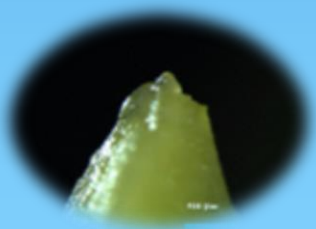
คู่มือเทคโนโลยีการผลิตต้นพันธุ์กล้วยไม้ปลอดโรค และ การตรวจสอบโรค



โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีจากผลงานวิจัย
การพัฒนาการผลิตกล้วยไม้เศรษฐกิจปลอด
โรคสู่ภาคเอกชนผู้ผลิตกล้วยไม้เป็นการค้า

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ดำเนินงานโครงการ “การถ่ายทอดเทคโนโลยีจากผลงานวิจัยการพัฒนาการผลิตกล้วยไม้เศรษฐกิจปลอดโรคสู่ภาคเอกชนผู้ผลิตกล้วยไม้เป็นการค้า” ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ซึ่งเป็นผู้ให้ทุนสนับสนุนการดำเนินงานโครงการนี้ และขอขอบคุณ *รองศาสตราจารย์ ดร.อำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์ คุณสุรภี กีรติยะอังกูร และรองศาสตราจารย์ ดร.พัฒนา ศรีฟ้า ฮุนเนอร์* วิทยากรผู้ทรงคุณวุฒิ ที่มาถ่ายทอดความรู้ในการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการครั้งนี้ รวมทั้งการให้ความอนุเคราะห์ภาพประกอบเพื่อให้การจัดทำคู่มือมีความสมบูรณ์ พร้อมกันนี้ขอขอบคุณ *บุคลากรศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตรจังหวัดสมุทรสาคร ฟาร์มกล้วยไม้ปัญจรัตน์ อำเภอกระทุ่มแบนจังหวัดสมุทรสาคร* รวมทั้งบุคลากรฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ที่ได้ให้ความร่วมมือร่วมใจ ช่วยให้การถ่ายทอดเทคโนโลยีโครงการนี้ดำเนินไปได้ด้วยดี ไม่มีอุปสรรค และสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ได้อย่างดียิ่ง

คำนำ

คณะผู้ดำเนินงานได้จัดทำคู่มือ “การผลิตต้นกล้วยไม้ปลอดโรคไวรัสและการตรวจสอบโรค” เพื่อใช้เป็นแหล่งความรู้สำหรับเกษตรกรผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ และผู้สนใจการปลูกเลี้ยงต้นกล้วยไม้ให้ปลอดโรคไวรัส โดยเรียบเรียงจากบทความของวิทยากรที่มาถ่ายทอดความรู้ให้แก่ผู้เข้าร่วมการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง “การถ่ายทอดเทคโนโลยีจากผลงานวิจัยการพัฒนาการผลิตกล้วยไม้เศรษฐกิจปลอดโรคสู่ภาคเอกชนผู้ผลิตกล้วยไม้เป็นการค้า” ซึ่งได้ดำเนินการฝึกอบรมให้แก่กลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ ในเขตจังหวัดสมุทรสาครและราชบุรี ตลอดจนนักวิชาการและผู้สนใจ มีเนื้อหาประกอบด้วยลักษณะอาการของโรคกล้วยไม้ วิธีการป้องกันกำจัด และการตรวจสอบโรคของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อไวรัส ซึ่งเกษตรกรสามารถตรวจสอบได้เองในพื้นที่ รวมทั้งวิธีการที่ต้องทำการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการโดยใช้เครื่องมือเฉพาะทาง ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ผลการตรวจมีความถูกต้อง แม่นยำ นอกจากนี้ยังมีเนื้อหาเกี่ยวกับการผลิตต้นกล้วยไม้ให้ปลอดโรคไวรัส และแนวทางการสร้างต้นพันธุ์กล้วยไม้ให้ต้านทานโรคไวรัส

คณะผู้ดำเนินงานหวังว่าเนื้อหาสาระในคู่มือเล่มนี้ น่าจะมีประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ นักวิชาการ ตลอดจนผู้สนใจ จะได้นำไปใช้เป็นองค์ความรู้ สำหรับการพัฒนาการผลิตต้นกล้วยไม้ให้มีคุณภาพดีมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการดูแลให้ต้นกล้วยไม้ที่ปลูกเลี้ยงกันอยู่ในประเทศไทยปลอดจากโรคไวรัสได้ในอนาคต

คณะนักวิจัย

ตุลาคม 2559

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
คำนำ	2
สารบัญ	3
บทที่ 1 โรคของกล้วยไม้และการป้องกันกำจัดโรค	4
บทที่ 2 วิธีการตรวจสอบโรคไวรัสในกล้วยไม้	21
บทที่ 3 การผลิตต้นพันธุ์กล้วยไม้ให้ปลอดโรคไวรัส	29
บทที่ 4 บทสรุป	35
บรรณานุกรม	36
ภาคผนวก	39
ผนวก 1 คู่มือการใช้งานชุดตรวจไวรัสกล้วยไม้ “POCy kit”	40
ผนวก 2 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้	44
ผนวก 3 สูตรอาหารพื้นฐานสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้	50
ผนวก 4 การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวพืช	54

บทที่ 1

โรคของกล้วยไม้

ปัญหาและอุปสรรคที่มีผลกระทบต่อการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ มีสาเหตุสำคัญเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืช ได้แก่ โรคที่เกิดจากเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และ เชื้อไวรัส เป็นต้น

- **โรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อรา**

1) โรคเน่าดำ

เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* พบมากในพวกแคทลียา หวาย แวนด้า และรองเท้านารี มีการแพร่ระบาดได้ง่ายโดยเฉพาะในฤดูฝน ลักษณะอาการแผลเน่าสีดำหรือสีน้ำตาล เกิดได้กับทุกส่วน และลุกลามไปได้ทั่ว ถ้ามีอาการรุนแรงทำให้ต้นกล้วยไม้ตาย

แคทลียา

อาการโรคเน่าดำในแวนด้า

รองเท้านารี

2) โรคเน่าแห้งหรือโรคราเมล็ดผักกาด

เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* พบในพวกสกุลหวาย ฟาแลนน้อปซีส แวนด้า และกล้วยไม้ดิน อาการเป็นแผลเน่าแห้ง สีน้ำตาล รากจะเป็นสีน้ำตาล แห้งกรอบ มักพบเส้นใยสีขาวของเชื้อราและเม็ด *Sclerotium* ที่ราก ทำให้ต้นกล้วยไม้ตายในที่สุด

3) โรคใบแห้งหรือโรคแอนแทรกโนส

เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* พบในกล้วยไม้ทุกสกุล ระบาดมากในฤดูฝน มักพบที่บริเวณปลายใบ และ ขอบใบ แผลมีลักษณะเป็นวงแหวนซ้อนกันหลายชั้น ทำให้ใบไหม้ แห้ง ถ้าเกิดบนเกสรของดอกจะเป็นแผลเน่าดำ

4) โรคใบปื้นเหลืองหรือโรคใบแต้มเหลือง

เกิดจากเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* พบเป็นปัญหามากกับกล้วยไม้สกุลหวาย ระบาดในฤดูหนาว ทำให้ใบเหลือง ร่วง ต้นโทรม ดอกมีขนาดเล็ก และจำนวนดอกลดลง

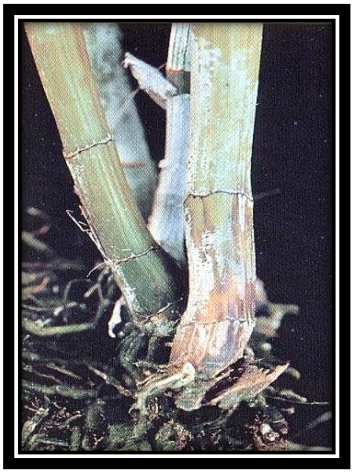
5) โรคดอกจุดสีสนิม

เกิดจากเชื้อรา *Curvularia eragostidis* เป็นอีกโรคหนึ่งที่เป็นปัญหามากในกล้วยไม้สกุลหวายทุกสายพันธุ์ ในช่วงรอยต่อของฤดูกาล มักเข้าทำลายดอกกล้วยไม้ ทำให้เกิดเป็นจุดสีเข้มคล้ายสนิมเหล็กตรงกลางแผล

6) โรคใบจุด เกิดจากเชื้อรา *Phyllusstictina pyriformis*

7) โรคดอกจุดและดอกเน่า เกิดจากเชื้อรา *Botrytis* sp.

8) โรคเหี่ยว เกิดจากเชื้อ *Fusarium* sp.



- **โรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย**

1) โรคเน่า เกิดจากเชื้อแบคที่เรีย

— *Burkholderia gladioli* Bg. พบมากในพวกแวนด้าม้อคคาร่า และเขาแกะ อาการใบเน่าช้ำสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ลามจากปลายใบและปลายยอด

— *Acidovorax avenae* พบในกล้วยไม้แวนด้า ช้าง แอสโคเซนด้า อะแรนเธอร่า และฟาแลนน้อปซีส อาการเริ่มจากเป็นจุดสีเขียวอ่อน ต่อมาแผลขยายใหญ่เป็นสีนำตาลดำ มีวงสีเหลืองล้อมรอบ

2) โรคเน่าเละ เกิดจากเชื้อแบคที่เรีย

– *Erwinia caratovora caratovora* Ecc. พบในกล้วยไม้หวาย และออนซิเดียม อาการใบ และลำต้นเน่าเละ มีกลิ่นเหม็นฉุน

– *Erwinia chrysanthemi* Ech. พบระบาดทำความเสียหายมาก ในพวกหวาย ฟาแลนน้อปซีส แวนด้า ช้าง และแคทลียา ทำให้ใบ และลำต้นเน่าช้ำมีสีเขียว หรือสีน้ำตาลอ่อน แต่ไม่มีกลิ่นเหม็นฉุน

- **โรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อไวรัส**

1) โรคใบด่างหรือโรคยอดบิดหวายมาดาม

เกิดจากเชื้อไวรัส Cymbidium mosaic virus (CymMV) กล้วยไม้มีอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อนเป็นหย่อมๆ ใบยอดบิดเบี้ยวและมีขนาดเล็กลง ดอกด่าง และช่อดอกมีขนาดเล็กลง

ฟาแลนน้อปซีสใบด่าง

หวายใบด่าง/ยอดบิด

แคทลียาดอกด่าง

ฟาแลนน้อปซีสดอกด่าง

2) โรคดอกด่างแคทลียา

เกิดจากเชื้อไวรัส Odontoglossom ringspot virus (ORSV) หรือ Tobacco mosaic virus-orchid strain (TMV-O) พบในกล้วยไม้แคทลียา ทำให้ดอกแสดงอาการด่าง และใบยอดบิดเบี้ยว

3) โรคใบด่าง

เกิดจากเชื้อไวรัส Potyvirus โดยมากพบในกล้วยไม้ฟาแลนน้อปซิส แต่ก็สามารถเข้าทำลายกล้วยไม้ได้หลายชนิด

ในบางครั้งอาจพบเชื้อไวรัสทั้ง CymMV และ ORSV เข้าทำลายกล้วยไม้ร่วมกัน ทำให้อาการของโรครุนแรงมากขึ้น

วิธีการป้องกันการแพร่ระบาดของโรค

เชื้อโรคพืชส่วนมากแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็วในช่วงฤดูฝน สปอร์ของเชื้อรา และแบคทีเรียสามารถแพร่ไปกับน้ำได้ น้ำจึงเป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อโรคได้เป็นอย่างดี จึงมีข้อควรระวังดังนี้

- ควรดูแลรักษาต้นกล้วยไม้ให้สมบูรณ์อยู่เสมอ
- อย่าปลูกต้นกล้วยไม้แน่นจนเกินไป
- เก็บรวบรวมใบ / ต้นที่เป็นโรค เผาทำลาย
- ไม่ควรให้น้ำกล้วยไม้ตอนเย็นใกล้ค่ำ โดยเฉพาะช่วงฤดูหนาว เพราะสภาพอากาศเย็น ความชื้นสูง โรคจะแพร่ระบาดรุนแรงได้ง่ายขึ้น
- ควรตรวจสอบเชื้อไวรัสในกล้วยไม้ก่อนนำไปขยายพันธุ์
- หลีกเลี่ยงการใช้อุปกรณ์ / เครื่องมือ ปะปนกัน

การใช้สารป้องกันกำจัดโรคที่สำคัญของกล้วยไม้

โรค	สารป้องกันกำจัดโรค (ชื่อสามัญ)	อัตราการใช้ / น้ำ 20 ลิตร	วิธีการใช้
1) โรคเน่าดำ	— เมทาแลกซิล	40 กรัม	— ควรพ่นในช่วงที่แดดไม่จัด — ไม่ควรผสมกับปุ๋ยและสารเคมีอื่นๆ — ควรพ่นสลับกับสารเคมีอื่น
2) โรคดอกสนิม / โรคดอกจุด	— แมนโคเซบ	30 กรัม	— ควรฉีดพ่นให้ทั่ว
3) โรคใบปื้นเหลือง	— คาร์เบนดาซิม — แมนโคเซบ — เบโนมิล	20 กรัม 30 กรัม 6-8 กรัม	— ควรพ่นสารให้ถูกกับพื้นที่ผิวใบที่มีสปอร์ — ปรับหัวพ่นเพื่อให้ทั่วทั้งบนใบ/ ใต้ใบ — ควรพ่นสารอื่นสลับกันเพื่อป้องกันการต้านทานสารเคมี

การใช้สารป้องกันกำจัดโรคที่สำคัญของกล้วยไม้

โรค	สารป้องกันกำจัดโรค (ชื่อสามัญ)	อัตราการใช้ / น้ำ 20 ลิตร	— วิธีการใช้
4) โรคเน่าที่เกิด จากเชื้อแบคทีเรีย	— สเตรปโตมัยซิน — ออกซิเตตตระไซคลินโปรเคน — เพนนิซิลิน-จี — คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์	10 กรัม 20 กรัม	— ความเข้มข้นต่ำ ใช้ป้องกันโรค — ความเข้มข้นสูงใช้กำจัดโรค — ไม่ควรใช้ผสมกับปุ๋ยใด ๆ
5) โรคราเมล็ดผักกาด	— ไวตาแวกซ์ สารคาร์บอกซิน75%	10 กรัม	- ฉีดพ่นทุก 7 วัน/ครั้ง
6) โรคไวรัส	น้ำสบู่/น้ำยาคลอร็อกซ์	10% โดยปริมาตร	- แช่/ทำความสะอาดเครื่องมือ เครื่องใช้ ทุกครั้ง หลังการตัดแยกหน่อหรือตัดดอก

บทที่ 2

วิธีการตรวจสอบโรคไวรัสในกล้วยไม้

ต้นกล้วยไม้ที่เป็นโรคไวรัสในประเทศไทย ส่วนมากพบเกิดจากเชื้อไวรัส 2 ชนิดได้แก่เชื้อ Cymbidium mosaic virus (CymMV) และ Odontoglossom ringspot virus (ORSV) ต้นกล้วยไม้ที่เป็นโรคมักแสดงอาการใบด่าง ยอดบิดเบี้ยว ดอกด่าง ช่อดอกสั้น ทำให้ผลผลิตมีปริมาณลดลง ผลผลิตไม่ได้คุณภาพตามที่ตลาดต้องการ นอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคได้ในต้นที่ไม่แสดงอาการอีกด้วย อย่างไรก็ตาม กรมวิชาการเกษตรได้รายงานล่าสุดว่า เริ่มมีการตรวจพบเชื้อไวรัสชนิด Potyvirus ในแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกร แต่ยังไม่พบการระบาดมากเท่าเชื้อ CymMV และ ORSV เชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิดนี้มีการแพร่ระบาดได้ โดยติดไปกับคน เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดแต่งภายในสวนกล้วยไม้ ดังนั้นเพื่อป้องกันไม่ให้มีการแพร่ระบาด จึงมีข้อควรปฏิบัติดังนี้

1) ทำความสะอาดเครื่องมือและอุปกรณ์ เช่น มีด กรรไกร โดยการแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร (คลอร็อกซ์ 1 ส่วน น้ำสะอาด 9 ส่วน) นานประมาณ 10 นาที หรือล้างด้วยน้ำสบู่ หรือแช่ในเอทธิลแอลกอฮอล์แล้วเผาไฟ

แช่ในแอลกอฮอล์

ใช้วิธีเผาไฟ

แช่ในคลอร็อกซ์ 10%

2) ไม่ใช้อุปกรณ์ / เครื่องมือปะปนกัน ต้องทำความสะอาดทุกครั้ง

3) คัดเลือกหน่อกล้วยไม้จากต้นที่แข็งแรง และไม่เป็นโรค สำหรับใช้ในการขยายพันธุ์

4) แยกปลูกต้นกล้วยไม้ที่ไม่เป็นโรค ไม่ปลูกรวมกับต้นเดิมที่มีอยู่ในแปลง

วิธีการตรวจเชื้อไวรัสในต้นกล้วยไม้ *มีหลายวิธีได้แก่*

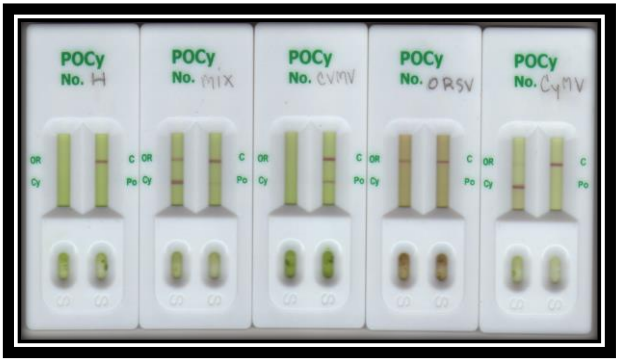
1) <u>การใช้ชุดตรวจสอบ “POCy kit</u>” เป็นวิธีที่สะดวกและเหมาะสมที่สุดสำหรับการตรวจสอบภาคสนาม เกษตรกรผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สามารถคัด เลือกต้นกล้วยไม้ที่ไม่เป็นโรคได้ด้วยตนเองโดยใช้ชุด “POCy kit” ก่อนที่จะส่งหน่อเข้าห้องแล็บ เพื่อปั่นตาเพิ่มปริมาณให้ได้ต้นกล้วยไม้ปลอดโรคไวรัส วิธีนี้สามารถทำได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ แต่ต้องมีชุด kit สามารถสั่งซื้อได้ รายละเอียดตามภาคผนวก 1 (คู่มือการใช้งาน POCy KIT)

ชุด “POCy KIT”

↓ เก็บตัวอย่างใบกล้วยไม้

↓ บดในน้ำยา

หยดน้ำคั้นลงบนชุดตรวจ



รอประมาณ 3 นาที

↓

อ่านผลที่ได้โดยดูจากแถบสีที่ปรากฏ

<u>แถบสีที่ปรากฏแสดงชนิดของเชื้อไวรัสที่ตรวจพบจากต้นกล้วยไม้</u>

C = พืชที่ไม่เป็นโรค

Po = เชื้อ Potyvirus

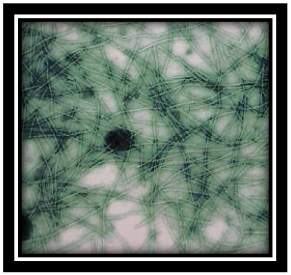
Cy = เชื้อ Cymbidium mosaic virus

OR = เชื้อ Odontoglossom ringspot virus

2) <u>การตรวจเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน</u>

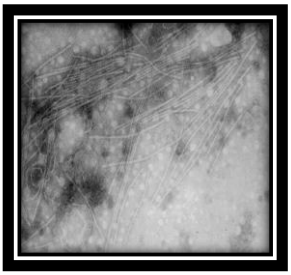
วิธีนี้ต้องใช้เครื่องมือชนิดพิเศษคือ กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่งมีกำลังขยายสูงเป็นแสนเท่า สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัสซึ่งไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคว่าเป็นเชื้อไวรัสชนิดใด

กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน



CymMV

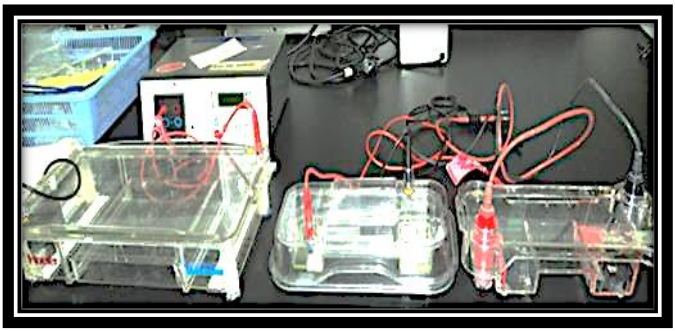
ORSV



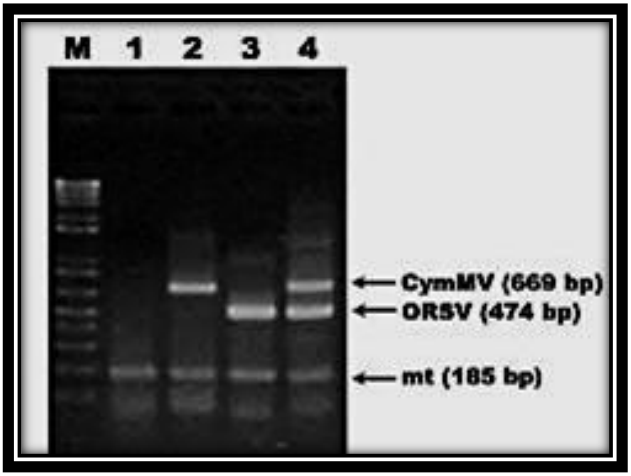
Potyvirus

3) <u>การตรวจเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR</u> วิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยากต้องมีเครื่องมือวิทยาศาสตร์ และอุปกรณ์จำเพาะที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ เครื่อง PCR เครื่องอิเลคโตรโฟรีซีส ชุด kit สำหรับสกัด RNA จากพืช เหล่านี้เป็นต้น ซึ่งแม้ว่าจะเป็นวิธีที่ต้องใช้เครื่องมือที่เฉพาะเจาะจง แต่เป็นวิธีตรวจสอบไวรัสที่มีประสิทธิภาพสูง และให้ความแม่นยำมากที่สุด โดยใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยมาก จึงเหมาะสำหรับการตรวจสอบเชื้อไวรัสในระยะเริ่มต้นของกระบวน การผลิตต้นกล้วยไม้ปลอดไวรัส โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ ทำให้สามารถคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ตรวจแล้วไม่พบเชื้อไวรัสไปเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้ปลอดไวรัสต่อไปได้

เครื่อง PCR



เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส



ตัวอย่างผลการตรวจสอบเชื้อไวรัสในกล้วยไม้ด้วยวิธี RT-PCR

ถ้าในตัวอย่างพืชมีเชื้อไวรัสจะปรากฏแถบให้เห็น ดังภาพ

แถว M เป็น marker บอกขนาดของ DNA / RNA

แถวที่ 1 เป็น น้ำกลั่น ***แถวที่ 2 มี CymMV***

แถวที่ 3 มี ORSV และ ***แถวที่ 4 มีทั้ง CymMV และ ORSV***

อย่างไรก็ตาม ยังมีวิธีอื่นนอกจากนี้อีกที่สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชได้ แต่ทั้ง 3 วิธีดังกล่าวนี้ เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับนำไปใช้ได้ วิธีที่ 1 เป็นวิธีเดียวที่เหมาะกับการตรวจสอบเชื้อในภาคสนาม ส่วนอีก 2 วิธีนั้นต้องทำในห้องปฏิบัติการ ซึ่งต้องใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และมีขั้นตอนที่ซับซ้อน ใช้กับกรณีที่ต้องการใบรับรองตามข้อกำหนดของประเทศคู่ค้า

บทที่ 3

การผลิตต้นพันธุ์กล้วยไม้ให้ปลอดโรคไวรัส

ในประเทศไทยมีรายงาน พบโรคไวรัสของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อ CymMV และ เชื้อ ORSV ซึ่งสามารถเข้าทำลายกล้วยไม้ได้หลายชนิด ทำให้กล้วยไม้แสดงอาการใบด่าง ต้นแคระแกร็น โดยทั่วไปมักพบอาการ ด่างแผลไหม้ อาการจุดช้ำน้ำ หรือจุดด่างเป็น สีเหลือง ยอดบิด ดอกเล็ก ช่อดอกสั้น กลีบดอกบิด ดอกมีสีซีด หรือ ดอกด่าง ผลผลิตน้อย คุณภาพ ของดอกต่ำไม่ได้มาตรฐาน มูลค่าผลผลิตลดลงทำให้เป็นอุปสรรคต่อวงการ ส่งออกกล้วยไม้ตัดดอก เชื้อไวรัส CymMV และ ORSV นี้ สามารถถ่ายทอด ได้โดยติดไปกับท่อนพันธุ์และอุปกรณ์ที่ใช้ตัดแต่งกล้วยไม้ การปลูกกล้วยไม้โดยทั่วไปเกษตรกรมักใช้ต้นพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการแบ่งหน่อจากกอของต้นเดิมที่ปลูกอยู่ในแปลง จึงทำให้เชื้อไวรัสสามารถแพร่ระบาดโดยติดไปกับเนื้อเยื่อและท่อนพันธุ์ที่เป็นโรค เกิดการแพร่ระบาดของโรค ทำให้เสียหายโดยไม่สามารถแก้ไขได้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิชาการแขนงหนึ่ง จากคุณสมบัติของเซลล์พืชที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้ (totipotency) จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยการนำชิ้นส่วนพืชมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในอาหารสังเคราะห์ ที่ประกอบด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช มีธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน (N) โปตัสเซียม (K) ฟอสฟอรัส (P) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg)เหล็ก (Fe) และธาตุอาหารรอง ได้แก่แมงกานีส (Mn) คอปเปอร์ (Cu) ซิงค์ (Zn) โบรอน (B)

คลอรีน (Cl) ซัลเฟอร์ (S) โคบอลท์ (Co) และไอโอดีน (I) ภายใต้สภาพแวดล้อมที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ และความเข้มของแสงตามที่พืชต้องการสำหรับการเจริญเติบโตได้ เนื้อเยื่อของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงทั่วไป ได้แก่ เนื้อเยื่อเซลล์ และอวัยวะต่างๆ ของพืช เช่น ตา ปลายยอด และปลายราก เป็นต้น แต่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตต้นปลอดโรคนั้น ต้องใช้เฉพาะส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ จึงจะสามารถหลีกเลี่ยงการแพร่ของเชื้อไวรัสได้

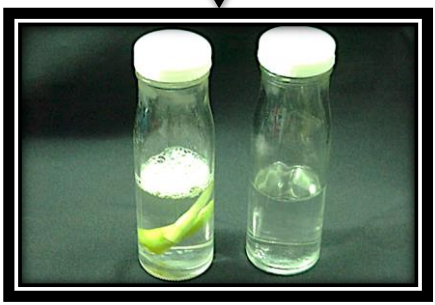
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ

เนื้อเยื่อเจริญ (meristem) เป็นเนื้อเยื่อที่มีขนาดเล็กประมาณ 0.2 - 0.5 มิลลิเมตร ซึ่งอยู่ที่บริเวณปลายยอด ตาข้าง และปลายราก เป็นเนื้อเยื่อที่กำลังเกิดการแบ่งเซลล์ และมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่ยังไม่พบมีการพัฒนาไปทำหน้าที่เฉพาะอย่าง ดังนั้นเนื้อเยื่อบริเวณนี้จึงเป็นบริเวณที่ปลอดจากเชื้อโรคทุกชนิด ซึ่งต้องอาศัยอยู่ในท่อน้ำท่ออาหารของพืชเพื่อการเจริญเติบโต รวมทั้งเชื้อไวรัสซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกล้วยไม้ที่สำคัญ คือโรคที่เกิดจากเชื้อ CymMV และ ORSV

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญกล้วยไม้

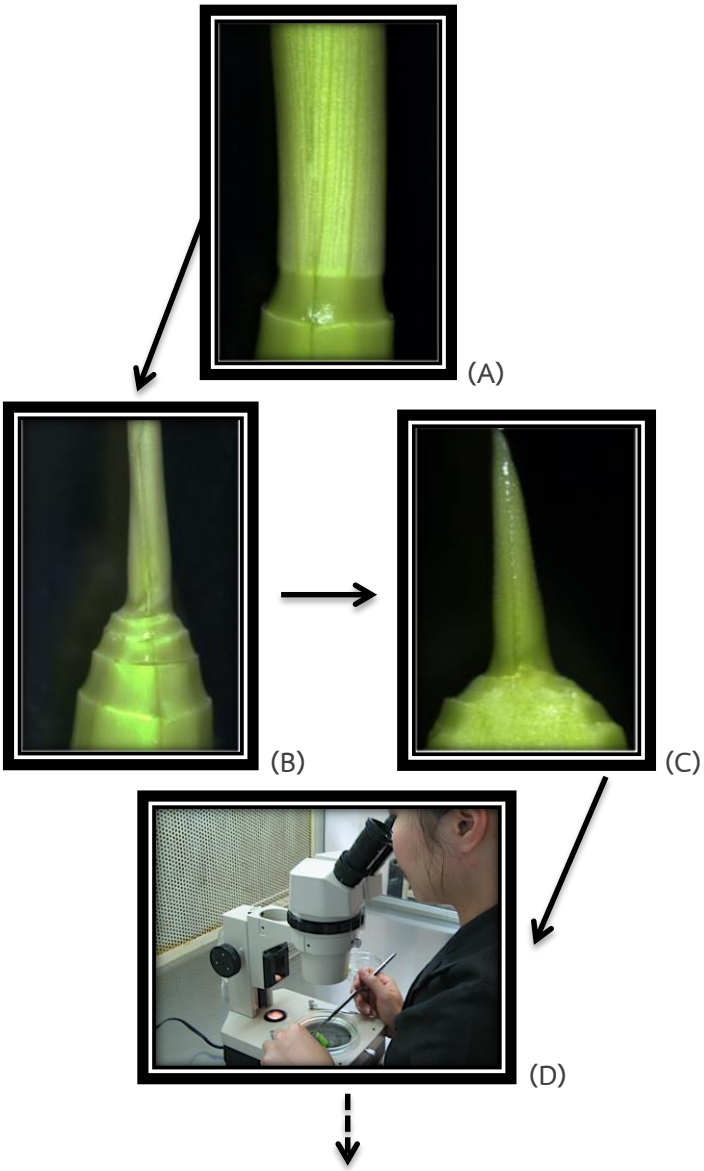
1) การฟอกฆ่าเชื้อ นำหน่อกล้วยไม้มาล้างน้ำสบู่

แช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 10%

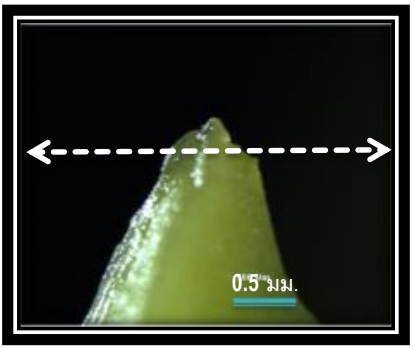


นาน 20 นาที

2) การตัดเนื้อเยื่อเจริญ จากปลายยอดหน่อกล้วยไม้ (ทำในตู้ปลอดเชื้อ)

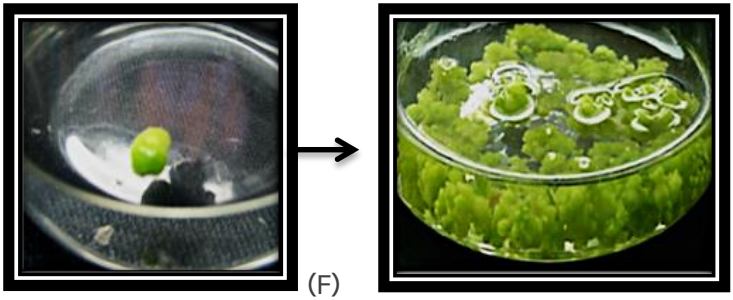


3) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ



(E)

ตัดเนื้อเยื่อเจริญ (E) ตามรอยเส้นประสีขาว (ขนาดประมาณ 0.3 มิลลิเมตร) นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Vacin & Went (1949) ซึ่งเติมน้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) และ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ขวดละ 1 ชิ้น วางบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 26 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน (F, G)



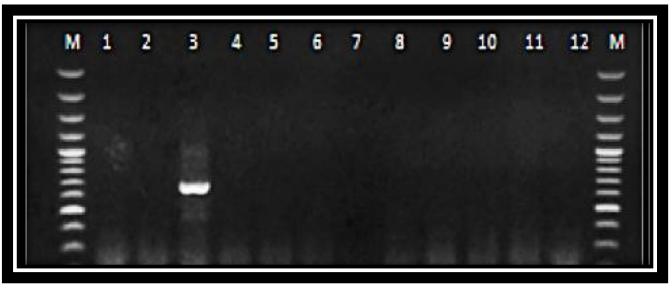
(F)

(G)

4) การตรวจเชื้อไวรัส

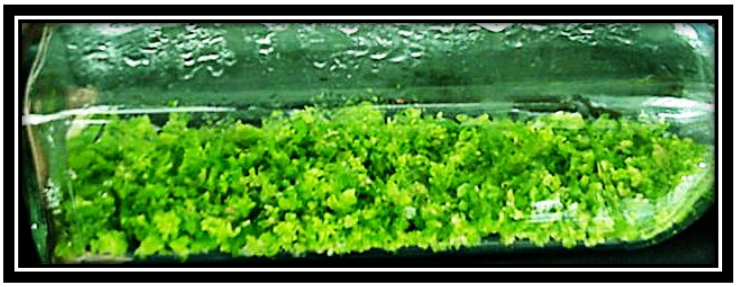
นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (G) มาตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR (H) แล้วจึงคัดเลือก

โคลนที่ตรวจ ไม่พบเชื้อไวรัส นำไปเพิ่มปริมาณ (I) และชักนำให้เกิดเป็นต้นกล้วยไม้ที่ สมบูรณ์มีรากพร้อมย้ายออกปลูก (J) ต่อไป



(H)

5) การเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้ปลอดเชื้อไวรัส



(I)

6) ต้นกล้วยไม้ปลอดเชื้อไวรัส

(J)

บทที่ 4

บทสรุป

ปัญหาของโรคกล้วยไม้ที่พบในประเทศไทย ส่วนใหญ่เกิดจากต้นกล้วยไม้ที่เป็นโรคซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส ทั้งนี้เนื่องจากไม่มีสารเคมีชนิดใดที่สามารถนำมาใช้ในการป้องกัน และกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสได้ ต้องบำรุงรักษาให้ต้นกล้วยไม้แข็งแรงสมบูรณ์เป็นอย่างดีตลอดเวลา เพื่อให้สามารถออกดอกได้สม่ำเสมอ แต่อย่างไรก็ตามต้นกล้วยไม้ทั้งหลายที่เป็นโรคไวรัสจะทรุดโทรมลงเรื่อยๆ จนไม่สามารถฟื้นฟูให้แข็งแรงเหมือนต้นปกติได้ ทำให้การออกดอกลดลงทั้งปริมาณและคุณภาพ ในที่สุดต้องรื้อทิ้งเปลี่ยนต้นใหม่ทดแทน จึงเป็นช่องทางในการนำต้นกล้วยไม้รุ่นใหม่ซึ่งปลอดโรคไวรัสมาปลูกทดแทนต้นเก่า ทำให้สามารถลด และกำจัดต้นกล้วยไม้เป็นโรคให้ค่อยๆ หมดไปได้ในที่สุด

ดังนั้นผู้ผลิตและผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ ตลอดจนผู้เกี่ยวข้อง จึงควรเล็งเห็นความสำคัญ ความจำเป็น ที่จะต้องเรียนรู้เกี่ยวกับ กระบวนการดูแล การตรวจสอบ และการผลิตต้นกล้วยไม้ปลอดโรคไวรัส เพราะการแพร่ระบาดของโรคนี้เกิดได้ง่ายในสภาพแปลงปลูก แม้จะปลูกต้นใหม่ที่ปลอดโรคก็ตาม แต่ถ้ายังมีต้นเป็นโรคปะปนอยู่ก็ยากที่จะจัดการกับปัญหาการแพร่ระบาดของโรคในแปลงให้หมดไปได้ คู่มือนี้เป็นเพียงแนวทางการปฏิบัติขั้นพื้นฐานสำหรับการผลิตต้นกล้วยไม้ปลอดโรคเท่านั้น ซึ่งจะสำเร็จได้ต้องอาศัยความรู้ ความเข้าใจ การดูแลเอาใจใส่ของผู้เกี่ยวข้องอย่างจริงจังต่อเนื่องสม่ำเสมอและตลอดไป

บรรณานุกรม

จันทร์แรม รูปขำ. 2559. การตรวจเชื้อไวรัสในกล้วยไม้ด้วยวิธี PCR / RT-PCR. *ใน* เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “การผลิตต้นพันธุ์กล้วยไม้ปลอดโรคไวรัส”. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 46 น.

จิตราพรรณ พิลึก. 2536. การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 82 น.

นงณพชร คุณากร. 2559. การผลิตต้นพันธุ์กล้วยไม้ปลอดไวรัสโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ. *ใน* เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “การผลิตต้น พันธุ์กล้วยไม้ปลอดโรคไวรัส”. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 46 น.

สุรภี กีรติยะอังกูร. 2559. เทคนิคการตรวจสอบเชื้อไวรัสในกล้วยไม้ด้วยวิธีทางอิมมูโนโลยี .*ใน* เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “การผลิตต้นพันธุ์ กล้วยไม้ปลอดโรค”. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 46 น.

อำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์. 2559. โรคของกล้วยไม้และการควบคุมโรค. *ใน* เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “การผลิตต้นพันธุ์กล้วยไม้ปลอดโรค”. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 46 น.

Arditti, J. and R. Ernst. 1993. Micropropagation of Orchids. John Wiley & Sons Inc., NY, 682 pp.

Balachandran, S., Hull, R.J., Martin, R.A., Vadia, Y. and Lucas, W.J. 1997a. Influence of environmental stress on biomass partitioning in transgenic tobacco plants expressing the movement protein of tobacco mosaic virus. Plant Physiol. 114: 474-481.

Balachandran, S., Hurry, V.M., Kelly, S.E., Osmond, C.B., Robinson, S.A., Rohozinski, J., Seaton, G.G.R. and Sim, D.A. 1997b. Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from perspective of photosynthesis. Physiol. Plant 100: 203-213.

Chia, T.F., Chan, Y.S. and Chua, N.H. 1991. Detection and survey of CyMV and ORSV in cultivated orchids by nucleic and hybridization. *In* : The Organizing Committee of The Nagoya International Orchid Congress, Nagoya, Japan. pp.56-59.

Chia, T.F. and He, J. 1999. Photosynthetic capacity in *Oncidium* (Orchidaceae) plants after virus eradication. Environ. Exp. Bot. 42: 11-16.

Eun, A.J-C., Huang, L., Chew, F.-T., Li, S.F.-Y. and Wong, S.-M. 2002. Detection of two orchid viruses using quartz crystal microbalance (QCM) immunosensors. J. Virol. Methods 99: 71-79.

Knudson, L. 1922. Non-symbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 73: 1-25.

Kim, K.K., J.T., Kunisaki and Y. Sagawa. 1970. Amer. Orch. Soc. Bull. 39: 1077-1080.

Vacin, E. and Went, F. 1949. Some pH changes in nutrient solution. Bot. Gaz. 110: 605-613.

Webster, C.G., Wylie, S.J. and Jones, M.G.K. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. Curr. Sci. 86: 1604-1607.

ภาคผนวก

CPAK

คู่มือการใช้งาน

POCy KIT

For Orchid Virus

ชุดตรวจสอบไวรัสกล้วยไม้

Potyvirus + ORSV + CyMV Test Kit

Patent Application no. 1103000996

DOA ARDA NIA

ผ่านการวิจัยจาก กรมวิชาการเกษตร (DOA)
ภายใต้การสนับสนุนของสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) สวก. (ARDA)
และสำนักงานวัตกรรมแห่งชาติ (NIA)

คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์

ชุดตรวจ POCy KIT ใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัสกล้วยไม้ได้ 3 ชนิด คือ Cymbidium mosaic virus (CyMV), Odontoglossum ring spot virus (ORSV) และ Potyvirus ได้ในตลับเดียว ทำให้ประหยัดและสะดวกเพราะใช้ง่าย มีเพียง 2 ขั้นตอน คือ บดตัวอย่างพืช และหยอดลงตลับชุดตรวจ สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในน้ำคั้นที่มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าปกติ ถึง 1,000 เท่า สามารถอ่านผลได้รวดเร็ว ง่ายและชัดเจน โดยใช้เวลาประมาณ 5 นาที ผู้ใช้สามารถตรวจสอบได้ด้วยตนเอง พกพาได้สะดวก และนำไปใช้ได้ในทุกที่นอกห้องปฏิบัติการ

ประโยชน์

- ใช้ตรวจสอบหาเชื้อไวรัส เพื่อควบคุมโรคไม่ให้แพร่ระบาด
- เพื่อใช้ในการคัดต้นพันธุ์กล้วยไม้ปลอดโรคไวรัส ไปขยายพันธุ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- ใช้ตรวจสอบต้นกล้วยไม้ส่งออก เพื่อออกใบรับรองปลอดไวรัส
- ใช้ตรวจสอบ เพื่อเลือกซื้อต้นกล้วยไม้ที่ปลอดโรคไวรัส

อุปกรณ์ในชุดตรวจสอบ

- ตลับตรวจสอบเชื้อไวรัส POCy KIT
- สารละลายบัฟเฟอร์ (Extraction buffer) สำหรับเตรียมน้ำคั้นพืช
- ถุงพลาสติกสำหรับเตรียมน้ำคั้นพืช
- หลอดพลาสติก ดูดสารละลาย

วิธีการใช้ POCy KIT ตรวจไวรัสบนกล้วยไม้

1. เขียนข้อมูลตัวอย่างพืชลงบนตลับ POCy KIT
2. บดตัวอย่างใบกล้วยไม้ขนาด 2x2 เซนติเมตร ในถุงพลาสติก กับสารละลายบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมน้ำคั้นพืช (ใช้หลอดพลาสติกที่อยู่ในชุดตรวจดูดสาระลายบัฟเฟอร์ประมาณ 2 ครั้ง)
3. ใช้หลอดพลาสติกดูดน้ำคั้นพืชหยดลงหลุมของ POCy KIT 3 หยดอย่างต่อเนื่อง (ตำแหน่ง S)**
4. ตรวจผลการเกิดปฏิกิริยาใน 3-5 นาที

*** หมายเหตุ ตำแหน่ง S คือ ตำแหน่งที่หยอดน้ำคั้นตัวอย่างพืช*

ข้อควรระวัง

- ไม่ควรใช้ชุดตรวจที่หมดอายุ
- หากน้ำคั้นพืชมีความหนืดมากเกินไป ทำให้ไม่เกิดการไหล และเชื้อไวรัสไม่สามารถละลายออกจากน้ำข้น ทำให้ไม่สามารถอ่านผลได้ และเกิดผลผิดพลาดได้ ทั้งผลบวกและผลลบปลอม
- ใบพืชที่มีความหนืดมาก ควรใช้ตัวอย่างปริมาณน้อยลงในการบด
- ห้ามใช้หลอดหยดพลาสติกที่ดูดน้ำคั้นพืชแล้ว มาดูดในขวดสารละลายบัฟเฟอร์ซ้ำอีก เพราะอาจเกิดการปนเปื้อนของเชื้อกับชุดทดสอบอื่น ที่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ขวดเดียวกัน
- ขณะทดสอบไม่ควรวางตลับในที่ถูกแสงแดดโดยตรง เพราะจะทำให้ปฏิกิริยาจางหายไป

การเก็บรักษา

- ควรเก็บ POCy Kit ที่อุณหภูมิไม่เกิน 30 องศาเซลเซียส
- เก็บห่างจากความชื้น แสงแดด และความร้อน
- ผลิตภัณฑ์มีอายุการใช้งานประมาณ 2 ปี หากมีการเก็บที่เหมาะสม

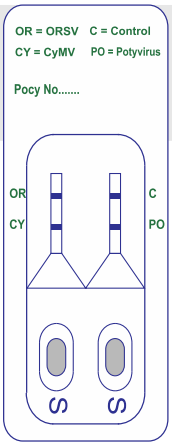
การอ่านผลการเกิดปฏิกิริยา

เส้น Control ต้องเกิดสีทุกครั้งเป็นการยืนยันคุณภาพที่ดีของชุดตรวจสอบ

ผลบวก พบเชื้อไวรัสในตัวอย่างพืชจะเกิดเส้นสีแดงในตำแหน่ง Control และตำแหน่งตรวจสอบเชื้อไวรัสนั้นๆ คือ

เกิดเส้นสีแดงที่ Po เมื่อตัวอย่างมีเชื้อ Potyvirus
เกิดเส้นสีแดงที่ Cy เมื่อตัวอย่างมีเชื้อ CyMV
เกิดเส้นสีแดงที่ OR เมื่อตัวอย่างมีเชื้อ ORSV

ผลลบ ไม่พบเชื้อไวรัสทั้งสามชนิดในตัวอย่างพืช ผลการทดสอบจะเกิดเส้นสีแดงเพียงเส้นเดียว ในตำแหน่ง Control (C) และไม่เกิดสีเลยตรงตำแหน่งตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้งสามชนิด



ผนวก 2

เครื่องมือและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

1. <u>เครื่องชั่ง</u> โดยมากมักใช้ 2 แบบ ได้แก่ เครื่องชั่งหยาบ สำหรับชั่งสารซึ่งมีน้ำหนักมากกว่า 0.1 กรัมขึ้นไป (หรือมีจำนวนทศนิยม 1 – 2 ตำแหน่ง) และเครื่องชั่งละเอียดสำหรับชั่งสารซึ่งมีน้ำหนักน้อยกว่า 0.1 กรัม (หรือมีจำนวนทศนิยม 3 – 4 ตำแหน่ง)

เครื่องชั่งหยาบ

เครื่องชั่งละเอียด

2. <u>เครื่องวัดความเป็นกรด/ด่าง</u> (pH meter) ใช้วัดค่าความเป็นกรด/ด่าง ของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับกล้วยไม้ค่า pH ที่เหมาะ สมอยู่ที่ประมาณ 4.8 – 5.2

เครื่อง pH meter

กรณีที่ไม่มีเครื่อง pH meter อาจใช้กระดาษลิธมัส (สำหรับใช้วัดค่าความเป็นกรด / ด่าง ในช่วง 4.8 – 5.5) แทนได้ โดยค่าที่วัดได้จะเป็นค่าประมาณจากการเทียบสี ผู้ใช้จะต้องมีความชำนาญจึงจะวัดค่าความเป็นกรด / ด่าง ด้วยวิธีนี้ได้ใกล้เคียงความเป็นจริง

3. <u>เครื่องกวนสารละลาย</u> ใช้สำหรับผสมสารละลายให้เข้ากัน โดยอาศัยแท่งแม่เหล็กช่วยในการกวนสารละลาย

เครื่องกวนสารละลาย

แท่งแม่เหล็ก

4. <u>เตาแก๊สหรือเตาไฟฟ้า</u> สำหรับต้มวุ้นให้ละลายก่อนที่จะเทอาหารใส่ขวด ในกรณีที่ทำอาหารแข็ง

5. <u>หม้อนึ่งความดันไอ</u> (autoclave) จำเป็นมาก สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อกำจัดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร ภาชนะ ตลอดจนเครื่องมือ และอุปกรณ์ การฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ อย่างมีประสิทธิภาพ จะต้องใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 – 20 นาที

หม้อนึ่งความดันไอ

6. <u>ตู้เย็น</u> ใช้สำหรับเก็บสารละลายเข้มข้น (stock solutions) และสารเคมีบางชนิด ซึ่งต้องเก็บไว้ในที่อุณหภูมิเย็น เพื่อรักษาคุณภาพของสารไว้ไม่ให้เสื่อมสภาพไป

7. <u>เครื่องปั่นน้ำผลไม้</u> ไว้ใช้สำหรับบดกล้วย และมันฝรั่ง

8. **<u>เครื่องแก้ว</u>**ต่างๆ ได้แก่

- บีกเกอร์ขนาดต่างๆ ตั้งแต่ 50 – 1,000 มิลลิลิตร หรือ อาจใช้หม้อสเตนเลสขนาดใหญ่แทนก็ได้
- กระบอกตวงขนาดตั้งแต่ 50, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
- ปิเปตต์ไว้สำหรับตวงสารละลายที่ใช้ปริมาตรน้อย ขนาด 1, 5, 10 และ 20 มิลลิลิตร
- ขวดแก้วสีชาสำหรับเก็บสารละลายเข้มข้น (stock solutions) ของอาหารสูตรต่างๆ
- ฟลาสต์ขนาด 50 – 250 มิลลิลิตร
- ขวดเหลี่ยมขนาด 600 – 700 มิลลิลิตร พร้อมจุกยางเจาะรูซึ่งอุดสำลีสำหรับใช้แทนฝา

9. **<u>ตู้ปลอดเชื้อ</u>** (Laminar flow) สำหรับการปฏิบัติงานภายใต้สภาพปลอดเชื้อ อากาศจากภายนอกจะต้องผ่านแผ่นกรองชนิด HEPA filter เพื่อกรองฝุ่นละอองและสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ ก่อนเข้าภายในตู้ปลอดเชื้อ

ตู้ Laminar flow

10. **<u>กล้องสเตอริโอ (Stereo microscope)</u>** มีกำลังขยาย 10 – 20 เท่า ใช้ช่วยในการตัดเนื้อเยื่อที่มีขนาดเล็ก โดยเฉพาะการตัดเนื้อเยื่อเจริญ

กล้อง Stereo

11. **<u>เครื่องมือและอุปกรณ์ผ่าตัด</u>** ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ ตะเกียง ฯลฯ

มีดผ่าตัด

ขวดแช่เครื่องมือ

ตะเกียงแอลกอฮอล์

12. **<u>ชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้</u>** ให้แสงสว่างจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสงประมาณ 2,000 ลักซ์ ช่วงแสง 12 – 14 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อความสะดวกอาจติดตั้งตัวควบคุมการเปิด / ปิดไฟ

อาหารสูตรพื้นฐานสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

1. สูตร Knudson C (1946) : ใช้ในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้สกุลต่างๆ

สารเคมี	ความเข้มข้นต่ออาหาร 1 ลิตร (กรัม)	ปริมาณที่ใช้เตรียม stock solutions (กรัม/ ลิตร)
1.1 <u>Stock A</u> (ความเข้มข้น 10 เท่า)		
— โมโนโปแตสเซียมแอซิดฟอสเฟต [monopotassium acid phosphate: KH_2PO_4]	0.25	2.5
— แอมโมเนียมซัลเฟต [ammonium sulphate: $(NH_4)_2SO_4$]	0.5	5.0
— แมกนีเซียมซัลเฟต [magnesium sulphate: $MgSO_4.7H_2O$]	0.25	2.5
— แมงกานีสซัลเฟต [manganese sulphate: $MnSO_4.H_2O$]	0.0075	0.075
1.2 <u>Stock B</u> (ความเข้มข้น 100 เท่า)		
— โซเดียม เอทธีลีนไดอามีน เตทตระอาซิเตท [sodium ethylenediamine tetraacetate: $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$]	0.037	3.725
— เฟอร์รัสซัลเฟต [ferrous sulphate: $FeSO_4.7H_2O$]	0.028	2.875

<u>หมายเหตุ</u> สารต่อไปนี้ให้ชั่งก่อนเตรียมอาหาร

- <u>แคลเซียมไนเตรท</u> [calcium nitrate: $Ca(NO_3)_2$] ใช้ 1 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร
- <u>น้ำตาลซูโครส</u> ใช้ 20 กรัมต่ออาหาร 1ลิตร
- <u>วุ้น</u> ใช้สำหรับทำให้อาหารแข็ง ควรใช้วุ้นบริสุทธิ์ อาจจะสั่งจากบริษัทหรือซื้อวุ้น ทำขนม ที่มีขายทั่วไปก็ได้ ปกติจะใช้ในอัตรา 6 – 8 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร

2. สูตร Vacin & Went (VW, 1949) ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ได้หลายชนิด อาจดัดแปลงเพื่อความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชในระยะต่างๆ

สารเคมี	ความเข้มข้นต่ออาหาร 1 ลิตร (กรัม)	ปริมาณที่ใช้เตรียม stock solutions (กรัม/ ลิตร)
2.1 <u>Stock A</u> (ความเข้มข้น 10 เท่า)		
—โปแตสเซียมไนเตรท [potassium nitrate: KNO_3]	0.525	5.25
—โมโนโปแตสเซียมแอซิดฟอสเฟต [monopotassium acid phosphate: KH_2PO_4]	0.25	2.5
2.2 <u>Stock B</u> (ความเข้มข้น 10 เท่า)		
—แอมโมเนียมซัลเฟต [ammonium sulphate: $(NH_4)_2SO_4$]	0.5	5.0
—แมงกานีสซัลเฟต [manganese sulphate: $MNSO_4.H_2O$]	0.0075	0.075
—แมกนีเซียมซัลเฟต [magnesium sulphate: $MgSO_4.7H_2O$]	0.25	2.5
2.3 <u>Stock C</u> (ความเข้มข้น 100 เท่า)		
—โซเดียม เอทธีลีนไดอามีน เตทตระอาซิเตท [sodium ethylenediamine tetraacetate: $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$]	0.037	3.725
—เฟอร์รัสซัลเฟต [ferrous sulphate: $FeSO_4.7H_2O$]	0.028	2.875

<u>หมายเหตุ</u> (สารต่อไปนี้ให้ชั่งก่อนเตรียมอาหารทุกครั้ง)

- **<u>ไตรแคลเซียมฟอสเฟต</u>** (Ca_3PO_4) ใช้ 0.2 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร ละลายด้วยกรดเกลือ (HCl) ความเข้มข้น 1N ประมาณ 2 – 3 มิลลิลิตร หรือจนกว่าสาร

ละลายใส จึงเติมน้ำกลั่นประมาณ 5 – 10 มิลลิลิตร (สารละลายยังคงสภาพใส เหมือน เดิมไม่มีตะกอนขุ่นขาว)

- **น้ำตาลซูโครส** ชั่งน้ำหนัก 10 – 20 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร
- **น้ำมะพร้าว** ใช้น้ำมะพร้าวอ่อนผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบาง อาจจะต้มหรือไม่ต้มก็ได้ โดยทั่วไปมักใช้น้ำมะพร้าว 100 – 200 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 1 ลิตร
- **กล้วย** ชั่งกล้วยหอมที่ยังห่าม (ไม่ควรใช้กล้วยดิบเพราะมียางเหนียวทำความสะอาดยาก) 50 – 100 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้
- **มันฝรั่ง** ล้างให้สะอาดปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋านำไปต้ม (ชั่งมันฝรั่ง 100 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร สำหรับสูตรอาหารที่ใช้น้ำมันฝรั่ง และใช้มันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตรสำหรับอาหารที่ใส่เนื้อมันฝรั่งบด)
- **ถ่าน** ใช้ถ่านบริสุทธิ์ที่บดละเอียด (activated charcoal) ความเข้มข้น 0.2 – 1% โดยน้ำหนัก
- **วุ้น** ใช้ 6 – 7 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร

ตัวอย่างสูตรอาหาร VW สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

1. อาหารเหลวสูตร VW_1

ประกอบด้วย อาหารสูตร VW + น้ำมะพร้าว 15% โดยปริมาตร + น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร

2. อาหารแข็งสูตร VW_2

ประกอบด้วย อาหารสูตร VW + น้ำมันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตร + กล้วยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร + น้ำมะพร้าว 10% โดยปริมาตร + น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร + ผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร

3. อาหารแข็งสูตร VW_3

ประกอบด้วย อาหารสูตร VW + มันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตร + กล้วยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร + น้ำมะพร้าว 15% โดยปริมาตร + น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร + ผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร

ผนวก 4

การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวพืช

การเตรียมน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ

1) นึ่งฆ่าเชื้อน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ขวดละประมาณ 90 มิลลิลิตร ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2) เติมสารละลายคลอร็อกซ์ (Clorox) หรือไฮเตอร์ (ซึ่งมีสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์เป็นองค์ประกอบ) ลงในน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ ดังนี้

- ความเข้มข้น 10% เติมคลอร็อกซ์ / ไฮเตอร์ ประมาณ 10 มิลลิลิตร
- ความเข้มข้น 5% เติมคลอร็อกซ์ / ไฮเตอร์ ประมาณ 5 มิลลิลิตร

3) หยดน้ำยาจับใบ (Tween 20) ประมาณ 1 – 2 หยด ลงในสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10%

สารละลายที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวพืช[1]

สารเคมี	ความเข้มข้น (%)	ระยะเวลา (นาที)
แคลเซียมไฮโปคลอไรท์	9 – 10	5 – 30
โซเดียมไฮโปคลอไรท์	0.5 – 5	5 – 30
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	3 – 12	5 – 15
เอทธิลแอลกอฮอล์	70 – 95	0.1 – 5
ซิลเวอร์ไนเตรท	1.0	5 – 30
เมอร์คูริคคลอไรด์	0.1 – 1.0	2 – 10

[1] ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้สำหรับฟอกฆ่าเชื้อ และระยะเวลา อาจต้องพิจารณาปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสมของเนื้อเยื่อพืช

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

1) เลือกหน่ออ่อนกล้วยไม้ที่มีใบปรากฏ 3 – 5 ใบ สำหรับกล้วยไม้พวก sympodial (ได้แก่สกุลหวาย แคทลียา ฯลฯ) และสำหรับกล้วยไม้ ประเภท monopodial (ได้แก่ แวนด้า ม็อคคาร่า แอสโคเซนดร้า ฯลฯ) ใช้ส่วนปลายยอดซึ่งมีใบ 2 คู่

2) ล้างชิ้นส่วนพืชให้สะอาดด้วยน้ำสบู่ ล้างผ่านน้ำไหล ลอกกาบใบออก จากนั้นจึงนำมาตัดให้สั้น แช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร นาน 10 – 15 นาที

3) [ทำภายในตู้ปลอดเชื้อ]

ใช้ปากคีบย้ายชิ้นส่วนพืชจากสารละลายคลอร็อกซ์ เข้มข้น 10% มาแช่ลงในสารละลายคลอร็อกซ์ เข้มข้น 5% นาน 5 นาที ล้างคลอร็อกซ์ออกด้วยน้ำกลั่น ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง

4) เทน้ำออก

5) ลอกกาบใบออก เจาะเนื้อเยื่อตาข้าง ปลายยอด / นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW

6) สำหรับการตัดเนื้อเยื่อเจริญควรทำใต้กล้องสเตอริโอ ภายในตู้ปลอดเชื้อ เพื่อให้สามารถตัดเนื้อเยื่อเจริญที่มีขนาดเล็กมากๆ (0.2 – 0.5 มิลลิเมตร) ได้ง่ายขึ้น