การขยายพันธุ์พืชด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

แก้วปัญญา Kaewpanya

ISBN : 978-974-625-832-6 (Print)
ISBN : 978-974-685-831-9 (E-book)

พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง
อภิชาติ ชิดบุรี
พิทักษ์ พุทธวรชัย

การขยายพันธุ์พืช
ด้วยเทคนิค
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

คำนำ

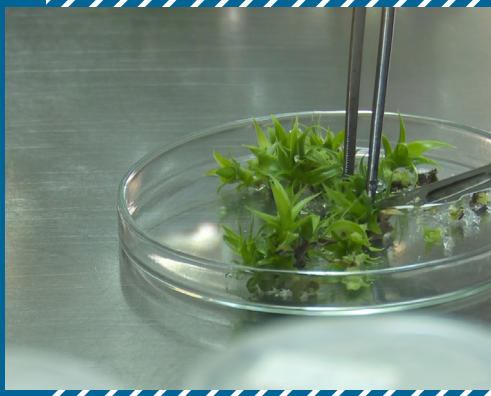
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเทคโนโลยีการขยายพันธุ์พืช เพื่อให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น โดยเป็นการเพาะเลี้ยงสิ่งมีชีวิตเฉพาะส่วนเท่านั้นไม่ใช้พืชทั้งต้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทำโดยนำเอาเนื้อเยื่อของพืชในส่วนที่กำลังเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เช่น ที่ปลายยอดอ่อน ตาข้าง ดอก ใบ เนื้อเยื่อหรือส่วนประกอบของพืชที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อซึ่งเป็นอาหารที่เนื้อเยื่อนั้นต้องการ พร้อมทั้งสารที่กระตุ้นโดยจัดและควบคุมสภาพแวดล้อมให้อยู่ในสภาพที่ปลอดเชื้อ มีอุณหภูมิความชื้นและแสงสว่างที่ต้องเอื้อต่อชิ้นส่วนของพืชจะเจริญเติบโตได้ การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อนั้น ๆ ทำให้เซลล์ของพืชแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากมายเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า แคลลัส (callus) เราจึงสามารถบังคับให้เนื้อเยื่อนี้เจริญเติบโตขึ้นเป็นต้นอ่อนได้เมื่อมีสภาวะที่เหมาะสมและแบ่งเนื้อเยื่อเหล่านี้ไปเลี้ยงในอาหารใหม่จนเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่จำนวนมากมายตามต้องการ วิธีนี้ใช้กันมากในการกระจายพันธุ์พืชบางชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น กล้วยไม้ หน้าวัว ต้นสัก หวาย กล้วย ข้าว เป็นต้น ที่จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการดำเนินการอย่างต่อเนื่องเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค

ประเทศไทยนั้นความรู้ทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากทางด้านการเกษตร เช่น การขยายพันธุ์พืชชนิดต่างๆ เช่น กล้วยไม้ กล้วยไม้ดอกชนิดต่าง ๆ เป็นต้น โดยมีการผลิตเป็นเชิงการค้า และได้มีการใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชพันธุ์ใหม่ๆ ให้มีลักษณะต่างๆ ตามความต้องการของเกษตรกร เช่น มะเขือเทศ และสตรอเบอรี่ เป็นต้น ตลอดจนการผลิตพืชปราศจากโรคแก่เกษตรกร เช่น มันฝรั่ง เป็นต้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา มีนักวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีประสบการณ์ มีอาคารปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสำหรับการทำงานวิจัย และการเรียนการสอนของนักศึกษามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา นอกจากนี้ ยังได้จัดการฝึกอบรมหลักสูตรด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้กับผู้ประกอบการขยายพันธุ์พืช เกษตรกร ครู อาจารย์จากโรงเรียนมัธยมศึกษาตอนปลาย และผู้สนใจทั่วไป เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาธุรกิจการขยายพันธุ์พืชของเกษตรกร ผู้ประกอบการ และเผยแพร่แก่ผู้สนใจอื่น เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

06

ความหมาย ของการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อพืช



09

ห้องปฏิบัติการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

18 อาหารวิทยาศาสตร์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

24 การคัดเลือกชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

30 ตัวอย่างการขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจบางชนิดด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

36 บทสรุป

ความหมาย ของการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อพืช

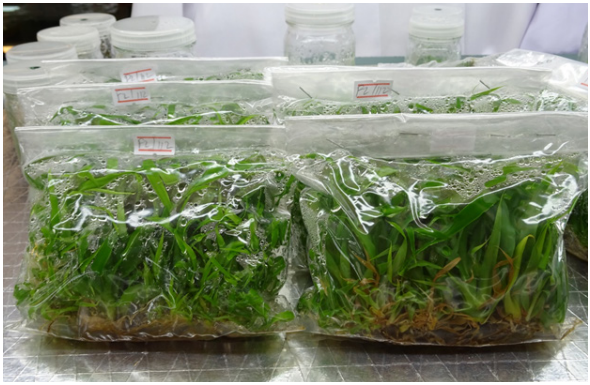
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหมายถึงการนำเอาอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น ใบ ดอก ราก ตา ข้อ หรือเมล็ด เนื้อเยื่อ เซลล์ หรือเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ที่เรียกว่าโพรโทพลาสต์ (protoplast) มาเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารต่างๆ วิตามิน น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) ภายใต้สภาพที่ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์และควบคุมอุณหภูมิและแสง ชิ้นส่วนของพืชเหล่านี้จะสามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชโดยตรง หรือแคลลัส หรือโครงสร้างคล้ายคัพภะ (embryo) ซึ่งเรียกว่าเอ็มบริออยด์ (embryoid) หลังจากนั้นจึงพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไป เนื่องจากเซลล์พืชมีคุณสมบัติที่เรียกว่าโททิโพเทนซี (totipotency) คือมีความสามารถที่จะเจริญเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้

หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

หลักการที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ ต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ตัดเอาชิ้นส่วนของพืชที่สะอาด นำมาเลี้ยงในขวดแก้วที่บรรจุอาหารวิทยาศาสตร์ ซึ่งได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อมาเรียบร้อยแล้ว เมื่อเซลล์จากชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาเลี้ยงได้รับแร่ธาตุ ไวตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโต และน้ำตาล จากอาหารวิทยาศาสตร์ ที่ใช้เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ จะมีการเจริญเติบโตเป็นต้นโดยตรง หรือเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ที่เรียกว่า "แคลลัส" หรือเกิดที่เป็นคัพภะที่เรียกว่า "โซมาติกเอมบริโอ" หรือ "เอมบริออยด์" และเมื่อตัดแบ่งเป็นชิ้นๆ แล้วเปลี่ยนอาหารใหม่บ่อยๆ ก็สามารถเพิ่มปริมาณได้ไม่มีที่สิ้นสุด ผลสุดท้ายก็จะได้ต้นที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการเป็นจำนวนมากเหมาะที่จะนำไปใช้ขยายพันธุ์ไม้ดอก ไม้ประดับ ผัก ไม้ผล ไม้ปลูกป่า พืชไร่ รวมทั้งพืชสมุนไพรต่างๆ

ประเภทของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแยกออกเป็นประเภทต่างๆ ได้ดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงพืชทั้งต้น (Plant culture) โดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดแก้วจนได้เป็นต้น เช่น การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในหลอดแก้วจนกระทั่งพัฒนาเป็นต้นพืช

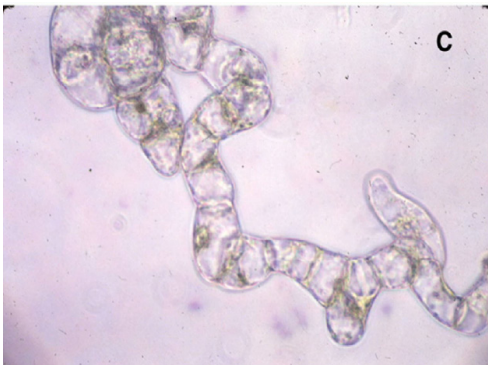


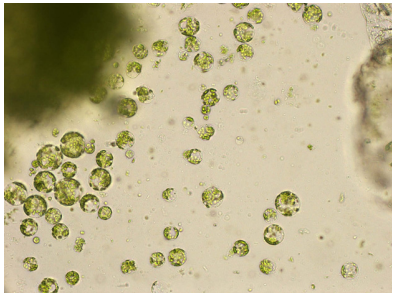
2. การเพาะเลี้ยงคัพภะ (Embryo culture) โดยแยกคัพภะมาเลี้ยงในสภาพหลอดแก้วหลังจากแกะเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออกแล้ว อาจเป็นคัพภะที่เจริญเต็มที่แล้ว (mature embryo) หรือยังอ่อนอยู่ (immature embryo)

3. การเพาะเลี้ยงอวัยวะ (Organ culture) เป็นการแยกเอาอวัยวะไปเลี้ยงในสภาพหลอดแก้ว เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ปลายยอด ใบอ่อน ราก ดอกอ่อน ผลอ่อน อับละอองเกสร เป็นต้น อวัยวะหรือชิ้นส่วนเริ่มต้นที่นำมาเลี้ยงเรียกว่า Explant

4. การเพาะเลี้ยงแคลลัส (Callus culture) โดยการเพาะเลี้ยงคัพภะหรืออวัยวะให้เจริญเติบโตเป็นแคลลัสซึ่งเป็นก้อนเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยเซลล์มีลักษณะเหมือนกัน ไม่สามารถบอกได้ว่ามาจากส่วนไหนของพืช (dedifferentiated tissue) แล้วจึงนำแคลลัสไปเลี้ยงต่อไป

5. การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (Suspension culture) เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กมากซึ่งกระจายตัวและเจริญเติบโตอยู่ในอาหารเหลว





6. การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ (Protoplast culture) เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ผนังเซลล์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์

การขยายพันธุ์พืช
ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ต้องเป็นห้องที่สะอาดปราศจากเชื้อ สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ โดยเฉพาะอุณหภูมิ โดยการติดตั้งเครื่องปรับอากาศ ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 25-28 องศาเซลเซียส ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน มืด 8 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสงประมาณ 2000 ลักซ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. พันธุ์พืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควรจะสะอาดปราศจากโรคและใช้ส่วนที่ยังอ่อนอยู่

2. เครื่องทำน้ำกลั่น หรือเครื่องกรองน้ำ เพื่อผลิตน้ำไว้ใช้เตรียมอาหาร และน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ

3. เครื่องชั่ง 2 ตัว ตัวแรกเป็นเครื่องชั่งอย่างละเอียด สามารถชั่งสารเคมีและสารควบคุมการเจริญเติบโตได้ในปริมาณน้อยมาก (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) เครื่องชั่งอีกตัวหนึ่งเป็นเครื่องชั่งอย่างหยาบ มีไว้สำหรับชั่งวุ้น และน้ำตาล

4. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

5. เตาแก๊ส เตาไฟฟ้า หรือตู้ไมโครเวฟ สำหรับต้มวุ้นให้ละลาย

6. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) มีไว้สำหรับฆ่าเชื้อในอาหาร ที่เตรียมไว้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และฆ่าเชื้อที่ติดมากับเครื่องมือผ่าตัด ในการนึ่งฆ่าเชื้อใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นึ่งเป็นเวลา 15-20 นาที

7. ตู้อบแห้ง (Oven) มีไว้สำหรับฆ่าเชื้อที่ติดมากับเครื่องแก้ว และเครื่องมือผ่าตัด ใช้อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

8. ตู้เย็น มีไว้สำหรับเก็บสารเคมี ที่เตรียมไว้เป็น Stock Solution สารควบคุมการเจริญเติบโต และไวตามิน

9. ตู้หรือชั้นวางสารเคมี

10. ตู้เก็บเครื่องแก้ว

11. ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Transfer Cabinet, Bioclean หรือ Laminar flow) ภายในตู้ประกอบด้วยแผ่นกรองฝุ่นละออง และเชื้อจุลินทรีย์จากอากาศ 2 แผ่น คือ Pre - filter และ Absolute Filter นอกจากนี้ยังใช้ระบบอื่นๆ ร่วมด้วยช่วยในการฆ่าเชื้อ เช่น ใช้แสง UV (Ultraviolet) การฉีดพ่นด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 70% หรือการอบด้วยฟอร์มาลิน และด่างทับทิม

12. ชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Culture shelf) ทำด้วยไม้ หรือเหล็กฉาก มีประมาณ 4 ชั้น ขนาดชั้นกว้าง 60 เซนติเมตร ยาว 125 เซนติเมตร แต่ละชั้นสูง 50 เซนติเมตร ติดหลอดไฟ White Light หรือ Gro lux ที่มีความเข้มของแสง ประมาณ 100 ฟุตแคนเดิล เปิดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง และปิดเป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน

13. เครื่องเขย่า (Shaker) เมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลว ต้องวางขวดบนเครื่องเขย่าที่เคลื่อนที่ในอัตรา 120 รอบต่อนาที เป็นการเพิ่มออกซิเจนลงไปในอาหาร

14. เครื่องปรับอากาศ จำเป็นต้องมีไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และห้องย้ายเนื้อเยื่อ ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ประมาณ 25 ถึง 28 องศาเซลเซียส

15. เครื่องแก้วต่างๆ ที่ใช้เตรียมอาหาร ได้แก่ กรวย กระบอกตวง ฟลาสก์ ปิเปตต์ บีกเกอร์ เครื่องแก้วที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ ฟลาสก์ หลอดแก้ว หลอดทดลอง มีดผ่าตัด ปากคีบ กรรไกร

16. เครื่องมือผ่าตัด ประกอบด้วย มีดผ่าตัด ปากคีบ กรรไกร

17. อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ อลูมินัมฟอยด์ สำลี ตะเกียงแอลกอฮอล์ กระดาษทิชชู และกระดาษกรอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการเลี้ยงชิ้นส่วน เซลล์ โพรโทพลาสต์ บนอาหารสังเคราะห์ ในอาหารสังเคราะห์มีส่วนประกอบที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อจุลิทรีย์ด้วย ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อจำเป็นที่ต้องทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับวัสดุพันธุ์พืช อาหาร เครื่องมือที่ใช้ทั้งหมด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเครื่องมือที่ใช้ในการตัดและเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งต้องทำในสภาพปลอดเชื้อ ความสะอาดเป็นหัวใจสำคัญโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ถ้าไม่สะอาดเนื้อเยื่อที่เลี้ยงจะตายเพราะเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้สภาพที่ปลอดเชื้อในระดับที่สูง ต้องคำนึงถึงห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยตั้งแต่เริ่มสร้างห้องปฏิบัติการ

การเลือกทำเลที่จะสร้างห้องปฏิบัติการ ดังนี้

- มีฝุ่นน้อย
- มีไฟฟ้า สำหรับในสถานที่ที่มีไฟฟ้าเสียบ่อย ๆ ควรที่จะต้องมีเครื่องกำเนิดไฟฟ้าสำรอง (Standby Generator) และมีตัวตัดไฟฟ้าอัตโนมัติในกรณีผิดปกติ เพื่อป้องกันเครื่องใช้ไฟฟ้าต่างๆที่เสียหายอาจจะเสียหายเนื่องจากกระแสไฟฟ้ากระชาก
- มีแหล่งน้ำสะอาดอย่างสม่ำเสมอ
- ควรเลี่ยงพื้นที่ ที่มีความชื้นเกินไป เพราะความชื้นจะทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ค่อนสูงในการเลี้ยง และห่างไกลจากพื้นที่ที่มีการเลี้ยงสัตว์ หรือโรงเห็ด

องค์ประกอบของของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ส่วนประกอบของพื้นที่ที่จำเป็นต่อการปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วยห้องปฏิบัติการแยกเป็นส่วน ๆ โดยควรคำนึงถึงความสะดวกในการปฏิบัติงาน การใช้เนื้อที่ให้เกิดประโยชน์มากที่สุด และค่าก่อสร้างน้อยที่สุด ดังนี้

1. ห้องเก็บสารเคมี (Chemical stored room)

ควรเป็นห้องแยกเฉพาะใช้เก็บสารเคมีเป็นหมวดหมู่ไว้ในตู้ที่วางกับพื้น ตู้ติดผนัง หรือตู้แขวนลอยก็ได้ เพื่อสะดวกในการหยิบใช้

2. ห้องเตรียมอาหาร (Preparation room)

ควรมีเนื้อที่กว้างขวางพอที่จะจัดอุปกรณ์ต่าง ๆ ได้แก่ โต๊ะทำงาน โต๊ะวางเครื่องมือ ตู้เก็บอาหาร ขวดและภาชนะสำหรับเลี้ยง และเครื่องแก้วต่าง ๆ อ่างน้ำ ตู้เย็นสำหรับเก็บอาหารเหลวและสารเคมีบางชนิดที่ต้องเก็บในที่เย็น เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ควรมีอยู่ในห้องนี้ ได้แก่ เครื่องวัดความเป็นกรดและด่าง (pH meter) เครื่องกรองน้ำ เครื่องทำน้ำกลั่น เตาแก๊ส หม้อนึ่งความดัน (autoclave) เตาอบไมโครเวฟ และเครื่องชั่ง เป็นต้น

3. ห้องย้ายเนื้อเยื่อ (Transferring or incubation room)

ต้องมีความสะอาดและปลอดเชื้อ จึงควรปิดให้สนิทและมีการผ่านเข้าออกน้อยที่สุดเท่าที่จำเป็น อุปกรณ์ที่สำคัญ ได้แก่ ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Laminar Air-Flow Cabinet) กล้องจุลทรรศน์ เครื่องวัดความนำไฟฟ้า สารเคมีและอุปกรณ์เกี่ยวกับการฟอกฆ่าเชื้อ

4. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Culture room)

ถ้าเป็นห้องปฏิบัติการขนาดเล็กอาจจัดรวมอยู่ในห้องเดียวกับห้องย้ายเนื้อเยื่อ และต้องการความสะอาดและปลอดโรคเช่นเดียวกัน หากเป็นไปได้ควรติดหลอดอัลตราไวโอเลตเพื่อใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เป็นบางครั้ง อุปกรณ์ที่สำคัญ ได้แก่ ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีขนาดพอเหมาะและจัดวางในตำแหน่งที่มีช่องทางเดินสะดวกทั่วถึง มีระบบระบายอากาศและติดตั้งเครื่องปรับอากาศเพื่อการควบคุมการเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสมที่สุด เครื่องเขย่า (shaker หรือ rotator) สำหรับเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารเหลว

5. ห้องพักนักวิจัย (Researcher room)

ถ้ามีเนื้อที่เพียงพออาจจัดเป็นมุมเล็ก ๆ ในส่วนของห้องย้ายเนื้อเยื่อ หรือแยกเป็นห้องเฉพาะในบริเวณใกล้เคียง เพื่อใช้เป็นส่วนนั่งทำงาน เก็บเอกสาร ตำรา และอุปกรณ์ที่สำคัญบางอย่างของนักวิจัย การวางผังห้องปฏิบัติการสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักจะไม่ตายตัวที่แน่นอน แต่ให้สามารถปรับได้เข้ากับสภาพพื้นที่แต่ละแห่ง แต่จะต้องคำนึงดังนี้

- มีความเป็นระเบียบ ซึ่งจะช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้
- การทำงานสามารถทำได้สะดวกจะต้องมีพื้นที่เพียงพอ แต่ไม่ควรใหญ่เกินไปเพราะจะเสียพลังงานมาก พื้นที่จะต้องคำนวณจากจำนวนคนที่จะทำงานในห้องนั้น
- วางผังให้ใช้ง่ายได้อย่างมีประสิทธิภาพและประหยัดเวลา
- การทำงานในแต่ละห้องให้สามารถทำงานได้แบบไหลเลื่อน (flow) ของงาน จะต้องเป็นไปอย่างธรรมชาติ เราจะวางแผนได้เราต้องทราบขั้นตอนในการทำงานก่อน และทำอะไรก่อนหลัง จะได้วางผังห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ถูกต้อง

ลักษณะการใช้งานห้องปฏิบัติการต่างๆ

โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควรมีการแยกสัดส่วนที่แน่นอนตามลักษณะของการใช้งานและอยู่ในอาคารบริเวณเดียวกัน แต่ละส่วนที่แยกนี้ควรมีเครื่องมือวัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ต้องใช้อยู่ด้วย เช่น มีโต๊ะและชั้นวางของเพื่อให้เครื่องมือแต่ละชนิดพร้อมจะใช้งานได้ทันที ข้อสำคัญ คือ ความสะอาด ถ้าเป็นห้องปิดไม่มีลมพัดได้ยิ่งดี ผนังห้องควรเรียบ เพื่อไม่ให้เป็นที่หลบซ่อนของจุลินทรีย์ต่าง ๆ

