



รายงานการวิจัย

การพัฒนาห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อรองรับตัวอย่าง จากชุมชน

The Develop of Tissue Culture Testing Laboratory for Support for
samples from the community

สมเพียร พักทอง

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2565

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อรองรับตัวอย่าง จากชุมชน

The Develop of Tissue Culture Testing Laboratory for Support for
samples from the community

สมเพียร พักทอง

แสงจันทร์ สอนสว่าง

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ทุนอุดหนุนโดย งานวิจัยประเภทโครงการวิจัยสถาบัน
งบประมาณเงินรายได้ของมหาวิทยาลัย
ประจำปีงบประมาณ 2565

ชื่องานวิจัย	การพัฒนาห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อรองรับตัวอย่างจากชุมชน The Develop of Tissue Culture Testing Laboratory for Support for samples from the community
ผู้วิจัย	นางสาวสมเพียร พักทอง
ผู้ร่วมวิจัย	นางสาวแสงจันทร์ สอนสว่าง
สาขาวิชา	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ปีเสรีจวิจย 2565

บทคัดย่อ

จากการพัฒนาและปรับปรุงห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อรองรับตัวอย่างจากชุมชน ซึ่งผลการประเมินความพึงพอใจผู้ให้บริการห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวน 15 คน พบว่า ความพึงพอใจในภาพรวม อยู่ในระดับมาก มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.02 คิดเป็นร้อยละ 80.42 โดยแยกออกเป็นแต่ละด้านดังนี้ ด้านเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ โดยมีค่าคะแนนเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 4.23 รองลงมา คือ ด้านวัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ อยู่ในระดับมาก มีค่าคะแนนเฉลี่ย เท่ากับ 4.08 รองลงมา คือ ด้านห้องปฏิบัติการ ด้านเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ อยู่ในระดับมาก มีค่าคะแนนเฉลี่ย เท่ากับ เท่ากับ 3.95 และท้ายสุด คือ ด้านเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ อยู่ในระดับมาก มีค่าคะแนนเฉลี่ย เท่ากับ 3.81

คำสำคัญ : ห้องปฏิบัติการ, เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, ตัวอย่างจากชุมชน

Title	The Develop of Tissue Culture Testing Laboratory for Support for samples from the community
Author	Miss Sompian Fangtong
Researcher	Miss Sangjan Sonsawang
Faculty	Science and Technology Phetchanbun Rajabhat University
	Year of research completed 2022

ABSTRACT

From The Develop of Tissue Culture Testing Laboratory for Support for samples from the community Which satisfaction assessment results Applicants for tissue culture laboratory services 15 people found overall satisfaction at a high level with an average of 4.02, representing 80.42 percent separated into each side as follows laboratory staff with the highest mean score equal to 4.23 Followed by materials, equipment and chemicals. used in the laboratory at a high level with an average score of 4.08 Followed by the laboratory. scientific instruments at a high level with a mean score equal to equal to 3.95 and finally, scientific instruments at a high level with an average score of 3.81

Keyword : Laboratory, Tissue Culture, samples from the community

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยคำแนะนำต่าง ๆ จากคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ ในคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ และความร่วมมือช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายฝ่าย ที่สละเวลาให้คำแนะนำ คำปรึกษา รวมถึงข้อเสนอแนะต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ ในคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เป็นอย่างสูง ที่ได้ให้ความกรุณา ให้ คำปรึกษาแนะนำ ให้แก่ผู้วิจัย จึงขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุน โดยงบประมาณเงินรายได้ของมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ประเภททุนอุดหนุนงานวิจัยสถาบัน ประจำปีงบประมาณ 2565 ครั้งนี้มา ณ ที่นี้ด้วย

นางสาวสมเพียร พักทอง

30 ตุลาคม 2565

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	1
1.4 ระเบียบวิธีวิจัย.....	1
1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ.....	2
1.6 ประโยชน์การวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ความสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	5
2.2 ความหมายของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	7
2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	16
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	37
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	44
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	44
5.2 อภิปรายผล.....	44
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	44

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บรรณานุกรม.....	45
ภาคผนวก.....	46
ประวัติคณะผู้วิจัย.....	48

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 กิจกรรมและแผนการดำเนินการวิจัย.....	17
4.1 แสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และผลการประเมินระดับความพึงพอใจ ด้านห้องปฏิบัติการ.....	40
4.2 แสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และผลการประเมินระดับความพึงพอใจ ด้านเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์.....	40
4.3 แสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และผลการประเมินระดับความพึงพอใจ ด้านวัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ.....	41
4.4 แสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และผลการประเมินระดับความพึงพอใจ ด้านเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ.....	42

สารบัญภาพ

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงจัดเตรียมเครื่องมือในห้องปฏิบัติการเตรียมอาหาร.....	18
3.2 แสดงจัดเตรียมอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการเตรียมอาหาร.....	21
3.3 แสดงอุปกรณ์ และเครื่องมือในห้องย่ายเนื้อเยื่อพืช.....	24
3.4 แสดงอุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	27
3.5 คู่มือการใช้งานโปรแกรมการจัดการสารเคมี.....	31
4.1 แสดงร้อยละของผู้ขอรับบริการจำแนกตามเพศ.....	37
4.2 แสดงร้อยละของผู้ขอรับบริการการจำแนกตามอายุ.....	37
4.3 แสดงร้อยละของผู้ขอรับบริการจำแนกตามระดับการศึกษา	38
4.4 แสดงร้อยละของผู้ขอรับบริการจำแนกตามประเภทผู้ขอรับบริการ.....	38
4.5 แสดงร้อยละของผู้ขอรับบริการจำแนกตามสถานภาพผู้ขอรับบริการ	39
4.6 แสดงผลการประเมินความพึงพอใจในแต่ละด้านของผู้เข้ารับการอบรม	42

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นห้องที่จัดขึ้นเพื่อการปฏิบัติงานในด้านการขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศวิธีหนึ่ง โดยการนำเอาชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ตาข้าง ตายอด เมล็ด มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยอาหาร แร่ธาตุและฮอร์โมนที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิด ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ สามารถควบคุมอุณหภูมิและความเข้มแสงได้ ทำให้ได้พืชที่มีความสมบูรณ์ สามารถผลิตพืชได้จำนวนมากในเวลาที่กำหนด ต้นพืชแข็งแรง ปราศจากเชื้อโรค เป็นการอนุรักษ์ ขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งสิ่งสำคัญสำหรับห้องปฏิบัติการนี้คือ การปลอดเชื้อ ทุกขั้นตอนการทำงานตั้งแต่การเตรียมอาหาร การถ่ายเชื้อไปจนถึงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้องมีการควบคุมพิเศษ ป้องกันการติดเชื้อ ตั้งแต่อุปกรณ์เครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ ไปจนถึงการจัดห้องให้เป็นสัดส่วนให้เหมาะสำหรับการปฏิบัติงาน ซึ่งห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย 4 ส่วนสำคัญคือ ห้องเตรียมอาหาร ห้องเก็บสารเคมี ห้องถ่ายเนื้อเยื่อ และห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยทั่วไปสามารถรวมส่วนของห้องเตรียมอาหารและห้องเก็บสารเคมีเข้าด้วยกันได้แต่ตู้สำหรับเก็บสารเคมีต้องมีความจำเพาะ คือ มีสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสารเคมีแต่ละชนิด

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาและปรับปรุงห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อรองรับตัวอย่างจากชุมชน
2. เพื่อนำความรู้ความสามารถและทักษะนำมาพัฒนาเพื่อรองรับตัวอย่างจากชุมชน

1.3 สมมติฐานการวิจัย

ห้องปฏิบัติการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะต้องมีการจัดเกี่ยวกับสารเคมีและการใช้เครื่องมือให้ถูกต้องเพื่อความปลอดภัยระหว่างการใช้งาน

1.4 ระเบียบวิธีวิจัย

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ห้องปฏิบัติการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant Tissue Culture) เป็นเทคโนโลยีแขนงหนึ่งที่มี ประโยชน์ต่อการผลิตพืชเป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นขยายพันธุ์พืชหรือการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการ นำเอาชิ้นส่วนใดชิ้นส่วนหนึ่งของพืช มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบไปด้วยแร่ธาตุ วิตามิน น้ำตาล กรดอะมิโน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ (Aseptic Condition) โดยอยู่ภายในสภาพแวดล้อมที่ควบคุม เช่น อุณหภูมิ แสงสว่าง และความชื้น ให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการพัฒนาของพืช

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึง เป็นห้องปฏิบัติการที่จัดขึ้นเพื่อ การปฏิบัติงานที่มีความพิเศษโดยเฉพาะในการควบคุมสภาพแวดล้อมที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ รวมทั้งควบคุมอุณหภูมิและแสงได้ โดยทั่วไปจะแบ่งเป็นห้อง 3 ส่วนหลัก ๆ คือ 1.ห้องเตรียมอาหาร (Media Preparation Room) 2.ห้องย้ายเนื้อเยื่อ (Transfer Room) 3.ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Culture Room)

สารเคมี หมายถึง สารหรือวัสดุที่ได้ใช้หรือได้จากกระบวนการเคมี เป็นธาตุหรือสารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีและสมบัติทางกายภาพ และทางเคมีเฉพาะตัว

สารเคมีสำหรับงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึง สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสูตรอาหารสังเคราะห์ ได้แก่ สารอนินทรีย์ที่เป็นธาตุอาหารหลัก และสารอินทรีย์ ใช้เป็นแหล่งพลังงานของพืช และสารเคมีที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Regulator, PGR) หรือเรียกว่าฮอร์โมน พืช เช่น ออกซิน ไซโตไคนิน จิบเบอเรลลิน รวมทั้งสารเคมีที่ใช้ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อุปกรณ์ หมายถึง อุปกรณ์ในการทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก ๆ ได้แก่ 1. อุปกรณ์ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์ เช่น เครื่องชั่ง เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง เตาไมโครเวฟ หม้อนึ่งความดัน เครื่องกวนแม่เหล็ก แท่งแก้วคนสาร ปีกเกอร์ กระจกตวง ปีเปตต์ และขวดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 2. อุปกรณ์ที่ใช้ตัดย้ายเนื้อเยื่อ เช่น ตู้อปลอดเชื้อ ด้ามมีดผ่าตัด ใบมีดผ่าตัด ปากคืบ ตะแกรงสำหรับวางมีดและปากคืบ จานแก้ว และตะเกียง แอลกอฮอล์ 3. อุปกรณ์ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น เครื่องเขย่า ชั้นวางเนื้อเยื่อที่มีไฟฟ้าให้แสงสว่าง เครื่องควบคุมเวลา และควบคุมอุณหภูมิ เป็นต้น

สารละลายเข้มข้น (Stock Solution) หมายถึง สารเคมีที่ใช้ในสูตรอาหารโดยเฉพาะธาตุอาหารรอง และวิตามินที่เตรียมให้มีความเข้มข้นมากกว่าปกติคือให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10 ถึง 1,000 เท่า เวลาใช้จะเจือจางให้เท่ากับปริมาณหรือความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้จริงในสูตร

อาหาร การเตรียมสารละลายเข้มข้นโดยนำสารเคมีพวกที่สามารถรวมกันได้โดยไม่ตกตะกอนไว้ด้วยกัน เพื่อไม่ให้มีสารละลายเข้มข้นหลายขวด

1.6 ประโยชน์การวิจัย

1. ได้ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถรองรับตัวอย่างจากชุมชน
2. สามารถนำความรู้ความสามารถและทักษะนำมาพัฒนาเพื่อรองรับตัวอย่างจากชุมชน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หมายถึง การนำเอาอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น ใบ ดอก ราก ตา ขั้ว หรือเมล็ด เนื้อเยื่อ เซลล์ หรือเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ที่ เรียกว่าโปรโทพลาสต์ (protoplast) มาเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารต่าง ๆ วิตามิน น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) ภายใต้สภาพที่ปลอด จากเชื้อจุลินทรีย์และควบคุม อุณหภูมิและแสง ขึ้นส่วนของพืชเหล่านี้จะสามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืช โดยตรง หรือแคลลัส หรือโครงสร้างคล้ายคัพภะ (embryo) ซึ่งเรียกว่าเอ็มบริอยด์ (embryoid) หลังจากนั้นจึงพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไป เนื่องจาก เซลล์พืชมีคุณสมบัติที่เรียกว่าโททิโพเทนซี (totipotency) คือมีความสามารถ ที่จะเจริญเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ (พงศยุทธ์ นวลบุญเรือง และคณะ, 2562 ; 6)

การนำขึ้นส่วนของพืชมาเพาะเลี้ยงเพื่อบังคับให้มีการเจริญเติบโตตามที่ต้องการในสภาพ ปลอดเชื้อ หรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จากหลักการในทฤษฎีเซลล์ ของ Schleiden (1838) and Schwann (1839) ที่กล่าวถึงคุณสมบัติของเซลล์แต่ละเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีความสามารถที่จะ พัฒนาไปเป็นสิ่งมีชีวิตที่สมบูรณ์ใหม่ได้อีก เมื่ออยู่สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ความสามารถ ดังกล่าวของเซลล์นั้นถูกเรียกภายหลังโดย Morgan (1901) ว่า totipotency แนวคิดนี้ได้รับความ สนใจมากจากนักพฤกษศาสตร์ ซึ่งได้เริ่มต้นในปี ค.ศ. 1902 เมื่อ Gottlieb Haberlandt นัก พฤกษศาสตร์ชาวเยอรมัน ซึ่งต่อมาได้รับการยกย่องว่าเป็นบิดาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้ นำเซลล์จากใบเลี้ยงมาเลี้ยงในอาหารเพื่อให้เซลล์มีการแบ่งตัวและสามารถที่จะเกิดต้นใหม่ที่ สมบูรณ์โดยอาศัยคุณสมบัติของเซลล์ดังกล่าว แต่พบว่าเซลล์มีการขยายขนาดอย่างเดียวและไม่ สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ เนื่องจากในเวลานั้นยังไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ของพืช ในปี ค.ศ.

วิชา เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการเกษตร 1930 ได้มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ จากรากพืชหลายชนิดในสภาพปลอดเชื้อ จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1938 สามารถเพาะเลี้ยงอวัยวะและ แคลลัส (Callus) ของพืชได้หลายชนิด และต่อมาได้มีการค้นพบสารควบคุมการเจริญเติบโต หลายชนิด เช่น สารกลุ่ม cytokinin เช่น kinetin (6-furfurylamonopurine) และ BA (6-benzylaminopurine) และมีนักวิทยาศาสตร์อีกหลายท่านที่พยายามพัฒนาสูตรอาหาร ต่างๆ เช่น

สูตรอาหาร Vacin and Went (1949) สูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962) สูตรอาหาร Gamborg และคณะ (1968) สูตรอาหารของ Chu และคณะ (1975) และสูตรอาหารของ Schenk and Hildebrandt (1972) ซึ่งเป็นสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอีกหลายชนิด ที่มีการใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน นับตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มีการพัฒนาไปอย่างกว้างขวาง มีการค้นพบเทคนิคใหม่ๆ อีกมากมาย ซึ่งสามารถนำการเพาะเลี้ยงพืชเซลล์เดียวและ โปรโตพลาสต์ของพืชได้หลายชนิด รวมถึงการนำเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การถ่ายยีนในพืชเข้ามาร่วมด้วยโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นพื้นฐาน จึงทำให้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีบทบาทสำคัญต่อวิทยาการแขนงอื่นๆ เช่น ชีวเคมี พันธุศาสตร์ การปรับปรุงพันธุ์พืช โรคพืช และเภสัชศาสตร์ เป็นต้น (วังสุษดี, 2540; อารีย์, 2541)

2.1 ความสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับงานทางด้านชีววิทยาและเภสัชวิทยา เกษตรกรรม อุตสาหกรรม และการแพทย์ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีประโยชน์ดังนี้ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2556; อรดี, 2542; อารีย์, 2541)

1. การขยายพันธุ์พืช (plant propagation)

เป็นการนำชิ้นส่วนมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณ โดยมีการพัฒนาสูตรอาหารที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นเป็นทวีคูณ เริ่มต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพียง 1 ต้น และทำการย้ายเนื้อเยื่อ (subculture) เดือนละ 1 ครั้งในแต่ละเดือน นำให้สามารถผลิตต้นพืชได้ถึง 100,000-1,000,000 ต้นในระยะเวลา 1 ปี ซึ่งเป็นการขยายพันธุ์พืชที่รวดเร็ว ปัจจุบันมีการใช้เพื่อผลิตพืชในเชิงการค้าอย่างกว้างขวาง

2. การปรับปรุงพันธุ์พืชและการคัดเลือกสายพันธุ์พืช

ในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช สามารถนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์พืชเพื่อผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน (resistant plant) โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสภาวะต่าง ๆ ก็จะสามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายได้ เช่น การสร้างพันธุ์พืชต้านทานต่อสารพิษของเชื้อสาเหตุโรค ต้านทานต่อแมลง หรือต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช เป็นต้น หรือเพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทาน (tolerance plant) โดยการคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนทานได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารและสภาวะแวดล้อมต่างๆที่กำหนด เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็มจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดเลือกสายพันธุ์ทนต่อดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนร้อนโดยการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิคดังกล่าวเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ แล้วคัดเลือกเอาสาย

พันธุ์ดีไว้ ซึ่งอาจทำได้โดยการใช้สารเคมี การฉายรังสี การตัดต่อยีน (DNA ricombination) และการย้ายยีน (gene transformation) เพื่อสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ (transgenic plants) ที่ต้องการในพืชบางชนิด รวมทั้งในขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงในอาหาร เมื่อเนื้อเยื่อพืชถูกเลี้ยงและย้ายอาหารไประยะเวลาอันยาวนานอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เรียกว่า somaclonal variation สายพันธุ์เซลล์ที่กลายไปอาจจะเป็นประโยชน์ เช่น สายพันธุ์มะเขือเทศที่มีน้ำ ในผลน้อย จะเป็นผลดีต่ออุตสาหกรรมการผลิตซอส ซึ่งจะช่วยลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการลดปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์

3. เพื่อการผลิตพืชปลอดเชื้อไวรัส (Virus-free plant propagation)

ปัญหาสำคัญของการผลิตพืช คือ โรค ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย หรือไวรัส ดังนั้นต้นพืชที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะปราศจากเชื้อราและแบคทีเรีย เป็นอันดับแรกเนื่องจากในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะแสดงอาการปนเปื้อนของเชื้อ (contamination) ดังกล่าวโดยจะแสดงกลุ่ม colony ของแบคทีเรียหรือสปอร์ของเชื้อราให้เห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งสามารถเก็บออกมาและทำการกำจัดทิ้งไป ส่วนกรณีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กมากและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ก็ต่อเมื่ออาศัยอยู่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเท่านั้น ซึ่งต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสจะไม่แสดงอาการปนเปื้อนบนอาหารให้เห็น แต่จะทราบได้ก็ต่อ เมื่อเกิดอาการบนต้นพืชเท่านั้น ดังนั้นก่อนทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องมีการคัดเลือกและตรวจสอบเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนของพืชเพื่อให้ปลอดจากเชื้อไวรัสมากที่สุด โดยการใช้ส่วนของ meristem ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่อยู่บริเวณปลายยอด หรือเนื้อเยื่อของคัพภะ (embryo) ที่อยู่ในเมล็ด ซึ่งเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีท่อลำเลียงน้ำ (xylem) และอาหาร (phloem) ที่จะติดต่อกับส่วนอื่น ๆ ของต้นพืช ดังนั้น อนุภาคของไวรัสจึงไม่สามารถเข้าไปได้

4. การผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite)

พืชบางชนิดสามารถให้สารที่มีคุณสมบัติทางยา หรือมีประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรม อุตสาหกรรม รวมทั้งการแพทย์ แต่ในบางครั้งปริมาณสารที่ต้องการมีอยู่ในปริมาณน้อยมาก และการเก็บพืชสมุนไพรออกมาจากป่าเป็นจำนวนมากและบ่อยครั้ง อาจทำให้สมุนไพรนั้นสูญพันธุ์ไป จึงต้องใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชมาช่วยในการผลิตเพื่อลดการเก็บสมุนไพรออกจากป่า โดยนำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงในสภาพแวดล้อมและอาหารที่เหมาะสมก็อาจชักนำให้เกิดการสังเคราะห์สารที่ต้องการได้มากขึ้น ต้นพืชที่ได้ในหลอดทดลองนั้นสามารถนำมาศึกษาทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของพืช เพื่อที่จะสามารถติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย เช่น การศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อพืชต่อสารฆ่าแมลง ยาปราบศัตรูพืช หรือต่อสารควบคุมการ

เจริญเติบโตของพืช และการควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ในหลอดทดลอง จะทำได้ง่ายได้กว่าต้นพืชที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ

5. เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืช (Germplasm conservation, gene bank)

ปัจจุบันมีพืชพรรณหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไป หรือกำลังจะสูญพันธุ์ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมหรือเกิดจากการทำลายของมนุษย์เอง ด้วยเหตุนี้นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงได้พยายามคิดหาวิธีที่จะเก็บรักษาพืชพรรณต่าง ๆ ไว้ในหลอดทดลอง โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของสารชะลอการเจริญเติบโตบางชนิด หรือมีสารที่ทำให้เกิดความเครียดของน้ำขึ้นในหลอดทดลอง ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามาก ๆ เพื่อเป็นการประหยัดแรงงาน เวลา และอาหารในการที่จะต้องทำการย้ายเนื้อเยื่อพืชบ่อย ๆ จนกว่าเมื่อใดที่ต้องการจะเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อนั้นสามารถย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชชนิดนั้น ๆ อีกวิธีหนึ่งก็คือ การเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชไว้ในไนโตรเจนเหลวที่ อุณหภูมิต่ำถึง -196°C ในสภาพเช่นนี้เซลล์และเนื้อเยื่อจะคงสภาพและมีชีวิตอยู่ได้ยาวนาน

6. เพื่อการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชระหว่างประเทศ

การเก็บรักษาสายพันธุ์พืชในรูปแบบต่างๆ เช่น เมล็ดเซลล์เพาะเลี้ยง เอ็มบริโอ หรือต้นพืชในหลอดทดลองทำให้สะดวกต่อการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชกับต่างประเทศเพราะสะดวกปราศจากเชื้อโรค นอกจากการแลกเปลี่ยนสายพันธุ์พืชแล้ว ปัจจุบันการผลิตพืชหลายชนิดเพื่อการค้าในต่างประเทศหลายบริษัทที่เปิด website ทาง internet ซึ่งเป็นอีกหนึ่งช่องทางการตลาด ได้มีการซื้อขายพืชในสภาพปลอดเชื้อในลักษณะของ tube หรือ flask ที่ทำด้วยพลาสติก และมีน้ำหนักรเบาเพื่อลดค่าใช้จ่ายในการขนส่ง ซึ่งไม่ค่อยมีปัญหาในการนำเข้าพันธุ์พืช เนื่องจากต้นพืชอยู่ในสภาพที่

2.2 ความหมายของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึง ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องดำเนินงานภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ และควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมสำหรับพืช ดังนั้นสถานที่ และเครื่องมือที่ใช้จึงแตกต่างไปจากห้องปฏิบัติการทั่วไป การดำเนินงานต้องต่อเนื่องกันตามลำดับขั้นการจัดสถานที่ และเครื่องมือจึงต้องวางแผนให้สอดคล้อง และสะดวกในการปฏิบัติงาน โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควรประกอบด้วย 1. ห้องเตรียมอาหาร (Medium prepared room) 2. ห้องย้ายเนื้อเยื่อ (Transferred room) 3. ห้องเพาะเลี้ยง (Incubated room) (ณัฐฐากร เสมสันทัด, 2552 ; 11)

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึง ต้องเป็นห้องที่สะอาดปราศจากเชื้อ สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ โดยเฉพาะอุณหภูมิ โดยการติดตั้งเครื่องปรับอากาศ ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 25-28 องศาเซลเซียส ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน มีด 8 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสงประมาณ 2000 ลักซ์ (พงศยุทธ์ นวลบุญเรือง และคณะ, 2562 ; 9, อรดี สหวัชรินทร์, 2542 ; 14)

การเลือกทำเลที่จะสร้างห้องปฏิบัติการ

พื้นที่นั้นควรมีผู้น้อย มีไฟฟ้า สำหรับในสถานที่ที่มีไฟฟ้าเสียบ่อย ๆ ควรที่จะต้องมีเครื่องกำเนิดไฟฟ้าสำรอง (stand by generator) และมีตัวตัดไฟฟ้าอัตโนมัติในกรณีผิดปกติ เพื่อป้องกันเครื่องใช้ไฟฟ้าต่างเสียหายอาจเนื่องจากกระแสไฟฟ้ากระชาก มีแหล่งน้ำสะอาดอย่างสม่ำเสมอ ควรเลี้ยงพื้นที่ ที่มีความชื้นเกินไป เพราะความชื้นจะทำให้เกิด การปนเปื้อนได้ค่อนข้างสูงในการเลี้ยง และห่างไกลจากพื้นที่ที่มีการเลี้ยงสัตว์ หรือโรงเห็ด

หลักการสร้างห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การสร้างห้องปฏิบัติการควรจะคำนึงถึงความสะดวกในการปฏิบัติการ, ต้นทุนการก่อสร้าง และการใช้เนื้อที่ให้เกิดประโยชน์มากที่สุด ดังนั้น จึงควรเป็นห้องปฏิบัติการที่เป็นสัดส่วนเฉพาะการทำงานในห้องนั้น ๆ เท่านั้น ข้อสำคัญคือ ต้องสะอาด ถ้าเป็นห้องปิดไม่มีลมพัดได้ยิ่งดี ผนัง และพื้นห้องควร เรียบ เพื่อไม่ให้เป็นที่หลบซ่อนของจุลินทรีย์ต่าง ๆ

1. ห้องเตรียมอาหาร (media preparation room) ต้องมีเนื้อที่กว้างขวางพอที่จะปฏิบัติการได้อย่างสะดวก มีโต๊ะสำหรับปฏิบัติการ, ตู้เก็บสารเคมี, ตู้เก็บอุปกรณ์เครื่องมือ, ตู้เก็บภาชนะสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ และอ่างน้ำสำหรับล้างเครื่องแก้วเพียงพอกับความต้องการ

2. ห้องย้ายเนื้อเยื่อ (transfession or incubation room) ต้องสะอาดและปลอดเชื้อ จึงควรเป็นห้องที่สร้างอย่างมิดชิด และให้ผู้คนเข้าออกน้อยที่สุดเท่าที่จำเป็น ควรมีการติดตั้งเครื่องกรองอากาศที่สามารถกรองเชื้อจุลินทรีย์ได้ และอาจจะมีเสื้อดักจับฝุ่นวางไว้ที่ปากประตูทางเข้า เพื่อป้องกันความสกปรกจากรองเท้า และควรมีน้ำยาที่ใช้ทำความสะอาดมือก่อนทำการย้ายเนื้อเยื่อซึ่งโดยทั่วไปจะใช้ 70% เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) หรืออาจใช้ฟอง (Hexifoam) ที่มีคุณสมบัติสามารถทำให้บริเวณที่ทาปลอดเชื้อได้ประมาณ 2 ชั่วโมง

3. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture room) ต้องปลอดเชื้อ ต้องมีการรักษาความสะอาดและทำความสะอาดโดยการฉีดพ่นเอทิลแอลกอฮอล์อยู่เสมอ หรือติดหลอดอัลตราไวโอเล็ตไว้ เพื่อเปิดฆ่าเชื้อเป็นบางครั้ง สภาพแวดล้อมในห้องควรจัดให้ใกล้เคียงกับตามธรรมชาติของพืชที่เพาะเลี้ยง เพราะพืชส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติของมันเอง หรือดัดแปลงใหม่ให้เหมาะสมกับเนื้อเยื่อและอวัยวะนั้น ๆ

4. ห้องพักนักวิจัย (researcher room) ใช้เป็นส่วนนั่งทำงาน เก็บหนังสือตำราสำหรับนักวิจัยรวมถึงเก็บเอกสารข้อมูลที่สำคัญบางอย่างเกี่ยวกับสารเคมี อุปกรณ์เครื่องมือในห้องปฏิบัติงาน

5. ห้องเก็บสารเคมี (chemical stored room) ควรจัดสารเคมีให้เป็นหมวดหมู่เพื่อความสะดวกในการหยิบใช้

อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควรจัดให้อยู่ในบริเวณที่เหมาะสมเพื่อความสะดวกในการใช้และการปฏิบัติงาน อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในห้องเตรียมอาหาร, ห้องย้ายเนื้อเยื่อ และห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในห้องเตรียมอาหาร ควรจะต้องมีอุปกรณ์และเครื่องมือ ดังนี้

1.1 เครื่องชั่ง (Balance) มีทั้งแบบอย่างหยาบ ชั่งน้ำหนักได้ต่ำสุด 0.01 กรัม และอย่างละเอียดชั่งได้ต่ำสุดถึง 0.001 หรือ 0.0001 กรัม

1.2 ช้อนตักสารเคมี (spatula) มีทั้งแบบที่เป็นโลหะ, ไม้ และพลาสติก

1.3 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) ใช้สำหรับวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างของสารละลายและอาหารที่เตรียม หรืออาจจะใช้กระดาษวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH paper) หรือน้ำยาวัดเทียบสี แทนก็ได้ถ้าไม่ต้องการความละเอียดมากนัก

1.4 เตาอุ่นความร้อนและเครื่องคน (hot plate and magnetic stirrer) ใช้สำหรับเตรียมอาหาร โดยมีตัวคนระบบแท่งแม่เหล็ก เครื่องมือชิ้นนี้ถ้ามีงบประมาณน้อย อาจใช้เตาหลอดความร้อนหรือเตาแก๊สซึ่งมีราคาถูกกว่ามากแทนได้แต่ผู้เตรียมจะต้องคนอาหารเอง

1.5 เครื่องจ่ายอาหารอัตโนมัติ (automatic dispenser)

1.6 เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven) ใช้สำหรับหลอมอาหาร อาจใช้เตาหลอดความร้อน (hot wire oven) หรือเตาแก๊สแทนได้ ในกรณีที่เตรียมอาหารคราวละมาก ๆ เตาแก๊สจะเหมาะกว่า

1.7 ตู้เย็น (refrigerator) ใช้สำหรับเก็บสารเคมีบางตัวมีความจำเป็นที่จะต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ มิฉะนั้นแล้ว จะทำให้เสื่อมคุณสมบัติได้ เช่น สารอินทรีย์, trypsin yeast extract, lactalbumin hydrolysate, ฮอริโมน, วิตามิน stock solution รวมอาหารเลี้ยงเยื่อที่ยังไม่ได้ใช้ เพราะอาหารที่เตรียมไว้แล้วสูญเสียคุณสมบัติได้ถ้าไม่ใช้ในทันทีที่เตรียม

1.8 เตาอบความร้อน (hot air oven) ใช้สำหรับอบฆ่าเชื้อที่อาจติดมากับเครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่สามารถทนต่อความร้อนสูงๆได้ เช่น เครื่องแก้วและเครื่องมือที่ทำด้วยโลหะ โดยใช้ความร้อนประมาณ 180 C เป็นเวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 25

1.9 หม้อนึ่งความดัน (autoclave) ใช้สำหรับนึ่งฆ่าเชื้อที่ติดมากับอาหารและเครื่องมือที่ไม่สามารถที่จะฆ่าเชื้อโดยการให้ความร้อนแห้งได้เช่น เครื่องมือที่เป็นโพลีเมอร์ต่างๆ หรือแผ่นกระดาษกรองเป็นต้น หม้อนึ่งความดันไอน้ำให้เลือกหลายขนาดและรูปแบบขึ้นอยู่กับลักษณะการใช้งาน ความดันไอน้ำที่ใช้คือประมาณ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (psi) ประมาณ 15-20 นาที

1.10 เยื่อกรอง (millipore filter) เนื่องจากมีสารบางชนิดหากทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันแล้ว จะทำให้คุณสมบัติเปลี่ยนแปลงหรือเสื่อมสภาพลง เช่น น้ำตาล saccharose จะแตกตัวเป็น fructose และ glucose ส่วน gibberellic acid ศักยภาพจะลดลงถึง 90% สารสกัดจากพืช (plant extracts) จะเสื่อมคุณภาพ ส่วนพวก cochicine เอ็นไซม์ วิตามิน B1, B2, panthothenic acid, วิตามินC, zeatin (antibiotics) และพวกยาปฏิชีวนภาพ (antibiotics) จะเสื่อมคุณภาพลงอย่างมาก ฉะนั้น เพื่อเป็นการแก้ปัญหาดังกล่าว จึงใช้เยื่อกรองแทนการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน เยื่อกรองที่นิยมใช้โดยทั่วไปมีรูกว้างประมาณ 0.22 ไมโครเมตร ซึ่งสามารถกรองเอาอนุภาคของแบคทีเรียและสปอร์ของราไว้ได้

1.11 เครื่องแก้วที่ทำจากแก้วเนื้อดีควรใช้ของ Pyrex glasses หรือเทียบเท่า ในบางกรณีอาจจำเป็นต้องนำมาฆ่าเชื้อแม้ว่าจะเป็นของใหม่ก็ตาม ได้แก่ หลอดทดสอบ (test tube), กระจกแก้ว (beaker), ขวด (bottle), ขวดรูปชมพู่ (flask), ปิเปต (pipette), กรวยแก้ว (funnel) และแท่งคนขนาดและรูปร่างต่าง ๆ

1.12 ภาชนะพลาสติกพวก polystyrene มักไม่เหมาะต่อการใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ เพราะเซลล์จำเป็นต้องเกาะยึดกับผิวภาชนะ ดังนั้นผิวพลาสติกนั้นจะต้องเป็นประจุลบด้วย อย่างไรก็ตามพลาสติกจำพวก Falcon plastics หรือเทียบเท่า สามารถนำมาใช้ได้ดี แต่ถ้าเป็นชนิดอื่นแล้วอาจจำเป็นต้องนำมาผ่านการฆ่าเชื้อก่อนใช้

1.13 วัสดุจำพวกยาง โดยเฉพาะยางที่มีสีแดงหรือสีดำ มักมีสารประกอบอินทรีย์บางอย่างที่เป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยง ดังนั้น ควรแน่ใจว่าได้ใช้จุลหรือวัสดุที่ทำจากยางที่ไม่มีสารพิษ หรือมีน้อยที่สุด

1.14 เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ (water purifier) ใช้เพื่อเตรียมน้ำบริสุทธิ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในห้องย้ายเนื้อเยื่อ ควรจะมีอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ดังนี้

2.1 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air-flow cabinet) เป็นตู้กรองอากาศให้บริสุทธิ์ปลอดจากอนุภาคของราและแบคทีเรียที่อาจติดมากับอากาศ เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic techniques) จะต้องปฏิบัติงานภายในตู้นี้ตลอด ส่วนประกอบสำคัญของตู้นี้ได้แก่ ตัวกรอง (filter) ซึ่งจะติดอยู่ด้านหลังหรือด้านบนของตู้ ทำหน้าที่กรองอากาศให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะไหลผ่านเข้าไปภายในตู้

2.2 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) ใช้ในการศึกษาสิ่งของที่มีขนาดเล็ก หรือใช้ในการผ่าตัดเนื้อเยื่อ มีทั้งแบบสองตาธรรมดา (binocular microscope) และแบบสามมิติ (stereomicroscope)

2.3 ตะเกียง (turnel) จะใช้ตะเกียงแอลกอฮอล์ ตะเกียงแก๊ส หรือตะเกียงบลูเลนกได้

2.4 กระดาษกรอง (filter paper) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.5 จานแก้วหรือพลาสติก (petri dish) ที่อบหรือนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) พร้อมหลอดทดสอบที่อบหรือนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.7 มีดผ่าตัดแบบต่าง ๆ (knives and scalpel) ที่อบหรือนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.8 ปากคีบ (forcep) ขนาดและแบบต่าง ๆ ที่อบหรือนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.9 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น เข็มเย็บ (needles), ลูป (loop), คราดโลหะ, ไมซ์ดไฟ เป็นต้น

3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture room) เนื้อเยื่อพืชที่ผ่านขั้นตอนต่างๆ จากห้องย้ายเนื้อเยื่อ จนกระทั่งอยู่ในอาหารสังเคราะห์ก็จะต้องย้ายมาเก็บไว้ในห้องนี้ ซึ่งจะต้องมีอุปกรณ์ต่าง ๆ ดังนี้

3.1 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (temperature controller) ได้แก่ เครื่องปรับอากาศซึ่งควรจะต้องมี 2 ตัว เพื่อเปิดสลับกลางวันและกลางคืน ซึ่งจะทำให้เครื่องปรับอากาศมีอายุการใช้งานได้ดีขึ้นแต่ทั้งนี้จำนวนของเครื่องปรับอากาศที่ใช้ก็ขึ้นอยู่กับขนาดของห้องด้วย อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชโดยทั่วไป คือ ประมาณ 25±2 องศา แต่ถ้าธรรมชาติของพืชที่เราเพาะเลี้ยงนั้นเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านั้น ก็สามารถหาการปรับอุณหภูมิได้ ข้อควรระวังคืออุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจทำให้เกิดการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากไอน้ำที่จับตัวข้างขวดมากจนเกิดเป็นฝ้า

3.2 เครื่องควบคุมความชื้น โดยจัดให้มีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 60-70% ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่ควรมีความชื้นสูงเกินไป เพราะอาจเป็นสาเหตุของการติดเชื้อได้ง่าย

3.3 ชั้นวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ (shelves) ซึ่งควรจะมีขนาดที่พอเหมาะ สะดวกต่อการตรวจตราการปนเปื้อนของเชื้อและติดตามการเจริญเติบโต ชั้นจะต้องไม่สูงเกินไป และทุกชั้นจะต้องติดไฟให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์แบบคูลไวท์ (cool white) หรือหลอดโกรลักซ์ (Gro-Lux)

ที่ให้แสงสีขาว ความเข้มแสง (light intensity) ที่พอเหมาะและนิยมใช้ คือ 1,000 - 4,000 ลักซ์ โดยทั่วไปให้แสงแก่พืช (photoperiod) 16 ชั่วโมงต่อวัน แต่ถ้าไม่มีระบบตัดไฟอัตโนมัติอาจเปิดไฟตลอด 24 ชั่วโมงเลยก็ได้ ในบางครั้งเนื้อเยื่ออาจต้องการสภาพที่พิเศษ เช่น การเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ต้องเก็บในที่มืด เป็นต้น ส่วนการติดตั้งหลอดไฟมี 2 ระบบ คือ ระบบหลอดไฟแนวนอน (downward) และระบบหลอดไฟแนวตั้ง (sideward) ซึ่งจะเลือกใช้แบบใดก็ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมกับประเภทของงานและชนิดของพืช

3.4 เครื่องเขย่าขวด (shaker or rotator) เซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว มีความจำเป็นต้องนำไปเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่า เพื่อให้อากาศได้คลุกเคล้าลงไปในการเพาะ เพราะถ้าหากปล่อยให้เนื้อเยื่อจมอยู่ใต้ของเหลวนานๆ เนื้อเยื่อจะขาดอากาศในการหายใจ จะทำให้เนื้อเยื่อตายได้ เครื่องเขย้านี้จะหมุนอยู่ตลอดเวลา ลักษณะการหมุนของเครื่องเขย่ามีหลายแบบ บางชนิดหมุนเป็นวงกลม บางชนิดเขย่าจากซ้ายไปขวา โดยปกติทั่วไปตั้งความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที

2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การจัดเตรียมสารเคมีเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ควรมี การตรวจเช็คสต็อกสารเคมีอยู่เสมอว่ามีเพียงพอต่อการใช้งานหรือตรวจเช็คความมีการหมดอายุการใช้งานหรือไม่ สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสูตรอาหารสังเคราะห์สำหรับการปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พืช ได้แก่ สารอนินทรีย์ที่เป็นธาตุอาหารหลัก และสารอินทรีย์ใช้เป็นแหล่งพลังงานของพืช และสารเคมีที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เช่น ออกซิน ไซโตไคนิน และจิบเบอเรลลิน เป็นต้น

สารเคมีที่จำเป็นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแยกเป็นหมวดหมู่ได้ดังนี้

1. สารเคมีที่ใช้ในการทำความสะดวก แยกเป็นสารเคมีที่ใช้ทำความสะอาดห้องทำงานและอุปกรณ์ เครื่องแก้ว เช่น น้ำยาล้างจาน ผงซักฟอก น้ำยาฆ่าเชื้อโรค สารเคมีที่ใช้ในการทำความสะดวกขึ้นพืช ได้แก่ เอทานอล 95% เอทานอล 70% แคลเซียมไฮโปคลอไรด์ หรือน้ำยาคลอโรกซ์ เป็นต้น

2. สารเคมีที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งประกอบด้วยสารอนินทรีย์พวกเกลือแร่ต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชและสารอินทรีย์ที่เติมในอาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต ได้แก่ ฮอโมน วิตามิน กรดอะมิโน น้ำตาล ไขมัน เป็นต้น

องค์ประกอบหลักของสารเคมีในอาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ โดยทั่วไป มีดังต่อไปนี้

1. สารอนินทรีย์(Inorganic Compound) ประกอบด้วยธาตุต่าง ๆ ดังนี้

1.1 ธาตุอาหารหลัก (Macro Elements) พืชต้องการในปริมาณมากเพื่อใช้สร้างโครงสร้าง ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) ซัลเฟอร์ (S) แมกนีเซียม (Mg) คาร์บอน (C) เป็นต้น

1.2 ธาตุอาหารรอง (Micro Elements) พืชต้องการในปริมาณน้อย ได้แก่ เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) โมลิบดีนัม (Mo) โบรอน (B) โคบอลต์ (Co) นิกเกิล (Ni) อะลูมิเนียม (Al) โมลิบดีนัม (Mo) คลอรีน (Cl) เป็นต้น (เพชรรัตน์ จันทรพิน, 2556: 29, ยุพา ปานแก้ว และคณะ, 2558 :15)

2. สารอินทรีย์ (Organic Compound) ประกอบด้วยธาตุต่าง ๆ ดังนี้

2.1 สารควบคุมการเจริญเติบโต (Plant Growth Regulators, PGR) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติเหมือนฮอร์โมนพืช ทำหน้าที่กระตุ้นและมีส่วนร่วม ในกระบวนการต่าง ๆ ที่นำไปสู่การพัฒนาของต้นที่เป็นปกติการเจริญเติบโตตลอดจนการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของ เซลล์ เนื้อเยื่อ และ Secondary Metabolism เป็นผลมาจากฮอร์โมนเหล่านี้ทั้งสิ้น การเติม สารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารจึงอาจไม่จำเป็นเสมอไปโดยเฉพาะในการเลี้ยงแคลลัส อย่างไรก็ตาม โดยปกติจะมีส่วนช่วยในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและ/หรือการกำเนิดอวัยวะ และมีเนื้อเยื่อพืชไม่กี่ชนิดที่สร้างแคลลัสได้ในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต สารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่

2.1.1 ฮอร์โมนกลุ่มออกซิน (Auxin) เป็นกลุ่มของสารที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขยายขนาดของเซลล์ (Cell Enlargement) การเกิดแคลลัส ยับยั้งการเกิดยอด แต่ส่งเสริม การเกิดราก สร้างบริเวณส่วนยอด ฮอร์โมนกลุ่มนี้ ได้แก่ IAA (indole acetic acid), IBA (indole butyric acid), NAA (naphthalene acetic acid), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) เป็นต้น

2.1.2 ฮอร์โมนกลุ่มไซโทไคนิน (Cytokinin) เป็นกลุ่มสารที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ของพืช กระตุ้นการเกิดยอด ยับยั้ง การเกิดราก และกระตุ้นให้เกิดแคลลัสเมื่อใช้ร่วมกับ ออกซินสร้างบริเวณปลายรากและใบอ่อน ฮอร์โมนกลุ่มนี้ ได้แก่ BA (6-Benzylaminopurine) , 2iP (N6-isopentenyl adenine) , Kinetin (6-Furfurylamino-purine (Kinetin), TDZ (Thiadiazuron, Zeatin (Zeatin) เป็นต้น

2.1.3 จิบเบอเรลลิน (Gibberellins) เป็นสารที่สร้างในพืช หรือโดยเชื้อราบางชนิด สลายตัวเมื่อถูกความร้อน มีผลช่วยในการยืดตัวของลำต้น ทำลายการพักตัวของเมล็ด ช่วยกระตุ้นการออกดอกของพืช แต่บางครั้ง gibberellins จะไปยับยั้งการชักนำขบวนการเกิด เป็นอวัยวะพืช

เช่น ทำให้การออกรากช้าลง และยับยั้งการเกิดยอด มีการใช้ gibberellins ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนปลายยอด (shoot tip) เพื่อผลิตต้นพืชปราศจากไวรัส

2.1.4 สารชะลอการเจริญเติบโต (Plant Growth Retardants) สารกลุ่มนี้ ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี มีคุณสมบัติชะลอการแบ่งเซลล์ และการยืดตัวของเซลล์ ทำให้พืช มีลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้นลง และยังมีผลทางอ้อมในการเร่งการออกดอกและติดผล เช่น พาโคลบิวทราโซล และ อาลาร์ จึงมีผู้นิยมนำมาใช้ในการสร้างพืชลักษณะพิเศษ เช่น ต้นแคระ มีดอก ตั้งแต่ต้นมีขนาดเล็ก หรือใช้ในการเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืช Absciscic acid (ABA) ช่วยควบคุม 25 ขบวนการทางสรีรวิทยา ต่าง ๆ ของพืช เช่น ควบคุมการปิดของปากใบ กระตุ้นการพักตัวของตา และเมล็ด ในการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อบางชนิด ABA จะกระตุ้นให้เกิด Somatic Embryogenesis

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มที่สำคัญ ซึ่งนิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ Auxins และ Cytokinins อัตราส่วนระหว่าง Auxin และ Cytokinins ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหาร โดยพบว่า อัตราส่วนของ Auxin ต่อ Cytokinin สูงกว่าอัตราสมมูล เนื้อเยื่อจะพัฒนาไปเป็น Callus และรากแต่หากอัตราส่วนของ Auxin ต่อ Cytokinin ต่ำกว่าอัตราส่วนสมมูล เนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นยอด หากอัตราส่วนของสารทั้ง 2 สมดุล เนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นยอดและราก

2.2 วิตามิน (Vitamin) ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ เป็นไปได้เป็นอย่างดี วิตามินที่นิยมใช้เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ วิตามิน B1 (Thiamine), วิตามิน B2 (Riboflavin), วิตามิน B6 (Pyridoxine), กลุ่มวิตามิน B รวม (Inositol), วิตามิน C (Ascorbic acid), ไนอะซิน (Nicotinic Acid), Biotin, Folic acid เป็นต้น

2.3 สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (Carbon sources) ได้แก่ น้ำตาล จำเป็นสำหรับ การเจริญเติบโตของพืชเนื่องจากเป็นแหล่งพลังงาน โดยทั่วไปน้ำตาลที่นิยมใช้ ได้แก่ น้ำตาล เช่น ซูโครส (Sucrose), ซึ่งคือน้ำตาลทรายที่ขายตามท้องตลาดนั่นเอง เนื่องจากมีราคาถูก โดยใช้ที่ความเข้มข้น 2-4 % แต่ในบางกรณีน้ำตาล กลูโคส (Glucose), ฟรุคโตส (Fructose) และ Sorbitol ในพืช พากใบเลี้ยงเดี่ยว (Monocotyledon) นิยมใช้น้ำตาล Glucose แทน Fructose

2.4 กรดอะมิโน (Amino acid) เป็นแหล่งให้ไนโตรเจนที่พืชจะได้รับเร็วกว่าจากสาร ในกลุ่มอนินทรีย์ แต่ไม่สามารถใช้แทนกันได้ทั้งหมด กรดอะมิโนที่สำคัญ ได้แก่ Glutamine, Asparagine, Adenine, Glycine, Casein เป็นต้น

2.5 สารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ (Undefined Supplement) เป็นแหล่งธาตุอาหาร และฮอร์โมนพืช สำคัญต่อการชักนำให้พืชสร้างอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ น้ำมะพร้าว กล้วยบด มัน ฝรั่ง

สารสกัดจากมอลต์ สารสกัดจากยีสต์ อิมัลชันปลา ถ่านกัมมันต์ (Activated Charcoal) สารประกอบจากธรรมชาติเหล่านี้ ในบางครั้งไม่สามารถทดแทนกันได้ด้วยสารอื่นใดในอาหารเลี้ยง เนื้อเยื่อพืช แต่พบว่าให้ผลดีต่อการเจริญของเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลอง บางชนิดยังช่วยทำหน้าที่ รักษาสมดุลของความเป็นกรด-ด่าง และบางชนิดช่วยดูดซับสารที่เป็นพิษเนื่องจากมีมากเกินไปด้วย

2.6 สารที่ทำให้อาหารแข็งตัวและวัสดุพองเนื้อเยื่อพืช โดยทั่วไปมักใช้วุ้น (Agar) และเจลาตินผสมลงในอาหารเพื่อ ทำให้อาหารแข็งตัวเพื่อเป็นที่ยึดเกาะของชิ้นส่วนพืช โดยเป็นวุ้นที่ทำมาจากสาหร่ายทะเลใช้ใน อัตรา 0.5-1.3 % หรือใช้เจลไรท์ (Gelrite) ที่ทำมาจาก Polysaccharide ของแบคทีเรีย ใช้ในอัตรา 0.2 % คุณภาพและราคาของสารที่ใช้ทำให้อาหารเลี้ยง เนื้อเยื่อพืชแข็งตัวมีหลายระดับ ควรระมัดระวังการใช้สารคุณภาพต่ำเนื่องจากไออนอน แป้ง และไขมัน ที่ปะปนอยู่จะไปทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่น ๆ ของอาหารและมีผลยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อพืช

2.7 น้ำ เป็นตัวทำละลายในการเตรียมสารละลายและการเตรียมอาหาร โดยทั่วไปนิยมใช้น้ำกลั่น ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะประกอบด้วยน้ำประมาณ 95 % ในการทำงานวิจัย ควรใช้น้ำที่บริสุทธิ์สะอาด เช่น น้ำกลั่น หรือน้ำกรองระบบ reverse osmosis การใช้ น้ำประปา ที่ไม่ผ่านการกรองจะมีสิ่งสกปรกต่าง ๆ เจือปนอยู่มาก ซึ่งจะไปรบกวนองค์ประกอบทางเคมี ของสิ่งต่าง ๆ ที่ใส่เข้าไปในอาหารได้ (เพชรรัตน์ จันทรทิน, 2556 ; 28, ยุพา ปานแก้ว และคณะ , 2558 ; 16 ธงชัย ศรีตะปัญญา, 2563 ; 32)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 กลุ่มเป้าหมาย

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ งานด้านชีววิทยา ศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา(รัฐบาล) ที่ตั้งของห้องปฏิบัติการ เลขที่ห้อง 16415 ชั้น 4 อาคารสิรินธร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

3.2 ระยะเวลาการดำเนินโครงการ

มกราคม – สิงหาคม 2565

3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการเก็บข้อมูล

สร้างแบบประเมินความพึงพอใจของผู้ใช้บริการห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในด้านห้องปฏิบัติการ ด้านเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ ด้านวัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ และด้านเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ แบบประเมินเป็นแบบมาตราส่วนประเมินค่า (Rating scale) จำนวน 14 ข้อ มีตัวเลือก 5 ตัวเลือก คือ พึงพอใจมากที่สุด พึงพอใจมากปานกลาง พึงพอใจน้อย และพึงพอใจน้อยที่สุด โดยมีเกณฑ์การให้คะแนน ดังนี้

เกณฑ์การแปลผลค่าเฉลี่ยแบ่งออกเป็น 5 ระดับ ดังนี้

ค่าเฉลี่ย 4.51-5.00	หมายถึง	มีระดับความพึงพอใจ มากที่สุด
ค่าเฉลี่ย 3.51-4.50	หมายถึง	มีระดับความพึงพอใจ มาก
ค่าเฉลี่ย 2.51-3.50	หมายถึง	มีระดับความพึงพอใจ ปานกลาง
ค่าเฉลี่ย 1.51-2.50	หมายถึง	มีระดับความพึงพอใจ น้อย
ค่าเฉลี่ย 1.00-1.50	หมายถึง	มีระดับความพึงพอใจ น้อยที่สุด

3.4 กิจกรรมและแผนการดำเนินการวิจัย

ตารางที่ 1 กิจกรรมและแผนการดำเนินการวิจัย

กิจกรรม	ระยะเวลา (เดือน)												ผู้ทำการศึกษาและ สถานที่ ทำการศึกษา
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1.การประชุมวางแผน งาน	←→												ศูนย์วิทยาศาสตร์
2.การสำรวจข้อมูลเบื้องต้น และค้นคว้าเอกสารที่ เกี่ยวข้อง	←→												ศูนย์วิทยาศาสตร์
3.การเก็บรวบรวมข้อมูล		←→											ศูนย์วิทยาศาสตร์
4.การวิเคราะห์ข้อมูล		←→											ศูนย์วิทยาศาสตร์
5.การสรุปผลและ รายงานผลการวิจัย									←→				ศูนย์วิทยาศาสตร์

3.5 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.5.1 ขั้นตอนการปฏิบัติงานในการจัดทำห้องปฏิบัติการและการเตรียมอุปกรณ์

ในการดำเนินงานสำหรับห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จำเป็นต้องมีการเตรียมความพร้อมต่าง ๆ ของอุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับปฏิบัติการ อยู่เสมอ โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะแบ่งเป็นห้อง 3 ส่วนหลัก ๆ ได้แก่ ห้องเตรียมอาหาร (Media Preparation Room) ห้องย้ายเนื้อเยื่อ (Transfer Room) และ ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Culture Room) รวมทั้งการจัดเตรียมสารละลายเข้มข้น และการจัดเก็บ สารเคมีที่จำเป็นสำหรับปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การจัดเตรียมอุปกรณ์สำหรับปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสำหรับห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น จะแบ่งส่วนในการปฏิบัติงานเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ห้องเตรียมอาหาร ห้องย้ายเนื้อเยื่อ และห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งในแต่ละส่วนจะมีอุปกรณ์ และเครื่องมือที่มีความสำคัญในการปฏิบัติงาน ดังนี้

1) ห้องปฏิบัติการเตรียมอาหาร (Media Preparation Room) การจัดเตรียมอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการเตรียมอาหาร มีความจำเป็นอย่างยิ่ง ที่ต้องจัดเตรียมความพร้อมของอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเตรียมอาหาร เพื่ออำนวยความสะดวก ต่อและมีเพียงพอสำหรับการปฏิบัติงาน อุปกรณ์ที่สำคัญในห้องนี้ได้แก่ เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ เครื่องชั่งไฟฟ้า (Balance) เครื่องกวนสารเคมี (Hotplate stirrer) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ตู้เย็น (Refrigerator) เต้าไฟฟ้า ช้อนตักสาร (Spatula) เป็นต้น (ดังแสดงในภาพที่ 3.1)



เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง ใช้สำหรับชั่งสารเคมีที่ต้องการในปริมาณมาก



เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง ใช้สำหรับการชั่งสารเคมีที่ต้องการในปริมาณเล็กน้อย

ภาพที่ 3.1 แสดงจัดเตรียมเครื่องมือในห้องปฏิบัติการเตรียมอาหาร



เครื่องกวนสารให้ความร้อน (Magnetic stirrer) ใช้สำหรับกวนสารละลายในการเตรียมอาหาร



เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) ใช้สำหรับวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง



หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ใช้สำหรับนึ่งฆ่าเชื้อที่ติดมากับอาหารและเครื่องมือต่าง ๆ การใช้
งานความดันที่ใช้ คือ ประมาณ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) ประมาณ 15-20 นาที

ภาพที่ 3.1 แสดงจัดเตรียมเครื่องมือในห้องปฏิบัติการเตรียมอาหาร (ต่อ)



เตาอบความร้อน (Hot air Oven) ใช้สำหรับอบฆ่าเชื้อที่อาจติดมากับเครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่สามารถทนต่อความร้อนสูง ๆ ได้ เช่น เครื่องแก้ว และเครื่องมือที่ทำด้วยโลหะ



ตู้เย็น (Refrigerator) ใช้สำหรับเก็บสารเคมีบางตัวมีความจำเป็นที่จะต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิเหมาะสม

ภาพที่ 3.1 แสดงจัดเตรียมเครื่องมือในห้องปฏิบัติการเตรียมอาหาร (ต่อ)



ปิเปต (pipette) ใช้สำหรับดูดสารละลาย ที่ต้องการปริมาตรที่แน่นอนและมีความแม่นยำ



ลูกยางดูด (Pipette bulb) ใช้ในการ ดูดสารใส่ปิเปต



กระบอกตวง (Cylinder) ใช้ในการตวงสารละลาย



แท่งแก้วคนสาร (Glass Rod) ใช้ในการคนสารละลาย และช้อนตักสาร

ภาพที่ 3.2 แสดงจัดเตรียมอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการเตรียมอาหาร



บีกเกอร์ (Beaker) ใช้เป็นภาชนะในการชั่ง เตรียมสารละลายและตวงสารในการเตรียม อาหาร



ขวดรูปชมพู่ (Flask) ใช้เป็นเครื่องมือที่ใช้ เตรียมสารละลายมาตรฐานหรือใส่อาหาร เหลวสำหรับ
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



ขวดใส่สารละลาย (Reagent bottle)ใช้สำหรับ ใส่สารเคมีเมื่อเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้น
ที่ต้องการแล้ว และจะเก็บสารละลายนี้ไว้ใช้ใน ภายหลัง

ภาพที่ 3.2 แสดงจัดเตรียมอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการเตรียมอาหาร (ต่อ)



ขวดวัดปริมาตร (Volumetric Flasks) ใช้สำหรับเตรียมสารละลายที่ต้องการความเข้มข้นแน่นอน
ซึ่งใช้ในการเตรียมสารละลายเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์สูตร



ห้องปฏิบัติการเตรียมอาหาร (Media Preparation Room)

ภาพที่ 3.2 แสดงจัดเตรียมอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการเตรียมอาหาร (ต่อ)

2) การจัดเตรียมอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการย้ายเนื้อเยื่อพืช

(Transfession Room) การจัดเตรียมอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการย้ายเนื้อเยื่อพืช เป็นห้องที่ใช้สำหรับ ย้ายชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อที่ต้องการเลี้ยงเป็นห้องที่ต้องรักษาความสะอาดมาก เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ มีโอกาสเข้าไปในภาชนะที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้โดยตรง โดยมีการติดตั้งหลอดยูวี (uv lamp) ในห้องนี้ และจำเป็นต้องทำความสะอาดเป็นประจำ ควรมีการฆ่าเชื้อในอากาศและเช็ดถูพื้นห้องด้วย น้ำยาฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เป็นครั้งคราว ห้องนี้จะต้องมีระบบการควบคุมความสะอาดปลอดเชื้อเป็นสำคัญ (Aseptic Condition) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเรื่องการเข้าออกของผู้ปฏิบัติงาน การจัดเตรียม และสำรวจความพร้อมของอุปกรณ์ในห้องย้ายเนื้อเยื่อพืชก็เพื่ออำนวยความสะดวกและความพร้อม สำหรับการปฏิบัติงาน อุปกรณ์ที่สำคัญในห้องนี้ สำหรับอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการตัดย้ายเนื้อเยื่อ ก่อนนำเข้าไปในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ควรฉีดพ่นฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70% ทุกครั้ง (ดังแสดงในภาพที่ 3.3)



ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Laminar air-flow cabinet) เป็นตู้กรองอากาศให้บริสุทธิ์ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ เป็นตู้สำหรับตัดแต่ง และย้ายเนื้อเยื่อพืชลงในภาชนะเพาะเลี้ยง โดยองค์ประกอบสำคัญภายในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ คือ หลอดไฟฟ้าให้แสงสว่างจะทำให้เห็นสิ่งต่าง ๆ ภายในตู้ ได้อย่างชัดเจน หลอดยูวี (UV lamp) เป็นหลอดที่ใช้สำหรับฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนภายในตู้

ภาพที่ 3.3 แสดงอุปกรณ์ และเครื่องมือในห้องย้ายเนื้อเยื่อพืช



ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด (Knives and Scalpel) ใช้สำหรับตัดย้ายเนื้อเยื่อพืช



ปากคีบ (Forceps) ใช้สำหรับจับ ชิ้นพืชเวลาตัดย้ายเนื้อเยื่อ



ตะแกรงสแตนเลส (Rack) ใช้สำหรับ วางมีดผ่าตัดและปากคีบ



ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Turnel) ใช้สำหรับ ในการเผามีดผ่าตัด และปากคีบ

ภาพที่ 3.3 แสดงอุปกรณ์ และเครื่องมือในห้องย้ายเนื้อเยื่อพืช (ต่อ)



ขวดแก้วสำหรับใส่แอลกอฮอล์ 95% ไว้สำหรับจุ่มอุปกรณ์ในการผ่าเนื้อ



กระบอกฉีดใส่แอลกอฮอล์ 70% สำหรับฉีดฆ่าเชื้ออุปกรณ์ต่าง ๆ



การจัดเตรียมอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการย้ายเนื้อเยื่อพืช (Transference Room)

ภาพที่ 3.3 แสดงอุปกรณ์ และเครื่องมือในห้องย้ายเนื้อเยื่อพืช (ต่อ)

3) การเตรียมอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Culture Room)

การเตรียมอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นห้องสำหรับ วางขวดเพาะเลี้ยง ซึ่งห้องนี้เป็นห้องที่ต้องควบคุมความสะอาดเป็นพิเศษทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ

การดูแลห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะต้องสะอาดอยู่เสมอ หมั่น ตรวจดูขวดหรือภาชนะที่เลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ถ้าพบว่ามีจุลินทรีย์ขึ้นปนเปื้อน จะต้องรีบนำออกไปทิ้งฆ่าเชื้อ และล้างทันที ไม่ให้เป็นที่สะสมเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งอาจแพร่กระจายภายในห้องได้ สภาพแวดล้อม ที่เหมาะสมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อจะแตกต่างกันสำหรับพืชแต่ละชนิด โดยทั่วไปมักจะปรับ สภาพแวดล้อมภายในห้องให้มีอุณหภูมิ ประมาณ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มของแสง 1,000-3,000 ลักซ์ (ดังแสดงในภาพที่ 4.6)



ชั้นวางเนื้อเยื่อ (Culture Shelf) ใช้สำหรับวางเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะต้องติดไฟให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์แบบคูลไวท์ (Cool White) ให้แสงสี ขาว ความเข้มแสง (Light Intensity) ที่พอเหมาะและนิยมใช้ คือ 1,000 - 3,000 ลักซ์ โดยทั่วไปให้แสงแก่พืช (Photoperiod) 16 ชั่วโมง ต่อวัน



เครื่องเขย่า (Shaker) ใช้สำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลว

ภาพที่ 3.4 แสดงอุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช



เครื่องปรับอากาศ (Air Conditioner) ใช้สำหรับควบคุมอุณหภูมิภายในห้องเพาะเลี้ยง โดยทั่วไป
จะควบคุมอุณหภูมิที่ประมาณ 25+2 องศาเซลเซียส



เครื่องควบคุมเวลา (Timer) ใช้ควบคุม การเปิด-ปิดไฟ



การจัดเตรียมอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Culture Room)

ภาพที่ 3.4 แสดงอุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (ต่อ)

3.5.2 การจัดเก็บสารเคมีในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีอยู่หลายชนิด ตามการใช้งาน และการปฏิบัติงาน ดังนั้นการจัดเก็บสารเคมีต้องคำนึงถึงความปลอดภัย และความสะดวกต่อผู้ปฏิบัติงานเป็นหลัก การจัดเก็บสารเคมีในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะทำการจัดเก็บในตู้เก็บสารเคมี โดยการใช้โปรแกรม ChemInvent สำหรับบันทึกข้อมูลสารเคมีพร้อมระบบประมวลผล (และรายงาน) ที่จะอำนวยความสะดวกให้ห้องปฏิบัติการ สามารถจัดการสารเคมีได้อย่างเป็นระบบและมีประสิทธิภาพ ทำให้ผู้ใช้งานสามารถตรวจสอบปริมาณสารเคมี ติดตามความเคลื่อนไหวสารเคมี ประมาณค่าใช้จ่ายในการเบิก/จ่ายสารเคมี รวมทั้งสามารถจัดระบบการควบคุมความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการได้อย่างเหมาะสม โดยดูจากข้อมูลความเป็นอันตรายของสารเคมีของหน่วยงาน/ห้องปฏิบัติการนั้น ๆ ที่ปรากฏในโปรแกรม

โปรแกรมการจัดการสารเคมี (ChemInvent2015) คือ โปรแกรมจัดการข้อมูลของสารเคมีทั้งชนิด ปริมาณที่นำเข้าและปริมาณคงเหลือ สถานที่เก็บ ค่าใช้จ่าย ตลอดจนข้อมูลความปลอดภัยของสารเคมีเพื่อให้มีการจัดการสารเคมีที่เป็นระบบ มีมาตรฐานและมีประสิทธิภาพ โดยโปรแกรม ChemInvent2015 ที่พัฒนาขึ้น นี้มีระบบการบันทึกและจัดเก็บข้อมูลบนฐานข้อมูลซึ่งสามารถใช้งานได้ทั้งในระบบออฟไลน์ (offline) และ ออนไลน์ (online) ที่ผู้ใช้งานจึงสามารถเข้าถึงฐานข้อมูลได้อย่างสะดวกรวดเร็วผ่านทางระบบเครือข่าย คอมพิวเตอร์

เนื่องจากโปรแกรมนี้นี้ถูกพัฒนาให้สามารถรองรับการใช้งานได้หลากหลาย ผู้ใช้งานสามารถเพิ่มและ ปรับปรุงชื่อสารเคมีและข้อมูลสารเคมีรวมทั้งข้อมูลบริษัทผู้ขายและผู้ผลิตสารเคมีในฐานข้อมูลภายใน โปรแกรมได้ ซึ่งจะทำให้ฐานข้อมูลในโปรแกรมมีความทันสมัยอยู่เสมอ นอกจากนี้โปรแกรมจะอำนวยความสะดวกให้กับผู้ใช้งานในการตรวจสอบปริมาณของสารเคมีการติดตามความเคลื่อนไหวของสารเคมีการ ประมาณค่าใช้จ่ายในการเบิก/จ่ายสารเคมี รวมทั้งดำเนินงานมาตรฐานความปลอดภัยภายในหน่วยงาน ทำให้หน่วยงานต่างๆ มีการจัดการสารเคมีในรูปแบบเดียวกัน

1.1 การทำงานและประโยชน์ของโปรแกรมการจัดการข้อมูลสารเคมี ChemInvent2015

- 1) มีการใช้งานผ่านระบบเครือข่ายคอมพิวเตอร์ทำให้สามารถเรียกใช้งานได้ตลอดเวลาผ่านหน้า จอคอมพิวเตอร์
- 2) มีการแบ่งระดับการเข้าถึงข้อมูลของผู้ใช้งานผ่านระบบรหัสผ่าน ทำให้มีความเป็นส่วนตัวในการเก็บ ข้อมูล

3) มีการอนุญาตให้ผู้ใช้งานเพิ่มข้อมูลสารเคมีชื่อบริษัทผู้ขายและบริษัทผู้ผลิตที่ไม่มีในฐานข้อมูลได้ทำให้ ข้อมูลมีความหลากหลายและรองรับการทำงานในทุกหน่วยงาน

4) ผู้ใช้งานสามารถติดตามข้อมูลต่าง ๆ ของสารเคมีได้ดังนี้

- ข้อมูลในการซื้อขอสสารเคมีนั้น ๆ เช่น บริษัทผู้ผลิต บริษัทผู้ขาย และเลขที่ใบแจ้งหนี้
- ข้อมูลการใช้งานสารเคมีเช่น ปริมาณที่นำเข้า ปริมาณคงเหลือ และผู้เบิกใช้สารเคมี
- ข้อมูลงบประมาณที่ใช้ในการซื้อสารเคมี
- ข้อมูลสถานที่เก็บสารเคมีแต่ละขวด
- ข้อมูลทั่วไปและข้อมูลอันตรายของสารเคมีเช่น ชื่อพ้อง (Synonym), CAS Number, GHS, UN Class และ UN Number

5) ผู้ใช้สามารถประมาณค่าใช้จ่ายในการจัดซื้อสารเคมีภายในหน่วยงานได้เนื่องจากมีการระบุ งบประมาณในการซื้อสารเคมีแต่ละขวดพร้อมกับระบุแหล่งเงินทุน

6) สามารถสรุปปริมาณการใช้งานสารเคมีเพื่อนำไปช่วยในการประเมินปริมาณและประเภทของเสียที่จะ เกิดขึ้นจากการใช้สารเคมีได้ คู่มือการใช้งานโปรแกรมการจัดการสารเคมี (ChemInvent2015): สำหรับผู้ใช้งาน ซี-2 สนับสนุนโดย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

7) สามารถระบุตำแหน่งของสารเคมีในหน่วยงาน จึงสามารถติดตามการใช้งาน ตรวจสอบสารเคมี หมดอายุ (ตามระยะเวลาที่ผู้ใช้ระบุ หรือ 5 ปีหลังจากวันที่นำเข้า) หรือสืบค้นข้อมูลเพื่อการบริจาค/ ขอแบ่งสารเคมีระหว่างหน่วยงาน ซึ่งช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมีซ้ำซ้อน

8) สามารถจัดระบบการควบคุมความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการได้อย่างเหมาะสม โดยดูจากข้อมูลความเป็นอันตรายของสารเคมีของหน่วยงานนั้น ๆ ที่ปรากฏในโปรแกรมฯ

9) อำนวยความสะดวกในการจัดทำรายงานสารเคมีภายในหน่วยงาน เพื่อประโยชน์ในการตรวจสอบ สารเคมีของเจ้าหน้าที่หรือการรายงานต่อผู้บริหาร (เอกสารประกอบรายงานผลการดำเนินงาน โครงการพัฒนาสาระและระบบประมวลผลบนเว็บไซต์ ESPReL Checklist และการพัฒนาและบำรุงรักษา ChemInvent คู่มือการใช้งานโปรแกรมการจัดการสารเคมี (ChemInvent2015): สำหรับผู้ใช้งาน จัดทำโดย สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)



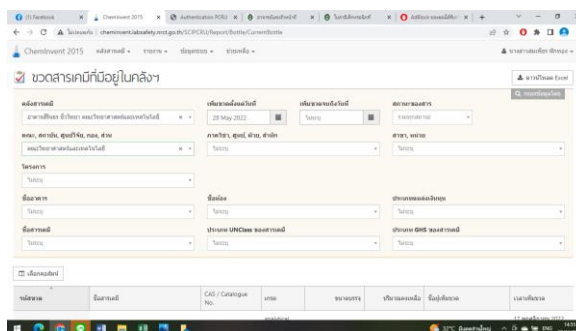
เอกสารประกอบรายงานผลการดำเนินงาน
โครงการพัฒนาสาระและระบบประมวลผลบนเว็บไซต์ ESPRel Checklist และ
การพัฒนาและบำรุงรักษา ChemInvent

คู่มือการใช้งานโปรแกรมการจัดการสารเคมี (ChemInvent2015): สำหรับผู้ใช้งาน

จัดทำโดย
สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เสนอต่อ
สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ

มกราคม 2559



ภาพที่ 3.5 คู่มือการใช้งานโปรแกรมการจัดการสารเคมี

3.5.3 ขยายพันธุ์พืชด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.5.3.1 การขั้นตอนการปฏิบัติงานในการเตรียมสารเคมี

การจัดเตรียมสารเคมี ซึ่งรวมไปถึงการจัดเก็บสารเคมี เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม สูตรอาหารสังเคราะห์สำหรับการปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ สารอนินทรีย์ที่เป็นธาตุอาหารหลัก และสารอินทรีย์ ใช้เป็นแหล่งพลังงานของพืช และสารเคมีที่ควบคุมการเจริญเติบโต ของพืช เช่น ออกซิน ไซโตไคนิน จิบเบอเรลลิน เป็นต้น สำหรับการจัดเตรียมสารเคมี มีขั้นตอน การจัดเตรียมดังรายละเอียดต่อไปนี้

การเตรียมสารละลายเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์สูตร VW (Vacin and Went, 1949) การเตรียมสารละลายเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์สูตร VW ซึ่งจะทำให้การเตรียม สารละลายโดยการจัดเตรียม ดังนี้

Stock solution A (Macro) ประกอบด้วย

KNO ₃	52.5 g
KH ₂ PO ₄	25 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 g

ละลายน้ำสารแต่ละชนิดแล้วรวมกันปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร (10 ml/L medium)

Stock solution B (Micro) ประกอบด้วย

MgSO₄.7H₂O 27 g

MnSO₄.2H₂O 0.75 g

ละลายน้ำสารแต่ละชนิดแล้วรวมกันปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร (10 ml/L medium)

Stock solution C (vitamin) ประกอบด้วย

Na EDTA.2H₂O 18.65 g

FeSO₄.7H₂O 13.65 g

ละลายน้ำสารแต่ละชนิดแล้วรวมกันปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร (2 ml/L medium)

หรือใช้สาร NaFe EDTA เพียงชนิดเดียว 31.5 g แล้วละลายน้ำแล้วทำการปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ทดแทนได้เช่นกัน

Stock solution D ประกอบด้วย

Ca₃(PO₄)₂ (dissolve with 1 N HCl) 20 g

ละลายน้ำสารแต่ละชนิดแล้วรวมกันปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร (10 ml/L medium)

การเตรียมอาหาร VW medium stock solutions

วิธีการเตรียมอาหารเพาะเมล็ด 1 ลิตร

1. รินน้ำกลั่นใส่หม้อเคลือบ 500 มิลลิลิตร
2. สารละลายเข้มข้น A, B, C และ D stock
3. เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร
4. มันฝรั่ง 50 กรัม (ต้มเอาแต่น้ำ)
5. เติมน้ำตาลทราย 20 กรัม แล้วคนให้ละลาย
6. เติมน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร
7. วัดค่า pH ให้ได้ 5.0-5.2 ถ้า pH สูงกว่า 5 หยดกรด HNO₃ หรือ HCL ลงไปค่อย ๆ ปรับให้ได้ เท่ากับ 5.2 ถ้า pH ต่ำกว่า 5.2 ให้ปรับด้วย NaOH หรือ KOH
8. เติมน้ำมัน 7.5 กรัม คนให้เข้ากัน
9. ยกตั้งไฟคนตลอดจนอาหารเดือดและอุ่นละลาย

วิธีการเตรียมวุ้นอาหาร subculture ถ่ายขวด 1 ลิตร

1. รินน้ำกลั่นใส่หม้อเคลือบ 500 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร
3. สารละลายเข้มข้น A, B, C และ D stock
4. เติมหัก้วยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร
5. และมันฝรั่งบด 50 กรัมต่อลิตร
6. เติมน้ำตาลทราย 20 กรัม แล้วคนให้ละลาย
7. เติมน้ำให้ครบ 1000 มิลลิลิตร
8. วัดค่า pH ให้ได้ 5.0-5.2 ถ้า pH สูงกว่า 5 หยดกรด HNO₃ หรือ HCL ลงไปค่อย ๆ ปรับให้ได้เท่ากับ 5.2 ถ้า pH ต่ำกว่า 5..2 ให้ปรับด้วย NaOH หรือ KOH
9. เติมนุ่นผง 7.5 กรัม คนให้เข้ากัน
10. ยกตั้งไฟคนตลอดจนอาหารเดือดและวุ้นละลาย

การเตรียมสารละลายเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) การเตรียมสารละลายเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์สูตร MS ซึ่งจะทำกรเตรียม สารละลาย โดยการจัดเตรียม ดังนี้

การเตรียม stock solution ของ MS medium

Stock Solution 1 Macronutrients (10 x concentration)

ละลายสารเคมีเหล่านี้ในน้ำกลั่น 1 L :

NH ₄ NO ₃	16.5 g	KNO ₃	19.0 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.4g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.7 g
KH ₂ PO ₄	1.7g		

Stock Solution 2 Micronutrients (100 x concentration)

ละลายสารเคมีเหล่านี้ในน้ำกลั่น 1 L :

MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.2300 g	ZnSO ₄ ·4H ₂ O	0.8600 g
H ₃ BO ₃	0.6200 g	KI	0.0830 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0250 g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0025g		

Stock Solution 3 Vitamins (100 x concentration)

ละลาย vitamins เหล่านี้ในน้ำกลั่น 100 mL :

Glycine	0.020 g	Nicotinic acid	0.005 g
Pyridoxine HCL	0.005 g	Thiamine HCl	0.001 g
Myo-Inositol	1 g		

Stock Solution 4 Fe-EDTA (100 x concentration)

ละลายสารเคมีเหล่านี้ในน้ำกลั่น 100 mL:

Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.373g	FeSO ₄ .7H ₂ O
--	--------	--------------------------------------

ละลาย EDTA ก่อน แล้วค่อยละลาย Iron เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียมอาหารสูตร MS 1 L จาก stock solutions

1. เทน้ำสะอาดลงในบีกเกอร์ ให้มีปริมาตรประมาณ 600 mL
2. นำ Stock Solution 1 ปริมาตร 100 mL Stock Solution 2 ปริมาตร 10 mL
Stock Solution 3 ปริมาตร 10 mL Stock Solution 4 ปริมาตร 10 mL เท
สารละลายของแต่ละ Stock Solution ลงในน้ำ ใส่ที่ละลายแล้วคนให้สารละลาย
เข้ากันจนไม่มีตะกอนให้เห็น
3. เติมน้ำตาล Sucrose 30 g/L
4. เติมน้ำสะอาดให้ได้ปริมาตร 1 L
5. ปรับ pH ให้เป็น 5.6-5.8 โดยใช้ NaOH หรือ HCl
6. เติมวุ้น (Agar) 8 g/l จากนั้นก็นำไปต้มและคนจนวุ้นละลายเข้ากับอาหาร
7. เทใส่ลงในภาชนะที่เหมาะสม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 °C
นาน 15 นาที

3.5.3.2 การคัดเลือกชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

พันธุ์พืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควรจะสะอาดปราศจากโรค และใช้ส่วนที่ยังอ่อนอยู่ ต้องมีการคัดเลือกให้เหมาะสม แล้วแต่ชนิดของพืช ชิ้นส่วนของพืชเหล่านี้ต้องสะอาด ถ้าต้องการต้นที่ปราศจากไวรัสก็ต้องใช้เนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ปลายสุดที่มีขนาดเล็ก ความยาวไม่เกิน 0.5 มิลลิเมตรไปเลี้ยง

การทำความสะอาดชิ้นส่วนพืช

เนื่องจากอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วยธาตุอาหาร น้ำตาล วิตามิน และ สารควบคุมการเจริญเติบโตอยู่ด้วย จึงเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เป็นอย่างดี และบางครั้งเจริญได้เร็วกว่าเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นนอกจากการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ และล้างออกได้ง่าย สารเคมีบางชนิดแม้ว่าจะฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่ล้างออกยาก จะมีผลทำให้เนื้อเยื่อตาย หรือเจริญเติบโตได้ไม่ดีเท่าที่ควร สารเคมีที่นิยมใช้ได้แก่ แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 9-10% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2-5% หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 10-12%

การเตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อ

1. เอทิลแอลกอฮอล์ 70% เตรียมได้จากการ ใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 95% จำนวน 70 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำ 25 มิลลิลิตร
2. คลอริกซ์ 10% ได้จากการใช้น้ำ 90 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อโรคไว้ก่อน เมื่อจะใช้ก็เติม คลอริกซ์ 10 มิลลิลิตร และสารเปียกใบ เช่น Tween 20 1-2 หยด
3. คลอริกซ์ 5% ได้จากการใช้น้ำ 95 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อโรคไว้ก่อน เมื่อจะใช้ก็เติม คลอริกซ์ 5 มิลลิลิตร และสารเปียกใบ เช่น Tween 20 1-2 หยด
4. น้ำ 100 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อโรคแล้วมีไว้ สำหรับล้างคลอริกซ์ ออกจากชิ้นส่วนของพืช ก่อน ที่จะนำไปเลี้ยงบนอาหาร หมายเหตุ คลอริกซ์เป็นสารฆ่าเชื้อ ประกอบ ด้วย โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5.25%

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ

1. นำชิ้นส่วนของพืชมาล้างให้สะอาด
2. ซุปด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70%
3. แช่น้ำนํ้ายาคลอริกซ์ 10% เป็นเวลา 15 นาที
4. ล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เอน้ำยาคลอริกซ์ ออกให้หมด
5. ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ตัดชิ้นส่วนที่ต้องการ ไปเลี้ยงบนอาหาร โดยหลักการแล้วไม่ว่าจะเป็นชิ้นส่วนพืชชนิดใดก็ตาม จะมีวิธีการในการฟอกฆ่าเชื้อที่คล้ายกัน ตามวิธีดังกล่าว แต่ในทางปฏิบัติแล้ว ลักษณะความ แตกต่างของชิ้นส่วนพืช เช่น ตายอด ตาข้าง ใบ ดอก ปลายราก ผักอ่อน นั้นมีความแตกต่างกันมาก ทั้งใน เรื่องของรูปร่างลักษณะ ความทนทานต่อการฟอก ฆ่าเชื้อ และความยากง่ายในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ ที่ติดมากับผิวพืช สิ่งต่าง ๆ

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องใช้เทคนิค ปลอดเชื้อ โดยมีวิธีการ 3 ขั้นตอนที่สำคัญ คือ

1. นำชิ้นส่วนของพืชมาทำการฟอกฆ่า เชื้อจุลินทรีย์ที่ติดอยู่ที่ผิวพืช (surface sterilization) แล้วเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ที่บรรจุอยู่ในขวด จนเจริญเติบโตและพัฒนาได้ต้นหรือแคลลัส หรือ เอ็มบริอยด์ที่ปลอดเชื้อ
2. การเพิ่มปริมาณ โดยการตัดแบ่งแยก ต้น หรือข้อ หรือแคลลัสออกเป็นชิ้นๆ โดยใช้เทคนิค ปลอดเชื้อ แล้วย้ายเปลี่ยนอาหารขวดใหม่ทุก ๆ เดือน นำขวดไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือวางบน แท่นเขย่า ก็จะเพิ่มปริมาณ 5-10 เท่า เรื่อย ๆ ไป
3. เมื่อได้ต้นที่มากพอแล้ว ก็ชักนำให้ออก ราก และเมื่อเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์แข็งแรงดี แล้วจึงนำออกปลูกในดิน

บทที่ 4

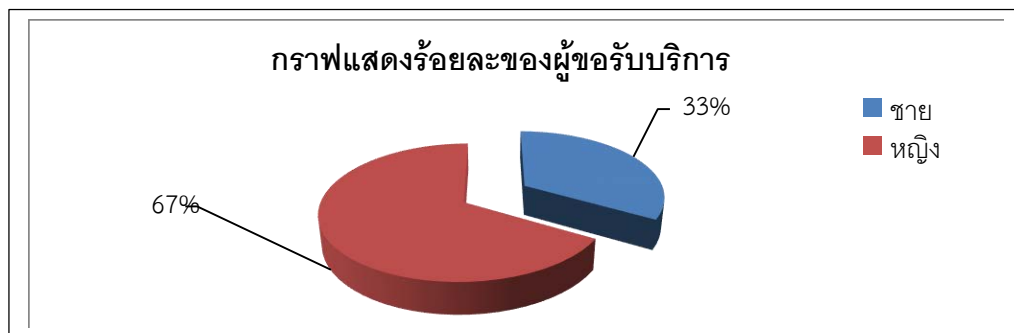
ผลการวิจัย

4.1 ผลการวิจัย

4.1.1 ผลการประเมินความพึงพอใจของผู้ขอรับบริการห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังต่อไปนี้

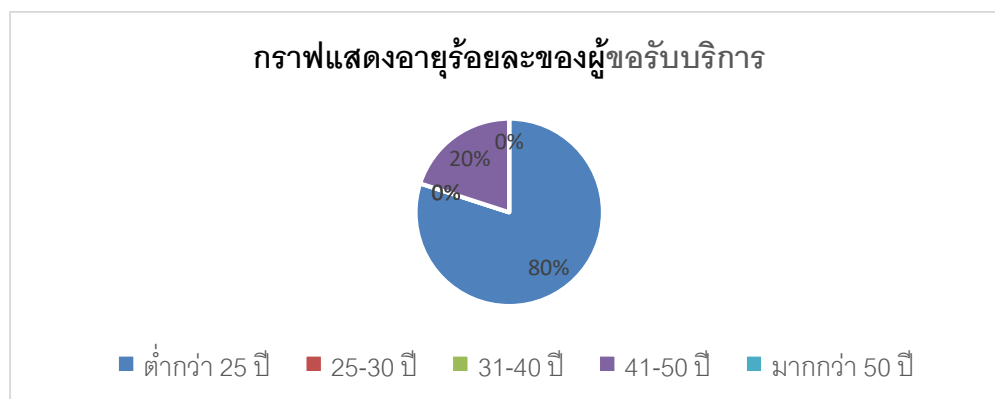
ข้อมูลทั่วไปของผู้ขอรับบริการ

ผู้ขอรับบริการห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีผู้ขอรับบริการ 15 คน สามารถจำแนกตามเพศ อายุ และระดับการศึกษา ดังแสดงในภาพที่ 3.1, 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ



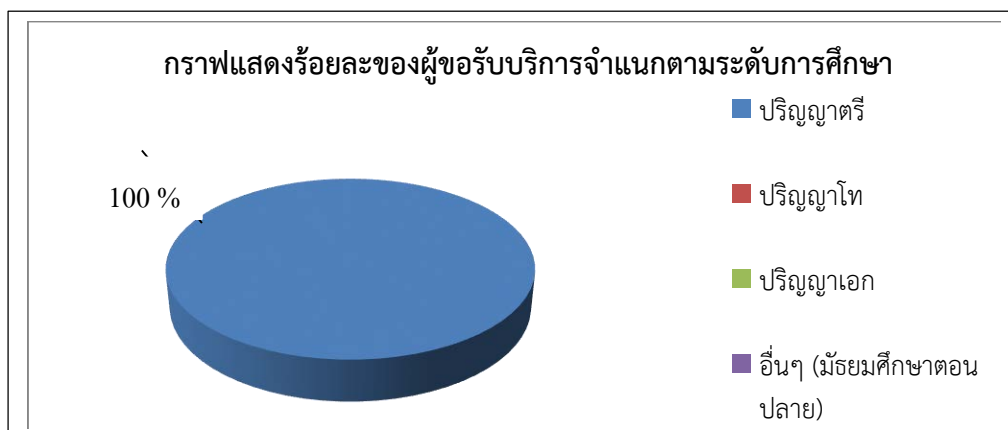
ภาพที่ 4.1 แสดงร้อยละของผู้ขอรับบริการจำแนกตามเพศ (n=15)

ผู้ขอรับบริการห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีผู้ขอรับบริการทั้งสิ้น 15 คน ส่วนใหญ่เป็นเพศหญิง ร้อยละ 67 และเพศชาย ร้อยละ 33



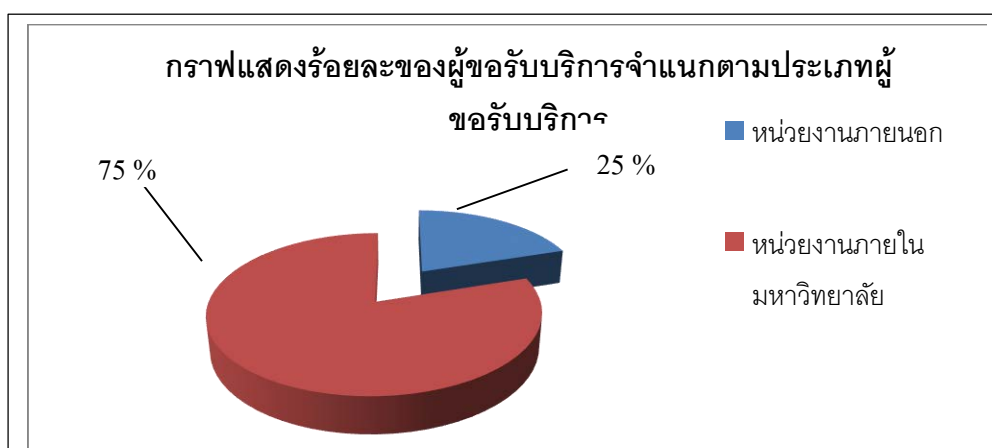
ภาพที่ 4.2 แสดงร้อยละของผู้ขอรับบริการการจำแนกตามอายุ (n=15)

เข้าร่วมโครงการส่วนใหญ่ มีอายุต่ำกว่า 25 ปี คิดเป็นร้อยละ 80 และอายุระหว่าง 41-50 ปี คิดเป็นร้อยละ 20



ภาพที่ 4.3 แสดงร้อยละของผู้ขอรับบริการจำแนกตามระดับการศึกษา (n=15)

จากภาพจะเห็นว่าผู้ขอรับบริการดังกล่าวมีระดับการศึกษาส่วนใหญ่อยู่ที่ระดับปริญญาตรี ซึ่งสูงถึงร้อยละ 100



ภาพที่ 4.4 แสดงร้อยละของผู้ขอรับบริการจำแนกตามประเภทผู้ขอรับบริการ(n=15)

จากภาพจะเห็นว่าผู้ขอรับบริการดังกล่าวมีประเภทผู้ขอรับบริการหน่วยงานภายในมหาวิทยาลัย ร้อยละ 75 และหน่วยงานภายนอก ร้อยละ 25



ภาพที่ 4.5 แสดงร้อยละของผู้ขอรับบริการจำแนกตามสถานภาพผู้ขอรับบริการ(n=15)

จากภาพจะเห็นว่าผู้ขอรับบริการดังกล่าวมีสถานภาพผู้ขอรับบริการ นักศึกษามากสุด ร้อยละ 67 เอกชนร้อยละ 20 อาจารย์/นักวิจัยและบุคลากรสายปฏิบัติการ ร้อยละ 7

4.2 ผลการประเมินความพึงพอใจผู้ขอรับบริการห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เกณฑ์การแปลผลค่าเฉลี่ยแบ่งออกเป็น 5 ระดับ ดังนี้

ค่าเฉลี่ย 4.51-5.00	หมายถึง	มีระดับความพึงพอใจ มากที่สุด
ค่าเฉลี่ย 3.51-4.50	หมายถึง	มีระดับความพึงพอใจ มาก
ค่าเฉลี่ย 2.51-3.50	หมายถึง	มีระดับความพึงพอใจ ปานกลาง
ค่าเฉลี่ย 1.51-2.50	หมายถึง	มีระดับความพึงพอใจ น้อย
ค่าเฉลี่ย 1.00-1.50	หมายถึง	มีระดับความพึงพอใจ น้อยที่สุด

1) ผลการประเมินความพึงพอใจผู้ให้บริการห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
ด้านห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และผลการประเมินระดับความพึงพอใจ ด้านห้องปฏิบัติการ (n=15)

ข้อ	รายการประเมิน	$\bar{x}$	S.D.	ผลการประเมิน
1	ความเป็นระเบียบของห้องปฏิบัติการ	4.06	0.68	มาก
2	ความเพียงพอของพื้นที่ในการทำปฏิบัติการ	4.00	0.52	มาก
3	การดูแลความปลอดภัยในการทำปฏิบัติการ	3.50	0.97	มาก
4	ความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการ	4.25	0.58	มาก
ภาพรวม		3.95	0.20	มาก

จากตารางที่ 4.1 ผลการประเมินความพึงพอใจผู้ให้บริการด้านห้องปฏิบัติการพบว่า ผู้ให้บริการมีความพึงพอใจในภาพรวมอยู่ในระดับมาก ($\bar{x} = 3.95$) และเมื่อพิจารณาในแต่ละรายการพบว่าผู้ให้บริการมีความพึงพอใจต่อ ความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการ อยู่ในระดับมาก ($\bar{x} = 4.25$) รองลงมา คือ ความเป็นระเบียบของห้องปฏิบัติการ อยู่ในระดับ มาก ($\bar{x} = 4.06$) รองลงมา คือ ความเพียงพอของพื้นที่ในการทำปฏิบัติการ อยู่ในระดับ มาก ($\bar{x} = 4.00$) และท้ายสุดคือ การดูแลความปลอดภัยในการทำปฏิบัติการ อยู่ในระดับมาก ($\bar{x} = 3.50$)

2) ผลการประเมินความพึงพอใจผู้ให้บริการห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
ด้านเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และผลการประเมินระดับความพึงพอใจ ด้านเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ (n=15)

ข้อ	รายการประเมิน	$\bar{x}$	S.D.	ผลการประเมิน
1	ความเพียงพอเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์	4.06	0.57	มาก
2	ประสิทธิภาพในการใช้งาน	3.56	0.63	มาก
3	ความสะดวกในการใช้งาน	3.81	0.54	มาก
ภาพรวม		3.81	0.04	มาก

จากตารางที่ 4.2 ผลการประเมินความพึงพอใจผู้ให้บริการด้านเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ พบว่า ผู้ให้บริการมีความพึงพอใจในภาพรวมอยู่ในระดับมาก ($\bar{x} = 3.81$) และเมื่อพิจารณาในแต่ละรายการพบว่าผู้ให้บริการมีความพึงพอใจต่อ ความเพียงพอเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ อยู่ในระดับมาก ($\bar{x} = 4.04$) รองลงมา คือ ความสะดวกในการใช้งาน อยู่ในระดับมาก ($\bar{x} = 3.81$) และท้ายสุดคือ ประสิทธิภาพในการใช้งาน อยู่ในระดับมาก ($\bar{x} = 3.56$)

3) ผลการประเมินความพึงพอใจผู้ให้บริการห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ด้านวัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และผลการประเมินระดับความพึงพอใจ ด้านวัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ (n=15)

ข้อ	รายการประเมิน	$\bar{x}$	S.D.	ผลการประเมิน
1	ความเพียงพอ วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี	4.13	0.72	มาก
2	อุปกรณ์อยู่ในสภาพดี พร้อมใช้งาน	4.38	0.50	มาก
3	ความเป็นระเบียบของสารเคมี	3.75	0.45	มาก
ภาพรวม		4.08	0.14	มาก

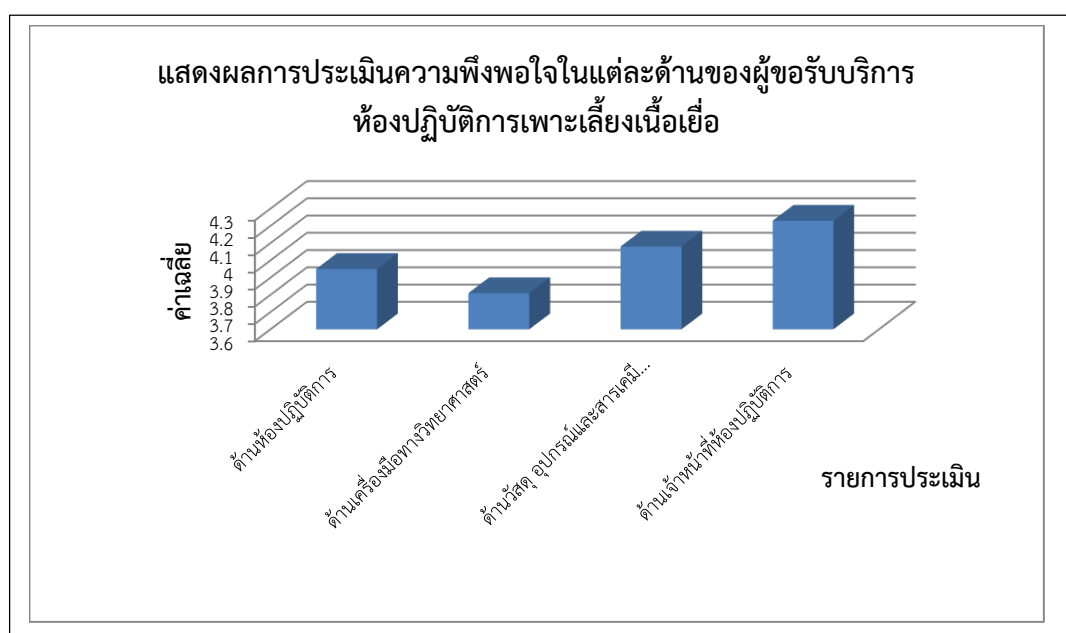
จากตารางที่ 4.3 ผลการประเมินความพึงพอใจผู้ให้บริการด้านวัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ พบว่า ผู้ให้บริการมีความพึงพอใจในภาพรวมอยู่ในระดับมาก ($\bar{x} = 4.08$) และเมื่อพิจารณาในแต่ละรายการพบว่าผู้ให้บริการมีความพึงพอใจต่อ อุปกรณ์อยู่ในสภาพดี พร้อมใช้งาน อยู่ในระดับมาก ($\bar{x} = 4.38$) รองลงมา คือ ความเพียงพอ วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี อยู่ในระดับ มาก ($\bar{x} = 4.13$) และท้ายสุดคือ ความเป็นระเบียบของสารเคมี อยู่ในระดับมาก ($\bar{x} = 3.81$)

4) ผลการประเมินความพึงพอใจผู้ให้บริการห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
ด้านเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และผลการประเมินระดับความพึงพอใจ ด้านเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ (n=15)

ข้อ	รายการประเมิน	$\bar{x}$	S.D.	ผลการประเมิน
1	ความพร้อมในการเตรียมปฏิบัติการ	3.94	0.57	มาก
2	ความเต็มใจในการให้บริการ	4.63	0.50	มาก
3	ความสะอาดและรวดเร็วในการให้บริการ	4.38	0.50	มาก
4	เจ้าหน้าที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์	4.00	0.63	ดีมาก
ภาพรวม		4.23	0.6	มาก

จากตารางที่ 4.4 ผลการประเมินความพึงพอใจผู้ให้บริการด้านเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ การพบว่า ผู้ให้บริการมีความพึงพอใจในภาพรวมอยู่ในระดับมาก ($\bar{x} = 4.20$) และเมื่อพิจารณาในแต่ละรายการพบว่าผู้ให้บริการมีความพึงพอใจต่อ ความเต็มใจในการให้บริการ อยู่ในระดับมาก ($\bar{x} = 4.63$) รองลงมา คือ ความสะอาดและรวดเร็วในการให้บริการ อยู่ในระดับ มาก ($\bar{x} = 4.38$) รองลงมา คือ เจ้าหน้าที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ อยู่ในระดับ มาก ($\bar{x} = 4.00$) และท้ายสุดคือ ความพร้อมในการเตรียมปฏิบัติการ อยู่ในระดับมาก ($\bar{x} = 3.94$)



ภาพที่ 4.6 แสดงผลการประเมินความพึงพอใจในแต่ละด้านของผู้เข้ารับการอบรม

จากภาพที่ 4.6 แสดงผลการประเมินความพึงพอใจในแต่ละด้านของผู้ขอรับ

บริการ จำนวน 15 คน พบว่า ความพึงพอใจในภาพรวม อยู่ในระดับมาก มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.02 คิดเป็นร้อยละ 80.42 โดยแยกออกเป็นแต่ละด้านดังนี้ ด้านเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ โดยมีค่าคะแนนเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 4.23 รองลงมา คือ ด้านวัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี ที่ใช้ใน ห้องปฏิบัติการ อยู่ในระดับมาก มีค่าคะแนนเฉลี่ย เท่ากับ 4.08 รองลงมา คือ ด้านห้องปฏิบัติการ ด้านเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ อยู่ในระดับมาก มีค่าคะแนนเฉลี่ย เท่ากับ เท่ากับ 3.95 และ ทำยสุด คือ ด้านเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ อยู่ในระดับมาก มีค่าคะแนนเฉลี่ย เท่ากับ 3.81

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการประเมินความพึงพอใจผู้ให้บริการห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวน 15 คน พบว่า ความพึงพอใจในภาพรวม อยู่ในระดับมาก มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.02 คิดเป็นร้อยละ 80.42 โดยแยกออกเป็นแต่ละด้านดังนี้ ด้านเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ โดยมีค่าคะแนนเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 4.23 รองลงมา คือ ด้านวัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ อยู่ในระดับมาก มีค่าคะแนนเฉลี่ย เท่ากับ 4.08 รองลงมา คือ ด้านห้องปฏิบัติการ ด้านเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ อยู่ในระดับมาก มีค่าคะแนนเฉลี่ย เท่ากับ เท่ากับ 3.95 และท้ายสุด คือ ด้านเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ อยู่ในระดับมาก มีค่าคะแนนเฉลี่ย เท่ากับ 3.81

5.2 อภิปรายผล

จากการพัฒนาและปรับปรุงห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อรองรับตัวอย่างจากชุมชน ซึ่งผลการประเมินความพึงพอใจผู้ให้บริการห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวน 15 คน พบว่า ความพึงพอใจในภาพรวม อยู่ในระดับมาก มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.02 คิดเป็นร้อยละ 80.42 พบว่าด้านเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ โดยมีค่าคะแนนเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 4.23 ซึ่งจะเห็นได้ว่าความเต็มใจในการให้บริการของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูงสุด และด้านเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ โดยมีค่าคะแนนเฉลี่ยน้อยที่สุด เท่ากับ 3.81 ซึ่งจะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการใช้งานเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ ในการให้บริการของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อน้อยสุด เนื่องจากเครื่องมือมีอายุใช้งานนานมากทำให้ประสิทธิภาพการใช้งานของเครื่องมือลดลง

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีวิธีดีไอสำหรับคำแนะนำในการใช้เครื่องมือ
2. ควรมีการจัดทำระเบียบข้อบังคับสำหรับมาใช้ห้องปฏิบัติการอย่างเคร่งครัด

บรรณานุกรม

- กรมส่งเสริมการเกษตร.2556.รายชื่อผู้ประกอบการผลิตพันธุ์พืชเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเชิงพาณิชย์. **กลุ่มงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนพัฒนาการเพาะเลี้ยงและจัดการพันธุ์พืช สำนักพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร.** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:[http://plantpro.doae.go.th/](http://plantpro.doae.go.th/TISSUE) (วันที่ค้นข้อมูล :15 ตุลาคม 2564).
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2556. ปัญหาและอุปสรรคที่พบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. **กลุ่มงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนพัฒนาการเพาะเลี้ยงและจัดการพันธุ์พืช สำนักพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร.** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: [http:// plantpro.doae.go.th/](http://plantpro.doae.go.th/TISSUE)TISSUE. (วันที่ค้นข้อมูล : 15 ตุลาคม 2564)
- ดร.ธราธร ทิระฐิติ.2559.**คู่มือส่งเสริมการเรียนรู้ด้านพืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ดอกไม้ประดับ.**ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค).
- ปรียาณัฐ หงษ์ทอง. 2564 **คู่มือปฏิบัติงานการดำเนินงานสำหรับห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.** คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.
- รังสฤษดิ์ กาวิตะ. 2540. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค.** ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ. 219 หน้า.
- สนธิชัย จันท์เปรม และ เสริมศิริ จันท์เปรม. 2549. **เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการเกษตร.** ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ. คณะเกษตร กำแพงแสน ร่วมกับศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม.
- ศิวพงษ์ จำรัสพันธุ์. 2546. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี.
- อภิชาติ ชิดบุรี. 2556. **หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์.** สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.

ภาคผนวก

แบบสำรวจความพึงพอใจของผู้ใช้บริการห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
หน่วยงาน : ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

คำชี้แจง : ขอความอนุเคราะห์ท่านในการตอบแบบสอบถามความพึงพอใจของผู้ใช้บริการ เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาปรับปรุงบริการของห้องปฏิบัติการ ซึ่งการตอบแบบสอบถามนี้จะไม่มีการระบุชื่อผู้ตอบแบบสอบถามใด ๆ ทั้งสิ้น ข้อมูลนี้จะถูกเก็บเป็นความลับเฉพาะ ขอความกรุณาตอบให้ตรงกับความเป็นจริงที่สุด

ส่วนที่ 1 : ข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถาม โปรดทำเครื่องหมาย ☒ ลงในช่อง

- 1) เพศ ☐ ชาย ☐ หญิง
- 2) อายุ ☐ น้อยกว่า 20 ปี ☐ 20 - 30 ปี ☐ 31 - 40 ปี ☐ 41 - 50 ปี ☐ 51 - 60 ปี ☐ มากกว่า 60 ปี
- 3) วุฒิการศึกษาสูงสุด ☐ ต่ำกว่าปริญญาตรี ☐ ปริญญาตรี ☐ ปริญญาโท ☐ ปริญญาเอก
- 4) ประเภทผู้ให้บริการ ☐ หน่วยงานภายนอก ☐ หน่วยงานภายในมหาวิทยาลัย
- 5) สถานภาพผู้ให้บริการ ☐ เอกชน ☐ ภาครัฐ/รัฐวิสาหกิจ ☐ บุคคลทั่วไป ☐ นักศึกษา ☐ อาจารย์/นักวิจัย ☐ บุคลากรสายปฏิบัติการ

ส่วนที่ 2 : คำถามเกี่ยวกับประเด็นที่ส่งผลต่อความพึงพอใจในการใช้บริการ

โดยทำเครื่องหมาย ☒ ในช่องระดับความพึงพอใจ ระดับความพึงพอใจ : 5 = มากที่สุด, 4 = มาก, 3 = ปานกลาง, 2 = น้อย และ 1 = น้อยที่สุด

ความพึงพอใจในการใช้บริการ	ระดับความพึงพอใจ				
	5	4	3	2	1
1. ด้านห้องปฏิบัติการ					
1.1 ความเป็นระเบียบของห้องปฏิบัติการ					
1.2 ความเพียงพอของพื้นที่ในการทำปฏิบัติการ					
1.3 การดูแลความปลอดภัยในการทำปฏิบัติการ					
1.4 ความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการ					
2. ด้านเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์					
2.1 ความเพียงพอ เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์					
2.2 ประสิทธิภาพในการใช้งาน					
2.3 ความสะดวกในการใช้งาน					
3. ด้านวัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ					
3.1 ความเพียงพอ วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี					
3.2 อุปกรณ์อยู่ในสภาพดี พร้อมใช้งาน					
3.3 ความเป็นระเบียบของสารเคมี					
4. ด้านเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ					
4.1 ความพร้อมในการเตรียมปฏิบัติการ					
4.2 ความเต็มใจในการให้บริการ					
4.3 ความสะดวกและรวดเร็วในการให้บริการ					
4.4 เจ้าหน้าที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์					

ส่วนที่ 3: ข้อคิดเห็น/เสนอแนะอื่น ๆ

.....

.....

.....

ขอบคุณที่กรุณาตอบแบบสอบถาม

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล นางสาวสมเพียร พักทอง
Miss Sompian Fagtong
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3670100751040
3. ตำแหน่งปัจจุบัน พนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏ
เพชรบูรณ์ 83 หมู่ 11 ตำบลสะเดียง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์
ไปรษณีย์ 67000 หมายเลขโทรศัพท์ 056-717122 ต่อ 2709 โทรสาร
056 – 717123 อีเล็กทรอนิกส์ (e-mail) mai_bio45@hotmail.com
5. ประวัติการศึกษา
ประถมศึกษา โรงเรียนบ้านนาป่า
มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนวิทยานุกูลนารี
มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนวิทยานุกูลนารี (วิทย์ – คณิต)
ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
มีความสามารถพิเศษด้านการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ขั้นสูงและการใช้
คอมพิวเตอร์ โปรแกรมมาตรฐาน และโปรแกรมด้านสถิติที่ใช้ในการ
วิจัย เช่น SPSS
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุ
สถานภาพในการ ทำการวิจัยว่าเป็นหัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย
 - 7.1 โครงการวิจัยเรื่องการขยายพันธุ์ดีปลากั้งโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยง
เนื้อเยื่อ ปี 2549 (ปริญญานิพนธ์)
 - 7.2 ผู้ช่วยวิจัยโครงการวิจัย เรื่องความหลากหลายชนิดของเห็ดไมคอร์ไรซา
และการเพาะเชื้อในห้องปฏิบัติการ ปีงบประมาณ 2557 (หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ดร.พวงผกา
แก้วกรม)

7.3 ผู้ร่วมการบูรณาการความรู้และภูมิปัญญาท้องถิ่นของสมุนไพรประจำถิ่น(ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559 หัวหน้าโครงการวิจัย อาจารย์สุรางค์รัตน์ พันแสง)

7.4 ผู้ร่วมโครงการวิจัย เรื่อง การหาทางอนุรักษ์ชนิดพันธุ์ปูน้ำจืด Potamidae ชนิดหายาก และการเพาะเลี้ยงนอกถิ่นกำเนิด (ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559 หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ดร.พวงผกา แก้วกรม)

7.5 ผู้ร่วมโครงการวิจัยเรื่องการทดสอบโคโตซานจากปูน้ำจืดเพื่อส่งเสริมการเจริญและควบคุมเชื้อโรคโคนเน่าของข้าวและพืชผัก (ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2560 โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาชุมชนและท้องถิ่น หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ดร.พวงผกา แก้วกรม)

7.6 ผู้ร่วมโครงการวิจัย เรื่อง การประเมินคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางภูมิคุ้มกันที่ได้จากสมุนไพรบางชนิดในหนู BALB/cMLac (ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2560 โครงการวิจัยเพื่อสร้างสะสมองค์ความรู้ที่มีศักยภาพ หัวหน้าโครงการวิจัย อาจารย์สุรางค์รัตน์ พันแสง)

7.7 ผู้ร่วมโครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของค้อ (Livistona sp.) เพื่อใช้ยับยั้ง Helicobacter pylori และการขยายพันธุ์โดยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2561 หัวหน้าโครงการวิจัย อาจารย์สุรางค์รัตน์ พันแสง)

7.8 ผู้ร่วมโครงการวิจัย เรื่อง การศึกษาสารประกอบในสมุนไพร Hiptage candicans Hook.f. และการใช้เพื่อลดพิษตกค้างของยาปฏิชีวนะ Dextacycline และ Enrofloxacin ในไก่เนื้อ (กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (กองทุน ววน.) งบประมาณปกติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2563 หัวหน้าโครงการวิจัย อาจารย์สุรางค์รัตน์ พันแสง)

7.9 ผู้ร่วมโครงการวิจัย เรื่อง การพัฒนานวัตกรรมและยกระดับมูลค่าผลิตภัณฑ์จากค้อ สำหรับผู้มีรายได้น้อยในอำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ (งบประมาณด้านวิจัยและนวัตกรรม ประเภท Fundamental Fund ประจำปีงบประมาณ 2565 หัวหน้าโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุรางค์รัตน์ พันแสง)

ประวัติผู้ร่วมโครงการ

1. ชื่อ - นามสกุล นางสาวแสงจันทร์ สอนสว่าง
Miss Sangjan Sonswang
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3670100389472
3. ตำแหน่งปัจจุบัน พนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่ง นักวิชาการศึกษา
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก
หลักสูตรสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ 83 หมู่ 11 ตำบลสะเดียง อำเภอ
เมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ ไปรษณีย์ 67000
หมายเลขโทรศัพท์ 056-717122 ต่อ 2709 โทรสาร 056 – 717123
อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) sangjanbio@hotmail.com
5. ประวัติการศึกษา
ประถมศึกษา โรงเรียนบ้านทุ่งหินปูน
มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนเพชรบูรณ์วิทยา (วิทย์ – คณิต)
มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเพชรบูรณ์วิทยา (วิทย์ – คณิต)
ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
มีความสามารถพิเศษด้านการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์และการใช้
คอมพิวเตอร์ โปรแกรมมาตรฐาน และโปรแกรมด้านสถิติที่ใช้ในการ
วิจัย เช่น SPSS
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุ
สถานภาพในการทำ การวิจัยว่าเป็นหัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย
 - 7.1 โครงการวิจัยเรื่อง เปรียบการเจริญเติบโตของรึ้นน้ำจืดในอาหาร
4 สูตร โดยการเพาะเลี้ยงในภาชนะแบบประยุกต์ ปี 2549 (ปริญญานิพนธ์)
 - 7.2 ผู้ช่วยวิจัยโครงการวิจัย เรื่องความหลากหลายชนิดของเห็ดไมคอร์ไรซา
และการเพาะเชื้อในห้องปฏิบัติการ ปีงบประมาณ 2557 (หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ดร.พวงผกา
แก้วกรม)

7.3 ผู้ร่วมการบูรณาการความรู้และภูมิปัญญาท้องถิ่นของสมุนไพรรักษาโรค (ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559 หัวหน้าโครงการวิจัย อาจารย์สุรางค์รัตน์ พันแสง)

7.4 ผู้ร่วมโครงการวิจัย เรื่อง การหาทางอนุรักษ์ชนิดพันธุ์ปูน้ำจืด Potamidae ชนิดหายาก และการเพาะเลี้ยงนอกถิ่นกำเนิด (ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559 หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ดร.พวงผกา แก้วกรม)

7.5 ผู้ร่วมโครงการวิจัยเรื่องการทดสอบโคโคซานจากปูน้ำจืดเพื่อส่งเสริมการเจริญและควบคุมเชื้อโรคโคนเน่าของข้าวและพืชผัก (ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2560 โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาชุมชนและท้องถิ่น หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ดร.พวงผกา แก้วกรม)

7.6 ผู้ร่วมโครงการวิจัย เรื่อง การประเมินคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางภูมิคุ้มกันที่ได้จากสมุนไพบบางชนิดในหนู BALB/cMLac (ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2560 โครงการวิจัยเพื่อสร้างสะสมองค์ความรู้ที่มีศักยภาพ หัวหน้าโครงการวิจัย อาจารย์สุรางค์รัตน์ พันแสง)

7.7 ผู้ร่วมโครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของค้อ (Livistona sp.) เพื่อใช้ยับยั้ง Helicobacter pylori และการขยายพันธุ์โดยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2561 หัวหน้าโครงการวิจัย อาจารย์สุรางค์รัตน์ พันแสง)