



บทที่ 2

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ

การผลิตต้นกล้วยไม้โดยวิธีเพาะ เมล็ดและ เพาะ เลี้ยง เนื้อ เยื่อ

กล้วยไม้เป็นพืชตระกูลใหญ่ ประกอบด้วยกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ หลายสกุล เช่น กล้วยไม้สกุลหวาย สกุลแวนดา สกุลแคทลียา สกุลแมลงปอ สกุลฟาแลนนอปซิส และสกุลออนซิเดียม เป็นต้น กล้วยไม้แต่ละสกุลยังแบ่งออกเป็นชนิดได้อีกมากมายหลายชนิด เช่น กล้วยไม้สกุลหวาย แบ่งออกเป็นชนิดต่าง ๆ ตามลักษณะของสีดอก คือ พันธุ์หวายขาว หวายชมพู และหวายเหลือง เป็นต้น พันธุ์กล้วยไม้ที่สามารถขยายพันธุ์ได้โดยวิธีเพาะ เมล็ดและ เพาะ เลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายพันธุ์ได้แก่ สกุลหวาย สกุลแวนดา สกุลออนซิเดียม และสกุลอะแวนดา เป็นต้น ซึ่งสามารถขยายพันธุ์ได้เป็นจำนวนมาก ในเวลาไม่นานนัก การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยวิธีนี้เป็นขั้นตอนแรกของการผลิตต้นกล้วยไม้โดยเพาะ เลี้ยงจนได้ลูกกล้วยไม้แล้วขายให้ผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ต่อไปเลี้ยงจนกระทั่งได้เป็นไม้รุ่นและตัดดอกขายต่อไป

เนื่องจากการผลิตต้นกล้วยไม้จากวิธีทั้งสองดังกล่าวข้างต้น สามารถขยายพันธุ์ได้เป็นจำนวนมากในเวลาไม่นานนัก ดังนั้นจึงช่วยลดต้นทุนการผลิตให้แก่ผู้ปลูกเลี้ยงได้ค่อนข้างมาก ซึ่งในอนาคต ถ้าได้มีการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้พันธุ์ที่ตลาดต่างประเทศต้องการแล้ว การผลิตลูกกล้วยไม้เพื่อการค้านี้จะสามารถทำรายได้ให้แก่ประเทศได้เช่นเดียวกับการผลิตกล้วยไม้ตัดดอกเพื่อการค้าความที่ทราบกันอยู่ทั่วไป

การขยายพันธุ์กล้วยไม้

การขยายพันธุ์กล้วยไม้ เป็น เรื่องที่มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ผู้เลี้ยงกล้วยไม้จะต้องมีความรู้ดีพอสมควร ความสำคัญของการขยายพันธุ์กล้วยไม้มี 3 ประการ คือ

1. การเพิ่มปริมาณ ซึ่งเป็น เป้าหมายหลักของการขยายพันธุ์
2. การเพิ่มกล้วยไม้พันธุ์ใหม่ ๆ แปลก ๆ โดยใช้เทคนิคการขยายพันธุ์มาช่วย เช่นการเพาะ เมล็ด จะช่วยให้วงการกล้วยไม้ได้กล้วยไม้ที่มีคุณลักษณะพิเศษมาปลูกเลี้ยงกัน

3. รักษาไว้ซึ่งความแข็งแรงของต้นพันธุ์ เนื่องจากกล้วยไม้ที่เจริญเต็มที่แล้ว ก็จะเริ่มลดความแข็งแรง จึงต้องมีการขยายพันธุ์เพื่อให้มีการต้นตัว และแข็งแรงอยู่เสมอ

การขยายพันธุ์กล้วยไม้ แบ่งเป็น 2 วิธี คือ

1. การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยการผสม เกสรหรือการ เพาะ เมล็ด
2. การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยไม่มีการผสม เกสร เช่นการ เพาะ เลี้ยง เนื้อ เยื่อ

การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยการผสม เกสรหรือการ เพาะ เมล็ด (Orchid Seed Culture)

วัตถุประสงค์ของการขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะ เมล็ด มีอยู่ 3 ประการคือ

1. ต้องการเพิ่มปริมาณของกล้วยไม้ให้มากขึ้น เนื่องจากในฝักของกล้วยไม้ ฝักหนึ่ง ๆ นั้นจะมีเมล็ดอยู่มากมาย เมื่อนำเมล็ดไปเพาะก็จะได้ต้นกล้วยไม้ตามปริมาณที่ต้องการ การขยายพันธุ์วิธีนี้คุณภาพอาจจะ เปลี่ยนแปลงไปบ้างแต่ไม่มากนัก

2. ต้องการจะ เปลี่ยนคุณลักษณะของกล้วยไม้ เนื่องจากกล้วยไม้แต่ละชนิดมีลักษณะ ของดอก กลีบดอก สี และช่อดอกไม่เหมือนกัน แม้แต่กล้วยไม้สกุลเดียวกันในแต่ละต้นก็ยังมี ส่วนที่ดีและไม่ดี ผู้ขยายพันธุ์จึงต้องการ เปลี่ยนแปลงคุณลักษณะให้ดีขึ้น โดย เลือก เฉพาะด้านพันธุ์ ที่ดีมาผสมกัน

3. ต้องการจะได้ดอกที่มีลักษณะแตกต่างกันไป ตามความต้องการของตลาดหรือ ต้องการพันธุ์กล้วยไม้ใหม่ ๆ

การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยไม่มีการผสม เกสร เช่นการ เพาะ เลี้ยง เนื้อ เยื่อ (Orchid Tissue Culture)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue Culture) คือการนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของ พืชไม่ว่าจะเป็นอวัยวะ (Organ) ของพืช เนื้อเยื่อ (Tissue) เซล (Cell) หรือ เซลที่ไม่มี ผนังเซลล์ที่เรียกว่าโปรโตพลาส (Protoplast) มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ (synthetic media) ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ เกลือ น้ำตาล ไรโบฟลาวิน และฮอร์โมนพืช ในสภาพปลอดเชื้อ (Aseptic condition) จากเชื้อรา แบคทีเรีย และสาหร่าย และในสภาพ

แวดล้อมที่ควบคุมได้ เช่น อุณหภูมิ ความชื้นและแสงสว่าง ขึ้นส่วนของพืชเหล่านี้จะเจริญได้ 3 แบบ ดังนี้

1. เจริญเป็นต้นที่มีรากหรือบางทีก็มีดอก เรียกว่า เกิด Organogenesis
2. เจริญเป็นแคลลัส (Callus) ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ ส่วนใหญ่จะเป็นเซลล์ที่ยังไม่เปลี่ยนแปลงเป็นต้นหรือราก (Parenchyma cell) แต่ก็สามารถจะทำให้เกิดเป็นต้นได้
3. เจริญไปเป็น embryoid ซึ่งมีลักษณะเหมือนต้นอ่อน (embryo) ที่ได้จาก Zygote ซึ่งเรียกว่าต้นอ่อนระยะแรก (Zygotic embryo) แต่ embryoid ได้มาจาก somatic cell ซึ่งอาจเรียกว่าเป็น somatic embryo ซึ่งจะเจริญเติบโตเป็นต้นที่มีรากต่อไป

ในทางทฤษฎีเนื้อเยื่อทุกชนิดของพืชสามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้สำเร็จ แต่ในทางปฏิบัติความสำเร็จของการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดมีไม่เท่ากันและบางเนื้อเยื่อไม่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้สำเร็จได้เลย เพราะในบางครั้งเนื้อเยื่อที่จะใช้จะต้องเฉพาะเจาะจง ซึ่งไม่สามารถใช้เนื้อเยื่อชนิดอื่น ๆ แทนได้ เพื่อให้ได้ผลตามที่ต้องการ เช่น ต้องการพืชที่มีจำนวนโครโมโซม (Chromosome number) เพียงชุดเดียว (Hyploid plant) จะเสี่ยงจากปลายยอดหรือปลายราก ซึ่งเป็นอวัยวะพืช (Organ) ไม่ได้ เป็นต้น

วัตถุประสงค์และประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นจะให้ประโยชน์ต่าง ๆ กันขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยง ดังนี้คือ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายสายพันธุ์ (Tissue Selection for Clonal Preparation by Tissue Culture) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชให้ได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว และได้ต้นที่เหมือนพ่อแม่พันธุ์เดิม ดังนั้นเมื่อนำไปประยุกต์ในทางการค้าจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากการขยายพันธุ์โดยวิธีนี้ ทำให้ได้ต้นใหม่ที่มีคุณภาพเหมือนเดิมและปริมาณมากในช่วงเวลาอันสั้น
2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์ (Tissue Selection for Crop Improvement by tissue culture) เช่น ทำการเพาะละอองเกสร หรือ อับละอองเกสรของพืชแล้วควบคุมโดยการใส่สาร colchicine เพื่อให้ได้เป็นต้นพันธุ์แท้ (homozygous disloid)



ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป

3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตต้นที่ปราศจากโรค (Apparent Disease-Free Plant Production by Tissue Culture) วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นการที่จะทำให้พืชปราศจากเชื้อโรค เพราะต้องมีการใช้ความร้อน (heat treatment) ช่วยโดยการปลูกในอุณหภูมิสูง คือประมาณ 30-40 °C. เป็นระยะเวลาประมาณ 2-4 อาทิตย์ เพื่อให้พืชมีการเจริญเติบโตทางด้านความสูง ขณะเดียวกันอุณหภูมิสูงนี้จะไปชะงักการเจริญของเชื้อโรคซึ่งจะทำให้ได้พันธุ์ที่แข็งแรง และไม่เป็นโรค

4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเก็บรักษาพันธุ์ (Germ-Plasm Preservation by Tissue Culture) ในการเก็บรักษาพันธุ์พืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอยู่ 2 แบบด้วยกัน คือ การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหรือต้นพืชในหลอดแก้ว โดยให้มีการเติบโตน้อยที่สุดเพื่อจะเก็บรักษาพันธุ์ให้นานที่สุดและโดยการเก็บรักษาเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิต่ำ เช่นในไนโตรเจนเหลว ซึ่งมีอุณหภูมิต่ำถึง -196 °C. การเก็บรักษาพันธุ์โดยวิธีทั้ง 2 อาจจะมุ่งประโยชน์เพื่อใช้ในการเก็บรักษาพันธุ์เพื่อแลกเปลี่ยนกับต่างประเทศได้สะดวกกว่าเมล็ดหรือส่วนอื่น ๆ ของพืช เพราะสะดวกปราศจากโรคอยู่แล้ว

นอกจากนั้นแล้ว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังเป็นวิธีการรวบรวมพันธุ์ ซึ่งใช้เนื้อที่ไม่มากและสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ง่าย และสะดวกกว่าการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติ

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนำมาใช้เพาะเลี้ยงพืชหลายประเภทและก่อให้เกิดประโยชน์มากมายหลายด้าน เช่น ทางด้านเภสัชกรรมใช้ในการผลิตพืชสมุนไพรให้มีสารตัวยา มากกว่าสมุนไพรตามธรรมชาติ ทางด้านเกษตรกรรมทำให้ได้ผลผลิตสูงกว่าและเหมาะสมกับพืชเศรษฐกิจแทบทุกชนิด ทั้งพืชไร่ พืชนา ได้แก่ ข้าว อ้อย เป็นต้น และพืชสวน ได้แก่ ไม้ดอก ไม้ประดับ ไม้ผล และพืชผักต่าง ๆ เป็นต้น ตลอดจนไม้ใหญ่ ๆ ที่ใช้ทางด้านป่าไม้ ก็ทำได้สำเร็จเช่นกัน

ในการเพาะเมล็ดและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้มีขั้นตอนที่สำคัญได้เป็น

3 ส่วน คือ

1. สถานที่และอุปกรณ์ในการ เพาะ เมล็ดและ เพาะ เลี้ยง เนื้อ เยื่อ
2. สารอาหารที่ใช้ในการ เพาะ เมล็ดและ เพาะ เลี้ยง เนื้อ เยื่อ
3. กรรมวิธีการผลิตต้นกล้วยไม้โดยวิธีเพาะ เมล็ดและ เพาะ เลี้ยง เนื้อ เยื่อ

สถานที่และอุปกรณ์ในการ เพาะ เมล็ดและ เพาะ เลี้ยง เนื้อ เยื่อกล้วยไม้

(Rooms and Equipments for Orchid Seed Culture and Orchid Tissue Culture)

สถานที่หรือห้องที่ใช้สำหรับการ เพาะ เมล็ดและ เพาะ เลี้ยง เนื้อ เยื่อสำหรับกล้วยไม้
แบ่งออกเป็น 3 ส่วนใหญ่ดังนี้คือ¹

1. ห้องเตรียมอาหารและเครื่องมือ (Medium and Equipment Prepared Room)
2. ห้องย้ายเนื้อเยื่อ (Transferring Room)
3. ห้องเพาะ เมล็ด และห้องเลี้ยง เนื้อ เยื่อ (Incubated Room)

1. ห้องเตรียมอาหารและเครื่องมือ (Medium and Equipment Prepared Room)

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.1.1 เครื่องชั่ง (Balances) ซึ่งสามารถชั่งละเอียด เป็นกรัมและ

มิลลิกรัม

- 1.1.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH metre)

1.1.3 หม้อนึ่ง (Autoclave) ใช้สำหรับนึ่งฆ่าเชื้อโรคในอาหารและ
เครื่องมือ หม้อนึ่งอาจจะ เป็นแบบอัตโนมัติ หรือไม้อัตโนมัติ ซึ่งอาจจะใช้ไฟฟ้าหรือแก๊สก็ได้
แต่จำเป็นต้องมีถังแก๊ส และเตาเป็นองค์ประกอบด้วย

1.1.4 เตาไฟฟ้า (Heating plate) ใช้สำหรับผสมส่วนประกอบ
อาหารให้เข้ากันและใช้สำหรับให้ความร้อนในการละลายวุ้น

¹ ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. หลักและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ชมทาง เกษตร พ.ศ. 2524)



1.1.5 สารเคมีต่าง ๆ ได้แก่

- สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสารอาหาร
- สารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อโรค ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์
- วุ้น
- สารเคมีที่เร่งการเจริญเติบโต เช่น ออกซิน (Auxin)

และไซโตคินิน (Cytokinin)

- เมอคิวริกคลอไรด์ ละลายน้ำ เพื่อทำน้ำยาเคลือบจุก
- น้ำตาลซูโครส

1.1.6 เครื่องแก้ว ได้แก่

10 มิลลิลิตร

- ปิเปตส์ (Pipets) ขนาดต่าง ๆ เช่น 1, 2, 3, 5 และ

มิลลิลิตร

- ไซลินเดอร์ (Cylinders) ขนาด 10, 20, 50 และ 100

1,000 มิลลิลิตร

- บีกเกอร์ (Beakers) ขนาด 50, 100, 300, 500 และ

มิลลิลิตร

- ฟลาสก์ (Flasks) ขนาด 50, 125, 250 และ 500

1,000 มิลลิลิตร

- ขวดใส่สารละลายเข้มข้น (Stock solution) 500 และ

- หลอดหยด (dropper)

- กรวย (Funnel)

- ขวดเพาะกล้วยไม้

1.1.7 อุปกรณ์อื่น ๆ

- สำลือหรือจุกยาง หรือ Aluminum foil
- กระจกแก้วสำหรับชั่งสารเคมี
- ข้อนตักสารเคมี
- กระจกเยื่อ
- มีดและกรรไกร
- อ่างน้ำ (Sink)

1.2 การจัดบริเวณ

การจัดบริเวณในส่วนห้องเตรียมอาหารและเครื่องมือนั้นมีการแบ่งบริเวณออกเป็นสัดส่วน เช่น สารเคมีควรอยู่ในตู้หรือบนชั้นวางของที่จัดเป็นระเบียบเรียงตามอักษรของสารเคมีหรือหมู่ของสารเคมีและควรวางอยู่ไกลกับเครื่องชั่ง เครื่องชั่งจัดวางอยู่บนโต๊ะที่แข็งแรงไม่สั่นสะเทือนได้ง่าย เครื่องแก้วและเครื่องมือ มีที่เก็บมีคชิต แบ่งออกเป็นพวกและไม่ห่างไกลจากอ่างน้ำ

2. ห้องย้ายเนื้อเยื่อ (Transferring Room)

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Transferring hood) เป็นตู้ที่มีเนื้อที่การทำงานมากพอสมควร ภายในตู้มีหลอดไฟฟ้าให้แสงสว่าง และมีหลอด UV. ติดไว้เพื่อฆ่าเชื้อโรคในตู้ด้วย

2.1.2 มีดผ่าตัด (Surgeon Knife) ตะเกียงแอลกอฮอล์ และปากคีบ

2.1.3 เครื่องปรับอากาศ และพัดลมดูดอากาศ (Air conditioner and exhaust fan)

2.2 การจัดบริเวณ

ภายในห้องย้ายเนื้อเยื่อจัดเป็นห้องโล่ง ทำความสะอาดง่าย ตู้ย้ายเนื้อเยื่อหันทิศทางไปตามการพัดของเครื่องปรับอากาศ

3. ห้อง เพาะ เมล็ดและห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Incubated Room)

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องปรับอากาศ (Airconditioner)

3.1.2 ไฟฟ้า ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟ้าชนิดฟลูออเรสเซนต์

โดยจัดให้มีความเข้มของแสงประมาณ 100-200 กำลังเทียน และควรให้แสงสว่าง 16 ชม.ต่อวัน

3.1.3 เครื่องเขย่า (Shaker) สำหรับการ เพาะ เลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในกรณีที่เลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลว เครื่องเขย่าจะหมุนประมาณ 100-160 รอบ/นาที

3.1.4 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Termostat) โดยจัดให้มีอุณหภูมิคงที่

ประมาณ 25°ซ.

3.1.5 เครื่องควบคุมความชื้น โดยจัดให้มีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 60%

3.2 การจัดบริเวณแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ

3.2.1 บริเวณเพาะเมล็ดและเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มต้น ควรอยู่ในห้องแอร์ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิแสงและความชื้นได้

3.2.2 บริเวณเพาะเมล็ดและเลี้ยงเนื้อเยื่อขั้นสุดท้ายก่อนส่งมอบให้ลูกค้า จะเลี้ยงในเรือนเพาะชำซึ่งได้รับแสงสว่าง อุณหภูมิ และความชื้นปกติ เหมือนการปลูกเลี้ยงต้นกล้วยไม้ ซึ่งเรียกว่าโรงไม้ขวด

สารอาหารที่ใช้ในการเพาะเมล็ดและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Medium for seed culture and tissue culture)

1. องค์ประกอบของอาหาร

อาหารที่ใช้เลี้ยงมีหลายสูตร สูตรอาหารต่าง ๆ จะมีชื่อเรียกตามผู้ที่ค้นคิด เช่น สูตรอาหารของ Knudson ก็เป็นสูตรอาหารที่ Knudson คิดค้นขึ้นเพื่อใช้ในการเพาะ เมล็ดกล้วยไม้ ซึ่งสูตรอาหารต่าง ๆ ส่วนใหญ่ จะประกอบด้วย

1.1 สารพวกอนินทรีย์ (Inorganic salts) เช่น ออกซิเจน (O), ไนโตรเจน (N), ฟอสฟอรัส (P), โพแทสเซียม (K), แคลเซียม (Ca), แมกนีเซียม (Mg) ไฮโดรเจน (H) ฯลฯ การใช้ธาตุเหล่านี้จะใช้ในรูปสารประกอบต่าง ๆ เช่น โพแทสเซียมไนเตรด (KNO_3) เป็นต้น

1.2 สารอินทรีย์ (Organic salts) ได้แก่ สารที่มีองค์ประกอบของ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน แบ่งเป็นหลายพวก คือ

- น้ำตาล (Sugar) ได้แก่ น้ำตาลซูโคส กลูโคส และฟรุคโตส
- วิตามิน (Vitamins) โดยมากมักใช้วิตามินบี วิตามินที่ไข่มุก ได้แก่ ไทอามีน (thiamine) และไนอาซิน (niacine)
- สารเร่งการเจริญเติบโต (Growth regulators) ได้แก่ ออกซิน (auxins) และไซโตไคนิน (Cytokinins)
- กรดอะมิโน (Amino acid) ตัวที่นิยมมากได้แก่ ไกลซีน (glycine)
- สารอินทรีย์อื่น ๆ สารเหล่านี้ส่วนใหญ่ได้จากผลิตภัณฑ์ของพืช เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน มันฝรั่ง และกล้วย

2. สูตรอาหาร

การเตรียมอาหารจะเตรียมในลักษณะเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นมาก ๆ (Stock Solution) เป็นหลายเท่าของความเข้มข้นที่จะใช้จริงในสูตรก่อนแล้วนำมาทำให้เจือจางเท่าที่ต้องการภายหลังสูตรอาหารที่นิยมใช้กันสำหรับการเพาะเมล็ด เป็นสูตร Vacin & Went ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

สูตรอาหาร Vacin & Went² ต่อ 1 ลิตร

สูตรสารเคมี	ชื่อสารเคมี	ปริมาณสารเคมีที่ใช้ ในอาหาร 1 ลิตร (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสาร เคมีที่ใช้ใน Stock 1 ลิตร (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ Stock ที่ใช้เพื่อเตรียม อาหาร 1 ลิตร (มล.)
KNO_3	โปแตสเซียมไนเตรท	0.525	5.25	} stock solution A 10
KH_2PO_4	โมโนโปแตสเซียมแอสเฟอเฟต	0.25	2.50	
$(NH_4)_2SO_4$	แอมโมเนียมซัลเฟต	0.50	5.00	
$MnSO_4$	แมงกานีสซัลเฟต	0.0075	0.075	
$MgSO_4$	แมกนีเซียมซัลเฟต	0.25	2.5	} stock solution B 10
$Fe_2(C_4H_4O_6)_3 \cdot 3H_2O$	เฟอร์ริกตาเตรท	0.50	5.00	
$(C_{12}H_{21}O_{12})_2$	น้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทราย)	20.00		
	วุ้น	16.00		
	น้ำกลั่นเติมให้ครบ	1000 มิลลิลิตร		

สูตรอาหาร Vacin & Went ในทางปฏิบัติมีการใช้น้ำมะพร้าวอ่อนเพิ่มในวุ้นอาหารสำหรับเพาะเมล็ดและใช้น้ำมะพร้าวอ่อน น้ำสกัดมันฝรั่งและกล้วยหอมเพิ่มเข้าไปในวุ้นอาหารสำหรับถ่ายขวด

² ไทบูลย์ ไทริท่ายฤทธิ. คำวากด้วยไม้สำหรับผู้เริ่มเล่น (ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคล อาหารการพิมพ์ พ.ศ. 2521) หน้า 190-191.



กรรมวิธีการผลิตต้นกล้วยไม้โดยวิธีเพาะเมล็ดและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กรรมวิธีการผลิตต้นกล้วยไม้โดยวิธีเพาะเมล็ด

กรรมวิธีการผลิตต้นกล้วยไม้โดยวิธีเพาะเมล็ด แบ่ง เป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. การเตรียมฐานอาหาร
2. การหว่าน เมล็ดลงในขวดเพาะ
3. การเลี้ยงในห้อง เพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ
4. การเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้ในโรงไม้ขวด

1. การเตรียมฐานอาหาร

การเตรียมฐานอาหาร เพื่อที่จะใช้สำหรับเพาะ เมล็ดกระทำโดยใช้สารละลายเข้มข้น A (stock solution A) 100 มิลลิลิตร สารละลายเข้มข้น B (stock solution B) 100 มิลลิลิตร สารละลายเข้มข้น C (stock solution C) 5 มิลลิลิตร ใส่โคโรแคลเซียม ฟอสเฟต 0.20 กรัม ที่ละลายด้วยกรดเกลือ ความเข้มข้น 1 normal แล้วเติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร เติมน้ำตาล 20 กรัม เติมน้ำสกัดมันฝรั่งและเติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรดและด่าง (pH) ให้ได้ 4.8-5 แล้วเติมน้ำ 8.5 กรัม คัมजनุนละลายหมด ใส่กล้วยหอม ที่บดละเอียดแล้วจำนวน 1/2 ผล จากนั้นจึงเทลงในขวดเพาะสูงประมาณ 10 นิ้ว ตามแนวนอน แล้วปิดจุก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโรคด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นจนจุนแข็ง จึงนำไปเพาะเมล็ดได้

2. การหว่าน เมล็ดลงในขวดเพาะ

ฝักกล้วยไม้ที่ต้องการเพาะ เมล็ดจะนำมาเปิดฝัก โดยใช้ปากคีบและมีดที่ลมนไฟฆ่าเชื้อโรค แล้ว ซึ่งภายในฝักจะมีเมล็ดกล้วยไม้จำนวนนับแสน ๆ เมล็ด นำเมล็ดใส่ในขวดน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นจึงทำการหว่าน เมล็ดในเข้าไปในขวดเพาะ โดยใช้หลอดหยดดูดเมล็ดพันธุ์เข้าไปในขวดเพาะซึ่งมีฐานอาหารที่เตรียมไว้แล้วในขั้นตอนที่ 1 การดูดเมล็ดพันธุ์เข้าไปในขวดเพาะจะพ่นเข้าไปขวดละประมาณ 3-4 มิลลิลิตร จากนั้นจึงปิดจุกขวดเพาะให้แน่นด้วยจุกยางแล้ว เคลือบจุกยางอีกครั้งหนึ่งด้วยน้ำยาเคลือบจุก

3. การเลี้ยงในท้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ

ขวดเพาะที่ได้หว่าน เมล็ดกล้วยไม้แล้วจะนำไปเลี้ยงในท้องเพาะ เมล็ดซึ่งควบคุมอุณหภูมิ ประมาณ 25°ซ. เป็นเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ถ้าเมล็ดงอกจะมองเห็น เป็นสีเหลือง ๆ พองขึ้นมา การเลี้ยงในท้องเพาะ เมล็ดที่ควบคุมอุณหภูมินี้จะใช้เวลาประมาณ 2 เดือน

4. การเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้ในโรงไม้ขวด

ขวดเพาะในชั้นตอนที่ 3 จะนำออกมาเลี้ยงในท้องเพาะเลี้ยงใหม่ที่เรียกว่า โรงไม้ขวด ซึ่งมีการจัดบริเวณเหมือนเรือนเลี้ยงกล้วยไม้ทั่วไป ในโรงไม้ขวดนี้ต้นอ่อนในขวดเพาะจะได้รับแสงแดดและอุณหภูมิปกติ ประมาณ 1 เดือนจะเกิดใบและรากให้เห็นชัด เจนสูงประมาณ 1 นิ้ว จากนั้นก็จะนำเอาขวดเพาะที่มีลูกกล้วยไม้จำนวนมากมาในขวดมาทำการถ่ายขวด เพื่อย้ายลงสู่ขวดเพาะใหม่ที่มีวัสดุอาหารใหม่ แต่เป็นสูตรเดียวกันกับการเพาะ การถ่ายขวดเพาะใหม่จะใส่ลูกกล้วยไม้เรียงเป็นแถว 3 แถว ขวดละประมาณ 50 ต้น จากนั้นจึงนำกลับไปเลี้ยงในโรงไม้ขวดเช่นเดิมอีกประมาณ 3-4 เดือน ก็จะได้ลูกกล้วยไม้ที่มีขนาดสูงประมาณ 2 นิ้ว พร้อมทั้งส่งขายให้ลูกค้า

กรรมวิธีการผลิตกล้วยไม้โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (การบ่มตากกล้วยไม้)

กรรมวิธีการผลิตต้นกล้วยไม้โดยวิธีเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน คือ

1. การเตรียมสารอาหารและน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ
2. การเตรียมเนื้อเยื่อและย้ายเนื้อเยื่อเพื่อนำมาเพาะเลี้ยง
3. การเลี้ยงเนื้อเยื่อจนเป็นต้นอ่อน
4. การเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้จนเป็นลูกกล้วยไม้

1. การเตรียมสารอาหารและน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ

1.1 การเตรียมสารอาหาร การเตรียมสารอาหารแบ่งเป็น

1.1.1 การเตรียมอาหารเหลว

ใช้สารละลายเข้มข้น A (Stock solution A) 100 มิลลิลิตร สารละลายเข้มข้น B (Stock solution B) 100 มิลลิลิตร สารละลายเข้มข้น C (Stock solution C) 5 มิลลิลิตร ไตรแคลเซียมฟอสเฟต 0.20 กรัมที่ละลายด้วยกรดเกลือ ความเข้มข้น 1 normal เติมน้ำมะพร้าวลงไป 100 มิลลิลิตร เติมน้ำตาล 20 กรัมแล้วเติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรดและด่างให้ได้ 4.8-5 จะได้สารอาหารเหลวใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เทสารอาหารที่โคลงในขวดแก้ว (Flasks) ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 125 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโรคด้วยหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 120 °C ประมาณ 15 นาที

1.1.2 การเตรียมวุ้นอาหาร

วุ้นอาหารแบ่งเป็น 2 ชนิด ชนิดแรกมีสีขาวใช้ในการเพาะเนื้อเยื่อที่ได้ในระยะแรก ชนิดที่ 2 เป็นวุ้นอาหารที่มีสีดำใช้สำหรับเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้

ขั้นตอนการเตรียมวุ้นอาหารมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเหลว แต่เมื่อหลังจากปรับความเป็นกรดและด่างให้ได้ 4.8-5 แล้ว เติมน้ำจำนวน 8 กรัม ต้มจนวุ้นละลายหมดจะได้วุ้นอาหารสีขาวที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ ถ้าต้องการวุ้นอาหารสีดำก็ให้เติมผงถ่านลงไป เทวุ้นอาหารที่โคลงในขวดเพาะสีเหลืองตามแนวนอนแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโรคแล้วทิ้งไว้จนเย็นเมื่อวุ้นแข็งจึงนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยง

1.2 การเตรียมน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ การเตรียมน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อแบ่งเป็น

1.2.1 การเตรียมเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ได้จากการใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 70 มิลลิลิตร เติมน้ำ 25 มิลลิลิตร

1.2.2 การเตรียมคลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ได้จากการใช้น้ำ 90 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อโรคไว้ก่อน เมื่อจะใช้ก็เติมคลอโรกซ์ 10 มิลลิลิตร และสารเปียกโชก เช่น Tween-20 1-2 หยด

1.2.3 การเตรียมคลอโร็กซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ ได้จากการใช้น้ำ 95 มิลลิลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อโรคไว้ก่อนเมื่อจะใช้ก็เติมคลอโร็กซ์ 5 มิลลิลิตร และสารเปียกใบ 1-2 หยด

2. การเตรียมเนื้อเยื่อและย้ายเนื้อเยื่อเพื่อนำมาเพาะเลี้ยง

2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อ

พ่นกล้วยไม้ที่ต้องการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะนำมาทำความสะอาดด้วยน้ำและ
ชุบล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงลอกใบและกาบออกเพื่อให้เห็นคาแล้วฟอก
ด้วยน้ำยาคลอโร็กซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 15 นาทีและลอกเอาส่วนที่ไม่ต้องการออกอีกแล้ว
ฟอกด้วยน้ำยาคลอโร็กซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปล้างน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ
โรคแล้ว

2.2 การย้ายเนื้อเยื่อ

ขั้นตอนในการย้ายเนื้อเยื่อนี้จะต้องทำในตู้ย้ายเนื้อเยื่อเพื่อป้องกันเชื้อโรค
โดยนำหน่อที่ได้ทำความสะอาดแล้วในชั้นเตรียมเนื้อเยื่อมาตัดจุดเจริญ คือ ตายอดและตาข้าง
โดยใช้มีดสะอาดที่ชุบแอลกอฮอล์ลงไฟตัดลงบนจานแก้วเพาะเชื้อ จากนั้นจึงใช้ปากคีบที่ชุบ
แอลกอฮอล์ลงไฟแล้ว คีบตาที่ตัดได้จากจานเพาะเชื้อใส่ลงในขวดแก้ว (Flasks) ขนาด 50
มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวไว้แล้วในขั้นตอนที่ 1 เสร็จแล้วจึงปิดปากขวดแก้วด้วยจุกยางหรือฟอยล์
แล้วนำไปเพาะในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในชั้นที่ 3

3. การเลี้ยงเนื้อเยื่อจนได้ต้นอ่อน

3.1 การเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (Shaker)

ขวดอาหารที่บรรจุตาหรือเนื้อเยื่อจุดเจริญในขั้นตอนที่ 2 จะนำมาวางบนเครื่อง
เขย่า โดยเครื่องเขย่านี้จะเขย่าอยู่ตลอดเวลาประมาณ 120 รอบ/นาที เพื่อให้เนื้อเยื่อเกิด
การแบ่งตัว การเลี้ยงบนเครื่องเขย่านี้จะใช้เวลาประมาณ 5-6 เดือน และต้องเปลี่ยนสารอาหาร
ทุกระยะ โดยเฉลี่ยแล้วประมาณ 7 วันต่อครั้ง โดยจะ เริ่มเปลี่ยนสารอาหารครั้งแรกเมื่อเลี้ยงบน

เครื่องเขย้านี้ได้ประมาณ 1-2 เดือน

หลังจาก 2-3 เดือนบนเครื่องเขย่า จะพบว่า เนื้อเยื่อจะแบ่ง เซลล์จำนวนมาก ในระยะนี้เป็นระยะที่เรียกว่า ระยะที่ได้โปรโตคอม (Protocom) เมื่อเลี้ยงต่อไปจะได้โปรโตคอมจำนวนมากมาย จึงต้องทำการถ่ายใส่ขวดแล้วขนาดใหญ่กว่าเดิม คือขนาด 125 มิลลิลิตร และเปลี่ยนสารอาหารทุก ๆ 10 วัน

3.2 การเลี้ยงโปรโตคอมในขวดเพาะ

หลังจากมีการถ่ายโปรโตคอมลงสู่ขวดแก้วขนาด 125 มิลลิลิตรแล้ว เลี้ยงบนเครื่องเขย่าอีกประมาณ 2-3 เดือน จึงนำเอาโปรโตคอมมาถ่ายลงสู่ขวดเพาะสี่เหลี่ยมขนาดความสูงประมาณ 10 นิ้ว โดยเรียงตามแนวนอนของขวด ภายในขวดจะมีอาหารสีขาวบรรจุอยู่แล้วตามชั้นคอนที่ 1 การเลี้ยงในชั้นคอนนี้จะวาง เรียงบนชั้น เหล็กภายในห้อง เพาะ เลี้ยง ที่ควบคุมอุณหภูมิ เช่นเดียวกับคอนที่เลี้ยงบน เครื่องเขย่า การเลี้ยงในระยะนี้จะใช้เวลาประมาณ 2-3 เดือน ซึ่งในชั้นคอนนี้เป็นชั้นคอนที่ต้องการให้กล้วยไม้มีการเจริญเป็นต้นอ่อน โดยไม่ต้องมีการให้มีการแบ่งตัวต่อไปอีก จึงไม่นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า เพราะการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าจะทำให้เซลล์เกิดการแบ่งตัว แต่อาจจะมีโปรโตคอมบางส่วน ยังคงเลี้ยงอยู่บนเครื่องเขย่าอีก เพื่อต้องการให้แบ่ง เซลล์จนกว่าจะได้จำนวนที่ต้องการจะผลิต จึงจะหยุดเลี้ยงบนเครื่องเขย่า แล้วถ่ายลงสู่ขวดเพาะหมด

3.3 การเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้ในขวดเพาะใหม่

โปรโตคอมจะเจริญเติบโตเป็นใบเล็ก ๆ สีเขียวในเวลา 2-3 เดือน ซึ่งในชั้นคอนนี้จะถ่ายลงสู่ขวดเพาะใหม่ขนาดเท่าเดิม แต่เปลี่ยนสารอาหารใหม่เป็นวันสีดำ การเปลี่ยนขวดนี้ จะเรียกว่า การเปลี่ยนไม้ ต้นอ่อนที่ถ่ายใส่ขวดเพาะใหม่แล้วจะนำไปเลี้ยงในห้องเพาะ เลี้ยงอีก ส่วนหนึ่งที่ควบคุมอุณหภูมิใหม่ประมาณ 25° ซ. ในชั้นนี้จะไม่มีการเปลี่ยนวันอาหารอีก การเลี้ยงในระยะนี้จะใช้เวลาอีกประมาณ 2 เดือน

4. การเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้จนเป็นลูกกล้วยไม้

ต้นอ่อนกล้วยไม้ที่ได้จากชั้นคอนที่ 3 จะถูกนำออกไปเลี้ยงต่อในห้องเลี้ยงใหม่ที่เรียกว่า โรงไม้ขวด ซึ่งห้องเลี้ยงนี้จะเป็นส่วนที่ต้นอ่อนจะได้รับอุณหภูมิและแสงแดดปกติตามธรรมชาติ

หลังจากนั้นประมาณ $1-1\frac{1}{2}$ เดือน จะพบว่าจะได้ลูกกล้วยไม้จำนวนมากซึ่งมีรากและใบให้เห็น ชัดเจน สูงประมาณ $1-1\frac{1}{2}$ นิ้ว ลูกกล้วยไม้ที่ได้จะขึ้นไม่เป็นระเบียบ เบียดเสียดกันมากต่อหนึ่งขวด ในระยะนี้จะมีการถ่ายขวด ลงสู่ขวดเพาะใหม่ โดยจัดเรียงลูกกล้วยไม้ต่อขวดประมาณขวดละ 50 ต้น และจัดเรียงเป็น 3 แถว จากนั้นจะนำขวดเหล่านี้ไปเลี้ยงในโรงไม้ขวดอีกประมาณ 1 เดือน จะได้ลูกกล้วยไม้สูงประมาณ 3-4 นิ้ว พร้อมทั้งจะขายให้ลูกค้าต่อไป

สรุปขั้นตอนการผลิตของทั้ง 2 วิธี

ตามที่ได้อธิบายมาแล้วจะเห็นว่าเวลาและสารอาหารที่ใช้ในการเพาะเมล็ดจะน้อยกว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยสามารถสรุปได้ดังนี้

การเพาะ เมล็ด

<u>ขั้นตอนการผลิต</u>		<u>ระยะเวลาที่ใช้ (เดือน)</u>
1. การเตรียมวัสดุอาหาร	2 ชม./100 ขวด	
2. การหว่าน เมล็ดลงในขวดเพาะ	1 วัน./100 ขวด	
3. การเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ		2
4. การเลี้ยงต้นอ่อนในโรงไม้ขวด		5
		<hr/>
รวมระยะเวลาที่ใช้ประมาณ		<u>7</u> เดือน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

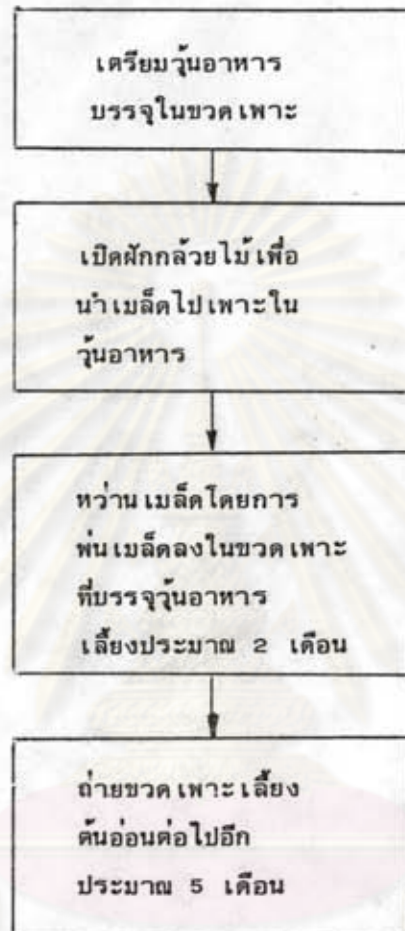
ขั้นตอนการผลิต

ระยะเวลาที่ใช้ (เดือน)

1. เตรียมสารอาหารและน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ
 - 1.1 เตรียมสารอาหาร
 - อาหารเหลวบรรจุในขวดแก้วที่เรียกว่า ฟาสท์ (Flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 125 มิลลิลิตร 2 ชม./100 ขวด
 - วัสดุแข็งบรรจุในขวดเพาะ
 - 1.2 เตรียมน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ
 2. เตรียมหน่อกล้วยไม้และย้ายเนื้อเยื่อเพื่อนำมาเพาะเลี้ยง 1 ชม./5 หน่อ
 - 2.1 ทำความสะอาดหน่อกล้วยไม้ด้วยน้ำและน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ
 - 2.2 ตัดตายอดและตาข้างใส่ลงในขวดแก้วที่มีสารอาหารเหลว
 3. การเลี้ยงเนื้อเยื่อจนได้เป็นต้นอ่อน
 - 3.1 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าหมุน 120 รอบ/ต่อนาทีและเปลี่ยนสารอาหารเหลวทุก 7 วัน โดยเริ่มเปลี่ยนครั้งแรกหลังจากเลี้ยงบนเครื่องเขย่าได้ 1-2 เดือน 5
 - เมื่อได้โปรโตคอมจำนวนมากจึงย้ายใส่ในขวดแก้วขนาด 125 มิลลิลิตร เปลี่ยนอาหารเหลว ทุก 10 วัน เลี้ยงบนเครื่องเขย่า เช่น เค็ม 3
 - 3.2 แยกโปรโตคอมกลุ่มเล็ก ๆ แล้วย้ายลงในวัสดุแข็ง ที่บรรจุในขวดเพาะ เลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยไม่ต้องอยู่บนเครื่องเขย่า 3
 - 3.3 ถ่ายขวดลงสู่วัสดุแข็งใหม่ เลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่ออีกส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิใหม่จนได้เป็นต้นอ่อน 2
 4. การเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้จนเป็นลูกกล้วยไม้

ทำการถ่ายขวดต้นอ่อนกล้วยไม้อีกครั้ง โดยเรียงให้เป็นระเบียบให้ได้ขวดละ 50 ต้น และเลี้ยงจนได้ลูกกล้วยไม้สูงประมาณ 3-4 นิ้ว พร้อมที่จะส่งขาย 2
- รวมระยะเวลาที่ใช้ประมาณ 15

แผนภูมิที่ 2.1 ขั้นตอนการเพาะ เมล็ดกล้วยไม้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภูมิที่ 2.2 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