ห้องปฏิบัติการทั่วไป

เป็นห้องที่ใช้สำหรับการเตรียมชิ้นส่วน และเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง โดยมีโต๊ะสำหรับเตรียมอาหาร ตู้เก็บเครื่องแก้วและเครื่องมือต่าง ๆ วัสดุอุปกรณ์ที่ควรมีในห้องนี้ ได้แก่

- เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ
- สารเคมี
- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด (ความแม่นยำถึง 0.01)
- เครื่องกวนสารละลายแบบมีแผ่นให้ความร้อน (Hotplate stirrer)
- เครื่องกวนหรือผสม สำหรับการเตรียมอาหารจำนวนมาก ๆ
- เตาอบไมโครเวฟ สำหรับทำให้ร้อนเร็วและละลายวุ้นอาหาร
- เครื่องจ่ายอาหารอัตโนมัติ (Automatic Dispensor)
- เครื่องปรับความเป็นกรดด่าง
- เครื่องกรองน้ำระบบรีเวอร์ออสโมซิส หรือเครื่องกลั่นน้ำ
- ข้อนตักสาร
- ชุดกรองมิลลิพอร์ (Millipore filter system)
- ตะแกรงโลหะสำหรับใส่หลอดทดลองในหม้อนึ่งความดัน
- กล่องโลหะใส่จานอาหารเพาะเลี้ยง
- ภาชนะพาลสติก
- จุกสำลี กระดาษตะกั่ว (Aluminum foil) พาราฟิล์ม
- ถังเก็บน้ำกลั่น
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
- ตู้เย็นเก็บสาร

ห้องย้ายเลี้ยงหรือห้องปลอดเชื้อ

ควรเป็นห้องปิดภายในปรับอากาศ อาจติดตั้งหลอดไฟอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet, UV) เพื่อฆ่าเชื้อในอากาศ และมีวัสดุอุปกรณ์ดังต่อไปนี้

- เครื่องปรับอากาศ พร้อมพัดลมดูดอากาศออก
- ตู้ปลอดเชื้อ (Lamimar air flow cabinet)
- ตะเกียงแก๊ส ตะเกียงแอลกอฮอล์
- กล้องสเตอริโอ
- กระดาษกรอง
- จานอาหารเพาะเลี้ยง
- แอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่าง ๆ
- ปากคีบ มีดผ่าตัด
- สารเคมีพวกสเตอริแลนด์ (Sterilants) เช่น โซเดียมไฮโพคลอไรด์ (NaOCl) คลอรอกซ์ (Clorox) สำหรบฟอกฆ่าเชื้อ

ห้องล้างเครื่องมือ

ควรมีบริเวณสำหรับวางขั้น เคาน์เตอร์และอ่างล้างเครื่องแก้ว วัสดุอุปกรณ์ที่ควรมีในห้องนี้ คือ

- ตู้อบแห้ง (Oven) สำหรับอบเครื่องแก้วให้แห้ง
- สารซักฟอก สำหรับล้างเครื่องแก้วและภาชนะที่เป็นพลาสติก
- ขั้นหรือเคาน์เตอร์สำหรับวางเครื่องแก้วที่จะล้างและเก็บเครื่องแก้วที่ล้างแล้ว

ห้องเพาะเลี้ยง

เป็นห้องสำหรับเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช ภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อมอัน ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง วัสดุอุปกรณ์ที่ควรมีในห้องนี้ คือ

- เครื่องปรับอากาศ เพื่อควบคุมอุณหภูมิและความชื้นให้อยู่ในช่วงประมาณ 17 - 27 องศาเซลเซียส ควรมีสองเครื่องไว้เปิดสลับกันไป ในกรณีที่เครื่องหนึ่งชำรุดนำไปซ่อมแซม อีกเครื่องหนึ่งสามารใช้งานได้ ทำให้ไม่เกิดความเปลี่ยนแปลงในด้านอุณหภูมิและแสงสว่างมากนัก
- ชั้นไฟเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- หลอดไฟโกรลักซ์ (Gro-lux) ให้แสงสว่าง หรือหลอดฟลูออเรสเซนต์ทั่ว ๆ ไป
- เครื่องเขย่าทั้งแบบธรรมดาและแบบควบคุมอุณหภูมิ
- นาฬิกาตั้งเวลาสว่างและมืด
- เทอร์โมมิเตอร์สำหรับวัดอุณหภูมิ
- ตู้เพาะเลี้ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ
- จานหมุน (Roller drums)

1. ธาตุอาหารอนินทรีย์ (Inorganic element) ประกอบด้วย

ธาตุอาหารหลัก (Macroelement) เป็นสารอนินทรีย์ที่พืชต้องการใช้ในปริมาณมาก ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โปแตสเซียม (K) ซัลเฟอร์ (S) แคลเซียม (Ca) และแมกนีเซียม (Mg) ซึ่งอาจจะใช้ในรูปของแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เป็นต้น

ธาตุอาหารรอง (Microelement) เป็นสารอินทรีย์ที่พืชต้องการเพียงเล็กน้อย แต่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ได้แก่ เหล็ก (Fe) คลอรีน (Cl) แมงกานีส (Mn) ทองแดง (Cu) สังกะสี (Zn) โบรอน (B) และโมลิบดินัม (Mo)

อาหารวิทยาศาสตร์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2. สารประกอบพวกคาร์บอนที่ให้พลังงาน ได้แก่ น้ำตาลซูโครสในปริมาณ 2-4%

3. ไวตามิน และสารอื่นๆ ได้แก่ thiamine, nicotinic acid, pyridoxine, inositol, pantothenic acid และ biotin

4. สารควบคุมการเจริญเติบโต (Growth regulator) ได้แก่

Auxin ที่ใช้มากคือ

IAA (3-indoleacetic acid)

IBA (3-indolebutyric acid)

NAA (naphthalene acetic acid)

2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)

Cytokinin ที่ใช้มากคือ

Kinetin (6-furfurylamino purine)

BA (6-benzylamino purine)

2-ip (r-r dimethylallylamino purine)

Zeatine

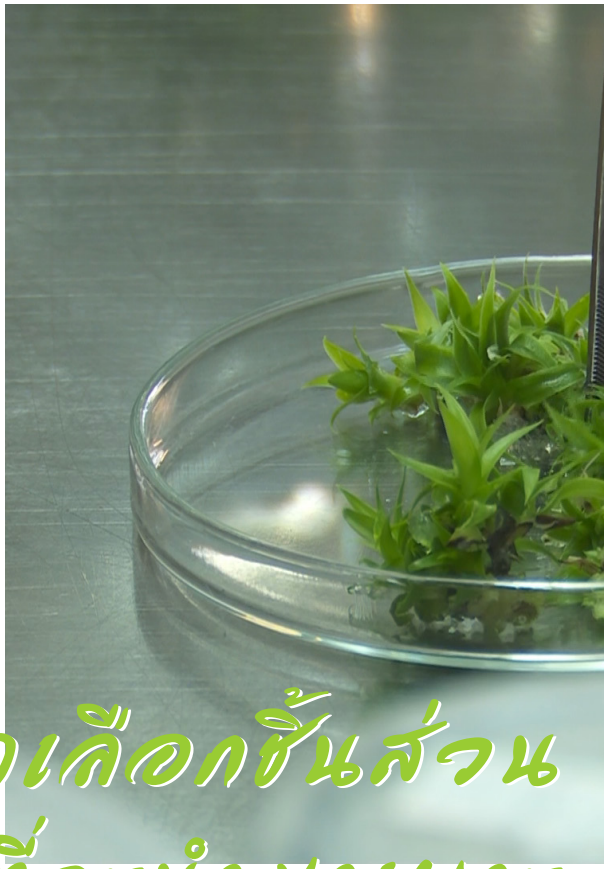
5. สารอินทรีย์ที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ น้ำมะพร้าว น้ำมะเขือเทศ น้ำสกัดจากหัวมันฝรั่ง กล้วยบด yeast extract และ casein hydrolysate เป็นต้น

ส่วนประกอบ	Murashige และ Skoog (1962)	Vacin และ Went (1949)	Gamborg , Miller และ Ojima (1968)	McCowan และ Lloyd (WPM; 1980)*	Nitsch และ Nitsch (1969)	Heller (1953)	White (1963)
สารอนินทรีย์							
KCl	-	-	-	-	-	-	-
NH_4NO_3	1,650	-	-	400	720	-	-
KNO_3	1,900	525	2,500	-	950	-	80
$CaCl_2.2H_2O$	440	-	150	96	166	75	-
$CaCl_2$	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	-	-	-	556	-	-	-
$Ca_3(PO_4)_2$	-	200	-	-	-	-	-
$MgSO_4.7H_2O$	370	250	250	370	185	250	750
K_2SO_4	-	-	-	990	-	-	-
KH_2PO_4	170	250	-	170	68	-	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	500	134	-	-	-	-
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	-	-	-	-	-	-	300
$NaNO_3$	-	-	-	-	-	600	-
Na_2SO_4	-	-	-	-	-	-	200
$NaH_2PO_2.H_2O$	-	-	150	-	-	125	19
KCl	-	-	-	-	-	750	65
KI	0.83	-	0.75	-	-	0.01	0.75
H_3BO_3	6.2	-	3	6.2	10	1	1.5
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	5.7	10	22.3	19	0.1	5
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	-	2	8.6	10	1	3
MoO_3	-	-	-	-	-	-	0.001
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	-	0.25	0.25	0.25	-	-
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	-	0.025	0.25	0.025	0.03	0.01

ส่วนประกอบ	Murashige และ Skoog (1962)	Vacin และ Went (1949)	Gamborg , Miller และ Ojima (1968)	McCowan และ Lloyd (WPM; 1980)*	Nitsch และ Nitsch (1969)	Heller (1953)	White (1963)
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	-	0.025	-	0.025	-	-
$AlCl_3$	-	-	-	-	-	0.03	-
$NiCl_2.6H_2O$	-	-	-	-	-	0.03	-
$FeCl_3.6H_2O$	-	-	-	-	-	1	-
$Fe(C_4H_2O_6)_3.2H_2O$	-	28	-	-	-	-	-
$Fe_2(SO_4)_3$	-	-	-	-	-	-	2.5
$FeSO_4.7H_2O$	27.85	-	-	27.8	27.8	-	-
$Na_2.EDTA$	37.25	-	-	33.6	37.3	-	
EDTA sodium ferric salt	-	-	40	-	-	-	-
สารอินทรีย์							
Myo-inositol	100	-	100	100	100	100	-
Nicotinic acid	0.5	-	1	0.5	5	5	0.05
Pyridoxine HCl	0.5	-	1	0.5	0.5	0.5	0.01
Thiamine HCl	0.1	-	10	1	0.5	0.5	0.01
Glycine	2	-	-	2	5	2	3
Cystein	-	-	-	-	-	-	1
Folic acid	-	-	-	-	-	0.5	-
Biotin	-	-	-	-	-	0.05	-
Sucrose	30,000	20,000	20,000	20,000	20,000	20,000	20,000
Coconut milk	-	150 มิลลิลิตร	-	-	-	-	-

สูตรสารเคมี	ปริมาณสารเคมีในอาหาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารเคมีในสารละลายเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารละลายเข้มข้นที่ใช้เตรียมอาหาร 1 ลิตร (มิลลิลิตร)
		stock # 1; 10 เท่า	100
NH_4NO_3	1650	16.50	
KNO_3	1900	19.00	
$CaCl_2.2H_2O$	440	4.40	
$MgSO_4.7H_2O$	370	3.70	
KH_2PO_4	170	1.70	
		stock # 2; 100 เท่า	10
H_3BO_3	6.2	0.62	
KI	0.83	0.083	
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.025	
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.0025	
$MnSO_4.\ 4H_2O$	22.3	2.23	
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	0.86	
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.0025	
		stock # 3; 100 เท่า	10
Na_2 EDTA	37.25	3.725	
$FeSO_4.\ 7H_2O$	27.85	2.785	
		stock # 4; 100 เท่า	10
Thiamine.HCl	0.1	0.01	
Nicotinic acid(Niacine)	0.5	0.05	
Pyridoxine.HCl	0.5	0.05	
Glycine	2.0	0.20	
Myo-inositol	100.0	10.0	
Sucrose	3 เปอร์เซ็นต์	-	*
Agar	1 เปอร์เซ็นต์	-	*

“ อาหารวิทยาศาสตร์
สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
เป็นปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จ
ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
ที่สำคัญยิ่งประการหนึ่ง ”



การคัดเลือกชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

พันธุ์พืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควรจะสะอาดปราศจากโรค และใช้ส่วนที่ยังอ่อนอยู่ ต้องมีการคัดเลือกให้เหมาะสม แล้วแต่ชนิดของพืช กล้วยไม้ส่วนใหญ่จะใช้ตา หน้าวัวใช้ใบอ่อน ลิลลี่ใช้ส่วนของดอก ไผ่ใช้เมล็ด เป็นต้น ชิ้นส่วนของพืชเหล่านี้ต้องสะอาด ถ้าต้องการต้นที่ปราศจากไวรัสก็ต้องใช้เนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ปลายสุดที่มีขนาดเล็กความยาวไม่เกิน 0.5 มิลลิเมตรไปเลี้ยง

การทำความสะอาดชิ้นส่วนพืช

เนื่องจากอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วยธาตุอาหาร น้ำตาล ไวตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตอยู่ด้วย จึงเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เป็นอย่างดี และบางครั้งเจริญได้เร็วกว่าเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นนอกจากการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ และล้างออกได้ง่าย สารเคมีบางชนิดแม้ว่าจะฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่ล้างออกยากจะมีผลทำให้เนื้อเยื่อตาย หรือเจริญเติบโตได้ไม่ดีเท่าที่ควร สารเคมีที่นิยมใช้ได้แก่ แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 9-10% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2-5% หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 10-12%

การเตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อ

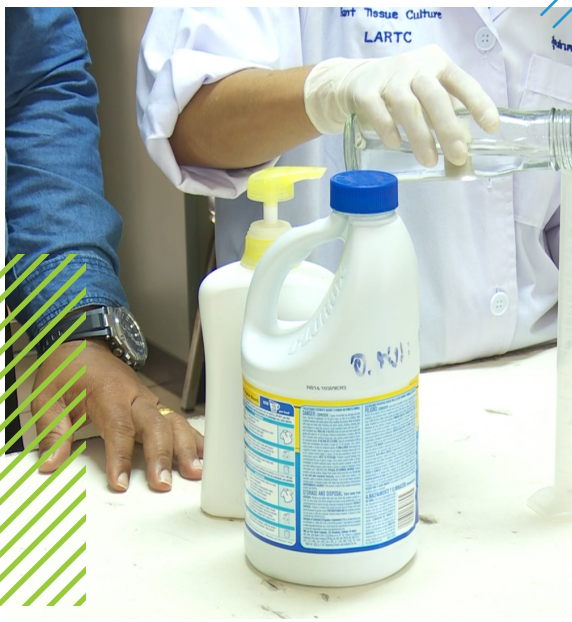
1. เอทธิลแอลกอออล์ 70% เตรียมได้จากการใช้เอทธิลแอลกอฮอล์ 95% จำนวน 70 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำ 25 มิลลิลิตร

2.คลอร็อกซ์ 10% ได้จากการใช้น้ำ 90 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อโรคไว้ก่อน เมื่อจะใช้ก็เติมคลอร็อกซ์ 10 มิลลิลิตร และสารเปียกใบ เช่น Tween 20 1-2 หยด

3. คลอร็อกซ์ 5% ได้จากการใช้น้ำ 95 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อโรคไว้ก่อน เมื่อจะใช้ก็เติมคลอร็อกซ์ 5 มิลลิลิตร และสารเปียกใบ เช่น Tween 20 1-2 หยด

4. น้ำ 100 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อโรคแล้วมีไว้สำหรับล้างคลอร็อกซ์ ออกจากชิ้นส่วนของพืช ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงบนอาหาร

หมายเหตุ คลอร็อกซ์เป็นสารฆ่าเชื้อ ประกอบด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5.25%



วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ

1. นำชิ้นส่วนของพืชมาล้างให้สะอาด
2. ชุบด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 70%
3. แช่ในน้ำยาคลอร็อกซ์ 10% เป็นเวลา 15 นาที
4. ล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เอาน้ำยาคลอร็อกซ์ออกให้หมด
5. ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ตัดชิ้นส่วนที่ต้องการไปเลี้ยงบนอาหาร

โดยหลักการแล้วไม่ว่าจะเป็นชิ้นส่วนพืชชนิดใดก็ตาม จะมีวิธีการในการฟอกฆ่าเชื้อที่คล้ายกันตามวิธีดังกล่าว แต่ในทางปฏิบัติแล้ว ลักษณะความแตกต่างของชิ้นส่วนพืช เช่น ตายอด ตาข้าง ใบ ดอก ปลายราก ฝักอ่อน นั้นมีความแตกต่างกันมาก ทั้งในเรื่องของรูปร่างลักษณะ ความทนทานต่อการฟอกฆ่าเชื้อ และความยากง่ายในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับผิวพืช สิ่งต่างๆ เหล่านี้เป็นข้อกำหนดให้เกิดเทคนิคที่แตกต่างกันออกไป ดังจะได้ยกตัวอย่างพอสังเขป แต่อย่างไรก็ตาม หากผู้ปฏิบัติมีความชำนาญ เทคนิคเหล่านี้อาจเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสม

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ โดยมีวิธีการ 3 ขั้นตอนที่สำคัญ คือ

1. นำชิ้นส่วนของพืชมาทำการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดอยู่ที่ผิวพืช (surface sterilization) แล้วเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ที่บรรจุอยู่ในขวด จนเจริญเติบโตและพัฒนาได้ต้น หรือแคลลัส หรือเอมบริออยด์ที่ปลอดเชื้อ

2. การเพิ่มปริมาณ โดยการตัดแบ่งแยกต้น หรือข้อ หรือแคลลัสออกเป็นชิ้นๆ โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ แล้วย้ายเปลี่ยนอาหารขวดใหม่ทุกๆ เดือน นำขวดไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือวางบนแท่นเขย่า ก็จะเพิ่มปริมาณ 5-10 เท่า เรื่อยๆ ไป

3. เมื่อได้ต้นที่มากพอแล้ว ก็ชักนำให้ออกราก และเมื่อเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์แข็งแรงดีแล้วจึงนำออกปลูกในดิน

วิธีเพิ่มปริมาณแคลลัสหรือต้น

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต้องการจนได้เป็นแคลลัสหรือต้นแล้ว ขั้นตอนสำคัญขั้นตอนต่อไปก็คือการทำให้แคลลัสหรือต้นเหล่านั้นเพิ่มปริมาณขึ้น ซึ่งวิธีการโดยทั่วไปมีดังนี้คือ

1. ทำการตัดแบ่งแคลลัสออกเป็นชิ้นเล็กๆ หรือถ้าเป็นต้นก็ทำการตัดแบ่งออกเป็นลำต้น ใบ หรือราก ย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ทุกเดือนเรื่อยๆ ไป ก็สามารถเพิ่มปริมาณได้มากมายไม่มีที่สิ้นสุด

2. สำหรับแคลลัสนั้นจำเป็นที่จะต้องบังคับให้เกิดเป็นต้น โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตพวกออกซินร่วมกับไซโตไคนิน

วิธีการนำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูก

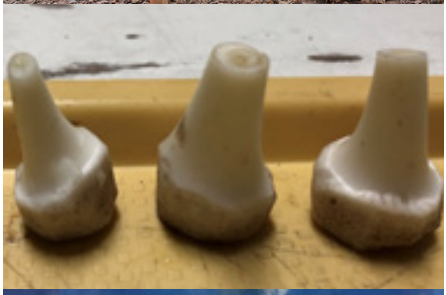
หลังจากเพิ่มปริมาณต้นได้มากจนเป็นที่พอใจแล้ว ขั้นตอนสุดท้ายที่จะเป็นตัวชี้ความสำเร็จคือการนำต้นออกปลูก ซึ่งมีวิธีการคือ

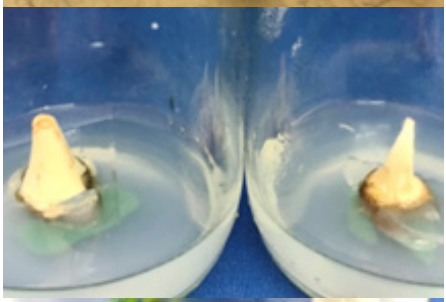
1. ใช้ปากคีบดึงเอาต้นออกจา กอาหารวุ้น
2. ล้างน้ำให้สะอาด
3. แช่ในน้ำยากันราและแบคทีเรีย
4. นำออกปลูกลงดิน หรือวัสดุปลูกชนิดอื่นที่เหมาะสม เก็บไว้ในที่ร่ม และมีความชื้นสูงชั่วระยะเวลาหนึ่ง

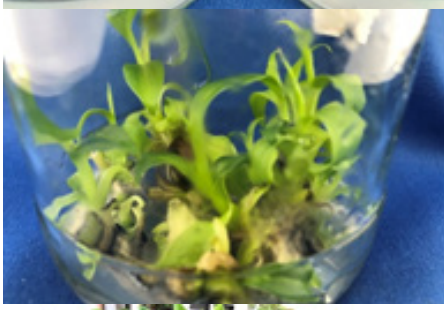
ตัวอย่างการขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจบางชนิดด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย

ในปัจจุบันกล้วยหลายชนิดมีความต้องการของตลาด และเริ่มมีการส่งออกเป็นสินค้า และมีราคาแพง การปลูกกล้วยเชิงการค้า จึงต้องการต้นพันธุ์กล้วยที่มีขนาดอายุใกล้เคียงกัน หรือสามารถกำหนดอายุของต้นพันธุ์ เพื่อง่ายในการบริหารจัดการ วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย การขยายพันธุ์กล้วย เป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชวิธีหนึ่ง แต่มีการปฏิบัติภายใต้สภาพที่ควบคุม เรื่อง ความสะอาดแบบปลอดเชื้อ อุณหภูมิ และแสง ด้วยการนำชิ้นส่วนของพืชที่ยังมีชีวิต เช่น ลำต้น ยอด ตาข้าง ก้านช่อดอก ใบ ก้านใบ อับละอองเกสร เป็นต้น มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ และชิ้นส่วนนั้นสามารถ เจริญและพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ มีทั้งส่วนใบ ลำต้น และรากที่สามารถนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้







ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อย่างแรกคือการคัดเลือกแม่พันธุ์ของต้นกล้วยที่ให้ผลผลิตสูง มีจำนวนหวีต่อเครือที่ดก ผลของกล้วยมีขนาดใหญ่ ปราศจากโรคและแมลง โดยที่เราจะนำแม่พันธุ์โดยการไปคัดหน่อจากแปลงปลูก ที่เป็นหน่อใบดาบหรือหน่อใบแคบ ต้องเลือกแม่พันธุ์ที่ดี 1 หน่อของต้นแม่

ขั้นตอนที่ 2 นำหน่อกล้วยที่ได้มาทำการลอกกาบออกให้ได้ขนาด ของหน่อประมาณ 2 ซม. จากนั้นจึงนำไปฟอกในสารละลายคลอร็อกซ์ 20% เป็นเวลา 10 นาที เทคลอร็อกซ์ออก ฟอกซ้ำด้วยคลอร็อกซ์ 10% อีกครั้งเป็นเวลา 10 นาที

ขั้นตอนที่ 3 หลังจากนั้นจึงนำไปทำการล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ครั้ง ในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อ ลอกเนื้อเยื่อด้านนอกออกให้เหลือปลายยอด นำไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เสริมด้วย BA 5 มก./ลิตร ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเป็นการควบคุมอุณหภูมิและแสง ให้อุณหภูมิประมาณ 25-27 องศา และให้แสง 16 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 4 เมื่อเนื้อเยื่อที่ทำการเพาะเลี้ยงมีการแตกหน่อในอาหารเพาะเลี้ยงแล้ว จึงทำการขยายเนื้อเยื่อกล้วยต่อ โดยการย้ายหน่อใหม่ ลงในอาหารชนิดเดิม ทำการเลี้ยงขยายไปเรื่อย ๆจนเป็นที่ได้จำนวนตามต้องการ

ขั้นตอนที่ 5 นำหน่อกล้วยที่ต้องการให้เกิดราก โดยการย้ายลงอาหาร MS เพื่อชักนำให้กล้วยเกิดราก เมื่อได้รากแล้วจึงย้ายลงในวัสดุปลูก นำออกมาอนุบาลภายในโรงเรือนประมาณ 60 วัน ก็สามารถที่จะนำไปปลูกได้แล้ว

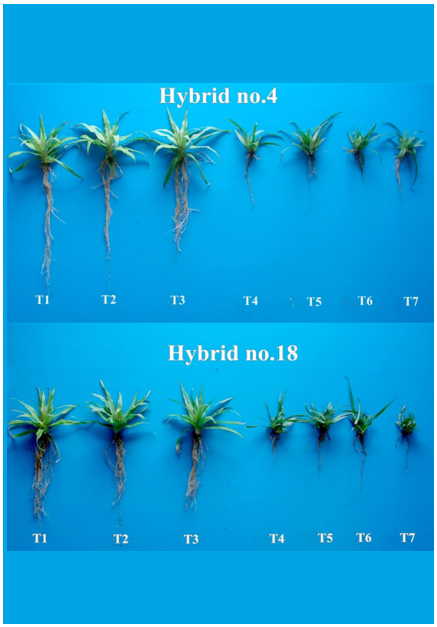
การเพาะเลี้ยงเนื้อสับปะรด

ในปัจจุบันสับปะรดที่ใช้ในการบริโภคผลสดส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่ได้จากสับปะรดที่ใช้ในการบรรจุกระป๋อง มีสายพันธุ์สับปะรดใหม่ๆหลายสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการบริโภคและการส่งออกสับปะรด โดยมีหลายสายพันธุ์ที่มีผลผลิตเป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศแต่ยังมีการเพาะปลูกไม่มากในประเทศไทย ดังนั้นการผลิตสายพันธุ์สับปะรดสายพันธุ์ดังกล่าวให้มีคุณภาพจึงมีความจำเป็นโดยเฉพาะอย่างยิ่งต้นพันธุ์ที่ใช้ในการปลูก เพื่อง่ายในการบริหารจัดการ วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชวิธีหนึ่ง แต่มีการปฏิบัติภายใต้สภาพที่ควบคุมเรื่อง ความสะอาดแบบปลอดเชื้อ อุณหภูมิ และแสง ด้วยการนำชิ้นส่วนของพืชที่ยังมีชีวิต เช่น ลำต้น ยอด ตาข้าง ก้านช่อดอก ใบ ก้านใบ อับละอองเกสร เป็นต้น มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ และชิ้นส่วนนั้นสามารถ เจริญและพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์มีทั้งส่วนใบ ลำต้น และรากที่สามารถนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรด

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อย่างแรกคือการคัดเลือกแม่พันธุ์ของต้นสับปะรด ปราศจากโรคและแมลง นำหน่อสับปะรดที่ได้มาทำการลอกใบออกให้ได้ขนาด ให้ได้ขนาดยอดประมาณ 1 ซม. จากนั้นจึงนำไปฟอกในสารละลายคลอร็อกซ์ 10% เป็นเวลา 10 นาที

ขั้นตอนที่ 2 หลังจากนั้นจึงนำไปทำการล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ครั้ง ในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อ ลอกเนื้อเยื่อด้านนอกออกให้เหลือปลายยอด นำไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เสริมด้วย BA 2 มก./ลิตร ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเป็นการควบคุมอุณหภูมิและแสง ให้อุณหภูมิประมาณ 25-27 องศา และให้แสง 16 ชั่วโมง



ขั้นตอนที่ 3 เมื่อเนื้อเยื่อที่ทำการเพาะเลี้ยงมีการแตกหน่อในอาหารเพาะเลี้ยงแล้ว จึงทำการขยายเนื้อเยื่อสับปะรดต่อ โดยการย้ายหน่อใหม่ ลงในอาหารชนิดเดิม ทำการเลี้ยงขยายไปเรื่อย ๆจนเป็นที่ได้จำนวนตามต้องการ

ขั้นตอนที่ 4 นำต้นอ่อนสับปะรดที่ต้องการให้เกิดราก โดยการย้ายลงอาหาร MS ที่เสริมด้วย IBA 4 มก./ลิตร เพื่อชักนำให้กล้วยเกิดราก เมื่อได้รากแล้วจึงย้ายลงในวัสดุปลูก นำออกมาอนุบาลภายในโรงเรือนประมาณ 60 วัน ก็สามารถที่จะนำไปปลูกได้แล้ว

บทสรุป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หรือการเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพหลอดแก้ว เป็นเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่โดยนำเซลล์ (cell) หรือชิ้นส่วนของพืชที่มีขนาดเล็ก เช่น อวัยวะต่าง ๆ เนื้อเยื่อ เซลล์ หรือโพรโทพลาสต์ (protoplast) มาเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหาร น้ำตาล วิตามิน และฮอร์โมนพืช ภายใต้สภาพที่ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิและแสง ส่งผลให้ชิ้นส่วนของพืชเหล่านี้เจริญเป็นต้นใหม่ แคลลัส (callus) หรือโครงสร้างคล้ายเอ็มบริโอ (embryo) เรียกว่า เอ็มบริออยด์ (embryoid หรือ somatic embryo) แล้วจึงพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ประกอบด้วยใบ ราก

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทอย่างมากทั้งในด้านการเกษตรกรรม อุตสาหกรรม และด้านการแพทย์ ดังนั้นประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถกล่าวได้ดังนี้

1. เพื่อการขยายพันธุ์ (Micropropagation)
2. เพื่อการผลิตพืชที่ปราศเชื้อไวรัส (Virus-Free Plant Propagation)
3. เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช (Plant Improvement)
4. เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน (Resistant Plant)
5. เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทาน (Tolerance Plant)
6. เพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary Metabolite)
7. เพื่อการศึกษาทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช (Biochemical and Physiology Study)
8. เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืช (Germplasm Conservation, Gene Bank)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นเทคโนโลยีสมัยใหม่ ที่จะช่วยเข้ามาพัฒนาการปลูกพืชในด้านต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นทั้งในแง่การสร้างสายพันธุ์พืชใหม่ๆและการเพิ่มจำนวนต้นพืชในปริมาณมาก ๆให้ได้ตามความต้องการของเกษตรกรที่ต้องการจะปลูกพืชชนิดต่าง ๆอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 162 หน้า.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. โอ.เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์, กรุงเทพฯ. 158 หน้า.

ประสาทพร สมิตะมาน. 2541. โปรโตพลาสต์เทคโนโลยี. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 196 หน้า.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524. หลักการและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 109 หน้า.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเทคนิค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

สมปอง เตชะโต. 2539. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 285 หน้า.

ผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์สาขาพืชศาสตร์
การศึกษา ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
หน่วยงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา
Email: phongyuth@rmutl.ac.th

ชื่อ-นามสกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์อภิชาติ ชิดบุรี
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์สาขาพืชศาสตร์
หน่วยงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา
การศึกษา ปริญญาเอก สาขาพืชสวน
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Email: chidburee@rmutl.ac.th

ชื่อ-นามสกุล นายพิทักษ์ พุทธวรชัย
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ สาขาพืชศาสตร์
หน่วยงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา
การศึกษา ปริญญาโท สาขาพืชสวน
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Email: puttawarachai@rmutl.ac.th

กองบรรณาธิการ

การขยายพันธุ์พืช ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ISBN : 978-974-625-832-6 (Print)
ISBN : 978-974-685-831-9 (E-Book)

ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประพัฒน์	เชื้อไทย
ดร.ภาสวรรธน์	วัชรดำรงค์ศักดิ์

ผู้เขียน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ ชิดบุรี
อาจารย์พิทักษ์ พุทธวรชัย

กองบรรณาธิการ

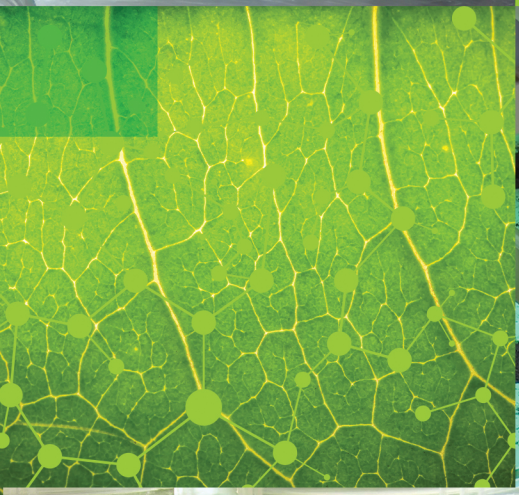
นายภฤศพงศ์	เพชรบุล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ยุทธนา	เขาสุเมรุ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์เกรียงไกร	ธารพรศรี
นายนริศ	กำแพงแก้ว
ว่าที่ ร.ต.รัชต์พงษ์	หอชัยรัตน์
ว่าที่ ร.ต.เกรียงไกร	ศรีประเสริฐ
นายพิษณุ	พรมพราย
นายจักรรินทร์	ขี่นสมบัติ
นางสาวรัตนาภรณ์	สารภี
นางสาวอารีรัตน์	พิมพ์นวน
นายเจษฎา	สุภาพรเหมินทร์
นางสาวสุธาสินี	ผู้อยู่สุข
นางสาวฉัตวณัฐ	มโนพฤกษ์
นางสาวหนึ่งฤทัย	แสงใส
นางสาวเสาวลักษณ์	จันทร์พรหม
นางสาวทิน	อ่อนนวล
นางสาววราภรณ์	ต้นใส
นายวีรวิทย์	ณ วรรณมา

จัดทำโดย

สถาบันถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา
98 หมู่ 6 ตำบลป่าป้อง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ 50220

พิมพ์ที่

เอ็ม ดี ดี กรุ๊ป
28/3 หมู่ 10 ตำบลป่าไผ่ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50210
โทร. 09-9226-1953, 09-9239-1771



KBS
Knowledge BookStore
สถาบันถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชน : 98 หมู่ 8 ต.ป่าป้อง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ 50220
โทรศัพท์ : 0 5326 6516 #1032 , โทรสาร : 0 5326 6522