

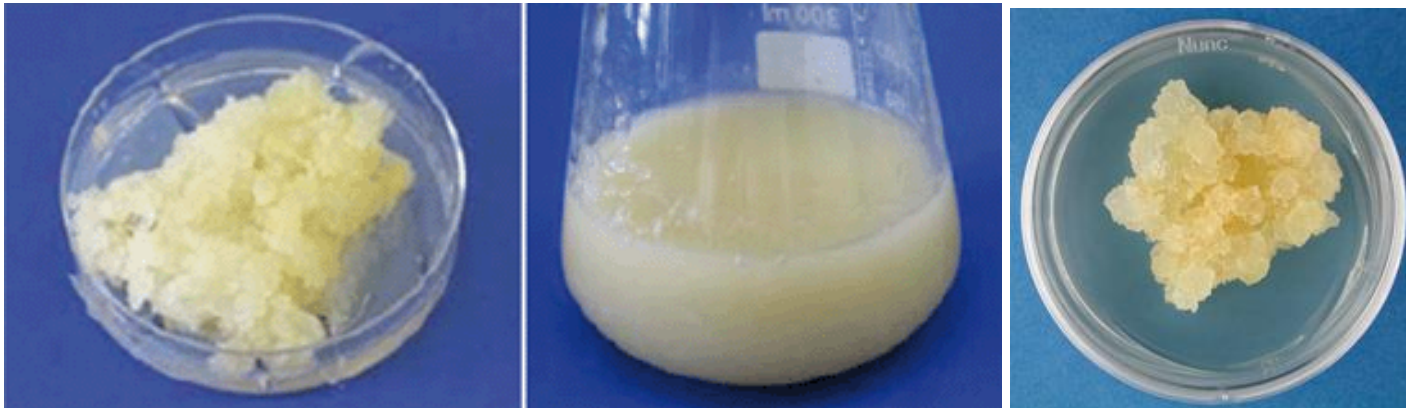
ธาตุอาหารและ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วิชา การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ครูสุดารัตน์ คำผา

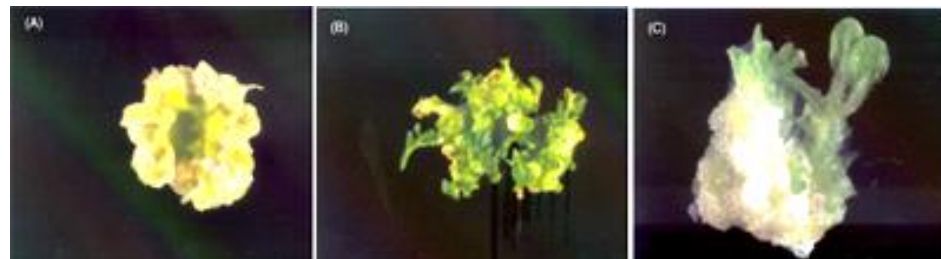
อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- ▶ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้องเหมาะสมกับชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่จะเพาะเลี้ยง
- ▶ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดัดแปลงมาจากอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus)
- ▶ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบด้วย ธาตุอาหารที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ และสารอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช



ธาตุอาหารอินทรีย์ (organic substances)

- ▶ ธาตุอาหารหลัก : เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก ได้แก่
C, H, O, N, P, K, Ca, Mg และ S
- ▶ ธาตุอาหารรอง : เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย ได้แก่
Fe, Mn, Cu, Zn, B, Cl, และ Mo



ธาตุอาหารอินทรีย์ (organic substances)

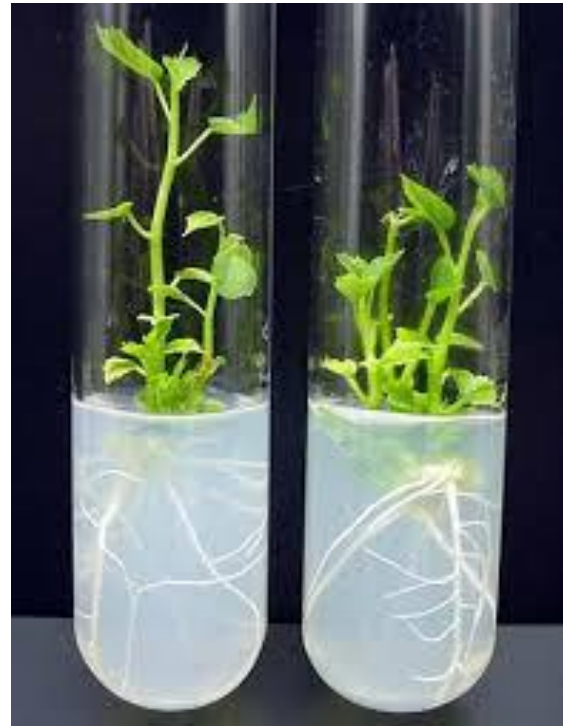
▶ วิตามิน (vitamin) ที่นิยมใช้เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่

- ▶ วิตามิน B1 (Thiamine)
- ▶ วิตามิน B2 (Riboflavin)
- ▶ วิตามิน B6 (pyridoxine)
- ▶ กลุ่มวิตามิน Bรวม (inositol)
- ▶ วิตามิน C (Ascorbic acid)
- ▶ ไนอะซิน (Nicotinic Acid)
- ▶ ฯลฯ



ฮอร์โมนและสารควบคุมการเจริญ (plant hormone, plant growth regulators)

- ▶ สารในกลุ่มออกซิน (**auxins**)
- ▶ การขยายขนาดของเซลล์
- ▶ การแบ่งตัวของเซลล์ในแคมเบียม
- ▶ การขยายขนาดของใบ, ผล
- ▶ การเกิดราก
- ▶ ป้องกันการหลุดร่วงของใบ ดอก ผล
- ▶ เช่น IAA, IBA, NAA, 2,4-D



ฮอร์โมนและสารควบคุมการเจริญ (plant hormone, plant growth regulators)

- ▶ สารในกลุ่มไซโทไคนิน (**cytokinins**)
- ▶ กระตุ้นการแบ่งเซลล์ของพืช
- ▶ ชะลอการแก่ชรา
- ▶ กระตุ้นการเกิดยอด
- ▶ เช่น BA, Kinetin, zeatin



ฮอร์โมนและสารควบคุมการเจริญ (plant hormone, plant growth regulators)

▶ สารในกลุ่มจิบเบอเรลลิน (gibberellins)

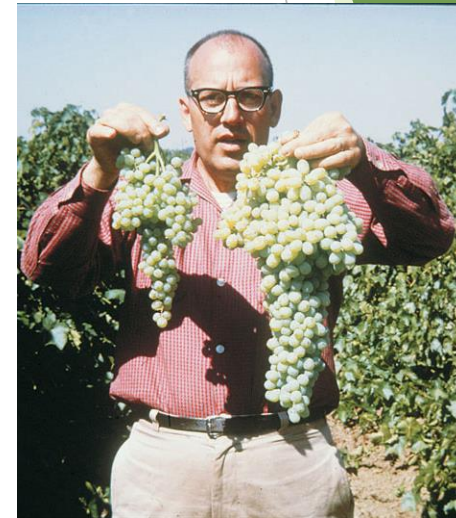
กระตุ้นการยืดตัวของเซลล์, ทำลายการพักตัวของพืช

▶ เอทิลิน (ethylene)

ผลควบคุมการแก่ชรา, การสุก, รวมทั้งการออกดอกของพืชบางชนิด

▶ สารชะลอการเจริญเติบโตของพืช (plant growth retardants)

ยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนจิบเบอเรลลินในพืช, ทำให้พืชมีข้อสั้น



สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon sources)

- ▶ เป็นธาตุหลักในการสร้างอวัยวะต่างๆ ของพืช
- ▶ นิยมใช้ซูโครส 2-3 %
- ▶ ได้แก่ สารประกอบน้ำตาลต่างๆ เช่น **Glucose, sucrose, fructose, saccharose, mannitol**



Mannitol

กรดอะมิโน (amino acid)

- ▶ เป็นแหล่ง N สำคัญต่อการสร้างอวัยวะต่างๆ ของพืช
- ▶ ได้แก่ Glutamine, asparagine, adenine, glycine, casein ฯลฯ



สารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ

- ▶ เป็นแหล่งธาตุอาหารและฮอร์โมนพืช สำคัญต่อการชักนำให้พืชสร้างอวัยวะต่าง ๆ
- ▶ ได้แก่ น้ำมะพร้าว สารสกัดจากยีสต์ น้ำต้มมันฝรั่ง น้ำคั้นมะเขือเทศ มอลต์สกัด กล้วยหอมมรด ฯลฯ



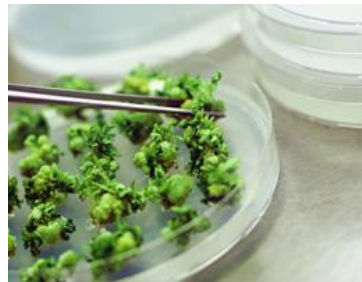
ข้อคำนึงในการเลือกอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- ▶ ชนิดและสายพันธุ์พืชที่จะเพาะเลี้ยง
- ▶ อายุและการพัฒนา
- ▶ ชนิดของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ
- ▶ เป้าหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- ▶ สถานะของอาหาร
 - ▶ อาหารเหลว (liquid medium)
 - ▶ อาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium)



สูตรอาหารที่นิยมแพร่หลาย

- ▶ **Murashige and Skoog (MS)** เป็นสูตรพื้นฐานที่นิยมใช้กับพืชทั่วไป
- ▶ **Gamborg B-5** นิยมใช้กับพืชทั่วไป
- ▶ **Vacin and Went** เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยง กล้วยไม้สกุลต่างๆ
- ▶ **Woody Plant Medium (WPM)** เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงพืชพวกไม้เนื้อแข็ง



คุณภาพของอาหาร

1. อาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium)

- ▶ นิยมใช้วุ้น (agar) ความเข้มข้น 0.8 % ทำให้อาหารมีสภาพกึ่งแข็ง
- ▶ อาจใช้สารอื่นได้ เช่น gelatin, silica gel, acylamind gel
- ▶ อาจเติมผงถ่าน (charcoal) เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตและดูดซับสารพิษจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช



คุณภาพของอาหาร

2. อาหารเหลว (liquid medium)

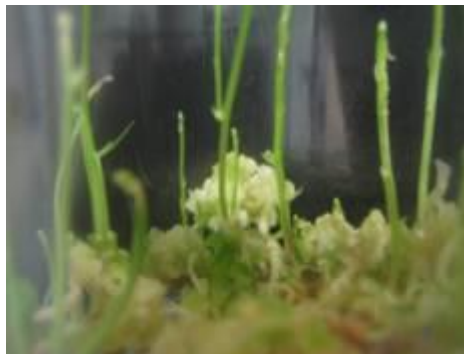
- ▶ เนื้อเยื่อจะจมในอาหารตลอดเวลา
- ▶ ต้องมีการเขย่า เพื่อช่วยในการหายใจ
- ▶ อาจใช้ (fabric support) อิมตัดั้ว เพื่อช่วยให้พืชเจริญเติบโตเร็วขึ้น



คุณภาพของอาหาร

3. ความเป็นกรดต่างของอาหาร (pH of medium)

- ▶ โดยทั่วไปจะปรับให้มีค่า pH ประมาณ 5.0-6.0 ก่อนเติมวุ้นและมาเชื้อ
- ▶ ถ้า pH สูง (>7.0) หรือน้อย (<4.0) เกินไป จะส่งผลต่อการดูดซึมอาหารของพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



คุณภาพของอาหาร

4. ปริมาณอาหารที่เหมาะสม

- ▶ ถ้ามากเกินไป ส่งผลเสียต่อการเจริญเติบโต
- ▶ ถ้าสูงเกินไป ทำให้พืชขาดสารอาหาร



กุหลาบหนู (Miniature Rose)



คุณภาพของอาหาร

5. การฆ่าเชื้อในอาหาร

- ▶ นิยมฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ ที่ความร้อน 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- ▶ ใช้เครื่องกรองเชื้อราและแบคทีเรียที่มีขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร



การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- ▶ สารที่ใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในปริมาณน้อย มักเตรียมในรูปสารละลายเข้มข้น **stock solution**
- ▶ สารที่อาจทำปฏิกิริยาเกิดเป็นสารพิษ ต้องเตรียมแยก **stock**
- ▶ สารบางชนิดเมื่อรวมกับสารอื่น อาจไม่ละลาย ต้องเตรียมแยก **stock**

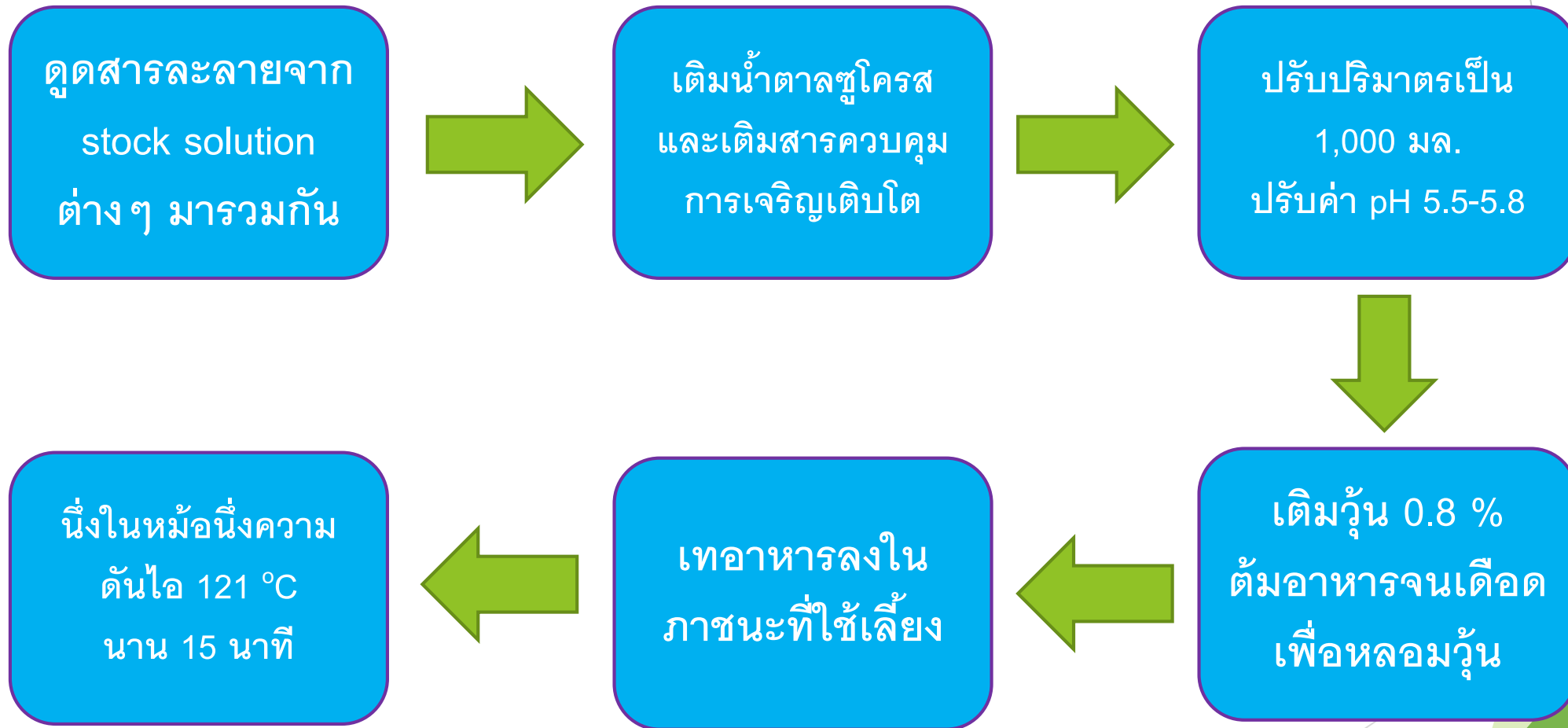


การเตรียมสารละลายเข้มข้น ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



Component	Concentration in stock (mg l ⁻¹)	Concentration in medium (mg l ⁻¹)	Volume of stock per litre of medium (ml)
Macronutrients			
NH ₄ NO ₃	33000	1650	50
KNO ₃	38000	1900	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	8800	440	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7400	370	
KH ₂ PO ₄	3400	170	
Micronutrients			
KI	166	0.83	5
H ₃ BO ₃	1240	6.2	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	4460	22.3	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1720	8.6	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	50	0.25	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5	0.025	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5	0.025	
Iron Source			
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5560	27.8	5
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	7460	37.3	
Vitamins			
Myo-inositol	Add freshly to the medium	100	5
Nicotinic acid	100	0.5	
Pyridoxine-HCl	100	0.5	
Thiamine-HCl	100	0.5	
Glycine	400	2	
Carbon Source			
Sucrose	Add freshly to the medium	30g l ⁻¹	
Adjust pH to 5.7-5.8 before autoclaving			

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



คำถามท้ายบท

- ▶ 1. ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองต่างกันอย่างไร
- ▶ 2. หากต้องการเพิ่มจำนวนยอดจะต้องใส่สิ่งใดลงไปในการเพาะเลี้ยง อธิบาย
- ▶ 3. จะเกิดอะไรขึ้นหากไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- ▶ 4. เหตุใดอาหารเพาะเลี้ยงกล้วยไม้สูตร **VW** ต้องเติมน้ำมะพร้าว
- ▶ 5. เหตุใดการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงต้องคำนึงถึงชนิดและสายพันธุ์พืช
- ▶ 6. หากต้องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้คัพภะ (**embryo**) นักเรียนจะออกแบบอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างไร
- ▶ 7. เมื่อนักเรียนเตรียม **stock solution** เสร็จแล้ว นักเรียนจะเก็บไว้ที่ใด เพราะเหตุใด
- ▶ 8. นักเรียนมีหลักการอย่างไรในการเลือกอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารเหลวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

