซินให้แก่พืชเพื่อชักนำให้เกิดราก (Fonnesbench และFonnesbench,1980) ดังตัวอย่างการศึกษาของ Freytag และคณะ (1988) ซึ่งสามารถกระตุ้น <u>Beta vulgaris</u> L. ให้เกิดรากหลังจากเกิดยอดแล้วโดยใช้ indolebutyric acid (IBA) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มออกซินชนิดหนึ่งFreytag และคณะ(1989) สามารถกระตุ้นต้นถั่วเหลืองให้เกิดรากที่สมบูรณ์ เมื่อใช้ IBA เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ สารกลุ่มออกซินยังช่วยเร่งการ-

ขยายตัวของเซลล์ Lippmann และ Lippmann (1984) ทำการชักนำให้เกิดโซมาติคเอมบริโอ (somatic embryo) ของส่วนใบเลี้ยงจากคัพภะอ่อนของถั่วเหลือง เมื่อเติมออกซิน 2,4-D, MCPA, 2,4,5-T, NAA, IAA สามารถทำให้เกิดเนื้อเยื่อเจริญบนใบเลี้ยง การเจริญของเนื้อเยื่อที่เกิด ขึ้นกับความเข้มข้นของออกซินในอาหารที่มี 2,4-D และ MCPA ทำให้เกิดการยืดตัวของเซลล์และเกิดโซมาติคเอมบริโอบนใบเลี้ยง

สำหรับไซโตไคนิน ก็มีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อพืช คือ กระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงเกิดยอดจำนวนมากมาย (Bhojwani และ Razdan, 1983) Chevreau และคณะ (1989) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบ ของ Pyrus sp. เมื่อใช้ thidiazuron (TDZ) ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินร่วมกับ NAA ในอัตราส่วนที่เหมาะสม สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก Goldfarb และคณะ (1991) สามารถชักนำให้เกิดยอดจากเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยงของ Douglas-fir (Pseudotsuga menziesii) เมื่อเติม TDZ และ BA ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง ไซโตไคนินยังมีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ Burger และ Hackett (1982) พบว่า kinetin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไซโตไคนิน ช่วยเพิ่มอัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์ไร้ผนัง

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น เมื่อนำชิ้นส่วนพืชมาเลี้ยงโดยชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส (callus) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์มีลักษณะเป็นก้อนแล้ว สามารถนำมาชักนำให้เกิดเป็นต้นสำหรับการพัฒนาเป็นยอดและรากเกิดขึ้นใหม่ โดยมีวิธีการชักนำได้ 2 แบบ คือ organogenesis เป็นการชักนำการเกิดยอดและรากไม่พร้อมกัน ขึ้นกับว่าจะได้รับการกระตุ้นให้เจริญเป็นยอดหรือราก การเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นยอดและราก เกิดจากการรวมตัวของกลุ่มเซลล์พาเรนไคมาพวก meristematic cell ที่อยู่ภายในแคลลัส เป็น

เซลล์มีขนาดเล็ก มีแวคิวโอล (vacuole) เล็กและไซโตพลาสซึมเข้มข้น กลุ่มเซลล์นี้เรียกว่า meristemoid ซึ่งมีความสามารถที่จะเจริญเป็นจุดเริ่มต้นของยอดหรือราก (Murashige และ Huang, 1985) อีกวิธีการหนึ่งในการชักนำให้เกิดยอดและราก เรียกว่า embryogenesis เป็นการเกิดยอดและรากโดยเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงผ่านขั้นตอนที่สามารถสังเกตได้ชัดเจนหลายขั้นตอน เช่น ระยะ globular proembryo ระยะ heart-shaped ระยะ torpedo shaped จนกระทั่งเป็นคัพภะ (embryo) แล้วเจริญเป็นยอดและรากพร้อมกัน เรียกว่า embryoid แคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชทั้งต้นเรียกว่า embryogenic callus ซึ่งสังเกตได้จากรูปร่างเซลล์ที่ค่อนข้างกลม มีไซโตพลาสซึมเข้มข้นและมีนิวเคลียสใหญ่ ส่วนแคลลัสที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้เรียกว่า non embryogenic callus รูปร่างเซลล์ของแคลลัสจำพวกนี้จะยาว มีแวคิลโอลใหญ่ ไซโตพลาสซึมไม่เข้มข้น (Vajrabhaya, 1988)

ได้มีการศึกษาวิธีการชักนำให้เกิดต้นจากเนื้อเยื่อแคลลัสกันมานานแล้ว แต่เทคนิคดังกล่าวเพิ่งถูกนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริงในงานวิชาการสาขาต่างๆ เมื่อไม่นานมานี้เอง ปัจจุบัน งานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่นั้น สามารถกระทำในพืชหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชทางเศรษฐกิจ (ตารางที่ 2) รวมทั้งไม้ดอกไม้ประดับพืชสวนและพืชสมุนไพร เช่น Kerbauy (1984) สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้บนอาหารสูตร Knudson ที่เสริมด้วย NAA 0.5 มก./ล. เนื้อเยื่อกล้วยไม้เจริญจนถึงระยะออกดอก ภายในเวลา 8-9 เดือน ซึ่งจากเดิมเมื่อเลี้ยงจากธรรมชาติใช้เวลาถึง 3 ปี Damasco และ Barba (1985) ประสบผลสำเร็จในการชักนำให้เกิดต้นในกล้วย Saba banana Arya และคณะ (1991) แยกเซลล์ไร้ผนังจากแคลลัส Panax ginseng แล้วทำ

ตารางที่ 2 พืชสำคัญทางเศรษฐกิจที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ชนิดพืช (species)	ชื่อสามัญ (Common name)	ชิ้นส่วนของพืชที่ใช้ (Explant)	การเกิดเป็นต้นพืช (Plant regeneration)	เอกสารอ้างอิง (Reference)
พืชใบเลี้ยงเดี่ยว				
Oryza sativa L.	rice	anther	embryogenesis	Raina, Sathish and Sarma, 1987
Oryza perennis Moench.	rice	young inflorescence	embryogenesis	Wang, Zapata and DeCastro, 1987
Zea may L.	maize	mature embryo	organogenesis, embryogenesis	Wang,1987
Zea may L.	maize	immature embryo	organogenesis, embryogenesis	Lowe et al.,1985
Zea may L.	maize	immature tassels	embryogenesis	Rhodes, Green and Phillips, 1986
Triticum aestivum	wheat	shoot	embryogenesis	Wang and Nguyen, 1990
Hordeum vulgare	barley	cell suspension	embryogenesis	Jähna, Lazzeri and Lörz, 1991

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชนิดพืช (species)	ชื่อสามัญ (Common name)	ชิ้นส่วนของพืชที่ใช้ (Explant)	การเกิดเป็นต้นพืช (Plant regeneration)	เอกสารอ้างอิง (Reference)
พืชใบเลี้ยงคู่				
Solanum torvum	potato	leaf protoplast	organogenesis	Guri, Volokita and Sink, 1987
Nicotiana plumbaginifolia	tobacco	leaf	organogenesis	Barfield, Robinson and Shields, 1985
Nicotiana tabacum	tobacco	callus	organogenesis	Galbraith, Afonso and Harkins, 1984
Pisum sativum L.	pea	innature embryo	embryogenesis	Kysely et al., 1987
Medicago spp.	forage legumes	cotyledon	embryogenesis	Gilmour, Davey and Cocking, 1987
Glycine max (L.) Merr.	soybean	innature embryo	embryogenesis	Lazzeri et al., 1988
Glycinemax (L.)Merr.	soybean	innature embryo	embryogenesis	Finer, 1988a

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังในอาหาร 1/2 MS จนพัฒนาเป็น embryogenic callus และเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนัง (protoplasts culture) เซลล์ไร้ผนัง(protoplast)เป็นเซลล์เดี่ยว ไม่มีผนังเซลล์ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane)ไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสเท่านั้น แต่เดิมสามารถแยกเซลล์ไร้ผนังออกมาด้วยวิธีกล โดยใช้มีดโกนตัดเซลล์ แล้วนำเซลล์ไปใส่ไว้ในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง เพื่อให้เซลล์ไร้ผนังหดตัวออกมาจากผนังเซลล์(plasmolysis) การแยกยังไม่ประสบผลสำเร็จนัก เพราะแยกเซลล์ไร้ผนังออกมาได้น้อยมาก แต่เป็นจุดที่ก่อให้เกิดความสนใจในเรื่องของเซลล์ไร้ผนัง) ต่อมาเมื่อมีการค้นพบเอนไซม์หลายชนิดที่เตรียมได้จากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น cellulase RS เตรียมได้จากเชื้อรา Trichoderma reesei, macerozyme เตรียมได้จากเชื้อ Rhizopus sp., hemicellulase เตรียมได้จากเชื้อ Aspergillus niger เป็นต้น เอนไซม์เหล่านี้ได้ถูกนำมาใช้แยกเซลล์ไร้ผนังได้เป็นจำนวนมากขึ้น เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยส่วนประกอบของผนังเซลล์พืชให้ผลเป็นเซลล์ไร้ผนังได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง (Bhojwani และ Razdan, 1983; Evan และคณะ, 1983)

การพัฒนาเทคนิคการแยกเซลล์ไร้ผนังขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ สารรักษาความสมดุลของออสโมซิสที่เหมาะสมต่อการแยกเซลล์ไร้ผนัง ฯลฯ การแยกเซลล์ไร้ผนังทำได้จากเนื้อเยื่อและองค์ประกอบของเซลล์พืชหลายส่วน เช่น ส่วนของใบ (Robertson และ Earle, 1987; Guilley และ Hahne, 1989; Li และคณะ, 1990) ส่วนของไฮโปคอทิล (Adachi และคณะ, 1989; Kao และคณะ, 1990) ส่วนของแคลลัส Kunitake และ Mii, 1990) ส่วนของเซลล์แขวนลอย (suspension culture) (Klimaszwska, 1989) ส่วนของรากขนอ่อน(root hair) (Rasheed และคณะ, 1990) เหล่านี้เป็นต้น

นอกจากนี้ เนื่องจากเซลล์ไร้ผนังไม่มีสิ่งปกคลุมสำหรับสร้างความแข็งแรงแก่เซลล์ การปั่นแยกอาจทำให้เซลล์ไร้ผนังแตกไปได้บ้าง จึงทำให้ประสิทธิภาพในการแยกเซลล์ไร้ผนังลดลง (Uchimiya และ Murashige, 1974)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนัง เพื่อให้เป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ มากมายหลายชนิด เช่น

<u>อาหารเพาะเลี้ยง</u> อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังมักประกอบด้วยสารอนินทรีย์ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แต่เพิ่มสารอาหารและเติมองค์ประกอบบางอย่าง เพื่อรักษาสภาวะของเซลล์ไร้ผนัง ซึ่งไม่สามารถสังเคราะห์สารบางอย่างได้ Shekhawat และ Galston (1983) พบว่า การมีกลูตามีน (glutamine) และแอสพาราจีน (asparagine) ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังของ <u>Trigonella foenumgraccum</u> จะทำให้การเจริญและการแบ่งเซลล์สมบูรณ์ขึ้น Guilley และ Hahne (1989) ศึกษาการย้อนกลับไปเกิดแคลลัสใหม่ของเซลล์ไร้ผนังดอกทานตะวัน พบว่า เมื่อให้แหล่งไนโตรเจนในรูปไนเตรทที่มีกลูตามีนเสริมอยู่ด้วย หรือมีกลูตามีนเพียงอย่างเดียวในอาหารเพาะเลี้ยง ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์และเกิดกลุ่มเซลล์ชนิดเอมบริโอเจนิคเพิ่มขึ้นได้

<u>สารควบคุมการเจริญเติบโต</u> มีผลต่อการแบ่งเซลล์รวมทั้งช่วยในการสร้างผนังเซลล์ของเซลล์ไร้ผนัง สารกลุ่มออกซิน เช่น NAA, 2,4-D ช่วยให้เซลล์ขยายตัวและสร้างผนังเซลล์ สารกลุ่มไซโตไคนิน เช่น kinetin, zeatin, BAP ช่วยในการแบ่งเซลล์ เมื่อใช้อัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินเหมาะสมจะมีผลในการสร้างยอดและรากจากเซลล์ระยะแคลลัสได้ (Shaw,1988) Adachi และคณะ (1989) รายงานว่า NAA 2 มก./ล. และ BAP 1 มก./ล. มีผลไปเร่งอัตราการแบ่งเซลล์และการเกิดกลุ่มเซลล์

สูงกว่าการใช้ 2,4-D และ BAP ถ้าหากไม่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต เซลล์ไร้ผนังจะไม่แบ่งตัว Brison และ Lamant (1990) พบว่า NAA 5.3 ไมโครโมลาร์, 2,4-D 2.2 ไมโครโมลาร์, BAP 2.2 ไมโครโมลาร์ และ zeatin 1.8 ไมโครโมลาร์ ทำให้เซลล์ไร้ผนังของ Quercus rubra L. เกิดการแบ่งเซลล์และเกิดกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กได้

ชนิดและความเข้มข้นของสารรักษาแรงดันออสโมซิส การแยกเซลล์ไร้ผนังโดยใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ออก ทำให้สมดุลของออสโมซิสเปลี่ยนแปลง ดังนั้น จำเป็นต้องรักษาดุลยภาพของเซลล์ไร้ผนังโดยใช้สารรักษาแรงดันออสโมซิส เช่น glucose, sucrose, mannitol, sorbitol เป็นต้น ชนิดและความเข้มข้นของสารปรับแรงดันออสโมซิสขึ้นกับชนิดของพืช (Evan และคณะ, 1986) Kunitake และ Mii (1990) พบโดย การแยกเซลล์ไร้ผนังจากส่วนแคลลัสของ Asparagus officinalis L. ใช้สารละลาย glucose 0.6 โมลาร์ เป็นสารปรับแรงดันออสโมซิส Li และคณะ (1990) สามารถแยกเซลล์ไร้ผนังจากส่วนใบเลี้ยงของ Xinjiang muskmelon โดยใช้ mannitol 0.4 โมลาร์ เป็นสารปรับแรงดันออสโมซิสรักษาคุลยภาพของเซลล์ได้

อุณหภูมิ,แสงและสภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีผลต่อการแบ่งเซลล์และการพัฒนาต่อไปเป็นต้นพืชใหม่ Gamborg และคณะ (1981) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสม โดยทั่วไป ของการเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังอยู่ระหว่าง 22-28 °ซ. pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.5-5.8 ความต้องการแสงมากหรือน้อย ขึ้นกับชนิดของพืช Maeda และคณะ (1990) รายงานว่า pH ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังของเฟิรน์ (Lygodium japonicum) คือ 5.8 Wilson และคณะ (1985) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนัง Nicotiana medicago ในที่มืด พบว่า จะสามารถทำให้เกิดกลุ่มเซลล์ขึ้นได้ แต่เซลล์ไร้ผนังของ N. otophora ไม่แบ่งเซลล์เมื่อเลี้ยงในที่มืด

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนัง วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังนั้น อาจเพาะเลี้ยงได้ทั้งในอาหารเหลวหรืออาหารแข็ง Shillito (1983) พบว่า agarose ทำให้เซลล์ไร้ผนังของยาสูบ Nicotiana tabacum และ Hyoscyamus muticus เกิดการแบ่งเซลล์สูงกว่า การใช้ agar ซึ่งเป็นสารที่ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงแข็งตัว Holbrook และคณะ (1985) รายงาน ว่าการเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังของ Medicage sativa ในอาหารที่มี agarose 0.4 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เซลล์ไร้ผนังจะมีอัตราการแบ่งเซลล์สูงที่สุด

ความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังในอาหารเพาะเลี้ยง จากการศึกษาของ Rasheed และคณะ (1990) พบว่า เซลล์ไร้ผนังของ Lotus corniculatus L. ที่ความหนาแน่น 1.0×10^5 และ 1.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เกิดการแบ่งเซลล์ได้ในขณะที่ความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังมีความหนาแน่นต่ำลง คือ 0.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ไม่มีการแบ่งตัว Galbraith และคณะ (1984) ทดลองเลี้ยงเซลล์ไร้ผนัง Nicotiana tabacum พบว่าที่ความหนาแน่น $1\text{-}4 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ไร้ผนัง ทำให้มีการสร้างผนังเซลล์ แบ่งเซลล์และเกิดกลุ่มเซลล์ขึ้นได้

เมื่อประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตลอดจนแยกและเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังได้แล้ว จึงนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้แก่ การรวม (fuse) เซลล์ไร้ผนังเพื่อหาลูกผสมพันธุ์ใหม่ นำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช (Pirrie และ Power, 1986; Klimaszewska, 1989; Chaput และคณะ, 1990) การใช้ขบวนการพันธุวิศวกรรมโดยการตัดต่อยีนที่ต้องการเข้าไปในเซลล์ไร้ผนังเพื่อให้ได้ลักษณะตามที่ต้องการ (Peng และคณะ, 1990) ตลอดจนการหาพันธุ์พืชที่ทนทานต่อดินเค็ม โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลงบนอาหารที่ใส่เกลือระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วชักนำให้เกิดต้น ทำการคัดเลือกเซลล์ที่ทนทานต่อเกลือ เช่นการคัดเลือกข้าวทนเค็ม (Kavi Kishor, 1988)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019159

งานวิจัยและพัฒนาที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อฝ้าย ส่วนใหญ่-เน้นที่การชักนำให้เกิดต้นจากเนื้อเยื่อฝ้ายที่เพาะเลี้ยง สำหรับการวิจัยและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อฝ้ายได้รับความสนใจและศึกษากันมาโดยตลอด

Davidonis และ Hamilton (1983) ประสบความสำเร็จในการ-ทำให้เซลล์แคลลัสของฝ้ายงอกกลับเป็นต้นใหม่ได้เป็นครั้งแรก โดยการชักนำให้-เกิดแคลลัสจากส่วนใบเลี้ยงของฝ้ายพันธุ์ Coker 310 ในอาหารสูตร LS เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. หลังจากเกิดแคลลัสแล้ว ย้ายลงอาหารสูตรเดิม แต่ไม่มี NH_4NO_3 เพิ่ม KNO_3 เป็น 2 เท่าในอาหาร-เพาะเลี้ยงและไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นยอดและรากได้ แต่ผลการทดลองยังไม่ได้รับการตรวจสอบอย่างแน่นอนมากนัก

Shoemaker และคณะ (1986)ศึกษาการพัฒนา (develop)เป็นต้นใหม่ของฝ้าย 17 สายพันธุ์ โดยใช้ส่วนไฮโปคอทิล (hypocotyl) เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม คือ กลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA และNAA กลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ kinetin จากผลการทดลอง พบว่า สภาวะดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิด embryogenic callus ได้ดีในฝ้ายสองพันธุ์ คือ Coker 201 และ Coker 315 เมื่อย้าย embryogenic callus ลงบนอาหารสูตรเดิมที่มีเฉพาะ kinetin แต่เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ได้

Gawel และคณะ (1986) ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน leaf discs ของฝ้าย 4 สายพันธุ์ (T 141, T 147, Acala SJ-1 และ Coker 312) และเนื้อเยื่อส่วน petioles ของฝ้าย 6 สายพันธุ์ (T 1, T 25, T 169, Coker 312, Acala SJ-5 และPaymaster 303) พบว่า เนื้อเยื่อส่วน leaf discs เจริญดีในอาหารสูตร LS ส่วน petiolesเจริญได้ดีบนอาหารสูตร MS หลังจาก-เกิดแคลลัสขึ้นย้ายแคลลัสลงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เสริมด้วย inositol, thiamine และ $MgCl_2$ เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และkinetin

สามารถชักนำให้เกิดต้นได้จากเนื้อเยื่อทั้งสองส่วน .

Trolinder และGoodin (1987)รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อฝ้ายพันธุ์ Coker 312 (Gossypium hirsutum L.) จากส่วนไฮโปคอทิลบนอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตรของ B5 แล้วเติม 2,4-D 0.1 มก./ล. และ kinetin 0.1 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสขึ้นได้ เมื่อย้ายแคลลัสลงไปในอาหารสูตรเดิมที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ปรากฏว่าสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้โดยผ่านทาง embryogenesis เช่นกัน

Finer (1988) ได้ศึกษาการเกิดต้นของฝ้ายพันธุ์ Coker 310 โดยชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนใบเลี้ยง ในอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 เติม NAA 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. ซึ่งเมื่อย้ายแคลลัสลงไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเฉพาะออกซิน แล้วจึงย้ายไปเลี้ยงต่อในอาหารแข็ง ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำให้เกิดต้นฝ้ายที่สมบูรณ์ได้

Trolinder และ Shang (1991)ศึกษาการคัดเลือกฝ้ายทนอุณหภูมิสูงโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของฝ้ายพันธุ์ Coker 312 สภาวะการเพาะเลี้ยงให้ได้รับอุณหภูมิสูง ๆ (45 °ซ.) ในระยะเวลาต่าง ๆ จากนั้น นำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารสูตร MS จนเจริญเป็นต้น แล้วทำการตัดส่วนใบมาชักนำให้เกิดแคลลัส นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38 °ซ. ปรากฏว่าเซลล์แคลลัสมีชีวิตรอด

Finer และ Smith (1982) ทดลองแยกเซลล์ไร้ผนังจากแคลลัสของ Gossypium klotzschianum Anderss. โดยใช้สารละลายเซลลูเลสร่วมกับมาเซโรไซม์ และศึกษาสภาวะของการหวนคืนกลับของผนังเซลล์ได้สำเร็จ

Firoozabady และ DeBoer(1986)แยกเซลล์ไร้ผนังจากใบจริงของฝ้าย Gossypium hirsutum และ G. barbadense พบว่า ใบเลี้ยงเป็นแหล่งของการแยกเซลล์ไร้ผนังได้ดีกว่าใบจริง ได้ใช้เอนไซม์ Cellulysin 1 เปอร์เซ็นต์ และ Macerase 0.5 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการแยกแล้ว นำเซลล์ไร้ผนังไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS เป็นเวลา 4-5 วัน เซลล์ไร้ผนังจะสร้างผนังเซลล์ขึ้น โดยทั่วไป ไม่พบการแบ่งเซลล์ของ G.hirsutum แต่กลับพบลักษณะของการแตกหน่อ (budding) ส่วน G. barbadense นั้น หลังจากเซลล์ไร้ผนังสร้างผนังเซลล์แล้ว 2 สัปดาห์ จึงเกิดการแบ่งเซลล์ 5-8 เซลล์ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานว่าสามารถชักนำเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่นี้ให้เจริญเติบโตต่อไปจนเกิดเป็นกลุ่มแคลลัสจำนวนมาก และพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ในฝ้ายทั้งสองชนิดได้

จะเห็นได้ว่า การศึกษาและวิจัย เพื่อหาสภาวะของการหวนคืนกลับเป็นต้นของฝ้ายยังมีไม่มากนัก ปัจจุบัน ยังไม่มีวิธีการชักนำให้เกิดต้นจากเนื้อเยื่อ (tissue) และเซลล์ไร้ผนัง (protoplast)ของฝ้าย ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยง-เนื้อเยื่อ ที่เป็นมาตรฐานให้ได้กับทุกสายพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในประเทศไทยยังไม่มีผู้ใดศึกษาการเพาะเลี้ยง และการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง2 และฝ้ายน้อย ที่ชาวชนบทปลูกกัน

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์ไร้ผนังของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 (Gossypium hirsutum) และฝ้ายน้อย (G. arboreum) ตลอดจนศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการชักนำให้มีการสังเคราะห์ผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ ทั้งนี้ เพื่อเป็นพื้นฐานของการพัฒนาพันธุ์ฝ้ายไทยด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพในอนาคต

ขั้นตอนการวิจัยมีดังต่อไปนี้

1. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อแคลลัส (callus) จากส่วนใบเลี้ยง (cotyledon) และไฮโปคอทิล (hypocotyl) ของฝ้าย พันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย (ฝ้ายพื้นเมือง)

2. หาสภาวะที่มีศักยภาพในการชักนำเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (culture tissue) ให้เป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (plant regeneration)

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเซลล์ไร้ผนัง (protoplast) จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของฝ้าย

4. หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังและการเปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์แคลลัสที่สมบูรณ์เพื่อชักนำสู่การหวนคืนกลับเป็นต้นต่อไป