

บทปฏิบัติการที่ 5

เรื่อง การเพาะเลี้ยงและการช่วยชีวิตอ่อนบุริโอล์ฟ

ข้อดีอีกประการหนึ่งของเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพิชในสภาพปลอดเชื้อ คือสามารถควบคุมปริมาณธาตุอาหารและสภาพแวดล้อมได้ตามที่ต้องการ ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยหลายด้าน รวมทั้งเพื่อศึกษาการพัฒนาของอ่อนบุริโอล์ฟที่ได้จากการผสมตามธรรมชาติ (zygotic embryo) ซึ่งช่วยให้นักวิจัยสามารถเห็นการเจริญเติบโตของอ่อนบุริโอล์ฟจนกระทั่งพัฒนาเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ และยังนำมาใช้ขยายพันธุ์พิชที่ไม่สามารถถูกตัดในธรรมชาติเนื่องจากปัญหาหลายประการดังเช่น พิชบางชนิดมีระยะพักด้วยนานมาก เช่น ปาล์มน้ำเงินชนิดพิชบางชนิดมีสารเคมีมีฤทธิ์ยับยั้งการออกของเมล็ด เช่น มะละกอ เป็นต้น สำหรับกลัวยไม่อ่อนบุริโอล์ฟในธรรมชาติไม่สามารถพัฒนาได้ เนื่องจากไม่มีอาหารสะสม ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงอ่อนบุริโอล์ฟเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว

การเพาะเลี้ยงอ่อนบุริโอล์ฟล้วยไม้ นับเป็นการเริ่มต้นของงานด้านการอนุรักษ์กล่าวไปแล้วก็ที่มีความสำคัญในปัจจุบันอย่างยิ่ง นอกจากนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงอ่อนบุริโอล์ฟเป็นเครื่องมือที่สำคัญของนักปรับปรุงพันธุ์ในการขยายพันธุ์พิชที่ได้จากการผสมข้าม ซึ่งมักประสบปัญหาอ่อนบุริโอล์ฟไม่สามารถพัฒนาได้ในธรรมชาติ โดยการแยกอ่อนบุริโอล์ฟที่ยังไม่เจริญเติบโตมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เรียกว่า เทคนิคนี้ว่าการช่วยชีวิตอ่อนบุริโอล์ฟ (embryo rescue) ซึ่งสามารถช่วยแก้ปัญหาความล้มเหลวที่มักเกิดขึ้นจากการผสมของพิชที่มีความแตกต่างกันมาก เช่นระหว่างพิชต่างชนิด (interspecific hybridization) หรือต่างสกุล (intergeneric hybridization) อย่างไรก็ตามอายุของอ่อนบุริโอล์ฟที่เลือกใช้มีความสำคัญต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเป็นอย่างมาก จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าอ่อนบุริโอล์ฟที่มีอายุย่อมมาก ๆ มักไม่ประสบความสำเร็จ อายุของอ่อนบุริโอล์ฟที่เหมาะสมในการนำมาเพาะเลี้ยงคือเมื่อมีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ globular stage

วัตถุประสงค์

1. เพื่อฝึกเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงและการช่วยชีวิตอ่อนบุริโอล์ฟ
2. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของอ่อนบุริโอล์ฟในสภาพปลอดเชื้อ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพิชได้แก่ ฝักกลัวยไม้ และ เมล็ดถั่วเหลือง
2. อุปกรณ์ในดูบปลดเชือก ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว ผ้า ตะเกียงและกอซอส
3. สารเคมีในการฟอกผ้าเชือก ได้แก่ คลอรอฟอร์ ทวีน 20 และกอซอสความเข้มข้น 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
4. น้ำกลันที่นึ่งผ้าเชือกแล้ว
5. อาหารสังเคราะห์สูตร VW และสูตร MS

วิธีการ

การเพาะเลี้ยงเมมบริโอลลัวยไม้

1. นำฝักกลัวยไม้มาล้างทำความสะอาดผิวของฝักให้สะอาดด้วยน้ำสูญ
2. ตัดแต่งส่วนของฝักที่มีบาดแผล และตัดกลีบดอกแห้งที่ติดอยู่ออกให้เรียบร้อย
3. ฟอกผ้าเชือกฝักกลัวยไม้ด้วยวิธีการเผาไฟ โดยจุ่มและกอซอส 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วเผาไฟ 1 – 2 ครั้ง
4. ผ่าฝักกลัวยไม้ตามยาว ใช้ปลายมีดเขี่ยเมมบริโอลลงเลี้ยงบนอาหารสูตร VW
5. นำขวดใส่เนื้อยื่นไปเพาะเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส มีความกว้าง 16 ซัมเมอร์ และมีต 8 ซัมเมอร์
6. บันทึกการเปลี่ยนแปลงทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

การเพาะเลี้ยงเมมบริโอลลัวยไม้

1. นำฝักถั่วเหลืองอ่อนมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสูญ
2. ผ่าเอาเฉพาะเมล็ดมาแขวนและกอซอส 70 เปอร์เซ็นต์ นานประมาณ 1 นาที

3. เขย่าในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ผสมทิวิน 20 ประมาณ 1-2
หยด เขย่านาน 15 นาที
4. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งข้าวเชือแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ ประมาณ 5 นาที
 5. นำเอมบริโอลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS
 6. นำขวดใส่เนื้อยื่นไปเพาะเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ± 0 องศาเซลเซียส มีความยาวช่วง
แสง 16 ชั่วโมง และมีค่า 8 ชั่วโมง
 7. บันทึกการเปลี่ยนแปลงทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

บันทึกผลการทดลอง

1. การปนเปื้อน ลักษณะและสาเหตุของการปนเปื้อน
2. การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น จำนวนและความยาวของยอดและราก
3. ลักษณะที่นำไปของเนื้อยื่นพิชเริ่มต้น

หมายเหตุ บันทึกผลการทดลองทุกวันจนครบ 1 สัปดาห์

ผลการเพาะเลี้ยงเอมบริโอ

พืชด้าวย่าง : ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ
 ชนิดส่วนเริ่มต้น เอembryo สูตรอาหาร
 วิธีการฟอกฝ่าเชือ
 วันที่ทำการทดลอง ผู้ทดลอง

สัปดาห์ ที่	การปนเปื้อน (%)	สาเหตุ	ข้อมูลด้านปริมาณ				ลักษณะทั่วไป	
			ยอด		ราก			
			จำนวน (ยอด)	ยาว (cm)	จำนวน (ราก)	ยาว (cm)		
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								

สรุปผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

คำถามท้ายบท

1. เอมบริโอมีลักษณะการเจริญเติบโตอย่างไร เทมoinหรือแตกต่างจากในธรรมชาติอย่างไร
จงอธิบาย ?

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

2. อาการที่พบอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำเกิดจากสาเหตุใด มีผลอย่างไรต่อพิษและ
มีวิธีการแก้ไขอย่างไรได้บ้าง ?

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

3. จงยกตัวอย่างพิชที่ควรนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงหรือช่วยชีวิตเอมบริโอมาใช้ในการ
ขยายพันธุ์ Maoอย่างน้อย 5 ชนิด พร้อมบอกเหตุผล?

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