ชื่อการศึกษาค้นคว้าอิสระ การสร้างเอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ กรุงเทพมหานคร

ผู้ศึกษา นางพูลสุข ณัฏฐการณิก **ปริญญา** ศึกษาศาสตรมหาบัณฑิต (หลักสูตรและการสอน)
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ประจวบจิตร คำจัตุรัส **ปีการศึกษา** 2546

บทคัดย่อ

การศึกษาค้นคว้าอิสระครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ กรุงเทพมหานคร

ลักษณะของเอกสารประกอบการเรียนที่สร้างขึ้นเป็นเอกสารทางวิชาการ ประกอบด้วยเนื้อหา 5 บท และบทปฏิบัติการ 10 บท โดยมีขอบเขตเนื้อหาเกี่ยวกับหลักการและขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช วัสดุ อุปกรณ์ และห้องปฏิบัติการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดำเนินการสร้างโดย การรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องจากเอกสารต่างๆ วิเคราะห์เนื้อหาที่จะนำมาใช้ในการเขียนจัดทำเอกสารประกอบการเรียน และตรวจสอบคุณภาพของเอกสารประกอบการเรียนโดยผู้ทรงคุณวุฒิทางด้านเนื้อหา ด้านภาษาไทย และด้านการวัดและประเมินผล การประเมินคุณภาพโดยผู้ทรงคุณวุฒิใช้แบบประเมินคุณภาพเอกสารประกอบการเรียนที่ผู้ศึกษาสร้างขึ้น การวิเคราะห์ข้อมูลใช้เกณฑ์ฐานนิยม

ผลการประเมินคุณภาพของเอกสารประกอบการเรียนโดยผู้ทรงคุณวุฒิทั้ง 3 ด้าน พบว่าผู้ทรงคุณวุฒิ 2 ใน 3 คน มีความคิดเห็นว่าคุณภาพของเอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ในระดับดี ถึง ดีมาก เหมาะสมที่จะนำไปใช้ประกอบการเรียนการสอนได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ เอกสารประกอบการเรียน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาค้นคว้าอิสระฉบับนี้ ผู้ศึกษาได้รับความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจากรองศาสตราจารย์
ดร.ประจวบจิตร คำจัตุรัส อาจารย์ที่ปรึกษาการศึกษาค้นคว้าอิสระ และรองศาสตราจารย์ ดร.ปราณี สังขะตะวรรธน์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และติดตามการดำเนินงานค้นคว้าอิสระครั้งนี้อย่างใกล้ชิด ทำให้งานประสบผลสำเร็จ จึงใคร่ขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

งานศึกษาค้นคว้าอิสระเล่มนี้สามารถลุล่วงด้วยดีด้วยความกรุณาอย่างสูงจากผู้ทรงคุณวุฒิ 3 คน ขอกล่าวนาม ดังนี้ อาจารย์ประนอม ลีธรรมชโย อาจารย์ปริศนา พุทธสุวรรณ และ อาจารย์บุปผา อนันตรศิริชัย ที่ช่วยเหลือให้การชี้แนะ และให้คำแนะนำในการทำงานค้นคว้าอิสระครั้งนี้ จึงใคร่ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านด้วยความซาบซึ้งในความกรุณาครั้งนี้เป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณผู้บริหารโรงเรียนวัดน้อยนพคุณ และคณาจารย์ ที่ให้การสนับสนุนเวลา โอกาส และให้ความสะดวกในการดำเนินงานศึกษาค้นคว้าอิสระจนมีผลสำเร็จเกิดขึ้น

ขอขอบคุณอาจารย์วิจิตร ณัฏฐการณิก หัวหน้างานห้องสมุดโรงเรียนหอวัง เป็นผู้มีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณผู้เป็นเจ้าของเอกสารค้นคว้าทุกฉบับ ที่ใช้ในการค้นคว้าจนทำให้ได้เป็นผลสำเร็จของงานศึกษาค้นคว้าอิสระฉบับนี้ สำหรับประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาค้นคว้าอิสระฉบับนี้ ขอมอบให้ผู้สนใจการศึกษาต่อไป

พูลสุข ณัฏฐการณิก
กรกฎาคม 2547

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……ง

กิตติกรรมประกาศ……จ

สารบัญตาราง……...ช

สารบัญภาพ……..ซ

บทที่ 1 บทนำ……...1

ความเป็นมาและความสำคัญ……1

วัตถุประสงค์……2

ขอบเขตของการสร้างเอกสารประกอบการเรียน
……..2

การดำเนินการสร้างเอกสารประกอบการเรียน……3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……13

บทที่ 2 เนื้อหา……14

เนื้อหาและบทปฏิบัติการ……...14

บทที่ 3 สรุปการสร้างเอกสารและข้อเสนอแนะ……16

สรุปการศึกษาค้นคว้า……16

ข้อเสนอแนะ……..20

บรรณานุกรม……..22

ภาคผนวก……26

ก รายชื่อผู้ทรงคุณวุฒิ……27

ข เอกสารประกอบการเรียน รายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยง
เนื้อเยื่อพืช สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6……..29

ค แบบประเมินเอกสารประกอบการเรียนโดยผู้ทรงคุณวุฒิ……108

ประวัติผู้ศึกษา……...112

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1 แสดงขอบข่ายเนื้อหาแต่ละบท ผลการเรียนรู้ที่คาดหวังและเวลา……...8
ตารางที่ 3.1 แสดงผลการประเมินคุณภาพของเอกสารประกอบการเรียน
โดยผู้ทรงคุณวุฒิ 3 คน……18
ตารางที่ 3.2 แสดงความคิดเห็นทั่วไปของผู้ทรงคุณวุฒิต่อเอกสารประกอบการเรียน
รายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช……19

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1 แสดงกระบวนการสร้างเอกสารประกอบการเรียน……...12

บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญ

ตามที่พระราชบัญญัติการศึกษาแห่งชาติ พ.ศ. 2542 ได้กำหนดให้มีการจัดทำหลักสูตรแกนกลาง การศึกษาขั้นพื้นฐานเพื่อความเป็นไทย ความเป็นพลเมืองดีของชาติ การดำรงชีวิตและการประกอบอาชีพ ตลอดจนเพื่อการศึกษาต่อ และให้สถานศึกษาขั้นพื้นฐานมีหน้าที่จัดทำสาระของหลักสูตรในส่วนที่เกี่ยวข้องกับสภาพปัญหาในชุมชนและสังคม และภูมิปัญญาท้องถิ่น (สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาแห่งชาติ 2545 : 15-16) กระทรวงศึกษาธิการจึงได้กำหนดหลักสูตรการศึกษาขั้นพื้นฐาน พุทธศักราช 2544 ขึ้น เป็นหลักสูตรที่กำหนดโครงสร้างที่เป็นสาระการเรียนรู้ จำนวนเวลาอย่างกว้างๆ มาตรฐานการเรียนรู้ที่แสดงคุณภาพผู้เรียนเมื่อเรียนจบ 12 ปี และเมื่อจบการเรียนรู้แต่ละช่วงชั้นของสาระการเรียนรู้ แต่ละกลุ่มสถานศึกษาต้องนำโครงสร้างดังกล่าวนี้ไปจัดทำเป็นหลักสูตรสถานศึกษา โดยคำนึงถึงสภาพปัญหา ความพร้อม เอกลักษณ์ ภูมิปัญญาท้องถิ่น และคุณลักษณะอันพึงประสงค์ ทั้งนี้สถานศึกษาต้องจัดทำรายวิชาในแต่ละกลุ่มสาระการเรียนรู้ให้ครบถ้วนตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด นอกจากนี้สถานศึกษาสามารถจัดทำสาระการเรียนรู้เพิ่มเติมเป็นหน่วยการเรียนรู้ รายวิชาใหม่ๆ รายวิชาที่มีความเข้มขึ้นอย่างหลากหลาย ให้ผู้เรียนได้เลือกเรียนตามความถนัด ความสนใจ ความต้องการ และความแตกต่างระหว่างบุคคล โดยเลือกสาระการเรียนรู้จาก 8 กลุ่มที่กำหนดไว้ในหลักสูตรแกนกลาง (กระทรวงศึกษาธิการ 2545 : 14)

จากพระราชบัญญัติการศึกษาแห่งชาติ พ.ศ. 2542 และที่แก้ไขเพิ่มเติม (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2545 และหลักสูตรการศึกษาขั้นพื้นฐาน พุทธศักราช 2544 ดังกล่าวข้างต้น โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ กรุงเทพมหานคร จึงได้พัฒนาหลักสูตรสถานศึกษาขั้นพื้นฐานขึ้นโดยให้สอดคล้องสนองต่อจุดหมายและหลักการของหลักสูตรการศึกษาขั้นพื้นฐาน ที่ว่าหลักสูตรมุ่งพัฒนาคนไทยให้เป็นมนุษย์ที่สมบูรณ์ เป็นคนดี มีปัญญา มีความสุข และมีความเป็นไทย มีศักยภาพศึกษาต่อ และประกอบอาชีพ ส่งเสริมให้ผู้เรียนได้พัฒนา และเรียนรู้ด้วยตนเองตลอดชีวิตโดยถือว่าผู้เรียนมีความสำคัญที่สุด สามารถพัฒนาตามธรรมชาติและเต็มตามศักยภาพ (กระทรวงศึกษาธิการ 2545 : 6-7) สำหรับหลักสูตรกลุ่มสาระการเรียนรู้วิชาวิทยาศาสตร์ ช่วงชั้นที่ 4 ที่โรงเรียนกำหนดขึ้นมี

รายวิชาพื้นฐาน 4 รายวิชา ส่วนรายวิชาเพิ่มเติมในส่วนที่เป็นวิชาชีววิทยา มี 5 รายวิชา รายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นรายวิชาหนึ่งในรายวิชาเพิ่มเติมซึ่งมีเนื้อหาสาระกำหนดไว้ในเอกสารหลักสูตรสถานศึกษาขั้นพื้นฐานของโรงเรียนวัดน้อยนพคุณ กรุงเทพมหานคร ดังนี้คือ ศึกษาและอธิบายความรู้ วิธีการเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ฝึกปฏิบัติการเกี่ยวกับการใช้อุปกรณ์เครื่องมือ และเทคนิคการทำงานในสภาพปลอดเชื้อ การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และสารควบคุมการเจริญเติบโต การเลือกเนื้อเยื่อพืชสำหรับเพาะเลี้ยง การฟอกฆ่าเชื้อ และการขยายเพิ่มจำนวน (โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ 2545 : 14)

เนื่องจากรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นรายวิชาที่ใหม่จำเป็นที่จะต้องมีเอกสารประกอบการเรียนทั้งในส่วนที่เป็นเนื้อหา และบทปฏิบัติการ เพื่อให้การจัดการเรียนการสอนเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น และเป็นความรู้พื้นฐานสำหรับผู้เรียนในการศึกษาค้นคว้าต่อไป หรือนำไปใช้ในการประกอบอาชีพได้ ผู้ศึกษาจึงมีความสนใจที่จะสร้างเอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 ขึ้น

2. วัตถุประสงค์

เพื่อสร้างเอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ กรุงเทพมหานคร

3. ขอบเขตของการสร้างเอกสารประกอบการเรียน

เอกสารประกอบการเรียนที่สร้างขึ้นใช้ประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 กำหนดหน่วยการเรียน 1 หน่วยกิต เวลาเรียน 40 ชั่วโมงต่อภาคเรียน ประกอบด้วยเนื้อหา 5 บท คือ บทนำ อุปกรณ์และเครื่องมือในการเพาะเลี้ยงเยื่อพืช การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และการย้ายพืชเพาะเลี้ยงลงปลูก โดยมีบทปฏิบัติการ 10 บท ที่สอดคล้องกับเนื้อหา

4. การดำเนินการสร้างเอกสารประกอบการเรียน

ในการสร้างเอกสารประกอบการเรียน ผู้ศึกษามีแหล่งที่มาของข้อมูล วิธีการศึกษาและรวบรวมข้อมูล และขั้นตอนการสร้างเอกสารประกอบการเรียน ดังต่อไปนี้

4.1 แหล่งที่มาของข้อมูล การสร้างเอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ กรุงเทพมหานคร มีแหล่งที่มาของข้อมูลในการดำเนินการเขียนเอกสาร ดังนี้

4.1.1 พระราชบัญญัติการศึกษาแห่งชาติ พ.ศ. 2542 และที่แก้ไขเพิ่มเติม (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2545 ได้กำหนดไว้เป็นกฎหมายในมาตรา 8(3), 22, 23(2, 5), 24(1-6) และ 26-28 กล่าวโดยสรุปดังนี้ การพัฒนาสาระและกระบวนการเรียนรู้ให้เป็นไปอย่างต่อเนื่อง สอดคล้องกับความต้องการของผู้เรียนด้วยความรู้ ทักษะกระบวนการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี โดยมีวิธีการเรียนรู้หลากหลาย ผู้เรียนได้ฝึกปฏิบัติจริง ความรู้ความเข้าใจและประสบการณ์ที่ได้รับใช้เป็นแนวทางในการศึกษาต่อ การดำรงชีวิต และประกอบอาชีพได้ ดังนั้นการจัดการศึกษาต้องยึดหลักว่าผู้เรียนทุกคนมีความสามารถเรียนรู้ได้ และถือว่าผู้เรียนมีความสำคัญที่สุด กระบวนการจัดการศึกษาต้องส่งเสริมให้ผู้เรียนสามารถพัฒนาตามธรรมชาติเต็มศักยภาพ ให้คณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐานกำหนดหลักสูตรแกนกลางการศึกษาขั้นพื้นฐานเพื่อความเป็นพลเมืองที่ดีของชาติ การดำรงชีวิตและการประกอบอาชีพ ตลอดจนเพื่อการศึกษาต่อ ให้สถานศึกษาขั้นพื้นฐานมีหน้าที่จัดทำสาระของหลักสูตรตามวัตถุประสงค์ในวรรคหนึ่งในส่วนที่เกี่ยวกับสภาพปัญหาในชุมชนและสังคม ภูมิปัญญาท้องถิ่น คุณลักษณะอันพึงประสงค์เพื่อเป็นสมาชิกที่ดีของครอบครัว ชุมชน สังคม และประเทศชาติ (สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาแห่งชาติ 2545 : 6 ,13-16)

4.1.2 หลักสูตรการศึกษาขั้นพื้นฐาน พุทธศักราช 2544 มีหลักการ จุดหมายทางการศึกษา และมาตรฐานการเรียนรู้ซึ่งในหลักสูตรกำหนดไว้เฉพาะมาตรฐานการเรียนรู้ที่จำเป็นสำหรับการพัฒนาคุณภาพผู้เรียนทุกคนเท่านั้น สำหรับมาตรฐานการเรียนรู้ที่สอดคล้องกับสภาพปัญหาในชุมชนและสังคม ภูมิปัญญาท้องถิ่น คุณลักษณะที่พึงประสงค์ เป็นสมาชิกที่ดีของครอบครัว ชุมชน สังคม และประเทศชาติ ตลอดจนมาตรฐานการเรียนรู้ที่เข้มมากขึ้นตามความสามารถ ความถนัด และความสนใจของผู้เรียนให้สถานศึกษาพัฒนาเพิ่มเติมได้ สถานศึกษาจึงต้องจัดการศึกษา ส่วนที่เป็นสาระการเรียนรู้เพิ่มเติม มีหน่วยการเรียนรู้รายวิชาใหม่ ๆ และรายวิชาที่มีความเข้มอย่างหลากหลาย เพื่อให้ผู้เรียนได้เลือกเรียนตามความถนัด ความสนใจ ความต้องการ ความแตกต่างระหว่างบุคคล และจัดทำมาตรฐานการเรียนรู้ของสาระการเรียนรู้หรือรายวิชานั้น ๆ ด้วย สำหรับในช่วงชั้นที่ 4 (ม.4-6) หลักสูตรเป็นการมุ่งเน้นการศึกษา เพิ่มพูนความรู้และทักษะเฉพาะด้าน โดยมุ่งปลูกฝัง ความรู้ความสามารถ และทักษะในวิทยาการและเทคโนโลยี เพื่อให้เกิดความคิดริเริ่มสร้างสรรค์ นำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อการศึกษาต่อและประกอบอาชีพ มุ่งมั่นที่จะพัฒนาตนและประเทศชาติตามบทบาทของตน สามารถเป็นผู้นำและผู้ให้บริการชุมชนในด้านต่าง ๆ ได้

4.1.3 เอกสารหลักสูตรสถานศึกษาขั้นพื้นฐาน พ.ศ. 2545 ของโรงเรียนวัดน้อยนพคุณ

โดยในหลักสูตรสถานศึกษาในช่วงชั้นที่ 4 มีจุดหมายคือ เป็นหลักสูตรที่มีความยืดหยุ่นในการจัดแผนการเรียนรู้ ที่ตอบสนองความสามารถ ความถนัด ความสนใจของผู้เรียนแต่ละคนทั้งด้านวิชาการและวิชาชีพ และจัดทำสาระการเรียนรู้เพิ่มเติมรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 ในกลุ่มสาระการเรียนรู้วิทยาศาสตร์ ซึ่งมีผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง และคำอธิบายรายวิชา ดังนี้ คือ

1) ผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง

(1) อธิบายความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อได้

(2) บอกประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้

(3) อธิบายหลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้

(4) อธิบายขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้

(5) บอกความเป็นมาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้

(6) อธิบายลักษณะของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้

(7) บอกอุปกรณ์และอธิบายเกี่ยวกับการใช้อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้

(8) จัดสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้

(9) ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อได้

(10) บอกเทคนิควิธีการทำงานในสภาพปลอดเชื้อและปฏิบัติได้

(11) บอกวิธีการเตรียมอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและปฏิบัติได้

(12) บอกวิธีเตรียมอาหารข้นและปฏิบัติได้

(13) บอกวิธีเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโตและปฏิบัติได้

(14) เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้

(15) อธิบายขั้นตอนการทำเทคนิคปลอดเชื้อได้

(16) บอกวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบบต่าง ๆ ได้

(17) บอกวิธีเลือกชิ้นส่วนที่นำไปใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและปฏิบัติได้

(18) บอกวิธีเลือกชนิดของเนื้อเยื่อพืช วัสดุ อุปกรณ์ในสภาพปลอดเชื้อและปฏิบัติได้

(19) ปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตามขั้นตอนได้

(20) บอกวิธีการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากชิ้นส่วนพืชและปฏิบัติได้

(21) บอกวิธีการย้ายเนื้อเยื่อพืชเพื่อเพิ่มจำนวนต้นและปฏิบัติได้

(22) บอกขั้นตอนการย้ายต้นพืช และนำต้นพืชเพาะเลี้ยงลงปลูกได้

(23) บอกวิธีการย้ายต้นพืชออกเลี้ยงในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติและปฏิบัติได้

2) คำอธิบายรายวิชา มีการกำหนดให้ ศึกษา และอธิบายความรู้ วิธีการเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ฝึกปฏิบัติการเกี่ยวกับการใช้อุปกรณ์เครื่องมือ เทคนิคการทำงานในสภาพปลอดเชื้อ การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโต การเลือกเนื้อเยื่อพืชสำหรับเพาะเลี้ยง การฟอกฆ่าเชื้อ และการขยายเพิ่มจำนวน (โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ 2545 : 14)

4.1.4 เอกสาร/ หนังสือ/ การฝึกอบรม/ การศึกษาจากแหล่งวิทยาการเกี่ยวกับเรื่องพืชและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ผู้ศึกษาได้ศึกษาข้อมูลจากแหล่งต่างๆ ดังนี้

1) เอกสารและหนังสือ ศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจากเอกสารและหนังสือ จำนวน 14 เล่ม ได้แก่

(1) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการเกษตร

(2) หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

(3) หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

(4) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขั้นพื้นฐาน

(5) หนังสือเรียนวิชาชีววิทยา ว 046 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

(6) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

(7) “เซลล์ เนื้อเยื่อ และระบบเนื้อเยื่อ” ในประมวลสาระชุดวิชาพฤกษศาสตร์ขั้นสูงสำหรับครู หน่วยที่ 1

(8) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

(9) เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

(10) การขยายพันธุ์พืช

(11) การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

(12) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

(13) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการบูรณาการกับวิชาชีววิทยา

(14) “เทคโนโลยีชีวภาพของพืช” ในประมวลสาระชุดวิชาพฤกษศาสตร์ขั้นสูงสำหรับครู หน่วยที่ 15

2) *การฝึกอบรม* ผู้ศึกษาได้เข้ารับการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทำให้ได้รับความรู้ความเข้าใจเทคนิคในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อเพิ่มมากขึ้น และทำให้เกิดความมั่นใจในการนำไปถ่ายทอดต่อให้กับผู้เรียนยิ่งขึ้น การเข้ารับการฝึกอบรมมี 2 ครั้ง ดังนี้คือ

(1) การอบรมเชิงปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ณ ศูนย์ชีววิทยา กรมสามัญศึกษา โรงเรียนเทพศิรินทร์ กรุงเทพมหานคร เมื่อวันที่ 18-20 กรกฎาคม 2544

(2) การอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต จังหวัดปทุมธานี เมื่อวันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2546

3) *การศึกษาจากแหล่งวิทยาการ* ผู้ศึกษาได้ศึกษาความรู้จากสถานประกอบการ ที่มีการผลิตเนื้อเยื่อพืชจำนวนมาก ส่งจำหน่ายผู้ประกอบการสวนกล้วยไม้ตัดดอกส่งต่างประเทศทำให้เข้าใจถึงการประยุกต์สร้างห้องปฏิบัติการอย่างง่าย การเตรียมอาหาร และการดัดแปลงอุปกรณ์ที่หาได้ง่ายจากวัสดุเหลือใช้ หรือสิ่งที่มีในครัวเรือนมาดัดแปลงใช้ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการจัดซื้ออุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีราคาแพงมาใช้

4.1.5 เอกสารเกี่ยวกับเรื่องเอกสารประกอบการเรียน ได้แก่

1) การวิจัยเชิงพัฒนาระดับโรงเรียน (กระทรวงศึกษาธิการ 2536 : 60) และรายงานการใช้ และพัฒนาเอกสารประกอบการเรียนการสอนและแผนการสอนที่ใช้เอกสารประกอบการสอนวิชาการผสมดินปลูก (ช 0155) ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5 (อรรณพ ตัญญู ม.ป.ป. : 6) โดยศึกษาเกี่ยวกับเอกสารประกอบการเรียน ซึ่งได้ข้อมูลเกี่ยวกับความหมายของเอกสารประกอบการเรียนว่าหมายถึง เอกสารทางวิชาการที่อ้างอิงจากหลักวิชาการที่เชื่อถือได้เพื่อใช้ประกอบการเรียนการสอน ให้ผู้เรียนได้ศึกษาค้นคว้าในเรื่องใดเรื่องหนึ่ง ผู้เรียนอาจใช้ประกอบคำอธิบายของผู้สอน หรือใช้สำหรับทำกิจกรรมท้ายบทเรียนและใช้เป็นการบ้าน ช่วยให้วิชาที่เรียนยากเป็นเรียนง่ายขึ้นสำหรับผู้เรียน มีหลักการสร้างโดยจัดลำดับประสบการณ์เป็นขั้นตอนจากง่ายไปหายากลักษณะทางเทคนิคประกอบด้วย คำนำ หน่วยต่างๆแต่ละหน่วยกล่าวถึงจุดประสงค์ ประสบการณ์การเรียนรู้ (เนื้อหา) กิจกรรมคิดวิเคราะห์ สรุปท้ายหน่วยและแบบฝึกหัด

2) การเขียน (สุทธิวงศ์ พงศ์ไพบูลย์ 2522 อ้างถึงในอรรณพ ตัญญู ม.ป.ป. : 8-9) ข้อมูลที่ได้คือ ส่วนประกอบของเอกสารทางวิชาการซึ่งได้แก่

(1) ส่วนนำเรื่อง ได้แก่ ปกนอก ปกใน คำนำ สารบัญ

(2) ส่วนเนื้อเรื่อง ได้แก่ บทนำ เนื้อเรื่อง บทสรุป

(3) ส่วนท้ายเรื่อง ได้แก่ บรรณานุกรม ภาคผนวก อภิธานศัพท์ดรรชนี

3) "รายงานการพัฒนาการเรียนการสอนโดยใช้เอกสารประกอบการเรียนเพื่อพัฒนาทักษะการฟัง พูด อ่าน และเขียน วิชาภาษาไทย (ท 503) ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5" ในวารสารการวิจัยทางการศึกษาฉบับเดือนเมษายน-ธันวาคม 2538 (พูนทรัพย์ เจริญสุข 2538 : 80) ข้อมูลที่ได้ คือ รูปแบบ และส่วนประกอบของเอกสาร ว่า ในแต่ละหน่วยประกอบด้วย สารบัญ สาระสำคัญ จุดประสงค์นำทาง ทบทวนหลักเกณฑ์ความรู้ ตัวอย่าง แบบฝึกหัด ใบงาน เฉลย ภาคผนวก และบรรณานุกรม

*4) รายงานการใช้และพัฒนาเอกสารประกอบการเรียนการสอนและแผนการสอนที่ใช้เอกสารประกอบการเรียนการสอนวิชาการผสมดินปลูก (ช 0155)ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5 (*อรรณพ ตัญญู ม.ป.ป. : 12) ส่วนประกอบในแต่ละบทเรียนมีดังนี้ สาระสำคัญ ผลการเรียนรู้ จุดประสงค์นำทาง เนื้อหา กิจกรรมการเรียน สื่อการเรียน และประเมินผล

4.2 วิธีการศึกษาและรวบรวมข้อมูล การสร้างเอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีวิธีการศึกษาและรวบรวมข้อมูล ดังนี้

4.2.1 ศึกษาพระราชบัญญัติการศึกษาแห่งชาติ พ.ศ. 2542 และที่แก้ไขเพิ่มเติม (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2545

4.2.2 ศึกษาหลักสูตรการศึกษาขั้นพื้นฐาน พุทธศักราช 2544

4.2.3 ศึกษาคำอธิบายรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง จากหลักสูตรสถานศึกษาขั้นพื้นฐาน โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ เพื่อให้ทราบขอบเขตของเนื้อหา สำหรับเป็นแนวทางในการกำหนดหน่วยการเรียนรู้ เนื้อหา ผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง และการจัดกิจกรรมการเรียนการสอน

4.2.4 ศึกษาเอกสาร/หนังสือ/ข้อมูลจากการฝึกอบรม/ข้อมูลจากการศึกษาจากแหล่งวิทยาการ วิเคราะห์เนื้อหา เอกสาร ตำรา และหนังสือเรียนเกี่ยวกับเรื่องพืชและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและข้อมูลจากการเข้ารับการอบรมเพื่อนำเนื้อหาที่เกี่ยวข้องมาใช้ในการเขียนเอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ตามขอบเขตของเนื้อหาในคำอธิบายรายวิชาที่หลักสูตรสถานศึกษากำหนด

4.2.5 ศึกษาวิธีการเขียนเอกสารประกอบการเรียน โดยศึกษาเกี่ยวกับส่วนประกอบของเอกสารประกอบการเรียน เพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางในการจัดทำรูปแบบของเอกสารประกอบการเรียนที่สร้างขึ้น

4.3 ขั้นตอนการสร้างเอกสารประกอบการเรียน จากการศึกษาแนวทางในการเขียนเอกสารประกอบการเรียนดังกล่าวข้างต้น ผู้ศึกษาได้ดำเนินการเขียนเอกสารประกอบการเรียนตามขั้นตอนดังนี้

4.3.1 การกำหนดโครงสร้าง โดยนำเนื้อหาที่รวบรวมจากแหล่งข้อมูลต่างๆ ตามขอบเขตที่ระบุไว้ในคำอธิบายรายวิชามาจัดแบ่งเป็นบท โดยมีการเรียงลำดับตามลักษณะของเนื้อหาที่ต้องการเรียนรู้ก่อนหลัง และเนื้อหาของแต่ละบทเรียนจะมีความสัมพันธ์เชื่อมโยงกันโดยตลอด มีการอ้างอิงแหล่งที่มาของข้อมูล มีการกำหนดผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง กำหนดแผนกิจกรรม กำหนดบทปฏิบัติการสำหรับเนื้อหาแต่ละบท ดังตารางที่ 1.1 แสดงขอบข่ายเนื้อหาแต่ละบท ผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง และเวลาที่ใช้ในการศึกษาแต่ละบทโดยประมาณ

ตารางที่ 1.1 แสดงขอบข่ายเนื้อหาแต่ละบท ผลการเรียนรู้ที่คาดหวังและเวลาที่ใช้โดยประมาณ

ลำดับเนื้อหา	เนื้อหา	เนื้อหาย่อย	ผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง	เวลา (คาบ)
บทที่ 1	บทนำ	-ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	-อธิบายความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อได้	4
		-ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	-บอกประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้	
		-หลักการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	-อธิบายหลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้	
		-ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	-อธิบายขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้	
		-ประวัติความเป็นมาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	-บอกความเป็นมาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้	
บทที่ 2	การเตรียมการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	-ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	-อธิบายลักษณะของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้	6
		-อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในห้องย้ายเนื้อเยื่อพืช ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เรือนเพาะชำ	-บอกอุปกรณ์และอธิบายเกี่ยวกับการใช้อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้	

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

ลำดับเนื้อหา	เนื้อหา	เนื้อหาย่อย	ผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง	เวลา (คาบ)
		-สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช -บทปฏิบัติการที่ 1 อุปกรณ์และเครื่องมือในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช -บทปฏิบัติการที่ 2 เทคนิคการทำงานในสภาพปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการ	-จัดสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ -ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อได้ -บอกเทคนิควิธีการทำงานในสภาพปลอดเชื้อและปฏิบัติได้	
บทที่ 3	การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	-อาหารวิทยาศาสตร์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สูตรอาหาร -บทปฏิบัติการที่ 3 การเตรียมอาหารข้น -บทปฏิบัติการที่ 4 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต -บทปฏิบัติการที่ 5 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	-บอกวิธีการเตรียมอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและปฏิบัติได้ -บอกวิธีการเตรียมอาหารข้นและปฏิบัติได้ -บอกวิธีการเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโตและปฏิบัติได้ -เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้	10
บทที่ 4	วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	- เทคนิคปลอดเชื้อ -ชนิดของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช -การคัดเลือกเนื้อเยื่อพืช การเพิ่มปริมาณ การชักนำต้นและราก	-อธิบายขั้นตอนการทำเทคนิคปลอดเชื้อได้ -บอกวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบต่าง ๆ พืชได้ -บอกวิธีเลือกชิ้นส่วนที่นำไปใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและปฏิบัติได้	

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

ลำดับเนื้อหา	เนื้อหา	เนื้อหาย่อย	ผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง	เวลา (คาบ)
		-บทปฏิบัติการที่ 6 การเลือกเนื้อเยื่อพืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	-บอกวิธีเลือกชนิดของเนื้อเยื่อพืช วัสดุ อุปกรณ์ในสภาพปลอดเชื้อและปฏิบัติได้	
		-บทปฏิบัติการที่ 7 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	-ปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตามขั้นตอนได้	
		-บทปฏิบัติการที่ 8 การฟอกฆ่าเชื้อ	-บอกวิธีการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากชิ้นส่วนพืชและปฏิบัติได้	
		-บทปฏิบัติการที่ 9 การขยายเพิ่มจำนวน	-บอกวิธีการย้ายเนื้อเยื่อพืชเพื่อเพิ่มจำนวนต้นและปฏิบัติได้	
		-ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช		
บทที่ 5	การย้ายต้นพืชเพาะเลี้ยงออกปลูก	-การปรับสภาพต้นพืช และขั้นตอนการย้ายต้นพืชออกปลูก	-บอกขั้นตอนการย้ายต้นพืชและนำต้นพืชเพาะเลี้ยงลงปลูกได้	10
		-บทปฏิบัติการที่ 10 การย้ายต้นออกปลูก	-บอกวิธีการย้ายต้นพืชออกเลี้ยงในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติและปฏิบัติได้	

4.3.2 การร่างต้นแบบเอกสารประกอบการเรียน ในการร่างต้นแบบเอกสารประกอบการเรียน ผู้ศึกษาได้กำหนดรูปแบบการเขียนและส่วนประกอบของเอกสาร ดังนี้

1) รูปแบบการเขียน ได้จัดเรียงเนื้อหาของเอกสารโดยการแบ่งเนื้อหาเป็นบทและแต่ละบทเรียนมีเนื้อหาสัมพันธ์เชื่อมโยงกันโดยตลอด มีการอ้างอิงถึงแหล่งที่มาของข้อมูลในการจัดรูปแบบเอกสาร จะยึดความถูกต้องตามหลักวิชาการเป็นสำคัญ

2) ส่วนประกอบของเอกสาร ได้กำหนดส่วนประกอบของเอกสารประกอบการเรียน ดังนี้

(1) ส่วนนำเรื่อง ได้แก่ ปกนอก ปกใน คำนำ สารบัญ

(2) ส่วนเนื้อเรื่อง ได้แก่ ผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง สาระเนื้อเรื่อง บทปฏิบัติการ

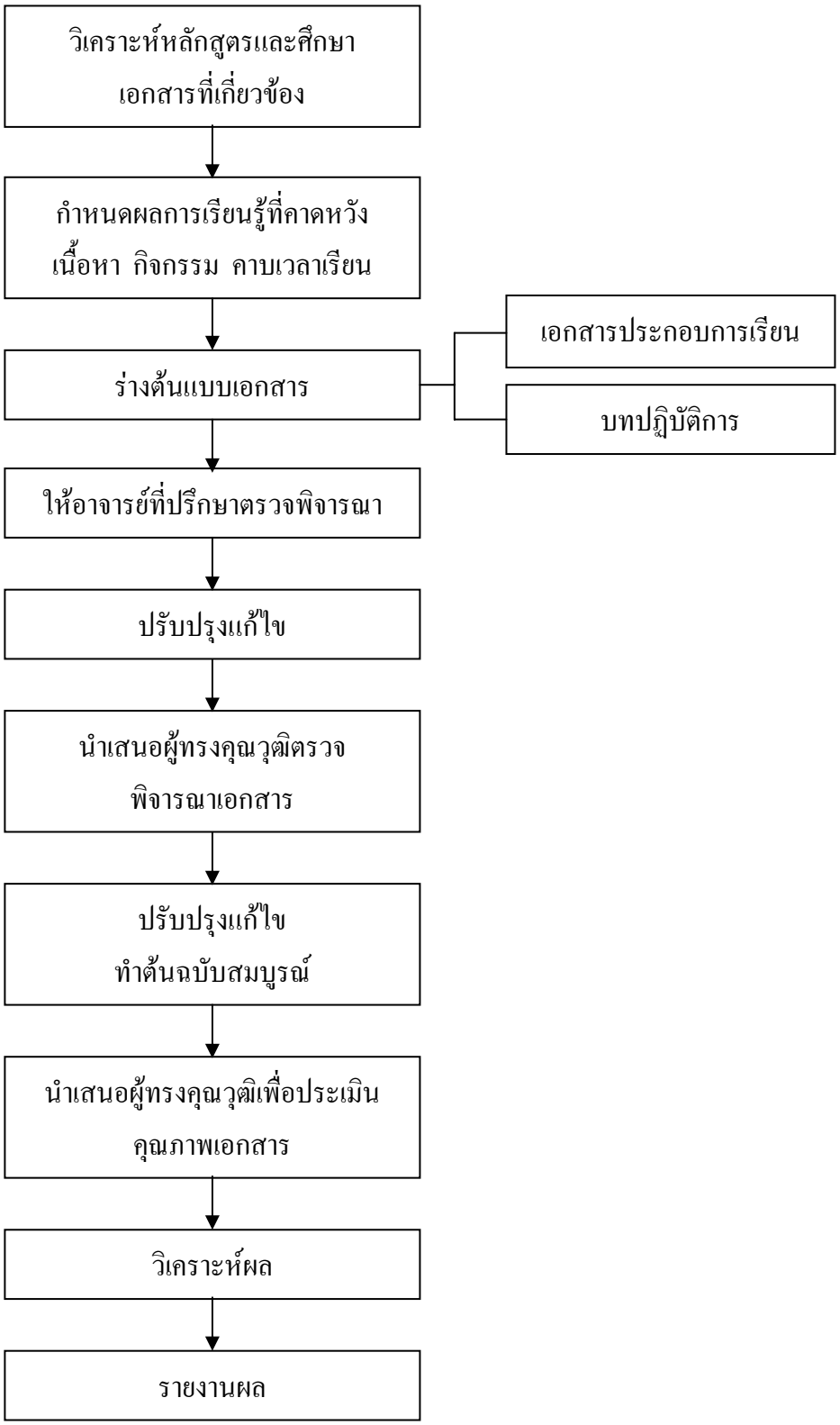
(3) ส่วนท้ายเรื่อง ได้แก่ ภาคผนวก อภิธานศัพท์ บรรณานุกรม

3) การใช้ภาษา การสื่อสารด้วยภาษา โดยเฉพาะภาษาเขียนที่ใช้ในเอกสารประกอบการเรียนเป็นสิ่งสำคัญ เพราะมีผลให้ผู้นำเอกสารไปศึกษา ทำความเข้าใจให้เกิดความรู้ และการปฏิบัติที่ถูกต้อง ดังนั้น จึงต้องใช้ภาษาให้ถูกต้องตามหลักภาษาไทย มีการเรียงลำดับข้อความให้อ่านเข้าใจง่าย ใช้ภาษาเขียนไม่ซับซ้อน แต่ละวรรคตอนเชื่อมโยงสัมพันธ์กัน

4.3.3 การตรวจสอบร่างต้นแบบเอกสาร นำร่างต้นแบบเอกสารเสนอให้อาจารย์ที่ปรึกษาตรวจแล้วปรับปรุงแก้ไขตามข้อเสนอแนะ นำเอกสารที่แก้ไขตามข้อเสนอแนะของอาจารย์ที่ปรึกษาไปให้ผู้ทรงคุณวุฒิตรวจพิจารณา แล้วนำมาปรับปรุงแก้ไขตามข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ

4.3.4 การตรวจสอบคุณภาพของเอกสาร นำเอกสารประกอบการเรียนที่แก้ไขแล้วไปให้ผู้ทรงคุณวุฒิประเมิน โดยใช้แบบประเมินเอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ กรุงเทพมหานคร (ภาคผนวก ค)

จากที่กล่าวมา สามารถสรุปขั้นตอนการสร้างเอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1.1 แสดงกระบวนการสร้างเอกสารประกอบการเรียน

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการสร้างเอกสารประกอบเรียนครั้งนี้ มีดังนี้

5.1 ได้เอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ กรุงเทพมหานคร

5.2 เป็นแนวทางในการเขียนเอกสารประกอบการเรียนรายวิชาวิทยาศาสตร์อื่น ๆ ต่อไป

5.3 เป็นแนวทางให้ครูผู้สอน จัดกิจกรรมและประสบการณ์สำหรับนักเรียนให้บรรลุตามผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง

5.4 ช่วยสร้างแรงจูงใจ ให้นักเรียนมีความสนใจใคร่รู้และศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติม

5.5 ช่วยให้นักเรียนบรรลุผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนสูงขึ้นทั้งทางทฤษฎีและปฏิบัติ

บทที่ 2
เนื้อหา

เอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 หน่วยการเรียน 1 หน่วยกิต เวลาเรียน 40 ชั่วโมง ต่อ ภาคเรียน โดยมีเนื้อหา 5 บท และบทปฏิบัติการ 10 บท ดังนี้

บทที่ 1 บทนำ ประกอบด้วย ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประวัติความเป็นมาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

บทที่ 2 การเตรียมการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วย ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อุปกรณ์และเครื่องมือ ห้องย้ายเนื้อเยื่อพืช ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เรือนเพาะชำ สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การปฏิบัติตนก่อนและขณะทำงานในสภาพปลอดเชื้อ

บทปฏิบัติการที่ 1 อุปกรณ์และเครื่องมือในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

บทปฏิบัติการที่ 2 เทคนิคการทำงานในสภาพปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการ

บทที่ 3 ธาตุอาหารที่จำเป็นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วย สูตรอาหารวิทยาศาสตร์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขั้นตอนการเตรียมอาหารสูตรอาหารดัดแปลง

บทปฏิบัติการที่ 3 การเตรียมอาหารเข้มข้น

บทปฏิบัติการที่ 4 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

บทปฏิบัติการที่ 5 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

บทที่ 4 วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเทคนิคปลอดเชื้อ ประกอบด้วย ชนิดของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การเจริญเติบโตและพัฒนาการของเนื้อเยื่อพืช ส่วนของพืชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักเกณฑ์การคัดเลือกเนื้อเยื่อ การฟอกฆ่าเชื้อ การเพิ่มปริมาณแคลลัสหรือต้น การชักนำรากพืช

บทปฏิบัติการที่ 6 การเลือกเนื้อเยื่อพืชในการเพาะเลี้ยง

บทปฏิบัติการที่ 7 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

บทปฏิบัติการที่ 8 การฟอกฆ่าเชื้อ

บทปฏิบัติการที่ 9 การขยายเพิ่มจำนวนต้น

บทที่ 5 การย้ายต้นพืชเพาะเลี้ยงลงปลูก ประกอบด้วย การปรับสภาพต้นอ่อน ขั้นตอนการย้ายต้นพืชออกปลูก

บทปฏิบัติการที่ 10 การย้ายต้นออกปลูก

สำหรับเนื้อหาและบทปฏิบัติการ ฉบับสมบูรณ์ ดังภาคผนวก ข

บทที่ 3
สรุปการสร้างเอกสารและข้อเสนอแนะ

เอกสารที่จัดทำขึ้นเป็นสื่อการเรียนการสอนประเภทเอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 เพื่อให้ผู้เรียนได้รับความรู้ ประสบการณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ใช้เป็นเอกสารศึกษาค้นคว้าประกอบการเรียนเฉพาะเรื่อง ซึ่งการเรียบเรียงเนื้อหามีลักษณะเชิงวิชาการและปฏิบัติการที่สอดคล้องกับความถนัด และความสนใจของผู้เรียน มีการจัดการเรียนรู้ที่สอดคล้องกับหลักสูตรแกนกลาง ซึ่งมีสรุปการสร้างเอกสารและข้อเสนอแนะ ดังนี้

1. สรุปการสร้างเอกสาร

การสร้างเอกสารประกอบการเรียนฉบับนี้ มีวัตถุประสงค์ วิธีการศึกษา ขั้นตอนการสร้างเอกสาร และผลการสร้างเอกสารประกอบการเรียน ดังนี้

1.1 วัตถุประสงค์

เพื่อสร้างเอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ กรุงเทพมหานคร

1.2 วิธีการศึกษา

ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ พระราชบัญญัติการศึกษาแห่งชาติ พ.ศ. 2542 และที่แก้ไขเพิ่มเติม (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2545 หลักสูตรการศึกษาขั้นพื้นฐาน พุทธศักราช 2544 คำอธิบายรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และผลการเรียนรู้ที่คาดหวังจากหลักสูตรสถานศึกษาขั้นพื้นฐาน ของโรงเรียนวัดน้อยนพคุณ เอกสารความรู้เกี่ยวกับพืชและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ข้อมูลจากการอบรมเชิงปฏิบัติการและการศึกษาจากแหล่งวิทยาการ และจากเอกสาร/งานวิจัยเกี่ยวกับการสร้างเอกสารประกอบการเรียน เพื่อนำข้อมูลมาใช้ในการกำหนดรูปแบบของเอกสารประกอบการเรียน เนื้อหา บทปฏิบัติการ และผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง

1.3 ขั้นตอนการสร้างเอกสาร

1.3.1 นำข้อมูลจากการศึกษาเอกสารและแหล่งการเรียนรู้ต่างๆ มาวิเคราะห์แล้วจัดทำร่างต้นแบบเอกสารประกอบการเรียน

1.3.2 นำร่างต้นแบบไปให้อาจารย์ที่ปรึกษาตรวจ และปรับแก้ไขตามข้อเสนอแนะ

1.3.3 นำร่างต้นแบบเอกสารที่ปรับปรุงแก้ไขตามข้อเสนอแนะของอาจารย์ที่ปรึกษาไปให้ผู้ทรงคุณวุฒิตรวจ ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิได้ให้ข้อเสนอแนะในการปรับปรุงแก้ไข ดังนี้

(1) ด้านเนื้อหา เนื้อหาควรมีความสัมพันธ์ต่อเนื่องกัน จุดประสงค์ที่อยู่ในบทปฏิบัติการกับภาระงานให้สอดคล้องกัน วรรคตอนในการเขียนควรปรับปรุงเพราะอาจจะสื่อความหมายผิด

(2) ด้านภาษา ภาษาที่ใช้ควรเป็นภาษาที่ง่าย ไม่ควรใช้คำฟุ่มเฟือย อักขระบางตัวควรเขียนให้ถูกต้อง แก้ไขบางจุด

(3) ด้านการจัดภาพ ควรขยายภาพให้มีขนาดใหญ่ และบรรยายภาพเป็นภาษาไทย

1.3.4 นำเอกสารที่ปรับแก้ไขตามข้อ 1.3.3 ไปให้ผู้ทรงคุณวุฒิตรวจประเมินคุณภาพ

1.4 ผลการสร้างเอกสารประกอบการเรียน

การประเมินคุณภาพของเอกสารประกอบการเรียนโดยผู้ทรงคุณวุฒิทางด้านเนื้อหา ด้านภาษา และด้านการวัดและประเมินผล 3 คน โดยใช้แบบประเมินคุณภาพเอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (ภาคผนวก ค) ปรากฏดัง ตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงผลการประเมินคุณภาพเอกสารประกอบการเรียนโดยผู้ทรงคุณวุฒิ 3 คน

ลำดับที่	ประเด็นข้อคำถามในการประเมิน	ระดับความคิดเห็น				ฐานนิยม
		ดีมาก	ดี	พอใช้	ควรปรับปรุง	
	ด้านเนื้อหา					
1	เนื้อหามีความสัมพันธ์กับชื่อเรื่อง	2	1			ดีมาก
2	เนื้อหามีความสัมพันธ์ต่อเนื่องกันเป็นลำดับ	1	2			ดี
3	ความยาวเนื้อหามีความเหมาะสม	1	2			ดี
4	เนื้อหามีความถูกต้องและทันสมัย	2	1			ดีมาก
5	เนื้อหาและบทปฏิบัติการมีความสัมพันธ์กัน	1	1	1		ดี
5	บทปฏิบัติการเข้าใจง่าย สามารถปฏิบัติได้จริง	2	1			ดีมาก
7	เนื้อหาสามารถสร้างเสริมความรู้แก่ผู้เรียน	1	2			ดี
8	เนื้อหาเหมาะสมกับวัยและประสบการณ์ของผู้เรียน	2	1			ดีมาก
9	เนื้อหามีประโยชน์ต่อผู้เรียนทั้งในปัจจุบันและอนาคต	1	2			ดี
	ด้านการใช้ภาษา					
1	การใช้ภาษามีความถูกต้องตามหลักภาษาไทย	1	2			ดี
2	ภาษามีความชัดเจนอ่านเข้าใจง่าย	1	2			ดี
3	ใช้ภาษาสื่อเนื้อหาสาระ ความคิดและแนวทางปฏิบัติให้ผู้เรียนได้	1	2			ดี
4	ใช้ภาษาในการลำดับความถูกต้อง	1	2			ดี
	ด้านการจัดภาพประกอบ					
1.	ภาพปกสามารถแสดงความสัมพันธ์กับชื่อเรื่อง	1	2			ดี
2.	ภาพประกอบสัมพันธ์กับเนื้อเรื่อง	2	1			ดีมาก
3.	ภาพประกอบดูเข้าใจง่าย ชัดเจน	1	2			ดี
	ด้านการจัดรูปเล่ม					
1	รูปเล่มภายนอกสวยงามดึงดูดความสนใจ	1	2			ดี
2	หนังสือมีความหนาพอเหมาะสามารถจับถือได้สะดวก	3				ดีมาก
3	หนังสือสามารถเปิดอ่านได้สะดวก	2	1			ดีมาก
4	การจัดวางหน้าหนังสือและขนาดตัวอักษรมีความพอเหมาะสม		3			ดี

จากตารางที่ 3.1 ปรากฏว่าการประเมินคุณภาพเอกสาร ทั้ง 4 ด้าน ค่าฐานนิยมอยู่ในระดับที่ดี คือ ด้านเนื้อหา ด้านการใช้ภาษา ด้านการจัดภาพประกอบ และ ด้านการจัดรูปเล่ม

จึงสรุปได้ว่าในด้านคุณภาพ เอกสารประกอบการเรียน จากการประเมินของผู้ทรงคุณวุฒิจัดว่าเป็นเอกสารประกอบการเรียนที่มีคุณภาพที่ดี เหมาะที่จะนำไปใช้ประกอบการเรียนการสอนได้เป็นอย่างดี

ในส่วนความคิดเห็นทั่วไป ผู้ทรงคุณวุฒิแสดงความคิดเห็น ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงความคิดเห็นทั่วไปของผู้ทรงคุณวุฒิต่อเอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ข้อมูลเกี่ยวกับเอกสารประกอบการเรียน	จำนวน	ฐานนิยม
เอกสารมีความเหมาะสมในการใช้ประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6		
ได้มาก	2	ได้มาก
ได้บ้าง	1	
ไม่ได้เลย		
เอกสารประกอบการเรียนมีเนื้อหาที่สามารถให้ความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับหลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช		
ได้มาก	3	ได้มาก
ได้บ้าง		
ไม่ได้เลย		
เมื่อท่านได้อ่านเอกสารประกอบการเรียนเล่มนี้แล้ว ท่านคิดว่าเทคโนโลยีทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในปัจจุบันนี้เป็นอย่างไร		
น่าสนใจ	3	น่าสนใจ
เฉยๆ		
ไม่น่าสนใจ		

จากตารางที่ 3.2 ความคิดเห็นทั่วๆไป สรุปได้ว่า เอกสารประกอบการเรียนที่สร้างขึ้นเป็นเอกสารที่น่าสนใจ มีเนื้อหาที่สามารถให้ความรู้แก่ผู้เรียน ในเรื่องหลักการเบื้องต้นในการ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จึงเหมาะสมที่จะใช้ประกอบการเรียนการสอนสำรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6ได้เป็นอย่างดี

ข้อคิดเห็นอื่น ๆ ที่ได้รับจากผู้ทรงคุณวุฒิ คือ เป็นเอกสารที่จะช่วยให้นักเรียนได้ศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติม มีความรู้ เป็นประโยชน์ต่อผู้เรียนและผู้สอนได้เป็นอย่างดี มีรูปภาพประกอบชัดเจนเหมาะสมกับเนื้อหา และประสบการณ์ของนักเรียน และเป็นเอกสารที่ควรสนับสนุนให้นำไปใช้ในการสอนเพื่อเพิ่มพูนความรู้ ประสบการณ์ และฝึกทักษะกระบวนการทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีให้แก่นักเรียนระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการสร้างเอกสารประกอบการเรียน

การสร้างเอกสารประกอบการสอน จะเป็นประโยชน์ทั้งต่อครูผู้สอน และผู้เรียน ดังนี้

1.5.1 ได้เอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ กรุงเทพมหานคร

1.5.2 เป็นแนวทางในการเขียน เอกสารประกอบการเรียนรายวิชาวิทยาศาสตร์อื่น ๆ ต่อไป

1.5.3 เป็นแนวทางให้ครูผู้สอน จัดกิจกรรมและประสบการณ์สำหรับนักเรียนให้บรรลุตามผลการเรียนรู้ที่คาดหวังที่วางไว้

1.5.4 ช่วยสร้างแรงจูงใจ ให้นักเรียนมีความสนใจใคร่รู้และศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติม

1.5.5 ช่วยให้นักเรียนบรรลุผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนสูงขึ้นทั้งทางทฤษฎีและปฏิบัติ

2. ข้อเสนอแนะ

2.1 ข้อเสนอแนะในการนำผลการศึกษาค้นคว้าไปใช้

2.1.1 ในการจัดทำเอกสารประกอบการเรียน รายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ กรุงเทพมหานคร มีขั้นตอนมาก ต้องใช้ความรู้และทักษะระดับสูง เพื่อให้เอกสารที่จัดทำขึ้นมีความถูกต้องตามหลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดังนั้น การจัดทำจึงควรได้รับความร่วมมือจากหลายฝ่าย โดยเฉพาะต้องมีผู้เชี่ยวชาญด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของเนื้อหาเอกสารด้วย

2.1.2 ควรนำเอกสารประกอบการเรียนฉบับนี้ไปทำการทดลองใช้ ในการจัดการเรียนการสอน และประเมินผลสัมฤทธิ์ที่เกิดขึ้นจากการนำเอกสารไปใช้ โดยผู้สอนและผู้เรียนกลุ่มทดลอง หาข้อดี ข้อควรแก้ไขปรับปรุง เพื่อหาประสิทธิภาพของงาน และปรับปรุงแก้ไข ให้เป็นสื่อที่สมบูรณ์ทั้งด้านคุณภาพและประสิทธิภาพ

2.2 ข้อเสนอแนะในการศึกษาค้นคว้าต่อไป

ควรมีการสร้างเอกสารประกอบการเรียนรายวิชาอื่น ๆ ซึ่งจะทำให้ได้สื่อที่มีประสิทธิภาพในการก่อให้เกิดองค์ความรู้ทั้งในและนอกห้องเรียน เป็นการลดปัญหาด้านเนื้อหามากเวลาน้อย

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กระทรวงศึกษาธิการ (2533) *เอกสารแนะนำหลักสูตร* กรุงเทพมหานคร กรมวิชาการ กระทรวงศึกษาธิการ

_____. (2536) *การวิจัยเชิงพัฒนาระดับโรงเรียน* กรุงเทพมหานคร กรมวิชาการ กระทรวงศึกษาธิการ

_____. (2545) *หลักสูตรการศึกษาขั้นพื้นฐาน พุทธศักราช 2544* กรุงเทพมหานคร กรมวิชาการ กระทรวงศึกษาธิการ

จิตราพรรณ พิลึก (2543) *การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้* กรุงเทพมหานคร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ณิชกานต์ กลิ่นกุสุม (2546) "เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้" ใน *เอกสารประกอบการฝึกอบรม* เรื่อง เทคนิคการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ วันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2546 มหาวิทยาลัยรังสิต (อัดสำเนา)

นันทิยา วรรธนะภูติ (2542) *การขยายพันธุ์พืช* พิมพ์ครั้งที่ 3 กรุงเทพมหานคร โอเดียนสโตร์

นิตย์ศรี แสงเดือน และสัมพันธ์ คัมภิรานนท์ (2538) "เทคโนโลยีชีวภาพของพืช" ใน *ประมวลสาระชุด วิชาพฤกษศาสตร์ขั้นสูงสำหรับครู* หน่วยที่ 15 หน้า 302-341 นนทบุรี มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช สาขาวิชาศึกษาศาสตร์

บุญยืน กิจวิจารณ์ (2540) *เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช* ขอนแก่น มหาวิทยาลัยขอนแก่น ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

ประคองศรี สายทอง (2545) "การพัฒนาเอกสารประกอบการเรียนภาษาอังกฤษเกี่ยวกับสถานที่ท่องเที่ยว สำหรับนักเรียนชั้นประถมศึกษาปีที่ 6 ในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์" วิทยานิพนธ์ศึกษาศาตรมหาบัณฑิต แขนงวิชาหลักสูตรและการสอน สาขาวิชาศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช

ประนอม จันทรโณทัย (2544) *อนุกรมวิธานพืช* ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประศาสตร์ เกื้อมณี (2536) *เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช* กรุงเทพมหานคร โอเดียนสโตร์

ปราณี สังขะตะวรรธน์ (2537) "เซลล์ เนื้อเยื่อ และระบบเนื้อเยื่อ" ใน *ประมวลสาระชุดวิชาพฤกษศาสตร์ขั้นสูงสำหรับครู* หน่วยที่ 1 หน้า 2-87 นนทบุรี มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช สาขาวิชาศึกษาศาสตร์

พูนทรัพย์ เจริญสุข (2538) “รายงานการพัฒนาการเรียนการสอนโดยใช้เอกสารประกอบการเรียนเพื่อพัฒนาทักษะการฟัง พูด อ่าน และเขียน วิชาภาษาไทย (ท 503) ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5” ใน *วารสารการวิจัยทางการศึกษา* (เมษายน-ธันวาคม 2538) หน้า 78-85

เพ็ญพรรณ คำศรีสุข (2538) “การสร้างประมวลการสอนรายวิชา ส 072 ท้องถิ่นของเรา 2 สำหรับชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น จังหวัดอุบลราชธานี” วิทยานิพนธ์ศึกษาศาตรมหาบัณฑิต แขนงวิชาหลักสูตรและการสอน สาขาวิชาศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช

มานี เตื้อสกุล (2538) *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการเกษตร* สงขลา วิทยาลัยครูสงขลา

โรงเรียนเทพศิรินทร์ (2544) “เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการบูรณาการกับวิชาชีววิทยา” ใน *เอกสารประกอบการฝึกอบรมสัมมนาเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การปฏิรูปการศึกษา* วันที่ 18-20 กรกฎาคม 2544 โรงเรียนเทพศิรินทร์ (อัดสำเนา)

โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ (2545) *หลักสูตรสถานศึกษาขั้นพื้นฐาน โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ* ฝ่ายวิชาการ โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ (อัดสำเนา)

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2542) *เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขั้นพื้นฐาน* นครปฐม ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัย และพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ม.ป.ป.) *หนังสือเรียนวิชาชีววิทยา ว 046 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช* กรุงเทพมหานคร สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี (อัดสำเนา)

สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาแห่งชาติ (2545) *พระราชบัญญัติการศึกษาแห่งชาติ พ.ศ. 2542 และที่แก้ไขเพิ่มเติม (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2545* สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาแห่งชาติ สำนักนายกรัฐมนตรี

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ม.ป.ป.) *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช* กรุงเทพมหานคร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (อัดสำเนา)

สุทิน เนียมพลับ (2525) *เทคนิคการสอนและประสบการณ์วิชาชีพภาคปฏิบัติ* พิมพ์ครั้งที่ 2 ราชบุรี โรงพิมพ์วิศวการพิมพ์

อบรม สินภิบาล และกุลชรี องค์ศิริพร (2524) *ประสบการณ์วิชาชีพภาคปฏิบัติ 1 (คู่มือฝึกสอน)*

กรุงเทพมหานคร โรงพิมพ์พีระพัธนา

อมรา เล็กเริงสินธุ์ (2529) *หลักสูตรและแบบเรียนมัธยมศึกษา* กรุงเทพมหานคร โรงพิมพ์จงเจริญการพิมพ์

อรดี สหวัชรินทร์ (2539) *หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช* กรุงเทพมหานคร ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อรรณพ ตัญญู (ม.ป.ป.) “รายงานการใช้และพัฒนาเอกสารประกอบการเรียนการสอนและแผนการสอนที่ใช้เอกสารประกอบการเรียนการสอนวิชาการผสมดินปลูก (ช 0155) ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5” (อัดสำเนา)

อรสา ปราชญ์นคร (2525) *หลักสูตรและแบบเรียนมัธยมศึกษา* กรุงเทพมหานคร ไทยวัฒนาพานิช

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

รายชื่อผู้ทรงคุณวุฒิ

รายชื่อผู้ทรงคุณวุฒิ

1. ผู้ทรงคุณวุฒิด้านเนื้อหา

อาจารย์ประนอม ลีธรรมชโย ตำแหน่งอาจารย์ 3 ระดับ 8
โรงเรียนราชนันทาจารย์ สามเสนวิทยาลัย 2
เขตบางซื่อ กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา กศ.ม. (การสอนชีววิทยา)
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

2. ผู้ทรงคุณวุฒิด้านภาษาไทย

อาจารย์ปริศนา พุทธสุวรรณ ตำแหน่งอาจารย์ 3 ระดับ 8 โรงเรียนหอวัง
เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา ศศ.ม. (การสอนภาษาไทย)
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

