บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของหญ้าหวาน

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Stevia rebaudiana* Bertoni.

วงศ์ : Compositae (Asteraceae)

ชื่ออื่น ๆ : Stevia, หญ้าหวาน

ก ข

ภาพที่ 2.1 ลำต้น ใบและดอกหญ้าหวาน

ก. ลำต้นและใบ

ข. ดอก

หญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Compositae เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี (perennial herb) สูง 30-90 เซนติเมตร ลำต้นแข็ง กิ่งก้านมีสีเขียว มีขนละเอียดสีขาว กิ่งก้านแตกเป็นพุ่ม ใบเป็นใบเดี่ยว (simple leaf) สีเขียวสดเรียงแบบตรงข้าม (opposite vernation) รูปใบหอกกลับ (lanceolate) หรือรูปใบหอกกลับแกมขอบขนาน (oblong lanceolate) กว้าง 1-1.5

เซนติเมตร ยาว 3-4 เซนติเมตร ขอบใบหยักฟันเลื่อย มีขนอ่อนนุ่ม (pappus) มีรสหวาน ดอกเป็นดอกช่อกระจุกแน่น (head) ที่ปลายยอดกลีบดอกสีขาวประกอบด้วยดอกย่อยจำนวนมาก กลีบดอกชั้นนอก (sepal) เป็นรูปกรวยยาวปลายกลีบแยกเป็นหยัก โคนกลีบดอกชั้นในเชื่อมติดกัน (sympetalous) ปลายแยกเป็นกลีบดอก 5 กลีบ เกสรตัวผู้ (stamen) เป็นสีขาวแทงขึ้นตรงกลางดอกเป็นเส้น ผลแห้งไม่แตก (indehiscent) มีเมล็ดเดี่ยว เมล็ดสีดำมีขนปุย ดอกช่อออกที่ปลายยอด กลีบดอกสีขาว ผลเป็นผลแห้งไม่แตก หญ้าหวานเป็นพืชพื้นเมืองแถบอเมริกาใต้ ที่ขึ้น และปลูกในตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศปารากวัยและบราซิล (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2535; ไมตรี สุทธจิตต์ อัมพวัน อภิสริยะกุล และรวิวรรณ พัวธนาโชคชัย, 2540; อัครสิทธิ์ บุญส่งแท้ กัลทิมา พิชัย และวัชรี หาญเมืองใจ, 2553)

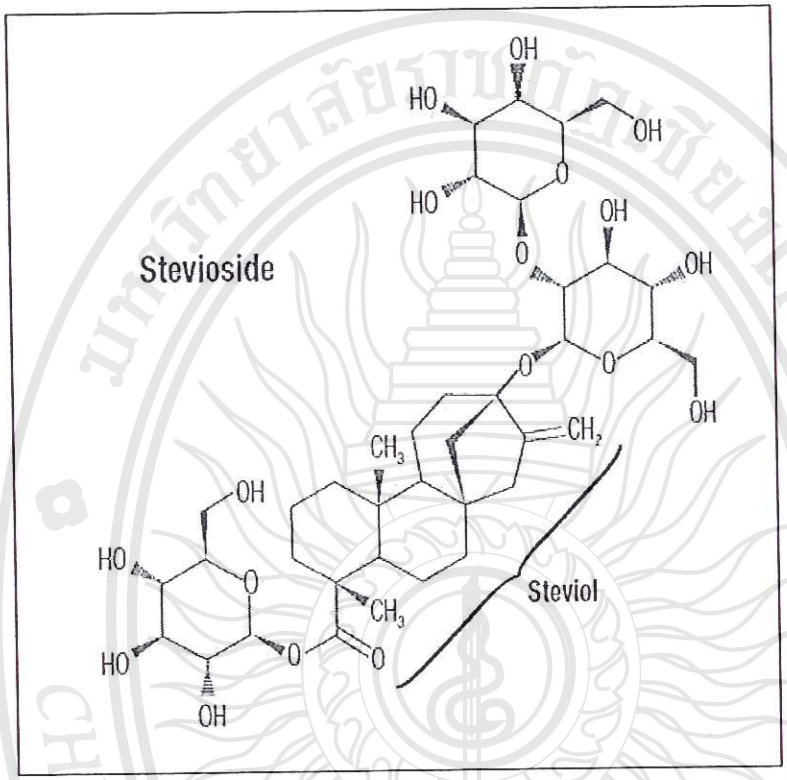
หญ้าหวานมีถิ่นกำเนิดในประเทศ บราซิล ปารากวัย ชื่อเดิมภาษาปรากวัยว่า Kar-he-e หรือภาษาสเปน Verbaducle แปลว่า สมุนไพรหวาน ชาวพื้นเมืองใช้เพิ่มรสอาหารเครื่องดื่มและชง เป็นชามะเตะมานานกว่า 400 ปี โดยพบพืชชนิดนี้ในภาคตะวันตกเฉียงใต้ของอเมริกาอาร์เจนตินา เม็กซิโก อเมริกาใต้ ปี พ.ศ. 2514 T.sumida จากศูนย์วิจัยการเกษตร Hokkaido แห่งกระทรวงเกษตรและป่าไม้ ประเทศญี่ปุ่น ได้นำเมล็ดพันธุ์หญ้าหวานจากประเทศบราซิลมาทำการทดลองปลูกในประเทศญี่ปุ่น

หญ้าหวานมีการเพาะปลูกเชิงการค้าที่ประเทศญี่ปุ่น จีน เกาหลีใต้ ส่วนในประเทศไทยมีการปลูกมากทางภาคเหนือที่จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน เป็นต้น พืชชนิดนี้มักพบในพื้นที่เหนือระดับน้ำทะเลประมาณ 500 เมตร อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส พื้นที่ดินแฉะ แต่น้ำไม่ขัง มีแสงแดด ดินที่ค่อนข้างเป็นกรด pH ประมาณ 6-6.5

สารประกอบทางเคมีที่สำคัญในหญ้าหวาน

ความเป็นมาของการศึกษาวิจัย คือ ปี พ.ศ.2451 Dr. Rebaudi และ Rasenack นักเคมีชาวปารากวัยได้วิจัยประสบผลสำเร็จในการแยกสารสำคัญในใบหญ้าหวาน และปี พ.ศ. 2464 The Union International De Chime L Copenhagen (1921) ได้ให้การยอมรับ และตั้งชื่อสารที่ค้นพบในใบหญ้าหวานนี้ว่า “สตีวิโอไซด์ (Stevioside)” ใน ปี พ.ศ.2474 Baidel และ Levieille สามารถแยกสารสตีวิโอไซด์จากใบหญ้าหวานได้ เป็นสารที่มีรสหวานจัด ได้ในปริมาณ 6-10 เปอร์เซ็นต์ ปี พ.ศ.2501 Nieman ได้ศึกษาเกี่ยวกับสารสตีวิโอไซด์ และนำเสนอว่าเป็นสารที่สามารถบริโภคได้ ปี พ.ศ. 2506 Masseting และคณะได้ศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมี พบว่า สตีวิโอไซด์ เป็นสารกลุ่มไดเทอร์พีนกลัยโคไซด์ (ภาพที่ 2.2, 2.3) ประกอบด้วย Stevial และ Glucose 3 โมเลกุล สตีวิโอไซด์

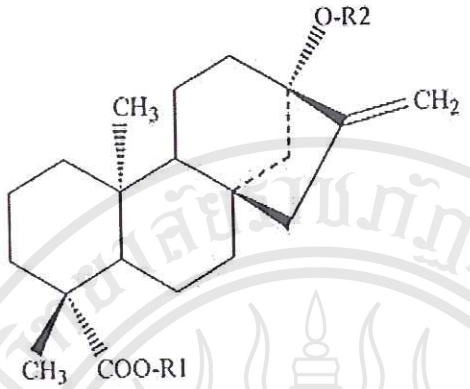
เป็นสารที่ไม่มีกลิ่น มีสีขาว รวมตัวกับน้ำได้ง่าย (อัครสิทธิ์ บุญส่งแท้ กัลทิมา พิชัย และวัชรี หาญเมืองใจ, 2553)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างสารสตีวิโอไซด์ที่พบในหญ้าหวาน

ที่มา : Geuns, 2003.

สารในกลุ่มไดเทอร์พีนกลัยโคไซด์ (ภาพที่ 2.3) มีหลายชนิดด้วยกัน โดยในใบแห้งของหญ้าหวานมีสตีวิโอไซด์เป็นสารให้ความหวานหลักที่พบในปริมาณมากที่สุด มีอยู่ประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์ w/w และมีสารให้ความหวานอื่นๆ ที่เป็นสารในกลุ่มนี้อีก เช่น รีบาวดิโอไซด์ เอ (Rebaudioside A) มีปริมาณอยู่ประมาณ 2-4 เปอร์เซ็นต์ w/w ซึ่งมีปริมาณรองจาก สตีวิโอไซด์, รีบาวดิโอไซด์ซี (Rebaudioside C) (1-2 เปอร์เซ็นต์ w/w) และดูลโคไซด์ เอ (Dulcoside A) (0.4-0.7 เปอร์เซ็นต์ w/w) เป็นต้น สารสตีวิโอไซด์เป็นสารในกลุ่มไดเทอร์พีนกลัยโคไซด์ ในโครงสร้างประกอบด้วย 2 ส่วน คือ Steviol aglycone และส่วนที่เป็นน้ำตาลกลูโคส 3 โมเลกุล มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น มีรสหวาน สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายต่าง ๆ เช่น น้ำ แอลกอฮอล์ และสารละลายกรด และเมื่อเปรียบเทียบความหวานกับซูโครส (น้ำตาลทราย) สารสตีวิโอไซด์มี



	Compound name	R1	R2
1	steviol	H	H
2	steviolbioside	H	β-Glc-β-Glc(2→1)
3	stevioside	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2→1)
4	rebaudioside A	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2→1) | β-Glc(3→1)
5	rebaudioside B	H	β-Glc-β-Glc(2→1) | β-Glc(3→1)
6	rebaudioside C (dulcoside B)	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2→1) | β-Glc(3→1)
7	rebaudioside D	β-Glc-β-Glc(2→1)	β-Glc-β-Glc(2→1) | β-Glc(3→1)
8	rebaudioside E	β-Glc-β-Glc(2→1)	β-Glc-β-Glc(2→1)
9	dulcoside A	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2→1)

ภาพที่ 2.3 โครงสร้างสารไดเทอร์พีนกลัยโคไซด์ที่พบในหญ้าหวาน

ที่มา : Geuns, 2003.

ความหวานมากกว่าถึง 300 เท่า ส่วนสารไดเทอร์พีนกลัยโคไซด์ตัวอื่น ๆ ก็ให้ความหวานเช่นกัน พบว่า สารไดเทอร์พีนกลัยโคไซด์ที่มีความเป็นขั้วน้อย (Steviolbioside) หรือมีหมู่ของน้ำตาล glucose เกาะที่โครงสร้างน้อยกว่า จะมีความหวานน้อย ส่วนสารไดเทอร์พีนกลัยโคไซด์ที่มีขั้วมากกว่า เช่น สาร รีบาวดิโอไซด์ เอ และสาร รีบาวดิโอไซด์ ดี จะให้ความหวานมาก ดังแสดงในตารางที่ 2.1 (สายดนีย์ หวังพัฒนพาณิชย์, 2554)

ตารางที่ 2.1 ค่าความหวานของสาร Steviol glycosides

Compound	Relative sweetness
Stevioside	300
Rebaudioside A	250-450
Rebaudioside B	300-350
Rebaudioside C	50-120
Rebaudioside D	250-450
Rebaudioside E	150-300
Dulcoside A	50-120
Steviolbioside	100-125

ที่มา : สายดนีย์ หวังพัฒนพาณิชย์, 2554.

สตีวิโอไซด์เป็นสารหวานที่ได้จากหญ้าหวาน พบในใบมีปริมาณสูงกว่าในลำต้นหรือราก ปริมาณที่พบในใบค่อนข้างแตกต่างกันในตัวอย่างจากต่างแหล่งปลูกในช่วง 4-13 เปอร์เซ็นต์ สตีวิโอไซด์มีความหวานถึง 300 เท่าของน้ำตาลซูโครส (Sucrose) ปัจจุบันมีการใช้สตีวิโอไซด์หรือสารสกัดหญ้าหวานเป็นสารหวานหรือใช้ทางยาในหลายประเทศ เช่น ปารากวัย บราซิล และญี่ปุ่น ในปารากวัย ใช้หญ้าหวานในการปรุงแต่งเครื่องดื่มตั้งแต่ศตวรรษที่ 16 ใช้สารสกัดใบด้วยน้ำเป็นยาคุมกำเนิดและรักษาโรคเบาหวาน มีบริษัทยาที่ผลิตขายทางการค้าในรูปยาชง ชาวปารากวัยใช้หญ้าหวานปรุงแต่งรสหวานในอาหารมานานกว่า 100 ปี ชาวอินเดียใช้หญ้าหวานเป็นยาคุมกำเนิด (อัครสิทธิ์ บุญส่งแท้ กัลทิมา พิชัย และวัชรี หาญเมืองใจ, 2553)

จุดเด่นของสารสตีวิโอไซด์ คือ เป็นสารที่ให้ความหวานสูง แต่ไม่ถูกย่อยให้พลังงาน มีความคงตัวและทนต่อความร้อนสูง และยังมีปริมาณมากในหญ้าหวาน จึงมีการพัฒนาวิธีการสกัดสารสตีวิโอไซด์จากหญ้าหวานให้มีความบริสุทธิ์ในระดับอุตสาหกรรม ปัจจุบันผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด มีการใช้สารสตีวิโอไซด์เป็นสารแต่งรสหวานสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก และใช้เป็นสารปรุงแต่งรสหวานในเครื่องดื่ม ขนม ลูกอม ยาสีฟัน และน้ำยาบ้วนปาก เป็นต้น สำหรับสารสตีวิโอไซด์ ได้รับอนุญาตให้ใช้เป็นสารปรุงแต่งในอาหาร (food additives) ในหลายประเทศ เช่น บราซิล เกาหลี และญี่ปุ่น ในประเทศสหรัฐอเมริกา อนุญาตให้ใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

(dietary supplement) (ฉัตรชัย เหมือนประสาท, 2553; สายดนีย์ หวังพัฒนพาณิชย์, 2554; Choi *et, al.,* 2002; Mizutani and Tanaka, 2002) ส่วนในประเทศไทย สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ในปี พ.ศ. 2545 ได้อนุญาตให้ใช้สารสตีวิโอไซด์ที่สกัดได้จากหญ้าหวานเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ และอาหารที่มีส่วนผสมของสารสตีวิโอไซด์ต้องใช้เป็นอาหารสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก (สายดนีย์ หวังพัฒนพาณิชย์, 2554) ยังมีรายงานว่า มีการใช้สารสกัดจากใบหญ้าหวานในการรักษาโรคความดันโลหิตสูง และโรคเบาหวาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศต่าง ๆ แถบทวีปอเมริกาใต้อีกด้วย (ฉัตรชัย เหมือนประสาท, 2553)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการขยายพันธุ์หญ้าหวาน

การขยายพันธุ์หญ้าหวานโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การขยายพันธุ์หญ้าหวานโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นนิยมเลี้ยงชิ้นส่วน ปลายยอด ข้อ และใบ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสหรือยอดจำนวนมากบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinin) เช่น kinetin, BA, zeatin และ TDZ เป็นต้น จนเกิดเป็นแคลลัสหรือยอดจำนวนมาก แล้วจึงนำแคลลัสไปพัฒนาเป็นต้นอ่อนต่อไป ส่วนยอดที่ชักนำ ได้นำมาตัดแบ่งเป็นยอดเดี่ยว ๆ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (auxin) เช่น NAA, IBA, 2,4-D, IAA เป็นต้น เพื่อชักนำราก

รายงานวิจัย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวาน โดยเลือกใช้อาหารสูตรต่าง ๆ และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ดังต่อไปนี้

เนื้อเยื่อส่วนใบ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวานนั้นพบรายงานจำนวนมากที่นิยมใช้เนื้อเยื่อส่วนใบเพาะเลี้ยง และสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสูตรอาหารร่วมกับชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และสภาพเพาะเลี้ยงที่มีแสง และไม่มีแสง เช่น ไตรรัตน์ ประทิศ (2555) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวานโดยนำใบ มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ชิ้นส่วนใบเมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากที่สุดคือ 0.3 ± 0.06 เซนติเมตร แคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็นกลุ่มยึดติดกันแน่น (compact) สีเขียวชุ่มน้ำ และ Mohammed *et, al.,* (2006) ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของหญ้าหวาน บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ชิ้นส่วน

ระหว่างข้อ สามารถเกิดแคลลัสได้เร็วกว่าชิ้นส่วนข้อ และใบ ชิ้นส่วนข้อ และใบ เกิดแคลลัสมากที่สุดบนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบบนสูตรอาหารที่แตกต่างกันพบว่าใบที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 90 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงแคลลัสบนอาหาร MS ที่ใส่วิตามินตามสูตร Nitsh ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัส สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้โดยผ่าน 2 ขั้นตอนคือ ขั้นแรกเป็นการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นยอดบนอาหาร MS ที่มี BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อจากนั้น ย้ายยอดไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มี NAA และ BAP อย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดให้เกิดราก และเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (พัชรินทร์ ศรีทองคำ, 2537) แต่อาหารสูตร LS ที่มี BA อย่างเดียว 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (Ferreira and Hander, 1988) นอกจากนี้การใช้อาหาร MS ที่มี NAA ร่วมกับ BAP อย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแสงตลอดเวลานาน 2 เดือน พบว่า เกิดขนาดแคลลัสที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ (friable callus) (Swanson, Mahady and Beecher, 1992)

มีรายงานจำนวนมากที่นิยมใช้เนื้อเยื่อหญ้าหวานส่วนใบ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และสามารถชักนำให้เกิดยอด และราก โดยมีค่าเฉลี่ยการเกิดยอด และราก แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสูตรอาหารร่วมกับชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และสภาพการเพาะเลี้ยง ที่มีแสง และไม่มีแสง ได้แก่งานวิจัยของ Ferreira and Handro ในปี 1988 รายงานการเลี้ยงใบอ่อนของหญ้าหวานบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมีแสง หรือบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วทำการย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้แล้วจึงทำการแยกยอดเดี่ยว ๆ ไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำรากต่อไป เช่นเดียวกับ Pourvi, Sumita and Kotharia (2008) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2.2 ไมโครโมล ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 2.8 ไมโครโมล และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $CuSO_4 5H_2O$ ในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเป็น 0.5 ไมโครโมล (5 เท่า ของอาหาร MS) สามารถเพิ่มจำนวนของยอดเฉลี่ยต่อชิ้นเนื้อเยื่อได้อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Latha and Usha (2003) ได้ใช้อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 ไมโครโมล ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 5.71 ไมโครโมล สามารถชักนำให้เกิดรากได้ เมื่อย้ายชิ้นส่วนยอดไปเลี้ยงบนอาหารที่เติมออกซิน เมื่อทำการย้ายออกปลูกในขุยมะพร้าว พบว่า มีอัตราการรอดชีวิต 70 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ Anbazhagan *et, al.,* (2010) พบว่า สูตรผสมที่ชักนำให้เกิดยอดได้ผลดีที่สุด คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ การเจริญของรากจะได้ผลดี เมื่ออยู่ในอาหารสูตร Nitsch (N_6) ความเข้มข้นครึ่งเท่า ที่เติม

IAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการย้ายต้นอ่อนหญ้าหวานลงปลูกในดิน สามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ ได้ประมาณ 82 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ มัทนียา วังประภา (2548) พบว่า เมื่อนำใบอ่อนหญ้าหวานเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นอย่างละ 0, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในสภาพ มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และสภาพมืดตลอดเวลา พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 4.5 ยอด ต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ใบอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณแคลลัสสูงสุด เช่นเดียวกับ อัครสิทธิ์ บุญส่งแท้ กัลทิมา พิชัย และวัชรี หาญเมืองใจ (2553) ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลของ NAA และ BA ต่อการเจริญของแคลลัส โดยนำใบหญ้าหวานมาตัดเนื้อเยื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ NAA ร่วมกับ BA ที่อัตราส่วนความเข้มข้นต่างกัน คือ 0:0, 0:1, 1:0, 1:1, 1:2, 2:1 และ 2:2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ รวมทั้งหมด 7 ชุดการทดลอง โดยย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ ตั้งแต่เริ่มเกิดแคลลัส เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทุกชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเจริญของแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด คือ มีความกว้าง ความยาว และน้ำหนักของแคลลัสสูงสุด เท่ากับ 1.0 ± 0.15, 1.3 ± 0.2 เซนติเมตร และ 0.027±0.008 กรัม ตามลำดับ

เนื้อเยื่อส่วนข้อ การใช้เนื้อเยื่อส่วนข้อในการเพาะเลี้ยง พบว่า สามารถชักนำให้เกิด multiple shoot และชักนำให้เกิดรากได้ เช่น กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์ (2556) ได้ทำการขยายพันธุ์หญ้าหวาน โดยการนำชิ้นส่วนข้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้าหวานมาชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ kinetin ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1,0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากที่สุด 9.31±4.17 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นจึงนำชิ้นส่วนข้อที่ได้จากชุดการทดลองดังกล่าวมาชักนำให้เกิดราก โดยเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ IAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่า NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากจำนวนมากที่สุด คือ 11.18±1.34 รากต่อยอด จากนั้นจึงนำต้นอ่อนที่ได้จากการทดลองทั้งหมดมาทำการย้ายออกปลูกในโรงเรือนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนที่ได้จากการชักนำรากโดยไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และชุดที่เติม NAA

0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ แต่ต้นอ่อนที่ได้จากการชักนำรากโดยไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด ภายหลังการย้ายออกปลูก เช่นเดียวกับ ไตรรัตน์ ประทิศ (2555) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวานโดยนำชิ้นส่วนข้อ มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนของข้อสามารถเจริญไปเป็นยอดได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้จำนวนยอดสูงสุด 3.8 ± 0.39 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และความสูงของต้นหญ้าหวานที่สูงที่สุดพบในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 3.26 ± 0.46 เซนติเมตร และ Mohammed *et, al.,* (2006) เลี้ยงชิ้นส่วนข้อ และชิ้นส่วนระหว่างข้อของหญ้าหวาน บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ชิ้นส่วนระหว่างข้อ สามารถเกิดแคลลัสได้เร็วกว่าชิ้นส่วนข้อและใบ ชิ้นส่วนข้อและใบ เกิดแคลลัสมากที่สุดบนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับ Pourvi, Sumita and Kotharia (2008) พบว่าชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ที่ระดับความเข้มข้น 2.2 ไมโครโมล ร่วมกับ IAA ระดับความเข้มข้น 2.8 ไมโครโมล และเพิ่มความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ ในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเป็น 0.5 ไมโครโมล (5 เท่าของอาหาร MS) สามารถเพิ่มจำนวนของยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อได้อย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยของ Latha and Usha (2003) รายงานว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 ไมโครโมล ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 5.71 ไมโครโมล สามารถชักนำให้เกิดรากได้ เมื่อย้ายชิ้นส่วนยอดไปเลี้ยงบนอาหารที่เติมออกซิน ทำการย้ายออกปลูกในขุยมะพร้าว พบว่า มีอัตราการรอดชีวิต 70 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนข้อหญ้าหวาน ที่ชักนำให้เกิดยอดได้ผลดีที่สุด คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ การเจริญของรากจะได้ผลดีเมื่ออยู่ในอาหารสูตร Nitsch (N_6) ความเข้มข้นครึ่งเท่า ที่เติม IAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและต้นอ่อนหญ้าหวานมีอัตราการอยู่รอดในธรรมชาติได้ประมาณ 82 เปอร์เซ็นต์ Anbazhagan *et, al.,* (2008) ใช้ชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวาน ทำการเพาะเลี้ยงแล้วเกิดยอด ตามด้วยการชักนำรากจากยอดอีกทีหนึ่ง พบว่า การชักนำยอดได้ดี คือ อาหารสูตร MS ความเข้มข้น 1 หรือ ครึ่งเท่า ที่เติม BAP หรือ kinetin ความเข้มข้นอย่างละ 0, 0.5, 1.0, และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร การชักนำรากบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้น 1 หรือ ครึ่งเท่า ที่เติม NAA หรือ IBA ความเข้มข้นอย่างละ 0, 0.5, 1.0, และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนข้อ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้น้อยกว่าชิ้นส่วนปลายยอด อาหาร สูตร MS ความเข้มข้น 1 และ ครึ่งเท่า มีผลต่อการชักนำยอดเท่า ๆ กัน พบว่า BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด สำหรับการชักนำให้เกิดราก พบว่า อาหาร สูตร MS ความเข้มข้น 1 เท่า สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากกว่าความเข้มข้น ครึ่งเท่า

อาหารสูตร MS ความเข้มข้น 1 เท่าที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด ส่วนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหาร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า BA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ตาข้าง เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 1.67 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด 10 ใบต่อยอด ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 3.75 เซนติเมตรต่อยอด และสามารถชักนำให้ปลายยอดมีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด 18 ใบต่อยอด ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 7.87 เซนติเมตรต่อยอด และพบว่า BA ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 3.33 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ (มยุรา เทพสิงห์, 2547)

เนื้อเยื่อส่วนยอด นอกจากเนื้อเยื่อส่วนใบและข้อแล้ว เนื้อเยื่อส่วนยอดก็มีรายงานว่าสามารถชักนำให้เกิด multiple shoot และรากได้เช่นกัน โดยการใช้ปริมาณและชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต และสูตรอาหารที่แตกต่างกัน เช่น การเลี้ยงปลายยอดของหญ้าหวานบนอาหาร Gamborg B5 ที่เติม BAP ร่วมกับ NAA ในสภาพมีแสง สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้อย่างรวดเร็ว และสามารถชักนำให้เกิดรากได้ในเวลา 2 หรือ 3 สัปดาห์ โดยการเลี้ยงบนอาหาร Gamborg B5 ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ (Miyagawa *et, al.,* 1986) การใช้ชิ้นส่วนปลายยอด สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 ไมโครโมล ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 5.71 ไมโครโมล และสามารถชักนำให้เกิดรากได้ เมื่อย้ายชิ้นส่วนยอดไปเลี้ยงบนอาหารที่เติมออกซิน ทำการย้ายออกปลูกในขุยมะพร้าว พบว่า มีอัตราการรอดชีวิต 70 เปอร์เซ็นต์ (Latha and Usha, 2003) การเพาะเลี้ยงใช้ปลายยอดของหญ้าหวานเป็นชิ้นเนื้อเยื่อที่ชักนำให้เกิดยอดได้ผลดีที่สุด คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ การเจริญของรากจะได้ผลดีเมื่ออยู่ในอาหารสูตร Nitsch (N_6) ความเข้มข้นครึ่งเท่าที่เติม IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อย้ายต้นอ่อนลงปลูกในดิน มีอัตราการอยู่รอดในธรรมชาติ ประมาณ 82 เปอร์เซ็นต์ (Anbazhagan *et, al.,* 2010) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Hossain *et, al.,* (2008) สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากของหญ้าหวาน แล้วตามด้วยการชักนำรากจากยอด โดยอาหารที่ใช้ในการชักนำยอด คือ อาหาร MS ที่มีความเข้มข้น 1 หรือ ครึ่งเท่า ที่เติม BAP หรือ kinetin ความเข้มข้นอย่างละ 0, 0.5, 1.0, และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำรากบนอาหาร MS ความเข้มข้น 1 หรือครึ่งเท่า ที่เติม NAA หรือ IBA ความเข้มข้นอย่างละ 0, 0.5, 1.0, และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนปลายยอดสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากกว่าชิ้นส่วนข้อ อาหาร MS ความเข้มข้น 1 และครึ่งเท่า มีผลต่อการชักนำยอดเท่า ๆ กัน และ BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำ

ให้เกิดยอดได้มากที่สุด สำหรับการชักนำให้เกิดราก พบว่า อาหาร MS ความเข้มข้น 1 เท่า สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากกว่าความเข้มข้นครึ่งเท่า อาหาร MS ความเข้มข้น 1 เท่าที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด และของ มยุรา เทพสิงห์ (2547) พบว่าปลายยอดของหญ้าหวานบนอาหาร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า BA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ตาข้างเกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 1.67 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด 10 ใบต่อยอด ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 3.75 เซนติเมตรต่อยอด สามารถชักนำให้ปลายยอดมีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด 18 ใบต่อยอด ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 7.87 เซนติเมตรต่อยอด BA ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 3.33 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Dheeranupattana, Wangprapa and Jatisatienr, (2007) เลี้ยงยอดในสภาพปลอดเชื้อของหญ้าหวานบนอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ระดับความเข้มข้นอย่างละ 0, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมีแสงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 4.5 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ส่วนอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้เฉลี่ย 11 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ส่วนงานวิจัยของ Morini *et, al.,* (2003) เลี้ยงยอดของหญ้าหวานบนอาหาร MS ที่เติม kinetin หรือ BA ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน สามารถชักนำให้เกิดรากบนอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มัทนียา วังประภา (2548) พบว่า เมื่อนำยอดหญ้าหวานเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นอย่างละ 0, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงยอดในสภาพมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าส่วนยอดที่เลี้ยงในอาหารที่มี NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ยอดที่มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 11 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ

การขยายพันธุ์หญ้าหวานโดยใช้เมล็ด

โดยทั่วไป การขยายพันธุ์หญ้าหวาน ทำได้โดยการปักชำกิ่ง และปัญหาสำคัญที่เกี่ยวข้องกับพืชชนิดนี้ คือ หญ้าหวานเป็น heterozygous และโดยธรรมชาติ ไม่มีความสมบูรณ์ภายในตนเอง จึงขาดการปฏิสนธิ (Miyazaki and Wanteable, 1974) เมล็ดหญ้าหวานส่วนใหญ่จะอ่อนแอ และการขยายพันธุ์จะทำได้ในต้นที่เป็น homozygous ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับความหวานและองค์ประกอบภายในเมื่อเจริญเติบโตเป็นต้นหญ้าหวานในรุ่นต่อไป (Miyagawa *et, al.,* 1986) การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดทำได้ยากมาก เนื่องจากความไม่สมบูรณ์ของเมล็ด ที่ส่งผลให้เมล็ดเป็นหมันเป็นส่วนมาก (Jagatheeswari and Ranganathan, 2012) ร้อยละการงอกของเมล็ดที่ไม่สมบูรณ์เป็นปัจจัยสำคัญที่จำกัดการเพาะปลูกพืชชนิดนี้ การขยายพันธุ์ยังถูกจำกัดเนื่องจากมีจำนวนน้อย

การขยายพันธุ์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีบทบาทสำคัญในการขยายพันธุ์ และผลผลิตจากลักษณะทางพันธุกรรมของหญ้าหวาน การศึกษาในปัจจุบัน จึงมุ่งค้นหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงหญ้าหวาน (Tamura *et, al.,* 1984; Ferreira and Handro, 1988; Patil *et, al.,* 1996; Sivaram and Mukundan, 2003; Mitra and Pal, 2007; Pourvi *et, al.,* 2009)

เมล็ดของหญ้าหวานมีสองประเภท คือ เมล็ดสีดำและสีน้ำตาล เมล็ดสีดำมีน้ำหนักมากกว่าเมล็ดสีน้ำตาล และเปอร์เซ็นต์การงอกจากเมล็ดสีดำ สูงกว่าเมล็ดสีน้ำตาล หากเลือกเมล็ดสีดำจะทำให้การงอกของเมล็ดอยู่ในอัตรา 60-65 เปอร์เซ็นต์ (Goettemoeller and Ching, 1999)

จากการศึกษางานวิจัยดังกล่าวข้างต้น สรุปได้ว่าการขยายพันธุ์หญ้าหวานโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นสามารถใช้ชิ้นส่วน ปลายยอด ข้อ และใบ และชักนำให้เกิดแคลลัสยอดจำนวนมาก และชักนำรากได้ ทำให้เกิดการเจริญเติบโตหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงตามความต้องการบนอาหารสังเคราะห์ ภายใต้สภาพแวดล้อม เช่นอุณหภูมิ ความชื้น แสงสว่าง ที่สามารถควบคุมได้ในสภาพที่ปลอดเชื้อ โดยใช้สมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเป็นตัวกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของเนื้อเยื่อที่นำมาทำการเพาะเลี้ยง ส่วนการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดทำได้ยากและควรเลือกเมล็ดที่มีสีดำจะมีอัตราการงอกสูงกว่าเมล็ดสีน้ำตาล

การตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีเทตระโซเลียม (Tetrazolium test : TZ test)

Tetrazoliumtest (TZ test) เป็นวิธีการทางชีวเคมี ที่สามารถประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ภายในเวลาอันรวดเร็ว (24-36 ชั่วโมงแล้วแต่ชนิดพืช) จึงนิยมนำมาใช้ประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ในภาวะที่ต้องการความเร่งด่วน ไม่สามารถรอผลการทดสอบความงอกได้ เช่น กรณีการตัดสินใจเพื่อซื้อเมล็ดพันธุ์จากเกษตรกรในภาวะรีบเร่ง กรณีต้องการบอกคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ชั่วคราว เพื่อการจำหน่ายเมล็ดพันธุ์ในระหว่างรอผลการทดสอบความงอก เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกายอมให้ใช้ผลความมีชีวิตจาก TZ test ติดป้ายถุงเมล็ดพันธุ์หญ้าไปจนกว่าจะมีผลการทดสอบความงอกแบบมาตรฐานออกมาซึ่งใช้เวลา 3-4 สัปดาห์ TZ test ยังถูกใช้ประโยชน์ในการประเมินความมีชีวิตของเมล็ดที่ไม่ยอมงอกในระหว่างการเพาะเมล็ด เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นเมล็ดที่ยังมีชีวิตอยู่แต่กำลังพักตัวหรือเป็นเมล็ดที่ตายแล้ว นอกจากนี้ การทำ TZ test ยังช่วยให้ข้อมูลถึงความแข็งแรงของเมล็ด และบางกรณียังสามารถใช้บอกสาเหตุของความผิดปกติของต้นกล้า (abnormal seedling)ได้อีกด้วย กฎการทดสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ของ International Rules for Seed Testing (ISTA, 2007) ได้ระบุถึงวัตถุประสงค์ของการนำ TZ test มาประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ไว้ ดังต่อไปนี้

1. เมื่อต้องการประเมินหาความมีชีวิตของตัวอย่างเมล็ดพันธุ์หนึ่ง ๆ อย่างรวดเร็วหรือประเมินความมีชีวิตของตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ที่ยังมีการพักตัวอยู่

2. เพื่อพิสูจน์ความมีชีวิตของเมล็ดที่ไม่งอกในการทดสอบความงอกแบบมาตรฐานและสงสัยว่าอาจเป็นเมล็ดพักตัว ที่มีปริมาณตั้งแต่ 5 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป

ประวัติและความเป็นมาของ TZ Test

ความพยายามหาวิธีประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์อย่างรวดเร็วโดยวิธีการทางเคมีนั้นมีมานานแล้ว เริ่มตั้งแต่ ปี ค.ศ.1911 มีการพยายามทดลองแช่เมล็ดในสารเคมีโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เพื่อดูว่าสามารถบอกความมีชีวิตของเมล็ดได้หรือไม่โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีสารละลายที่เกิดจากอนุมูลสารที่แพร่ออกจากเมล็ดที่เริ่มเสื่อมคุณภาพ ต่อมาในปี ค.ศ.1918 มีการทดลองใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ ชนิดหนึ่งที่มีอยู่ในเมล็ด คือ Peroxidase เป็นตัวชี้วัดความมีชีวิตของเมล็ด จนถึงปี ค.ศ.1935 มีชาวญี่ปุ่นคนหนึ่งชื่อ K. Hasegawa เป็นคนแรกที่ดัดแปลงนำเกลือโลหะบางอย่างที่เคยใช้สำหรับย้อมสีดูความมีชีวิตของแบคทีเรียมาใช้กับการประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ นับเป็นการเริ่มต้นแนวทางในการประเมินความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์จากการย้อมสีเมล็ดขึ้นมาเป็นครั้งแรก ทำให้เกิดการพัฒนาวิธีการย้อมสีเมล็ดเพื่อดูความมีชีวิตนี้มาเป็นลำดับ ปี ค.ศ.1942 Prof. Dr. George Lakon แห่ง Institute of Seed Science of Agricultural Academy, Hohenheim, Germany ได้เป็นคนแรกที่นำเอาลักษณะของการติดสีของอวัยวะภายในเมล็ดมาอธิบายและแยกความมีชีวิตของเมล็ด พร้อมต่อมาได้นำสาร Tetrazolium ที่มีความปลอดภัยมากขึ้นมาใช้แทนเกลือโลหะแบบเดิม

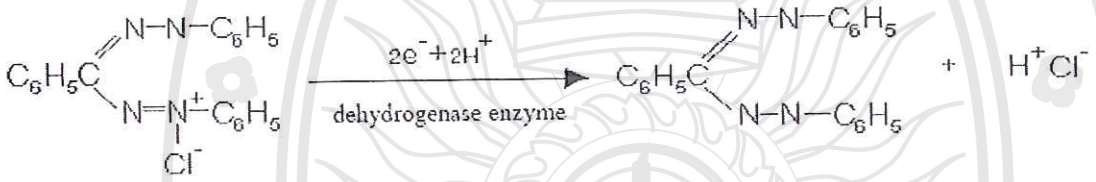
ใน ปี ค.ศ.1950 ISTA ได้ก่อตั้ง Tetrazolium committee ขึ้นเพื่อดูแลกำกับวิธีการทดสอบ TZ test ให้มีมาตรฐาน จนถึงปี ค.ศ. 1966 วิธีการนี้ได้จึงถูกบรรจุไว้บทที่ 6 (Biochemical Test for Viability) ของ ISTA Rules for Seed Testing ต่อมาใน ปี ค.ศ. 1985 ISTA ได้พิมพ์คู่มือการทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ด้วย Tetrazolium test ขึ้นมาครั้งแรก และปรับปรุงเพิ่มเติมชนิดพืชมาเป็นระยะๆ จนถึงปี 2003 ISTA ได้ปรับปรุงคู่มือ TZ test ให้อยู่ในรูปของ Working Sheet for Tetrazolium Testing ที่บอกวิธีการทดสอบ TZ test แต่ละพืชพร้อมภาพประกอบอยู่ในหน้าเดียวกันเพิ่มความสะดวกในการใช้งานเป็นอย่างมาก (ธรรมศักดิ์ ทองเกตุ, 2550)

หลักการตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีเทตระโซเลียม

วิธี Tetrazolium Test เป็นการตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์โดยตรวจหาการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ซึ่งมีอยู่ในเซลล์เมล็ดที่มีชีวิต ซึ่งเป็นดัชนีในการวัดการเกิดกระบวนการหายใจ (respiration) และความมีชีวิต (viability) ของเมล็ดพันธุ์ โดยเอนไซม์ dehydrogenase จะทำปฏิกิริยากับ substrates และปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออน (H^+)

ออกมา ซึ่งไฮโดรเจนไอออนจะไปทำปฏิกิริยากับสาร 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ซึ่งเป็นสารไม่มีสี ให้กลายเป็นสาร 2,3,5- triphenyl tetrazolium formazan ซึ่งมีสีแดง (ภาพที่ 2.4) ทั้งนี้การแปรผลความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์สามารถพิจารณาได้จากการติดสีของส่วนประกอบต่าง ๆ ของเมล็ด และความเข้มของการติดสี (Copeland and McDonald, 1995)

ตามปกติเนื้อเยื่อเมล็ดที่มีชีวิตจะมีแรงต้านการแพร่ของสารละลายเทตระโซเลียม แต่ในเนื้อเยื่อที่เสื่อมคุณภาพจะเกิดกระบวนการหายใจเร็วขึ้นกว่าปกติ จึงเกิดอัตราการปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออนที่เร็วขึ้น และเนื้อเยื่อจะสูญเสียแรงต้านการแพร่ของสารละลาย เทตระโซเลียม สารละลายจึงเปลี่ยนรูปเป็นฟอมาซาน (Formazan) อย่างรวดเร็ว ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าวติดสีแดงชั้น (Sarah and Brenda, อ้างถึงใน วสุ อมฤตสุทธิ์, 2547)



2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride
(ไม่มีสีและมีคุณสมบัติแพร่กระจาย)

2,3,5-triphenyl tetrazolium formazan
(มีสีแดงและมีคุณสมบัติไม่แพร่กระจาย)

ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาทางเคมีของการเปลี่ยนแปลงของสารละลาย 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride เป็น 2,3,5-triphenyl tetrazolium formazan โดย dehydrogenase enzyme

ที่มา : วสุ อมฤตสุทธิ์, 2547.

ดังนั้น เมื่อนำเมล็ดพันธุ์มาแช่ในสารละลายเทตระโซเลียมหรือ TTC เป็นเวลานานพอจนสารซึมเข้าสู่ภายในเมล็ดไปยังอวัยวะต่าง ๆ ได้ทั่วถึง และหากเนื้อเยื่อหรือเซลล์นั้นยังมีชีวิตอยู่ มีการหายใจและปลดปล่อย H^+ ออกมาก็จะเกิดการทำปฏิกิริยากับสารเทตระโซเลียมให้เปลี่ยนเป็นสารฟอมาซานที่มีสีแดง ไม่ละลายน้ำ และไม่เคลื่อนที่ เนื้อเยื่อของอวัยวะที่ยังมีชีวิตอยู่นั้นจึงปรากฏเป็นสีแดง ส่วนบริเวณที่ไม่ติดสี แสดงถึงเซลล์ของเนื้อเยื่อนั้นไม่มีการหายใจหรือไม่มีชีวิตแล้ว จึงสามารถแยกเมล็ดที่มีชีวิต และไม่มีชีวิตออกจากกันได้ โดยพิจารณาว่าหากอวัยวะที่มีความสำคัญต่อการงอกของเมล็ดติดสีทั้งหมด หรือติดสีคลอบคลุมพื้นที่สำคัญเพียงพอ เมล็ดนั้นน่าจะงอกได้ และจัดเป็นเมล็ดที่ยังมีชีวิตอยู่ (viable seed) แต่ถ้าอวัยวะสำคัญนั้นไม่ติดสีเลย หรือติดสีเพียง

บางส่วน แต่พื้นที่ส่วนสำคัญที่จะพัฒนาเป็นต้นอ่อนนั้นไม่ติดสีเพราะเซลล์ตายแล้วนั้นและเมล็ดนั้นจะถูกจัดเป็นเมล็ดที่ไม่มีชีวิต (non-viable seed) (ธรรมศักดิ์ ทองเกตุ, 2550)

วิเคราะห์ความมีชีวิตของเมล็ด

การตัดสินว่าเมล็ดใดเป็นเมล็ดที่มีชีวิตหรือเมล็ดตาย (viable seed or non-viable seed) โดยการพิจารณาทีละเมล็ด ดูจากลักษณะของการติดสีแดงที่อวัยวะสำคัญภายในเมล็ดที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาต้นอ่อนที่สมบูรณ์ ซึ่งจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของพืช

เมล็ดมีชีวิต (viable seed) คือ เมล็ดที่สามารถงอกเป็นต้นอ่อนที่ปกติ ดังนั้น เมล็ดจึงต้องมีการติดสีอย่างสมบูรณ์ หรืออวัยวะส่วนที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของต้นอ่อนที่ปกติจะต้องติดสี ซึ่งแสดงถึงความมีชีวิตของส่วนนั้น ลักษณะของการติดสีควรมีสีแดงเรื่อ หรือชมพูที่สดใส แวววาวซึ่งแสดงว่าเนื้อเยื่อมีชีวิต การแพร่ของสีมักมีสีเข้มบริเวณขอบนอก และค่อยๆ จางลงสู่ด้านใน แสดงถึงการแพร่ของน้ำยาที่ช้าลง เนื่องจากเนื้อเยื่อด้านในมีความแข็งแรง จึงต้านการแพร่ของสาร

เมล็ดไม่มีชีวิต (non-viable seed) คือ เมล็ดที่ไม่สามารถงอกเป็นต้นอ่อนที่ปกติได้ ไม่มีการติดสีเลย หรืออวัยวะที่สำคัญ และเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่ปกติ ไม่มีการติดสี รอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อที่มีชีวิตกับไม่มีชีวิตจะเป็นขอบเขตระหว่างสีขาว และสีแดงที่ชัดเจน และยังรวมทั้งที่ติดสีเข้มผิดปกติจนเป็นสีม่วง ลักษณะการติดสีไม่สดใส ไม่แวววาว เนื้อเยื่อมีลักษณะนุ่ม และ (ธรรมศักดิ์ ทองเกตุ, 2550)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ทำกันมานานแล้ว เริ่มตั้งแต่ ปี ค.ศ. 1902 Gottlieb Harberlandt นักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมัน เป็นคนแรกที่พยายามแยกเซลล์จากใบพืชมาเลี้ยง โดยหวังว่าเซลล์เพียงเซลล์เดียวจะสามารถแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตให้เป็นพืชต้นใหม่ได้ แต่เขาทำไม่สำเร็จ เนื่องจากใช้เซลล์จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งเพาะเลี้ยงยาก และในสมัยนั้นยังไม่มีการค้นพบฮอร์โมนพืช (plant hormones) และสารควบคุมการเจริญเติบโต (Plant growth regulators) แต่อย่างไรก็ตามเขาได้ทำนายไว้ว่า ในอนาคตน่าจะสามารถเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเติบโต และเปลี่ยนแปลงไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ทั้งต้น เรียกความสามารถนี้ว่า “Totipotency” นับตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีการศึกษาและพัฒนาไปอย่างกว้างขวาง จนกระทั่งปัจจุบันสามารถเลี้ยงเซลล์เดี่ยวและโปรโตรพลาสต์ หรือเซลล์ไร้ผนังได้สำเร็จ รวมทั้งการใช้ความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การตัดต่อยีน การถ่ายยีน เข้ามาร่วมด้วย ทำให้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทสำคัญต่อ

วิทยาการแขนงต่างๆ เช่น พันธุศาสตร์ การปรับปรุงพันธุ์พืช โรคพืช พฤกษศาสตร์ เภสัชศาสตร์ ชีวเคมี และอุตสาหกรรม

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึง การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น อวัยวะ (organ) เนื้อเยื่อ (tissue) เซลล์ (cell) หรือเซลล์ไร้ผนัง ที่เรียกว่า โปรโตพลาสต์ (protoplast) มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล ไวตามิน กรดอะมิโน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ (aseptic condition) ภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แสง และความชื้น ส่วนต่างๆ ของพืชเหล่านี้สามารถเจริญไปเป็นต้นใหม่ได้ โดยมีการเจริญ 3 แบบ ดังนี้

1. เจริญเป็นต้นที่มีราก หรือบางครั้งก็มีดอก เรียก organogenesis

2. เจริญเป็นแคลลัส (callus) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ส่วนใหญ่เป็น parenchyma cell ที่ยังไม่เปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นหรือราก แต่ต่อไปก็สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นได้

3. เจริญไปเป็น embryoid ซึ่งมีลักษณะเหมือน embryo ที่ได้จาก zygote ซึ่งเรียกว่า zygotic embryo แต่ embryoid ได้มาจาก somatic cell ซึ่งอาจเรียกว่า somatic embryo ซึ่งจะเจริญเติบโตได้ต้นที่มีรากต่อไป (ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์ และกอบเกียรติ แสงนิล, 2552)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อขยายพันธุ์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเทคนิคที่นำเอาชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุอาหารที่พืชต้องการในสภาพปลอดเชื้อ และภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อม Murashige (1974) ได้เสนอขั้นตอนของการขยายพันธุ์พืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ 3 ขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมชิ้นส่วนพืชให้สะอาด โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับเนื้อเยื่อผิวเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ให้มีชีวิตรอดและมีการเจริญเติบโตต่อไป

2. การเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อ โดยนำเนื้อเยื่อพืชที่มีการเจริญเติบโต และสะอาดปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ มาทำการขยายปริมาณ และกระตุ้นให้มีการเจริญเติบโต

3. การเตรียมต้นพืชใหม่ที่สมบูรณ์ให้แข็งแรง และย้ายปลูกลงในวัสดุปลูกในสภาวะแวดล้อมภายนอก

ปัจจุบันมีการสร้างห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการค้าอย่างแพร่หลายในประเทศแถบทวีปยุโรป สหรัฐอเมริกา แคนาดา และญี่ปุ่น ความก้าวหน้าต่อไปในอนาคตยิ่งมีมากขึ้นในแง่การหาวิธีที่เหมาะสมทางด้านอุตสาหกรรม การลดต้นทุนการผลิต การผลิตเป็นการค้า ซึ่งเมื่อใดที่

วิทยาการด้านนี้ก้าวหน้าจนสามารถพัฒนาไปในเชิงการค้าและอุตสาหกรรมได้แล้ว ย่อมส่งผลไปสู่การสร้างพืชพันธุ์ใหม่ ๆ ตลอดจนผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ประโยชน์ในทางปฏิบัติที่กว้างขวางยิ่งขึ้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ นั้นมีจุดมุ่งหมายแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางการเกษตรได้หลายประการ ได้แก่ เพื่อการขยายพันธุ์พืชให้ได้เป็นจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว เพื่อการผลิตพืชที่ปราศจากโรค เพื่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมของพืช เพื่อการผลิตยาหรือสารเคมีจากพืช เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อการศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์พืช (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2541)

ปัจจัยที่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ประสบผลสำเร็จนั้นต้องอาศัยปัจจัยหลายประการ ไม่ว่าจะเป็นสภาพแวดล้อม ซึ่งได้แก่ แสง อุณหภูมิ และความชื้น ชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยง เทคนิคปลอดเชื้อ การเตรียมชิ้นส่วนพืชและการฟอกฆ่าเชื้อ เทคนิคในการชักนำให้เกิดยอด และราก เทคนิคการย้ายพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูก และอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมาก ต่อความสำเร็จในการขยายพืชอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายสูตรซึ่งแต่ละสูตรจะมีชนิดและปริมาณความเข้มข้นของธาตุอาหารที่แตกต่างกัน อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละสูตรจะเรียกตามชื่อของผู้ที่คิดค้นสูตรอาหารนั้นๆ ขึ้นมา เช่น สูตรอาหารของ Murashige and Skoog (MS), White, Gamborg, Vacin and Went และ Nitsch and Nitsch เป็นต้น สูตรอาหารแต่ละสูตรจะมีองค์ประกอบของอาหารแตกต่างกัน เช่น ความเข้มข้นของแหล่งของสารประกอบ การจะเลือกใช้สูตรอาหารอะไร จะต้องคำนึงถึงวัตถุประสงค์ของงาน ชนิดของพืช และชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยง ประกอบด้วย โดยทั่ว ๆ ไปสูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะประกอบด้วยสารต่าง ๆ คือ สารอนินทรีย์ (inorganic salts) แหล่งพลังงาน สารประกอบอินทรีย์ (organic compound) และสารควบคุมการเจริญเติบโต

1.1 สารอนินทรีย์

ในอาหารสังเคราะห์ องค์ประกอบของเกลือแร่เป็นส่วนที่ได้รับความสนใจมากในการตัดสินใจเลือกใช้อาหารสูตรใดสูตรหนึ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในสภาพปลอดเชื้อพืชต้องการเกลือแร่อนินทรีย์อย่างสม่ำเสมอเช่นเดียวกับในสภาพธรรมชาติ เกลือแร่ที่มีอยู่ในอาหารสังเคราะห์นั้นแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ 3 กลุ่ม คือ 1) ธาตุอาหารหลัก ซึ่งเป็นธาตุที่พืชจำเป็นใช้ในระดับความเข้มข้นสูงกว่า 0.5 mM 2) ธาตุอาหารรอง ซึ่งเป็นธาตุที่พืชจำเป็นต้องใช้ในระดับความเข้มข้นน้อยกว่า 0.5 mM และ 3) ธาตุซึ่งยังไม่แน่ใจถึงความจำเป็นที่มีต่อพืช เช่น อลูมิเนียม และนิเกิล เป็นต้น

1.1.1 ธาตุอาหารหลัก ได้แก่

1.1.1.1 ไนโตรเจน (N) เป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิค เอ็นไซม์ โคเอ็นไซม์คลอโรฟิลล์ และสารประกอบสำคัญอื่น ๆ รวมประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ไนโตรเจนอาจอยู่ในรูปของแอมโมเนียมหรือไนเตรทอิสระอีกราว 10-20 เปอร์เซ็นต์ ปกติในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นพืชดูดธาตุไนโตรเจนในรูปไนเตรทได้ดีกว่ารูปแอมโมเนียม ทำให้พืชสะสมไนโตรเจนในรูปกลูตามีนเป็นส่วนใหญ่ กระบวนการเปลี่ยนไนเตรทเป็นกลูตามีนนั้นมี โมลิบดินั่มเกี่ยวข้องด้วย ธาตุไนโตรเจนช่วยการเติบโตของส่วนยอด ทำให้การเติบโตของรากลดลง

1.1.1.2 ฟอสฟอรัส (P) เป็นองค์ประกอบของนิวคลีโอโปรตีน ฟอสฟอไลปิด NADP ATP กรด phytic ซึ่งเป็น hexaphosphate ester ของ myo-inosital และไพรีดอกซอลฟอสเฟต (pyridoxzl phosphate) พืชที่ขาดฟอสฟอรัสจะมีสีเขียวเข้ม อัตราการหายใจต่ำ และหยุดการเจริญเติบโต ฟอสฟอรัสในปริมาณมากอาจเป็นพิษต่อพืชได้ ธาตุฟอสฟอรัสช่วยการเติบโตของรากและช่วยให้พืชดูดใช้ธาตุโปแตสเซียมได้ดีขึ้น

1.1.1.3 โปแตสเซียม (K) เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการมากรองจากไนโตรเจน แต่พืชก็เติบโตได้เป็นปกติเมื่อมีโปแตสเซียมเพียง 10 M ทั้งนี้ความต้องการโปแตสเซียมนั้นแตกต่างกัน ตามชนิดของพืช ยาสูบต้องการโปแตสเซียมสูงกว่าพืชอื่น ๆ โปแตสเซียมไม่ได้อยู่ในพืชในรูปมาโครโมเลกุลใด ๆ แต่มีส่วนสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสง การหายใจ การคายน้ำ และการเคลื่อนย้ายน้ำตาล ตลอดจนเป็นโคเฟคเตอร์ (cofactor) ของเอ็นไซม์ (enzyme) ธาตุโปแตสเซียม ช่วยให้พืชใช้ธาตุเหล็กได้อย่างมีประสิทธิภาพ และช่วยให้เซลล์สะสมน้ำได้มาก

1.1.1.4 แคลเซียม (Ca) เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของเนื้อเยื่อต่าง ๆ และคลอโรพลาสต์ ในพืชปกติ 60 เปอร์เซ็นต์ของแคลเซียมในใบสะสมอยู่ในคลอโรพลาสต์ พืชที่ขาดแคลเซียมจะมีความผิดปกติในการแบ่งเซลล์ นอกจากนี้แคลเซียมยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับเอ็นไซม์ และลดความเป็นพิษของทองแดงได้

1.1.1.5 แมกนีเซียม (Mg) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของคลอโรฟิลล์ และมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับเอ็นไซม์ไม่น้อยกว่า 14 ชนิด เนื่องจากแมกนีเซียมมีสภาวะปฏิปักษ์กับโปแตสเซียม แคลเซียม และแอมโมเนียม จึงทำให้อาจพบแมกนีเซียมอยู่ในปริมาณน้อยโดยพบในรูปเกลือของกรด phytic บ้าง แต่แมกนีเซียมมีสภาวะเสริมกับฟอสฟอรัสโดยแมกนีเซียมทำให้พืชใช้ฟอสฟอรัสได้มีประสิทธิภาพขึ้น

1.1.1.6 กำมะถัน (S) เป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ cystine cysteine และ methionine และโปรตีนที่มีกรดอะมิโนเหล่านี้ เช่น ไวตามินบี 1 ไบโอติน

(Biotin) โคเอ็นไซม์เอ (coenzyme A) และ ferridoxins ซึ่งเป็นโปรตีนในกระบวนการสังเคราะห์แสงและเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน ดังนั้นพืชที่ขาดกำมะถันจะทำให้กระบวนการสร้างโปรตีนชะงักลง เช่นเดียวกับการขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

1.1.2 ธาตุอาหารรอง ได้แก่

1.1.2.1 สังกะสี (Zn) เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอ็นไซม์ carbonic anhydrase ซึ่งช่วยตรึงแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ tryptophane ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตออกซิน (auxin) พืชอาจมีปริมาณสังกะสีสูงถึง 300 ppm

1.1.2.2 เหล็ก (Fe) เป็นส่วนประกอบของโปรตีนหลายชนิดซึ่งมีบทบาทในกระบวนการสังเคราะห์แสงและหายใจ พืชที่ขาดเหล็กจะมีอาการเหลืองซีด เนื่องจากเหล็กมีส่วนเกี่ยวข้องกับ RNA ในคลอโรพลาสต์ด้วย

1.1.2.3 โบรอน (B) เป็นที่ต้องการของพืชแต่ละชนิดในปริมาณที่ต่างกันมาก โดยพืชใบเลี้ยงคู่มีความต้องการธาตุนี้สูงกว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายเท่า โบรอนมีบทบาทในการสร้างสารเพคติน (pectin) ในผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญ และการเคลื่อนย้ายน้ำตาล ดังนั้นเมื่อพืชขาดโบรอนจะทำให้ผนังเซลล์แตกได้ง่าย

1.1.2.4 แมงกานีส (Mn) มีบทบาทโดยตรงเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสง และเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอ็นไซม์ 4 ชนิดซึ่งแมงกานีส หรือแมกนีเซียมทำงานแทนกันได้ การขาดแมงกานีสทำให้เกิดผลกระทบกับกระบวนการสังเคราะห์แสงอย่างมาก ซึ่งมากกว่าการขาดธาตุเหล็ก เนื่องจากแมงกานีสมีผลต่อการใช้ไนโตรเจน และเหล็กในพืช อาจมีแมงกานีสสูงถึง 2,000 ppm

1.1.2.5 ทองแดง (Cu) เป็นองค์ประกอบของเอ็นไซม์ในโมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง การหายใจ และการป้องกันตัวเมื่อพืชเกิดบาดแผล ธาตุทองแดงยังช่วยให้พืชใช้ธาตุเหล็กได้ดีขึ้นด้วย

สำหรับธาตุอื่น ๆ ในอาหารสังเคราะห์ซึ่งมีบทบาทบางประการกับการเจริญเติบโตของพืชเช่น คลอรีนมีบทบาทในการสร้างน้ำตาล ซิลิกอนมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการใช้ฟอสฟอรัส แมงกานีส เหล็ก และโคบอลต์มีบทบาทเกี่ยวข้องกับเอ็นไซม์ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน ส่วนไอโอดีน อลูมิเนียม และนิเกิล ซึ่งพบในพืชเพียงเล็กน้อยและเป็นพิษต่อพืชได้ง่าย

เกลือแร่ต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์นั้น ไนโตรเจนและเหล็กเป็นเพียง 2 ธาตุที่ได้รับความสนใจศึกษากันมาก ไนเตรทถูกแนะนำให้ใช้ในอัตราไม่น้อยกว่า 25 mM เช่นเดียวกับโปแตสเซียม และควรใช้แอมโมเนียมไม่เกิน 8 mM เพื่อรวมกับไนเตรทเป็น 60

391452

mM การใช้แอมโมเนียมมากเกินไปอาจเกิดผลเสียได้ แต่แอมโมเนียมมีผลต่อ embryogenesis ซึ่งเกิดขึ้นได้ดีเมื่อโปแตสเซียมสูงกว่า 20 mM สำหรับเหล็กนั้น เกลือหลายรูปได้ถูกทดลองใช้ เช่น เฟอริคซัลเฟต เฟอรัสคลอไรด์ เฟอริคซิเตรท เฟอริคตาร์เตรท และโซเดียมเฟอริคเอทธิลีนเตตราหรือโซเดียมเหล็กอีดีทีเอ (NaFe.EDTA) ซึ่งเกลือ NaFe.EDTA นั้นถูกใช้ในสูตรอาหาร MS โดยให้เฟอรัสซัลเฟตทำปฏิกิริยากับเกลือโซเดียมอีดีทีเอ เกลือโซเดียมเหล็กอีดีทีเอ นี้ช่วยแก้ปัญหาเหล็กตกตะกอนในสภาวะอาหารค่อนข้างเป็นด่าง

1.2. แหล่งพลังงาน

ปกติน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นต่อเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะแรกซึ่งพืชยังไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้อย่างเต็มที่ และชิ้นพืชที่มีสีเขียวเมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงมักสูญเสียคลอโรฟิลล์ไปในการเพาะเลี้ยง ทำให้พืชเหล่านี้ต้องพึ่งแหล่งพลังงานจากภายนอก การเพิ่มน้ำตาลมักช่วยทำให้พืชที่มีสีเขียวเจริญเติบโตได้ดี ทั้งนี้น้ำตาลอาจเป็นแหล่งพลังงาน และช่วยรักษาระดับแรงดันออสโมติคด้วย

น้ำตาลทรายขาวซึ่งก็คือน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ 99 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งพลังงานที่นิยมใช้ในอัตรา 2-3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอาหารสูตรทั่ว ๆ ไป สารละลายน้ำตาลซูโครสนั้นควรถูกฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอเพื่อแตกตัวเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส แทนการฆ่าเชื้อด้วยเยื่อกรอง เนื่องจากพืชสามารถใช้ประโยชน์จากน้ำตาลทั้งสองชนิดได้ โดยใช้น้ำตาลกลูโคสก่อน นอกจากนี้ความเป็นกรด-ด่าง เอ็นไซม์จากพืช และออกซิน ยังช่วยให้น้ำตาลซูโครสในอาหารแตกตัวอีกด้วย นอกจากน้ำตาลซูโครสแล้ว น้ำตาลกาแลคโตส แลคโตส กลูโคส ตลอดจนแป้งก็อาจใช้เป็นแหล่งพลังงานของพืชที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อได้

1.3 สารประกอบอินทรีย์

1.3.1 ไวตามิน

พืชส่วนมากที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ สามารถสร้างไวตามินได้เองแต่มีปริมาณไม่เพียงพอ จึงต้องเพิ่มไวตามินลงในอาหารสังเคราะห์ เพื่อให้พืชเจริญเติบโตได้อย่างปกติ เนื่องจากไวตามินมีหน้าที่เป็น coenzyme ในกระบวนการต่าง ๆ คือ ไวตามิน บี 1 (thiamine) ซึ่งจำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Decarboxylation ของอัลฟาคีโตแอซิด ไวตามินบี 2 (riboflavin) เกี่ยวข้องกับการสร้าง FAD ไวตามินบี 3 (nicotinic acid) เกี่ยวข้องกับการสร้าง NAD^+ และ $NADP^+$ ไวตามินบี 5 (pantothenic acid) ไวตามินบี 6 (pyridoxine) เกี่ยวข้องกับกระบวนการ เมตาโบลิซึมของกรดอะมิโน กรดโพลิค (folic acid) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไวตามินบี 10 และ บี 11 (บางทีจัดแยกเป็นไวตามินเอ็ม) เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาโบลิซึมของสารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอม ไวตามินซี (ascorbic acid) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้ง

กระบวนการ Oxidation ไบโอติน (Biotin) ซึ่งเคยถูกจัดเป็นไวตามิน H เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา Carboxylation-Decarboxylation และ อิโนซิตอล (inositol) ซึ่งเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ อาจถูกจัดเป็นไวตามินชนิดหนึ่งด้วย

การใช้ไวตามินชนิดต่างๆ นั้นมีวัตถุประสงค์ต่าง ๆ กัน เช่น ไวตามินบี 1 ช่วยให้เกิดแคลลัสที่เซลล์อัดตัวแน่น (compact callus) ช่วยให้แคลลัสเติบโตได้ดี และช่วยในการเติบโตของราก ไวตามินบี 5 ร่วมกับ 2,4-D ทำให้เซลล์แยกตัวจากกันได้ง่ายเหมาะสำหรับการแยกเซลล์ ไวตามินบี 6 เชื่อว่าช่วยในการเกิดราก ไวตามินซีช่วยในการแบ่งเซลล์ของพืชและลดการผลิตสารประเภทฟีโนลิค (pheonolic compound) ซึ่งทำให้เนื้อเยื่อตายได้ ไบโอตินช่วยในการสร้างคลอโรฟิลล์ และอิโนซิคตอลแยกตัวเป็นไวตามินซีและเพคติน (pectin) แล้วถูกพืชนำไปใช้ในการแบ่งเซลล์ ความต้องการไวตามินต่างๆเหล่านี้แตกต่างไปตามชนิดของชิ้นส่วน และชนิดของพืช รวมทั้งรูปแบบของการเจริญเติบโตของพืชที่ผู้เพาะเลี้ยงต้องการ สูตรอาหารมาตรฐานมีไวตามินเป็นองค์ประกอบในชนิดและปริมาณที่แตกต่างกัน

1.3.2 กรดอะมิโน

แหล่งไนโตรเจนในรูปอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโนนั้น พืชนำไปใช้ได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนในรูปอนินทรีย์ โดยกลูตามีน (glutamine) เป็นกรดอะมิโนที่ถูกใช้อย่างแพร่หลาย และแอสพาราจีน(asparagines) ถูกพบว่าอาจใช้แทนน้ำมะเขือเทศ และสารที่สกัดจากยีสต์ (yeast extract) ผลของกรดอะมิโนต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อนั้นจะเด่นชัดเมื่อสูตรอาหารที่ใช้นั้นมีเกลือแอมโมเนียมไม่เพียงพอ และเมื่อเริ่มต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การใช้กรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่งเดี่ยว ๆ นั้นต้องกระทำอย่างระมัดระวังเนื่องจากเกิดผลทางลบได้ ดังนั้นจึงนิยมใช้กรดอะมิโนหลาย ๆ ชนิดร่วมกันโดยใช้สารที่ได้จากการย่อยโปรตีน เช่น เปปโตน เป็นต้น กรดอะมิโนที่พบว่าช่วยการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ L-arginine, L-asparitc acid, L-glutamic acid และ L-glutamine ทั้งนี้ L-serine ช่วยในการเกิดต้นแฮพลอยด์ (haploid) จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู ขณะที่ L-tyrosine มีส่วนสำคัญต่อการเกิดยอดจากแคลลัส อนึ่ง กรดอะมิโนที่ใช้จะต้องเป็น L-form เท่านั้น

1.3.3 สารอินทรีย์อื่น ๆ

โพลีอะมีน (polyamines) เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ embryogenesis เช่น putrescine ช่วยให้กระบวนการ embryogenesis ของเซลล์แครอทเกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน จึงอาจมีการใช้โพลีอะมีนในการชักนำให้เกิด embryogenesis กันบ้าง สารที่ได้จากพืชบางชนิด เช่น น้ำมะพร้าว น้ำมะเขือเทศ กล้วยบด สารสกัดจากยีสต์และข้าวมอลต์ และน้ำมันฝรั่ง ประกอบด้วยสารอินทรีย์ต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืชในสภาพปลอดเชื้อ ทั้งนี้เพราะสารเหล่านี้มีคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไวตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นองค์ประกอบ ชนิด

และปริมาณองค์ประกอบของสารเหล่านี้มักผันแปรตามอายุ ฤดู และพันธุ์พืชที่นำมาใช้ จึงจำเป็นต้องเตรียมสารกลุ่มนี้แต่ละครั้งเป็นปริมาณมากแล้วจึงแบ่งเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง แล้วทยอยนำออกมาใช้ น้ำมะพร้าวจากมะพร้าวอ่อนซึ่งเนื้อยังเป็นวุ้นนั้น เป็นสารกลุ่มที่มีคนนิยมใช้กันมากที่สุด โดยใช้ราว 5-20 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าวนี้มีฤทธิ์ของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน สำหรับน้ำมะเขือเทศนั้นใช้ประมาณ 5-30 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นแหล่งไวตามิน และกรดอะมิโน สารที่ได้รับจากการย่อยโปรตีน เช่น casein hydroly sate เป็ปโตน ทริปโตน อาจใช้ประมาณ 0.05-0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนในรูปอินทรีย์สาร ในอาหารสังเคราะห์ซึ่งมีสารเหล่านี้อยู่มีส่วนทำให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตได้ดีขึ้นกว่าปกติมาก แต่เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีองค์ประกอบที่ไม่แน่นอนจึงต้องเลือกใช้สารที่เตรียมโดยวิธีการและบริษัทเดียวกันตลอดงานทดลอง ถ่านพืชที่ได้จากการเผาภายใต้ความดัน (activated charcoal) มีผลดีต่อการเติบโตของพืชเป็นอย่างมาก เนื่องจากถ่านสามารถดูดซับสารพิษที่พืชปลดปล่อยออกสู่อาหารได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ถ่านดูดซับสารควบคุมการเจริญเติบโตรักษาระดับความเป็นกรด-ด่าง และยังช่วยให้อาหารทึบแสงจึงทำให้การเติบโตแบบมีขั้ว (polar growth) ดีขึ้น ถ่านที่ใช้ต้องเป็นฝุ่นละเอียดที่สุดซึ่งมีประสิทธิภาพการดูดซับสูงปกตินิยมใช้ถ่านในอาหารสังเคราะห์ราว 0.2-3.0 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้พืชเกิดโครงสร้างได้ดีขึ้น

1.4 สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นสารอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา โดยสารกลุ่มนี้เพียงเล็กน้อยอาจเร่ง หรือชะลอการเจริญเติบโตและพัฒนาของอวัยวะต่างๆของพืช

สารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นปัจจัยที่สำคัญมากสำหรับงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยสารกลุ่มนี้อาจแบ่งเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1.4.1 ออกซิน (auxins)

สารกลุ่มนี้ทำให้เซลล์ยืดตัว เนื้อเยื่อบวม เกิดแคลลัส ยับยั้งการเกิดยอดแต่ส่งเสริมการเกิดราก และชักนำให้เนื้อเยื่อเกิด embryogenesis ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปกติพืชสร้างออกซินได้มากที่ปลายยอดที่กำลังเติบโต และเนื้อเยื่อเจริญ อื่น ๆ IAA (indole-3-acetic acid) เป็นสารที่พืชสร้างเองตามธรรมชาติ สารนี้มีฤทธิ์ของ ออกซินสูง แต่เสื่อมคุณสมบัติได้ง่าย เช่น สลายตัวเมื่อได้รับแสง ความร้อน และรังสีเปลี่ยนรูปโดย IAA-oxidase และ Peroxidase และหมดประสิทธิภาพชั่วคราวเมื่อรวมตัวกับสารอื่น เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล และ myo-inositol

นอกจากออกซินธรรมชาติแล้ว สารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ของออกซิน เช่น NAA (naphthaleneacetic acid) IBA (indolebutyric acid) 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) และ dicamba (2-methoxy-3, 6-dichorobenzoic acid) ความเข้มข้นที่ใช้ในอาหารสังเคราะห์ประมาณ

0.005-50 M การใช้ออกซินความเข้มข้นต่ำจะชักนำให้เกิดราก ขณะที่ความเข้มข้นสูงจะชักนำให้เกิดแคลลัส การใช้ 2,4-D ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงต้องระมัดระวังมากกว่าการใช้ออกซินชนิดอื่น ๆ อนึ่ง 2,4-D เหมาะกับพืชใบเลี้ยงคู่ ขณะที่ dicamba เหมาะกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

1.4.2 ไซโตไคนิน (Cytokinin)

สารกลุ่มนี้กระตุ้นให้พืชเจริญเติบโต ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ กระตุ้นการเกิดยอด แต่ถ้าใช้สารกลุ่มนี้ร่วมกับออกซิน พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดราก และกระตุ้นให้เกิดแคลลัส ไซโตไคนินเป็นสารประเภท 6-substituted purine ที่ถูกสร้างขึ้นจากบริเวณปลายราก และใบอ่อน เป็นส่วนใหญ่ zeatin เป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเองตามธรรมชาติ พบในเมล็ดอ่อนของข้าวโพด และน้ำมะพร้าวอ่อน สารนี้มีฤทธิ์ของไซโตไคนินสูง แต่มีราคาแพงมากจึงไม่นิยมใช้ในรูปสารบริสุทธิ์ น้ำมะพร้าวซึ่งมีไซโตไคนินหลายชนิด เช่น diphenylurea ribofuranosyl zeatin และ zeatin riboside จึงเป็นที่นิยมใช้กันมากในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สำหรับไซโตไคนินสังเคราะห์เช่น ไคเนติน (kinetin, 6-furfurylamino-purine) BA (benzyladenine) หรือ BAP (benzylaminopurine) และ adenine sulphate ตลอดจนสารที่มีฤทธิ์ของไซโตไคนิน เช่น myoinositol นั้นได้ถูกใช้ในอาหารสังเคราะห์กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความบริสุทธิ์และราคาถูกโดยนิยมใช้ไซโตไคนินสังเคราะห์ประมาณ 5-45 M ขณะที่ myoinositol ส่วนใหญ่ใช้ที่ระดับความเข้มข้นประมาณ 500 M ปกติพืชในสภาพปลอดเชื้อต้องการไซโตไคนินจากอาหารไม่มากนัก

1.4.3 จิบเบอริลลิน (Gibberellins)

สารกลุ่มนี้กระตุ้นให้เซลล์ยืดตัว ส่งผลให้ยอดและปล้องของพืชยืดตัวออก และอาจช่วยทำลายการพักตัวของเอ็มบริโอและเมล็ด ปกติจิบเบอเรลลินยับยั้งการเกิดรากและยอด จิบเบอเรลลินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ GA3 และ GA7 ซึ่งควรขจัดเชื้อด้วยการกรอง เนื่องจากสลายตัวง่ายเมื่อถูกความร้อน (สูญเสียประสิทธิภาพไปราว 90 เปอร์เซ็นต์ หลังการนึ่งฆ่าเชื้อ) อย่างไรก็ตาม การใช้จิบเบอเรลลินนั้นมีอยู่ในวงจำกัดมาก เช่น อาจใช้กระตุ้นให้ embryoid เจริญเป็นต้นได้

1.4.4 เอทิลีน (Ethylene)

แก๊สเอทิลีนกระตุ้นให้พืชแตกกอ ลดการยืดตัวของต้นและรากทำให้ลำต้น และใบอวบน้ำ ชักนำให้เกิดรากขนอ่อน (root hair) และทำให้พืชเกิดรากผิดปกติ เช่น เกิดรากตามกิ่งและลำต้นแก๊สเอทิลีนถูกสร้างมากที่สุดบริเวณเนื้อเยื่อเจริญและบริเวณข้อโดยพืชจะสร้างเอทิลีนเพียงเล็กน้อยในภาวะปกติ แต่จะสร้างเอทิลีนมากอย่างผิดปกติเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียด เช่น เมื่อเกิดบาดแผล เป็นต้น

ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เอทิลีนอาจเข้าไปอยู่ในภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยง ขณะที่ใช้ไฟลนปากขวด เนื่องจากตะเกียงโดยเฉพาะตะเกียงแก๊สผลิตเอทิลีนขึ้นมาขณะเกิดการสันดาป การปิดภาชนะให้แน่นจะทำให้เอทิลีนซึ่งพืชผลิตเมื่อเกิดบาดแผลสะสมอยู่ภายในภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยง ซึ่งอาจทำให้เกิดผลเสียต่อพืชหลายประการ เช่นยับยั้งการเจริญเติบโต ยังยั้งการเกิด embryogenesis ตลอดจนทำให้เกิดอาการฉ่ำใส (vitrification) อย่างไรก็ตาม เอทิลีน อาจมีผลให้เซลล์แขวนลอยเติบโต ๆได้ดี และช่วยการเกิดหัวของพืชหัวได้ ปัจจุบันนักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้พยายามลดปริมาณเอทิลีนในภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงโดยการใช้ฝาปิดภาชนะ ซึ่งยอมให้แก๊สเอทิลีนซึ่งเบากว่าอากาศผ่านออกไปได้หรือปิดฝาภาชนะเพียงหลวม ๆ เท่านั้น (ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์ และกอบเกียรติ แสงนิล, 2552)

2. ปัจจัยทางด้านพืช

2.1 ลักษณะทางพันธุกรรม (Genetic factor)

การเจริญและพัฒนาไปเป็นและ/หรือราก ของพืชแต่ละชนิดจะมีความสามารถเจริญและพัฒนาได้ไม่เหมือนกัน พืชบางชนิดสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นและ/หรือรากได้ง่าย บางชนิดก็ยาก แม้ว่าได้เลี้ยงบนหรือในอาหารที่เหมาะสมแล้วก็ตาม พืชบางชนิดการเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นและ/หรือราก โดยผ่านขบวนออร์แกนโนเจเนซิสบางชนิดก็ผ่านขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบจะพัฒนาเป็นต้นยาสูบที่สมบูรณ์ได้โดยการพัฒนาผ่านออร์แกนโนเจเนซิสในขณะที่แครอทจะผ่าน เอ็มบริโอเจเนซิส ส่วนเนื้อเยื่อ รังไข่ และอับละอองเกสรพัฒนาผ่านขบวนการ เอ็มบริโอเจเนซิส มากกว่าขบวนการ ออร์แกนโนเจเนซิส

2.2 ฮอร์โมนภายในพืช (Plant hormones)

ฮอร์โมนที่มีอยู่ภายในพืช มีบทบาทอย่างมากกับขบวนการเกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง จากทฤษฎีของโฮบ ได้มีผู้พยายามพิสูจน์ว่า การเกิดลักษณะรูปร่าง ควบคุมด้วยชนิดและระดับของฮอร์โมน ดังนั้นภายในเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเลี้ยงจึงมีฮอร์โมนบางชนิดส่งเสริมการเกิดการเกิดลักษณะรูปร่าง และมีฮอร์โมนอีกบางชนิดที่ยับยั้งการเกิดขบวนการนี้ นอกจากนี้พบว่าชนิด (kinds) และระดับ (levels) ของฮอร์โมนภายในชิ้นส่วนของพืชจะแตกต่างกันไปดังนี้

2.2.1 ชนิดของพืช ภายในเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณฮอร์โมนชนิดแตกต่างกันออกไป เช่น พืชบางชนิดอาจจะมีออกซินในปริมาณที่สูง เมื่อนำเนื้อเยื่อของพืชชนิดนี้ไปเลี้ยง เนื้อเยื่อก็สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสและรากได้ดี พืชบางชนิดอาจจะมีไซโตไคนินเนื้อเยื่อของพืชชนิดนี้เมื่อนำไปเลี้ยงจะพัฒนาไปเป็นหน่อได้ดี เป็นต้น

2.2.2 ชนิดของเนื้อเยื่อในพืชชนิดเดียวกันหรือต้นเดียวกัน ปริมาณฮอร์โมนในแต่ละส่วนของต้นพืชจะไม่เหมือนกัน เช่น ส่วนปลายยอดจะมีออกซินปริมาณสูงกว่าส่วนลำต้น

ในรังไข่ก็มีปริมาณออกซินค่อนข้างสูง ส่วนในเมล็ดนอกจากจะมีออกซินค่อนข้างสูงแล้ว ปริมาณของจิบเบอริลลินยังสูงด้วย เป็นต้น ฮอร์โมนของพืชในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช เนื้อเยื่อพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างกันที่ชิ้นส่วน เช่น ยอด ใบ ราก ก็จะมีฮอร์โมนที่อยู่ภายในแตกต่างกัน สภาพของเนื้อเยื่อ เช่น เนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตกับเนื้อเยื่อที่มีการพักตัวจะมีสารควบคุม การเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชหลังจากนำมาเพาะเลี้ยง

2.3 สภาพของเนื้อเยื่อ

เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชมีการเจริญ และพัฒนาอยู่เสมอ ดังนั้นชนิด และระดับของฮอร์โมนที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อจึงมีการเปลี่ยนแปลงไป ตามสภาพของเนื้อเยื่อในระยะนั้น ๆ เป็นที่เชื่อกันว่าการเปลี่ยนแปลงชนิดและระดับของฮอร์โมนภายในเนื้อเยื่อ เป็นสาเหตุให้เนื้อเยื่อ มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระ จึงทำให้การเปลี่ยนชนิดและระดับฮอร์โมนกับการเปลี่ยนแปลงทางสรีระเกิดควบคู่กันไปเสมอ เช่น หัวลิลี่ (lily) และซ่อนกลิ่นฝรั่ง (gladiolus) ขณะที่เก็บเกี่ยวมาใหม่จะมีสารยับยั้งการเจริญเติบโต (Inhibitor) เช่น abcissic acid (ABA) ในปริมาณค่อนข้างสูง ดังนั้นถ้านำเนื้อเยื่อในระยะนี้มาเลี้ยงจะไม่ค่อยประสบความสำเร็จในการเกิดหัวย่อย (bulblets หรือ cormels)แต่ถ้านำหัวลิลลี่ หรือ ซ่อนกลิ่นฝรั่งนี้เก็บไว้สักระยะหนึ่ง ปริมาณ ABA ก็จะลดลง ขณะที่จิบเบอริลลินเพิ่มขึ้นเมื่อนำหัวระยะนี้ไปเลี้ยงโอกาสที่จะประสพความสำเร็จในการเกิดหัวย่อยก็มีสูงขึ้น

2.4 ขนาดของชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง (size of explants)

ขนาดของชิ้นส่วนมีความสำคัญต่อการประสพความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือการเกิดลักษณะรูปร่างมาก การใช้ชิ้นส่วนขนาดใหญ่จะมีโอกาสประสพความสำเร็จมากกว่าการใช้ชิ้นส่วนขนาดเล็ก

3. ปัจจัยทางด้านกายภาพ

3.1 แสง (Light)

แสงที่ให้กับพืชเป็นปัจจัยที่สำคัญ พืชที่เจริญในแปลงปลูกกับที่เจริญในหลอดทดลองจะมีความต้องการแสงที่แตกต่างกัน พืชที่เจริญในหลอดทดลองยังไม่มีการสังเคราะห์แสงเนื่องจากได้รับคาร์โบไฮเดรตจากน้ำตาล อย่างไรก็ตามแสงยังมีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืชในหลอดทดลองเช่น ช่วยในการสร้างราก การสร้างต้นใหม่จากแคลลัส เป็นต้น และต้นพืชที่อยู่ในช่วงย้ายออกจากหลอดทดลองจำเป็นต้องมีการสังเคราะห์แสงเพื่อเตรียมพร้อมออกสู่ภายนอกหลอดทดลอง แต่ถ้าความเข้มแสงมากเกินไปอาจทำให้พืชตายได้ลักษณะของแสงที่เกี่ยวข้องได้แก่ ความเข้มแสง (light intensity) ช่วงแสง (photoperiod) และคุณภาพของแสง (light quality)

ความเข้มแสง (light intensity) มีรายงานความเข้มแสงที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชในสภาพหลอดแก้วมากกว่าทางด้านช่วงแสง ถ้าหากพืชในสภาพหลอดแก้วได้รับความเข้มแสงสูงเท่าในแปลงปลูกพืชอาจเป็นอันตรายได้ เนื่องจากทำให้พืชได้รับอุณหภูมิสูงไปด้วย ควรเลี้ยงภายใต้สภาพแสงประมาณ 1,000-4,000 ลักซ์ (Lux) (1 ฟุตกำลังเทียน = 10.75 ลักซ์) การที่พืชต้องการความเข้มแสงต่ำ สันนิษฐานว่าการสังเคราะห์แสงในสภาพหลอดแก้วถูกจำกัดด้วยปริมาณของ คาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่ำ ในหน่อไม้ฝรั่ง เยอบีร่าและสับปะรดความเข้มแสงที่เหมาะสมในระยะเพิ่มจำนวนคือ 1,000 ลักซ์ ส่วนในระยะที่ต้องการให้ต้นพืชเจริญเตรียมออกรากต้องการความเข้มแสงคือ 1,000-3,000 ลักซ์ โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเป็นอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของพืช ต้องการคุณภาพแสง ความเข้มแสง และช่วงแสงที่เหมาะสม

3.2 อุณหภูมิ (temperature)

อุณหภูมิที่ใช้มักคงที่ประมาณ 24-26 องศาเซลเซียสในการทดลองอาจเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส หรือสูงถึง 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช มักต่ำกว่าในธรรมชาติ จึงควรเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต่ำกว่าธรรมชาติ อุณหภูมิที่ต่ำมากเกินไป เช่น เย็นจัด ถึง 4 องศาเซลเซียส ทำให้พืชหยุดการเจริญเติบโต บางครั้งพืชต้องการอุณหภูมิต่ำสลับกับอุณหภูมิสูง เช่น การสร้างรากของทานตะวันจะดีขึ้นถ้าเพาะเลี้ยงให้ได้รับอุณหภูมิกลางวัน 26 องศาเซลเซียส กลางคืน 15 องศาเซลเซียส การเลี้ยงแคลลัสของพืชบางชนิดให้ผลเช่นเดียวกัน อุณหภูมิทำให้พืชเกิดการพ้นระยะการพักตัว (break dormancy) ใน gladiolus hortulans หัวหรือต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นต้นพืชที่ปลูกลงดินได้ ต้องเลี้ยงที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส นาน 4-6 สัปดาห์ก่อนการย้ายลงดิน เช่นเดียวกับลิลลี่ ต้นจะพักตัว จึงต้องทำให้พ้นระยะการพักตัวโดยเลี้ยงที่ในที่มืด อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ก่อนย้ายปลูก

3.3 ความชื้น (Humidity)

เนื่องจากความชื้นในหลอดแก้วค่อนข้างสูง ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเนื่อต่ำก็จะเกิดการสูญเสียน้ำภายในหลอด ส่งผลทำให้อาหารแห้งเร็ว แต่ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงสูงเกิดไปก็จะเอื้ออำนวยให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ดี เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย และในบางครั้ง ถ้าความชื้นภายในหลอดทดลองสูงมากจะทำให้พืชเกิดอาการฉ่ำน้ำ

3.4 ออกซิเจน (Oxygen)

เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ การเลี้ยงบนอาหารเหลว อาจใช้วิธีเพาะเลี้ยงบนสะพานกระดาษหรือวางบนเครื่องเขย่า

3.5 คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide)

แม้ว่าจะเป็นแหล่งพลังงานของพืชซึ่งเกิดการสังเคราะห์แสง แต่ถ้าเกิดการสะสมมากเกินไปก็จะเป็นอันตราย

3.6 ปัจจัยอื่น

3.6.1 สภาพของการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture condition) สภาพภายในภาชนะที่เลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น สภาพของอาหารเป็นอาหารแข็งหรืออาหารเหลว เนื้อเยื่อบางชนิดจะเกิดการเกิดลักษณะรูปร่างได้บนอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารวุ้น แต่จะไม่เกิดลักษณะรูปร่าง ในอาหารเหลว เช่น กล้วยไม้ แต่เนื้อเยื่อบางชนิดสามารถเกิดลักษณะรูปร่างได้ทั้งบนอาหารกึ่งแข็งและในอาหารเหลว หรือถ้าปริมาณออกซิเจนภายในภาชนะที่ใช้เลี้ยงมาก คาร์บอนไดออกไซด์น้อย เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นราก แต่ถ้าปริมาณออกซินน้อย คาร์บอนไดออกไซด์มาก เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นยอด

3.6.2 การเปลี่ยนอาหาร (subculture) การย้ายเนื้อเยื่อจากอาหารเก่าไปยังอาหารใหม่หลาย ๆ ครั้ง จะมีผลทำให้การเกิดลักษณะรูปร่าง ลดลง ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซมขึ้น ซึ่งสาเหตุที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด

3.6.3 ส่วนประกอบอาหารอื่น ๆ (medium component) นอกเหนือจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช อาหารบางชนิดจะมีผลต่อการเกิดลักษณะรูปร่าง เช่น ถ้ามีฟอสเฟตในอาหารเป็นปริมาณสูงจะเกิดยอดได้ดีกว่าที่มีฟอสเฟตในปริมาณต่ำ ถ้าให้ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียม (NH_4^+) ในปริมาณมาก เนื้อเยื่อจะเกิดเอ็มบริโอเจเนซิส มากกว่าการเกิดออร์แกนโนเจนเนซิส นอกจากนี้ ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลก็เป็นตัวควบคุมการเกิดลักษณะรูปร่างเหมือนกัน เช่น ถ้าในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยมีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์จะช่วยให้เนื้อเยื่ออ้อยเกิดยอด ถ้า 3 เปอร์เซ็นต์ จะยับยั้งการเกิดยอด ส่วนในการเลี้ยงลิลลี่ พบว่าน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เกิดท่อน้ำในก้อนแคลลัส และ 4 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เกิดท่ออาหารส่วนน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ จะชักนำให้เกิดทั้งท่อน้ำและท่ออาหาร (เทิดศักดิ์ โทณลักษณ์, 2555)

คุณสมบัติของสาร Thidiazuron (TDZ)

Thidiazuron (TDZ) หรือ *N*-phenyl-*N'*-1,2,3-thidiazol-5-yl urea เป็นสารประกอบพวก phenylurea มีสูตรเคมีคือ $C_9H_8N_4OS$ มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน (light-yellow-crystal) มวลโมเลกุลเท่ากับ 220.2 มีจุดหลอมเหลวที่ 213 องศาเซลเซียส ละลายได้ดีในเอธานอล (ethanal) หรือตัวทำละลายอื่น ๆ เช่น อะซีโตน เบนซีน และ ดีเอ็มเอ็สโอ (DMSO) เป็นต้น TDZ ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์ทางการค้า เพื่อทำให้ใบฝ้ายหลุดร่วงก่อนเก็บเกี่ยว และจดทะเบียนในชื่อทางการค้า

เป็นครั้งแรกว่า Dropp นอกจากนี้ TDZ ยังมีความเสถียรสูง สามารถเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นและเก็บไว้ในตู้เย็นได้โดยไม่เสื่อมสภาพ และสามารถเตรียมรวมกับอาหารและนึ่งฆ่าเชื้อได้โดยไม่สูญเสียการออกฤทธิ์ ทำให้สะดวกในการเตรียมอาหารเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และมีการใช้อย่างแพร่หลายในเวลาต่อมา (มิ่งขวัญ ทวีทรัพย์, 2549)

TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีบทบาทในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างกว้างขวาง สามารถใช้ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก แคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ หรือแม้แต่การชักนำให้เกิดดอกในหลอดทดลองได้ด้วย ในพืชส่วนใหญ่ TDZ สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของเนื้อเยื่อได้ดีกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น ทั้งในด้านปริมาณสารที่ใช้และผลลัพธ์ที่ได้ (วราภรณ์ ฉุยฉาย, 2552)

การใช้ TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช นอกจากมีการใช้ TDZ เพียงอย่างเดียวแล้ว พบว่าในพืชบางชนิดการใช้สาร TDZ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่นสามารถเพิ่มการเกิดยอดได้ดีขึ้น มีรายงานวิจัยพบว่า มีการใช้ TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด เช่นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ปล้อง และข้อของกล้วยไม้ช้างกระ (*Rhynchostylis gigantea*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 3 µM ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก 60 เปอร์เซ็นต์ ถ้าใช้ร่วมกับ BA 3 µM เกิดยอด 90 เปอร์เซ็นต์ (Le *et, al.*, 1999) และการเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นอ่อนรองเท้านารี (*Paphiodilum* sp.) บนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นครึ่งเท่า เติม TDZ 0.4 µM ร่วมกับ 2,4-D 4.52 µM เกิดยอดจำนวนมาก 80 เปอร์เซ็นต์ (Chen *et, al.*, 2002) การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นอ่อนกะเรกะร่อน (*Cymbidium aloifolium*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 2.2 µM เกิดยอดจำนวนมาก 97.2 เปอร์เซ็นต์ และการเพาะเลี้ยงโดยใช้ข้อของต้นอ่อนเอื้องสาย (*Dendrobium aphyllum*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 4.5 µM เกิดยอดจำนวนมาก 98.6 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพาะเลี้ยงข้อของต้นอ่อนเอื้องจำปา (*Dendrobium moschatum*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 4.5 µM สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก 95 เปอร์เซ็นต์ (Nayak *et, al.*, 1997) เช่นเดียวกับการทดลองเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยได้สูงสุด 3.8 ยอด มีความสูงเฉลี่ย 3.96 เซนติเมตร (ไตรรัตน์ ประทิศ, 2555) นอกจากนี้มีรายงานว่า TDZ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ในจำนวนที่มากกว่า BA ที่ความเข้มข้นเท่ากันในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะพืชใบเลี้ยงคู่ ตัวอย่างเช่น จากใบของ *Gypsophila paniculata* หรือจากปลายยอดของกระเทียม นอกจากนั้น ยอดที่ได้จากการชักนำด้วย TDZ จากใบของ Alstroemeria สามารถเกิดยอด

จำนวนมาก และยอดพัฒนาได้เร็ว ในพืชบางชนิด เช่น *Cyclamen pesicumr* จะเกิดยอดจำนวนมาก เมื่อถูกชักนำด้วย TDZ เท่านั้น จะไม่เกิดยอดเมื่อใช้ไซโตไคนินอื่น ๆ ในพืชบางชนิดเช่น ช้างกระ การใช้ TDZ ร่วมกับ BA ทำให้เกิดยอดจำนวนมาก มากกว่าการใช้ TDZ หรือ BA อย่างเดียว ในพืช บางชนิด เช่น Tiliacordata ยอดที่ได้จากการใช้ TDZ ร่วมกับ BA ยาวกว่ายอดที่ชักนำด้วย TDZ อย่างเดียว (วราภรณ์ ฉุยฉาย, 2552) และ TDZ จัดอยู่ในกลุ่มไซโตไคนินซึ่งเกี่ยวข้องกับการแบ่ง และการยืดตัวของเซลล์ส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของตาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tongumpai, 1994)

มิ่งขวัญ ทวีทรัพย์ (2549) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงหน้าวัว (*Anthurium andraeanum* Lind.) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลของ TDZ ต่อการเกิดยอด ของหน้าวัวพันธุ์ลินเนต และทรอปพิคอล โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อที่มีตาติดของหน้าวัวพันธุ์ ลินเนตในสภาพปลอดเชื้อในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ เข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ แล้วย้ายไปยังอาหาร MS ที่ปราศจาก ฮอร์โมนเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ระดับความเข้มข้นของ TDZ และระยะเวลาการเลี้ยง มีผล ต่อจำนวนยอดต่อชิ้น และจำนวนยอดรวมของหน้าวัวอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) TDZ ที่ระดับ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ชักนำยอดได้จำนวนยอดสูงสุดที่ระยะ 6 และ 8 สัปดาห์ และเมื่อเลี้ยงที่ระยะเวลานาน 8 สัปดาห์ มีการเกิดจำนวนยอดต่อชิ้นสูงสุด 3.94 ยอด และมีจำนวน ยอดรวม 349.94 ยอด รองลงมาคือในอาหารสูตรเดียวกันที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดต่อ ชิ้น 3.38 ยอด และเกิดยอดรวม 311.55 ยอด ซึ่งการเลี้ยงทั้ง 2 ระยะเวลาให้จำนวนยอดไม่แตกต่าง กันทางสถิติ การเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ระดับความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เนื้อเยื่อมีการพัฒนา ไปเป็นแคลลัสสูงในทุกระยะเวลาการเลี้ยง ที่ระยะเวลา 6 และ 8 สัปดาห์ให้จำนวนยอดต่อชิ้น และ จำนวนยอดรวมต่ำกว่า TDZ ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญ และยอดที่ได้มี ลักษณะสั้นและแคระแกร็น บางส่วนมีการเกิดลักษณะใบด่าง เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนข้อของพันธุ์ ลินเนตมาเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 0.10-0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารสูตรที่เติม BA 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรเปรียบเทียบ) เป็นระยะเวลา 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ แล้วย้ายไปยัง อาหาร MS ที่ปราศจากฮอร์โมนเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของ TDZ ให้ จำนวนยอดรวมเฉลี่ยในทุกระยะเวลาการเลี้ยงมากกว่า BA อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) สำหรับ อาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวเพื่อเพิ่มจำนวนยอด ได้แก่ อาหารที่เติม TDZ เข้มข้น 0.40 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยให้จำนวนยอดต่อชิ้นสูงสุด 5.56 ยอด และจำนวนยอดรวมสูงสุด 547.90 ยอดมากกว่าอาหารสูตรเปรียบเทียบ 5.6 และ 6.8 เท่า ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อของหน้าวัวพันธุ์ทรอปพิคอล ในอาหารสูตรที่เติม TDZ 0.10,

0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับ BA0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4, 6 และ 8 สัปดาห์ จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหารที่ต่างกันให้จำนวนยอดต่อชิ้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ให้จำนวนยอดรวมต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดย TDZ 0.25-0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นช่วงความเข้มข้นที่มีการชักนำให้เกิดยอดสูง ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด และจำนวนเฉลี่ยสูงกว่าสูตรเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญ($P<0.05$) และมีแนวโน้มในการเกิดจำนวนยอดสูงสุดเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี TDZ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ โดยให้จำนวนยอดต่อชิ้น 2.50 ยอด ซึ่งมากกว่าสูตรเปรียบเทียบ 1.4 เท่า และเกิดจำนวนยอดรวม 239.75 ยอด ซึ่งมากกว่าสูตรเปรียบเทียบ 4.1 เท่า ผลการทดลองแสดงว่าปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำยอดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อที่มีตาติดของหน้าวัว ได้แก่ ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ระยะเวลาเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมถึงพันธุกรรมของหน้าวัว

อัญชิสา ปานแก้ว นงลักษณ์ เทียนเสรี และสนธิชัย จันทร์เปรม (2555) ได้ศึกษาผลของชนิดของเนื้อเยื่อและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำพันธุ์โคราช โดยใช้ชิ้นส่วนก้านช่อดอกอ่อน และก้านใบอ่อน ทดสอบกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ NAA ที่มีต่อการชักนำแคลลัส และผลของ BA ที่มีผลต่อการชักให้เกิดการพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ พบว่า ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัส คือ ก้านใบอ่อน และอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ เพียงอย่างเดียวความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากก้านใบอ่อน โดยแคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็น compact callus ซึ่งมีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดี และเมื่อย้ายแคลลัสนั้นมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ทุกสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ และเกิดยอดได้ดีที่สุดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้ดี

อนุพันธ์ กงบังเกิด และพันธิตรา กมล (2006) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นที่ปลอดเชื้อของกระเจียวขาวพันธุ์ป่าบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) (1962) ที่เติมฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนิน BAP Kinetin และ TDZ ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการสร้างยอดได้มากที่สุด คือ 2.7 ยอดต่อชิ้นส่วน และในการทดลองชักนำให้เกิดรากจากต้นใหม่ โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรที่เติมฮอร์โมนในกลุ่มของออกซิน NAA, IAA และ IBA ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม

ต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนรากได้สูงสุดคือ 8.06 รากต่อชิ้นส่วน สำหรับการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP 0, 1.0, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดได้สูงสุด 2.88 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่ชิ้นส่วนต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด 8.33 รากต่อชิ้นส่วน ทั้งนี้ไม่พบการสร้างแคลลัสขึ้นบนชิ้นส่วนใดๆ และพืชต้นใหม่ที่มีขนาดต้นสูงประมาณ 5-10 เซนติเมตร ที่ได้จากการทดลอง สามารถย้ายออกปลูกและเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมปกติ โดยมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด 75 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายเลี้ยงไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์