

บทปฏิบัติการที่ 8

เรื่อง การซักนำและเพาะเลี้ยงโซมาติกเอมบริโอ

กระบวนการเกิดและพัฒนาของเอมบริโอ (embryogenesis) สำหรับเอมบริโอที่เกิดจากการผสมในธรรมชาตินั้นเริ่มจาก การสร้าง zygote และสิ้นสุดลงเมื่อเกิดเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ ระหว่างกระบวนการพัฒนาเอมบริโอนั้น มีรูปแบบทางสัณฐานวิทยาของส่วนปลายยอดและปลายรากที่ได้ถูกกำหนดไว้แล้ว ซึ่งในระหว่างกระบวนการจะมีการสะสมอาหารต่างๆ ในกลุ่ม ควรนำไปใช้เดรทไขมัน และโปรตีน สำหรับใช้ในการพัฒนาของเอมบริออด้วยไป

โซมาติกเอมบริโอ (somatic embryo) คือเอมบริโอที่มีกระบวนการเกิดและพัฒนามาจากเซลล์ร่างกายของพืชโดยมิได้ผ่านการผสมของเซลล์สืบพันธุ์ในธรรมชาติ การมีจุดกำเนิดยอดและจุดกำเนิดรากนั้นจะถูกซักนำให้เกิดขึ้นจากสภาวะในการเพาะเลี้ยง ซึ่งแนวทางในการซักนำโซมาติกเอมบริโอมีทั้งแบบทางตรง คือการเกิดโซมาติกเอมบริโอกลางซึ่งส่วนพืชเริ่มต้นโดยไม่มีการพัฒนาผ่านแคลลัส (direct embryogenesis) และการเกิดโดยพัฒนาผ่านแคลลัส (indirect embryogenesis) กระบวนการพัฒนาของโซมาติกเอมบริโอนั้นมีลำดับขั้นตอนคล้ายกับการเกิดในธรรมชาติ คือ มีระยะพัฒนาเป็น globular shape heart shape และ torpedo shape แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการเกิดโซมาติกเอมบริโอนั้น เราสามารถซักนำให้มีการเพิ่มจำนวนของโซมาติกเอมบริโอด้วยรูปของเซลล์ขนาดเล็กโดยไม่พัฒนาไปเป็นเอมบริโอบนราบเดียว แนะนำจากนั้นพบว่าไม่มีการพัฒนาของโซมาติกเอมบริโอบนราบเดียวซึ่งเป็นข้อแตกต่างจากเอมบริโอบนธรรมชาติที่สำคัญอีกประการหนึ่ง ดังนั้นจึงมีการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอมบริโอด้วยการนำใบประยุกต์ใช้ในการซักนำให้เกิดพืชพันธุ์ใหม่จากเทคนิค somaclonal variation การเพิ่มปริมาณต้นพืชเพื่อการค้า การผลิตเมล็ดเทียม และการเก็บรักษายาพันธุกรรมพืช เป็นต้น

ในการซักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอมีปัจจัยเกี่ยวข้องที่สำคัญได้แก่ สารควบคุมการเจริญเติบโต แหล่งในโครงสร้าง แหล่งคาร์บอน วิตามิน รวมทั้งสารประกอบอินทรีย์ และ อินทรีย์ต่างๆ ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังมีปัจจัยเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อม เช่น สภาพอากาศ ความชื้น แสง สี ฯลฯ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ที่นิยมใช้ในการซักนำโซมาติกเอมบริโอด้วยสารเคมี เช่น 2,4-D นอกจากนี้ได้แก่สารในกลุ่มกำจัดวัชพืช เช่น picloram และ dicamba เป็นต้น

วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาเทคนิคการซักนำโชมาติกเอมบริโอ
- เพื่อศึกษารูปแบบการพัฒนาของโชมาติกเอมบริโอ

อุปกรณ์

- พิชุดลงชิ้น ชุดดอกอ่อนของหญ้าแฟก ตันถ้วนเหลืองในสภาพปลอดเชื้อ
- อุปกรณ์ในครัวปลอดเชื้อ ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว ผ้า ตะเกียงและซอฟต์
- สารเคมีในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอรอฟอร์ ทวิน 20 และกลอชอล 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- อาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมด้วย 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.25 0.45 10 และ 15 ไมโครโมลาร์

วิธีการ

การซักนำโชมาติกเอมบริโอหญ้าแฟก

- ล้างทำความสะอาดชุดดอกอ่อนของหญ้าแฟกด้วยน้ำสูง
- เช็ดบริเวณผิวของชุดดอกอ่อนด้วยและกลอชอล 70 เปอร์เซ็นต์
- นำชุดดอกอ่อนด้วยและกลอชอล 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วเผาไฟ 2 ครั้ง
- ตัดชุดดอกออกเป็นหònสันๆ ขนาดประมาณ 1 นิ้ว
- ผ่าตามยาวแล้วใช้ปากคีบหยิบชุดดอกที่อยู่ภายในหònมา แล้วนำลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 15 ไมโครโมลาร์
- นำขวดเนื้อยோไปเพาะเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16 ชั่วโมง มีค 8 ชั่วโมง ประมาณ 4 – 8 สัปดาห์

การซักนำโซมาติกเอมบอร์อถัวเหลือง

1. คัดเลือกต้นถัวเหลืองที่ปลูกเชื้อ จากบทปฏิบัติการที่ 5
2. ตัดแยกส่วนใบเลี้ยง (cotyledon) นำลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวางในทิศทางต่างๆ กัน ในแนวนอนและแนวตั้ง
4. นำขวดเนื้อยื่นพิชไปเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 – 8 สัปดาห์

การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอมบอร์อหัญญ่าแฟก

1. ตัดแยกโซมาติกเอมบอร์ที่เกิดขึ้นย้ายลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 10 ไมโครโมลาร์
2. นำขวดเนื้อยื่นพิชไปเพาะเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16 ชั่วโมง มีด 8 ชั่วโมง นาน 4 สัปดาห์

การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอมบอร์อถัวเหลือง

1. คัดเลือกขั้นส่วนของถัวเหลืองที่มีแคคลัสเกิดขึ้น
2. ตัดแยกเฉพาะแคคลัสขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลวอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. นำขวดเนื้อยื่นพิชไปเพาะในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์

บันทึกผลการทดลอง

1. การป่นเมือน ลักษณะและสาเหตุของการป่นเมือน
2. รูปแบบการเกิดและลักษณะของโซมาติกเอมบอร์
3. การเติบโตของโซมาติกเอมบอร์
4. ลักษณะทั่วไปของเนื้อยื่นพิชเริ่มต้น

หมายเหตุ บันทึกผลการทดลองทุกวันจนครบ 4 สัปดาห์

ผลการชักนำโซมาติกเอมบริโอ

พิชิตอวย่าง : ชื่อวิทยาศาสตร์.....ชื่อสามัญ.....
 ชั้นส่วนเริ่มต้นสูตรอาหาร
 วันที่ทำการทดลอง.....ผู้ทดลอง.....

ลำดับ ที่	การปนเปื้อน		การเกิดโซมาติกเอมบริโอ		ลักษณะทั่วไป
	(%)	สาเหตุ	direct	indirect	
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					

สรุปผลการทดสอบ

ผลการเพาะเลี้ยงเชิงมานาดิกเอมบิร์โธ

พิชตัวอย่าง : ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ
 ชื่นส่วนเริ่มต้น สูตรอาหาร
 วันที่ทำการทดลอง ผู้ทดลอง

สัปดาห์ ที่	การปนเปื้อน		การเติบโต		ลักษณะทั่วไป
	(%)	สาเหตุ	ขนาด (cm ³)	สี/ลักษณะ	
1					
4					
3					
4					

สรุปผลการทดสอบ

คำถ้ามท้ายบท

1. รูปแบบการเกิดโฆษณาดิจิทัลบนช่องทางอิเล็กทรอนิกส์เป็นแบบใด เหมือนหรือแตกต่างจากถ้า
เหลืออย่างไร ?

2. ลักษณะของโฉมดิกกेमบริโอที่เกิดขึ้นเป็นแบบใด
เมื่อันหรือแตกต่างกับไข่โภคึก
โฉมบริโภในธรรมชาติอย่างไร ?

3. โฆษณาดิจิทัลของบริโภคจากบริเวณใดของชั้นส่วนเริ่มต้นมากที่สุด เพราะเหตุใด?