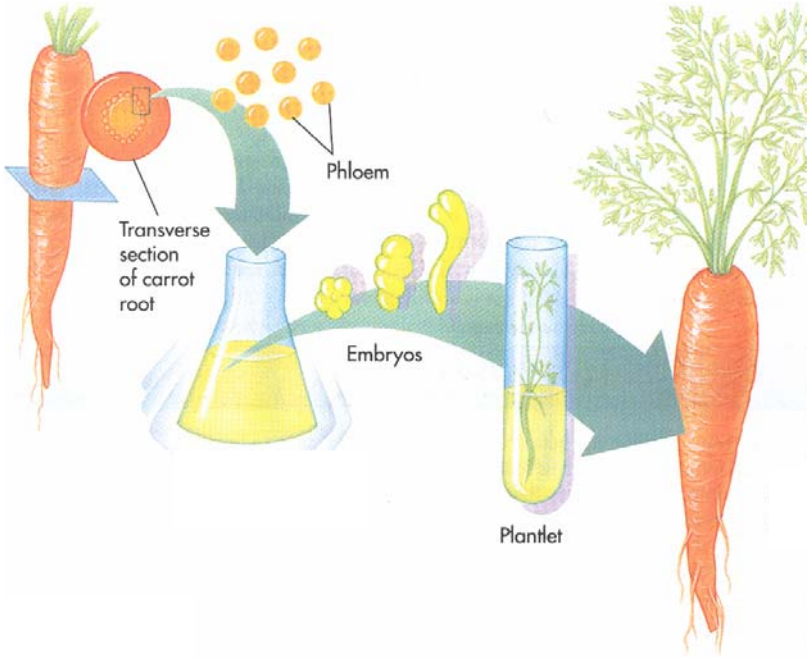
3. ผู้ทรงคุณวุฒิด้านการวัดผลและประเมินผล

อาจารย์บุปผา อนันตรศิริชัย ผู้อำนวยการสำนักงานทะเบียน
มหาวิทยาลัยศรีปทุม กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา ค.ม. (การวัดและประเมินผลการศึกษา)
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

เอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645
หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6

เอกสารประกอบการเรียนรายวิชา ว 645
หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6



โดย พูลสุข ณัฏฐการณิก

คำนำ

ปัจจุบันวิทยาการทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีความเจริญก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว และมีความสำคัญมาก สามารถนำมาใช้เพื่อการพัฒนาด้านการเกษตรได้อย่างกว้างขวาง ทำให้ผลผลิตพืชมีคุณภาพสูงทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ เป็นการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรออกสู่ท้องตลาด เป็นการขยายพันธุ์พืชปลอดโรคจำนวนมาก เพียงพอกับความต้องการ นอกจากประโยชน์ในด้านการได้พืชปลอดโรคแล้ว ยังใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์พืชใหม่ๆ หรือ การเก็บรักษาพันธุ์รวบรวมพันธุ์พืช ในหลักสูตรกลุ่มสาระการเรียนรู้วิทยาศาสตร์ ได้ให้ความสำคัญเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยระบุว่า ให้นักเรียนได้ศึกษา รู้จัก และใช้เครื่องมือศึกษาพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ศึกษาวิธีการ หลักการเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เทคนิคปลอดเชื้อ การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ฝึกปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดังนั้น จึงจัดทำรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นรายวิชาเพิ่มเติมขึ้น เพื่อให้นักเรียนมีความเข้าใจ มีทักษะและนำความรู้ ประสบการณ์เป็นพื้นฐานใช้ในการศึกษาหาความรู้ ความชำนาญต่อไป และเป็นแนวทางประกอบอาชีพได้

นางพูลสุข ณัฏฐการณิก

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	34
ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	34
ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	34
หลักการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	35
ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	36
ประวัติความเป็นมาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	37
บทที่ 2 การเตรียมการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	41
ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	41
อุปกรณ์และเครื่องมือ	41
ห้องย้ายเนื้อเยื่อ	44
ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ	45
เรือนเพาะชำ	45
สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	46
การปฏิบัติตนก่อนและขณะทำงานในสภาพปลอดเชื้อ	46
บทปฏิบัติการที่ 1 อุปกรณ์และเครื่องมือในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	48
บทปฏิบัติการที่ 2 เทคนิคการทำงานในสภาพปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการ	50
บทที่ 3 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	52
ธาตุอาหารที่จำเป็นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	52
สูตรอาหารวิทยาศาสตร์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	58
ขั้นตอนการเตรียมอาหาร	61
สูตรอาหารดัดแปลง	62
บทปฏิบัติการที่ 3 การเตรียมอาหารเข้มข้น	70
บทปฏิบัติการที่ 4 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต	72
บทปฏิบัติการที่ 5 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	74
บทที่ 4 วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	75
เทคนิคปลอดเชื้อ	75

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ชนิดของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	76
การเจริญเติบโตและพัฒนาการของเนื้อเยื่อพืช	81
ส่วนของพืชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	82
หลักเกณฑ์การคัดเลือกเนื้อเยื่อพืช	86
การฟอกฆ่าเชื้อ	86
การเพิ่มปริมาณแคลลัสหรือต้น	89
การชักนำรากพืช	89
ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	90
บทปฏิบัติการที่ 6 การเลือกเนื้อเยื่อพืชในการเพาะเลี้ยง	92
บทปฏิบัติการที่ 7 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	93
บทปฏิบัติการที่ 8 การฟอกฆ่าเชื้อ	96
บทปฏิบัติการที่ 9 การขยายเพิ่มจำนวนต้น	98
บททที่ 5 การย้ายต้นพืชเพาะเลี้ยงลงปลูก	99
การปรับสภาพต้นอ่อน	99
ขั้นตอนการย้ายต้นพืชออกปลูก	99
บทปฏิบัติการที่ 10 การย้ายต้นออกปลูก	102
บรรณานุกรม	103
อภิธานศัพท์	105

บทที่ 1
บทนำ

ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึง การเพาะเลี้ยงอวัยวะ เนื้อเยื่อ เซลล์ หรือเซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์ (Protoplast) ด้วยอาหารวิทยาศาสตร์ หรืออาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ โดยอาศัยคุณสมบัติพิเศษของเซลล์พืชที่เรียกว่า โททิโพเทนซี (Totipotency)

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ประศาสตร์ เกื้อมณี (2536 : 4-6) จำแนกประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชออกเป็น 8 ประการ ดังนี้

1. การผลิตต้นพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว
2. การผลิตพืชที่ปราศจากโรค
3. การปรับปรุงพันธุ์พืช
4. การผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน
5. การผลิตพันธุ์ทนทาน
6. การผลิตยาหรือสารเคมีจากพืช
7. การศึกษาทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช
8. การเก็บรักษาพันธุ์พืช

หลักการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

หลักการสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ ต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ตัดเอาชิ้นส่วนของพืชที่สะอาด นำมาเลี้ยงในขวดแก้วที่บรรจุอาหารวิทยาศาสตร์ซึ่งได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว เมื่อเซลล์ชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาเลี้ยงได้รับแร่ธาตุ วิตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำตาลจากอาหารวิทยาศาสตร์ที่ใช้เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อจะเจริญเติบโตเป็นต้นโดยตรง หรือเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า “แคลลัส” หรือ คัพภะที่เรียกว่า “โซมาติก เอ็มบริโอ” หรือ “เอ็มบริออยด์” และเมื่อตัดแบ่งออกเป็นชิ้นๆ และเปลี่ยนอาหารใหม่บ่อยๆ จะสามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างไม่มีที่สิ้นสุด และที่สุดจะได้ต้นพืชที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการเป็นจำนวนมาก เหมาะจะนำไปใช้ขยายพันธุ์ทั้งพืชที่เป็นไม้ดอก ไม้ประดับ ผัก ไม้ผล ไม้ปลูกป่า พืชไร่ และสมุนไพรต่างๆ (อรดี สหวัชรินทร์ 2539 : 3)

นันทิยา วรรธนะภูติ (2542 : 400-401) กล่าวไว้ว่า การเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นอยู่กับหลักการหรือทฤษฎี 4 ข้อ คือ

1. โททิโพเทนซี (Totipotency) เป็นทฤษฎีที่กล่าวว่า เซลล์มีชีวิตทุกเซลล์มีความสามารถทางพันธุกรรมที่จะเกิดเป็นต้นใหม่ (กรณีเป็นพืช) หรือเกิดเป็นสัตว์ตัวใหม่ (ในกรณีเป็นสัตว์) โดย เฮเบอร์แลนดท์ (Gottieb Heberlandt) นักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมันเป็นผู้ตั้งทฤษฎีนี้ขึ้นเมื่อ ค.ศ.1902 กล่าวว่า เราสามารถเลี้ยงเนื้อเยื่อ เซลล์และอวัยวะของพืชไว้ได้ตลอดไป ในปี ค.ศ.1934 ไวท์ (White) สามารถเลี้ยงรากมะเขือเทศโดยใช้สารสกัดจากยีสต์ซึ่งประกอบด้วยวิตามินบีบางตัวโดยเฉพาะไทอะมีนได้ในหลอดแก้ว

ต่อมา ค.ศ.1939 โนบิคอร์ต (Nobecourt) กับ กุตเทอเรต (Gautheret) จากฝรั่งเศส และ ไวท์ (White) จากสหรัฐอเมริกาสามารถเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสไว้ได้อย่างต่อเนื่องในอาหารสังเคราะห์พื้นฐานที่มีออกซิน

2. ออกซิน และไซโทไคนินเป็นฮอร์โมนที่ควบคุมการเกิดต้นและราก โดย สกู๊ค (Skoog) และคณะได้เลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสพิธ (Pith) ของยาสูบ พบปฏิสัมพันธ์ของไซโทไคนินและออกซิน อันเป็นทฤษฎีพื้นฐานของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้ต้นเล็กๆ ทั้งหมด

3. ขั้นตอนการพัฒนาของการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ได้ต้นเล็กๆ จนตั้งตัวได้ ทฤษฎีนี้เกิดขึ้นเมื่อ โมเรล (Morel) ได้ทำการเลี้ยงปลายยอด (Shoot tip) ของกล้วยไม้ซิมบิเดียมเพื่อให้ปลอดไวรัส และพบว่าการเลี้ยงปลายยอดเป็นวิธีที่สามารถขยายพันธุ์ทางลำต้นได้รวดเร็วมากโดยนำโครงสร้างที่เรียกว่าโพรโทคอร์มมาตัดแบ่ง ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณได้โดยไม่มีที่สิ้นสุด หลังจากนั้นจึงนำต้นเล็กๆ มาทำให้เกิดราก ซึ่ง มูราชิง (Murashige) ได้ทำงานนี้ต่อและพบทฤษฎีนี้

หลักการของการเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ขยายองค์ความรู้ต่อมาจนเป็นการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว (Cell suspension culture) การค้นพบว่า เซลล์เหล่านั้นสามารถพัฒนาเป็นโครงสร้างคล้ายเอ็มบริโอที่เรียกว่าเอ็มบริออยด์ (Embryoids) แสดงว่าเราสามารถควบคุมการเกิดอวัยวะคือต้นและรากที่เรียกว่า ออร์แกโนเจนีซิส (Organogenesis) เท่านั้น และสามารถควบคุมการเกิดเอ็มบริโอที่เรียกว่า เอ็มบริโอเจนีซิส (Embryogenesis) ด้วย

4. การควบคุมขั้นตอนการพัฒนาข้างต้นสัมพันธ์กับทฤษฎีที่ 4 คือ คอมพิเทนซี (Competency) และ ดีเทอร์มิเนชั่น (Determination) กล่าวคือ

Competency เป็นความสามารถภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่จะพัฒนาในลักษณะที่ผ่านโปรแกรมภายในเซลล์ (Memory) การพัฒนาไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อหรืออวัยวะพิเศษอาจต้องการฮอร์โมนพิเศษหรือสัญญาณจากสภาพแวดล้อม เซลล์เหล่านั้นจึงถูกเจาะจงหรือถูกกำหนดขึ้น (Determined) และเมื่ออยู่ในบางขั้นตอนของการพัฒนาจะไม่สามารถกลับคืนมาเหมือนเดิมได้อีก

ในการขยายพันธุ์พืช Competency และ Determined กำหนดว่าเซลล์ หรือเนื้อเยื่อจะเกิดเป็นเอ็มบริโอ หรือเป็นอวัยวะ และจะเกิดเป็นราก ต้น หรือดอก เช่น การเกิดเป็นเอ็มบริโอขึ้นอยู่กับการเลือกเนื้อเยื่อที่สามารถจะเป็นเอ็มบริโอได้ หรือจะชักนำเซลล์ หรือเนื้อเยื่อที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ให้เกิดเป็นเอ็มบริโอ คล้ายกับการชักนำให้เกิดราก หรือต้น ใน Organogenesis บางเซลล์ในต้นมีความสามารถที่จะพัฒนาจุดกำเนิดรากภายใต้กระบวนการ Determination และเกิดจุดกำเนิดราก

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 6 ขั้นตอน คือ

1. การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. การคัดเลือกเนื้อเยื่อพืช
3. การฟอกฆ่าเชื้อ
4. การขยายพันธุ์เพิ่มจำนวน
5. การชักนำรากพืช
6. การย้ายออกปลูก

ประวัติความเป็นมาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้เริ่มต้นขึ้นใน ค.ศ.1930 เมื่อนักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมัน ชื่อ Gottieb Haberlandt ได้ทำการแยกเซลล์พืชมาเลี้ยง เพื่อจะทำการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ แต่ได้พบกับความสำเร็จเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ครั้นต่อมาในปี ค.ศ.1930 ได้มีการพัฒนาการเลี้ยงเซลล์ที่แยกมาจากรากของพืชหลายชนิด โดยเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ต่อมาปี ค.ศ.1938 สามารถเพาะเลี้ยงอวัยวะ (Organ) และแคลลัส (Callus) ของพืชได้หลายชนิด และนับตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก็ได้มีการพัฒนาไปอย่างกว้างขวาง มีการค้นพบเทคนิคใหม่ ๆ อีกมากมาย ตราบนกระทั่งในปัจจุบันนี้ มนุษย์สามารถทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวๆ และโปรโตพลาสต์ของพืชได้หลายชนิด รวมทั้งการใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การตัดต่อยีนส์ การถ่ายยีนส์ เข้ามาร่วมด้วย เพื่อสร้างสายพันธุ์ใหม่

ปัจจุบันนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทสำคัญยิ่งต่อวิทยาการแขนงอื่น ๆ เช่น ชีวเคมี พันธุศาสตร์ การปรับปรุงพันธุ์ โรคพืช การป่าไม้ และเภสัชศาสตร์ ฯลฯ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มีวิวัฒนาการอันยาวนานจากอดีตจนถึง ค.ศ.1985 ดังนี้ (อรดี สหวัชรินทร์ 2539 : 4)

ค.ศ.1636 ชวาล (Schwann) และชไลเดน (Schleiden) ได้ตั้งทฤษฎีเซลล์ที่ว่า “สิ่งมีชีวิตที่ประกอบด้วยเซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์ โดยเซลล์ถือว่าเป็นหน่วยที่เล็กที่สุดของสิ่งมีชีวิตที่สามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตอยู่อย่างอิสระได้”

ค.ศ.1878 วอชติ้ง (Vochting) ได้ทดลองตัดกิ่งพืชมาเพาะชำและสังเกตเห็นว่า เซลล์จากกิ่งสามารถพัฒนาเป็นราก หรือเป็นต้นก็ได้

ค.ศ.1902 เฮเบอร์แลนดท์ (Haberlandt) ทดลองเลี้ยงเซลล์พืชในอาหารสังเคราะห์ โดยได้แยกเอาเนื้อเยื่อภายในใบ ของ Lamin purpurecum และ Eichornia crassipes เซลล์ผิวใบของ Ornithogalum sp. และเซลล์ขนของ Pulmonaria mollissima มาเลี้ยงไว้ใน Knop’s solution และน้ำตาล พบว่า เซลล์สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 1 เดือน เซลล์มีการขยายขนาดและเปลี่ยนรูปร่าง มีผนังเซลล์หนาขึ้น มีแป้งปรากฏอยู่ในคลอโรพลาสต์ แต่ไม่พบว่าเซลล์มีการแบ่งตัวแต่อย่างใด

ค.ศ.1922 รอบบินส์ (Robbins) และก๊อตต์ (Kotte) ได้ทำการเพาะเลี้ยงปลายรากหญ้า (Root tip)ในอาหารเหลวที่มีสารอนินทรีย์และน้ำตาล ซึ่งพบว่า ในระยะแรกๆ รากหญ้ามีการเจริญเติบโตได้ดี และสามารถแตกแขนงได้อีกด้วย แต่มีชีวิตอยู่ได้ไม่นานก็ตายไป และ Hnudson สามารถเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในหลอดทดลองได้สำเร็จ

ค.ศ.1934 ไวท์ (White) ได้ทำการเพาะเลี้ยงรากมะเขือเทศในอาหารเหลวที่มีสารอินทรีย์ น้ำสกัดจากกยีสต์ และน้ำตาล ปรากฏว่ารากมะเขือเทศมีการเจริญเติบโตและมีชีวิตอยู่ได้นาน ต่อมามีการใช้วิตามินบีต่างๆ ได้แก่ ไพรีดอกซิน (Pyridoxine) ไทอะมีน (Thiamine) และรดนิโคตินิค (Nicotinic acid) แทนการใช้น้ำสกัดจากยีสต์ อาหารวิทยาศาสตร์แบบง่ายๆ นี้ ได้มาดัดแปลงและใช้ในงานวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา และกัตเทอเรต (Gautheret) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (Cambium) ของไม้ยืนต้นบางชนิด ได้แก่ Salix capraeca และ Populus nigra โดยใช้ Knop's solution ที่มีกากน้ำตาลกลูโคส และ สารซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ (Cysteine hydrochloride) พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดี

ค.ศ.1937 ทิแมน (Thimann) ทำการทดลองต่อและพบว่า หากเติมวิตามินบี และออกซิน ได้แก่ IAA ลงไปใน Knop's solution ที่มีกากน้ำตาลกลูโคส และสารซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ (Cysteine hydrochloride) เซลล์จะมีการเจริญเติบโตได้ดียิ่งมากขึ้น

ค.ศ.1939 ไวท์ (White), กัตเทอเรต (Gautheret) และ โนบิคอร์ต (Nobecourt) พบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงแคลลัส

ค.ศ.1945 ลู (Loo) สามารถเพาะเลี้ยงปลายยอด (Shoot tip) ของหน่อไม้ฝรั่ง

ค.ศ.1948 เคปลิน (Caplin) และ สเตวาร์ด (Steward) รายงานว่า ในน้ำมะพร้าวมีสารที่ช่วยให้พาเรงคิมา ในหัวแครอทมีการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ได้ ต่อมาจึงมีการใช้น้ำมะพร้าวร่วมกับ สาร 2,4-D โดยใส่ลงไปในอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่เคยทำมาก่อนแล้วแต่ไม่สำเร็จ ปรากฏว่าทำให้พืชแบ่งเซลล์ได้ ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมาได้มีการใช้น้ำมะพร้าวกันอย่างแพร่หลาย

ค.ศ.1950 บอล (Ball) สามารถชักนำแคลลัสของต้น Sequoia sempervirens ให้เกิดเป็นอวัยวะขึ้นได้

ค.ศ.1952 โมเรล (Morel) และมาร์ติน (Martin) สามารถผลิตต้นรักเร่ (Dahlias) ที่ปลอดโรคไวรัสโดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และเป็นครั้งแรกที่สามารถขจัดโรคไวรัสออกจากต้นรักได้สำเร็จโดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงปลายยอด เป็นเพราะว่าเนื้อเยื่อเจริญที่ปลายยอดพืชนั้นปลอดจากเชื้อไวรัสและเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ จากนั้นเป็นต้นมาก็ได้มีการนำเอาเทคนิคนี้ไปใช้กันอย่างกว้างขวางกับพืชสวนและพืชไร่อีกหลายชนิด

ค.ศ.1953 เมอร์ (Muir) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยการเอาแคลลัสของดาวเรืองและยาสูบมาเลี้ยงในอาหารเหลว และวางบนเครื่องเขย่า ทำให้เกิดเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือกลุ่มของเซลล์แขวนลอยอยู่ในอาหารเหลว ต่อมา ค.ศ.1954 เมอร์ (Muir) และคณะสามารถชักนำให้เกิดต้นพืชขึ้นจากเซลล์เดี่ยว ๆ ได้เป็นครั้งแรก

ค.ศ.1956 นิคเกล (Nickell) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลว (Suspension culture) ของถั่วและพืชอื่นๆ อีกหลายชนิด พบว่า ถ้ามีการเปลี่ยนอาหารใหม่ ๆ อยู่เสมอ เซลล์ก็จะมีการเจริญเติบโตได้ไม่มีที่สิ้นสุด

ค.ศ.1960 กันตัน (Kantan) ประสบความสำเร็จในการทำการปฏิสนธิในหลอดทดลองของต้น Papaver rhoeas และ คอกกิ้ง (Cocking) ค้นพบเอนไซน์ที่ใช้ย่อยผนังเซลล์ เพื่อใช้ในการผลิตโปรโตพลาสต์ ต่อมา โมเรล สามารถผลิตต้นกล้วยไม้ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ

ค.ศ.1962 กันตัน (Kunta) และคณะได้ทำการพัฒนาเทคนิคการผสมเกสรและปฏิสนธิในหลอดทดลอง โดยการเพาะเลี้ยงรังไข่และละอองเกสรบนอาหารวิทยาศาสตร์ในขวดเดียว สามารถผลิตลูกผสมได้สำเร็จ ต่อมาจึงได้มีการใช้เทคนิคนี้กันมากกับพืชที่ไม่สามารถผสมติดในธรรมชาติ เช่น การผลิตลูกผสมระหว่างชนิด ลูกผสมข้ามชนิด และลูกผสมข้ามสกุล

ค.ศ.1962 มูราชิง (Murashige) และสกู๊ค (Skoog) คิดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ขึ้น

ค.ศ.1964 กูฮา (Guha) และ มาเฮสวาริ (Mheswari) สามารถผลิต haploid plant ได้จากการเพาะเลี้ยงเรณูของต้นลำโพง (Datura)

ค.ศ.1967 บอร์จิน (Bourgin) และ นิส์ช (Nitsch) สามารถผลิต haploid plant จากการเลี้ยงเรณูของยาสูบ และต่อมาก็ได้นำไปใช้กับพืชอื่นๆ เช่น ข้าว

ค.ศ.1970 คาร์สัน (Carlson) ได้ค้นพบวิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหลอดทดลองโดยการใช้สารเคมี , กาสชา (Kasha) และ เกา (Kao) สามารถผลิต Monoploid plant ได้จากการเลี้ยงคัพภะของข้าวบาร์เล่ย์ , พาวเวอร์ (Power) และคณะ ค้นพบวิธีการรวบรวมโปรโตพลาสต์เป็นครั้งแรก

ค.ศ.1970 นากาตะ (Nagata) และ ทาเคเบ (Takebe) สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบยาสูบได้สำเร็จ และสามารถทำให้ เกิดการแบ่งตัวได้เป็นกลุ่มของเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว

ค.ศ.1971 ทาเคเบ (Takebe) และคณะ สามารถทำการชักนำให้เกิดต้นพืชขึ้นได้จากการเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นครั้งแรก

ค.ศ.1972 คาร์ลสัน (Carlson) และคณะ สามารถทำการผสมข้ามชนิดได้โดยวิธีการรวบรวมโปรโตพลาสต์

ค.ศ.1974 มีการค้นพบเทคนิคการถ่ายทอดลักษณะ โดยผ่านทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Biotransformation) และ Agrobacterium ได้ค้นพบ Ti-plasmid อันเป็นสาเหตุของการเกิดปมในต้นพืช

ค.ศ.1976 พาวเวอร์ (Power) และคณะ ได้ประสบความสำเร็จในการผสมข้ามชนิดระหว่าง Petunia hybrida กับ Petunia parodii โดยการรวมโปรโตพาลสต์

ค.ศ.1977 คลินตัน (Chilton) และคณะ ได้ประสบความสำเร็จในการถ่าย Ti-plasmid จาก Agrobacteriums เข้าสู่พืช

ค.ศ.1978 เมลเชอร์ (Melchers) และคณะ ประสบความสำเร็จในการทำ Somatic hybridization ระหว่างมะเขือเทศกับมันฝรั่ง

ค.ศ.1982 เครน (Kren)และคณะ สามารถย้าย DNA บริสุทธิ์เข้าไปสู่โปรโตพลาสต์ได้โดยตรง และ ซิมเมอร์แมน (Zimmermann) ได้ค้นพบเทคนิคการรวมโปรโตพลาสต์ โดยการใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้น

ค.ศ.1983 เพลเลเทียร์ (Pelletier) และคณะ ประสบความสำเร็จในการทำการผสมข้ามสกุล (Intereneric hybridization) ระหว่าง เรดิช (Radish) กับ เรพ (Rape) โดยการรวมโปรโตพลาสต์

ค.ศ.1984 พาสซคอฟกี (Paszkowki) และคณะค้นพบเทคนิคการถ่าย DNA ระหว่างเซลล์พืช

ค.ศ.1985 ฮอร์ช (Horsh) และคณะ พบวิธีการถ่ายยีนส์จาก Agrobacterium tumefaciens เข้าเซลล์พืชทางแผ่นใบ

ปัจจุบันมนุษย์กำลังพัฒนาเทคนิคการสร้างพืชพันธุ์ใหม่ๆ โดยวิธีการทางพันธุกรรม คือ การทำพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) หรือ การรวมดีเอ็นเอใหม่ (Recombinate DNA) ซึ่งเป็นการการนำ DNA เข้าไปใส่ในโปรโตพลาสต์ ตัวอย่างพืชพันธุ์ใหม่ที่เกิดโดยกรรมวิธีนี้ คือ ซันบีน (Sunbean) ซึ่งเกิดขึ้นจาก Sun flower กับ bean

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในยุคปัจจุบันได้มีความก้าวหน้าไปอย่างไม่หยุดยั้ง โดยอาศัยวิทยาการด้านวิทยาศาสตร์สาขาต่างๆ เป็นพื้นฐาน ซึ่งได้แก่ พฤกษศาสตร์ จุลชีววิทยา สัตววิทยา ชีววิทยาระดับโมเลกุล ชีวเคมี และฟิสิกส์ เมื่อมีความรู้ทางด้านพื้นฐานอย่างครบถ้วนแล้ว ก็สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมากมายมหาศาลในหลายสาขา เช่น การขยายพันธุ์พืชปลอดโรค, การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช, การปรับปรุงพันธุ์พืช การผลิตเมล็ดพันธุ์พืช เป็นต้น

บทที่ 2
การเตรียมการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เพื่อความสะดวกต่อการใช้และปฏิบัติงาน การเตรียมการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงควรจัดเตรียมความพร้อมสำหรับการดำเนินงาน ดังนี้

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ห้องปฏิบัติการสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควรคำนึงถึงหลักการและเหตุผลต่าง ๆ เช่น ความสะดวก ต้นทุนการก่อสร้าง พื้นที่และประโยชน์ใช้สอย ฯลฯ ซึ่งห้องปฏิบัติการควรจัดแบ่งพื้นที่ออกเป็นส่วนต่างๆ ดังนี้

1. ห้องพักผู้ปฏิบัติงาน (Researcher room) อาจจัดเป็นมุมเล็กๆ โดยใช้พื้นที่ส่วนหนึ่งของห้องปฏิบัติการ ใช้เป็นที่เก็บตำราหรือเอกสารทางวิชาการที่เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. ห้องเก็บสารเคมี (Chemical room) ใช้จัดเก็บสารเคมีไว้เป็นหมวดหมู่ในตู้ โดยคำนึงถึงความสะดวกในการหยิบใช้

3. ห้องเตรียมอาหาร (Media preparation room) ควรมีขนาดมากกว่าสองห้องแรก

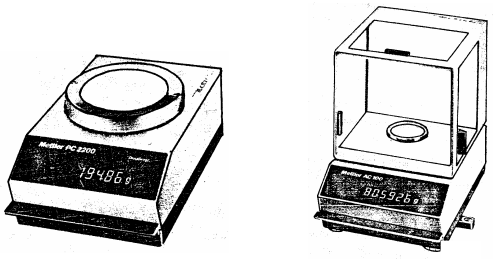
4. ห้องย้ายเนื้อเยื่อ (Transferation or Inoculation room) จำเป็นต้องมีความสะอาดและปลอดเชื้อ ควรปิดกั้นห้องให้สนิท และควรมีผู้คนผ่านเข้าออกน้อยให้ที่สุดเท่าที่จำเป็น

5. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Culture room) อาจจัดรวมอยู่กับห้องย้ายเนื้อเยื่อก็ได้ ห้องนี้จำเป็นต้องสะอาดและปลอดเชื้อเช่นเดียวกับห้องย้ายเนื้อเยื่อ โดยต้องป้องกันเชื้อและรักษาความสะอาดเป็นพิเศษ จึงควรเป็นห้องที่มีผู้คนผ่านน้อยที่สุด ถ้าเป็นไปได้ควรติดหลอดอัลตราไวโอเลต (Untraviolet light) ไว้เพื่อเปิดฆ่าเชื้อเป็นครั้งคราว

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ห้องเตรียมอาหาร (Media preparation room) ภายในห้องควรมีโต๊ะทำงาน โต๊ะวางเครื่องมือ ตู้สำหรับเก็บ Stock อาหาร ตู้เก็บสารเคมี ตู้เก็บขวดเพาะเลี้ยง อ่างน้ำ โดยมีอุปกรณ์ และเครื่องมือดังนี้

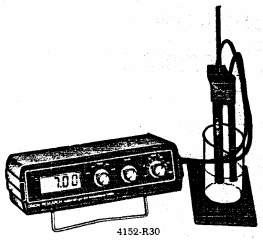
1.1 เครื่องชั่ง (Balance) ใช้ชั่งสารเคมี ในการเตรียมสารละลายความเข้มข้นสูง และการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งมีทั้งแบบหยาบ (2 ตำแหน่ง) ที่ชั่งน้ำหนักต่ำสุดได้ 0.01 กรัมและแบบละเอียด (มากกว่า 2 ตำแหน่ง) ที่ชั่งได้ถึง 0.001 กรัม หรือ 0.0001 กรัม



เครื่องชั่งละเอียด

1.2 ช้อนตักสารเคมี (Spatula) ซึ่งมีทั้งแบบโลหะและพลาสติก

1.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ใช้วัดความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเพาะเลี้ยง



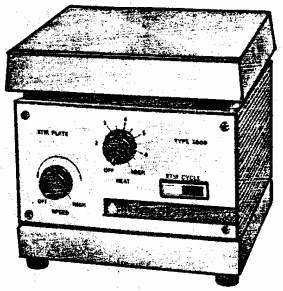
เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส

1.4 เตาอุ่นความร้อนและเครื่องคน (Hot plate and Magnetic stirrer) ใช้ในการอุ่นหรือหลอมอาหาร พร้อมด้วยเครื่องคนระบบแม่เหล็ก หากมีงบประมาณน้อยอาจจะใช้เตาลวดความร้อน หรือเตาแก๊ส ซึ่งมีราคาถูกกว่าทดแทนได้ แต่ผู้เตรียมอาหารจะต้องคนอาหารเอง

