

1. แผนงานวิจัย 1. วิจัยและพัฒนากล้วยไม้
2. โครงการวิจัย 139. วิจัยและพัฒนากล้วยไม้สกุลรองเท้านารี เพื่อการค้า ระยะที่ 2
กิจกรรม 2. การเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี
3. ชื่อการทดลอง 2.1 เทคนิคการขยายพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีหมวดฤาษีโดยการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ
Aseptic Seeding Propagation Techniques of *Paphiopedilum parishii* (Rchb.f.) Pfitzer

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	เพ็ญลักษณ์ ชูดี	สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี
ผู้ร่วมงาน	สุภาภรณ์ สาชาติ	สังกัด สถาบันวิจัยพืชสวน
	สุปิ่น ไม้ตัดจันทร์	สังกัด ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย
	สังัด ดวงแก้ว	สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี

5. บทคัดย่อ

เทคนิคการขยายพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีหมวดฤาษี โดยการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ ดำเนินการระหว่างปี 2559–2562 ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอายุ ฝักของกล้วยไม้รองเท้านารีหมวดฤาษีที่เหมาะสม สำหรับนำมาใช้ขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเมล็ดในสภาพ ปลอดเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 13 ซ้ำ 2 กรรมวิธี ประกอบด้วยอาหารสำหรับเพาะเมล็ดจำนวน 2 สูตร ได้แก่ 1) อาหารสูตร Jittrapan II และ 2) อาหารสูตร สุปิ่น (2551) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมของ ½ MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + peptone 2 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า เดือนกรกฎาคม 2562 ต้นกล้วยไม้รองเท้านารีหมวดฤาษีเริ่ม แทงช่อดอก และดอกเริ่มบานเดือนสิงหาคม จึงทำการผสมเกสรจำนวน 2 ครั้ง คือ วันที่ 20 สิงหาคม 2562 และวันที่ 24 กันยายน 2562 ได้ฝักกล้วยไม้ จำนวน 8 ฝัก

Abstract

Aseptic seeding of *Paphiopedilum parishii* (Rchb.f.) Pfitze propagational technique was carried out during 2016-2019 at Kanchanaburi Agricultural Research and Development Center. The objective of this experiment was to find out the optimum pod age of *P. parishii* for aseptic seeding method. Completely randomized design (CRD) with 13 replications and 2 media formula include Jittrapan II formula and Supan's formula (1/2MS + 2 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA + 2 g/l peptone) was used. The progress of this experiment showed that breeding was done twice (August 20, and September 24, 2019) after blossom in July 2019 and nowadays 8 pods were collected. This is ongoing trial.

6. คำนำ

6.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีหลายชนิด แต่เนื่องจากในปัจจุบันได้มีการตัดไม้ทำลายป่าซึ่งเป็นแหล่งพันธุกรรมของกล้วยไม้ รวมทั้งมีการลักลอบเก็บกล้วยไม้ออกมาจำหน่ายมากขึ้น ทำให้กล้วยไม้รองเท้านารีหลายชนิดที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ มีจำนวนลดลงมาก วิธีการหนึ่งในการช่วยเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ให้มีจำนวนมากขึ้นคือการเพาะเมล็ด ซึ่งเมล็ดกล้วยไม้ไม่สามารถงอกได้เองเนื่องจากไม่มีอาหารสะสม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยอาหารจากภายนอกมาช่วยในการพัฒนา การงอกของเมล็ดตามธรรมชาติต้องอาศัยเชื้อราที่อยู่บริเวณรากกล้วยไม้ โดยใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการงอกของเมล็ด แต่เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการงอกตามธรรมชาติเปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้มีการเพิ่มปริมาณในธรรมชาติมีน้อย บางชนิดสูญพันธุ์ไปจากประเทศไทย

กล้วยไม้รองเท้านารีหมวดฤๅษีหรือรองเท้านารีเมืองกาญจน์ (*Paphiopedilum parishii*) เป็นพันธุ์กล้วยไม้ที่ค้นพบเมื่อปี พ.ศ. 2407 พบมีถิ่นกำเนิดตามต้นไม้ในป่าดิบชื้นทางภาคตะวันตก แถบจังหวัดกาญจนบุรีและกำแพงเพชร พบมากบริเวณเทือกเขาตะนาวศรี สูงกว่าระดับน้ำทะเล 1,000-2,000 เมตร เป็นกล้วยไม้อากาศ กล้วยไม้พันธุ์นี้มีลักษณะเด่นคือ ใบรูปขอบขนาน แผ่นใบค่อนข้างหนา อวบน้ำ ขนาดค่อนข้างใหญ่ มีเส้นกลางใบพับเป็นร่อง ใบเรียงสลับทั้งสองข้างและซ้อนกัน จำนวน 2-6 ใบต่อต้น ปลายใบมนหยักไม่เท่ากัน ใบมีทั้งสีเขียวเป็นมันและแบบที่มีลายจางๆ เป็นเส้นสีเขียวสลับสีเขียวอ่อนขนานไปกับความยาวของใบ ไม่เด่นชัด ใต้ใบมีสีเขียวอ่อนกว่าหน้าใบ ออกดอกเป็นช่อแบบกระจุก นั่นคือมีดอกจำนวนมากเรียงบนแกนช่อดอกที่ระดับต่างกันจากโคนไปสู่ปลายช่อดอก แต่ละดอกมีก้านยาวเท่ากัน และดอกมักบานพร้อมกันทั้งช่อหรือทยอยบานไปสู่ปลายช่อ ก้านช่อดอกสีเขียว มีขนนุ่ม มีดอก 3-8 ดอก กลีบนอกบนเป็นรูปไข่กลับสีขาวอมเขียวหรือเขียวอมเหลือง มีเส้นลายจางๆ จากโคนกลีบถึงปลายกลีบ กลีบดอกรูปแถบ ขอบกลีบดอกเป็นคลื่นและบิดเป็นเกลียวห้อยลง โคนกลีบสีเขียวอมเหลือง ปลายกลีบสีม่วงแดง มีแต้มสีน้ำตาลแดงหรือสีม่วงแดงที่กึ่งกลางกลีบ ขอบกลีบบนย่นเป็นคลื่น ส่วนขอบกลีบล่างมีตุ่มนูนสีม่วงเข้มจำนวนมากหลายตุ่ม บนตุ่มมีขนสีน้ำตาลแดงขนาดใหญ่ 3-5 เส้น กระจุกสีเขียวอ่อนอมเหลือง มีเส้นร่างแหสีน้ำตาล ขอบปากไม่เว้าเข้า โถงมีสีเหลืองอ่อนคล้ายรูปไข่กลับ ผิวขรุขระ กึ่งกลางสีเขียว กล้วยไม้ชนิดนี้จึงเป็นกล้วยไม้รองเท้านารีที่มีลักษณะสวยงาม เป็นที่ต้องการของชาวสวนกล้วยไม้และผู้ปลูกเลี้ยงทั้งในประเทศและต่างประเทศ ทำให้มีการลักลอบนำกล้วยไม้ชนิดนี้ออกมาขายในตลาดนัดต้นไม้เป็นจำนวนมาก แต่เนื่องจากในสภาพธรรมชาติของกล้วยไม้

ชนิดนี้มีการขยายพันธุ์ได้ช้ามาก ทำให้มีแนวโน้มในการลดจำนวนลงมากในสภาพธรรมชาติ เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ต่อไปในอนาคต จึงควรทำการศึกษาในการเพิ่มปริมาณในสภาพปลอดภัย เพื่ออนุรักษ์กล้วยไม้สายพันธุ์นี้ให้มีอยู่ในสภาพธรรมชาติของประเทศไทยต่อไป

ปัจจุบันมีการประยุกต์สูตรอาหารเพื่อการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเพาะเมล็ด โดยเฉพาะกล้วยไม้ Yaemrakchat, J. and Thammasiri, K. (2009) และได้มีการนำสูตรอาหารหลายชนิดมาเพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารี แต่ยังไม่มีการวิจัยที่ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการนำมาเพาะเมล็ด การชักนำให้เป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ของต้นกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤาษี

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเมล็ด การชักนำให้เป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤาษีในสภาพปลอดภัย และเพื่อเป็นประโยชน์ในการขยายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์กล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤาษีต่อไป

6.2 การทบทวนวรรณกรรม

ประเทศไทย มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ อยู่เป็นจำนวนมาก (ที่มา : www.orchidcenter.org) ถึงมากกว่า 250 ผลงาน

วิวัฒน์ (2529) ศึกษาการเพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor*) โดยเพาะเมล็ดจากฝักอายุตั้งแต่ 60-225 วัน (หลังผสมเกสร) เพาะห่างกันทุก 15 วัน ในสูตรอาหาร Thomale GD เติมน้ำมะพร้าว มันฝรั่ง และถ่านปน พบว่าเมล็ดงอกเมื่อฝักมีอายุตั้งแต่ 75-180 วันขึ้นไป อายุฝักที่เมล็ดงอกได้มากที่สุด คือ 105 วัน ต้นกล้าในสูตรอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวหรือถ่านมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดีกว่าในสูตรอาหารที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว ส่วนต้นกล้าในสูตรอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวหรือถ่านมีการเจริญเติบโต และพัฒนาลดลงกว่าในสูตรอาหารที่ไม่เติมปัจจัยทั้งสอง การเติมน้ำมะพร้าวร่วมกับน้ำมะพร้าวในสูตรอาหาร มีปฏิกริยาสัมพันธ์ (interaction) ต่อกัน โดยมีแนวโน้มให้การเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นกล้าดีขึ้น การเติมน้ำมะพร้าวร่วมกับถ่านหรือมันฝรั่งร่วมกับถ่านมีปฏิกริยาสัมพันธ์ต่อกันในทางลบต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นกล้า สำหรับการเติมน้ำมะพร้าว น้ำมะพร้าว และถ่านร่วมกันมีปฏิกริยาต่อกัน โดยมีแนวโน้มทำให้การเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นกล้าลดลง (ที่มา : www.orchidcenter.org)

จิตรพรพรรณ (2536) ทดลองเพื่อพัฒนาเทคนิคการเพาะเมล็ดอ่อนของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีได้แบ่งเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 เพื่อศึกษาการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ดอ่อนรองเท้านารี 5 ชนิด โดยเพาะในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went (VW) ดัดแปลงนาน 30-50 วัน แล้วย้าย plbs สีขาวชุ่นที่เจริญจากเมล็ดไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 15% และเห็ดหูหนู 25 กรัม/ลิตร ผลปรากฏว่าเมล็ดรองเท้านารีอินทนนท์และเหลืองกระบี่ซึ่งเป็นชนิดที่มีใบเขียวนั้น เมล็ดงอกได้มากกว่า และต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตดีกว่ารองเท้านารีฟาหอย เหลืองปราจีน และเหลืองตรัง ซึ่งเป็นพวกใบลาย

การทดลองที่ 2 เพื่อศึกษาสูตรอาหารสูตร VW ดัดแปลงที่เหมาะสมต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนรองเท้านารีฟาหอย โดยเพาะเมล็ดในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง แล้วย้ายต้นอ่อนลงบนอาหารแข็ง 3

ครั้ง โดยใช้สูตรอาหารต่างกันทุกครั้ง พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการถ่ายขวดครั้งที่ 1 คือสูตรที่เพิ่มน้ำมะพร้าว 15% และกล้วยหอม 50 กรัม/ลิตร และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของต้นและรากในการถ่ายขวดครั้งที่ 3 คือสูตรที่เพิ่มน้ำมะพร้าว 15% BA 3 ppm หรือเพิ่มทั้ง BA 3 ppm และ NAA 0.1 ppm หลังการถ่ายขวดครั้งที่ 3 นี้ 5 เดือน ต้นมีขนาดใหญ่ สามารถนำออกปลูกภายนอกได้ (ที่มา : www.orchidcenter.org.)

เกษนันท (2538) ศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของเมล็ด และการพัฒนาของโปรโตคอร์มของรองเท้านารีฟาหอย (*Paphiopedilum bellatulum* (Rchb.f.) Pfitz.) ในสภาพหลอดแก้ว พบว่าอายุฝักที่เหมาะสมอยู่ระหว่างอายุ 18-28 สัปดาห์ โดยเมล็ดมีความสมบูรณ์มากกว่า 60% ความสมบูรณ์ของเมล็ดเพิ่มขึ้นตามอายุฝักที่มากขึ้น เมื่อเพาะในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง เมล็ดเริ่มงอกตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ขนาดของคัพเพาะเพิ่มขึ้นทุกสัปดาห์หลังจากเพาะ มีผลทำให้ความกว้างของเมล็ดเพิ่มขึ้น แต่ความยาวของเมล็ดลดลง โดยที่เมล็ดงอกมากกว่า 75% เมื่อเพาะนาน 5-7 สัปดาห์ และการเพาะเมล็ดในอาหารเหลว มีเปอร์เซ็นต์ในการงอกไปเป็นโปรโตคอร์มมากกว่าการเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้น ซึ่งงอกเร็วกว่าเมื่อเพาะบนอาหารเหลว 1 สัปดาห์

เมื่อเมล็ดงอกเป็นโปรโตคอร์ม และย้ายไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง เพื่อหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นต้นกล้าพบว่า peptone จำเป็นต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์มไปเป็นยอดและราก ปริมาณ peptone ที่เหมาะสมคือ 1-2 กรัมต่อลิตร ทำให้โปรโตคอร์มมีชีวิตรอดมากที่สุด

ความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาไปเป็นต้นกล้าที่มีราก มีค่าตั้งแต่ 6.5-7.5 แต่พบว่าการเติม glutamine มีแนวโน้มว่าจำเป็นต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์มไปเป็นต้นกล้า และการเกิดราก โดยมีระดับที่เหมาะสมที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสูตรอาหารที่เติมถ่านหรือเติมกล้วยร่วมกับถ่าน ทำให้โปรโตคอร์มมีชีวิตรอดสูงกว่าการเติมแต่กล้วยอย่างเดียว หรือการไม่เติมทั้งสองอย่าง การเติมทั้งกล้วยและถ่านมีผลต่อการพัฒนาและการออกรากของต้นกล้ามากกว่าอาหารที่เติมกล้วยหรือถ่านเพียงอย่างเดียว และอาหารที่ไม่เติมทั้ง 2 อย่าง นอกจากนี้การเติมน้ำตาล และ/หรือน้ำมะพร้าวที่ระดับต่างๆ ลงในอาหารวุ้น พบว่าการเติมน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรอย่างเดียว ทำให้โปรโตคอร์มมีชีวิตรอดมากที่สุด แต่การพัฒนาของโปรโตคอร์มไปเป็นต้นกล้าที่มีใบ 1-3 ใบ เกิดมากที่สุด เมื่อเติมน้ำตาลที่ระดับ 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตร (ที่มา : www.orchidcenter.org.)

ฐิติพร (2540) ขยายโคลนกล้วยไม้รองเท้านารีในสภาพปลอดเชื้อ โดยการเพาะเลี้ยงส่วนลำต้นของรองเท้านารีเหลืองตรัง (*P.godefroyae*) และรองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*P.exul*) ในสภาพอาหารเหลวและอาหารแข็ง ที่มีน้ำมะพร้าว 0, 15, 20 และ 25% พบว่าอาหารแข็งที่มีน้ำมะพร้าว 15 และ 20% ทำให้ลำต้นรองเท้านารีทั้ง 2 ชนิดมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ความเข้มข้นของธาตุอาหารในสูตร WS ซึ่งประกอบด้วยมหาธาตุของสูตร Vacin and Went (1949) และจุลธาตุของสูตร Murashige and Skoog (1962) ทั้งความเข้มข้นปกติ (WS) และลดลงครึ่งหนึ่ง (1/2 WS) ให้ผลต่อการเจริญเติบโตของลำต้นไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้การใช้แคลเซียมทำให้ลำต้นเจริญเติบโตได้ดีกว่าไม่ใช้แคลเซียมในสูตรอาหาร ส่วนการเพิ่มโพแทสเซียมอีกเท่าตัวทำให้ลำต้นรองเท้านารีเหลืองกระบี่เจริญเติบโตได้ดีขึ้น แต่ไม่แสดงความแตกต่างในรองเท้านารีเหลืองตรัง

อาหารแข็งสูตร WS ที่ใช้ไตรโพแทสเซียมซึเตรท เข้มข้น 714 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำมะพร้าว 20% ซึ่งมี 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ kinetin เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงได้ โดยการใช้ 2,4-D ร่วมกับ kinetin เข้มข้น 10 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่ทำให้เกิดแคลลัส การเพิ่มน้ำตาลทรายจาก 20 กรัม/ลิตร เป็น 60 กรัม/ลิตร ทำให้เกิดแคลลัสได้น้อยลง ส่วนการเพาะเลี้ยงลำต้นในที่มืดและภายใต้ความเข้มแสง $28 \text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำให้มีจำนวนต้นที่เกิดแคลลัสไม่แตกต่างกัน เมื่อนำแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารสูตรจิตราพรธ III และสูตร WS ดัดแปลง 4 สูตร พบว่าแคลลัสมีการเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อน เป็นสีเขียวในอาหารสูตร WS ที่มีกัมมันต์ 2 กรัม/ลิตร แต่ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้

ดวงพร (2544) ขยายโคลนกล้วยไม้รองเท้านารีในสภาพปลอดเชื้อ โดยการเพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัสจากส่วนลำต้น ใบ และรากของรองเท้านารีเหลืองตรัง และรองเท้านารีม่วงสงขลา ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตรของ Vacin and Went (1949) (VW) ดัดแปลง, Murashige และ Skoog (1962) (MS), Wannakraioj (1992) (WS) หรือ Tsukamoto และ คณะ (1963) (Kyoto, KT) ที่เติม 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid (2,4 - D) 0, 1 หรือ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนรองเท้านารีทั้งสองชนิดที่สามารถเกิดแคลลัสได้คือส่วนลำต้นเท่านั้น โดยรองเท้านารีเหลืองตรังสามารถเกิดแคลลัสได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4 - D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และรองเท้านารีม่วงสงขลาสามารถเกิดแคลลัสได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร KT ที่เติม 2,4 - D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้การเพิ่ม N6 - benzyladenine (BA) 1 หรือ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ thidiazuron (TDZ) 0.1, 1 หรือ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือการเพิ่ม 2,4 - D เป็น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้การเกิดแคลลัสลดลงในรองเท้านารีทั้งสองชนิด การเพิ่มขนาดชิ้นลำต้น หรือการใช้น้ำมะพร้าว 150 มิลลิตรต่อลิตร ไม่สามารถเพิ่มการเกิดแคลลัสของรองเท้านารีเหลืองตรังได้

การเพาะเลี้ยงแคลลัสรองเท้านารีเหลืองตรังเพื่อชักนำยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0, 10 หรือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ TDZ 0.01, 0.1, 1 หรือ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมืด หรือได้รับแสง 28 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตรที่เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมืดเท่านั้นที่สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มจุดกำเนิดยอดได้ นอกจากนี้ยังทำให้แคลลัสมีการเจริญเติบโตสูงสุดอีกด้วย (ที่มา : www.orchidcenter.org.)

ปนิญา (2541) ศึกษาผลของการเจริญเติบโตของกล้วยไม้รองเท้านารีคางกบในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง โดยเติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิตรต่อลิตร เนื่อมะเขือเทศปั่น 100 มิลลิตรต่อลิตร และเห็ดหูหนูบดละเอียด 25 กรัมต่อลิตร ที่ pH ต่างๆ คือ 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0 และ 6.2 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ต้นกล้วยไม้รองเท้านารีจะเจริญด้านความสูงได้ดี เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง ที่ pH 5.0 ต้นกล้วยไม้มีจำนวนใบมากที่สุด เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง ที่ pH 6.2 และต้นกล้วยไม้เกิดรากได้ดี เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง ที่ pH 6.0 ส่วน pH หลังการทดลองนั้นพบว่า อาหารที่ปรับ pH 4.8, 5.0 และ

5.2 เปลี่ยนค่า pH เป็น 5.0, 5.2 และ 5.6 ตามลำดับ ส่วนอาหารที่ปรับ pH 5.4, 5.6, 5.8, 6.0 และ 6.2 เปลี่ยนค่า pH เป็น 6.0 (ที่มา : www.orchidcenter.org.)

ธารทิพย์ (2549) ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนรากของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองตรังและเหลืองพังงา ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีขนาดของดอกใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-4 เซนติเมตร และดอกบานทน เป็นที่ต้องการของตลาดและนักนิยมเลี้ยงกล้วยไม้รองเท้านารี พบว่า รากที่ใช้เพาะเลี้ยงสามารถให้จำนวนต้นตั้งแต่ 15-40 ต้นต่อราก ขึ้นอยู่กับขนาดของรากที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วย ซึ่งสามารถขยายพันธุ์ได้ปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็วกว่าการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ดและการแยกหน่อ

สุปัน และคณะ (2551) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกและพัฒนาของเมล็ดในรองเท้านารีอินทนนท์ อินทนนท์ลาว ฝายหอย และดอยตุง บนอาหาร 4 สูตร คือ Vacin & Went ½ สูตร Vacin & Went เต็มสูตร จิตราพรรณ II ½ สูตร และจিতราพรรณ II เต็มสูตร โดยเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เมล็ดงอกได้ดีที่สุด คือ สูตรจিতราพรรณ II ½ สูตร โดยรองเท้านารีอินทนนท์ลาวมีความงอกในสูตรอาหารดังกล่าวดีที่สุด รองลงมาคือ ฝายหอย อินทนนท์ และดอยตุงตามลำดับ หลังจากเมล็ดงอกทำการย้ายเมล็ดที่พัฒนาเป็นโปรโตคอร์ลัลักษณะเป็นก้อนกลมสีขาว ขนาด 0.1 มม.ให้ได้รับแสง โปรโตคอร์ลัสังเคราะห์แสงเปลี่ยนเป็นสีเขียวมีการพองตัวเป็นก้อนกลมใหญ่ขึ้น และยอดเริ่มปรากฏ ทำการย้ายเนื้อเยื่อมาเลี้ยงบนอาหารสูตร จิตราพรรณ II ½ สูตร เนื้อเยื่อมีการพัฒนาต่อจนเกิดใบ หลังจากเมล็ดพัฒนาได้ต้นที่มีใบ 1-2 ใบ ทำการย้ายเนื้อเยื่อมาทดสอบเลี้ยงบนอาหาร 2 สูตร เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ หลังเพาะเลี้ยง 6 เดือน พบว่าอาหารสูตรดัดแปลงซึ่งประกอบด้วย ¾ macronutrients ของ V & W และ ¼ macronutrients ของ MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 75 มล./ล. เนื้อมะเขือเทศสด 50 ก./ล. เห็ดหูหนูบดละเอียด 12.5 ก./ล. และกล้วยหอมบด 25 ก./ล. มีผลทำให้ต้นเนื้อเยื่อรองเท้านารีอินทนนท์ อินทนนท์ลาว และฝายหอย มีน้ำหนักสด จำนวนราก และความยาวรากมากที่สุด

6.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาอายุฝักของกล้วยไม้รองเท้านารีหมวดฤาษีที่เหมาะสมในการนำมาใช้ขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

วิธีดำเนินการ

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 เปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีหมวดฤาษี

แบบและวิธีการทดลอง

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. ฝักกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤาษี อายุ 6½ เดือน อายุ 7 เดือน อายุ 7½ เดือน และอายุ 8 เดือน มาทดสอบสูตรอาหาร (อายุฝักประมาณ 28 สัปดาห์หลังการผสมเกสร)
2. เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ
3. เครื่องแก้ว
4. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารี
5. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร Murashige และ Skoog (1962)
6. สารเคมีควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ 6-benzylamino purine (BA) และ naphthyl acitic

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD 13 ซ้ำ 2 กรรมวิธี กรรมวิธีประกอบด้วยอาหารสำหรับเพาะเมล็ด จำนวน 2 สูตร ได้แก่

- 1) อาหารสูตร Jittrapan II
- 2) สูตรญี่ปุ่น (2551) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมของ ½ MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + peptone 2 กรัมต่อลิตร

วิธีปฏิบัติการทดลอง มีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. นำฝักรองเท้านารีหวดฤาษี ที่ได้จากการผสมพันธุ์ ทำความสะอาดเบื้องต้นโดยใช้มีดที่สะอาดชุบขมที่อยู่นบนฝักออก เช็ดผิวฝักด้วยสำลีชุบแอลกอฮอล์ 70%
2. นำเข้าตู้กรองอากาศ จุ่มฝักลงในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % ลนไฟ 2 ครั้ง
3. ใช้มีดตัดโคนและปลายฝักออกเล็กน้อย ฆ่าฝักตามรอยตะเข็บเย็บเมล็ดลงบนอาหาร 2 สูตร ได้แก่ อาหารสูตร Jittrapan II และ สูตรญี่ปุ่น (2551)
4. เคลือบเมล็ดให้มีความสม่ำเสมอเต็มผิวหน้าอาหาร
5. เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 8 สัปดาห์
6. ทำการประเมินความงอกของเมล็ดจากปริมาณการงอกของเมล็ดต่อพื้นที่ที่เพาะเมล็ด

การบันทึกข้อมูล

- ประเมินความงอกของเมล็ดจากปริมาณการงอกของเมล็ดต่อพื้นที่ที่เพาะเมล็ด เปรียบเทียบความแตกต่างกันของสูตรอาหาร โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์จากจำนวนขวดที่มีระดับความงอกต่างกัน และให้ระดับคะแนนความงอก (germination scale) ดังนี้

- 0 = เมล็ดไม่งอก
- 1 = เมล็ดงอก 1- 25% ของพื้นที่
- 2 = เมล็ดงอก 26-50% ของพื้นที่
- 3 = เมล็ดงอก 51-75% ของพื้นที่
- 4 = เมล็ดงอกมากกว่า 75% ของพื้นที่
- การพัฒนาของเมล็ดตั้งแต่เริ่มงอกถึงเริ่มมีใบ

ขั้นตอนที่ 2 เปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤาษี

แบบและวิธีการทดลอง

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. ฝักกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤาษี อายุ 6½ เดือน อายุ 7 เดือน อายุ 7½ เดือน และอายุ 8 เดือน มาทดสอบสูตรอาหาร (อายุฝักประมาณ 28 สัปดาห์หลังการผสมเกสร)
2. เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ
3. เครื่องแก้ว
4. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารี
5. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร Murashige และ Skoog (1962)

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD 13 ซ้ำ 2 กรรมวิธี กรรมวิธีประกอบด้วยอาหารสำหรับเพาะเมล็ดจำนวน 2 สูตร ได้แก่

- 1) อาหารสูตร Jittrapan III
- 2) สูตรญี่ปุ่น (2551) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมของ ½ MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + peptone 2 กรัมต่อลิตร + ผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร

วิธีปฏิบัติการทดลอง มีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. นำต้นอ่อนของรองเท้านารีหวดฤาษี ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระยะที่ต้นมีใบเล็กๆ 1-2 ใบ
2. ย้ายลงในอาหารสูตรดัดแปลง 2 สูตร ได้แก่ อาหารสูตร Jittrapan III และ ญี่ปุ่น (2551)
3. เพาะเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ภายใต้ความเข้มของแสง 1,000 ลักซ์ นาน 12 ชม.ต่อวัน เป็นเวลา 6 เดือน

การบันทึกข้อมูล

- ลักษณะของเนื้อเยื่อหลังเพาะเลี้ยง ได้แก่ น้ำหนักสด จำนวนใบ จำนวนราก และความยาวราก

สถานที่ดำเนินการ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี

ระยะเวลาดำเนินการ ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ปี 2559 ได้ทำการรวบรวมต้นพันธุ์รองเท้านารีหวดฤๅษีจากร้านขายต้นกล้วยไม้ สวนจตุจักร กรุงเทพฯ และสวนกล้วยไม้จังหวัดจันทบุรี มาปลูกในกระถางด้วยวัสดุปลูก ได้แก่ มะพร้าวสับที่แช่น้ำ 2 ครั้ง และตั้งวางในสภาพโรงเรือนของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี เนื่องจากไม่สามารถหาต้นกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤๅษีที่แทงช่อดอกหรือต้นกล้วยไม้ที่ออกดอกแล้ว พร้อมทั้งจะนำมาทำการผสมพันธุ์ได้

2. ดูแลต้นกล้วยไม้ด้วยการรดน้ำ ใส่ปุ๋ยละลายช้า ได้แก่ ออสโมโค้ท สูตร 13-13-13 ทุก 3 เดือน นำต้นกล้วยไม้ไปโรงเรือนใหม่ เพื่อเตรียมต้นกล้วยไม้ให้มีสภาพพร้อมแทงช่อดอกตามฤดูกาล

3. ปี 2561 เมื่อต้นกล้วยไม้รองเท้านารีเจริญเติบโตได้สมบูรณ์และสามารถปรับสภาพในโรงเรือนของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรได้ ก็จัดวางกระถางต้นกล้วยไม้และใส่ปุ๋ย ออสโมโค้ท-พลัส สูตร 13-26-7+1.5% แมกนีเซียม เพื่อกระตุ้นการออกดอกของต้นกล้วยไม้รองเท้านารี ซึ่งจะแทงช่อดอกในเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ แต่เนื่องจากในปี 2561 มีฤดูหนาวสั้น คือ ประมาณ 1-2 วัน และอุณหภูมิระหว่างกลางวันและกลางคืนแตกต่างกันน้อยกว่า 10 องศาเซลเซียส จึงไม่กระตุ้นตาดอกของต้นกล้วยไม้รองเท้านารีให้แทงช่อดอกได้

4. ปี 2562 นำต้นกล้วยไม้ มาเลี้ยงในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 อาทิตย์ เพื่อกระตุ้นตาดอกของกล้วยไม้ พบว่าไม่สามารถกระตุ้นการแทงช่อดอกของต้นกล้วยไม้ได้ แต่กลับกระตุ้นการแทงหน่อของต้นกล้วยไม้ ต้นละ 1-2 หน่อ

5. ปลายปี 2562 ได้ทำการรวบรวมต้นกล้วยไม้หวดฤๅษีที่กำลังแทงช่อดอกมาปลูกเลี้ยงที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตร จำนวน 6 กระถาง

6. เดือนกรกฎาคม 2562 ต้นกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤๅษีเริ่มแทงช่อดอก และดอกเริ่มบานเดือนสิงหาคม จึงทำการผสมเกสรจำนวน 2 ครั้ง ดังนี้

ครั้งที่ 1 วันที่ 20 สิงหาคม 2562

กระถางที่ 1 ผสมเกสรดอกกล้วยไม้รองเท้านารีจำนวน 3 ดอก ผสมติดฝักจำนวน 2 ดอก

กระถางที่ 2 ผสมเกสรดอกกล้วยไม้รองเท้านารีจำนวน 3 ดอก ผสมติดฝักจำนวน 3 ดอก

กระถางที่ 3 ผสมเกสรดอกกล้วยไม้รองเท้านารีจำนวน 3 ดอก ผสมติดฝักจำนวน 2 ดอก

ครั้งที่ 2 วันที่ 24 กันยายน 2562

กระถางที่ 4 ผสมเกสรดอกกล้วยไม้รองเท้านารีจำนวน 2 ดอก ผสมติดฝักจำนวน 1 ดอก

กระถางที่ 5 ผสมเกสรดอกกล้วยไม้รองเท้านารีจำนวน 3 ดอก ไม่ติดฝักจำนวน 3 ดอก

กระถางที่ 6 ผสมเกสรดอกกล้วยไม้รองเท้านารีจำนวน 1 ดอก ไม้ตัดฝักจำนวน 1 ดอก



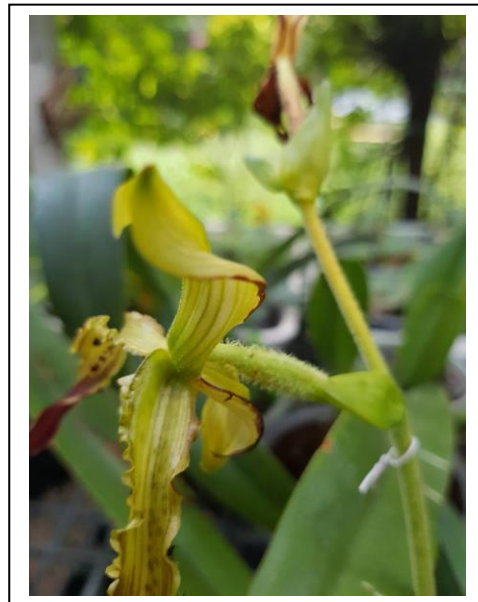
ภาพที่ 1 ฝักกล้วยไม้รองเท้านารีหมวดฤาษีกระถางที่ 1



ภาพที่ 2 ฝักกล้วยไม้รองเท้านารีหมวดฤาษีกระถางที่ 2



ภาพที่ 3 ฝักกล้วยไม้รองเท้านารีหมวดฤาษีกระถางที่ 3



ภาพที่ 4 ฝักกล้วยไม้รองเท้านารีหมวดฤาษีกระถางที่ 4



ภาพที่ 5 ฝักกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤๅษีกระถางที่ 5



ภาพที่ 6 ฝักกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤๅษีกระถางที่ 6

จากผลการทดลอง พบว่าสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤๅษีเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤๅษีเป็นต้นกล้วยไม้ที่ต้องการความเย็นในการกระตุ้นการแทงช่อดอก คือ ต้องการความเย็นในการกระตุ้นการแทงช่อดอกอย่างน้อย 2 อาทิตย์และต้องการความแตกต่างกันของอุณหภูมิที่แตกต่างกันของช่วงเวลากลางวันและกลางคืนประมาณ 10 องศาเซลเซียส ความสมบูรณ์ของต้นพ่อแม่พันธุ์ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่ง เพราะถ้าต้นไม่สมบูรณ์ฝักที่ได้รับการผสม มักจะมีเมล็ดที่ไม่สมบูรณ์ด้วย การนำต้นกล้วยไม้รองเท้านารีมาแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 15 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 อาทิตย์ ไม่สามารถกระตุ้นให้ต้นกล้วยไม้แทงช่อดอก แต่กระตุ้นให้ต้นกล้วยไม้แทงหน่อใหม่ ต้นละ 1 หรือ 2 หน่อ

9. สรุปผลการทดลอง

กล้วยไม้รองเท้านารีที่นำมาปลูกเลี้ยงในสภาพโรงเรือนที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี จำนวน 20 กระถาง ไม่สามารถแทงช่อดอกได้เนื่องจากสภาพภูมิอากาศไม่เหมาะสมในการกระตุ้นให้ต้นกล้วยไม้แทงช่อดอก เนื่องจากในปี 2560 และ 2561 อุณหภูมิวันและอุณหภูมิระหว่างกลางวันและกลางคืนแตกต่างกันน้อยมาก ประมาณ 5 องศาเซลเซียส ซึ่งความแตกต่างของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการกระตุ้นการแทงช่อดอกของกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤๅษี คือประมาณ 10 องศาเซลเซียส อย่างน้อยประมาณ 2 อาทิตย์ ดังนั้น ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี จึงทำการรวบรวมต้นกล้วยไม้ที่กำลังแทงช่อดอกหรือที่แทงช่อดอกแล้วจากสวนกล้วยไม้ จำนวน 6 กระถาง เพื่อนำมาผสมเกสร พบว่าติดฝักได้ทั้งหมดจำนวน 8 ฝัก

เนื่องจากงานวิจัยนี้ถูกระงับโครงการวิจัย ทำให้ไม่สามารถดำเนินการทดลองต่อ

10. เอกสารอ้างอิง

เกษนันท ศรีเกษม. 2538. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการรอกของเมล็ด และการพัฒนาโปรโตคอร์มของรวงเท้านารีฝายหอย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 222 น.

จิตรภาพรณ พิลึก. 2536. การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , กรุงเทพฯ. 82 น.