

บทปฏิบัติการที่ 4

เรื่อง การเตรียมชิ้นส่วนพืชและการฟอกฆ่าเชื้อ

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

ในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีขั้นตอนที่สำคัญซึ่งมักถูกละเลยไป คือการเตรียมต้นพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น (explant) เพื่อนำไปสู่กระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีประสิทธิภาพต่อไป สำหรับการเตรียมชิ้นส่วนพืชนั้นควรให้ความสำคัญของต้นพืชตั้งแต่มีสภาพธรรมชาติจนถึงขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช ซึ่งมีหลักการพื้นฐานที่ควรปฏิบัติให้เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างต้นพันธุ์ ดังต่อไปนี้

1. สำหรับพืชที่ปลูกในพื้นที่ธรรมชาติ ควรหลีกเลี่ยงการตัดชิ้นส่วนพืชในวันที่มีสภาพบรรยากาศชื้นโดยเฉพาะในวันที่มีฝนตก
2. งดการให้น้ำและปุ๋ยตามปกติอย่างน้อยประมาณ 3-5 วัน หรือใช้วิธีรดน้ำที่บริเวณโคนต้นระวังอย่าให้สัมผัสกับส่วนของพืชที่จะใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น
3. เลือกต้นพันธุ์ที่ปราศจากโรคหรือแมลงรบกวน
4. ควรใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นให้เหมาะสมกับชนิดและจุดประสงค์ของงาน ที่สำคัญควรเลือกใช้ชิ้นส่วนพืชที่มีความเยาว์วัย (juvenile)

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช

เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อมีหลายวิธี การเลือกใช้ควรคำนึงถึงความเหมาะสมของเนื้อเยื่อพืชและความสะดวกในการปฏิบัติงาน วิธีที่นิยมใช้โดยทั่วไปมี 2 วิธี ได้แก่

1. การใช้สารเคมี เป็นวิธีการที่ใช้ได้อย่างกว้างขวาง โดยเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นตามลักษณะของเนื้อเยื่อพืช เหมาะกับเนื้อเยื่อที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เช่น ใบ ตายอดหรือตาข้าง สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อพืชมีหลายชนิด (ตารางผนวกที่ 4) แต่ที่นิยมใช้ ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ และโซเดียมไฮโปคลอไรด์ที่รู้จักกันในชื่อการค้าคือ คลอรอกซ์
2. การเผาไฟ มีข้อจำกัดในการเลือกใช้ เนื่องจากความร้อนจากไฟจะทำลายเนื้อเยื่อพืชจึงเหมาะกับอวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่มีส่วนห่อหุ้มหนาหรือแข็งแรง เช่น เมล็ด เนื้อเยื่อท่อลำเลียง (vascular cambium) เนื้อเยื่อใจกลางลำต้น (pith) เป็นต้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมต้นพันธุ์และคัดเลือกชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นให้เหมาะสม
2. เพื่อศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อและเทคนิคการตัดแยกชิ้นส่วนพืช
3. เพื่อฝึกตรวจสอบเนื้อเยื่อพืชที่มีการรอดชีวิตและการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์

อุปกรณ์

1. ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น (explant) ได้แก่ หัวแครอท (*Daucus carota* L.)
2. สารเคมีในการฟอกฆ่าเชื้อ เช่น คลอโรกซ์ ทวิน 20 แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
3. น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว
4. อุปกรณ์ในตู้ปลอดเชื้อ ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์ ผ้า
5. อาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS

วิธีการ

1. ฟอกฆ่าเชื้อแครอทด้วยวิธีการดังนี้

1.1 การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี

- ล้างทำความสะอาดหัวแครอทด้วยน้ำสบู่ เพื่อกำจัดฝุ่นละอองหรือสิ่งสกปรกที่ติดอยู่ภายนอก แล้วตัดแต่งผิวภายนอกออกให้เรียบ

- ตัดหัวแครอทเป็นท่อนขนาดยาวประมาณ 2 เซนติเมตร

- แช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 1 นาที

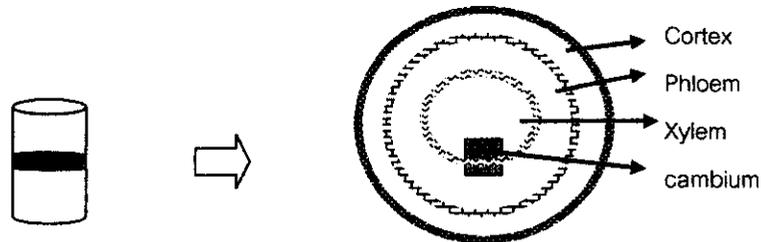
- เขย่าในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ผสมสาร ประมาณ 1-2 หยด เขย่านานประมาณ 15 นาที

- ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ ประมาณ 5 นาที

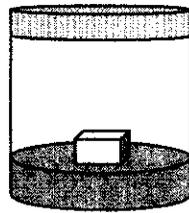
1.2 การเผาไฟ

- ล้างทำความสะอาดผิวสัมผัสภายนอก
- ตัดแต่งบริเวณผิวที่ขรุขระภายนอกให้เรียบ
- ตัดหัวแครอทเป็นท่อนขนาดยาวประมาณ 2 เซนติเมตร
- จุ่มแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วเผาไฟ 2 ครั้ง

2. ตัดเฉพาะชิ้นส่วนบริเวณ cambium ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร



3. นำชิ้นพืชลงเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS โดยกดให้ชิ้นพืชจมลงในอาหารบางส่วน



4. นำขวดเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส สภาพมืด

5. ตรวจสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์จนครบ 7 วัน พร้อมบันทึกผล

บันทึกผลการทดลอง

1. อัตราการรอดชีวิตและการตาย
2. อัตราการปนเปื้อน ลักษณะและสาเหตุของการปนเปื้อน
3. การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นและลักษณะทั่วไปของชิ้นส่วนพืช เช่น ขนาด และสี

หมายเหตุ บันทึกผลการทดลองทุกวันจนครบ 1 สัปดาห์

ผลการฟอกฆ่าเชื้อ

พืชตัวอย่าง : ชื่อวิทยาศาสตร์.....ชื่อสามัญ.....

ชิ้นส่วนเริ่มต้นสูตรอาหาร.....

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ.....

วันที่ทำการทดลอง.....ผู้ทดลอง.....

จำนวน วัน	การปนเปื้อน (%)	สาเหตุการปนเปื้อน (รา/แบคทีเรีย)	การตาย (%)	ลักษณะทั่วไป
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				

สรุปผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

คำถามท้ายบท

1. หากหลักการฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อพืชเปลี่ยนเป็นสีขาวหรือสีน้ำตาล แสดงว่าวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่ใช้เป็นอย่างไร ควรดำเนินการอย่างไร?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. ถ้าพบว่ามี การปนเปื้อนสูงมาก สันนิษฐานว่ามีสาเหตุจากอะไรได้บ้าง จงอธิบายพร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะ?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3. หลังจากฟอกฆ่าเชื้อแล้วชิ้นส่วนปลอดเชื้อ แต่ไม่มีการเจริญเติบโตและตายไปในที่สุด แสดงว่าเกิดจากสาเหตุใด มีวิธีแก้ไขอย่างไร ?

.....

.....

.....

.....

.....

.....