สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง การอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์วานิลาสายพันธุ์ป่าในประเทศไทย ณ พระตำหนักสวนปทุม (โครงการต่อเนื่อง)

โดย

ผศ. ดร.วัฒนชัย พงษ์นาค
หัวหน้าโครงการ

RCH
SB
307
.V2
ว393ก
2550
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....19 ก.ย. 2551

โครงการวิจัย(research project) ที่ได้รับการสนับสนุนประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2550 ตามมติคณะรัฐมนตรี

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพ

b.....
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรื่อง การอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์วานิลาสายพันธุ์ป่าในประเทศไทย ณ พระตำหนักสวนปทุม

บทคัดย่อ

จากการทดลองอย่างต่อเนื่องพบว่าวานิลาชอบเจริญในที่แสงแดดรำไร ปริมาณความเข้มของแสงต่ำ อุณหภูมิค่อนข้างเย็นและความชื้นในอากาศต้องเหมาะสม จึงจะแตกตาดอกได้และโรคแอนแทรกโนส เป็นโรคที่ระบาดทำความเสียหายมากที่สุด ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยเฉพาะจะระบาดมากในช่วงฤดูฝนทั้งที่ปลูกวานิลาภายในและนอกโรงเรือน วานิลาที่ปลูกภายในและภายนอกโรงเรือนมีการจัดการโดยให้ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ ป้องกันแมลงศัตรูโดยฉีดสารสกัดสะเดา ควบคุมโรคแอนแทรกโนสโดยใช้ยาเชื้อจุลินทรีย์คีโตเมี่ยมชนิดผง ฉีดพ่นในวนิลาทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ *Vanilla planifolia, V. siamensis, V. pilifera* , *V. albida* และ *V. aphylla* (พันธุ์จากประเทศฝรั่งเศส) จากศึกษาอย่างต่อเนื่องพบว่าวนิลา 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Vanilla planifolia, V. siamensis, V. pilifea* และ *V. albida* ที่ปลูกภายในบริเวณพระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี พบว่า *V. albida* ออกดอกในช่วงธันวาคมถึงกุมภาพันธ์ปีละครั้งเดียว และพัฒนาจากดอกเป็นฝักจนกระทั่งเก็บเกี่ยวเป็นเวลา 10 เดือน

จากการทดลองศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของวานิลา 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-07, OPA-20, OPB-14, OPB-18 และ OPC-09 โดยไพรเมอร์ OPB-14 เท่านั้นที่ไม่สามารถแยกได้ และพบว่าวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia varigate* และ *V. planifolia* มีความสัมพันธ์กัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าทั้งสองสายพันธุ์มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก ไพรเมอร์ OPB-18 และ OPA-20 สามารถใช้แยก *V.siamemsis* ได้ แต่สำหรับวานิลาสายพันธุ์อื่นยังไม่สามารถจำแนกได้อย่างชัดเจน พบว่าวานิลาทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถพัฒนาส่วนตาข้างไปเป็นต้นใหม่ได้ ซึ่งต้นที่เกิดขึ้นมีสีเขียวเข้ม และสีเขียวอมเหลืองแตกต่างกันไปในแต่ละสูตรอาหาร โดยขั้นตอนมีลำดับดังภาพที่แสดง

นอกจากนี้ วานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้น 0.5+0.5, 0.5+1 และ 0.5+3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำตาข้างของวานิลาให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้ ส่วนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้น 1+0.5, 1+1 และ 1+3 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถชักนำตาข้างของวานิลาให้เป็นต้นใหม่ได้ (ตารางที่ 2) โดยอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้น 0.5+1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุด

12003219

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

al. 2007) กลิ่นหอมของวานิลาเกิดจากสารองค์ประกอบต่างๆ ในระหว่างการหมักและบ่มฝักของวานิลา ซึ่งมีสารประกอบที่ทำให้เกิดกลิ่นมากกว่า 250 ชนิด ซึ่งสารวานิลิน (Vanillin) 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde เป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นที่สำคัญที่สุดของวานิลา (Havkin-Frenkel *et al.* 1996) จากสถิติที่รายงานไว้ใน International Trade Center (ITC) ของการนำเข้าฝักวานิลาและสารวานิลินในประเทศไทย พบว่ามีแนวโน้มที่เพิ่มมากขึ้นทุกปี ในปี 2003 2004 และ 2005 มีการนำเข้าฝักวานิลา 287 131 และ 185 กิโลกรัม ตามลำดับ และการนำเข้าสารวานิลิน 55,391 64,532 และ 86,210 กิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งในการนำเข้าแต่ละครั้งมีมูลค่าสูงมาก ซึ่งในปี 2006 พบว่ามีการนำเข้าสารวานิลินถึง 81 ตัน เป็นมูลค่าถึง 1,055 พันเหรียญสหรัฐอเมริกา (http://www.Trademap.net) และสำหรับในประเทศไทย ได้มีการค้นคว้าวิจัยถึงเทคนิคและวิธีการปลูกวานิลาในแหล่งต่างๆ ทางภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคตะวันออกของประเทศ ที่ศูนย์วิจัยและสถาบันวิจัยพืชสวนหลายแห่ง โดยเฉพาะสถานีทดลองพืชสวนดอยมูเซอ จังหวัดตาก ศูนย์วิจัยพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี เพื่อนำมาทดสอบให้ได้ผลผลิตสูงสุด ซึ่งจะช่วยลดการนำเข้าของฝักวานิลาและสารวานิลิน

วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของวานิลาสายพันธุ์ป่าที่พบ ตลอดจนการเพาะเลี้ยง การเจริญเติบโต การให้ดอกและฝัก ในสภาพภูมิอากาศและระบบนิเวศน์ต่าง ๆ การให้สารวานิลินของแต่ละสายพันธุ์
2. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของวานิลา
3. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการปรับปรุงพันธุ์ลูกผสมวานิลาสายพันธุ์ใหม่ให้ได้ตามลักษณะที่ต้องการและการขึ้นทะเบียนสายพันธุ์ใหม่
4. เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากวานิลา
5. เพื่อศึกษาการสกัดสารวานิลิน

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการนี้เป็นโครงการต่อเนื่อง เป็นศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ การเจริญเติบโต การให้ดอกและฝัก การปรับปรุงพันธุ์ของวานิลาสายพันธุ์ป่าที่พบในประเทศไทย จำนวน 4 สายพันธุ์ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลา ที่ปลูกที่พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี และศึกษาการสกัดสารวานิลินและสารประกอบทางเคมีอื่น ๆ ที่พบในฝักวานิลา สร้างวานิลาสายพันธุ์ลูกผสมใหม่ ที่มีศักยภาพในการผลิตสารวานิลิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วานิลา (Vanilla) เป็นพืชจัดอยู่ในตระกูลกล้วยไม้ (Orchidaceae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vanilla fargrans* (Salish) Ames วานิลาเป็นพืชเถาเลื้อย อายุการให้ผลผลิตหลายปี เถาจะเลื้อยพันไปบนค้างหรือไม้ยืนต้นอื่นๆ วราวุธ ชูธรรมธัช (2536) อธิบายลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของวานิลาโดยทั่วไปมีดังนี้ ลำต้น มีลักษณะเป็นเถายาว ทรงกระบอก สีเขียว มีลักษณะอวบน้ำ ขนาดของลำต้นขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของเถา เมื่อโค้งงอจะหักง่าย มีเส้นผ่านศูนย์กลางเถา 1-2 เซนติเมตร เถาวานิลามีปากใบจึงสามารถสังเคราะห์แสงได้ ปล้องมีความยาว 5-15 เซนติเมตร ใบ สีเขียวมีลักษณะแบน อวบน้ำ ลักษณะใบแบบ oblong-elliptic จนถึง lanceolate ใบอาจยาว 8-25 เซนติเมตร กว้าง 2-8 เซนติเมตร ปลายใบมีลักษณะแบบ acute ถึง acuminate ใบออกสลับกัน (Alternate) มีก้านใบสั้น ราก วานิลามีราก 2 ประเภทคือ รากอากาศ มีสีขาวถึงเขียวอ่อน เป็นรากเดี่ยวค่อนข้างยาว มีลักษณะอวบน้ำ จะเจริญออกจากเถาบริเวณข้อตรงข้ามกับใบ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร ทำหน้าที่ยึดเกาะ ส่วนรากบริเวณโคนจะแตกออกมาเป็นแขนง ทำหน้าที่ดูดซับธาตุอาหารและน้ำในดิน ช่อดอกเกิดจากตรงซอกใบ เป็นช่อแต่ไม่มีก้านช่อดอกย่อยแตกออกไป แต่ละต้นมีประมาณ 4 ช่อ ช่อดอกยาวประมาณ 8 เซนติเมตร กว้างประมาณ 0.78 เซนติเมตร มีจำนวน 5-20 ดอก ดอกจะบานจากโคนช่อดอกไปยังปลายช่อดอก ดอกจะบานครั้งละ 1-2 ดอก ดอก แต่ละช่อดอกจะมีดอกเฉลี่ย 15 ดอก ดอกของวานิลาไม่เป็นที่ดึงดูดของแมลง ดังนั้นผู้ปลูกจึงช่วยผสมเกสรให้ไม่เช่นนั้นจะไม่ติดฝัก ดอกจะบานในตอนเช้าเป็นเวลาที่พร้อมจะผสมเกสรคือระหว่าง 8.00-10.00 น. ภายหลังผสมติดแล้วรังไข่จะเจริญอย่างรวดเร็ว ดอกวานิลามีสีเขียวออกเหลือง กลีบดอกหนา ดอกมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 เซนติเมตร ก้านดอกสั้นหรือแทบไม่มี มีรังไข่แบบ inferior ovary ยาวประมาณ 4-7 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3-0.5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงมี 3 กลีบ รูปร่างยาวรีขนาด 4-7x10-15 เซนติเมตร ส่วนกลีบดอกก็มี 3 กลีบเช่นเดียวกัน สองกลีบด้านบนของดอกมีลักษณะคล้ายกลีบเลี้ยง อีกกลีบหนึ่งเปลี่ยนรูปไปเป็นรูปปากแตร จะมีขนาดสั้นกว่ากลีบดอกอื่น ปลายของฝา (ปากแตร) แยกเป็น 3 ส่วนและขอบหยักไม่สม่ำเสมอ เกสรตัวผู้มี 1 อัน ประกอบด้วย อับละอองเกสรตัวผู้ 2 อัน ส่วนของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียจะแยกออกจากกันโดยมีเยื่อบางๆ กั้นอยู่ เยื่อนี้เรียกว่า โรสเทลลัม (Rostellum) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ละอองเกสรตัวผู้ไม่สามารถถ่ายละอองเกสรลงไปผสมกับเกสรตัวเมียได้ ผล เป็นประเภท capsule ปกติเรียกว่าฝัก (Pod) มีลักษณะคล้ายทรงกระบอกแคบโป่งตรงปลายฝัก มี 3 มุม ฝักยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-15 มิลลิเมตร การเจริญเติบโตของฝักวานิลาจะเป็นไปอย่างรวดเร็วภายใน 2 สัปดาห์หลังการผสมเกสรติด จากนั้นการเจริญเติบโตจะค่อนข้างคงที่ ภายในฝักจะมีเมล็ดอยู่จำนวนมาก เมื่อฝักแห้งจะมีกลิ่นหอม ผลบางชนิดเมื่อสุกจัดจะแตกตามยาว บางพันธุ์เมื่อสุกผลจะไม่แตก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของวานิลา

วานิลาที่ปลูกเป็นการค้าโดยทั่วๆ ไปมี 3 ชนิดคือ

1. *Vanilla planifolia* เป็นชนิดที่สำคัญที่สุดในการปลูกเป็นการค้าและเป็นแหล่งผลิตสารวานิลินที่สำคัญ ปลูกแถบทางตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศเม็กซิโก เวสต์ อินเดียน กัวเตมาลา เอลซันวาดอร์ เวนเนซูเอล่า ซูรินัม เปรู โปลิเวียและปลูกทั่วไปในแถบร้อน วานิลาสายพันธุ์นี้มีลักษณะใบยาว อวบน้ำ สีเขียว ใบออกตรงกันข้ามกับราก ก้านใบสั้น ใบมีลักษณะ oblong-elliptic จนถึง narrowy lanceolate หรือ acute จนถึง acuminate ยาว 9-23 เซนติเมตร กว้าง 2-8 เซนติเมตร ช่อดอกอาจมีมากกว่า 20 ดอก ดอกสีเขียวออกเหลืองมี 3 กลีบดอก 3 กลีบเลี้ยง ตรงกลางคือ column มี stamen และ pistil อยู่ หนึ่งใน petal จะเปลี่ยนและขยายเป็น lip, sepal และ petal มีลักษณะ oblong-oblanceolate, obtuse จนถึง subacute ยาว 4-7 เซนติเมตร กว้าง 1-1.5 เซนติเมตร หนึ่งใน petal จะเปลี่ยนและขยายเป็น lip คล้ายทรัมเปตเกือบติดกับยอดของ column ซึ่งจะมีอยู่ 3 lobed ต้นมีลักษณะแบนยาว 4-8 เซนติเมตร กว้าง 1.5-3 เซนติเมตร (Divakaran *et al.* 2006)

2. *Vanilla pompona* บางครั้งเรียกว่า วานิลลอน เวสต์อินเดียน เซาท์อเมริกัน หรือ ปอมโปนา วานิลาเป็นพืชที่ปลูกกันในแถบอเมริกากลาง ตรินิแดท ตะวันออกเฉียงใต้ของเม็กซิโกและทางเหนือของอเมริกาใต้ *V. pompona* ต้องการความชื้นน้อยกว่า *V. planifolia* และต้านทานต่อโรครากเน่า (*Fusarium batatalis* var. *vanillae* Tuckes) วานิลา pompona จะมีการออกดอกเมื่ออายุ 1 หรือ 2 ปี หลังจากปลูก โดยทั่วๆไป *V. pompona* จะคล้ายกับ *V. planifolia* มาก ยกเว้นใบจะมีขนาดใหญ่กว่า ยาวประมาณ 15-18 เซนติเมตร กว้าง 4-11 เซนติเมตร ดอกจะมีสีเขียวออกเหลือง ฝักมีลักษณะสามเหลี่ยมขนาดยาว 15-17.8 เซนติเมตร กว้าง 2.5-3.3 เซนติเมตร เวลาฝักแก่มักจะไม่ค่อยแตก แต่คุณภาพของฝักจะต่ำกว่า *V. planifolia* จึงทำให้มีราคาต่ำกว่าด้วย กลิ่นมักจะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมยาสูบ สบู่ น้ำหอม ยาและเครื่องดื่ม (Hawkes. 1965)

3. *Vanilla tahitensis* ปลูกกันมากในประเทศตาฮิติ เรียกว่า Tahitian vanilla มาจากหมู่เกาะของประเทศฝรั่งเศสในมหาสมุทรแปซิฟิก พันธุ์นี้ยังนิยมปลูกใน Hawaii ด้วย ลำต้นเรียวกว่า *V. planifolia* ใบแคบกว่า ส่วนของ perianth ยาวกว่าและ lip สั้นกว่า sepals ฝักสั้นกว่า สีปนแดงน้ำตาล ยาว 12-14 เซนติเมตร กว้าง 9 มิลลิเมตร ตรงกลางฝักจะกว้างและค่อยๆ แคบลงตรงด้านปลาย (วราวุธ ชูธรรมธัช. 2536)

วานิลาชนิดที่พบในประเทศไทย (เต็ม สมิตินันท์. 2523; อบฉันท์ ไทยทอง. 2543; Seidenfaden and Smitinand. 1958; Comber. 1990) ได้แก่

1. *Vanilla aphylla* Rolfe (เถางูเขียว เครืองูเขียว คดนกกูด) ลำต้นเป็นลำเกือบกลมหรือแบนเล็กน้อย ผิวต้นเกลี้ยง สีเขียวเข้ม ปล้องยาวได้ถึง 50 เซนติเมตร กว้าง 0.5-1 เซนติเมตร รากออกที่ข้อ ใบลดรูปไปมีลักษณะเป็นเกล็ดมองดูคล้ายไม่มีใบ ดอกออกตามข้อเป็นช่อสั้น ช่อละ 2-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดอก ขนาดดอกประมาณ 3-4 เซนติเมตร ฤดูออกดอก ออกตลอดปี แหล่งที่พบ เกือบทุกภาคตามป่าดิบแล้ง

2. *Vanilla siamensis* Rolfe ex Downie (พลูช้าง) ลำต้นสีเขียวเข้ม ผิวต้นเกลี้ยง กลมปล้องยาว 20-50 เซนติเมตร กว้าง 1-1.5 เซนติเมตร รากออกที่ข้อ ใบรูปรี มีขนาดใหญ่ ขนาด 10-30x6-12 เซนติเมตร แผ่นใบเรียบ หนา อวบน้ำ ปลายใบแหลมหรือปลายมน สีเขียวเข้ม ดอกออกตามข้อเป็นช่อสั้นๆ ดอกในช่อทยอยบานเป็นเวลานาน ขนาดดอก 4-5 เซนติเมตร กลีบค่อนข้างอวบน้ำ ฤดูออกดอกเมษายน-มิถุนายน แหล่งที่พบ ภาคเหนือ (ดอยสุเทพ ดอยเชียงดาว) ภาคตะวันออก (เขาสอยดาว)

3. *Vanilla pilifera* Holttum (งค สามร้อยต่อใหญ่) ลำต้นปล้องยาว 7-10 เซนติเมตร สีเขียวเข้ม รากออกที่ข้อ ใบมีขนาด 10-16x4-8 เซนติเมตร ใบบางปลายแหลม ดอกสีขาวปนเขียวออกตามข้อเป็นช่อสั้นๆ ขนาดดอก 2-3 เซนติเมตร แหล่งที่พบ ตรัง ประจวบคีรีขันธ์

4. *Vanilla albida* Bl., Bijdr. ลำต้นปล้องยาว สีเขียวเข้ม รากออกที่ข้อ ใบแคบขนาด 12-14x3.5-5 เซนติเมตร ดอกช่อดอกสั้น ยาวประมาณ 1-3 เซนติเมตร ช่อละ 6-12 ดอก ดอกมีสีขาวปนเขียวข้างในมีสีม่วง

วานิลา (Vanilla) เป็นพืชที่จัดอยู่ในตระกูลกล้วยไม้ (Orchidaceae) เป็นพืชเครื่องเทศที่มีการใช้ประโยชน์โดยการนำเอาฝักมาหมักและบ่มให้เกิดกลิ่น จากนั้นนำไปสกัดให้ได้สารที่ทำให้เกิดกลิ่นหอมและรสชาติ มาใช้ในการปรุงแต่งกลิ่นไอศกรีม ช็อคโกแลต ขนม ลูกกวาด นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมยาและน้ำหอมอีกด้วย (วราวุธ ชูธรรมธัช. 2536) กลิ่นหอมของวานิลานั้น เกิดจากสารองค์ประกอบต่างๆ ในระหว่างการหมักและบ่มฝักของวานิลา ซึ่งมีสารประกอบที่ทำให้เกิดกลิ่นมากกว่า 250 ชนิด แต่สารวานิลิน (vanillin) 4-hydroxy-3-methoxybenzaldahyde เป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นที่สำคัญที่สุดของวานิลา (Havkin-Frenkel *et al.* 1996) การนำไปใช้ประโยชน์ของวานิลานั้นมีหลายรูปแบบ เช่นสารสกัดวานิลา (vanilla extract) วานิลาทิงเจอร์ (vanilla tincture) หรือวานิลาผง สารวานิลินที่สกัดได้จากวานิลาจะมีกลิ่นหอมที่เกิดจากธรรมชาติ ซึ่งมีคุณภาพดีกว่าสารวานิลินสังเคราะห์ ซึ่งสังเคราะห์จากของเสียของโรงงานทำกระดาษ และ eugenol จากน้ำมันกานพลู ที่มีราคาถูกกว่าวานิลินที่สกัดได้จากธรรมชาติ (วราวุธ ชูธรรมธัช และ อรุณ เลียววสุต. 2535)

