บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae ซึ่งมีการพัฒนามากที่สุดในบรรดาพืชมีดอกทั้งหมด เป็นพืชที่มีการสำรวจพบมากที่สุดในปัจจุบันพบแล้วประมาณ 796 สกุล และพบมากกว่า 17,500 ชนิด สำหรับในประเทศไทยได้มีการสำรวจพบแล้ว 168 สกุล และพบมากกว่า 1,170 ชนิด (สลิล, 2549) บางชนิดพบเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น

หวายแดงจันทบูร เป็นกล้วยไม้ท้องถิ่นที่พบเฉพาะในเขตภาคตะวันออกของไทย พบมากที่จังหวัดจันทบุรี และจังหวัดตราด มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Renanthera coccinea* Lour. ดอกมีสีส้มแดงจนไปถึงสีแดงสด (Kamemoto and Sagarik, 1975) จึงเป็นที่นิยมใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ลูกผสมใหม่ๆ แต่ที่พบเห็นทั่วไปในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่เป็นลูกผสม ซึ่งกล้วยไม้หวายแดงจันทบูรที่เป็นสายพันธุ์แท้หาได้ยากและมีจำนวนลดลงเป็นอย่างมากในปัจจุบัน พบว่ากล้วยไม้ป่าหลายๆ ชนิดที่อยู่สภาพธรรมชาติมีจำนวนลดลงจนถึงขั้นวิกฤต ซึ่งมีสาเหตุมาจากหลายประการด้วยกันคือ สภาวะโลกร้อน การลักลอบเผาป่า การตัดไม้ทำลายป่า หรือแม้กระทั่งการลักลอบเก็บกล้วยไม้เพื่อนำมาขาย ส่งผลให้กล้วยไม้ป่าที่อาศัยอยู่ในสภาพธรรมชาติจึงมีจำนวนลดลง จากการสำรวจของภาคีอนุสัญญาว่าด้วยการคุ้มครองสัตว์ป่าและพันธุ์พืช (ไซเตส) ในปี พ.ศ.2535 พบว่า กล้วยไม้ป่าของไทยบางชนิดถูกจัดอันดับเป็นกล้วยไม้หายากของโลก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องดำเนินการอนุรักษ์และเก็บรักษาพันธุกรรมกล้วยไม้ป่าอย่างจริงจังโดยเร็ว

ภาพที่ 1หวายแดงจันทบูร

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ สามารถเพิ่มประชากรกล้วยไม้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ป่าในสภาพปลอดเชื้อนั้นเป็นการเพิ่มอัตราการ

งอกของเมล็ดให้สูงกว่าการงอกตามธรรมชาติ และยังคงความหลากหลายทางพันธุกรรมเอาไว้ด้วย เพื่อให้พันธุ์กล้วยไม้คงอยู่และหลีกเลี่ยงการสูญเสียจากปัจจัยต่างๆที่กล่าวมาข้างต้น การเก็บรักษาพันธุกรรมพืชที่ดีอีกวิธีหนึ่งคือ การเก็บรักษาพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการหรือการเก็บรักษาพันธุกรรมในสภาพปลอดเชื้อโดยปกติการเก็บรักษาพันธุ์พืชส่วนใหญ่จะเป็นการเก็บในรูปของเมล็ดพันธุ์พืช แต่เมล็ดพันธุ์บางชนิดมีอายุสั้นไม่สามารถเก็บรักษาได้นานแม้ว่าจะเก็บในอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ ในขณะเดียวกันนั้นพันธุกรรมพืชอาจเกิดการสูญหายและเสี่ยงต่อการกลายพันธุ์ได้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งที่นำมาประยุกต์ใช้กับงานด้านการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืช ซึ่งมีข้อดี คือ ใช้พื้นที่น้อย ปราศจากโรคและแมลง สามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากในเวลาอันสั้น การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อนั้นสามารถรักษาความมีชีวิตไว้ได้นานและสามารถใช้เก็บรักษาจากส่วนต่างๆได้ ไม่ว่าจะเป็น โปรโตพลาสต์ เซลล์แขวนลอย ละอองเกสร อับเรณู แคลลัส เนื้อเยื่อ เอมบริโอ เมล็ด และส่วนอวัยวะต่าง ๆ ของพืช การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยการนำเมล็ดกล้วยไม้มาเพาะเลี้ยงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถเพิ่มปริมาณกล้วยไม้ให้มีจำนวนมากขึ้นและยังสามารถคงความหลากหลายทางพันธุกรรมไว้เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต การนำเทคนิคการชะลอการเจริญเติบโตซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชสามารถทำได้หลายวิธีเช่น วิธีการลดอุณหภูมิ การลดสภาพแสงในการเพาะเลี้ยง การดัดแปลงสภาพบรรยากาศ

การปรับแต่งอาหารเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพิ่มตัวยับยั้งการออสโมซิส (osmosis) ในอาหารเพาะเลี้ยงนั้น สามารถทำได้โดยการเติมน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งเทคนิคการชะลอการเจริญเติบโตนี้สามารถยืดระยะเวลาในการเปลี่ยนถ่ายอาหารต่อไป เนื่องจากน้ำตาลความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้พืชเกิดความเครียด อันเนื่องมาจากการออสโมซิสจึงมีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโต การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้เหมาะสำหรับการเก็บส่วนปลายยอดและต้นที่ชักนำ (plantlets) แล้ว ดังนั้นควรทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดของหวายแดงจันทบูร และเมื่อต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมีการเจริญเติบโตดีแล้ว จึงนำต้นกล้วยไม้มาทำการศึกษาการเก็บรักษาพันธุกรรมด้วยเทคนิคการชะลอการเจริญเติบโตต่อไป เพื่อให้ได้องค์ความรู้ในการเก็บรักษาพันธุกรรมหวายแดงจันทบูรด้วยการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ อีกทั้งยังสามารถยืดระยะเวลาในการเปลี่ยนถ่ายอาหารเพาะเลี้ยงครั้งต่อไปให้นานขึ้น ปกติในการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อต้องมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารทุก 1 เดือน ซึ่งสามารถลดค่าใช้จ่ายต่างๆ อย่างเช่น สารเคมี รวมไปถึงแรงงานในการปฏิบัติงาน ได้อีกทางหนึ่งด้วย (รังสฤษดิ์, 2541)

สถาบันวิทยบริการ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้หวายแดง Kamemoto and Sagarik(1975**)**แบ่งไว้ดังนี้

ลำต้น เลื้อยขึ้นที่สูงเกาะตามต้นไม้ โดยมีลำต้นค่อนข้างใหญ่ เจริญบนปลายยอด

ใบ ใบมีจำนวนมาก แผ่นใบเป็นรูปขอบขนาน ปลายเว้า โคนใบเป็นกาบ แผ่นใบเกลี้ยงมัน ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร

ก้านช่อ เป็นแบบแยกแขนง และเกิดทางด้านข้างของลำต้นยาวประมาณ 50 ถึง 100 เซนติเมตร มีหลายแขนงห่างกลีบนอกและกลีบในแคบ

ดอก ใหญ่ประมาณ 5 เซนติเมตร สีแดงเข้มบนเหลือง กลีบนอกล่างสีแดง เส้นอ่อน ขอบหยิก ปากเล็กสีแดง คอขาว เดือยแหลม ออกดอกช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ถึง เมษายน

การขยายพันธุ์กล้วยไม้อบฉันท์(2543) แบ่งการขยายพันธุ์กล้วยไม้ออกเป็น 4 วิธี ดังนี้

1. การตัดแบ่งส่วนของปลายยอด มักใช้ขยายพันธุ์กล้วยไม้กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตทางปลายยอดโดยตัดยอดที่มีใบและราก 2 ถึง 3 ราก

2. การแยกหน่อหรือลำลูกกล้วยไม้ มักขยายพันธุ์กล้วยไม้กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตทางข้างโดยแยกกอใหม่อย่างน้อยประกอบด้วยลำลูกกล้วย 2 ลำ ออกจากกอเดิม

3. การเพาะเมล็ดโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นวิธีการช่วยให้ชีวิตเอ็มบริโอของเมล็ดกล้วยไม้ให้สามารถงอกได้จำนวนมากภายในระยะเวลาที่จำกัดมักทำในกรณีที่ต้องการสร้างพันธุ์ใหม่ การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อเมล็ดเป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่ดีที่สุดเนื่องจากช่วยให้งอกได้จำนวนมาก

4. การเพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของกล้วยไม้ เป็นการขยายพันธุ์ที่ได้พันธุ์เดิม และยังสามารถเพิ่มจำนวนในเวลาอันสั้น

การขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขยายพันธุ์กล้วยไม้แทบทุกชนิด เนื่องจากสามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว โดยการนำเอาส่วนตาข้างและตายอดของหน่ออ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อก่อนเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งขั้นตอนต่างๆนั้นต้องอาศัยเทคนิคปลอดเชื้อเป็นสำคัญ เนื้อเยื่อส่วนตานี้จะเจริญเป็นโปรโตคอร์มที่มีลักษณะคล้ายต้นอ่อนซึ่งสามารถทำให้เจริญเป็นต้นได้ ต้นใหม่จะมีลักษณะเหมือนต้นแม่หรือใกล้เคียง นอกจากนี้ยังสามารถใช้ส่วนของเมล็ดที่มีอยู่ในฝักนำมาเพาะบนอาหารสังเคราะห์ แต่ต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดอาจผิดเพี้ยนไปจากต้นแม่เนื่องจากเกิดการผสมเกสร (สาโรจน์, 2548)

ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

ฮอร์โมนพืช (หรืออาจเรียกว่า ไฟโตฮอร์โมน) เป็นสารเคมีที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ฮอร์โมนพืชเป็นโมเลกุลที่ใช้ส่งสัญญาณ ถูกผลิตขึ้นในต้นพืชเอง และถูกพบในปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำมาก ฮอร์โมนจะควบคุมกระบวนการที่เกี่ยวกับเซลล์ในเซลล์เป้าหมายเฉพาะที่ ฮอร์โมนยังช่วย

กำหนดรูปทรงของพืช การงอกของเมล็ด การออกดอก เวลาการออกดอก เพศของดอก การแตกกิ่ง การแตกใบ การสลัดใบ การเจริญเติบโต และการสุกของผล

ฮอร์โมนพืชจะส่งผลกับการแสดงออกของยีนส์ ระดับของการถอดรหัส การแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโต โดยธรรมชาติพืชจะผลิตฮอร์โมนขึ้นมาเอง แต่สารเคมีที่มีลักษณะคล้ายฮอร์โมนที่ผลิตมาจากเชื้อราหรือแบคทีเรียก็สามารถมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ นอกจากนี้ยังมีสารเคมีที่เกี่ยวข้องจำนวนมากที่สามารถถูกสังเคราะห์ขึ้นมาได้ และถูกใช้สำหรับการควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เพาะปลูก วัชพืช พืชที่ปลูกในหลอดทดลอง รวมถึงเซลล์พืช สารเคมีที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นนี้จะถูกเรียกว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

เซลล์พืชไม่สามารถตอบสนองกับฮอร์โมนได้ทุกเซลล์ พืชต้องการฮอร์โมนเฉพาะที่และเฉพาะเวลาในรอบวงจรการเจริญเติบโต ฮอร์โมนจะถูกสร้างขึ้นมากบริเวณเนื้อเยื่อเจริญ ความเข้มข้นของฮอร์โมนที่พืชใช้อยู่ในระดับที่ต่ำมาก คือ 10^{-6} ถึง 10^{-5} โมลต่อลิตร (พีรเดช, 2537)

ไซโตไคนิน (Cytokinin)

พีรเดช (2537) กล่าวว่าไซโตไคนิน เป็นฮอร์โมนของพืชที่พบครั้งแรกในน้ำมะพร้าว โดยสารนี้มีความสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ต่อมาพบว่าสารนี้คือ 6-furfuryladenine เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างแบบพูรีน (Purine) จากคุณสมบัติที่สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ได้ จึงเรียกสารนี้ว่า ไคเนติน (Kinetin) หลังจากนั้นมีผู้พบสารที่มีคุณสมบัติคล้ายกับไคเนตินอีกหลายชนิด จึงเรียกสารเหล่านี้ว่าไซโตไคนิน

ไซโตไคนินที่พบในพืชคือ ซีอะติน (Zeatin) แหล่งสร้างไซโตไคนินในพืชอยู่ที่ปลายราก ปมราก และพบทั่วไปในต้นพืช เป็นส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิก นอกจากนี้ยังพบในรูปสารอิสระในเอ็มบริโอและผลที่กำลังเจริญเติบโต ผลของไซโตไคนินกับพืช จะเกิดรวมกับสารในการทำงาน (Co-factor) อื่นๆ ถ้าไม่มีสารเหล่านี้ไซโตไคนินจะไม่แสดงผลกับพืช ในปัจจุบันได้มีการสังเคราะห์ไซโตไคนินขึ้นในห้องปฏิบัติการหลายชนิด และนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในทางเกษตรและทางการค้า ไซโตไคนินเหล่านี้มีคุณสมบัติในการแบ่งเซลล์ ชะลอการเจริญเติบโตของพืช หรือยืดอายุของส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ดอก และผล ให้สดอยู่ได้นาน ตลอดจนมีการนำมาใช้ในสูตรอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างแพร่หลาย ไซโตไคนินสังเคราะห์ที่สำคัญ และนิยมใช้กันมาก ได้แก่ เบนซิลอะดีนิน (benzlyadenine) เป็นต้น

สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์ ราชภัฏรำไพพรรณี

ประโยชน์ของไซโตไคนินพีรเดช (2537) แบ่งได้ดังนี้

1. ส่งเสริมเซลล์ให้แบ่งตัวและพัฒนาไปเป็นอวัยวะต่าง ๆ ของพืช หน้าที่ของไซโตไคนินคือช่วยให้ไซโตพลาสซึมแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น สัดส่วนของไซโตไคนิน และออกซินมีส่วน

สำคัญมาก ถ้ามีไซโตไคนินมาก กลุ่มเซลล์จะพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่จะแปลงสภาพไปเป็นส่วนของยอด คือ ตา ลำต้น และใบ แต่ถ้ามีไซโตไคนินต่ำจะเกิดรากมาก ดังนั้นการใช้สัดส่วนของฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้อย่างเหมาะสม กลุ่มเซลล์จะสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบรูณ์ได้

2. กระตุ้นการเจริญของกิ่งแขนง สารไซโตไคนินสามารถกระตุ้นให้ตาข้างของพืชเจริญออกมาเป็นกิ่งได้จึงมีประโยชน์ในการควบคุมทรงพุ่ม

3. ช่วยชะลอความแก่ของพืช เช่น BAP สามารถชะลอความแก่ของพืชได้หลายชนิด

4. ช่วยในการเคลื่อนย้ายอาหาร ไซโตไคนินมีคุณสมบัติช่วยในการเคลื่อนย้ายสารอาหารจากส่วนอื่นๆไปยังส่วนที่ได้รับไซโตไคนินได้ เช่น ใบอ่อน ซึ่งมีไซโตไคนินอยู่มากจะสามารถเคลื่อนย้ายสารอาหารจากใบแก่มาเก็บสะสมไว้ในใบอ่อนที่กำลังเจริญเติบโต

5. กระตุ้นการเกิดดอกและผล โดยไซโตไคนินสามารถชักนำการออกดอกของพืชวันยาว หรือพืชที่ต้องการอากาศเย็นได้ และยังช่วยกระตุ้นให้มีการสร้างผลพาร์ทีโนคาร์ปิคฟรุทในพืชบางชนิดได้

สารประกอบในน้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวสามารถกระตุ้นเซลล์ให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว จากคุณสมบัติของน้ำมะพร้าวนี้ เมื่อทำการแยกส่วนประกอบในน้ำมะพร้าวพบว่า สารประกอบในน้ำมะพร้าวมีหลายตัวทำงานร่วมกัน ส่วนประกอบที่แยกได้ ได้แก่ กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ กรดนิวคลีอิก พิวรีน (Purine) น้ำตาล น้ำตาลแอลกอฮอล์ วิตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโต และธาตุอาหาร เป็นต้น (อภิญญ์, 2554) และการสกัดสารฮอร์โมนไซโตไคนินจากน้ำมะพร้าว ที่ได้จากผลมะพร้าวที่อายุต่างๆ คือ มะพร้าวอ่อน มะพร้าวกึ่งแก่กึ่งอ่อน (มะพร้าวทึนทึก) และมะพร้าวแก่ (มะพร้าวแกง) ผลปรากฏว่า ปริมาณสารฮอร์โมนไซโตไคนินที่สกัดได้ในมะพร้าวอ่อนเฉลี่ย 0.53 ppm ซึ่งมีประมาณมากที่สุด รองลงมาได้แก่ มะพร้าวกึ่งแก่กึ่งอ่อน ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 0.12 ppm และในมะพร้าวแก่ 0.02 ppm ตามลำดับ ส่วนสารประกอบอื่นๆ ที่มีอยู่ในน้ำมะพร้าว ได้แก่ น้ำตาล Galactose และ Arabinose และไขมัน (อัญชลี, 2542)

บทบาทของน้ำมะพร้าวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

น้ำมะพร้าวอ่อนประกอบด้วยสารที่มีผลกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของพืชอยู่ในปริมาณมากค้นพบโดยนักวิทยาศาสตร์ที่มีชื่อว่า Johannes Van Overbeek ในปี ค.ศ. 1940 เรียกว่า ไซโตไคนิน (Cytokinin) ต่อมาในปี ค.ศ. 1941 Van Overbeek ได้ศึกษาการเจริญของเอ็มบริโอของต้นลำโพงในสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ ปรากฏว่าเอ็มบริโอไม่เติบโตเลย แต่ภายหลังจากใส่น้ำมะพร้าวลงไปในสูตรนั้น เอ็มบริโอจึงเจริญ และในปี ค.ศ. 1950 F.C. Steward ได้ค้นพบเทคนิคในการเพาะเลี้ยง

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

เนื้อเยื่อโดยใช้น้ำมะพร้าวผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์โดยใส่น้ำมะพร้าวซึ่งเป็นเอ็นโดสเปริ์มเหลวลงไปในอาหาร พบว่าสามารถเลี้ยงเอ็มบริโอได้ดี ต่อมาในปีค.ศ. 1975 Skoog และ Miller พบว่า สารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ที่อยู่ในน้ำมะพร้าวเป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างแบบพิวรีน (Purine) (คำนูณ, 2542) ที่ช่วยในการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของเซลล์เพาะเลี้ยง ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว น้ำมะพร้าวยังช่วยส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจนเนซิสได้อีกด้วย

เนื่องจากในน้ำมะพร้าวมีสารสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ น้ำมะพร้าวจึงเป็นส่วนหนึ่งขององค์ประกอบหนึ่งของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การเพาะเลี้ยงอวัยวะต่างๆ ของพืช เช่น ราก ใบ ดอก รังไข่ ออวุล การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ เป็นต้น ซึ่งการเติมน้ำมะพร้าวจะช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้หลายชนิดงอกได้ดีขึ้น และยังส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงปลายยอดของกล้วยไม้หลายชนิด โดยจะส่งเสริมการแบ่งเซลล์ผิว (Epidermal cell) ส่งเสริมการเกิดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มได้ดี (มัลลิกา, 2548) ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะนิยมใช้น้ำมะพร้าวใส่ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงร้อยละ 10.0 ถึง 15.0 (อภิญญ์, 2554)

สารอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งพลังงาน

สุชาดา (2545) ได้กล่าวถึงสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาล ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จำเป็นสำหรับการเจริญและการพัฒนาของพืช เนื่องจากเป็นปัจจัยสำคัญในการสังเคราะห์แสง น้ำตาลที่นิยมใช้ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส (Sucrose) จัดเป็น ไดแซ็คคาไรค์ (Disaccharide) เมื่อถูกความร้อนจากการนึ่งฆ่าเชื้อจะมีการแตกตัวให้กลูโคสและฟรุคโตส ซึ่งน้ำตาลซูโครส (Sucrose) สามารถหาได้ง่ายและราคาถูก โดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะนิยมการเติม กรดอะมิโน (Amino acid) โดยที่จำเป็นต่อกระบวนการ (Metabolism) ต่าง ๆ การเติมกรดอะมิโนร่วมกับ Adenine sulphate สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์หรือเพิ่มอัตราในการเกิดยอด แต่ถ้ามีการเติมมากเกินไปก็จะเกิดเป็นการยับยั้งการเจริญของเซลล์โดยที่ กรดอะมิโน (Amino acid) ส่วนใหญ่ที่นำมาเติมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ คือ ไกลซีน (Glycine) เพราะเป็นส่วนประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962) หรือสูตรอาหาร MS

สารประกอบธรรมชาติที่ซับซ้อน (Natural complexes)

Arditti andErnst (1993) ได้มีการศึกษาค้นคว้าสารประกอบอินทรีย์จากธรรมชาติที่ซับซ้อน (Natural complexes) หรือเป็นสารประกอบที่เกิดตามธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน กล้วยหอมบด มันฝรั่งบด และ Protein hydrolysates (เช่น Casein hydrolysate, Peptone และ Tryptone) เมื่อใส่ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชนิยมใช้กับ

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ และส่งผลที่แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ มักจะมีการเติมน้ำมะพร้าวเนื่องจากน้ำมะพร้าวอ่อนมีสารต่าง ๆ ได้แก่ ไซโตไคนิน คาร์โบไฮเดรตหลายชนิด กรดอินทรีย์ และน้ำตาล ส่วนในมันฝรั่งนั้นมีโพลีเอมีน (Polyamine) และ Biosynthetic enzyme กระจายอยู่ทั่วไปในส่วนต่าง ๆ ของมันฝรั่ง สารโพรีเอมีนมีผลต่อการเจริญเติบโต การพัฒนาของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีผลต่อกรดนิวคลีอิค (Nucleic acid) ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส (Mitosis)ในเนื้อเยื่อมากขึ้น นอกจากนี้มันฝรั่งบดประกอบไปด้วย แป้ง น้ำตาล โปรตีน วิตามิน ในการใช้มันฝรั่งบดในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้มีรายงานว่ามีส่วนในการช่วยให้เมล็ดงอกได้ดีขึ้น และมีต้นอ่อนที่แข็งแรง

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ

การเก็บรักษาพันธุ์หรือการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชนั้นเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุ์พืช โดยปกตินั้นการเก็บรักษาพันธุ์พืชส่วนใหญ่จะเป็นการเก็บในรูปของเมล็ดพันธุ์พืช แต่เมล็ดพันธุ์บางชนิดมีอายุสั้นไม่สามารถเก็บรักษาได้นานแม้ว่าจะเก็บในอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ ในขณะเดียวกันนั้นพันธุกรรมพืชอาจเกิดการสูญหายและเสี่ยงต่อการกลายพันธุ์ได้ Razdan (1994) กล่าวว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งที่นำมาประยุกต์ใช้กับงานด้านการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืช ซึ่งมีข้อดี คือ ใช้พื้นที่น้อย ปราศจากโรคและแมลง สามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากในเวลาอันสั้น การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อนั้นสามารถรักษาความมีชีวิตไว้ได้นานและสามารถใช้เก็บรักษาจากส่วนต่างๆได้ ไม่ว่าจะเป็นโปร โตพลาสต์ เซลล์แขวนลอย ละอองเกสร อับเรณู แคลลัส เนื้อเยื่อ เอมบริโอ เมล็ด และส่วนอวัยวะต่าง ๆ ของพืช (รังสฤษดิ์, 2541)

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ สามารถแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบคือ

1. การชะลอการเจริญเติบโต (slow growth technique) การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้เป็นการเก็บรักษาในระยะเวลาสั้นหรือปานกลาง Ashmore (1997) รายงานว่าสามารถขยายช่วงเวลาการย้ายเลี้ยง (subculture) ออกไปได้ 1-4 ปีในพืชหลายชนิด วิธีการชะลอหรือการลดการเจริญเติบโตสามารถทำได้หลายวิธีเช่นโดยวิธีการลดอุณหภูมิ การลดสภาพแสงในการเพาะเลี้ยง การดัดแปลงสภาพบรรยากาศ การปรับแต่งอาหารเพาะเลี้ยงและโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพิ่มตัวยับยั้งการออสโม-ซิส (osmosis) สำหรับการเพิ่มตัวยับยั้งการออสโมซิสในอาหารเพาะเลี้ยงนั้น สามารถทำได้โดยการเติมน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง เช่นแมนนิทอล (mannitol) (รังสฤษดิ์, 2541) เนื่องจากแมนนิทอลที่มีความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้พืชเกิดความเครียดอันเนื่องมาจากการออสโมซิสจึงมีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโต ดังรายงานของ Lopez *et al.* (1998) ทำการทดลองโดยใช้แมนนิทอล 4 เปอร์เซ็นต์ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสในการลดการเจริญเติบโตของมันฝรั่ง พบว่าสามารถ

ขยายเวลาในการเปลี่ยนอาหารออกไปได้ 8 เดือนหรืออาจจะมากกว่า 12 เดือน ซึ่งโดยปกตินั้นมันฝรั่งต้องทำการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงทุก 4 ถึง 8 สัปดาห์ เนาวรัตน์ (2547) ศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมในการชะลอการเจริญเติบโตของเอื้องแซะหลวง พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์สามารถชะลอการเจริญเติบโตทางความสูง ในรายงานของ Yong *et al.* (2000) ได้ทดลองความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Rehmanniaglutinosa* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งในตระกูล Scrophulariaceae ทำการทดลองโดยใช้ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0, 15 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นการเจริญเติบโตจะลดลง อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการปรับแต่งสูตรอาหารก็คือ การใช้สารชะลอการเจริญเติบโต ดังรายงานของ Chung *et al.* (1999) ได้ทดสอบสารชะลอการเจริญเติบโตกับกล้วยไม้ *Bletilla striata*โดยใช้สารชะลอเจริญการเติบโต 4 ชนิด คือ Uniconazole, Paclobutrazol, Ancymidol และ *N*-dimethyl succinamic acid เติมลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าสารทั้ง 4 ชนิด สามารถลดการเจริญเติบโตของ*Bletilla striata*ได้แต่สาร Uniconazole ส่งผลให้รูปร่างของใบมีลักษณะผิดปกติ เช่นเดียวกันในปีถัดมา Jee *et al.* (2000) ได้ทำการทดลองเพื่อทดสอบความสามารถในการชะลอการเจริญเติบโตของสาร Uniconazole, Paclobutrazol และ ancymidol กับ*Bletilla striata*พบว่า Paclobutrazol ความเข้มข้น 0.4-0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นเหมาะสำหรับการลดการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามวิธีการเก็บรักษาด้วยวิธีนี้เหมาะสำหรับการเก็บส่วนปลายยอดและต้นที่ชักนำ(plantlets) แล้วเท่านั้น

2. การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยเทคนิคเมล็ดเทียม(artificial seed technique)เมล็ดเทียมเป็นการเรียกเอมบริออยด์หรือชิ้นส่วนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่เอมบริออยด์เช่น ปลายยอด ปลายราก ตาข้าง และแคลลัส ที่เคลือบด้วยสารที่ทำให้เกิดเจลทำให้มีลักษณะคล้ายกับเมล็ดจริง (Senaratna, 1992) การเก็บรักษาด้วยเทคนิคเมล็ดเทียมนี้เป็นอีกวิธีการหนึ่งเพื่อทดแทนการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อที่ต้องมีการเปลี่ยนอาหารไปตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา อีกทั้งการเก็บรักษาในรูปของเซลล์แขวนลอย หรือแคลลัส จะมีการพัฒนาเป็นต้นพืชได้ในระดับต่ำ และอาจเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ที่ส่งผลให้เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะจุด การขาดหายของยีน การเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม หรืออาจเกิดการสูญหายของโครโมโซมบางส่วนหรือทั้งหมด (Grout, 1995) การสูญเสียความตรงตามพันธุ์ซึ่งเกิดจากการผันแปรทางพันธุกรรมไปตามระยะเวลาในการเก็บรักษาที่เพิ่มมากขึ้น (Engelmann, 1991) เมล็ดเทียมจะทำหน้าที่เสมือนเปลือกหุ้มเมล็ด(seed coat) เพื่อป้องกันอันตรายให้แก่เอมบริโอที่อยู่ภายใน (Redenbaugh, 1990) โดยการใช้สารที่ทำให้เกิดเจล เช่น สารอัลจิเนต วุ้น อกาโรส และเจลลาติน นำมาเคลือบชิ้นส่วนของพืช แต่พบว่าสารอัลจิเนตนั้นสามารถทำให้เกิดเป็นแคปซูลและทำให้เอมบริออยด์ยังคงความมีชีวิตได้ดีกว่าชนิดอื่น นอกจากนี้เมล็ดเทียมยังสามารถใช้เป็นแหล่งของอาหารสะสม เช่น ธาตุอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และ

องค์ประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการงอก การเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นอ่อนได้อีกด้วย (Redenbaugh *et al.*, 1987) อีกทั้งยังสามารถผลิตได้จำนวนมากโดยไม่จำกัดช่วงเวลาการผลิต (Ashmore, 1997) แต่ก็มีข้อควรระวังคือ เนื่องจากเมล็ดเทียมมีลักษณะเป็นรูพรุนทำให้สูญเสียธาตุอาหารที่ละลายน้ำไปก่อนที่รากและยอดจะงอกออกมา อีกทั้งยังแห้งได้ง่ายเมื่อได้รับอากาศจึงทำให้เก็บรักษาได้เพียงระยะเวลาสั้น ๆ ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการระเหยน้ำออกจากอัลจิเนต เพื่อให้มีสภาพกับเหมือนเมล็ดจริง (Redenbaugh *et al*., 1987) ส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารอัลจิเนตที่ใช้ในการเคลือบนั้นปัจจุบันใช้สารโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรตความเข้มข้น 100 มิลลิโมล โดยใช้เป็นระยะเวลา 30 ถึง 40 นาที (Malemnganba *et al*., 1996)

3. การเก็บรักษาแบบแช่แข็งหรือการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation) การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชโดยการเปลี่ยนถ่ายอาหารจำเป็นต้องทำอย่างสม่ำเสมอและต่อเนื่องซึ่งสิ้นเปลืองแรงงานและค่าใช้จ่าย การเก็บเนื้อเยื่อพืชไว้ในอุณหภูมิต่ำมากๆดังเช่นอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสของไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) (Withers, 1985) เป็นการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง ซึ่งหยุดกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ของพืช ไม่มีการแบ่งเซลล์และไม่มีกระบวนการทางเมตาบอลิซึมต่างๆเกิดขึ้นคล้ายกับการพักตัวของเมล็ด ในทางทฤษฎีนั้นเนื้อเยื่อของพืชจะคงสภาพนั้นไปตลอดกาล และเมื่อนำออกสู่สภาวะปกติเซลล์ต่างๆจะยังมีชีวิต สามารถแบ่งเซลล์ มีการเจริญเติบโตและมีการพัฒนาเป็นต้นพืชได้ตามปกติ (Ashmore, 1997)

การเก็บรักษาด้วยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต (slow growth technique)

รังสฤษดิ์ (2541) กล่าวถึงวิธีการเก็บรักษาด้วยวิธีการนี้ว่าเป็นวิธีการเก็บรักษาส่วนของยอด (Shoot culture) และต้นที่ชักนำได้ (Plantlets) แต่ไม่เหมาะสำหรับแคลลัส อาหารที่ใช้ควรเป็นอาหารกึ่งแข็งเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาธาตุอาหารจำกัด (ในกรณีที่เป็นอาหารแข็ง) หรือมีธาตุอาหารมากเกินไป (กรณีอาหารเหลว) ซึ่งจะมีผลต่อ Osmotic ของเนื้อเยื่อพืช สำหรับวิธีที่มีการพัฒนาใช้นั้นมีด้วยกันหลายวิธี คือ

1. การลดอุณหภูมิ (Reduced temperature) วิธีนี้เหมาะสำหรับการเก็บรักษาแคลลัสและยอด โดยมีขั้นตอนดังนี้

: เตรียมภาชนะเก็บรักษาเนื้อเยื่อ และอาหารที่ใช้ (Standard medium)

: นำเนื้อเยื่อพืชจากที่เพาะเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิปกติมาก่อน มาไว้ในที่มีอุณหภูมิต่ำ 4 ถึง 10 องศาเซลเซียส (ในกรณีที่เดิมเลี้ยงที่ 20 ถึง 25 องศาเซลเซียส) หรือนำมาไว้ที่ 15 ถึง 20 องศาเซลเซียส (ในกรณีที่เดิมเลี้ยงไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส) โดยให้ได้รับแสงความเข้มต่ำประมาณ 50 ลักซ์ ช่วงแสงนาน 16 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

: ตรวจดูเป็นระยะ (ปกติทุก ๆ 1 เดือน) เพื่อดูการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ หรือความเสียหายเนื่องจากปิดภาชนะไม่ดี หรือต้นมีการเจริญเติบโตผิดปกติ

: ย้ายอาหารถ้าเห็นว่าจำเป็น ซึ่งโดยปกติเนื้อเยื่อพืชจะมีการเจริญเติบโตช้าลง จึงไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารบ่อยนัก

2. การใช้สารยับยั้งออสโมซิส (Osmotic inhibitor)วิธีนี้เหมาะสำหรับการเก็บรักษายอด โดยมีขั้นตอนดังนี้

: เตรียมภาชนะเก็บรักษาเนื้อเยื่อ และอาหารที่ใช้ (Standard medium) ที่เติม mannitol 3 ถึง 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

: นำเนื้อเยื่อพืชจากที่เพาะเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิปกติมาก่อน มาเลี้ยงในที่มีความเข้มข้นแสงต่ำประมาณ 50 ลักซ์ ช่วงแสงนาน 16 ชั่วโมง

: ตรวจดูเป็นระยะดังกล่าวข้างต้น

: ย้ายอาหารใหม่

3. การใช้สารยับยั้งการเจริญเติบโต (Growth inhibitor)
วิธีนี้เหมาะสำหรับการเก็บรักษายอด โดยมีขั้นตอนเช่นเดียวกันแต่แตกต่างที่มีการเติมสารยับยั้งการเจริญเติบโต (Growth inhibitor) ลงในอาหาร

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี