



คู่มือ

การเพาะเลี้ยงเนื้อ

ชั้นตอน และวิธีการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

พร้อมเทคนิคในแต่ละขั้นตอน

คู่มือ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ขั้นตอน และวิธีการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
พร้อมเทคนิคในแต่ละขั้นตอน

จัดทำโดย

นางสาวเปี่ยมพร ศรีประทัย

พนักงาน (ระดับ 5) งานวิจัยพัฒนาด้านสวนป่าและอุตสาหกรรมไม้

สำนักวิจัยพัฒนาการจัดการป่าไม้เศรษฐกิจอย่างยั่งยืน

ขอขอบพระคุณผู้ให้ความรู้

ดร.สุบิน หินจันทร์

กรรมการผู้จัดการบริษัท บางกอกคอร์โดเพกซ์ จำกัด

คำนำ

องค์การอุตสาหกรรมป่าไม้มีพื้นที่ป่าเศรษฐกิจ กระจายอยู่ทั่วประเทศ และยังเป็นแหล่งรวบรวมความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้เศรษฐกิจสายพันธุ์ที่สำคัญจำนวนมาก ซึ่งถือเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่าและมีความสำคัญ หากนำไม้เศรษฐกิจที่มีอยู่มาปรับปรุงพันธุ์ และขยายพันธุ์ ก็จะทำให้ได้กล้าไม้สายพันธุ์ดีมาใช้ในการปลูกสร้างสวนป่าไม้เศรษฐกิจที่ให้ผลผลิตต่อไร่สูงขึ้น ซึ่งการปลูกสร้างสวนป่าเศรษฐกิจ เป็นกิจกรรมที่องค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ได้ดำเนินการมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2510 จนถึงปัจจุบัน และเป็นรายได้หลักขององค์การอุตสาหกรรมป่าไม้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นวิทยาการสำหรับการอนุรักษ์และการเก็บรักษาพันธุกรรมพืช ที่มีการพัฒนาเทคนิคในการขยายพันธุ์แบบใหม่ เพื่อให้ได้ต้นพืชปริมาณมาก ใช้ระยะเวลาอันสั้น และมีลักษณะทางพันธุกรรมตรงตามแม่พันธุ์ทุกประการ ซึ่งวิธีนี้จะสามารถเก็บพืชได้เป็นเวลานานโดยไม่มีการกลายพันธุ์ หรืออาจใช้ในการเก็บรวบรวมพันธุ์พืชโดยชะลอการเจริญเติบโตให้พืชโตช้าๆ ในขวดแก้วเล็กๆ ซึ่งการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชเช่นนี้จะใช้พื้นที่น้อยกว่าการเก็บพันธุ์พืชที่ผลิตเป็นต้นพืชโดยตรง อีกทั้ง ยังเป็นประโยชน์มหาศาลในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้พืชต้านทานโรคและแมลงศัตรูพืชได้ดีขึ้น หรือให้ผลผลิตมากขึ้น โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นการนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช มาเพาะเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ที่ประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมความเจริญเติบโต ภายใต้สภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์และอยู่ในสภาวะควบคุมอุณหภูมิ แสง และความชื้น โดยชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยงนี้จะสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาได้หลายรูปแบบ ไม่ว่าจะพัฒนาเป็นส่วนอวัยวะหรือเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า แคลลัส หรือ คัพภะ (ต้นอ่อนขนาดเล็ก) ที่เรียกว่า เอ็มบริโอ ซึ่งสามารถชักนำส่วนต่างๆ เจริญไปเป็นต้นพืชที่มีรากที่สมบูรณ์สำหรับการนำไปปลูกลงดินต่อไปได้

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. การเตรียมเนื้อเยื่อ

เป็นการนำชิ้นส่วนพืชจากต้นแม่พันธุ์ในส่วนของยอดอ่อนหรือตายอด เพื่อนำเข้ามาสู่กระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยส่วนของพืชนั้น สามารถนำมาได้จากหลายวิธี เช่น ยอดจากการปักชำทราย ยอดจากการติดตา ยอด Cutting และยอดจากต้นแม่พันธุ์โดยตรง ทั้งนี้ การได้ยอดจากการติดตา เป็นวิธีที่ยังนิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่มีข้อเสีย คือต้องใช้เวลานาน และต้องมีความชำนาญ อีกทั้ง ยังต้องมีต้นพันธุ์เพื่อใช้สำหรับการติดตาอีกด้วย

ในส่วนนี้จะขอกล่าวถึงการปักชำทราย ซึ่งเป็นการปฏิบัติการ ณ ห้องปฏิบัติการสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อ.อ.ป. ราชดำเนินนอก กทม. โดยมีรายละเอียด ดังนี้

โรงเรือนขนาดเล็ก

โรงเรือนขนาดเล็กสำหรับชำกิ่งด้วยทราย เพื่อจะทำให้ยอดที่สะสมอาหารนั้น แดกยอดที่มีความสมบูรณ์ พร้อมทั้งจะนำมาสู่ที่กระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สำหรับการปักชำทรายนี้ ถือว่าเป็นส่วนสำคัญอย่างหนึ่ง เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนของพืชจากต้นแม่พันธุ์ที่ต้องการขยายพันธุ์หรือปรับปรุงพันธุ์ มาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้จำนวนมาก และมีลักษณะเหมือนต้นแม่พันธุ์ทุกประการ ทำให้ได้สายต้นที่มีลักษณะที่ดี ตรงตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ ซึ่งสามารถต่อยอดเพื่อปลูกเป็นสวนผลิตเมล็ดพันธุ์ต่อไป

อุปกรณ์

1. กิ่งแม่พันธุ์ (ตายอด/ตาข้าง)
2. ทรายขนาด 10 นิ้วขึ้นไป
3. ทราย
4. โรงเรือน
 - 4.1 ตาข่ายกันแสง/สแลน 50%-80%
 - 4.2 Timer
 - 4.3 สเปรย์หมอกรดน้ำต้นไม้

ขั้นตอนการนำกิ่งมาชำทราย

1. เตรียมกิ่งแม่พันธุ์ที่ต้องการ
(กิ่งแม่พันธุ์ต้องมีตาข้าง/ตายอด และไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไป ควรตัดด้วยยาวประมาณ 50-80 เซนติเมตร)
2. ปักกิ่งแม่พันธุ์ที่ต้องการลงทรายที่เตรียมไว้ โดยปักลึกไปประมาณ 20 เซนติเมตร จำนวน 3-5 กิ่งเท่านั้น เพื่อไม่ให้แน่นทรายจนเกินไป (ทรายควรเป็นทรายที่สะอาด มีการตากแดดเพื่อฆ่าเชื้อในเบื้องต้น)
3. ให้น้ำทุกๆ 1 ชั่วโมง นาน 1 นาที (โดยใช้ Timer ตั้งเวลาเพื่อสเปรย์หมอกรดน้ำ)

เทคนิคในขั้นตอนการปักชำทราย

1. หลังจากปักกิ่งแม่พันธุ์แล้วลงในกระถางแล้ว ไม่ควรขยับตัวกิ่งแม่พันธุ์ หรือย้ายกระถางเด็ดขาด เนื่องจากกิ่งแม่พันธุ์มีความไวต่อการติดเชื้อ
2. ควรปักให้ห่างกันประมาณหนึ่ง นิ้วไม่ให้ชิดหรือแน่นมากเกินไป ทั้งนี้ ให้พิจารณาตามความเหมาะสม เพื่อจะตัดยอดที่แตกออกมาได้อย่างสะดวก
3. ในฤดูฝนเป็นฤดูที่ควรหลีกเลี่ยงจากชำทราย เนื่องจากเสี่ยงการติดเชื้อราที่มาจากน้ำฝน



2. การเตรียมอาหาร

เป็นการนำธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการในการเจริญเติบโต และธาตุอาหารรองมาผสมกับวัจนฮอร์โมนพืช วิตามิน น้ำตาล และบางกรณีอาจมีการเติมผงถ่านด้วย ในอัตราส่วนที่เหมาะสมแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง สิ่งที่สำคัญมากอย่างหนึ่งคือองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชชนิดนั้นๆ ซึ่งต้องประกอบด้วยอาหารที่พืชสามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

1. สารอนินทรีย์ ได้แก่ ธาตุอาหารหลักคือ ธาตุอาหารที่พืชจำเป็นต้องใช้ในปริมาณมาก เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม กำมะถัน แคลเซียม แมกนีเซียมและกำมะถัน และธาตุอาหารรองหรือธาตุอาหารที่พืชจำเป็นต้องใช้ในปริมาณน้อย เช่น เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดง โมลิบดีนัม โบรอน ไอโอดีน โคบอล คลอรีน
2. สารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และ ออกซิเจน (O) แบ่งออกได้หลายกลุ่ม คือ
 - 2.1 น้ำตาล
 - 2.2 วิตามิน ชนิดที่มีความสำคัญ ได้แก่ Thiamine Pyridoxine Nicotinic acid
 - 2.3 กรดอะมิโน ได้แก่ ไกลซีน
 - 2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ ออกซิน ไซโตไคนิน จิบเบอเรลลิน
 - 2.5 สารอินทรีย์พวกอินซูลิน อะดีนีน ช่วยส่งเสริมให้เกิดยอด
 - 2.6 วัจน เป็นเพียงส่วนที่ทำให้อาหารแข็ง หรือกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่พอจะพุงเนื้อเยื่อพืชไม่ให้จมอยู่ในอาหาร
 - 2.7 ผงถ่าน เพื่อดูดสารพิษที่พืชสร้างขึ้นมา ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช (ถ้ามี)

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบ่งออกเป็น 4 สูตรอาหารหลัก

1. อาหารสำหรับหลังจากการฟองฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ
2. อาหารสำหรับขยายกอลชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ
3. อาหารสำหรับยึดยอด
4. อาหารสำหรับออกราก

อุปกรณ์ในการทำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. เครื่องแก้วต่างๆ ไตแก๊ว ปีกเกอร์ ปเปตต์ จานเพาะเชื้อ กระบอกตวงขวด (Cylinder)
2. สารเคมีต่างๆ
 - 2.1 สารเคมีที่ไซเตรียมสูตรอาหารต่างๆ
 - 2.2 สารเคมีที่ควบคุมการเจริญเติบโต
 - 2.3 น้ำตาลทรายขาว
 - 2.4 วุ้น (Agar Agar) ตรานางฟ้า
 - 2.5 ผงถ่าน
3. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
4. เต้าไฟฟ้า
5. หม้อสำหรับต้มอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และกระบวยตัก

การเตรียมสารละลายเข้มข้น (Stock)

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช โดยสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น MS (Murashige and Skoog) และ Woody Plant สำหรับการเลือกสูตรอาหารมาใช้จะต้องคำนึงถึงความเหมาะสมกับพืชและวัตถุประสงค์ในการศึกษา ปัจจุบันนิยมเตรียมในรูปแบบสารละลายเข้มข้น ซึ่งสะดวกต่อการใช้งาน โดยทั่วไป การเตรียมสารละลายจะเตรียมในขวดสีชา และนำสารละลายดังกล่าวแช่ตู้เย็น เพื่อเป็นการยืดอายุการใช้งานของสารละลาย



ขั้นตอนทำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. เตรียมสารละลายเข้มข้น (Stock) ด้วยความเข้มข้นต่างๆ ตามสูตรของสารละลายเข้มข้น (Stock) ที่ต้องการ ในขวดแก้วสีชา และนำแช่ตู้เย็น เพื่อยืดอายุการใช้งานของสารเคมี
2. ผสมสารละลายเข้มข้น (Stock) ตามสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต้องการ ด้วยกระบอกตวง (Cylinder) เพื่อความแม่นยำ ใส่น้ำตาล และปรับปริมาตรให้เป็นไปตามสูตรอาหารนั้นๆ
3. หลังจากปรับปริมาตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว ต้องทำการวัดความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งควรมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ระหว่าง 5.7-5.8 เท่านั้น โดยสามารถใช้กรด (1 Normal HCL) และเบส (1 Normal NaOH) เพื่อปรับให้ได้ความเป็นกรด-ด่าง ที่ต้องการ
4. หลังจากที่ได้ความเป็นกรด-ด่าง ที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานแล้ว ก็ให้ใส่วุ้น และผงถ่าน (ถ้ามี) ลงไป แล้วผสมให้เข้ากัน
5. นำสารละลายดังกล่าวมาต้มให้เดือด โดยต้องคนตลอดเวลา เพื่อไม่ให้วุ้นติดกันหม้อ
6. เมื่อเดือดได้ที่ให้นำสารละลายดังกล่าว มาเทใส่ขวดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทันทีขณะที่ยังร้อน
7. ควรเทอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลงขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประมาณ 1-2 เซนติเมตร ของขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หากเทอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมากเกินไปจะทำให้เป็นการเพิ่มค่าใช้จ่าย ในทางกลับกันหากเทอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อน้อยเกินไป ก็จะทำให้ไม่สามารถปักชิ้นส่วนพืชลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้
8. หลังจากอาหารแข็งตัว ให้ทำการปิดฝา และนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) โดยทั่วไปจะใช้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เพื่อฆ่าเชื้ออีกครั้ง (หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) มีหลายประเภท แล้วแต่การใช้งาน ซึ่งเวลาที่เหมาะสมสำหรับการฆ่าเชื่อนั้น คือ 15-20 นาที เท่านั้น)
9. หลังจากครบกำหนดเวลาแล้วให้นำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกจากหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ซึ่งระหว่างการนำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้องระวังการหกเลอะปากขวดของอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อป้องกันการเสี่ยงติดเชื้อ หลังจากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแข็งตัวให้นำเข้าห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

เทคนิคสำหรับการทำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. การชั่งสารเคมี

เครื่องชั่งสำหรับชั่งสารเคมีควรมีอย่างน้อย 3 ประเภท

เพื่อชั่งสารเคมีให้เหมาะสมกับเครื่องชั่งที่มีอยู่ เพื่อความแม่นยำของสารเคมีที่ใช้ อีกทั้งยังเป็นการถนอมเครื่องชั่งอีกทางหนึ่งด้วย

- เครื่องชั่งที่สามารถชั่งสารเคมี 1 g – 1,000 g
- เครื่องชั่งที่สามารถชั่งสารเคมี (สองตำแหน่ง) 0.01 g – 500 g
- เครื่องชั่งที่สามารถชั่งสารเคมี (สี่ตำแหน่ง) 0.0001 g- 0.1 g

2. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

2.1 ควรทำการ calibrate ให้เรียบร้อยก่อนใช้ซึ่งก่อนและหลังการใช้ทุกครั้ง ต้องทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นให้เรียบร้อย เช็ดให้แห้งทุกครั้ง

2.2 ควรวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง หลังจากปรับปริมาณให้ได้ตามจำนวนที่ต้องการ ก่อนการใส่วุ้นและผงถ่าน

3. สารละลายเข้มข้น

3.1 ควรตรวจสอบสารละลายเข้มข้นในกระบอกตวง (Cylinder) ที่เหมาะสมกับปริมาณที่ต้องการเท่านั้น เช่น เมื่อต้องการสารละลายเข้มข้นปริมาณ 5 มิลลิลิตร ควรใช้กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 10 มิลลิลิตรมิใช่กระบอกตวงขนาด 25 มิลลิลิตร หรือ 50 มิลลิลิตร เพื่อความแม่นยำของปริมาตรสารละลายเข้มข้น

3.2 ระหว่างการตวงสารละลายเข้มข้นจากขวด Stock เพื่อทำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรต่างๆ แล้ว หากเทเกินปริมาตรที่ต้องการ ต้องหาภาชนะรองรับเพื่อทิ้งเท่านั้น ไม่ควรเทใส่ขวด Stock ขวดเดิมเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารละลายเข้มข้น

3.3 สารละลายเข้มข้น ควรใช้ขวดสีชา และเก็บไว้ในตู้เย็น เท่านั้น

3.4 ควรมีตู้เย็นเพื่อแช่สารเคมีโดยเฉพาะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารละลาย โดยไม่ควรแช่อาหารร่วมกับสารเคมี

4. การเทอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลงขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ต้องใช้ปิ๊กเกอร์ที่มีขอบปากป้องกันการหกของสารละลาย และระหว่างการเทอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลงขวด สิ่งที่สำคัญสำหรับขั้นตอนนี้คือ ห้ามให้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเลอะปากขวดเด็ดขาด เพื่อป้องกันการติดเชื้อ หากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเลอะปากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควรเปลี่ยนขวดทันที ไม่ควรนำขวดดังกล่าวมาใช้ต่อ ซึ่งการเทอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ควรเทให้ห่างจากปากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยไม่ให้ปิ๊กเกอร์สัมผัสกับปากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเด็ดขาด



3. การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อและการนำเนื้อเยื่อลงขวดเลี้ยง

เป็นวิธีการใช้สารเคมีหรือวิธีการต่างๆ ที่ทำให้ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ และการนำเอาชิ้นส่วนของพืชที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว วางลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อ โดยใช้เครื่องมือและปฏิบัติการในห้องหรือตู้ปลอดเชื้อโดยเฉพาะ

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช นิยมใช้ 2 วิธี ได้แก่

1. การใช้สารเคมี เป็นวิธีที่ใช้ได้อย่างกว้างขวาง โดยเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นตามลักษณะของเนื้อเยื่อพืช เหมาะกับเนื้อเยื่อที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เช่น ใบ ตายอด หรือตาข้าง สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อพืชมีหลายชนิดแต่ที่นิยมใช้ ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol) และ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (Sodium Hypochloride) หรือคลอโรกซ์ (Clorox)
2. การเผาไฟ มีข้อจำกัดในการเลือกใช้ เนื่องจากความร้อนจากไฟจะทำลายเนื้อเยื่อพืชจึงเหมาะกับอวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่มีส่วนห่อหุ้มหนาหรือแข็งแรง เช่น เมล็ด เนื้อเยื่อทอลำเลี้ยง เป็นต้น

อุปกรณ์สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช

1. เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ บีกเกอร์ ปเปตต์ จานเพาะเชื้อ กระบอกตวงขวด (Cylinder)
2. สารเคมีต่างๆ
 - 2.1 สารเคมีที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อพืช เช่น คลอโรกซ์ เอทิลแอลกอฮอล์ เมอคิวริก คลอไรด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
 - 2.2 เอทิลแอลกอฮอล์ 70%
 - 2.3 น้ำยากันเชื้อรา (ถ้ามี)
3. ชิ้นส่วนจากต้นแม่พันธุ์ในส่วนของยอดอ่อนหรือตายอด
4. ขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
 - 4.1 ขวดแก้วเปล่า จำนวน 1 ขวด
 - 4.2 ขวดแก้วที่มีน้ำสะอาดปริมาณ 90 ml จำนวน 1 ขวด
 - 4.3 ขวดแก้วที่มีน้ำสะอาดปริมาณ 120 ml จำนวน 3 ขวด

วิธีการพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพีช

เนื้อเยื่อพีชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงนั้นจะต้องผ่านการฆ่าเชื้อ เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ที่อาจติดอยู่ที่บริเวณผิวของเนื้อเยื่อพีชออกเสียก่อนด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ ซึ่งสารเคมีที่ในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่นิยมใช้คือ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (Sodium Hypochloride), คลอโรกซ์ (Clorox) และ เมอร์คิวริก คลอไรด์ (Mercuric Chloride) โดยอัตราส่วนที่ใช้คือ คลอโรกซ์ (Clorox) 8-10 % หรือ เมอร์คิวริก คลอไรด์ (Mercuric Chloride) 0.1 กรัม ผสมกับ tween-20 ขึ้นตอนมีดังนี้

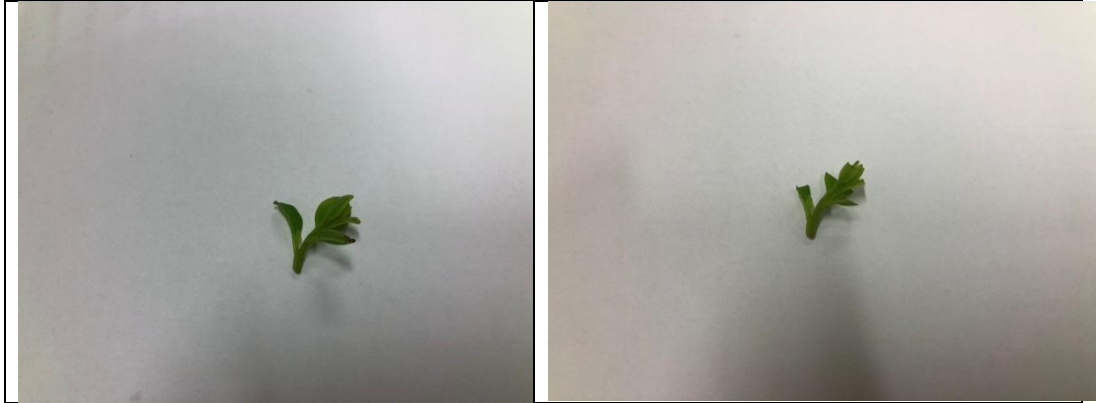
1. ตัดชิ้นส่วนของยอดหรือตาข้างมาทำการรีบไบออกเล็กน้อย หลังจากนั้นแช่ Ethyl Alcohol 70% เป็นเวลา 10-15 วินาที เพื่อล้างคราบแป้งหรือสิ่งสกปรกต่างๆ ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเบื้องต้น
2. แช่ชิ้นส่วนพีชในสารละลายคลอโรกซ์ (Clorox) ความเข้มข้น 8-10 % หรือ เมอร์คิวริก คลอไรด์ (Mercuric Chloride) 0.1 กรัม ต่อน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 90 มิลลิลิตร
3. เติม tween-20 ในอัตราส่วน 5-10 หยด ต่อน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เพื่อลดแรงตึงผิวและช่วยให้สารละลายสามารถจับกับผิวพีชได้ดี
3. ทำการเขย่าประมาณ 10-15 นาที (เขย่าตลอดเวลา) หรืออาจใช้เครื่องเขย่า
4. ล้างเอาสารละลายออกด้วยน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 120 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที ภายในตู้ปลอดเชื้อ
5. ทำการตัดแต่งชิ้นส่วนพีช เพื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

อุปกรณ์นำเนื้อเยื่อลงขวดเลี้ยง

1. จานเพาะเชื้อ หรือกระดาษ A4 ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
2. ตะเกียงแอลกอฮอล์
3. แร่ควางอุปกรณ์ภายในตู้ปลอดเชื้อ
4. มีดผ่าตัด (ประมาณ 3-4 ชุด)
5. ฟอเซปสายฟ้า (ประมาณ 3-4 ชุด)
6. กรรไกรปลายโค้ง
7. ผ้าสะอาดที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
8. ตู้ปลอดเชื้อ

วิธีการนำเนื้อเยื่อลงขวดเลี้ยง

1. หลังจากทำการตัดแต่งชิ้นส่วนพืชแล้ว ให้ทำการปักชิ้นส่วนเนื้อเยื่อนั้นๆ ลงไปในอาหารสำหรับหลังจากการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ จำนวน 1 ชิ้น ต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



2. หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารสำหรับฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ให้ทำการย้ายชิ้นส่วนเนื้อเยื่อออกจากขวดมายังขวดอาหารสำหรับขยายกต่อไป เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์
3. เมื่อสังเกตเห็นว่าภายในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการแตกออกเป็นจำนวนมาก มีลักษณะสีเขียวสดขึ้นให้ทำการย้ายชิ้นส่วนเนื้อเยื่อลงไปในอาหารสำหรับแตกกอ เพื่อขยายจำนวนเนื้อเยื่อและบางส่วนลงในอาหารสำหรับยึดยอด เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ (ให้ผู้ปฏิบัติการพิจารณาตามเหมาะสม)
4. เมื่อเนื้อเยื่อในอาหารสำหรับยึดยอด มีความยาว 5-8 เซนติเมตร ให้ทำการตัดยอดเพื่อนำมาอาหารสำหรับยึดยอดอีกครั้ง
5. เมื่อผ่านไปประมาณ 4-6 สัปดาห์ ให้นำไปเนื้อเยื่อออกจากขวดอาหารสำหรับยึดยอดมาใส่ในอาหารออกรากต่อไป
6. หลังจากเนื้อเยื่ออยู่ในอาหารสำหรับออกรากแล้ว จะสังเกตเห็นรากแขนง และรากฝอย เมื่อลักษณะที่แข็งแรงพร้อมแล้ว ให้นำขวดออกไปสู่โรงเรือนได้

หมายเหตุ

1. คลอโรกซ์ (Clorox) สามารถใช้สารทดแทนคือ ไฮเตอร์
2. tween-20 สามารถใช้สายทดแทนคือ ซัลไลต์
3. ตั้งแต่ขั้นตอนที่ 4 เป็นต้นไป ต้องปฏิบัติการภายในตู้ปลอดเชื้อเท่านั้น
4. ต้องทำความสะอาดตู้ปลอดเชื้อด้วย Alcohol 70%

เทคนิคสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชและการนำเนื้อเยื่อลงขวดเลี้ยง

1. ในการตัดชิ้นส่วนของยอดจากต้น/กิ่งแม่พันธุ์นั้น ควรเลือกยอดที่ไม่มีลักษณะอ่อนหรือแก่จนเกินไป ในปริมาณที่เหมาะสมไม่มากหรือน้อยเกินไป ประมาณ 15-20 ชิ้นส่วนเท่านั้น
2. ตู้อบลอดเชื้อ
 - 2.1 ก่อนจะนำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และอุปกรณ์ต่างๆ เข้าสู่ตู้อบลอดเชื้อนั้น ต้องทำความสะอาดสะอาดมือ และขวดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ และอุปกรณ์ต่างๆ ดังกล่าว ด้วย Alcohol 70% ก่อน
 - 2.2 อุปกรณ์ภายในตู้อบลอดเชื้อ เช่น มีดผ่าตัด กรรไกรสายฟ้า ฟอเซป ต้องทำการเผาด้วย Alcohol 95% จำนวน 5 ครั้ง หลังจากนั้นเผาด้วย Alcohol 70% เพื่อเป็นการฆ่าเชื้ออุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
 - 2.3 อุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น มีดผ่าตัด กรรไกรสายฟ้า ฟอเซป ให้ใช้ 1 ครั้งต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นให้ทำความสะอาดด้วยการนำอุปกรณ์ไปแช่ Alcohol 70% เป็นเวลาอย่างน้อย 30 วินาที แล้วเผา
 - 2.4 ควรมีผ้าสะอาดที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ซุปด้วย Alcohol 70% ให้หมดตลอดเวลา เพื่อทำความสะอาดตู้อบลอดเชื้อ และเช็ดทำความสะอาดอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
 - 2.5 ไม่ควรให้อุปกรณ์ภายในตู้อบลอดเชื้อสัมผัสมือโดยตรง เช่น บริเวณใบมีด บริเวณปลายกรรไกรสายฟ้า บริเวณปลายฟอเซปที่ใช้จับชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ ไม่ควรสัมผัสกับมือเด็ดขาด ซึ่งหากสัมผัสถูกมือโดยตรง ต้องนำอุปกรณ์ไปแช่ Alcohol 70% เป็นเวลาอย่างน้อย 30 วินาที แล้วเผาเพื่อเป็นการฆ่าเชื้อ
3. งานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
 - 3.1 งานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้สำหรับตัดแต่งชิ้นส่วนเนื้อเยื่อสามารถใช้กระดาษ A4 ที่ยังไม่ได้ใช้งาน นำไปอบฆ่าเชื้อทดแทนได้
 - 3.2 การใช้งานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควรใช้สำหรับชิ้นส่วนเนื้อเยื่อจำนวนไม่มาก (ผู้ปฏิบัติงานสามารถดูความเหมาะสมของการใช้งาน) ในการสับชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ 1 ครั้ง ต้องไม่สับชิ้นส่วนเนื้อเยื่อบริเวณเดิมซ้ำๆ กันเพื่อป้องกันการติดเชื้อ และระหว่างการ sub ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อนั้น หากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อไม่ได้อยู่ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ชิ้นส่วนนั้นไม่ควรนำมาลงขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพราะเสี่ยงต่อการติดเชื้อ

4. การย้ายกล้ามเนื้อเยื่อออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปสู่วัสดุ

เป็นขั้นตอนที่สำคัญอย่างหนึ่งที่จะบ่งบอกถึงความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งคือการนำกล้ามเนื้อเยื่อที่มีรากและลำต้นที่สมบูรณ์แข็งแรง โดยนำกล้ามเนื้อเยื่อออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และนำไปอนุบาลในโรงเรือน หลังจากกล้ามเนื้อเยื่อปรับตัวกับและเข้ากับสภาพแวดล้อมได้แล้ว แล้วนำไปปลูกในพื้นที่ที่ต้องการ เพื่อประโยชน์ตามวัตถุประสงค์ต่อไป

อุปกรณ์การย้ายกล้ามเนื้อเยื่อออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. ฟอเซปสายฟ้า
2. น้ำยาเร่งราก
3. น้ำกันเชื้อรา (ถ้ามี)
4. ภาชนะในการชำกล้ามเนื้อเยื่อ
5. วัสดุสำหรับการชำกล้ามเนื้อเยื่อ
6. โรงเรือน
 - 6.1 ตาข่ายกันแสง/สแลน 50%-80%
 - 6.2 Timer
 - 6.5 สเปรย์หมอกรดน้ำต้นไม้

วิธีการย้ายกล้ามเนื้อเยื่อออกจากขวดเพาะเลี้ยง

1. นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีกล้ามเนื้อเยื่อที่มีรากและลำต้นที่สมบูรณ์แข็งแรง (สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) โดยกล้ามเนื้อเยื่อจะอยู่ในอาหารสูตร R (อาหารสูตรออกราก) ไปทำการฝั่งขวดในพื้นที่ที่มีอากาศถ่ายเทสะดวก โดยเปิดฝาขวดเล็กน้อย เพื่อให้กล้ามเนื้อเยื่อสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพสิ่งแวดล้อมเป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์
2. หลังผ่านไป 1 สัปดาห์ในนำกล้ามเนื้อเยื่อมาล้างทำความสะอาดวันออกด้วยสะอาดอย่างระมัดระวัง เพื่อป้องกันไม่กล้ามเนื้อเยื่อชำ และรากหักหรือขาด ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญเติบโต
3. นำกล้ามเนื้อเยื่อจุ่มน้ำยาเร่งรากเป็นเวลา 10 วินาที โดยระวังไม่ให้น้ำยาโดนใบของกล้ามเนื้อเยื่อ
4. นำกล้ามเนื้อเยื่อปลูกลงในวัสดุปลูกที่จัดเตรียมไว้ภายในโรงเรือนที่ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม โดยใช้ของแถมแหว่งวัสดุปลูกให้เป็นรูขนาดใหญ่พอสมควร เพื่อให้ง่ายต่อการเพาะปลูก ระวังอย่าให้ต้นกล้ามเนื้อเยื่อชำ และรากหักหรือขาดเด็ดขาด
5. ให้น้ำทุกๆ 1 ชั่วโมง นาน 1 นาที (โดยใช้ Timer ตั้งเวลาเพื่อสเปรย์หมอกรดน้ำ) จนกว่ากล้ามเนื้อเยื่อที่จะแข็งแรง และปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี โดยสามารถปรับเวลาให้น้ำได้ตามความเหมาะสม
6. นำกล้ามเนื้อเยื่อที่แข็งแรง ออกจากโรงเรือนอนุบาล ไปปลูกลงในแปลงเพื่อประโยชน์ตามวัตถุประสงค์ต่อไป

เทคนิคสำหรับการย้ายกล้ามเนื้อเยื่อออกจากขวดเพาะเลี้ยง

1. การสัมผัสกล้ามเนื้อเยื่อควรระมัดระวังเป็นอย่างยิ่ง เพื่อป้องกันกล้ามเนื้อเยื่อฉีก และรากลึกหรือขาด เพราะจะทำให้กล้ามเนื้อเยื่อเกิดการเจริญเติบโตและอาจตายได้
2. โรงเรือนที่ใช้อนุบาลกล้ามเนื้อเยื่อ จะต้องมีการควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ให้เหมาะสมกับกล้ามเนื้อเยื่อ
3. โรงเรือนเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะต้องมีการนำสแลนออกตามระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อเปิดให้กล้ามเนื้อเยื่อได้รับแสง ให้กล้ามเนื้อเยื่อแข็งแรง และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้
4. การให้น้ำกล้ามเนื้อเยื่อนั้น ต้องให้เหมาะสม ไม่มากหรือน้อยจนเกินไป เนื่องจากกล้ามเนื้อเยื่อยังที่ออกมาจากขวดในระยะแรกๆ มีความอ่อนแออย่างมาก