1.5 เตาอบไมโครเวฟ (Microwave oven) ใช้เดี่ยวหรือหลอมอาหาร อาจใช้เตาลวดความร้อนหรือเตาแก๊สแทนได้ แต่หากต้องการจะเตรียมอาหารคราวละมาก ๆ ควรใช้เตาแก๊สจะเหมาะสมกว่า

1.6 ตู้เย็น (Refrigerator) ใช้เก็บสารเคมีบางตัวที่จำเป็นต้องจัดเก็บรักษาไว้ในที่ซึ่งมีอุณหภูมิต่ำ มิฉะนั้นแล้วจะเกิดการเสื่อมคุณสมบัติได้ เช่น ฮอร์โมน วิตามิน รวมทั้ง Stock ของอาหารด้วย

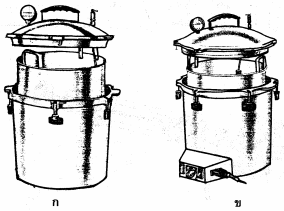
1.7 ตู้อบความร้อน (Hot oven) ใช้อบฆ่าเชื้อที่ติดมากับอุปกรณ์ หรือเครื่องมือซึ่งสามารถทนความร้อนสูงๆ ได้ เช่น พวกที่เป็นเครื่องแก้วหรือโลหะ ในการอบฆ่าเชื้อใช้อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง



ตู้อบความร้อน

1.8 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ใช้นึ่งฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเครื่องมือที่ไม่สามารถทนความร้อนของเตาอบความร้อนได้ ความดันที่ใช้ในการนึ่งฆ่าเชื้อใช้ความดันที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ใช้เวลาประมาณ 15 นาที

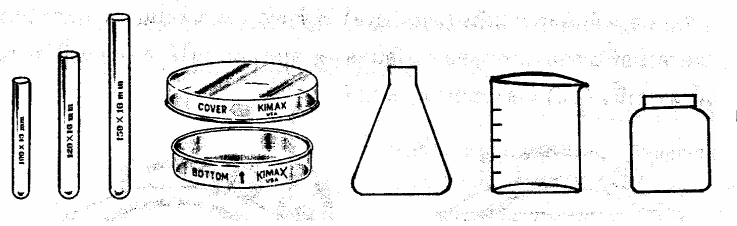
หม้อนึ่งความดันใช้แก๊ส



หม้อนึ่งความดันใช้ไฟฟ้า

1.9 เยื่อกรอง (Millipore filter) เนื่องจากสารบางชนิดไม่สามารถทำการนึ่งฆ่าเชื้อได้ เพราะจะทำให้คุณสมบัติเปลี่ยนไป หรือเสื่อมสภาพลง เช่น ซัคคาโรส(Saccharose) จะแตกตัวเป็น ฟรัคโตส (Fructose) และกลูโคส (Glocose) กรดจิบเบอเรลลิก ซึ่งศักยภาพจะลดลงถึง 90% (Pierik, 1987) สารสกัดจากพืช (Plant extracts) จะเสื่อมคุณภาพ ส่วนพวกสาร โคชิซีน (Cochicine) เอนไซม์ วิตามินบี1, บี12 กรดแพนโทธีนิก (Pantothenic acid) วิตามิน ซี สารซีเอติน (Zeatin) และพวกยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) จะด้อยคุณภาพลง การแก้ปัญหาดังกล่าวจำเป็นต้องใช้เยื่อกรองแทนการนึ่งฆ่าเชื้อ เยื่อกรองมีรูกว้างประมาณ 0.22 μm ซึ่งสามารถกรองเอาอนุภาคของแบคทีเรียและสปอร์ของราไว้ได้

1.10 เครื่องแก้วต่างๆ เช่น หลอดทดสอบ (Test tube) ขวด (Bottle) ขนาดต่างๆ ขวดชมพู่ (Flask) ปิเปต (Pipette) กรวยแก้ว (Funnel) และแท่งแก้วคน ฯลฯ

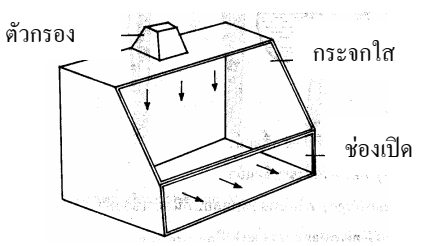


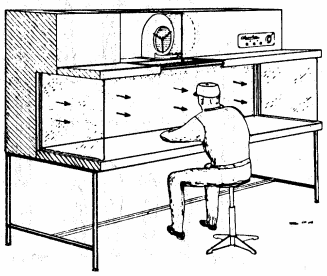
เครื่องแก้ว

ห้องย้ายเนื้อเยื่อ (Transferation or Inoculation room)

ภายในห้องย้ายเนื้อเยื่อควรมีอุปกรณ์และเครื่องมือดังนี้

1. ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Laminar air-flow cabinet) ทำหน้าที่เป็นตู้กรองอากาศให้บริสุทธิ์ ปลอดจากอนุภาคของราและแบคทีเรียก่อนจะไหลผ่านเข้าไปภายใน เทคนิคการปลอดเชื้อ (Aseptic techniques) จะต้องปฏิบัติงานภ 42 จ ส่วนประกอบสำคัญของตู้นี้คือ ตัวกรอง (Filter) ซึ่งติดอยู่ด้านหลังหรือด้านบนของตู้

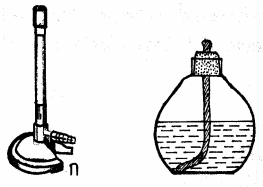




2. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) ใช้ทั้งแบบธรรมดา และแบบสามมิติ (Stereo microscope)

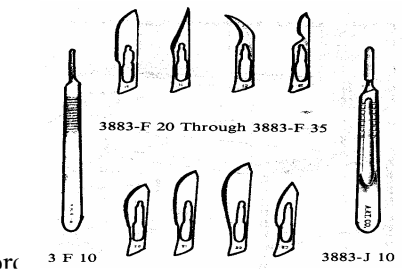
3. ตะเกียง (Lamp) อาจจะใช้ตะเกียงแอลกอฮอล์ ตะเกียงแก๊ส หรือตะเกียงบุนเสนก็ได้

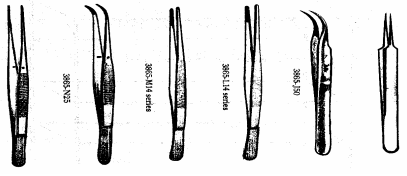
ตะเกียงแก๊ส



ตะเกียงแอลกอฮอล์

4. กระดาษกรอง (Filter paper) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
5. จานแก้ว (Petri dish) ที่อบ หรือนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) พร้อมหลอดทดสอบที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
7. มีดผ่าตัด (Knives and Scalpel) แบบต่างๆ
8. ปากคีบ (For





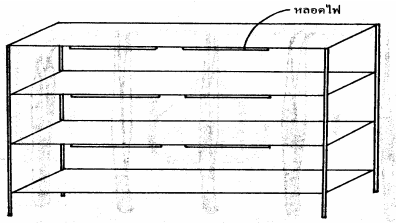
9. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น เข็มเขี่ย ลูพ (Loop) คราดโลหะ ฯลฯ

ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Culture room)

เป็นพื้นที่สะอาดและปลอดเชื้อ ควรมีการติดตั้งหลอดอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet light) ไว้เพื่อเปิดฆ่าเชื้อเป็นบางครั้ง โดยภายในห้องจะต้องมีอุปกรณ์และเครื่องมือดังนี้

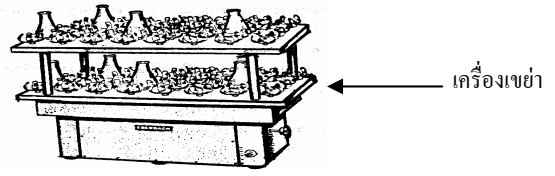
1. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controlled) ในประเทศเขตร้อน หรือในประเทศไทย คือ เครื่องปรับอากาศ แต่ในประเทศเขตหนาวจะต้องรวมถึงเครื่องทำความร้อน (Heater) ด้วย เพราะอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ 25 °C

2. ชั้นวางขวดเนื้อเยื่อ ซึ่งต้องไม่สูงเกินไป เพราะต้องติดตามการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงและตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ ทุกช่องชั้นต้องติดหลอดฟลูออเรสเซนต์ให้แสงสว่างด้วยความสว่างประมาณ 2000-4000 ลักซ์ (lux)



3. เครื่องตั้งเวลา (Timer) ใช้ตั้งเวลาปิด-เปิดไฟฟ้า เพื่อกำหนดความยาวของช่วงแสง

4. เครื่องเขย่า (Shaker or Rotator) เนื่องจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว จำเป็นต้องนำไปเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่า เพื่อให้อากาศได้คลุกเคล้าลงไปในอาหาร เพราะถ้าปล่อยให้เนื้อเยื่อจมอยู่ในของเหลวนานๆ จะทำให้เนื้อเยื่อขาดอากาศหายใจ จะทำให้เนื้อเยื่อตาย



เรือนเพาะชำ

เรือนเพาะชำมีความสำคัญต่อการเตรียมตัวอย่างพืชก่อนนำมาฟอกฆ่าเชื้อ เนื่องจากต้นพืชในสภาพธรรมชาติจะมีปริมาณเชื้อโรคอยู่จำนวนมาก ที่จำเป็นต้องนำมาทำการลดปริมาณเชื้อเพื่อลดการปนเปื้อนโดยการฟอกฆ่าเชื้อ และเรือนเพาะชำยังมีความจำเป็นต่อการย้ายต้นพืชออก

ปลูก เพราะในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความชื้นสัมพัทธ์สูง ทำให้ต้นพืชจะอวบน้ำและมีสารคิวตินที่ผิวน้อย เมื่อย้ายออกปลูก พืชจะมีอัตราการคายน้ำสูงและเหี่ยวง่าย ทำให้ร้อยละของการรอดชีวิตต่ำ การนำต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกไปพักที่เรือนเพาะชำ จะช่วยให้ต้นพืชพบกับสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มแสงต่ำ ความชื้นสัมพัทธ์สูง มีการระบายน้ำดี อุณหภูมิต่ำ มีตาข่ายคอยป้องกันแมลงศัตรูพืชด้วย ดังนั้น เรือนเพาะชำจึงช่วยให้อัตราการรอดชีวิตของต้นพืชที่ย้ายออกปลูกสูงขึ้นได้เป็นอย่างดี

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. แสง ความต้องการแสงของเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ การเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยทั่วไปจะใช้หลอดฟลูออเรสเซนซ์ ขนาด 40 วัตต์ จำนวน 2 หลอด ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควรอยู่ห่างจากหลอดไฟประมาณ 50 cm. ช่วงเวลาในการให้แสงขึ้นอยู่กับชนิดของพืชอีกเช่นกัน โดยทั่วไปประมาณ 12-16 ชั่วโมง ต่อวัน

2. อุณหภูมิ เนื้อเยื่อเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ ประมาณ 25-28 °C แต่เนื้อเยื่อหลายชนิดเจริญได้ดีที่อุณหภูมิห้อง

3. ค่า pH ของสารสังเคราะห์ ค่า pH ของสารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ โดยทั่วไป เซลล์พืชจะเจริญได้ดีในสารสังเคราะห์ที่เป็นกรด ช่วง pH 5.5-5.8 แต่ในช่วงที่มีการเจริญเติบโต ความต้องการของ pH ก็เปลี่ยนแปลงไป

การปฏิบัติตนก่อนและขณะทำงานในสภาพปลอดเชื้อ

เนื่องจากการปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีความต้องการจำเป็นเกี่ยวกับเรื่องความสะอาดที่มีสภาพปลอดเชื้อ ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานจึงควรปฏิบัติตนดังนี้

1. สวมเสื้อผ้าที่สะอาด รวบผมให้เรียบร้อยในขณะทำงาน

2. ไม่สวมเครื่องประดับต่างๆ เช่น แหวน นาฬิกา และสร้อยข้อมือ เมื่อทำงานในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

3. ล้างมือให้สะอาดก่อนลงมือปฏิบัติงาน

4. ฉีดพ่นมือหรือเช็ดทำความสะอาดมือจนถึงข้อศอกด้วยแอลกอฮอล์ 70% ทุกครั้งเมื่อจะนำมือเข้าตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

5. ไม่พูดคุยในขณะปฏิบัติงาน

6. ระหว่างการปฏิบัติงานไม่เดินผ่านพื้นที่สกปรกแล้วกลับเข้ามาทำงานใหม่

7. ห้ามรับประทานอาหารในขณะทำงาน

8. ไม่นำชิ้นส่วนพืชที่มีดินติดอยู่ พืชหรืออาหารที่ขึ้นรา หรือเน่าเสียเข้าไปในห้องปฏิบัติงาน หรือตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

9. ทำความสะอาดตู้ย้ายเนื้อเยื่อด้วยการฉีดพ่นแอลกอฮอล์ 70% ทุกครั้ง และเปิดหลอดไฟ UV เมื่อปฏิบัติงานเสร็จ

บทปฏิบัติการที่ 1
อุปกรณ์และเครื่องมือในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จุดประสงค์

1. ให้ผู้เรียนมีความรู้ ความเข้าใจ เกี่ยวกับวิธีการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. ให้ผู้เรียนมีความสามารถใช้หม้อนึ่งความดันได้

งานที่ปฏิบัติ

1. ศึกษาทำความเข้าใจวิธีการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. ฝึกหัดใช้หม้อนึ่งความดัน

วิธีการ

1. ศึกษาทำความเข้าใจวิธีการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากห้องย้ายเนื้อเยื่อ
2. การฝึกใช้หม้อนึ่งความดัน
   2.1 นำวัสดุสิ่งของที่ต้องการนึ่งฆ่าเชื้อลงในหม้อนึ่งความดัน
   2.2 เติมน้ำลงในหม้อนึ่งความดันชั้นนอกให้ระดับน้ำสูง 3-5 ซ.ม.
   2.3 นำหม้อนึ่งความดันชั้นในบรรจุลงในหม้อนึ่งความดันชั้นนอก
   2.4 ปิดฝาหม้อนึ่งโดยให้สายไล่อากาศอยู่ในช่องเสียบสายไล่อากาศ และให้สังเกตเครื่องหมายที่อยู่บนฝาหม้อนึ่งความดันและตัวหม้อนึ่งความดันตรงกัน
   2.5 หมุนเกลียวขันปิดฝาหม้อ โดยหมุนปิดเป็นคู่ที่อยู่ตรงข้าม เมื่อหมุนเกลียวปิดครบทุกคู่ แล้วจึงขันปิดให้แน่นอีกครั้ง
   2.6 นำหม้อนึ่งความดันขึ้นตั้งไฟ เปิดวาล์วไล่อากาศ รอจนน้ำเดือดมีไอพุ่งเป็นสายอย่างสม่ำเสมอออกจากวาล์วไล่อากาศ จึงปิดวาล์ว
   2.7 ควบคุมความดันของหม้อนึ่งให้อยู่ที่ความดัน 15 ปอนด์/หนึ่งตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วจึงปิดไฟ

2.8 รอจนความดันในหม้อนึ่งลดลงจนถึง 0 ปอนด์/หนึ่งตารางนิ้ว จึงเปิดฝาหม้อนึ่งนำอาหารออกจากหม้อนึ่ง

2.9 หมุนฝาขวดปิดให้แน่นอีกครั้ง

ภาระงาน

1. จงวาดรูปตู้ถ่ายเนื้อเยื่ออย่างง่ายที่นักเรียนได้ศึกษามา
2. บอกชื่ออุปกรณ์ที่นักเรียนคิดว่าควรจะมีอยู่ในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ
3. อธิบายความสำคัญจำเป็นของหม้อนึ่งความดันที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
4. บอกถึงข้อควรระวังขณะใช้หม้อนึ่งความดัน

บทปฏิบัติการที่ 2
เทคนิคการทำงานในสภาพปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการ

จุดประสงค์

1. ให้ผู้เรียนสามารถทำให้เครื่องมือเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออยู่ในสภาพปลอดเชื้อได้
2. ให้ผู้เรียนมีทักษะการใช้เครื่องมือเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ

งานที่ปฏิบัติ

1. เตรียมแอลกอฮอล์ 95% และ 70%
2. ทำเครื่องมือเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ
3. ฝึกทักษะการใช้เครื่องมือเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ

วิธีการ

1. ล้างมือด้วยน้ำสะอาด
2. ฉีดพ่น หรือเช็ดมือด้วยแอลกอฮอล์ 70%
3. ฉีดพ่นตู้เนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ 70% ให้ทั่ว และเช็ดให้แห้งด้วยผ้าสะอาด
4. จัดวางอุปกรณ์ในตู้ย้ายเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้อง ให้อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน แล้วจึงจุดตะเกียง
5. นำปากคีบและมีดผ่าตัดจุ่มลงในแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไปเผาไฟจากตะเกียง ให้ไฟลุกท่วมปากคีบและมีดผ่าตัดไม่น้อยกว่าครึ่งด้าม วางทิ้งไว้ให้เย็นบนแท่นวางอุปกรณ์ โดยให้ปลายปากคีบและใบมีดลอยอยู่ในอากาศ
6. นำขวดเนื้อเยื่อพืชที่เตรียมไว้ ลนไฟที่บริเวณรอบปากขวด
7. เปิดฝาขวด โดยหงายฝาขวดวางลงบนโต๊ะ ใช้ปากคีบคีบเอาเนื้อเยื่อพืชในขวดออกไปวางบนจานตัดเนื้อเยื่อ
8. นำปากคีบและมีดผ่าตัดจุ่มลงในแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไปเผาไฟจากตะเกียง ให้ไฟลุกท่วมปากคีบและมีดผ่าตัดไม่น้อยกว่าครึ่งด้าม วางทิ้งไว้ให้เย็นบนแท่นวางอุปกรณ์ โดยให้ปลายปากคีบและใบมีดลอยอยู่ในอากาศ

9. ลนปากขวดเนื้อเยื่อพืช ปิดฝาขวด ลนไฟรอบขวดอีกครั้ง

10. ใช้ปากคีบและมีดผ่าตัดที่ลนไฟและทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว ตัดแบ่งเนื้อเยื่อพืชออกเป็นชิ้นเล็กๆ และพักไว้

11. นำขวดเนื้อเยื่อพืชลนไฟที่บริเวณรอบปากขวด

12. ใช้ปากคีบที่ลนไฟและทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว คีบเนื้อเยื่อพืชที่ตัดและพักไว้ ย้ายไปลงขวดอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

13. ลนปากขวดแล้วปิดฝา

14. เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ให้ตรวจดูผลการปนเปื้อนของเชื้อ

ภาระงาน

1. จงอธิบายวิธีการเตรียมแอลกอฮอล์ 70%

2. จากขั้นตอนในวิธีการปฏิบัติงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ข้อ 1-14 บันทึกผลการปฏิบัติงาน และนักเรียนคิดว่าโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนของเชื้ออาจเกิดขึ้นได้ในขั้นตอนใดบ้าง และมีวิธีการป้องกันอย่างไร

บทที่ 3
การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เนื่องจากหลักการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจำเป็นต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ฉะนั้น การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรืออาหารวิทยาศาสตร์จำเป็นต้องจัดเตรียมและเก็บรักษาไว้ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อที่นำไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อถ้านึ่งนานเกินไปอาจทำให้สารบางชนิดสูญเสียคุณสมบัติไป สารบางชนิดถูกความร้อนไม่ได้ เช่น วิตามินต่างๆ GA และยูเรีย ต้องกรองด้วยกระดาษกรองชนิด เยื่อกรอง (Millipore filter)แบคทีเรียจะติดอยู่ข้างบน น้ำที่ไหลผ่านลงมาจะปราศจากเชื้อ

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายสูตร มักเรียกชื่อตามผู้ที่คิดค้นสูตรอาหารนั้นๆ เป็นอาหารวิทยาศาสตร์ เป็นธาตุอาหารให้แก่พืช โดยจัดแบ่งกลุ่ม ได้แก่

1. ธาตุอาหารที่จำเป็นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. สูตรอาหารวิทยาศาสตร์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
3. ขั้นตอนการเตรียมอาหาร
4. สูตรอาหารดัดแปลง

ธาตุอาหารที่จำเป็นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เป็นอาหารวิทยาศาสตร์ ประกอบด้วยสารเคมี ที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ที่เป็นธาตุอาหารให้แก่พืช โดยจัดแบ่งกลุ่มของสารที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดังนี้

1. สารกลุ่มอนินทรีย์ (Inorganic chemicals) ประกอบด้วยธาตุอาหารต่างๆ ดังนี้
   1.1 ธาตุอาหารหลัก (Major element) พืชต้องการใช้ในปริมาณมาก ได้แก่
      1.1.1 ไนโตรเจน (N) ธาตุอาหารจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช เป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน โปรตีน คลอโรฟิลล์ อัลคาลอยด์ กรดนิวคลิอิก และฮอร์โมนพืชบางชนิดถ้าหากพืชขาดธาตุอาหารนี้จะแสดงอาการใบเหลือง อัตราการเจริญเติบโตของพืชลดลง ธาตุไนโตรเจนที่ใช้จะอยู่ในรูปเกลือแอมโมเนียมไนเตรท หรือโปรแตสเซียมไนเตรท ซึ่งจะแตกตัวให้แอมโมเนียมไอออน (NH_4) และไนเตรทไอออน (NO_3)

1.1.2 ฟอสฟอรัส (P) เป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อเนื้อเยื่อเจริญของพืช (Meristematic tissue) ที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลิอิก สารให้พลังงานสูง (ATP) ช่วยเร่งปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์พืช ถ้าพืชขาดธาตุอาหารนี้ ต้นพืชจะมีการเจริญผิดปกติและอ่อนแอต่อสภาพแวดล้อม ธาตุฟอสฟอรัสที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะพบเห็นอยู่ในรูปของเกลือโปรแตสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) และโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) ซึ่งจะแตกตัวให้ H_2PO_4 หรือ HPO_4^{2-} หรือ PO_4^{3-}

1.1.3 โปรแตสเซียม (K) เป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการแบ่งเซลล์ ส่งเสริมการทำงานของการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรทในคลอโรฟิลล์ (Phytosynthesis) และกระบวนการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นกรดอะมิโน ทั้งยังมีผลต่อความแข็งแรงของพืช โดยเป็นตัวควบคุมแรงดัน ออสโมติกภายในเซลล์พืชให้สมดุลกับสภาพแวดล้อมภายนอก หากพืชขาดธาตุอาหารนี้จะทำให้ต้นพืชผิดปกติและอ่อนแอต่อสภาพแวดล้อม ธาตุโปรแตสเซียมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมักจะอยู่ในรูปของเกลือโปรแตสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) โปรแตสเซียมไอโอไดด์ (KNO_3) และโปรแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ซึ่งจะแตกตัวให้ K^+

1.1.4 ซัลเฟอร์ (S) เป็นองค์ประกอบของโปรตีนบางชนิดในพืช ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของราก ทำให้ใบมีสีเขียวเข้ม ธาตุซัลเฟอร์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะอยู่ในรูปเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) แมงกานีสซัลเฟต ($MgSO_4$) และซิงค์ซัสเฟต (Cu SO_4) ซึ่งจะแตกตัวให้ SO_4^{2-}

1.1.5 แคลเซียม (Ca) เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ช่วยรักษาสภาพของเซลล์ในการขยายตัว และการเพิ่มจำนวนเซลล์ ช่วยในการเคลื่อนย้ายคาร์โบไฮเดรต และกรดอะมิโนจากใบพืชไปส่วนต่างๆ ช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์บางชนิดในต้นพืช เช่น อะไมเลส (Amylase) เอทีพีเอส (ATPase) และฟอสโฟไลเปส (Phospolipase) เป็นต้น นอกจากนี้ ยังช่วยส่งเสริมการเจริญของเติบโต และพัฒนาการของรากพืช ธาตุแคลเซียมที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ในรูปของเกลือแคลแซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) และแคลเซียมไนเตรท ($Ca(NO_3)_2$) ซึ่งจะแตกตัวให้ Ca^{2-}

1.1.6 แมกนีเซียม (Mg) เป็นธาตุองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ และช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมตาโบลิซึมภายในเซลล์พืช ธาตุแมกนีเซียมที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ในรูปของเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ซึ่งแตกตัวให้ Mg^{2-}

1.1.7 เหล็ก (Fe) เป็นธาตุอาหารที่กระตุ้นการสร้างคลอโรฟิลล์ทำให้ใบพืชมีสีเขียว เป็นแหล่งในการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช เป็นตัวส่งถ่ายอิเล็กตรอนในกระบวนการ

สังเคราะห์ด้วยแสงและกระบวนการหายใจ เพื่อให้ได้พลังงานในการดำรงชีวิตของพืช ถ้าขาดธาตุนี้ใบพืชจะมีสีเหลืองซีด ธาตุเหล็กที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อยู่ในรูปของเกลือเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ผสมกับเกลือโซเดียมเอธิลีนไดเอมีนเตตระอะซิตริกแอซิค (NaEDTA) ซึ่งจะแตกตัวให้ Fe^{2+} Fe^{3+}

1.1.8 คาร์บอน

1.1.9 ไฮโดรเจน

1.1.10 ออกซิเจน

1.2 ธาตุอาหารรอง (Minor element)เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย ได้แก่

1.2.1 โบรอน (B) เป็นธาตุที่มีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนย้ายน้ำตาลไปยังส่วนต่างๆ ของพืช ซึ่งมีผลต่อการทำงานและสมดุลของฮอร์โมนพืช หากพืชขาดโบรอนจะมีออกซินเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ฮอร์โมนภายในต้นพืชเปลี่ยนแปลงและมีการเจริญเติบโตผิดปกติ โดยเฉพาะในส่วนเนื้อเยื่อเจริญจะหยุดการเจริญเติบโตและตายจากส่วนปลายลงมา ใบอ่อนจะเกิดอาการใบไหม้เป็นจุด แต่หากได้รับโบรอนมากเกินไปพืชจะแสดงอาการเป็นพิษหรือตายได้ ธาตุโบรอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะอยู่ในรูปของกรดบอริก (H_3BO_3)

1.2.2 โมลิบดีนัม (Molybdenum) เป็นธาตุที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการไนเตรท รีดักชั่น (Nitrate reduction) โดยเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย สำหรับพืชบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ธาตุโมลิบดีนัมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อยู่ในรูปของเกลือโซเดียมโมลิบเดท (Na_2MoO_4) ซึ่งจะแตกตัวให้ MoO_4^{2-} ใช้เพียงเล็กน้อย ถ้าใช้มากจะทำให้ต้นพืชแสดงอาการเป็นพิษ

1.2.3 แมงกานีส (Mn) เป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังคลอโรพลาสต์ (Chloroplast membrane) ช่วยเร่งปฏิกิริยาภายในเซลล์พืช หากขาดธาตุอาหารนี้จะทำให้ใบไหม้หรือใบเหลืองทั้งใบ ธาตุแมงกานีสที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อยู่ในรูปของเกลือแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) ซึ่งจะแตกตัวให้ Mn^{2-}

1.2.4 โคบอลต์ (Co) เป็นองค์ประกอบของวิตามิน บี12 มีความสำคัญต่อปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (Nitrogen fixation) ธาตุโคบอลต์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อยู่ในรูปขอองเกลือโคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$) ซึ่งจะแตกตัวให้ Co^{2-}

1.2.5 สังกะสี (Zn) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเอนไซม์หลายๆ ชนิด เช่น เอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ การสังเคราะห์ออกซิน และการสังเคราะห์ IAA

(Indoleacetic acid) เป็นต้น ธาตุสังกะสีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อยู่ในรูปของเกลือซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) ซึ่งจะแตกตัวให้ Zn^{2-}

1.2.6 ทองแดง (Cu) เป็นธาตุสำคัญในขบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน เพื่อให้ได้พลังงานในการดำรงชีวิตของพืช หากขาดธาตุนี้พืชจะยับยั้งเกิดการเจริญเติบโต ลำต้นบวม ข้อสั้น ใบลู่ลง ส่วนปลายยอดตาย ใบอ่อนแห้ง ธาตุทองแดงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อยู่ในรูปของเกลือคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ซึ่งจะแตกตัวให้ Cu^{2-}

1.2.7 คลอรีน/คลอไรด์ (Cl) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง และรักษาสมดุลของ Na^- และ K^- ของเซลล์พืช หากขาดธาตุนี้พืชจะแสดงอาการใบเหี่ยว ใบมีสีเหลือง หรือสีบรอนซ์ และตายได้ ธาตุคลอรีนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มักจะอยู่ในรูปของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ซึ่งจะแตกตัวให้ Cl^-

1.2.8 ไอโอดีน (I) เป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่สำคัญบางชนิดในพืช ธาตุไอโอดีนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อยู่ในรูปของเกลือโปรแตสเซียมไอโอไดด์ (KI) ซึ่งจะแตกตัวให้ I^-

2. สารกลุ่มอินทรีย์ (Organic chemicals)

2.1 สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (Carbon and energy source) ที่ใช้เป็นแหล่งให้พลังงาน ได้แก่ น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส ประกอบด้วยโมเลกุลของคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) โดยใช้เป็นแหล่งให้พลังงานแก่พืชแทนคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และน้ำ (H_2O) ซึ่งต้องผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงจึงจะได้น้ำตาลและออกซิจน (O_2) ในระยะแรกๆ ต้นพืชที่อยู่ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชยังไม่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ จำเป็นต้องใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโต น้ำตาลที่ใช้ได้แก่ ซูโครส กลูโคส ฟรัคโตส และแซคคาโรส เป็นต้น โดยทั่วไปนิยมใช้น้ำตาลซูโครสเพราะหาได้ง่ายและราคาถูก น้ำตาลซูโครส เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ เมื่อแตกตัวจะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือกลูโคส และฟรัคโตส ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

2.2 สารจำพวกวิตามิน (Vitamin) เป็นสารที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์หลายๆ ชนิดภายในเซลล์ วิตามินที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช ได้แก่

2.2.1 อิโนซิตอล (Inorsitol ; $C_6H_{12}O_6$) หรืออาจเรียกวิตามินบีรวม เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ (Sugar alcohol) ที่อยู่ในรูปของฟอสเฟต ช่วยรักษาแรงดันออสโมติกของเยื่อหุ้ม ออร์กาเนลล์ (Organell membrane) ต่างๆ ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์พืช มีผลต่อ

การแบ่งเซลล์ของพืช และสารอิโนซิตอล ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะอยู่ในรูปของไมโออิโนซิตอล (Myo-inositol)

2.2.2 ไทอะมีน (Thiamine ; $C_{12}H_{17}ON_4SCl$) หรือวิตามินบี 1 ซึ่งทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาการหายใจของพืช โดยเปลี่ยนแป้งที่สะสมในเซลล์พืชให้เป็นพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช ไทอะมีนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อยู่ในรูปของไทอะมีนไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl)

2.2.3 กรดนิโคตินิค (Nicotinic acid ; $C_6H_5O_2N$) หรือไนอะซีน ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในการส่งผ่านอิเล็กตรอนของการสังเคราะห์ด้วยแสง ในปฏิกิริยาการใช้แสง (Light reaction) เพื่อให้การทำงานของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์

2.2.4 ไพริดอกซีน (Pyridoxine) หรือวิตามิน B6 ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ในเซลล์พืช โดยไพรีดอกซีนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมักจะอยู่ในรูปของไพรีดอกซีนไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine-HCl)

2.2.5 กรดแพนโทธีนิค (Pantothenic acid ; $C_9H_{17}O_5N$) เป็นโคเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์และสลายกรดไขมัน (Fat metabolism)

2.2.6 กรดโฟลิก (Folic acid ; $C_{19}H_{19}O_7N_6$) เป็นวิตามินในส่วนของใบ และส่วนที่มีสีเขียวของพืช

2.2.7 โคลีน (Choline ; $C_5H_{15}O_2N$) เป็นอัลคาลอยด์ อยู่ในวิตามินบีรวม โคลีน ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อยู่ในรูปของโคลีนไฮโดรคลอไรด์ (Choline-HCl)

2.2.8 โรโบฟลาวิน (Riboflavin) เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาต่างๆ เช่นเดียวกับวิตามินบี

2.2.9 วิตามินเอช (Vitamin H ; $C_{10}H_{16}O_3N_2S$) เป็นโคเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์และสลายกรดไขมัน (Fat metabolism)

3. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulators) หรือฮอร์โมนพืช เป็นสารที่มีความสำคัญในการควบคุมรูปแบบของการเจริญ และพัฒนาการของพืช (Morphogenesis) ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดพืชสามารถสร้างได้เอง ส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมี โดยดูรูปแบบจากสารที่พบในธรรมชาติ ซึ่งสารที่สกัดได้จากพืช และสารสังเคราะห์นี้รวมกันเรียกว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ และกลุ่มไซโตไคนิน สารกลุ่มออกซิน ได้แก่ IBA (3-Indole butyric acid), NAA (Napthalene acetic acid) และ 2,4 D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) ได้แก่ BA (6-Benzylamino purine), Kinetin (6-Furfuryiamino purine)

3.1 ออกซิน (Auxins) ทำให้เซลล์พืชเกิดการยืดตัวและบวม (Cell elongation and swelling) เซลล์เกิดการแบ่งตัว (Cell division) ส่งเสริมการเกิดราก (Root formation) และยับยั้งการเกิดยอด (Inhibition shoot) ออกซินที่พืชสังเคราะห์ขึ้นบริเวณปลายยอดและปลายรากคือ IAA (1H-indole-3-acetic acid) ซึ่งเป็นออกซินที่ค้นพบตัวแรก ในการเตรียม IAA เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงต้องเตรียมในปริมาณที่น้อยและควรจะใช้ให้หมดภายใน 2-3 สัปดาห์ เนื่องจาก IAA สลายตัว หรือถูกดูดซึมโดยพืชอย่างรวดเร็ว หรือจะเสื่อมคุณภาพได้ง่ายโดยแสง ความเป็นกรด ออกซิน และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 1H- indole-3-butyric acid (IBA), 1-napthaleneacetic acid (NAA) และ (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) เป็นต้น

3.2 ไซโตไคนิน (Cytokinins) ใช้กระตุ้นการเจริญเติบโต และพัฒนาการของเซลล์พืช กระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัว (Cell division) ช่วยส่งเสริมการเกิดยอด (Shoot formation) ยับยั้งการเกิดราก (Inhibition root) ลดผลการข่มของตายอด (Decrease apical dorminance) กระตุ้นการแตกตาข้าง (Axillary shoot formation) และชะลอการแก่ของเซลล์พืช (Delay senescence)

3.3 จิบเบอเรลลิน (Gibberellins) นิยมใช้ในรูปที่เป็นผลึก GA_3 ซึ่งสกัดได้จากเชื้อรา และพืชชั้นสูง สารกลุ่ม GA จะสลายตัวได้ง่ายเมื่อผ่านความร้อน จึงไม่สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อได้ ต้องใช้การกรองผ่านตัวกรองละเอียด สาร GA ทำให้ปล้องของพืชยืดยาว ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเจริญ ทำลายการพักตัวของเมล็ดพืช อีกทั้งส่งเสริมการเกิดยอด และยับยั้งการเกิดราก

3.4 กรดแอบไซซิค (Abscisic acid) ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อน้อยมาก ในพืชบางชนิดใช้ในการเพิ่มปริมาณยอด ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และส่งเสริมการพัฒนาของเอ็มบริโอ

4. สารกลุ่มกรดอะมิโน (Amino acidds) ใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจนให้กับพืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้พืชนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน (Protein) และกรดนิวคลิอิก (Nucleic acid) ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และกระตุ้นการเกิดยอด สารในกลุ่มนี้ได้แก่ ไกลซีน กลูตามีน แอสพาราจีน อาร์จีนีน ซีสเทอีน ไธโรซีน อะดีนีน และเคซีนไฮโดรไลเสท ซึ่งเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด

5. สารประกอบอินทรีย์อื่นๆ จากธรรมชาติบางชนิด ได้แก่ น้ำมะพร้าว กล้วยหอมบด น้ำสกัดจากหัวมันฝรั่ง น้ำสกัดจากยีสต์ น้ำมะเขือเทศ น้ำสกัดจากมอลท์ เป็นต้น ซึ่งไม่สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบที่แน่นอนได้ แต่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และพัฒนาการของเซลล์พืชในการเพาะเลี้ยงได้ดี

6 วุ้น (Agar) เป็นผงวุ้นที่ได้จากการสกัดสาหร่ายสีแดง ใส่เพื่อให้อาหารแข็งตัวเป็นที่ยึดของเนื้อเยื่อ อาหารสังเคราะห์ที่มีวุ้นละลายอยู่เรียกว่า อาหารวุ้น หรืออาหารแข็ง ความเข้มข้นของวุ้นประมาณ 0.6 –1 % ถ้าละลายวุ้นใส่ในอาหารให้มีความเข้มข้นมาก จะทำให้อาหารที่ได้ค่อนข้างแข็ง เป็นผลให้สารละลายที่ปะปนอยู่ในวุ้นไม่สามารถเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชได้ วุ้นละลายได้ที่อุณหภูมิ 60-100 °C และจะแข็งตัวที่อุณหภูมิประมาณ 45 °C

7. ผงถ่าน ใช้เติมลงในอาหารปริมาณ 0.5-30 % เพื่อดูดซับสารพิษที่พืชปลดปล่อยออกสู่อาหาร หรือสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญ

การเตรียมอาหาร มักเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้นสูงกว่าความเป็นจริง 10-200 เท่า เพื่อความสะดวกและป้องกันการผิดพลาดในการชั่งสารเคมี ซึ่งบางชนิดใช้ปริมาณน้อยมากเวลาใช้จริง จึงนำมาเจือจางลง จนมีความเข้มข้นเท่าความเข้มข้นจริง แต่มักเกิดปัญหา คือ สารเคมีบางชนิดตกตะกอน หรือ บางชนิดอาจทำปฏิกิริยากันเอง ดังนั้น ในการเตรียมสารละลายเข้มข้นจึงนิยมจัดกลุ่มของสารเคมีที่มีความสามารถละลายรวมกันได้ที่ความเข้มข้นสูง โดยไม่ตกตะกอนหรือเกิดปฏิกิริยาเคมีที่ก่อให้เกิดอันตราย นำมาละลายรวมกัน เรียกว่าStock solution จัดกลุ่มสารละลาย โดยแยก กลุ่มวิตามินมา ละลายรวมกันเป็น Stock ต่างหาก ส่วนน้ำตาล จะนำมาละลายในอาหารที่เจือจางแล้ว โดย Stock ที่เตรียมแล้ว ต้องแช่ไว้ในตู้เย็น เพื่อเก็บไว้ใช้ได้นาน

สูตรอาหารวิทยาศาสตร์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารวิทยาศาสตร์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีอยู่หลายสูตร (ตารางที่ 1) ชื่ออาหารแต่ละสูตรมักตั้งตามชื่อของนักวิทยาศาสตร์ผู้คิดค้นสูตรอาหารนั้นขึ้นมา ในแต่ละสูตรจะมีส่วนประกอบและปริมารของธาตุอาหารที่แตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและจุดประสงค์ที่ใช้ ดังนี้ (อรดี สหวัชรินทร์ 2539 : 23)

ตารางที่ 1 แสดงชื่อสูตรอาหาร ผู้คิด และปีที่คิด

สูตรอาหาร / ผู้คิด (ปีคิด)		สูตรอาหาร / ผู้คิด (ปีคิด)	
MS	= Murashige และ Skoog (1962)	NN	= Nitsch และ Nitsch (1967)
W	= White (1963)	KC	= Knudson C (1964)
B_5	= Gamborg (1963)	RM	= Reinert และ Mohr (1967)
VW	= Vacin และ Went (1949)	GD	= Greshff และ Doy (1972)
KN	= Kano (1963)	WP	= McCown Lloyd (1981)

อาหารแต่ละสูตรประกอบด้วยสารอนินทรีย์ และสารอินทรีย์ในปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งจะแสดงไว้ในตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2 สารอินทรีย์ที่ใช้ในสูตรอาหารสูตรต่างๆ ในปริมาณมิลลิกรัมต่อลิตร

สารเคมี	ชื่อสูตรอาหารวิทยาศาสตร์และปริมาณ									
	MS	**W**	**B_5**	**VW**	**KN**	**NN**	**KC**	**RM**	**GD**	**WP**
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	134	500	-	-	500	400	200	-
$MgSO_4.7H_2O$	370	720	250	250	-	125	250	400	250	370
Na_2SO_4	-	200	-	-	-	-	-	-	-	-
KCI	-	65	-	-	-	-	-	500	300	-
$CaCl_2.2H_2O$	440	-	150	-	-	-	-	-	150	96
KNO_3	1900	80	2500	525	-	125	-	-	1000	-
K_2SO_4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	990
$Ca_3(PO_4)_2$	-	-	-	200	-	-	-	-	-	-
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	-	300	-	-	-	500	1000	100	-	556
NH_4NO_3	1650	-	-	-	-	-	-	-	-	400
$NaH_2PO_4.H_2O$	-	16.5	150	-	-	-	-	-	-	-
Na_2HPO_4	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-
KH_2PO_4	170	-	-	250	-	125	250	250	90	172
$FeSO_4.4H_2O$	27.8	-	-	-	-	27.85	25	-	27.8	27.8
Na_2-EDTA	37.3	-	-	-	-	37.25	-	22.4	37.3	37.3
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	7	-	7.5	-	25	7.5	.5	10	22.3
$MnSO_4.H_2O$	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	3	2	-	-	10	-	0.03	3	8.6
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	-	0.025	-	-	0.025	-	0.001	0.25	0.25
$Fe_2(SO_4)_3$	-	2.5	-	-	-	-	-	10.67	-	-
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	-	0.025	-	-	0.025	-	-	0.25	-
Kl	0.83	0.75	0.75	-	-	-	-	-	0.75	-
H_3BO_3	6.2	1.5	3	-	-	10	-	0.03	3	6.2
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.025	-	0.025	-	-	0.025	-	-	0.25	-
Fe.EDTA	-	-	40	-	-	-	-	-	-	-
Ferric tartrate	-	-	-	28	-	-	-	-	-	-
Hyponex	-	-	-	-	3000	-	-	-	-	-

ที่มา : อรดี สหวัชรินทร์ **หลักการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช** กรุงเทพมหานคร ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2539 หน้า 25.

ตารางที่ 3 สารอินทรีย์ที่ใช้ในสูตรอาหารสูตรต่างๆ ในปริมาณมิลลิกรัมต่อลิตร ยกเว้นน้ำตาลและวุ้นเป็นปริมาณกรัมต่อลิตร

สารเคมี	ชื่อสูตรอาหารวิทยาศาสตร์และปริมาณ									
	MS	**W**	**B_5**	**VW**	**KN**	**NN**	**KC**	**RM**	**GD**	**WP**
Myo-inositol	100	-	100	-	-	100	-	-	100	100
Nicotinic acid	0.5	0.5	1	-	-	5	-	0.5	0.1	0.5
Pyridoxine	0.5	0.1	1	-	-	0.5	-	0.5	0.1	0.5
Thiamine	0.1-1	0.1	10	-	-	0.5	-	0.1	1	1
Pantothenic	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Biotin	-	-	-	-	-	0.05	-	-	-	-
Glycine	2	3	-	-	-	2	-	2	2	2
Cysteine	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Vitamin C	-	-	-	-	-	-	-	150.1	-	-
Sucrose	30g	20g	20g	20g	30g	20-30g	20g	-	20g	20g
Agar	10g	5g	9-10g	16g	8-10g	20g	17.5g	-	6g	6g
PH	5.8	5.5	5.5	4.8	5.0	5.4	5.2	-	-	-

ที่มา : อรดี สหวัชรินทร์ **หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช** กรุงเทพมหานคร ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2539 หน้า 26.

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละสูตรประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด จึงจำเป็นต้องจัดแบ่งสารเคมีออกเป็นกลุ่มๆ เพราะ

1. สารเคมีบางตัวใช้ในปริมาณน้อยมาก เช่น $CoCl_2$, $CuSO_4$ ซึ่งจะมีโอกาสที่เกิดความคลาดเคลื่อนในการเตรียมสูงและยากในการชั่ง ต้องใช้เครื่องชั่งที่มีความละเอียดมาก ๆ ฉะนั้น การเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงหลาย ๆ เท่า (50 ถึง 100 เท่า) จะทำได้ง่ายกว่า

2. สารเคมีบางตัว ถ้าทำละลายรวมกันกับสารตัวอื่น อาจทำปฏิกิริยากันได้ ทำให้เกิดสารประกอบที่ไม่พึงประสงค์ ฉะนั้น ในแต่ละกลุ่มของสารละลายเข้มข้น (Stock) จึงต้องเป็นสารที่อยู่ร่วมกันได้

3. สารเคมีบางตัวหากอยู่ร่วมกันกับสารอื่นจะไม่ละลาย หรือละลายได้ไม่หมด จึงต้องแยกกลุ่มออกต่างหาก

ตารางที่ 4 แสดงการเตรียมสารละลายเข้มข้นของอาหารสูตร MS ต่อปริมาตร 1 ลิตร (1 ลิตร = 1,000 cc)

Stock	สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (mg)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาณที่ใช้ cc/ลิตร
1	NH_4NO_3	82,500	50	20
2	KNO_3	95,000	50	20
3	H_3BO_3	1,240	200	
	KM_2PO_4	34,000	200	
	KI	166	200	5
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	50	200	
	$Co\ Cl_2.6H_2O$	5	200	
4	$CaCl_2.2H_2O$	88,000	200	5
5	$MgSO_4.7H_2O$	74,000	200	
	$MnSO_4.4H_2O$	4,460	200	
	$ZnSO_4.7H_2O$	1,720	200	
	$CuSO_4.5H_2O$	5	200	
6	Na_2EDTA	7,450	200	5
	$FeSO_4.7H_2O$	5,570	200	
7	Glycine	400	200	
	Nicotinic acid	100	200	
	Pyridoxine-HCl	100	200	5
	Thiamine-HCl	20	200	
8	Myo-inositol	100	1	

ที่มา : ประศาสตร์ เกื้อมณี. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. กรุงเทพมหานคร : โอเดียนสโตร์, 2536. หน้า 31.

ขั้นตอนการเตรียมอาหาร

1. ดูดเอาสารละลายจาก Stock ต่างๆ มารวมกัน โดยใช้ปริมาตรในแต่ละ Stock ตามที่คำนวณไว้ ยกตัวอย่างการเตรียมอาหารสูตร MS จากตารางที่ 1 จะเห็นว่า ต้องใช้สารละลายจาก Stock ที่ 1 และ 2 Stock ละ 20 cc, Stock ที่ 3 ถึง 7 Stock ละ 5 cc ส่วน Stockที่ 8 ให้ชั่งสารละลายลงไปทีหลัง

2. เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (Carbon source) ซึ่งก็คือน้ำตาลนั่นเอง อาจจะเป็น Sucrose, Glucrose หรือ Fructose แล้วแต่สูตร

3. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือสารเคมีอื่นๆ ตามความต้องการ

4. ปรับปริมาตรให้ครบตามปริมาณที่ต้องการเตรียม

5. ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) โดยใช้กรดเกลือ (HCl) และโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เป็นบัฟเฟอร์ pH ที่ใช้ปกติอยู่ในช่วง 5.5-5.8 ยกเว้นการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ ใช้ pH 4.8-5.0

6. เติมวุ้น (ในกรณีที่เตรียมอาหารแข็ง)

7. เคี่ยวอาหารเพื่อหลอมวุ้น โดยใช้เตาลวดความร้อน เตาไมโครเวฟ หรือเตาแก๊สก็ได้

8. หยอดอาหารลงในภาชนะที่ใช้เลี้ยง เช่น ขวด หลอดทดสอบ หรือขวดรูปชมพู่

9. นำอาหารที่หยอดลงขวดเรียบร้อยแล้วไปเข้าหม้อนึ่งความดัน โดยปรับใช้ความดันที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ใช้เวลาประมาณ 15 นาที อาหารที่นึ่งแล้วเมื่อทิ้งไว้ให้เย็นก็จะสามารถนำไปใช้เพาะเลี้ยงแนื้อเยื่อพืชได้

สูตรอาหารดัดแปลง

สูตรอาหารวิทยาศาสตร์ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีหลายสูตร ซึ่งแต่ละสูตรประกอบด้วยสารอนินทรีย์และอินทรีย์ในปริมาณแตกต่างกัน สูตรอาหารที่นิยมใช้กันมาก คือ

1. สูตรอาหารดัดแปลง Vacin และ Went : VW (1949)

เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ แบ่งเป็นชนิดที่ไม่ละลายน้ำและละลายน้ำ เพื่อเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น และแบ่งใช้โดยการตวงปริมาตรแทนการชั่งน้ำหนัก

ตารางที่ 5 : แสดงสูตรอาหารดัดแปลง Vacin และ Went : VW (1949)

สารเคมี	ปริมาณ
สารไม่ละลายน้ำ	กรัม
Tricalcium phosphate	0.20
สารละลายน้ำ กลุ่ม A	กรัม
Potassium nitrate	0.525
Ammonium sulphate	0.50
Monopotassium acid phosphate	0.25
สารละลายน้ำ กลุ่ม B	กรัม
Magnesium sulphate	0.25
Manganese sulphate	0.0075

ตารางที่ 5 : แสดงสูตรอาหารดัดแปลง Vacin และ Went : VW (1949) (ต่อ)

สารเคมี	ปริมาณ
สารละลายน้ำ กลุ่ม C	กรัม
Ferric tartrate หรือ แทนด้วย Ferrous ulphate ได้	0.028
น้ำตาลซูโครส	20.00
วุ้นใช้ในปริมาณที่อาหารแข็งพอดี (ขวดเล็กใช้)	5-6
อื่นๆ	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000
น้ำมะพร้าว	850

pH ปรับให้ได้ 4.8-5.2

อาหารสูตรดัดแปลง Vacin และ Went : VW (1949) มีวิธีการเตรียมเป็นขั้นตอน ดังนี้

1. ใช้ Stock VW 1 10 มิลลิลิตร
   Stock VW 2 10 มิลลิลิตร
   Stock VW 3 10 มิลลิลิตร

2. ใส่ Tricalcium phosphate 0.20 กรัม ละลายด้วยกรดเกลือความเข้มข้น 1 nomal จากเริ่มต้นสีขาวขุ่นจนได้ solution ใส

3. เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร

4. เติมน้ำตาล 20 กรัม

5. เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร

6. เติมวุ้น 6.2 กรัม (ถ้าต้องการอาหารเหลว ไม่ต้องใส่วุ้น)

7. ต้มจนวุ้นละลาย

8. ปรับ pH ให้ได้ 4.8-5.2 ด้วยกรดไนตริก 10%

9. กล้วยหอม 50 กรัม บดในน้ำ 100 มิลลิลิตร

10. ถ่านผงละเอียด 2 กรัม คนให้เข้ากัน

11. เทลงในขวดแก้ว ปิดฝาการเท

12. นำไปนึ่ง ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15-30 นาที

13. ปล่อยไว้ให้เย็น จนวุ้นแข็งจึงนำไปใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อได้

การปรับค่า pH สูงกว่า 6 จะทำให้อาหารค่อนข้างแข็ง ถ้าต่ำกว่า 5 จะทำให้อาหารวุ้นไม่แข็งตัว การเจริญของแคลลัสจะเจริญได้ดีที่ pH 7 ดังนั้น จึงใช้ประมาณ 5-6 และการใส่ผงถ่านลงในอาหารปริมาณ 0.5-30% จะเติมเพื่อดูดซับสารพิษบางชนิดที่พืชปลดปล่อยออกมาสู่อาหาร

สำหรับการเตรียมอาหารถ่ายขวด ปรับปรุงจาก สูตร VW เพิ่มกล้วยหอมเป็น 100 กรัม เพิ่มเนื้อมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้ว 50 กรัม บดละเอียดใส่แล้วคนละลาย

2. สูตรอาหาร Murashige และ Skoog : MS (1962)

อาหารสูตรนี้ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแทบทุกชนิด ทั้งพืชสวน พืชไร่ เฟิร์น หรือสาหร่าย ก็ได้ มีองค์ประกอบต่อลิตร ดังนี้ (สูตรอาหาร MS อาจดัดแปลงโดยการเติมออกซินและไซโตไคนิน ในปริมาณต่างๆ กัน) สูตรอาหารนี้ใช้ค่า pH 5.6

ตารางที่ 6 : แสดงสูตรอาหาร Murashige และ Skoog : MS (1962)

ชื่อสารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (ต่อลิตร)
Ammonium nitrate	1,650 มิลลิกรัม
Calcium chloride	440 มิลลิกรัม
Magnesium sulphate	370 มิลลิกรัม
Potassium dihydrogen phosphate	170 มิลลิกรัม
Potassium nitrate	1,900 มิลลิกรัม
Boric acid	6.20 มิลลิกรัม
Cobalt chloride	0.025 มิลลิกรัม
Copper sulphate	0.025 มิลลิกรัม
Manganese sulphate	22.30 มิลลิกรัม
Potassium iodide	0.83 มิลลิกรัม
Sodium molypdate	0.25 มิลลิกรัม
Zinc sulphate	8.60 มิลลิกรัม
Sodium EDTA	37.30 มิลลิกรัม
Ferrous sulphate	27.80 มิลลิกรัม
Glycine	2 มิลลิกรัม
Myo-inositol	100 มิลลิกรัม
Nicotinic acid	0.50 มิลลิกรัม
Pyridoxine hydrochloride	0.50 มิลลิกรัม
Thiamine hydrochloride	0.10 มิลลิกรัม
น้ำตาลซูโครส	30 กรัม
วุ้น	6.2 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ตารางที่ 7 : แสดงวิธีเตรียม Stock solution ของสูตรอาหาร MS (1962)

ชื่อสารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (ต่อลิตร)
Stock MS 1 (100 x)	ปริมาตรต่อลิตร
Ammonium nitrate	165 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	17 กรัม
Boric acid	620 มิลลิกรัม
Manganese sulphate	2,230 มิลลิกรัม
Zinc sulphate	860 มิลลิกรัม
Potassium iodide	83 มิลลิกรัม
Copper sulphate	2.5 มิลลิกรัม
Sodium molypdate	25 มิลลิกรัม
Cobalt chloride	2.5 มิลลิกรัม
Stock MS 2 (100 x)	ปริมาตรต่อลิตร
Potassium nitrate	190 มิลลิกรัม
Stock MS 3 (100 x)	ปริมาตรต่อลิตร
Calcium chloride	44 กรัม
Stock MS 4 (100 x)	ปริมาตรต่อลิตร
Magnesium sulphate	37 กรัม
Stock MS 5 (100 x)	ปริมาตรต่อลิตร
Sodium EDTA	3.73 กรัม
Ferrous sulphate	2.78 กรัม
Stock MS 6 (100 x)	ปริมาตรต่อลิตร
Myo-inositol	100 กรัม
Nicotinic acid	100 มิลลิกรัม
Pyridoxine hydrochloride	100 มิลลิกรัม
Thiamine hydrochloride	20 มิลลิกรัม
Glycine	400 มิลลิกรัม

อาหารสูตร Murashige และ Skoog : MS 1 ลิตร มีวิธีการเตรียมดังนี้

1. ใช้ Stock MS 1 10 มิลลิลิตร
   Stock MS 2 10 มิลลิลิตร
   Stock MS 3 10 มิลลิลิตร
   Stock MS 4 10 มิลลิลิตร
   Stock MS 5 10 มิลลิลิตร
   Stock MS 6 5 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำตาล 30 กรัม
3. เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร
4. ปรับ pH ให้ได้ 5.6
5. ใส่วุ้น 6.2 กรัม ต้มจนวุ้นละลาย
6. เทใส่ขวดแก้ว ปิดฝา
7. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15-20 นาที

3. สูตรอาหารอรดี (2530)

เป็นสูตรอาหารที่ ดร.อรดี สหวัชรินทร์ ได้ดัดแปลงให้ง่ายขึ้น โดยมีองค์ประกอบต่อ 1 ลิตร ดังนี้

3.1 ปุ๋ยทวินเฟอร์ตี้ สูตร 13 : 27 : 27 2 กรัม
3.2 น้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร
3.3 น้ำตาล 30 กรัม
3.4 วุ้น 6.2 กรัม

ซึ่งปุ๋ยทวินเฟอร์ตี้ มีองค์ประกอบของธาตุอาหารต่างๆ ดังนี้

ปริมาณธาตุอาหารรับรอง

ไนโตรเจนทั้งหมด (N)	13%
ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์(P_2O_5)	27%
โปแตสที่ละลายน้ำ (K_2O)	27%

ปริมาณธาตุอาหารรอง

แมกนีเซียม (MgO)	0.02%

ปริมาณธาตุอาหารเสริม

เหล็ก (Fe)	0.02%

แมงกานีส (Mn)	0.01%
ทองแดง (Cu)	0.01%
สังกะสี (Zn)	0.01%
โบรอน (B)	0.01%
โมลิบดินัม (Mo)	0.009%

อาหารสูตรอรดี (2530) 1 ลิตร มีวิธีการเตรียมดังนี้

1. ละลายธาตุอาหาร 2 กรัม ในน้ำ 500 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำตาล 30 กรัม คนให้ละลาย
3. เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร
4. เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร
5. ปรับ pH 5.6
6. ใส่วุ้น 6.2 กรัม ต้มจนวุ้นละลาย
7. เทใส่ขวดแก้ว ปิดฝา
8. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15-นาที

ปริมาณ Stock solution ที่จะใช้ จากวิธีการเตรียมอาหารวิทยาศาสตร์ ข้างต้น เช่น สูตรอาหาร MS และ VW จะต้องเตรียม Stock solution ให้มีปริมาณมากๆ และเมื่อจะนำมาใช้งานต้องทำให้เจือจางด้วยน้ำ ความสำคัญอยู่ขั้นตอนที่ การคำนวณปริมาณ Stock solution ที่จะใช้ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ มีความละเอียดรอบคอบของผู้ตวงสารละลาย ตารางต่อไปนี้จะช่วยให้เกิดความสะดวกในการเตรียมอาหารมากขึ้น โดยช่วยในด้านความถูกต้องของการคำนวณ

ตารางที่ 8 : แสดงปริมาณของ Stock solution ที่จะนำมาเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายสุดท้ายที่ต้องการ

ความเข้มข้นของ Stock solution	**ปริมาณที่ใช้ (ml)**	**ความเข้มข้นของสารละลายสุดท้าย (mg/l) ที่ต้องการ**				
		250 ml	**500 ml**	**1 liter**	**2 liters**	**10 liters**
0.01 mg/ml	0.1	0.004	0.002	0.001	0.0005	0.0001
	0.5	0.02	0.01	0.005	0.0025	0.0005
	1.0	0.04	0.02	0.01	0.005	0.001
	10.0	0.4	0.2	0.1	0.05	0.01
0.01 mg/ml	0.1	0.04	0.02	0.01	0.005	0.001
	0.5	0.2	0.1	0.05	0.025	0.005
	1.0	0.4	0.2	0.1	0.05	0.01
	10.0	4.0	2.0	1.0	0.5	0.1
0.01 mg/ml	0.1	0.4	0.2	0.1	0.05	0.01
	0.5	2.0	1.0	0.5	0.25	0.05
	1.0	4.0	2.0	1.0	0.25	0.05
10.0 mg/ml	0.1	4.0	2.0	1.0	0.5	0.1
	0.5	20.0	10.0	5.0	2.5	0.5
	1.0	40.0	20.0	10.0	5.0	1.0
	10.0	400.0	200.0	100.0	50.0	10.0

บทปฏิบัติการที่ 3
การเตรียมอาหารเข้มข้น

จุดประสงค์

1. ให้ผู้เรียนมีความรู้ความเข้าใจ สามารถเตรียมอาหารเข้มข้นสูตร VW และสูตรอรดี (2530) ได้
2. ให้ผู้เรียนมีทักษะการใช้เครื่องมือเตรียมสารเคมีตามสูตรอาหารเข้มข้นได้

งานที่ปฏิบัติ

1. ปฏิบัติการเตรียมอาหารเข้มข้นสูตร VW ปริมาตร 1 ลิตร และสูตรอรดี (2530) ปริมาตร 1 ลิตร

การเตรียมสารละลายเข้มข้น วิธีการคำนวณ

ตัวอย่างโจทย์ ต้องการเตรียมสารละลายเข้มข้น โปแตสเซียมไนเตรท จำนวน 500 มิลลิลิตร ต่อการเตรียมอาหาร 1 ลิตร ในสูตร VW

วิธีทำ ในสูตรอาหาร 1 ลิตร ใช้โปแตสเซียมไนเตรท 0.525 กรัม ต้องการสารละลายเข้มข้น 500 มิลลิลิตร เพื่อใช้ ครั้งละ 10 มิลลิลิตร

ดังนั้น ในสารละลายเข้มข้น 500 มิลลิลิตร ต้องมีเนื้อสาร $\frac{0.525 \times 500}{10} = 26.25$ กรัม

2. ฝึกทักษะการใช้เครื่องมือเตรียมสารเคมีตามสูตรอาหารเข้มข้น

วิธีการ

ตอนที่ 1 สูตรอาหาร VW

1. จัดเตรียมสารเคมีให้ครบสูตรอาหาร (ใช้ข้อมูลจากตารางที่ 5)
2. แบ่งกลุ่มสารเคมีตาม Stock ของสูตรอาหาร VW ได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม
3. ชั่งสารเคมีแต่ละกลุ่มให้ครบตามสูตร ละลายสารเคมีในกลุ่มเดียวกันในภาชนะที่มีน้ำอยู่ 500 มิลลิลิตร และปรับน้ำจนถึง 1000 มิลลิลิตร เมื่อใส่สารเคมีจนครบ กวนสารให้ละลายเข้ากันจะได้สารละลายเข้มข้น 1 Stock (ใช้ข้อมูลจากตารางที่ 5)

4. ติดฉลากกับขวดที่ใส่ Stock เพื่อบอกว่าในขวดเป็นธาตุอาหาร Stock ใด

5. ปฏิบัติการเช่นเดียวกับข้อ 3-4 จนได้ Stock ครบ 3 Stock

6. จัดเก็บ Stock ทั้ง 3 ในตู้เย็น อุณหภูมิปกติ เพื่อป้องกันการเสื่อม และสามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน

ตอนที่ 2 สูตรอาหาร อรดี (2530)

1. ปุ๋ย NPK = 13:27:27 กรัมต่อลิตร ละลายธาตุอาหาร 2 กรัม ในน้ำจำนวน 500 มิลลิลิตร

2. เติมน้ำตาล 30 กรัม คนให้ละลาย

3. เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร

4. เติมน้ำจนครบ 1000 มิลลิลิตร

5. ปรับค่า pH ของอาหาร ปรับให้ได้ pH 5.6

6. ใส่วุ้น 6 กรัม ต้มจนวุ้นละลาย และกรอกใส่ขวดที่เตรียมไว้ ปิดฝา

7. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

ภาระงาน

1. จงอธิบายวิธีการเตรียมอาหารเข้มข้นสูตร VW ในปริมาตร Stock 500 มิลลิลิตร โดยบอกชื่อสารเคมีและปริมาณที่ใช้อย่างละเอียด

2. จงอธิบายวิธีการเตรียมอาหารเข้มข้นสูตร อรดี (2530) ในปริมาตร Stock 500 มิลลิลิตร โดยบอกชื่อสารเคมีและปริมาณที่ใช้อย่างละเอียด

3. เพราะเหตุใดจึงต้องใส่สารทีละชนิดและคนให้ละลายก่อนใส่สารชนิดต่อไป

บทปฏิบัติการที่ 4
การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

จุดประสงค์

1. ให้ผู้เรียนสามารถเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโตได้
2. ให้ผู้เรียนมีทักษะในการใช้เครื่องมือเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

งานที่ปฏิบัติ

1. ปฏิบัติการเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต
2. ฝึกทักษะการใช้เครื่องมือเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

วิธีการ

1. ฝึกเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 N โดยปฏิบัติตามขั้นตอนดังนี้
   1.1 ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำ 1 ลิตร
   1.2 ได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N ปริมาตร 1 ลิตร
2. ฝึกเตรียมแอลกอฮอล์ 70% จากแอลกอฮอล์ 95% โดยปฏิบัติตามขั้นตอนดังนี้

จากแอลกอฮอล์ 95% ลดความเข้มข้นลงเหลือแอลกอฮอล์ 70% จำนวน 100 มิลลิลิตร (EtOH = เอธิลแอลกอฮอล์)

สูตร $N_1 V_1 = N_2 V_2$

แทนค่า $95 \times V_1 = 70 \times 1000$

$V_1 = 665$ มิลลิลิตร

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายตั้งต้น

V_1 = ปริมาตรของสารละลายตั้งต้น

N_2 = ความเข้มข้นของของสารละลายสุดท้าย

V_2 = ปริมาตรของของสารละลายสุดท้าย

2.1 ตวงแอลกอฮอล์ (EtOH) 95% ปริมาตร 66.5 มิลลิลิตร

2.2 เติมน้ำ 33.5 มิลลิลิตร ได้สารละลายแอลกอฮอล์ 70% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. ฝึกเตรียมกรดเกลือ (HCl) 1 N โดยปฏิบัติตามขั้นตอนดังนี้

3.1 ตวงกรดเกลือเข้มข้น มิลลิลิตร ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร

3.2 ได้สารละลายกรดเกลือ 1 N ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4. ฝึกเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้น 1000 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

4.1 กลุ่มออกซิน หรือ 2,4-D หรือ IBA หรือ NA เลือกปฏิบัติเพียงสารเดียว

4.1.1 ชั่งสารหนัก 0.2 กรัม

4.1.2 ละลายในแอลกอฮอล์ (EtOH) 50% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4.1.3 หลังจากสารละลายหมดแล้ว ให้เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

4.1.4 ได้สารละลายความเข้มข้นสูง 200 มิลลิกรัม/ลิตร

4.2 กลุ่มไซโตไคนิน หรือไคนิติน หรือ BA เลือกปฏิบัติเพียงสารเดียว

4.2.1 ชั่งสารหนัก 0.2 กรัม

4.2.2 ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 N ปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร

4.2.3 หลังจากสารละลายหมดแล้ว ให้เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

4.2.4 ได้สารละลายความเข้มข้นสูง 200 มิลลิกรัม/ลิตร

ภาระงาน

1. จงอธิบาย และแสดงการคำนวณ การดูดใช้สารควบคุมการเจริญเท่าไร จากสารความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร ที่ต้องการให้มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อเตรียมสารควบคุมการเจริญ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน 500 มิลลิลิตร โดยใช้สูตร $N_1 V_1 = N_2 V_2$

บทปฏิบัติการที่ 5
การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จุดประสงค์

1. ให้ผู้เรียนสามารถเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สูตร VW ได้
2. ให้ผู้เรียนได้ฝึกทักษะการเตรียมสารเคมีตามสูตรอาหาร

งานที่ปฏิบัติ

1. เตรียมอาหารสูตรเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สูตร VW
2. ฝึกทักษะการเตรียมสารเคมีตามสูตร

วิธีการ

1. จัดเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สูตร VW จำนวน 1 ลิตร โดยตวงสารละลายเข้มข้นที่ได้เตรียมไว้ ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ใส่น้ำตาล 30 กรัม และวุ้น 6 กรัม ปรับค่า pH ให้เป็น 4.8-5.2

2. เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สูตร VW ปริมาณที่เตรียม 1 ลิตร จาก Stock 1-3 ชนิดละ 10 มิลลิลิตร ใส่น้ำมะพร้าว 150 มิลลิกรัม ใส่น้ำตาล 20 กรัม และวุ้น 6 กรัม ปรับค่า pH ให้เป็น 4.8-5.2

3. เตรียมน้ำสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อ โดยตวงน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร/ขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ เป็นเวลา 15 นาที

ภาระงาน

จงอธิบายวิธีการเมื่อเตรียมอาหารสูตร VW จำนวน 500 มิลลิลิตร (1/2 ลิตร) จาก Stock 1-3 มาพอเข้าใจ

บทที่ 4
วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เนื่องจากหลักการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจำเป็นต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ และตัดเอาชิ้นส่วนของพืชที่สะอาดมาดำเนินการตามขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งจะได้กล่าวถึงดังนี้

เทคนิคปลอดเชื้อ

เนื่องจากการรักษาสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์เป็นสิ่งสำคัญยิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การเลือกบริเวณทำงานจึงควรหลีกเลี่ยงสถานที่ที่มีกระแสลมพัดผ่าน เพราะกระแสลมจะเป็นพาหะพัดพาเอาสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์เข้ามาได้ โดยเฉพาะสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยเป็นเขตร้อนชื้น เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย บริเวณที่ทำงานจึงควรปรับสภาพให้เป็นบริเวณที่มีอากาศนิ่งสงบเหมือนกับห้องอัดรูป จึงควรเป็นห้องที่ติดเครื่องปรับอากาศและปรับอุณหภูมิให้อยู่ที่ 25 °C ซึ่งเป็นระดับที่ต่ำกว่าอุณหภูมิภายนอก ควรทาสีกันเชื้อราที่ผนังห้องเพื่อยับยั้งและลดปริมาณการเกิดเชื้อราด้วย

อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ เครื่องมือผ่าตัด และเครื่องแก้ว จะต้องนำไปทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งอาจอยู่ในสภาพ Vegetative cell หรือ Spore ที่สามารถทำให้เกิดการปนเปื้อน (Contamination) ได้ การฆ่าเชื้อทำได้โดยการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย หม้อนึ่งความดัน (Steam pressure) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที หม้อนึ่งความดันอาจเป็นแบบปิดเองอัตโนมัติ (Automatic) แบบไฟฟ้า แบบแก๊ส แต่หากทำน้อยๆ อาจใช้หม้อนึ่งอาหาร ก็ได้

อาหารที่นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ถ้านึ่งนานเกินไปอาจทำให้สารบางชนิดสูญเสียคุณสมบัติ สารบางชนิดถูกความร้อนไม่ได้ เช่น วิตามินต่างๆ GA และยูเรีย ต้องกรองด้วยกระดาษกรองชนิดเยื่อกรอง แบคทีเรียจะติดอยู่ข้างบน น้ำที่ไหลผ่านลงมาจะปราศจากเชื้อ

เครื่องแก้ว และเครื่องมือผ่าตัด อาจนึ่งพร้อมกับอาหาร ให้ห่อด้วย แผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum foil) แผ่นเซลโลเฟน (Cellophane) กระดาษสีน้ำตาล หรือ กล่องโลหะก็ได้

เพื่อป้องกันไม่ให้เปียกน้ำขณะทำการนึ่งฆ่าเชื้อ ถ้าไม่นึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันอาจใช้วิธีอบแห้งใน ตู้อบแห้ง ที่อุณหภูมิ 180 °C เป็นเวลา 2–3 ชั่วโมง

มีดผ่าตัด ปากคีบ เข็ม และช้อน วิธีฆ่าเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์ 95% แล้วลนไฟ ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงย่อมมีเชื้อติดมาด้วย จึงต้องทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ติดอยู่ที่ผิวพืช

(Surface sterilization) ซึ่งมีสารฆ่าเชื้อ (Sterilant) หลายชนิด และเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ จะแตกต่างกันออกไป สารฆ่าเชื้อที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (Sodium hypochlorite) และแคลเซียมไฮโปคลอไรด์ Calcium hypochlorite) ซึ่งจะปล่อย Cl_2 ออกมา ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide), ซิลเวอร์ไนเตรท (Silver nitrate) และเมอร์คิวริกคลอไรด์ (Mercuric chloride)

ในทางการค้า สารฆ่าเชื้อที่นิยมใช้กันมาก คือ คลอร็อกซ์ (Clorox) หรือ ไฮเตอร์ (Haiter) มีสารโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (Sodium hypochlorite) ในปริมาณที่บอกไว้ข้างขวด ใช้สารฆ่าเชื้อในปริมาณ 5-10% โดยปริมาตร ฟอกฆ่าเชื้อเป็นเวลา 15-30 นาที ใช้ฆ่าเชื้อได้ดี

ก่อนที่จะใช้คลอร็อกซ์ อาจจะนำชิ้นส่วนของพืชไปชุบในเอธิลแอลกอฮอล์ (70% ethanol) เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเอาไข (Wax) ที่ติดอยู่ตามผิวใบหรืออวัยวะขอองพืชออก เพื่อให้ได้สารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นควรเติมสารเปียกใบ (Wetting agent) ลงไปในน้ำยาคลอร็อกซ์ 2-3 หยด สารเปียกใบที่ใช้ได้แก่ ทีโพล (Teepol), ทวีน-20(Tween-20), เลสซาโพล เอฟ (Lessapole F) และเมื่อฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อแล้ว จะต้องนำไปล้างนำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (Sterile water) เพื่อล้างเอาสารฆ่าเชื้อออกให้หมด

การฟอกฆ่าเชื้อนี้เป็นการฆ่าเฉพาะเชื้อที่ติดอยู่ตามผิวพืช (surface sterilization) เท่านั้น เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ข้างในชิ้นส่วนพืชในบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์จะไม่ตาย จึงจำเป็นจะต้องใช้ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) ด้วย แต่ก็ไม่ค่อยได้ผลเพราะยาปฏิชีวนะบางชนิดเลือกฆ่าเฉพาะจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้น ควรเลือกใช้ชนิดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด

คัดเลือกใบ ฟอกฆ่าเชื้อ ตัด

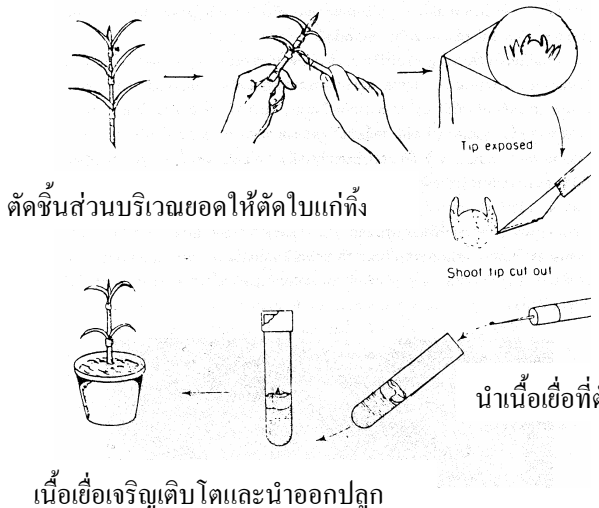
ชนิดของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึง การเพาะเลี้ยงอวัยวะ เนื้อเยื่อ เซลล์ และโปรโตพลาสต์

1. การเพาะเลี้ยงอวัยวะ (Organ culture) ได้แก่

1.1 การเพาะเลี้ยงปลายยอด (Shoot tip culture) เป็นวิธีที่ใช้เพื่อการขยายพันธุ์พืชเพียงจุดประสงค์เดียวเท่านั้น การเพาะเลี้ยงปลายยอดทำได้โดยตัดเนื้อเยื่อเจริญจากปลายยอด

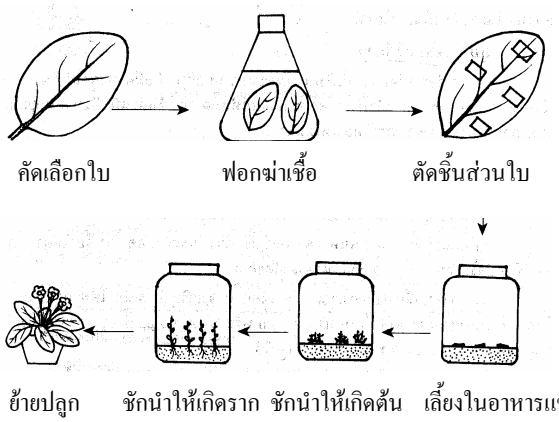
ประมาณ 0.1-0.2 มิลลิเมตร มาเลี้ยงและทำให้ออกรากก็จะได้ต้นที่ปราศจากเชื้อไวรัส แต่ถ้าตัดยอดมาประมาณ 1-10 มิลลิเมตร ก็จะมีสามารถสร้างต้นพืชได้หลายต้น แต่ควรระวังเพราะอาจมีเชื้อไวรัส ติดมาด้วยก็ได้



1.2 การเพาะเลี้ยงปลายราก (Root tip culture) โดยนำรากพืชเพียงอย่างเดียวมาทำการเพาะเลี้ยง รากก็จะเจริญเติบโตและแตกแขนงได้ด้วย สามารถตัดแบ่งรากไปเลี้ยงต่อไปได้เรื่อยๆ ไม่มีที่สิ้นสุด

1.3 การเพาะเลี้ยงตาข้าง (Axillary bud culture) เป็นกรรมวิธีเดียวกับการเพาะเลี้ยงปลายยอด ต่างกันตรงที่ใช้ตาข้างของพืชมาทำการเพาะเลี้ยง

1.4 การเพาะเลี้ยงใบ (Leaf culture)

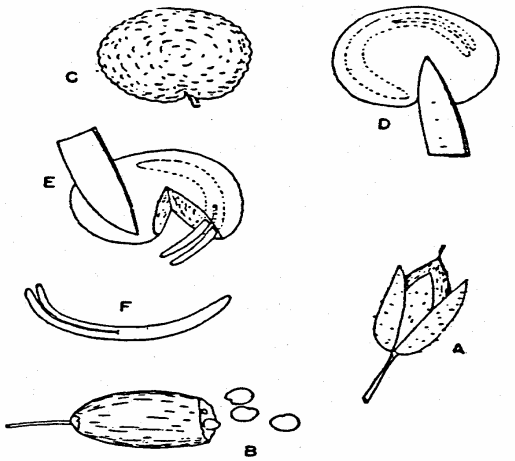


1.5 การเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ (Ovule and Ovary culture) สามารถนำไปใช้เป็นวิธีผสมพันธุ์ที่ตามปกติผสมยาก หรือผสมง่ายแต่เอ็มบริโอ อ่อนแอ อาจแท้งหรือตายไปก่อนที่เมล็ดจะแก่

1.6 การเพาะเลี้ยงดอก (Flower culture) ถ้านำดอกมาเลี้ยงก็อาจจะได้ต้นพืชที่ให้ผลที่มีหรือไม่มีเมล็ดก็ได้ ขึ้นอยู่กับว่าดอกนั้นถูกผสมเกสรมาก่อนหรือไม่ ถ้าดอกที่นำมาเลี้ยงยังไม่ถูกผสมเกสรก็ควรเลี้ยงด้วยอาหารที่มีออกซิน หรืออาจจะทำการถ่ายละอองเกสร (Test-tube pollination) และมีการปฏิสนธิ (Test-tube fertilization) เกิดขึ้นในหลอดทดลองด้วยก็ได้ ภายในผลที่เกิดขึ้นจะมีเมล็ดซึ่งสามารถนำไปปลูกต่อไปได้

1.7 การเพาะเลี้ยงผล (Fruit culture)

1.8 การเพาะเลี้ยงคัพภะหรือเอมบริโอ (Embryo culture) เป็นวิธีที่อาจช่วยชีวิตลูกผสมทำให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ขึ้นมา มักใช้กันในหมู่นักผสมพันธุ์และนักคัดเลือกพันธุ์ ซึ่งวิธีการไม่ยากนัก แต่ต้องใช้เอ็มบริโอที่มีขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วยเซลล์มากกว่า 50 เซลล์ขึ้นไป และมีขนาดโตพอที่จะผ่าตัดได้โดยไม่เละ อาหารก็สามารถใช้สูตรง่ายๆ ทั้งนี้ เพื่อให้เอ็มบริโองอกเป็นต้นพืชสำหรับนำไปปลูกในดินต่อไป



ภาพแสดงการนำเอ็มบริโอออกจากเมล็ด
A = ผล
B = ตัดผลเพื่อให้เมล็ดออกมา
C – F = ตัดเมล็ดเพื่อนำเอ็มบริโอออกมา

1.9 การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและละอองเกสร (Anther culture and Pollen culture or Microspore culture) ใช้กันมากในหมู่นักปรับปรุงพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงแบบนี้จะได้แคลลัส หรือ เอ็มบริออยด์ ซึ่งจะเจริญเป็นต้นต่อไป โดยต้นที่ได้นี้อาจจะมีโครโมโซมเพียง 1 ชุด (Haploid) 2 ชุด (Diploid) หรือ หลายชุด (Polyploid) ก็ได้ พืชที่ทำสำเร็จแล้วได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ยาสูบ แครอท ผักกาดขาว มะเขือเทศ พริก สตรอเบอรี่

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture or Callus culture) โดยนำเอาเนื้อเยื่อของพืชมาเลี้ยงด้วยอาหารวิทยาศาสตร์ก็จะได้แคลลัสซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ที่ประกอบไปด้วยเซลล์

พาเรงคิมาเป็นส่วนใหญ่ ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นยอดหรือราก การเพาะเลี้ยงแบบนี้มีประโยชน์ต่อการศึกษาเกี่ยวกับสันฐานวิทยา สรีระวิทยา และโรคพืช ปัจจุบันนำวิธีการนี้มาใช้ในการผลิตตัวยาทางเคมีของพืชสมุนไพร และนำไปใช้ในการขยายพันธุ์พืชอีกหลายชนิด พืชโดยทั่วๆ ไป ไม่ว่าจะเป็นพืชชั้นต่ำ พวกสาหร่าย มอส เฟิร์น สน และพืชชั้นสูง ทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และพืชใบเลี้ยงคู่ สามารถทำการเพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัสได้ง่าย เพียงใช้อาหารที่มีองค์ประกอบง่ายๆ เช่น เกลือแร่ธาตุ น้ำตาล ไวตามิน ฮอร์โมน และสารควบคุมการเจริญเติบโตพวกออกซิน และไซโตไคนิน ฮอร์โมนที่ได้จากพืชโดยตรง เช่น น้ำมะพร้าว น้ำสกัดจากยีสต์ จากข้างมอลท์ จากมันฝรั่ง น้ำมะเขือเทศ กล้วย และ Casein hydrolysate เมื่อได้แคลลัสแล้วก็สามารถตัดแบ่งแคลลัส

ออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปเลี้ยงในอาหารที่เตรียมใหม่ แคลลัสก็จะเจริญเติบโตได้แคลลัสต่อไปเรื่อย ๆ ไม่มีที่สิ้นสุด แต่ก็ต้องระวังเพราะการเลี้ยงแคลลัสและย้ายเปลี่ยนอาหารใหม่เป็นเวลานาน ๆ อาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์เนื่องจากการเพิ่มโครโมโซม ซึ่งพบบ่อย แคลลัสที่เกิดบนอาหารแข็งหรืออาหารวุ้นจะประกอบไปด้วยเซลล์ซึ่งอาจมีหลายสี เช่น สีขาว สีเขียว หรือสีม่วง ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับ รงควัตถุชนิดต่างๆ ภายในเซลล์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ

2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (Meristematic tissue)

2.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพาเรงคิมา (Parenchyma tissue) จากส่วนสะสมอาหาร (Storage organ) ซึ่งส่วนใหญ่จะเจริญไปเป็นแคลลัส (Callus)

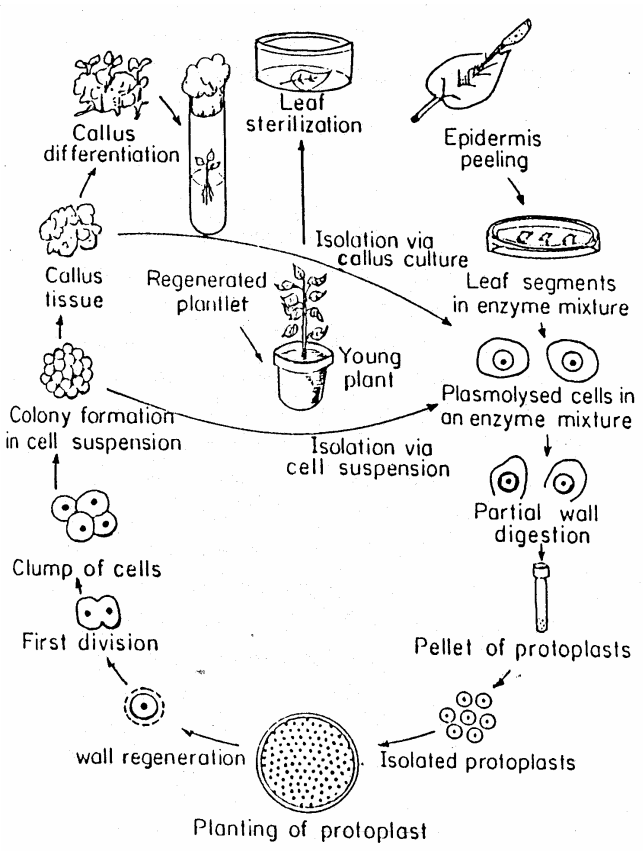
3. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture) หากนำเอาแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารเหลว วางบนเครื่องเขย่าจะได้เซลล์ที่เป็นเซลล์แขวนลอย (Cell suspension culture) ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์เดี่ยวๆ หรือกลุ่มของเซลล์ 2-3 เซลล์ แขวนลอยกระจัดกระจายอยู่ในอาหารเหลวอีกทีหนึ่ง ก่อนจะนำแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารเหลวต้องทำให้เซลล์ในแคลลัสเกาะกันอย่างหลวมๆ สามารถหลุดออกจากกันได้ง่ายเสียก่อน ซึ่งทำได้โดยการเลี้ยงในอาหารที่มีเกลือแร่ธาตุและออกซินในปริมาณสูง และต้องมี Casein hydrolysate ด้วย การเพาะเลี้ยงเซลล์มีวิธีการเลี้ยงดังนี้

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยว (Single cell culture) ทำได้โดยการกรองเซลล์แขวนลอยแล้วนำเอาอาหารที่กรองได้ซึ่งมีเซลล์เดี่ยวๆ อยู่ด้วยไปผสมกับอาหารวุ้นที่ยังร้อนและไม่แข็งตัว ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส แล้วเทอาหารลงเลี้ยงในจานมีฝาปิด เซลล์เหล่านี้ก็จะเจริญไปเป็นแคลลัสต่อไปได้ เรียกวิธีการนี้ว่า Agar plating technique

3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์บนหยดอาหาร (Micro chambers) ทำโดยนำเซลล์ไปเลี้ยงบนหยดอาหารที่ติดอยู่กับแผ่นแก้ว แล้วคว่ำลงบนสไลด์หลุม

3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษกรอง (Nurse culture) เป็นการนำเซลล์ไปเลี้ยงบนกระดาษกรองที่วางอยู่บนแคลลัสอีกทีหนึ่ง เซลล์ที่วางอยู่บนกระดาษกรองจะมีการเจริญเติบโตแบ่งเซลล์เป็นแคลลัส ซึ่งสามารถทำให้เป็นต้นและมีรากได้ในภายหลังโดยการเติมออกซินและไซโตไคนินในอัตราส่วนที่เหมาะสม หรืออาจใช้วิธีการเปลี่ยนแปลงปริมาณเกลือแร่ธาตุที่ใส่ในอาหารก็ได้

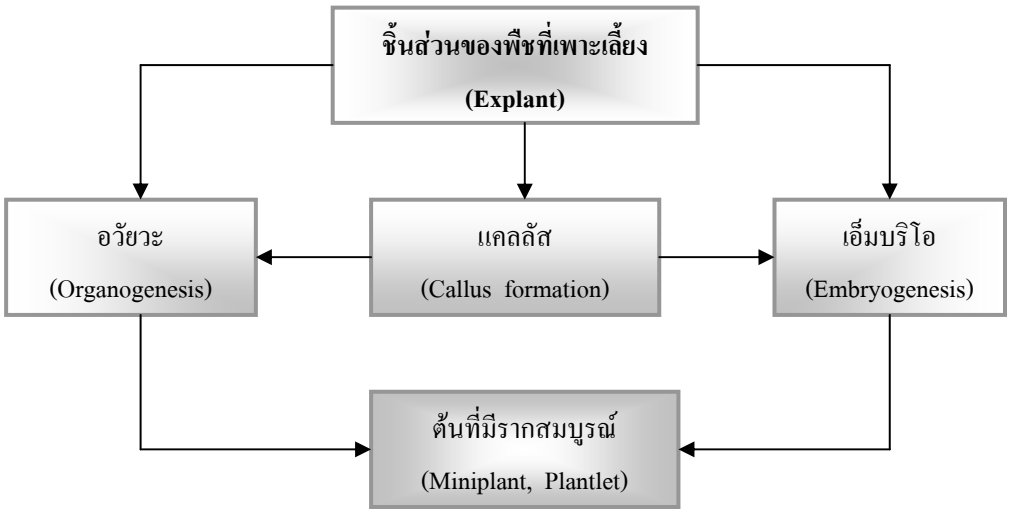
4. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (Protoplast culture) โดยการเพาะเลี้ยงเริ่มต้นจากเซลล์แขวนลอย หรือเซลล์จากใบพืช โดยเติมเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) และเพคติเนส (Pectinase) ที่สกัดได้จากเชื้อรา ซึ่งจะไปช่วยย่อยผนังเซลล์ได้เป็นโปรโตพลาสต์ และทำให้โปรโตพลาสต์นี้ไปรวมกับโปรโตพลาสต์อันอื่นของพืชชนิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกัน หรือต่างสกุลกันก็ได้ ซึ่งทำได้โดยการเติมสารเคมี Polyethylene glycol (PEG) หรือใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้น ทำให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ขึ้นมาได้ วิธีการแบบนี้เรียกว่า การรวมโปรโตพลาสต์(Protoplast fusion หรือ Somatic hybridization)



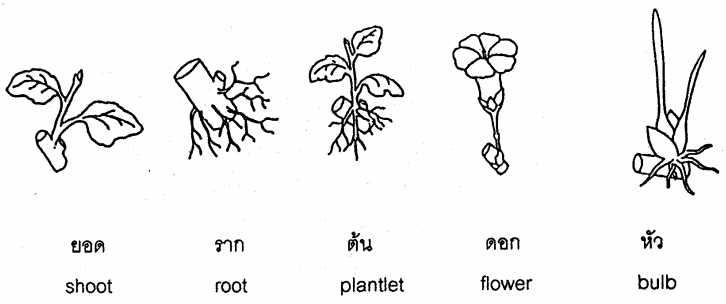
อนึ่ง ในปัจจุบันได้มีนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากที่พยายามสร้างพืชจำลองพันธุ์โดยวิธีการทางพันธุวิศวกรรม โดยได้นำเอา DNA ที่ได้จากการตัดต่อยีนจากแบคทีเรีย พืช และสัตว์บางชนิด แล้วนำเข้าไปอยู่ในโปรโตพลาสต์ของพืช และทำการบังคับให้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็น ต้นพืชพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะตามที่ประสงค์ได้

การเจริญเติบโตและพัฒนาการของเนื้อเยื่อพืช

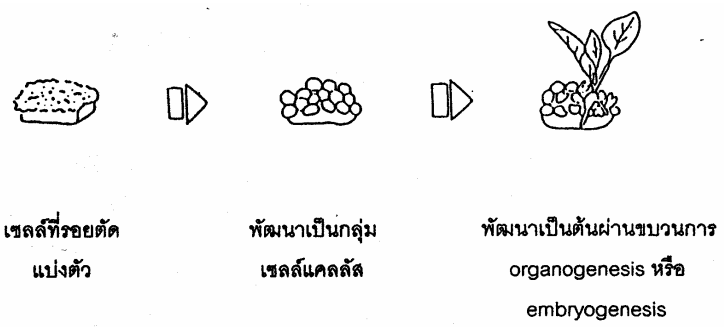
การเจริญเติบโตและพัฒนาการของเนื้อเยื่อพืชเพาะที่เลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ในสภาพปลอดเชื้อมีหลายรูปแบบ ดังนี้



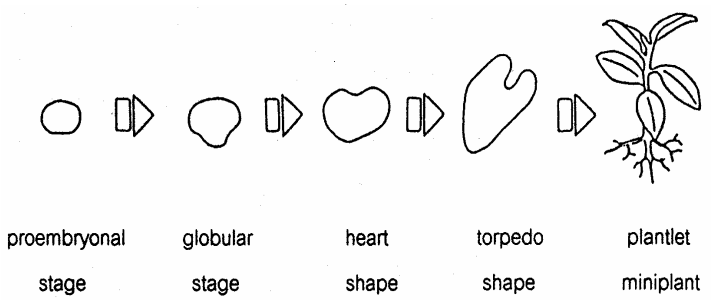
1. พัฒนาเป็นอวัยวะ (Organogenesis) โดยอาจพัฒนาเป็นอวัยวะต่างๆ เช่น



2. พัฒนาเป็นแคลลัส (Callus formation)



3. พัฒนาเป็นเอ็มบริโอ (Embryogenesis)

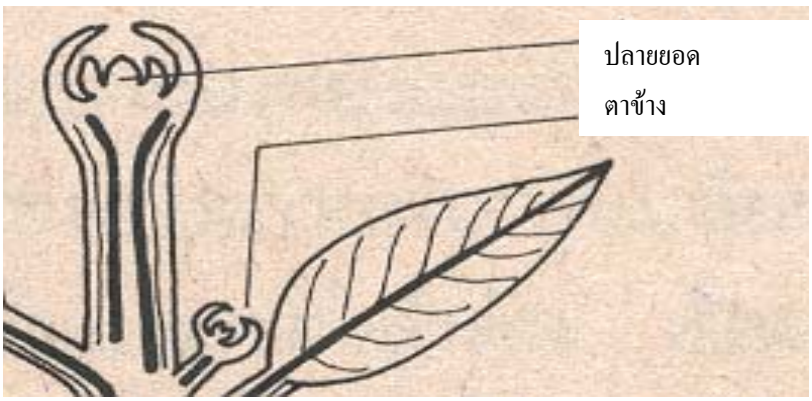


ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ ในสภาพปลอดเชื้อนี้จะมีการพัฒนาไปในรูปแบบใดก็ได้ ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดของพืช (Plant species) ส่วนของพืช (Explant) ปัจจัยทางเคมี (Chemical factor) และปัจจัยทางกายภาพ (Physical factor) ซึ่งไม่ว่าจะพัฒนาไปเป็นรูปแบบใดก็ตาม ในที่สุดก็สามารถบังคับให้เกิดเป็นต้นที่มีรากสมบูรณ์ที่สามารถนำออกปลูกลงดินได้สำเร็จ

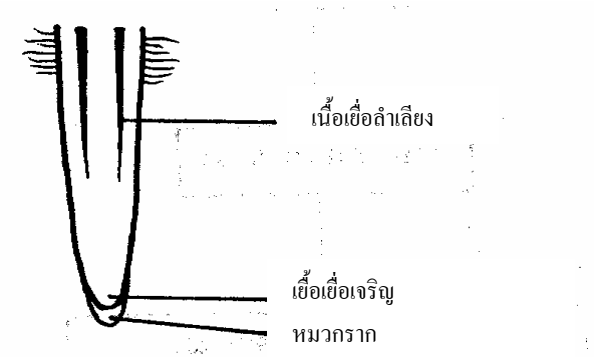
ส่วนของพืชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิดสามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ ทั้งพืชที่เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว หรือใบเลี้ยงคู่ จิมโนสเปิร์ม (Gymnosperms) เฟิร์น (Fern) และไบรโอไฟท์ (Bryophytes) เนื้อเยื่อที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงต้องเป็นเนื้อเยื่อที่มีชีวิต อย่างไรก็ตามความสามารถในการเจริญเติบโตอาจจะแตกต่างกัน เพราะเซลล์แต่ละชนิดย่อมมีความตื่นตัว (Active) ไม่เท่ากันการคัดเลือกเนื้อเยื่อจึงย่อมส่งผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอย่างยิ่ง การคัดเลือกเนื้อเยื่อจึงควรมีเทคนิคดังนี้

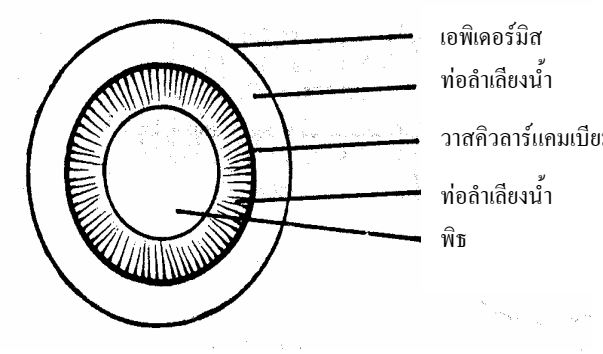
1. ปลายยอด (Shoot apex) หมายถึงส่วนที่นับจากปลายยอดสุดของลำต้นลงมาไม่เกิน 5 มิลลิเมตร เป็นส่วนที่เซลล์มีการแบ่งตัวมากที่สุด



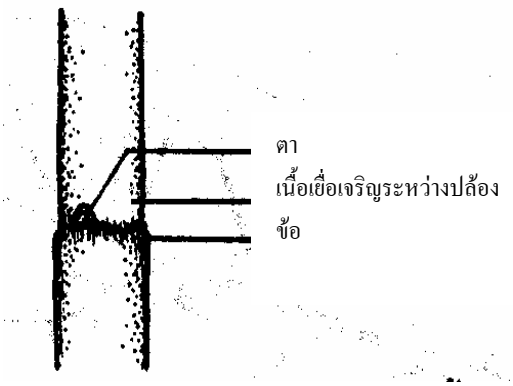
2. ปลายราก (Root apex) เป็นส่วนที่ถัดขึ้นมาจากส่วนที่เรียกว่า หมวกราก (Root cap) จะมีส่วนที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญคล้ายกับส่วนปลายยอด



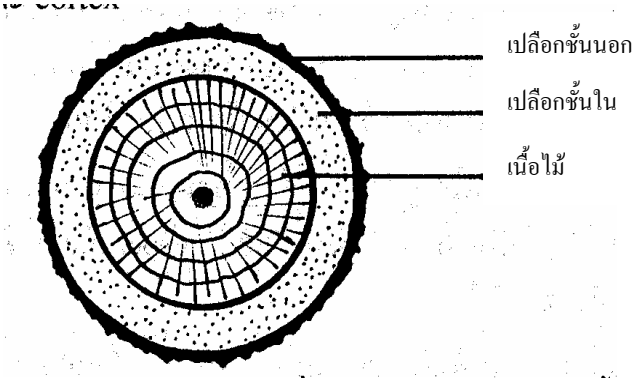
3. เนื้อเยื่อเจริญในท่อลำเลียง (Vascular cambium) เป็นเนื้อเยื่อเจริญที่พบในส่วนของ ลำต้นและราก ซึ่งอยู่ในระหว่างกลุ่มท่ออาหาร (Phloem) และท่อน้ำ (Xylem)



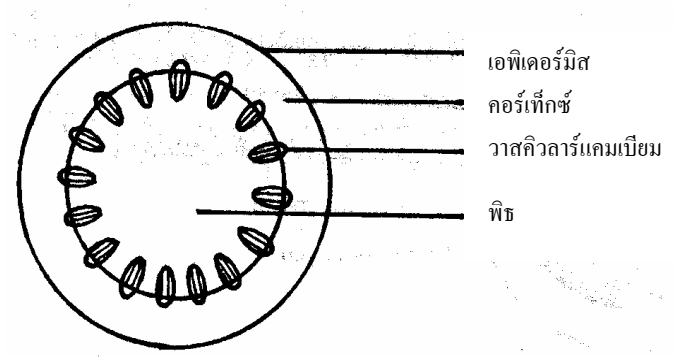
4. เนื้อเยื่อเจริญระหว่างปล้อง (Intercalary meristem) ซึ่งจะพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ทำหน้าที่เพิ่มความยาวของปล้อง



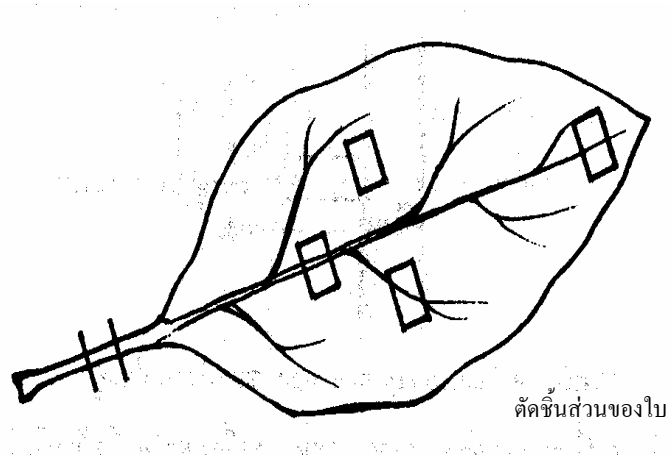
5. เปลือกชั้นใน (Inner bark) ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อชั้น Phloem และ Cortex



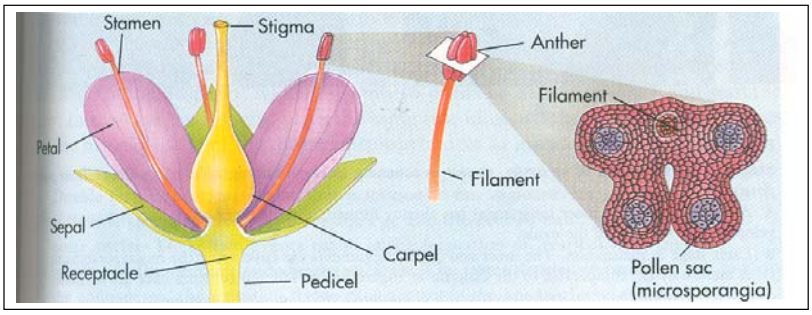
6. ไส้ (Pith) เป็นส่วนที่อยู่ในใจกลางสุดของลำต้น จะมีเซลล์พวก พาเรงคิมา



7. ใบ (Leaf) ภายในใบมีเซลล์ของแผ่นใบที่เรียกว่า พาลิเสดพาเรงคิมา (Palisade parenchyma) และ สปันจี พาเรงคิมา (Spongy parenchyma) อยู่จำนวนมาก นิยมนำไปใช้แยกโปรโตพลาสต์



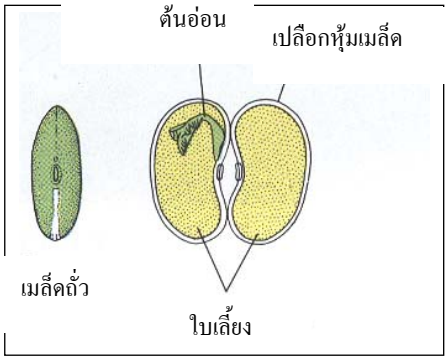
8. ดอก (Flower) ซึงส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยเซลล์พวก พาเรงคิมา ยกเว้นในส่วนของก้านดอก (Peduncle) และฐานรองดอก (Receptacle) ซึ่งอาจมีเนื้อเยื่อเจริญอยู่ด้วย ตัวอย่าง เช่น ในฐานรองดอกของเยอบีราและเบญจมาศที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดี



9. ผล (Fruit) เนื้อเยื่อของผลส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยเซลล์พวก พาเรงคิมา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลสด (Fleshy fruit) ชนิด Berry, Pepo และ Hesperidium ตัวอย่าง เช่น ผลของมะเขือเทศที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้

ผลและเมล็ด

10. เมล็ด (Seed) ในเมล็ดประกอบด้วย คัพภะ (Embryo) ใบเลี้ยง (Cotyledon) และ Endosperm ซึ่งทั้ง 3 ส่วนนี้สามารถให้ความสำเร็จสูงในการเพาะเลี้ยง



การเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์พืช ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มี 2 แบบ คือ

1. ออร์กาโนเจเนซิส (Organogenesis) เป็นการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่อไปในทิศทางเดียว เช่น การเจริญบริเวณปลายยอด หรือการพัฒนาของเซลล์พืชไปเป็นต้นพืช หรือราก เป็นการพัฒนาที่มีจุดกำเนิดจากเซลล์ที่ต่างกัน การเพิ่มจำนวนต้นจากเซลล์เยาว์วัย สามารถชักนำให้เกิดต้นได้จำนวนมาโดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน

สารกลุ่มนี้จะกระตุ้นการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเซลล์ กระตุ้นการแบ่งเซลล์ ส่งเสริมการเกิดยอด กระตุ้นการเกิดตาข้าง

2. โซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส (Somatic embryo genasis) เป็นการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่อไปในสองทิศทาง มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับการพัฒนาของเอ็มบริโอ แต่เป็นการพัฒนาจากโซมาติกเซลล์โดยตรง การเกิดต้น และ ราก จะมีการพัฒนาพร้อมๆกัน จากจุดเริ่มต้นจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว

หลักเกณฑ์การคัดเลือกเนื้อเยื่อพืช

ในทางทฤษฎีเนื้อเยื่อทุกชนิดของพืชมีโอกาสที่จะนำมาเพาะเลี้ยงได้สำเร็จ แต่ในทางปฏิบัติแล้ว ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละชนิดไม่เท่ากัน เนื้อเยื่อบางชนิดไม่สามารถนำมาเลี้ยงให้สำเร็จได้เลย ดังนั้น การเลือกชนิดของเนื้อเยื่อจึงมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีหลักเกณฑ์การพิจารณาคัดเลือกเนื้อเยื่อพืช ดังนี้

1. เนื้อเยื่อพืชใบเลี้ยงคู่มักมีโอกาสทำการเพาะเลี้ยงได้สำเร็จมากกว่าเนื้อเยื่อจากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จึงควรหลีกเลี่ยงการใช้เนื้อเยื่อพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมาทำการเพาะเลี้ยง

2. ควรเลือกเนื้อเยื่อเจริญมาใช้เพาะเลี้ยง เพราะจะมีโอกาสทำได้สำเร็จมากกว่า ซึ่งเนื้อเยื่อดังกล่าวได้แก่ ปลายยอด ปลายราก แคมเบียม ตา ฯลฯ

3. ความแก่-อ่อนของเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะพืชที่จะนำมาเลี้ยง ส่วนมากมักจะเลือกใบหรือกิ่งที่อ่อน เพราะใบหรือกิ่งที่อ่อนมีเซลล์ที่พร้อมจะเจริญเติบโต สามารถทำการกระตุ้นให้เกิดการเจริญได้ง่าย

อนึ่ง เนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการเลือกเพื่อทำการเพาะเลี้ยง หากมีลักษณะผิวเรียบไม่มีขนหรือ คอร์กปกคลุม เมื่อผ่านกระบวนการทำความสะอาดแล้ว จะมีโอกาสปลอดเชื้อจุลินทรีย์สูงมาก

การฟอกฆ่าเชื้อ

การฟอกฆ่าเชื้อ เป็นการทำความสะอาด ที่ผิวของเนื้อเยื่อที่จะนำมาเพาะเลี้ยง พืชที่เจริญตามธรรมชาติย่อมมีเชื้อโรคติดอยู่เสมอ ในการเพาะเลี้ยงถ้ามีเชื้อโรคเพียงชนิดเดียว หรือเซลล์เดียว เชื้อเหล่านั้นจะสามารถแบ่งตัวมากขึ้น จะไปทำลายเนื้อเยื่อพืช ดังนั้น จึงต้องทำลายเชื้อที่ผิวของเนื้อเยื่อก่อนเพาะเลี้ยง ดังนี้

1. นำเนื้อเยื่อมาทำความสะอาด ด้วยน้ำไหล หรือ แอลกอฮอล์ 70 %

2. ทำความสะอาดเนื้อเยื่อโดยแช่ลงในน้ำยาคลอร็อกซ์ หรือไฮเตอร์ ในปริมาณ

5-10 % โดยปริมาตร ฟอกฆ่าเชื้อเป็นเวลา 15-30 นาที จะได้ผลดี

3. นำเนื้อเยื่อที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วตามข้อ 2. มาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

การฟอกฆ่าเชื้อ จะช่วยทำให้ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาทำการเพาะเลี้ยงปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งแฝงตัวอยู่ในชิ้นส่วนพืชโดยธรรมชาติ เช่น เชื้อรา หรือแบคทีเรีย อันเป็นตัวการสำคัญของการปนเปื้อน (Contamination) ในอาหารเพาะเลี้ยง เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเหตุให้อาหารเน่าเสีย และส่งผลให้ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเน่าตายไปในที่สุด

การใช้สารเคมีทำการฟอกฆ่าเชื้อจึงเป็นหนทางในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ออกไปจากชิ้นส่วนของพืชที่นำมาทำการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้ผู้ปฏิบัติงานจะต้องเลือกใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ โดยคำนึงถึงหลักการดังนี้

1. เป็นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพดี ให้ร้อยละของความปลอดเชื้อสูง

2. ราคาไม่แพง หาซื้อได้ง่าย

3. สามารถเตรียมได้ง่าย ไม่มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก

4. ไม่เป็นอันตราย หรือมีอันตรายน้อยที่สุดต่อสิ่งมีชีวิต ทั้งคนและชิ้นส่วนพืช

ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์นั้น ผู้ปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้องดำเนินการเตรียมน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ ดังนี้

1. เอธิลแอลกอฮอล์ 70% เตรียมได้จากการใช้เอธิลแอลกอฮอล์ 95% จำนวน 70 มิลลิลิตร เติมน้ำ 25 มิลลิลิตร

2. คลอร็อกซ์ 10% เตรียมได้จากการใช้น้ำ 90 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อไว้ก่อนแล้ว เมื่อจะใช้ก็เติมคลอร็อกซ์ 10 มิลลิลิตร และสารเปียกใบ เช่น ทวีน-20 จำนวน 1-2 หยด

3. คลอร็อกซ์ 5% เตรียมได้จากการใช้น้ำ 95 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อไว้ก่อนแล้ว เมื่อจะใช้ก็เติมคลอร็อกซ์ 5 มิลลิลิตร และสารเปียกใบ 1-2 หยด

การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวและการเพาะเลี้ยง โดยหลักการทางทฤษฎีแล้ว การฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับชิ้นส่วนพืชไม่ว่าจะเป็นส่วนใดก็มีวิธีการที่คล้ายคลึงกันคือใช้แอลกอฮอล์ 70% และคลอร็อกซ์ เป็นสารฟอกฆ่าเชื้อ แต่ในทางปฏิบัติแล้ว ชิ้นส่วนของพืชที่ได้มาจากอวัยวะส่วนต่างๆ เช่น ตา ยอด ใบ ราก ดอก ฯลฯ ของพืชย่อมมีความแตกต่างกันมาก ทั้งในเรื่องของลักษณะรูปร่าง ความทนทานต่อการฟอกฆ่าเชื้อ ความยากง่ายในการกำจัดเชื้อ ฯลฯ ความแตกต่างเหล่านี้ จะเป็นปัจจัยหรือข้อกำหนดให้เกิดเทคนิคที่แตกต่างกันออกไป ถ้าหากผู้ปฏิบัติการฟอกเชื้อมีความชำนาญเทคนิคเหล่านี้อาจเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสม

ตารางที่ 9: แสดงความเข้มข้นของสารเคมีบางชนิด และระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อ

ที่	ชื่อสารเคมี		ความเข้มข้น	ระยะเวลา (นาที)
1.	แคลเซียมไฮโปคลอไรด์	$Ca(OCl)_2$	9-10%	5-30
2.	โซเดียมไฮโปคลอไรด์	NaOCl	0.5-5%	5-30
3.	ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	H_2O_2	3-12%	5-15
4.	เอธิลแอลกอฮอล์	C_2H_5OH	70-95%	0.1-5.0
5.	ซิลเวอร์ไนเตรท	$Ag(NO_3)_2$	1%	5-30
6.	เมอคิวริคคลอไรด์	$HgCl_2$	0.1-1.0%	2-10
7.	เบนซัลโคเนียมคลอไรด์		0.01-0.1%	5-20

ที่มา : อรดี สหวัชรินทร์. **หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2539. หน้า 42.

ตารางที่ 10 : แสดงความเข้มข้นของสารเคมี ระยะเวลา และประสิทธิภาพในการฟอกฆ่าเชื้อ

ที่	ชื่อสารเคมี		การใช้		ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ
			ความเข้มข้น	เวลา (นาที)	
1.	แคลเซียมไฮโปคลอไรต์	$Ca(Ocl)_2$	9-10%	5-30	ดีมาก
2.	โซเดียมไฮโปคลอไรต์	NaOCl	0.25-2.63%	5-30	ดีมาก
3.	ไฮโดรเจนเปอร์ไซต์	H_2O_2	10-12%	5-15	ดี
4.	คลอร๊อกซ์		5-10%	5-20	ดีมาก
5.	สารละลายโบรไมต์		1-2%	2-10	ดีมาก
6.	ซิลเวอร์ไนเตรท	$Ag(NO_3)_2$	1%	5-30	ดี
7.	สารละลายไอโอดีน		3%	30	ดี
8.	เมอคิวริคคลอไรด์	$HgCl_2$	0.1-1.0%	2-10	ดีพอสมควร
9.	เมอคิวริคไอโอไดด์	Hgl_2	0.5%	30	ดี
10.	เมอคิวริคโบรไมด์	$HgBr_2$	0.5%	30	ดี
11.	เอธิลแอลกอฮอล์		70-95%	2-5	ดีมาก
12.	กรดกำมะถัน หรือกรดซัลฟุริค		20-70%	5-20	ดีมาก

ที่มา : ประศาสตร์ เกื้อมณี. **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. กรุงเทพมหานคร : โอเดียนสโตร์, 2536. หน้า 37-38.

การเพิ่มปริมาณแคลลัสหรือต้น

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจนได้แคลลัส หรือ ต้นแล้ว การทำให้แคลลัส หรือต้นเพิ่มปริมาณขึ้นโดยอาศัยขั้นตอนสำคัญๆ ดังนี้

1. ทำการตัดแบ่งแคลลัสออกเป็นชิ้นเล็กๆ หรือถ้าเป็นต้นก็ทำการตัดแบ่งออกเป็นลำต้น ใบ หรือราก แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ทุกเดือนเรื่อยๆ ไป ก็จะสามารถจะเพิ่มปริมาณได้มากมายโดยไม่มีที่สิ้นสุด

2. ทำการบังคับแคลลัสให้เกิดเป็นต้น โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตจำพวกออกซิน ร่วมกับไซโตไคนิน

ปัจจัยที่ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนต้นในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบด้วย

1. สูตรอาหารและฮอร์โมน จะต้องมีอยู่ในระดับที่เหมาะสมกับชนิดของพืช ซึ่งโดยมากมักนิยมใช้ฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนิน เช่น BA เป็นต้น

2. อุณหภูมิ โดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 25-28 องศาเซลเซียส

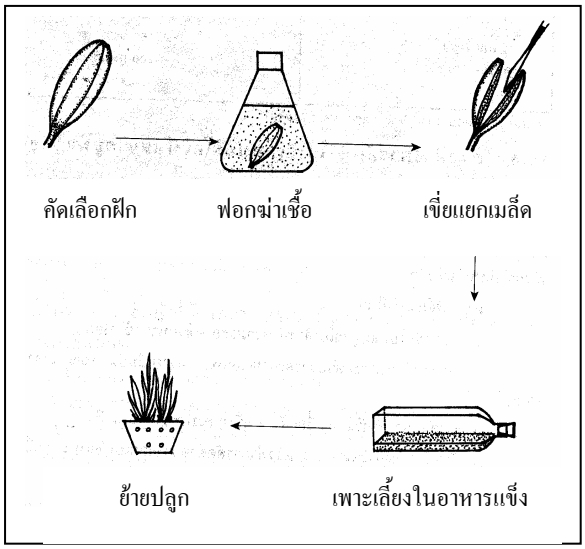
3. แสง ใช้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ ระยะห่าง 1 ฟุต เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมงต่อวัน

การชักนำรากพืช

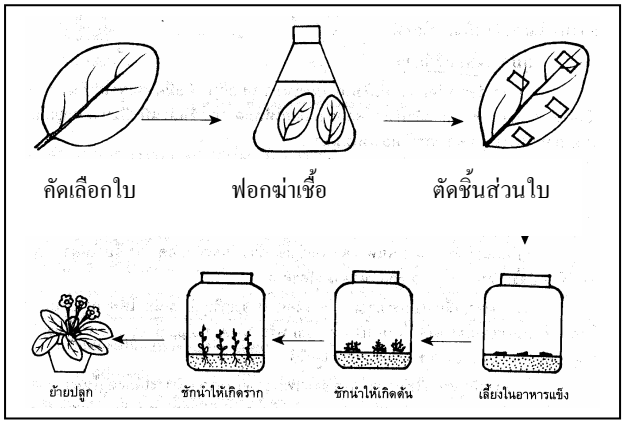
การชักนำให้เกิดราก สามารถทำได้ในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน สารกลุ่มนี้ทำให้เซลล์เกิดการแบ่งตัว ส่งเสริมการเกิดราก และยับยั้งการเกิดยอด

ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

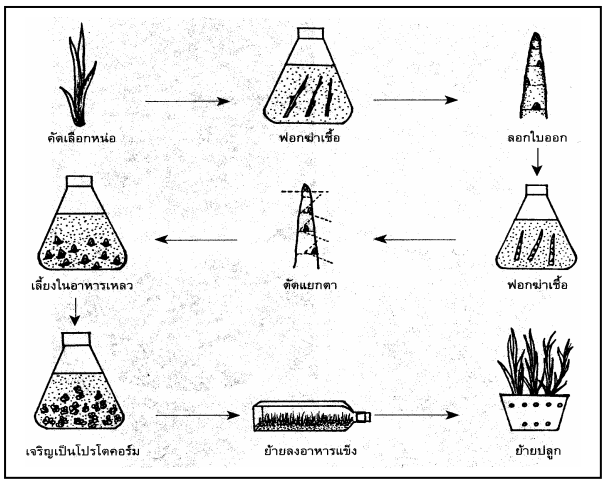
เอ็มบริโอกล้วยไม้



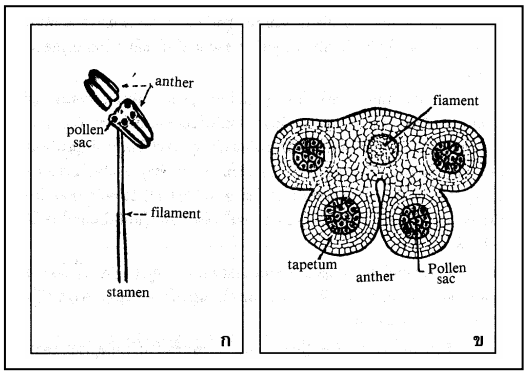
ใบ-การเพาะเลี้ยง



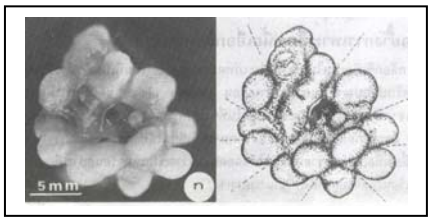
กล้วยไม้-ขั้นตอน
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

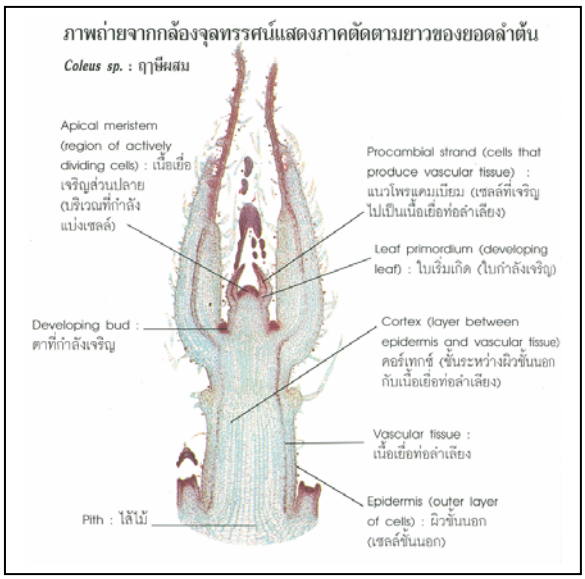


อับเรณู-การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



ลักษณะของโปรโตคอร์ม
และตำแหน่งการพัฒนาของหน่อ





บทปฏิบัติการที่ 6
การเลือกเนื้อเยื่อพืชในการเพาะเลี้ยง

จุดประสงค์

ให้ผู้เรียนมีความรู้ สามารถสังเกตลักษณะและเลือกชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชที่จะนำไปใช้เพาะเลี้ยงได้

งานที่ปฏิบัติ

ฝึกสังเกตลักษณะชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช และเลือกชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชที่จะนำไปใช้เพาะเลี้ยง

วิธีการ

1. ศึกษามวลความรู้เกี่ยวกับเทคนิคการเลือกเนื้อเยื่อพืชในการเพาะเลี้ยง
2. ทำการสังเกตลักษณะชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช และเลือกชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชที่สนใจจะนำไปใช้เพาะเลี้ยง คนละ 1 ชิ้น

ภาระงาน

จงอธิบายวิธีการเลือกชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชที่สนใจจะนำไปใช้เพาะเลี้ยง โดยให้วาดรูปแสดงให้เห็นถึงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชดังกล่าวประกอบ

บทปฏิบัติการที่ 7
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จุดประสงค์

ให้ผู้เรียนสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนของพืชบางชนิดได้ โดยเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรอรดี ที่เตรียมไว้แล้ว

งานที่ปฏิบัติ

ฝึกทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อเอ็มบริโอ ใบเลี้ยงของพืช เนื้อเยื่อพาเรงคิมา และเนื้อเยื่อตาของพืช

วิธีการ

ตอนที่ 1 การเลี้ยงเนื้อเยื่อเอ็มบริโอและใบเลี้ยงของพืช

1. เตรียมทำความสะอาด เช็ดตู้ย้ายเนื้อเยื่อด้วย คลอร็อกซ์ 10% ฉีดด้วยแอลกอฮอล์ 70% อบตู้ไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนใช้งาน

2. ใช้อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร อรดี ที่เตรียมไว้

3. เตรียมเนื้อเยื่อพืชเลี้ยงในอาหาร โดยใช้ถั่วฝักยาว หรือ ฝักถั่วชนิดที่หาได้ในท้องถิ่น เลือกฝักที่มีความสด สมบูรณ์ และดำเนินการในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ดังนี้

3.1 ล้างฝักถั่วให้สะอาด ใช้ปากคีบจับฝักถั่วชุบในเอธิลแอลกอฮอล์ 95%

3.2 คีบฝักถั่วมาผ่านเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ แล้วใช้มีดผ่าตัดที่ลนไฟแล้วผ่า ฝักถั่วแยกเอาเมล็ดออกมา

3.3 ลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก แล้วใช้มีดแยกใบเลี้ยงและดึงเอาเอ็มบริโอใส่ลงในขวดอาหาร ส่วนใบเลี้ยงตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในขวดอีกใบหนึ่ง

4. วางขวดอาหารที่มีชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อไว้ในชั้นเพาะเลี้ยง ที่มีแสง และ อุณหภูมิพอเหมาะกับการเจริญเติบโตของพืช

ภาระงาน

1. ศึกษาการเจริญเติบโตและบันทึกผล สังเกตลักษณะการเจริญเติบโต สีของเนื้อเยื่อ บันทึกผลเป็นระยะ จนครบ 2-3 สัปดาห์ แล้วรายงานผลการศึกษา

2. อธิบายวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชที่นักเรียนศึกษา

ตอนที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพาเรงคิมา

1. เตรียมทำความสะอาดตู้ย้ายเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับตอนที่ 1

2. ใช้อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร ดร.อรดี ที่เตรียมไว้

3. เตรียมเนื้อเยื่อพาเรงคิมา จากลำต้นพืชที่หาได้ในท้องถิ่น เช่นหัวแครอท คะน้า และดำเนินการในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ดังนี้

3.1 นำชิ้นส่วนพืชมาที่ล้างน้ำแล้ว มาชุบในเอธิลแอลกอฮอล์ 95%

3.2 ใช้มีดลนไฟ แล้วนำมาตัดส่วนผิวทิ้งไป แล้วตัดเฉพาะเนื้อเยื่อข้างในลำต้นหรือหัว ตัดเป็นชิ้นขนาด 2-3 mm. ใส่ลงในขวดอาหาร

4. วางขวดอาหารที่มีชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อไว้ในชั้นเพาะเลี้ยง ที่มี แสง และ อุณหภูมิพอเหมาะกับการเจริญเติบโตของพืช

ภาระงาน

1. ศึกษาการเจริญเติบโตและบันทึกผล สังเกตลักษณะการเจริญเติบโต สีของเนื้อเยื่อ บันทึกผลเป็นระยะ จนครบ 2-3สัปดาห์ แล้วรายงานผลการศึกษา

2. อธิบายวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชที่นักเรียนศึกษา

ตอนที่ 3 /การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาของพืช

1. เตรียมทำความสะอาดตู้ย้ายเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับ ตอนที่ 1

2. ใช้อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร ดร.อรดี ที่เตรียมไว้

3. นำกิ่งกุหลาบ หรือ พืชที่หาได้ในท้องถิ่นที่ยังอ่อนอยู่มา และดำเนินการในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ดังนี้

3.1 ตัดเอาข้อที่มีตาติดอยู่ด้วยมาทำความสะอาดด้วยน้ำยาคลอร็อกซ์ 10 % โดยแช่ไว้เป็นเวลา 15 นาที นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

3.2 ใช้มีดลนไฟแล้ว ตัดเฉพาะส่วนข้อกุหลาบ นำไปเลี้ยงในขวดอาหาร

4. วางขวดอาหารที่มีชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อไว้ในชั้นเพาะเลี้ยงที่มี แสงและอุณหภูมิพอเหมาะกับการเจริญเติบโตของพืช

ภาระงาน

1. ศึกษาการเจริญเติบโตและบันทึกผล สังเกตลักษณะการเจริญเติบโต สีของเนื้อเยื่อ บันทึกผลเป็นระยะ จนครบ 2-3 สัปดาห์ แล้วรายงานผลการศึกษา
2. อธิบายวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชที่นักเรียนศึกษา

บทปฏิบัติการที่ 8
การฟอกฆ่าเชื้อ

จุดประสงค์

1. ให้ผู้เรียนสามารถทำการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากชิ้นส่วนต้นกล้วยไม้พวกลำต้นเดี่ยวได้

งานที่ปฏิบัติ

1. ฝึกทำการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากชิ้นส่วนต้นกล้วยไม้พวกลำต้นเดี่ยว

วิธีการ

1. นำยอดกล้วยไม้ที่มีใบประมาณ 2 ใบ มาล้างน้ำให้สะอาด
2. ตัดใบทิ้ง แล้วชุบด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 70%
3. ลอกเอาโคนใบที่หุ้มตาออกให้หมด
4. นำเอาชิ้นส่วนกล้วยไม้ที่เหลือแช่ลงในน้ำยาคลอร๊อกซ์ 10% ที่มีน้ำยาจับใบ 1-2 หยด ใช้เวลาแช่นาน 15 นาที
5. นำเอาชิ้นส่วนกล้วยไม้ไปแช่ลงในน้ำยาคลอร๊อกซ์ 5% ที่มีน้ำยาจับใบ 1-2 หยด ใช้เวลาแช่นาน 10 นาที
6. นำชิ้นส่วนกล้วยไม้ไปล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
7. ตัดเอาตายอดและตาข้างไปเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร VW วางบนเครื่องเขย่า 120 รอบ/นาที ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25-28˚C และให้ได้รับแสงวันละ 16 ชั่วโมง
8. ทำการย้ายเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ เดือน และวางบนเครื่องเขย่าจนได้ปริมาณ Protocorn-like body : Plb มากเพียงพอต่อความต้องการ
9. ย้ายลงไปเลี้ยงในอาหารแข็ง สูตร VW โดยวางบนชั้นในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 25-28˚C และให้ได้รับแสงวันละ 16 ชั่วโมง Plb ก็จะเกิดเป็นต้นที่มีรากสมบูรณ์ หากไม่ได้ต้นกล้วยไม้ที่สมบูรณ์แข็งแรงพอ ให้ดัดแปลงสูตรอาหารโดยการเติมน้ำสกัดจากมันฝรั่งและกล้วยหอมบด อย่างละ 100 กรัม/ลิตร ผงถ่าน 0.5 กรัม/ลิตร

อนึ่ง ในระยะ Plb นี้ หากสังเกตพบอาการเหลือง ให้ลดปริมาณน้ำตาลในอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงลง

ภาระงาน

1. ศึกษาการเจริญเติบโตและบันทึกผล สังเกตลักษณะการเจริญเติบโต สีของเนื้อเยื่อ บันทึกผลเป็นระยะ จนครบ 4-5 สัปดาห์ แล้วรายงานผลการศึกษา
2. อธิบายวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชที่นักเรียนเลือกตามข้อ 1

บทปฏิบัติการที่ 9
การขยายเพิ่มจำนวนต้น

จุดประสงค์

ให้ผู้เรียนสามารถทำการย้ายเนื้อเยื่อเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้พวกลำต้นเดี่ยวได้

งานที่ปฏิบัติ

ฝึกทำการย้ายเนื้อเยื่อเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้พวกลำต้นเดี่ยว

วิธีการ

1. คัดเลือกพืชในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถนำไปเพิ่มปริมาณต้นได้
2. ทำการตัดแบ่งเนื้อเยื่อในตู้ย้ายเนื้อเยื่อที่มีสภาพปลอดเชื้อ
3. ตัดแบ่งเนื้อเยื่อส่วนที่ไม่มีชีวิต ใบ และรากบางส่วนออกทิ้งไป
4. สังเกตต้นพืชในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดใดมีการเพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อให้ทำการตัดแยกหน่อออก เป็นกอๆ โดยให้มีต้นพืชอยู่เพียง กอละ 2-3 ต้น
5. ตัดแบ่งต้นที่มีการเจริญเติบโตเป็นต้นเดี่ยวออกเป็นข้อๆ โดยให้แต่ละข้อมีตาติดอยู่ด้วย
6. ย้ายเนื้อเยื่อพืชที่ได้จากการตัดแบ่งตามข้อ 5 ไปเลี้ยงในอาหารใหม่ (สูตร VW หรือ สูตร อรดี)

ภาระงาน

อธิบายวิธีการเพิ่มจำนวนกล้วยไม้พวกลำต้นเดี่ยว หรือพืชชนิดอื่นที่เพาะเลี้ยงไว้ในขวด โดยให้วาดรูปแสดงวิธีการตามขั้นตอนการปฏิบัติงานประกอบด้วย

บทที่ 5
การย้ายต้นพืชเพาะเลี้ยงลงปลูก

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ได้มีความก้าวหน้าและได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลาย เพราะสามารถทำให้ผู้เพาะเลี้ยงได้ต้นกล้วยไม้ในจำนวนที่มากเพียงพอกับความต้องการ ภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว การย้ายต้นพืชหรือกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงออกไปปลูกลงวัสดุปลูกธรรมชาติจึงมีความสำคัญต่ออัตราการรอดชีวิต ของพืชเพาะเลี้ยงเป็นอย่างมาก เพราะการย้ายต้นพืชเพาะเลี้ยงที่เคยอาศัยอาหารวิทยาศาสตร์ ในสภาพการควบคุมทั้งอุณหภูมิ ปริมาณแสงที่ได้รับ การปลอดเชื้อ ฯลฯ ไปปลูกลงในวัสดุปลูกธรรมชาติภายใต้สภาพแวดล้อมใหม่ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมให้กับต้นพืชโดยสิ้นเชิง การย้ายต้นพืชออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงจำเป็นต้องกระทำอย่างระมัดระวัง

การปรับสภาพ

ในการย้ายต้นพืชเพาะเลี้ยงออกไปปลูกในวัสดุปลูกธรรมชาติ ต้นพืชจำเป็นต้องได้รับการปรับสภาพ ดังนั้น ก่อนนำต้นพืชที่เพาะเลี้ยงออกจากขวดเพาะเลี้ยง ให้นำต้นพืชที่ได้และยังอยู่ในขวดเพาะเลี้ยง ไปวางพักไว้ในสภาพแวดล้อมปกติก่อนประมาณ 2 - 4 สัปดาห์ หรืออาจนานกว่านั้น ทั้งนี้ก็เพื่อให้ต้นพืชได้ปรับสภาพให้แข็งแรง สามารถดำรงชีพอยู่ในสภาพแวดล้อมใหม่ที่ใกล้เคียงสภาพจริงที่จะนำออกจากขวดให้มากที่สุด

ขั้นตอนการย้ายต้นพืชออกปลูก

1. การนำต้นพืชออกขวด

หลังจากได้ทำการเพิ่มปริมาณต้นได้มากจนเป็นที่พอใจแล้ว การนำต้นพืชออกปลูกนับเป็นขั้นตอนสุดท้ายที่สำคัญมาก วิธีการนำต้นพืชออกปลูกให้รอดตายนั้น จำเป็นต้องดำเนินการดังนี้

1.1 ใช้ปากคีบดึงเอาต้นออกจากอาหารวุ้น

1.2 ล้างน้ำให้สะอาด

1.3 แช่ในน้ำยากันราและแบคทีเรีย

1.4 นำออกปลูกลงดิน ชนิดอื่นที่เหมาะสม นำเก็บไว้ในที่ร่มและมีความชื้นสูง หรือเรือนเพาะชำชั่วระยะเวลาหนึ่งประมาณ 2 สัปดาห์ รอจนต้นพืชตั้งตัวได้ดีแล้ว

1.5 เมื่อต้นพืชตั้งตัวได้ดีแล้วจึงย้ายลงแปลงปลูกต่อไป

ข้อควรระวัง เนื่องจากต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีขนาดเล็ก การย้ายจึงควรทำด้วยความระมัดระวังและเบามือ เพื่อให้ต้นพืชบอบช้ำน้อยที่สุด ซึ่งจะทำให้ต้นพืชที่นำออกปลูก มีร้อยละของการรอดชีวิตสูง

2. การย้ายออกปลูก ก่อนย้ายต้นพืชออกปลูกในสภาพธรรมชาติ ต้องมีการปรับสภาพต้นพืช ซึ่งปัจจุบันมีวิธีการเพิ่มพันธุ์ดีไม่กลายพันธุ์ ใช้เวลาน้อยในการให้ผลผลิตสั้นกว่าการปลูกโดยเมล็ด คราวละมากๆ เหมาะสำหรับพืชเศรษฐกิจ และพืชที่เพาะพันธุ์ยาก การขยายพันธุ์โดยเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อ

หลังจากการนำต้นพืชในขวดเพาะเลี้ยงไปพักตัวปรับสภาพดีแล้ว ผู้เพาะเลี้ยงต้องนำต้นพืชออกจากขวดเพาะเลี้ยงไปปลูกลงในวัสดุปลูก จะมีขั้นตอนในการปฏิบัติ ดังนี้

2.1 นำขวดเพาะเลี้ยงที่มีต้นพืชหรือต้นกล้วยไม้ที่นำไปพักและปรับตัวได้ดีแล้ว โดยสังเกตเห็นว่าต้นมีความสมบูรณ์แข็งแรงดีแล้วมาตบก้นขวดเพื่อให้เกิดช่องว่าง และกระแทกก้นขวดให้แตกออก นำต้นพืช (ลูกไม้) ไปล้างน้ำสะอาด 2-3 น้ำ เพื่อล้างเอาวุ้นออกให้หมด

2.2 นำลูกไม้ที่ล้างสะอาดแล้วไปปรับสภาพในกระจาด ตะแกรงลวด หรือกระถางทรงเตี้ย (3-4 นิ้ว) ที่ใส่ถ่านทุบหยาบไว้ประมาณครึ่งกระถาง โรยทับหน้าไว้ด้วยวัสดุปลูกบาง ๆ โดยปลูกลูกไม้ลงในกระถาง 25-30 ต้น หรือมากกว่านั้น (แล้วแต่ขนาดภาชนะปลูก)

2.3 ลูกไม้ที่ออกจากขวดไปได้ประมาณ 1-3 เดือน ให้คัดแยกลงปลูกในกระถางนิ้วตามแต่สกุลและวิธีการปลูก หลังจากปลูกในกระถางนิ้วได้ 6-8 เดือน ลูกไม้จะโตขึ้น ให้ย้ายลงปลูกในกระถาง 3–4 นิ้ว หรือกระเช้าไม้ (ตามแต่สกุล) อีกครั้ง แล้วให้นำไปขึ้นลวดแขวนได้

3. การบำรุงรักษา สำหรับการให้ยาและปุ๋ยให้ปฏิบัติดังนี้ คือ

3.1 ยา สามารถให้ได้เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 2 สัปดาห์โดยควรให้ยากันเชื้อรา เช่น ออโลไซด์ ในทุกๆ 10 วัน

3.2 ปุ๋ย สามารถให้ได้เมื่อระยะเวลาผ่านไปประมาณ 3 สัปดาห์ โดยให้ปุ๋ยสัปดาห์เว้นสัปดาห์ และให้น้ำวันละครั้ง

บทปฏิบัติการที่ 10
การย้ายต้นออกปลูก

จุดประสงค์

ให้ผู้เรียนสามารถทำการย้ายพืชที่เจริญเติบโตออกเลี้ยงในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติได้

งานที่ปฏิบัติ

ฝึกทำการย้ายพืชที่เจริญเติบโตออกเลี้ยงในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติได้

วิธีการ

1. นำต้นพืชทั้งขวดที่จะทำการย้ายออกปลูกไปวางพักในสภาพแวดล้อมปกติ ประมาณ 2-4 สัปดาห์ ให้วางในที่ร่ม อย่าให้ถูกแสงจัดมาก
2. นำขวดเพาะเลี้ยงในข้อ 1 มาตบก้นขวดให้เกิดช่องว่าง และกระแทกให้ก้นขวดแตกออก
3. นำต้นพืชไปล้างน้ำเอาวุ้นออกให้หมด
4. นำลูกไม้ที่ล้างสะอาดไปปลูกในกระถางทรงเตี้ยที่มีถ่านทุบหยาบอยู่ แล้วโรยทับด้วยวัสดุปลูก นำไปวางในที่ร่ม
5. แยกลูกไม้ที่นำออกปลูกแล้ว ประมาณ 1-3 เดือน ลงปลูกในกระถางมี่มีขนาดเหมาะสม

ภาระงาน

ศึกษาการเจริญเติบโตและบันทึกผล สังเกตลักษณะการเจริญเติบโต สีของเนื้อเยื่อ จำนวนใบ ความสูง และความสมบูรณ์ของลูกไม้ บันทึกผลเป็นระยะ จนครบ 4-5 สัปดาห์ แล้วรายงานผลการศึกษา

บรรณานุกรม

จิตราพรรณ พิลึก (2543) ***การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้*** กรุงเทพมหานคร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ณิชกานต์ กลิ่นกุสุม (2546) "เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้" ใน ***เอกสารประกอบการฝึกอบรม เรื่อง เทคนิคการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้*** วันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2546 มหาวิทยาลัยรังสิต (อัดสำเนา)

นันทิยา วรรธนะภูติ (2542) ***การขยายพันธุ์พืช*** พิมพ์ครั้งที่ 3 กรุงเทพมหานคร โอเดียนสโตร์

นิตย์ศรี แสงเดือน และสัมพันธ์ คัมภิรานนท์ (2538) "เทคโนโลยีชีวภาพของพืช" ใน ***ประมวลสาระ วิชาพฤกษศาสตร์ขั้นสูงสำหรับครู*** หน่วยที่ 15 หน้า 302-341 นนทบุรี มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช สาขาวิชาศึกษาศาสตร์

บุญยืน กิจวิจารณ์ (2540) ***เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช*** ขอนแก่น มหาวิทยาลัยขอนแก่น ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

ประนอม จันทรโณทัย (2544) ***อนุกรมวิธานพืช*** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประศาสตร์ เกื้อมณี (2536) ***เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช*** กรุงเทพมหานคร โอเดียนสโตร์

ปราณี สังขะตะวรรธน์ (2537) "เซลล์ เนื้อเยื่อ และระบบเนื้อเยื่อ" ใน ***ประมวลสาระวิชาพฤกษศาสตร์ขั้นสูง สำหรับครู*** หน่วยที่ 1 หน้า 2-87 นนทบุรี มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช สาขาวิชาศึกษาศาสตร์

มานี เตื้อสกุล (2538) ***การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการเกษตร*** สงขลา วิทยาลัยครูสงขลา

โรงเรียนเทพศิรินทร์ (2544) "เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการบูรณาการกับวิชาชีววิทยา" ใน ***เอกสารประกอบการฝึกอบรมสัมมนาเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การปฏิรูปการศึกษา*** วันที่ 18-20 กรกฎาคม 2544 โรงเรียนเทพศิรินทร์ (อัดสำเนา)

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ม.ป.ป.) ***การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช*** กรุงเทพมหานคร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (อัดสำเนา)

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2542) ***เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขั้นพื้นฐาน*** นครปฐม ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัย และพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ม.ป.ป.) ***หนังสือเรียนวิชาชีววิทยา ว 046 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช*** กรุงเทพมหานคร สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี (อัดสำเนา)

อรดี สหวัชรินทร์ (2539) ***หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช*** กรุงเทพมหานคร ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อภิธานศัพท์

คำศัพท์	ความหมาย
Agar plating technique	วิธีการเลี้ยงเซลล์เดี่ยวที่ผสมเซลล์กับอาหารวุ้นที่ยังร้อนและไม่แข็งตัว ที่มีอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส ในจานมีฝาปิด เซลล์เหล่านี้ จะเจริญไปเป็นแคลลัสต่อไปได้
Axillary bud culture	การเพาะเลี้ยงตาข้าง เป็นการนำ ตาข้างของพืชมาทำการเพาะเลี้ยง
Callus	กลุ่มเซลล์พาเรงคิมาที่อยู่เป็นกลุ่มแต่ยังไม่เปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อ หรือ อวัยวะ
Cell suspension culture	การเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลว
Contamination	สภาวะไม่ปกติของพืชเนื่องจากการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยง
Competency	ความสามารถภายในเซลล์
Determination	การกำหนดขึ้น หรือการ การเจาะจง
Embryogenesis	กระบวนการพัฒนาของเอ็มบริโอ เกิดได้ 2 รูปแบบ คือ แบบเกิดจากไข่ที่ได้รับการผสมแล้ว และแบบเกิดจากไข่ที่ไม่ได้รับการผสม หรือเนื้อเยื่ออื่นๆ
Embryoids	เอ็มบริออยด์ เป็นต้นอ่อนที่ได้จากเซลล์ของร่างกาย เช่น เซลล์พาเรงคิมา
Embryo culture	การเพาะเลี้ยงคัพภะหรือเอ็มบริโอ นำเอ็มบริโอขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วยเซลล์มากกว่า 50 เซลล์ขึ้นไป มาผ่าตัด และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อให้เอ็มบริโองอกเป็นต้นพืช
Explant	ชิ้นส่วนของพืชเริ่มแรก มีขนาดเล็กๆ นำมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ
Haploid plant	ต้นพืชที่มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว
Intercalary meristem	เนื้อเยื่อเจริญระหว่างปล้อง พบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทำหน้าที่เพิ่มความยาวของปล้อง
Intereneric hybridization	การทำการผสมข้ามสกุล

Knop's solution	สารละลาย ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส แอสพาราจีน และ เพปโตน
Micropropagation	การขยายพันธุ์พืชขนาดเล็กๆ
Millipore filter	เยื่อกรองละเอียด
Organogenesis	การเจริญเติบโตและการพัฒนาของเนื้อเยื่อไปในทิศทางเดียว เช่น การเจริญบริเวณปลายยอด หรือการพัฒนาของเซลล์พืช ไปเป็นต้นพืช หรือราก ซึ่งเป็นการพัฒนาที่มีจุดกำเนิดจาก เซลล์ที่ต่างกัน
Plant Tissue culture	การเพาะเลี้ยงอวัยวะ เนื้อเยื่อ เซลล์ หรือเซลล์ที่ปราศจาก ผนังเซลล์ ด้วยอาหารวิทยาศาสตร์ หรืออาหารสังเคราะห์ใน สภาพปลอดเชื้อ
Protocorm	ก้อนเซลล์ที่เจริญแขวนลอยในอาหารเหลว
Protoplast	เซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์
Protoplast culture	การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ เริ่มต้นจากเซลล์แขวนลอย หรือเซลล์จากใบพืชโดยทำให้โปรโตพลาสต์รวมกับ โปรโตพลาสต์อันอื่นของพืชชนิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกัน หรือต่างสกุลกัน โดยการเติมสารเคมี หรือใช้กกระแสไฟฟ้า กระตุ้น ทำให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ขึ้นมาได้
Protoplast fusion	การรวมโปรโตพลาสต์
Root apex	ปลายราก เป็นส่วนที่ถัดขึ้นมาจากส่วนที่เรียกว่าหมวกราก จะมีส่วนที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญคล้ายกับส่วนปลายยอด
Shoot apex	ปลายยอด เป็นส่วนที่นับจากปลายยอดสุดของลำต้นลงมา ไม่เกิน 5 มิลลิเมตร เซลล์มีการแบ่งตัวมากที่สุด
Shoot tip culture	การเพาะเลี้ยงปลายยอด ที่ใช้เพื่อการขยายพันธุ์พืชเพียง จุดประสงค์เดียวเท่านั้น
Stock solution	สารละลายเข้มข้นที่ประกอบด้วยสารเคมีที่มีความสามารถ ละลายรวมกันได้ที่ความเข้มข้นสูงโดยไม่ตกตะกอนหรือ เกิดปฏิกิริยาเคมีที่ก่อให้เกิดอันตราย

Somatic embryo genesis	การเจริญเติบโตและการพัฒนาของเนื้อเยื่อไปในสองทิศทาง มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับการพัฒนาของเอ็มบริโอ แต่เป็นการพัฒนาจากโซมาติกเซลล์โดยตรง การเกิดต้น และ ราก จะมีการพัฒนาพร้อมๆกัน จากจุดเริ่มต้นจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว
Surface sterilization	เป็นการฟอกฆ่าเชื้อที่ติดอยู่ตามผิวพืช
Tissue culture	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำเอาเนื้อเยื่อของพืชมาเลี้ยงด้วยอาหารวิทยาศาสตร์แล้วจะได้แคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ที่ประกอบไปด้วยเซลล์พาเรงคิมาเป็นส่วนใหญ่ ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นยอดหรือราก
Totipotency	คุณสมบัติที่เซลล์ทุกเซลล์มีความสามารถจะเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นพืชทั้งต้นได้ และทุกต้นจะมีลักษณะเหมือนกัน
Vascular cambium	เนื้อเยื่อเจริญในท่อลำเลียง เป็นเนื้อเยื่อเจริญที่พบในส่วนของลำต้นและราก ซึ่งอยู่ในระหว่างกลุ่มท่ออาหาร และท่อน้ำ

ภาคผนวก ค

แบบประเมินเอกสารประกอบการเรียนโดยผู้ทรงคุณวุฒิ

แบบประเมินเอกสารประกอบการเรียน
รายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โ รงเรียนวัดน้อยนพคุณ กรุงเทพมหานคร
โดยผู้ทรงคุณวุฒิ

<u>คำชี้แจง</u> แบบประเมินฉบับบนี้ใช้สำหรับผู้ทรงคุณวุฒิประเมินคุณภาพเอกสารประกอบการเรียน แบ่งออกเป็น 3 ตอน

ตอนที่ 1 ข้อมูลส่วนตัว

ตอนที่ 2 การประเมินคุณภาพของเอกสารประกอบการเรียน

ตอนที่ 3 ความคิดเห็นทั่วไปเกี่ยวกับเอกสารประกอบการเรียน

เขียนเครื่องหมาย X ลงในช่องที่ตรงกับความคิดเห็นของท่านมากที่สุดในตอนที่ 2 และให้ระบุข้อความลงในช่องที่เว้นว่างในตอนที่ 1 และ 3

ตอนที่ 1 ข้อมูลส่วนตัว

ชื่อ – สกุล .....

วุฒิการศึกษา .....

ตำแหน่งปัจจุบัน .....

สถานที่ทำงาน .....

ตอนที่ 2 รายการประเมินคุณภาพเอกสารประกอบการเรียน

ข้อ	ข้อความในการประเมิน	ระดับความคิดเห็น			
		ดีมาก (4)	ดี (3)	พอใช้ (2)	ควรปรับปรุง (1)
ด้านเนื้อหา					
1.	เนื้อหามีความสัมพันธ์กับชื่อเรื่อง				
2.	เนื้อหามีความสัมพันธ์ต่อเนื่องกันเป็นลำดับ				
3.	ความยาวเนื้อหามีความเหมาะสม				
4.	เนื้อหามีความถูกต้องและทันสมัย				
5.	เนื้อหาและบทปฏิบัติการมีความสัมพันธ์กัน				
6.	บทปฏิบัติการเข้าใจง่าย สามารถปฏิบัติได้จริง				
7.	เนื้อหาสามารถสร้างเสริมความรู้แก่นักเรียน				
8.	เนื้อหาเหมาะสมกับวัยและประสบการณ์ของผู้เรียน				
9.	เนื้อหามีประโยชน์ต่อผู้เรียนทั้งในปัจจุบันและอนาคต				
ด้านการใช้ภาษา					
1.	การใช้ภาษามีความถูกต้องตามหลักภาษาไทย				
2.	ภาษามีความชัดเจนอ่านเข้าใจง่าย				
3.	ใช้ภาษาสื่อเนื้อหาสาระ ความคิด และแนวทางปฏิบัติให้ผู้เรียนได้				
4.	ใช้ภาษาในการลำดับความถูกต้อง				
ด้านการจัดภาพประกอบ					
1.	ภาพปกสามารถแสดงความสัมพันธ์กับชื่อเรื่อง				
2.	ภาพประกอบสัมพันธ์กับเนื้อเรื่อง				
3.	ภาพประกอบดูเข้าใจง่าย ชัดเจน				
ด้านการจัดรูปเล่ม					
1.	รูปเล่มภายนอกสวยงามดึงดูดความสนใจ				
2.	หนังสือมีความหนาพอเหมาะสามารถจับถือได้สะดวก				
3.	หนังสือสามารถเปิดอ่านได้สะดวก				
4.	การจัดวางหน้าหนังสือและขนาดตัวอักษรมีความพอเหมาะ				

ตอนที่ 3 ความเห็นทั่วไปเกี่ยวกับเอกสารประกอบการเรียน

1. เอกสารประกอบการเรียนมีความเหมาะสมในการใช้ประกอบการเรียนรายวิชา ว 645 หลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6

   ( ) ได้มาก ( ) ได้บ้าง ( ) ไม่ได้เลย

2. เอกสารประกอบการเรียนมีเนื้อหาที่สามารถให้ความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับหลักการเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

   ( ) ได้มาก ( ) ได้บ้าง ( ) ไม่ได้เลย

3. เมื่อท่านได้อ่านเอกสารประกอบการเรียนเล่มนี้แล้ว ท่านคิดว่าเทคโนโลยีทางชีวภาพด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในปัจจุบันนี้เป็นอย่างไร

   ( ) ได้มาก ( ) ได้บ้าง ( ) ไม่ได้เลย

4. ท่านคิดว่าเอกสารประกอบการเรียนฉบับนี้ยังมีส่วนที่ควรจะปรับปรุงแก้ไขเรื่องใดบ้าง

.....

.....

5. ความคิดเห็นอื่นๆเกี่ยวกับเอกสารประกอบการเรียนฉบับนี้

.....

.....

ขอขอบพระคุณอย่างสูง

นางพูลสุข ณัฏฐการณิก

ประวัติผู้ศึกษา

ชื่อ	นางพูลสุข ณัฏฐการณิก
วัน เดือน ปี เกิด	1 กุมภาพันธ์ 2497
สถานที่เกิด	เขตดุสิต กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร (ชีววิทยา)
สถานที่ทำงาน	โรงเรียนวัดน้อยนพคุณ ถนนพระราม 5 เขตดุสิต กรุงเทพมหานคร
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	อาจารย์ 2 ระดับ 7