

บทปฏิบัติการ  
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue Culture)

ครูเสกสรรค์ สุวรรณสุข  
ครู คศ.1 โรงเรียนศรีหนองกาวิทยา

สำนักงานเขตพื้นที่การศึกษามัธยมศึกษา เขต 25  
สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐาน กระทรวงศึกษาธิการ

## บทปฏิบัติการ

### การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue)

#### ความหมาย

เป็นวิธีการขยายพันธุ์พืช ด้วยการนำชิ้นส่วนพืช (ที่ยังมีชีวิต) เช่น ลำต้น ยอด ตาข้าง เมล็ด ดอก ช่อดอก ใบ ก้านใบ อับละอองเกสร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์และเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสม ชิ้นส่วนนั้นสามารถเจริญเติบโต และพัฒนาเป็นพืชที่สมบูรณ์ มีทั้งส่วนใบ ลำต้น และราก ที่สามารถออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้

#### ประโยชน์ของการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้เข้ามามีบทบาทต่อการเกษตร โดยเฉพาะในด้าน การขยายพันธุ์ เนื่องจากสามารถขยายพันธุ์พืชได้อย่างรวดเร็ว มีความสม่ำเสมอ ได้ปริมาณมากในระยะเวลาสั้น การเพาะเลี้ยงมีทั้งข้อดีและข้อจำกัด ดังนี้

##### ข้อดีของการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. เพิ่มปริมาณได้ในระยะเวลาอันสั้น
2. ต้นที่ได้มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนพ่อแม่
3. ต้นพืชที่ได้จะโตเร็วและมีขนาดสม่ำเสมอ เก็บเกี่ยวผลผลิตได้พร้อมกัน และผลผลิตได้มาตรฐาน
4. ต้นที่ได้จะปลอดโรค
5. เพื่อเก็บรักษาและแลกเปลี่ยนพันธุ์พืช

##### ข้อจำกัดของการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. ลักษณะทางพันธุกรรมที่ต้องการอาจเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (กรณีการชักนำต้นจากแคลลัส)
2. ในพืชบางชนิด (กรณีไม้เนื้อแข็ง) ชักนำการเกิดรากค่อนข้างยาก
3. การย้ายปลูกต้น ไม้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลงปลูกในดินค่อนข้างยาก
4. การลงทุนสูง เพราะต้องใช้ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ สารเคมีเฉพาะทางซึ่งมีราคา งานประดิษฐ์มีค่าแรงสูง ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการค้นคว้าเทคนิคและอาหารที่เหมาะสม รวมทั้งต้องลงทุนในการสร้างห้องปฏิบัติการสูง ทำให้ต้นทุนในการผลิตต่อหน่วยค่อนข้างสูง จะต้องผลิตจำนวนมาก ๆ จึงจะคุ้ม

- วัตถุประสงค์
1. เพื่อศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของพืช
  2. นำพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาเพาะปลูก

พันธุ์พืช ต้นไม้และสมุนไพรต่าง ๆ ในโรงเรียน

## วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. ต้นไม้และสมุนไพรต่าง ๆ
2. ตู้ถ่ายเชื้อ
3. Hot oven
4. หม้อนึ่งอบไอน้ำ
5. เครื่องชั่ง
6. เครื่องวัด pH
7. เต้าไฟฟ้า
8. ซ้อนตักสารและแท่งแก้วคนสาร
9. ขวดรูปชมพู่
10. บีกเกอร์
11. กระจกตวง
12. ขวดใส่อาหารและน้ำกลั่น
13. ปากคีบ
14. มีดผ่าตัด
15. จานเลี้ยงเชื้อ
16. ตะเกียงแอลกอฮอล์
17. กระจกยอลูมิเนียม
18. คลอโรกซ์ 15%
19. Tween
20. อาหารสูตรแข็ง MS

หมายเหตุ อุปกรณ์ 7 – 15 ต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันก่อนนำเข้าตู้ถ่ายเชื้อ

## วิธีปฏิบัติ

ขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ ๆ 5 ขั้นตอน ดังนี้

1. การคัดเลือกแม่พันธุ์ดี
2. การเตรียมชิ้นส่วนและการฟอกฆ่าเชื้อ
3. การทิวจำนวนหรือเพิ่มจำนวน
4. การชักนำราก
5. การย้ายออกปลูกในโรงเรือนอนุบาล

### 1. การคัดเลือกแม่พันธุ์ดี

ให้คัดเลือกแม่พันธุ์ที่มีลักษณะดี ให้ปริมาณผลผลิตมากสม่ำเสมอ เติบโตรวดเร็ว แข็งแรง สมบูรณ์ ปราศจากโรคและแมลง ให้ผลผลิตสูง สารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี

## 2. การเตรียมชิ้นส่วนและการฟอกฆ่าเชื้อ ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

2.1 การเลือกชิ้นส่วนพืช ให้เลือกชิ้นส่วนที่จะนำมาตัดเนื้อเยื่อ เช่น ตายอด ตาข้าง ราก ใบ มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร แยกชิ้นส่วนพืชจัดวางให้เป็นระเบียบ

2.2 การฟอกฆ่าเชื้อ เพื่อกำจัดจุลินทรีย์และสิ่งสกปรกที่ติดมากับชิ้นส่วนพืช ทำโดย

2.2.1 นำชิ้นส่วนพืชไปล้างน้ำให้สะอาดผสมผงซักฟอก 2-3 ครั้ง

2.2.2 นำชิ้นส่วนพืชมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนนี้ทำในตู้ถ่ายเชื้อ

2.2.3 ทำการฟอกชิ้นส่วนพืชใน Clorox 15% ใส่ tween เล็กน้อย เป็นเวลา 25 นาที

2.2.4 ล้างชิ้นส่วนพืชด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2.2.5 นำชิ้นส่วนพืชดังกล่าว มาเตรียมพันธุ์เริ่มต้น โดยการโดยการนำมาตัดแต่งให้พอเหมาะประมาณ 0.5 เซนติเมตร ให้ทำในตู้ปลอดเชื้อ

2.3 การนำชิ้นส่วนพืช มาเลี้ยงในอาหาร

ในขณะที่มีการเตรียมชิ้นส่วนและการฟอกฆ่าเชื้อ ต้องเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลงให้แล้วเสร็จก่อนเวลา 30 นาที มีลักษณะเป็นวุ้นและแข็งตัวในจานเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนพืชมาวางเพื่อเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงของ Murashige & Skoog 1962 (MS) ที่เตรียมไว้ ให้พอเหมาะกับจานเลี้ยงเชื้อไม่แน่นจนเกินไป

ตัวอย่างสูตรอาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ

- สูตร MS (Murashige & Skoog, 1962)
- สูตร VW (Vaein & Went, 1949)

## 3. การทวีจำนวนและเพิ่มจำนวน

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนพืช โดยการย้ายชิ้นส่วนพืชหลาย ๆ ชิ้นส่วนที่ผ่านการตัดแต่งแล้วในสูตรอาหาร MS เก็บไว้ในชั้นวางหรือตู้ ที่มีแสงสว่างและมีอุณหภูมิระหว่าง 18 – 25 องศาเซลเซียส

เมื่อครบประมาณ 1 เดือน ให้ทำการย้ายชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการคัดเลือกจากการเจริญเติบโตได้ดีในจานเลี้ยงเชื้อ มาวางในสูตรอาหาร MS ในขวดแก้วขนาดเล็ก จำนวน 1 ชิ้นส่วน : 1 ขวดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิระหว่าง 18 – 25 องศาเซลเซียส ทำการดัดแปลงหลาย ๆ ขวด จนได้ปริมาณตามต้องการ

## 4. การชักนำราก

เมื่อเพิ่มปริมาณต้นไม้ ได้จำนวนตามต้องการให้ชักนำให้เกิดราก โดยการตัดแต่งขอกเลี้ยงในอาหาร MS + NAA 0.35 มก./ลิตร + น้ำตาล 60 กก./ลิตร ให้มีการเจริญเติบโต

## 5. การย้ายออกปลูกในโรงเรือนอนุบาล

เมื่อชิ้นส่วนพืชเจริญเติบโต ให้ล้างวุ้นออกย้ายออกปลูกในโรงเรือนอนุบาล

**การตรวจและวิเคราะห์ผล**

ในระหว่างที่เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในห้องปฏิบัติการและย้ายปลูกในโรงเรือนอนุบาล ให้มีการบันทึกผล สัปดาห์เริ่มต้น , 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 และ 10 ดังนี้

1. วัดค่าความสูงของการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิด เปรียบเทียบกัน
2. ลักษณะของเนื้อเยื่อที่เจริญเติบโต
3. รูปภาพการเจริญเติบโต

**บันทึกผลการทดลอง**

**ในระหว่างการเจริญเติบโตในห้องปฏิบัติการ**

ค่า		ระยะเวลา (สัปดาห์)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ค่าความสูง (cm)	ชนิดที่ 1											
	ชนิดที่ 2											
	ชนิดที่ 3											
ลักษณะ เนื้อเยื่อ	ชนิดที่ 1											
	ชนิดที่ 2											
	ชนิดที่ 3											
ภาพประกอบ	ชนิดที่ 1											
	ชนิดที่ 2											
	ชนิดที่ 3											

.....

.....

.....

.....

.....

ในระหว่างการปลูกในโรงเรือนอนุบาล

ค่า		ระยะเวลา (สัปดาห์)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ค่าความสูง (cm)	ชนิดที่ 1											
	ชนิดที่ 2											
	ชนิดที่ 3											
ลักษณะ เนื้อเยื่อ	ชนิดที่ 1											
	ชนิดที่ 2											
	ชนิดที่ 3											
ภาพประกอบ	ชนิดที่ 1											
	ชนิดที่ 2											
	ชนิดที่ 3											

.....

.....

.....

.....

.....

วิเคราะห์และสรุปผล

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....