หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ข้าวเป็นอาหารหลักของประชากรเกือบทั่วโลกโดยเฉพาะประชากรในทวีปเอเชีย กว่า 80 เปอร์เซ็นต์บริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ข้าวเป็นสินค้าเศรษฐกิจหลักที่สำคัญมากที่สุดของประเทศไทย ทั้งต่อการค้าและการผลิตในภาคเกษตรและการส่งออก เป็นสินค้าที่ทำรายได้เข้าสู่ประเทศสูงสุดมาโดยตลอด ในปี พ.ศ. 2527 ประเทศไทยส่งออกข้าว 4.5 ล้านตัน ซึ่งทำรายได้เข้าสู่ประเทศ 2.5 หมื่นล้านบาท และเป็นประเทศส่งออกข้าวเป็นอันดับหนึ่ง รองลงมาคือ สหรัฐอเมริกาและปากีสถาน ตามลำดับ ในปี พ.ศ. 2527/2528 คาดว่าผลผลิตข้าวของโลกจะสูงขึ้น เนื่องจากคาดหมายว่าความสามารถในการผลิตของประเทศสหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย และสาธารณรัฐประชาชนจีนจะเพิ่มขึ้น (พีระเสถียร, 2527) สำหรับประเทศไทยผลผลิตข้าวต่อไร่ยังอยู่ในเกณฑ์ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับประเทศอื่น ๆ เช่น ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา หรือแม้แต่ประเทศมาเลเซีย จึงจำเป็นที่จะต้องหาวิธีเพิ่มผลผลิตต่อไร่ให้สูงขึ้น เพื่อให้ต้นทุนต่ำลง จะได้สามารถสู้กับราคาของตลาดโลกได้ (Vajrabhaya et al., 1984 a.)

ในการเพิ่มผลผลิตต่อไร่ให้อยู่ในเกณฑ์สูงนั้น อาจทำได้หลายวิธี อาทิ การปรับปรุงพันธุ์ การขยายเขตชลประทาน ตลอดจนหาวิธีบำรุงรักษาที่ดี และการปรับปรุงพันธุ์นี้อาจทำได้หลายวิธี เช่น การผสมและคัดเลือกพันธุ์ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมกันทั่วไป แต่ปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์หรือปล่อยให้เกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ แล้วคัดเลือกพันธุ์ที่เหมาะมาขยายพันธุ์โดยตรงหรือใช้เป็นแม่พันธุ์เพื่อผสมต่อไป ซึ่งวิธีนี้ประหยัดเวลาและเนื้อที่ในการคัดเลือกมาก

อย่างไรก็ดีการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อข้าวนั้น ยังประสพปัญหาพื้นฐานหลายประการที่สำคัญคือ การเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสยังอยู่ในอัตราต่ำ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับสาเหตุหลายประการ ได้แก่

1. อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งขึ้นอยู่กับ

ก. องค์ประกอบ ความเข้มข้นและสัดส่วนของธาตุอาหารอนินทรีย์ ซึ่งได้แก่ ธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง

ข. องค์ประกอบ ความเข้มข้นและสัดส่วนของสารอินทรีย์ได้แก่ วิตามิน กรดอมิโนต่าง ๆ สารควบคุมการเจริญเติบโตคือสารกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอน

ค. แรงดันออสโมซิสและความสมดุลย์ของอิออนในอาหาร

2. สิ่งแวดล้อมได้แก่

ก. แสง ขึ้นอยู่กับความเข้ม ความยาวคลื่น และช่วงแสง

ข. อุณหภูมิ

ค. ความชื้น

ง. แก๊ส เช่น ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และ เอทีลีน เป็นต้น

3. ชนิดของเซลล์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4. ลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมของพืช

5. อายุและส่วนต่าง ๆ ของพืชที่นำมาเลี้ยง (Staba, 1980, Nabors et al., 1984)

การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มได้รับความสนใจเมื่อประมาณสิบกว่าปีที่ผ่านมา และกำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาเทคนิคต่าง ๆ ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว แต่ก็ประสพปัญหาในการชักนำเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าวให้เกิดแคลลัส และในการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ โดยเฉพาะการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ยังอยู่ในอัตราต่ำ (Yoshida et al., 1983, Zapata et al., 1983, Vajrabhaya et al., 1984 a)

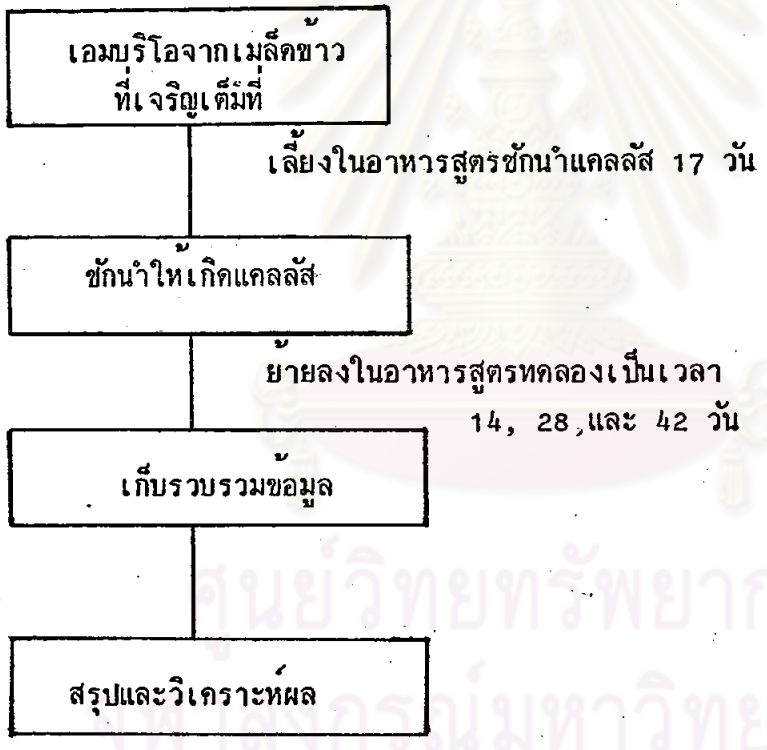
<u>วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย</u>

เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นและสัดส่วนของธาตุอาหารหลักที่สามารถชักนำให้แคลลัสของข้าวเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ โดยแบ่งการศึกษาเป็น 2 ขั้นตอนคือ

ขั้นตอนแรกศึกษาความเข้มข้นและสัดส่วนของไนเตรต แอมโมเนียม ฟอสฟอรัส และ โปแตส-เซียมในสูตรอาหารหลักของ White (1963) ขั้นตอนที่สองนำสูตรทดลองที่คัดเลือกจากขั้นตอนแรก 5 สูตรทดลอง มาศึกษาความเข้มข้นและสัดส่วนของแคลเซียมและแมกนีเซียม เพื่อหาความเข้มข้นและสัดส่วนของธาตุอาหารหลักที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสของข้าวให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ได้มากที่สุด

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสังเขป

การวิจัยนี้ได้ใช้แคลลัสที่ชักนำจากเอมบริโอของเมล็ดแก่เลี้ยงในสูตรอาหารของ Vajrabhaya et al (1983) จากนั้นจึงนำแคลลัสที่ได้ไปทำการทดลองต่อไป ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 1



แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการวิจัยโดยสังเขป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสำรวจเอกสาร

ปัจจุบันความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่จากแคลลัสของข้าวยังคงต่ำอยู่ (Yamada, 1982, Nabors, 1983, Vajrabhaya et al; 1984a) ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่จากแคลลัสเป็นสิ่งสำคัญสิ่งหนึ่งในการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อสามารถคัดเลือกเซลล์ที่มีลักษณะที่ต้องการได้แล้ว เช่นลักษณะทนต่อความแห้งแล้ง ทนต่อความเค็มหรือทนต่อยาปราบวัชพืชเป็นต้น ก็จะต้องชักนำให้เซลล์ที่มีลักษณะที่ต้องการหรือที่เป็นประโยชน์นี้สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ได้มาก ๆ (Yamada, 1982) ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ของข้าวจากแคลลัส พบว่าแคลลัสที่ได้จากการชักนำเอมบริโอข้าวให้เกิดแคลลัสมี 2 ชนิด คือ embryogenic (E) callus ซึ่งมีสีเหลืองอ่อนและแน่น และ non-embryogenic (NE) callus ซึ่งมีสีขาวใสอยู่กันอย่างหลวม ๆ เฉพาะ E.callus เท่านั้นที่ให้ greenspot ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นหน่อและต้นที่สมบูรณ์ได้ในเวลาต่อมา (Nabors ,1983, วัชราภัย และพูนทรัพย์, 2527) แคลลัสหรือเซลล์สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ได้ 2 วิธี คือ 1. โดยทางตาหน่อซึ่งมีการเจริญแบบทางเดียว (unipolar) ไปเป็นหน่อ การเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่เป็นแบบ organogenesis โดยเจริญจากกลุ่มเซลล์เมอริสเตมอยด์ (meristemoid) 2. โดยทางเอมบริโอร่างกาย ซึ่งมีการเจริญแบบสองทาง (bipolar)ไปเป็นหน่อและราก การเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่จะเป็นแบบ embryogenesis โดยเจริญจากเซลล์ซึ่งมีการพัฒนาไปเป็นเอมบริออยด์ (Kohlenbach, 1977, Dodds และ Roberts, 1982) Genovesi และ Magill (1982) ศึกษาการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่จากแคลลัสของเรณูข้าว พบว่าหน่อและรากเกิดจากการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ทั้งแบบ organogenesis และ embryogenesisและเชื่อว่าส่วนใหญ่เป็นแบบ embryogenesis และ Raghava Ram และ Nabors (1984) ศึกษาแคลลัสของเอมบริโอข้าวก็ได้ผลคล้ายคลึงกัน อย่างไรก็ตามวัชราภัยและพูนทรัพย์ (2527) ศึกษาการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่จากแคลลัสของเอมบริโอข้าวพบว่าเป็นแบบ organogenesis เช่นเดียวกับ Yamada (1982) ศึกษา ซึ่งการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่จะเป็นแบบใดนั้นพบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและชนิดของฮอร์โมนพืชคือ ออกซินและไซโตไคนินมีบทบาทสำคัญอย่างเห็นได้ชัด (Murashige, 1977) และได้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ

ฮอร์โมนพืชที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นไว้หลายท่าน อาทิ Kohlenbach (1977), Dodds และ Roberts (1982) Genovesi และ Magill (1982) Yamada (1982) Nabors (1983) Vajrabhaya et al. (1984 a) Ling et al. (1984) และ Brar et al. (1984) เป็นต้น

Dougall (1981) รายงานว่า นอกเหนือจากออกซินและไซโตไคนินที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นแล้ว องค์ประกอบของอาหารอื่น ๆ ได้แก่ น้ำตาล แหล่งไนโตรเจน โปแตสเซียม ฟอสฟอรัส pH และบัฟเฟอร์ในอาหารที่เลี้ยงเนื้อเยื่อ ก็มีบทบาทเพิ่มจำนวนต้นหรืออย่างน้อยที่สุดก็กรณีใดกรณีหนึ่ง

ในการศึกษาบทบาทของน้ำตาลนั้น Tran Thanh Van(1977) พบว่าปริมาณน้ำตาลในอาหารมีผลต่อการเกิดดอกในเนื้อเยื่อยาสูบที่เลี้ยง และกลูโคสเหมาะในการชักนำให้เกิดดอกมากกว่าน้ำตาลชนิดอื่น Brown และคณะ (1976) ศึกษาปริมาณน้ำตาลที่มีผลต่อการเกิดหน่อในเนื้อเยื่อยาสูบที่เลี้ยงพบว่าซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นปริมาณที่พอเหมาะ Ling และคณะ (1984) รายงานว่าซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์เหมาะในการชักนำให้เกิด embryogenic callus และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นของข้าว ในขณะที่ Vajrabhaya และคณะ (1984 a) พบว่า embryogenic callus มี greenspot ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นข้าวได้ในอาหารที่มีน้ำมะพร้าว โดยไม่ต้องเติมซูโครส และการเติมซูโครสทำให้ greenspot ลดลง

แหล่งไนโตรเจนและโปแตสเซียมก็มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มผลผลิตที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Murashige และ Skoog, 1962) Eeuwen, 1976 ศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อมะพร้าวพบว่าองค์ประกอบของเกลือแร่ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต Ohira และคณะ (1973) ศึกษาความต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าว โดยแบ่งการศึกษาเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกศึกษาผลของธาตุอาหารอนินทรีย์ อีกกลุ่มศึกษาผลของสารอาหารอินทรีย์เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารอาหารทั้งสองกลุ่มเป็น 2 และ 5 เท่า และลดลงครึ่งเท่าของสูตรอาหารมาตรฐาน B5 พบว่าธาตุอาหารอนินทรีย์ที่เพิ่มเป็น 2 เท่า ให้ผลผลิตดีที่สุด และเมื่อเพิ่มเฉพาะธาตุอาหารหลักซึ่งได้แก่ NO_3-N NH_4-N P K Ca Mg และ S เป็น 2 เท่าของ B5 พบว่าเมื่อเพิ่ม NO_3-N NH_4-N K และ P เป็น 2 เท่า ให้ผลผลิตและอัตราการเจริญเติบโตดีอย่างเห็นได้ชัด และสรุป

ว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนและโปตัสเซียมถ้าเพิ่มขึ้นจะให้ผลผลิตดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของธาตุอาหารที่ศึกษานี้ให้ผลดีกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองและยาสูบด้วย

ไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อจะใช้ในรูปไนเตรตและ/หรือรีดิวซ์ไนโตรเจน ซึ่งอาจใช้ในรูปแอมโมเนียมหรือกรดอมิโนอื่น ๆ เช่น กลูตามีน อลานีน เป็นต้น พบว่าหากใช้ไนโตรเจนในรูปไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว หรือการใช้ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมเพียงอย่างเดียวจะทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์และการเกิดแอมบริโอต่ำ โดยเฉพาะการใช้แอมโมเนียมเพียงอย่างเดียวจะทำให้อาหารที่เลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีสภาพเป็นกรดอย่างรวดเร็วจนถึงจุดที่เซลล์ไม่สามารถเจริญได้ (Halperin และ Wetherell, 1965, Wetherell และ Dougall, 1976) Eeuwen (1976) รายงานว่าไนเตรตและแอมโมเนียมถ้าใช้เดี่ยว ๆ สนับสนุนการเจริญเติบโตน้อยมาก แต่ถ้าใช้ด้วยกันนอกจากจะสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เลี้ยงแล้วยังปรับ pH ของอาหารให้เหมาะสมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ด้วย ซึ่งตรงกับรายงานของ Wetherell และ Dougall (1976) กรณีที่ใส่แอมโมเนียมเพียงอย่างเดียวต้องควบคุม pH ไม่ให้ต่ำมากโดยใช้กรดไดคาร์บอกซีลิค ซึ่งเป็นกรดอนินทรีย์ที่ใช้ทำหน้าที่บัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Gamborg และ Shyluk, 1970, Behrend และ Mateles, 1976, Wetherell และ Dougall, 1976) Ohira และคณะ (1973) ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ข้าว และรายงานว่า pH เริ่มต้นของอาหารในช่วง 4-7 ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตาม Wetherell และ Dougall (1976) พบว่า pH ของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อระหว่าง 5-6 เป็นช่วงที่เหมาะสมที่พืชสามารถนำแอมโมเนียมไปใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบได้ Halperin และ Wetherell (1965) และ Halperin (1966) ศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อแคร์รอทบ่าพบว่า แอมโมเนียมหรือกรดอมิโนตัวใดตัวหนึ่งหรือหลายตัวจะส่งเสริมให้เนื้อเยื่อที่เลี้ยงมีความสามารถในการเจริญไปเป็นเอมบริโอสูงในขณะที่ไนเตรตสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่ไม่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญไปเป็นเอมบริโอ นอกจากนี้ในการศึกษาการเจริญเติบโตของข้าว Shen (1969) รายงานว่าแอมโมเนียมส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวและความต้องการแอมโมเนียมของข้าวสืบเนื่องมาจากการปรับตัวให้เข้ากับสภาพดินในนาที่มีน้ำท่วมขังตามธรรมชาติ ซึ่งมีแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญ และ Kaul และ Sabharwal (1972) พบว่าแอมโมเนียมจำเป็น

สำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อพวกพืชใบเลี้ยงเดี่ยว อย่างไรก็ตาม Sargent และ King (1974) รายงานว่าแม้ว่าการใส่แอมโมเนียมและไนเตรตลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วเหลืองและข้าวจะทำให้มีการเจริญเติบโตดีกว่าการใส่ไนเตรตเพียงอย่างเดียว แต่เมื่อศึกษาในพืชอื่น ๆ เช่น ข้าวสาลี ยาสูบ Vicia เป็นต้น การใส่แอมโมเนียมกลับไม่ส่งเสริมการเจริญ Behrend และ Mateles (1975) ศึกษาเมตาโบลิซึมของไนโตรเจนในยาสูบ มะเขือเทศ แคร์รอท และถั่วเหลือง พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีไนเตรตหรือยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน นั้นกรดอมิโนเช่น ทรีโอนีน อาร์จินีน เป็นต้น จะยับยั้งการนำแอมโมเนียมไปใช้สร้างกรดอมิโนภายในเซลล์ แต่ถ้าเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน กรดอมิโนในอาหารจะไม่สามารถยับยั้งขบวนการดังกล่าวได้ เนื่องจากกรดอมิโนเหล่านี้ไปยับยั้งการทำงานของ NADH (nitrate oxidoreductase) Yamaya และคณะ (1977) พบว่าการเลี้ยงเซลล์ข้าวในสูตรอาหาร R-2 ซึ่งมีไนเตรต 40 mM จะเพิ่มไนเตรตในเซลล์และการเติมแอมโมเนียม 5 mM ลงไปในอาหารจะส่งเสริมการสะสมไนเตรตและชักนำการทำงานของ NADH พบว่ามีไนเตรตสะสมภายในเซลล์ในระดับสูง เมื่อเซลล์เลี้ยงในอาหารที่มีไนเตรต 10-40 mM และไม่ได้ใส่ซูโครสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งแสดงว่าซูโครสในอาหารไม่มีผลต่อการสะสมไนเตรตในระยะการเจริญเติบโตช่วงแรก ความต้องการไนเตรตและแอมโมเนียมเพื่อการเจริญเติบโตดีที่สุดในพืชแต่ละชนิดที่ศึกษาจะแตกต่างกันไป เช่น Ohiraและคณะ (1973) ศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพบว่าจะมีการเจริญเติบโตดีเมื่ออาหารที่เลี้ยงเนื้อเยื่อมีไนเตรต 40 mM มีแอมโมเนียม 5 mM Wetherell และ Dougall (1976) ศึกษาการเจริญเติบโตและการเกิดเอมบริโอในแคร์รอทว่าจะดีที่สุดเมื่อ NH_4Cl 10 mM KNO_3 40 mM Eeuwens (1976) ศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อมะพร้าว พบว่าแคลลัสจะเจริญเติบโตดีและมีสีน้ำตาลที่ผิวแคลลัสเพียงเล็กน้อยเมื่อ NH_4Cl 10 mM KNO_3 20 mM

Brown และคณะ (1976) ศึกษาความต้องการโปแตสเซียมของเซลล์แคร์รอทว่าพบว่าความต้องการโปแตสเซียมของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงไม่ขึ้นกับแอมโมเนียมในอาหารนั้น และความต้องการโปแตสเซียมสำหรับการเกิดเอมบริโอก็ไม่ขึ้นกับความต้องการโปแตสเซียมในการเจริญเติบโต เขาพบว่า แคร์รอทว่าต้องการโปแตสเซียม 1 mM เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์ และใช้โปแตสเซียม 20 mM เพื่อให้เกิดเอมบริโอมากที่สุด นอกจากนี้

ยังพบว่าทั้งโซเดียมและแอมโมเนียมจะใช้แทนโปแตสเซียมไม่ได้ แม้ว่าแหล่งไนโตรเจนจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและการเกิดเอมบริโอ แต่ก็มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตหรือการเกิดเอมบริโอแตกต่างกัน นอกจากนี้เขายังพบว่า โปแตสเซียมในรูป KCl จะให้ผลดีกว่าในรูป K_2SO_4 และ KH_2PO_4 ตามลำดับ โปแตสเซียมเข้มข้น 11 และ 21 mM แอมโมเนียม 1 และ 5 mM ช่วยกระตุ้นการเกิดเอมบริโอ และ KCl 11 และ 20-30 mM NaCl 30 mM ให้จำนวนต้นมาก Eeuwens (1976) พบว่าเมื่อโปแตสเซียมความเข้มข้น 10-40 mM ฟอสฟอรัส 0.5-2 mM และแคลเซียม 0.5-2.0 mM กระตุ้นการเจริญเติบโตของแคลลัสมะพร้าวอย่างมีนัยสำคัญ แมกนีเซียมความเข้มข้น 0.5-2 mM ให้ผลไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามพบว่าแมกนีเซียม แคลเซียม และโปแตสเซียมมีความสัมพันธ์ระหว่างกัน Veliky และคณะ (1977) ศึกษาใน Morning glory พบว่าแมกนีเซียมความเข้มข้นต่ำกว่า 0.3 mM ก็เพียงพอต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ การที่เซลล์ที่เลี้ยงมีแมกนีเซียมสะสมมากขึ้นเนื่องจากอาหารที่เลี้ยงมีแมกนีเซียมมากประมาณ 10 mM จะลดการเจริญเติบโตของเซลล์ลงเล็กน้อย ซึ่งแสดงว่าถ้ามีแมกนีเซียมในอาหารมากเกินไปก็จะมีความเป็นพิษในระดับต่ำ เมื่อ pH ของอาหารเพิ่มขึ้นเซลล์จะได้รับแมกนีเซียมมากขึ้น การใส่แมกนีเซียมลงไปในอาหารมากจึงไม่ควรทำ อย่างไรก็ตามควรเติมแมกนีเซียมลงไปในอาหารที่เลี้ยงเนื้อเยื่อจะช่วยลดความเป็นพิษของธาตุอื่น ๆ เช่น โคบอลท์ เป็นต้น

Miller และ Murashige(1976) ศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์พืชประเภทไม้ประดับในเขตร้อนหลายชนิดพบว่า เมื่อเพิ่มฟอสเฟตมากกว่าปริมาณที่ใช้ในสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (1962) ลงในอาหารที่เลี้ยงเนื้อเยื่อจะเพิ่มจำนวนหน่อและความยาวของหน่อ Eeuwens (1976) รายงานว่าในการเลี้ยงเนื้อเยื่อมะพร้าว โซเดียม คลอไรด์ และซัลเฟอร์ เป็นธาตุที่มีความจำเป็นต้องใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์น้อยมาก Smith (1975) พบว่าปริมาณซัลเฟตภายในเซลล์ยาสูบเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมการนำซัลเฟตเข้าไปภายในเซลล์ Ohiraและคณะ (1975) ศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว พบว่า ข้าวต้องการธาตุอาหารรองคือเหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดง โบรอน และโมลิบดีนัมในการเจริญเติบโตของเซลล์ และถ้าไม่มีเหล็กและสังกะสีจะทำให้การเจริญของข้าวลดลงอย่างเห็นได้ชัด ความต้องการแมงกานีสของข้าวต่ำกว่าพืชอื่น ๆ ที่เคยศึกษา เมื่อขาดเหล็กก็จะทำให้กรดอมิโนบางตัวและเอไมด์สะสมในเซลล์และอาหารที่เลี้ยง ถ้า

ขาดสังกะสีเซลล์จะมีโปรตีนน้อยมากและมีกรดอมิโนบางตัวและเอไมด์สะสม และถ้าขาดทั้งสังกะสีและเหล็กก็จะทำให้การนำเอาออกซิเจนไปใช้ในระบบหายใจลดลง

นอกจากฮอร์โมนพืช และแหล่งคาร์บอนแล้วสารอาหารอินทรีย์ที่สำคัญในการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่ออีกอย่างหนึ่งคือวิตามิน วิตามินที่จำเป็นในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อคือไทอามีน (Ohira et al., 1976; Huang และ Murashige, 1976, Gamborg et al., 1976; Shannon และ Liu, 1977) ซึ่งจะขาดไม่ได้ ไทอามีนจะใช้ในรูปไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้นระหว่าง 0.1 ถึง 30 มก./ล. ความต้องการไทอามีนสำหรับการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อจะมีมากเมื่อมีฮอร์โมนไซโตไคนินในระดับต่ำ และพบว่าเมื่อความเข้มข้นของไซโตไคนินสูงพอควรคือประมาณ 0.1 ถึง 10 มก./ล. เซลล์ยาสูบสามารถเจริญได้โดยไม่ต้องเติมไทอามีนในอาหารที่เลี้ยง (Digby และ Skoog, 1966) และไซโตไคนินนี้มีมากในน้ำมะพร้าว (Salisbury และ Ross, 1977)

<u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย</u>

คาดว่าจะทราบสัดส่วนของธาตุอาหารหลักคือ N P K Ca และ Mg ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสของข้าวมี differentiation ไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ เพื่อที่จะได้นำไปประยุกต์ใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าว หรือ งานวิจัยอื่นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย