บทปฏิบัติการที่ 10
เรื่อง พืชปลอดไวรัส

เมื่อพืชมีการปนเปื้อนจากไวรัสจะส่งผลให้ความแข็งแรงของพืชลดลง และอาจจะปรากฏอาการใบเหลือง ใบม้วน ใบหรือดอกเป็นขีดสีขาว และที่สำคัญผลผลิตจะลดลง ปัจจุบันพืชเศรษฐกิจหลายชนิดประสบปัญหาการติดเชื้อไวรัส แต่ยังไม่มีสารเคมีหรือวิธีการใดที่จะขจัดปัญหานี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามไวรัสจะไม่มีการแพร่กระจายผ่านทางเมล็ดพันธุ์ ดังนั้นพืชที่มีการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศจึงไม่ประสบปัญหาไวรัสรุนแรงนัก แต่ในกรณีของพืชที่จำเป็นต้องใช้การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะมีอัตราการติดเชื้อไวรัสสูงมาก ดังที่พบในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น มันฝรั่ง กระเทียม สับปะรด กล้วยไม้ คาร์เนชัน กล้วย และ สตรอเบอรี่ เป็นต้น

การนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้เพื่อแก้ปัญหาไวรัส จึงเป็นทางเลือกที่มีโอกาสประสบความสำเร็จได้สูง โดยมีวิธีการที่นิยมในปัจจุบัน 2 วิธี ได้แก่ การใช้ความร้อน (thermo therapy; heat treatment) และ การเพาะเลี้ยงปลายยอด (meristem-tip culture) เนื่องจากส่วนของปลายยอดและจุดกำเนิดใบ (leave primordia) เป็นเนื้อเยื่อเจริญส่วนที่ยังไม่มีท่อลำเลียงจึงปลอดจากไวรัสที่มีการแพร่กระจายผ่านทางระบบท่อลำเลียง แต่อย่างไรก็ตามในการตัดแยกชิ้นส่วนจะต้องทำด้วยความระมัดระวัง มิให้มีการสัมผัสกับเนื้อเยื่อส่วนอื่นซึ่งจะเป็นพาหะของไวรัสได้ สำหรับเทคนิคการใช้ความร้อนอาจใช้ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงปลายยอด หรือจะใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียวก็ได้ โดยการนำพืชไปไว้ในสภาพที่มีการควบคุมอุณหภูมิสูง เช่น แช่ในน้ำร้อน หรือ วางใน growth chamber เพื่อกระตุ้นให้พืชมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วพร้อมกับเป็นการยับยั้งการเจริญของไวรัส แล้วจึงตัดส่วนปลายยอดไปเพาะเลี้ยง

โดยแท้จริงแล้วความหมายของ meristem culture คือการเพาะเลี้ยงส่วนของ apical dome โดยปราศจากจุดกำเนิดใบ ซึ่งในการปฏิบัติจะทำได้ยากมาก เนื่องจากชิ้นส่วนจะมีขนาดเล็ก ต้องการความชำนาญและเครื่องมือพิเศษ เช่น ใบมีดที่ทำจากแก้ว หรือ razer blade silvers ดังนั้นโดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงปลายยอดจึงอาจมีส่วนของจุดกำเนิดใบ ประมาณ 2-4 ใบติดมาด้วย เพื่อให้สามารถทำงานได้สะดวกยิ่งขึ้นและชิ้นส่วนพืชจะมีโอกาสรอดชีวิตและเจริญพัฒนาต่อไปได้ง่ายขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อฝึกเทคนิคการผลิตพืชปลอดไวรัส
2. เพื่อศึกษาการพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

อุปกรณ์

1. พืชตัวอย่าง เช่น ต้นมันฝรั่งในสภาพปลอดเชื้อ (จากบทปฏิบัติการที่ 6)
2. อุปกรณ์ในตู้ปลอดเชื้อ ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว ผ้า ตะเกียงแอลกอฮอล์
3. กล้องจุลทรรศน์แบบเสตอริโอ
3. อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม kinetin 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (เตรียมใส่จานแก้ว)

วิธีการ

1. ตัดส่วนยอดของมันฝรั่งในสภาพปลอดเชื้อจากข้อที่ 3-4 วางบนกระจกไสลด์
2. นำไปวางใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วตัดแยกส่วน apical meristem ที่มีส่วนของ leaf primordial ประมาณ 2-4 ใบ (ขนาดประมาณ 0.3-0.7 มิลลิเมตร)
3. นำ apical meristem วางบนอาหาร ปิดฝาจานแก้วแล้วพันขอบด้วยพาราฟิล์มให้สนิท
4. นำจานแก้วที่ใส่เนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีความยาวช่วงแสง 16 ชั่วโมง และมืด 8 ชั่วโมง
5. เปลี่ยนถ่ายอาหารทุก 4 สัปดาห์ จนกระทั่งยอดเจริญเติบโตขนาดประมาณ 6 ข้อ
6. นำยอดที่ได้ไปทำการตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิค ELISA

บันทึกผลการทดลอง

1. การปนเปื้อน ลักษณะและสาเหตุของการปนเปื้อน
2. การเจริญเติบโตของปลายยอด จำนวนข้อ และความยาวยอด
3. ผลการตรวจ ELISA

หมายเหตุ บันทึกผลการทดลองทุกวันจนครบ 8 สัปดาห์

ผลการทดลอง

พืชตัวอย่าง : ชื่อวิทยาศาสตร์.....ชื่อสามัญ.....
ชิ้นส่วนเริ่มต้น .....สูตรอาหาร.....
วันที่ทำการทดลอง.....ผู้ทดลอง.....

สัปดาห์ที่	การปนเปื้อน		การเจริญเติบโต		ผลการตรวจ ELISA
	(%)	สาเหตุ	จำนวน (ข้อ)	ความยาว (cm)	
2					
4					
6					
8					

สรุปผลการทดลอง

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

คำถามท้ายบท

1. พืชปลอดไวรัสมีความสำคัญอย่างไร เหตุใดจึงต้องมีการผลิตพืชปลอดไวรัส ?

.....

.....

.....

.....

.....

2. อะไรเป็นสาเหตุของการแพร่กระจายพันธุ์พืชปนเปื้อนไวรัสในธรรมชาติ ?

.....

.....

.....

.....

.....

3. การเพาะเลี้ยง apical meristem มีอัตราการรอดชีวิตต่ำเพราะอะไร มีวิธีการแก้ไขอย่างไร ?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

4. การผลิตพืชปลอดไวรัสโดยเทคนิคการใช้ความร้อน มีหลักการอย่างไร ?

.....

.....

.....

.....

.....