บทที่ 2
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับฟิโลเดนดรอน

ฟิโลเดนดรอนมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Philodendron* spp. อยู่ในตระกูล Arum หรือ วงศ์ Araceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในธรรมชาติของหมู่เกาะอินเดียตะวันตกและ อเมริกาเขตร้อน (สุนทร,2523) ฟิโลเดนดรอน อยู่ในตระกูล Arum จึงทำให้ดอกมีรูปร่างเป็นกาบและมีปลีเหมือนพวกไม้ในตระกูล Arum ทั่วๆไป เป็นไม้ใบหรือไม้ประดับที่ดูรูปทรงของต้นและใบมากกว่าดูดอก ตามธรรมชาติชอบขึ้นอยู่กับต้นไม้ใหญ่ มีรากอากาศงอกออกยาว ส่วนมากเป็นพันธุ์ไม้ที่ชอบเลื้อย ชอบไต่ตามสิ่งที่อยู่ใกล้เคียง โดยใช้รากอากาศเกาะพยุงลำต้น ลักษณะของใบมีรูปร่างแปลกๆ แต่ส่วนมากมีใบเป็นรูปหัวใจ บางชนิดใบยาวรี หรือบางชนิดใบมีรูปคล้ายลูกศร ความยาวใบนั้นอาจมีความยาวตั้งแต่ 3 นิ้ว – 3 ฟุต ส่วนมากมีสีเขียวสด บางชนิดมีสีชมพูทองแดงอยู่ใต้ใบด้วย ใบอ่อนบางชนิดมีสีชมพู หรือสีแดงอ่อนๆ เมื่อใบแก่เปลี่ยนเป็นสีเขียว หรือบางชนิดมีใบคล้ายลีลาวดี(ลั่นทม) เส้นใบสีแดงหรือสีชมพู พื้นใบมีสีเขียวอ่อน บางชนิดใบมีแฉกลึกเกือบถึงเส้นกลางใบ หรือบางชนิดก้ไม่มีลำต้นขึ้นสูงจากพื้นดิน

ฟิโลเดนดรอน เป็นพันธุ์ไม้ที่นิยมกันมากในการตกแต่งภายใน เป็นไม้ในร่ม ถูกแดดจัดไม่ได้ นิยมปลูกเป็นไม้กระถาง พันธุ์ไม้ในบ้าน ในอาคาร หรือนอกอาคารตามโคนร่มต้นไม้ บางชนิดสามารถนำมาแช่น้ำเปล่าๆ อยู่ในภาชนะที่ใส่น้ำไว้เป็นระยะนานๆ

ฟิโลเดนดรอน มีมากมายหลายชนิด ในปี ค.ศ. 1830 มีผู้รวบรวมพันธุ์ไว้ได้ถึง 220 ชนิด ต่อมามีการจำแนกพันธุ์ใหม่โดยแยกฟิโลเดนดรอน ออกไปเป็นพวก Monstera เสียพวกหนึ่ง จึงทำให้เหลือประมาณ 190 ชนิด ที่รวมรวมไว้เป็นพวก Philodendron

Monstera กับ Philodendron เป็นพันธุ์ไม้ใบที่คล้ายคลึงกันแยกออกจากกันได้ยาก พันธุ์ไม้ที่อยู่ใกล้เคียงกันมากในพวก Philodendron ก็มี Monstera , Pothos , Syngonium , Scindapsus (พลูด่าง) และ Rhaphidophora จนกระทั่งปัจจุบันนี้ก็ยังสับสนและปนเปกันอยู่มากเหมือนกับยากที่จะชี้ชัดได้ว่าต้นไหนอยู่ในสกุล Philodendron หรือ Monstera หรือ Scindapsus ในปัจจุบันมีผู้สั่งฟิโลเดนดรอน เข้ามาปลูกกันมากหลายพันธุ์ ปรากฏว่าส่วนใหญ่เจริญได้ดี

การขยายพันธุ์

ใช้เมล็ดเพาะ การตอนยอด ปักชำยอด ในการขยายพันธุ์โดยเพาะเมล็ด ตอน หรือปักชำ สิ่งที่สำคัญที่สุดคือความชุ่มชื้น ซึ่งพวกฟิโลเดนดรอนทุกชนิดต้องการความชุ่มชื้นสูง และเจริญเติบโตได้ดีในที่มีความชุ่มชื้นสูงด้วย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue Culture)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมายถึง การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช ไม่ว่าจะเป็นอวัยวะ เนื้อเยื่อ เซลล์ หรือเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ ที่เรียกว่า โปรโตพลาสต์ มาเลี้ยงในขวดแก้วที่มีอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารต่าง ๆ ได้แก่ น้ำตาล วิตามิน สารอินทรีย์ และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ เชื้อรา แบคทีเรีย และสาหร่าย ในสภาพแวดล้อมที่ควบคุมคือในห้องปรับอากาศ ได้รับแสง 1,000-3,000 ลักซ์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มมาจากการที่ Gottlieb Haberlandt นักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมัน ประสบความสำเร็จในการแยกเซลล์พืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ในปี ค.ศ.1902 เพื่อศึกษาถึงคุณสมบัติของเซลล์ ในปี ค.ศ.1930 ได้มีการเลี้ยงเซลล์ที่แยกมาจากรากของพืชหลายชนิดในลักษณะปลอดเชื้อ จนกระทั่งในปี ค.ศ.1938 สามารถเลี้ยงอวัยวะพืชได้หลายชนิด นับแต่นั้นเป็นต้นมา เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีการพัฒนาไปอย่างกว้างขวาง ปัจจุบันสามารถเลี้ยงเซลล์เดี่ยวและโปรโตพลาสต์หรือเซลล์ไร้ผนังของพืชหลายชนิด รวมทั้งการใช้เทคโนโลยีชีวภาพ เช่นการตัดต่อและถ่ายยีนเข้าร่วมด้วยเพื่อประโยชน์ในด้านการศึกษาทางชีวเคมี พันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช ทำให้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก้าวหน้าไปอย่างมาก และมีบทบาทสำคัญต่อวิทยาการแขนงอื่น ๆ เช่น ชีวเคมี พันธุศาสตร์ การปรับปรุงพันธุ์พืช โรคพืช พฤกษศาสตร์ และอุตสาหกรรม เป็นต้น ส่วนต่าง ๆ ของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงได้แก่ ยอด ใบ ลำต้น ราก เมล็ด เอมบริโอ อับเรณู รังไข่ ตา ดอก โปรโตพลาสต์ (ประศาสตร์,2538)

สิรินุช(2536) กล่าวว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบ่งออกได้เป็น 5 วิธีใหญ่ๆคือ

1. การเพาะเลี้ยงส่วนของพืช ได้แก่การนำชิ้นส่วนของพืช เช่น ราก ยอด คัพภะ อับละอองเรณู รังไข่ สปอร์ ฯลฯ มาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว หรืออาหารเหลวภายในสภาวะที่เหมาะสมมีการพัฒนาเป็นต้นต่อไป

2.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ ได้แก่ การนำเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ที่ประกอบด้วยตายอด และตาข้าง เนื้อเยื่อเจริญมีลักษณะเป็นรูปโดมห่อหุ้มไว้ด้วยใบอ่อน หรือเกล็ดหุ้มตา เมื่อตัดแยกมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ซึ่งประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนตายอดและการเกิดราก โดยปกติใช้ไซโตไคนินในปริมาณค่อนข้างสูง(10-30 มิลลิกรัมต่อลิตร) กระตุ้นให้เกิดการแตกตาและมีการพัฒนาไปเป็นยอดที่สมบูรณ์

3.การเพาะเลี้ยงแคลลัส แคลลัส คือกลุ่มของเซลล์ที่แบ่งตัวจากเซลล์เริ่มต้นบริเวณ

แผลรอยตัดของชิ้นส่วนพืช ลักษณะเป็นก้อนมีสีและโครงสร้างแตกต่างกันออกไป ขึ้นกับอัตราสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ โดยทั่วไปแคลลัสมี 2 ประเภทคือ แคลลัสที่เกาะกันหลวมๆ เรียกแคลลัสนี้ว่า friable callus ส่วนแคลลัสอีกประเภทหนึ่งเป็นแคลลัสที่เกาะกันแน่นมาก เรียกว่า compact callus (สมปอง,2539)

การเพาะเลี้ยงแคลลัส ได้แก่การนำชิ้นส่วนของพืช เช่น ลำต้น ราก ใบเลี้ยง เนื้อเยื่อสืบพันธุ์อื่น ๆ นำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ทำให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นกลุ่มเซลล์เรียกว่าแคลลัสและสามารถเลี้ยงแคลลัสให้อยู่ในสภาพนี้ไปได้เป็นเวลานานโดยตัดแบ่งเลี้ยงบนอาหารใหม่ เซลล์แคลลัสนี้เมื่อมีการปรับเปลี่ยนสมดุลและสัดส่วนของฮอร์โมนในอาหารให้เหมาะสม ทำให้แคลลัสสามารถกลับสภาพไปเป็นโครงสร้างหรือสัดส่วนต่าง ๆ ของพืชได้เช่น เปลี่ยนไปเป็นยอด ราก หรือคัพภะได้ โดยพัฒนาผ่านกระบวนการออร์แกนโนเจเนซิสและเอมบริโอเจเนซิส

4.การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ได้แก่การย้ายชิ้นส่วนของพืชหรือแคลลัสลงเลี้ยงบนอาหารเหลวที่อยู่ในขวดหรือหลอดทดลอง ซึ่งวางบนเครื่องเขย่า หรือล้อหมุนเพื่อให้เซลล์กระจายตัว มีการเปลี่ยนแก๊ส เซลล์แขวนลอยประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดต่าง ๆกัน และรวมทั้งเป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยปกติการเลี้ยงเซลล์ในสภาพแขวนลอยจะมีอัตราการเจริญเติบโตมากกว่าการเลี้ยงในสภาพกึ่งแข็ง เนื่องจากทุกๆเซลล์สัมผัสกับอาหารทั่วถึงกัน เซลล์ในสภาพแขวนลอยเป็นแหล่งสำคัญในการให้ต้นพืช โดยผ่านกระบวนการออร์แกนโนเจเนซิส หรือเอมบริโอเจเนซิส การเลี้ยงแคลลัสหรือเซลล์แขวนลอยเป็นเวลานานๆ จะทำให้คุณสมบัติในการพัฒนาเป็นต้นพืชน้อยลง

5.การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โปรโตพลาสต์ คือเซลล์เปลือย ที่ไม่มีผนังเซลล์ห่อหุ้ม มีคุณสมบัติในการสร้างผนังเซลล์ และมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ โปรโตพลาสต์แยกออกมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อจากเซลล์เพาะเลี้ยงหรือเนื้อเยื่อโดยตรง เมื่อแยกโปรโตพลาสต์มาแล้วนำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดการแบ่งเซลล์ เพิ่มจำนวนโคโลนีเล็กๆ และสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้

Murashige(1974 a,1974 b) ได้เสนอขั้นตอนการขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นที่ 1 การเตรียมชิ้นส่วนพืชให้สะอาดปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับเนื้อเยื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ให้มีชีวิตรอดและมีการเจริญเติบโตต่อไป

ขั้นที่ 2 การเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อ โดยการนำเนื้อเยื่อที่เจริญเติบโตและสะอาดปราศจากจุลินทรีย์มาทำการขยายเพิ่มปริมาณและกระตุ้นให้มีการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ โดยการใช้สารเร่งการเจริญเติบโต

3.อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะของพืช สามารถเจริญได้ดีในหลอดทดลอง ก็เพราะมีอาหารที่เหมาะสมกับความต้องการ อวัยวะต่างชนิดกันอาจต้องการอาหารต่างกัน ถึงแม้จะเป็นพืชชนิดเดียวกันก็ตาม อาหารชนิดหนึ่งอาจกระตุ้นให้เกิดแคลลัส อีกชนิดหนึ่งทำให้เกิดราก หรืออีกชนิดหนึ่งทำให้เกิดเอมบริออยด์ เป็นต้น ไม่มีอาหารชนิดใดที่ทำให้ชิ้นส่วนพืชทุกชนิดเจริญได้ดี

ปกติแล้วอาหารต่างๆ ที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะมีองค์ประกอบคล้ายกัน แบ่งออกได้ดังนี้

ธาตุอาหารที่เป็นสารอนินทรีย์(Inorganic compounds) มี 2 พวก คือ

1) ธาตุอาหารหลัก (Macronutrient) เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการมากและจำเป็น ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนิเซียม และซัลเฟอร์ ธาตุอาหารเหล่านี้พืชต้องการมาก ใช้ในรูปสารประกอบ ได้แก่ NH_4No_3 KNO_3 $NH_4H_2PO_4$ KH_2PO_4 $CaCl_2$. $2H_4O$ และ $MgSO_4.7H_2O$ เป็นต้น

2) ธาตุอาหารรอง (Micronutrient) เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการน้อย แต่ขาดไม่ได้ เช่น โบรอน โมลิบดีมัน แมงกานีส ทองแดง สังกะสี เหล็ก และคลอรีน นอกจากนี้ยังมีธาตุที่อาจจะใส่กันบ้างในบางสูตรอาหาร เช่น ไอโอดีนและโคบอลต์ ธาตุอาหารเหล่านี้พืชต้องการมากมักใช้ในความเข้มข้นเป็นไมโครโมล/ลิตร รูปสารประกอบที่ใช้เช่น H_3BO_3 $MnSO_4 4H_2O$, $ZnSO_4 7H_2O$, $Na_2MoO_4 2H_2O$ เป็นต้น ในกรณีของเหล็กนิยมใช้ในรูปของเกลือเฟอร์รัส (Fe^{++}) ได้แก่ $FeSO_4.7H_2O$ ซึ่งละลายน้ำได้ดีและคงวาเลนซีไว้ในสภาพที่เป็นกรด แต่ถ้าสารละลายมีค่าความเป็นกรด-ด่างสูง เหล็กจะถูกออกซิไดซ์ให้เป็นเฟอร์ริค(Fe^{++}) ซึ่งละลายน้ำยาก นอกจากนี้เหล็กยังไวต่อการทำปฏิกริยากับอนุมูลอื่นๆ ที่อยู่ในสารละลาย ทำให้เหล็กละลายน้ำยากหรือตกตะกอนหมด เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงต้องใส่สารอีดีทีเอ (EDTA ย่อมาจาก Ethylene diamine tetra acetic acid) ซึ่งจะทำปฏิกริยากับ Fe^{++} ทำให้ไม่ตกตะกอน โดยที่โมเลกุลของสารนี้จะไปห้อมล้อมอิออนนี้ของเหล็กเอาไว้และไม่เปิดโอกาสให้เหล็กทำปฏิกริยากับอนุมูลอื่นจึงทำให้ธาตุนี้คงสภาพอยู่ในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง(pH)สูงกว่า จึงทำให้เหล็กเป็นประโยชน์ต่อต้นพืชได้มากขึ้นหรืออาจใช้สารสำเร็จรูป NaFe-EDTA ซึ่งมีธาตุเหล็กอยู่แล้วในสารประกอบ ความเข้มข้นที่ใช้ตามปกติจะอยู่ในระดับ ไมโครโมลาร์

ธาตุอาหารพืชที่ใช้เป็นสารประกอบอนินทรีย์เหล่านี้ ที่นำมาใช้ควรเป็นสารที่มีความบริสุทธิ์สูงในระดับสารเคมีเพื่องานวิเคราะห์ (Analytical reagent)

สารประกอบอินทรีย์ (Organic compounds) มีอยู่หลายอย่าง คือ

1) วิตามิน เป็นสารอินทรีย์ที่ไม่ทราบหน้าที่ที่แน่นอนแต่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้ต้นสมบูรณ์แข็งแรง วิตามินที่ใช้ได้แก่ วิตามิน หรือกรดแอสคอร์บิค (Ascorbic acid) ไบโอติน (Biotin) ดี-แคลเซียม แพนโตทีเนต (D-Calcium Pan-tothenate) ไซยาโนโคบาลามิน (Cyanocobalamin) นิโคตินาไมด์ (Nicotinamide) กรดนิโคตินิค (Nicotininc acid) กรดโฟลิค (Polic acid) ไพริดอกซีน (Pyridoxine HCl) ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) ไทอะมีน (Thiamine) เป็นต้น สารเหล่านี้จะใช้ในระดับความเข้มข้นเป็น ไมโครโมลาร์

2) กรดอะมิโน กรดอะมิโนไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช แต่ถ้าในอาหารมีสารอินทรีย์ไม่เพียงพอ อาจเติมกรดอะมิโนลงไปได้ เช่น เคซีน ไฮโดรไลเซต (Casein hydrolysate) ไกลซีน (Glycine) แอล กลูตามิน (L.Glutamin) แอล.แอสพาราจีน (L.Asparagine) และแอล.อาร์จินิน (L.Arginine) เป็นต้น

3) ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโต จะช่วยในการเจริญเติบโตของพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดจะมีผลต่อเนื้อเยื่อแตกต่างกัน เช่น ไซโตไคนิน ช่วยในการเจริญของเนื้อเยื่อ ทำให้แตกตา ออกชินทำให้เกิดราก จิบเบอเรลลิน ทำให้ลำต้นยาวออก ความเข้มข้นที่ใช้แตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพืชและอวัยวะที่ใช้ ปกติจะใช้เป็น ไมโครโมลาร์ สารควบคุมการเจริญเติบที่ใช้เป็นประจำ

4) แหล่งของคาร์บอน พืชสีเขียวทั่วไป สามารถสร้างอาหารได้เองโดยวิธีสังเคราะห์แสง แต่พวกพืชที่เกิดขึ้นในขวดเพาะเลี้ยง หรือชิ้นส่วนพืชที่มีขนาดเล็กในช่วงแรกๆ ยังไม่สามารถพัฒนาตัวเองเพื่อการสังเคราะห์แสงจึงจำเป็นต้องเติมสารประกอบคาร์บอน และสารให้พลังงานลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย สารที่ใช้ได้แก่ น้ำตาลจะใช้ปริมาณ 20-30 กรัม/ลิตร หรือ 60-90 มิลลิโมล/ลิตร น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโทส ก็สามารถนำมาใช้ได้แต่ที่ใช้ได้ดีคือซูโครส

5) สารธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว (Coconut water) สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract) ยีสต์ (Yeast extract) มันฝรั่ง (Potato extract) น้ำต้มถั่วงอก กล้วยบด น้ำมะเขือเทศ ปรากฏว่าสารอินทรีย์เหล่านี้ช่วยในการเจริญของเนื้อเยื่อได้ โดยเฉพาะในน้ำมะพร้าวซึ่งมีกรดอะมิโน วิตามิน น้ำตาล ฮอร์โมน ไซโตไคนิน และอื่นๆ

ตัวอย่างสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (มิลลิกรัม/ลิตร)

	B5	M S[a]	S H
KNO_3	2500.0	1900.0	2500.0
NH_4NO_3	-	1650.0	-
KCl	-	-	-
$(NK_4)_2SO_4$	134.0	-	-
$NH_4.H_2PO_4$	-	-	300.0
$Na_2H_2PO_4.H_2O$	150.0	-	-
KH_2PO_4	-	170	-
$Ca(NO_3).4H_2O$	-	-	-
$CaCl_2.2H_2O$	150.0	440.0	200.0
$MgSO_4.7H_2O$	250.0	370.0	400.0
$MnSO_4.H_2O$	10.0	22.3	10.0
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	27.8	15.0
Na-EDTA	37.2	37.2	20.0
H_3BO_3	3.0	6.2	5.0
$ZnSO_4.7H_2O$	3.0	8.6	1.0
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.25	0.1
KI	0.75	0.85	1.0
$CuSO_4.5H_2O$	0.25	0.025	0.2
$CoCl_2.6H_2O$	0.25	0.025	0.1
Inostiol	100.00	100.0	1000.0
Glycine	-	2.0	-
Thiamine.HCl	10.0	0.1	5.0
Pyridoxine.HCl	1.0	0.5	0.5
Nicotinic acid	1.0	0.5	5.0
Sucrose	200,000	30,000	30,000

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

2,4-D	2.0	-	0.5
CPA	-	-	2.0
KIN	-	-	0.1
pH	5.5	5.8	5.9

B5 = Gamborg *et al.* (1967)

MS = Murashige & Skoog (1962)

SH = Schend & Hildebrandt (1972)

(ที่มา : Sharp,1984 : 114)

6) เจลลิงเอเจนต์ (Gelling agent) นิยมใช้ได้แก่ วุ้น (Agar) คล้ายเจลาติน (Gelatin) ซึ่งผลิตจาสาหร่ายทะเล มีหลายบริษัทที่ผลิต สามารถนำมาใช้เป็นอาหารของมนุษย์ได้ มีคุณภาพหลายระดับให้เลือกใช้ตามความเหมาะสม ใช้สำหรับให้ทำอาหารแข็ง นอกจากนี้ยังมีเพคติน (Pectin) ที่ขายในท้องตลาดจะสกัดมาจากแอปเปิ้ล นิยมใช้รวมกับวุ้นแต่สารชนิดนี้จะละลายได้ยาก

นอกจากสารดังกล่าวแล้ว ยังมีสารที่ไม่มีคุณค่าทางอาหารและอื่นๆ ต่อพืช (Inert material) แต่ที่ใส่ลงไป ก็เพื่อให้พืชสามารถตั้งอยู่อย่างมั่นคงบนอาหาร เช่น กระดาษกรอง เป็นต้น สารช่วยดูดซับสารพิษและป้องกันการเกิดสีน้ำตาล ได้แก่ ผงถ่าน ซึ่งจะใส่ประมาณ 0.1-1.0 เปอร์เซ็นต์

หน่วยน้ำหนักและความเข้มข้นของสูตรอาหาร

1. หน่วยน้ำหนัก ที่ใช้ในสูตรอาหารมีหลายชนิดได้แก่

1) หน่วยน้ำหนักที่ใช้เป็นระบบเมตริก เช่น ที่เป็นกรัม (g) มิลลิกรัม (mg) หรือไมโครกรัม (µg)

1 มิลลิกรัม	=	10^{-3}	กรัม
1 ไมโครกรัม	=	10^{-6}	กรัม
1 กรัม	=	1,000	มิลลิกรัม
1 กรัม	=	1,000,000	ไมโครกรัม

2) น้ำหนักกรัมโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุลของสารทราบได้จากสูตรโดยน้ำหนักอะตอมเป็นกรัมของธาตุต่างๆ ทั้งหมดในสารนั้น 1 โมเลกุล เช่น

1 กรัม โมเลกุลของ NaOH = 23+16+1 = 40 กรัม

1 กรัม โมเลกุลของ H_2SO_4 = 2+23+64 = 98 กรัม

หน่วยวัดความเข้มข้นที่ใช้ได้แก่

1) โมลาริตี้ หรือ M (Molartiy) เป็นความเข้มข้นที่บอกให้ทราบว่าสารละลาย 1,000 มิลลิกรัม หรือ 1 ลิตร มีตัวถูกละลายอยู่กี่กรัมโมเลกุล เช่น

1 *M* NaOH แสดงว่าสารละลาย 1000 มิลลิกรัม มี NaOH อยู่ 1 กรัมโมเลกุล

1.2 *M*H_2SO_4 แสดงว่าสารละลาย 1000 มิลลิกรัม มี H_2SO_4 อยู่ 1.2 กรัมโมเลกุล

1 กรัมโมเลกุลของ H_2SO_4 = 98 กรัม ดังนั้นถ้ามีอยู่ 1.2 กรัมโมเลกุล จะมีค่าเป็น

1.2 x 98 = 117.6 กรัม แสดงว่าสารละลาย 1000 มิลลิกรัม มี H_2SO_4 อยู่ 117.6 กรัม

2) มิลลิกรัม/ลิตร หรือ ส่วนในล้านส่วน (ppm = parts per million) หมายถึง ในสารละลาย 1,000 มิลลิลิตร มีเนื้อสารอยู่เป็น มิลลิกรัม หรือ กรัม/กิโลลิตร (g/kl) หรือ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (µg/ml)

3) เป็นเปอร์เซ็นต์ หมายถึง สารละลาย 100 มิลลิลิตร มีเนื้อสารอยู่กี่กรัม เช่น 5 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าในสารละลาย 100 มิลลิลิตร มีเนื้อสารอยู่ 5 กรัม เป็นต้น

สารละลายเตรียมข้น (Stock solution)

ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อให้สารประกอบที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งมีปริมาตรที่แน่นอนไม่ผิดพลาด และสะดวกในการเตรียมอาหารแต่ละครั้ง จำเป็นต้องเตรียมสารละลายเข้มข้นเอาไว้ โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 10 เท่า หรือ 100 เท่า ปกติจะไม่เตรียมต่ำกว่า 5 เท่า หรือไม่ควรเกิน 100 เท่า

วิธีเตรียมสารละลายเข้มข้น ในสูตรอาหารที่ใช้มีหน่วยเป็นมิลลิกรัม/ลิตร

ในการเตรียมสารละลายเตรียมเข้มข้น ทุกครั้งต้องคำนวณสารประกอบที่จะใช้ในแต่ละสูตร ดังเช่นสูตรเอ็มเอส ประกอบด้วยสารประกอบอนินทรีย์ และสารประกอบอินทรีย์ หลายชนิดตามตารางตัวอย่างสูตรอาหาร ก่อนคำนวณต้องพิจารณาว่าจะใช้สารละลายที่เตรียมข้นกี่เท่า ตามปกติสารที่เป็นธาตุอาหารหลักใช้เนื้อสารจำนวนมาก อาจเตรียมโดยใช้ความเข้มต่ำ เช่น ให้เข้มข้น 10-20 เท่า ส่วนธาตุอาหารรองใช้ในปริมาณน้อย จึงเตรียมให้มีความเข้มข้นสูง นอกจากต้องพิจารณาเรื่องความเข้มข้นของสารแล้ว ยังต้องพิจารณาถึงปริมาตรของสารที่จะใช้ได้อีกด้วย ไม่ควรเตรียมสารมากเกินไป เพราะสารบางชนิดเมื่อละลายน้ำอาจเสื่อมคุณภาพได้เร็ว เช่น สารอินทรีย์ สารเหล่านี้เมื่อเตรียมแล้วต้องเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อป้องกันการเสื่อมคุณภาพ และชะลอการเจริญเติบโตของเชื้อราและจุลินทรีย์บางชนิด

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณสารเพื่อเตรียมสารละลายเตรียมข้น สมมุติต้องการเตรียมธาตุอาหารหลักสูตรเอ็มเอส ความเข้มข้น 20 เท่า จำนวน 1000 มิลลิลิตร จะใช้สารประกอบแต่ละชนิด จำนวนกี่กรัม

จากสูตรใช้ $CaII_2 . 2H_2O$ 440.0 mg/l

แสดงว่าอาหาร 1 ลิตรใน $CaII_2 . 2H_2O$ 440.0 mg

เตรียมเข้มข้น 20 เท่า 1000 ml = $\frac{440 \times 20 \times 1000}{1000 \times 1000}$ g

ใช้ $CaII_2$ = 8.8 g

$MgSo_4 . 7H_2O$ = 370 mg/l

ต้องใช้ $MgSo_4 . 7H_2O$ = $\frac{370 \times 20 \times 1000}{1000 \times 1000}$ g

= 7.4 g

สารประกอบชนิดอื่นๆ ก็คำนวณตามตัวอย่างที่ยกมา เมื่อคำนวณทราบน้ำหนักของสารที่ได้แล้ว ให้นำสารแต่ละตัวที่ชั่งได้มาละลายน้ำกลั่นโดยใช้น้ำเพียงเล็กน้อย เมื่อสารละลายเข้ากันได้ดีจึงนำสารทั้งหมดทำให้เจือจาง แล้วผสมรวมกันให้มีปริมาตรตามที่ต้องการ ตามตัวอย่าง จะต้องพิจารณา เช่น สารซัลเฟตและฟอสเฟต ของแคลเซียมและแมกนีเซียม เพราะสารเหล่านี้อาจตกตะกอนได้ สารที่เป็นธาตุอาหารรองปกติใช้เพียงเล็กน้อย การเตรียมมักทำให้มีความเข้มข้นสูง สารบางชนิดไม่สามารถรวมกันได้ เช่น $FeSO_4 7H_2O$ จะตกตะกอน จึงต้องเตรียมแยกสารประกอบชนิดอื่นๆ และเตรียมผสมรวมกับ Na_2-EDTA

การเตรียมสารละลายเตรียมข้น ในสูตรอาหารที่ใช้หน่วยเป็นโมลาร์ (*M*) สูตรอาหารบางครั้งจะพบว่าใช้หน่วยเป็นโมลาร์ ดังนั้นต้องคำนวณหาน้ำหนัก ของสารประกอบแต่ละชนิดก่อนที่จะเตรียม และต้องทราบน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบนั้น น้ำหนักของสารประกอบที่ใช้ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดูได้จากตารางตัวอย่างความเข้มข้นของสูตรอาหาร สารละลายเตรียมข้น ที่เตรียมได้ควรใส่ในขวดสีชา เขียนข้างขวดบอกชื่อสารประกอบหรือชื่อของสูตรอาหาร จำนวนเท่าของความเข้มข้น วัน เดือน ปี ที่เตรียม และถ้าต้องการเตรียมอาหาร 1 ลิตร จะต้องดูดมาใช้กี่มิลลิลิตร ควรเก็บสารเตรียมข้นไว้ในตู้เย็น เพื่อป้องกันการปนเปื้อนและการเสื่อมคุณภาพของสารละลาย

2. หาปริมาตรของสารละลายเตรียมข้นที่ใช้เตรียมอาหาร สมมุติว่ามีสารละลายเตรียมข้นสูตร MS ความเข้มข้น 100 เท่า ต้องการเตรียมอาหารสูตร MS จำนวน 1000 มิลลิลิตร ควรดูดสารละลายเตรียมข้น มากี่มิลลิลิตร

วิธีคำนวณใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_1V_1$$

N_1 **คือ ความเข้มข้นของสารละลายเตรียมข้น**

V_1 **คือ ปริมาตรของสารละลายเตรียมข้นที่ใช้**

N_2 **คือ ความเข้มข้นของอาหาร**

V_2 **คือ ปริมาตรของอาหารที่ต้องการ**

แทนค่าในสูตร

$$100 \times V_1 = 1 \times 1000$$

$$V_1 = \frac{1 \times 1000}{100}$$

$$= 10 \text{ มิลลิลิตร}$$

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเตรียมอาหารเป็นสิ่งที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ข้อแรกที่ต้องคำนึงถึงคือ การเลือกอาหารที่จะใช้ว่าควรให้อาหารชนิดใด โดยค้นคว้าจากผลงานที่ได้มีผู้ทดลองมาแล้ว ข้อที่สองก็คือเตรียมสารละลายเข้มข้น เมื่อเตรียมแล้วควรใส่ตู้เย็น การเตรียมสารละลายเตรียมข้น เป็นสิ่งที่จำเป็น เพื่อให้อาหารที่แน่นอน จะเตรียมมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับงานที่ทำ อุปกรณ์สำคัญ ในการเตรียมอาหารก็คือ ปิเปตต์ขนาดต่างๆ เพื่อปริมาตรวัดปริมาตร ปิเปตต์ 1 อัน ใช้ดูด สารละลายเพียงชนิดเดียว เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสารเคมีตัวอื่น ในห้องปฏิบัติการ ที่เตรียมอาหารจำนวนมาก อาจใช้กระบอกตวง (Cylinder) สำหรับวัดปริมาตรก็ได้ ข้อที่สามก็คือ การเตรียมอาหาร ให้ดูดสารละลายเตรียมเข้มข้นแต่ละชนิดมาตามจำนวนที่ต้องการ

ตัวอย่างต้องการเตรียมอาหารสูตร เอ็ม เอส จำนวน 1 ลิตร โดยมี สารละลายเตรียมข้น ที่เตรียมไว้ดังนี้

MS 1	ธาตุอาหารหลัก	20	เท่า
MS 2	ธาตุอาหารรอง	100	เท่า
MS 3	เหล็ก	100	เท่า
MS 4	สารประกอบอินทรีย์	100	เท่า
MS 5	ได้แก่ ฮอร์โมน	100	มิลลิกรัมต่อลิตร
	น้ำตาลทราย	30	กรัม/ลิตร
	วุ้น	7	กรัม/ลิตร

น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH	5.6	

ลำดับขั้นของการเตรียมอาหาร

1) เติมน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์ 300 มิลลิลิตร

2) ตวงสารละลายเตรียมเข้มข้น แต่ละชนิดลงในบีกเกอร์ตามปริมาณที่ต้องการ MS 1 ใช้ 50 มิลลิลิตร MS 2 ใช้ 10 มิลลิลิตร MS 3 ใช้ 10 มิลลิลิตร MS 4 ใช้ 10 มิลลิลิตร

3) ใส่ฮอร์โมนตามปริมาณที่ต้องการ

4) เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรประมาณ 970 มิลลิลิตร

5) ปรับค่า pH ของสารละลายให้ได้ 5.6 ด้วย HCl หรือ NaOH เจือจาง

6) ใส่น้ำตาลทรายคนให้ละลายจะใช้น้ำตาลทราย 30 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร

7) ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

8) เทอาหารที่เตรียมได้ใส่ในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อปิดฝาขวด

9) ถ้าต้องการอาหารแข็ง ให้เติมวุ้น 7.0 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตรแล้วนำไปต้มจนละลาย จึงใส่ขวดและปิดฝา

10) นำขวดอาหารไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งอัดไอ ที่อุณหภูมิ 121 เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 15-20 นาที

สิ่งที่ต้องพิจารณาในการเตรียมอาหาร

1) การหลอมละลายวุ้นและผสมสารละลายแต่ละชนิดมีวิธีทำ 2 วิธี ได้แก่

วิธีที่ 1 ใส่วุ้นในสารละลายอาหารโดยตรง แล้วหลอมละลายโดยการตั้งไฟคนให้ทั่วให้ความร้อน 90 เซลเซียส จนกระทั่งวุ้นละลาย

วิธีที่ 2 ให้แบ่งน้ำกลั่นออกเป็น 1/3 ของปริมาตรของอาหารที่ต้องการเตรียมหลอมละลายวุ้นแล้วนำมาผสมกับอาหาร คนให้เข้ากัน ปกติวุ้นละลายที่ 90 เซลเซียสและจะแข็งเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 40 เซลเซียส ดังนั้นเพื่อไม่ให้วุ้นแข็งตัวควรควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 40- 90 เซลเซียส วุ้นจะเหลวหรือแข็ง ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง ภาชนะที่ใส่อาหารวุ้น ก็ควรปิดป้องกันการระเหยของน้ำ เมื่อวุ้นละลายจึงผสมลงในอาหารทั้งที่ต้องรักษาระดับปริมาตรให้ได้ตามที่ต้องการ ดังนั้นจึงต้องคำนวณให้แน่นอนว่า ต้องเติมน้ำอีกเท่าใด

2) อาหารที่เตรียมต้องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง การวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง ของอาหารให้วัดก่อนที่จะใส่วุ้นลงไป ทั้งนี้เพื่อ ไม่ให้เศษวุ้นติดที่หัวอิเล็กโทรด อาหารที่วัดต้องมีอุณหภูมิ

อยู่ในอุณหภูมิห้อง ห้ามวัดในขนาดที่อาหารยังร้อนหรือเพิ่งนำออกมาจากตู้เย็นนอกจากมีอิเล็กโทรดที่ใช้โดยเฉพาะ

3) อาหารที่เตรียมเสร็จ ควรถ่ายลงในขวดอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันไม่ให้วุ้นแข็งตัว ผู้ปฏิบัติต้องวางแผนก่อนว่าต้องใช้ภาชนะชนิดใดบ้าง เช่น หลอดทดลอง ฟลาสต์ ปริมาตรที่ใส่ลงไปในภาชนะจึงแตกต่างกัน การใช้ดินเพนเซอร์ (Dispenser) สำหรับเอาอาหารใส่ลงในภาชนะ เช่น หลอดทดลองก็จะง่ายและสะดวกกว่าใช้เทใส่โดยตรง ในกรณีที่เตรียมอาหารร้อนเช่น 0.5 – 1 ลิตร ใช้แบบธรรมดาก็ได้ แต่ถ้าต้องการเตรียมอาหารจำนวนหลายลิตรจำเป็นต้องใช้ ดินเพนเซอร์แบบอัตโนมัติที่สามารถกำหนด ปริมาตร และ การถ่ายอาหารลงในหลอดได้ ซึ่งมีอยู่หลายแบบ

4) การปิดฝาขวด มีหลายแบบ เช่น ใช้สำลี ฝาโลหะ พลาสติก หรือฝาแก้ว ภาชนะบรรจุต้องปิดหลังจากใส่สารแล้ว ถ้าปิดด้วยสำลีควรปิดทับด้วยกระดาษอลูมิเนียม เพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้น และป้องกันการปนเปื้อนเนื่องจากมีความชื้นหรือหยดน้ำลงบนสำลี หรืออาจใช้พลาสติกฟิล์ม (Plastic film) แต่ต้องไม่ห่อให้หนามากจนเกิดปัญหาด้านความดันภายในซึ่งอาจทำให้ภาชนะแตกได้ ภาชนะที่ใส่อาหารและปิดฝาเรียบร้อยแล้ว ให้นำเข้าหม้อนึ่งอัดไอ ฆ่าเชื้อตามเวลาที่กำหนด

5) สารบางชนิด เช่น จิบเบอเรลลิน เป็นฮอรโมนที่ไม่สามารถนำเข้าหม้อนึ่งอัดไอได้ เพราะจะถูกทำลายด้วยความร้อน จากการศึกษาพบว่าจะเสื่อมคุณภาพลงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงควรใช้วิธีกรอง ด้วยเครื่องกรองจุลินทรีย์

6) เครื่องมือที่จะใช้ในการถ่ายเนื้อเยื่อทุกชนิด ต้องห่อด้วยกระดาษอลูมิเนียมก่อนที่จะฆ่าเชื้อ ที่ 121 เซลเซียส เวลา 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว แต่การฆ่าเชื้อด้วยวิธีใช้หม้อนึ่งอัดไอ จะเกิดไอน้ำในภาชนะ ดังนั้นให้นำภาชนะที่ฆ่าเชื้อแล้วเข้าตู้อบโดยใช้อุณหภูมิ 160 เซลเซียส เป็นเวลา 2- 3 นาที ภาชนะที่เป็นเหล็ก ควรระวังอาจเกิดการออกซิไดซ์ (Oxidized) ได้ถ้าใช้การฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

7) อาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อต้องการเติมสารอาหารบางอย่างลงไป ให้ทำในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ ปิดฝาและหุ้มทันทีด้วยพลาสติกฟิล์ม เพื่อป้องกันฝุ่นละอองผ่านทางช่องว่างของภาชนะ พลาสติกที่ใช้ต้องทนความร้อนและต้องไม่ละลายเมื่อเข้าหม้อนึ่งอัดไอ

8) อาหารที่เตรียมไว้ ควรเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 –10 เซลเซียส หมั่นดูแลความสะอาด ป้องกันการปนเปื้อนในระหว่างเก็บ ข้างหลอดให้เขียน (Label) บอกชื่ออาหาร วัน เดือน ปี ที่เตรียม ก่อนนำอาหารมาใช้ควรเช็ดภาชนะให้ทั่วด้วยเอทานอลจึงนำมาใช้ได้ (มานี,2544.)

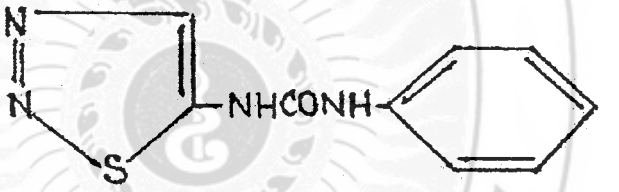
3 สารควบคุมการเจริญเติบโตได้แก่

ออกซิน(auxin) ที่นิยมได้แก่ IAA (3-indoleacetic acid) NAA (2-naphthaleneacetic acid) IBA (indolebutyvic acid) และ 2 , 4 D (2 , 4 –

dichlorophenoxyactic acid) ออกซินส่งเสริมในการงอกรากของพืช การยืดตัวของเซลล์ และการแบ่งตัวของเซลล์ (Leopole , 1967)

ไซโตไคนิน ที่นิยมใช้ได้แก่ kinetin (6 – furfurylaminopurine) และ BA (6 - benzyladenine) 2 ไอพี และไทไดอะซูรอน มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งเซลการขยายของเซล และการเปลี่ยนแปลงของเซล และยังพบว่า ใช้ cytokinins ร่วมกับ auxin ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอัตราส่วนที่เหมาะสม ทำให้เนื้อเยื่อเจริญไปเป็นแคลลัส แต่ถ้ามีปริมาณใน cytokinin สูงจะมีการส่งเสริมให้เกิดยอด และถ้า auxin สูงจะเกิดราก (Skoog and Miller,1957)

ไทไดอะซูรอน (Thidiazuron หรือ 1-phenyl-3-(1,2,3-thidiazol-5-yl)) มีน้ำหนักโมเลกุล 220.25



Thidiazuron

Huetteman Preece(1993) รายงานว่า TDZ(thidiazuron) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้เนื้อแข็ง TDZ มีผลยับยั้งการยืดยาวของยอด แต่ในบางกรณีพบว่าการใช้ TDZ ความเข้มข้นต่ำ เติมในอาหารส่งผลให้ยอดยืดยาวได้ดีขึ้น การใช้ TDZ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น ทำให้ประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูงกว่าการใช้ TDZ เพียงอย่างเดียว

จิบเบอเรลลิน ที่นิยมใช้ได้แก่ gibberellic acid (GA_3) กระตุ้นการยืดตัวของเซล และขยายขนาดของเซล (Salisbury,1969)

กรดอะมิโน ที่นิยมใช้มากคือ ไกลซีน ใช้ประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนตัวอื่นๆ ใช้ในบางกรณี เช่น กลูตามิค แอซิค และแอสปาติค

4 สารประกอบอินทรีย์อื่นๆ

ส่วนใหญ่ได้จากธรรมชาติมาจากผลิตภัณฑ์ของพืช การใช้สารที่ได้จากธรรมชาติเป็นส่วนประกอบในสูตรอาหาร แม้จะยังไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัด แต่พบว่าช่วยให้การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้ผลดียิ่งขึ้น สารที่ได้จากธรรมชาติที่นิยมเติมในสูตรอาหารมีหลายชนิด เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน น้ำต้มมันฝรั่ง กล้วย น้ำคั้นมะเขือเทศ สารสกัดจากยีสต์ และจากมอลท์ เป็นต้น (White,1951)

5 pH ของอาหารเลี้ยงพืช

pH โดยทั่วไปที่เนื้อเยื่อพืชสามารถเจริญเติบโตได้อยู่ระหว่าง 5.0-6.5 แต่ที่ 5.4 เหมาะสมที่สุด pH ของอาหารจะมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของและขณะที่นึ่งฆ่าเชื้อโรคในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ การปรับ pH อาหารให้คงที่สามารถใช้ส่วนผสมของ mono และ dihydrogen ปรับได้ แต่มีขอบเขตจำกัดคือสามารถปรับได้ที่ประมาณ pH 6.0 หรือสูงกว่าเล็กน้อยเท่านั้น (Puhan and Martin ,1967)

6 สภาพของอาหาร

การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะประสบผลสำเร็จหรือล้มเหลวยังขึ้นอยู่กับสภาพของอาหารที่ใช้ในแต่ละชนิดว่าเป็นอาหารแข็งหรืออาหารเหลว ซึ่งเนื้อเยื่อพืชบางชนิดเจริญได้ดีในอาหารเหลวแต่การเพิ่มปริมาณและการเตรียมพืชก่อนย้ายออกปลูกจะเจริญได้ดีในอาหารแข็ง แต่บางพืชจะเจริญได้ดีในอาหารแข็ง (Murashige, 1974a,1974b) สภาพอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แบ่งออกเป็น 2 พวก คือ

1. อาหารแข็ง (Solid medium) การเตรียมอาหารแข็งจำเป็นต้องเติมวุ้นเพื่อให้ชิ้นส่วนพืชยึดเกาะได้ และสิ่งสำคัญต้องพิจารณาถึงความเข้มข้นและคุณภาพของวุ้นที่นำมาใช้ การเจริญของเนื้อเยื่อ นอกจากจะขึ้นอยู่กับคุณภาพของวุ้นแล้ว ยังขึ้นกับความเข้มข้นของวุ้นในอาหาร ปกติใช้ Difco "Bacto" agar เข้มข้น 0.6 – 1 % ถ้าความเข้มข้นมากกว่านี้ทำให้อาหารแข็งมากซึ่งจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช แต่ถ้าอาหารมี pH ต่ำ จะทำให้วุ้นอ่อนตัวลง (Murashige,1974a; Romberger and Tabor, 1971)

2. อาหารเหลว (liquid medium) การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวจะวางเนื้อเยื่อพืชลงในอาหารเหลวโดยตรงแต่ต้องวางขวดเพาะเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่า (shaker) ตลอดเวลา เพื่อให้อากาศในขวดเนื้อเยื่อถ่ายเท และเนื้อเยื่อได้รับออกซิเจน หรือจะวางบนกระดาษกรอง

(filter paper bidge) เพื่อไม่ให้เนื้อเยื่อจมในอาหารเหลวซึ่งจะทำให้เน่าและเนื้อเยื่ออาจตายได้ (Murashige,1974a,1974b)

สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีหลายปัจจัย ได้แก่

1. แสง มิได้มีจุดประสงค์เพื่อให้เนื้อเยื่อใช้แสงในการปรุงอาหาร แต่เพื่อช่วยการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพมากกว่า (ไพบูลย์,2524) การให้แสงแก่เนื้อเยื่อพืชควรพิจารณาถึงคุณภาพของแสง Murashige (1974a) ได้กล่าวว่า แสงสีแดงกระตุ้นให้เกิดรากและแสงสีน้ำเงินกระตุ้นให้เกิดยอดในพืชบางชนิด ส่วนความเข้มของแสงในพืชหลายชนิดความเข้มของแสง 1,000 ลักซ์ เหมาะในช่วงก่อนการย้ายปลูก แต่ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวของซ่อนกลิ่นไทยพบว่าจะเกิดรากเมื่อให้ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ และระยะเวลาการให้แสง โดยทั่วไปมักให้แสงแก่พืชประมาณ 16 ชั่วโมงต่อวัน ซึ่งให้ผลดีในการเกิดการเปลี่ยนแปลงของพืชหลายชนิด แต่มีบางชนิดที่ต้องการแสงน้อยกว่า 16 ชั่วโมงต่อวัน

2. อุณหภูมิ การเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส Murashige, (1974a,1974b) รายงานว่าอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียสเหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชล้มลุกและพืชกึ่งเขตร้อน แต่ไม่เหมาะกับพืชเขตหนาว เช่น ลิลลี้ แกลดิโอลัส ซึ่งต้องการอุณหภูมิเฉพาะคงที่ตลอดเวลาที่เลี้ยงเนื้อเยื่อ

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (ประศาสตร์,2538)

1. เพื่อผลิตต้นพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยอาหารสูตรที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นเป็นทวีคูณ

2. เพื่อการผลิตพืชที่ปราศจากโรค โรคที่เป็นสาเหตุ ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย หรือไวรัส ต้นพืชที่ได้จากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปราศจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราเป็นอันดับแรก เพราะถ้าหากว่ามีอนุภาคของเชื้อเหล่านั้นตกลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก็จะแสดงอาการปนเปื้อนของเชื้อ

3. เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ โดยการชักนำให้เกิดรากกลายพันธุ์แล้วคัดเลือกเอาสายพันธุ์ดีไว้

4. เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเงื่อนไขต่างๆ เช่น การสร้างพันธุ์ต้านทานต่อสารพิษของโรค ต้านทานแมลง ต้านทานต่อสารเคมีกำจัดวัชพืช

5. เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทาน เราสามารถที่จะคัดสายพันธุ์ทนทานได้จากการจัดเงื่อนไขของอาหารและสภาพแวดล้อม เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็มจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดเลือกสายพันธุ์ทนต่อดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดสายพันธุ์ที่ทนร้อนโดยการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง

6. เพื่อการผลิตยาหรือสารเคมีจากพืช

7. เพื่อศึกษาทางชีวเคมี และสรีรวิทยา ต้นพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลองสามารถที่จะติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายอย่างใกล้ชิด

8. เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืช โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของสารชะลอการเจริญเติบโตบางชนิด ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามาก

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ใช้ชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชขนาดเล็กมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เพื่อผลิตต้นพืชจำนวนมากในพื้นที่จำกัด

2. ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในขวดอาหาร ทำให้ประหยัดเนื้อที่และใช้แรงงานน้อย สามารถเก็บรวบรวมพันธุ์พืชต่างๆ ได้

3. ต้นใหม่ที่ผลิตได้จะปลอดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ในบางกรณีอาจปลอดจากเชื้อไวรัสด้วย

4. สามารถควบคุมอุณหภูมิ แสง ความชื้น อาหาร และปัจจัยอื่นๆ ได้ดร

5. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่ขึ้นกับฤดูกาล

6. การย้ายอาหาร (subculture) ไม่ต้องเสียค่าแรงมาก ไม่ต้องให้น้ำและไม่ต้องใช้สารเคมีกำจัดวัชพืช

7. พืชที่ขยายพันธุ์โดยวิธีตามธรรมชาติได้ยาก สามารถแก้ไขโดยการใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการขยายพันธุ์พืชได้

ข้อเสียของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. ต้องอาศัยความชำนาญและเครื่องมือเฉพาะอย่าง มากกว่าการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการปกติ (การปักชำ,การติดตา,การทาบกิ่ง และการตอน)

2.ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีวิธีที่เฉพาะสำหรับพืชแต่ละชนิด เพื่อให้ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเจริญและพัฒนาเป็นต้น

3. ต้นใหม่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีขนาดเล็ก

4. ในพืชบางชนิดอาจจะต้องมีการใช้สารกระตุ้นหลายขั้นตอน จึงจะเกิดเป็นต้นพืชใหม่ที่สมบูรณ์

งานวิจัยเกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่ทำ

สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของบอนสีและพืชในวงศ์ Araceae ได้แก่ เผือก cocoyam,dieffenbchia,agilodendron และ cryptocoryne นั้น เริ่มครั้งแรกโดย Hartman (1974) ทำการเพาะเลี้ยงส่วนปลายยอดของพืชดังกล่าวบนอาหารแข็งดัดแปลงจากสูตรอาหารของ Mueashige และ Skoog โดยเติมไคเนติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และIAA 15 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไป

เลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 21-25 องศาเซลเซียสให้แสง 750 ฟุต-แคลเดิล วันละ 12 ชั่วโมง พบว่ามีพืช เพียง 3 ชนิดเท่านั้นคือ บอนสี เผือก และ cocoyam ที่เจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นแคลลัสและต้นอ่อนได้ ส่วน dieffenbchia,agilodendron และ cryptocoryne ไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารสูตรนี้ สำหรับบอนสีนั้นได้นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 พันธุ์ด้วยกันคือพันธุ์ Candium กับพันธุ์ Frieda Hemple พบว่าหลังจากนำส่วนของปลายยอดซึ่งมีสีขาวครีมมาเลี้ยงจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวภายใน 2 สัปดาห์ แคลลัสจะเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงไปเป็นหน่อภายใน 8 สัปดาห์ หน่อจะเจริญเติบโตเป็นต้นและจากย้ายออกปลูก 10-12 สัปดาห์ จะได้ต้นที่มีสีของใบตรงตามพันธุ์ ซึ่งจะเจริญเติบโตเต็มที่ ให้ดอกได้หลังจากย้ายปลูกประมาณ 6-7 เดือน ให้หัวที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4-5 เซนติเมตร ใบใหญ่กว้าง 20-27 เซนติเมตร ยาว 25-30 เซนติเมตร

Pierik et al. (1974) ได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาศึกษาเกี่ยวกับการขยายพันธุ์หน้าวัวพบว่าคัพภะและชิ้นส่วนต่างๆ ของหน้าวัวที่เลี้ยงบนอาหารดัดแปลงจากสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (MS) โดยเติมไซโตไคนิน PBA สามารถทำให้เกิดแคลลัสได้ แคลลัสเจริญเติบโตได้ดีในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ความแตกต่างในการเจริญเติบโตของแคลลัสขึ้นอยู่กับพันธุ์ แคลลัสอาจเกิดเป็นต้นเมื่อนำไปไว้ในที่มีแสง และเกิดเป็นรากเมื่อใช้อาหารสูตรธรรมดา (basal media) ต้นที่ได้ย้ายออกปลูกได้สำเร็จ

Kumisaki (1980) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตาของหน้าวัวในอาหารเหลวดัดแปลงจากสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog โดยการเติมน้ำมะพร้าว 15 % พบว่าตาเจริญเติบโตเป็นต้นได้ จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณโดยตัดส่วนของต้นแต่ละชิ้นส่วนมี 2 ข้อ เลี้ยงบนอาหารแข็งดัดแปลงจากสูตรอาหาร Murashige และ Skoog โดยเติม BA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าชิ้นส่วนเจริญเติบโตเป็นต้นได้ดีที่สุดในอาหารที่มี BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ BA ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปทำให้ปริมาณแคลลัสเพิ่มขึ้นและต้นมีลักษณะแคระ

Te-chato และคณะ (1995a) รายงานว่า การเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆของต้นกล้ามังคุดในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS เติม BAและ TDZ ความเข้มข้นต่างๆพบว่าใบอ่อนสีม่วงมีการสร้างเอ็มบริโอเจนิคได้สูงที่สุด รองลงมาเป็นใบอ่อนสีเขียว ก้านใบ และ เมล็ดตามลำดับ การใช้ BA กับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการสร้างแคลลัสได้ดีที่สุด การศึกษาของ Te-chato และคณะ (1995b) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงต้นอ่อนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์ ในอาหารเหลวสูตร1/2 MS เติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำการสร้างใบอ่อนสีม่วงได้ดี เมล็ดที่ผ่านการตัดแยกยอดแล้ว ไปวางเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม สามารถชักนำการสร้างแคลลัสได้ดีกว่าเมล็ดที่ไม่ผ่านการตัดแยกยอด เมื่อเปรียบเทียบผลของ BAและ TDZ ต่อการสร้างใบอ่อนสีม่วงและการสร้างแคลลัส พบว่า TDZ มีประสิทธิภาพสูงกว่า BA อย่างไรก็ตามการ

ใช้ TDZ และ BA มีผลใกล้เคียงกับการใช้ TDZ เพียงอย่างเดียว Te-chato และคณะ (1995c) รายงานว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้จากใบอ่อนสีม่วง สามารถเติบโตเพิ่มปริมาณได้ดีเมื่อวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม PVP (polyvinypyrrlidone) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร