

# ความรู้เบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์

## ขั้นตอนการขยายพันธุ์ (stages of propagation by tissue culture)

ขั้นตอนหลักในการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มี 3 ระยะ ซึ่งอาจมีความแตกต่างกันบ้างในรายละเอียดในแต่ละชนิดของพืช แต่หลักใหญ่ ๆ แล้วเหมือนกัน ซึ่งแยกขั้นตอนตามระยะต่าง ๆ ได้ดังนี้

### ระยะที่ 1 เริ่มเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. เลือกต้นแม่ที่มีลักษณะตามที่ต้องการ
2. ตัดชิ้นส่วนที่จะเพาะเลี้ยง
3. ตัดแต่งส่วนที่ไม่ต้องการทิ้ง
4. ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว
5. ล้าง
6. เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารที่เหมาะสม

### ระยะที่ 2 เพิ่มปริมาณ

7. ย้ายลงอาหารที่เพิ่มปริมาณ
8. เร่งให้เกิดยอดหรือต้นและราก

### ระยะที่ 3 ย้ายออกสู่สภาพแวดล้อมภายนอก

9. ย้ายยอดหรือต้นลงดินหรือเครื่องปลูกโดยค่อย ๆ ลดความชื้นและเพิ่มความเข้มแสงเพื่อให้ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมภายนอก

## ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง (explants)

การเลือกชิ้นส่วนพืชจากต้นพืชเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นับว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อความสำเร็จในการขยายพันธุ์ ชิ้นส่วนพืชอาจเป็นเนื้อเยื่อเจริญ (meristems) เนื้อเยื่อ (tissue) หรือ อวัยวะ (organs) ซึ่งจะต้องได้จากต้นที่แข็งแรงสมบูรณ์ (vigorous plants) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับอายุของต้นพืช การปลูกดูแลรักษาสภาพแวดล้อมที่ต้นพืชนั้นได้รับและรวมถึงฤดูกาลด้วยชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดี ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญ ตายอด (apical buds) ตาข้าง (axillary buds หรือ lateral buds) ช่อดอก (inflorescence) ใบ (leaves) และราก (root)

## การเลือกชิ้นส่วน

ขนาดของเนื้อเยื่อ โดยเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่จะง่ายต่อการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์และเชื้อโรคต่าง ๆ ขณะที่เนื้อเยื่อขนาดเล็กมีโอกาส หลีกเลี่ยงการปนเปื้อนได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามขนาดของเนื้อเยื่อที่เล็กที่สุดที่มีประสิทธิภาพเป็นสิ่งที่ควรพิจารณา เนื่องจากเนื้อเยื่อเจริญที่มีขนาดเล็กเกินไปอาจโตช้า และไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเท่าเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ หากเกิดสภาพเครียดหรือช็อคจากการแยก ในทางปฏิบัตินิยมแก้ไขโดยเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดเล็กหลาย ๆ ชิ้นในภาชนะ (ขวด) เดียวกันเพื่อกระตุ้นให้มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงมากขึ้นแต่อาจเกิดปัญหาอิทธิพลของชิ้นส่วนจากแคลลัสที่โตเร็วกว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพียงชิ้นเดียวมาก ทำให้ต้องย้ายเนื้อเยื่อและเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้งขึ้นซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองทั้งเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่าย ทั้งยังเพิ่มความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนมากขึ้นด้วย

### 1. การเลือกต้นแม่พันธุ์ ควรพิจารณาดังนี้

1.1 พันธุ์ นอกจากการเลือกชนิดพืชที่ต้องการแล้ว นิสยของพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ง่าย หรือมีการสร้างรากง่ายขึ้นอยู่กับพันธุกรรม ถ้าเป็นไปได้ควรเลือกหลายพันธุ์ เนื่องจากบางพันธุ์อาจขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ง่ายกว่าพันธุ์อื่น โดยทั่วไปพืชที่ขยายพันธุ์ง่ายด้วยวิธีการปักชำ มักจะขยายพันธุ์ได้ง่ายโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2 สภาพของต้นแม่พันธุ์ ชิ้นส่วนพืชที่เริ่มต้น ที่จะนำมาเลี้ยงควรมาจากต้นที่แข็งแรง จะทำได้สำเร็จมากกว่า การนำมาจากต้นที่อ่อนแอ

1.3 หลีกเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้จากต้นแม่พันธุ์ที่เป็นโรค ควรเลือกเฉพาะเนื้อเยื่อที่สมบูรณ์แข็งแรงปลอดโรค

**2. ชิ้นส่วนของพืช (explant)** ทุกส่วนของพืชที่ประกอบด้วยเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่สามารถนำมาทำการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ทั้งนั้น แต่ความสามารถในการเจริญเติบโตอาจแตกต่างกันเพราะเซลล์แต่ละชนิดมีความตื่นตัว (active) ไม่เท่ากัน เนื้อเยื่อพืชที่มีเซลล์ตื่นตัวมากที่สุดคือเนื้อเยื่อเจริญ ซึ่งพบได้ในส่วนต่าง ๆ ดังนี้

2.1 ส่วนปลายยอดของลำต้น (shoot apex) เป็นบริเวณที่เซลล์มีการแบ่งตัวมากที่สุด ส่วนนี้นับจากปลายยอด สุดลงมาไม่เกิน 5 มิลลิเมตร

2.2 ส่วนปลายราก (root apex) ถัดจากส่วนของหมวกราก ก็จะมีส่วนที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญคล้ายกับ ส่วนของปลายยอด

2.3 เนื้อเยื่อเจริญในท่อลำเลียง (vascular cambium) เป็นเนื้อเยื่อเจริญที่พบในส่วนของลำต้นและราก ซึ่งอยู่ ระหว่างกลุ่มของท่ออาหาร และท่อน้ำ

2.4 เนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ระหว่างปล้อง (intercalary meristem) ซึ่งจะพบในพืชพวก ใบเลี้ยงเดี่ยว ทำหน้าที่ ใน การเพิ่มความยาวของปล้อง นอกจากนี้มีเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ ที่สามารถนำทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้มีดังนี้

- ส่วนของเปลือกชั้นใน (inner bark) ซึ่งส่วนนี้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อของชั้น phloem และ cortex
- ส่วนไส้ (pith) เป็นส่วนที่ในใจกลางสุดของลำต้นซึ่งประกอบด้วยเซลล์พวก parenchyma
- ใบ (leaf) ในส่วนของใบมีเซลล์ของแผ่นใบที่เรียกว่า palisade parenchyma และ spongy parenchyma อยู่จำนวนมาก ซึ่งนิยมใช้สำหรับแยกโพรโทพลาสต์
- ดอก (flower) ส่วนของดอกส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์พวก parenchyma ยกเว้นในส่วนของก้านดอก (peduncle) และฐานรองดอก (receptacle) ซึ่งอาจมีเนื้อเยื่อเจริญอยู่ด้วย ยกตัวอย่างในฐานรองดอกของเยอบีราและ เบญจมาศที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดี- ผล (fruit) เนื้อเยื่อของผลส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์พวก parenchyma โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลสด (fleshy fruit) ชนิดที่ผลมีเปลือกหุ้มผลนั้นทั้งผล มักมีเมล็ดมากมาย (berry) เช่น กล้วย มะละกอ ละคร ส่วนผลมีผนังชั้นนอกของเปลือกหุ้มผล พัฒนามาจากฐานรองดอก เมื่อผลแก่ผนังนี้จะแข็งและเหนียว แน่น ภายในผลนั้นทั้งผล (pepo) เช่น พืชตระกูลแตง เป็นต้น และผลที่มีเปลือกหุ้มผลคล้ายหนังและมีต่อมน้ำมันจำนวนมาก ข้างในผลแยกเป็นส่วนๆ ซัดเจน (hesperidium) เช่น พืชตระกูลส้ม เป็นต้น
- เมล็ด (seed) ในส่วนของเมล็ดซึ่งประกอบด้วยคัพภะ (embryo) ใบเลี้ยง (cotyledon) และ endosperm ทั้งสามส่วนนี้ให้ความสำเร็จสูงในการเพาะเลี้ยง

### การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนพืช (surface sterilization)

ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงมักจะมีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ที่ผิว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องฟอก ฆ่าเชื้อที่ผิวก่อนเพื่อ ปลอดเชื้อที่ทำให้เปลี่ยนสภาพของอาหารเน่าเสียจนชิ้นส่วนพืชไม่สามารถเจริญพัฒนาต่อไปได้ การฟอกฆ่าเชื้อส่วนใหญ่ เริ่มต้นโดยล้างด้วยน้ำผงซักฟอกอ่อน ๆ (mild detergent) ก่อน แล้วล้างตามด้วยน้ำประปาเปิดให้ไหล จากนั้นใส่ชิ้น ส่วนพืชในสารละลายฆ่าเชื้อ ส่วนใหญ่นิยมใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) เข้มข้น 0.5-5 % (สาร Clorox มี NaOCl เข้มข้น 5.25 %) เขย่าเบา ๆ นาน 5-30 นาที แล้วจึงล้างน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 - 3 ครั้งจากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร วิทยาศาสตร์โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

### การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วน

เนื้อเยื่อที่จะนำมาเพาะเลี้ยงจะต้องผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจมีติดอยู่ที่บริเวณผิวของเนื้อเยื่อ ออกเสียก่อนด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (sterilizing agent) ซึ่งมีอยู่หลายชนิด การเลือกชนิดของน้ำยาฆ่าเชื้อและสภาวะที่ เหมาะสมสำหรับเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงซึ่งจะต้องทดลองหาในแต่ละชนิดพืช สารเคมีที่นิยม ใช้ในห้องปฏิบัติการใช้คือ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) แคลเซียมไฮโปคลอไรต์

(calcium hypochlorite)ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) เป็นต้น ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้น้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในบ้าน เช่น Clorox ผลิตภัณฑ์นี้มีโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 5.25 % อัตราที่ใช้ คือ 10-20 % สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์จะทำงานได้ไม่ดีเมื่อมี pH มากกว่า 8 และจะมีประสิทธิภาพสูงที่สุดเมื่อสารละลายมี pH 6 และเพื่อให้การทำงานของคลอรีนมีประสิทธิภาพมากขึ้น ในการฆ่าเชื้อบริเวณผิวพืช ควรเติมสบู่เหลวเข้าไปในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ เช่น Tween20 2 - 3 หยด ถ้าไม่สามารถใช้น้ำยาล้างจาน และในขณะที่ทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวพืช ต้องเขย่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ตลอดเวลาหรืออาจวางบนเครื่องเขย่าได้ เวลาในการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ว่าทนต่อสารละลายคลอรีน นานแค่ไหนถ้ามีความทนทานมากก็ใช้เวลาสั้นขึ้นได้มีสารเคมีหลายชนิดและวิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการทำความสะอาดให้ตัวอย่างพืชให้มีความปลอดภัย ซึ่งผู้ทำการเพาะเลี้ยงต้องใช้ดุลยพินิจในการเลือกใช้ให้เกิดความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชและประสิทธิ

### ภาพที่จะได้รับ ซึ่งมีแนวทางในการเลือกใช้ ดังนี้

1. มีประสิทธิภาพดี ให้เปอร์เซ็นต์ความปลอดภัยสูง
2. ราคาไม่แพง และหาซื้อได้ง่าย
3. เตรียมได้ง่าย ไม่มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก
4. ไม่เป็นอันตราย หรือมีอันตรายน้อยที่สุดต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคนและชั้นตัวอย่างพืช

### ตัวอย่างการฟอกฆ่าเชื้อตายอดและตาข้าง

ตายอดและตาข้างเป็นชิ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) ที่มีการตื่นตัว (active) อยู่ตลอดเวลา เหมาะแก่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งจะมีเปอร์เซ็นต์ ความสำเร็จสูง มีขั้นตอนดังนี้

1. ตัดเอาส่วนของยอดหรือตามาทำการแยกเอาใบและก้านใบออกให้หมด หรือถ้ามีใบเก็ดที่ห่อหุ้มตายอดก็ให้แกะออกจนสังเกตเห็นส่วนของตา
2. แช่ในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 % หรือสารละลายโซเดียม ไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 2 % เติม tween -20 ในอัตราส่วน 1 หยด ต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร หรือประมาณ 0.01 % เพื่อช่วยให้สารละลายจับกับผิวตัวอย่างได้ดี
3. ทำการเขย่าเป็นระยะ ๆ หรือวางไว้บนเครื่องเขย่าเป็นเวลาประมาณ 15 นาที
4. ล้างเอาสารละลายออกด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที
5. ย้ายตัวอย่างไปวางผึ่งบนจานแก้วให้แห้งพอหมาด ๆ แล้วทำการตัดแต่งพืชตัวอย่าง เพื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไป

### ตัวอย่างการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของแผ่นใบ

ใบพืชเป็นอวัยวะที่ค่อนข้างจะบอบบางเนื่องจากประกอบด้วยเนื้อเยื่อเพียงไม่กี่ชั้นเซลล์ โอกาสที่เนื้อเยื่อจะตายหรือได้รับอันตรายจากสารเคมีที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อมีมาก จึงมีความจำเป็นที่ต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ มีขั้นตอนดังนี้

1. เลือกใบพืชที่สมบูรณ์ มาทำความสะอาดด้วยน้ำสบู่ เพื่อขจัดคราบฝุ่นและเศษซากของแมลงที่อาจติดอยู่กับใบ และเป็นการช่วยลดแรงตึงผิวของใบด้วย
2. แช่ใบในสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 5 % เวลาประมาณ 10 นาที โดยทำการเขย่าเป็นระยะ ๆ หรือวางบนเครื่องเขย่า
3. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ ประมาณ 5 นาที
4. ย้ายตัวอย่างลงในจานแก้ว เพื่อทำการตัดแต่งตัวอย่าง และทิ้งไว้ให้แห้งพอหมาด ๆ จึงย้ายลงเลี้ยงในอาหาร

### ตัวอย่างการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดพืช

เมล็ดพืชเป็นอวัยวะที่มีความแข็งแรงทนทานกว่าส่วนอื่น ๆ สามารถทนต่อสารเคมีที่มีความเข้มข้นสูง ๆ ได้ดี จึงเป็นการสะดวกในการฟอกฆ่าเชื้อ ประกอบกับเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเมล็ด คือ คัพภะ และใบเลี้ยง มีสภาพที่

ความปลอดภัยสูง จึงเหมาะแก่การใช้ในการเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเนื่องจากเมล็ดพืชมีความแตกต่างกันมากจึงมีเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อแตกต่างกันด้วยดังนี้

## 1. การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่มีลักษณะแข็ง เช่น ถั่วต่าง ๆ หน่อไม้ฝรั่ง หน่อหน่า เป็นต้น มีขั้นตอนดังนี้

- (1) แช่เมล็ดในแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95 % นานประมาณ 5 นาที เพื่อการฆ่าเชื้อที่ติดมากับเมล็ด และช่วยขจัดคราบไขมันบริเวณผิวเมล็ด
- (2) ถ่ายเอาแอลกอฮอล์ออก ผึ่งเมล็ดไว้ให้แห้ง
- (3) แช่เมล็ดในสารละลายคลอริกซ์ ความเข้มข้น 20 % เติม tween-20 ประมาณ 0.01 % ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที
- (4) ทำการล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ ประมาณ 5 นาที
- (5) ย้ายเมล็ดลงเลี้ยงในอาหาร

## 2. การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่มีความอ่อนนุ่มหรือเมล็ดที่ยังไม่แก่เต็มที่ (immature seed) มีขั้นตอนดังนี้

- (1) ถ้าเมล็ดมีเยื่อหุ้ม เช่น เมล็ดมะเขือเทศจะมีลักษณะคล้ายวุ้น หรือเมล็ดมะละกอที่มีผนังเมล็ดที่เป็นเยื่อใส ๆ และสารละลายเหลว ๆ ห่อหุ้มอยู่ ก็ให้ทำการกำจัดออกเสียก่อน เพราะสิ่งดังกล่าวเหล่านั้นเป็นตัวยับยั้งการงอกของเมล็ด
- (2) แช่เมล็ดในสารละลายคลอริกซ์ ความเข้มข้น 15 % เติม tween-20 ประมาณ 0.01 % ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที
- (3) ทำการล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ ประมาณ 5 นาที
- (4) ย้ายเมล็ดลงเลี้ยงในอาหาร

## ตัวอย่างการฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อของกิ่งไม้

ส่วนของกิ่งไม้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่ยังมีชีวิตที่จะใช้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ ก็คือ กลุ่มเนื้อเยื่อของท่อน้ำเลี้ยงอาหารเนื้อเยื่อแคมเบียม และเนื้อเยื่อตรงใจกลางของ ลำต้น ซึ่งเนื้อเยื่อดังกล่าวอยู่ในส่วนภายในของกิ่งหรือลำต้น ซึ่งมีสภาพที่ปลอดภัยอยู่แล้ว ฉะนั้นการฟอกฆ่าเชื้อจึงทำเฉพาะผิวนอกเท่านั้น ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. นำส่วนของกิ่งหรือลำต้นมาลนไฟ หรือจุ่มแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 % ก่อนแล้วเผาไฟ ก็จะสามารถฆ่าเชื้อที่ติดมากับผิวของตัวอย่างได้
2. ใช้มีดผ่าและตัดแยกเอาเฉพาะเนื้อเยื่อที่ยังมีชีวิตอยู่ดังกล่าวข้างต้น ลงเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงได้เลย

## ตัวอย่างการฟอกฆ่าเชื้ออับเรณู

การเพาะเลี้ยงอับเรณูมีวัตถุประสงค์เพื่อการผลิตพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว (haploid plant) จากเซลล์สร้างสปอร์ (microspore mother cell) ที่อยู่ในอับเรณู มีขั้นตอนดังนี้

1. เลือกดอกที่ยังตูม โดยที่กลีบเลี้ยงและกลีบดอกยังไม่กางออก มากทำการฉีดยาฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 % ทิ้งไว้ให้แห้งพอสมควร ๆ
2. แช่ดอกในสารละลายคลอริกซ์ ความเข้มข้น 10 % เติม tween-20 ประมาณ 1 - 2 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที โดยเขย่าเป็นระยะ ๆ
3. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ ประมาณ 5 นาที
4. ย้ายดอกลงในจานแก้ว ผึ่งให้แห้งพอสมควร ๆ แล้วทำการแกะดอกแยกเอาเฉพาะอับเรณูลงเลี้ยงในอาหารเพาะ

## อาหารวิทยาศาสตร์(culture media)

อาหารวิทยาศาสตร์ประกอบด้วยสารอนินทรีย์ ได้แก่ แร่ธาตุต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชและสารอินทรีย์ ได้แก่ วิตามิน กรดอะมิโน สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช น้ำตาล และน้ำมะพร้าว สูตรอาหารสำหรับ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้มีมากมาย ตั้งแต่มี องค์ประกอบของสารเคมีเพียงไม่กี่ตัวไปจนถึงความสลับซับซ้อนมาก บางสูตรอาจใช้ได้ดีเพียงบางพืชหรือบางชนิด แต่บางสูตรอาจใช้ได้กว้างขวางครอบคลุมหลายชนิดและกลุ่มสูตรที่ใช้ ได้แก่ สูตร Modified Vacin and Went (1949) และสูตร Murashige and Skoog (1962) อาหารที่ใช้มีทั้งอาหารเหลวและอาหารวุ้น อาหารเหลวมักใช้ในระยะเริ่มต้นเพื่อเพิ่มปริมาณ เนื่องจากเนื้อเยื่อทุกส่วนได้รับอาหารซึ่งจะทำให้เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและยังช่วยกระจายหรือลดความเข้มข้นของสารที่ขึ้นส่วนพืชปล่อยออกมา ซึ่งถ้าสะสมหรือมีในปริมาณมากก็อาจเป็นพิษกับชิ้นส่วนพืชนั้น แต่กล้วยไม้บางชนิดจะเพิ่มปริมาณมาก เมื่อเริ่มเลี้ยงบนอาหารวุ้น การเลี้ยงบนอาหารเหลวต้องวางบนเครื่องเขย่าในแนวขนานกับพื้นโลกด้วยอัตราเร็ว 100 - 120 รอบ/นาที ตลอด 24 ชั่วโมง เพื่อให้อาหารเหลวมีการเคลื่อนที่ เป็นการถ่ายเทอากาศและเพิ่มปริมาณออกซิเจนในอาหารเหลว

## ประเภทของอาหาร

1. อาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium) เทคนิคที่ใช้ในยุคแรก ๆ นั้น ใช้วุ้น (agar) เพื่อปรับสารละลายอาหารให้มีสภาพเป็นของแข็งมากขึ้น โดยหนึ่งในหม้อหนึ่งความดันเพื่อหลอมละลายอาหารแล้วเทใส่ภาชนะและทิ้งให้แข็งตัวอยู่ในสภาพอาหารกึ่งแข็ง แต่มักพบว่าคุณสมบัติต่าง ๆ ของสารประกอบเคมีในอาหารอาจไม่ได้รับสูงสุดเท่ากับอาหารเหลว (liquid medium) กระนั้นก็ตามวุ้นยังคงถูกนำมาใช้แต่จำเป็นต้องดัดแปลงให้เหมาะสมและต้องแน่ใจว่ามีความบริสุทธิ์จริง ๆ ในทางปฏิบัติแนะนำให้ล้างด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์อย่างน้อย 3 ครั้ง รายงานว่าการเจริญเติบโตของถั่ว Pea abies จะดีที่สุดในการเลี้ยงที่ใช้วุ้น Difco Purified agar ขณะที่ Difco Noble agar ซึ่งผ่านการฟอกใสมากกว่าจะให้ผลที่ไม่ดีเท่า และการใช้วุ้นปริมาณมากเกินไปอาจไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้ ดังนั้นความเข้มข้นของวุ้นที่พอเหมาะสำหรับอาหารแต่ละชนิดจะต้องมีการทดสอบเสียก่อน อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นที่ใช้กันแพร่หลายและได้ผลดีเพื่อวัตถุประสงค์ส่วนใหญ่ คือ 0.8 % สารสังเคราะห์พวก gelatin และ silica gel ได้เคยมีการใช้ และในปัจจุบันมีการพัฒนาสารประกอบพวก acrylamide gels เช่นเดียวกับ starch co- polymers ก็มีการแนะนำมาใช้แทนวุ้น สารเหล่านี้มีข้อดีที่ไม่จำเป็นต้องต้มให้เดือดเพื่อช่วยให้ละลายน้ำได้ แต่ยังมีปัญหาในเรื่องการปรับค่า pH ในขณะที่สารพวกผงถ่าน (charcoal) ถูกเติมในอาหารหลายสูตร เพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตเนื่องจากสามารถดูดซับสารพิษพวก toxic metabolites ที่เกิดจากเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงได้ดี

2. อาหารเหลว (liquid medium) อาหารเหลวเป็นที่นิยมใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเนื้อเยื่อจะจมหรือแขวนลอยอยู่บนกระดาดหรือกรงที่จุ่มในอาหารเหลวตลอดเวลา ในทางปฏิบัติอาจใช้ glass wool ช่วยพยุงเนื้อเยื่อที่เลี้ยงได้เช่นกันเช่นเดียวกับการใช้ fabric support (100 % polyester) ที่อึดตัวด้วยอาหารเหลว ซึ่งจะช่วยในการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานได้ดีขึ้น เนื้อเยื่อที่จมอยู่ในอาหารเหลวอาจถูกคนที่ความเร็ว 1-150 รอบต่อนาที (rpm) เพื่อช่วยในการหายใจ

## ส่วนประกอบของอาหาร (media constituents)

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะประกอบด้วยธาตุอาหารต่าง ๆ ที่พืชต้องการอย่างครบถ้วน จึงขอกกล่าวส่วนประกอบของอาหาร ดังต่อไปนี้ น้ำ (water) ประมาณ 95 % ของอาหารเป็นน้ำ ในการทำงานวิจัยควรใช้น้ำกลั่นจาก เครื่องกลั่นแก้ว เครื่องกลั่นควรได้รับการทำความสะอาดอย่างสม่ำเสมอ และควรบรรจุน้ำกลั่นในขวดพลาสติก วุ้น (agar) เนื้อเยื่อส่วนมากจะเลี้ยงในอาหารกึ่งที่มีวุ้น ซึ่งหน้าที่ช่วยพยุงเนื้อเยื่อให้ตั้งอยู่ได้บนอาหารในกรณีเลี้ยงในอาหารเหลวจะวางบนเครื่องเขย่า หรือเลี้ยงบนสะพานกระดาษกรอง (filter paper bridge) เพื่อให้เนื้อเยื่อได้รับอากาศเพียงพอ วุ้นเป็นส่วนประกอบแพงที่สุดในอาหาร ผลิตจากสาหร่ายทะเลทำให้อาหารแข็งตัว วุ้นเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) มีโมเลกุลใหญ่ วุ้นที่มีคุณภาพสูง เช่น difcoitek Agar มีราคาแพงมากปราศจากสิ่งเจือปน ในห้องปฏิบัติการบางแห่งใช้วุ้นประกอบอาหารแทนได้ วุ้นจาก Difco Bacto มักใช้ในปริมาณ 0.6 - 1.0 % เหมาะสำหรับการเลี้ยงแคลลัสส่วนอะกาโรสเจล (agarose gel) หรือวุ้นสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงเซลล์เดียวหรือโพรโทพลาสต์ วุ้นสังเคราะห์เหล่านี้จะทำให้เกิดปัญหาการฉ่ำน้ำ (vitrification) ของเนื้อเยื่อพืชผลิตภัณฑ์ใหม่ของบริษัทซิกมา (Sigma) ชื่อ อะการ์เจล (AgarGel) ช่วยลดปัญหานี้ได้ การใช้วุ้นในปริมาณที่ต่ำ (0.5 %) จะทำให้ อาหารไม่แข็งตัวไหลไปมาได้ โดยเฉพาะ

เมื่อมี pH ต่ำจึงไม่สามารถพองเนื้อเยื่อพืชไว้ได้ แต่ถ้าใช้วันในปริมาณที่ สูง (1.0 %) จะทำให้อาหารแข็งมากจนไม่สามารถให้น้ำเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของพืชและยังทำให้พืชดูดอาหารไปใช้ได้ยากแหล่งให้ธาตุคาร์บอน (carbon sources) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารทุกสูตรเป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นมากต่อการเจริญเติบโต เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชยังไม่มี การสังเคราะห์แสงในสภาพหลอดแก้วหรือมีการสังเคราะห์แสงในอัตราที่ต่ำเพราะได้รับแสงน้อยและมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์จำกัด น้ำตาลที่นิยมใช้ คือ ซูโครส (sucrose) ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่พืชสังเคราะห์ได้เองและมีความจำเป็นอย่างมากต่อเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิด โดยปกติมักใช้ในปริมาณ 1 - 5 % และมีหลักฐานชี้ว่าการสร้างสารเมตาโบไลต์บางชนิดในเนื้อเยื่อที่เลี้ยงเป็นผลมาจากความเข้มข้นของซูโครส สำหรับน้ำตาลชนิดอื่น เช่น กลูโคส (glucose) และฟรุคโตส (fructose) มีการใช้บ้างปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของพืช โดยทั่วไปพืชจะเจริญเติบโตดีขึ้นเมื่อได้รับปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่ง จากนั้นการเพิ่มปริมาณน้ำตาลมากขึ้นอีกจะลดการเจริญเติบโตลง น้ำตาลอาจเปลี่ยนรูปได้เมื่อถูกทิ้งฆ่าเชื้อนอกจากนี้ น้ำตาลพอลิแซ็กคาไรด์อาจเปลี่ยนเป็น มอโนแซ็กคาไรด์ เมื่อเกิดการแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) เกลืออนินทรีย์ (inorganic salt) ธาตุอาหารมีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อรองมาจากน้ำตาล แยกออกได้เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการมาก และธาตุอาหารที่พืชต้องการน้อย แม้ว่าสูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในระยะแรกจะเหมาะสมต่อการเลี้ยงเซลล์และแคลลัส แต่ในระยะต่อมา เช่น สูตรของ Murashige and Skoog (MS), Gamborg B-5 และของ Miller ได้รับการพัฒนาให้เหมาะต่อการเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืชได้กว้างขวางมากขึ้นทั้งยังมีผลดีอย่างมากในการกระตุ้นการกำเนิดอวัยวะ โดยมีการกำหนดปริมาณเกลืออนินทรีย์ให้เหมาะต่อการเจริญของเซลล์ที่เลี้ยงแต่ละพืช และในบางกรณีเฉพาะต่อแต่ละพันธุ์ โดยปกติสารละลายเกลืออนินทรีย์ของ Murashige and Skoog (MS-salt solution) ถูกใช้เป็นส่วนผสมหลักเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เลี้ยง สาเหตุหนึ่งคือ เกลือสูตรนี้มีความเข้มข้นสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง NH<sub>4</sub> อีออน และ ธาตุอื่น ๆ บางชนิดมีปริมาณที่สูงมากซึ่งจำเป็นต่อเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิดที่จะพัฒนา ทั้งยังพบว่า NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O ในสูตรอาหาร MS ยังให้ผลดีแก่เนื้อเยื่อพืชบางชนิด ธาตุอาหารรองที่ใช้ในสูตรอาหารโดยปกติมีการเจือปนของธาตุอื่นและให้ ธาตุอาหารหลัก N, P และ K เพิ่มเติมในปริมาณที่น้อยมาก แต่คุณภาพของธาตุอาหารรองเองก็มีส่วนสำคัญไม่น้อย ในเกลือสูตร MS นั้นมีปริมาณธาตุอาหารรองค่อนข้างสูงเป็นพิเศษเมื่อเทียบกับสูตรอื่น โดยเฉพาะการมีสาร chelating agents เช่น EDTA ยังเป็นหลักประกันว่า ธาตุเหล็กจะมีประโยชน์ในปริมาณที่มากพอ แม้ว่าจะมี pH เปลี่ยนแปลงไปอย่างมากก็ตามวิตามิน (Vitamins) พืชสามารถสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตได้ทุกชนิด แต่เซลล์พืชที่เลี้ยงในสภาพหลอดแก้วต้องการวิตามินเพิ่ม โดยเฉพาะวิตามินบี 1 เพื่อช่วยในการพัฒนา ให้เป็นปกติ วิตามินที่ใช้ เช่น วิตามินบี 1 (thiamine 0.1 - 0.5 มก./ล.) วิตามินบี 5 (pantothenic acid 0.5 - 2.5 มก./ล.) วิตามินเอ็ม (folic acid 0.1 - 0.5 มก./ล.) วิตามิน บี 2 (riboflavin 0.1 - 10.0 มก./ล.) วิตามินเอช (biotin 0.01 - 1.00 มก./ล.) และวิตามินอี (tocopherol 1 - 50 มก./ล.) ถึงอย่างวิตามินในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น มีลักษณะที่ใช้ตามกันมากกว่าจะมีการพิสูจน์หรือทดสอบก่อนว่ามีความจำเป็นอย่างแท้จริงหรือไม่ มีเพียง thiamine-HCl เท่านั้นที่ดูจะมีความจำเป็น และเป็นที่ต้องการในการเจริญเติบโตหรือการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน (morphogenesis) ความเป็นกรดและด่างของอาหาร (pH of nutrient medium) pH ที่เหมาะสมของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ในช่วง 5.0 - 6.5 ถ้าต่ำเกินไป (<4.5) หรือสูงเกินไป (>7.6) จะทำให้พืชหยุดการเจริญเติบโต ถ้า pH สูงกว่า 6 จะทำให้อาหารแข็งมาก ถ้า pH ต่ำกว่า 5.2 อาหารจะอุ่นตัว ไม่เหมาะในการพองเนื้อเยื่อพืช นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโต และการเลือกกระตุ้นของอาหารที่ใช้เลี้ยงนั้นจะขึ้นอยู่กับ pH ด้วย ที่มีค่าสูงหรือต่ำเกินไปควรหลีกเลี่ยงเพราะจะไปขัดขวางความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหาร ตัวอย่าง pH ที่เป็นด่าง (>7.0) หรือเป็นกรดจัด (<4.0) ทำให้กรดจิบเบอเรลลินไม่เป็นประโยชน์ได้ การเติมสารประกอบ EDTA ลงในอาหารอาจมีความสำคัญในการรักษาความเป็นประโยชน์ของธาตุเหล็กและธาตุโลหะอื่น ๆ เนื่องจาก pH จะเปลี่ยนแปลงไปตลอดเวลาขณะเพาะเลี้ยงฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโต (Hormones and growth regulators) ฮอร์โมนที่สร้างขึ้นในต้นพืช (plant hormones) ทำหน้าที่กระตุ้นและมีส่วนร่วม ในกระบวนการต่าง ๆ ที่นำไปสู่การพัฒนาของต้นที่เป็นปกติการเจริญเติบโตตลอดจน การเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ เนื้อเยื่อ และ secondary metabolism เป็นผลมาจากฮอร์โมนเหล่านี้ทั้งสิ้นการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารจึงอาจไม่จำเป็นเสมอไปโดยเฉพาะในการเลี้ยงแคลลัส อย่างไรก็ตามโดยปกติจะมี

ส่วนช่วยในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและ/หรือการ กำเนิดอวัยวะ และมีเนื้อเยื่อพืชไม่กี่ชนิดที่สร้างแคลลัสได้ในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชออกซินและไซโทไคนินมีความสำคัญที่สุด พืชบางชนิดสร้างสารเหล่านี้อยู่แล้วแต่ควรเพิ่มเข้าไปในอาหารเพื่อช่วยให้การเจริญดีขึ้น บางครั้งอาจต้องใช้จิบเบอเรลลินหรือเอทิลีนการเก็บฮอร์โมนพืชมักเก็บในตู้เย็นในรูปสารละลายเข้มข้น การนำฮอร์โมนพืชไปใช้อาจมีปัญหาการทำละลายของฮอร์โมนพืชในน้ำ การละลายออกซินควรทำในต่าง เช่น 0.1 KOH ไซโทไคนินก็เช่นเดียวกัน แต่จิบเบอเรลลินละลายได้ได้ในแอลกอฮอล์ออกซินและไซโทไคนินที่เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นควรเก็บไว้ในที่มืด หรือใส่ขวดสีชาเพราะจะเสื่อมสภาพเมื่อได้รับแสง

1. ออกซิน (auxin) เช่น IAA (indole acetic acid) IBA (indole butyric acid) NAA (naphthalene acetic acid) 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) ใช้ในช่วง 0.01- 10 มก/ล. ออกซินช่วยเพิ่มขนาดของเซลล์ มักใช้ร่วมกับไซโทไคนินเพื่อช่วยในการแบ่งเซลล์การสร้างรากแต่การเจริญของรากจะถูกยับยั้งถ้ามีออกซินในปริมาณที่สูง

2. ไซโทไคนิน (cytokinin) ไซโทไคนินที่สังเคราะห์ได้ในธรรมชาติ คือ ซีอะทิน (zeatin) ใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโต ไซโทไคนินที่ใช้กันมากคือ ไคเนทิน (kinetin) ZiP (N6-isopentenyl adenine) BAP (benzyl aminopurine) มีหน้าที่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์โดยเฉพาะถ้าใช้ร่วมกับออกซิน ถ้าใช้ในความเข้มข้นสูงขึ้นจะช่วยในการสร้างรากแต่ยังยับยั้งการเจริญของราก ส่งเสริมการสร้างยอดโดยลดผลจากการที่ตายอดข่มตาข้าง มีบทบาทในการเปลี่ยนสภาพเซลล์เป็นอวัยวะได้และชักนำให้เกิดเป็นต้นไซโทไคนินทนความร้อนได้ดีจึงมักเติมในอาหารก่อนฆ่าเชื้อ บทบาทของออกซินและไซโทไคนินในพืชทั้งต้นและในสภาพหลอดแก้วอาจจะเหมือนกันหรือไม่เหมือนกันก็ได้

3. จิบเบอเรลลิน (gibberellin) ฮอร์โมนพืชกลุ่มนี้มี 60 กว่าชนิด แต่ GA3 เป็นชนิดที่ใช้มากที่สุด จิบเบอเรลลินไม่ค่อยใช้กันมากนักในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีบทบาทในการชักนำให้ปล้องยาวขึ้นหลังจากการสร้างยอดช่วยให้เนื้อเยื่อเจริญมีการเจริญเติบโตและช่วยในการงอกของเมล็ด ไม่ควรฆ่าเชื้อจิบเบอเรลลินด้วยหม้อนึ่งความดัน เพราะจิบเบอเรลลินส่วนหนึ่งจะเสื่อมสลายไปเมื่อได้รับความร้อน ควรทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้เครื่องกรองเมมเบรน นอกจากนี้จิบเบอเรลลินนั้นเคยถูกนำมาใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่โดยทั่ว ๆ ไป มีผลปิดกั้น การเกิดอวัยวะ

4. แอ็บซิชิกแอซิด (ABA; abscisic acid) มักยับยั้งการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อแต่ในบางครั้งพบว่า เอบีเอส่งเสริมการเจริญของแคลลัส และการเกิดเป็นต้นใหม่ ควรทำให้สารนี้ปลอดเชื้อโดยใช้เครื่องกรองเมมเบรน เอบีเอมีบทบาทเกี่ยวกับ การสังเคราะห์ไซโทไคนินและเป็นตัวต่อต้านการทำงานของ จิบเบอเรลลิน

5. เอทิลีน (ethylene) อวัยวะพืช แคลลัส หรือเซลล์ในสภาพหลอดแก้วมีการผลิตเอทิลีน จึงไม่ควรปิดหลอดแก้วแน่นเกินไปเพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของแก๊สนี้ ผลของเอทิลีนมีทั้งส่งเสริม และยับยั้งการเจริญเติบโต การเลี้ยงเนื้อเยื่อในที่มืดแสงจะมีการสะสมเอทิลีนมากกว่า ในที่มืด ถ้ามีมากเกินไปจะทำให้เกิดการฉ่ำน้ำของพืชได้แก๊สนี้ยังเป็นสาเหตุของการแก่ของเนื้อเยื่อพืช

### สารอินทรีย์ (organic salt)

ก. สารอินทรีย์จากผักหรือผลไม้ที่สำคัญมาก คือ น้ำมะพร้าว น้ำส้ม น้ำมะเขือเทศ สารสกัดจากยีสต์ น้ำแอปเปิล กล้วยบด สารเหล่านี้ไม่ควรใช้ในงานวิจัย เนื่องจากไม่ทราบส่วนประกอบแน่นอน (undefined medium) ในระยะที่นำมาใช้

ข. สารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ เช่น กรดอะมิโน ช่วยส่งเสริม การเจริญเติบโต และทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงพร้อมที่จะเกิดเป็นต้นได้ เช่น แคลซีนไฮโดรไลเซท (casein hydrolysate) 0.1 - 1.0 มก/ล. ทริปโทน (tryptone) 0.25 - 2.00 มก/ล. และสารสกัดจากมอลท์ (malt extract) 0.5 - 10 มก/ล. สารเหล่านี้ประกอบด้วยวิตามินและกรดอะมิโน ส่วนสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ซึ่งมีวิตามินที่สูงมักใช้ในปริมาณ 0.25 - 2.00 มก/ล. อะดีนีน (adenine) การใส่อะดีนีนในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประโยชน์คือ ช่วยในการผลิตยอดแต่ยังไม่ทราบกลไกการทำงานแน่ชัดผงถ่าน (activated charcoal) มักใช้ในความเข้มข้น 0.2 - 3.0 % ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ผงถ่านมีความสามารถในการดูดซับสารบางตัวออกจากอาหารได้ เนื่องจากผงถ่านมีช่องว่างที่ ละเอียดมาก มีพื้นที่ผิวในช่องว่างสูง จึงใช้ผงถ่านในการดูดซับสารพิษ เช่น สารประกอบฟีนอล (phenol) เอทิลีน ทำให้ปริมาณสารดังกล่าวในอาหาร

ลดลง เช่น การดูดซับฮอร์โมนหรือ สารประกอบฟีนอล ซึ่งเป็นพิษกับเซลล์ นอกจากนี้อาจใช้ผงถ่านในระยะเวลาที่เกิดราก เพื่อลดแสงบริเวณรากทำให้รากเจริญเติบโตได้ดี ผงถ่านจึงสำคัญต่อการสร้างเป็นต้นใหม่ สารที่มีคุณสมบัติเหมือนกับผงถ่าน คือ PVP (polyvinyl pyrrolidone) ก็สามารถดูดซับสาร ฟีนอลได้ หรือการเติม diethyl-dithiocarbonate (DIECA) จะช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชัน

### **สภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture condition)**

ภายในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องมีการให้แสงสว่างตั้งแต่ไม่ให้เลยหรือให้น้อยกว่า 100 ฟุตเทียนไปจนถึง 2,000 ฟุตเทียนโดยเฉลี่ย แล้วให้ความเข้มแสงประมาณ 2,000 - 3,000 lux เป็นเวลานาน 12 - 18 ชั่วโมงต่อวัน ส่วนอุณหภูมิในการเลี้ยงเนื้อเยื่อจะอยู่ระหว่าง 22 - 29°C

(ที่มา : หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์ โดย ผศ.ดร.อภิชาติ ชิดบุรี สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา )