



# คู่มือปฏิบัติงาน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์จิง

โครงการจัดตั้งสถาบันอุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกงชาติ  
มหาวิทยาลัยมหิดล

# แนวทางการปฏิบัติงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิง

## การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture)

คือ การนำเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะของพืชที่ต้องการ เช่น ลำต้น ยอด ตาข้าง ดอก ใบ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมอุณหภูมิ แสง และความชื้น เพื่อให้ชิ้นส่วนเหล่านั้นสามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ และนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้

## โดยมีแนวทางการปฏิบัติงานเบื้องต้นดังนี้

1 วัน

### 1. การเตรียมชิ้นส่วนพืช

- ใช้ส่วนของต้น/เหง้า ของพืชวงศ์ขิง ที่มีตาข้างหรือจุดเจริญเพื่อชักนำให้เป็นต้นและยอดต่อไปได้
- คัดเลือกต้นที่มีความแข็งแรง สมบูรณ์ ปลอดโรค และมีความสะอาด

1- 2 วัน

### 2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมและการทำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการเจริญของเนื้อเยื่อพืช
- เตรียมสารละลายเข้มข้น (Stock solution) ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) และ สารควบคุมการเจริญเติบโต BA (benzyl adenine)
- เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- นึ่งฆ่าเชื้ออุปกรณ์สำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (น้ำสะอาดนึ่งฆ่าเชื้อ/ กระจก/มีด/Forceps ฯลฯ)

1 วัน

### 3. การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิง

- ตัดแต่งชิ้นส่วนพืชแล้วนำไปล้างด้วยน้ำยาล้างจาน นาน 1 นาที
- นำชิ้นส่วนพืชไปฟอกด้วย แอลกอฮอล์ 70 % นาน 1 นาที
- ฟอกด้วยคลอรีนเมต (NaDCC) ประมาณ 1.25 กรัม ต่อน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที (ทำตุ้ปลอดเชื้อ)
- นำชิ้นส่วนพืชวางลงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA
- วางบนชั้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม

# แนวทางการปฏิบัติงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิง

## แนวทางการปฏิบัติงานเบื้องต้นดังนี้ (ต่อ)

2 - 3  
เดือน

### 4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิง

- โดยทั่วไป อุณหภูมิภายในห้องวางเนื้อเยื่ออยู่ที่ประมาณ 25 องศาเซลเซียส
- ให้แสงประมาณ 12 - 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มของแสง 1,000 - 3,000 lux
- ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช สังเกตการเปลี่ยนแปลง สังเกตการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

ไม่น้อยกว่า  
1 - 2  
วัน

(ขึ้นอยู่กับปริมาณพืช)

### 5. การย้ายเนื้อเยื่อและการเพิ่มจำนวนพืชวงศ์ขิงเพื่ออนุรักษ์พันธุกรรม หรือ นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

- เมื่อเนื้อเยื่อพืชเจริญเติบโตจนเต็มขวด (ประมาณ 2 - 3 เดือน ) ทำการย้ายเนื้อเยื่อพืช (Subculture) ลงในอาหารใหม่ (อาหารสูตร MS หรือ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต) เพื่อเพิ่มจำนวนต้นจนได้ปริมาณที่ต้องการ
- วางบนชั้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2 - 3  
เดือน

### 6. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิงและการนำออกปลูก

- เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนชั้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 - 3,000 lux 12 - 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
- เมื่อเนื้อเยื่อพืชเจริญเติบโตเต็มขวด (ประมาณ 2 - 3 เดือน ) นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

## หมายเหตุ

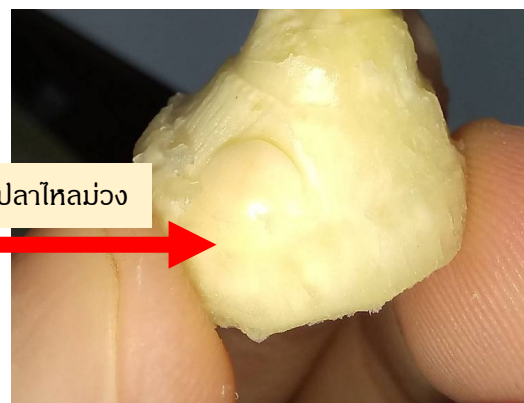
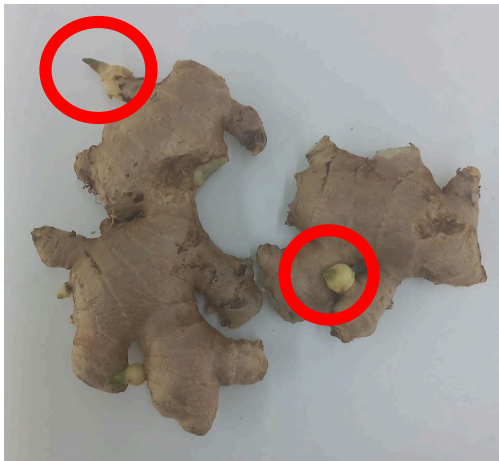
เมื่อเนื้อเยื่อพืชเจริญเติบโตเต็มขวด (2 - 3 เดือน) จะดำเนินการเปลี่ยนอาหารใหม่ (subculture) ทุกครั้ง เพื่อเก็บรักษาสายพันธุ์ไว้ในสภาพปลอดเชื้อ

# แนวทางการปฏิบัติงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิง

## 1. การเตรียมชิ้นส่วนพืช

ในการเตรียมชิ้นส่วนพืชวงศ์ขิงเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีแนวทางดังนี้

1. เก็บตัวอย่างพืช และคัดเลือกส่วนของ ต้น/เหง้า พืชวงศ์ขิงที่มีตาข้างหรือส่วนที่มีจุดเจริญเพื่อชั่งน้ำหนักเป็นต้นและยอดต่อไปได้
2. คัดเลือกชิ้นส่วนที่มีความแข็งแรง สมบูรณ์ปลอดโรค และมีความสะอาด เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์
3. หลีกเลี่ยงการเก็บตัวอย่างพืชในวันที่มีอากาศชื้นโดยเฉพาะวันที่มีฝนตก



ส่วนของเหง้า/ต้น ของพืชวงศ์ขิงที่นำฟอกฆ่าเชื้อ

# แนวทางการปฏิบัติงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิง

## 2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมและการทำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบไปด้วยธาตุอาหารในรูปของสารเคมีและถูกจัดเป็นกลุ่ม ๆ เพื่อง่ายต่อการชั่งและการละลาย ได้แก่กลุ่มธาตุอาหารที่พืชต้องการมาก กลุ่มธาตุอาหารที่พืชต้องการน้อย กลุ่มธาตุเหล็ก กลุ่มวิตามิน กลุ่มสารอินทรีย์ และกลุ่มสารควบคุมการเจริญเติบโต

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละครั้งจะต้องมีการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้พืชเกิดการเจริญเติบโตของพืช โดยการค้นคว้าจากบทความวารสารทางวิชาการ และเมื่อได้สูตรอาหารที่เหมาะสมจึงดำเนินการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) คืออาหารสังเคราะห์ที่เตรียมได้จากสารเคมีต่าง ๆ (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับใช้เพาะเลี้ยงพืชได้เกือบทุกชนิด

ตารางที่ 1: สูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962)

ชื่อสารเคมี	ปริมาณสาร (g/L)	
<b>ธาตุอาหารหลัก (Macroelement)</b>		
Ammonium nitrate ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	1.65	MS I (ธาตุอาหารหลัก)
Potassium nitrate ( $\text{KNO}_3$ )	1.9	
Potassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.17	
Magnesium sulfate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.37	
Calcium chloride ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.44	
<b>ธาตุอาหารรอง (Microelement)</b>		
Potassium iodide (KI)	0.00083	MS II (ธาตุอาหารรอง)
Boric acid ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	0.0062	
Manganese sulfate ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0.0223	
Zinc sulfate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.0086	
Sodium molybdate ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.00025	
Cupric sulfate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.000025	
Cobalt chloride ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.000025	
Ferrous sulfate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.0278	MS III (Chelated ion)
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0373	
<b>กลุ่มวิตามิน</b>		
Niacin (Nicotinic acid)	0.0005	MS vitamin (กลุ่มวิตามิน)
Pyridoxine · HCl	0.0005	
Thiamine · HCl	0.0001	
Glycine	0.002	
Myo-inositol	0.1	
<b>แหล่งคาร์บอน</b>		
น้ำตาล	30	

# การเตรียมอาหารสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1

เตรียม Stock solution ของอาหารสูตร MS โดยกำหนดความเข้มข้นของแต่ละ Stock ดังนี้

- Stock MS I มีความเข้มข้น 20 X
- Stock MS II มีความเข้มข้น 20 X
- Stock MS III มีความเข้มข้น 200 X
- Stock MS Vitamin มีความเข้มข้น 200 X

เมื่อเตรียม Stock solution เสร็จแล้วให้เก็บไว้ในตู้เย็น

2

ชั่งสาร/ตวงสาร ดังนี้

สารเคมี	ปริมาณสาร
Stock MS I (20x)	50 มิลลิลิตร
Stock MS II (200x)	5 มิลลิลิตร
Stock MS III (200x)	5 มิลลิลิตร
Stock MS vitamin (200x)	5 มิลลิลิตร
Inositol	0.1 กรัม
น้ำตาล	30 กรัม
ผงวุ้น Gelland Gum	2.5 กรัม

3

ผสมสารเคมีรวมกัน( ยกเว้นผงวุ้น) และละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน

4

ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

5

ปรับ pH อาหาร ประมาณ 5.6 – 5.8

6

เติมวุ้นลงไปในอาหาร และนำไปต้ม/เวฟ จนวุ้นละลาย จะได้อาหารที่ใส

7

ตักใส่ขวดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 - 20 นาที

# แนวทางการปฏิบัติงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิง

## 3. การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิง

1



ตัดแต่งชิ้นพืช

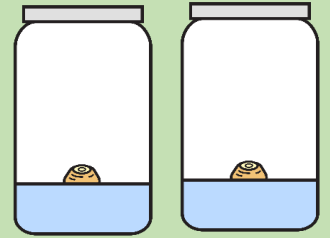
2

STERILE R

ฟอกฆ่าเชื้อ

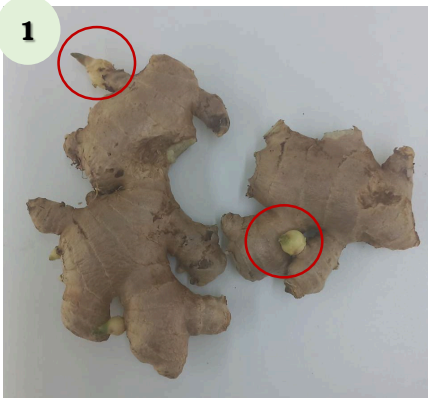
- ล้างด้วยน้ำยาล้างจาน นาน 1 นาที
- นำชิ้นส่วนขิงไปฟอกด้วยแอลกอฮอล์ 70 % นาน 1 นาที
- ฟอกด้วยคลอรีนเมต (NaDCC) ประมาณ 1.25 กรัม ต่อน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที (ทำตู้ปลอดเชื้อ)

3



เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA

1



2



3



# แนวทางการปฏิบัติงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิง

## 4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิง

1. นำขวดที่มีเนื้อเยื่อพืชวางบนชั้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม
2. โดยทั่วไป อุณหภูมิภายในห้องวางเนื้อเยื่ออยู่ที่ประมาณ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงประมาณ 12 -16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มของแสง 1,000 – 3,000 lux
3. ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช สังเกตการเปลี่ยนแปลง สังเกตการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์
4. ย้ายเนื้อเยื่อพืชลงอาหารใหม่ (Subculture) ทุก ๆ 2 - 3 เดือน



เนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิงหลังจาก  
ฟอกฆ่าเชื้อ



ห้องวางเนื้อเยื่อ



# แนวทางการปฏิบัติงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิง

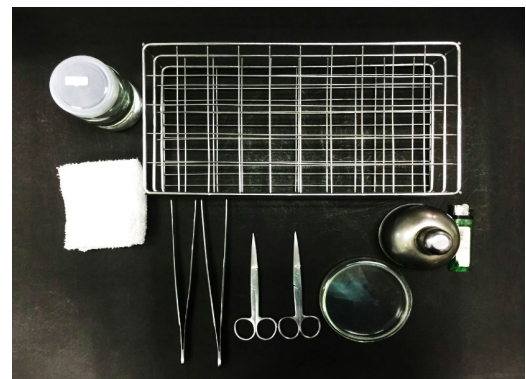
## 5. การย้ายเนื้อเยื่อและการเพิ่มจำนวนพืชวงศ์ขิงเพื่ออนุรักษ์พันธุกรรม หรือนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

เมื่อเนื้อเยื่อพืชเจริญเติบโตเต็มขวด (ประมาณ 2 - 3 เดือน ) ทำการย้ายเนื้อเยื่อพืช (Subculture) ลงในอาหารใหม่(อาหารสูตร MS หรือ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต) เพื่อเพิ่มจำนวนจนได้ปริมาณที่ต้องการ โดยขั้นตอนการย้ายเนื้อเยื่อจะทำในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) โดยมีขั้นตอนดังนี้

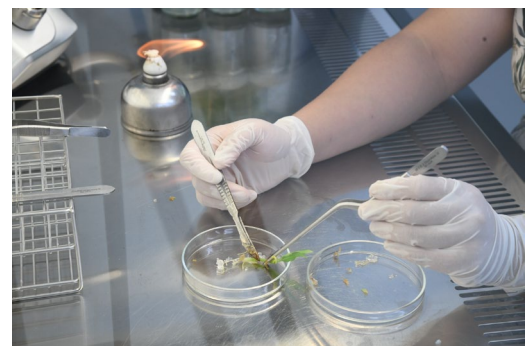
1. ก่อนใช้งานตู้ปลอดเชื้อให้เปิด UV นาน 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวในตู้ปลอดเชื้อ
2. ล้างมือให้สะอาดก่อนปฏิบัติงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
3. เปิดตู้ปลอดเชื้อ ก่อนนำมือเข้าตู้ปลอดเชื้อจะต้องฉีดแอลกอฮอล์ 70% ก่อนทุกครั้ง
4. ฉีดพ่น แอลกอฮอล์ 70 % ไปที่ตู้ปลอดเชื้อ หรือบริเวณที่ทำงานและใช้ผ้าสะอาด (ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) เช็ดทำความสะอาดสะอาดอย่างน้อย 2 ครั้ง
5. ฉีดพ่น แอลกอฮอล์ 70 % ที่อุปกรณ์ต่างๆ เช่น มีด Forceps กระจกครอบตัด ตะเกียงแอลกอฮอล์ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก่อนแล้วจึงนำมาจัดวางในตู้ปลอดเชื้อ
6. ย้ายเนื้อเยื่อพืชลงในอาหารใหม่ (Subculture) โดยการ ตัดราก ตัดยอด ตกแต่งชิ้นพืช แล้วปักลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
7. เขียน ชื่อพืช วัน/เดือน/ปี ชนิดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ลงบนสติ๊กเกอร์ (ควรถือเขียนด้วยดินสอ) แล้วติดบนฝาขวด
8. นำไปวางไว้ในห้องเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 - 3,000 lux 12 - 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
9. สังเกตการ Contaminate และเจริญเติบโตของพืชทุก ๆ สัปดาห์



ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)



อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



การย้ายเนื้อเยื่อ (Subculture)

# แนวทางการปฏิบัติงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิง

## 6. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิงและการนำออกปลูก

หลังจาก เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิงบนชั้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภายใต้ความเข้มแสง 2,000 - 3,000 lux 12 - 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อเนื้อเยื่อพืชเจริญเติบโตเต็มขวด (ประมาณ 2-3 เดือน ) นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ โดยมีขั้นตอนการนำออกปลูกดังนี้

1. ล้างวันออกจากรากด้วยน้ำสะอาด
2. ใส่พีทมอส/ขุยมะพร้าว หรือวัสดุปลูก ในกระถางเล็กประมาณครึ่งกระถาง
3. นำพืชที่ล้างรากแล้วลงปลูก เติมวัสดุปลูกให้เต็ม และรดน้ำให้ชุ่ม
4. ปิดด้วยฝา/ถุงพลาสติก/พลาสติกแรป เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ
5. อนุบาลไว้ในที่ร่ม แดดรำไร และไม่ร้อนจัด ประมาณ 3 - 4 อาทิตย์ ค่อยๆ คลายพลาสติกหรือ/ฝาครอบ ออก เพื่อให้พืชค่อยๆ ปรับตัวกับสภาพอากาศ
6. เมื่อต้นพืชแตกใบใหม่ ดูแข็งแรง จึงสามารถนำปลูกลงดินได้ปกติ



เนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิงที่นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