

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปี 2557

1. ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนากล้วยไม้
2. โครงการวิจัย การวิจัยและพัฒนากล้วยไม้สกุลอื่นๆที่มีศักยภาพ
 กิจกรรมที่ 2 การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและขยายพันธุ์กล้วยไม้
 กิจกรรมย่อยที่ 2.3 การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและขยายพันธุ์กล้วยไม้ดินสกุลคาแลนเธ
3. ชื่อการทดลองที่ 2.3.1 การขยายพันธุ์กล้วยไม้ดินสกุลคาแลนเธจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ในสภาพปลอดเชื้อ

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายวราพงษ์ ภิระบรรณ	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร
ผู้ร่วมงาน	นายวสุรณ พงษ์สมบุรณ์	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร
	นายจรัญ ดิษฐไชยวงศ์	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร
	นายณรงค์ แดงเปี่ยม	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร
	นางสุดาวรรณ มีเจริญ	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร
	นายเสงี่ยม แจ่มจำรูญ	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร

5. บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลคาแลนเธ (*Calanthe* spp.) จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อศึกษาวิธีการและเทคนิคการขยายพันธุ์ของกล้วยไม้ดินสกุลคาแลนเธที่เหมาะสมจากชิ้นส่วนต่างๆและเป็นการเพิ่มปริมาณกล้วยไม้ดินสกุลคาแลนเธ ตั้งแต่ปี 2555-2557 โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบอ่อน ต้นอ่อน เนื้อเยื่อปลายยอดก้านช่อดอก เนื้อเยื่อก้านช่อดอกและตาที่ช่อก้านช่อดอกบนอาหารสังเคราะห์ VW ดัดแปลง 2 สูตร คือ VW + BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L และ VW + BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L พบว่า ชิ้นส่วนตาที่ช่อก้านช่อดอกที่สมบูรณ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW + BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ 20% โดยจะเกิดเนื้อเยื่อที่มีลักษณะคล้ายดอกเล็กๆสีขาวหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 8 สัปดาห์ แล้วจึงเจริญไปเป็นต้นอ่อนที่มีใบและรากที่สมบูรณ์หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 24 สัปดาห์ ส่วนชิ้นส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดและชิ้นส่วนเนื้อเยื่อก้านช่อดอกบางชิ้นส่วนจะมีการยึดตัวหรือมีลักษณะบวมในช่วง 4-8 สัปดาห์หลังจากเพาะเลี้ยง แล้วชิ้นส่วนจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 16 สัปดาห์ ชิ้นส่วนใบอ่อนจะเกิดสีน้ำตาลบริเวณรอยตัดหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 สัปดาห์ แล้วจะลามเข้าไปด้านในเรื่อยๆและต่อมาชิ้นส่วนจะตายไปทั้งชิ้นหลังเพาะเลี้ยงได้ 12 สัปดาห์ จึงทำให้ชิ้นส่วนของใบอ่อน เนื้อเยื่อปลายยอด เนื้อเยื่อก้านช่อดอกและตาที่ช่อก้านช่อดอกที่ไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสหรือต้นอ่อนได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ VW ดัดแปลง

ทั้ง 2 สูตร และการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นอ่อนบนอาหารสังเคราะห์ VW ดัดแปลงทั้ง 2 สูตรนั้นมีปัญหาเรื่องการปนเปื้อน เนื่องจากชิ้นส่วนได้จากการแตกต้นใหม่ของกล้วยไม้สกุลคาแลนเธ่ ซึ่งเกิดในช่วงฤดูฝนและต้นมีลักษณะเป็นกาบใบซ้อนกันหลายๆชั้น ทำให้ชิ้นส่วนต้นอ่อนยากต่อการฟอกทำความสะอาด จึงต้องพัฒนาวิธีการทำความสะอาดเนื้อเยื่อก่อนการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

6. คำนำ

กล้วยไม้เป็นพืชส่งออกที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทยที่ทำรายได้สูงและปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี แม้การส่งออกกล้วยไม้ไทยจะเพิ่มมูลค่ามากขึ้นในแต่ละปี แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องขาดการพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้ใหม่ ๆ อย่างต่อเนื่อง ทำให้ไม่สามารถสร้างความหลากหลายให้สอดคล้องกับความต้องการของตลาดได้ ประเทศไทยถือเป็นศูนย์กลางของกล้วยไม้ที่มีความหลากหลายทางสายพันธุ์ มีลักษณะเด่นเป็นเอกลักษณ์ แตกต่างจากกล้วยไม้ในภูมิภาคอื่น ซึ่งกล้วยไม้สกุลคาแลนเธ่ (*Calanthe* spp.) เป็นกล้วยไม้ดินที่คาดว่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาได้ ภัทรพิชชา (2551) กล่าวว่า การขยายพันธุ์กล้วยไม้ในสภาพธรรมชาติเป็นวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยาก เพราะต้องอาศัยการเพาะเมล็ด ซึ่งเมล็ดมีขนาดเล็กมาก และไม่มีอาหารสะสม จึงมีโอกาสมองออกได้น้อยมาก ทำให้ได้จำนวนต้นน้อย ไม่เพียงพอต่อความต้องการ และอาจมีปัญหาเรื่องการแพร่กระจายเชื้อโรค จึงมีผู้นิยมขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ โดยนำส่วนเนื้อเยื่อหรือ อวัยวะต่าง ๆ ของพืช เช่น ก้านช่อดอก ปลายยอด ปลายใบ ตาข้าง ลำต้น ปลายราก มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มีการเติมแร่ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนั้นยังเติมวิตามิน กรดอะมิโน และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ ตามวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนกล้วยไม้มีการพัฒนาไปเป็น protocorm like bodies (PLBs) แคลลัส หรือเจริญไปเป็นยอด ราก และเป็นต้นที่สมบูรณ์ในที่สุด และความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับชนิดของกล้วยไม้ สายพันธุ์ อายุของต้น การดูแลรักษา สภาพแวดล้อมในการปลูก อาหาร และสภาพในการเพาะเลี้ยง การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ของการขยายพันธุ์กล้วยไม้ดินสกุลคาแลนเธ่ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อจะได้เทคนิคในการขยายพันธุ์จากชิ้นส่วนต่างๆและเป็นการเพิ่มปริมาณกล้วยไม้ดินสกุลคาแลนเธ่

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- 1.1 วัสดุทดลอง คือ ชิ้นส่วนของกล้วยไม้ดินสกุลคาแลนเธ่ ได้แก่ ใบอ่อน ต้นอ่อน เนื้อเยื่อปลายยอดก้านช่อดอก เนื้อเยื่อก้านช่อดอก และตาที่ช่อก้านช่อดอก
- 1.2 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ เครื่องซังไฟฟ้า, เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง, กระจกบด, บีกเกอร์, ขวดใส่สารละลายเข้มข้น, แท่งแก้วคนสาร, ซ้อนตักสาร, ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, หม้อนึ่งความดัน, จานแก้ว, มีดผ่าตัด, ปากคีบ และตะเกียงแอลกอฮอล์
- 1.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ น้ำยาล้างจาน, 70% เอทิลแอลกอฮอล์, คลอโรกซ์ และ Tween 20
- 1.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร ได้แก่ สารเคมี (ภาคผนวกตารางที่ 1) น้ำตาลและผงวุ้น
- 1.5 สารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA (6-benzyladenine) และ NAA (1-Naphthaleneacetic acid)

วิธีการ

1.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 5 Factorial in CRD มี 10 กรรมวิธีๆ ละ 10 ซ้ำ คือ

- สูตรอาหารสังเคราะห์ VW ดัดแปลง 2 สูตร ได้แก่

สูตร 1 VW + BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L

สูตร 2 VW + BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L

- ชิ้นส่วนของกล้วยไม้ดินสกุลคาแลนเท 5 ชิ้นส่วน ได้แก่ ใบอ่อน ต้นอ่อน เนื้อเยื่อปลายยอด เนื้อเยื่อก้านช่อดอก และตาที่ช่อก้านช่อดอก (ภาคผนวกภาพที่ 1)

1.2 การปฏิบัติการทดลอง

1) การเตรียมอาหารแข็งสูตร VW ในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยเทน้ำกลั่นเล็กน้อยลงในปีกเกอร์ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมสารละลายของอาหารสูตร VW โดยเติมสารละลาย A 100 ml สารละลาย B 5 ml และสารละลาย C 1 ml เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ BA 0.5 และ 2.0 mg กับ NAA 0.5 และ 2.0 mg เติม peptone 2.0 กรัม เติมน้ำตาล 20 กรัม ละลายสารให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารให้เป็น 4.8 เติมน้ำ 7.0 กรัม ต้มจนน้ำละลายแล้วบรรจุลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดละ 30 มล. ปิดฝาให้สนิท นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้อาหารเย็นและแข็งจึงนำไปใช้ทำการทดลองได้

2) การเตรียมชิ้นส่วนพืช โดยนำชิ้นส่วนพืชมาทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน จากนั้นล้างน้ำให้สะอาด แล้วแช่ใน 70% เอทิลแอลกอฮอล์ 30 วินาที ก่อนนำมาฟอกในสารละลายคลอโรกซ์ 15% นาน 15 นาที ใส่ Tween 20 2-3 หยด หลังจากนั้นนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ แล้วฟอกในสารละลายคลอโรกซ์ 10% นาน 15 นาที ใส่ Tween 20 2-3 หยด แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

3) การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช โดยชิ้นส่วนของใบอ่อนจะตัดให้มีขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ชิ้นส่วนของต้นอ่อนจะตัดส่วนของโคนต้นให้มีขนาด 1.0 เซนติเมตรแล้วแบ่งครึ่ง ชิ้นส่วนของก้านช่อดอกตัดแยกเป็นเนื้อเยื่อปลายยอด เนื้อเยื่อก้านช่อดอกขนาด 0.5 มิลลิเมตร และตาที่ช่อดอกขนาด 0.5 มิลลิเมตร (ภาคผนวกภาพที่ 2) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ตามสูตรที่เตรียมไว้ นำไปวางไว้ในที่มืดเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

4) การบันทึกข้อมูล สังเกตและบันทึกการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเจริญในแต่ละช่วง ลักษณะสี ขนาดของแคลลัสและการเจริญเติบโตของต้นอ่อน

เวลาและสถานที่ เริ่มต้น ตุลาคม 2555 สิ้นสุด กันยายน 2557

สถานที่ทำการทดลอง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร ตำบลโรงช้าง

อำเภอเมือง จังหวัดพิจิตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาการขยายพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลคาแลนเธจากชิ้นส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบอ่อน ต้นอ่อน เนื้อเยื่อปลายยอด เนื้อเยื่อก้านช่อดอก และตาที่ช่อก้านช่อดอกบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลง 2 สูตร คือ VW + BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L และ VW + BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลงทั้ง 2 สูตร พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 สัปดาห์ บริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 2 สัปดาห์ ชิ้นส่วนเริ่มมีการปล่อยสารสีน้ำตาลออกมาจากบริเวณรอยตัด เป็นผลให้ชิ้นส่วนใบอ่อนมีการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลหรือดำ แล้วลามเข้าไปด้านในเรื่อยๆ และต่อมาเนื้อเยื่อตายไปทั้งชิ้นหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 12 สัปดาห์ (ภาคผนวกภาพที่ 4A และ 4B) เนื้อเยื่อพืช เมื่อเกิดบาดแผลสามารถสร้างสารประกอบพินอลขึ้นมาเพื่อให้นเนื้อเยื่อบริเวณนั้นตายและเนื้อเยื่อบริเวณรอยแผลที่ตายไปแล้วนั้นจะช่วยปิดรอยแผลไม่ให้เนื้อเยื่อสูญเสียน้ำหรือเป็นตัวกั้นการเข้าทำลายของเชื้อโรค (สุนนทิพย์, 2540) ทำให้ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นอ่อนบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลงทั้ง 2 สูตร พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 1 สัปดาห์ ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงไว้เกิดการปนเปื้อน (contaminate) เนื่องจากชิ้นส่วนต้นอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงนั้น ได้มาจากการแตกต้นใหม่ของกล้วยไม้สกุลคาแลนเธ ซึ่งเกิดในช่วงฤดูฝนและต้นมีลักษณะเป็นกาบใบซ้อนกันหลายชั้น จึงทำให้ชิ้นส่วนต้นอ่อนยากต่อการฟอกทำความสะอาดและไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดก้านช่อดอกบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลง 2 สูตร พบว่า ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดก้านช่อดอกบางชิ้นส่วนเกิดการยึดขึ้น หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW + BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L ได้ 4 สัปดาห์ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW + BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L ชิ้นส่วนไม่เกิดการยึดขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก้านช่อดอกต่อไปชิ้นส่วนเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลและลามไปทั้งชิ้นส่วน ทำให้ชิ้นส่วนตายหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลงทั้ง 2 สูตร ได้ 16 สัปดาห์และไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (ภาคผนวกภาพที่ 4C)

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อก้านช่อดอกบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลง 2 สูตร พบว่า ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อก้านช่อดอกบางชิ้นส่วนเกิดการบวมขึ้น หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW + BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L ได้ 4 สัปดาห์ (ภาคผนวกภาพที่ 3A) แต่อาหารสูตร VW + BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L ชิ้นส่วนไม่เกิดการบวมขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก้านช่อดอกต่อไปชิ้นส่วนเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลและสีดำ ทำให้ชิ้นส่วนตายหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลงทั้ง 2 สูตร ได้ 16 สัปดาห์และไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (ภาคผนวกภาพที่ 4D)

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาที่ช่อก้านช่อดอกบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลง 2 สูตร คือ พบว่า ชิ้นส่วนตาที่ช่อก้านช่อดอกสามารถเจริญเป็นต้นอ่อนได้ 20% (ตารางที่ 1) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW + BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L โดยชิ้นส่วนตาที่ช่อก้านช่อดอกที่สมบูรณ์จะเริ่มบวมขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ (ภาคผนวกภาพที่ 3B) แล้วเริ่มพัฒนาขึ้นมีลักษณะคล้ายดอกเล็กๆสีขาวหลังเพาะเลี้ยงได้ 8 สัปดาห์ และเกิดรากอ่อนสีขาวปลายรากสีเหลืองงอกขึ้นมา 4-5 ราก ยาว 1-2 เซนติเมตรหลังเพาะเลี้ยงได้ 12 สัปดาห์ จากนั้น

เจริญเป็นส่วนยอดสีเขียวชัดเจนและรากสีเขียว 4-5 ราก ยาว 4-5 เซนติเมตรหลังเพาะเลี้ยงได้ 16 สัปดาห์ แล้วเริ่มแตกเป็นใบอ่อน 2 ใบหลังเพาะเลี้ยงได้ 20 สัปดาห์ จากนั้นเจริญเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์หลังเพาะเลี้ยงได้ 24 สัปดาห์ แล้วจึงเปลี่ยนย้ายลงอาหารใหม่เพาะเลี้ยงจนได้ต้นที่แข็งแรงสมบูรณ์ มีหัวสะสมอาหาร มีใบ 4-5 ใบและมีรากที่แข็งแรงพร้อมที่จะออกปลูกลงบถหลังเพาะเลี้ยงได้ 36 สัปดาห์ (ภาคผนวกภาพที่ 5) แต่มีชิ้นส่วนตาที่ซอก้านช่อดอกที่ไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสหรือต้นอ่อนได้และชิ้นส่วนกลายเป็นสีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน ทำให้ชิ้นส่วนตาย (ภาคผนวกภาพที่ 4E) จิตราพรรณ (2536) กล่าวว่า การเลือกชิ้นส่วนพืชจากต้นพืชเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นับว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อความสำเร็จในการขยายพันธุ์ ซึ่งต้องได้จากต้นที่แข็งแรงสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับอายุของต้นพืช การ ปลูกดูแลรักษา สภาพแวดล้อมที่ต้นพืชนั้นได้รับและรวมถึงฤดูกาลด้วย ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดี ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญ ตายอด, ตาข้าง, ช่อดอก, ใบ และราก เช่นกล้วยไม้ในสกุล *Doritis*, *Oncidium*, *Phalaenopsis* และลูกผสม ใช้ส่วนของก้านช่อดอกที่มีตาที่ซอก และ การตัดแปลงสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อช่วงการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ในสภาพเพาะเลี้ยง และการเติมสารอื่นที่ต้นกล้วยไม้ต้องการในอาหารสามารถทำให้กล้วยไม้พัฒนาได้เหมาะสมกับช่วงการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น

ตารางที่ 1 เพอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นอ่อนของเนื้อเยื่อต่างๆของกล้วยไม้สกุลคาแลนเทที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

ชนิดของเนื้อเยื่อ ที่นำมาเพาะเลี้ยง	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส		เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อน	
	อาหารสังเคราะห์ สูตร 1	อาหารสังเคราะห์ สูตร 2	อาหารสังเคราะห์ สูตร 1	อาหารสังเคราะห์ สูตร 2
ใบอ่อน	0	0	0	0
ต้นอ่อน	0	0	0	0
เนื้อเยื่อปลายยอด	0	0	0	0
เนื้อเยื่อก้านช่อดอก	0	0	0	0
ตาที่ซอก	0	0	0	20

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การขยายพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลคาแลนเธจากชิ้นส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบอ่อน ต้นอ่อน เนื้อเยื่อปลายยอด เนื้อเยื่อแกนช่อดอก และตาที่ซอกแกนช่อดอกบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลง 2 สูตร คือ VW + BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L และ VW + BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และมีปัญหาเกี่ยวกับการตัดชิ้นส่วนที่จะนำไปเพาะเลี้ยง เนื่องจากในระหว่างการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ นั้นจะเกิดสีน้ำตาลขึ้น ซึ่งเริ่มเป็นที่บริเวณขอบของเนื้อเยื่อก่อน แล้วลามเข้าไปด้านใน ทำให้เนื้อเยื่อตายในที่สุด และชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงไว้เกิดการปนเปื้อน (contaminate) เพราะบางชิ้นส่วนยากต่อการทำความสะอาด แต่มีชิ้นส่วนตาที่ซอกแกนช่อดอกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW + BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนหลังเพาะเลี้ยงได้ 24 สัปดาห์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์น้อย เนื่องจากความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับชนิดของกล้วยไม้ สายพันธุ์ อายุของต้น การดูแลรักษา สภาพแวดล้อมในการปลูก อาหาร และสภาพในการเพาะเลี้ยง (ประสาทร, 2541) การศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลคาแลนเธจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ในสภาพปลอดเชื้อครั้งนี้ ได้ข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ต่อการนำไปวางแผนการศึกษาเพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการทดลองครั้งนี้ และได้เห็นแนวโน้มที่จะพัฒนาเทคนิคเพื่อทำให้การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลคาแลนเธในสภาพปลอดเชื้อเกิดผลสำเร็จในที่สุด

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลคาแลนเธ (*Calanthe* spp.) จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อได้นำวิธีการและเทคนิคที่ได้ไปปรับใช้หรือเป็นแนวทางในการศึกษาการขยายพันธุ์จากเนื้อเยื่อต่างๆ และเป็นการเพิ่มปริมาณกล้วยไม้ดินสกุลคาแลนเธหรือกล้วยไม้ดินสกุลอื่นๆ ต่อไป

11. คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตรที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์และปัจจัยการผลิต ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ได้ช่วยปฏิบัติงานทดลองให้สำเร็จได้ด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

จิตราพรรณ พิสิท. 2536. การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 82 หน้า.

ประสาทร สมิตะมาน. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: เทคนิคและการประยุกต์ใช้. นพบุรีการพิมพ์, เชียงใหม่. 141 หน้า.

ภัทร์พิชชา รุจิระพงษ์ชัย. 2551. การขยายพันธุ์เอื้องน้ำต้นในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 98 หน้า.

สุนันทิพย์ บุณนาค. 2541. การเจริญเติบโตและฮอร์โมนพืช. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น. 354 หน้า.

13. ภาคนวก

สูตรอาหารของ Vacin and Went (1949)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (g/l)
Stock solution A (10X) (NH ₄) ₂ SO ₄	5.0

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5
KH_2PO_4	2.5
KNO_3	5.25
Stock solution B (200X)	
Na_2EDTA	7.5
$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.57
Stock solution C (100X)	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.075 (g/100ml)



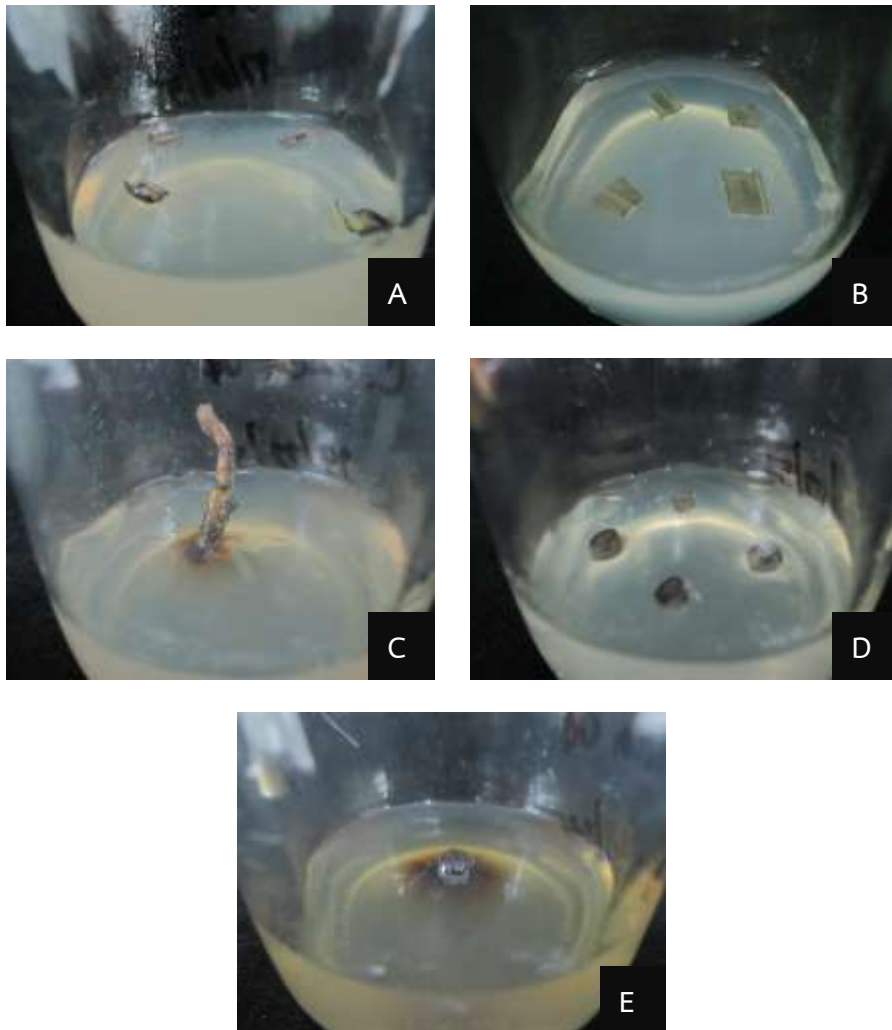
ภาพที่ 1 ลักษณะของชิ้นส่วนกล้วยไม้สกุลคาแลนเธที่นำมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ A: ต้นที่แตกใหม่ B: ใบอ่อน C: ต้นอ่อน D: ก้านช่อดอกตัดแยกเป็นชิ้นส่วนเนื้อเยื่อปลายยอด, เนื้อเยื่อก้านช่อดอกและตาที่ซั้ว



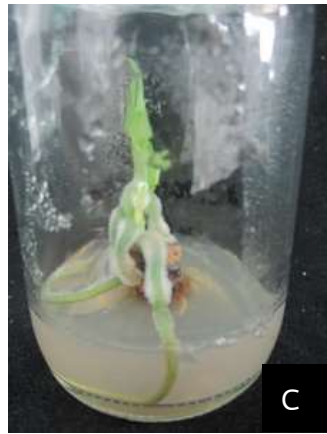
ภาพที่ 2 ลักษณะชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของกล้วยไม้สกุลคาแลนเทที่นำมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ A: ชิ้นส่วนใบอ่อน B: ชิ้นส่วนต้นอ่อน C: ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดก้านช่อดอก D: ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อก้านช่อดอกและ E: ชิ้นส่วนตาที่ช่อก้านช่อดอก



ภาพที่ 3 ลักษณะชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของกล้วยไม้สกุลคาแลนเท A: ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อก้านช่อดอกและ B: ชิ้นส่วนตาที่ข้อที่สมบูรณ์เกิดการบวมขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW + BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L ได้ 4 สัปดาห์



ภาพที่ 4 ลักษณะชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของกล้วยไม้สกุลคาแลนเท A: ชิ้นส่วนใบอ่อนที่เริ่มเป็นสีน้ำตาล B: ชิ้นส่วนใบอ่อนที่เป็นสีดำและตายทั้งชิ้น C: ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดที่ยืดตัว แต่กลายเป็นสีน้ำตาล D: ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อก้านช่อดอกที่เป็นสีน้ำตาลดำและตายทั้งชิ้น และ E: ชิ้นส่วนตาที่ข้อที่ไม่สมบูรณ์ที่เป็นสีดำและตายทั้งชิ้นหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW + BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L และ VW + BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L



ภาพที่ 5 ชิ้นส่วนตาที่ซ็อก้านช่อดอกที่สมบูรณ์หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW + BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L A: เกิดเนื้อเยื่อลักษณะคล้ายดอกหลังเพาะเลี้ยงได้ 8 สัปดาห์ B: เนื้อเยื่อลักษณะคล้ายดอกมีรากอ่อนเกิดขึ้นหลังเพาะเลี้ยงได้ 12 สัปดาห์ C: เจริญเป็นส่วนยอดและรากสีเขียวหลังเพาะเลี้ยงได้ 16 สัปดาห์ D: เริ่มแตกใบอ่อนหลังเพาะเลี้ยงได้ 20 สัปดาห์ E: เจริญเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์หลังเพาะเลี้ยงได้ 24 สัปดาห์ และ F: ต้นสมบูรณ์หลังเพาะเลี้ยงได้ 36 สัปดาห์