ปฏิบัติการบทที่ 4
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออวัยวะ

การเพาะเลี้ยงราก (Root culture)

บทนำ

การทดลองเพาะเลี้ยงรากของพืชตระกูลถั่ว (Legume) และ ธัญพืช (Cereal) มีการศึกษามานาน แต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จ ผู้ที่สามารถเลี้ยงรากให้เจริญเติบโตได้สำเร็จ คือ White โดยการเพาะเลี้ยงรากของมะเขือเทศในอาหารที่มีเกลือแร่ น้ำตาลซูโครส และน้ำสกัดจากยีสต์ (yeat extract) ต่อมาสามารถเพาะเลี้ยงรากของพืชยาสูบได้หลายชนิด เช่น *Nicotiana langsdorfii* และ *N. tabaccum* รากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนั้นมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับรากของต้นพืช การเพาะเลี้ยงรากไว้เป็นเวลานานๆ นั้น White พบว่า รากบางอันเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม เช่นเมื่อเลี้ยงไว้เป็นเวลา 30 ปี รากของมะเขือเทศที่มีจำนวนโครโมโซม 2n เปลี่ยนเป็น 4n ความยากง่ายของการเพาะเลี้ยงรากของพืชในแต่ละชนิดไม่มีความแน่นอน

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงรากนั้นต้องใส่น้ำตาลซูโครสเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ถ้าเป็นรากของธัญญพืชอาจใช้กลูโคสแทนได้ ความเป็นกรดด่างที่มีความเหมาะสมสำหรับการเจริญของราก คือ 5.0-5.5 ส่วน pH 6.0-6.5 เหมาะสำหรับทำให้เกิดรากแขนงได้ดี ความเข้มของแสงในระดับต่ำๆ สามารถทำให้รากพืชบางชนิดเจริญได้ดี แต่ในรากของพืชบางชนิดอาจจะหยุดการเจริญเติบโตเมื่อได้รับแสง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรากคือ 25-27 ^{o}ซ

การนำเอารากของพืชที่ปลูกอยู่ในเรือนต้นไม้หรือในแปลงมาเพาะเลี้ยงนั้นค่อนข้างลำบากปัญหาที่สำคัญคือการทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์นั้นค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อรา และแบคทีเรียจะอาศัยอยู่ตามรอยแตกของราก หรืออาศัยอยู่ระหว่างเซลล์ การกำจัดเชื้อจุลินทรีย์จึงอาจทำให้เกิดความเสียหายแก่รากได้ การเพาะเลี้ยงรากจึงควรนำมาจากการเลี้ยงเมล็ดที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำเมล็ดมาฟอกฆ่าเชื้อแล้วนำไป

เพาะในอาหาร วิธีการที่จะช่วยให้ปราศจากเชื้อได้ดีก็โดยการลอกเอาส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดออก การเพาะเลี้ยงเมล็ดในที่มืดจะช่วยให้เมล็ดมีการเจริญได้ดี

วิธีการศึกษา

1. เพาะเมล็ดถั่วพุ่มในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์

- นำเมล็ดถั่วพุ่มมาเพาะฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยน้ำยาคลอรอกซ์ 15 % เป็นเวลา 25 นาที
- ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละประมาณ 5 นาที เพื่อล้างคลอรอกซ์ออกให้หมด
- ใช้ช้อนหรือปากคีบ คีบเมล็ดไปเลี้ยงในขวดที่มีอาหารเตรียมไว้ 2-3 เมล็ดต่อหนึ่งขวด
- นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิ ประมาณ 27 $^{\circ}$ซ

2 . ตัดรากเพาะในอาหารเหลวสังเคราะห์

โดยตัดเอาเฉพาะส่วนปลายสุดของรากยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใส่ลงไปในอาหารเหลวที่เตรียมไว้อาหารเหลวสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงรากให้เกิดเป็นแคลลัสเตรียมโดยใช้สูตร MS จากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยทำให้อาหารเหลวเคลื่อนที่ตลอดเวลาโดยใช้ shaker เพื่อที่จะให้ชิ้นเนื้อเยื่อได้รับออกซิเจน

การเพาะเลี้ยงแคลลัส (Callus Culture)

การกระตุ้นให้เกิดแคลลัสและการเลี้ยงแคลลัส

แคลลัสประกอบด้วยกลุ่มของเซลล์พาเรงคิมาที่อยู่กันอย่างหลวมๆ และมีรูปร่างของเซลล์หลายแบบ แคลลัสจากการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อที่นำเอาไปเลี้ยงครั้งแรกตำแหน่งที่เกิดอาจเป็นบริเวณรอยแผลที่ปลายลำต้นหรือราก ส่วนใหญ่แคลลัสจะมักกล่าวถึงในพวก Angiosperms แต่ความจริงแล้ว แคลลัสเกิดได้ในพืชทุกพวก จิมโนสเปริม (Gymnosperms), เฟริน (Fern), มอส (Mosses), และ ลิเวอร์เวิร์ต (Liverworts)

เนื่องจากแคลลัสยังไม่มีการรวมกันเป็นอวัยวะ การเกิดแคลลัสบริเวณที่เป็นรอยแผลมีตัวกระตุ้นที่สำคัญคือ ออกซินและไซโตไคนินที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อ นอกจากนั้นแคลลัสอาจเกิดจากการรุกรานของเชื้อจุลินทรีย์เข้าไปในเนื้อเยื่อ หรือเกิดจากแมลงที่ดูดน้ำเลี้ยงเป็นอาหาร เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถกระตุ้นให้แคลลัสเกิดเป็นอวัยวะและเนื้อเยื่อจำนวนมาก การเกิดแคลลัสไม่จำเป็นต้องเป็นการตอบสนองในบริเวณที่เป็นแผล เนื้อเยื่อของพืชสามารถเลี้ยงให้เกิดเป็นแคคลัสได้ เช่น เนื้อเยื่อของแคมเบียมพาเรงคิมาที่สะสมอาหาร ใบเลี้ยง ชั้นมีโซฟิลล์ของใบ และเนื้อเยื่อที่จะเจริญเป็นเนื้อเยื่อลำเลียง ลักษณะการเจริญโดยทั่วไปของแคลลัส มีความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนระหว่างชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อ ส่วนประกอบของอาหาร และสิ่งแวดล้อม การเจริญของแคลลัสในพืชบางชนิดมีสารลิกนินสะสมมาก และผิวนอกค่อนข้างแข็ง ลักษณะของแคลลัสชนิดนี้เรียกว่า compact callus ส่วนแคลลัสบางชนิดอาจแยกออกจากกันได้ง่ายและอยู่กันอย่างหลวมๆ ลักษณะของแคลลัสชนิดนี้เรียกว่า friable callus สีของแคลลัสแตกต่างกันซึ่งอาจมีสีเหลือง ขาว เขียว การเกิดเม็ดสีอาจเกิดตลอดทั้งแคลลัสหรืออาจเกิดเฉพาะบางส่วนของแคลลัส ในแคลลัสจะเกิดกลุ่มเซลล์ที่แบ่งตัวเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่เรียกว่า meristemoids หรือ vascular nodule ซึ่งจะเป็นตำแหน่งหรือศูนย์กลางของการเกิด shoot apices, root primordia หรือ เริ่มเจริญเป็นคัพภะ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและอวัยวะ

อวัยวะและเนื้อเยื่อของพืชประกอบด้วยเซลล์จำนวนมาก เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์จึงมีโอกาสที่จะเจริญเติบโตได้ ถ้าเป็นเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญ (meristems) โอกาสที่เนื้อเยื่อสามารถเจริญได้ก็มีมากกว่าเนื้อเยื่อถาวรปฐมภูมิ การนำอวัยวะหรือเนื้อเยื่อส่วนใดมาเลี้ยงก็ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ ความสะดวกและผลที่ควรจะได้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (Shoot tip culture) เนื้อเยื่อปลายยอดของพืชเป็นกลุ่มของเนื้อเยื่อเจริญ ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (apical meristems) และจุดกำเนิดของใบ กลุ่มเนื้อเยื่อเหล่านี้มีเซลล์ที่อยู่กันแน่น รูปร่างค่อนข้างกลม ไม่มีช่องว่างระหว่างเซลล์ เซลล์สามารถแบ่งตัวได้เรื่อยๆ การนำเอาเนื้อเยื่อเจริญไป

เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เรียกว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (meristem culture) หรือถ้านำเอาเฉพาะเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดไปเพาะเลี้ยงจึงเรียกว่า การเพาะเลี้ยงปลายยอด (apical bud culture) หรือถ้ามีจุดกำเนิดของใบติดมาด้วย เรียกว่า shoot tip culture หรือ shoot apex culture การนำเอาปลายยอดของพืชที่มีขนาดประมาณ 0.2-0.5 มม. ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดและจุดกำเนิดของใบ 1-4 ใบ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม สามารถเจริญและพัฒนาจนเกิดเป็นต้นและรากได้ อาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดอาจเป็นแบบง่ายๆ คือ ประกอบด้วยอนินทรีย์สารและน้ำตาล แต่ในพืชบางชนิดอาจต้องการวิตามินโดยเฉพาะอย่างยิ่งไทเอมีนและฮอร์โมนพืช (บุญยืน, 2539)

การเพาะเลี้ยงใบ (Leaf culture) ใบเป็นอวัยวะของพืชที่ประกอบด้วยแผ่นใบ (blade) และก้านใบ (petiole) การเจริญเติบโตของใบ ในระยะเริ่มแรกอยู่ใกล้กับยอด โดยมีจุดกำเนิดของใบเจริญและพัฒนามาเป็นใบ จุดกำเนิดของใบประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญสามารถแบ่งตัวได้จนถึงระยะหนึ่ง จากนั้นจึงมีการเปลี่ยนแปลง (differentiate) เป็นเนื้อเยื่อถาวรปฐมภูมิ แผ่นใบประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อของเอพิเดอร์มิส (epidermis) ทั้งทางด้านบนและด้านล่าง ส่วนระหว่างกลางเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อของมีโซฟิลล์ (mesophyll) ใบมีหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แสง การหายใจ และการคายน้ำ การนำเอาใบของพืชมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เรียกว่า การเพาะเลี้ยงใบ (leaf culture)

วิธีการเพาะเลี้ยงใบหรือเนื้อเยื่อจากใบ ใบของพืชแต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกัน ใบที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงและสามารถเจริญเติบโตได้มักเป็นใบที่ยังอ่อนอยู่ ประกอบด้วยเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ เนื้อเยื่อใบสามารถเจริญเติบโตเป็นแคลลัส หรือเจริญเติบโตเป็นหน่อขนาดเล็กตามบริเวณรอยตัดหรือบนผิวของใบ (บุญยืน, 2539)

การตรวจเอกสาร

Rout, Samantaray, และ Das (1995) ศึกษา Somatic Embryogenesis และการชักนำให้เกิดต้นพืชจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Acacia catechu* ซึ่งเป็นไม้ยืนต้นที่จัดอยู่ในวงศ์ถั่ว การชักนำให้เกิดต้นพืชใหม่ทำได้โดย Somatic Embryogenesis ที่ได้มาจากแคลลัสซึ่งเกิดจากใบเลี้ยงที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ของ *Acacia catechu* Willd. บนอาหารสูตร WPM (Woody Plant Medium) เติมไคเนติน 13.9 ไมโครโมลาร์ และ 2.7 ไม

โครโมลาร์ 1-naphthaleneacetic acid และเพิ่ม L-proline 0.9-3.5 ไมโครโมลาร์ ในอาหารเพื่อเร่งการเจริญของ somatic embryo และ somatic embryo สามารถเจริญในขั้นต่อไปได้บนอาหารสูตร half-strength MS ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วน somatic embryo ที่เจริญเป็นต้นพืชแล้วจะนำไปปรับสภาพให้เคยชินกับอากาศในเรือนกระจก และจากนั้นจึงย้ายในปลูกในแปลงปลูก

Rout, Samantaray และ Das (1995) ทำการทดลองเพื่อที่จะชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงของ *Acacia catechu* ใบเลี้ยงต้องไม่มีส่วนของแกนเอ็มบริโอ สูตรอาหารที่ใช้คือ อาหารสูตร MS หรืออาหารเหลวสูตร WPM ที่ประกอบด้วยสารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และมีความเข้มข้นของ 2,4 dichlorophenoxyacetic acid อยู่ในช่วง 2.3-13.6 ไมโครโมลาร์, indole-3-acetic acid ช่วงความเข้มข้น 2.9-17.1 ไมโครโมลาร์, 1-naphthaleneacetic acid ช่วงความเข้มข้น 2.7-21.5 ไมโครโมลาร์ และ indole-3-butyric acid ช่วงความเข้มข้น 2.2-13.3 ไมโครโมลาร์ หรือไค-เนตินช่วงความเข้มข้น 2.3-18.6 ไมโครโมลาร์ และสูตรอาหารที่จะชักนำให้เกิด somatic embryo คือสูตร 1/2 MS ที่ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต แต่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

วัตถุประสงค์การศึกษา

1. เพื่อศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากอวัยวะส่วนต่างๆ ของต้นกล้าถั่วพุ่ม
2. นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาผ่านขั้นตอนการ transformation

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เมล็ดถั่วพุ่ม
2. ต้นกล้าถั่วพุ่ม
3. ตู้ถ่ายเชื้อ
4. Hot oven
5. หม้อนึ่งความดันไอ
6. เครื่องชั่ง

7. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
8. เตาไฟฟ้า
9. ช้อนตักสารและแท่งแก้วคนสาร
10. ขวดรูปชมพู่
11. บีกเกอร์
12. กระบอกตวง
13. ขวดใส่อาหารและน้ำกลั่น
14. ปากคีบ
15. มีดผ่าตัด
16. จานเลี้ยงเชื้อ
17. ตะเกียงแอลกอฮอล์และไม้ขีดไฟ
18. กระดาษอลูมิเนียม (aluminum foil)
19. น้ำผงซักฟอก
20. แอลกอฮอล์
21. คลอรอกซ์ 15%
22. tween
23. อาหารแข็งสูตร MS

<u>หมายเหตุ</u> อุปกรณ์ในข้อ 9 - 16 ต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันก่อนนำเข้าตู้ถ่ายเชื้อ

วิธีการศึกษา

ในปฏิบัติการทำการเพาะเมล็ดถั่วพุ่มบนอาหารแข็ง เมื่อถั่วงอกออกมาเป็นต้นกล้า ตัดส่วนของยอดอ่อน, hypocotyl, epicotyl, cotyledon และใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

1. Germination

การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดถั่วพุ่มทำได้ดังนี้คือ

1.1 ล้างเมล็ดถั่วพุ่มในน้ำผสมผงซักฟอก 2-3 ครั้ง

1.2 แช่เมล็ดถั่วในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนนี้ทำในตู้ถ่ายเชื้อ

1.3 ทำการฟอกเมล็ดถั่วใน clorox 15% ใส่ tween เล็กน้อย เป็นเวลา 25 นาที

1.4 ล้างเมล็ดถั่วด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

1.5 นำเมล็ดถั่วที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนอาหารแข็งสูตร Ms ที่เตรียมไว้ โดยวาง เมล็ดถั่วจำนวน 3 เมล็ดต่ออาหารเลี้ยง 1 ขวด

หมายเหตุ ในขั้นตอนที่ 1.2-1.5 ให้ทำในตู้ถ่ายเชื้อ

เมล็ดถั่วใช้เวลาในการงอกออกมาเป็นต้นกล้าประมาณ 1 สัปดาห์ จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงอวัยวะส่วนต่างๆ ของต้นกล้าเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

2. การเพาะเลี้ยงแคลลัสจากอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าถั่วพุ่ม

วิธีการศึกษา

1. เตรียมอาหารสูตรแข็ง MS

2. นำต้นกล้าถั่วพุ่มออกมาวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3. นำมีดผ่าตัดลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อทิ้งไว้ให้เย็น แล้วตัดต้นกล้าออกเป็นส่วนๆ ดังนี้คือ ปลายยอดยาวประมาณ 0.5 ซม. ตัดเอาใบออก, hypocotyl ยาว 0.5 ซม., epicotyl ยาว 0.5 ซม., ใบตัดให้ได้ขนาด 0.5x0.5 ซม. และ ใบเลี้ยงตัดให้ได้ขนาด 0.5x0.5 ซม.

4.นำชิ้นส่วนพืชที่ตัดตามขนาดที่ต้องการแล้วไปเลี้ยงในขวดอาหารสูตร Ms ที่ได้เตรียมไว้แล้ว โดยทำการแยกอวัยวะส่วนต่างๆ ออกจากกัน วางชิ้นตัวอย่างขวดละ 3 ชิ้น

5.ปิดปากขวด แล้วติดฉลากชื่อชนิดพืช อวัยวะที่เพาะเลี้ยง สูตรอาหาร และวันที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยกระดาษ label

6. นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยง แล้วคอยติดตามผล

7. จดบันทึกผล ถ่ายภาพ

<u>หมายเหตุ</u> การปฏิบัติในข้อ 2-5 ให้ทำในตู้ถ่ายเชื้อ และปฏิบัติด้วยวิธีปลอดเชื้อ

ผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่า

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ก. ภาพแสดง callus ของถั่วพุ่มที่เพาะเลี้ยงจากใบ

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

ข. ภาพแสดง callus ของถั่วพุ่มที่เพาะเลี้ยงจาก shoot tip

ค. ภาพแสดง callus ของถั่วพุ่มที่เพาะเลี้ยงจาก epicotyl

.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....
.....

ง. ภาพแสดง callus ของถั่วพุ่มที่เพาะเลี้ยงจาก hypocotyl

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....