

## บทปฏิบัติการที่ 6

### เรื่อง การซักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัส

การพัฒนาของพืชในสภาพปลดเชือนั้น นอกจากจะเกิดเป็นยอดและรากแล้วยังสามารถเกิดเป็นรูปแบบของกลุ่มเซลล์พาร์โนมา ที่มีการเพิ่มจำนวนโดยไม่พัฒนาเป็นอวัยวะใดๆ ซึ่งเรียกลักษณะของกลุ่มเซลล์นี้ว่าแคลลัส ซึ่งในธรรมชาติแคลลัสเป็นการตอบสนองของเนื้อเยื่อพืชเมื่อได้รับบาดแผล แต่สำหรับการเพาะเลี้ยงในสภาพปลดเชือนนี้เซลล์พืชสามารถถูกซักนำให้เกิดแคลลัสได้จากอวัยวะทุกส่วน เช่น ราก ลำต้น และใบ เป็นต้น ทั้งนี้ในแต่ละชิ้นส่วนอาจมีเพียงบางเซลล์เท่านั้นที่เกิดแคลลัสได้ ซึ่งสามารถจำแนกแคลลัสโดยอาศัยลักษณะทางกายภาพได้เป็น 2 ประเภท คือ พวກที่มีลักษณะแข็งการเกาะตัวกันแน่นมีการเติบโตข้าม เรียกว่า hard callus หรือ compact callus และพวกที่มีการเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ เจริญแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว เรียกว่า friable callus เมามะในการนำไปเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนโดยแคลลัสได้หลายสีเช่น ขาว เหลือง ม่วง แดง และเขียว ขึ้นอยู่กับรังคัดถูกในเซลล์ จะสามารถถูกซักนำให้มีการพัฒนาไปเป็นโครงสร้างที่ท่าหน้าที่ต่อไปได้

การซักนำและการเพาะเลี้ยงแคลลัส จำเป็นต้องอาศัยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมเป็นตัวกำหนด ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและประเภทของชิ้นส่วนเริ่มต้นรวมทั้งสภาวะในการเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ ความแข็งของอาหารและปริมาณแสง เป็นต้น นอกจากนี้ในพืชบางชนิดพบว่าปริมาณออกซิเจนของพืชในธรรมชาติและความมีช้า (polarity) ของชิ้นส่วนพืชมีผลต่อการซักนำให้เกิดแคลลัส ดังนั้นจึงมีส่วนของรายละเอียดบางประการที่ต้องคำนึงถึง เช่น วิธีการตัดชิ้นส่วน และตำแหน่งในการวางบนอาหาร เป็นต้น

ในการเพิ่มปริมาณแคลลัสสามารถทำได้โดยเปลี่ยนอาหารด้วยการตัดแบ่งแคลลัสแล้วนำไปเลี้ยงในอาหารใหม่ ซึ่งอาจเป็นอาหารสูตรเดียวกับที่ใช้ในการซักนำหรืออาจต้องมีการปรับปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตให้เหมาะสมซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช อย่างไรก็ตาม บางครั้งอาจพบลักษณะของแคลลัสยื่นและมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารหลายๆ ครั้งจะพบแคลลัสแสดงอาการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือสีเทาใส ควรจะคัดแยกออกไม่นำมาเพาะเลี้ยงต่อไป

## วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการซักน้ำแคลลัส
- เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัส
- เพื่อศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของแคลลัสประเภทต่างๆ

## อุปกรณ์

- ตัวอย่างพืชได้แก่ ชิ้นส่วนแครอท และหัวมันฝรั่ง
- อุปกรณ์ในดูปลดเชือ "ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคิม งานแก้ว ผ้า ตะเกียงและขอร์"
- แหลกขอร์ความเข้มข้น 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- สารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และทวิน 20
- น้ำกลันที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- อาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ "ได้แก่
  - สูตร MS
  - สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อ笑意
  - สูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อ笑意

## วิธีการ

### การซักน้ำแคลลัสแครอท

- คัดเลือกชิ้นส่วนแครอทที่ปลดเชือ จากบทปฏิบัติการที่ 4
- ย้ายชิ้นส่วนแครอทลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม

### ต่อติด

- นำขวดเนื้อเยื่อพืชไปเพาะเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส สภาพมีด  
ประมาณ 7 วัน

### **การเตรียมชิ้นส่วนเริ่มต้นมันฝรั่ง**

1. คัดเลือกหัวมันฝรั่งที่มีสภาพสมบูรณ์ไม่มีโรคและแมลง
2. ล้างทำความสะอาดหัวมันฝรั่งด้วยน้ำสบู่เพื่อขจัดสิ่งสกปรกภายนอก
3. ตัดเฉพาะชิ้นส่วนดาษงามทำการฟอกผ่าเชือดด้วยสารละลายคลอรอฟอร์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ผสมทวน 20 1-2 หยด เขย่านานประมาณ 10 นาที
4. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งผ่าเชือดแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
5. ตัดแต่งเนื้อเยื่อส่วนที่เสียหายจากการฟอกผ่าเชือดออก แล้วนำลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS จำนวนหนึ่งเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16 ชั่วโมง มีด 8 ชั่วโมง ประมาณ 4 สัปดาห์

### **การซักนำแคลลัสมันฝรั่ง**

1. ตัดส่วนปล้อง (internode) ของมันฝรั่งขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วกรีดตามแนวยาว นำลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. นำขวดเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16 ชั่วโมง มีด 8 ชั่วโมง ประมาณ 4 - 8 สัปดาห์

### **การเพาะเลี้ยงแคลลัสแครอฟท์**

1. คัดเลือกชิ้นแครอฟท์ที่มีแคลลัสมันฝรั่งเกิดขึ้น
2. ตัดแยกเฉพาะแคลลัสมันฝรั่งขนาดประมาณ 1 ถูกบาทก์เซนติเมตร ย้ายลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. นำขวดเนื้อเยื่อพิชนำไปเพาะเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ประมาณ 4 สัปดาห์

### **การเลี้ยงแคลลัสมันฝรั่ง**

1. คัดเลือกชิ้นส่วนมันฝรั่งที่มีแคลลัสมันฝรั่งเกิดขึ้น

2. ตัดแยกแคลลสูชนาดประมาณ 1 ถุงขนาดเซนติเมตร นำลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำ NAA 0.5 ร่วมกับ IAA 0.1 และ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. นำขวดเนื้อยืดพิชนำไปเพาะเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส นานประมาณ 4 สัปดาห์

### บันทึกผลการทดลอง

1. การป่นเปื้อน ลักษณะและสาเหตุของการป่นเปื้อน
2. อัตราการเกิดแคลลส์ สีและลักษณะของแคลลส์
3. ลักษณะทั่วไปของเนื้อยืดพิชเริ่มต้น

หมายเหตุ บันทึกผลการทดลองทุกวันจนครบ 4 สัปดาห์

## ผลการซักนำแคลลัส

พิชตัวอย่าง : ชื่อวิทยาศาสตร์.....ชื่อสามัญ.....  
 ชั้นส่วนเริ่มต้น .....สูตรอาหาร .....  
 วันที่ทำการทดลอง.....ผู้ทดลอง.....

จำนวน วัน	การปนเปื้อน		การเกิดแคลลัส		ลักษณะทั่วไป
	(%)	สาเหตุ	(%)	สี / ลักษณะ	
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					

### สรุปผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## ผลการเพาะเลี้ยงแคลลัส

พิชตัวอย่าง : รื่อวิทยาศาสตร์..... รื่อสามัญ.....

ชั้นส่วนเริ่มคัน ..... สูตรอาหาร.....

วันที่ทำการทดลอง..... ผู้ทดลอง.....

สับดาห์ ที่	สูตรอาหาร	การปนเปื้อน		ลักษณะของแคลลัส		ลักษณะทั่วไป
		(%)	สาเหตุ	สี	ขนาด ( $\text{cm}^3$ )	
1						
4						
3						
4						

## สรุปผลการทดลอง

---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---

คำถ้ามทัยนท

1. แคลลส์เจริญมาจากการส่วนได้ของชั้นส่วนเริ่มต้น เพราะเหตุใดจึงเป็นเช่นนั้นจงอธิบาย ?

---

---

---

---

---

2. แคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะทางกายภาพเป็นแบบใด จงอธิบาย ?

---

---

---

---

---

3. อาหารแต่ละสูตรมีผลต่อการเจริญเดินไตของแคลลสอย่างไรบ้าง มีความเห็นหรือ  
แตกต่างกันอย่างไร จงอธิบาย ?

---

---

---

---

---

---

---

---

---