

บทปฏิบัติการที่ 3

เรื่อง การเตรียมอาหารสังเคราะห์ : อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเลือกใช้สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้เหมาะสมนั้น มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการดังเช่น ปัจจัยด้านความแตกต่างของชนิดพืช ลักษณะของชิ้นส่วนเริ่มต้น อายุและการพัฒนาของเซลล์พืช รวมทั้งวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งในแต่ละสูตรอาหารมีส่วนประกอบที่แตกต่างกันไป

โดยทั่วไปอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีส่วนประกอบของธาตุอาหารที่จำเป็น (essential element) เช่นเดียวกับพืชในสภาพธรรมชาติ ซึ่งแบ่งออกได้ดังนี้

1. ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์ (Inorganic Compound)

1.1 ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก (macronutrient)

ได้แก่ C H O N P K S Ca และ Mg

1.2 ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย (micronutrient)

ได้แก่ Fe Mn Cu Zn Mo B Cl

2. ธาตุอาหารพวกอินทรีย์ (Organic Compound)

2.1 วิตามิน

ได้แก่ Myo-inositol, Thiamine (B1), Nicotinic acid, Pyridoxine (B6), Ca-D-panthothenate, Biotin, Folic acid, Chlorine Chloride, p-Amino benzoic acid, Riboflavin (B2), Nicotinamide, Ascorbic acid (vitamin C)

2.2 กรดอะมิโน

ได้แก่ Glycine, L-arginine, L-aspartic acid, L-cysteine, L-glutamic acid, L-glutamine, L-asparagine

2.3 สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (Carbon Source)

ได้แก่ สารประกอบประเภทน้ำตาลต่างๆ เช่น sucrose , fructose , glucose

2.4 undefined supplement

ได้แก่ น้ำมันพรวัว สารสกัดจากมันฝรั่ง กล้วยบด สารสกัดจากยีสต์

2.5 สารควบคุมการเจริญเติบโต (Plant Growth Regulators)

แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่

2.5.1 ออกซิน (Auxins)

กลุ่มที่มาจากธรรมชาติ เช่น Indole-3 acetic acid (IAA)

กลุ่มที่เป็นสารสังเคราะห์ เช่น Napthaleneacetic acid (NAA),
Indole-3-butyric acid (IBA), 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)

หน้าที่ของออกซิน

- เพิ่มการขยายตัวของเนื้อเยื่อพืช
- ชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์
- ชักนำให้เกิดราก
- ชักนำให้เกิด embryogenesis

2.5.2 ไซโตไคนิน (Cytokinins)

กลุ่มไซโตไคนินที่มาจากธรรมชาติ เช่น Zeatin (6 - (4-hydroxy -3-methyl-trans-2-butenylamino purine)), Zip (6-(γ , γ -dimethylallyl amino purine)

กลุ่มไซโตไคนินสังเคราะห์ เช่น kinetin (6-furfurylamino-purine),
BA หรือ BAP (6-benzylamino purine) หรือ (N^6 -benzyladenine)

หน้าที่ของไซโตไคนิน

- เร่งการแบ่งเซลล์
- ช่วยในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์

- ช่วยชะลอการแก่ในใบ
- ช่วยการขยายตัวของเซลล์
- ชักนำการสังเคราะห์รงควัตถุ

2.5.3 จิบเบอเรลลิน (Gibberellins) นิยมใช้ GA_3 แต่มีข้อเสียคือ เมื่อได้รับความร้อนจะมีการสลายตัวไปประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์

หน้าที่ของ GA

- ทำให้ปล้องยืดยาวขึ้น
- ทำลายการพักตัวของเมล็ด
- ทำให้การออกรากช้าลง
- ช่วยชักนำในขบวนการออกดอก
- ยับยั้งการเกิดยอด

2.5.4 สารยับยั้งการเจริญเติบโต (Plant Growth Inhibitors) เช่น Abscisic acid (ABA)

หน้าที่ของ ABA

- กระตุ้นให้เกิดการสุกแก่
- กระตุ้นให้เกิด callus และ embryogenesis

2.5.5 เอทิลีน (Ethylene) ไม่นิยมใช้เนื่องจากอยู่ในรูปก๊าซ มักพบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเมื่อมี Auxins ปริมาณสูงในอาหารเพาะเลี้ยงหรือเมื่อเกิดสภาวะเครียดอื่นๆ โดยทั่วไปเอทิลีนมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช แต่มีรายงานว่าเอทิลีนมีผลส่งเสริมการเกิด somatic embryogenesis ในพืชบางชนิดเช่น ข้าวโพด

3. Solidifying Agents

ได้แก่ สารที่ทำให้อาหารแข็งตัว เช่น agar agarose gelrite

4. น้ำ ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชควรใช้น้ำสะอาด เช่น น้ำกลั่น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเลือกใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยง
2. เพื่อฝึกเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ ได้แก่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต ขวดแก้วใส หลอดทดสอบ ขวดชมพู กรวยแก้ว แท่งแก้วคนสาร
2. ซ้อนตักสาร
3. เครื่องกวนสารละลาย
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบหยาบ และแบบละเอียด
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
6. เตาอบไมโครเวฟ หรือ เตาแก๊ส
7. หม้อน้ำความดันไอ
8. สารเคมี HCl 1 N และ NaOH 1 N
9. น้ำตาลทราย

วิธีการ

การคำนวณปริมาตรสารละลายเข้มข้นที่ใช้เพื่อเตรียมอาหาร (ตารางที่ 2)

$$\text{สูตร } P_1V_1 = P_2V_2$$

$$P_1 = \text{NH}_4\text{NO}_3 \text{ ในสารละลายเข้มข้น} = 33,000 \text{ mg}$$

$$P_2 = \text{NH}_4\text{NO}_3 \text{ ที่ต้องการใช้} = 1,650 \text{ mg}$$

$$V_1 = \text{ปริมาตรของสารละลายเข้มข้นที่จะต้องใช้}$$

$$V_2 = \text{ปริมาตรของอาหารที่ต้องการเตรียม } 1,000 \text{ ml}$$

$$\text{แทนค่า } 33,000 \times V_1 = 1,650 \times 1,000$$

$$V_1 = \frac{1,650 \times 1,000}{33,000} = 50 \text{ ml}$$

ดังนั้นในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร จึงใช้สารละลายเข้มข้นกลุ่มที่ 1 ปริมาตร 50 ml

เตรียมอาหารสูตร MS (1962) จำนวน 1 ลิตร

1. เทน้ำกลั่นประมาณ 300 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
2. คูดสารละลายเข้มข้น (ปริมาตรที่ใช้ดังตารางที่ 2) ใส่ลงรวมกันในบีกเกอร์
3. เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม ลงในบีกเกอร์
4. คนสารละลายจนกระทั่งน้ำตาลละลายหมด
5. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสารอื่นๆ ตามความต้องการของสูตรอาหาร
6. ปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร
7. ปรับ pH ด้วย HCl 1N หรือ KOH 1N ให้ได้ประมาณ 5.6 - 5.8
8. เติมวุ้น กรณีเตรียมอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารแข็ง
9. เคี่ยวอาหารให้เดือดเพื่อหลอมละลายวุ้น
10. เทอาหารลงภาชนะที่ใช้เลี้ยง
11. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นานประมาณ 15 - 20 นาที

หมายเหตุ ระยะเวลาที่เหมาะสมในการนึ่งฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับปริมาตรของอาหาร ดังแสดงในตารางผนวกที่ 4

ตารางที่ 2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (1962)

Stock	สารเคมี	ปริมาณ (mg/l)	ปริมาณเข้มข้น (mg/l)	ปริมาตรที่ใช้ (ml/l)
1			20X	50
	NH ₄ NO ₃	1,650	33,000	
	KNO ₃	1,900	38,000	
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	8,800	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	7,400	
	KH ₂ PO ₄	170	3,400	
2			100X	10
	H ₃ BO ₃	6.2	620	
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	2,230	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	860	
	KI	0.83	83	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	25	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	2.5	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	2.5	
3			100X	10
	Na ₂ -EDTA	37.25	3,725	
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85	2,785	
4			100X	10
	Glycine	2.0	200	
	Nicotinic acid	0.5	50	
	Pyridoxine-HCl	0.5	50	
	Thiamine-HCl	0.1	10	
	Myo-inositol	100	10,000	

คำถามท้ายบท

1. ต้องการเตรียมอาหารสูตร MS (1962) ปริมาตร 500 ml ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.5 mg/l จาก BA ความเข้มข้น 100 mg/l จะต้องใช้ BA จาก stock solution ปริมาตรเท่าไร ?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. ในการเตรียมอาหารสูตร VW ต้องใช้ KNO_3 525 mg/l หากต้องการเตรียมอาหาร ปริมาตร 800 ml ต้องใช้ KNO_3 ที่มีความเข้มข้น 52,500 mg/l ปริมาตรเท่าไร ?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3. อาหารสูตร MS (1962) มีส่วนประกอบของ KNO_3 1,900 mg/l ต้องการเตรียมอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ปริมาตร 250 ml ต้องใช้สารละลายเข้มข้นที่มี KNO_3 38,000 mg/l ปริมาตรเท่าไร จึงจะได้ ความเข้มข้นตามที่ต้องการ ?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....