

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

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

หวายแดงจันทบุรี เป็นกล้วยไม้ท้องถิ่นที่พบเฉพาะในเขตภาคตะวันออกของไทย พบมากที่จังหวัดจันทบุรี และจังหวัดตราด มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Renanthera coccinea* Lour. ดอกมีสีส้มแดงจนไปถึงสีแดงสด (Kamemoto and Sagarik, 1975) จึงเป็นที่นิยมใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ลูกผสมใหม่ ๆ แต่ที่พบเห็นทั่วไปในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่เป็นลูกผสมซึ่งกล้วยไม้หวายแดงจันทบุรีที่เป็นสายพันธุ์แท้หาได้ยากและมีจำนวนลดลงเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันพบว่ากล้วยไม้ป่าหลาย ๆ ชนิดที่อยู่สภาพธรรมชาติมีจำนวนลดลงจนถึงขั้นวิกฤต ซึ่งมีสาเหตุมาจากหลายประการด้วยกันคือ สภาวะโลกร้อน การลักลอบเผาป่า การตัดไม้ทำลายป่า หรือแม้กระทั่งการลักลอบเก็บกล้วยไม้เพื่อนำมาขาย ส่งผลให้กล้วยไม้ป่าที่อาศัยอยู่ในสภาพธรรมชาติจึงมีจำนวนลดลงจากการสำรวจของภาคีอนุสัญญาว่าด้วยการคุ้มครองสัตว์ป่าและพันธุ์พืช (ไซเตส) ในปี พ.ศ.2535 พบว่า กล้วยไม้ป่าของไทยบางชนิดถูกจัดอันดับเป็นกล้วยไม้หายากของโลก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องดำเนินการอนุรักษ์และเก็บรักษาพันธุ์กรรมกล้วยไม้ป่าอย่างจริงจังโดยเร็ว



ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี
ภาพที่ 1 หวายแดงจันทบุรี

การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ สามารถเพิ่มประชากรกล้วยไม้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ป่าในสภาพปลอดเชื่อนั้นเป็นการเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดให้สูงกว่าการงอกตามธรรมชาติ และยังคงความหลากหลายทางพันธุกรรมเอาไว้ด้วย เพื่อให้พันธุ์กล้วยไม้คงอยู่และหลีกเลี่ยงการสูญเสียจากปัจจัยต่างๆที่กล่าวมาข้างต้น การเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชที่ดีอีกวิธีหนึ่งคือ การเก็บรักษาพันธุ์กรรมในห้องปฏิบัติการหรือการเก็บรักษาพันธุ์กรรมในสภาพปลอดเชื้อ โดยปกติการเก็บรักษาพันธุ์พืชส่วนใหญ่จะเป็นการเก็บในรูปของเมล็ดพันธุ์พืช แต่

เมล็ดพันธุ์บางชนิดมีอายุสั้นไม่สามารถเก็บรักษาได้นานแม้ว่าจะเก็บในอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ ในขณะที่เดียวกันนั้นพันธุ์กรรมพืชอาจเกิดการสูญหายและเสี่ยงต่อการกลายพันธุ์ได้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งที่น่ามาประยุกต์ใช้กับงานด้านการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืช ซึ่งมีข้อดี คือ ใช้พื้นที่น้อย ปราศจากโรคและแมลง สามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากในเวลาอันสั้น การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อนั้นสามารถรักษาความมีชีวิตไว้ได้นานและสามารถใช้เก็บรักษาจากส่วนต่างๆได้ ไม่ว่าจะเป็น โปรโตพลาสต์ เซลล์แขวนลอย ละอองเกสร อับเรณู แคลลัส เนื้อเยื่อ เอ็มบริโอ เมล็ด และส่วนอวัยวะต่าง ๆ ของพืช การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยการนำเมล็ดกล้วยไม้มาเพาะเลี้ยงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถเพิ่มปริมาณกล้วยไม้ให้มีจำนวนมากขึ้นและยังสามารถคงความหลากหลายทางพันธุกรรมไว้เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต การนำเทคนิคการชะลอการเจริญเติบโตซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในการเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชสามารถทำได้หลายวิธีเช่น วิธีการลดอุณหภูมิ การลดสภาพแสงในการเพาะเลี้ยง การตัดแปลงสภาพบรรยากาศ

การปรับแต่งอาหารเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพิ่มตัวยับยั้งการออสโมซิส (osmosis) ในอาหารเพาะเลี้ยงนั้น สามารถทำได้โดยการเติมน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งเทคนิคการชะลอการเจริญเติบโตนี้สามารถยืดระยะเวลาในการเปลี่ยนถ่ายอาหารต่อไป เนื่องจากน้ำตาลความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้พืชเกิดความเครียด อันเนื่องมาจากการออสโมซิสจึงมีผลไปยังการเจริญเติบโต การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้เหมาะสำหรับการเก็บส่วนปลายยอดและต้นที่ซีกน้า (plantlets) แล้ว ดังนั้นควรทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดของหวายแดงจันทบูร และเมื่อต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมีการเจริญเติบโตดีแล้ว จึงนำต้นกล้วยไม้มาทำการศึกษาการเก็บรักษาพันธุ์กรรมด้วยเทคนิคการชะลอการเจริญเติบโตต่อไป เพื่อให้ได้องค์ความรู้ในการเก็บรักษาพันธุ์กรรมหวายแดงจันทบูรด้วยการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ อีกทั้งยังสามารถยืดระยะเวลาในการเปลี่ยนถ่ายอาหารเพาะเลี้ยงครั้งต่อไปให้นานขึ้น ปกติในการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อต้องมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารทุก 1 เดือน ซึ่งสามารถลดค่าใช้จ่ายต่างๆ อย่างเช่น สารเคมี รวมไปถึงแรงงานในการปฏิบัติงาน ได้อีกทางหนึ่งด้วย (รังสฤษดิ์, 2541)

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 กลีบนอกกลางสีแดง เส้นอ่อน ขอบหยิก ปากเล็กสีแดง คอขาว เตี้ยแหลม ออกดอกช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ถึง เมษายน

การขยายพันธุ์กล้วยไม้ ออบฉันท (2543) แบ่งการขยายพันธุ์กล้วยไม้ออกเป็น 4 วิธี ดังนี้

1. การตัดแบ่งส่วนของปลายยอด มักใช้ขยายพันธุ์กล้วยไม้กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตทางปลายยอดโดยตัดยอดที่มีใบและราก 2 ถึง 3 ราก

2. การแยกหน่อหรือลำลูกกล้วยไม้ มักขยายพันธุ์กล้วยไม้กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตทางข้าง โดยแยกกอใหม่อย่างน้อยประกอบด้วยลำลูกกล้วย 2 ลำ ออกจากกอเดิม

3. การเพาะเมล็ดโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นวิธีการช่วยให้ชีวิตเอ็มบริโอของเมล็ดกล้วยไม้ที่สามารถงอกได้จำนวนมากภายในระยะเวลาที่จำกัดมักทำในกรณีที่ต้องการสร้างพันธุ์ใหม่ การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อเมล็ดเป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่ดีที่สุดเนื่องจากช่วยให้งอกได้จำนวนมาก

4. การเพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของกล้วยไม้ เป็นการขยายพันธุ์ที่ได้พันธุ์เดิม และยังสามารถเพิ่มจำนวนในเวลาอันสั้น

การขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขยายพันธุ์กล้วยไม้แทบทุกชนิด เนื่องจากสามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว โดยการนำเอาส่วนตาข้างและตายอดของหน่ออ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อก่อนเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งขั้นตอนต่าง ๆ นั้นต้องอาศัยเทคนิคปลอดเชื้อเป็นสิ่งสำคัญ เนื้อเยื่อส่วนตานั้นจะเจริญเป็นโปรโตคอร์มที่มีลักษณะคล้ายต้นอ่อนซึ่งสามารถทำให้เจริญเป็นต้นได้ ต้นใหม่จะมีลักษณะเหมือนต้นแม่หรือใกล้เคียง นอกจากนี้ยังสามารถใช้ส่วนของเมล็ดที่มีอยู่ในฝักนำมาเพาะบนอาหารสังเคราะห์ แต่ต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดอาจผิดเพี้ยนไปจากต้นแม่เนื่องจากเกิดการผสมเกสร (สารโวจน์, 2548)

ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

ฮอร์โมนพืช (หรืออาจเรียกว่า ไฟโตฮอร์โมน) เป็นสารเคมีที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ฮอร์โมนพืชเป็นโมเลกุลที่ใช้ส่งสัญญาณ ถูกผลิตขึ้นในต้นพืชเอง และถูกพบในปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำมาก ฮอร์โมนจะควบคุมกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ในเซลล์เป้าหมายเฉพาะที่ ฮอร์โมนยังช่วยกำหนดรูปร่างของพืช 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 (พีเรเดซ, 2537)

ไซโตไคนิน (Cytokinin)

พรีเดซ (2537) กล่าวว่าไซโตไคนิน เป็นฮอร์โมนของพืชที่พบครั้งแรกในน้ำมะพร้าว โดยสารนี้มีความสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ต่อมาพบว่าสารนี้คือ 6-furfuryladenine เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างแบบพิวรีน (Purine) จากคุณสมบัติที่สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ได้ จึงเรียกลักษณะนี้ว่า ไคเนติน (Kinetin) หลังจากนั้นก็มีผู้พบสารที่มีคุณสมบัติคล้ายกับไคเนตินอีกหลายชนิด จึงเรียกลักษณะนี้ว่า ไซโตไคนิน

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

ประโยชน์ของไซโตไคนิน พรีเดซ (2537) แบ่งได้ดังนี้

1. ส่งเสริมเซลล์ให้แบ่งตัวและพัฒนาไปเป็นอวัยวะต่าง ๆ ของพืช หน้าที่ของไซโตไคนินคือช่วยให้ไซโตพลาสซึมแบ่งตัว ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น สัดส่วนของไซโตไคนิน และออกซินมีส่วนสำคัญมาก ถ้ามีไซโตไคนินมาก กลุ่มเซลล์จะพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่จะแปลงสภาพไปเป็นส่วนขยาย คือ ตา ลำต้น และใบ แต่ถ้ามีไซโตไคนินต่ำจะเกิดรากมาก ดังนั้นการใช้สัดส่วนของฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้อย่างเหมาะสม กลุ่มเซลล์จะสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้
2. กระตุ้นการเจริญของกิ่งแขนง สารไซโตไคนินสามารถกระตุ้นให้ตาข้างของพืชเจริญออกมาเป็นกิ่งได้จึงมีประโยชน์ในการควบคุมทรงพุ่ม
3. ช่วยชะลอความแก่ของพืช เช่น BAP สามารถชะลอความแก่ของพืชได้หลายชนิด
4. ช่วยในการเคลื่อนย้ายอาหาร ไซโตไคนินมีคุณสมบัติช่วยในการเคลื่อนย้ายสารอาหารจากส่วนอื่นๆ ไปยังส่วนที่ได้รับไซโตไคนินได้ เช่น ใบอ่อน ซึ่งมีไซโตไคนินอยู่มากจะสามารถเคลื่อนย้ายสารอาหารจากใบแก่มาเก็บสะสมไว้ในใบอ่อนที่กำลังเจริญเติบโต
5. กระตุ้นการเกิดดอกและผล โดยไซโตไคนินสามารถชักนำการออกดอกของพืชวันยาว หรือพืชที่ต้องการอากาศเย็นได้ และยังช่วยกระตุ้นให้มีการสร้างผลพาร์ทิโนคาร์ปพรุทในพืชบางชนิดได้

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 (มะพร้าวที่ขึ้นทีก) และมะพร้าวแก่ (มะพร้าวแก่) ผลปรากฏว่า ปริมาณสารฮอร์โมนไซโตไคนินที่สกัดได้ในมะพร้าวอ่อนเฉลี่ย 0.53 ppm ซึ่งมีปริมาณมากที่สุด 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 แต่ภายหลังจากใส่น้ำมะพร้าวลงในสูตรนั้น เอ็มบริโอจึงเจริญ และในปี ค.ศ. 1950 F.C. Steward ได้ค้นพบเทคนิคในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้น้ำมะพร้าวผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์โดยใส่น้ำมะพร้าวซึ่งเป็นเอ็นโดสเปิร์มเหลวลงในอาหาร พบว่าสามารถเลี้ยงเอ็มบริโอได้ดี ต่อมาในปี ค.ศ. 1975 Skoog และ Miller พบว่า สารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ที่อยู่ในน้ำมะพร้าวเป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างแบบพิวรีน (Purine) (คำนูน, 2542) ที่ช่วยในการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของเซลล์เพาะเลี้ยงในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว น้ำมะพร้าวยังช่วยส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสได้อีกด้วย

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

สารอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งพลังงาน

สุชาติ (2545) ได้กล่าวถึงสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาล ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จำเป็นสำหรับการเจริญและการพัฒนาของพืช เนื่องจากเป็นปัจจัยสำคัญในการสังเคราะห์แสง น้ำตาลที่นิยมใช้ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส (Sucrose) จัดเป็น ไดแซ็กคาไรด์ (Disaccharide) เมื่อถูกความร้อนจากการนึ่งฆ่าเชื้อจะมีการแตกตัวให้กลูโคสและฟรุคโตส ซึ่งน้ำตาลซูโครส (Sucrose) สามารถหาได้ง่ายและราคาถูก โดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะนิยมการเติม กรดอะมิโน (Amino acid) โดยที่จำเป็นต่อกระบวนการ (Metabolism) ต่าง ๆ การเติมกรดอะมิโนร่วมกับ Adenine sulphate สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์หรือเพิ่มอัตราในการเกิดยอด แต่ถ้ามีการเติมมากเกินไปก็จะเกิดเป็นการยับยั้งการเจริญของเซลล์โดย

ที่ กรดอะมิโน (Amino acid) ส่วนใหญ่ที่นำมาเติมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ คือ ไกลซีน (Glycine) เพราะเป็นส่วนประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962) หรือ สูตรอาหาร MS

สารประกอบธรรมชาติที่ซับซ้อน (Natural complexes)

Arditti and Ernst (1993) ได้มีการศึกษาค้นคว้าสารประกอบอินทรีย์จากธรรมชาติที่ซับซ้อน (Natural complexes) หรือเป็นสารประกอบที่เกิดตามธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน กล้วยหอมบด มันฝรั่งบด และ Protein hydrolysates (เช่น Casein hydrolysate, Peptone และ Tryptone) เมื่อใส่ลงไปในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชนิยมใช้กับอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ และส่งผลที่แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ มักจะมีการเติมน้ำมะพร้าวเนื่องจากน้ำมะพร้าวอ่อนมีสารต่าง ๆ ได้แก่ ไซโตโคนิน คาร์โบไฮเดรตหลายชนิด กรดอินทรีย์ และน้ำตาล ส่วนในมันฝรั่งนั้นมีโพลีเอมีน (Polyamine) และ Biosynthetic enzyme กระจายอยู่ทั่วไปในส่วนต่าง ๆ ของมันฝรั่ง สารโพรเอมีนมีผลต่อการเจริญเติบโต การพัฒนาของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีผลต่อการตรึงคลอโรฟิลล์ (Nucleic acid) ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (Mitosis) ในเนื้อเยื่อมากขึ้น นอกจากนี้มันฝรั่งบดประกอบไปด้วย แป้ง น้ำตาล โปรตีน วิตามิน ในการใช้มันฝรั่งบดในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ มีรายงานว่ามีส่วนในการช่วยให้เมล็ดงอกได้ดีขึ้น และมีต้นอ่อนที่แข็งแรง

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ

การเก็บรักษาพันธุ์หรือการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชนั้นเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุ์พืช โดยปกติแล้วการเก็บรักษาพันธุ์พืชส่วนใหญ่จะเป็นการเก็บในรูปของเมล็ดพันธุ์พืช แต่เมล็ดพันธุ์บางชนิดมีอายุสั้นไม่สามารถเก็บรักษาได้นานแม้ว่าจะเก็บในอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ ในขณะเดียวกันนั้นพันธุกรรมพืชอาจเกิดการสูญหายและเสี่ยงต่อการกลายพันธุ์ได้ Razdan (1994) กล่าวว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถประยุกต์ใช้กับงานด้านการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช ซึ่งมีข้อดี คือ ใช้พื้นที่น้อย ปราศจากโรคและแมลง สามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากในเวลาอันสั้น การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อนั้นสามารถรักษาความมีชีวิตไว้ได้นานและสามารถใช้เก็บรักษาจากส่วนต่างๆได้ ไม่ว่าจะเป็นโปรโตพลาสต์ เซลล์แขวนลอย ละเอียดของเยื่อ อับเรณู แคลลัส เนื้อเยื่อ เอมบริโอ เมล็ด และส่วนอวัยวะต่าง ๆ ของพืช (รังสฤษดิ์, 2541)

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ สามารถแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบคือ

1. การชะลอการเจริญเติบโต (slow growth technique) การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้เป็นการเก็บรักษาในระยะเวลาสั้นหรือปานกลาง Ashmore (1997) รายงานว่าสามารถขยายช่วงเวลากการย้ายเลี้ยง (subculture) ออกไปได้ 1-4 ปีในพืชหลายชนิด วิธีการชะลอหรือการลดการเจริญเติบโตสามารถทำได้หลายวิธีเช่นโดยวิธีการลดอุณหภูมิ การลดสภาพแสงในการเพาะเลี้ยง การตัดแปลงสภาพบรรยากาศ การปรับแต่งอาหารเพาะเลี้ยงและโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพิ่มตัวยับยั้งการออสโมซิส (osmosis) สำหรับการเพิ่มตัวยับยั้งการออสโมซิสในอาหารเพาะเลี้ยงนั้น สามารถทำได้โดยการ

เติมน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง เช่น แมนนิทอล (mannitol) (รังสฤษดิ์, 2541) เนื่องจากแมนนิทอลที่มีความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้พืชเกิดความเครียดอันเนื่องมาจากการออสโมซิสจึงมีผลไปยังการเจริญเติบโต ดังรายงานของ Lopez *et al.* (1998) ทำการทดลองโดยใช้แมนนิทอล 4 เปอร์เซ็นต์ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสในการลดการเจริญเติบโตของมันฝรั่ง พบว่าสามารถขยายเวลาในการเปลี่ยนอาหารออกไปได้ 8 เดือนหรืออาจจะมากกว่า 12 เดือน ซึ่งโดยปกติมันฝรั่งต้องทำการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงทุก 4 ถึง 8 สัปดาห์ เนาวรัตน์ (2547) ศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมในการชะลอการเจริญเติบโตของเอื้องชะหลวง พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์สามารถชะลอการเจริญเติบโตทางความสูง ในรายงานของ Yong *et al.* (2000) ได้ทดลองความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Rehmannia glutinosa* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งในตระกูล Scrophulariaceae ทำการทดลองโดยใช้ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0, 15 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นการเจริญเติบโตจะลดลง อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการปรับแต่งสูตรอาหารก็คือ การใช้สารชะลอการเจริญเติบโต ดังรายงานของ Chung *et al.* (1999) ได้ทดสอบสารชะลอการเจริญเติบโตกับกล้วยไม้ *Bletilla striata* โดยใช้สารชะลอการเจริญเติบโต 4 ชนิด คือ Uniconazole, Paclobutrazol, Ancymidol และ *N*-dimethyl succinamic acid เติมนลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ 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 สารอัลจินต วัณ อกาโรส และเจลาติน นำมาเคลือบชิ้นส่วนของพืช แต่พบว่าสารอัลจินตนั้นสามารถทำให้เกิดเป็นแคปซูลและทำให้เอมบริออยด์ยังคงความมีชีวิตได้ดีกว่าชนิดอื่น นอกจากนี้เมล็ดเทียมยังสามารถใช้เป็นแหล่งของอาหารสะสม เช่น ธาตุอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และองค์ประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการงอก การเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นอ่อนได้อีกด้วย

(Redenbaugh *et al.*, 1987) อีกทั้งยังสามารถผลิตได้จำนวนมากโดยไม่จำกัดช่วงเวลาการผลิต (Ashmore, 1997) แต่ก็มีข้อควรระวังคือ เนื่องจากเมล็ดเทียมมีลักษณะเป็นรูปพวงทำให้สูญเสียธาตุอาหารที่ละลายน้ำไปก่อนที่รากและยอดจะงอกออกมา อีกทั้งยังแห้งได้ง่ายเมื่อได้รับอากาศจึงทำให้เก็บรักษาได้เพียงระยะเวลาสั้น ๆ ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการระเหยน้ำออกจากอัลจินेट เพื่อให้มีสภาพกับเหมือนเมล็ดจริง (Redenbaugh *et al.*, 1987) ส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารอัลจินेटที่ใช้ในการเคลือบนั้นปัจจุบันใช้สารโซเดียมอัลจินेट 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไฮเดรตความเข้มข้น 100 มิลลิโมล โดยใช้เป็นระยะเวลา 30 ถึง 40 นาที (Malemnganba *et al.*, 1996)

3. การเก็บรักษาแบบแช่แข็งหรือการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation) การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชโดยการเปลี่ยนถ่ายอาหารจำเป็นต้องทำอย่างสม่ำเสมอและต่อเนื่องซึ่งสิ้นเปลืองแรงงานและค่าใช้จ่าย การเก็บเนื้อเยื่อพืชไว้ในอุณหภูมิต่ำมาก ๆ ดังเช่นอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสของไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) (Withers, 1985) เป็นการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง ซึ่งหยุดกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ของพืช ไม่มีการแบ่งเซลล์และไม่มีการบวนการทางเมตาบอลิซึมต่างๆเกิดขึ้นคล้ายกับการพักตัวของเมล็ด ในทางทฤษฎีนั้นเนื้อเยื่อของพืชจะคงสภาพนั้นไปตลอดกาล และเมื่อนำออกสู่สภาวะปกติเซลล์ต่างๆจะยังมีชีวิต สามารถแบ่งเซลล์ มีการเจริญเติบโตและมีการพัฒนาเป็นต้นพืชได้ตามปกติ (Ashmore, 1997)

การเก็บรักษาด้วยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต (slow growth technique)

รังสฤษดิ์ (2541) กล่าวถึงวิธีการเก็บรักษาด้วยวิธีการนี้ว่าเป็นวิธีการเก็บรักษาส่วนของยอด (Shoot culture) และต้นที่ชักนำได้ (Plantlets) แต่ไม่เหมาะสมสำหรับแคลลัส 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

: ตรวจสอบเป็นระยะ (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

: ตรวจสอบเป็นระยะดังกล่าวข้างต้น

: ย้ายอาหารใหม่

3. การใช้สารยับยั้งการเจริญเติบโต (Growth inhibitor)

วิธีนี้เหมาะสำหรับการเก็บรักษายอด โดยมีขั้นตอนเช่นเดียวกันแต่แตกต่างที่มีการเติมสารยับยั้งการเจริญเติบโต (Growth inhibitor) ลงในอาหาร



ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี