

# คู่มือปฏิบัติการงาน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี



Presented By :  
**นางสาวพรพกา ไพร์พร้อม**  
นักวิทยาศาสตร์



คู่มือปฏิบัติงาน  
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ปรับปรุงครั้ง	1
วันที่อนุมัติใช้	27 มีนาคม 2567
จัดทำโดย	นางสาวพรพกา โพธิ์พร้อม นักวิทยาศาสตร์
สอบทานโดย	นางสาวธัญวรัณณิข โพธิ์สุวรรณ รักษาการหัวหน้าสำนักงานคณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร
อนุมัติโดย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา มากศิริ คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

## คำนำ

คู่มือการปฏิบัติงาน ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ จัดทำขึ้นเพื่อเป็นแนวทางสำหรับ ผู้ปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถปฏิบัติงานการจัดเตรียมอุปกรณ์รายวิชา ปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ โดยมีเนื้อหา ประกอบไปด้วย อุปกรณ์ของแต่ละการทดลอง รูปของอุปกรณ์ วิธีการเตรียม วิธีการดูแลรักษา วิธีการซ่อมแซมเบื้องต้น ปัญหาที่อาจเกิดขึ้น และข้อเสนอแนะในการแก้ปัญหา ซึ่งจะช่วยให้ผู้ปฏิบัติงานสามารถปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการพื้นฐานได้อย่างถูกต้อง ครบถ้วน

ทั้งนี้ ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าคู่มือฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และขอขอบคุณผู้มีส่วนเกี่ยวข้อง ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ ซึ่งเป็นแรงผลักดันให้คู่มือฉบับนี้สำเร็จลุล่วงมาได้ จึงขอขอบคุณ มา ณ ที่นี้

นางสาวพรผกา โพธิ์พร้อม

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตรมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

31 มกราคม 2567

## สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญภาพ	ค
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
- ความเป็นมา ความจำเป็น ความสำคัญ	1
- วัตถุประสงค์	1
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	1
- ขอบเขต	1
- นิยามศัพท์เฉพาะ คำจำกัดความ	2
<b>บทที่ 2 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบและการบริหารจัดการ</b>	
- บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง	3
- ลักษณะของงานที่ปฏิบัติ	4
- คำบรรยายลักษณะงาน (Job Description)	4
- โครงสร้าง/การบริหารจัดการ	4
<b>บทที่ 3 หลักเกณฑ์วิธีการปฏิบัติงานและเงื่อนไข</b>	
- หลักเกณฑ์และกฎระเบียบที่เกี่ยวข้องในการปฏิบัติ	8
- ขั้นตอนและวิธีการปฏิบัติงานตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดกระบวนการ	9
- เงื่อนไข/ข้อสังเกต/ข้อควรระวัง/สิ่งที่ควรคำนึงในการปฏิบัติ	46
- แนวคิด/งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	47
- จรรยาบรรณ/คุณธรรม/จริยธรรมในการปฏิบัติงาน	48
<b>บทที่ 4 เทคนิคในการปฏิบัติงาน</b>	
- กิจกรรม/แผนปฏิบัติงาน	50
- วิธีการติดตามและประเมินผลการปฏิบัติงาน	50
<b>บทที่ 5 ปัญหาและอุปสรรค แนวทางแก้ไขและพัฒนา</b>	
- ปัญหาและอุปสรรคในการปฏิบัติงาน/ แนวทางแก้ไขและพัฒนา	52
- ข้อเสนอแนะ	53
<b>บรรณานุกรม</b>	54
<b>ภาคผนวก</b>	
<b>ประวัติผู้เขียน</b>	

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 1 ภาพแสดงโครงสร้างการบริหารมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี	6
ภาพที่ 2 ภาพโครงสร้างการแบ่งส่วนงานคณะเทคโนโลยีการเกษตร	7
ภาพที่ 3 ภาพโครงสร้างตำแหน่งบุคลากรคณะเทคโนโลยีการเกษตร	7
ภาพที่ 4 ขั้นตอนการปฏิบัติงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการเกษตร(Flow Chart)	9
ภาพที่ 5 ตู้เก็บสารเคมี	12
ภาพที่ 6 เครื่องชั่งแบบละเอียด (ก) และเครื่องชั่งแบบหยาบ (ข)	13
ภาพที่ 7 ตู้เย็น	13
ภาพที่ 8 เตาอุ่นความร้อนและที่กวนสาร	14
ภาพที่ 9 ตู้อบความร้อน	14
ภาพที่ 10 ตู้เก็บเครื่องแก้ว	15
ภาพที่ 11 หม้อนึ่งความดัน	15
ภาพที่ 12 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง	16
ภาพที่ 13 หม้อสำหรับเตรียมอาหาร	16
ภาพที่ 14 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อพืช	17
ภาพที่ 15 กล้องจุลทรรศน์	18
ภาพที่ 16 ตะเกียง	18
ภาพที่ 17 กระดาษ A4	19
ภาพที่ 18 มีดผ่าตัด	19
ภาพที่ 19 ปากคีบ	20
ภาพที่ 20 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ	20
ภาพที่ 21 ชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	21
ภาพที่ 22 เครื่องตั้งเวลา	22
ภาพที่ 23 เครื่องเขย่า	22

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมา/ความจำเป็น/ความสำคัญ

คู่มือการทำงานฉบับนี้ จัดทำขึ้นเพื่อเป็นแนวทางในการปฏิบัติงานของผู้ปฏิบัติงาน หรือผู้ร่วมงานที่มาทดแทนทราบ และเข้าใจ ขั้นตอนการปฏิบัติงาน เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานไว้ใช้อย่างไม่ให้เกิดความผิดพลาดในการปฏิบัติงาน หรือเพื่อเป็นคู่มือในการกำกับตรวจสอบ การปฏิบัติงาน ให้การปฏิบัติงานเป็นมาตรฐานเดียวกัน เป็นเครื่องมือในการเรียนการสอน

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้การปฏิบัติงานเป็นมาตรฐานเดียวกัน
2. ผู้ปฏิบัติงานทราบและเข้าใจขั้นตอนการปฏิบัติงาน
3. เป็นเครื่องมือในการเรียนการสอน
4. เพื่อลดระยะเวลาในการทำงาน
5. บุคลากรสามารถปฏิบัติงานแทนกันได้
6. ลดข้อผิดพลาดจากการทำงานที่ไม่เป็นระบบ

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ผู้ปฏิบัติงานทราบและเข้าใจหน้าที่ ไม่เกิดความสับสน และสามารถทำงานแทนกันได้ เมื่อมีการโยกย้ายตำแหน่ง
- 2) เพื่อลดระยะเวลาในการปฏิบัติงาน
- 3) เพื่อป้องกันการเสียหายและความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในการปฏิบัติงาน

### ขอบเขต

ผู้อ่านสามารถประสานงานแทนกันได้ในเรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการฝึกทักษะ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยมีแนวทางปฏิบัติงานได้ถูกต้อง รวดเร็ว ลดการปฏิบัติงานที่ซับซ้อน ช่วยลดระยะเวลาในการสอนงาน ควบคุมการปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการ โดยเริ่มต้นตั้งแต่ดูแล การเก็บรักษา การทำความสะอาดเครื่องแก้ว อุปกรณ์ การขออนุญาตใช้อุปกรณ์ เครื่องแก้ว เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ ของนักศึกษา และการจัดเก็บสารเคมีในห้องปฏิบัติการ

### นิยามศัพท์เฉพาะ/คำจำกัดความ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture) หมายถึง การนำชิ้นส่วนของพืช (Explant) ซึ่งได้แก่ เนื้อเยื่อส่วนของ ลำต้น ใบ ดอก ตา และปลายยอด มาทำความสะอาดให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ แล้วนำมาวางเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ (Culture media) ในสถานที่เหมาะสม

อาหารวิทยาศาสตร์ (Culture media) หรืออาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าอาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) เป็นอาหารที่ประกอบด้วยอินทรีย์ (วิตามินต่าง ๆ) สารอนินทรีย์ (ธาตุอาหารต่าง ๆ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแตสเซียม) น้ำตาล สารอาหารควบคุมการเจริญเติบโต และผงวุ้น นำรวมกัน แล้วทำให้ปลอดเชื้อ โดยวิธีการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

อุปกรณ์ - เครื่องแก้ว หมายถึง อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น บีกเกอร์ กระจกบด และปิเปต

สารเคมี หมายถึง วัสดุใด ๆ ที่สามารถระบุงค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอน เช่น โปแตสเซียมไนเตรต และแอมโมเนียมไนเตรต

## บทที่ 2

### บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบและการบริหารจัดการ

ผู้ปฏิบัติงานตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ได้รับมอบหมายหน้าที่ด้านการจัดการเรียนการสอน ปฏิบัติ การจัดวัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการให้บริการสอนการใช้เครื่องมือกับนักศึกษา บำรุงรักษาเครื่องมือและเป็นผู้ช่วยสอนในรายวิชาต่างๆ ซึ่งผู้ปฏิบัติงานจะต้องมีความรู้ความเข้าใจ เพื่อให้การปฏิบัติงานเป็นไปอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ

#### บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง

ลักษณะงานที่ปฏิบัติโดยทั่วไปของนักวิทยาศาสตร์ อ้างอิงจากมาตรฐานกำหนดตำแหน่ง สำนักงานงานคณะกรรมการข้าราชการพลเรือน (สำนักงาน ก.พ.) ฉบับแก้ไขเพิ่มเติมครั้งที่ 2 วันที่ 1 กรกฎาคม พ.ศ.2554 ดังนี้

ตำแหน่งประเภท	วิชาการ
สายงาน	วิทยาศาสตร์
ลักษณะงาน	โดยทั่วไป

สายงานนี้คลุมถึงตำแหน่งต่างๆ ที่ปฏิบัติงานทางวิเคราะห์ วิจัย และทดสอบทาง วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ซึ่งมีลักษณะงานที่ปฏิบัติเกี่ยวกับการทดสอบ วิเคราะห์ และวิจัยทาง วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาต่างๆ เช่น การวิเคราะห์วัตถุดิบ แร่ธาตุ อาหาร และ ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม เพื่อรับรองหรือควบคุมคุณภาพให้เป็นไปตามกฎหมาย หรือเพื่อใช้ประโยชน์ใน การอุตสาหกรรม การค้า การเก็บภาษี การดำเนินการทางคดี หรือเพื่อเผยแพร่ความรู้แก่ประชาชน การ วิจัยทรัพยากรธรรมชาติ ผลิตภัณฑ์ และผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรม และเกษตรกรรม เพื่อนำมาใช้ เป็นประโยชน์ การวิจัยเพื่อปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์สินค้า การวิจัยเรื่องการถนอมอาหาร เป็นต้น ปฏิบัติงานเกี่ยวกับการกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม หรือการสอนวิชาวิทยาศาสตร์ และ ปฏิบัติหน้าที่อื่นที่เกี่ยวข้อง

ตำแหน่งในสายงานนี้มีชื่อและระดับตำแหน่ง ดังนี้

นักวิทยาศาสตร์	ระดับปฏิบัติการ
นักวิทยาศาสตร์	ระดับชำนาญการ
นักวิทยาศาสตร์	ระดับชำนาญการพิเศษ



## ลักษณะงานที่ปฏิบัติ

ลักษณะงานของนักวิทยาศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่ได้รับมอบหมายมี ดังนี้

### 1. ด้านปฏิบัติงาน

- 1.1 เตรียมเครื่องมือ อุปกรณ์ สำหรับการเรียนการสอนและวิจัย
- 1.2 ดูแล ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการปฏิบัติการและอำนวยความสะดวก ให้การช่วยเหลือเมื่อเกิดปัญหาหรือเกิดอันตรายกับนักศึกษา
- 1.3 ให้บริการยืม – คืน เครื่องมือ เครื่องแก้ว วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี

### 2. ด้านการวางแผน

วางแผนการเปลี่ยนถ่ายอาหารแก่ต้นพืชในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดูแลทำความสะอาดขยายพันธุ์พืช เพื่อใช้ในการเรียนการสอนต่อไปพร้อมทั้งดูแล เครื่องมือวัสดุ อุปกรณ์ ในห้องปฏิบัติการ และแจ้งผู้เกี่ยวข้องในการดูแล และแก้ไขต่อไป

### 3. ด้านการประสานงาน

ประสานงานกับนักศึกษาและอาจารย์ผู้สอน

### 4. ด้านบริการ

- 4.1 บริการผลิตพืชปลอดเชื้อ
- 4.2 บริการเบิก จ่าย อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ
- 4.3 งานมอบหมายอื่นๆ

## คำบรรยายลักษณะงาน (Job Description)

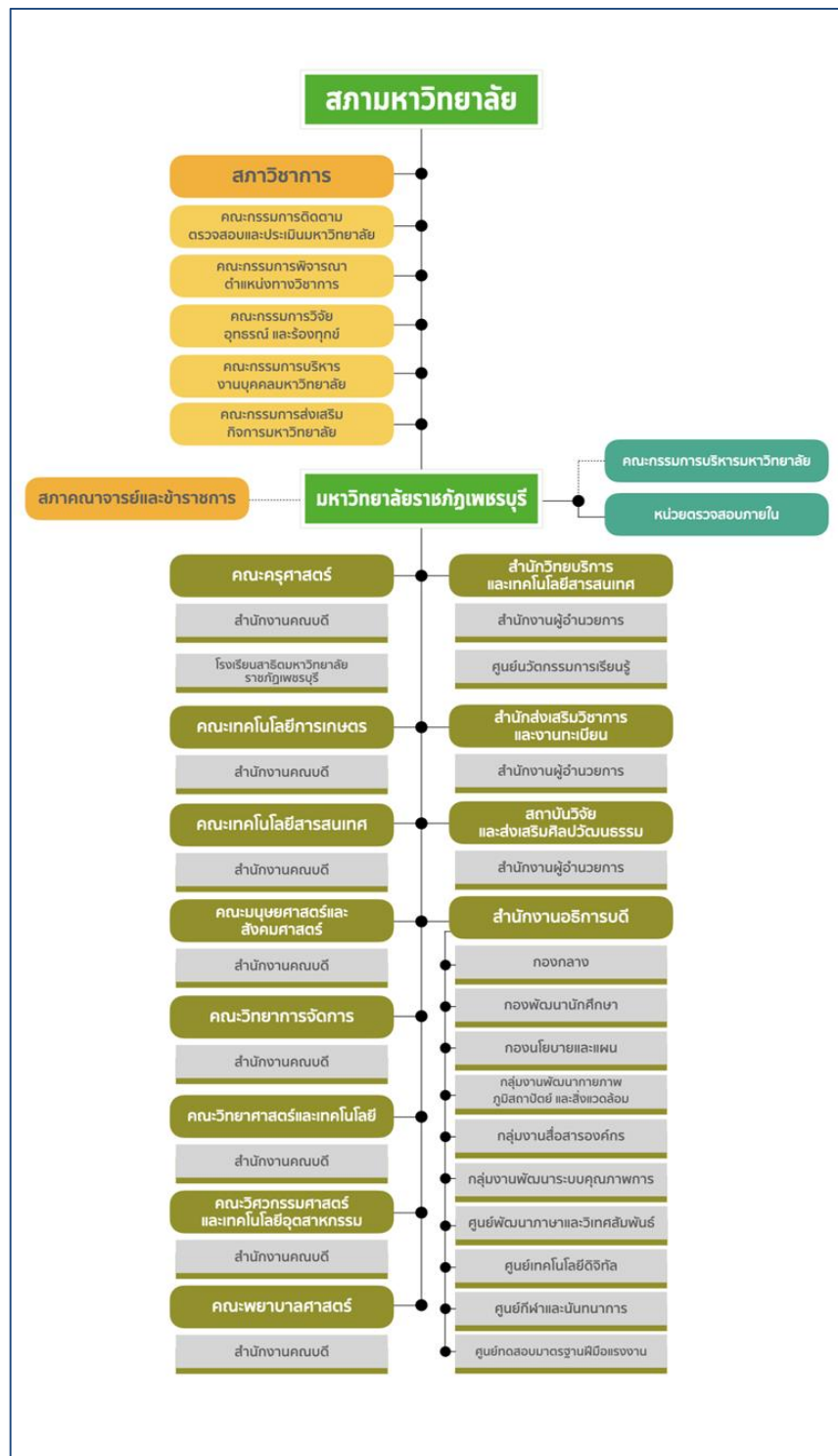
1. จัดเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี เครื่องแก้วในการเรียนการสอน
2. เป็นผู้ช่วยสอนในวิชา การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการเกษตร
3. ดูแลทำความสะอาด เปลี่ยนถ่ายอาหารพืชในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
4. ดูแลโรงเรือนอนุบาลต้นกล้าที่ย้ายจากห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

## ติดต่อบุคคลและหน่วยงานอื่นโครงสร้าง / การบริหารจัดการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี (Phetchaburi Rajabhat University) (พระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยราชภัฏ พ.ศ.2547 ให้ไว้ ณ 10 มิถุนายน 2547, อ้างอิง<https://www.pbru.ac.th/pbru/regulations>) จัดตั้งขึ้นตามประกาศราชกิจจานุเบกษา มีสถานะเป็นนิติบุคคลและเป็นส่วนราชการ ตามกฎหมายว่าด้วยวิธีการงบประมาณ เป็นสถาบันอุดมศึกษา สังกัดกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (Ministry of Higher Education, Science, Research and Innovation) (พระราชบัญญัติการอุดมศึกษา พ.ศ. 2562, อ้างอิง <https://www.mhesi.go.th/>)

[index.php/aboutus/legalall.html](http://index.php/aboutus/legalall.html)) มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ตั้งอยู่ เลขที่ 38 หมู่ 8 ตำบลนาุ้ง อำเภอมืองเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี

โครงสร้างการบริหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี มีคณะกรรมการสภามหาวิทยาลัยและ คณะกรรมการ ฝ่ายต่างๆ กำกับ ดูแล ตรวจสอบและติดตาม การบริหารจัดการดำเนินการต่างๆ โดยมีการแบ่งส่วน ราชการ 8 คณะ 1 สถาบัน 3 สำนัก ได้แก่ คณะครุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ คณะวิทยาการจัดการ คณะเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม คณะเทคโนโลยีสารสนเทศ คณะพยาบาลศาสตร์และ วิทยาการสุขภาพ สถาบันวิจัยและส่งเสริมศิลปวัฒนธรรม สำนักส่งเสริมวิชาการและงานทะเบียน สำนัก วิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ สำนักงานอธิการบดี ตามภาพแสดงโครงสร้างการบริหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

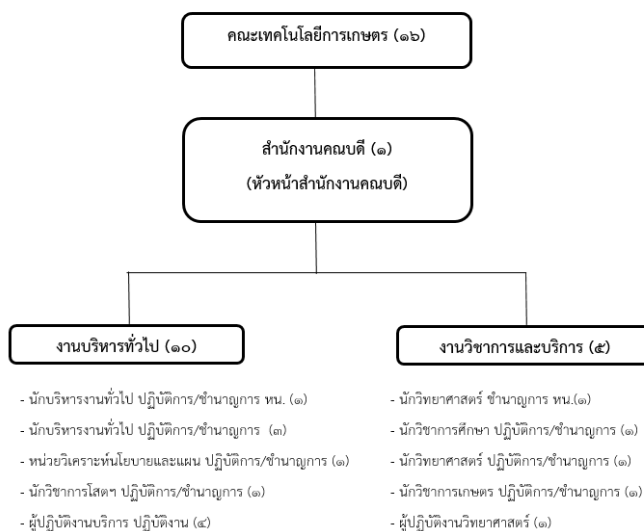


ภาพที่ 1 ภาพแสดงโครงสร้างการบริหารมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี  
ที่มา : เว็บไซต์มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี (โครงสร้างมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี)

## โครงสร้างคณะเทคโนโลยีการเกษตร



ภาพที่ 2 โครงสร้างการแบ่งส่วนงานคณะเทคโนโลยีการเกษตร  
 ที่มา:เว็บไซต์กองนโยบายและแผน(กรอบอัตรากำลังบุคลากรสายสนับสนุน  
 มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ประจำปีงบประมาณ 2562-2565 )



ภาพที่ 3 โครงสร้างโครงสร้างอัตรากำลัง/ตำแหน่งในคณะเทคโนโลยีการเกษตร  
 ที่มา:เว็บไซต์กองนโยบายและแผน(กรอบอัตรากำลังบุคลากรสายสนับสนุน  
 มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ประจำปีงบประมาณ 2562-2565 )

### บทที่ 3

## หลักเกณฑ์วิธีการปฏิบัติงานและเงื่อนไข

### หลักเกณฑ์และกฎ ระเบียบที่เกี่ยวข้องในการปฏิบัติงาน

นักวิทยาศาสตร์ สาขาเกษตรศาสตร์ มีภาระหน้าที่ หลักเกณฑ์วิธีการและวิธีปฏิบัติงาน ดังต่อไปนี้

ประสานงานกับอาจารย์ผู้สอน เพื่อเตรียมความพร้อมในการจัดการเรียนการสอนในแต่ละครั้ง ตรวจสอบสภาพความพร้อมของ เครื่องมือ อุปกรณ์ เครื่องแก้วอย่างสม่ำเสมอ พร้อมให้บริการ

เมื่อนักศึกษาใช้งานเครื่องมือ อุปกรณ์เรียบร้อยแล้ว ต้องตรวจสอบให้นักศึกษาทำความสะอาด เครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ และพื้นที่ที่มีการใช้งานให้สะอาดเรียบร้อยทุกครั้ง

ตรวจเช็คสารเคมี อุปกรณ์ ต่างๆ เพื่อทดแทนเมื่อมีการใช้งานหรือเสียหายชำรุด

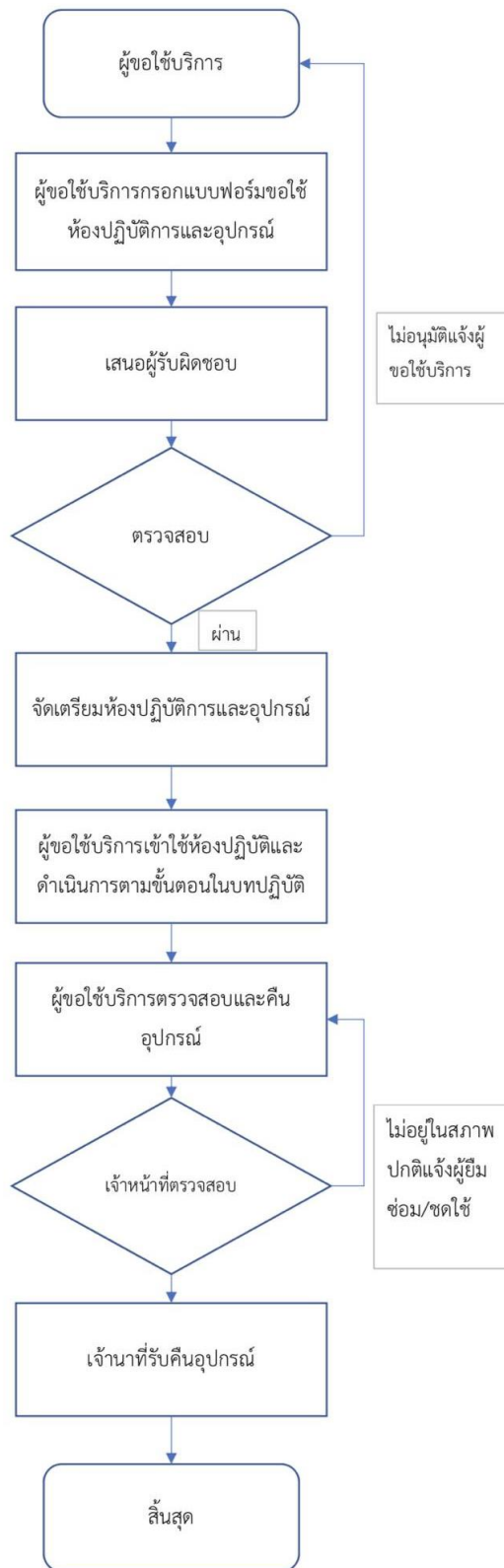
ดูแลทำความสะอาดห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และห้องเตรียมสารเคมี

ขยายพันธุ์พืชในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดให้เพียงพอในการเรียนการสอนครั้งต่อไป

ดูแลโรงเรือนอนุบาล ต้นอ่อนของพืชที่นำออกจากห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เป็นผู้ช่วยสอนในรายวิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการเกษตร

## ขั้นตอนและวิธีการปฏิบัติงานตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดกระบวนการ



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการปฏิบัติงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการเกษตร (Flow Chart)

## อธิบายขั้นตอนการปฏิบัติงาน

ประชุมร่วมกับอาจารย์ผู้สอนเพื่อเตรียมการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก่อนการจัดการเรียนการสอนแก่นักศึกษา และดำเนินการตามขั้นตอนการทำงาน โดยมีการแบ่งขั้นตอนการปฏิบัติงาน ดังนี้

- ขั้นตอนที่ 1 การจัดเตรียมห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- ขั้นตอนที่ 2. การใช้ห้อง และอุปกรณ์ เครื่องแก้ว ที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- ขั้นตอนที่ 3 การเตรียม Stock อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- ขั้นตอนที่ 4. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- ขั้นตอนที่ 5 การฟอกฆ่าเชื้อตายอด และตาข้าง
- ขั้นตอนที่ 6 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วย
- ขั้นตอนที่ 7 การแยกหน่อ ( Sub culture )
- ขั้นตอนที่ 8 การย้ายพืชลงปลูก

## บทปฏิบัติการที่ 1

### การจัดเตรียมห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องการสภาพปลอดเชื้อสูง ดังนั้นการดูแลเรื่องความสะอาดของห้องและอุปกรณ์ที่ใช้งาน ซึ่งจำเป็นสำหรับห้องปฏิบัติการโดยเฉพาะ โดยต้องทำความสะอาดทุกสัปดาห์ ในแต่ละห้องโดยมีขั้นตอนดังนี้

#### ห้องเตรียมสาร

1. กวาดหยากไย่บนเพดาน
2. เช็ดกระจกโดยใช้น้ำยาเช็ดกระจก
3. ใช้ผ้าชุบน้ำบิดให้หมาดเช็ดทำความสะอาดบนหลังโต๊ะต่าง ๆ
4. กวาดพื้นห้องให้สะอาดแล้วถูด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ โดยผสมคลอโรกซ์ (Clorox) 10 เปอร์เซ็นต์ ถูให้สะอาด หรือใช้น้ำยาถูพื้นที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

#### ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. กวาดหยากไย่บนเพดาน
2. ใช้แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ฉีดแล้วใช้ผ้าขาวบางเช็ดบนชั้นวางขวดเพาะเลี้ยง เช็ดให้หมดทุกชั้น รวมถึงหลังตู้แช่เชื้อ
3. เช็ดกระจกทั้งด้านใน และด้านนอกห้องให้สะอาด โดยใช้ น้ำยาเช็ดกระจก
4. กวาดพื้นห้องให้สะอาดหรือใช้เครื่องดูดฝุ่น แล้วถูด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ โดยผสมคลอโรกซ์ (Clorox) 10 เปอร์เซ็นต์ และอบฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีจำพวกต่างทัทิม (KMnO<sub>4</sub>) ผสมฟอร์มาลิน 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นครั้งคราวหรือเมื่อปิดภาคเรียน โดยใช้ต่างทัทิม (KMnO<sub>4</sub>) 120 กรัม ต่อฟอร์มาลิน 250 มิลลิลิตร



## บทปฏิบัติการที่ 2

### การใช้ห้อง และอุปกรณ์ เครื่องแก้ว ที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืช

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วย 3 ส่วนสำคัญ ดังนี้

1. ห้องเตรียมอาหาร (Preparation Room) เป็นห้องธรรมดาที่ไม่จำเป็นต้องมีเครื่องปรับอากาศ ภายในห้องควรมีเครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์ ดังนี้ คือ

1.1 ตู้เก็บสารเคมี สารเคมีทั่วไปที่สามารถโดนแสงได้ ทั้งชนิดผงและแบบน้ำ (ภาพที่ 5)

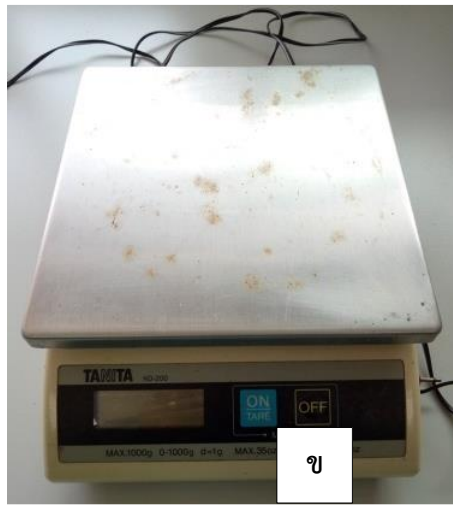


ภาพที่ 5 ตู้เก็บสารเคมี

1.2 เครื่องชั่ง (Balance) ควรมีทั้ง 2 แบบ คือ 1. แบบหยาบ ชั่งได้ต่ำสุด 0.01 กรัม สำหรับชั่งสารซึ่งใช้จำนวนค่อนข้างมาก เช่น น้ำตาล วัุ้นผง และผงถ่าน (ภาพที่ 6 ก) และ 2. แบบละเอียดชั่งได้ต่ำถึง 0.001 กรัม หรือ 0.0001 กรัม สำหรับชั่งสารที่ใช้จำนวนน้อยมาก (ภาพที่ 6 ข) ได้แก่ ธาตุอาหารรองต่าง ๆ หรือสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

1.3 ตู้เย็น (Refrigerator) สำหรับเก็บ Stock ของอาหาร หรือสารเคมีที่มีการเสื่อมสลายได้ง่าย ถ้าได้รับอุณหภูมิสูง เช่น วิตามิน หรือฮอร์โมนต่าง ๆ (ภาพที่ 7)

1.4 เตาแก๊ส หรือเตาอุ่นความร้อน และที่กวนสาร (Hot plate and Magnetic Stirrer) ใช้สำหรับอุ่นหรือหลอมอาหารที่มีวัุ้นเป็นส่วนประกอบ โดยชนิดหลังมีแท่งแม่เหล็กสำหรับกวนสารละลายด้วย (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 6 เครื่องชั่งแบบละเอียด (ก) และเครื่องชั่งแบบหยาบ (ข)



ภาพที่ 7 ตู้เย็น



ภาพที่ 8 เตาแก๊ส เตาอุ่นความร้อนและที่กวนสาร

1.5 ตู้อบความร้อน (Hot air oven) ใช้สำหรับอบฆ่าเชื้อที่ติดมากับเครื่องมือที่ทนต่ออุณหภูมิสูง ๆ ได้ เช่น เครื่องแก้วต่าง ๆ โลหะ โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1-3 ชั่วโมง (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ตู้อบความร้อน

1.6 ตู้เก็บเครื่องแก้ว ซึ่งเครื่องแก้วที่ใช้ได้แก่ ปีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขวดปริมาตร (Volumetric flask) กระจกบอกลง จานแก้ว ปิเปต หลอดทดสอบ กรวยแก้ว และแท่งแก้วคนสาร (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ตู้เก็บเครื่องแก้ว

**1.7 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)** ใช้สำหรับนึ่งฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และเครื่องมือที่ไม่สามารถทนความร้อนของเตาอบความร้อนได้ ซึ่งมีทั้งแบบใช้แก๊ส ใช้ไฟฟ้า และแบบอัตโนมัติซึ่งใช้ไฟฟ้า ความดันที่ใช้ประมาณ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15-30 นาที (ภาพที่ 11)

**1.8 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)** ซึ่งควรใช้แบบที่ใช้ไฟฟ้าที่มีขั้ว (Electrode) จุ่มลงในสารละลาย (ภาพที่ 12) อ่านค่าความเป็นกรดเป็นด่างได้อย่างละเอียดดีกว่าแถบวัด pH แบบกระดาษที่สังเกตการเปลี่ยนแปลงได้ยาก

**1.9 หม้อสำหรับเตรียมอาหาร** กรณีใช้เตาแก๊ส ควรใช้หม้อสแตนเลส (ภาพที่ 13) เพราะสะดวกในการทำมาสะอาด และไม่ทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ



ภาพที่ 11 หม้อนึ่งความดัน



ภาพที่ 12 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง



ภาพที่ 13 หม้อสำหรับเตรียมอาหาร

2. ห้องย้ายเนื้อเยื่อ (Transferred room) ควรเป็นห้องมิดชิดที่ติดตั้งเครื่องปรับอากาศ เพื่อไม่ให้เกิดการฟุ้งกระจายของอนุภาคฝุ่นละอองหรือเชื้อโรค ทำความสะอาดได้ง่ายเพราะห้องนี้จะต้องปลอดเชื้อ โดยภายในห้องควรประกอบด้วยอุปกรณ์ และเครื่องมือ ดังนี้ คือ

2.1 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Transferred hood หรือ Air flow cabinet) เป็นตู้ที่มีตัวกรอง (Filter) ให้อากาศภายในตู้บริสุทธิ์ปราศจากเชื้อรา และแบคทีเรีย ซึ่งตัวกรองอาจอยู่ด้านบน ถ้าเป็นตู้แบบเป่าลมลงด้านล่างแนวตั้ง (Verticle) หรือตัวกรองอยู่ด้านหลังเป่าลมออกมาในแนวนอน

(Horizontal) ก็ได้ โดยถ้าเป็นตู้แบบธรรมดาจะมีตัวกรองถึง 2 ตัว คือ Prefilter และ Hepafilter ซึ่งทำให้อากาศหมุนเวียนภายในตู้บริสุทธิ์มาก และภายในตู้มักจะติดหลอดอัลตราไวโอเล็ต ไว้สำหรับฆ่าเชื้อ โดยเปิดทิ้งไว้ในช่วงที่ไม่ทำงาน หรือเปิดทิ้งไว้ก่อนทำงานประมาณ 2 ชั่วโมง (ภาพที่ 14)

**2.2 กล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope)** ซึ่งมีแบบธรรมดา (Light microscope) และแบบสามมิติ (Stereo microscope) สำหรับส่องดูการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่เลี้ยง หรือช่วยให้ตัดเนื้อเยื่อเจริญซึ่งมีขนาดเล็กมาก และถ้าห้องปฏิบัติการใดจะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ อาจต้องมีกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวิร์ท (Inverted microscope) จะทำให้สะดวกในการดูหรือเลือก โปรโตพลาสต์ยิ่งขึ้น (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 14 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อพืช

**2.3 ตะเกียง** อาจเป็นแบบใช้แอลกอฮอล์หรือใช้เตาแก๊สก็ได้ สำหรับใช้ลนไฟรอบ ๆ ของภาชนะใส่น้ำยาฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ หรือภาชนะสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (ภาพที่ 16)

**2.4 กระจาด A4** ที่ห่อด้วยกระจาดอลูมิเนียมพอยด์ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 15 กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 16 ตะเกียง



ภาพที่ 17 กระดาษ A4

2.5 มีดผ่าตัด ที่ห่อด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยด์ หรือที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

(ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 มีดผ่าตัด



## 2.6 ปากคีบ สำหรับเป็นเครื่องมือย้ายเนื้อเยื่อพืชลงสู่ภาชนะที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป (ภาพที่

19)



ภาพที่ 19 ปากคีบ

## 3. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Culture room) ประกอบด้วยอุปกรณ์ต่างๆ ดังนี้

3.1 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controlled) โดยถ้าเป็นประเทศในแถบร้อน คือ เครื่องปรับอากาศ (Air Condition) ถ้าเป็นประเทศแถบหนาวจะรวมทั้งเครื่องทำความร้อน (Heater) ด้วย เพื่อให้อุณหภูมิในห้องเหมาะสมกับการเจริญของเนื้อเยื่อพืช คือ 25 - 28 องศาเซลเซียส จำนวนและขนาดของเครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นอยู่กับขนาดของห้องถ้าห้องมีขนาดใหญ่มากอาจต้องใช้เครื่องขนาดใหญ่ หรือใช้หลายเครื่อง และควรมีเครื่องควบคุมสำหรับเปิดสลับกลางวันและกลางคืนอย่างละชุดเพื่อไม่ให้เครื่องทำงานหนักเกินไป หรือมีอายุการใช้งานสั้นลง (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ

3.2 ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งต้องมีขนาดที่เหมาะสม และสะดวก ในการตรวจสอบ การปนเปื้อนของเชื้อ และติดตามการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช แต่ละชั้นไม่ควรสูงเกินไป และทุกชั้น ต้องติดหลอดไฟโกรลักซ์หรือฟลูออเรสเซนต์ให้ความสว่างประมาณ 1,000 - 3,000 ลักซ์ (Lux) (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 ชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.3 เครื่องตั้งเวลา (Timer) ใช้ประกอบชั้นวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อ กำหนดความยาวของช่วงแสง (Photoperiod) ที่ให้กับพืช ซึ่งปกติจะให้ปริมาณ 14 - 16 ชั่วโมงต่อวัน (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 เครื่องตั้งเวลา

3.4 เครื่องเขย่า (Shaker หรือ Rotator) สำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ใช้อาหารเหลว ซึ่งจำเป็นต้องเขย่าให้อากาศคลุกเคล้าลงไปในการอาหารเพื่อให้เนื้อเยื่อพืชได้ใช้ในการหายใจ โดยปกติถ้าเป็น Shaker จะใช้ความเร็วรอบประมาณ 120 รอบต่อนาที แต่ถ้าเป็น Rotator จะใช้ความเร็วรอบประมาณ 1-4 รอบต่อนาที (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 เครื่องเขย่า

นอกจากห้องปฏิบัติการทั้ง 3 ห้อง ดังกล่าวมาแล้ว ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ควรมี เรือนเพาะชำ หรือตู้ควบคุม ความชื้น แสงและอุณหภูมิ (Growth chamber) ไว้รองรับต้นกล้าก่อนจะ ย้ายไปปลูกในสภาพธรรมชาติด้วย เพราะต้นพืชจะต้องปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่ต่างไปจากที่อยู่ ในขวดในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิค่อนข้างต่ำ และความชื้นสูง

### ข้อควรปฏิบัติสำหรับการใช้และดูแลรักษาอุปกรณ์ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ส่วนมากเป็นอุปกรณ์ที่มีราคาสูง และต้องการ ความสะอาดเช่นเดียวกัน ผู้ปฏิบัติงานด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงควรเรียนรู้ถึงวิธีการใช้และวิธีการดูแล รักษาที่ถูกต้อง

**1. ตู้อบความร้อน (Hot air oven)** ในการใช้ควรมีการจดบันทึกเวลา และอุณหภูมิที่ใช้ เครื่องทุกครั้ง ไม่ควรใส่ของที่จะอบฆ่าเชื้อมากเกินไป ทำความสะอาดภายในตู้เดือนละ 1 ครั้ง ตรวจสอบระบบการทำงาน ปรับเทียบเทอร์โมมิเตอร์ที่ติดมากับตัวตู้ และการกระจายตัวของความร้อน ที่จุดต่าง ๆ ภายในตู้โดยช่างผู้ชำนาญปีละ 1 ครั้ง

**2. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)** ควรตรวจสอบระดับน้ำให้อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดก่อนใช้ งานทุกครั้ง และน้ำที่ใช้ต้องเป็นน้ำกลั่นหรือน้ำที่กำจัดไอออน (Deionized water) มีการจดบันทึกอุณหภูมิ ความดัน เวลาในการใช้งานทุกครั้ง มีการตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงาน ของเครื่องสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยใช้แถบสปอร์ (Spore strip) หรือสารละลายสปอร์ (Spore suspension) ของเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งบางเครื่องไม่เสื่อมสภาพ เชื้อดังกล่าวจะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลาประมาณ 15-30 นาที หมั่นทำความสะอาดภายในหม้อนึ่ง ความดัน และเปลี่ยนน้ำใหม่สัปดาห์ละ 1 ครั้ง หรือเมื่อมีสิ่งสกปรกลงไป ตรวจสอบการทำงานของระบบต่าง ๆ โดยเฉพาะเซฟต์วาล์ว (Saffy valve) ปีละครั้ง โดยช่างผู้ชำนาญ

**3. เครื่องชั่ง (Balance)** สำหรับเครื่องชั่งควรตั้งอยู่บนฐานที่มั่นคง ไม่กระเทือนง่าย ถ้าเป็นเครื่องชั่งไฟฟ้าต้องปรับระดับลูกน้ำให้อยู่ในตำแหน่งที่กำหนดทุกครั้งก่อนใช้งานควรทำการปรับ ค่าสมดุลย์หรือปรับให้ได้ศูนย์ในลักษณะไม่ได้ชั่งน้ำหนักทุกครั้งก่อนใช้งาน ทำความสะอาดเครื่องชั่งทุก ครั้งหลังจากใช้งานเสร็จ ตรวจสอบความเที่ยงตรง และความถูกต้องของเครื่องชั่งโดยใช้น้ำหนัก มาตรฐานทุก ๆ 3 เดือน ซึ่งค่าความเบี่ยงเบนที่ยอมรับขึ้นอยู่กับความสามารถของเครื่อง เช่น ถ้าเครื่อง ชั่งที่สามารถชั่งน้ำหนักได้ 2000 กรัม ยอมให้มีความเบี่ยงเบนได้ 0.1 กรัม

**4. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)** ส่วนประกอบที่สำคัญ คือ อิเล็กโทรด (Electrode) ถ้าซื้อใหม่ ๆ ควรแช่ในน้ำกลั่นหรือบัฟเฟอร์ (Buffer) pH 4.0 นาน 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ งานเพื่อปรับสภาวะของเมมเบรน (Glass membrane) มีการตรวจสอบระดับสารละลาย

ในแท่งอิเล็กโทรด (Filling solution) ทุกครั้งก่อนใช้งาน มีการล้างอิเล็กโทรดก่อน และหลังการใช้งานทุกครั้งด้วยน้ำกลั่น แล้วซับน้ำให้แห้งด้วยกระดาษซับหรือผ้าสะอาด มีการเปลี่ยนสารละลายมาตรฐาน (Standard buffer) เมื่อเห็นว่าขุ่นหรือมีสีผิดไปจากเดิม และต้องเก็บไว้ในตู้เย็น และเมื่อต้องการใช้งานจึงนำมาไว้ในอุณหภูมิห้องก่อนใช้งาน

หลังการใช้งานเสร็จต้องแช่อิเล็กโทรดไว้ในสารละลายที่กำหนดในคู่มือการใช้งานของเครื่องแต่ละเครื่อง เช่น บัฟเฟอร์ โปตัสซียมคลอไรด์ (KCl) หรือสารละลายผสมระหว่างบัฟเฟอร์ และ โปตัสซียมคลอไรด์ เมื่ออิเล็กโทรดสกปรกถ้าเกิดจากโปรตีนให้ล้างด้วยเอนไซม์เปปซิน หรือ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 โมลาร์ (M) ถ้าเกิดจากสารอินทรีย์ให้ล้างด้วยอะซิโตน (Acetone) เมทานอล (Methanol) ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether)

**5. ตู้เย็น (Refrigerator)** ต้องตั้งในที่ที่มีอากาศถ่ายเทได้สะดวกเพื่อป้องกันการสะสมของหยดน้ำรอบ ๆ ตู้ซึ่งอาจทำให้เกิดสนิมได้ หากมีน้ำแข็งเกาะหนามาก ให้ละลายน้ำแข็งออก หรือปิดตู้ทำความสะอาดทุก 3 เดือน บันทึกอุณหภูมิของตู้ทุกวันแรกของสัปดาห์ (อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงได้ บวกลบ 2 องศาเซลเซียส) ตรวจสอบความถูกต้องของเทอร์โมมิเตอร์ที่ติดมากับตัวตู้ และตรวจสภาพยางขอบประตูตู้ทุก 6 เดือน

**6. กล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope)** ต้องตั้งบนโต๊ะหรือฐานที่มั่นคงไม่สั่นสะเทือน และไม่ควรเคลื่อนย้ายบ่อย ๆ เก็บกล้องในที่มืดชิดโดยเก็บในตู้ ในกล่องไม้หรือมีพลาสติกครอบเพื่อป้องกันความชื้นฝุ่นละออง หลังการใช้กล้องต้องทำความสะอาดทุกครั้ง โดยเฉพาะเลนส์ต้องเช็ดด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ และน้ำยาทำความสะอาดเลนส์ หากเลนส์ใกล้ตา (Eyepiece) มีเหงื่อหรือคราบไขมันจับติดอยู่ ให้ทำความสะอาดโดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 3 เปอร์เซ็นต์ในอีเทอร์ซัพกระดาษเช็ดเลนส์หมาด ๆ เช็ดออก หลังจากการใช้งานให้เลื่อนเลนส์ใกล้วัตถุ (Objective) ที่มีกำลังขยายต่ำสุดอยู่กลางแท่นรองรับวัตถุ (Stage) เพื่อป้องกันเลนส์กระแทกกับแท่นรองรับวัตถุ

**7. เครื่องแก้วต่าง ๆ** ควรใช้เครื่องแก้วชนิดที่ทนความร้อนได้สูง ถ้าเป็นเครื่องแก้วหรือขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีเชื้อเจริญ ก่อนล้างต้องฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันก่อนแล้วจึงนำไปล้างให้สะอาดเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ และปลอดภัยสำหรับผู้สัมผัส ส่วนเครื่องแก้วควรล้างด้วยน้ำสบู่หรือผงซักฟอกแล้วล้างด้วยน้ำที่สะอาด เพื่อกำจัดสารเคมี ฝุ่นละออง และสปอร์ของเชื้อราที่มีอยู่ในหีบห่อ สำหรับเครื่องแก้ว เช่น ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือขวดชมพูที่มีการใช้ปากกาเคมีเขียนชื่อหรือหมายเลขเอาไว้ ต้องล้างออกให้หมดก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เพราะถ้าล้างออกไม่หมดก่อนนำไปนึ่ง จะทำให้สารเคมีติดแน่นล้างออกยาก โดยแนะนำหลักการวิธีการใช้งาน และการดูแลรักษาให้กับนักศึกษา

### บทปฏิบัติการที่ 3 การเตรียม Stock อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เนื่องจากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แต่ละสูตรประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดซึ่งสารเคมีบางชนิดใช้ในปริมาณที่น้อยมาก ไม่สะดวก และมีความคลาดเคลื่อน ถ้าซึ่งทุกครั้งที่เตรียมจึงนิยมเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น (Stock) สูงหลาย ๆ เท่า (50 ถึง 200 เท่า) เพื่อจะเตรียมให้ง่ายขึ้น แต่สารบางตัวหากอยู่ร่วมกับสารอื่น ๆ จะไม่ละลาย หรือละลายไม่หมด จึงจำเป็นต้องแยกเป็นกลุ่ม Stock ออกต่างหาก ดังนี้

#### 1. การเตรียม stock และเตรียมอาหารสูตร MS

การเตรียมอาหารสูตร MS แบ่งเป็น 7 Stock ดัง ตารางที่ 1

2. การเตรียม Stock และเตรียมอาหารสูตร Vacin & Went อาหารสูตรนี้เหมาะสำหรับใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ กล้วยไม้ โดยเฉพาะ การเตรียม Stock สามารถแบ่งกลุ่มได้ 3 stock ดังนี้คือ

Stock A (ความเข้มข้น 100 เท่า) ปริมาณที่ใช้เตรียม Stock 1 ลิตร

$\text{KNO}_3$	52.5 กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	25.0 กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50.00 กรัม

Stock B (ความเข้มข้น 100 เท่า)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.50 กรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.75 กรัม

Stock C (ความเข้มข้น 100 เท่า)

$\text{Na}_2\text{EDTA}$	7.45 กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.75 กรัม

ตารางที่ 1 การเตรียม Stock สูตร MS ปริมาตร 1 ลิตร

Stock ที่	สารเคมี	ปริมาณที่กำหนดในสูตร (มก./ลิตร)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาณที่ใช้เตรียมStock (มก./ลิตร)	ปริมาณที่ใช้เตรียมอาหาร (มก./ลิตร)
1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650	50	82,500	20
2	KNO <sub>3</sub>	1,900	50	95,000	20
3	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	200	1,240	5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	200	34,000	
	KI	0.83	200	166	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	200	50	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	200	5	
4	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	200	88,000	5
5	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	200	74,000	5
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.9	200	3,380	
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6	200	1,720	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	200	5	
6	Na <sub>2</sub> EDTA	37.25	200	7,450	5
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.85	200	5,570	
7	Glycine	2.0	200	400	5
	Nicotinic acid	0.5	200	100	
	Pyridoxine	0.5	200	100	
	HCL	0.1	200	20	
	Thaimine HCL				

หมายเหตุ : สูตรอาหาร Vacin & Went จริง ๆ ใช้ Fe<sub>2</sub>(C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)<sub>3</sub> 2H<sub>2</sub>O (Ferric tartrate) 0.028 กรัม แต่ในประเทศไทยหาซื้อได้ยาก จึงใช้ FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O และ Na<sub>2</sub>EDTA แทน

### การเตรียมอุปกรณ์สำหรับเตรียม Stock อาหารดังนี้

1. ปีกเกอร์ ขนาด 1000 มิลลิลิตร
2. ปีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. ปีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร
4. กระจกบอทวง ขนาด 1000 มิลลิลิตร
5. กระจกบอทวง ขนาด 100 มิลลิลิตร
6. แท่งแก้ว
7. ปีกเกอร์พลาสติก
8. ขวดน้ำกลั่น
9. ซ้อนตักสารเคมี ทั้งแบบโลหะ และพลาสติก
10. กระจกติดป้ายชื่อสาร
11. กรวย
12. ขวดสีชา
13. เครื่องชั่ง ทั้งแบบหยาบ และแบบละเอียด

จัดเตรียมสารเคมีไว้ตาม Stock ที่ 1- 7 โดยอาจารย์ผู้สอนเป็นผู้กำหนด ผู้ปฏิบัติงานเป็นผู้ช่วยควบคุมดูแลการเตรียมสารเคมีให้กับนักศึกษาในทุก ๆ กลุ่ม โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ชั่งสารแต่ละชนิดออกมาโดยติดป้ายชื่อสารเคมีไว้ที่ปีกเกอร์ เมื่อชั่งครบแล้ว
- ทอยยใส่น้ำกลั่นลงไป แล้วใช้แท่งแก้วคนสารเคมีแต่ละชนิดให้ละลาย เมื่อสารเคมีละลายครบจำนวนแล้ว
  - เตรียมน้ำกลั่นใส่ปีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร จำนวน 200 มิลลิลิตร นำสารเคมีที่ละลายแล้วเทใส่ลงไปทั้งหมด แล้วคนให้เข้ากัน ใส่น้ำกลั่นเพิ่มลงไปเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ตามจำนวนที่ต้องการ
  - ปรับปริมาตรอีกครั้งโดยใช้กระจกบอทวง แล้วเทใส่ขวดสีชา ติดป้ายชื่อสารเคมี วันเดือน ปี ผู้เตรียม ความเข้มข้น ปริมาตรที่ใช้ต่อลิตร เก็บในตู้เย็น



## บทปฏิบัติการที่ 4 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

### การเลือกสูตรอาหาร

อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายสูตร แต่ละสูตรมีความเข้มข้น และส่วนประกอบแตกต่างกัน เนื้อเยื่อเหมาะสมจะใช้สูตรใดขึ้นอยู่กับสภาพทดลองใช้ และดัดแปลงเพื่อความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อแต่ละชนิด สูตร MS medium เป็นสูตรที่ใช้ได้กับพืชทั่วไป และเป็นสูตรพื้นฐานที่นำมาใช้ในบทปฏิบัติการ

### การเตรียมอุปกรณ์ในการเลี้ยงอาหารสูตร MS

1. ปีกเกอร์ ขนาด 1000 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ
2. ปีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ใบ
3. ปีเปต ขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 7 อัน
4. จุกยาง จำนวน 7 อัน
5. แท่งแก้ว จำนวน 2 อัน
6. หม้อสแตนเลส จำนวน 1 ใบ
7. เต้าแก๊ส
8. ทัพพี 1 อัน
9. ขวด 4 ออนซ์ กับฝาปิด ประมาณ 70 ขวด พร้อมใช้
10. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง
11. เครื่องชั่งดิจิตอล
12. หม้อนึ่งความดัน
13. Stock ทั้ง 7 Stock
14. วัุ้น
15. น้ำตาลทราย
16. MyO - inositol
17. น้ำกลั่น

### ขั้นตอนการเตรียมสูตรอาหาร MS 1 ลิตร มีขั้นตอนดังนี้คือ

1. ชั่ง MyO – inositol 100 มิลลิกรัม (0.1 กรัม) น้ำตาล 30 กรัม วุ้น 8 กรัม
2. เตรียมน้ำกลั่นใส่ปีเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร จำนวน 300 มิลลิลิตร
3. ใช้ปีเปตดูสารละลาย Stock ต่าง ๆ ตามจำนวนที่คำนวณไว้ให้ครบทุก Stock ใช้แท่งแก้วคนสารละลายให้เข้ากันทุกครั้งที่อยู่ Stock ได้
4. นำ MyO – inositol 100 มิลลิกรัม (0.1 กรัม) ใส่ลงไปคนให้ละลาย
5. ใส่น้ำตาลทราย 30 กรัม คนให้ละลาย
6. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เตรียมเป็น Stock ไว้ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) ตามปริมาณที่ต้องการใช้เลี้ยงพืชชนิดต่างๆ
7. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร
8. ปรับความเป็นกรดต่างด้วย เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง โดยใช้กรดเกลือเจือจาง (HCl 1 N) หรือโปตัสซียมไฮดรอกไซด์ (KOH 1 N) ให้ pH ของอาหารอยู่ที่ 5.6-5.8
9. เติมวุ้น 8 กรัม (ถ้าต้องการเตรียมอาหารอาหารกึ่งแข็ง ใช้วุ้น 6 กรัม) ยกขึ้นตั้งเตาแก๊ส หรือเตาหลอดความร้อน คนตลอดเวลาจนวุ้นละลายดี หรือใช้เตาไมโครเวฟก็ได้ ถ้าเป็นอาหารเหลวให้นำไปบรรจุได้เลยไม่ต้องเติมวุ้น
10. บรรจุอาหารลงในภาชนะที่ใช้เลี้ยง โดยระวังอย่าให้อาหารเปื้อนบริเวณปากภาชนะ เพราะจะทำให้อาหารเสียง่าย และอย่าปิดอาหารแน่นเกินไป
11. นำอาหารที่บรรจุภาชนะเรียบร้อยแล้วไปเข้าหม้อนึ่งความดัน ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ซึ่งจะได้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 นาที เมื่อนึ่งเสร็จเอาอาหารออก ปิดฝาขวดให้แน่นสนิทอีกครั้ง ทิ้งให้เย็นแล้วจึงนำไปใช้เลี้ยงต่อไป

### วิธีการเตรียมอนุกรม Vacin & Went 1 ลิตร มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมน้ำกลั่น 600-700 มิลลิลิตร ใส่ปีเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ไว้
2. เติม Stock A 10 มิลลิลิตร Stock B 10 มิลลิลิตร Stock C 5 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
3. ใส่ Tricalcium phosphate 0.20 กรัม ที่ละลายด้วยกรดเกลือ 1 นอร์มอล แล้วคนให้เข้ากันดี
4. เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร
5. เติมน้ำตาลทราย 20 กรัม คนให้น้ำตาลละลายหมด
6. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร
7. ปรับ pH ให้ได้ 4.8-5.0

8. เติมน้ำ 8 กรัม (ถ้าต้องการเตรียมเป็นอาหารเหลวไม่ต้องใส่หัว) เคี้ยวให้หัวละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน

9. บรรจุใส่ภาชนะที่ต้องการ

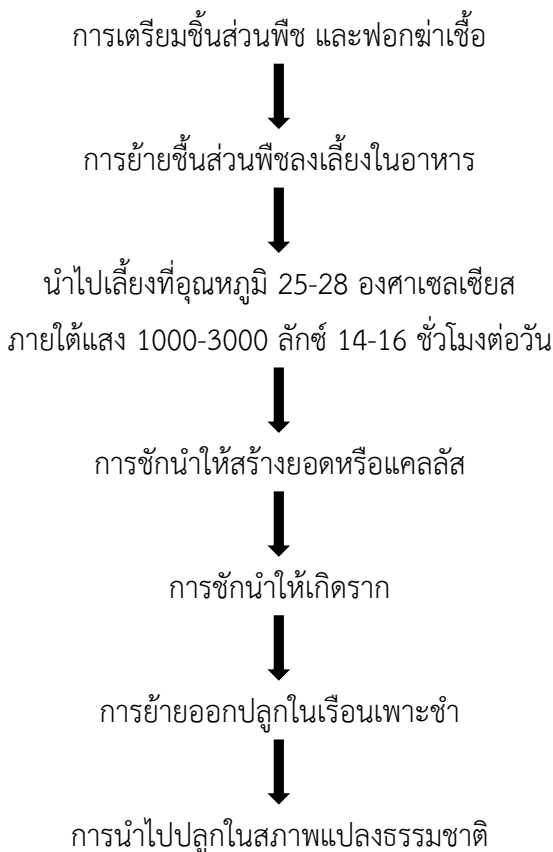
10. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน เช่นเดียวกับการเตรียมอาหารสูตร MS เมื่ออาหารเย็นแล้ว จึงนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

### สรุป

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องเหมาะสมกับชนิดของพืช และสายพันธุ์ ตลอดจนชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง อายุพืช และวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยงว่าต้องการชักนำชิ้นส่วนพืชเหล่านั้นให้มีการเจริญและพัฒนาแบบใด โดยทั่วไปอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละสูตรจะมีส่วนประกอบ คือ สารอนินทรีย์ ได้แก่ ธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองที่อาจใช้ในรูปกรดเกลือหรือสารที่เป็นแหล่งของคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลต่าง ๆ วิตามินได้

## บทปฏิบัติการที่ 5 การฟอกฆ่าเชื้อตายอด และตาข้าง

โดยทั่ว ๆ ไป ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดต่าง ๆ จะประกอบด้วยขั้นตอนโดยสรุปดังแผนภูมิดังต่อไปนี้



### การเตรียมชิ้นส่วนพืช และการฟอกฆ่าเชื้อ

ขั้นตอนนี้ นับว่ามีความสำคัญมาก เพราะถ้าเราเตรียมชิ้นส่วนพืชไม่ดีหรือฆ่าเชื้อไม่หมด จะทำให้เนื้อเยื่อพืชช็อกขาดตายไป หรือเชื้อจุลินทรีย์เจริญขึ้นบนอาหาร และทำให้ชิ้นส่วนพืชเน่าตายไปในที่สุด ไม่สามารถเจริญและพัฒนาต่อไปได้ เป็นเหตุให้งานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อล้มเหลวได้

โดยทั่วไป ขั้นตอนนี้จะเริ่มจากการคัดเลือกชิ้นส่วนพืชมาตัดแต่งส่วนที่ไม่ต้องการออก เช่น ถ้าต้องการปลายยอดหรือตาข้าง ให้ตัดกิ่งมายาวประมาณ 3-6 นิ้ว ตัดเอาใบ และก้านใบออก ล้างด้วยน้ำไหลนาน ๆ หรือน้ำสบู่ น้ำยาล้างจาน ผงซักฟอก เพื่อขจัดเอาฝุ่นละออง และเพื่อลดแรงตึงผิว ครั้งหนึ่ง หลังจากนั้นนำไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70-95 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-2 นาที แล้วเอาไปฟอกฆ่าเชื้อ ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อหรือสารเคมีต่าง ๆ ในการฟอกฆ่าเชื้อ เพื่อให้ปลอดเชื้อนั้นผู้ทำการเพาะเลี้ยงต้อง

ใช้ดุลยพินิจในการเลือกเพื่อให้เกิดความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืช และมีประสิทธิภาพ โดยมีแนวทางในการเลือกดังนี้

1. มีประสิทธิภาพดี ให้เปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อสูง

2. ราคาไม่แพง และหาซื้อได้ง่าย

3. เตรียมได้ง่าย ไม่มีขั้นตอนยุ่งยาก

4. ไม่เป็นอันตรายหรือมีอันตรายน้อยที่สุดต่อตัวอย่างพืช ต่อสิ่งมีชีวิต และผู้ใช้ สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ปัจจุบันมีรายงานใช้หลายชนิดด้วยกันดังนี้

1. แคลเซียมไฮโปคลอไรต์ ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 9-10 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที พบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก และไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช แต่ราคาค่อนข้างแพง

2. โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ( $\text{NaOCl}$ ) ความเข้มข้นประมาณ 0.25-2.63 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที พบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

3. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ความเข้มข้น 3-12 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-15 นาที พบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี และไม่ค่อยเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช ไม่ต้องล้างออกด้วยน้ำเมื่อฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว

4. คลอโรกซ์ (Clorox) เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อหรือน้ำยาฟอกผ้าขาวที่ใช้กันตามบ้านเรือน ซึ่งมีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรต์อยู่ประมาณ 5-7 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นในการใช้ประมาณ 5-20 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

5. สารละลายโบรมไนด์ (Bromide Solution) ความเข้มข้นที่ใช้ 1-2 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 2-10 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

6. ซิวเวอร์ไนเทรต ( $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$ ) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

7. สารละลายไอโอดีน (Iodine Solution ) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

8. เมอคิวริคลอไรด์ ( $\text{HgCl}_2$ ) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.1-1.0 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 2-10 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีพอสมควร แต่อาจเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อได้ ถ้าเป็นเนื้อเยื่อค่อนข้างบอบบาง

9. เมอคิวริกไอโอไดด์ ( $\text{HgI}_2$ ) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

10. เมอคิวรีโบรมไนด์ ( $\text{HgBr}_2$ ) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

11. เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) ความเข้มข้นที่ใช้ 70-95 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 1-5 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

12. กรดกำมะถันหรือกรดซัลฟูริก ( $H_2SO_4$ ) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 20-70 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-20 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

13. สารปฏิชีวนะต่าง ๆ (Antibiotic) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 4-50 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลาที่ใช้ 30-60 นาที มีประสิทธิภาพดีพอสมควร

### ตัวอย่างการฟอกฆ่าเชื้อบนชิ้นส่วนต่าง ๆ

#### 1. การฟอกฆ่าเชื้อบนตายอด และตาข้าง มีขั้นตอนดังนี้

1.1 ตัดเอาส่วนของยอดมายาวประมาณ 3-6 นิ้ว ตัดเอาใบ และก้านใบออกให้หมด หรือถ้ามีใบเกล็ด ที่ห่อหุ้มตาให้เอาออกเสียบ้าง

1.2 ล้างน้ำไหลสักครู่หนึ่ง แล้วล้างด้วยน้ำผสมผงซักฟอกหรือน้ำยาล้างจาน เพื่อขจัดเอาเศษดินหรือฝุ่นละอองออกให้หมด พยายามล้างอย่างเบามือไม่ให้เนื้อเยื่อชำรุด

1.3 ตัดยอดเป็นท่อน ๆ 2-3 ท่อน แช่ยากันราประมาณ 5-20 นาที แล้วล้างด้วย น้ำกลั่นให้สะอาด

1.4 นำลงฟอกในน้ำยาคลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 10-15 นาที แล้วแช่ชนิดพีช (เตรียมใหม่ ๆ โดยใช้ น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร ผสมน้ำยาคลอโรกซ์ 10 มิลลิลิตร และ ผสมทวิน-20 1-2 หยด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อให้มากขึ้น เขย่าเป็นระยะ ๆ)

1.5 นำออกเมื่อครบเวลา ลอกใบเกล็ดที่หุ้มตาหรือกาบใบออกให้หมด เอาลงฟอกต่อในคลอโรกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 5 นาที (เตรียมโดยใช้ น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 95 มิลลิลิตร ผสมน้ำยาคลอโรกซ์ 5 มิลลิลิตร ทวิน 20 1-2 หยด)

1.6 ล้างเอาคลอโรกซ์ออก ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร อีก 3 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที

1.7 คีบตัวอย่างด้วยปากคีบไปวางบนกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว และวางในกระดาษเพื่อซับน้ำให้แห้งพอสมควร ๆ แล้วจึงตัดเอาเฉพาะส่วนตาข้าง และตายอดขนาดประมาณ 2-3 มิลลิลิตร เพื่อย้ายลงขวดอาหารต่อไป

#### อุปกรณ์ที่ต้องเตรียม

1. อาหารสูตร MS (เตรียมอาหารสูตร MS โดยใช้ขั้นตอนการเตรียมอาหารสูตรต่าง ๆ)

2. น้ำฟอกฆ่าเชื้อสำหรับทุกคน ประกอบไปด้วยน้ำ 90 95 และ 100 มิลลิลิตร

3. ปิเปต จุกยาง ปากกาเคมี

4. มีด ปากคีบ กระดาษกรองตัด ผ้าขาวบาง

5. ตูย่ายเนื้อเยื่อ
6. แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์
8. ขวดขนาด 8 ออนซ์
9. ปีกเกอร์ขนาด 100 250 และ 500 มิลลิลิตร

#### สารเคมี

1. Clorox
2. Tween 20
3. ยากำนรา
4. น้ำยาล้างจาน

#### การเตรียมน้ำฟอกฆ่าเชื้อ มีขั้นตอนดังนี้

1. ล้างขวดขนาด 8 ออนซ์ พร้อมฝาขวดให้สะอาด
2. ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร ใส่ขวดปิดฝาพร้อมติดป้าย 90 มิลลิลิตร ให้เรียบร้อยตามจำนวนนักศึกษา คนละ 1 ขวด นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
3. ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 95 มิลลิลิตร ใส่ขวดปิดฝาพร้อมติดป้าย 95 มิลลิลิตร ให้เรียบร้อยตามจำนวนนักศึกษา คนละ 1 ขวด นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
4. ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดปิดฝาพร้อมติดป้าย 100 มิลลิลิตร ให้เรียบร้อยตามจำนวนนักศึกษา คนละ 3 ขวด นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

#### การเตรียมมีด ปากคิ๊บ ผ้าขาวบาง กระดาษรองตัด และตู้แช่เนื้อเยื่อ มีขั้นตอนดังนี้

1. ถอดใบมีดเก่าแล้วล้างทำความสะอาดผึ่งให้แห้ง
2. เปลี่ยนใบมีด แล้วห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ออบใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ใส่ถุงมัดปากถุงให้เรียบร้อย
3. ล้างทำความสะอาดปากคิ๊บ ผึ่งให้แห้ง แล้วห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ออบใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ใส่ถุงมัดปากถุงให้เรียบร้อย
4. ผ้าขาวบาง ซักทำความสะอาด แล้งผึ่งให้แห้ง แล้วห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ออบใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ใส่ถุงมัดปากถุงให้เรียบร้อย

5. กระจกครอบตัดพับครึ่ง แล้วห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ออบในหม้อน้ำความดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เปิดน้ำออกให้หมด แล้ว กด Dry ให้แห้ง อีก 15 นาที ใส่ถุงมัดปากถุงให้เรียบร้อย

6. ตูย้ายเนื้อเยื่อ ใช้แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ฉีดแล้วใช้ผ้าเช็ดให้สะอาดให้ทั่วแล้ว ปิดฝาดำ เปิด UV ประมาณ 30 นาที - 1 ชั่วโมง ก่อนใช้งาน

7. แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ใช้สูตร  $N_1V_1=N_2V_2$  ในการคำนวณปริมาตร แอลกอฮอล์

8. ตะเกียงแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ใช้แอลกอฮอล์ที่เหลือจากการใช้งานจากการใส่ ตะเกียง

#### การเตรียมการเรียนการสอน

1. จัดเตรียมปากคีบ ใบมีด กระจก ผ้าขาวบาง ใส่ถุงแพ็คชุด ไว้คนละ 1 ชุด
2. เตรียมน้ำ 90 และ 95 มิลลิลิตร คนละ 1 ขวด ออกมาไว้ห้องเตรียมสาร
3. เตรียม Clorox และ Tween 20 พร้อมปิเปต
4. เตรียมผสมยากันรา โดยใช้ยากันรา 2 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร ไว้แช่ชิ้นส่วนพืช
5. เตรียมน้ำยาล้างจาน
6. เตรียมตูย้ายเนื้อเยื่อ พร้อมอุปกรณ์ทั้งหมดที่เตรียมไว้
7. ดูแลการทำภารกิจปฏิบัติการของนักศึกษา และวางบนชั้นให้เรียบร้อย
8. ดูแลจัดเก็บอุปกรณ์ที่นักศึกษาทำเสร็จแล้วให้เข้าที่เรียบร้อย



## บทปฏิบัติการที่ 6 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วย

เตรียมอาหารสูตรเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย คือ MS + น้ำมะพร้าว 15 % + แอสคอร์บิก 3 % มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ในปิเกอร์ ขนาด 1 ลิตร
2. เติม Stock 1-7 โดยใช้
  - Stock 1 ใช้ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 2 ใช้ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 3 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 4 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 5 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 6 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 7 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
- เติมน้ำมะพร้าวกรอง 150 มิลลิลิตรต่อลิตร
- เติมแอสคอร์บิก 0.3 กรัมต่อลิตร
3. เติม Myo – inositol 0.1 กรัม
4. เติมน้ำตาลทราย 30 กรัม
5. เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร แล้วคนให้น้ำตาลละลาย
6. ปรับ pH โดยให้ได้ 5.6-5.8 ตามสูตร
7. เติมน้ำ 8 กรัม
8. ตั้งหม้อให้ความร้อนจนน้ำตาลละลาย
9. บรรจุอาหารในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 ออนซ์
10. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
11. ตัดป้ายชื่ออาหารที่ทำเก็บเข้าชั้นวางให้เรียบร้อย

### อุปกรณ์

1. เขียง
2. มีด
3. น้ำยาล้างจาน
4. กระดาษหนังสือพิมพ์ กล้วยขยะ
5. ถุงมือยาง

6. น้ำฟอก 90 95 และ 100 มิลลิลิตร คนละ 1 ชุด
7. ปากคืบ ผ้าขาวบาง ที่ฆ่าเชื้อแล้ว แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ตะเกียงคนละ 1ชุด
8. เตรียมตู้ที่เปิด UV ทิ้งไว้แล้ว
9. Clorox + ปีเปต ขนาด 10 มิลลิลิตร + จุกยาง
10. Tween 20
11. อาหารสูตร MS + น้ามะพร้าว 15% + แอสคอร์บิก 3%
12. แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

ต้องเตรียมให้พร้อมก่อนมีการเรียนการสอน ปูกระดาษหนังสือพิมพ์เตรียมไว้สอนนักศึกษาสับหน่อกล้วยให้มีขนาดเล็ก ๆ แล้วล้างทำความสะอาดหน่อกล้วยให้สะอาดเพื่อเข้าสู่ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อในห้อง แล้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลังจากเสร็จขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ ควบคุมให้นักศึกษาเก็บกวาดเศษหน่อกล้วย และทำความสะอาดห้องให้เรียบร้อย

#### การคัดเลือกหน่อและการฟอกฆ่าเชื้อ มีวิธีการดังนี้

1. คัดเลือกหน่อกล้วยที่เพิ่งโผล่ขึ้นมาเหนือดิน มีความสูงไม่เกิน 1 ฟุต นำมาล้างทำความสะอาด ตัดส่วนยอดออกบ้างให้เหลือส่วนกาบใบประมาณ 10 เซนติเมตร
2. ใช้มีดคม ๆ ลอกกาบหุ้มใบออกทีละชั้นพร้อมกับตัดส่วนฐานลำต้นที่มีขนาดใหญ่ ออก จนหน่อมีขนาดเล็กลง มีความยาวประมาณ 3-4 เซนติเมตร นำไปฟอกฆ่าเชื้อในคลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นานประมาณ 15 นาที และฟอกต่อด้วยคลอโรกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ อีก 5 นาที
3. ล้างน้ำยาคลอโรกซ์ออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที
4. นำออกมาลอกกาบใบที่ห่อหุ้มออกจนเหลือปลายยอดขนาด 1 เซนติเมตร หรือเล็กกว่านี้ นำจุ่มลงสารละลายกรดแอสคอร์บิก หรือโพลิไวนิลไพร์โรลิโดล เข้มข้น 200-500 มิลลิกรัมต่อลิตร แช่นาน 10-15 นาที เพื่อลดการสร้างสารสีน้ำตาลของกล้วย
5. ตัดแบ่งยอดออก 2-4 ส่วนตามความยาว เพื่อทำลายตายอดซึ่งจะส่งเสริมให้แตกตาข้างนำไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2-5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโคส 30 กรัม น้ามะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์

#### การเพิ่มปริมาณและทำให้ออกราก

หลังจากเลี้ยงไป 1-2 เดือน ตาจะเจริญเป็นหน่อให้แยกหน่อมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม เพื่อเพิ่มปริมาณตามต้องการ โดยตัดแยกหน่อมาลอกส่วนกาบใบออกจนเหลือโคนลำต้น สูง 3-5 มิลลิเมตร ตัดใบออก ผ่าโคนลำต้นเป็น 2 ส่วนไปวางบนอาหารชนิดใหม่ แต่ถ้าหลังจากเลี้ยงประมาณ 1 เดือน กล้วยสร้างสารสีน้ำตาลออกมามากและเนื้อเยื่อมีสีดำนมาก ให้ตัดแต่งส่วนที่เป็นสีดำออก แล้ว

เปลี่ยนอาหารใหม่ ประมาณอีก 2-3 สัปดาห์ ตาเจริญเป็นหน่อขึ้นมาแล้ว จึงทำการแยกหน่อและลอก กาบใบออกผ่าครึ่งตามยาวของต้นตามวิธีที่กล่าวมา ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ ทุก 3-4 สัปดาห์ จะได้ต้นมากขึ้น

เมื่อได้จำนวนมากพอดัดแยกหน่อเดี่ยว ๆ ลงเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำราก (ใช้อาหารสูตร MS เต็ม NAA หรือ IAA ความเข้มข้น 0.5-1 มิลลิกรัมต่อลิตร เต็มผงถ่านประมาณ 0.01-0.05 เปอร์เซ็นต์) ประมาณ 3-4 สัปดาห์ จะแตกรากพร้อมย้ายปลูกได้ (จากการทดลองของประศาสตร์ เกี่ยมณี พบว่าถ้า เลี้ยงในอาหารเหลว จะทำให้เกิดหน่อเร็วขึ้น 2-3 เท่าตัว ของที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง)

### การย้ายปลูก

ทำการล้างวุ้นที่ติดมากับรากให้หมด ตัดแต่งใบแห้ง ใบเหี่ยว จุ่มในยากันราประมาณ 5 นาที นำไปปลูกในถุงพลาสติกสีดำขนาดเล็ก บรรจุดินผสมซึ่งประกอบด้วย แกลบเผา 1 ส่วน ทรายละเอียด 1 ส่วน และดินร่วน 1 ส่วน รดน้ำให้ชุ่มครอบด้วยแก้วพลาสติกเจาะรูด้านบนหรือวางในกระบะ ฟันหมอก ประมาณ 3 วัน แล้วเอาแก้วพลาสติกออกให้น้ำตามปกติ เมื่อแข็งแรงแล้วจึงเอาออกปลูกใน แปลง

## บทปฏิบัติการที่ 7 การแยกหน่อ ( Sub culture )

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยอาศัยอาหารสูตรที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นเป็นทวีคูณ จากที่เริ่มต้นทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพืชเพียงต้นเดียว และทำการย้ายเนื้อเยื่อเดือนละครั้ง และแต่ละเดือนต้นพืชสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้ 10 ต้น เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 6 เดือน จะสามารถผลิตต้นพืชในหลอดทดลองได้ถึง 1 ล้านต้น ซึ่งไม่มีวิธีอื่นใดที่จะผลิตต้นกล้าพืชให้ได้ปริมาณมาก และรวดเร็วเช่นนี้

### เตรียมอาหาร

โดยเตรียมสูตรจากคำสั่งของอาจารย์ผู้สอน หรือ MS Medium MS สูตร 1 ลิตร มีขั้นตอนดังนี้

1. เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ ขนาด 1 ลิตร
2. เติม Stock 1-7 โดยใช้
  - Stock 1 ใช้ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 2 ใช้ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 3 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 4 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 5 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 6 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 7 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
3. เติม Myo – inositol 0.1 กรัม
4. เติมน้ำตาลทราย 30 กรัม
5. เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร แล้วคนให้น้ำตาลละลาย
6. ปรับ pH โดยให้ได้ 5.6-5.8 ตามสูตร
7. เติมน้ำ 8 กรัม
8. ตั้งหม้อให้ความร้อนจนน้ำละลายใส
9. บรรจุอาหารในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 ออนซ์
10. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
11. ตัดป้ายชื่ออาหารที่ทำเก็บเข้าชั้นวางให้เรียบร้อย

## อุปกรณ์

1. เตรียมมีด ปากคีบ ผ้าขาวบาง กระดาษรองตัด ที่ฆ่าเชื้อแล้ว
2. เตรียมตู้ที่เปิด UV ทิ้งไว้แล้ว
3. เตรียมต้นไม้ไว้ให้นักศึกษาแยกหน่อให้ครบจำนวนนักศึกษา
4. แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ใส่ฟ็อกกี้ แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และ

ตะเกียงแอลกอฮอล์

หลังจากเตรียมของเสร็จแล้ว ต้องเข้าช่วยอาจารย์ผู้สอนสอนการแบ่งแยกต้นไม้ในขวด  
ให้นักศึกษา เพราะว่าพืชแต่ละชนิดแบ่งแยกไม่เหมือนกัน หลังจากเสร็จแล้วควบคุมนักศึกษาเก็บล้าง  
ทำความสะอาดเครื่องมือ และอุปกรณ์ให้เรียบร้อย

## บทปฏิบัติการที่ 8 การย้ายพืชลงปลูก

ต้นไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะมีรูปร่างทรงต้นปกติในสภาพธรรมชาติเพียงแต่มีขนาดเล็ก มีความสูงประมาณ 4-6 เซนติเมตร มีใบไม่ต่ำกว่า 4 ใบ จำนวนราก มี 4-5 เส้น เมื่อนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำเป็นต้องได้รับการดูแลเป็นพิเศษ ต้นพืชจะมีการสร้างคิวติน (Cutin) ทำหน้าที่ควบคุมการสูญเสียน้ำ จากใบน้อยในขณะที่ปากใบยังเปิดกว้าง เมื่อออกสัมผัสกับอากาศที่มีสภาพแวดล้อมทั้งแสง อุณหภูมิ ความชื้นไม่สม่ำเสมอตลอดเวลา พืชจะคายน้ำมากขึ้นทำให้เหี่ยวเฉาและตายได้ง่าย ดังนั้นการย้ายพืชเนื้อเยื่อจากอาหารรุ้น เพื่อปลูกในสภาพธรรมชาติต้องระมัดระวังเรื่องอัตราการสูญเสียน้ำของพืชเป็นพิเศษ ควรให้ความสมดุลระหว่างอัตราการสูญเสียน้ำกับอัตราการดูดน้ำขึ้นมาใช้ให้มากที่สุด จึงจะสามารถทำให้ต้นพืชรอดชีวิตอยู่ได้

ก่อนเข้าถึงขั้นตอนการดูแลหรือการอนุบาลพืชเนื้อเยื่อระยะต่าง ๆ ควรมีการปรับสภาพพืชให้เริ่มเรียนรู้และค่อย ๆ ปรับตัว อยู่กับสภาพแวดล้อมที่เป็นธรรมชาติได้ โดยเพิ่มความเข้มแสง ลดความชื้นภายในภาชนะลดลง อาจใช้วิธีนำขวดเนื้อเยื่อพืชออกมาวาง ในสภาพอุณหภูมิห้องที่มีอากาศถ่ายเทสะดวก ระยะเวลา 2-3 วันแรกตามลำดับ

### สิ่งที่ต้องเตรียม

1. เลือกต้นพืชที่ออกรากมาปรับสภาพเนื้อเยื่อพืช 2-3 วัน ก่อนปลูกในสภาพอุณหภูมิห้องปกติที่มีอากาศถ่ายเทสะดวก ให้พอกับจำนวนนักศึกษา
2. ยาป้องกันเชื้อรา ปากคิบ กรรไกร มีดผ่าตัด ตามจำนวนกลุ่ม
3. ถาดสแตนเลส ตามจำนวนกลุ่ม
4. กระชอน กะละมัง ตามจำนวนกลุ่ม
5. น้ำกรอง
6. ถ่านแกลบ กาบมะพร้าวสับ ขุยมะพร้าวร่อน ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว
7. ทราย 4 นิ้ว ถู ปากกาเคมี

### การปฏิบัติการช่วยอาจารย์ผู้สอนดูแลการทำกรย้ายโดยแบ่งพืชละชนิด มีขั้นตอนดังนี้

1. ผสมวัสดุปลูกถ่านแกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 ผสมให้เข้ากัน รดน้ำให้มีความชื้นพอสมควร
2. ล้างทราย 4 นิ้ว ให้สะอาด ใส่กากมะพร้าวสับรองก้นกระถางเล็กน้อย
3. นำพืชออกจากภาชนะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยปากคิบ

4. ล้างอาหารวุ้นที่ติดอยู่บริเวณปลายรากออกให้หมดด้วยน้ำสะอาด ตัดแต่งใบแห้งออก ใบล่างที่อยู่ชิดโคนออก ถ้ายอดยาวไปให้ใช้กรรไกรตัดออกได้ ถ้ารากยาวไปสามารถตัดออกได้บ้าง
5. นำต้นพืชแช่ในสารป้องกันเชื้อรา และแบคทีเรีย เป็นเวลา 3-5 นาที ก่อนปลูก เพื่อป้องกันโรคต้นเน่า เนื่องจากพืชยังอ่อนแอต่อการทำลายเชื้อโรค
6. ทำหลุมเล็ก ๆ ในวัสดุปลูกใช้ปากคีบจับโคนต้นพืช นำลงปลูกกลบวัสดุปลูกให้มิดราก หรือมิดโคนต้นพอดี เพราะถ้ารากโผล่พื้นวัสดุปลูกสัมผัสกับอากาศ อาจทำให้ราก และต้นพืชเหี่ยวได้ รดน้ำให้ชุ่ม
7. ใช้ถุงพลาสติกใส่คลุมกระถางทำให้ถุงโปร่งเล็กน้อย พร้อมทั้งเขียนชื่อพืช วันเดือนปีที่ทำ ทิ้งไว้ในที่ร่มรำไร ประมาณ 10 วัน เมื่อพืชเริ่มแตกยอดให้ทยอยเปิดปากถุงทีละนิด เพื่อปรับสภาพพืช และคอยรดน้ำบ้างเป็นบางครั้งจนพืชสามารถตั้งตัวได้
8. ย้ายต้นพืชไปไว้ในเรือนเพาะชำเพื่อดูแลและให้การเจริญเติบโต สามารถนำมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ เพื่อจัดจำหน่ายต่อไป

## บทปฏิบัติการที่ 9 การเตรียมอาหารสูตรอื่น

โดยการเตรียมอาหารสูตรอื่น เพื่อใช้ในการขยายพันธุ์สำหรับให้นักศึกษาฝึกปฏิบัติหรือเพาะเลี้ยงพันธุ์พืชใหม่

### 1. การเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog, MS + BAP

1. เติมน้ำกลั่น 600-700 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ ขนาด 1000 มิลลิลิตร
2. เติม Stock 1-7 โดยใช้
  - Stock 1 ใช้ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 2 ใช้ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 3 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 4 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 5 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 6 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 7 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
3. เติม BAP 20 มิลลิลิตร
4. เติม Myo – inositol 0.1 กรัม
5. เติม น้ำตาลทราย 30 กรัม
6. เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร แล้วคนให้น้ำตาลละลาย
7. ปรับ pH โดยให้ได้ pH 5.6-5.8 ตามสูตร
8. เติมน้ำ 7-8 กรัม
9. ตั้งหม้อให้ความร้อนจนน้ำละลายใส
10. บรรจุอาหารในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 และ 8 ออนซ์
11. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที อุณหภูมิ 121

องศาเซลเซียส นาน 15 นาที



## 2. การเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog หรือ MS + IAA 5 มิลลิลิตร

1. เติมน้ำกลั่น 600-700 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ ขนาด 1000 มิลลิลิตร
2. เติม Stock 1-7 โดยใช้
  - Stock 1 ใช้ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 2 ใช้ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 3 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 4 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 5 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 6 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
  - Stock 7 ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร
3. เติม IAA
4. เติม Myo – inositol 0.1 กรัม
5. เติม น้ำตาลทราย 30 กรัม
6. เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร แล้วคนให้น้ำตาลละลาย
7. ปรับ pH โดยให้ได้ 5.6-5.8 ตามสูตร
8. เติมน้ำ 7-8 กรัม
9. ตั้งหม้อให้ความร้อนจนน้ำละลายใส
10. บรรจุอาหารในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 และ 8 ออนซ์
11. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที อุณหภูมิ 121

องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

## 3. การเตรียมอาหารสูตร Vacin & Went 1 ลิตร มีขั้นตอนดังนี้ (สำหรับเพาะเมล็ดกล้วยไม้)

1. เตรียมน้ำกลั่น 600-700 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ไว้
  2. เติม Stock A 10 มิลลิลิตร Stock B 10 มิลลิลิตร Stock C 5 มิลลิลิตร คนให้เข้า
- กัน
3. ใส่ Tricalcium phosphate 0.20 กรัม ที่ละลายด้วยกรดเกลือ 1 N แล้วคนให้เข้า
- กันดี
4. เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร

5. เติมน้ำตาลทราย 20 กรัม คนให้น้ำตาลละลายหมด
6. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร
7. ปรับ pH ให้ได้ 4.8-5.0
8. เติมน้ำ 6-8 กรัม เคี้ยวให้มันละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน
9. เติมผงถ่าน 1.5 กรัม
10. บรรจุอาหารในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 และ 8 ออนซ์
11. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที อุณหภูมิ 121

องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

#### 4. การเตรียมอาหารสูตร Vacin & Went สำหรับย้ายต้นอ่อน

1. เตรียมน้ำกลั่น 600-700 มิลลิลิตร ใส่ปีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ไว้
  2. เติม Stock A 10 มิลลิลิตร Stock B 10 มิลลิลิตร Stock C 5 มิลลิลิตร คนให้เข้า
- กัน
3. ใส่ Tricalcium phosphate 0.20 กรัม ที่ละลายด้วยกรดเกลือ 1 N แล้วคนให้เข้า
- กันดี
4. เติมน้ำมะพร้าว (เนื้อมะพร้าวยังเป็นมัน) 150 มิลลิลิตร
  5. เติมน้ำตาลทราย 20 กรัม คนให้น้ำตาลละลายหมด
  6. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร
  7. ปรับ pH ให้ได้ 4.8-5.0
  8. เติมน้ำ 7 กรัม
  9. เติมกล้วยหอม 100 กรัม
  10. เติมผงถ่าน 1.5 กรัม
  11. ต้มจนมันใส
  12. บรรจุอาหารในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 และ 8 ออนซ์
  13. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที อุณหภูมิ 121

องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

### เงื่อนไข/ข้อสังเกต/ข้อควรระวัง/สิ่งที่ควรคำนึงในการปฏิบัติ

สิ่งที่ควรระวังและคำนึงถึง เพื่อให้การเรียนการสอนในวิชาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีความถูกต้อง และผิดพลาดน้อยที่สุด และปลอดภัยแก่ผู้เรียน มีดังต่อไปนี้

3.3.1 การแต่งกาย เครื่องแต่งกายควรรัดกุม ไม่หลวม ไม่ใส่กางเกงหรือกระโปรงสั้น ไม่ใส่ รองเท้าแตะ ไม่สวมเครื่องประดับ ไม่ใส่คอนแทคเลนส์ ควรสวมเสื้อกาวนแขนยาวปิดกระดุมตลอดเวลา ที่ปฏิบัติงาน เพื่อป้องกันการกระเด็นและปนเปื้อนสารเคมี สวมหน้ากากป้องกันระเหย ใส่ถุงมือเมื่อต้อง ปฏิบัติงานกับสารเคมี ใส่แว่นตาป้องกันสารเคมีหรืออันตรายทางกายภาพอื่นๆ และควรถอดเสื้อกาวน ตลอดจนอุปกรณ์ป้องกันอื่นๆ เมื่อออกจากห้องปฏิบัติงาน

3.3.2 ในห้องปฏิบัติการ ห้ามวิ่งเล่น กระทบก Ding ดัน ผลัก สุกบุหรี รับประทานอาหารเครื่องดื่ม

3.3.3 เมื่อเกิดปัญหา ดังรายการข้างล่าง ให้ปฏิบัติดังนี้

3.3.3.1 ไฟดับระหว่างใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ แจ้งผู้ดูแลเพื่อแก้ไขปัญหา

3.3.3.2 ได้รับอันตรายในระหว่างปฏิบัติงาน

อันตรายในห้องปฏิบัติการ	ข้อควรปฏิบัติ	แก้ไขเบื้องต้น
สุดตมสารเคมี	เตรียมสาร ระเหย ในตู้ดูดควัน	รีบออกจากห้องปฏิบัติการ โดยเร็ว
สารเคมีเข้าปาก	ห้ามดูดสารจากปิเปตด้วยปาก ล้างมือเมื่อมีการปนเปื้อน	-กรณีรู้สึกตัวและไม่มีอาการชัก ให้ดื่มน้ำสะอาด หรือนมเพื่อเคลือบ ภาวะอาหาร กระตุ้นให้อาเจียน -กรณีหมดสติ ได้รับสารพิษ เช่น กรดต่าง เบนซิน เป็นโรคหัวใจ ห้ามทำให้อาเจียนเด็ดขาด รีบ นำส่งโรงพยาบาลระหว่างนำส่ง หากอาเจียนให้จัดศีรษะต่ำเพื่อ ป้องกันการสำลักสาเคมีเข้า ปอด
สารเคมีหกใส่ร่างกาย	ใส่เสื้อกาวน ใส่ถุงมือป้องกัน	รีบถอดเสื้อผ้าที่เปื้อนออก เช็ด หรือซับอย่างรวดเร็วภายใน 15 วินาที และชำระล้างสารเคมี ออกจากร่างกายด้วยน้ำไหล

		ประมาณ 15 นาที รีบไปพบแพทย์
สารเคมีกระเด็นเข้าตา	ใส่แว่นตาป้องกัน	รีบล้างตาทันที โดยให้น้ำพุ่งเข้าตาอย่างเต็มที่ เป็นเวลานาน 15 นาที รีบไปพบแพทย์
ไฟไหม้ตู้แช่เยื่อ	วางขวดแอลกอฮอล์ให้ห่างจากมือ	ปิดเครื่องทันที แล้วชักปลั๊กไฟ ใช้ผ้าชุบน้ำคลุมเปลวไฟหลายๆ ชั้น จักกว่าไฟจะดับ ห้ามนำน้ำมาลาดในตู้แช่เยื่อเด็ดขาด

3.3.3.3 เมื่อมีการใช้งานเครื่องมือต้องลงชื่อบันทึกการใช้งานทุกครั้ง

3.3.3.4 เมื่อใช้งานห้องปฏิบัติการเรียบร้อยแล้วให้ดูแลความสะอาดพื้นที่ปฏิบัติงาน จัดเก็บอุปกรณ์เข้าที่ ปิดน้ำ - ไฟ

#### แนวคิด/งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การใช้ห้องปฏิบัติการจะต้องยึดหลักปฏิบัติเดียวกันเพื่อความเป็นระเบียบปลอดภัย และให้เกิดผลตามวัตถุประสงค์ เพื่อประโยชน์ของส่วนรวมและของผู้ปฏิบัติเอง

1. ทุกคนต้องนึกถึงความปลอดภัยที่จะเกิดจากการทำงานในห้องปฏิบัติการซึ่งอาจเกิดจากไฟ สารเคมี และอื่นๆ

2. ทุกคนต้องช่วยรักษาความสะอาด ต้องทำความสะอาดทุกครั้งหลังจากทำงานเสร็จ

3. ช่วยประหยัด วัสดุหรือพลังงานด้วยความประหยัด เช่น ไฟฟ้า น้ำ เป็นต้น

4. ก่อนใช้งานอุปกรณ์ทุกชนิด จะต้องเข้าใจและรู้วิธีใช้จากผู้รู้ก่อน การใช้ผิดวิธีจะทำให้เกิดผลเสียกับอุปกรณ์นั้นๆ เช่น เครื่องชั่ง เป็นต้น

5. การชั่งสารเคมี ควรตักใส่ภาชนะหรือกระดาษไข ห้ามวางสารเคมีบนแท่นชั่งโดยตรง ให้เทสารเคมีที่ละน้อยจนครบความต้องการ

6. การใช้ตู้ปลอดเชื้อให้เปิดไฟ UV ทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที พร้อมทั้งเปิดพัดลมก่อนการใช้งาน หลังจากเปิดไฟแล้วให้ฉีดแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ให้ทั่วภายในตู้ ควรฉีดพ่นแอลกอฮอล์กับอุปกรณ์ทุกชิ้นก่อนนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ หลังจากใช้เสร็จแล้ว ควรเช็ดให้ตู้สะอาด ปิดไฟให้เรียบร้อย

ลดาพร บุญฤทธิ(2545) คู่มือปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 29,2,2004, from ( . [http://sci.pit.ac.th/\\_files/down/pic\\_rFbIPEhP.pdf](http://sci.pit.ac.th/_files/down/pic_rFbIPEhP.pdf). )

## จรรยาบรรณ/คุณธรรม/จริยธรรมในการปฏิบัติงาน

ผู้ปฏิบัติงานตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ได้ยึดหลักจรรยาบรรณนักวิทยาศาสตร์ มีดังนี้

### 1. จรรยาบรรณของนักวิทยาศาสตร์

1.1 เป็นผู้มีศีลธรรมและคุณธรรมในการประกอบอาชีพ

1.2 ประกอบอาชีพด้วยความซื่อสัตย์สุจริต ไปรับทรัพย์สินหรือผลประโยชน์อย่างใดสำหรับตนเองโดยมิชอบ

1.3 มีวินัยในตนเอง พัฒนาตนเองด้านวิชาชีพ บุคลิกภาพและวิสัยทัศน์ให้ทันต่อการพัฒนาทางวิชาการ เศรษฐกิจและสังคม

1.4 ต้องไม่ทำงานทางวิทยาศาสตร์ที่จัดต่อความสงบเรียบร้อย ศีลธรรมอันดีของประชาชนและความมั่นคงของชาติ

1.5 มีจรรยาบรรณของนักวิจัยตามที่สภาวิจัยกำหนดไว้

### 2. จริยธรรมของบุคลากรมหาวิทยาลัย

2.1 บุคลากรของมหาวิทยาลัย ต้องรักษาจริยธรรมต่อตนเอง วิชาชีพและการปฏิบัติงาน ดังนี้

2.1.1 พึงยึดมั่นในระบอบประชาธิปไตยอันมีพระมหากษัตริย์ทรงเป็นประมุขปฏิบัติ ตาม กฎหมาย ระเบียบ ข้อบังคับ และแบบธรรมเนียมของมหาวิทยาลัย

2.1.2 พึงประพฤติตนตามแนวทางหลักปรัชญาเศรษฐกิจพอเพียง ยึดหลักพออยู่พอกิน พอใช้ ลดค่าใช้จ่าย และความฟุ่มเฟือย

2.1.3 พึงยึดมั่นในคุณธรรมและจริยธรรม เป็นผู้ที่มีศีลธรรมอันดี และประพฤติตนให้เหมาะสมกับการเป็นผู้ปฏิบัติงานในมหาวิทยาลัยและตำแหน่งที่ดำรงอยู่

2.1.4 ต้องมีจิตสำนึกที่ดี ซื่อสัตย์สุจริตและรับผิดชอบ ใช้วิชาชีพในการปฏิบัติหน้าที่ด้วยความซื่อสัตย์ สุจริต โปร่งใสและตรวจสอบได้ ยึดถือประโยชน์ของประเทศชาติเหนือกว่าประโยชน์ส่วนตน ไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อน รวมทั้งไม่แสวงหาผลประโยชน์โดยมิชอบ ในกรณีที่วิชาชีพใดมี จริยธรรมวิชาชีพกำหนดไว้ พึงยึดมั่นในหลักจรรยาวิชาชีพและปฏิบัติตามจรรยาวิชาชีพนั้นอย่างเคร่งครัด

2.1.5 พึงยินดีทำในสิ่งที่ถูกต้องเป็นธรรมและถูกกฎหมาย มีทัศนคติที่ดี รวมทั้งเพิ่มพูนความรู้ ความสามารถ และทักษะในการทำงานจนเกิดความแตกฉานแม่นยำ เพื่อให้การปฏิบัติหน้าที่มีประสิทธิภาพและได้ประสิทธิผลยิ่งขึ้น

2.1.6 พึงให้บริการแก่ผู้รับบริการทุกคนด้วยความรวดเร็ว มีอัธยาศัยอันดี และไม่เลือกปฏิบัติ

2.1.7 พึงให้ข้อมูลข่าวสารแก่ประชาชนอย่างครบถ้วนถูกต้อง และไม่บิดเบือนข้อเท็จจริง

- 2.1.8 พึ่งมุ่งผลสัมฤทธิ์ของงาน รักษามาตรฐานและมีคุณภาพ
- 2.2 บุคลากรของมหาวิทยาลัย ต้องรักษาจริยธรรมต่อมหาวิทยาลัย ดังนี้
- 2.2.1 พึ่งยึดมั่นในปณิธานของมหาวิทยาลัย
- 2.2.2 ต้องปฏิบัติงานด้วยความซื่อสัตย์ สุจริต เสมอภาค ปราศจากอคติ
- 2.2.3 พึ่งปฏิบัติหน้าที่อย่างเต็มกำลังความสามารถ รอบคอบ รวดเร็วขยันหมั่นเพียร ถูกต้องสมเหตุสมผล โดยคำนึงถึงประโยชน์ของมหาวิทยาลัย ผู้ปกครอง และประชาชนเป็นสำคัญ
- 2.2.4 พึ่งประพฤติตนเป็นผู้ตรงต่อเวลา และใช้เวลาการทำงานปฏิบัติหน้าที่ให้เป็นประโยชน์ ต่อมหาวิทยาลัยอย่างเต็มที่
- 2.2.5 พึ่งดูแลรักษาและใช้ทรัพย์สินของมหาวิทยาลัยอย่างประหยัดและคุ้มค่าโดยระมัดระวังมิให้เสียหาย หรือสิ้นเปลืองเยี่ยงวิญญูชนพึงปฏิบัติต่อทรัพย์สินของตนเอง
- 2.3 บุคลากรของมหาวิทยาลัย ต้องรักษาจริยธรรมต่อผู้ใต้บังคับบัญชา ผู้บังคับบัญชา และผู้ร่วมงาน ดังนี้
- 2.3.1 ผู้บังคับบัญชา พึ่งดูแลเอาใจใส่ผู้ใต้บังคับบัญชาในทุกเรื่องทั้งในด้านการปฏิบัติงาน ขวัญกำลังใจ สวัสดิการ ยอมรับฟังความคิดเห็นของผู้ใต้บังคับบัญชา ตลอดจนปกครองผู้ใต้บังคับบัญชาด้วยหลักธรรมาภิบาล
- 2.3.2 บุคลากรพึงปฏิบัติต่อผู้บังคับบัญชา ผู้ร่วมงานตลอดจนผู้เกี่ยวข้องด้วยความสุภาพ มีน้ำใจไมตรี เอื้ออาทร มีมนุษยสัมพันธ์และความสัมพันธ์ที่ดี
- 2.3.3 บุคลากรพึงมีความรับผิดชอบในการปฏิบัติงาน การให้ความร่วมมือช่วยเหลือเพื่อนร่วมงาน หรือกลุ่มงานของตนและส่วนรวม ทั้งในด้านการให้ความคิดเห็น การช่วยทำงานและแก้ปัญหาาร่วมกัน รวมทั้งการเสนอแนะในสิ่งที่จะเห็นว่าจะมีประโยชน์ต่อการพัฒนางานในความรับผิดชอบด้วย
- 2.3.4 บุคลากรต้องละเว้นจากการนำผลงานของผู้อื่นมาเป็นของตน และต้องไม่คัดลอกหรือลอกเลียนผลงานทางวิชาการของผู้อื่นโดยมิชอบ หรือนำผลงานทางวิชาการของผู้อื่น หรือจ้างวานหรือใช้ผู้อื่นทำผลงานทางวิชาการ เพื่อนำไปใช้ในการเสนอขอตำแหน่งหรือการเลื่อนตำแหน่งให้สูงขึ้น หรือการให้ได้รับเงินเดือนในระดับสูงขึ้นหรือในการอื่นใด
- 2.3.5 บุคลากรพึงเคารพเสรีภาพในการแสดงความคิดเห็น ยกย่องให้เกียรติในศักดิ์ศรีของเพื่อนร่วมงานที่มีมุมมองต่างจากตนเอง

## บทที่ 4

### เทคนิคในการปฏิบัติงาน

#### กิจกรรม/แผนปฏิบัติงาน

ชื่อแผนปฏิบัติงาน	การเตรียมบทปฏิบัติการของรายวิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
ข้อกำหนดของแผนปฏิบัติงาน	เตรียมปฏิบัติการได้อย่างถูกต้อง ครบถ้วนและทันเวลา
ตัวชี้วัด	1. ร้อยละของจำนวนครั้งที่เตรียมปฏิบัติการเสร็จก่อนเริ่มการเรียนอย่างน้อย 1 วัน 2. ร้อยละของความพึงพอใจที่เตรียมปฏิบัติการ

แผนปฏิบัติงาน	รายละเอียดงาน
1. ประชุมกับอาจารย์ผู้สอน	เพื่อจัดแผนการเรียนการสอนในภาคปฏิบัติและเตรียมบทปฏิบัติ
2. ศึกษาวิเคราะห์ บทปฏิบัติการอย่างละเอียด	เพื่อวิเคราะห์บทปฏิบัติการต้องใช้สารเคมี วัสดุ - อุปกรณ์ จำนวนเท่าไร ใช้เครื่องมืออะไรบ้าง
3. ตรวจสอบจำนวนอุปกรณ์สารเคมี เครื่องมือต่างๆ	เพื่อตรวจสอบว่า วัสดุ - อุปกรณ์ สารเคมี มีเพียงพอหรือไม่ เพื่อจัดซื้อต่อไป
4. เตรียมห้องปฏิบัติการ	จัดเตรียมอุปกรณ์ เครื่องแก้วที่ต้องใช้ในชั่วโมงปฏิบัติการ
5. สอนปฏิบัติการ	ช่วยควบคุมนักศึกษา ระหว่างชั่วโมงปฏิบัติการ แก้ไขปัญหาต่างๆ ให้นักศึกษา
6. จัดเก็บ	จัดเก็บอุปกรณ์ เครื่องแก้ว ล้างทำความสะอาดคว่ำให้แห้งที่ใช้ในการเรียนการสอนให้พร้อมในรายวิชาต่อไป ทำความสะอาดเก็บกวาดห้องให้เรียบร้อย

#### วิธีการติดตามและประเมินผลการปฏิบัติงาน

ติดตามและประเมินผลปฏิบัติงานเป็นขั้นตอนในการตรวจสอบผลจากการปฏิบัติงานจริงเพื่อนำผลการประเมินไปพิจารณาวางแผนการปฏิบัติงานให้สะดวกและรวดเร็ว สำหรับการเรียนการสอนในรายวิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยผู้เขียนใช้แบบประเมินตนเองเมื่อแล้วเสร็จภาคการศึกษา โดยคาดหวังไว้ว่าเป้าหมายที่ตั้งไว้ควรประสบความสำเร็จมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

แบบฟอร์มประเมินการปฏิบัติงาน

เป้าหมาย	คะแนน				
	สำเร็จตามเป้า	สำเร็จตามเป้า	สำเร็จตามเป้า	สำเร็จตามเป้า	สำเร็จตามเป้า
	100 %	80 %	60 %	40 %	20 %
จัดเตรียมปฏิบัติการแล้ว เสร็จพร้อมทำปฏิบัติการ ล่วงหน้าก่อนถึงเวลาทำ จริง					
เตรียมปฏิบัติการได้ ถูกต้องตามคู่มือ ปฏิบัติการ					
สอนปฏิบัติการได้ผลที่ ถูกต้องตามทฤษฎี					
สารเคมีและอุปกรณ์มี เพียงพอต่อจำนวน นักศึกษา					
ปฏิบัติการสามารถ ดำเนินไปได้อย่างราบรื่น ไม่อุปสรรคใดๆ					



## บทที่ 5

### ปัญหาอุปสรรค แนวทางแก้ไขและพัฒนา

ปัญหาและอุปสรรคแนวทางการแก้ไขและการพัฒนา เนื่องจากในรายวิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีนักศึกษาที่เรียนอย่างต่อเนื่องในทุกปีและจะต้องมีห้องสำหรับการเรียนการสอนโดยเฉพาะต้องมีการดูแลอย่างต่อเนื่อง จึงทำให้พบปัญหาในการเรียนการสอนได้

ปัญหาที่พบบ่อยๆ จากการทำงาน ในการเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี ในห้องปฏิบัติการ สามารถสรุป ได้ดังนี้

ปัญหาและอุปสรรค	แนวทางแก้ไขและพัฒนา
1. ต้นพืชที่เจริญเติบโตในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเติบโตไม่ทันกับ บทปฏิบัติการนั้น	1. ต้องตรวจสอบระยะเวลาในบทปฏิบัติการนั้นๆ ให้ชัดเจนเพื่อที่จะคำนวณการเจริญเติบโตได้ 2. ต้องเตรียมจำนวนต้นพืชให้มากกว่าจำนวนของนักศึกษาที่เรียน 3. เตรียมในช่วงที่ไม่มีการเรียนการสอนให้เพียงพอ
2. อุปกรณ์หรือเครื่องมือไม่เพียงพอต่อความต้องการของนักศึกษา	1. แบ่งนักศึกษาเป็นกลุ่มๆในการเรียนการสอน 2. ยุบรวมกลุ่มให้น้อยลงในการทำปฏิบัติการ
3. นักศึกษาทำอุปกรณ์เสียหาย และขาดความรู้ความเข้าใจในการใช้เครื่องมือ	1. จัดซื้อมาสำรองเพิ่มเติม 2. อาจารย์ผู้ควบคุมปฏิบัติการกำชับ เรื่องความระมัดระวังในการใช้และหากมีการเสียหายให้นักศึกษารับผิดชอบ 3. ให้นักศึกษา ศึกษาวิธีการใช้เครื่องมือเบื้องต้นอย่างเข้าใจก่อนการใช้งาน หากยังไม่เข้าใจให้สอบถามอาจารย์หรือเจ้าหน้าที่ก่อน

<p>4. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีสถานะที่ไม่เหมาะสมคือ มีอุณหภูมิไม่อยู่ในช่วง 25 องศาเซลเซียสหรือมีแสงสว่างไม่อยู่ในช่วง 1000 – 3000 ลักซ์ ซึ่งอาจเกิดจากหลอดไฟบนชั้นวางเสีย</p>	<p>1. ให้รีบดำเนินการปรับอุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้อยู่ในสถานะเหมาะสมโดยเร็วที่สุด เนื่องจากความร้อนของห้องจะทำให้พืชที่ทำการเพาะเลี้ยงนั้นตายได้ ให้รีบดำเนินการแก้ไขซ่อมแซม หรือลดปริมาณการเปิดไฟก่อน จนมีการซ่อมแซม</p>
<p>5. ห้องย้ายเนื้อเยื่อ มักมีสิ่งปนเปื้อน มีสถานะไม่ปลอดภัย</p>	<p>1. ควรตรวจเช็ค ทำความสะอาดให้ทั่วด้วยน้ำยาฆ่าเชื้ออย่างสม่ำเสมอ และทำการอบฆ่าเชื้อ ด้วยสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ ( Formaldehyde Solution ) เพื่อกำจัดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ภายในห้อง</p>

#### ข้อเสนอแนะ

1. อาจารย์ผู้สอนควรชี้แจงเรื่องความปลอดภัยในการใช้ห้องปฏิบัติการแก่นักศึกษาทุกคนให้ทราบข้อตกลงในการใช้ห้องปฏิบัติการร่วมกันก่อนการเรียนการสอน
2. มีการจัดทำระเบียบ ข้อบังคับการใช้ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือ อุปกรณ์ต่างๆ ทางวิทยาศาสตร์ อย่างเคร่งครัด
3. ห้องปฏิบัติการแต่ละห้อง ควรมีสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมและปลอดภัยต่อการทำปฏิบัติการ

## บรรณานุกรม

- บุญสนอง ช่วยแก้ว. (2556). **อบรมปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี.
- พระราชบัญญัติ มหาวิทยาลัยราชภัฏ พ.ศ.2547 ให้ไว้ ณ 10 มิถุนายน 2547, อ้างอิง (<https://www.pbru.ac.th/pbru/regulations>)
- อุบล สมทรง. (2544). **เอกสารประกอบการสอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการเกษตร**. คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี.
- ลดาทพร บุญฤทธิ์(2545 ) คู่มือปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 29,2,2004, from ( . [http://sci.pit.ac.th/\\_files/down/pic\\_rFblPEhP.pdf](http://sci.pit.ac.th/_files/down/pic_rFblPEhP.pdf). )
- เอกสารประกอบโดยการอบรมเชิงปฏิบัติการ “การพัฒนาด้วยศักยภาพบุคลากรสายสนับสนุนให้สามารถวิเคราะห์ และประเมินค่างานในการกำหนดระดับตำแหน่ง ระดับชำนาญการ และระดับชำนาญการพิเศษ” งานบริหารงานบุคคล กองกลางสำนักงานอธิการบดี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี.
- อรุณี เจริญศักดิ์, รัตนา อังกสิทธิ์ (2542). **คู่มือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เอกสารการฝึกอบรมทางวิชาการ 1-19** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง งานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- ณิชชาพล บัวทอง (2561) **ระเบียบการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ 3-35** มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร อำเภอละแม จังหวัดชุมพร

ภาคผนวก



แบบฟอร์ม การยืม คินอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ สาขาวิชาเกษตรศาสตร์  
คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

ข้าพเจ้า.....นักศึกษาชั้นปีที่.....สาขา.....  
เบอร์โทร.....วันที่ยืม.....วันที่คืน.....  
อาจารย์ที่ปรึกษา.....

มีความประสงค์ขอเบิก

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

ข้าพเจ้าขอรับรองว่าจะใช้อุปกรณ์อย่างระมัดระวัง จะรับผิดชอบ ต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นและ  
จะส่งคืนทันทีที่ใช้งานเสร็จ

.....  
(.....)

...../...../.....

นักศึกษา

.....  
(.....)

...../...../.....

อาจารย์ที่ปรึกษา

รับ-อุปกรณ์..... วันที่..... เวลา..... ผู้ดูแล.....	ส่ง-อุปกรณ์..... วันที่..... เวลา..... ผู้ดูแล.....
--	--



แบบฟอร์ม การขอใช้ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สาขาวิชาเกษตรศาสตร์  
คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

ข้าพเจ้า.....นักศึกษาชั้นปีที่.....สาขา.....

เบอร์โทร.....วันที่ขอใช้ห้อง.....

อาจารย์ที่ปรึกษา.....

มีความประสงค์ขอใช้ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

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

ข้าพเจ้าขอรับรองว่าจะใช้ห้องอย่างระมัดระวัง จะรับผิดชอบ ต่อความเสียหายที่เกิดขึ้น

.....  
(.....)

...../...../.....

นักศึกษา

.....  
(.....)

...../...../.....

อาจารย์ที่ปรึกษา

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวพรพกา โพธิ์พร้อม
วันเดือนปีเกิด	8 มีนาคม 2519
ที่อยู่ปัจจุบัน	30 หมู่ 6 ตำบล หนองพลับ อำเภอกำแพงแสน จังหวัด เพชรบุรี 76000
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี ครุศาสตรบัณฑิต วิทยาศาสตร์ทั่วไป สถาบันราชภัฏเพชรบุรี
ประวัติการทำงาน	นักวิทยาศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี