บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ผักกาดขาวปลี (*Brassica campestris* Linn. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson) มีถิ่นกำเนิดแถบประเทศจีนตอนกลางซึ่งเป็นบริเวณที่มี *B. campestris* ssp. *rapa* และ *B. campestris* ssp. *chinensis* เกิดขึ้นก่อนแล้วและอาจเป็นไปได้ที่ผักกาดขาวปลีเป็นลูกผสมของพืชทั้งสอง (Li, 1981) ผักกาดขาวปลีมีจำนวนโครโมโซม 2n=20 (Opena et al., 1988) (ภาพที่ 1) การจำแนกผักกาดขาวปลีสามารถจำแนกตามลักษณะการเข้าปลีได้เป็น 3 ชนิดคือ

1. ชนิดที่เข้าปลีกลมแน่น ลักษณะปลีเป็นทรงสั้น อ้วนกลม จัดเป็น *B. campestris* var. *cephalata* ได้แก่พันธุ์ Saladia hybrid พันธุ์ Tropical pride hybrid

2. ชนิดที่เข้าปลียาว(ผักกาดหางหงส์) ลักษณะปลีตั้งทรงสูง จัดเป็น *B. campestris* var. *cylindrica* ได้แก่พันธุ์ Tropicana hybrid พันธุ์ W-R-Crucider hybrid

3. ชนิดที่เข้าปลีหลวมหรือไม่ห่อปลี จัดเป็น *B. campestris* var. *laxa* ได้แก่พันธุ์ผักกาดขาวที่ปลูกทั่วไปเช่น ผักกาดขาวใหญ่ ผักกาดขาวธรรมดา (เมืองทองและสุรีรัตน์, 2525)

ผักกาดหัว (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus* Linn.) มีถิ่นกำเนิดในเอเชีย มีจำนวนโครโมโซม 2n=18(Opena et al., 1988)(ภาพที่2) สามารถแบ่งผักกาดหัวเป็น 2 พวกใหญ่คือ

1. Radish เป็นกลุ่มที่ปลูกมากในแถบยุโรป จะมีส่วนของรากขนาดเล็ก อายุการเก็บเกี่ยวสั้นนิยมปลูกและบริโภคในเขตอบอุ่นเช่นยุโรป อเมริกา

2. Chinese Radish เป็นกลุ่มที่ปลูกมากในแถบเอเชีย จะมีส่วนของรากขนาดใหญ่ รูปร่างเป็นแบบกลมและยาวกลุ่มนี้สามารถแยกได้เป็น 2 ชนิดคือ

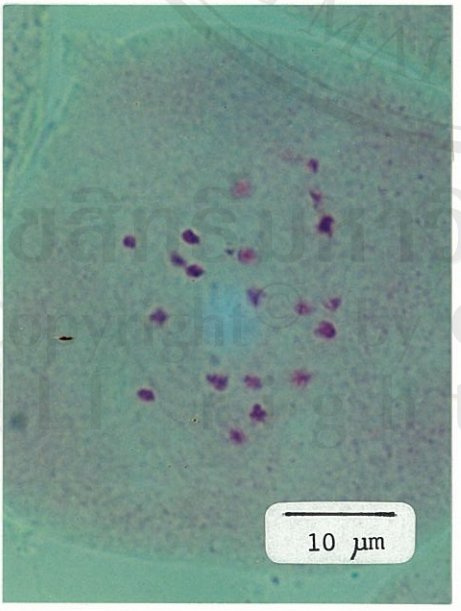
-พันธุ์แบบญี่ปุ่น(Japanese type) ลักษณะใบมีขอบหยักลึกเข้าไปในใบตลอดใบ จะถี่มากน้อยขึ้นกับชนิดพันธุ์

-พันธุ์แบบจีน(Chinese type) ลักษณะใบเรียบไม่มีรอยหยักหรือมีน้อยมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(เมืองทองและสุรีรัตน์, 2525)

ผักกาดขาวปลีและผักกาดหัวจัดอยู่ในตระกูล Cruciferae มีช่อดอกแบบ raceme ดอกจัดเป็นดอกสมบูรณ์เพศประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 4 กลีบ กลีบดอก 4 กลีบ อับละอองเกสร 6 อัน ก้านชูเกสรตัวเมีย 1 อัน และยอดเกสรตัวเมีย 1 อัน รังไข่เป็นแบบ superior ovary (Wivutvongvana, 1980) ถึงแม้ว่าดอกของผักกาดขาวปลีและผักกาดหัวจัดเป็นดอกสมบูรณ์เพศ แต่พืชทั้งสองชนิดโดยธรรมชาติแล้ว เป็นพืชที่มีการผสมข้าม และผสมตัวเองไม่ได้ (self incompatibility) เพราะควบคุมโดยพันธุกรรมแบบ sporophytic system อย่างไรก็ตามสามารถชักนำให้เกิดการผสมตัวเองได้ โดยการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ เช่น ผสมในขณะดอกตูม ควบคุมอุณหภูมิ ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ ควบคุมปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ กระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า และใช้สารเคมี (Opena et al., 1988) แต่การใช้วิธีการเหล่านี้เพื่อสร้างสายพันธุ์แท้ จำเป็นต้องผสมตัวเองไม่น้อยกว่า 6-7 ชั่ว ดังนั้นปัจจุบันจึงนำเอาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้เพาะเลี้ยงไข่ และละอองเกสรเพื่อสร้าง haploid และชักนำให้เป็น diploid โดยการใช้ colchicine ทำให้สามารถสร้างสายพันธุ์แท้ได้ในระยะเวลาอันสั้น (Pierik, 1987; Keller and Armstrong, 1983)



ภาพที่ 1 แสดงจำนวนโครโมโซมของผักกาดขาวปลี 2n=20

ภาพที่ 2 แสดงจำนวนโครโมโซมของผักกาดหัว 2n=18

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและละอองเกสร

Blakeslee et al. (1922) ได้รายงานการค้นพบต้น haploid ของ *Datura stramonium* ในธรรมชาติเป็นครั้งแรกโดยมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับใน gametophytic cell ต่อมามีรายงานตรวจพบต้น haploid ในพืชชนิดต่าง ๆ และได้มีการนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารสังเคราะห์มาใช้เพาะเลี้ยงถุงคัพภะ และอับละอองเกสรเพื่อผลิตต้น haploid ในพืชชนิดที่ต้องการ การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเป็นวิธีการที่นิยมกันมากเพราะเป็นวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว (Bajaj, 1983) และในอับละอองเกสรประกอบด้วย haploid cell เป็นจำนวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับถุงคัพภะ ดังนั้นการกระตุ้นให้เกิดต้น haploid จากอับละอองเกสรจึงมีโอกาสได้ต้น haploid ที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมมากกว่าการเพาะเลี้ยงถุงคัพภะ (Pierik, 1987)

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรได้ประสบความสำเร็จครั้งแรกในพืชพวก Gymnosperm โดย Tulecke (1953) สามารถกระตุ้นให้ละอองเกสรของ *Ginkgo biloba* พัฒนาเป็น callus จากการแบ่งตัวของ vegetative nucleus แต่ไม่สามารถกระตุ้น callus ให้พัฒนาเป็นต้นพืชได้ ส่วนพืชพวก Angiosperm นั้น Guha and Maheshwari (1964) ได้ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของ *Datura innoxia* โดยสามารถกระตุ้นให้พัฒนาไปเป็นโครงสร้างคล้าย คัพภะ (embryoid) และกลายเป็นต้น haploid ในที่สุด ต่อมา Bourgin and Nitsch (1967) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของ *Nicotiana tabacum* ประสบความสำเร็จได้ต้น haploid เป็นจำนวนมาก ส่วนพืชสกุล *Brassica* ได้มีรายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเป็นครั้งแรกใน *B. oleracea* โดย Kameya and Hinata (1970) และได้มีการนำเอาวิธีการไปใช้ผลิตต้น haploid ใน *B. napus* (Thomas and Wenzel, 1975)และ *B. campestris* (Keller et al., 1975) นับตั้งแต่นั้นมาได้มีรายงานถึงความสำเร็จและลักษณะต่าง ๆ ของต้น haploid ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของ *B. napus* (Lichter, 1981; Keller and Armstrong, 1978) *B. campestris* (Keller and Armstrong, 1979) *B. oleracea* (Keller and Armstrong, 1981,1983) *B. hirta* (Klimaszewska and Keller, 1983) และ *B. juncea* (George and Rao, 1982) เป็นต้น ส่วนการแยกเอาเฉพาะละอองเกสรออกมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นั้น Lichter (1982) สามารถแยกเอาเฉพาะละอองเกสรของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

B. napus มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ได้สำเร็จ และมีการพัฒนาวิธีการโดย Chuong and Beversdorf (1985) เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการผลิตต้น haploid เพิ่มขึ้น ส่วนผักกาดขาวปลีนั้น Sato et al. (1989) ได้นำวิธีการของ Chuong and Beversdorf (1985) มาใช้เพาะเลี้ยงละอองเกสรได้สำเร็จโดยเกิดคัพภะจากละอองเกสรและสามารถชักนำให้เกิดคัพภะได้ 0.1-0.25 % การชักนำให้ละอองเกสรเกิดการพัฒนาไปเป็นต้น haploid ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ หลายประการ

ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาของอับละอองเกสรและละอองเกสร

1. ลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ของพืช

การเพาะเลี้ยงละอองเกสรพืชในอาหารสังเคราะห์นั้น ลักษณะทางพันธุกรรมของพืชทดลองเป็นสิ่งสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้การตอบสนองของละอองเกสรไม่เหมือนกัน (Collins and Genovesi, 1982) พืชชนิดต่างกัน จะมีความแตกต่างในการกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของ haploid cell จากง่ายไปจนถึงยากมาก โดยเฉพาะไม้ยืนต้นจะมีความยากมาก (Pierik, 1987) พืชที่อยู่ในตระกูล Solanaceae บางชนิดจะแสดงการตอบสนองต่ออาหารสังเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว เช่น *Nicotiana tabacum* *N. sylvestris* *N. knightiana* *Hyoscyamus niger* และ *Datura innoxia* สามารถพัฒนาได้ในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตใด ๆ เลย (Sunderland and Dunwell, 1977) และโดยเฉพาะละอองเกสรของ *N. tabacum* และ *D. innoxia* (Sunderland, 1974) สามารถพัฒนาได้แม้ในสารละลายของน้ำตาลซูโครส 2 % แต่พืชอื่น ๆ เช่น *Hordeum spp.* *B. campestris* *Triticum spp.* และ *Asparagus officinalis* ต้องผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง auxin และ cytokinin ลงในอาหารสังเคราะห์จึงจะสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้ (Sunderland and Dunwell, 1977) พืชบางอย่าง แม้ว่าจะเป็นพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์กันความสามารถในการพัฒนามีความแตกต่างกันด้วย เช่น ธัญญพืชจำพวกข้าวนั้น อุดมและอรดี (2523) ทดลองเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวพันธุ์ กข 1 กข 3 กข 5 กข 7 กข 9 และ กข 11 บนอาหารเพื่อกระตุ้นให้เกิด callus พบว่าข้าวพันธุ์ กข 5 มีเปอร์เซ็นต์การเกิด callus สูงสุด เมื่อนำ callus ลงเพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อกระตุ้นให้เกิดต้นกลับ พบว่า callus ของข้าวพันธุ์ กข 1 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้น และรากสูงสุด แต่ callus ของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้าวพันธุ์ กข 5 ให้เปอร์เซ็นต์ต้นปกติและต้นเผือกสูงสุด ส่วน callus ของข้าวพันธุ์ กข 9 ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ Niizeki and Oono (1968) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าว 10 สายพันธุ์ มีเพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถพัฒนาเป็น callus ได้ ในข้าวบาร์เลย์นั้น Dunwell (1985a) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าจำนวนอับละอองเกสรที่เกิด callus มีความแตกต่างกัน ส่วน Foroughi-Wehr et al. (1976) ได้ทดลองกับข้าวบาร์เลย์สายพันธุ์ spring 19 สายพันธุ์ พบว่าพันธุ์ Dissa แสดงการตอบสนองต่ออาหารได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงได้ผสมพันธุ์ Dissa กับพันธุ์อื่น ๆ แล้วนำอับละอองเกสรของลูกผสมที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารทำให้พันธุ์อื่นที่เคยตอบสนองต่ำกลับมีการตอบสนองเพิ่มขึ้น ลักษณะนี้ได้พบในข้าวไรย์ (Wenzel et al., 1977) ข้าวสาลี (Bullock et al., 1982) ในข้าวโพด Wenzel and Foroughi-Wehr (1984b) พบว่าข้าวโพดพันธุ์ Dan-san 91 เกิดการพัฒนาของอับละอองเกสร 4.1 % ในขณะที่พันธุ์ King Hwang 13 เกิดเพียง 0.4 % ส่วน Dunwell(1985a) พบว่าจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดถึง 13 สายพันธุ์ มีเพียง 3 สายพันธุ์เท่านั้นที่ตอบสนองต่ออาหารและได้ต้นเพียง 14 ต้นจากอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด 21,638 อับ ในมะเขือ อำพล (2525) ทดลองเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของมะเขือเปราะพันธุ์เจ้าพระยา มะเขือยาวพันธุ์เขียวงาช้างและมะเขือพวง พบว่าละอองเกสรของมะเขือเปราะและมะเขือยาวสามารถพัฒนาเป็น haploid callus ได้จากการแบ่งตัวของ vegetative nucleus ในขณะที่ละอองเกสรของมะเขือพวงไม่มีการพัฒนาใด ๆ เลย ในพริก จรรยา (2528) ทดลองเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของพริกชี้ฟ้า พริกชี้หนู พริกหยวก พบว่าเปอร์เซนต์การเกิด callus จากอับละอองเกสรมีความแตกต่างกันตามชนิด ส่วนพืชตระกูลกะหล่ำ Loh and Ingram (1982) ทดลองเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของ *B. napus* ssp. *oleifera* พันธุ์ Brinke Jet neuf Primor Quinta Rafal และ Rapora บนอาหารตาม Keller et al. (1975) พบว่าพันธุ์ Primor เกิดคัพภะสูงสุด และยังพบการเกิด secondary embryo บนคัพภะด้วย นอกจากนั้นความสามารถของคัพภะที่พัฒนาเป็นต้นอ่อนและจำนวนต้น haploid ที่ได้แตกต่างกันไปตามพันธุ์ ส่วน Thurling and Chay (1984) ทดลองในลักษณะเช่นเดียวกันนี้ โดยใช้พันธุ์แท้ทั้งหมด พบว่า การพัฒนาของละอองเกสรเป็น multinucleate แตกต่างกันตามพันธุ์ และการทดลองของ Dunwell et al. (1985) ได้ใช้พันธุ์ลูกผสม F_1 ทั้งหมด พบว่าจำนวนของคัพภะที่ได้มีความแตกต่างกันและการตอบสนองต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาหารของลูกผสมไปในทิศทางเดียวกันกับพันธุ์พ่อและแม่ นอกจากนั้นยังพบว่าการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ 4 °ซ. เป็นเวลา 14 วันจะยับยั้งการพัฒนาของอับละอองเกสรในพันธุ์ประเภท winter rape ส่วนพันธุ์ประเภท spring rape ไม่มีการยับยั้ง Chuong and Beversdorf (1985) ทดลองเพาะเลี้ยงเฉพาะละอองเกสรของ *B. napus* 6 สายพันธุ์ และ *B. carinata* 1 สายพันธุ์พบว่าการพัฒนาของละอองเกสรเป็นคัพภะ การเกิดต้นอ่อนแตกต่างกัน ใน *Sinapis alba* นั้น Jain et al. (1989) ทดลองเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรในพันธุ์ต่าง ๆพบว่ามีเพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่ callus สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ ใน *B. oleracea* var.*gemmifera* นั้น Ockendon (1985) สามารถแบ่งพันธุ์ออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้ คือ กลุ่มที่ตอบสนองต่ออาหารได้ดีที่สุด กลุ่มที่ตอบสนองได้ดีปานกลาง และกลุ่มที่ไม่ตอบสนองเลย ส่วนในกะหล่ำดอก Ockendon (1988) ยังได้พบว่า แม้แต่จำนวนต้น haploid มีความแตกต่างกัน จากผลการทดลองเหล่านี้พบว่าพันธุกรรมของพืชทดลอง จะส่งผลถึงความแตกต่างในการพัฒนาของอับละอองเกสรเป็น callus หรือเป็นคัพภะโดยตรง จำนวนอับละอองเกสรที่พัฒนา จำนวนต้นอ่อนที่ได้ และจำนวนต้น haploid ที่เป็นเช่นนี้ อาจเป็นเพราะว่าการกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของเนื้อเยื่อ haploid ของละอองเกสรอยู่ภายใต้การควบคุมของพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (Nitsch and Nitsch, 1969)

2. สภาพแวดล้อมขณะที่ปลูกพืชและอายุของพืช

สภาพแวดล้อมของพืช เช่นอุณหภูมิ ความเข้มแสง ช่วงแสง แร่ธาตุและความเข้มข้นของ CO_2 ในบรรยากาศ มีผลต่อการตอบสนองของละอองเกสร เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ (Wenzel and Foroughi-Wehr, 1984b) ในข้าวบาร์เลย์จะเกิดการพัฒนาของอับละอองเกสร สูงถึง 3 % เมื่อปลูกที่อุณหภูมิ 12 °ซ. เป็นเวลา 14 ชม. และ 5 °ซ. เป็นเวลา 10 ชม. ต่อวัน (Foroughi-Wehr and Mix, 1979) พืชสกุล *Brassica* ทั่วไปปลูกที่อุณหภูมิ 15-20 °ซ. ต่อวัน แต่ใน *B. napus* จะเกิดการพัฒนาของอับละอองได้ดี เมื่อนำอับละอองเกสรจากต้นที่ปลูกในอุณหภูมิ 10-15 °ซ. ต่อวัน (Keller and Stringham, 1978) ใน *B. oleracea* var.*gemmifera* นั้น Ockendon (1984) ทดลองปลูกต้นในเรือนกระจกที่มีอุณหภูมิ 10-20 °ซ.และในสภาพควบคุมที่อุณหภูมิกลางวันและกลางคืนดังนี้ 10 °ซ./ 11 °ซ. 15 °ซ./ 9 °ซ. และ15 °ซ./ 5 °ซ. พบว่าการตอบสนองของละอองเกสรต่ออาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากต้นที่ปลูกในสภาพควบคุมจะให้ผลการทดลองที่มีความแปรปรวนน้อยกว่า และยังพบว่าสภาพความเข้มของแสงสูง อุณหภูมิกลางวันและกลางคืน 15 °ซ./ 9 °ซ. เป็นสภาพที่เหมาะสมที่สุด Thurling and Chay (1984) พบว่าสภาพแวดล้อมมีผลต่อความสัมพันธ์ระหว่างขนาดดอก และระยะการพัฒนาของละอองเกสรของ *B. napus* ssp. *oleifera* โดยดอกที่มีขนาดที่เท่ากันแต่ได้จากต้นที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกันจะมีระยะการพัฒนาของละอองเกสรที่แตกต่างกัน นอกจากนั้นการเกิด multinucleate จะเกิดได้ดีเมื่อปลูกต้นที่อุณหภูมิกลางวันและกลางคืนเป็น 20 °ซ. และ 15 °ซ. ตามลำดับ นอกจากนี้ต้นควรได้รับการ vernalization เสียก่อน จะให้ผลดีกว่าต้นที่ไม่ได้รับการ vernalization และพันธุ์แต่ละพันธุ์มีความจำเพาะต่อสภาพแวดล้อมด้วย ส่วน Dunwell et al. (1985) พบว่า เมื่อปลูก *B. napus* ssp. *oleifera* ที่อุณหภูมิ 15 °ซ. จะทำให้การพัฒนาของอับละอองเกสรสูงกว่าปลูกที่ 20 °ซ. แต่พืชสกุล *Datura* นั้น Nitsch and Norreel (1973) กลับพบว่า เมื่อปลูกที่ 24 °ซ. ทำให้อัตราการพัฒนาของอับละอองเกสรสูงถึง 45 % ในขณะปลูกที่ 17 °ซ. เกิดเพียง 8 % เท่านั้น Dunwell (1985a) พบว่าการเกิด callus ของข้าวสาลีและความสามารถในการเกิดต้นของ callus ที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างพันธุ์และสภาพแวดล้อม และยังพบว่าอุณหภูมิขณะที่ปลูกมีผลต่อความแข็งแรงของละอองเกสรของข้าวไรย์ กล่าวคือเมื่อปลูกข้าวไรย์ที่ 25 °ซ. จะทำให้ละอองเกสรแตกง่ายเมื่อแยกเอาเฉพาะละอองเกสรมาเพาะเลี้ยง นอกจากอุณหภูมิแล้วแสงยังมีผลด้วย Keller (1984)พบว่า *B. napus* จะตอบสนองได้ดีถ้าให้แสง 16 ชม.ต่อวัน ส่วนใน *B. campestris* ควรให้แสงตลอด 24 ชม. Keller et al. (1983) พบว่าความเข้มของแสง 3000 foot-candles เป็นระดับที่เหมาะสม แต่อาจให้ 750 หรือ 1500 foot-candles และควรให้แสงจากหลอด fluorescent 84 % และ incandesent 16 % Bajaj (1977) พบว่าอับละอองเกสรของข้าวสาลีที่ได้จากสภาพแปลงปลูกจะเกิดการพัฒนาเป็น callus ได้มากกว่าปลูกในเรือนกระจก ทั้งนี้เป็นเพราะว่ามีสภาพความเข้มของแสงสูงกว่า Wenzel and Foroughi-Wehr (1986b) พบว่าเมื่อปลูกข้าวบาร์เลย์ที่อุณหภูมิ 18-20 °ซ. แต่มีความเข้มของแสงต่ำจะทำให้การพัฒนาของละอองเกสรลดลง และยังพบว่าข้าวไรย์เมื่อปรับสภาพบรรยากาศโดยเพิ่ม CO_2 ในสภาพวันสั้นจะให้ผลดีกว่าไม่เพิ่ม CO_2 การใช้สาร gametocide บางชนิดฉีดพ่นแก่ต้นหรือดอกก่อนการนำอับละอองเกสรมาเพาะเลี้ยง จะส่งผลให้ละอองเกสรแบ่งตัวผิดปกติเกิด multinucleate ในขณะที่ดอกยังอยู่บนต้น ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่ทำให้เพิ่มการพัฒนาของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ละอองเกสร Bennett and Hughes (1972) พบว่าเมื่อฉีดพ่นข้าวสาลีพันธุ์ Chinese spring ด้วยอีเทรล (2-chloroethylphosphonic acid) ในระยะ microspore mother cell ก่อนการเกิด meiosis ทำให้เกิดการแบ่งตัวผิดปกติได้ multinucleate Bajaj (1983) พบว่าเมื่อฉีดพ่นยาสูบด้วยอีเทรล 1000-2000 ppm. จะทำให้ใบร่วงภายใน 2 วัน ขณะที่ 250-500 ppm. ทำให้ดอกเหลืองและร่วงใน 1 สัปดาห์ ส่วนดอกที่ใช้ 100 ppm. ทำให้ vegetative nucleus เกิดการแบ่งตัว เมื่อนำอับละอองเกสรมาเพาะเลี้ยงหลังจากฉีดพ่นได้ 4 วัน จะเกิดการพัฒนาของละอองเกสรได้ถึง 25 % อย่างไรก็ตาม callus ที่ได้มีสีน้ำตาล Bajaj (1975) พบว่าการฉีดพ่นข้าวสาลีด้วยอีเทรล 4000 ppm. ในระยะที่ละอองเกสรเกิด mitosis ครั้งแรกทำให้ละอองเกสรมีการแบ่งตัวของนิวเคลียสได้ 4-8 นิวเคลียสแต่ในบางกรณีทั้ง vegetative และ generative แบ่งตัวซ้ำหลายครั้ง นอกจากนั้นละอองเกสรไม่มีการสะสมแป้ง แร่ธาตุบางชนิดเช่น ไนโตรเจน มีผลต่อการพัฒนาของละอองเกสรด้วย จากการศึกษาของ Sunderland (1978) and Tsay (1981, 1982) พบว่าต้นยาสูบที่ไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนจะให้ผลดีกว่าต้นที่ใส่ปุ๋ย แต่เมื่อทำการศึกษาอีกครั้งหนึ่งกลับพบว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจน 15 mM. มีความเหมาะสม นอกจากนั้น ไนโตรเจนยังมีผลต่อจำนวนวันที่ออกดอกด้วย Bajaj (1983) เสนอว่าควรให้ Hoagland's solution ทุก ๆ 2 สัปดาห์แก่ต้นยาสูบ อายุของพืชมีผลต่อการพัฒนาของละอองเกสรด้วย ดังนั้นควรใช้ดอกจากช่อดอกหลักและดอกที่อยู่ในช่วงต้นของการเจริญเติบโต (Anagnostakis, 1974; Narayanaswamy and Chandy, 1971) ซึ่งเป็นระยะที่ดอกแรกของช่อดอกหลักเพิ่งบาน (Dunwell, 1986) หากต้นมีจำนวนจำกัดอาจตัดให้ต้นเกิดการแทงช่อดอกใหม่ (Keller, 1984) นอกจากนั้นอายุยังส่งผลทำให้ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดดอกและขนาดของอับละอองเกสรเปลี่ยนไป เช่นในมันฝรั่ง พบว่าดอกที่อยู่ช่วงต้นของการเจริญเติบโตจะมีขนาดใหญ่ แต่มีอับละอองเกสรขนาดเล็ก ในขณะดอกที่เกิดช่วงหลังของการเจริญเติบโตจะมีดอกขนาดเล็ก แต่มีอับละอองเกสรขนาดใหญ่ (Wenzel and Foroughi-Wehr, 1984a) การเก็บดอกที่แก่มากของต้นลำโพงออกโดยไม่ปล่อยทิ้งไว้กับจะให้ผลดีกว่าปล่อยไว้กับต้น (Nitsch, 1975) การตัดเอาปลายช่อดอกของต้นข้าวสาลีออกจะเพิ่มการพัฒนาของละอองเกสร (Picard, 1973) ในธัญญพืชพบว่าเมื่อนำอับละอองเกสรจาก primary tiller มาเพาะเลี้ยงจะเกิดการพัฒนาของละอองเกสรได้ดีกว่า lateral tiller (Orlikowska, 1977) แต่ Chen and Tsay (1982) ไม่พบความแตกต่าง การอยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แตกต่างกันจะมีผลต่อความสมบูรณ์ของละอองเกสรและมีผลทำให้การตอบสนองลดลงสามารถตรวจสอบโดยนำเอาละอองเกสรไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ และสังเกตความสามารถในการงอก pollen tube (Wenzel and Foroughi-Wehr, 1984b) นอกจากนั้นความมีชีวิตของละอองเกสรสามารถตรวจสอบโดยใช้ fluorescein diacetate (Dunwell, 1985b) เพื่อให้การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรได้ผลดีควรนำอับละอองเกสรจากต้นที่มีความสมบรูณ์ อยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ให้ธาตุอาหารตามความเหมาะสม และควรใช้ดอกจากต้นที่ยังอ่อนอยู่ (Bajaj, 1983)

3. ระยะการพัฒนาของละอองเกสร

ปัจจัยนี้เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมาก ที่จะนำไปสู่ความสำเร็จ ของการเพาะเลี้ยงละอองเกสร (Nitsch and Nitsch, 1969) การนำละอองเกสรที่มีระยะไม่เหมาะสมมาเพาะเลี้ยง หรือเลือกระยะที่ผิด จะส่งผลทำให้การตอบสนองต่ออาหารสังเคราะห์ลดลงอย่างมาก จากการทดลองของ Sunderland and Dunwell (1977) ที่เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงละอองเกสรของยาสูบที่มีระยะของละอองเกสรแตกต่างกัน พบว่าความยาวของกลีบดอกเพียง 2 มม. จะทำให้การพัฒนาของอับละอองเกสรเป็นต้นอ่อนแตกต่างกันถึง 4 เท่า นอกจากนั้นละอองเกสรที่อยู่ในระยะ binucleate ให้เปอร์เซ็นต์ของละอองเกสรที่พัฒนา เปอร์เซ็นต์ของการเจริญเป็นต้นอ่อนและจำนวนต้นอ่อนต่ออับละอองเกสรมีค่าสูงสุด ส่วนการทดลองของ Nitsch and Nitsch (1969) พบว่าระยะ uninucleate เป็นระยะที่มีความเหมาะสมมากกว่าระยะอื่น ๆ แต่ถ้าอยู่ในระยะหลังจาก uninucleate แล้วจะต้องใช้ auxin ในความเข้มข้นที่สูงเพื่อชักนำให้เกิดการแบ่งตัวแบบ mitosis ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดการแบ่งตัว ของเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ ที่เป็น diploid ได้ด้วย (Sunderland and Wicks, 1971) ในยาสูบ (Engvild, 1974) ลำโพง (Engvild et al., 1972) *Hyoscyamus niger* (Corduan, 1975) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรในระยะ uninucleate ต้นอ่อนที่ได้จะเป็นต้น haploid แต่ในระยะอื่น ๆ จะได้ต้นอ่อนที่มีระดับ ploidy แตกต่างกัน นอกจากนี้ Raquin et al. (1982) พบว่าอับละอองเกสรของข้าวสาลีจะเกิดเป็นต้นกะได้นั้นต้องนำละอองเกสรที่อยู่ในระยะ uninucleate และอยู่ในระยะ G_2 เท่านั้นมาเพาะเลี้ยง ส่วน Sunderland et al. (1981) พบว่าควรเก็บช่อดอกข้าวบาร์เลย์ที่อุณหภูมิต่ำเมื่อละอองเกสรอยู่ในระยะ G_2 ในพืชสกุล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Brassica ระยะที่เหมาะสมควรอยู่ในระยะ uninucleate มากกว่า แม้ว่าการเกิดคัพภะสามารถกระตุ้นให้เกิดได้ในระยะ binucleate ก็ตาม (Keller, 1984) จากการทดลองของ Pechan and Keller (1988) and Fan et al. (1988) ที่นำละอองเกสรของ *B. napus* ในระยะ uninucleate และ binucleate มาเพาะเลี้ยงพบว่าระยะ uninucleate จะเกิด mitosis ครั้งแรกเพื่อสร้างคัพภะภายใน 8-16 ชม. ส่วน binucleate จะเกิดภายใน 8-48 ชม. และละอองเกสรในระยะ uninucleate ให้คัพภะมากกว่าละอองเกสรที่อยู่ในระยะ binucleate ระยะ binucleate บางส่วนมีการพัฒนาเช่นเดียวกับ in vivo Coventry et al. (1988) พบว่าระยะ binucleate จะมีละอองเกสรที่อยู่ในระยะอื่น ๆ ปนอยู่หากนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์จะมีการปล่อยสารยับยั้งการเจริญเติบโตออกมาทำให้ละอองเกสรไม่สามารถพัฒนาได้ ดังนั้นการเลือกดอกเพื่อนำละอองเกสรมาเพาะเลี้ยงควรทำด้วยความระมัดระวังโดยใช้ระยะที่เหมาะสมที่สุด การนำลักษณะภายนอกของดอกมาใช้บ่งบอกถึงระยะที่เหมาะสมสามารถปฏิบัติได้ในบางกรณี เช่น ยาสูบ จะใช้ดอกที่เริ่มแย้มกลีบดอกให้เห็นส่วนในพืชสกุล *Brassica* ควรใช้ดอกที่มีความยาวของกลีบดอกเป็น 1/4 หรือ 1/2 ของความยาวของอับละอองเกสร ระยะนี้อับละอองเกสรจะมีสีเขียวเหลือง (Keller, 1984) อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างขนาดดอกและระยะการพัฒนาของละอองเกสรมีการผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมและสายพันธุ์ที่ใช้ (Pierik, 1987; Keller, 1984) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดดอกและระยะการพัฒนาของละอองเกสร เพื่อจะได้ใช้เป็นเกณฑ์ในการนำดอกที่มีขนาดและระยะการพัฒนาของละอองเกสรเหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร เมื่อใช้พันธุ์ใหม่ และสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ในพืชสกุล *Brassica* สามารถศึกษาระยะการพัฒนาของละอองเกสร โดยการนำอับละอองเกสรไป fixed ใน 6:3:1 ของ ethanol: acetic acid:chloroform และย้อมใน propiono-carmine ถ้าเตรียมสดอาจบี้ (squashes) ใน lactopropionic orcein หรือ 0.05 % toluidine blue ใน citric acid buffer (pH 4.0) (Keller, 1984) แต่ Fan et al. (1988) พบว่าในพืชสกุล *Brassica* การย้อมสีละอองเกสร มักจะย้อมติดได้ยากเมื่อใช้สีธรรมดา ดังนั้นจึงมีการใช้สีย้อม fluorescent ย้อมตรวจสอบการพัฒนาของละอองเกสร (Coleman and Goff, 1985) เช่น ใน *B. napus* ใช้สี DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) (Fan et al., 1988) ในข้าวโพดใช้ mitramycin (Pescitelli and Petolino, 1988)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การ pretreatment

การให้อุณหภูมิต่ำแก่ดอกหรืออับละอองเกสรในช่วงระยะเวลาหนึ่งก่อนนำอับละอองเกสรไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ พบว่าช่วยให้เกิดการพัฒนาของละอองเกสร จากการทดลองของ Morrison et al. (1986) พบว่าเมื่อนำดอกของพริกไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ.ภายใต้ความชื้นสูงเป็นเวลา 2 วัน แล้วนำอับละอองเกสรไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร จะช่วยให้อับละอองเกสรพัฒนาเป็นต้นได้เพิ่มขึ้น ในข้าว Dunwell (1985a) พบว่าเมื่อนำช่อดอกไปเก็บที่อุณหภูมิ 7-8 °ซ.เป็นเวลา 7 วัน จะเพิ่มจำนวนอับละอองเกสรพัฒนาเป็น callus สูงถึง 67 % ส่วนมันฝรั่งนั้น Wenzel and Foroughi-Wehr (1984a) เสนอว่าควรเก็บดอกที่อุณหภูมิ 6 °ซ. เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำอับละอองเกสรไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร นอกจากนี้ George and Rao (1982) พบว่าการเก็บช่อดอกของ *B. juncea* ที่อุณหภูมิ 10 °ซ. เป็นเวลา 2-15 วัน ก่อนนำอับละอองเกสรไปเพาะเลี้ยงจะช่วยให้เกิดคัพภะเพิ่มขึ้น ในข้าวบาร์เลย์ Dunwell (1985b) พบว่าควรเก็บช่อดอกที่อุณหภูมิที่ 4 °ซ. เป็นเวลา 28 วัน หรือ 7 °ซ. เป็นเวลา 14 วัน โดยให้ทั้งช่อดอกหรือให้เฉพาะอับละอองเกสรไม่ให้เกิดการสัมผัสกับน้ำหรืออาจแบ่งครึ่ง petridish ให้ข้างหนึ่งมีน้ำเพื่อให้เกิดความชื้นสูงแล้วเก็บไว้ในที่มืด แต่ Keller et al. (1983) พบว่าการใช้อุณหภูมิที่ 5 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน จะมีผลยับยั้งการพัฒนาของละอองเกสร *B. campestris* การให้อุณหภูมิต่ำมากมีผลต่อการพัฒนาของละอองเกสรด้วย เช่น ในข้าวเมื่อนำช่อดอกไปผ่านไนโตรเจนเหลว ก่อนนำอับละอองเกสรไปเพาะเลี้ยง จะกระตุ้นให้เกิดต้นอ่อนจากละอองเกสร (Conlibaly and Demarly, 1979) บทบาทของอุณหภูมิต่ำที่ทำให้ละอองเกสรของพืชต่าง ๆ สามารถพัฒนาได้ดีขึ้นยังไม่ทราบแน่ชัดแต่ Sunderland and Dunwell (1977) ได้อธิบายว่าอาจเกี่ยวข้องกับการสลายตัวของเนื้อเยื่อ diploid ช้าลงช่วยยับยั้งการเกิด spindle fiber และบางกรณีอาจทำให้เกิดการแบ่งตัวผิดปกติโดยส่งเสริมการเกิด mitosis ทำให้ได้นิวเคลียสที่มีขนาดเท่ากัน แต่ Stow (1930) พบว่าอุณหภูมต่ำไม่ได้เป็นตัวการทำให้เกิด mitosis ผิดปกติ แต่จะช่วยส่งเสริมความมีชีวิตของละอองเกสร และเพียงยับยั้งการพัฒนาเป็น gametophytic cell เท่านั้น จึงทำให้เพิ่มการพัฒนาของละอองเกสร ส่วน Bajaj (1983) พบว่าการให้อุณหภูมิต่ำแก่ละอองเกสรของ *Hyacinthus orientalis* จะทำให้เกิดการสูญเสียศักยภาพการพัฒนาเป็น gametophytic cell และยังทำให้เกิดการแบ่งตัวเป็น 8 นิวเคลียสเหมือนกับคัพภะ (embryo)นอกจากนั้นการให้อุณหภูมิสูงก็มีผลทำให้เพิ่มการเกิดคัพภะ Keller and Armstrong

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(1983) พบว่าบร็อคโคลี่พันธุ์ Green mountain เมื่อนำช่อดอกไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 45 °ซ. เป็นเวลา 1 ชม. และให้อุณหภูมิ 40 °ซ. เป็นเวลา 3 ชม. ก่อนนำละอองเกสรไปเพาะเลี้ยงจะเพิ่มการเกิดคัพภะ ดังนั้นระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม หรือระยะเวลาอาจเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของพืช ชนิดของชิ้นส่วนพืชที่เลือกใช้ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการ pretreatment (Huang and Sunderland, 1982) Dunwell (1985a) พบว่าการเก็บช่อดอกข้าวบาร์เลย์ใน petridish จะให้ประสิทธิภาพดีกว่าการ pretreatment ทั้ง tiller ในน้ำ หรือในถุง polythene หรือแยกเฉพาะอับละอองเกสรมา pretreatment นอกจากนั้น ใน *B. hirta* การ pretreatment โดยลดความดันของบรรยากาศที่ 500 มม. ของปรอท เป็นเวลา 30 นาที จะเพิ่มจำนวนคัพภะที่เกิดจากละอองเกสร (Klimaszewska and Keller, 1983)

5. อาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยง

ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงละอองเกสร ถือเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมาก อีกปัจจัยหนึ่งที่จะนำไปสู่ความสำเร็จ (Dunwell, 1985b) ไม่เฉพาะมีผลต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเท่านั้น แต่มีผลต่อความถี่ในการตอบสนองต่ออาหารด้วย (Bajaj, 1983) Collins and Genovesi (1982) กล่าวว่าอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงละอองเกสรนั้นคืออาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั่วไปนั่นเอง เพียงแต่ได้ดัดแปลงให้เหมาะสมต่อการพัฒนาของละอองเกสรมากขึ้น อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงละอองเกสรมีด้วยกันหลายสูตร เช่น สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) สูตร B_5 (Gamborg et al., 1968) เป็นต้น แต่โดยทั่วไปส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงละอองเกสรมีส่วนประกอบดังนี้

ก. แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้กันคือ น้ำตาลซูโครส โดยทั่วไปแล้วปริมาณที่ใช้อยู่ในช่วง 2-4 % (Reinert and Bajaj, 1977) ในข้าวบาร์เลย์ใช้ 12 % (Dunwell,1985a) ส่วนพืชสกุล *Brassica* ใช้น้ำตาลซูโครสอย่างต่ำ 4 % และที่เหมาะสมใช้สูงถึง 10 % (Keller, 1984) แต่การทดลองของ Roulund et al. (1991) ได้เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของ *B. oleracea* L. var. *capitata* (L.) Alef พบว่าน้ำตาล ซูโครส 14.2 % เป็นระดับที่เหมาะกว่า 10 % โดยเกิดคัพภะและได้ต้นมากกว่า 1.7 เท่า นอกจากนั้นยังพบว่าพันธุ์ที่ต่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กันมีการตอบสนองต่อปริมาณน้ำตาลในระดับที่แตกต่างกันด้วย ส่วน Coventry et al. (1988) พบว่าการเพาะเลี้ยงเฉพาะละอองเกสรของ *B. napus* นั้น ขณะที่ทำการแยกละอองเกสรออกจากอับละอองเกสรจะใช้น้ำตาลซูโครส 13 % แต่เมื่อเพาะเลี้ยงจะใช้เพียง 10 % ในข้าวโพด Kuo (1982) พบว่าควรเลี้ยงละอองเกสรข้าวโพดบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 25 % เป็นเวลา 6 นาทีก่อนแล้วจึงเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 9 - 15 % จะให้ผลดีกว่าไม่ผ่านการเลี้ยงละอองเกสรที่มีน้ำตาล 25 % แต่ Pescitelli et al. (1990) พบว่าการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 8.0-9.5 % เป็นระดับที่เหมาะสมกว่าระดับอื่น การใช้น้ำตาลที่ระดับสูงเช่นนี้อาจเกี่ยวข้องกับ osmotic pressure ของอาหารมากกว่าความต้องการจริง (Reinert and Bajaj, 1977) ในละอองเกสรของพวก bicellular จะต้องการ osmotic pressure สูงกว่าพวก tricellular (Dunwell, 1985b) การใช้น้ำตาลในปริมาณสูงในช่วงแรกจะส่งเสริมการเกิด callus ได้น้อย แต่ช่วงหลังจะส่งผลดีต่อการพัฒนาของ callus เป็นต้นอ่อนได้ดี เช่นในข้าวเมื่อเพิ่มน้ำตาลซูโครสจาก 3 % เป็น 6 % จะลดเปอร์เซ็นต์การเกิด callus แต่ความสามารถของ callus พัฒนาเป็นต้นปกติได้มากกว่าการใช้น้ำตาลที่ระดับต่ำ (อุดม และ อรดี, 2523) ในยางพารา Zhenghua (1984) พบว่าการใช้น้ำตาลซูโครสที่ 10 % ทำให้อัตราการเกิด callus ต่ำเนื่องจากเนื้อเยื่อส่วนอื่นถูกยับยั้ง แต่กลับเพิ่มความมีชีวิตของละอองเกสร เมื่อใช้น้ำตาล 3 % ทำให้เนื้อเยื่อส่วนอื่นพัฒนาเป็น callus ได้ดีกว่า และมีผลยับยั้งการเกิด multinucleate ระดับซูโครสที่เหมาะสมสำหรับยางพาราคือ 7 - 8 % สามารถยับยั้งการเกิด callus และส่งเสริมการพัฒนาละอองเกสรเป็นคัพภะได้ดี อย่างไรก็ตาม Keller and Armstrong (1977) พบว่าการพัฒนาของคัพภะเป็นต้นอ่อนจะถูกยับยั้งเมื่อน้ำตาลซูโครสอยู่ในระดับสูง ดังนั้นหลังจากเกิดคัพภะแล้วจะต้องลดระดับน้ำตาลซูโครสให้ต่ำลง ในผักกาดขาวปลี Sato et al. (1989) พบว่าช่วงแรกจะเลี้ยงละอองเกสรในอาหารที่มี ซูโครส 10 % แต่หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2-3 สัปดาห์ จะเติมอาหารที่มีระดับน้ำตาลซูโครส 3 % ส่วน Jain et al.(1989) พบว่าการตุ้นให้เกิดต้นจาก callus ของ *Sinapis alba* จะใช้น้ำตาลซูโครส 2 % ส่วนยางพาราจะใช้น้ำตาลซูโครส 4-6 % สำหรับการพัฒนาของคัพภะ (Zhenghua, 1984) นอกจากการใช้น้ำตาลซูโครสแล้วยังมีการใช้น้ำตาลชนิดอื่น จากการทดลองของ Batty and Dunwell (1989) พบว่าการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของมันฝรั่งนั้น น้ำตาลมอลโตสจะให้ผลดีกว่าน้ำตาลซูโครส ในข้าว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บาร์เลย์ สามารถใช้ mannitol เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Huang, 1982; Clapham, 1973) ส่วน inositol จะส่งเสริมการพัฒนาของ multinucleate (Xu and Sunderland,1981) แต่ inositol นี้กลับเป็นอันตรายต่อการชักนำให้เกิด callus ข้าวโพด (Brettle et al., 1981) ในข้าวสาลี Ziauddin et al.(1992) พบว่าช่วงแรกจะใช้ myo-inositol 2 ก. น้ำตาลซูโครส 6 % และ กลูโคส 1.75 % หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 16 วันจะย้ายลงเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี น้ำตาลซูโครส 3 % กลูโคส 1.75 % แต่ Keller et al. (1977) พบว่าพืชสกุล *Brassica* การใช้น้ำตาลชนิดอื่น เช่น กลูโคส ฟรัคโตส รัฟฟิโนส และมอลโตสให้ผลไม่ดีเท่ากับน้ำตาลซูโครส

ข. เกลือแร่

แร่ธาตุที่สำคัญได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซี่ยม แคลเซี่ยม ซัลเฟอร์ แมกนีเซี่ยม นอกจากนั้นยังมีธาตุอื่น ๆ ที่ต้องการในปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้ คือ เหล็ก แมงกานิส สังกะสี โบรอน ทองแดง คลอรีน และ โมลิบดินั่ม สำหรับธาตุไนโตรเจนเป็นธาตุที่สำคัญในขบวนการเมตาบอลิซึมของการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิค แหล่งไนโตรเจนในอาหารได้แก่ เกลือไนเตรตและเกลือแอมโมเนียม ส่วนประกอบของสารที่ให้ไนโตรเจน และความเข้มข้นของไนโตรเจนมีผลต่อการพัฒนาของละอองเกสร จากการทดลองของ Zhenghua (1984) พบว่าการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรยางพารา เมื่อใช้ไนโตรเจนทั้งหมด 50.58 mM. โดยใช้ KNO_3 9.4 mM.กับ NH_4NO_3 20 mM.จะทำให้เกิด callus 51.9 % และเกิดคัพภะ 45.0 % แต่เมื่อไนโตรเจนทั้งหมดเป็น 30.03 mM. โดยมี KNO_3 9.4 mM. กับ NH_4NO_3 10.3 mM.กลับทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิด callus เป็น 80.0 % เกิดคัพภะ 0.8 % นอกจากนั้นการเกิด callus และคัพภะต้องการระดับ KH_2PO_4 สูง เมื่อให้ KH_2PO_4 3.75 mM. จะทำให้เกิด callus และคัพภะได้ดีกว่าการใช้ KH_2PO_4 2.5 mM. Keller (1984) พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณแคลเซี่ยมคลอไรด์จาก 150 มก./ล.เป็น 750 มก./ล. จะให้ผลดีต่อการพัฒนาของละอองเกสรพืชในสกุล *Brassica* เหล็กเป็นอีกธาตุหนึ่งที่มีความสำคัญมากต่อการพัฒนาของละอองเกสรในยาสูบถ้าขาดธาตุเหล็ก หรือมีธาตุเหล็กในปริมาณที่ต่ำ จะทำให้คัพภะไม่สามารถเจริญผ่านระยะ globular ได้ (Reinert and Bajaj, 1977) แหล่งธาตุเหล็กที่นิยมใช้คือ FeEDTA จากการทดลองของ Vagera et al. (1979)พบว่าการพัฒนาของคัพภะของยาสูบระยะ globular

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต้องการ Fe-NaEDTA 30 µM. ในขณะที่ต้นอ่อนต้องการ 40-150 µM. อย่างไรก็ตามธาตุเหล็กนี้เป็นตัวชักนำให้เกิดการเสื่อมสลายของผนังอับละอองเกสรด้วย (Vagera and Havranek, 1983) ในการเพาะเลี้ยงละอองเกสรของ *B. rapa* L. ssp. *oleifera* ในขณะล้างละอองเกสรด้วยอาหารที่มีธาตุเหล็กผสมอยู่จะทำให้เกิดคัพภะน้อยกว่าอาหารที่ไม่มีเหล็ก แต่หลังจากเพาะเลี้ยงแล้วจำเป็นต้องมีเหล็ก (Burnett, 1992) นอกจากนั้นอาจใช้เหล็กในรูปอื่น เช่น เฟอริคตาร์เตท (Vacin and Went, 1949)

ค. วิตามินและกรดอะมิโน

วิตามินที่นิยมใช้อยู่ในกลุ่มวิตามิน B เช่น Thiamine Nicotinic acid และ Pyridoxine นอกจากนั้นอาจใช้ Pantothenic acid และ Biotin แต่การใส่วิตามินมีข้อคำนึงอยู่ประการหนึ่ง คือ ควรใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ (Gamborg, 1975) ส่วนกรดอะมิโนเช่น glycine สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ (Gamborg, 1975) Reinert and Bajaj (1977) พบว่าการเติม alanine 8 มก./ล. และ aparagine 8 มก./ล. ลงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวบาร์เลย์ จะช่วยเพิ่มการเกิดต้นจาก callus และเพิ่มการเกิดต้นปกติด้วย glutamine และ serine เป็นสารที่ช่วยการพัฒนาของคัพภะ Keller (1984) พบว่าพืชในสกุล *Brassica* ปกติจะใช้ glutamine 800 มก./ล. ส่วน serine ใช้ 100 มก./ล. ในข้าวสาลี Sozinov et al. (1981) พบว่าสามารถใช้ glutamine แทน potato extract ในสูตรอาหารได้ และยังพบว่าการใช้ proline 100 มก./ล.จะทำให้เกิด callus มากกว่าไม่ได้ใช้ 6 เท่า ในข้าวโพดใช้ proline 100 มก./ล. ในข้าวบาร์เลย์ใช้ 500 มก./ล. นอกจากนั้น Reinert and Bajaj (1977) ยังพบว่า proline เพิ่มการพัฒนาของ callus เป็นต้นอ่อนด้วย ในการเลี้ยงเฉพาะละอองเกสรของ *B. napus* และผักกาดขาวปลีจะใช้ glutathion 30 มก./ล. (Sato et al., 1989; Coventry et al., 1988)

ง. สารควบคุมการเจริญเติบโต

มีพืชหลายชนิดต้องอาศัยสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมลงในอาหาร เพื่อกระตุ้นการพัฒนาของละอองเกสรเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ (Reinert and Bajaj, 1977)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เช่น *B. napus* ต้องผสมทั้ง auxin และ cytokinin ลงในอาหาร (Lichter, 1981) ในเนื้อเยื่อของพืชปริมาณของ auxin และ cytokinin จะมีปริมาณที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชนิดของเนื้อเยื่อ และสภาพของเนื้อเยื่อ (ไพบูลย์ 2524) ดังนั้นความสมดุลย์ของปริมาณ auxin และ cytokinin ที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์จึงมีบทบาทอย่างมากต่อการพัฒนาเป็น ต้น ราก และอวัยวะอื่น ๆ แต่การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในปริมาณมากมักจะทำให้เกิด callus จากเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ ของอับละอองเกสร เช่น ผนังอับละอองเกสร หรือรอยตัดก้านชูเกสรตัวผู้ มากกว่าจะทำให้เกิดการพัฒนาของละอองเกสร (Reinert and Bajaj, 1977 ; Sunderland and Dunwell, 1977) นอกจากนั้นยังเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความไม่คงตัวของโครโมโซม มีการปนกันของเนื้อเยื่อที่มีระดับ ploidy ต่างกัน เกิด chimera ขึ้นได้ ซึ่งจะต้องสูญเสียแรงงาน และสูญเสียเวลาในการค้นหาต้นที่เป็น haploid (Reinert and Bajaj, 1977) ดังนั้นเมื่อไม่มีความจำเป็นควรหลีกเลี่ยง อย่างไรก็ตามบางครั้งมีความจำเป็นต้องใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อให้เกิดการพัฒนาของละอองเกสรอย่างสมบูรณ์ (Bajaj, 1983) สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้กันมากอยู่ในกลุ่ม auxin เช่น NAA (Napthalene acetic acid) และ 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) กลุ่ม cytokinin เช่น BAP (6-Benzylaminopurine) และ Kinetin (6-Furfurylaminopurine) สารควบคุมการเจริญเติบโตบางกลุ่มไม่มีการเติมลงไปในอาหารแต่ถูกสร้างขึ้นจากอับละอองเกสรของพืชและมีผลไปยับยั้งการพัฒนาของละอองเกสร เช่น Ethylene และ ABA (Abscisic acid) (Horner et al., 1977) ความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของละอองเกสรของพืชที่ต่างชนิด จะมีความแตกต่างกัน นอกจากนั้นยังมีความจำเพาะต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตด้วย จากการศึกษาของ Lichter (1981) พบว่าเมื่อเติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BAP 0.05 มก./ล. ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของ *B. napus* สามารถชักนำให้เกิดคัพภะจากละอองเกสรได้ดีที่สุด แต่ Keller (1984) พบว่าการใช้ NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มก./ล. เป็นระดับที่เหมาะสม ส่วนธัญญพืช Dunwell (1985a) พบว่าการใช้ 2,4-D 1-5 มก./ล. เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของละอองเกสรได้ Keathley and Scholl (1982) พบว่าการใช้ Pichloram ใน *Arabidopsis* จะให้ผลดีกว่า 2,4-D Jain et al. (1989) พบว่าการใช้ Zeatin 1.0 มก./ล. ใน *Sinapis alba* จะให้ผลดีกว่าการใช้ auxin ในข้าวสาลี และข้าวบาร์เลย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พบว่าการใช้ PAA (Phenylacetic acid) ไม่เฉพาะมีผลต่อการพัฒนาของละอองเกสรแต่มีผลต่อการเกิดต้นปกติอย่างมีนัยสำคัญ ในข้าวสาลีใช้ PAA 100 มก./ล. ส่วนในข้าวบาร์เลย์ใช้ 1-100 มก./ล. ขึ้นอยู่กับพันธุ์ (Ziauddin et al., 1992) การใช้สารคล้าย auxin เติมลงในอาหารทำให้เกิดการพัฒนาของละอองเกสรได้เหมือนการใช้ auxin จากการทดลองของ Keller et al. (1977) พบว่า การเติม Benazolin ลงในอาหาร 10 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของละอองเกสรของ *B. campestris* ดังนั้นพืชชนิดที่ต่างกันจำเป็นต้องศึกษาระดับความเข้มข้น และการใช้ร่วมกันของสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อให้เกิดผลดีที่สุด

จ. สารสกัดจากธรรมชาติและสารอื่น ๆ

สารสกัดจากธรรมชาติหรือสารอินทรีย์เชิงซ้อนได้แก่ น้ำมะพร้าว yeast extract casein hydrolysate potato extract tomato juice เป็นต้น ส่วนสารอื่น ๆ ได้แก่พวก nucleotide ผงถ่าน (activated charcoal) และ ethylene antagonist เป็นต้น น้ำมะพร้าวตามปกติใช้ 10 % (Kiss et al., 1992) ส่วนในธัญพืชใช้ 5-20 % ก่อนใช้จะต้องนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 60 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที (Wenzel and Foroughi-Wehr, 1984b) ในการเพาะเลี้ยงละอองเกสรของยางพารา เมื่อใช้น้ำมะพร้าวร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำมะพร้าวจะยับยั้งการแบ่งตัวของเนื้อเยื่อส่วนอื่น โดยลดเปอร์เซ็นต์การเกิด callus แต่จะเพิ่มการเกิดคัพภะ (Chen et al., 1979) แต่ในข้าวพบว่าไม่สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิด callus จากละอองเกสร (อุดม และ อรดี, 2523) การเติม yeast extract ลงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงละอองเกสรของบร็อคโคลี่ ปกติใช้ 2.5 ก./ล. (Quazi, 1978) ส่วน potato extract จะช่วยการพัฒนาของละอองเกสรยาสูบ (Nitsch and Noreel, 1973) สำหรับธัญพืชจะใช้ potato extract 20 % โดยจะใช้หัวมันฝรั่ง 200 ก. ตัดเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลบ.ซม. ใส่น้ำ 400-600 มล. นำไปต้มเป็นเวลา 30 นาที แล้วกรอง ต่อจากนั้นสามารถนำไปใช้ได้ หรืออาจเก็บไว้ที่ -18 °ซ. โดยไม่มีการเสียคุณภาพ แต่พันธุ์ของมันฝรั่งที่ต่างกันอาจจะให้ผลที่แตกต่างกันด้วย (Wenzel and Foroughi-Wehr, 1984b) ใน *B. napus* จะใช้ potato extract dehydrated 2.5 ก./ล. (Lichter, 1981) ใน *B. oleracea* var. *gemmifera* พบว่าการเติม $AgNO_3$ 0.1-10 มก./ล.ช่วยเพิ่มการตอบสนองต่ออาหารในพันธุ์ที่ไม่ตอบสนอง (Biddington et al., 1988)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเติมวุ้นลงในอาหารทำให้อาหารเกิดการแข็งตัว จึงทำให้ละอองเกสรสามารถอยู่บนผิวของอาหารได้ เพิ่มการถ่ายเทอากาศได้ดี ปกติใช้ 0.8 % (Keller, 1984) แต่การใช้อาหารเหลวจะให้ผลดีกว่าอาหารแข็ง เพราะอับละอองเกสรสามารถสัมผัสอาหารได้ดีกว่า และเมื่อละอองเกสรพัฒนาเป็นคัพภะสามารถหลุดลงไปในอาหารได้โดยตรง เป็นการลดการแข่งขันระหว่างคัพภะด้วยกันเอง แต่การถ่ายเทอากาศอาจไม่ดี ดังนั้นการใช้สาร ficoll 400 เติมลงไปในอาหาร 200 ก./ล.จะช่วยเพิ่มการเกิด callus ของข้าวบาร์เลย์ (Kao, 1981) แต่การทดลองของ Zhou et al. (1992) พบว่าการเติม ficoll 50-200 ก./ล. จะลดการเกิด callus และลดการเกิดต้นของข้าวสาลี แม้ว่าจะเพิ่มการลอยตัวของ callus เพิ่มความหนืด (viscosity) ของอาหารและเพิ่ม osmolality ได้ก็ตาม การใช้ผงถ่านสามารถเพิ่มการพัฒนาละอองเกสร เช่น ยาสูบพันธุ์ Havana จะเพิ่มการพัฒนาของอับละอองเกสรจาก 25 % เป็น 45 % เมื่อเติมผงถ่านลงในอาหาร (Anagnostakis, 1974) ในยาสูบพันธุ์ Badischer burley เมื่อใช้ผงถ่านเติมลงในอาหาร 2 % สามารถเพิ่มการพัฒนาของอับละอองเกสรจาก 15 % เป็น 45 % นอกจากนั้นยังเพิ่มต้นต่ออับละอองด้วย (Fridborg and Eriksson,1975) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าผงถ่านจะเป็นตัวดูดซับ สาร 5-hydroxymethylfurfural ซึ่งเกิดขึ้นจากการสลายตัวของน้ำตาลซูโครสเมื่อถูกนึ่งฆ่าเชื้อ โดยสารนี้จะส่งผลต่อการสลายของเนื้อเยื่อ (Weatherhead et al., 1978) นอกจากนั้นผงถ่านยังเป็นตัวดูดซับสารพวกฟีนอล (phenolic compound) ที่ถูกปล่อยจากเนื้อเยื่อที่แก่ (Dunwell, 1985) ดูดซับ auxin และ cytokinin (Weatherhead et al., 1978) ดูดซับ abscisic acid (Johansson et al.,1982) ดูดซับ ethylene (Horner et al., 1977) ทำให้ลดการตายของละอองเกสร อย่างไรก็ตาม การใช้ผงถ่านยังมีผลต่อการเพิ่มต้นที่เป็น diploid ด้วย (Reinert and Bajaj, 1977)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฉ. ค่า pH ของอาหาร

ค่า pH ของอาหารโดยทั่วไปจะอยู่ระหว่าง 5 - 6 ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความเหมาะสมต่อการแตกตัวของประจุต่าง ๆ โดยทั่วไปจะปรับ pH ของอาหารโดยใช้ KOH 1 N และ HCl 0.1 N ในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของพืชสกุล *Brassica* ใช้ pH 5.8 (Keller, 1984) ส่วนการเพาะเลี้ยงเฉพาะละอองเกสรของ *B. napus* ใช้ pH 6

(Coventry et al., 1988) Arnison et al. (1990) ทดลองปรับ pH ของอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของบร็อคโคลี่ตั้งแต่ 4.5-7.5 พบว่า pH ของอาหารอยู่ระหว่าง 5-6.5 เป็น pH ที่เหมาะต่อการพัฒนาของละอองเกสรมากที่สุด

6. สภาพแวดล้อมที่ใช้เพาะเลี้ยงและปัจจัยอื่น ๆ

ในยาสูบเมื่อเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่อุณหภูมิ 15 °ซ. จะเกิดต้นอ่อนน้อย แต่ต้นอ่อนจะมากเมื่อเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิที่สูงขึ้นและพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 °ซ. (Sunderland, 1974) ส่วนการเพาะเลี้ยงเฉพาะละอองเกสรของข้าวโพดกลับพบว่าการเพาะเลี้ยงละอองเกสรที่ 15 °ซ. เป็นเวลา 4 วัน ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงที่ 28 °ซ. จะช่วยลดการตายของละอองเกสรและเพิ่มการเกิดคัพภะ (Pescitelli et al., 1990) การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงก่อนเป็นช่วงระยะเวลาหนึ่งแล้วจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงที่ 25 °ซ. จะช่วยเพิ่มการเกิดคัพภะ เช่น *B. napus* พันธุ์ Tower ต้องให้อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 14 วันส่วนในพันธุ์อื่น ๆ จะใช้ระยะเวลา 1-2 วัน ที่อุณหภูมิ 35 °ซ. (Keller, 1984) ในผักกาดขาวปลีจะเพาะเลี้ยงที่ 33 °ซ. เป็นเวลา 1 วันแล้วจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงต่อที่ 25 °ซ. (Sato et al., 1989) ส่วน *Sinapis alba* ใช้อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 35 °ซ. จะเป็นอันตรายต่อการเกิด callus และคัพภะ (Jain et al., 1989) ในบร็อคโคลี่เมื่อเพาะเลี้ยงที่ 35 °ซ. เป็นเวลา 35 ชม. อับละอองเกสรมีการสร้างโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งเรียกว่า heat shock protein อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างโปรตีนชนิดนี้ กับการเกิดคัพภะ จากละอองเกสร (Fabijanski et al., 1991) ในธัญพืชเช่น ข้าวสาลีจะใช้อุณหภูมิ 28-30 °ซ. (Ouyang et al., 1983) ส่วนการทดลองของ Jing et al. (1982) พบว่าการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวสาลีที่อุณหภูมิ 33 °ซ. เป็นเวลา 8 วันแล้วจึงย้ายเพาะเลี้ยงต่อที่ 24 °ซ. จะช่วยเพิ่มการเกิด callus แต่ Song et al. (1978) พบว่าถ้าเพาะเลี้ยง callus ของข้าวที่อุณหภูมิ 29-30 °ซ. จะลดการเกิดต้นของ callus Bernard (1980) and Wang et al. (1978) ยังพบว่า การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวที่อุณหภูมิสูงเป็นช่วงระยะเวลาหนึ่งก่อนนั้นจะเพิ่มการเกิดต้นเผือกด้วย ในกรณีของแสงสว่าง ยังสรุปไม่ได้ว่ามีความจำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงละอองเกสรหรือไม่ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ในพืชสกุล *Brassica* ส่วนใหญ่ระยะแรกจะเพาะเลี้ยงในที่มืดจนกว่าจะปรากฏเห็นคัพภะจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงในที่มีแสง (Keller, 1984) ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยาสูบพบว่า การให้แสง 300 lux เป็นระดับที่เหมาะสม (Sharma et al., 1983) นอกจากนั้นคุณภาพของแสงยังมีผลด้วย ในยาสูบเมื่อให้แสงสีแดงจะทำให้ละอองเกสรพัฒนาเป็นคัพภะจนสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าภายใน 10 วัน แต่ถ้าให้แสงสีขาวจะใช้เวลาถึง 15 วัน (Reinert and Bajaj, 1977) ความหนาแน่นของอับละอองเกสรหรือละอองเกสรต่อปริมาณของอาหารมีผลต่อการพัฒนาของอับละอองเกสรและละอองเกสร จากการทดลองของ Arnison et al. (1990) โดยเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของบร็อคโคลี่ 3-36 อับต่อปริมาณอาหาร 4 มล. พบว่าจำนวนอับละอองเกสร 12-24 อับ จะให้เปอร์เซ็นต์อับละอองเกสรที่เกิดคัพภะสูงสุด แต่ในข้าวบาร์เลย์ Dunwell (1985b) พบว่าจำนวนอับละอองเกสร 60 อับต่ออาหาร 1 มล. เป็นจำนวนที่เหมาะ Huang et al. (1990) พบว่าการเพาะเลี้ยงเฉพาะละอองเกสรของ *B. napus* นั้น จำนวนละอองเกสร 40,000 ละอองเกสรต่อปริมาณอาหาร 1 มล. เป็นจำนวนที่เหมาะสมและการใช้ความหนาแน่นระดับนี้จะมีความสำคัญมากใน 2-4 วันแรกของการเพาะเลี้ยง แต่หลังจากนี้สามารถลดความหนาแน่นลงได้ ส่วนการใช้ความหนาแน่นถึง 100,000 ละอองเกสรต่ออาหาร 1 มล. จะมีผลต่อการยับยั้งการเกิดคัพภะ ระยะเวลาการฟอกฆ่าเชื้อมีผลด้วย Lai et al. (1980) พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อดอกของข้าวด้วย hypochorite หรือแอลกอฮอล์เป็นเวลานาน ๆ จะลดการพัฒนาของอับละอองเกสรเป็น callus กรรมวิธีการวางอับละอองเกสรให้สัมผัสกับอาหารมีผลต่อการพัฒนาของละอองเกสร Yang and Zhou (1979) พบว่าเมื่อแยกเอาเฉพาะอับละอองเกสรของข้าวออกมาเพาะเลี้ยงจะเกิด callus ได้ดีกว่าการเอาเฉพาะก้านดอกสัมผัสกับอาหารหรือเอาด้านข้างของดอกสัมผัสกับอาหาร ซึ่งเพียงแต่ทำให้เกิดการแบ่งตัวของนิวเคลียสแต่ละอองเกสรไม่สามารถพัฒนาเป็น callus ได้ บร็อคโคลี่ควรเอาด้านที่ตัดเอาก้านชูเกสรตัวผู้ออก สัมผัสกับอาหารจะให้ผลดีกว่าการวางให้ด้านท้องสัมผัสกับอาหาร (Arnison et al., 1990) และไม่ควรให้มีส่วนของก้านชูเกสรตัวผู้เหลือติดอยู่ที่อับละอองเกสร จะทำให้ส่วนนี้พัฒนาเป็น callus ได้ (Keller, 1984) การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของยาสูบระหว่างการเพาะเลี้ยงจะมีการสร้าง ethylene (Hornor et al., 1977) ดังนั้นการปรับสภาพบรรยากาศในภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงจะส่งผลดีต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร เช่น การเพิ่มแกสไนโตรเจน 2.5 % หรือแกสออกซิเจน 5 % จะกระตุ้นการเกิดคัพภะ (Imamura and Harada, 1981) นอกจากนั้น การเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์สามารถเพิ่ม การพัฒนาของอับละอองเกสรในพืชสกุล *Papaver* และ *Anemone* (Johansson and Eriksson, 1984)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การพัฒนาของละอองเกสร

เกสรตัวผู้ของพืชพวก Angiosperm จะประกอบด้วยก้านชูเกสรตัวผู้และอับละอองเกสร ภายในอับละอองเกสรจะมีเนื้อเยื่อบางส่วนทำหน้าที่โดยตรงเป็น microspore mother cell มีการแบ่งตัวแบบ meiosis ในที่สุดจะได้ microspore tetrad ห่อหุ้มด้วย callose เมื่อ callose สลายตัวจะได้ 4 ละอองเกสรที่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ จากนั้นนิวเคลียสจะถูกดันไปยังขอบเซลล์โดยเคลื่อนในทิศทางตรงกันข้ามกับรูตามธรรมชาติของละอองเกสร และนิวเคลียสนี้จะมีขนาดเล็กลงแต่ความหนาแน่นเพิ่มขึ้น พร้อมกับเกิดการแบ่งตัวแบบ mitosis ครั้งที่ 1 ได้ vegetative nucleus ซึ่งมีขนาดใหญ่ และ generative nucleus ที่มีขนาดเล็กกว่า vegetative nucleus จะเคลื่อนจากขอบเซลล์ไปยังกลางเซลล์ ส่วน generative nucleus จะเกิดการแบ่งตัวแบบ mitosis อีกครั้งหนึ่งได้ 2 generative nucleus (Bajaj, 1983) ใน *B. napus* พบว่า generative nucleus ทั้ง 2 จะมีขนาดที่แตกต่างกัน generative nucleus อันหนึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่า (Fan et al., 1988) เมื่อละอองเกสรแก่ และถูกปล่อยออกจากอับละอองเกสรไปตกบนยอดเกสรตัวเมีย ละอองเกสรจะงอก pollen tube (ภาพที่ 3) ลงไปยังรังไข่ genertive nucleus อันหนึ่งจะผสมกับไข่ อีกอันหนึ่งจะผสมกับ 2 polar nuclei (ไพศาล, 2525) การพัฒนาของละอองเกสรข้าวโพด พบว่า ละอองเกสรบางส่วนมีการพัฒนาที่ผิดปกติโดยมีขนาดเล็กและกลมมาก สามารถย้อมติดสี aceto-carmine ได้อย่างชัดเจนเนื่องจากไม่มีการสะสมแป้ง ละอองเกสรเหล่านี้อาจจะเป็นละอองเกสรที่พัฒนาเป็นคัพภะแต่ยังไม่สามารถสรุปได้ (Pescitelli and Pitolino, 1988) ละอองเกสรที่พัฒนาผิดปกตินี้สามารถพบในพืชสกุล *Sorghum Dennisetum* และ *Secale* ใน *Sorghum* จะปรากฏ 0.4-13.5 % (Dunwell, 1985a)

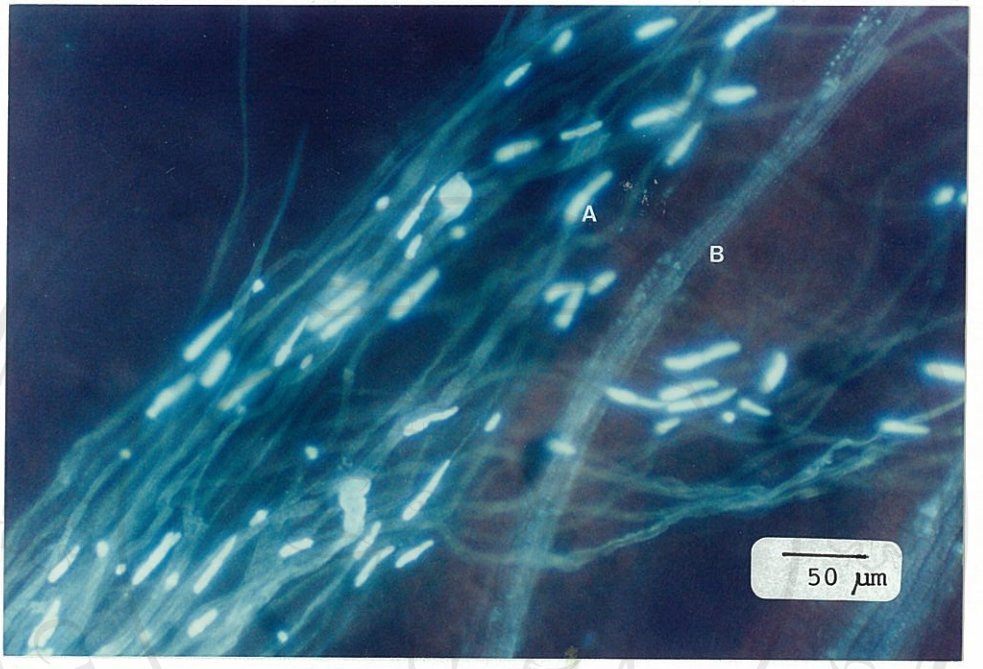
เมื่อนำละอองเกสรมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์จะทำให้การพัฒนาของละอองเกสรเปลี่ยนแปลงไปซึ่งจะเกิดการแบ่งตัวแบบ mitosis หลายลักษณะดังนี้

1. vegetative nucleus แบ่งตัวแบบ mitosis พัฒนาเป็น trinucleate และ multinucleate ตามลำดับ ส่วน generative ไม่แบ่งตัว

2. generative nucleus แบ่งตัวแบบ mitosis พัฒนาเป็น trinucleate และ multinucleate ตามลำดับ ส่วน vegetative ไม่แบ่งตัว

3. ทั้ง vegetative nucleus และ generative nucleusแบ่งตัวแบบ mitosis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3 แสดงการงอก pollen tube ของละอองเกสรผักกาดขาวปลีผ่านก้านชูเกสรตัวเมีย A pollen tube B เนื้อเยื่อก้านชูเกสรตัวเมีย ศึกษาตามวิธีการของ Opena et al. (1988) จาก Nikornpun (1992)

4. นิวเคลียสเกิด mitosis ได้ 2 นิวเคลียสที่มีขนาดเท่ากันโดยไม่พัฒนาเป็น vegetative nucleus หรือ generative nucleus (Reinert and Bajaj, 1977)

หลังจากละอองเกสรเกิดการพัฒนาแบบใดแบบหนึ่งทั้ง 4 แบบแล้ว ละอองเกสรสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ 2 ทางคือ

1. embryogenesis ละอองเกสรจะพัฒนาผ่านระยะต่าง ๆ ของการเกิดคัพภะจนในที่สุดจะได้ต้นที่สมบูรณ์ เช่นพบในพืชสกุล *Brassica* (Keller, 1984)

2. organogenesis ละอองเกสรจะไม่พัฒนาเป็นคัพภะ แต่จะเป็นเพียงกลุ่มเซลล์ซึ่งเรียกว่า callus ต่อจากนั้นจะต้องย้าย callus ลงเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่เพื่อชักนำให้เกิดยอดบน callus เหล่านั้น (Reinert and Bajaj, 1977) ละอองเกสรของพืชแต่ละชนิดจะเกิดการพัฒนาแบบใดนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ดังกล่าวมาแล้ว

จากการทดลองของ Fan et al.(1988) โดยเพาะเลี้ยงละอองเกสรของ *B. napus*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่เป็นระยะ uninucleate (ประกอบด้วย 1 นิวเคลียส) และ binucleate (ประกอบด้วย vegetative และ generative) พบว่าระยะ uninucleate นั้น หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 24 ชม. ละอองเกสรประมาณ 66 % จะเกิด mitosis ได้ 2 นิวเคลียสที่มีขนาดเท่ากัน และมีบางส่วนพบเป็น trinucleate (ประกอบด้วย 3 นิวเคลียสที่มีขนาดเท่ากัน) 0.2 % ซึ่งเกิดจากนิวเคลียสอันหนึ่งของ binucleate เกิด mitosis ทำให้พัฒนาเป็น trinucleate หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 48 ชม. uninucleate ลดลงเหลือ 25 % แสดงให้เห็นว่า 75 % เกิดการแบ่งตัวแบบ mitosis ภายใน 2 วัน trinucleate เพิ่มเป็น 11 % และยังพบที่เป็น tetranucleate (ประกอบด้วย 4 นิวเคลียสที่มีขนาดเท่ากัน) ด้วย ซึ่งเกิดจากนิวเคลียสอันหนึ่งของ trinucleate แบ่งตัว หรือเกิดจากนิวเคลียสของ binucleate ทั้ง 2 เกิด mitosis หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 6-12 วัน เกิดเป็น multinucleate (ประกอบด้วยหลายนิวเคลียส) พัฒนาเป็นคัพภะ มีเพียงเล็กน้อยที่แบ่งตัวแบบ mitosis แล้วได้ callus ซึ่งมีลักษณะพิเศษโดย cell wall จะติดสี DAPI ส่วนการใช้ระยะ binucleate หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 24 ชม. ประมาณ 37 % จะเกิด mitosis เช่นเดียวกับธรรมชาติได้ trinucleate ที่ประกอบด้วย 1 vegetative และ 2 generative มีบางส่วนของ binucleate ที่ vegetative เกิดการแบ่งตัวแบบ mitosis ทำให้สามารถใช้ลักษณะความแตกต่างของขนาดนิวเคลียสจำแนกลักษณะของ trinucleate ที่เกิดจาก uninucleate หรือเกิดจาก binucleate ในข้าวโพดพบว่าเกิดการเชื่อมกันของนิวเคลียสซึ่งเป็นทางหนึ่งที่ทำให้เกิด diploid ขึ้นได้ (Pescitelli and Petolino, 1988)

การชักนำให้เกิด organogenesis

Deng and Guo (1977 in Zee and Johnson, 1984) เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีบนอาหารตาม Nitsch and Nitsch (1969) โดยการเติม 2,4-D 2.0 มก./ล. เพื่อกระตุ้นให้เกิด callus หลังจากได้ 25-30 วันจะย้าย callus เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม แต่เปลี่ยน 2,4-D เป็น IAA 0.5 มก./ล. และ Kinetin 0.5 มก./ล. เพื่อชักนำให้เกิดต้น

Quazi (1978) เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของบร็อคโคลี่ บนอาหารที่ประกอบด้วยธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองตามสูตร MS วิตามินตามสูตร B_5 เติมน้ำตาลซูโครส 20 ก./ล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

yeast extract 2.5 ก./ล. วุ้น 8 ก./ล. เติม 2,4-D และ BAP ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกันพบว่า 2,4-D ที่ระดับ 0.44 มก./ล. และ BAP ที่ระดับ 0.45 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิด callus ได้ดีที่สุด หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 28 วันย้าย callus ไปบนอาหารสูตรเดิมแต่เปลี่ยน 2,4-D และ BAP เป็น IBA ที่ระดับ 1.016 มก./ล. GA_3 ที่ระดับ 0.35 มก./ล. และน้ำมะพร้าว 10 % หลังจากเลี้ยง callus ได้ 18 วัน callus เหล่านี้จะเกิดต้นอย่างสมบูรณ์ แต่มีบางส่วนเกิดเฉพาะรากเท่านั้น callus ที่มีเฉพาะรากนี้สามารถย้ายลงอาหารสูตรเดิมเพื่อกระตุ้นให้เกิดยอดต่อไปได้

Dunwell (1981) ทดลองเพาะเลี้ยงส่วนของใบเลี้ยง *B. oleracea* *B. napus* *B. campestris* (ตัดให้เป็นรูปวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม.) บนอาหารตามสูตร MS ดัดแปลงเติม NAA และ BAP ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่าอาหารที่เติม NAA 1.0 มก./ล.ร่วมกับ BAP 10.0 มก./ล.และ NAA 10.0 มก./ล.ร่วมกับ BAP 10.0 มก./ล.และ NAA 10.0 มก./ล.ร่วมกับ BAP 1.0 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิด callus และยอดจากใบเลี้ยงของ *B. oleracea* *B. napus* และ *B. campestris* ได้ดีที่สุดตามลำดับ

Leelavathi et al. (1987) เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของ *B. nigra* บนอาหารสูตร N_6 (Chu et al., 1975) แต่เปลี่ยนธาตุอาหารเสริมและสารอินทรีย์เป็นสูตร B_5 (Gamborg et al., 1968) เติมเหล็กตามสูตร MS น้ำตาลซูโครส 2 % และ 2,4-D 2.0 มก./ล. เพื่อชักนำให้เกิด callus หลังจากได้ 6 สัปดาห์ย้าย callus เพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS ที่มี IAA 0.5 มก./ล. และ BAP 0.5 มก./ล. ให้แสง 4,000 lux และอุณหภูมิ 24 $\pm$ 1 °ซ. เพื่อกระตุ้นให้เกิดต้นแล้วย้ายต้นลงเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรเดิม แต่เติม IAA 0.5 มก./ล. และผงถ่าน 0.5 % เพื่อชักนำให้เกิดราก

Palmer (1992) ทดลองเพาะเลี้ยงส่วนของใบเลี้ยง *B. campestris* (ให้ส่วนก้านใบสัมผัสกับอาหาร) บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 % NAA BAP และ $AgNO_3$ ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันพบว่าอาหารที่มี NAA 1.0 มก./ล BAP 2.0 มก./ล และ $AgNO_3$ 30 หรือ 60 µM. สามารถกระตุ้นให้เกิดยอดได้ดีที่สุด และยังพบว่า $AgNO_3$ มีความสำคัญต่อการเกิด organogenesis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความไม่คงตัวของโครโมโซมของเนื้อเยื่อที่ได้จากละอองเกสร

สิ่งที่ต้องการจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและละอองเกสรคือต้นที่เป็น haploid หรือต้นที่เกิดจากละอองเกสรแต่บ่อยครั้งที่ตรวจพบต้นที่มี ploidy ในระดับต่าง ๆ บางทีไม่พบต้นที่เป็น haploid เลย (Quazi, 1978) จึงเป็นปัญหาหนึ่งของการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและละอองเกสร การเกิด ploidy ในระดับต่าง ๆ อาจเกิดได้หลายทางคือ

1. เกิดจากการพัฒนาของเนื้อเยื่อส่วนอื่นที่ไม่ใช่ละอองเกสร

2. เกิด endomitosis โดยเกิดการแบ่งตัวของโครโมโซมแต่ไม่เกิดการแบ่งเซลล์จึงทำให้จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น พบในยาสูบ (Kochhar et al., 1971; Nitsch, 1969)

3. เกิดจากการเชื่อมกันของนิวเคลียสที่อยู่ในละอองเกสรเช่นข้าวโพด (Pescitelli and Petolino, 1988)

ถ้าเกิดต้น diploid ในกรณีที่ 2 และ 3 จะได้ต้นที่เป็นสายพันธุ์แท้โดยไม่ต้องใช้สาร colchicine แต่ถ้าเป็นกรณีที่ 1 จะเป็นต้น diploid ที่เกิดจากเนื้อเยื่อส่วนอื่นที่ไม่ต้องการ แต่ไม่สามารถจำแนกได้ว่าต้นที่เป็น diploid นั้นเกิดในกรณีใดได้โดยง่าย ดังนั้นจึงมีการใช้สารเคมีบางชนิดเติมลงในอาหารเพื่อยับยั้งการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่มีระดับ ploidy ต่าง ๆ แต่ไม่ยับยั้งการพัฒนาของเนื้อเยื่อ haploid Gupta and Carlson (1972) ได้เติม PEP (Para-fluorophenylalanine) ลงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง callus ของยาสูบพันธุ์ Havana wisconsin โดยที่ callus มีการผสมกันของเซลล์ที่มี ploidy ในระดับต่าง ๆ พบว่าเนื้อเยื่อที่เป็น diploid จะถูกยับยั้งการเจริญ แต่เนื้อเยื่อที่เป็น haploid ไม่ถูกยับยั้ง แต่ Dix and Street (1974) พบว่าการใช้ PEP 37.5 มก./ล. ไม่สามารถยับยั้งการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่เป็น diploid ของยาสูบได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า genotype ที่ใช้ไม่เหมาะสม ส่วน Matthews and Vasil (1976) พบว่า PEP มีการยับยั้งเนื้อเยื่อของยาสูบทั้งที่เป็น haploid และ diploid อย่างไรก็ตามถ้า PEP ยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อ diploid แต่ไม่ยับยั้งเนื้อเยื่อ haploid แล้ววิธีการนี้สามารถนำมาใช้เพื่อเก็บรักษาเนื้อเยื่อที่เป็น haploid ได้เป็นเวลานาน โดยไม่เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมและจะทำให้เนื้อเยื่อที่เป็น haploid มีโอกาสพัฒนาเป็นต้นได้ (Bajaj, 1983)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสร้างสายพันธุ์แท้โดยใช้ colchicine

colchicine จะเป็นตัวยับยั้งการเกิด spindle fiber จึงทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมเป็น 2 เท่าโดยโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นนั้นเป็นชุดเดียวกับที่มีอยู่เดิม ตามปกติจะแช่ต้น haploid ที่ยังคงติดอยู่กับอับละอองเกสรในสารละลาย colchicine 0.5 % เป็นเวลา 24-48 ชม. แล้วล้างด้วยน้ำให้สะอาด นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารต่อจะทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นต้น diploid ถ้าเป็นต้นที่โตแล้วอาจใช้ colchicine 0.4 %ในlanolin ป้ายที่ตาข้าง (Bajaj, 1983) ถ้าเป็นธัญญพืช Clapham (1977)จะใช้กอที่มีหน่อ 3-4 หน่อ ล้างรากเอาดินออกให้สะอาด ตัดรากให้เหลือ 3 ซม. แล้วแช่หน่อในสารละลาย colchicine (เตรียมโดยชั่ง colchicine 2.5 ก.ละลายใน dimethyl sulfoxide 20 มล. แล้วเติมน้ำให้เป็น 1 ล.) ภายใต้ที่มีแสงเป็นเวลา 5 ชม. ส่วน อรดี (2532) ใช้สำลีชุบสารละลาย colchicine 0.2-0.3 % วางที่ปลายยอดของลูกผสมระหว่างผักกาดขาวปลีและกะหล่ำปลีเป็นเวลา 3 วัน ยอดที่เจริญขึ้นมาใหม่จะมีลักษณะใบหนา อ้วนสั้นกว่ายอดเดิม Coventry et al. (1988) ทดลองแช่รากของต้น *B. napus* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงละอองเกสรในสารละลาย colchicine 0-0.4 % และใช้ระยะเวลา 1 ชม. 30 นาที ถึง 10 ชม. พบว่าสารละลาย colchicine 0.34 % และระยะเวลา 1 ชม.30 นาทีจะให้เปอร์เซนต์ของต้นที่เป็น diploid สูงสุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved