คู่มือ

การถ่ายทอดองค์ความรู้และเทคโนโลยี การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก (Training on Aquatic Plants Tissue Culture for Export)

โดย

ดร. กาญจนรี พงษ์ฉวี
นายรัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์
นางสาววรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย

กองวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด กรมประมง

ได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัย
โครงการจัดการความรู้และถ่ายทอดเทคโนโลยีจากผลงานวิจัยและนวัตกรรม
จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2559

สารบาญ

	หน้า
บทนำ	1
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ	8
ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ	13
อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ	22
การฆ่าเชื้ออุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	30
ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ	31
การเก็บรักษาพันธุ์พรรณไม้น้ำด้วยเทคนิคการทำเมล็ดเทียม	56
การปรับสภาพพรรณไม้น้ำจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก่อนออกปลูกภายนอก	59
การปลูกเลี้ยงพรรณไม้น้ำ	62
การปักชำพรรณไม้น้ำใต้น้ำ	92
เอกสารอ้างอิง	95

บทนำ

พรรณไม้น้ำ ได้แก่ พืชที่มีส่วนสังเคราะห์แสงอยู่ในน้ำตลอด หรืออยู่ในน้ำเป็นระยะเวลาหลายเดือน และพืชที่ลอยอยู่บนผิวน้ำ รวมถึงพืชชั้นต่ำ ได้แก่ เฟิร์นน้ำ และมอสน้ำ ตลอดจนพืชที่ต้องเจริญอยู่ในน้ำในช่วงระยะเวลาหนึ่งของช่วงชีวิต เช่น มีระยะที่งอกอยู่ใต้น้ำหรือเจริญอยู่ ในน้ำได้เมื่อมีน้ำท่วมถึงตามฤดูกาล ปัจจุบันมีการนำพรรณไม้น้ำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน ทั้งเป็นพืชอาหาร สมุนไพร เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีการผลิตเพื่อการส่งออก ได้แก่ พรรณไม้น้ำสวยงามประดับตู้ปลา หรือจัดสวนน้ำ ตลอดจนใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำ เป็นต้น

สามารถจำแนกพรรณไม้น้ำได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1. พืชที่เจริญอยู่ในน้ำ (Hydrophytes) หมายถึง พืชที่เจริญใต้น้ำทั้งต้น หรือมีบางส่วนที่เจริญอยู่ใต้น้ำ พืชในกลุ่มนี้จะมีการปรับตัวให้มีชีวิตอยู่ในน้ำ เช่น มีสารเคลือบผิวใบ (cuticle) น้อย และปากใบ (stomata) ลดลง ใบที่ลอยน้ำจะมีปากใบเฉพาะด้านบนของใบ ส่วนใบที่อยู่ใต้น้ำจะไม่มีปากใบ

2. พืชที่ขึ้นอยู่บริเวณที่ชื้นแฉะ (Helophytes) พบเจริญตามชายน้ำ หนอง บึง ที่ลุ่มน้ำขัง น้ำตก บริเวณที่ชื้นแฉะ แต่สามารถเจริญอยู่ใต้น้ำ หรือลอยในน้ำได้เป็นระยะเวลานาน เช่น บัวบก ผักแว่น และมอสน้ำ เป็นต้น

นอกจากนี้ยังจำแนกประเภทของพรรณไม้น้ำตามลักษณะการเจริญเติบโตและแหล่งที่อยู่อาศัยได้เป็นประเภทต่างๆ ดังนี้

1. พืชลอยน้ำ (Floating plants) เป็นพรรณไม้น้ำที่เจริญอยู่บริเวณผิวน้ำ ลอยน้ำไปได้อย่างมีอิสระ ไม่มีส่วนใดๆ สัมผัสดิน แต่ถ้าระดับน้ำลงลดตื้นเขิน รากอาจจะฝังดินและยึดดินได้ มักมีอวัยวะที่เปลี่ยนไปเป็นทุ่นเพื่อช่วยในการลอยตัว เช่น ผักตบชวา และกระจับ มีก้านใบพองตัวเป็นทุ่นลอยน้ำ พรรณไม้น้ำประเภทนี้ที่นิยมนำมาปลูกในตู้ปลา และประดับสวนน้ำ ได้แก่ ริคเซีย *Riccia fluitans* L., จอก *Pistia stratiotes* L. และกระจับ *Trapa natans* L. เป็นต้น

ริคเซีย

กระจับ

2. พืชใต้น้ำ (Submerged plants) เป็นพรรณไม้น้ำที่มีทั้งส่วนของต้นเจริญอยู่ใต้น้ำ พรรณไม้น้ำในกลุ่มนี้ประกอบด้วย 2 กลุ่ม คือพืชลอยใต้ผิวน้ำและพืชท้องน้ำ โดยพืชลอยใต้ผิวน้ำมีส่วนของใบ ราก และลำต้น แขวนลอยอยู่ใต้ผิวน้ำ เคลื่อนที่ไปโดยกระแสน้ำ มักจะมีลำต้นผอมยาว และใบอ่อนบอบบาง พรรณไม้น้ำประเภทนี้ ได้แก่ สาหร่ายพุงชะโด *Ceratophyllum demersum* L.., สันตะวาหางไก่ *Blyxa japonica* (Miq.) Maxim. ex Asch. & Gürke และสาหร่ายข้าวเหนียว *Utricularia vulgaris* L. เป็นต้น สำหรับพืชท้องน้ำเป็นพรรณไม้น้ำที่ขึ้นอยู่บริเวณพื้นดินใต้น้ำ โดยมีรากยึดที่พื้นท้องน้ำ มีใบและดอกเจริญอยู่ใต้น้ำทั้งต้น พรรณไม้น้ำประเภทนี้ ได้แก่ สันตะวาใบข้าว *Blyxa echinosperma* (Clarke) Hook. และเทป *Vallisneria* spp. เป็นต้น

สาหร่ายพุงชะโด

เทปยักษ์

3. พืชเหนือน้ำ (Emerged plants) เป็นพรรณไม้น้ำที่ขึ้นอยู่บริเวณพื้นดินใต้น้ำ โดยมีรากยึดที่พื้น มีลำต้นสั้น แข็งแรง มีบางส่วนของต้นอยู่เหนือน้ำโดยมีการเจริญส่งใบขึ้นมาลอยที่ผิวน้ำหรือเหนือน้ำ มีดอกชูขึ้นมาเหนือน้ำ โดยใบที่อยู่เหนือน้ำมักจะมีขนาดใหญ่กว่า หนา และแข็งแรงกว่าผิวใบด้านบนมีสารคิวตินเคลือบอยู่เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ พรรณไม้น้ำประเภทนี้ เช่น ไส้ปลาไหล *Barclaya longifolia* Wall., บัวสาย *Nymphaea lotus* L., บัวเผื่อน *Nymphaea nouchali* var. *versicolor* (Sims.) และบัวหลวง *Nelumbo nucifera* Gaertn. เป็นต้น

ไส้ปลาไหล

บัวสาย

4. พืชชายน้ำ (Marginal plants) ประกอบด้วยพรรณไม้น้ำกลุ่มที่เป็นพืชครึ่งบกครึ่งน้ำ และพืชริมฝั่ง โดยพรรณไม้น้ำที่เป็นพืชครึ่งบกครึ่งน้ำมักขึ้นอยู่บริเวณน้ำตื้น หรือใกล้ฝั่ง มีรากยึดดิน ส่วนล่างของต้นอยู่ใต้น้ำและมีส่วนบนของต้นอยู่เหนือน้ำ พรรณไม้น้ำในกลุ่มนี้ ได้แก่ พืชในสกุลใบพาย *Cryptocoryne* spp., ดาวน้อย *Pogostemon helferi* (Hook. f.) Press, คล้าน้ำ *Schumannianthus dichotomus* (Roxb.) Gagnep. และตาลปัตรฤาษี *Limnocharis flava* (L.) Buchenau เป็นต้น สำหรับกลุ่มพืชริมฝั่งเป็นพรรณไม้น้ำที่ขึ้นอยู่บริเวณริมตลิ่ง หนองน้ำ หรือที่มีน้ำท่วมขัง และที่ชื้นแฉะ โดยมีบางส่วนของต้นจมน้ำหรือเจริญใต้น้ำได้เมื่อเกิดน้ำท่วม พรรณไม้น้ำในกลุ่มนี้ ได้แก่ ผักเป็ดแดง *Alternanthera sessilis* (L.) R. Br. ex DC., ผักแว่น *Marsilea minuta* L., โรทาลา ทับทิม *Rotala rotundifolia* (Buch.-Ham. ex Roxb.) Koehne, รากดำใบใหญ่ *Bolbitis heteroclita* (C. Presl) Ching และมอสน้ำ *Vesicularia dubyana* (Müll. Hal.) Broth. เป็นต้น

โรทาลา ทับทิม

ดาวน้อย

ส่วนการจัดแบ่งประเภทของพรรณไม้น้ำสำหรับจัดตู้ปลา ตามลักษณะของต้น เพื่อประโยชน์ในการดูแลรักษา สามารถแบ่งได้เป็น 4 ประเภทคือ

1. พรรณไม้น้ำประเภทไม้กอ (Rosette plants) ได้แก่ พรรณไม้น้ำที่มีใบแตกออกจากโคนต้นเป็นกอ เช่น อนูเบียส *Anubias* spp., ชบาน้ำ *Aponogeton* spp., ใบพาย *Cryptocoryne* spp., อเมซอน *Echinodorus* spp., บัว *Nymphaea* spp. และเทป *Vallisneria* spp. เป็นต้น พรรณไม้น้ำประเภทนี้ส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตช้า มักจะไม่ต้องมีการตัดตกแต่ง จึงเหมาะสำหรับการปลูกประดับบริเวณหน้าตู้ปลา (ชนิดที่มีขนาดเล็ก) และกลางตู้ปลา (ชนิดที่มีขนาดปานกลาง) สำหรับชนิดที่มีใบยาว และมีขนาดต้นสูง เช่น เทปเหมาะสำหรับปลูกบริเวณส่วนหลังตู้ปลา

Cryptocoryne wendtii de Wit

Echinodorus cordifolius ‘Marble queen’

Anubias barteri ‘Wrinkle leave’

Ophiopogon pusillus

2. พรรณไม้น้ำประเภทไม้ข้อ (Stem plants) ได้แก่ พรรณไม้น้ำที่มีลำต้นแตกเป็นข้อยาว และมีใบแตกออกจากข้อ เช่น ทับทิม *Rotala rotundifolia* (Buch.-Ham. ex Roxb.) Koehne, สาหร่ายแปรงล้างขวด *Rotala wallichii* (Hook. f.) Koehne, ขาไก่ *Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson, หลิวน้ำ *Hygrophila angustifolia* R. Br., หางนกยูงแดง *Hygrophila corymbosa* (Blume) Lindau และดาวกระจาย *Hygrophila difformis* Blume เป็นต้น พรรณไม้น้ำประเภทนี้ส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตเร็ว ต้องมีการตัดตกแต่งบ่อย จึงเหมาะสมสำหรับการปลูกประดับบริเวณส่วนหลังตู้ปลา

สาหร่ายแปรงล้างขวด

ดาวกระจาย

หลิวน้ำ

ขาไก่

3. พรรณไม้น้ำประเภทพืชชั้นต่ำ ได้แก่ เฟิร์นน้ำสกุล *Microsorium* และ *Bolbitis* มอสน้ำ *Vesicularia* spp. และริคเซีย *Riccia fluitans* L. เป็นกลุ่มของพรรณไม้น้ำที่สามารถเจริญยึดเกาะกับวัสดุต่างๆ ได้ จึงนิยมนำมาปลูกให้เกาะบนก้อนหิน ขอนไม้ หรือวัสดุอื่นๆ เพื่อเพิ่มความสวยงาม ก่อนนำมาปลูกประดับในตู้ปลา

รากดำใบยาว

ริคเซีย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพมีบทบาทอย่างมากต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มผลผลิต และการปรับปรุงพันธุ์พืชได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ โดยเทคโนโลยีชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture) ซึ่งคือการนำส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ยอด ใบ ดอก คัพภะ หัว ราก เนื้อเยื่อ เซลล์ และโปรโตพลาสต์ มาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุ วิตามิน น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยมีการควบคุมปัจจัยสภาพแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ และแสง เพื่อให้เกิดการเจริญและเติบโตเป็นส่วนต่างๆ ของพืช หรือ เป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ทั้งต้นที่สามารถเจริญเติบโตได้ต่อไป เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชมีคุณสมบัติการแบ่งตัวของเซลล์ที่จะเจริญกลายเป็นต้นสมบูรณ์ได้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงมีประโยชน์ในการเพิ่มจำนวนต้นพืชได้อย่างรวดเร็ว ภายในระยะเวลาสั้น ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชซึ่งเป็นเซลล์ร่างกายเหล่านี้จะมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ (clone) เนื่องจากมีสารพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ที่ได้คัดเลือกมาเป็นต้นพันธุ์ จึงเรียกได้ว่าเป็นการโคลนนิ่ง (cloning) ซึ่งเป็นการสร้างต้นพืชขึ้นมาใหม่ โดยไม่ได้อาศัยการปฏิสนธิของเซลล์สืบพันธุ์ แต่ใช้เซลล์ร่างกาย (somatic cell) ของพืช ทำให้ได้ต้นพันธุ์ปริมาณมากที่มีลักษณะดีเหมือนกันกับต้นแม่ที่คัดเลือกมาขยายพันธุ์ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตได้ทั้งปี ไม่ต้องรอฤดูกาล โดยสามารถจำแนกประโยชน์ได้ดังนี้

1. การขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำจำนวนมาก

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทสำคัญมากในการผลิตพรรณไม้น้ำเชิงพาณิชย์ เนื่องจากเป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่ทำให้ได้ต้นอ่อนปริมาณมาก สม่ำเสมอ ในระยะเวลาสั้น จึงช่วยแก้ปัญหาการขาดแคลนต้นพันธุ์สำหรับพรรณไม้น้ำบางชนิดที่มีการขยายพันธุ์ได้ช้าโดยวิธีการขยายพันธุ์ปกติ นอกจากนี้การขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังทำให้ได้ต้นพันธุ์ที่สะอาด ปราศจากโรคแมลงศัตรูพืช มีความแข็งแรงเติบโตได้ดี จึงเหมาะสำหรับการนำออกปลูกเลี้ยงในโรงเรือนแบบปิด (green house) ด้วยวิธีการเลี้ยงในระบบไร้ดิน (soilless culture) เพื่อให้สามารถควบคุมคุณภาพของผลผลิตได้ตามมาตรฐานส่งออก

Cryptocoryne albida ‘Red’ (ซ้าย) และ *Echinodorus* ‘Ozelot’ (ขวา) เพิ่มปริมาณต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. การผลิตพรรณไม้น้ำปลอดโรค

การขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีการใช้เทคนิคปลอดเชื้อในทุกขั้นตอนการผลิตตั้งแต่การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อ การใช้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และการใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในการปลูกถ่ายชิ้นเนื้อเยื่อพืชในตู้ปลอดเชื้อ นอกจากนี้หากเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยงมีการปนเปื้อนเชื้อรา แบคทีเรีย จะมีเชื้อเหล่านี้ปรากฏให้เห็นปนเปื้อนอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งสามารถตรวจสอบและกำจัดได้ง่าย จึงทำให้สามารถผลิตพรรณไม้น้ำให้ปราศจากเชื้อโรคเช่น เชื้อรา และแบคทีเรีย ตลอดจนแมลงศัตรูพืช นอกจากนี้ยังสามารถผลิตพรรณไม้น้ำที่ปลอดเชื้อไวรัส โดยการนำเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (apical meristem) และเนื้อเยื่อของคัพภะ (embryonic tissues) ที่อยู่ในเมล็ด มาเพาะเลี้ยง จะทำให้ได้ต้นอ่อนที่ปลอดเชื้อไวรัส เนื่องจากเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีส่วนของท่อลำเลียง (vascular tissues) ที่จะติดต่อกับส่วนต่างๆของพืชที่เชื้อไวรัสจะสามารถเคลื่อนย้ายมาปนเปื้อนได้

3. การปรับปรุงพันธุ์

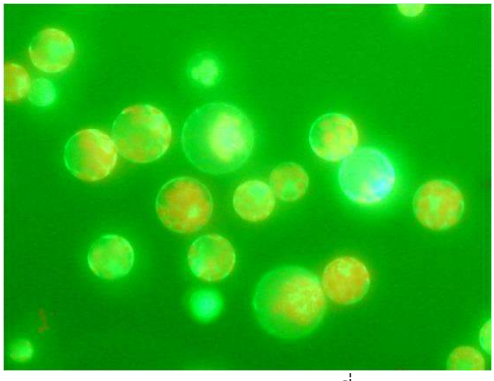
เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ เช่นการสร้างพืชลูกผสมใหม่ซึ่งไม่สามารถทำให้สำเร็จได้ด้วยวิธีการผสมแบบปกติ การรวมตัวของเซลล์ไร้ผนัง (protoplast fusion) การผสมเกสรในหลอดทดลอง การสร้างพืชที่มีโครโมโซมต่างจากปกติโดยการใช้สารโคลชิซิน (colchicine) การตัดต่อ ดี เอน เอ (DNA recombination) และการถ่ายยีน (gene transformation) ทำให้สามารถผลิตพืชสายพันธุ์ใหม่ (transgenic plants) ตลอดจนการฉายรังสีเพื่อให้เกิดลักษณะแปลกใหม่ เช่น การฉายรังสีแกมมาให้กับต้นอ่อนพรรณไม้น้ำอนูเบียสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และคัดเลือกพันธุ์กลายในสภาพหลอดทดลองทำให้ได้ต้นกลายพันธุ์ที่มีลักษณะแตกต่าง เช่น ได้ต้นอนูเบียสแคระหรือต้นอนูเบียสที่มีลักษณะของใบ

เปลี่ยนแปลง (กาญจนรี และคณะ, 2550) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชยังมีประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ต้านทานและทนทาน (tolerance plants) เช่น ต้านทานสารกำจัดวัชพืช แมลง คัดเลือกสายพันธุ์พืชทนต่อสภาพดินกรด ดินเค็ม ดินเปรี้ยว เป็นต้น ตลอดจนการช่วยชีวิตคัพภะ (embryo rescue) ในกรณีพืชผสมข้ามพันธุ์บางชนิด ไข่ที่ได้รับการผสมแล้ว (zygote) ไม่สามารถเจริญต่อไปเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้ การนำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์จะช่วยให้ลูกผสมเจริญพัฒนาเป็นต้นได้

Anubias congensis ต้นปกติ

Anubias congensis ต้นพันธุ์กลายจากการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีลักษณะใบด่างและต้นเตี้ยแคระ (กาญจนรี, 2550)

Anubias congensis ต้นปกติ (ซ้าย) และต้นกลายพันธุ์จากการใช้รังสีแกมมา (ขวา)
ที่มา: กาญจนรี, 2550



โปรโตพลาสต์ของ *Cryptocoryne wendtii* De Wit. ที่มา: Pongchawee *et al*., 2007

4. การผลิตยาหรือสารเคมีจากพืช

พืชบางชนิดสามารถผลิตสารประกอบทางเคมีที่มีประโยชน์ซึ่งเป็น secondary metabolites เช่นเป็นยารักษาโรค อายุรเวช ผลิตภัณฑ์เสริมความงาม หรือเป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เป็นต้น อย่างไรก็ตามการสกัดสารที่เป็นประโยชน์เหล่านี้จากต้นพืชปกติอาจได้ปริมาณสารน้อย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อชักนำให้เกิดมีการสังเคราะห์สารที่ต้องการให้มีปริมาณมากขึ้น เช่น การชักนำให้เกิดแคลลัสขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนของพืช แล้วจึงนำแคลลัสนั้นๆ มาสกัดสารที่เป็นประโยชน์ หรือการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้สารที่เป็นประโยชน์ปริมาณมากในสภาพปลอดเชื้อ ก่อนนำมาขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณเพื่อนำไปสกัดสารที่ต้องการ

5. การเก็บรักษาพันธุ์

การเก็บรักษาพันธุ์พรรณไม้น้ำมีประโยชน์ทั้งในด้านการอนุรักษ์ และการนำไปใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะพืชที่หายาก พืชที่ใกล้สูญพันธุ์ และมีเฉพาะถิ่น เก็บรักษาเชื้อพันธุ์พรรณไม้น้ำ (Germplasm conservation) ในสภาพหลอดทดลอง เป็นวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พรรณไม้น้ำที่ไม่สามารถเก็บเมล็ดได้ โดยการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ให้ยาวนานสามารถทำได้โดยการเก็บรักษาชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของพืช เช่นชิ้นส่วนปลายยอดในสภาพหลอดทดลองภายใต้อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส โดยใช้ไนโตรเจนเหลว เรียกวิธีนี้ว่า cryopreservation ซึ่งจะเก็บรักษาไว้ได้เป็นระยะเวลานาน หรือการเก็บรักษาต้นพืชในหลอดทดลองโดยใช้สารชะลอการเจริญเติบโต หรือลดความเข้มข้นของธาตุอาหารที่เป็นส่วนผสมหลักของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตลอดจนการใช้เทคนิคเมล็ดเทียม ทำให้สามารถเก็บรักษาต้นพืชได้ในสภาพหลอดทดลองเป็นระยะเวลานานโดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหารใหม่ ดูแลรักษาง่าย ไม่เปลืองพื้นที่ ประหยัดเวลาและแรงงาน เมื่อต้องการจะปลูกจึงนำมาชักนำให้เกิดต้น เพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการ และย้ายปลูกในสภาพธรรมชาติ

การเก็บรักษาพรรณไม้น้ำในสภาพหลอดทดลอง

นอกจากนี้ยังใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการเพาะขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำที่หายาก หรือที่ใกล้สูญพันธุ์ เป็นการรักษาพันธุ์ให้คงอยู่พร้อมทั้งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ หรือนำลูกพันธุ์กลับไปปลูกฟื้นฟูในแหล่งอาศัยเดิมเช่นการดำเนินงานโครงการอนุรักษ์พรรณไม้น้ำพลับพลึงธาร เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

ต้นอ่อนพลับพลึงธารจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ

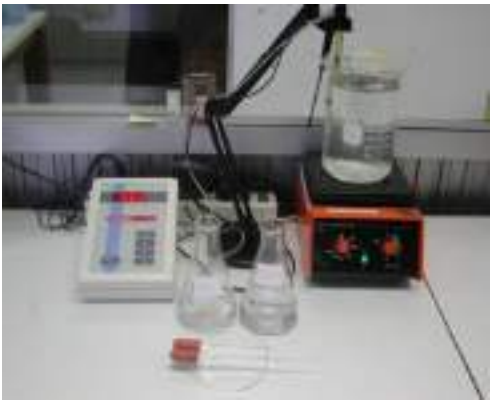
การจัดแบ่งพื้นที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำจะต้องคำนึงถึงความสะดวกในการปฏิบัติงานเป็นหลักสำคัญ โดยทั่วไปมักแบ่งพื้นที่เป็นส่วนๆ ตามลักษณะการใช้งาน ได้แก่

1. ห้องเตรียมอาหาร (Media preparation room)

แบ่งเป็นส่วนที่จัดเก็บอุปกรณ์เครื่องแก้ว สารเคมี ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการเตรียมอาหารได้สะดวก และส่วนล้างทำความสะอาดอุปกรณ์ อุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับห้องนี้ เช่น ตู้เก็บเครื่องแก้ว ตู้เก็บสารเคมี ตู้เย็นสำหรับเก็บสารละลายต้นตอ (stock solution) หม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) เครื่องชั่งไฟฟ้า (balance) เครื่องวัด pH เตาอุ่นความร้อนและเครื่องกวน (hot plate and stirrer) ตู้เย็น ไมโครเวฟ เตาแก๊ส และอ่างล้างอุปกรณ์ เป็นต้น

เครื่องชั่งไฟฟ้า ชนิด 2 ตำแหน่ง

เครื่องชั่งไฟฟ้า ชนิด 4 ตำแหน่ง



เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (ซ้าย) และเครื่องกวน (ขวา)

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง ชนิดใช้ไฟฟ้า

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง ชนิดใช้แก๊ส

2. ห้องถ่ายเนื้อเยื่อ (Sterile transfer room)

ห้องถ่ายเนื้อเยื่อเป็นส่วนที่จะต้องมีความสะอาดที่สุด ปิดมิดชิด มีผู้ผ่านเข้าออกน้อย หรือเข้าได้เฉพาะผู้ปฏิบัติงานเท่านั้น อุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับห้องนี้ เช่น ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (laminar flow hood) มีอุปกรณ์กรองอากาศให้ปราศจากเชื้อโรค และมีหลอดรังสียูวีช่วยในการฆ่าเชื้อ อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ เช่น ใบมีดผ่าตัด ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์ เป็นต้น ชั้นวางอุปกรณ์ รถเข็นที่มีชั้น 3 ชั้นสำหรับเคลื่อนย้ายขวดอาหารและขวดเพาะเลี้ยง เป็นต้น สำหรับตู้ถ่ายเนื้อเยื่อก่อนใช้งานจะต้องเปิดไฟ UV (ultraviolet) พร้อมทั้งปิดพัดลมทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ภายในตู้ เมื่อจะใช้งานจึงปิดไฟ UV และทำความสะอาดอุปกรณ์ที่นำเข้าไปใช้ในตู้ด้วยการฉีดพ่นหรือเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ (ethanol) 70% อย่างไรก็ตามแอลกอฮอล์ที่มีจำหน่ายเป็นแอลกอฮอล์ 95% ดังนั้นการเตรียมแอลกอฮอล์ 70% จำนวน 1 ลิตร จึงทำได้โดยการตวงแอลกอฮอล์ 95% จำนวน 737 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 263 มิลลิลิตร

ห้องถ่ายเนื้อเยื่อที่กลุ่มวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ

ตู้ปลอดเชื้อ (lamina air-flow cabinet)

ตู้ปลอดเชื้ออย่างง่าย

ตะเกียงแอลกอฮอล์

ตะเกียงแบบใช้แก๊ส

อุปกรณ์ฆ่าเชื้อแบบใช้ไฟฟ้า

การถ่ายเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำในตู้ปลอดเชื้อ

3. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Culture room)

ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องเป็นห้องที่มีการรักษาความสะอาดเป็นพิเศษ เพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ให้เหลือน้อยที่สุด มีอุปกรณ์ที่จำเป็น เช่น เครื่องปรับอากาศ ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ พร้อมอุปกรณ์ให้แสงสว่าง และเครื่องเขย่า การควบคุมปัจจัยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ ได้แก่ การให้แสง 12-16 ชั่วโมง/วัน จึงควรมีเครื่องควบคุมการตั้งเวลาอัตโนมัติ ส่วนความเข้มของแสงประมาณ 2,000-4,000 ลักซ์ ขึ้นกับชนิดพืช สำหรับพรรณไม้น้ำจะใช้ความเข้มแสงประมาณ 1,000-3,000 ลักซ์ โดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ ชนิด daylight หรือหลอดพิเศษที่ให้สัดส่วนของแสงสีแดงและสีน้ำเงินสูง ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์แสงได้โดยตรงทำให้เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตได้ดี เมื่อติดตั้งหลอดไฟบนชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อควรให้มีระยะห่างจากหลอดไฟถึงขวดเนื้อเยื่อประมาณ 30 เซนติเมตร นอกจากนี้ควรมีการควบคุมอุณหภูมิในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำโดยทั่วไปคือประมาณ 25±2 องศาเซลเซียส

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์

1. เครื่องแก้ว (glassware) ชนิดต่าง ๆ ได้แก่
    1.1 บีกเกอร์ (beaker)
    1.2 กระบอกตวง (cylinder)
    1.3 ปิเปตต์ (pipette)
    1.4 ขวดรูปชมพู่ (flask และ volumetric flask)
    1.5 ขวดเก็บสารละลายเข้มข้น

1.6 หลอดทดสอบ (test tube)
1.7 ขวดแก้ว (vials) สำหรับบรรจุอาหาร
1.8 ขวดหยด
1.9 แท่งแก้วคนสาร
1.10ขวดน้ำกลั่น

2. เครื่องชั่งไฟฟ้า (balances) ชนิด 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง

3. เครื่องกวนสารแบบแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และเตาอุ่นความร้อน (hot plate) ใช้ในการเตรียมสารละลาย สำหรับทำอาหารสังเคราะห์

4. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

5. หม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) ใช้ในการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารสังเคราะห์ และอุปกรณ์เครื่องมือ โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

6. ตู้เย็น (refrigerator) ใช้เก็บสารละลายเข้มข้น (stock solution) และฮอร์โมน

7. เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven) ใช้ในการหลอมอาหารปริมาณไม่มาก

8. เตาแก๊ส และหม้อต้ม ใช้ในการหลอมอาหารปริมาณมาก

9. รถเข็น ใช้ในการขนย้ายอาหาร สารเคมี และอุปกรณ์ต่างๆ

10. เครื่องมือผ่าตัด เช่น ด้ามมีดผ่าตัด ใบมีดผ่าตัดขนาดต่างๆ

11. ตู้เก็บสารเคมีและเครื่องแก้ว

12. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ช้อนตักสาร แปรงล้างขวด ถุงมือกันความร้อน

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการถ่ายเนื้อเยื่อ

1. ตู้ปลอดเชื้อ (lamina air-flow cabinet) เป็นตู้ปลอดเชื้อสำหรับถ่ายเนื้อเยื่อ
2. รถเข็น สำหรับวางขวดแก้วบรรจุอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ และอุปกรณ์อื่นๆ
3. ปากคีบ (forceps) ใช้ในการจับชิ้นส่วนเนื้อเยื่อขณะตัด
4. ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด (knives and scalpel) ใช้ในการตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ
5. จานแก้ว (Petri dish) ใช้ในการรองตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ
6. กระดาษที่ใช้ในการรองตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ
7. ตะเกียงบุนเสน ตะเกียงแก๊ส หรือเครื่องฆ่าเชื้อชนิดใช้ไฟฟ้า สำหรับฆ่าเชื้ออุปกรณ์ที่ใช้ในตู้ปลอดเชื้อ

8. ถาดสแตนเลส หลอดแก้ว หรือขวดแก้ว ใช้บรรจุแอลกอฮอล์สำหรับจุ่ม หรือแช่ฆ่าเชื้ออุปกรณ์

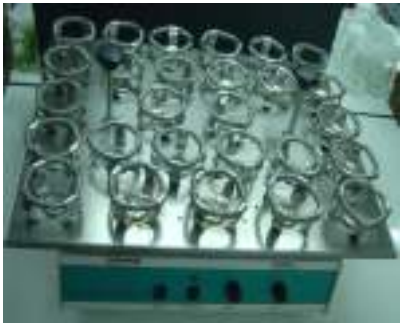
9. ขวดแก้ว หรือหลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

10. วัสดุอื่นๆ เช่น ขวดรูปชมพู่ แผ่นกระดาษอลูมิเนียม (aluminium foil) ปิเปตต์ (pipette)

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ พร้อมหลอดไฟให้แสงกับพืช
2. เครื่องเขย่า (shaker) ใช้สำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือเซลล์พืชในอาหารเหลว
3. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (temperature controller) ได้แก่ เครื่องปรับอากาศ
4. เครื่องควบคุมเวลา (timer) ใช้ควบคุมการปิด-เปิดไฟอัตโนมัติ

ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ



เครื่องเขย่า (shaker)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

รถเข็น (troller)

อุปกรณ์เครื่องแก้วที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ

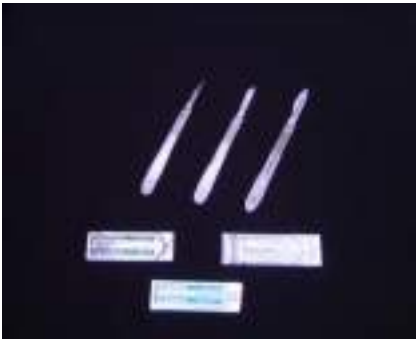
บีกเกอร์ (beaker)

ขวดรูปชมพู่ (flask)

กระบอกตวง (cylinder)

ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask)

หลอดทดสอบ (test tube) และขวดแก้ว (vials) สำหรับบรรจุอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช



ด้ามมีดผ่าตัดและใบมีดผ่าตัดขนาดต่างๆ

ปากคีบ (forceps)

ช้อนตักสารและกระดาษชั่งสาร

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำส่วนใหญ่ จะใช้อาหารสูตร MS ที่มีการปรับธาตุอาหาร วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตให้เหมาะสม ขึ้นกับชนิดพันธุ์ ชิ้นส่วนพืช อายุ ระยะการพัฒนา และเป้าหมายของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากพรรณไม้น้ำแต่ละชนิดมีความต้องการธาตุอาหาร เกลือแร่ และวิตามินต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน องค์ประกอบของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ สารอนินทรีย์ (inorganic salts) สารประกอบอินทรีย์ (organic compounds) สารที่ได้จากธรรมชาติ (complex natural products) และสารไม่ออกฤทธิ์ (inert materials)

1. สารอนินทรีย์ (Inorganic compound) ได้แก่ เกลือแร่ต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยต้องมีในปริมาณและสัดส่วนที่เหมาะสม เนื่องจากหากใช้ในปริมาณที่สูงเกินไปอาจเป็นพิษต่อพืช ในขณะเดียวกันถ้ามีปริมาณต่ำเกินไปพืชอาจมีการเจริญเติบโตที่ไม่สมบูรณ์ได้ แร่ธาตุที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของพืชมีดังนี้

1.1 ธาตุอาหารหลัก (Macro elements) เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โปแตสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และซัลเฟอร์ (S) ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิค คลอโรฟิลล์ และฮอร์โมนพืชบางชนิด ทำหน้าที่ช่วยในการสังเคราะห์โปรตีน หรือสังเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์ การขาดไนโตรเจนจะทำให้ใบเหลือง ต้นแคระแกร็น แหล่งของไนโตรเจนได้แก่ สารประกอบแอมโมเนียม (NH_4^+) และไนเตรต (NO_3^-) สำหรับฟอสฟอรัส มีบทบาทในการกระตุ้นเอ็นไซม์ แหล่งของฟอสฟอรัส ได้แก่ โปแทสเซียมฟอสเฟต และโซเดียมฟอสเฟต แคลเซียมช่วยในการสร้าง

ผนังเซลล์ นิยมให้ในรูปของเกลือคลอไรด์ (Cl^-) หรือเกลือไนเตรต (NO_3^-) แมกนีเซียมเป็น co-factor ของเอ็นไซม์เป็นองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์และช่วยให้ผนังเซลล์แข็งแรง นิยมให้ในรูปของเกลือซัลเฟต (SO_4^{2-})

1.2 ธาตุอาหารรอง (Micro elements) เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับพืช แต่ต้องการในปริมาณน้อย ได้แก่ แมงกานีส (Mn) สังกะสี (Zn) โบรอน (B) ทองแดง (Cu) เหล็ก (Fe) โคบอลท์ (Co) โมลิบดินัม (Mo) คลอไรด์ (Cl) ไอโอดีน (I) ธาตุอาหารเหล่านี้ส่วนใหญ่จะทำหน้าที่เป็น co-factor ของเอ็นไซม์ในเซลล์ นิยมให้ในรูปสารประกอบเกลือ นอกจากนี้พืชบางชนิดอาจต้องการธาตุอาหารรองชนิดอื่นเพิ่มเติม เช่น อลูมินัม (Al) นิคเกิล (Ni) ซิลิกอน (Si) หรือฟลูออไรด์ (F)

2. สารประกอบอินทรีย์ (Organic compound)

2.1 สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (Carbon source) ได้แก่ น้ำตาล จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืชเนื่องจากเป็นแหล่งพลังงาน โดยทั่วไปน้ำตาลที่นิยมใช้ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส (sucrose) ซึ่งคือน้ำตาลทรายนั่นเอง โดยใช้ที่ความเข้มข้น 2-4 % แต่ในบางกรณีอาจใช้น้ำตาล glucose fructose และ sorbitol ในพืชพวกใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledon) นิยมใช้น้ำตาล glucose แทน sucrose

2.2 วิตามิน (Vitamins) ช่วยในการเจริญเติบโตของพืช วิตามินใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ วิตามิน B1 (Thiamine), วิตามิน B3 (nicotinnicacid), วิตามิน B6 (pyridoxine), วิตามิน C (ascorbic acid), วิตามิน E (tocopherol), biotin และ folic acid เป็นต้น

2.3 กรดอะมิโน (Amino acids) เช่น Glycine, L-arginine, L-aspartic acid, L-cysteine, L-glutamic acid, L-glutamine, L-asparagine เป็นต้น

2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulators) เป็นสารที่เกิดจากธรรมชาติ และสารที่สังเคราะห์ซึ่งมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตที่พืชสร้างขึ้นมาเองจะเรียกว่า ฮอร์โมน โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชแบ่งเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่

2.4.1 ออกซิน (Auxins) ออกซินที่พบในธรรมชาติเป็นสารที่พืชสังเคราะห์จากส่วนเนื้อเยื่อเจริญ ใบอ่อน ดอก ผล และปลายราก มีผลช่วยในการยืดตัวของเซลล์ ส่งเสริมหรือชักนำการแบ่งเซลล์ การเกิดรากและแคลลัส กลุ่มออกซินที่มาจากธรรมชาติ ได้แก่ IAA (indole-3-acetic acid) มีคุณสมบัติที่ถูกทำลายโดยแสงและเอนไซม์ IAA oxidase ซึ่งพบสูงในเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง ดังนั้นการเติม IAA ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงอาจไม่ได้ผล หรือต้องใช้ความเข้มข้นสูง 1-30 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับกลุ่มออกซินที่ได้จากการสังเคราะห์

จะมีฤทธิ์ค่อนข้างสูง และไม่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ จึงมักนิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยใช้ในปริมาณน้อยคือ 0.001-10 มิลลิกรัม/ลิตร โดยการละลายออกซินใช้แอลกอฮอล์ ได้แก่ ethyl alcohol 70-95 % หรือโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เจือจาง (0.1-1 N KOH) ชนิดของออกซินที่นิยมใช้ ได้แก่

IBA (3-lndolebutyric acid)
NAA (1-naphthaleneacetic acid)
CPA (4-Chlorophenoxyacetic acid)
2,4-D (2,4 Dichlorophenoxynacetic acid)
Picloram

2.4.2 ไซโตไคนิน (Cytokinin) มีหน้าที่เร่งการแบ่งเซลล์ ช่วยในกระบวนการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ ชักนำให้เกิดยอด ช่วยการขยายตัวของเซลล์ และชักนำการสังเคราะห์รงค์วัตถุ อัตราที่ใช้ 1-10 มิลลิกรัม/ลิตร ไซโตไคนินเมื่อใช้ร่วมกันกับออกซินในสัดส่วนที่เหมาะสมจะส่งผลให้เกิดการแบ่งเซลล์ เจริญพัฒนาเกิดต้น โดยการละลายไซโตไคนินใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง (NaOH) หรือกรดเกลือเจือจาง (0.1-1 N HCL) ไซโตไคนินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่มาจากธรรมชาติ ได้แก่
  Zeatin
  2-ip 6-(y,y-Dimethylallylamino) purine
- กลุ่มที่ได้จากการสังเคราะห์ ได้แก่
  kinetin
  BAP (6-benzylaminopurine)
  BA (6-benzyladenine)

2.4.3 จิบเบอเรลลิน (Gibberellins) เป็นสารที่สร้างในพืช หรือโดยเชื้อราบางชนิด สลายตัวเมื่อถูกความร้อน มีผลช่วยในการยืดตัวของลำต้น ทำลายการพักตัวของเมล็ด ช่วยกระตุ้นการออกดอกของพืช แต่บางครั้ง gibberellins จะไปยับยั้งการชักนำขบวนการเกิดเป็นอวัยวะพืช เช่น ทำให้การออกรากช้าลง และยับยั้งการเกิดยอด มีการใช้ gibberellins ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอด (shoot tip) เพื่อผลิตต้นพืชปราศจากไวรัส

2.4.5 สารชะลอการเจริญเติบโต (plant growth retardants) สารกลุ่มนี้ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี มีคุณสมบัติชะลอการแบ่งเซลล์ และการยืดตัวของเซลล์ ทำให้พืชมีลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้นลง และยังมีผลทางอ้อมในการเร่งการออกดอกและติดผล เช่น พาโคลบิวทราโซล และอาลาร์ จึงมีผู้นิยมนำมาใช้ในการสร้างพืชลักษณะพิเศษ เช่น ต้นแคระ มีดอกตั้งแต่ต้นมีขนาดเล็ก หรือใช้ในการเก็บรักษาพันธุกรรมพืช Abscisic acid (ABA) ช่วยควบคุม

ขบวนการทางสรีรวิทยาต่างๆ ของพืช เช่น ควบคุมการปิดของปากใบ กระตุ้นการพักตัวของตาและเมล็ด ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบางชนิด ABA จะกระตุ้นให้เกิด somatic embryogenesis

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มที่สำคัญซึ่งนิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ auxins และ cytokinins อัตราส่วนระหว่าง auxin และ cytokinin ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหาร โดยพบว่า อัตราส่วนของ auxin ต่อ cytokinin สูงกว่าอัตราสมดุล เนื้อเยื่อจะพัฒนาไปเป็น callus และราก แต่หากอัตราส่วนของ auxin ต่อ cytokinin ต่ำกว่าอัตราส่วนสมดุล เนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นยอด หากอัตราส่วนของสารทั้ง 2 สมดุล เนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นยอดและราก

2.5 Organic addenda เช่น inositol, adenine, adeninc sulfate, citric acid และ ascorbic acid เป็นต้น inositol ทำหน้าที่คล้ายวิตามินแต่เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ ทำหน้าที่ช่วยการพัฒนาของเซลล์เมมเบรนและผนังเซลล์ โดยทั่วไปใช้ที่ความเข้มข้น 100 mg/l ส่วน adenine หรือ adeninc sulfate ช่วยส่งเสริมให้เกิดยอด citric acid และ ascorbic acid ช่วยลดสารสีน้ำตาลที่บริเวณชิ้นส่วนพืช

2.6. น้ำ เป็นตัวทำละลายในการเตรียมสารละลายโดยนิยมใช้น้ำกลั่น

2.7 วุ้น ทำให้อาหารแข็งตัวเพื่อเป็นที่ยึดเกาะของชิ้นส่วนพืช โดยเป็นวุ้นที่ทำมาจากสาหร่ายทะเลใช้ในอัตรา 0.5-1.3 % หรือใช้เจลไรท์ (gelrite) ที่ทำมาจาก polysaccharide ของแบคทีเรีย ใช้ในอัตรา 0.2 % อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำบางชนิดเหมาะกับอาหารเหลวมากกว่าจึงไม่ต้องใส่วุ้น

2.8 สารอื่นๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังอาจประกอบด้วยสารอินทรีย์อื่นที่เติมเพื่อวัตถุประสงค์บางประการ เช่น ผงถ่าน (activated charcoal) ความเข้มข้น 0.2-0.3 % เพื่อดูดซับสารประกอบบางอย่างที่เนื้อเยื่อขับออกมาในอาหารที่อาจเป็นพิษต่อพืช นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยให้ทำให้ pH คงที่ และทำให้อาหารมีสีดำเพื่อช่วยในการออกราก อย่างไรก็ตามมีข้อควรระวังในการใช้ผงถ่านเนื่องจากผงถ่านจะดูดซับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใส่ไปในอาหารได้ด้วย ทำให้ประสิทธิภาพของสารควบคุมการเจริญเติบโตลดลง นอกจากนี้ยังมีสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ ที่เป็นอาหารเสริม เช่น กล้วยบด ใช้ปริมาณ 100-150 กรัม/ลิตร น้ำมะพร้าวใช้ปริมาณ 10-20 % โดยปริมาตร น้ำมะเขือเทศใช้ปริมาณ 30 % โดยปริมาตร เป็นต้น อาหารเหล่านี้ไม่รู้ส่วนประกอบที่แน่นอน การใช้จึงอาจให้ผลที่ไม่คงที่ได้

ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของอาหาร

ปัจจัยอีกประการหนึ่งที่สำคัญคือความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร ส่วนใหญ่ในการเตรียมอาหารจะปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารให้อยู่ในช่วง 5.6-6.0 เนื่องจากหาก pH สูงมากขึ้น ชิ้นส่วนของพืชจะดูดน้ำและสารอาหารได้ยาก และหาก pH ต่ำกว่า 5.5

จะทำให้เกิดปัญหาวุ้นไม่แข็งตัว เหล็กตกตะกอน ฮอร์โมน auxin และ GA สลายตัว และทำให้การดูดใช้ของ NH_4^+ น้อยลง หาก pH ต่ำกว่า 4.5 หรือสูงกว่า 7.0 เซลล์หรือเนื้อเยื่ออาจหยุดการเจริญเติบโต

การเตรียมสารละลายเข้มข้น (Stock solution)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำนิยมใช้อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) โดยการเตรียมอาหารควรต้องเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นก่อน เนื่องจากสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายชนิด และบางชนิดเมื่อรวมกันอาจเกิดเป็นสารประกอบที่ไม่พึงประสงค์ หรือไม่สามารถละลายได้ทั้งหมด และบางสารใช้น้อยมาก จึงอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการชั่งหากต้องชั่งในปริมาณน้อยมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้นสูงกว่าปกติของที่ใช้ในสูตรอาหาร เมื่อต้องการทำอาหารจึงจะนำมาเจือจางให้เท่ากับความเข้มข้นของสารที่ใช้จริงในสูตรอาหาร

ความเข้มข้นของสารที่ใช้มีหลายหน่วย เช่น

1. เปอร์เซ็นต์ปริมาตร (volume percentage) ใช้กับสารที่เป็นของเหลว เช่น น้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ หมายถึงน้ำมะพร้าว 5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 95 มิลลิลิตร
2. เปอร์เซ็นต์น้ำหนัก (weight percentage) ใช้กับสารที่เป็นผง เช่น น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ หมายถึง น้ำตาล 3 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร
3. น้ำหนักต่อปริมาตร เช่น กรัมต่อลิตร (g/l) มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l) ตัวอย่างเช่น BA 1 mg/l หมายถึง BA 1 มิลลิกรัม ในอาหาร 1 ลิตร

การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งสารเคมีแต่ละชนิด
2. ละลายสารเคมีแต่ละชนิดในน้ำกลั่น
3. รวมสารละลายทุกชนิดเข้าด้วยกัน
4. ปรับปริมาตรสารละลายเข้มข้น

ตัวอย่างการเตรียมสารละลายเข้มข้นของอาหารสูตร MS

Stock 1 Macronutrients

ชื่อสาร	ปริมาณสารในอาหาร (mg/l)	สารละลายเข้มข้น (g/l)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาตรที่ใช้ในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร
NH_4NO_3 (แอมโมเนียมไนเตรท)	1650.0	33.0	20	50 ml
KNO_3 (โปตัสเซียมไนเตรท)	1900.0	38.0		
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (แคลเซียมคลอไรด์)	440.0	8.8		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (แมกนีเซียมซัลเฟต)	370.0	7.4		
KH_2PO_4 (โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต)	170.0	3.4		

Stock 2 Micronutrients

ชื่อสาร	ปริมาณสารในอาหาร (mg/l)	สารละลายเข้มข้น (g/l)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาตรที่ใช้ในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร
H_3BO_3 (กรดบอริค)	6.2	0.62	100	10 ml
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (แมงกานีสซัลเฟต)	22.3	2.23		
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (ซิงค์ซัลเฟต)	8.6	0.86		
KI (โปตัสเซียมไอโอไดด์)	0.83	0.083		
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (โซเดียมโมลิบเดต)	0.25	0.025		
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (คอปเปอร์ซัลเฟต)	0.025	0.0025		
$CoCl_2 \cdot {}_6H2O$ (โคบอลคลอไรด์)	0.025	0.0025		

Stock 3 Iron

ชื่อสาร	ปริมาณสารในอาหาร (mg/l)	สารละลายเข้มข้น (g/l)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาตรที่ใช้ในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร
Na_2EDTA (โซเดียมเอธิลีนไดเอมีนเตตราอะซิเตท)	37.25	3.725	100	10 ml
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (เฟอรัสซัลเฟต)	27.85	2.785		

Stock 4 Organic Components

ชื่อสาร	ปริมาณสารในอาหาร (mg/l)	สารละลายเข้มข้น (g/l)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาตรที่ใช้ในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร
Glycine (ไกลซีน)	2.0	0.2	100	10 ml
Nicotinic acid (กรดนิโคตินิค)	0.5	0.05		
Pyridoxine-HCL (ไพริดอกซีน)	0.5	0.05		
Thiamine-HCl (ไธอามีน)	0.1	0.01		
myo-inositol (อินโนซิทอล)	100.0	10.0		

การเตรียมสารละลายเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต

1. ออกซิน ได้แก่ NAA, IAA, 2,4-D และ IBA นิยมเตรียมที่ความเข้มข้น 100-1,000 เท่า โดยใช้ 50-95 % ethyl alcohol หรือ 1 N NaOH เป็นตัวทำละลาย แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ

2. ไซโตไคนิน ได้แก่ BA, kinetin, zeatin และ 2iP นิยมเตรียมที่ความเข้มข้น 100-1,000 เท่า โดยใช้ 1 N HCL เป็นตัวทำละลาย แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ

การเตรียมอาหารสังเคราะห์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ

เมื่อเลือกสูตรอาหาร และทำการเตรียมสาร stock solution ไว้แล้ว สามารถทำการเตรียมอาหารได้ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. ดูดสารละลายจาก stock solution ต่างๆ มารวมกัน โดยใช้ปริมาตรตามตาราง เช่น ดูดสารละลายจาก stock 1 มา 50 มิลลิลิตร ถ้าต้องการเตรียมอาหาร 1 ลิตร

2. เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น น้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทราย) 3 เปอร์เซ็นต์ หรือปรับเปลี่ยนปริมาณตามความเหมาะสม

3. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสารอื่นๆ ตามความต้องการของสูตรอาหาร

4. ปรับปริมาตรสารละลาย ให้ครบตามที่ต้องการเตรียม เช่นปรับให้ได้ 1 ลิตร

5. ปรับ pH ด้วย 1 N HCL หรือ 1 N KOH ให้ได้ประมาณ 5.6

6. เติมวุ้น กรณีเตรียมอาหารกึ่งแข็ง หรืออาหารแข็ง

7. เคี่ยวอาหารเพื่อหลอมละลายวุ้น

8. เทอาหารลงภาชนะที่ใช้เลี้ยงแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15-20 นาที

ขั้นตอนการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS จำนวน 1 ลิตร

1. ตวงสารละลายธาตุอาหารเข้มข้น stock ที่ 1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2. ใช้ปิเปตต์ ดูดสารละลายธาตุอาหารเข้มข้น stock ที่ 2, 3 และ 4 มาอย่างละ 10 มิลลิลิตร เทลงในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

3. ชั่งน้ำตาล 30 กรัม (3 %) (ใช้เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง) เติมน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วคนให้ละลาย เทลงใน ขวดวัดปริมาตร

4. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตตามที่ต้องการเทลงในขวดวัดปริมาตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

5. เขย่าให้เข้ากัน แล้วเทลงในบีกเกอร์ขนาด 1,500-2,000 มิลลิลิตร

6. ปรับ pH ของอาหารสังเคราะห์ให้ได้ประมาณ 5.6 ด้วย 1 N HCl (ถ้า pH สูงกว่า 5.6) หรือ 1 N KOH (ถ้า pH ต่ำกว่า 5.6)

7. ชั่งผงวุ้น 7 กรัม (0.7 %) เติมลงในอาหารสังเคราะห์ แล้วหลอมละลายวุ้นด้วยความร้อน

8. เทอาหารสังเคราะห์ลงในภาชนะที่ใช้เลี้ยง แล้วปิดฝา นำลงตะกร้าสำหรับนึ่งฆ่าเชื้อ

9. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15-30 นาที ขึ้นกับปริมาตรอาหาร โดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 15 นาที

10. เอาออกจากหม้อนึ่งความดันสูง ทิ้งให้เย็น บันทึกชื่อสูตรอาหารสังเคราะห์และวันที่ผลิตอาหารให้ชัดเจน

การนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclaving)

เป็นการฆ่าเชื้อในอาหารสังเคราะห์ และอุปกรณ์ เช่นเครื่องแก้ว อุปกรณ์โลหะ ภาชนะพลาสติก เป็นต้น อุณหภูมิที่ใช้คือ 121^{O}C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อย่างน้อย 15 นาที หรือประมาณ 15-30 นาที

ข้อดี คือ ฆ่าเชื้อได้ปริมาณมาก รวดเร็ว สะดวก

ข้อเสีย คือ สารเคมีบางชนิดในอาหารอาจสลายตัวบ้าง เช่น PGRs บางตัว โดยเฉพาะ GA, zeatin วิตามิน สารธรรมชาติจากพืช และยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

การฆ่าเชื้ออุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำจะต้องดำเนินการในสภาพปลอดเชื้อ ดังนั้นตู้ถ่ายเนื้อเยื่อจะต้องเป็นตู้ปลอดเชื้อ โดยการใช้รังสี UV ซึ่งปกติจะต้องเปิดหลอดไฟที่ให้แสง UV ไว้ก่อนการใช้ตู้อย่างน้อย 30 นาที แล้วจึงปิดเมื่อจะปฏิบัติงาน และควรใช้แอลกอฮอล์ 70% เช็ดภายในตู้หรือพื้นผิววัสดุอุปกรณ์เพื่อฆ่าเชื้อ สำหรับวัสดุอุปกรณ์ที่จะนำเข้าไปใช้ในตู้ปลอดเชื้อ

จะต้องสะอาด และผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ โดยวัสดุที่เป็นโลหะ อุปกรณ์เครื่องแก้ว และวัสดุที่ไม่ติดไฟง่าย เช่นด้ามมีด ใบมีดผ่าตัด ปากคีบ และจานแก้ว ควรใส่กล่องหรือห่อด้วยแผ่นกระดาษอะลูมิเนียม นำเข้าอบในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง นอกจากนี้ควรทำความสะอาดมือและแขนของผู้ที่จะทำงานกับตู้ปลอดเชื้อด้วยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 %

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ	Linsmaier & Skoog (1965)	Murashige & Skoog (1962)
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	1,650	1,650
Boric acid (H_3BO_3)	6.2	6.2
Calcium chloride ($CaCl_2 . 2H_2O$)	400	440
Cobalt chloride ($CoCl_2 . 6H_2O$)	0.025	0.025
Cupric sulfate ($CuSO_4 . 5H_2O$)	0.025	0.025
Magnesium sulfate ($MgSO_4 . 7H_2O$)	370	370
Manganese sulfate, monohydrate ($MnSO_4 . H_2O$)	-	16.9
Manganese sulfate ($MnSO_4 . 4H_2O$)	22.3	-
Potassium iodide (KI)	0.33	0.83
Potassium nitrate (KNO_3)	1,900	1,900
Potassium phosphate (KH_2PO_4)	170	170
Sodium molybdate ($Na_2MoO_4 . 2H_2O$)	0.25	0.25
Zinc sulfate ($ZnSO_4 . 7H_2O$)	8.6	8.6
Ferrous sulfate ($FeSO_4 . 7H_2O$)	2.8	27.8
Na_2EDTA	37.3	37.3
Inositol	100	100
Nicotinic acid	-	0.5
Pyridoxine-HCl	-	0.5
Thiamine-HCl	-	0.4

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ

หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ปลูกชิ้นส่วนพรรณไม้น้ำ (explants) ที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วในหลอดทดลอง หรือขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ เลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่ปลอดเชื้อในอาหารสังเคราะห์ที่มีความสมดุลของธาตุอาหาร ซึ่งจะทำให้ชิ้นส่วนพรรณไม้น้ำนั้นสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ และเพิ่มปริมาณต้นอ่อน (plantlets) ได้ เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชมีคุณสมบัติการแบ่งตัว

ของเซลล์ที่จะเจริญกลายเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ (totipotency) และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเหนี่ยวนำจัดการให้เนื้อเยื่อเจริญพัฒนาเป็นรูปแบบต่างๆได้ เช่น บังคับให้ชิ้นเนื้อเยื่อเจริญเป็นยอด เป็นราก เป็นแคลลัส หรือเป็นเอ็มบริโอ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การคัดเลือกชิ้นส่วนพืช

โดยทั่วไปเนื้อเยื่อของพืชที่กำลังมีการเจริญเติบโต (meristem cell) เช่น ตายอด ตาข้าง หรือส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญประกอบอยู่ด้วย และเป็นเนื้อเยื่อที่อยู่ในระยะหนุ่ม-สาว (juvenile stage) ตลอดจนส่วนของใบโดยเฉพาะที่มีเส้นกลางใบ ใบอ่อน ดอกอ่อน ฐานรองดอก เมล็ด และลำต้นอ่อนในเมล็ดก็สามารถนำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เพื่อชักนำให้เนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนเหล่านี้มีการเจริญพัฒนาเกิดยอดและราก จนกระทั่งเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ในที่สุด อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์เชิงปริมาณ ซึ่งต้องการต้นพันธุ์ที่มีความสม่ำเสมอ ตรงตามสายพันธุ์ จำนวนมากๆ ควรเลือกเนื้อเยื่อที่เป็นเซลล์ร่างกายและมีลักษณะปกติตรงตามสายพันธุ์เช่นชิ้นส่วนยอด ตาข้าง ใบอ่อน ที่ได้จากต้นแม่ซึ่งมีความสมบูรณ์แข็งแรงไม่เป็นโรค การคัดเลือกชิ้นส่วนพืชในการปรับปรุงพันธุ์พรรณไม้น้ำซึ่งต้องการลักษณะที่มีความแปลกใหม่แตกต่างจากเดิม ควรเลือกชิ้นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นพันธุ์เดิม เช่น ชิ้นเนื้อเยื่อส่วนใบ ดอก และยอดที่มีลักษณะรูปร่าง หรือสีเปลี่ยนแปลง

คุณลักษณะของชิ้นเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืช (explants) ที่เหมาะสมสำหรับนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อได้ง่าย มีความเยาว์วัย และตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น ปลายยอด ตาข้าง เมล็ด ใบ ลำต้นอ่อน ดอก ก้านช่อดอก หัว หัวย่อย กลีบหัว ไหล เหง้า เป็นต้น

2. การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนพืช

หลักการสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือการปลอดเชื้อ โดยขั้นตอนเริ่มต้นที่สำคัญคือ การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ที่ผิวภายนอกของชิ้นส่วนพืช หากชิ้นเนื้อเยื่อมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ จะทำให้เนื้อเยื่อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และตายในที่สุด โดยทั่วไปการกำจัดสิ่งปนเปื้อนออกจากผิวชิ้นส่วนต่างๆ ของพรรณไม้น้ำ ทำได้โดยการใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา วิธีการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ที่ผิวภายนอกของชิ้นส่วนพรรณไม้น้ำ มีดังนี้

2.1 การใช้สารฟอกฆ่าเชื้อ (sterilizing agents, disinfectants) ใช้ได้กับชิ้นส่วนทั่วไป โดยสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่

Calcium hypochlorite ($Ca(OCl)_2$)	9-10	%
Sodium hypochlorite (NaOCl)	0.5-5	%
Mercuric chloride ($HgCl_2$)	0.1-1	%
Mercuric iodide (Hgl_2)	0.5	%
Mercuric bromide ($HgBr_2$)	0.5	%
Silver nitrate ($Ag(NO_3)_2$)	1	%
Alcohol	50-70	%
คลอรอกซ์ (clorox)	4-40	%
ยาปฏิชีวนะ	4-50	มิลลิกรัม/ลิตร

2.2 การจุ่มแอลกอฮอล์ 95 % แล้วเผาไฟ ใช้กับชิ้นส่วนที่แข็ง เช่น เมล็ด ผล ฝัก

วัสดุอุปกรณ์ในการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนพรรณไม้น้ำ มีดังนี้

- สารฟอกฆ่าเชื้อ (disinfectants)
- น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (sterile distilled water)
- สารลดแรงตึงผิว (Tween 20)
- เอธิลแอลกอฮอล์ 70 % และ 95 %
- อุปกรณ์เครื่องแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- มีดผ่าตัด
- จานแก้ว หรือกระดาษรองตัดที่ฆ่าเชื้อแล้ว

สารฟอกฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ

ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวของชิ้นส่วนพืช

• ตัดกิ่ง หัว หรือชิ้นส่วนพืชที่เลือกไว้ นำมาล้างน้ำไหลแรง ไล่ดิน ฝุ่นละอองที่มองเห็นออกให้สะอาด ซับให้หมาด

• ตัดแต่งชิ้นส่วนพืช โดยตัดส่วนที่ไม่ต้องการออก เช่น ใบ กาบใบ ราก ขน แล้วตัดให้มีขนาดพอเหมาะในการทำงาน ไม่ใหญ่หรือเล็กเกินไป

• ล้างให้สะอาดด้วยสบู่อ่อน หรือน้ำประปา

• แช่ชิ้นส่วนพืชในแอลกอฮอล์ 70 % ประมาณ 30-60 วินาที

• นำชิ้นส่วนพืชใส่ขวด เทน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อที่เตรียมไว้ให้ท่วมชิ้นส่วนพืช เขย่าเป็นครั้งคราว หรือนำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 50-150 rpm เป็นเวลาประมาณ 10-30 นาที

• เทน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อออก ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ล้างซ้ำทั้งหมดประมาณ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

• นำชิ้นส่วนพืชที่ฟอกฆ่าเชื้อและล้างน้ำกลั่นเรียบร้อยแล้ว ตัดแต่งเอาส่วนที่ถูกทำลายโดยน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อออก แล้วเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้

• ลงรายละเอียด รหัสชื่อพรรณไม้น้ำ วัน เดือน ปี ที่เลี้ยง และชื่อผู้เลี้ยงลงบนขวดอาหารที่เลี้ยง

3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ ได้แก่ การนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้วไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ซึ่งเป็นอาหารเหลว หรืออาหารเหลวกึ่งแข็งที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและปริมาณที่เหมาะสม โดยทำการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อในตู้ปลอดเชื้อ และทุกขั้นตอนดำเนินการในสภาวะปลอดเชื้อโดยการทำความสะอาดบริเวณภายในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อโดยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 % รวมถึงอุปกรณ์ต่างๆ และขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่จะนำเข้าไปในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อต้องเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 % นอกจากนี้ขณะที่ทำการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อที่ต้องใช้ใบมีดผ่าตัด และปากคีบ ต้องฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มแอลกอฮอล์ แล้วเผาไฟทิ้งให้เย็นก่อนนำไปใช้ตัดเนื้อเยื่อ ลนปากขวดอาหารก่อนเปิด และปิดปากขวดทุกครั้ง เมื่อปลูกถ่ายเนื้อเยื่อเสร็จแล้วจึงนำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการควบคุมอุณหภูมิ และแสงที่เหมาะสม เพื่อให้ชิ้นเนื้อเยื่อพืชมีการเจริญพัฒนาจนกระทั่งเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์

การเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยง เซลล์ของพืชภายหลังจากการแบ่งตัวจะมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนสภาพไปเพื่อเป็นเนื้อเยื่อและอวัยวะซึ่งทำหน้าที่เฉพาะอย่างและเจริญ

ไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ในที่สุด โดยชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ 3 แบบ คือ

1. พัฒนาเป็นแคลลัส (callus formation) เซลล์บริเวณรอยตัดจะมีการแบ่งตัวพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์ เจริญเติบโตขยายจำนวนและขนาดเพิ่มมากขึ้น เซลล์เหล่านี้เรียกว่าแคลลัส ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่ยังไม่มีพัฒนาการ (undifferentiated) ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์เป็นเนื้อเยื่อเจริญ และพัฒนาเป็นต้นพืชได้

แคลลัสของดาวกระจาย *Hygrophilla difformis* ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนข้อ

2. พัฒนาเป็นอวัยวะ (organogenesis) ชิ้นส่วนพืชมีการเจริญพัฒนาไปเป็นอวัยวะต่างๆ เช่น ยอด ราก ดอก หัว และเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้

3. พัฒนาเป็นเอมบริโอ (embryogenesis) การเลี้ยงเซลล์พืช สามารถชักนำให้เซลล์พืชเซลล์เดียว มีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์รูปร่างต่างๆ จนกระทั่งเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์

4. การเพิ่มจำนวนต้น

ขั้นตอนนี้เป็นการเพิ่มผลผลิตต้นอ่อนให้ได้จำนวนมากที่สุดโดยการเพิ่มจำนวนยอด ทำได้โดยการแบ่งหน่อของต้นอ่อนปลอดเชื้อเป็นกลุ่มเล็กๆ เช่นกลุ่มละ 2-4 หน่อ แล้วนำลงปลูกในอาหารใหม่ เรียกว่าการ subculture โดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตรที่เร่งการเกิดยอดเลี้ยงจนกระทั่งแตกยอดใหม่เพิ่มจำนวนมากขึ้นจึงตัดแบ่งไปปลูกในอาหารใหม่ ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ ก็จะได้ต้นอ่อนจำนวนมาก โดยทั่วไปพรรณไม้น้ำจะทำการ subculture ทุกๆ 3-8 สัปดาห์ ขึ้นกับชนิดและชิ้นส่วนพรรณไม้น้ำ

การ subculture ในตู้ปลอดเชื้อ

5. การชักนำให้เกิดราก

เป็นการนำยอดที่ได้ปริมาณเพียงพอแล้วมากระตุ้นให้เกิดราก โดยการ subculture ลงเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน เช่น NAA อย่างไรก็ตามขั้นตอนนี้อาจไม่จำเป็นสำหรับพืชบางชนิด เช่น พรรณไม้น้ำส่วนใหญ่ที่มีการออกรากสมบูรณ์แล้วในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนในข้อ 4 จึงไม่จำเป็นต้องนำมาชักนำให้เกิดรากอีก

ต้นอ่อนของดาวน้อย *Pogostemon helferi* และใบพาย *Cryptocoryne griffithii* ที่มีรากพร้อมออกปลูก

ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบพาย *Cryptocoryne* spp.

(*Cryptocoryne tonkinensis, C. albida, C. wendtii, C. walkerii, C. petchii, C. blassii, C. balansae*)

1. การเลี้ยงต้นแม่พันธุ์

นำต้นพันธุ์มาเลี้ยงในระบบไร้ดินในโรงเรือนเพาะชำ จนกระทั่งแตกหน่อขึ้นมาใหม่ จึงตัดตายอดหรือชิ้นส่วนยอดที่เจริญขึ้น มาทำการฟอกฆ่าเชื้อต่อไป

2. การฟอกฆ่าเชื้อ

ล้างชิ้นส่วนยอดในน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 % เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 2 ครั้ง ที่ความเข้มข้น 8 % หยดสารเปียกใบ (tween-20) 1 หยด/100 มิลลิกรัม แช่และเขย่านาน 15 นาที ตามด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 4 % หยดสารเปียกใบ (tween-20) 1 หยด/100 มิลลิกรัม แช่และเขย่านาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว แช่และเขย่านาน 5 นาที ล้างซ้ำอีกจนครบ 3 ครั้ง

3. การปลูกชิ้นเนื้อเยื่อ

นำชิ้นส่วนยอดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดเอาส่วนเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อออกไป จากนั้นจึงนำลงปลูกในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยวางชิ้นเนื้อเยื่อส่วนยอดบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS+BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร นำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมง/วัน เมื่อเนื้อเยื่อเจริญพัฒนาเกิดต้นอ่อน จึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณต้นอ่อนต่อไป

4. การเพิ่มปริมาณต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ

เมื่อชิ้นเนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนปลอดเชื้อ จึงนำต้นอ่อนมาตัดแยกชิ้นส่วนยอดลงปลูกในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ได้แก่อาหารสูตร MS+BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 12-16 ชั่วโมง/วัน อาหารสูตรดังกล่าวนี้สามารถชักนำให้ใบพายเกิดยอดและรากในปริมาณที่เหมาะสม ได้ต้นอ่อนที่มีความสมบูรณ์ การเพิ่มจำนวนต้นอ่อนปริมาณมากทำได้โดยการตัดแยกชิ้นส่วนยอดและย้ายลงปลูกในขวดใหม่ทุกๆ 3-4 สัปดาห์

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผมหอม *Cryptocoryne tonkinensis*

เลี้ยงต้นพันธุ์ผมหอมในระบบ Sand culture จนกระทั่งเกิดยอดใหม่

คัดเลือกชิ้นส่วนยอดใหม่ที่สมบูรณ์

ล้างทำความสะอาดแล้วฟอกฆ่าเชื้อ

ตัดชิ้นส่วนปลายยอดลงเลี้ยงในอาหารสูตร MS เพื่อชักนำให้เกิดต้นอ่อน

ทำการ subculture ทุกๆ 4 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มจำนวนต้นอ่อนปริมาณมาก

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบพายอัลบิดา *Cryptocoryne albida* Parker

1. การเลี้ยงต้นพันธุ์

พรรณไม้น้ำ “คริปอัลบิดา” *Cryptocoryne albida* Parker เป็นพรรณไม้น้ำพื้นเมืองของไทย ทำการคัดเลือกต้นพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์ แข็งแรง จากแหล่งอาศัยในธรรมชาติมาปลูกเลี้ยงในระบบไร้ดิน จนกระทั่งแตกหน่อเกิดต้นอ่อน (ประมาณ 12 สัปดาห์) จึงตัดชิ้นส่วนยอดอ่อนที่เจริญขึ้นมาทำการฟอกฆ่าเชื้อต่อไป

2. การฟอกฆ่าเชื้อ

ล้างชิ้นส่วนยอดโดยใช้น้ำไหลผ่านเป็นเวลา 15 นาที นำไปล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ (ethanol) 50% แล้วเขย่านาน 1 นาทีจากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อ โดยชนิดและปริมาณสารฟอกฆ่าเชื้อชิ้นเนื้อเยื่อส่วนยอดของ *C. albida* ที่ใช้ คือ ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ด้วยคลอรอกซ์ (Clorox) 2 % นาน 15 นาที แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วยเมอคิวริคคลอไรด์ 1 % นาน 20 นาที (การฟอกครั้งที่ 1 และ 2 ให้หยดสารเปียกใบ (tween-20) 1 หยด/100 มิลลิลิตร เพื่อช่วยลดแรงตึงผิวของน้ำเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของสารฟอกฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วแช่และเขย่านาน 5 นาที ล้างซ้ำอีก 3 ครั้งหรือจนกว่าฟองจะหมด

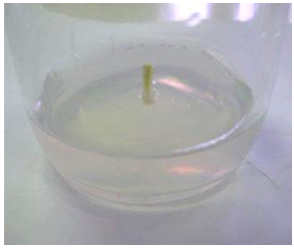
3. การปลูกเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อ

นำชิ้นเนื้อเยื่อส่วนยอดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอกแล้วไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ในสภาพปลอดเชื้อ ที่เติม BA 4 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมง/วัน

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *C. albida* (คริปอัลบิดา)

1. คัดเลือกชิ้นส่วนยอดจากต้นพันธุ์ที่ปลูกเลี้ยงในระบบไร้ดิน

2. ล้างทำความสะอาด ตัดแต่งชิ้นเนื้อเยื่อส่วนยอด



3. นำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอก

4. ปลูกชิ้นเนื้อเยื่อส่วนยอดลงเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

5. ทำการ subculture ทุกๆ 3-4 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มจำนวนต้นอ่อนปริมาณมาก

6. นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปปรับสภาพเพื่อออกปลูกในโรงเรือนระบบไร้ดินต่อไป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออนูเบียส *Anubias* spp.

1. การเลี้ยงต้นแม่พันธุ์

คัดเลือกต้นพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์ แข็งแรง มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์และไม่เป็นโรค นำมาปลูกเลี้ยงในระบบไร้ดิน โดยใช้แร่ใยหินเป็นวัสดุปลูกในเรือนเพาะชำ เลี้ยงจนกระทั่งแตกหน่อเกิดยอดใหม่เจริญขึ้นมา จึงตัดชิ้นส่วนที่เจริญขึ้นมาในอากาศ นำไปฟอกฆ่าเชื้อต่อไป

2. การฟอกฆ่าเชื้อ

ล้างชิ้นส่วนยอดโดยใช้น้ำไหลผ่านเป็นเวลา 15 นาที นำไปล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ (ethanol) 70 % เขย่านาน 1 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 8 % หยดสารเปียกใบ (tween-20) 1 หยด/100 มิลลิลิตร แช่และเขย่านาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 4 % หยดสารเปียกใบ (tween-20) 1 หยด/100 มิลลิลิตร แช่และเขย่านาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3. การปลูกชิ้นเนื้อเยื่อ

เตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอาหารเหลวกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร เติมวุ้น 7 กรัม/ลิตร ปรับ pH 5.7 ใส่ในหลอดปิดฝาแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำชิ้นส่วนยอดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดเอาส่วนปลายยอดความยาวประมาณ 3-5 มิลลิเมตร นำลงปลูกในหลอด แล้วนำไปเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ให้แสง 12-16 ชั่วโมง/วัน

4. การเพิ่มปริมาณต้นอ่อน

เมื่อชิ้นส่วนปลายยอดของอนูเบียสเจริญพัฒนาขึ้นเป็นต้นอ่อนแล้ว จึงนำมาตัดแยกชิ้นส่วนลงปลูกถ่ายในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีเหลวกึ่งแข็งสูตร MS ซึ่งเติม BA 2-3 มิลลิกรัม/ลิตร นำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เมื่อชิ้นเนื้อเยื่อเจริญพัฒนาเพิ่มปริมาณยอดในขวด ทำการตัดแยกชิ้นส่วนยอดลงปลูกในขวดใหม่ทุกๆ 4-6 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มปริมาณต้นอ่อนต่อไป

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออนูเบียส *Anubias* spp.

ต้นแม่พันธุ์อนูเบียส

ตัดชิ้นส่วนยอดมาล้าง

ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์

ตัดชิ้นส่วนยอดลงเลี้ยงใน
อาหารสังเคราะห์

ทำการ Subculture ทุกๆ
4-6 สัปดาห์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชบาน้ำ *Aponogeton* spp.

(*Aponogeton undulatus, A. madagascariensis*, *A. bolivianus*)

1. การฟอกฆ่าเชื้อ

นำช่อดอกของชบาน้ำ (*Aponogeton madagascariensis, A. boivianus)* ส่วนที่ชูขึ้นเหนือน้ำ มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ด้วย ethanol ความเข้มข้น 70 % แช่นาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้น 1 % หยดสารจับใบ (surfactant) ได้แก่ tween-20 ความเข้มข้น 0.05 % แช่เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ตามวิธีใน Smith (1992) นำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ ช่วงเวลาให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน ใช้วิธีเลี้ยงแบบเขย่าตลอดเวลา โดยวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที จนกระทั่งชิ้นเนื้อเยื่อเจริญพัฒนาเกิดต้นอ่อนปลอดเชื้อ

ช่อดอกของชบาน้ำที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. การเพิ่มปริมาณต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ

ตัดแยกชิ้นส่วนยอดของต้นอ่อนปลอดเชื้อชบาน้ำลงเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณยอด จากนั้นตัดแยกชิ้นส่วนยอดลงเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อชักนำให้เกิดหัวย่อยต่อไป

ชบาน้ำเจริญในอาหารเหลว

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบยาว *Microsorium pteropus* (Blume) Ching

รากดำใบยาว หรือ กูดหางนกกะลิง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Microsorium pteropus* (Blume) Ching ชื่อสามัญคือ Java fern เป็นพรรณไม้น้ำในวงศ์เฟิร์น Polypodiaceae ในธรรมชาติพบเจริญเติบโตบนก้อนหินหรือขอนไม้บริเวณลำธารหรือน้ำตก ใบของรากดำใบยาวมีลักษณะเป็นรูปหอก ปลายใบเรียวแหลม ขอบใบเรียบ ใบมีสีเขียวเข้ม รากมีขนาดเล็กและมีสีดำ

รากดำใบยาว *Microsorium pteropus* (Blume) Ching

1. การเลี้ยงต้นพันธุ์

นำต้นแม่พันธุ์มาเลี้ยงในระบบปลูกโดยไม่ใช้ดินในโรงเรือนเพาะชำจนกระทั่งแตกใบอ่อน (ใช้ระยะเวลาประมาณ 4 สัปดาห์) จากนั้นทำการตัดใบอ่อนที่เพิ่งคลี่ออกมาทำการฟอกฆ่าเชื้อต่อไป

2. การฟอกฆ่าเชื้อ

ล้างชิ้นส่วนใบเฟิร์นซึ่งอยู่ในระยะใบอ่อนด้วยน้ำไหลผ่านให้สะอาด จากนั้นจึงนำชิ้นส่วนใบอ่อนไปแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 % ระยะเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ทำการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบอ่อนครั้งที่ 1 โดยใช้สารละลายคลอรอกซ์ ระดับความเข้มข้น 0.5 % ระยะเวลา 15 นาที และฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 โดยใช้สารละลายเมอคิวริคคลอไรด์ ระดับความเข้มข้น 0.25 % ระยะเวลา 10 นาที (การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ทำในตู้ปลอดเชื้อ) สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อทั้ง 2 ครั้ง ได้ทำการหยดสารจับใบ (surfactant) ได้แก่ tween-20 ระดับความเข้มข้น 0.05 % แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

ชิ้นส่วนของรากดำใบยาวที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ใบอ่อนม้วน และใบอ่อนที่เพิ่งคลี่

3. การปลูกชิ้นเนื้อเยื่อ

ตัดชิ้นส่วนใบอ่อนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วให้มีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร จากนั้นทำการย้ายชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่มีผงถ่านกัมมันต์ระดับความเข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร และเติม Kinetin ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อนำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 1,000 ลักซ์ เมื่อเนื้อเยื่อพัฒนาเกิดใบอ่อน จึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรที่เพิ่มปริมาณต้นอ่อนและใบอ่อนต่อไป

4. การเพิ่มปริมาณต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ

นำใบอ่อนปลอดเชื้อมาตัดแยกแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ระดับความเข้มข้น ½ MS ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ระดับความเข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร ที่เติม Kinetin ระดับความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อนำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 1,000 ลักซ์ อาหารสูตรดังกล่าวสามารถชักนำให้ต้นอ่อนและเกิดใบอ่อนได้ในปริมาณที่เหมาะสมและมีความสมบูรณ์ การเพิ่มจำนวนต้นอ่อนให้ได้ในปริมาณมากสามารถทำได้โดยการตัดแยกชิ้นส่วนใบอ่อนย้ายลงปลูกเลี้ยงในขวดใหม่ทุก 8-10 สัปดาห์

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบยาว

ต้นพันธุ์รากดำใบยาวที่ปลูกเลี้ยงในระบบไร้ดิน จนกระทั่งเกิดใบอ่อน

นำชิ้นส่วนใบอ่อนฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ระดับความเข้มข้น 0.5 % และสารละลายเมอคิวริคคลอไรด์ ระดับความเข้มข้น 0.25 %

ตัดชิ้นส่วนใบอ่อนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วให้มีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร

นำชิ้นส่วนใบอ่อนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อลงเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์

ทำการ Subculture ทุกๆ 8-10 สัปดาห์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลัดวิเจีย *Ludwigia* spp.

1. การเลี้ยงต้นแม่พันธุ์

นำต้นแม่พันธุ์มาเลี้ยงในบ่อเลี้ยงแบบไร้ดินที่ใช้กรวดแม่น้ำขนาดเล็กเป็นวัสดุปลูก จนกระทั่งแตกกิ่งใหม่ (ใช้ระยะเวลาประมาณ 3 สัปดาห์) จึงตัดกิ่งที่แตกใหม่มาทำการฟอกฆ่าเชื้อ

2. การฟอกฆ่าเชื้อ

ล้างชิ้นส่วนลำต้นในน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 15 นาที และตัดเป็นท่อน แล้วจึงนำไปล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ (ethanol) 70 % เขย่านาน 1 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 8 % หยดสารเปียกใบ (tween-20) 1 หยด/100 มิลลิลิตร แช่และเขย่านาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 4 % หยดสารเปียกใบ (tween-20) 1 หยด/100 มิลลิลิตร แช่และเขย่านาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3. การปลูกชิ้นเนื้อเยื่อ

เตรียมอาหารสูตร MS+BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร เติมวุ้นในอัตรา 6-7 กรัม/ลิตร ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที นำชิ้นส่วนลำต้นที่ผ่านการฟอก ฆ่าเชื้อแล้ว ตัดขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร ลงปลูกเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium) สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร นำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยง

เนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 12-16 ชั่วโมง/วัน เมื่อเนื้อเยื่อพัฒนาเกิดต้นอ่อน จึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณต้นอ่อนต่อไป

4. การเพิ่มปริมาณต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นอ่อนปลอดเชื้อมาตัดแยกชิ้นส่วนลำต้นลงปลูกในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอาหารสูตรเพิ่มปริมาณต้นอ่อน ได้แก่อาหารสูตร MS ที่มี BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร นำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 12-16 ชั่วโมง/วัน อาหารสูตรดังกล่าวนี้สามารถชักนำให้เกิดยอด ในปริมาณมาก ได้ต้นอ่อนที่มีความสมบูรณ์ การเพิ่มจำนวนต้นอ่อนปริมาณมาก ทำได้โดยการตัดแยกชิ้นส่วนยอดย้ายลงปลูกในขวดใหม่ทุก 4 สัปดาห์

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใต้ใบแดง *Ludwigia repens*

ปลูกต้นพันธุ์ใต้ใบแดงในบ่อเลี้ยง
แม่พันธุ์จนกระทั่งแตกกิ่งใหม่

1. ตัดชิ้นส่วนลำต้นนำมาล้างให้สะอาด
และตัดเป็นท่อน

2. ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย
โซเดียมไฮโปคลอไรท์

3. ตัดชิ้นส่วนข้อขนาด 0.5 เซนติเมตร
ลงเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

4. ทำการ Subculture ทุกๆ 3-4 สัปดาห์
เพื่อเพิ่มจำนวนต้นอ่อน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพลับพลึงธาร *Crinum thaianum* Schulze

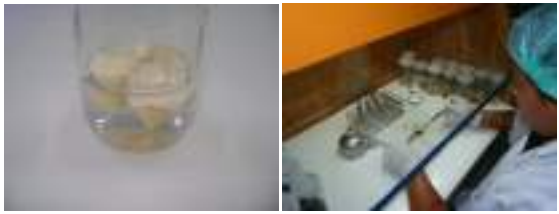
พลับพลึงธาร *Crinum thaianum* Schulze จัดเป็นพืชมีดอกในวงศ์พลับพลึง (Amaryllidaceae) มีชื่อไทยว่า“หอมน้ำ” หรือ “พลับพลึงธาร” และมีชื่อสามัญภาษาอังกฤษว่า “Onion plant” ซึ่งเรียกตามลักษณะลำต้นในดินเป็นที่หัวคล้ายหัวหอมใหญ่ เป็นชนิดที่เป็นพรรณไม้น้ำเฉพาะถิ่นของไทย พบแพร่กระจายทางภาคใต้ในเขตจังหวัดระนองและพังงา จัดเป็นพรรณไม้น้ำประเภทครึ่งบกครึ่งน้ำ อายุหลายปี ชอบขึ้นบริเวณที่ชื้นแฉะหรือบริเวณชายน้ำ ลำต้นมีลักษณะเป็นหัวเจริญอยู่ในดินใต้น้ำ ใบเป็นใบเดี่ยว ลักษณะเป็นแถบยาวสีเขียวคล้ายริบบิ้นขนาดใหญ่ แตกจากลำต้นเป็นกอ โคนใบหุ้มประกบกัน ความกว้างของใบ 2-3 เซนติเมตร ความยาวของแผ่นใบขึ้นกับความลึกของระดับน้ำ ใบที่เจริญเหนือน้ำจะมีลักษณะหนาแข็งแรงกว่าใบใต้น้ำ ดอกออกเป็นช่อแบบร่มมีสีขาวคล้ายดอกพลับพลึง นิยมเก็บหัวมาชำให้แตกใบใต้น้ำ แล้วจึงนำไปจำหน่ายหรือประดับตู้ปลา พรรณไม้น้ำในสกุลนี้ตลาดต่างประเทศมีความต้องการมากและมีราคาดี อย่างไรก็ตามผลผลิตที่ส่งออกเกือบทั้งหมดได้จากการเก็บรวบรวมจากธรรมชาติ อีกทั้งในปัจจุบันแหล่งที่อยู่อาศัยในธรรมชาติยังถูกทำลายเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศอย่างมากทำให้พลับพลึงธารมีความเสี่ยงสูงที่จะสูญพันธุ์ไปจากถิ่นอาศัยในธรรมชาติ

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพลับพลึงธาร

1. นำหัวพลับพลึงธารทำความสะอาดสิ่งสกปรกที่ผิวภายนอก

2. ตัดแต่ง และผ่าแบ่งหัวเพื่อฟอกฆ่าเชื้อ

3. ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 โดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 4 % นาน 20 นาที และฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 โดยใช้เมอคิวริคคลอไรด์ 2 % นาน 10 นาที



4. นำชิ้นเนื้อเยื่อส่วนหัวพลับพลึงธารที่ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วมาตัดแต่งในตู้ปลอดเชื้อ

5. ปลูกในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA 1 ไมโครโมลาร์ (0.225 มิลลิกรัม/ลิตร)

6. ลักษณะการเกิดหัวย่อย (bulblets) ของพลับพลึงธารจากชิ้นเนื้อเยื่อ ส่วนกลีบหัวเมื่อเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลา 4-6 เดือน

7. ทำการ Subculture ทุกๆ 2 เดือน โดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS+BA 6 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนหัวย่อย

8. ต้นพันธุ์พรรณไม้น้ำพลับพลึงธารที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพร้อมสำหรับการนำออกปลูกในโรงเรือนภายนอกต่อไป

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพลับพลึงธาร

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีส่วนช่วยในการผลิตต้นพันธุ์พลับพลึงธารที่มีคุณภาพได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น ช่วยแก้ปัญหาขาดแคลนต้นพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้นพันธุ์พลับพลึงธารที่มีการขยายพันธุ์ได้ช้าโดยวิธีขยายพันธุ์ปกติ (ขยายพันธุ์โดยเมล็ด, แตกหัวย่อย) ต้นพันธุ์ที่ได้จะแข็งแรง ปราศจากโรค นอกจากนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการเก็บรักษาชิ้นส่วนเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลานานๆ (*In vitro* conservation) เป็นวิธีที่จำเป็นอย่างยิ่งการอนุรักษ์ต้นพันธุ์พลับพลึงธารและพรรณไม้น้ำหลายชนิดที่หายากหรืออยู่ในสภาวะเสี่ยงจะสูญพันธุ์ไปจากแหล่งธรรมชาติ

ข้อควรคำนึงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพลับพลึงธารในสภาพปลอดเชื้อ

การพิจารณาเลือกขนาดและอายุของหัวพลับพลึงธารเพื่อใช้ในการเพาะขยายพันธุ์อาจมีผลต่อการชักนำให้เกิดหัวย่อยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และพืชหัวมักมีระยะพักตัวซึ่งจะเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิและชนิดพันธุ์ การนำหัวของพืชที่อยู่ในระยะพักตัวมาขยายพันธุ์มักไม่ประสบผลสำเร็จ

ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำชนิดอื่นๆ

ชื่อ/ชนิด	ชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง	การฟอกฆ่าเชื้อ	สูตรอาหาร/การเลี้ยง	ที่มา
บัว American lotus *Nelumbo lutea*	ผลจากดอกอ่อน	แช่ใน 50 % ethanol 1 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารฟอกขาว 50 % ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นนำมาผ่าเอาต้นอ่อนข้างในออกมาเลี้ยงในอาหารเหลว	อาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติม GA_3 100 มก./ล. ตัดแยกชิ้นส่วนและ subculture ทุกๆ 28 วัน	Kane *et.al*., 1988
ไส้ปลาไหล *Barclaya longifolia*	หัวย่อย, เมล็ด	ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ 6 % 15 นาที ตามด้วย $HgCl_2$ 0.2 % 10 นาที	อาหารสูตร MS ที่มี BA 1 มก./ล. และ NAA 0.25 มก./ล.	Tantiwiwat and Pongchawee, 2005
สาหร่ายขนนก Parrot feather *Myriophyllum aquaticum*	ชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้าง	ตัดข้อของลำต้นที่เจริญเหนือวัสดุปลูกมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารฟอกขาว 20 % ล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง	อาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติม 2 ip 30 ไมโครโมลาร์	Kane *et.al*., 1991
บัว Water lily *Nymphaea daubeniana*	ต้นอ่อนที่เกิดจากใบ	ล้างด้วยน้ำไหลผ่าน 30 นาที จากนั้นแช่และเขย่าในแอลกอฮอล์ 50 % เป็นเวลา 90 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารฟอกขาว 25 % เป็นเวลา 12 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง	อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2 ip 10 ไมโครโมลาร์ และ IAA 3 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ จึงย้ายมาปลูกในอาหารแข็งสูตรเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์	Jank *et.al*., 1990
โลบิเลีย *Lobelia cardinalis*	ตายอด	แช่และเขย่าในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ 3 % เป็นเวลา 10 นาที	อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มี BA 2 มก./ล และ NAA 0.25 มก./ล.	กาญจนรี และคณะ, 2543

ชื่อ/ชนิด	ชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง	การฟอกฆ่าเชื้อ	สูตรอาหาร/การเลี้ยง	ที่มา
		จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริคคลอไรด์ 2 % เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง		
แอมมาเนีย *Ammannia senegalensis*	ลำต้นยอด	ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ 10 % เป็นเวลา 15 นาที และฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยคลอรอกซ์ 5 % เป็นเวลา 10 นาที	อาหารสูตร MS ที่มี BA 0.1 มก./ล	กาญจนรี และคณะ, 2543
อเมซอนแดง *Echinodorus osiris* Rataj	ตายอด	ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ 8 % เป็นเวลา 15 นาที และฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยคลอรอกซ์ 4 % เป็นเวลา 10 นาที	อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มี BA 2 มก./ล	สุรียา และคณะ, 2545
ใบพายมวกเหล็กแหลม *Cryptocoryne retrospiralis* (Roxb.) Fischer	ตายอด	ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยการฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วยเมอคิวริคคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที	อาหารสังเคราะห์สูตร ¾ MS ที่มี BA เท่ากับ 2 มก./ล.	กาญจนรี และคณะ, 2557
ใบพายอัฟฟินิส *Cryptocoryne affinis* Hook. f.	ตายอด	ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 2 % เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยการฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วยเมอคิวริคคลอไรด์ 1 % เป็นเวลา 20 นาที	อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BA 1 มก./ล และ NAA 0.2 มก./ล.	กาญจนรี และคณะ, 2557

ชื่อ/ชนิด	ชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง	การฟอกฆ่าเชื้อ	สูตรอาหาร/การเลี้ยง	ที่มา
รากดำใบใหญ่ *Bolbitis heteroclita* (Presl) Ching ex. C. Chr.	ใบอ่อน	ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 2 % เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยการฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วยเมอคิวริคคลอไรด์ 1 % เป็นเวลา 10 นาที	อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 µM และ 2,4-D ความเข้มข้น 1 µM + ผงถ่าน (activated charcoal) 0.1 %	กาญจนรี และคณะ, 2556

การเก็บรักษาพันธุ์พรรณไม้น้ำด้วยเทคนิคการทำเมล็ดเทียม

การผลิตต้นพันธุ์ปลอดเชื้อซึ่งการใช้เทคนิคการผลิตเมล็ดเทียมเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปอีกระดับหนึ่ง สามารถเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ได้ในปริมาณมากในระยะเวลาที่สั้นเพื่อทดแทนทรัพยากรเดิม (recruitment) ลดปริมาณการเก็บเกี่ยวจากธรรมชาติ ปัจจุบันเทคนิคเมล็ดเทียมเป็นอีกทางเลือกสำหรับการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พรรณไม้น้ำเพื่อทดแทนระบบการเก็บรักษาในสภาพหลอดแก้วแบบเก่าที่มักเกิดความผันแปรทางพันธุกรรมจากการย้ายเลี้ยงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้สูญเสียลักษณะความตรงตามสายพันธุ์ได้ จึงมีการนำเอาเทคนิคเมล็ดเทียมเข้ามาใช้เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้ เนื่องจากต้นที่ได้จากเมล็ดเทียมจะมีลักษณะเหมือนต้นแม่ทุกประการ เพราะเป็นการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ สามารถผลิตได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น สามารถลดพื้นที่ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพรรณไม้น้ำที่มีความสำคัญได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น พรรณไม้น้ำเศรษฐกิจสำคัญหรือพรรณไม้น้ำกลุ่มเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ หลักการโดยทั่วไปของเมล็ดเทียม ได้แก่ การชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ (somatic embryos) จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ หรือเนื้อเยื่อร่างกายของพืช เช่น ปลายยอด ตา กิ่งอ่อน เป็นต้น จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ได้ซึ่งเปรียบเสมือนเอมบริโอหรือต้นอ่อนที่ได้จากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศกับมาฝังลงในสารละลายเจล พร้อมด้วยสูตรอาหารสังเคราะห์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเปรียบเสมือนอาหารสะสมในเมล็ด (artificial endosperm) ซึ่งจะมีความแตกต่างกันขึ้นกับชิ้นส่วนและชนิดของพืชที่นำมาเลี้ยง โดยทั่วไปจะประกอบด้วย เกลือแร่ วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่พืชต้องการในอัตราส่วนที่เหมาะสม โดยสารที่ทำให้เกิดเจลที่นิยมใช้ในการห่อหุ้มและป้องกันต้นอ่อนนั้น ได้แก่ alginate, agar และ gelatin โดยพบว่าชนิดที่นิยมใช้กันมาก คือ โซเดียมอัลจีเนต ซึ่งมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี ให้ความหนืดต่ำ ราคาไม่แพง และใช้ปริมาณน้อย แต่ต้องเสริมความแข็งแรงด้วยเกลือ

แคลเซียม เพื่อให้ทำหน้าที่เป็นเปลือกหุ้มเมล็ดเทียม (artificial seed coat) อย่างสมบูรณ์ (จิรพันธ์, 2009; Saiprasad, 2001)

ตัวอย่างขั้นตอนการเก็บรักษาพันธุ์พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* spp. ด้วยเทคนิคการทำเมล็ดเทียม

1. รวบรวมคัดเลือกต้นพันธุ์พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* ที่แข็งแรง มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์ นำมาเพาะขยายพันธุ์ในระบบปลูกเลี้ยงแบบไร้ดินจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตโซมาติกเอมบริโอ (somatic embryo)

2. เตรียมโซมาติกเอมบริโอ หรือชิ้นส่วนเนื้อเยื่อบริเวณปลายยอดของพรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* ขนาดไม่เกิน 2-4 มิลลิเมตร

3. นำโซมาติกเอมบริโอที่ปลอดเชื้อโรค ขนาดประมาณ 2-4 มิลลิเมตร มาผสมลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี sodium alginate ระดับความเข้มข้น 3 % (W/V)

4. นำปลายหลอดปิเปตต์ขนาดที่เหมาะสมมาดึงโซมาติกเอมบริโอพร้อมด้วยอาหารสังเคราะห์ นำไปหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.075-0.1 M ($CaCl_2$ $2H_2O$) ทิ้งไว้ประมาณ 20-30 นาที และเขย่าเป็นระยะจนเกิดเป็นก้อนเมล็ดที่สมบูรณ์

5. รินสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ออกให้หมด ล้างเมล็ดเทียมด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ ใช้ silica gel เป็นเวลา 7 ชั่วโมง เพื่อลดปริมาณน้ำ (dehydration) ภายในเมล็ดเทียม

6. นำเมล็ดเทียมที่ได้ไปทดสอบการงอกโดยนำไปเลี้ยงในสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับแต่ละชนิด และเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25±1 องศาเซลเซียส ได้รับแสง 2,200 ลักซ์ 16 ชั่วโมง/วัน

7. จดบันทึกข้อมูล อัตราการงอก จำนวนยอด จำนวนราก ความสูงต้น ของเมล็ดเทียม

เมล็ดเทียมของพรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* ในขั้นตอนลดความชื้น (dehydration)

C. blassii (บอนแดง) ที่งอกจากเมล็ดเทียมหลังเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 เดือน

C. balansae (ใบพายเขาใหญ่) และ *C. tonkinensis* (ผมหอม)
งอกจากเมล็ดเทียม หลังเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 เดือน

การปรับสภาพพรรณไม้น้ำจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก่อนออกปลูกภายนอก

การใช้ต้นอ่อนพืชที่ได้จากการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีลักษณะทางสรีรวิทยาที่แตกต่างจากพืชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ เนื่องจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่เลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25±1 องศาเซลเซียส พื้นที่เลี้ยงมีความชื้นสัมพันธ์สูง มีความเข้มแสงต่ำกว่าในสภาพธรรมชาติ โดยทั่วไปเลี้ยงโดยใช้แสงจากหลอดไฟที่ให้ความเข้มแสงบริเวณชั้นเลี้ยงประมาณ 1,000-3,000 ลักซ์ พืชที่ทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อมักได้รับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีสภาพแตกต่างจากต้นพืชที่เลี้ยงในสภาพแวดล้อมภายนอก ใบพืชจะมีชั้นของ wax (cuticle layer) ที่ผิวใบน้อย และการทำงานของปากใบผิดปกติเนื่องจากเจริญเติบโตในสภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูง ใบมีความสามารถในการสังเคราะห์แสงต่ำเนื่องจากพืชใช้คาร์บอนจากน้ำตาลที่ใส่ลงไปในอาหาร การเชื่อมต่อของระบบท่อลำเลียงระหว่างลำต้นและรากไม่สมบูรณ์ ทำให้การลำเลียงน้ำจากรากไปยังต้นได้น้อย นอกจากนี้รากที่เกิดขึ้นในอาหารสังเคราะห์ไม่แข็งแรงและไม่มีรากขน ทำให้ประสิทธิภาพในการดูดน้ำและแร่ธาตุต่ำ เมื่อย้ายออกปลูกจึงมีโอกาสรอดชีวิตต่ำ ต้นพืชจะอ่อนแอและอาจตายได้ในที่สุดเนื่องจากการสูญเสียน้ำ

จากลักษณะของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อย้ายปลูกในโรงเรือนเพาะชำหรือสภาพแวดล้อมภายนอกซึ่งมีอุณหภูมิเปลี่ยนแปลง ความเข้มแสงสูงขึ้น ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศลดลง พืชจะต้องมีการสังเคราะห์แสงเอง และพืชจะไม่ได้อยู่ในสภาพปลอดเชื้ออีกต่อไป เพื่อให้ต้นพืชสามารถรอดชีวิตภายใต้สภาพธรรมชาติหลังจากย้ายออกจากขวดได้ จำเป็นต้องมีการปรับสภาพพืชก่อนย้ายออกปลูก (*in vitro* acclimatization) และหลังย้ายออกปลูก (*ex vitro* acclimatization)

ตารางเปรียบเทียบความแตกต่างของสภาพแวดล้อมในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและสภาพแวดล้อมภายนอก

สภาพแวดล้อมในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	สภาพแวดล้อมภายนอก
1. อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส	1. อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล
2. ความเข้มแสงต่ำ	2. ความเข้มแสงสูง
3. ความชื้นสัมพัทธ์สูง	3. ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ
4. อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ปลอดเชื้อ	4. อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่ปลอดเชื้อ

ตารางเปรียบเทียบความแตกต่างของต้นพืชที่เลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและสภาพแวดล้อมภายนอก

สภาพแวดล้อมในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	สภาพแวดล้อมภายนอก
1. ใบมีสารเคลือบที่ผิวใบน้อย	1. ใบมีสารเคลือบที่ผิวใบปกติ
2. การควบคุมการปิดเปิดของปากใบ (stoma) ยังทำได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้พืชมีการคายน้ำสูง	2. ปากใบทำงานปกติ
3. ใบมีการสังเคราะห์แสงต่ำ เนื่องจากพืชใช้คาร์บอนจากน้ำตาลที่ใส่ลงไปในอาหาร	3. ใบมีการสังเคราะห์แสงปกติ
4. การเชื่อมต่อของระบบท่อลำเลียงระหว่างลำต้นและรากไม่สมบูรณ์ ทำให้การลำเลียงน้ำจากรากไปยังต้นได้น้อย	4. มีการเชื่อมต่อของระบบท่อลำเลียงระหว่างลำต้นและราก
5. รากไม่แข็งแรงและไม่มีรากขน	5. รากมีรากขน

การปรับสภาพพืชก่อนย้ายออกปลูก (*In vitro* acclimatization)

ปัจจุบันมีการศึกษาและปรับปรุงเทคนิควิธีการปรับสภาพพืชก่อนย้ายออกปลูก โดยการปรับสูตรอาหารสังเคราะห์หรือลดปริมาณก๊าซสะสมและความชื้นสัมพัทธ์ภายในขวด ทั้งนี้เพื่อกระตุ้นให้ต้นพืชเกิดการพัฒนาของ cuticle layer ปากใบ ราก และความสามารถในการสังเคราะห์แสงที่ดีขึ้น วิธีปฏิบัติโดยทั่วไป ได้แก่

1. คลายฝาขวด 2-3 วัน ก่อนย้ายปลูก เพื่อให้มีการแลกเปลี่ยนก๊าซและลดความชื้นภายในขวดลง

2. พักขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไว้ในที่อุณหภูมิสูงขึ้น เพื่อให้ต้นพืชปรับตัวก่อนย้ายปลูก

การย้ายปลูกและปรับสภาพพืชหลังการย้ายออกปลูก (*ex vitro* acclimatization)

หลังจากปรับสภาพพืชก่อนย้ายออกปลูกแล้วมีขั้นตอนการย้ายปลูก ดังนี้

1. เตรียมระบบอนุบาลและวัสดุปลูก สำหรับวัสดุปลูกที่เหมาะสมควรเป็นวัสดุปลูกที่สะอาด สามารถอุ้มน้ำ ความชื้นและแลกเปลี่ยนอากาศได้ดี จะทำให้การพัฒนาของรากเป็นไปได้ดี เช่น ฟองน้ำ ใยหิน เป็นต้น

2. นำต้นพรรณไม้น้ำออกจากขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยอาจใช้ปากคีบหรือลวดปลายงอดึงต้นอ่อนออกจากขวด แต่ต้องระวังอย่าให้ต้นและรากช้ำ

3. ล้างอาหารวุ้นที่ติดอยู่บริเวณรากออกให้หมดด้วยน้ำสะอาด เพราะวุ้นที่ติดค้างบริเวณรากจะเป็นตัวชักนำให้เกิดการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ และตัดแต่งใบที่เน่าเสียออก

4. ปลูกพรรณไม้น้ำในวัสดุปลูก

5. อนุบาลในสภาพแวดล้อมที่สามารถควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ อุณหภูมิและแสง

ปัจจัยที่จะช่วยให้ประสบความสำเร็จในการย้ายออกปลูก ได้แก่ การปรับความชื้นสัมพัทธ์ของสภาพแวดล้อม ต้นพืชที่ย้ายออกจากขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีอัตราการสูญเสียน้ำสูง การปรับลดความชื้นสัมพัทธ์ลงโดยการคลุมพลาสติกหรือการใช้ระบบสเปรย์น้ำหรือระบบพ่นหมอกจะทำให้ต้นพืชสามารถปรับตัวพัฒนากลไกในการป้องกันการสูญเสียน้ำได้ดีขึ้น นอกจากนี้ควรพรางแสงให้แก่ต้นพืชในระยะแรกที่ย้ายออกปลูก เพราะการสังเคราะห์แสงมีผลต่อกลไกการเปิด-ปิดของปากใบ ทำให้มีการคายน้ำเพิ่มขึ้น หลังจากการปรับสภาพพืชเป็นระยะเวลา 1-3 สัปดาห์แล้วควรทำการเปิดพลาสติกคลุมออกเพื่อให้พืชได้รับแสงมากขึ้น แล้วจึงให้สารละลายธาตุอาหารหรือย้ายไปยังระบบปลูกเลี้ยงต่อไป

การปลูกเลี้ยงพรรณไม้น้ำ

วิธีการปลูกเลี้ยงพรรณไม้น้ำสวยงามในแปลงปลูกมีหลายวิธีขึ้นกับประเภทหรือชนิดของพรรณไม้น้ำ เนื่องจากพรรณไม้น้ำแต่ละชนิดมีการแพร่กระจายในธรรมชาติซึ่งมีสภาพทางนิเวศวิทยาที่แตกต่างกัน บางประเภทดำรงชีวิตแบบครึ่งบกครึ่งน้ำหรือบางประเภทจมอยู่ใต้น้ำตลอดชีวิต ดังนั้นวิธีการปลูกจึงต้องแตกต่างกัน ดังนี้

1. การปลูกพรรณไม้น้ำในแปลงดิน วิธีนี้เหมาะสำหรับพรรณไม้น้ำประเภทครึ่งบกครึ่งน้ำและพรรณไม้น้ำประเภทชายน้ำ ซึ่งโดยส่วนใหญ่พรรณไม้น้ำสวยงามที่ใช้ในการจัดตู้พรรณไม้น้ำหรือการจัดสวนน้ำมักพบว่าอยู่ในประเภทนี้ ในธรรมชาติจะเจริญเติบโตได้ดีบริเวณที่ลุ่มมีน้ำขังหรือชื้นแฉะ เมื่อนำมาขยายพันธุ์สามารถปลูกในแปลงที่มีวัสดุปลูกเป็นดินที่มีน้ำแฉะหรือน้ำท่วมแค่โคนต้น บ่อปลูกอาจเป็นบ่อซีเมนต์หรือก่อด้วยอิฐบล็อกเตี้ยๆ ที่เก็บกักน้ำได้ หรืออาจจัดทำเป็นกระบะปูด้วยแผ่นพลาสติกยกสูงขึ้นจากพื้นซึ่งจะสะดวกกับการปฏิบัติงานได้มากขึ้น ด้านบนของบ่อปลูกควรมีตาข่ายพรางแสงประมาณร้อยละ 40-60 % ซึ่งขึ้นกับชนิดพรรณไม้น้ำที่มีความต้องการแสงมากน้อยแตกต่างกัน นอกจากนี้ควรมีระบบน้ำหยดหรือติดตั้งอุปกรณ์ควบคุมเวลาเปิด-ปิดอัตโนมัติเพื่อสเปรย์น้ำเป็นเวลา หรืออาจใช้บัวรดน้ำเป็นระยะๆ เพื่อช่วยให้ความชุ่มชื้นแก่พรรณไม้น้ำ ขั้นตอนการปลูกมีดังนี้

1.1 การเตรียมแปลงเพาะพันธุ์ ดินที่เหมาะสมสำหรับปลูกพรรณไม้น้ำส่วนใหญ่จะเป็นดินร่วนปนดินเหนียว หากเป็นแปลงเพาะพันธุ์ที่จัดสร้างใหม่ควรเตรียมดินผสมปุ๋ยคอกในอัตรา 0.5-1.0 กิโลกรัมต่อตารางเมตร จากนั้นเติมน้ำให้ชุ่มแล้วคราดดินให้เรียบ

1.2 การปลูกและการดูแลรักษา นำต้นพันธุ์พรรณไม้น้ำที่แยกมาจากแปลงพ่อแม่พันธุ์ถ้าเป็นการตัดยอดมาควรเด็ดใบข้อที่ 1-2 ออก เพื่อให้เกิดรากใหม่ขึ้นที่ข้อ หลังจากนั้นจึงนำไปปักชำลงบนวัสดุปลูก การเด็ดยอดปักชำควรกระทำในช่วงเย็นเพื่อไม่ให้พรรณไม้น้ำสูญเสียน้ำมากซึ่งอาจเหี่ยวตาย และทำให้ฟื้นตัวเร็วขึ้น ในระยะแรกควรกำบังแดดให้มากและรดน้ำหรือสเปรย์น้ำ

วันละหลายๆ ครั้ง พรรณไม้น้ำบางชนิดต้องการความชื้นสูงมาก เช่น การปลูกเลี้ยงอนูเบียส อาจต้องมีการรดน้ำหรือสเปรย์น้ำทุกๆ 15-30 นาที ส่วนแอมมาเนีย พรมมิ ใต้ใบแดง หางนกยูง ขาไก่ ดาวกระจาย หรือโรทาล่า อาจทำการรดน้ำวันละ 2-4 ครั้งก็เพียงพอ หลังจากพรรณไม้น้ำเจริญตั้งตัวดีแล้วควรใส่ปุ๋ยวิทยาศาสตร์เพื่อช่วยเร่งการเจริญเติบโตทุกๆ 1-2 สัปดาห์ ปุ๋ยที่ใช้เป็นปุ๋ย NPK ชนิดละลายน้ำ เช่น สูตร 25-5-5, สูตร 27-5-5 โดยอัตราการใช้ตามระบุไว้ที่ฉลาก

การเตรียมแปลงเพาะพันธุ์แบบแปลงดิน และการปลูกพรรณไม้น้ำในแปลงดิน

โรงเรือนปลูกพรรณไม้น้ำที่มีตาข่ายพรางแสงประมาณ 40-60 %
และติดตั้งระบบสเปรย์น้ำเป็นเวลา

2. การปลูกพรรณไม้น้ำแบบใต้น้ำ วิธีนี้จะใช้ในการเพาะขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำที่เป็นประเภทพืชใต้น้ำ เช่น ชบาน้ำ สาหร่ายคาบอมบ้า สาหร่ายเดนซ่า สาหร่ายฉัตร สาหร่ายขนนก เทปเล็ก เทปเกลียวและเทปใหญ่ เป็นต้น บ่อปลูกจะมีทั้งที่เป็นบ่อดินและบ่อซีเมนต์ โดยขนาดของบ่อปลูกจะมีหลายขนาดขึ้นอยู่กับการวางแผนจัดการและงบประมาณ โดยทั่วไปจะมีความลึก

ของบ่อปลูกประมาณ 60-80 เซนติเมตร การปลูกทำได้โดยการตัดลำต้นมาปักชำในบ่อดินหรือในบ่อซีเมนต์ที่มีวัสดุปลูกเป็นกรวดแม่น้ำที่มีขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร โดยเติมน้ำให้มีระดับความลึกประมาณ 30 เซนติเมตร ปุ๋ยที่ใช้เป็นปุ๋ย NPK ชนิดละลายน้ำ เช่น สูตร 25-5-5, 30-20-10, 27-17-10 เป็นต้น อัตราการใช้ตามระบุไว้ที่ฉลาก (ส่วนใหญ่มีอัตราการใช้อยู่ระหว่าง 5-15 กรัมต่อปริมาตรน้ำในบ่อน้ำ 1,000 ลิตร) เมื่อพรรณไม้น้ำเจริญเติบโตแล้วจึงเด็ดยอดไปจำหน่าย ส่วนการปลูกต้นเทปชนิดต่างๆ ในบ่อซีเมนต์ที่มีพื้นเป็นกรวดแม่น้ำขนาดเล็ก ต้นเทป จะขยายออกทางด้านข้าง แตกออกเป็นไหลเกิดต้นใหม่เมื่อเจริญเติบโตดีแล้วจึงตัดออกไปจำหน่าย

บ่อปลูกสาหร่ายที่มีดินเป็นวัสดุปลูก

ต้นสาหร่ายคาบอมบ้าที่ปลูกในบ่อดิน

ต้นเทปที่ปลูกในบ่อดิน

ต้นสาหร่ายคาบอมบ้าที่ปลูกในกรวดแม่น้ำภายในบ่อซีเมนต์

3. การปลูกพรรณไม้น้ำโดยไม่ใช้ดิน

การปลูกพรรณไม้น้ำโดยไม่ใช้ดิน หมายถึง การปลูกพรรณไม้น้ำลงบนวัสดุปลูกชนิดต่างๆ แทนดิน หรือไม่ต้องมีวัสดุปลูกก็ได้ โดยพรรณไม้น้ำจะได้รับสารละลายธาตุอาหารพืชที่มีน้ำผสมกับปุ๋ยที่มีธาตุต่างๆ ที่พืชต้องการจากทางรากพืช

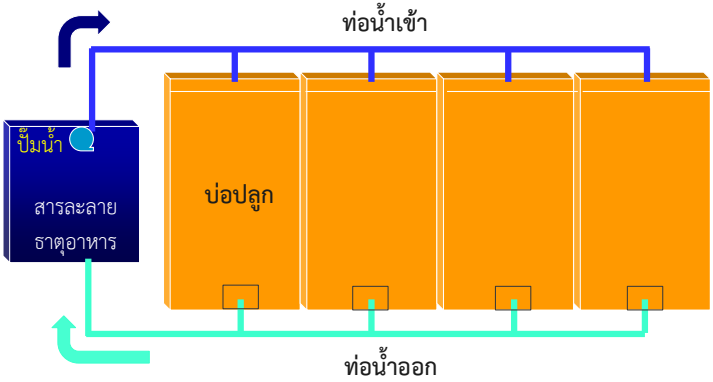
ระบบการปลูกพรรณไม้น้ำแบบไร้ดินสามารถจำแนกตามวิธีการปลูกออกเป็น 2 ระบบใหญ่ๆ คือ การปลูกพรรณไม้น้ำในกรวดแม่น้ำ และการปลูกพรรณไม้น้ำในสารละลายธาตุอาหารพืช

1. การปลูกพรรณไม้น้ำในกรวดแม่น้ำ

การปลูกพรรณไม้น้ำโดยใช้กรวดแม่น้ำขนาดเล็กเป็นวัสดุปลูก กรวดแม่น้ำที่ใช้มีขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร บ่อปลูกอาจเป็นบ่อซีเมนต์ บ่อไฟเบอร์ กระบะพลาสติก หรือถาดปลูกแบบสแตนเลส โดยมีระดับความลึกของกรวดแม่น้ำประมาณ 10-15 เซนติเมตร ก่อนนำกรวดแม่น้ำมาใช้ควรล้างด้วยน้ำประปาหรือน้ำสะอาดอย่างน้อย 2-3 ครั้ง จากนั้นเกลี่ยและผึ่งแดดให้กรวดแห้งเพื่อใช้ปลูกพรรณไม้น้ำ ข้อดีของการใช้กรวดแม่น้ำขนาดเล็กเป็นวัสดุปลูก คือ การผลิตพรรณไม้น้ำจะสะอาดและถอนต้นขึ้นมาได้ง่าย พรรณไม้น้ำที่ปลูกด้วยวิธีนี้เหมาะสำหรับพรรณไม้น้ำประเภทครึ่งบกครึ่งน้ำและประเภทชายน้ำ ซึ่งพรรณไม้น้ำสวยงามส่วนใหญ่มักพบว่าอยู่ในประเภทดังกล่าว เมื่อนำมาเพาะขยายพันธุ์โดยการตัดลำต้นปักชำ การตัดไหลหรือการตัดแยกเหง้า เป็นต้น แล้วนำไปปลูกในกรวดแม่น้ำที่มีน้ำแฉะหรือท่วมแค่โคนต้น แต่การใช้กรวดแม่น้ำขนาดเล็กเป็นวัสดุปลูกไม่มีแร่ธาตุซึ่งจะพบในส่วนผสมของดินตามธรรมชาติ จึงต้องมีการเติมธาตุอาหารหรือใส่ปุ๋ยเพิ่มเติมลงไปในรูปของสารละลายธาตุอาหารพืช การให้สารละลายธาตุอาหารพืชส่วนใหญ่เป็นระบบการนำสารละลายธาตุอาหารพืชหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ (recirculation system) โดยการใช้ปั๊มน้ำ ซึ่งจะหมุนเวียนสารละลายธาตุอาหารในระบบปลูกวันละ 2-3 ครั้ง สำหรับระดับค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายธาตุอาหารพืชที่ใช้ปลูกเลี้ยงพรรณไม้น้ำโดยใช้ทรายเป็นวัสดุปลูกมีค่าอยู่ระหว่าง 0.5-2.0 มิลลิซีเมนต์/เซนติเมตร

นอกจากนี้โรงเรือนปลูกควรมีตาข่ายพรางแสงประมาณร้อยละ 40-60 ซึ่งขึ้นกับความต้องการแสงของพรรณไม้น้ำแต่ละชนิด และอาจมีระบบสเปรย์น้ำโดยการตั้งเวลาหรือใช้บัวรดน้ำเป็นระยะๆ ช่วยให้ความชุ่มชื้นแก่พรรณไม้น้ำที่ปลูก

➢ **การปลูกพรรณไม้น้ำในระบบที่มีการนำสารละลายธาตุอาหารที่พืชกลับมาใช้ใหม่ (recirculating system)**



ระบบปลูกพรรณไม้น้ำโดยใช้กรวดแม่น้ำขนาดเล็กเป็นวัสดุปลูกโดยมีการนำสารละลายธาตุอาหารพืชหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่

บ่อซีเมนต์สำหรับปลูกพรรณไม้น้ำที่มีการให้สารละลายธาตุอาหารแบบหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่

บ่อพลาสติกสำหรับปลูกพรรณไม้น้ำที่มีกรวดแม่น้ำขนาดเล็กเป็นวัสดุปลูก

บ่อปลูกต้นอนูเบียสโดยใช้กรวดแม่น้ำขนาดเล็กเป็นวัสดุปลูก

บ่อปลูกพรรณไม้น้ำประเภทพืชครึ่งบกครึ่งน้ำและประเภทพืชชายน้ำ

2. การปลูกพรรณไม้น้ำในสารละลายธาตุอาหาร (water culture หรือ hydroponics) คือ การปลูกพืชลงบนสารละลายธาตุอาหารพืช โดยให้รากพืชสัมผัสกับสารอาหารโดยตรง

การปลูกพรรณไม้น้ำในน้ำเป็นการปลูกเลี้ยงพรรณไม้น้ำในระบบที่มีน้ำและสารละลายธาตุอาหารพืชหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ โดยการใช้ปั๊มน้ำซึ่งจะหมุนเวียนสารละลายธาตุอาหารในระบบปลูก สำหรับระดับความเข้มข้นของสารละลายธาตุอาหารมีค่าอยู่ระหว่าง 0.5-2.0 มิลลิซีเมนต์/เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับการเลี้ยงพรรณไม้น้ำแต่ละชนิด พรรณไม้น้ำที่ปลูกเลี้ยงมีทั้งการใช้วัสดุปลูกเพื่อพยุงลำต้นและการไม่ใช้วัสดุในการพยุงลำต้น พรรณไม้น้ำที่ปลูกเลี้ยงโดยใช้วัสดุปลูกเพื่อพยุงลำต้น เช่น การใช้ใยหิน (rock wool) ฟองน้ำ ขุยมะพร้าว เป็นต้น ซึ่งมีความเหมาะสำหรับการปลูกเลี้ยงพรรณไม้น้ำประเภทครึ่งบกครึ่งน้ำและประเภทชายน้ำ ได้แก่ อนูเบียส ใบพาย อเมซอน หางนกยูง โลบิเลีย ดาวน้อย และเฟิร์นน้ำ เป็นต้น ส่วนพรรณไม้น้ำที่ปลูกเลี้ยงโดยไม่ใช้วัสดุในการพยุงลำต้น แต่เป็นการปลูกเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารพืชโดยตรง เช่น การเลี้ยงมอสน้ำและริคเซีย เป็นต้น ทั้งนี้การปลูกพรรณไม้น้ำในน้ำสามารถจำแนกตามระบบการให้สารละลายธาตุอาหารพืช ได้ดังนี้

2.1 การปลูกพรรณไม้น้ำแบบระบบให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพืชเป็นแผ่นบางบนรางปลูกอย่างต่อเนื่อง (Nutrient film technique, NFT) เป็นการปลูกพรรณไม้น้ำโดยให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพรรณไม้น้ำอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา มีลักษณะคล้ายแผ่นฟิล์มที่มีความบางประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ระบบนี้ประกอบด้วยรางปลูกซึ่งอาจทำจากแผ่นพลาสติกสองหน้าขาวและดำ ความหนา 80-200 ไมครอน หรือจาก PVC ขึ้นรูปเป็นรางสำเร็จรูป มีสีขาวเพื่อลดการสะสมความร้อน มีความกว้าง 10 เซนติเมตร รางปลูกมีความยาวอยู่ระหว่าง 4-18 เมตร แต่โดยทั่วไปไม่ควรเกิน 10 เมตร เพราะจะทำให้เกิดความแตกต่างของปริมาณออกซิเจนระหว่างหัวและท้ายรางได้ รางปลูกมีความสูง 5 เซนติเมตร ด้านบนหรือฝารางมีความโค้งนูนหรือมีเหลี่ยมเล็กน้อยเพื่อสะดวกในการไหลของน้ำจากระบบสเปรย์ให้ออกไปจากตัวรางปลูกได้ โดยด้านบนเจาะรูเพื่อใช้ปลูกพรรณไม้น้ำ รางปลูกถูกปรับให้ลาดเทประมาณร้อยละ 1-1.5 สารละลายจะถูกปั๊มสูบน้ำจากถังเก็บสารละลาย แล้วปล่อยเป็นฟิล์มบางๆ ผ่านรากพืชด้วยความเร็วประมาณ 1-2 ลิตรต่อนาที เพื่อให้รากพืชได้รับออกซิเจนเพียงพอ ที่ปลายอีกด้านหนึ่งของลำรางจะมีรางรองรับสารละลายธาตุอาหารที่ใช้แล้ว ไปรวมที่ถังเพื่อดูดกลับมาใช้ใหม่

รางปลูกมักวางบนโครงสร้างที่สามารถรองรับน้ำหนักได้ ส่วนใหญ่มักใช้เหล็กหรืออลูมิเนียม โดยมีความสูงจากพื้นประมาณ 80-100 เซนติเมตร เพื่อสะดวกในการปฏิบัติงาน การปลูกพรรณไม้น้ำในระบบนี้มักใช้ใยหิน (rockwool) เป็นวัสดุเพื่อพยุงลำต้น

ระบบให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพืชเป็นแผ่นบางบนรางปลูกอย่างต่อเนื่อง (Nutrient film technique, NFT)

2.2 การปลูกพรรณไม้น้ำแบบระบบให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพืชในระดับลึก (Deep flow technique, DFT) เป็นการปลูกพรรณไม้น้ำโดยรากของพรรณไม้น้ำแช่อยู่ในสารละลายธาตุอาหารพืชที่มีระดับความลึกประมาณ 1.5-5 เซนติเมตร การหมุนเวียนสารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านช่องว่างภายในรางโดยใช้ปั๊มน้ำ ซึ่งติดตั้งเครื่องควบคุมเวลาหรืออาจใช้แรงงานคนในการเปิด-ปิดการทำงานของปั๊มน้ำเป็นระยะๆ เนื่องจากเมื่อปั๊มน้ำหยุดการทำงานก็ยังคงมีสารละลายธาตุอาหารขังอยู่ในระบบปลูก การปลูกพรรณไม้น้ำในระบบนี้มีทั้งการใช้วัสดุปลูกเพื่อพยุงลำต้นและการไม่ใช้วัสดุในการพยุงลำต้น เทคนิคการปลูกแบบ DFT ได้มีการพัฒนาหลายรูปแบบ ดังนี้

- การปลูกพรรณไม้น้ำระบบให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพืชในรางปลูกระดับลึก (DFT) แบบรางปลูก ระบบนี้ใช้รางปลูกเช่นเดียวกับการปลูกพรรณไม้น้ำแบบระบบให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพืชเป็นแผ่นบางบนรางปลูกอย่างต่อเนื่อง (NFT) โดยจัดวางพรรณไม้น้ำในหลุมปลูก ให้รากของพรรณไม้น้ำแช่อยู่ในสารละลายธาตุอาหารพืชซึ่งมีระดับความลึกประมาณ 1.5-2.5 เซนติเมตร การหมุนเวียนสารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านช่องว่างภายในรางโดยใช้ปั๊มน้ำ วัสดุปลูกและรากพรรณไม้น้ำจะสัมผัสกับสารละลายธาตุอาหารในรางปลูก

ต้นอนูเบียสที่ปลูกในระบบ DFT แบบรางปลูก

ต้นอเมซอนที่ปลูกในระบบ DFT แบบรางปลูก

ระบบการให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพืชในรางปลูกระดับลึก (DFT) แบบรางปลูกที่จัดวางรางปลูกซ้อนกัน 2 ชั้น

- การปลูกพรรณไม้น้ำแบบระบบให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพืชในระดับลึกอย่างต่อเนื่อง (DFT) แบบท่อปลูก ระบบนี้ใช้ท่อปลูกทำมาจากท่อ PVC สีขาว โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 นิ้ว ความยาวอยู่ระหว่าง 4-6 เมตร และด้านบนของท่อเจาะรูเพื่อปลูกพรรณไม้น้ำ โดยรากของพรรณไม้น้ำแช่อยู่ในสารละลายธาตุอาหารพืชซึ่งมีระดับความลึกประมาณ 3-5 เซนติเมตร การหมุนเวียนสารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านช่องว่างภายในท่อโดยใช้ปั๊มน้ำ

ระบบการให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพืชในรางปลูกระดับลึก (DFT) แบบท่อปลูก

- การปลูกพรรณไม้น้ำแบบระบบให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพืชในระดับลึกอย่างต่อเนื่อง (DFT) แบบถาดปลูก ระบบนี้เป็นวิธีการปลูกพรรณไม้น้ำในถาดปลูกแบบสแตนเลส ขนาดความกว้างอยู่ระหว่าง 0.6-1.0 เมตร ความยาวอยู่ระหว่าง 1.5-2 เมตร และมีความสูงประมาณ 15 เซนติเมตร (ถาดปลูกมีหลายขนาดขึ้นอยู่กับพื้นที่และการวางแผนจัดการ) ระบบนี้เป็นวิธีการปลูกพรรณไม้น้ำด้วยใยหินแล้วใส่ลงในตะกร้าปลูกชนิดพลาสติก จากนั้นนำไปวางในถาดหลุมปลูกชนิดพลาสติกหรืออาจใช้แผ่นโฟมเจาะรูซึ่งวางอยู่ในถาดปลูกแบบสแตนเลส โดยรากของพรรณไม้น้ำแช่อยู่ในสารละลายธาตุอาหารพืชระดับลึกประมาณ 5-10 เซนติเมตร และหมุนเวียนสารละลายธาตุอาหารโดยใช้ปั๊มน้ำ

การปลูกพรรณไม้น้ำแบบระบบให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพืชในระดับลึก (DFT) แบบถาดปลูก

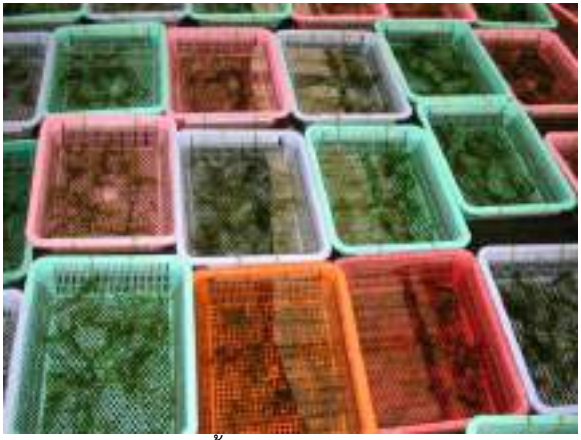
พรรณไม้น้ำที่ปลูกในระบบ DFT แบบถาดปลูก ซึ่งจัดวางถาดปลูกแบบชั้นเดียว

ต้นอนูเบียสที่ปลูกในระบบ DFT แบบถาดปลูก ซึ่งจัดวางถาดปลูกซ้อนกัน 2 ชั้น

2.3 การปลูกพรรณไม้น้ำในสารละลายธาตุอาหารพืช

บ่อปลูกอาจเป็นบ่อซีเมนต์ บ่อไฟเบอร์หรือพลาสติก (บ่อปลูกมีหลายขนาดขึ้นอยู่กับพื้นที่ การวางแผนจัดการและงบประมาณ โดยทั่วไปมีขนาดความกว้างอยู่ระหว่าง 90-400 เซนติเมตร ความยาวอยู่ระหว่าง 120-600 เซนติเมตร และความสูงอยู่ระหว่าง 20-60

เซนติเมตร) การให้สารละลายธาตุอาหารเป็นระบบการนำสารละลายธาตุอาหารพืชหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ (recirculating system) ด้วยปั๊มน้ำเป็นระยะ พรรณไม้น้ำที่ปลูกด้วยวิธีนี้ได้แก่ มอสน้ำ และริคเซีย โดยทำการตัดทัลลัสลงในตะกร้าพลาสติกและลอยไว้ในน้ำ



การปลูกมอสน้ำในสารละลายธาตุอาหารพืช

วัสดุและอุปกรณ์ในระบบปลูกพรรณไม้น้ำโดยไม่ใช้ดิน

1. โรงเรือน (green house)

ปัจจุบันการปลูกพรรณไม้น้ำเพื่อการค้าแบบพัฒนาส่วนใหญ่นิยมเพาะเลี้ยงกันในโรงเรือน ซึ่งสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่างๆ ให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำ ได้แก่

- สามารถป้องกันแมลงไม่ให้เข้าไปทำลายพืชที่ปลูก ทำให้ไม่ต้องใช้ยาฆ่าแมลง
- ป้องกันน้ำฝนลงไปเจือปนในสารละลายธาตุอาหาร จนสารละลายเจือจางเกินไป ไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของพืช และมีปริมาตรที่เพิ่มขึ้นจนไหลล้นออกมาจากเครื่องปลูก ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายกับการปลูกพืชทั้งระบบ
- สามารถควบคุมปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมในการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช เช่น ความเข้มแสง ระยะเวลาที่พืชรับแสง อุณหภูมิของอากาศ อุณหภูมิของสารละลาย อุณหภูมิของราก และความชื้นสัมพัทธ์ เป็นต้น ทำให้สามารถผลิตพืชได้ทั้งปี โดยไม่ต้องอาศัยฤดูกาลตามธรรมชาติเข้าช่วย ผู้ปลูกสามารถวางแผนการผลิตได้ง่าย และเสี่ยงต่อการแปรปรวนของธรรมชาติน้อยกว่าการปลูกในพื้นที่โล่งแจ้ง

- สามารถออกแบบให้เป็นการผลิตอัตโนมัติ ช่วยประหยัดแรงงานในการดำเนินการ
- ลดโอกาสในการสัมผัสสิ่งสกปรก ทำให้พืชที่ผลิตได้ สะอาดไม่เป็นพาหะนำโรค
- มีสิ่งแวดล้อมในการทำงานที่ดี และสะอาดไม่เปื้อนดินโคลน ช่วยให้ผู้ปลูกมีความเพลิดเพลินในการทำงานมากกว่า

องค์ประกอบของโรงเรือนสามารถจำแนกได้ดังนี้

1. รูปแบบโรงเรือน สามารถจำแนกตามรูปทรง ได้ดังนี้

1.1 โรงเรือนที่มีวัสดุพลางแสงคลุมแปลงปลูก โรงเรือนประเภทนี้โครงสร้างโรงเรือนอาจสร้างด้วยไม้หรือท่อเหล็กหรือโครงสร้างคอนกรีต วัสดุมุงโรงเรือนอาจใช้พลาสติกหรือตาข่ายพราง 40-80 % ขึ้นอยู่กับชนิดของพรรณไม้น้ำ ด้านข้างของโรงเรือนป้องกันแมลงด้วยตาข่ายกันแมลง และพรางแสงด้วยตาข่ายพรางแสง การหมุนเวียนของอากาศเกิดจากลมที่พัดผ่าน

โรงเรือนที่มีวัสดุพลางแสงคลุมบ่อปลูกพรรณไม้น้ำ

1.2 โรงเรือนแบบกึ่งปิดที่ควบคุมสภาพแวดล้อม โรงเรือนประเภทนี้โครงสร้างโรงเรือนส่วนใหญ่ทำด้วยเหล็ก วัสดุมุงหลังคาและผนังโรงเรือนอาจใช้พลาสติกหรือพลาสติกชนิดแผ่นแข็ง พรางแสงด้วยตาข่ายประมาณ 40-80 % ไว้เหนือหลังคาโรงเรือนและด้านข้างของโรงเรือน ภายในโรงเรือนติดตั้งพัดลมดูดอากาศ และระบบสเปรย์น้ำ ลมจากภายนอกสามารถหมุนเวียนเข้าไปในโรงเรือนได้และระบายอากาศภายในโรงเรือนด้วยพัดลมดูดอากาศ

โรงเรือนแบบกึ่งปิดที่ควบคุมสภาพแวดล้อม

1.3 โรงเรือนปลูกพรรณไม้น้ำระบบทำความเย็นแบบระเหยน้ำ (Evaporative cooling greenhouse)

โรงเรือนประเภทนี้โครงสร้างโรงเรือนส่วนใหญ่ทำด้วยเหล็ก วัสดุคลุมโรงเรือนมักใช้เป็นพลาสติกใส เหนือหลังคาโรงเรือนและด้านข้างของโรงเรือน พรางแสงด้วยตาข่ายประมาณ 40-80 % โรงเรือนเป็นระบบที่อาศัยหลักธรรมชาติ คือ หลักการระเหยของน้ำในการลดอุณหภูมิเมื่อน้ำระเหยไปเป็นไอน้ำ น้ำจะดูดซับพลังงานจากอากาศในรูปของความร้อนแฝงทำให้อากาศที่สูญเสียความร้อนไปกับการระเหยของน้ำมีผลให้อุณหภูมิลดต่ำลง โดยภายในโรงเรือนติดตั้งระบบควบคุมและสั่งงานอัตโนมัติ โดยมีเครื่องตรวจจับ (sensors) ซึ่งจะวัดค่าต่างๆ เช่น ปริมาณความชื้นสัมพันธ์ อุณหภูมิอากาศ เป็นต้น โดยเครื่องตรวจจับจะส่งข้อมูลที่วัดได้ไปสั่งงานอุปกรณ์ต่างๆ เช่น แผงระเหยน้ำ (cooling pad) พัดลม ตาข่ายพรางแสง ฯลฯ

โรงเรือนปลูกพรรณไม้น้ำระบบทำความเย็นแบบระเหยน้ำ

1.4 โรงเรือนขนาดเล็ก โครงสร้างโรงเรือนทำด้วยท่อ PVC หรือเหล็ก วัสดุคลุมโรงเรือนมักใช้พลาสติก หลังคาโรงเรือนและด้านข้างของโรงเรือน พรางแสงด้วยตาข่าย ภายใน

โรงเรือนติดตั้งระบบสเปรย์น้ำ โรงเรือนประเภทนี้เหมาะสำหรับการวางแผนการผลิตในระยะเริ่มต้น การปรับสภาพต้นอ่อน การทดลองและวิจัย เป็นต้น

โรงเรือนขนาดเล็ก

2. โครงสร้างโรงเรือน สามารถเลือกใช้วัสดุได้หลายแบบ ได้แก่ โครงสร้างเหล็ก โครงสร้างคอนกรีต โครงสร้างไม้ เป็นต้น

3. วัสดุมุงหลังคาโรงเรือนปลูก ได้แก่

- พลาสติกชนิดแผ่นม้วน (film) ปัจจุบันมีการใช้พลาสติกชนิดแผ่นม้วนเป็นวัสดุมุงหลังคาโรงเรือนเป็นจำนวนมาก พลาสติกที่ใช้มักมีการผสมหรือเคลือบด้วยสารเสริมความแข็งแรงเพื่อป้องกันไม่ให้แผ่นพลาสติกยืดออกเมื่อถูกดึงให้ตึงเป็นเวลานาน มีการผสมหรือเคลือบด้วยสารดูดกลืนแสง UV เพื่อช่วยยืดอายุการใช้งานให้นานขึ้น มีการผสมหรือเคลือบด้วยสารกระจายแสง ช่วยให้ความเข้มแสงในโรงเรือนสม่ำเสมอ พืชสามารถเจริญเติบโตได้สม่ำเสมอตามไปด้วย ข้อดีของการใช้พลาสติกชนิดแผ่นม้วนคือราคาถูก แต่มีข้อเสียคืออายุการใช้งานสั้นประมาณ 2-3 ปี

- ไฟเบอร์กลาส เป็นวัสดุที่มีโครงสร้างแข็งแรง แสงอาทิตย์ส่องผ่านได้ประมาณ 80-90 % แสงเกิดการกระจายเมื่อส่องผ่าน ทำให้พืชในโรงเรือนได้รับแสงสม่ำเสมอ ไฟเบอร์กลาสมักมีการผลิตเป็นลักษณะลอนคลื่น ทำให้น้ำฝนหรือหยดน้ำสามารถไหลได้ง่าย มีน้ำหนักเบา อายุการใช้งาน 10-15 ปี

- กระจก ยอมให้แสงผ่านได้ดีมาก ประมาณร้อยละ 90 % ไม่ติดไฟ มีระยะเวลาการใช้งานนาน อาจถึง 30 ปี แต่อาจแตกได้ง่ายเมื่อได้รับแรงกระแทกแรงๆ หรือการยืด-หดตัว มีราคาแพง โรงเรือนที่ใช้กระจกมุงหลังคาต้องมีโครงสร้างที่แข็งแรง จึงมีค่าก่อสร้างที่สูงขึ้น

4. พื้นโรงเรือน มีหลายรูปแบบ ได้แก่ พื้นทราย พื้นกรวด พื้นหินเกล็ด และพื้นคอนกรีต เป็นต้น

5. การแบ่งพื้นที่ใช้สอยของโรงเรือนควรประกอบด้วยส่วนต่างๆ ได้แก่ ส่วนที่ใช้ปลูกพรรณไม้น้ำ ส่วนที่ใช้ติดตั้งระบบปรับสภาพสารละลายและเตรียมสารละลาย ส่วนที่ใช้สำหรับกระบวนการหลังเก็บเกี่ยว และส่วนที่ใช้เก็บวัสดุ เป็นต้น

2. ภาชนะที่ใช้ในการปลูกพรรณไม้น้ำ

ภาชนะปลูกที่ดีจะต้องทำจากวัสดุที่ไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารต่างๆ ต้องมีความคงทนแข็งแรง ใช้ได้นาน ติดตั้งใช้งานง่าย และน้ำหนักเบา ปัจจุบันมีการนำภาชนะพลาสติกมาใช้เนื่องจากมีความคงทน น้ำหนักเบา สามารถทำเป็นรูปร่างต่างๆ ได้มาก และราคาถูก ภาชนะโลหะที่เคลือบด้วยสังกะสีไม่ควรนำมาใช้เพราะอาจมีการละลายของสังกะสี ทำให้สารละลายธาตุอาหารพืชมีความเข้มข้นของสังกะสีสูงและอาจเป็นพิษต่อพืชได้ ภาชนะปลูกที่ทำจากวัสดุประเภทซีเมนต์เมื่อนำไปใช้ใส่สารละลายจะมีสภาพเป็นด่างทำให้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของสารละลายสูงขึ้นจึงควรนำไปแช่น้ำให้สะอาดเพื่อเป็นการปรับสภาพให้เป็นกลางก่อนนำไปใช้ นอกจากนี้การวางภาชนะปลูกนิยมวางในแนวยาว ขวางทิศทางการเคลื่อนที่ของดวงอาทิตย์เพื่อให้พืชได้รับแสงอย่างทั่วถึง ไม่มีการบังแดดกัน ภาชนะที่ใช้กันในปัจจุบันอาจจำแนกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ดังนี้

2.1 ภาชนะที่เป็นรางปลูก (gully) คล้ายรางรองน้ำฝน ทำจากพลาสติก PVC (polyvinyl chloride) โดยนิยมทำรางปลูกให้มีลักษณะเป็นเหลี่ยมและแบบตัวยู (U) แล้วมีฝาปิดด้านบน รางปลูกมีความกว้าง 10 เซนติเมตร ความยาว 4-8 เมตร และความสูง 5 เซนติเมตร และเจาะรูเป็นวงกลมเพื่อปลูกพรรณไม้น้ำ ส่วนใหญ่รางปลูกแบบนี้ใช้กับระบบให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพืชเป็นแผ่นบางบนรางปลูกอย่างต่อเนื่อง (NFT) และการปลูกพรรณไม้น้ำแบบระบบให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพืชในระดับลึก (DFT) แบบรางปลูก

2.2 ภาชนะที่เป็นท่อปลูก (tube) มีทรงกลม มักทำด้วยพลาสติก PVC ทรงกลมขนาดต่างๆ ส่วนมากใช้กับระบบการปลูกพรรณไม้น้ำแบบระบบให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพืชในระดับลึก (DFT) แบบท่อปลูก

2.3 ภาชนะที่ขึ้นรูปร่าง เช่น รูปทรงสี่เหลี่ยมที่ทำจากวัสดุอื่นๆ ได้แก่ บ่อซีเมนต์ บ่อพลาสติก บ่อไฟเบอร์ ถาดสแตนเลส หรือโฟม เป็นต้น

ในการปลูกพรรณไม้น้ำในระบบ NFT และ DFT โดยใช้วัสดุค้ำจุน เช่น ใยหินหรือฟองน้ำ เมื่อปลูกพรรณไม้น้ำในวัสดุค้ำจุนแล้วต้องนำพรรณไม้น้ำปลูกลงในตะกร้าปลูกชนิดพลาสติกซึ่งมีขนาดเล็ก จากนั้นนำไปวางในระบบปลูกที่เตรียมไว้ เช่น รางปลูก ท่อปลูกหรือแผ่นโฟมที่เจาะรูไว้ หากเป็นระบบปลูกที่ใช้ถาดปลูกแบบสแตนเลสก็สามารถวางตะกร้าปลูกชนิดพลาสติกที่ปลูกพรรณไม้น้ำแล้วลงในถาดหลุมชนิดพลาสติกแล้วนำไปวางบนถาดสแตนเลสต่อไป

รางปลูกพรรณไม้น้ำทำจากพลาสติก PVC

บ่อซีเมนต์

บ่อพลาสติก

ถาดสแตนเลส

ภาชนะที่ใช้ในการปลูกพรรณไม้น้ำ ได้แก่ ตะกร้าปลูกชนิดพลาสติกและถาดหลุมชนิดพลาสติก

3. วัสดุปลูก

วัสดุปลูก หมายถึง วัตถุต่างๆ ที่เลือกนำมาเพื่อใช้ปลูกพืชทดแทนดินและทำให้ต้นพืชเจริญเติบโตได้เป็นปกติ โดยทั่วไปวัสดุปลูกมีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืช คือ ค้ำจุนส่วนของพืชที่อยู่เหนือวัสดุปลูกให้ตั้งตรงอยู่ได้ เก็บสำรองธาตุอาหารพืช กักเก็บน้ำเพื่อเป็นประโยชน์ต่อพืช และการแลกเปลี่ยนอากาศระหว่างรากพืชกับช่องว่างรอบๆ วัสดุปลูก ในการพิจารณาเลือกใช้วัสดุปลูกสำหรับการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน จำเป็นต้องพิจารณาถึงคุณสมบัติของวัสดุปลูกด้วย เช่น มีคุณสมบัติรักษาอัตราส่วนของน้ำและอากาศให้เหมาะสมตลอดการปลูก ไม่มีการอัดตัวหรือยุบตัวเมื่อเปียกน้ำหรือเมื่อใช้ไปนานๆ ไม่มีสารที่เป็นพิษต่อพืชเจือปนอยู่ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารละลายธาตุอาหารและกับภาชนะที่ใช้บรรจุ เป็นวัสดุที่มีความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุ (C.E.C.) ต่ำหรือไม่มีเลยเพื่อจะได้ไม่มีผลต่อองค์ประกอบของสารละลายธาตุอาหารพืช รากพืช

สามารถแพร่กระจายได้สะดวกทั่วทุกส่วนของวัสดุปลูก เป็นวัสดุที่ไม่เป็นแหล่งสะสมของโรคและแมลง สามารถนำวัสดุปลูกกลับมาใช้ใหม่ได้ง่าย และมีราคาถูก เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำวัสดุที่ไม่ใช่ดินมาปลูกพรรณไม้น้ำ ได้แก่

(1) กรวดแม่น้ำ ที่ใช้มีขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร ความคงทนของโครงสร้างดี อายุการใช้งานหลายปี ไม่มีคุณสมบัติในการแลกเปลี่ยนประจุ ราคาถูกและหาได้ง่าย แต่ทรายจะมีน้ำหนักมาก มีความพรุนต่ำ มีความสามารถอุ้มน้ำได้น้อย ขนาดทรายถ้าละเอียดมากจะจับตัวกันแน่นทำให้การระบายน้ำและอากาศไม่ดี

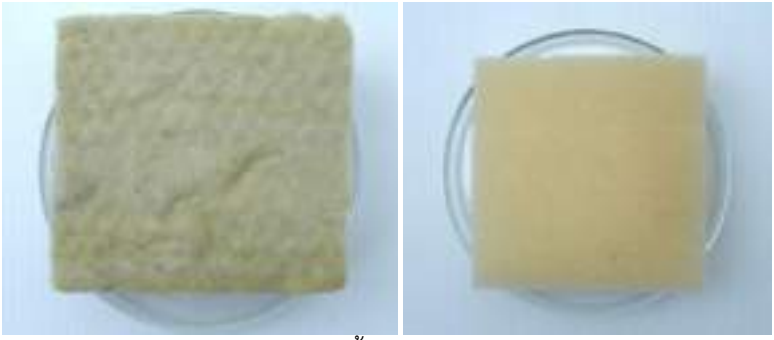
(2) ใยหิน (rock wool) เป็นวัสดุที่ผลิตในโรงงานอุตสาหกรรม โดยการหลอมหินภูเขาไฟและทำให้เป็นเส้นใยและผสมด้วยสารเรซินประมาณ 4-5 % โดยน้ำหนัก เพื่อทำให้อ่อนตัวและผสมด้วยน้ำมันชนิดพิเศษเพื่อให้มีคุณสมบัติเกาะน้ำได้ มีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำสูงประมาณ 87 % ไม่มีคุณสมบัติในการแลกเปลี่ยนประจุ ความพรุนสูงประมาณ 97 % เป็นวัสดุที่มีการระบายน้ำและอากาศดีที่สุด การใช้งานง่ายน้ำหนักเบา ฆ่าเชื้อโรคและแมลงได้ง่าย แต่ความคงทนของโครงสร้างไม่ดีและมีราคาแพง

(3) ฟองน้ำอัดแท่ง ผลิตจากการนำเศษฟองน้ำหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และนำกลับมาอัดเป็นแผ่นโดยไอน้ำ และตัดเป็นแท่งตามขนาดที่ต้องการ ฟองน้ำอัดแท่งที่ใช้ต้องไม่มีการใส่สารป้องกันการติดไฟ เนื่องจากสารนี้เป็นพิษต่อพืชอย่างรุนแรง ฟองน้ำอัดแท่งมีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำประมาณ 70 % และมีความพรุนประมาณ 90 % สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้งโดยมานึ่งฆ่าเชื้อโรคด้วยไอน้ำ แต่การล้างทำความสะอาดวัสดุปลูกระหว่างการปลูกเลี้ยงทำได้ยาก

(4) ขุยมะพร้าว มีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำดีมาก ความพรุนสูง น้ำหนักเบาง่ายต่อการนำมาใช้และราคาถูก แต่มีคุณสมบัติในการแลกเปลี่ยนประจุมีค่าสูงเมื่อขุยมะพร้าวผ่านขบวนการสลายตัว ความคงทนของโครงสร้างไม่ดีเนื่องจากสามารถสลายตัวได้

นอกจากวัสดุปลูกพรรณไม้น้ำที่กล่าวมาแล้ว สามารถใช้ขอนไม้สำหรับใช้เป็นค้ำจุนสำหรับการปลูกเลี้ยงพรรณไม้น้ำอนูเบียส รากดำใบใหญ่และรากดำใบยาว เป็นต้น การใช้อิฐมอญสำหรับการปลูกเลี้ยงพรรณไม้น้ำในรากดำใบใหญ่และรากดำใบยาว เป็นต้น การใช้แผ่นตะแกรงสแตนเลสหรือสก็อตไบรท์สำหรับการปลูกเลี้ยงมอสน้ำและริคเซีย เป็นต้น

กรวดแม่น้ำขนาดเล็ก

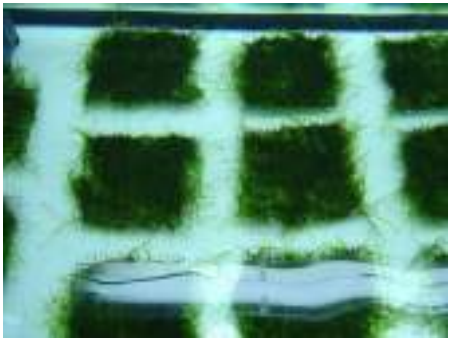


ใยหินและฟองน้ำชนิดสำหรับปลูกพืช

ขุยมะพร้าว

อิฐมอญ

ขอนไม้



แผ่นตะแกรงสแตนเลสและสก็อตไบรท์

4. ปุ๋ยหรือสารละลายธาตุอาหารพืช

ในการปลูกพรรณไม้น้ำโดยไม่ใช้ดิน ปัจจัยหลักที่ทำให้พรรณไม้น้ำมีการเจริญเติบโต คือ ธาตุอาหารที่เป็นวัตถุดิบในการให้พรรณไม้น้ำเจริญเติบโต ในกระบวนการสร้างสารอาหารโดยกระบวนการสังเคราะห์แสง วัตถุดิบที่ใช้คือ คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เมื่อได้รับแสงบนคลอโรฟิลด์ จะได้สารคาร์โบไฮเดรต และออกซิเจนจะเห็นได้ว่าธาตุอาหารที่พรรณไม้น้ำใช้ในกระบวนการดังกล่าว คือ คาร์บอน (C) จากคาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน ออกซิเจน จากน้ำ (H_2O) และในส่วนของคลอโรฟิลล์ในพืชมีธาตุอื่นๆ เป็นองค์ประกอบ โดยแบ่งธาตุอาหารตามแหล่งที่มาของธาตุอาหารออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

4.1 กลุ่มที่ได้มาจากน้ำและอากาศได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O)

4.2 กลุ่มที่ได้มาจากปุ๋ย ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โปตัสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) กำมะถัน (S) เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) โบรอน (B) โมลิบดินัม (Mo) และคลอรีน (Cl)

5. น้ำ

น้ำเป็นสิ่งที่จำเป็นที่สุดสำหรับการปลูกพรรณไม้น้ำโดยไม่ใช้ดินโดยต้องคำนึงถึง แหล่งน้ำที่ใช้และคุณสมบัติของน้ำที่เหมาะสม แหล่งน้ำที่ใช้สำหรับการปลูกพรรณไม้น้ำโดยไม่ใช้ดิน ได้แก่ น้ำฝน น้ำท่า น้ำใต้ดิน น้ำชลประทาน และน้ำประปา เป็นต้น คุณสมบัติของน้ำที่ใช้เตรียมสารละลายเป็นปัจจัยในการกำหนดการเจริญเติบโตพรรณไม้น้ำที่ปลูก การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำทำให้ทราบถึงระดับของธาตุอาหารในน้ำ โดยน้ำที่เหมาะสมในการเตรียมสารละลายธาตุอาหารควรมีคุณสมบัติดังนี้

คุณสมบัติของน้ำที่ใช้ในการปลูกพรรณไม้น้ำโดยไม่ใช้ดิน

ธาตุและอนุมูลที่เจือปนในน้ำ		น้ำหนักโมเลกุล	ค่าสูงสุดที่สามารถมีอยู่ในน้ำได้
			มิลลิกรัม/ลิตร
โซเดียม	Na^{+}	23.0	11.5
คลอรีน	Cl^{-}	35.5	35.5
แคลเซียม	Ca^{++}	40.1	80.2
แมกนีเซียม	Mg^{++}	24.3	12.2
ซัลเฟต	SO_4^{++}	96.1	48.1
			ไมโครกรัม/ลิตร
เหล็ก	Fe^{++}	55.9	28.0
แมงกานีส	Mn^{++}	54.9	549.0
ทองแดง	Cu^{++}	63.5	63.5
สังกะสี	Zn^{++}	65.4	327.0
โบรอน	B^{+++}	10.8	270.0
ฟลูออไรด์	F^{-}	19.0	475.0
ค่าการนำไฟฟ้า	EC		0.5mS/cm 25°C

ที่มา: อารักษ์ (2544)

น้ำที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสารละลายธาตุอาหาร ควรเป็นน้ำที่มีปริมาณของอิออนต่างๆ อยู่น้อยมากหรือไม่มีเลย หากคุณสมบัติที่ได้จากการวิเคราะห์มีคุณภาพไม่เหมาะสม ควรปรับปรุงหรือแก้ไขตามสาเหตุ เช่น การกรองเพื่อแก้ไขปัญหาน้ำขุ่น การเติมคลอรีนเพื่อแก้ปัญหาเชื้อโรค การใช้วิธี Reverse osmosis เพื่อแก้ไขปัญหาเกลือของสารอื่นๆ ที่ปนอยู่ เป็นต้น

6. ต้นพันธุ์พรรณไม้น้ำ ควรเป็นชนิดที่ตลาดต้องการมีปริมาณมากพอ และมีความสะอาดปราศจากโรค แมลงและศัตรูพืช

7. ระบบไฟฟ้า เป็นต้นกำลังของพลังงานที่ขาดไม่ได้ การปลูกพรรณไม้น้ำโดยไม่ใช้ดินเชิงการค้าจำเป็นต้องพิจารณาจัดหากำลังไฟสำรองเนื่องจากหากไฟฟ้าขัดข้องเป็นระยะเวลานานอาจทำให้ผลผลิตเสียหายได้

8. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับควบคุมอุณหภูมิ แสงและความชื้นสัมพัทธ์ของโรงเรือน เพื่อช่วยลดอุณหภูมิและความร้อนแก่โรงเรือนและพรรณไม้น้ำ

8.1 เครื่องตรวจวัดอุณหภูมิของอากาศและความชื้นสัมพัทธ์ (Thermo-hygrometer)

8.2 เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter)

8.3 ระบบสเปรย์น้ำ เพื่อช่วยเพิ่มความชื้นและลดอุณหภูมิภายในโรงเรือน

- ระบบสเปรย์น้ำโดยใช้สปริงเกอร์ โดยการติดตั้งหัวพ่นไว้เหนือรางปลูก เพื่อช่วยเพิ่มความชื้นให้มีความเหมาะสมต่อการปลูกพรรณไม้น้ำโดยไม่ใช้ดิน

- ระบบมิสสเปรย์ เป็นระบบที่ใช้ปรับสภาพแวดล้อมโดยการพ่นน้ำเป็นกลุ่มละอองขนาดเล็กมาก ทำให้ความชื้นโดยรอบสูงขึ้น

นอกจากนี้ควรติดตั้งเครื่องกรองน้ำเพื่อลดการอุดตันของสิ่งต่างๆ ในน้ำที่มีต่อหัวน้ำหยดหรือระบบสเปรย์

เครื่องตรวจวัดอุณหภูมิของอากาศและความชื้นสัมพัทธ์ (Thermo-hygrometer)

เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter)

9. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับหมุนเวียนสารละลายธาตุอาหาร

- ถังหมุนเวียนสารละลายธาตุอาหาร ไม่ควรใช้ถังที่เป็นโลหะเนื่องจากสารเคมีในสารละลายอาจทำให้เกิดการกัดกร่อนเป็นสนิมได้ ถังที่เหมาะสมที่สุดควรเป็นถังพลาสติกหรือถังไฟเบอร์

- ปั๊มน้ำ เป็นเครื่องมือที่ทำหน้าที่หมุนเวียนสารละลายธาตุอาหารในระบบให้เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและเพื่อให้ออกซิเจนแก่รากพืช ดังนั้นปั๊มที่ใช้ต้องไม่เป็นสนิมง่าย และต่อกับท่อ PE เพื่อนำสารละลายหมุนเวียนในระบบ

10. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับตรวจและควบคุมสารละลายธาตุอาหาร

- อุปกรณ์สำหรับตรวจวัดความเป็นกรดเป็นด่าง การวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างนั้นอาจทำได้ 2 วิธี คือ วิธีเปรียบเทียบสีโดยใช้น้ำยาเปลี่ยนสี ซึ่งเป็นการวัดอย่างคร่าวๆ ส่วนอีกวิธีคือ ใช้เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

- เครื่องตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายธาตุอาหาร (EC meter) ซึ่งจะวัดการไหลของกระแสไฟฟ้าผ่านขั้วสองขั้ว ถ้าสารละลายมีความเข้มข้นของประจุมาก การไหลของอิเลคตรอนก็จะมากไปด้วยทำให้อ่านค่าการนำไฟฟ้าได้สูง

- เครื่องตรวจวัดอุณหภูมิของน้ำ (Thermometer) เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตร้อน อุณหภูมิของน้ำมีผลต่อการละลายได้ของออกซิเจนในน้ำ

การตรวจวัดนี้อาจใช้แรงคนหรือติดตั้งระบบอัตโนมัติก็ได้ ซึ่งการตรวจวัดและควบคุมด้วยระบบอัตโนมัติจะให้ผลที่ถูกต้องและรวดเร็วกว่า แต่ก็ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง

เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) และเครื่องตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายธาตุอาหาร (EC meter)

11. วัสดุและอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมสารละลายธาตุอาหาร

- ถังเก็บสารละลายธาตุอาหาร เพื่อใช้เก็บสารละลายธาตุอาหารที่เตรียมไว้สำหรับระบบปลูก
- เครื่องชั่ง เพื่อชั่งน้ำหนักปุ๋ยที่ต้องการ
- บีกเกอร์และกระบอกตวง เพื่อใช้ปรับระดับความเข้มข้นของสารละลายธาตุอาหาร
- ถุงมือ ใช้ในการเตรียมและควบคุมค่าความเป็นกรดเป็นด่าง เนื่องจากสารที่ใช้ปรับสภาพความเป็นกรดเป็นด่าง อาจทำลายผิวหนังและเสื้อผ้าได้

12. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับจัดการผลผลิต เช่น อุปกรณ์สำหรับเก็บเกี่ยว ตัดแต่ง ล้างทำความสะอาด และคัดขนาดเพื่อบรรจุหีบห่อ เป็นต้น

การเตรียมสารละลายธาตุอาหารในการปลูกพรรณไม้น้ำโดยไม่ใช้ดิน

โดยการนำแม่ปุ๋ยชนิดต่างๆ มาละลายน้ำ เพื่อให้ได้สัดส่วนของธาตุอาหารตามที่ต้องการ สัดส่วนของธาตุหลักและธาตุรองในสารละลายขึ้นอยู่กับความต้องการของพืชแต่ละชนิด โดยทั่วไปจะเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง เมื่อจะใช้จึงนำมาเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ ข้อดีคือ ไม่ต้องเตรียมภาชนะขนาดใหญ่เพื่อบรรจุสารละลายในปริมาณมาก ไม่ต้องชั่งหรือตวงปุ๋ยหรือสารที่ใช้หลายครั้ง นอกจากนี้ปุ๋ยบางชนิด เช่น สารประกอบแคลเซียมและโซเดียมไนเตรท ไม่ควรเก็บในรูปผงแห้ง เพราะจะดูดความชื้น จึงต้องเก็บในรูปสารละลาย

การเตรียมสารละลายธาตุอาหารจะแยกเป็น 2 ถัง คือ ถัง A และถัง B เนื่องจากปุ๋ยบางชนิดไม่สามารถผสมกันได้ที่ความเข้มข้นสูง ในการเติมสารละลายธาตุอาหารจะใช้ปริมาณถัง A และ B เท่ากับ 1 : 1 โดยสารละลายธาตุอาหาร A และ B มีความเข้มข้น 100 เท่า ในการละลายน้ำให้ได้ 10 ลิตร

ตัวอย่างปริมาณธาตุอาหาร (กรัม) สำหรับใช้เตรียมสารละลายธาตุอาหาร 1,000 ลิตร

ชนิดปุ๋ยเคมี	**กรัม**
Stock A	
Calcium nitrate	1,000
Iron chelate	65
Stock B	
Potassium nitrate	700
Magnesium sulphate	500
Mono potassium phosphate	150
Mono ammonium phosphate	50
Manganese sulphate	13.0
Boric acid	6.0
Zinc sulphate	4.9
Copper sulphate	1.8
Ammonium molybdate	1.9

ความเข้มข้นของสารละลายธาตุอาหารพรรณไม้น้ำ (จากตารางตัวอย่างปริมาณธาตุอาหาร)

ธาตุอาหาร	ความเข้มข้น (ppm)
Nitrogen	235
Phosphorus	44
Potassium	298
Calcium	176
Magnesium	48
Sulphur	67
Iron	7.35
Manganese	4.12
Zinc	1.11
Copper	0.45
Boron	1.05
Molybdinum	0.84

การจัดการคุณภาพน้ำและสารละลายธาตุอาหารในการปลูกพรรณไม้น้ำโดยไม่ใช้ดิน

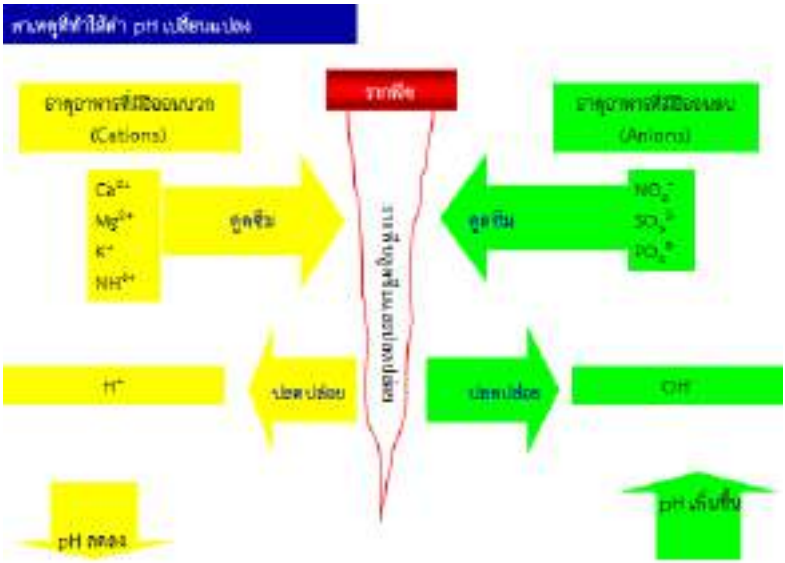
1. การควบคุมค่าความเป็นกรดเป็นด่างของสารละลายธาตุอาหาร

ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ คือ ปริมาณไฮโดรเจนอิออนและไฮดรอกไซด์อิออนที่มีอยู่ในน้ำ ซึ่งค่าความเป็นกรดเป็นด่างของสารละลายที่ต่ำจะทำให้พืชดูดธาตุอาหารหลัก เช่น ฟอสฟอรัส โปตัสเซียม แคลเซียมและแมกนีเซียม ได้น้อยลง ในขณะเดียวกันถ้าค่าความเป็นกรดเป็นด่างของสารละลายที่สูงจะทำให้พืชดูดธาตุจำพวกจุลธาตุ เช่น เหล็ก สังกะสี ทองแดง และแมงกานีส ได้น้อยลง

สาเหตุที่ทำให้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเปลี่ยนแปลง

1) พืชดูดธาตุอาหารที่มีอิออนลบหรือแอนอิออน (anions) เช่น ไนเตรต ซัลเฟตและฟอสเฟต แล้วปลดปล่อยไฮดรอกไซด์ (OH^-) สู่สารละลายธาตุอาหารจะทำให้สารละลายมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างสูงขึ้น

2) พืชดูดธาตุอาหารที่มีอิออนบวกมากหรือแคตอิออน (cations) เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม โปตัสเซียม แอมโมเนียม แล้วปลดปล่อยไฮโดรเจน (H^+) สู่สารละลายธาตุอาหารจะทำให้สารละลายมีความเป็นกรดเป็นด่างลดลง



การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดเป็นด่างเนื่องจากการดูดธาตุอาหารในสารละลายธาตุอาหารพืช

ที่มา: ดัดแปลงจาก ดิเรก (2546)

หากธาตุอาหารในสารละลายธาตุอาหารพืชมีอิออนบวกมากกว่าอิออนลบ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของสารละลายธาตุอาหารจะลดลง แต่ถ้าพืชมีการดูดกินอิออนลบมากกว่าอิออนบวกค่าความเป็นกรดเป็นด่างจะเพิ่มขึ้น ดังนั้น ควรรักษาระดับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้มีค่าอยู่ในช่วง 5.8-6.5 หากระบบควบคุมความเป็นกรดเป็นด่างของสารละลายที่ไม่ใช่วิธีการควบคุมดูแลแบบอัตโนมัติ ควรมีการปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างทุกวัน กรดที่เหมาะสมสำหรับการปรับลดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ได้แก่ กรดไนตริก (HNO_3) และกรดฟอสฟอริค (H_3PO_4)

หากสารละลายธาตุอาหารมีปริมาณแคลเซียมสูง การใช้กรดไนตริกจะเหมาะสมกว่าการใช้กรดฟอสฟอริค เนื่องจากแคลเซียมอิออนในน้ำอาจทำปฏิกิริยากับกรดฟอสฟอริคได้เป็นแคลเซียมฟอสเฟต ซึ่งไม่ละลายน้ำทำให้เกิดการตกตะกอน ส่วนสารที่ใช้ในการปรับเพิ่มความเป็นกรดเป็นด่าง ได้แก่ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

2. การควบคุมค่าความนำไฟฟ้า (Electrical conductivity, EC) ของสารละลายธาตุอาหารพืช

ค่าความนำไฟฟ้า (EC) เป็นค่าที่บอกความเข้มข้นของสารละลาย มีหน่วยเป็นมิลลิซีเมนส์/เซนติเมตร (mS/cm) หรือ มิลลิโมล/เซนติเมตร (mmho/cm) ถ้าค่า EC สูงแสดงว่าสารละลายมีความเข้มข้นสูง คือ มีธาตุอาหารละลายอยู่มาก ในการควบคุมระดับของเกลือหรือปุ๋ยในสารอาหารเพื่อให้พืชได้รับปริมาณสารอาหารตามที่ต้องการ โดยการวัดค่าการนำไฟฟ้าหรือวัดความสามารถของสารละลายที่จะให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่าน สำหรับค่า EC ที่เหมาะสำหรับการปลูกพรรณไม้น้ำควรมีค่าอยู่ระหว่าง 0.5-2 mS/cm

3. การควบคุมอุณหภูมิและออกซิเจนในสารละลายธาตุอาหารพืช

อุณหภูมิสูงมีอิทธิพลต่อปริมาณออกซิเจน ความสามารถในการดูดน้ำและธาตุอาหาร ถ้าอุณหภูมิสูงรากพืชจะต้องการออกซิเจนสูงมากขึ้นด้วย แต่ทั้งนี้อุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนจะมีความสัมพันธ์แบบผกผันกันคือเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นปริมาณออกซิเจนที่ละลายจะลดลง ทำให้ไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืช ระดับออกซิเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของพืชโดยทั่วไปควรมีออกซิเจน 8 มิลลิกรัม/ลิตร อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้ออกซิเจนละลายน้ำได้ลดลง ทำให้มีออกซิเจนไม่เพียงพอต่อการหายใจของราก เช่น เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 25 เป็น 30 องศาเซลเซียส จะทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลงจาก 8.25 ppm เหลือเพียง 7.5

ตัวอย่างวิธีการปลูกพรรณไม้น้ำโดยไม่ใช้ดิน

การปลูกต้นอนูเบียสบาร์เทอรี่โดยใช้ใยหินเป็นวัสดุปลูก

1. เตรียมระบบปลูกเลี้ยงพรรณไม้น้ำ ระบบให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพืชในรางปลูกระดับลึก (Deep flow techniques, DFT) แบบรางปลูก

- วัสดุและอุปกรณ์ เช่น รางปลูกแบบ DFT ระบบท่อหมุนเวียนสารละลายธาตุอาหาร ปั๊มน้ำ และใยหิน
- บริเวณพื้นที่ปลูกควรมีตาข่ายพรางแสง ประมาณ 40-60 %

- ระบบน้ำหยดหรือติดตั้ง timer สเปรย์น้ำเป็นเวลา หรือใช้บัวรดน้ำเป็นระยะ ช่วยให้ความชุ่มชื้นแก่พรรณไม้น้ำ

2. ปลูกต้นอนูเบียสบาร์เทอรี่ในระบบปลูกโดยไม่ใช้ดิน หากเป็นต้นอ่อนได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควรผ่านการปรับสภาพพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก่อนออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก โดยทำการปลูกต้นอนูเบียสบาร์เทอรี่ในใยหิน (rock wool) จำนวน 1 ต้นต่อ 1 ตะกร้าปลูก หากเป็นต้นอ่อนจากการตัดแยกเหง้าอาจพลางแสงในระยะเริ่มต้น

3. เตรียมสารละลายธาตุอาหาร

4. ปรับระดับความเข้มข้นของสารละลายธาตุอาหารและหมุนเวียนสารละลายธาตุอาหาร โดยระดับความเข้มข้นของสารละลายธาตุอาหารให้อยู่ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม (ประมาณ 1.0 มิลลิซีเมนต์/เซนติเมตร)

5. ตรวจสอบและปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้มีค่าอยู่ระหว่าง 5.8-6.5

6. ตรวจสอบสภาพแวดล้อมภายในโรงเรือน เช่น อุณหภูมิของอากาศควรมีค่าอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ควรมีค่าอยู่ในระหว่าง 60-80 %

การปักชำพรรณไม้น้ำใต้น้ำ

พรรณไม้น้ำที่ปลูกในดินหรือทราย ที่เป็นพรรณไม้น้ำประเภทครึ่งบกครึ่งน้ำส่วนใหญ่ ต้องมาปักชำในน้ำก่อนจำหน่าย เพื่อให้ลำต้น ใบ มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและสีสันให้มีความอ่อนช้อยสวยงามยิ่งขึ้น ทั้งสามารถเจริญงอกงามได้ดีเมื่อนำไปปลูกในตู้ การปลูกพรรณไม้น้ำที่เรียกว่าการปักชำใต้น้ำ มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมบ่อ

บ่อสำหรับปักชำใต้น้ำควรเป็นบ่อซีเมนต์ สามารถเก็บกับน้ำได้สูงประมาณ 60-80 เซนติเมตร ใส่กรวดแม่น้ำที่มีขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร ล้างสะอาดจนไม่มีตะกอน (ถ้าทรายไม่สะอาดจะทำให้น้ำขุ่น ตะกอนจะจับที่ใบทำให้ไม่สวยงาม) ใส่กรวดแม่น้ำระดับความลึกประมาณ 10-15 เซนติเมตร เติมน้ำให้มีระดับความลึกประมาณ 30 เซนติเมตร น้ำที่ใช้ต้องใสสะอาด อาจเป็นน้ำที่ผ่านการกรอง หรือใช้น้ำประปาก็ได้

2. การปลูก

2.1 เด็ดยอดพรรณไม้น้ำมาจากต้นพ่อ-แม่พันธุ์ ที่มีความยาวตามต้องการ แต่ต้องมีอย่างน้อย 2-3 ข้อ เช่น อาจตัดมา 5-6 ข้อ

2.2 เด็ดใบข้อที่ 1-2 ออก (เพื่อให้เกิดรากที่ข้อ) ถ้าหากไม่เด็ดใบออก ใบที่อยู่ใต้กรวดจะเน่า ทำให้น้ำเสียหรือเกิดความสกปรก

2.3 ปลูกพรรณไม้น้ำลงในกรวดแม่น้ำให้ห่างกันพอประมาณ เพื่อให้มีเนื้อที่ในการเจริญเติบโตของใบ จากนั้นเติมน้ำที่ใสและสะอาดลงไปจนกระทั่งระดับน้ำสูงจากทรายประมาณ 30-50 เซนติเมตร (ขึ้นกับความสูงของพรรณไม้น้ำที่ต้องการ)

3. การดูแลจัดการภายในบ่อ

3.1 ควรมีการถ่ายน้ำสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ประมาณ 30 % ของปริมาณน้ำในบ่อ เพื่อให้น้ำสะอาด

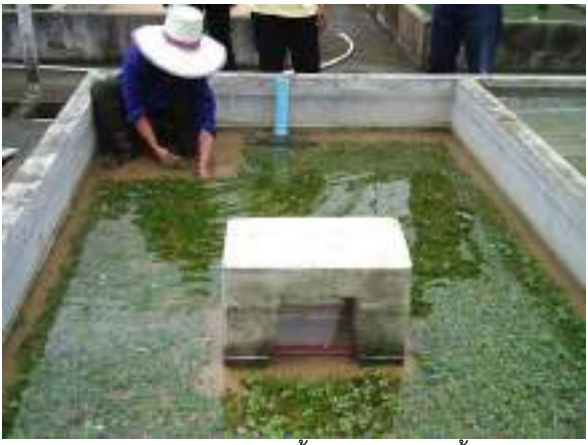
3.2 ใส่ปุ๋ยสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ได้แก่ ปุ๋ย NPK ชนิดละลายน้ำ เช่น สูตร 25-5-5, 30-20-10, 27-17-10 ในปริมาณ 5-15 ppm (5-15 กรัม/ปริมาตรน้ำ 1,000 ลิตร) ซึ่งปริมาณการใช้ปุ๋ยจะมากหรือน้อยขึ้นกับชนิดของพรรณไม้น้ำ และการใส่ปุ๋ยควรใส่หลังจากการเติมน้ำใหม่แล้ว 2-3 วัน

3.3 เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อให้พรรณไม้น้ำนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ทำได้โดยการเติมลงไปในกล่องกักคาร์บอนไดออกไซด์ที่ติดตั้งไว้ในบ่อ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะค่อยๆ ละลายออกมาจนกว่าพรรณไม้น้ำจะใช้จนหมด

3.4 ประมาณ 2-3 สัปดาห์ เมื่อใบมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและสีสันสวยงามตลอดจนมีรากงอกดีแล้ว จึงนำมาล้างทำความสะอาดเพื่อจำหน่ายหรือปลูกประดับในตู้ปลาต่อไป

ก่อนนำพรรณไม้น้ำลงชำใหม่ ควรล้างกรวดแม่น้ำให้สะอาด โดยสังเกตว่าน้ำที่ใส่ลงไปต้องใส จึงจะนำพรรณไม้น้ำลงปลูก นอกจากนั้นหากพรรณไม้น้ำที่ชำในบ่อทิ้งไว้นานเกินไปจนกระทั่งมีตะกอนเกาะตามลำต้นและใบ ควรถอนพรรณไม้น้ำออกให้หมด ถ่ายน้ำในบ่อออกให้หมด ล้างทรายให้สะอาด แล้วจึงเด็ดส่วนยอดนำไปชำใหม่อีกครั้ง เพราะการที่มีตะกอนเกาะตามลำต้นและใบดังกล่าว แสดงว่าน้ำในบ่อสกปรก หากไม่ล้างออกปลูกใหม่ ตะกอนเก่าจะเกาะซ้ำอีก ซึ่งจะไม่สามารถนำพรรณไม้น้ำไปจำหน่ายได้

บ่อซีเมนต์สำหรับปักชำใต้น้ำโดยใส่กรวดแม่น้ำขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร และล้างสะอาดจนไม่มีตะกอน



การปักชำพรรณไม้น้ำลงในกรวดแม่น้ำ

ใบของพรรณไม้น้ำมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและสีสันสวยงาม ตลอดจนมีรากงอก

เอกสารอ้างอิง

กาญจนรี พงษ์ฉวี. 2542. การขยายพันธุ์ผมหอม *Cryptocoryne tonkinensis* โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2542, สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ, กรุงเทพฯ. 22 หน้า.

กาญจนรี พงษ์ฉวี. 2543. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโลบิเลีย *Lobelia cardinalis* L., 1753. เอกสารวิชาการฉบับที่ 9/2543. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ, กรุงเทพฯ. 16 หน้า.

กาญจนรี พงษ์ฉวี. 2543. การเพาะขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำ**.** มติชนฉบับเทคโนโลยีชาวบ้าน 12(239) : 82-83.

กาญจนรี พงษ์ฉวี. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออนูเบียส *Anubias nana* Engler. **ใน:** รายงานการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. วันที่ 3-6 กุมภาพันธ์ 2547. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

กาญจนรี พงษ์ฉวี, กาญจนา จิรพันธ์พิพัฒน์, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์ และ วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย. 2553. พลับพลึงธาร พรรณไม้น้ำไทยหนึ่งเดียวในโลก. วารสารการประมง 63 (2) : 159-162.

กาญจนรี พงษ์ฉวี, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์ และ วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย. 2550. การปรับปรุงพันธุ์พรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส (*Anubias* spp.) โดยการฉายรังสีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารการประมง 60 : 493-497.

กาญจนรี พงษ์ฉวี, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์ และ วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย. 2554. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ *Cryptocoryne affinis* Hook. f., 1893. เอกสารวิชาการฉบับที่ 18/2554, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ. 29 หน้า.

กาญจนรี พงษ์ฉวี, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์ และ วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย. 2557. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบพาย ‘กริฟฟิทธิไอ’ *Cryptocoryne griffithii* Schott และการปลูกเลี้ยงในระบบไร้ดิน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 18/2557, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 23 หน้า.

กาญจนรี พงษ์ฉวี, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์ และ วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย. 2557. การขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำ *Cryptocoryne retrospiralis* (Roxb.) Fischer ในสภาพปลอดเชื้อ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 19/2557. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 16 หน้า.

กาญจนรี พงษ์ฉวี, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์ และ วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย. 2558. 60 ชนิดพรรณไม้น้ำประดับของไทย เฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราช

กุมารี ในโอกาสฉลองพระชนมายุครบ 5 รอบ 2 เมษายน 2558. กองวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 100 หน้า.

กาญจนรี พงษ์ฉวี, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์ และ วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย. มปป. พรรณไม้น้ำ. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 109 หน้า.

กาญจนรี พงษ์ฉวี, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์, วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย และ กาญจนา จิรพันธ์พิพัฒน์. มปป. การเพาะขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำ. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 62 หน้า.

กาญจนรี พงษ์ฉวี, สนธิพันธ์ ผาสุขดี, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์ และ วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย. 2555. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออเมซอนแดง *Echinodorus osiris* Rataj. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2555, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ. 23 หน้า.

กาญจนรี พงษ์ฉวี, ศาลักษณ์ พรรณสิริ และ รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์. 2557. การพัฒนาการขยายพันธุ์เฟิร์นน้ำเชิงปริมาณเพื่อการส่งออก. **ใน**: รายงานการวิจัยการเพิ่มศักยภาพในการผลิตพรรณไม้น้ำ หญ้าทะเล และสาหร่ายทะเลสู่เชิงพาณิชย์ด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ. หน้า 29-72.

กองประมงน้ำจืด. 2538. พรรณไม้น้ำในประเทศไทย. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 154 หน้า.

ดิเรก ทองอร่าม. 2546. การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน : หลักการจัดการการผลิตและเทคโนโลยีการผลิตเชิงธุรกิจในประเทศไทย. ธรรมรักษ์การพิมพ์, ราชบุรี. 640 หน้า.

ทัศนีย์ อัตตะนันท์ และ สรสิทธิ์ วัชโรทยาน. 2531. การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. วารสารดินและปุ๋ย 10(11) : 59-66.

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์. 2546. การปลูกพรรณไม้น้ำในระบบไร้ดินร่วมกับการเลี้ยงปลา. **ใน**: เอกสารประกอบการฝึกอบรมการใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการผลิตพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก. วันที่ 9-12 สิงหาคม 2546. ณ สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ.

นพดล เรียบเลิศหิรัญ. 2550. การปลูกพืชไร้ดิน. สุวีริยาสาส์น, กรุงเทพฯ. 172 หน้า.

พรทิพย์ ธนูทอง. 2528. วิธีเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช. คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 114 หน้า.

พีรเดช ทองอำไพ. 2529. ฮอร์โมนพืช และสารสังเคราะห์. หจก. ไดนามิคการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 195 หน้า.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524. หลักการและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 97 หน้า.

มนูญ ศิรินุพงศ์. 2544. การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินสู่การปฏิบัติในประเทศไทย. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี, ปัตตานี. 90 หน้า.

ยงยุทธ โอสถสภา. 2546. ธาตุอาหารพืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 424 หน้า.

ยุทธนา เกียรติธร. 2547. ผลของสารละลายธาตุอาหารและระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแบบต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำชนิดใบพายเขาใหญ่ (*Cryptocoryne crispatula* var. *balansae*). วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ. 103 หน้า.

ราเชนทร์ วิสุทธิแพทย์, สยาม สินสวัสดิ์, ศิริธรรม สิงโต และ ประธาน โพธิสวัสดิ์. 2548. เทคโนโลยีการปลูกพืชไร้ดิน (Soiiless Culture). ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 35 หน้า.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์, กาญจนรี พงษ์ฉวี และ วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย. 2553. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบยาว *Microsorium pteropus* (Blume) Ching, 1933. เอกสารวิชาการฉบับที่ 27/2553, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 47 หน้า.

รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์ และ วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย. 2551. การศึกษาชีววิทยาของหอมน้ำ *Crinum thaianum* Schulze. เอกสารวิชาการฉบับที่ 65/2551, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 50 หน้า.

วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย และ รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหอมน้ำ *Crinum thaianum* Schulze. เอกสารวิชาการฉบับที่ 58/2551, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 26 หน้า.

วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย, กาญจนรี พงษ์ฉวี และ รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์. 2557. การเก็บรักษาพันธุ์หอมน้ำ *Crinum thaianum* Schulze ในสภาพปลอดเชื้อ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 4/2557, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 29 หน้า.

วันเพ็ญ มีนกาญจน์ และ กาญจนรี พงษ์ฉวี. 2543. พรรณไม้น้ำสวยงาม. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 122 หน้า.

วิภารัตน์ รัตนะ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเก็บรักษาพันธุ์มะตูมในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 57 หน้า.

ศาลักษณ์ พรรณศิริ, โอฬาร ตัณฑวิรุฬห์, วรวิทย์ ยี่สวัสดิ์, บัวบาง ยะอูป และ วีระศรี เมฆตรง. 2557. การปรับปรุงพันธุ์พลับด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สถาบันราชภัฏอุดรธานี, อุดรธานี. 187 หน้า.

สนธิพันธ์ ผาสุขดี. 2554. อนุกรมวิธานของพืชน้ำสกุล Cryptocoryne ในประเทศไทย. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 78 หน้า.

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2542. พรรณไม้น้ำในประเทศไทย. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน), กรุงเทพฯ. 312 หน้า.

โสระยา ร่วมรังสี. 2544. การผลิตพืชสวนแบบไม่ใช้ดิน. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 88 หน้า.

อรดี สหวัชรินทร์. 2526. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ภาควิชาพืชสวน, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 38 หน้า.

อารักษ์ ธีรอำพน. 2544. การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา. 130 หน้า.

อารีย์ วรัญญูวัฒน์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. โรงพิมพ์อักษรรรค์, กรุงเทพฯ. 133 หน้า.

อิทธิสุนทร นันทกิจ. 2542. สารละลายธาตุอาหารพืช. **ใน:** เอกสารประกอบการฝึกอบรมการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน รุ่นที่ 2 ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ร่วมกับวารสารเคหการเกษตร. วันที่ 13-15 ธันวาคม 2542. ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อิทธิสุนทร นันทกิจ. 2546. การปลูกพืชในระบบ NFT (Nutrient film technique). **ใน:** เอกสารประกอบการฝึกอบรมการใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการผลิตพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง. วันที่ 9-12 สิงหาคม 2546. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง.

Allgayer, R. and J. Teton. 1987. Aquarium Plants. Worlds Lock Ltd., London. 157 pp.

Benoit, F. 1992. Practical Guide For Simple Soilless Culture Techniques Ecology : Ergonomy Economy. European Vegetable R&D Center, Belgium. 72 pp.

Cooper, A. 1979. The ABC of NFT. London. Grower Books. 184 pp.

Douglas, J.S. 1988. Beginner's Guide to Hydroponics : Soilless Culture. Pelnam Books Ltd, London. 140 pp.

Gamborg, D. L. and G. C. Phillips. 1995. Sterile Techniques. In: Gamborg, O.L. and G. C. Phillips (eds). Plant cell tissue and organ culture fundamental methods. Springer-Verlag, Berlin. pp. 35-42.

Hewitt, E. J. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical Communication No. 22 (revised 2nd edition) Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops East Malling, Maidstone, Kent. 547 pp.

Jones, L. 1990. Home Hydroponics. Crown Publishers, Inc., New York. 142 pp.

Jones, J. B. 2005. Hydroponics : a practical guide for the soilless grower, 2nd ed. CRC press, Washington, D.C. 432 pp.

Kane, M. E., G. L. Davis, D. B. McConnell and J. A. Gargiulo. 1999. *In Vitro* propagation of *Cryptocoryne wendtii*. *Aqua. Bot*. 63 : 97-202.

Kyte, L. And J. Kleyn. 1999. Plants from Test Tube. Timber press., Inc., Oregon. 240 pp.

Mason, J. 1990. Commercial Hydroponics. Kangaroo press, NSW. 172 pp.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15 : 473-479.

Pongchawee, K., U. Na-Nakorn, S. Lamseejan, S. Poompuang and S. Phansiri. 2006. Factor affecting protoplast isolation and culture of *Anubias nana* Engler. International Journal of Botany 2(2) : 193-200.

Pongchawee, K., U. Na-Nakorn, S. Lamseejan, S. Poompuang and S. Phansiri. 2007. Protoplast isolation and culture of aquatic plant *Cryptocoryne wendtii* De Wit. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 41 : 300-310.

Pongchawee, K., R. Pradissan and W. Pipatcharernchai. 2010. *In vitro* propagation for conservation and sustainable used of endangered Thai native aquatic plants. Global conference on aquaculture 2010-farming the water for people and food, 22-25 September, 2010. Movenpic resort and spa, Phuket.

Phansiri, S., Charoensub, R., Plasilmongkol, P. and Taniguchi, T. 2001. Plant regeneration from protoplasts of paper mulberry, Thai variety. Conference of Paper Mulberry and Hand-Made Paper for Rural Development, 19-24 March 2001, Rama Garden Hotel, Bangkok.

Schwarz, M. 1995. Soilless Culture Management. Berlin Heidelberg. Springer-Verlag. 197 pp.

Trigiano, R. N. and D. J. Gray. 2000. Plant Tissue Culture Concept and Laboratory Exercises. CRC Press, Washington, D.C. 374 pp.