วานิลาเป็นพืชที่เกิดขึ้นในป่าพื้นเมืองตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศเม็กซิโก กัวเตมาลา และบางส่วนของประเทศแถบอเมริกากลาง ปัจจุบันมีการปลูกกระจายอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะในเขตร้อนชื้น เช่น มาดากัสการ์ หมู่เกาะรียูเนียน อินโดนีเซีย (Heywood. 1985) ประเทศที่ผลิตและส่งออกเป็นรายใหญ่ที่สุดในโลกคือประเทศมาดากัสการ์ รองลงมาคือ ประเทศอินโดนีเซีย วานิลาถือเป็นพืชทองของอินโดนีเซีย ทางรัฐบาลอินโดนีเซียกำลังส่งเสริมและพัฒนาพืชนี้เป็นพืชเศรษฐกิจ ที่สำคัญพืชหนึ่ง ทำรายได้ให้แก่เกษตรกรค่อนข้างสูง โดยจำหน่ายราคาฝักสดกิโลกรัมละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

125 บาท ฝักที่แห้งแล้วหลังจากหมักบ่มแล้วราคากิโลกรัมละ 700-1,000 บาท ขึ้นอยู่กับการคัดเกรด (ประยูร สมฤทธิ์. 2544) แต่การปลูกวานิลาก็มักจะมีปัญหาจากการทำลายของโรคอยู่เสมอ เช่นโรคเน่าดำ (Black rot) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Phytophthora palmivora* (แสงมณี ชิงดวง และคณะ. 2536) นอกจากนี้ยังมีโรค Phytophthora rot เชื้อสาเหตุคือ *Phytophthora meadii* (Bhai and Thomas. 2000) โรคลำต้นเน่า (Stem rot) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae* (George. 1973) และโรคแอนแทรคโนส เชื้อสาเหตุคือ *Glomerella vanillae* (George. 1973)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของวานิลาวานิลาเป็นพืชเถาเลื้อย พบขึ้นในป่าดิบชื้น มีอายุการให้ผลหลายปี (perennial) ลำต้นสีเขียว อวบน้ำ ยาวได้หลายเมตร ค่อนข้างกลมหรือแบนเล็กน้อย ผิวเรียบหรือเป็นร่องตามยาว มีรากอากาศสำหรับยึดติดบนต้นไม้อื่นหรือไม้หลัก ใบมีลักษณะเรียวยาวรูปไข่ ใบหนาและอวบน้ำ บางสายพันธุ์ใบได้ลดรูปไปมีลักษณะเป็นเกล็ดมองดูคล้ายไม่มีใบ ช่อดอกสั้น เกิดตามข้อ ดอกค่อนข้างโต ดอกมีสีเหลืองอมเขียวหรือสีเขียวปนขาว กลีบดอกขนาดใกล้เคียงกัน โคนกลีบปากด้านข้างเชื่อมกับเส้าเกสร ส่วนปลายกางออกและมีขนครุยตรงกลางหรือแนวกลางกลีบ ฝักยาว 7-22 เซนติเมตร ภายในฝักมีเมล็ดขนาดเล็กละเอียดสีดำจำนวนมาก (อบฉันท์ ไทยทอง. 2543 : Ames and Correll. 1985)

วราวุธ ชูธรรมธัช (2536) กล่าวไว้ว่าสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของวนิลาได้แก่ ฝนและอุณหภูมิ โดยวนิลาสามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนชื้น ในแหล่งปลูกวนิลาควรมีปริมาณฝนระหว่าง 850-2000 มิลลิเมตร ต่อปี วนิลาต้องการการกระจายของฝนที่สม่ำเสมอประมาณ 9-10 เดือน เพื่อให้เถาและฝักที่ติดมีการเจริญเติบโตดี ต้องการช่วงแล้งอย่างน้อย 2 เดือน สำหรับการออกดอก แต่ไม่ควรมีช่วงแล้งนานเกินไป อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของวนิลาอยู่ระหว่าง 21-23 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 60-80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแสงที่พอเหมาะมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตของวนิลา นอกจากนี้ยังมีผลต่อน้ำหนักและกลิ่นของฝักวนิลาด้วย วนิลาต้องการแสงเพียงเล็กน้อย โดยวนิลาจะมีการเจริญเติบโตทางด้านเถาและรากดีเมื่อได้รับแสงเพียง 30-50 เปอร์เซ็นต์

เมื่อวานิลาออกดอกจำเป็นต้องช่วยผสมเกสรมิฉะนั้นจะไม่ติดฝัก ช่วงเวลาที่เหมาะสมคือช่วงเช้า ในต้นเดียวกันควรผสมไม่เกิน 10-12 ช่อ เด็ดตาดอกที่เหลือทิ้งเพื่อไม่ให้แย่งอาหาร วิธีผสมเกสรโดยใช้ไม้ไผ่ปลายแหลม หรือไม้จิ้มฟันด้านแหลมเขี่ยแผ่นบาง ๆ ที่กั้นระหว่างเกสรตัวผู้กับตัวเมียออกและใช้นิ้วหัวแม่มือบีบเกสรตัวเมียให้ติดกับเกสรตัวผู้ เกลี่ยละอองเกสรให้ทั่ว วานิลาจะให้ผลผลิตเมื่ออายุ 2-3 ปี และให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นจนอายุ 7-8 ปี ฝักวานิลานับแต่ได้รับการผสมเกสรจนถึงเจริญเต็มที่ใช้เวลาประมาณ 10 เดือน ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บเกี่ยวคือ ฝักเริ่มมีสีเหลืองที่ปลายฝัก หากปล่อยให้ฝักเหลืองจะเริ่มปริแตก (กลุ่มพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ. 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ของวานิลา วานิลาสายพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้า *Vanilla planifolia* Andrews (Hawkes.1965) ลำต้นสีเขียวเข้ม ผิวต้นเกลี้ยง กลมหรือแบนเล็กน้อย รากออกที่ข้อ ใบมีก้านสั้น ใบหนาอวบน้ำ รูปไข่ยาวรี ขนาดกว้าง 3 นิ้ว ยาว 9 นิ้ว ดอกออกตามข้อ ช่อดอกยาวประมาณ 3 นิ้ว แต่ละช่อมีดอกมากถึง 20 ดอก ขนาดดอกประมาณ 2.5 นิ้ว มีสีเหลืองอมเขียว วานิลาสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย (อบฉันท์ ไทยทอง. 2543 : Seidenfaden and Smitinand. 1958 : Comber. 1990 : Seidenfaden and Wood. 1992) ได้แก่ *V. aphylla* Rolfe (เถางูเขียว เครืองูเขียว คดนกกูด) ลำต้นเป็นลำเกือบกลมหรือแบนเล็กน้อย ผิวต้นเกลี้ยง สีเขียวเข้ม ปล้องยาวได้ถึง 50 เซนติเมตร กว้าง 0.5 - 1 เซนติเมตร รากออกที่ข้อ ใบลดรูปไปมีลักษณะเป็นเกล็ดมองคูคล้ายไม่มีใบ ดอกออกตามข้อเป็นช่อสั้น ช่อละ 2-3 ดอก ขนาดดอกประมาณ 3-4 เซนติเมตร ฤดูออกดอก ออกตลอดปี แหล่งที่พบ เกือบทุกภาคตามป่าดิบแล้ง *V. siamensis* Rolfe ex Downie (พลูช้าง) ลำต้นสีเขียวเข้ม ผิวต้นเกลี้ยง กลม ปล้องยาว 20 - 50 เซนติเมตร กว้าง 1 - 1.5 เซนติเมตร รากออกที่ข้อ ใบรูปรี มีขนาดใหญ่ ขนาด 10 - 30 x 6 - 12 เซนติเมตร แผ่นใบเรียบ หนา อวบน้ำ ปลายแหลมหรือปลายมน สีเขียวเข้ม ดอกออกตามข้อเป็นช่อสั้น ๆ ดอกในช่อทยอยบานเป็นเวลานาน ขนาดดอก 4 - 5 เซนติเมตร กลีบค่อนข้างอวบน้ำ ฤดูออกดอก เมษายน-มิถุนายน แหล่งที่พบ ภาคเหนือ (ดอยสุเทพ ดอยเชียงดาว) ภาคตะวันออก (เขาสอยดาว) *V. pilifera* Holttum (งด สามร้อยต่อใหญ่) ลำต้นปล้องยาว 7 - 10 เซนติเมตร สีเขียวเข้ม รากออกที่ข้อ ใบมีขนาด 10 - 16 x 4 - 8 เซนติเมตร ใบบางปลายแหลม ดอกสีขาวปนเขียว ออกตามข้อเป็นช่อสั้น ๆ ขนาดดอก 2 - 3 เซนติเมตร แหล่งที่พบ ตรัง ประจวบคีรีขันธ์ *V. albida* Bl., Bijdr. ลำต้นปล้องยาว สีเขียวเข้ม รากออกที่ข้อ ใบแคบ ขนาด 12 - 14 x 3.5 - 5 เซนติเมตร ดอกช่อดอกสั้น ยาว 1 - 3 เซนติเมตร ช่อละ 6 - 12 ดอก ดอกมีสีขาวปนเขียว ข้างในมีสีม่วง

โรคที่สำคัญของวานิลา ได้แก่ โรคแอนแทรคโนส เกิดจากเชื้อรา *Glomerella vanillae* (Zimm.) Petch & Ragun เชื้อเข้าทำลายบริเวณลำต้นและใบ บริเวณที่เป็นโรคเห็นเป็นรอยบุ๋มลงเป็นรูปไข่หรือวงรี อาการเริ่มแรกเห็นเป็นจุดฉ่ำน้ำก่อนแล้วจึงเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและแผลเริ่มแห้ง หลังจากนั้นสีของแผลจะเริ่มเข้มขึ้น ทำให้เฉาเหี่ยวและฝักร่วงได้ (George. 1973) โรคลำต้นเน่า (Stem rot) เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* ระยะแรกบริเวณรากจะเริ่มมีสีน้ำตาลและเริ่มตาย โดยเริ่มสังเกตเห็นบริเวณผิวดิน ต่อมารากก็จะตายและจะมีผลต่อการสร้างรากใหม่ ส่วนปลายยอดก็จะตาย ส่วนลำต้นและใบเริ่มเป็นสีเหลือง จนในที่สุดก็อาจถึงตายได้ (George. 1973) โรคลำต้นเน่านี้เป็นโรคที่สำคัญและมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางของพื้นที่ปลูกในประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจทุกปี โดยจะมีการแพร่ระบาดรุนแรงบริเวณ ชวา บาหลี และสุมาตราเหนือ (Tombe *et al.* 1991) โรค Phytophthora rot เกิดจากเชื้อ *Phytophthora meadii* เชื้อจะเข้าทำลายทำให้เกิดอาการบริเวณเนื้อเยื่อที่อยู่เหนือดินและทำให้เกิดอาการรากเน่า Bhai and Thomas (2000) รายงานว่าที่ประเทศอินเดีย โรคนี้ทำให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาการเน่าที่ฝัก ใบ และลำต้นของวานิลา ซึ่งเป็นรายงานครั้งแรกที่พบโรคที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* spp. เป็นครั้งแรกในอินเดียอีกด้วย และโรคเน่าดำ (Black rot) เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ซึ่งแสงมณี ชิงดวงและคณะ (2536) รายงานว่า จากการทดลองปลูกวานิลาของสถาบันวิจัยพืชสวนจังหวัดเชียงใหม่ ได้ประสบปัญหาการเกิดโรคของวานิลา โดยจะระบาดรุนแรงมากขึ้นเมื่อมีความชื้นของอากาศสูง อาการเริ่มแรก คือใบหรือลำต้นเป็นสีเหลือง โดยเชื้อจะเข้าทำลายที่บริเวณรากอ่อน แล้วลุกลามขึ้นโคนต้นและจากลำต้นไปสู่ใบและยอด ส่วนที่ถูกทำลายจะเหลือง จากนั้นใบ ลำต้น ท่อน้ำและท่ออาหารจะถูกทำลาย เกิดอาการเน่าเป็นสีดำ และแห้งตายไปในที่สุด ส่วนใบและยอดมีอาการเน่าและเป็นสีดำและเหี่ยวย่น

โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) เกิดจากเชื้อรา *Glomerella vanillae* (Zimm.) Petch&Ragun imperfect Stage of *Colletotrichum* sp. เข้าทำลายบริเวณลำต้นและใบ เป็นรอยบุ๋มรูปไข่หรือวงรี อาการเริ่มแรกเห็นเป็นจุดฉ่ำน้ำก่อนแล้วจึงเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและแผลเริ่มแห้ง หลังจากนั้นสีของแผลจะเริ่มเข้มขึ้นทำให้เฉาเหี่ยวและฝักร่วงได้ (George. 1973) จากรายงานการปลูกวานิลาในประเทศอินเดียพบว่าโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงในแหล่งปลูกคือ โรคแอนแทรคโนสที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Calospora vanillae* ซึ่งจะเข้าทำลายลำต้น ใบและราก ทำให้ฝักเหี่ยวและร่วง ในสภาพแปลงปลูกที่มีความชื้นสูงมาก มีการระบายน้ำในดินไม่ดี มีสภาพร่มเงามากเกินไป จะทำให้มีการระบาดของโรคนี้ได้ง่าย (Sasikumar *et al.* 1992)

โรคลำต้นเน่า (Stem rot) เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* ระยะแรกบริเวณรากจะเริ่มมีสีน้ำตาลและเริ่มตาย โดยเริ่มสังเกตเห็นบริเวณผิวดิน ต่อมารากก็จะตายและจะมีผลต่อการสร้างรากใหม่ ปลายยอดก็จะตาย ลำต้นและใบเริ่มเป็นสีเหลือง จนในที่สุดก็อาจถึงตายได้ (George. 1973) โรคลำต้นเน่านี้เป็นโรคที่สำคัญและมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางของพื้นที่ปลูกในประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจทุกปี โดยจะมีการแพร่ระบาดรุนแรงบริเวณ ชวา บาหลีและสุมาตราเหนือ (Tombe *et al.* 1991)

โรค Phytophthora rot เกิดจากเชื้อ *Phytophthora meadii* เชื้อจะเข้าทำลายทำให้เกิดอาการบริเวณเนื้อเยื่อที่อยู่เหนือดินและทำให้เกิดอาการรากเน่า Bhai and Thomas (2000) รายงานว่าโรคนี้ทำให้เกิดอาการเน่าที่ฝัก ใบและลำต้นของวานิลา ซึ่งเป็นรายงานครั้งแรกที่พบ โรคที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* spp. ในอินเดีย

โรคเน่าดำ (Black rot) เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ซึ่ง แสงมณี ชิงดวง และคณะ (2536) รายงานว่าจากการทดลองปลูกวานิลาของสถาบันวิจัยพืชสวนจังหวัดเชียงใหม่ ได้ประสบปัญหาการเกิดโรคของวานิลา โดยจะระบาดรุนแรงมากขึ้นเมื่อมีความชื้นของอากาศสูง อาการเริ่มแรกคือ ใบหรือลำต้นเป็นสีเหลือง โดยเชื้อจะเข้าทำลายที่บริเวณรากอ่อน แล้วลุกลามขึ้นโคนต้นและจากลำต้นไปสู่ใบและยอด ส่วนที่ถูกทำลายจะเหลือง จากนั้นใบ ลำต้น ท่อน้ำและท่ออาหารจะถูกทำลาย เกิดอาการเน่าเป็นสีดำและแห้งตายไปในที่สุด ส่วนใบและยอดมีอาการเน่าและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นสีดำและเหี่ยวย่น ดังนั้นโรคที่สำคัญและทำความเสียหายกับวานิลารุนแรงมากและมีผลทำให้ผลผลิตของฝักวานิลาลดลง ได้แก่ โรคแอนแทรคโนส โรครากเน่า ลำต้นเน่า

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Biological control of plant pathogens) หมายถึง การใช้จุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตหรือสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืช สามารถลดปริมาณเชื้อก่อโรคและลดการเกิดโรคได้ รวมถึงการใช้พืชพันธุ์ต้านทานโรค เพื่อให้การเกิดโรคลดลงจนต่ำกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ โดยใช้การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีร่วมกับวิธีการควบคุมโรคพืชวิธีการอื่นๆ แบบผสมผสานซึ่งอาจเรียกว่าการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีแบบผสมผสาน (Integrated biological control of plant disease) (เกษม สร้อยทอง. 2548) ในการนำเทคโนโลยีควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี หรือการนำเอาจุลินทรีย์ไปใช้เพื่อความสำเร็จของการลดปริมาณเชื้อก่อโรคและลดอัตราการเกิดโรคพืชนั้น จำเป็นจะต้องศึกษาและทำความเข้าใจถึงกลไกการควบคุมโรค (Control mechanisms) ของจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชหรือจุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคพืชว่ามีกลไกหรืออาวุธในการเข้าทำลายเชื้อโรคพืชอย่างไร ซึ่ง เกษม สร้อยทอง (2548) ได้อธิบายกลไกที่เกี่ยวข้องกับขบวนการต่อต้านเชื้อโรคพืช (Antagonism) 5 ลักษณะคือ

1. การแย่งอาหารกัน (Competition) หมายถึง การที่เชื้อสาเหตุทำให้เกิดโรคพืชและจุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคพืชจะแข่งขันกันในการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ จากการแย่งกันดูดซับอาหารพวกสารอินทรีย์ต่างๆ และเจริญเข้าครอบครอง (Colonization) ในบริเวณนั้น ดังนั้นสิ่งมีชีวิตใดเจริญเติบโตได้ดีกว่า จึงหมายถึงมีความสามารถในการแย่งอาหารได้ดีกว่า เช่น การทดสอบเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma harzianum* ร่วมกับเชื้อ *Phytophthora parasitica* และ *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของพริกไทยและโรคเน่าดำของวานิลา ตามลำดับ บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อ *T. harzianum* สามารถเจริญได้รวดเร็วกว่าเชื้อรา *Phytophthora* และเจริญปกคลุมโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิด ได้หมดภายใน 5 วัน หลังจากวางเชื้อ *T. harzianum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สามารถแย่งอาหารและที่อยู่อาศัยและยังมีความสามารถในการเจริญเติบโตที่เหนือกว่าการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าว (แสงมณี ชิงดวง และคณะ. 2540)

2. การสร้างสารปฏิชีวนะ (Antibiosis) จุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคพืช (Antagonistic microorganism) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยการดูดซับสารละลายอินทรีย์เป็นอาหารในการเจริญแพร่ขยายพันธุ์และปลดปล่อยสารพิษ (Toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (Antibiotic substances) ออกมาภายนอก สารดังกล่าวมีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่อยู่ในบริเวณนั้นได้ มีผลทำให้เซลล์เชื้อสาเหตุโรคตาย ลดปริมาณลง อ่อนแอลง ความสามารถในการทำให้เกิดโรคลดลง ตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านที่สร้างสารปฏิชีวนะได้แก่ *Chaetomium globosum* ที่สร้างสาร Chaetoglobosin C และ ergosterol ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ราสาเหตุโรคต่างๆ ได้ เช่น *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. dematium*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *P. palmivora* และ *Pyricularia oryzae* (Soytong *et al.* 2001) Kanokmedhakul *et al.* (2006) พบสารกลุ่ม azaphilones ใหม่ 3 สาร ได้แก่ rotiorinols A-C (1-3) สารกลุ่ม stereoisomers 2 สาร คือ (-)-rotiorin (4) และ epi-isochromoplilone II (5) และไม่ทราบกลุ่ม คือ rubrorotiorin (6) ที่แยกได้จากเชื้อรา *Chaetomium cupreum* CC3003 จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสาร 1, 3, 4 และ 6 สามารถต่อต้านเชื้อ *Candida albicans* โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.5, 16.7, 24.3 และ 0.6 µm/ml ตามลำดับ

Silva *et al.* (2006) พบว่า สาร Cadinane sesquiterpenes 5 ชนิด ที่แยกได้โดยวิธี bioassay-guided fractionation จากรา endophyte *Phomopsis cassiae* ที่เจริญอยู่ในต้นขี้เหล็กอเมริกัน (*Cassia spectabilis*) เป็นพืชในตระกูล Caesalpinioideae พบว่า 3, 11, 12-trihydroxycadalene เป็นสารประกอบที่ได้ ที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium sphaerospermum* และ *Cladosporium cladosporioides*

Lu *et al.* (2000) รายงานว่า เชื้อรา endophyte *Colletotrichum* sp. ในชิงเฮาซึ่งเป็นพืชสมุนไพรในประเทศจีน สามารถผลิตสาร antimicrobial metabolites มายับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* และ *Pseudomonas* sp. และยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Candida albicans* และ *Aspergillus niger* และยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคในพืช *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum* และ *Phytophthora capsici*

3. การเป็นปรสิตของเชื้อก่อโรค (Parasitism) หรือเชื้อราฆ่าเชื้อโรค (Mycoparasite) หมายถึง การที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดสามารถเจริญบนจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่เป็นเชื้อสาเหตุทำให้เกิดโรค โดยดูดน้ำเลี้ยงหรือได้รับอาหารโดยตรงจากเชื้อสาเหตุโรค จุลินทรีย์ดังกล่าวอาจเรียกว่า เป็นเชื้อราฆ่าเชื้อโรค (Mycoparasite) (เกษม สร้อยทอง. 2548) จากรายงานของ แสงมณี ชิงดวง และคณะ (2540) ที่ทำการทดสอบเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma harzianum* ร่วมกับเชื้อ *Phytophthora parasitica* และ *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของพริกไทยและโรคเน่าดำของวานิลาตามลำดับ บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อ *T. harzianum* สร้างเส้นใยเข้าไปสัมผัสกับเส้นใยของเชื้อรา *Phytophthora* และพันรัดล้อมรอบเส้นใยแล้วเจริญแทงเข้าไปในเส้นใยของเชื้อรา *Phytophthora* และใช้ของเหลวที่อยู่ในเส้นใยเป็นอาหาร โดยพบว่าของเหลวภายในเส้นใยของเชื้อรา *Phytophthora* ที่ถูกทำลายจะหายไป เกิดเป็นช่องว่าง ทำให้มีลักษณะแตกต่างจากเส้นใยปกติเป็นผลให้เชื้อรา *Phytophthora* ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ และยังพบว่าเส้นใยที่ถูกทำลายมีลักษณะโป่งพอง และเมื่อการทำลายรุนแรงมากขึ้นเส้นใยจะสลายตัวไป

4. การขัดขวางการเจริญของเชื้อโรคพืช (Hyphal interference) เป็นกลไกอย่างหนึ่งของจุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคพืช ซึ่งสามารถเจริญพันรัดเส้นใยหรือโครงสร้างต่างๆ ของเชื้อราสาเหตุโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืช มีผลต่อการรบกวนหรือขัดขวางการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรค ทำให้มีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติไป เสียรูปทรง ความสามารถในการซึมผ่านของของเหลวสู่เซลล์สูญเสียไป

5. การสร้างภูมิคุ้มกันโรค (Plant immunity) เป็นการชักนำให้พืชป้องกันตนเองโดยการปลูกเชื้อหรือการใช้สารเคมีบางชนิด ทำให้พืชเกิดความต้านทานโรคเฉพาะแห่งและกระจายทั่วต้น เนื่องจากพืชในธรรมชาติไม่สามารถสร้างแอนติบอดีมาต่อต้านเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ และกลไกการป้องกันทางชีวเคมีของพืชส่วนใหญ่ จะไม่เกิดขึ้นจนกว่าจะมีสัญญาณเตือน (Signal transmitted) จากเชื้อสาเหตุโรคที่เข้าทำลายเซลล์พืช (เกษม สร้อยทอง. 2548)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นศาสตร์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพสาขาหนึ่ง โดยนำเซลล์เนื้อเยื่อหรืออวัยวะส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ในสภาพปราศจากเชื้อภายใต้การควบคุมสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ แสงสว่าง และความชื้นเป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกำเนิดมาจากหลักการ Totipotency ที่ว่า เซลล์พืชเดี่ยวๆ ทุกเซลล์มีลักษณะ และองค์ประกอบทางพันธุกรรมสมบรูณ์เหมือนต้นแม่ ซึ่งสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. การขยายพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถขยายพันธุ์พืชที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีอื่นได้ยากหรือขยายได้ช้า เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้จำนวนมากได้ อย่างรวดเร็ว สามารถผลิตต้นพันธุ์ได้ตลอดปี ซึ่งต้นพันธุ์ที่ได้มีลักษณะเหมือนเดิมทุกประการ และให้ผลผลิตคุณภาพดี
2. การผลิตต้นพันธุ์ที่ปราศจากโรค พืชหลายชนิดมีเชื้อไวรัสแฝงตัวอยู่ในท่อลำเลียงจึงเป็นการยากต่อการผลิตพันธุ์พืชที่ปราศจากโรค ดังนั้นการเพาะเลี้ยงส่วนของปลายยอดที่ยังไม่มีท่อลำเลียงสามารถขจัดการปนเปื้อนของไวรัสเหล่านั้นได้
3. การผลิตสารสำคัญหรือสารทุติยภูมิ พืชหลายชนิดสามารถผลิตสารสำคัญได้ ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้ เช่น สารตัวยารักษาโรค สีที่ใช้ในอุตสาหกรรม ซึ่งการนำพืชเหล่านี้มาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมได้ทำให้สามารถชักนำให้เซลล์ของพืชผลิตสารในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น
4. การอนุรักษ์พันธุกรรมและการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืช เป็นการเก็บรวบรวมพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงไว้ในขวด และบังคับให้เติบโตอย่างช้าๆ ซึ่งทำให้สามารถเก็บรักษาพันธุ์พืชไว้ได้นาน ประหยัดพื้นที่ และแรงงาน นอกจากนี้ยังมีความสะดวกต่อการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชกับต่างประเทศ เพราะอยู่ในขวดเพาะเลี้ยง และปราศจากเชื้อโรค
5. การปรับปรุงพันธุ์พืช เป็นการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาประยุกต์ใช้ เช่น การสร้างพืชโครโมโซมชุดเดียว การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ การรวมเซลล์พืช และพันธุวิศวกรรมของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาวิจัยด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของวานิลานั้น George และ Ravishankar (1997) ได้ทำการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลา สกุล *V. planifolia* ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดยอดจำนนวนมาก จากนั้นย้ายยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหาร ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2-3 อาทิตย์ แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยวิธีนี้ยอดหนึ่งยอดสามารถเพิ่มเป็น 42 ยอด ในเวลา 134 วัน

Geetha และ Shetty (2000) ได้ทำการทดลองเลี้ยงปลายยอด และบริเวณตาข้างวานิลา สกุล *V. planifolia* ในอาหารสูตร คือ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 สัปดาห์ แล้วย้ายไปในอาหารใหม่ทุกๆ 4 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มของเซลล์ที่พัฒนาขึ้น แล้วย้ายลงมาพาะเลี้ยงในอาหาร สูตร N69 ที่ประกอบด้วย BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ d-biotin 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร folic acid 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดการยืดตัวของยอด และการเกิดราก หลังจากนั้นทำการตัดยอดที่มีขนาด 7-8 เซนติเมตร แล้วย้ายในอาหารสูตรเดิม ทุกๆ 2-3 สัปดาห์

Giridhar และคณะ (2002) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงปลายยอดของวานิลา สกุล *V. planifolia* ในอาหารสูตร ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ PAA สามารถชักนำการเกิดยอดใหม่ที่เกิดจากตาได้เป็นผลสำเร็จ และสามารถชักนำให้เกดเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ได้

ที่พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี ได้มีการรวบรวมวานิลาสายพันธุ์ป่าที่พบในประเทศไทยไว้ 5 สายพันธุ์ ซึ่งจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกัน เช่นการออกดอกขนาดของฝัก ตลอดจนการเพาะเลี้ยง

วานิลาเป็นไม้ที่มีสารหอมระเหยที่สามารถนำสารสกัดมาใช้ในการทำอาหาร อุตสาหกรรมยาและสารหอมระเหยได้ ซึ่งประเทศไทยต้องมีการนำเข้าสารสกัดวานิลาเป็นจำนวนมากในแต่ละปี จึงน่าจะมีการศึกษาหาสายพันธุ์ทั้งวานิลาสายพันธุ์ป่า สายพันธุ์ที่เป็นการค้า เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ผลผลิตทั้งปริมาณและคุณภาพ ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม การเพาะปลูกพืชส่วนใหญ่มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ รวมทั้งวานิลา (Vanilla) ซึ่งเป็นพืชที่จัดอยู่ในตระกูลกล้วยไม้ที่มีสารหอมระเหยที่สามารถนำสารสกัดมาใช้ในการทำอาหาร อุตสาหกรรมยาและสารหอมระเหยได้ ซึ่งประเทศไทยต้องมีการนำเข้าสารสกัดวานิลาเป็นจำนวนมากในแต่ละปี จึงน่าจะมีการศึกษาหาสายพันธุ์ทั้งวานิลาสายพันธุ์ป่า สายพันธุ์ที่เป็นการค้า รวมทั้งพันธุ์ลูกผสมจากการผสมพันธุ์ข้ามเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ผลผลิตทั้งปริมาณและคุณภาพ แต่การศึกษาโดยอาศัยความรู้ทางด้านสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาอาจให้ข้อแตกต่างของแต่ละชนิดไม่ชัดเจน รวมทั้งต้องใช้ระยะเวลานานในกรณีการศึกษาจากพันธุ์ลูกผสม รวมทั้งต้องใช้ผู้ที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประสบการณ์และเชี่ยวชาญพิเศษ จึงควรมีการการคัดเลือกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของวานิลา ทั้งเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ลูกผสมวานิลาสายพันธุ์ใหม่ๆ

ดังนั้นประเทศไทยนอกจากจะมีการนำเข้าสารสกัดวานิลินเป็นจำนวนมากในแต่ละปีแล้ว จึงน่าจะมีการอนุรักษ์วนิลาสายพันธุ์ป่าที่พบในประเทศไทยไม่ให้สูญพันธุ์ไปในอนาคตเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม และน่าจะมีการปรับปรุงสายพันธุ์ลูกผสมขึ้นมาเพื่อประโยชน์ต่อการให้ผลผลิตทั้งปริมาณและคุณภาพ ตลอดจนการนำไปสู่การสกัดสารวานิลินใช้เองภายในประเทศต่อไป สำหรับในประเทศไทยได้มีการค้นคว้าวิจัยถึงเทคนิคและวิธีการปลูกวานิลาในแหล่งต่าง ๆ ทางภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคตะวันออกของประเทศ เพื่อให้ได้ผลผลิตสูง จึงควรจะสนับสนุนการศึกษาวานิลาสายพันธุ์ป่าที่พบในประเทศไทยและศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ลูกผสมที่ให้ผลผลิตสูงทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพ ซึ่งจะเป็นการสามารถลดการนำเข้าของน้ำมันหอมระเหยจากต่างประเทศได้

วิธีการดำเนินการวิจัย

สถานที่ทำการทดลอง

พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี

คณะเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การศึกษาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการออกดอกแต่ละสายพันธุ์

ทำการศึกษาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การขยายพันธุ์ และการออกดอกและฝักของวนิลาแต่ละสายพันธุ์ โดยศึกษาทางด้านอุณหภูมิและความชื้นในอากาศที่เหมาะสม ตลอดจนทำการศึกษาด้านการเกิดโรคและแมลงศัตรูของวนิลา โดยทำการวัดอุณหภูมิและความชื้นเปรียบเทียบ วนิลาแต่ละสายพันธุ์ที่ปลูกในโรงเรือน และภายนอกโรงเรือน และการดูแล การให้ปุ๋ย การกำจัดแมลง การควบคุมโรคโดยชีววิธี ในวนิลาทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ *Vanilla planifolia, V. siamensis, V. pilifera* , *V. albida* และ *V. aphylla* สังเกตการเจริญเติบโต จำนวนสายพันธุ์ละประมาณ 100 ต้น การขยายพันธุ์และการออกดอกตามธรรมชาติ การศึกษาการออกดอกโดยทำการทดลองวนิลาจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Vanilla planifolia, V. siamensis, V. pilifera* , *V. albida* และ *V. aphylla* ที่พระตำหนักสวนปทุม ในสภาพภายในโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิ และสภาพภายนอกโรงเรือน ศึกษาการออกดอก ลักษณะของดอก และความเป็นไปได้ของการผสมข้ามสายพันธุ์ที่ออกดอก สังเกตการเจริญเติบโตจนเป็นฝักแก่ และนำมาขยายพันธุ์ดูลักษณะต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาความต้องการและการตอบสนองของปุ๋ยเคมีและดินปลูกที่เหมาะสม

โดยทำการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 4 ซ้ำ มี factor มีการใช้ปุ๋ยเคมีร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ อัตรา 1:1 โดยนำหนัก ปุ๋ยเคมีที่ใช้ได้แก่ 15-15-15 และ 8-24-24 มีจำนวนวานิลา 5 ต้นต่อ treatment จำนวน 4 ซ้ำ รวม 240 ต้น ทำการควบคุมโรคโดยใช้ไม่ใช้สารเคมี โดยนำจุลินทรีย์ป้องกันกำจัดโรคพืช (คีโตเมี่ยม) อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และใช้ป้องกันกำจัดแมลงโดยฉีดพ่นสารสกัดสะเดา อัตรา 100 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร และเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตด้านลำต้น การออกดอก และการติดฝักวานิลา เพื่อเป็นข้อมูลในการทดลองต่อไป

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์วานิลา

ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ โดยทำการบันทึกข้อมูลกายวิภาค แหล่งที่มาของสายพันธุ์อย่างชัดเจน รวมทั้งเก็บรวบรวมสายพันธุ์ลูกผสมต่างๆที่ทำขึ้นก่อนหน้านี้

นำตัวอย่างใบอ่อนที่เก็บมาได้มาทำความสะอาดด้วยสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ให้สะอาด จากนั้นมาบดให้ละเอียดในที่เติมไนโตรเจนเหลว นำผงละเอียดที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอซึ่งมี 2 วิธี คือ การใช้กระดาษสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอ (เพื่อสะดวกในการเก็บตัวอย่างในอนาคต) และโดยการใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit ของ Qiagen

ในกรณีใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit ของ Qiagen จะนำผงที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 100 มิลลิกรัม เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และสารละลาย RNase ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการ vortex จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการกลับหลอดไปมาเบาๆทุก 2-3 นาทีเพื่อให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP2 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร และนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายที่ได้ลงในคอลัมน์สีม่วง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรและเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP3/E ปริมาตร 675 ไมโครลิตร ดูดสารละลายที่ผสมแล้วปริมาตร 650 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์สีขาวนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที (ทำซ้ำอีกครั้ง) จากนั้นย้ายคอลัมน์สีขาว ใส่ลงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตรที่มาพร้อมกับชุดสกัดดีเอ็นเอ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AW ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AW ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงไปอีกครั้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ตามด้วยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำคอลัมน์ออกจากหลอดทดลอง โดยส่วนใสที่อยู่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้ นำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตรและการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซีส

ในกรณีใช้กระดาษสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอ นำผงที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการ vortex จากนั้นนำไปหยดลงบนกระดาษ ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรือบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สามารถเจาะกระดาษขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตรนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้เลย ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสกัดดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อทำการศึกษาในบริเวณ Internal Transcribed Spacer region (ITS) โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆ ตาม White และคณะ (1990) และทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าว โดยการเติมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในการทำ PCR ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ด้วยเครื่อง DNA thermal cycle โดยใช้สภาวะดังนี้คือ Initial Denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1.5 นาที Annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และ Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ทั้ง 3 สภาวะใช้จำนวนรอบ 35 รอบ และ Final Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หรือตามสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส โดยเทียบจากแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด และส่งผลิตภัณฑ์ PCR เพื่อหาการเรียงตัวของลำดับเบส นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเพื่อหาความสัมพันธ์ของลำดับเบส ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของปฏิกิริยาระหว่างการสกัดดีเอ็นเอแบบใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปและการใช้กระดาษสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

การศึกษาด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

การตัดผลผลิต PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP) โดยการนำผลผลิต PCR ในบริเวณ ITS ที่ได้ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่นำมาใช้ในการศึกษาขึ้นกับไพรเมอร์และผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา เช่น ในกรณีใช้ ไพรเมอร์ชนิด ITS1 และ ITS4 จะมีตำแหน่งในการตัดของเอนไซม์ *Hind*III, *Hae*III, *Sma*I และ *Bam*HI ซึ่งเป็นทั้งที่มีและไม่มีจุดตัดบริเวณตำแหน่งดังกล่าว โดยนำผลผลิต PCR ที่ทราบปริมาณความเข้มข้นใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 10XRE Buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร Bovine Serum Albumin ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร ผสมให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิตามที่กำหนดของเอนไซม์แต่ละชนิด เป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาโดยนำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
83910

10 นาที จากนั้นตรวจผลที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส นำมาวิเคราะห์จัดกลุ่ม พร้อมกับเปรียบเทียบผลกับการแบ่งกลุ่มโดยใช้ลำดับเบส

การศึกษาด้วยเทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนเช่นเดียวเทคนิค PCR-RFLP นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณเช่นเดียวกัน แต่จะเป็นในตำแหน่งต่างโดยใช้ชุดของไพรเมอร์ชนิดต่างๆ ที่มีลำดับเบส 10 เบส แทน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ที่จะให้แถบที่แยกชัดเจน นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส โดยเทียบจากแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด และนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเพื่อหาความสัมพันธ์ของแถบที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่าง

นำผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการหาการหาลำดับเบส (Sequencing) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่แล้วของ gene bank เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับที่มีอยู่แล้ว โดยอาศัยตำแหน่งของจุดตัดจากเทคนิค PCR-RFLP ร่วมด้วย สำหรับเทคนิคRAPD ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบแถบที่เกิดขึ้น บันทึกผลในแต่ละตัวอย่างและในแต่ละไพรเมอร์ที่ใช้ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เป็นรายคู่แบบ UPGMA (The unweighted pair group method with arithmetic mean)

การศึกษาวิธีการสกัดและหาปริมาณของสารวานิลินจากฝักวานิลาแต่ละชนิด

การสกัดและแยกสารวานิลิน ศึกษาวิธีการสกัดสารวานิลินจากฝักวานิลาแต่ละชนิดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ปริมาณสารวานิลินในปริมาณสูงสุด ทำการแยกสารวานิลินโดยวิธีทางโครมาโทรกราฟฟีและวิธีการสกัดแยก หรือวิธีการตกผลึก พิสูจน์ยืนยันโครงสร้างทางสเปกโตรสโคปี และหาปริมาณสารวานิลิน เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการได้สารสกัดจากขั้นตอนการสกัดแล้ว นำสารสกัดดังกล่าวไปหาปริมาณสารวนิลินโดยใช้เครื่อง HPLC ศึกษาวิธีและพัฒนาการสกัดแยกสารวานิลินที่เหมาะสมในการแยกในปริมาณมาก

ทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการเจริญเติบโตของตาข้างของวานิลาเพื่อชักนำให้เจริญเติบโตเป็นต้นใหม่

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ดัดแปลงที่มีการเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 8 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ BA และ IBA โดยมีความเข้มข้น 0.5-3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1) ทำการปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 5.8 ก่อนนำเข้าเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบใช้ความดัน ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนตาข้าง ของ *V. planifolia* และ *V. pilifera* ล้างทำความสะอาด นำไปแช่แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกภายนอกออกเป็นเวลา 1-2 นาที ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ โดยใช้ความเข้มข้นคลอรอกซ์ร้อยละ 30-40 ที่มีการเติม Tween-20 ผสมให้เข้ากันและแช่ตลอด 30 นาที นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากนั้นทำการล้างชิ้นส่วนเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้งๆ ละ 4-6 นาที นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อวางบนจานแก้วที่มีทิชชูผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ พร้อมทั้งทำการตัดแต่งชิ้นส่วนเนื้อเยื่อให้เหลือเฉพาะส่วนตาข้างที่ต้องการ นำส่วนตาข้างที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง สูตรละประมาณ 5 ชิ้น สังเกตการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อวานิลาพร้อมทั้งทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์

ตารางที่ 1 สูตรอาหาร MS ดัดแปลง

สูตร	BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)
MS 1	0.5	0.5
MS 2	0.5	1
MS 3	0.5	3
MS 4	1	0.5
MS 5	1	1
MS 6	1	3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรื่อง การอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์วานิลาสายพันธุ์ป่าในประเทศไทย ณ พระตำหนักสวนปทุม

บทคัดย่อ

จากการทดลองอย่างต่อเนื่องพบว่าวานิลาชอบเจริญในที่แสงแดดรำไร ปริมาณความเข้มของแสงต่ำ อุณหภูมิค่อนข้างเย็นและความชื้นในอากาศต้องเหมาะสม จึงจะแตกตาดอกได้และโรคแอนแทรกโนส เป็นโรคที่ระบาดทำความเสียหายมากที่สุด ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยเฉพาะจะระบาดมากในช่วงฤดูฝนทั้งที่ปลูกวานิลาภายในและนอกโรงเรือน วานิลาที่ปลูกภายในและภายนอกโรงเรือนมีการจัดการโดยให้ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ ป้องกันแมลงศัตรูโดยฉีดสารสกัดสะเดา ควบคุมโรคแอนแทรกโนสโดยใช้ยาเชื้อจุลินทรีย์คีโตเมี่ยมชนิดผง ฉีดพ่นในวนิลาทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ *Vanilla planifolia, V. siamensis, V. pilifera , V. albida* และ *V. aphylla* (พันธุ์จากประเทศฝรั่งเศส) จากศึกษาอย่างต่อเนื่องพบว่าวนิลา 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Vanilla planifolia, V. siamensis, V. pilifea* และ *V. albida* ที่ปลูกภายในบริเวณพระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี พบว่า *V. albida* ออกดอกในช่วงธันวาคมถึงกุมภาพันธ์ปีละครั้งเดียว และพัฒนาจากดอกเป็นฝักจนกระทั่งเก็บเกี่ยวเป็นเวลา 10 เดือน

จากการทดลองศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของวานิลา 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-07, OPA-20, OPB-14, OPB-18 และ OPC-09 โดยไพรเมอร์ OPB-14 เท่านั้นที่ไม่สามารถแยกได้ และพบว่าวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia varigate* และ *V. planifolia* มีความสัมพันธ์กัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าทั้งสองสายพันธุ์มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก ไพรเมอร์ OPB-18 และ OPA-20 สามารถใช้แยก *V.siamemsis* ได้ แต่สำหรับวานิลาสายพันธุ์อื่นยังไม่สามารถจำแนกได้อย่างชัดเจน พบว่าวานิลาทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถพัฒนาส่วนตาข้างไปเป็นต้นใหม่ได้ ซึ่งต้นที่เกิดขึ้นมีสีเขียวเข้ม และสีเขียวอมเหลืองแตกต่างกันไปในแต่ละสูตรอาหาร โดยขั้นตอนมีลำดับดังภาพที่แสดง

นอกจากนี้ วานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้น 0.5+0.5, 0.5+1 และ 0.5+3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำตาข้างของวานิลาให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้ ส่วนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้น 1+0.5, 1+1 และ 1+3 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถชักนำตาข้างของวานิลาให้เป็นต้นใหม่ได้ (ตารางที่ 2) โดยอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้น 0.5+1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิจัย

การศึกษาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการออกดอกแต่ละสายพันธุ์

ทำการศึกษาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การขยายพันธุ์ และการออกดอกและฝักของวนิลาแต่ละสายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง พบว่าวานิลาชอบเจริญในที่แสงแดดรำไร ปริมาณความเข้มของแสงต่ำ อุณหภูมิค่อนข้างเย็นและความชื้นในอากาศต้องเหมาะสม จึงจะแตกตาดอกได้ จากการสำรวจโรคพบว่าโรคแอนแทรกโนส เป็นโรคที่ระบาดทำความเสียหายมากที่สุด ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สามารถเข้าทำลายและทำให้วานิลาแสดงการแผลไหม้ใบ ลำต้นและฝัก โดยเฉพาะจะระบาดมากในช่วงฤดูฝน ส่วนแมลงศัตรูที่เข้าทำลายมีน้อยมากและไม่ทำให้เกิดความเสียหาย จากการทดลองปลูกวานิลาภายในและนอกโรงเรือน ซึ่งมีอุณหภูมิและความชื้นแตกต่างกัน กล่าวคือภายในโรงเรือนมีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80 % และภายนอกโรงเรือน ซึ่งปลูกในโรงเรือนที่คลุมวัสดุพลางแสง 50 % เป็นหลังคา มีอุณหภูมิเฉลี่ย 27 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 50-70 % พบว่าวนิลาแต่ละสายพันธุ์ที่ปลูกในโรงเรือน จะเจริญเติบโตได้ดีกว่าและภายนอกโรงเรือน แต่วานิลาที่ปลูกภายในโรงเรือนก็ยังออกดอกไม่ดี เช่นเดียวกับวานิลาที่ปลูกภายนอกโรงเรือน

วานิลาที่ปลูกภายในและภายนอกโรงเรือนมีการจัดการโดยให้ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพทุกระยะ 1-2 เดือน ป้องกันแมลงศัตรูโดยฉีดสารสกัดสะเดาในอัตรา 100 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร ควบคุมโรคแอนแทรกโนสโดยใช้ยาเชื้อจุลินทรีย์คีโตเมี่ยมชนิดผง ฉีดพ่นในอัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ในวนิลาทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ *Vanilla planifolia, V. siamensis, V. pilifera* , *V. albida* และ *V. aphylla* (พันธุ์จากประเทศฝรั่งเศส) นอกจากนี้จากการสังเกตการณ์เจริญเติบโตของวานิลาทั้ง 5 สายพันธุ์ จำนวนสายพันธุ์ละ ประมาณ 100 ต้น พบว่ามีการเจริญเติบโตของลำต้น การแตกยอด ไม่แตกต่างกัน ส่วนการขยายพันธุ์ สามารถขยายพันธุ์ได้ทุกสายพันธุ์โดยการปักชำ และการออกดอกตามธรรมชาติของวนิลาจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Vanilla planifolia, V. siamensis, V. pilifera* , *V. albida* และ *V. aphylla* พบว่าจะออกดอกในช่วงเดือนธันวาคมถึงกุมภาพันธุ์ และได้ทดลองนำเกสรตัวผู้ของแต่ละสายพันธุ์ที่ได้มาผสมข้าม และผสมตัวเอง พบว่าเมื่อนำมาผสมตัวเอง (คนละต้น) สามารถติดฝักได้ดี แต่เมื่อนำมาผสมข้าม การติดฝักไม่ดีและมีปริมาณน้อย

จากการศึกษาพบว่าสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การขยายพันธุ์ และการออกดอกและฝักของวนิลาแต่ละสายพันธุ์ ค่อนข้างที่จะเจริญได้ดี ในอุณหภูมิเย็น ซึ่งได้ปรับโรงเรือน โดยใช้เครื่องปรับความเย็นที่อุณหภูมิ 20-25 องศา และให้ความชื้นในอากาศที่เหมาะสมโดยการติดตั้งระบบสปริงเก้อร์ มีผลทำให้การเจริญของวนิลาดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการสำรวจการเกิดโรคอย่างต่อเนื่อง ยังพบว่าวนิลาทุกสายพันธุ์ เกิดโรคแอนแทรกโนส ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosorioides* ซึ่งพบทั้งที่ปลูกในโรงเรือน และภายนอกโรงเรือน ในวนิลาทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ *Vanilla planifolia, V. siamensis, V. pilifera* , *V. albida* และ *V. aphylla* กล่าวได้ว่าวนิลาทั้งสี่สายพันธุ์อ่อนแอต่อการเกิดโรคแอนแทรกโนส โดยพบอาการโรคทั้งบนใบและลำต้น

จากศึกษาอย่างต่อเนื่องพบว่าการออกดอก ลักษณะของดอก และความเป็นไปได้ของการผสมข้ามสายพันธุที่ออกดอก สังเกตการเจริญเติบโตจนเป็นฝักแก่ และนำมาขยายพันธุ์คูลักษณะต่างๆ จากการศึกษาพบว่า วนิลา 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Vanilla planifolia, V. siamensis, V. pilifea* และ *V. albida* ที่ปลูกภายในบริเวณพระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี พบว่า *V. albida* ออกดอกในช่วงธันวาคมถึงกุมภาพันธ์ปีละครั้งเดียว และพัฒนาจากดอกเป็นฝักจนกระทั่งเก็บเกี่ยวเป็นเวลา 10 เดือน

การศึกษาการออกดอกของวนิลาแต่ละสายพันธุ์

จากการสำรวจ เก็บข้อมูลช่วงระยะเวลาในการออกดอก ของวนิลาทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่า *Vanilla albida* สายพันธุ์เดียวที่ออกดอก ในขณะที่อีก 3 สายพันธุ์ คือ *V. planifolia, V .siamensis,* และ *V. pilifera* ไม่การออกดอกเลย ซึ่ง *V. albida* สามารถออกดอกได้ในระหว่างเดือน ธันวาคม-กุมภาพันธ์ โดยออกดอกปีละหนึ่งครั้ง แต่ส่วนใหญ่ออกดอกในเดือน มกราคม 2546 และพัฒนาเป็นฝักแก่ในเดือนพฤศจิกายน ใช้เวลาในการพัฒนาจากดอกจนกระทั่งเป็นฝักที่เก็บเกี่ยวได้ประมาณ 10 เดือน เดือนมกราคม พบการออกดอกของ *V.albida* สำหรับวานิลาฝักลูกผสม ได้นำไปพยายามหาวิธีการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และนำไปวิเคราะห์หาสารวานิลา

การศึกษาความต้องการและการตอบสนองของปุ๋ยเคมีและดินปลูกที่เหมาะสม

จากการทดลองพบว่าวนิลาทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *Vanilla albida, V. planifolia, V .siamensis,* และ *V. pilifera* เจริญได้ดีในดินร่วนปนทราย และตอบสนองต่อปุ๋ยเคมี ทั้งสองสูตร โดยทำให้วานิลามีการเจริญเติบโต ดีกว่า วนิลาที่ไม่ใช้ปุ๋ยเคมีดังกล่าว โดยใช้ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ ทำให้การเจริญเติบโตดีขึ้น

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์วานิลา

ใบวานิลาสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง *V. planifolia,* (2) *V.pilifera,* (3) *V.* siamensis, (4) *V. albida,* (5) *V.aphylla,* (6) *V. planifolia variegate* (รูปที่ 9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองเพื่อศึกษาและวิเคราะห์การจำแนกสายพันธุ์ของวานิลาโดยใช้เทคนิค ITS-PCR พบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ดีเอ็นเอของตัวอย่างทั้ง 6 ตัวอย่าง เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ภายใต้สภาวะอุณหภูมิดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น เมื่อทำการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นที่ได้ด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของวานิลาทุกตัวอย่างได้ โดยมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 750 bp ผลแสดงดังรูปที่ 1 ซึ่งผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของตัวอย่างไม่สามารถแยกกลุ่มหรือใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้เนื่องจากไม่มีข้อแตกต่างของขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ

รูปที่ 1. แสดงขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ของตัวอย่างทั้ง 6 ตัวอย่าง โดย M คือ marker ขนาด 100 bp

จากการทดลองนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อหาลำดับเบส และนำมาหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (phylogenetic relationship) โดยใช้ *Juncus scirpoides* (AY727821 และ AY727827), *Erycina hyalinobulbon* (AF350536), *Eriaxis rigida* (AF135201), *Epistephim subrepens* (AF135200) เป็น outgroup และใช้ *V.aphylla* (AF151006), *V.hersuta* และ *V.planifolia* (AF391786, AF030049, VPU66819) เป็น ingroup ดังรูปที่ 7 ซึ่งสามารถแบ่งตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ของ *V. siamemsis* (VS), *V. aphylla* (VAL และ VAS) และ *V.aphylla* (AF151006) ซึ่งพบว่า *V. aphylla* ทั้ง 2 ลักษณะคือที่มีลักษณะลำต้นใหญ่ (VAL) และลำต้นเล็ก (VAS) อาจเป็นชนิดเดียวกันแต่ลำต้นแตกต่างกันขึ้นกับสภาวะแวดล้อม หรืออาจเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้กัน และอาจกล่าวได้ว่า *V. siamemsis* มีความใกล้ชิดกันกับ *V. aphylla* ดังนั้นจึงอาจใช้เพื่อการสร้างลูกผสมได้ และอีกกลุ่มหนึ่งคือ *V.hersuta* และ *V.planifolia*

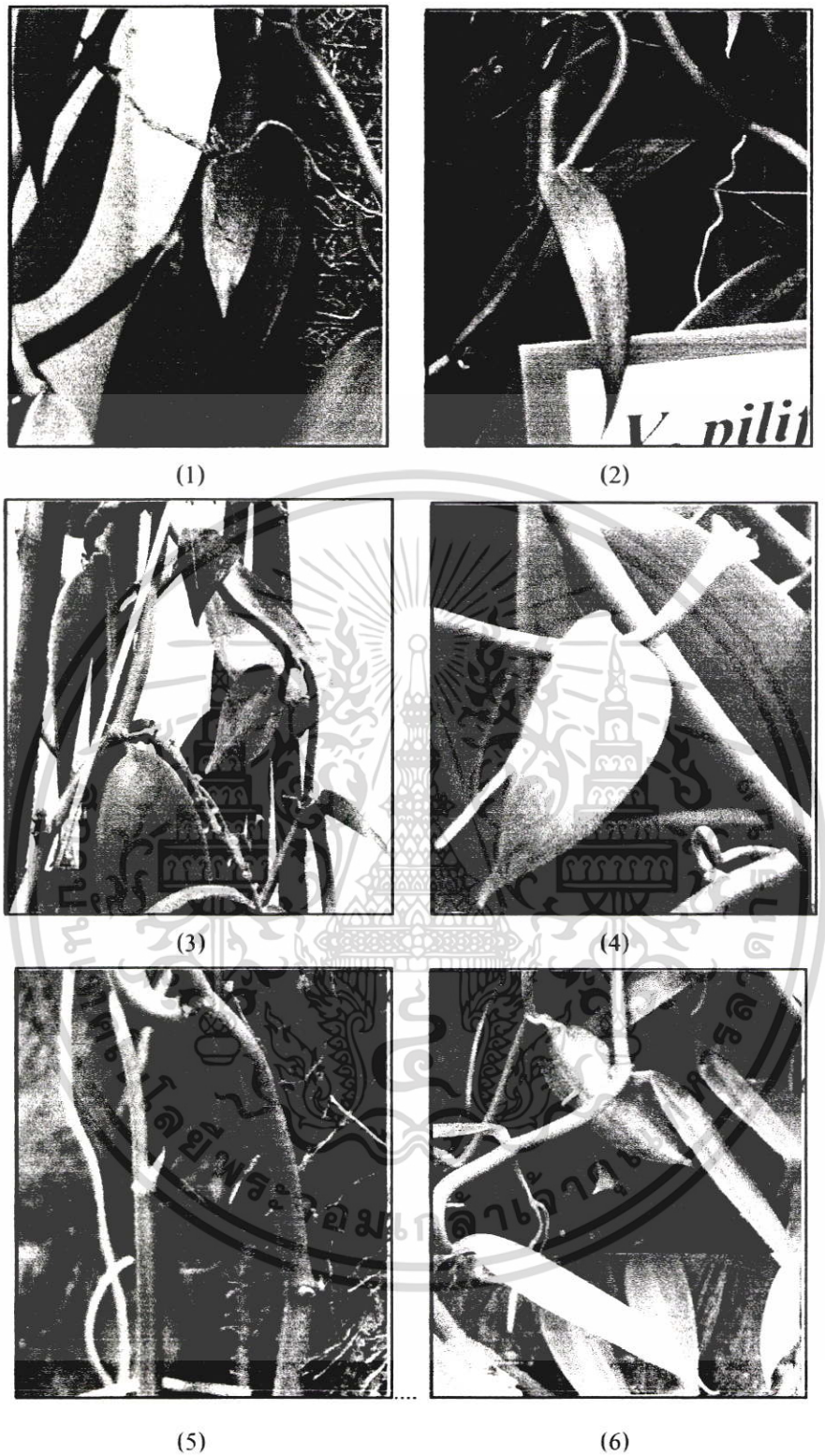
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(AF391786, AF030049, VPU66819) ซึ่งพบว่า*V. planifolia* จาก 2 แหล่งคือจากพระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี (VPLA1) และจากภาคใต้ของไทย (VPLA2) มีความใกล้ชิดกันมาก รวมทั้ง *V. pilifera* (VPIL) รวมทั้ง *V.planifolia* ที่ใช้เป็น ingroup แต่อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ที่ใช้ศึกษาจะมีความใกล้ชิดกับ *V.planifolia* (AF391786) มากกว่า *V.planifolia* (AF030049, VPU66819)

การทดลองเพื่อศึกษาและวิเคราะห์การจำแนกสายพันธุ์ของวานิลาโดยใช้เทคนิค RAPD

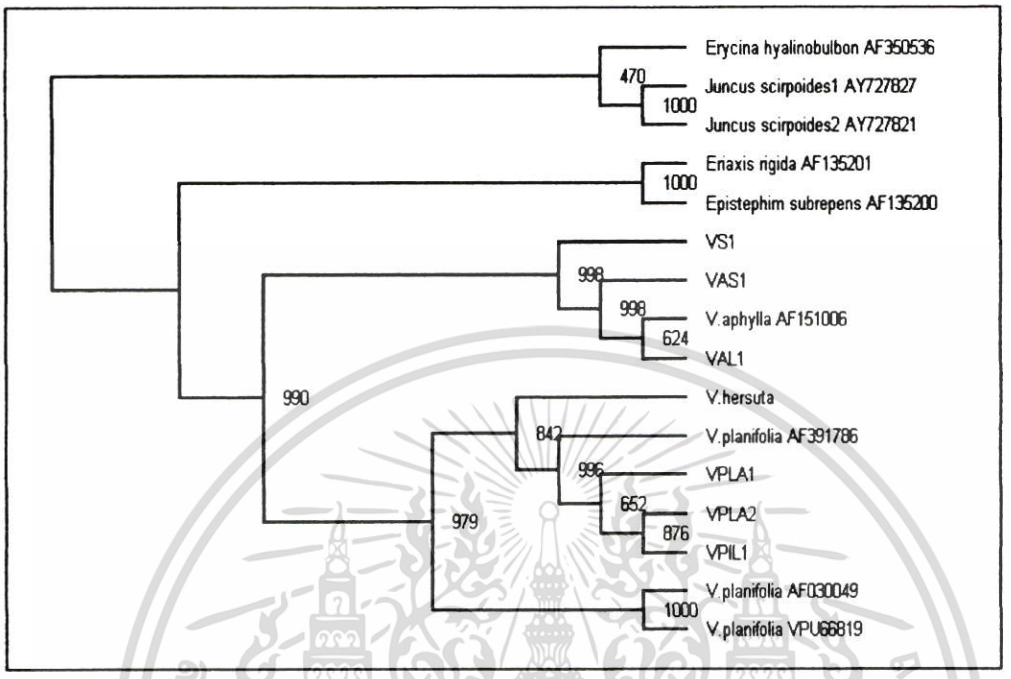
หลังจากการสกัดดีเอ็นเอออกจากใบของวานิลาทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่บางสายพันธุ์มีลักษณะทางกายภาพไม่แตกต่างกัน จึงใช้เทคนิคระดับโมเลกุลช่วยในการจัดจำแนกสายพันธุ์ ไพรเมอร์ชนิด OPA-07 เกิดแถบ 2 สายพันธุ์คือ *V. planifolia* (VPLA5)และ *V.planifolia varigata* (VVAR1) โดยแถบ VVAR 1 มีความคล้ายคลึงกับ VPLA 5 (รูปที่ 2) ไพรเมอร์ OPA-20 เกิดแถบ 4 สายพันธุ์ของ *V. planifolia* (VPLA5), *V. pilifera* (VPIL2), *V. siamemsis* (VS2) และ *V.planifolia varigata* (VVAR1) และไม่เกิดแถบ 2 สายพันธุ์ของ *V.albida* (VALB2) และ *V.aphylla* (VA1) โดยแถบที่เกิดขึ้นในแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกัน และแถบของสายพันธุ์ VPLA 5 และ VVAR 1 มีลักษณะบางส่วนคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 3) และเมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-14 ไม่เกิดแถบทั้ง 6 สายพันธุ์ (รูปที่ 4) สำหรับไพรเมอร์ OPB-18 เกิดแถบ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. planifolia* (VPLA5), *V.siamemsis* (VS2) และ *V.planifolia varigate* (VVAR1) โดย VS2 ให้แถบที่แตกต่างจากสายพันธุ์อื่น และแถบของ VPLA5 และ VVAR1 มีลักษณะบางส่วนคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 5) และไพรเมอร์ OPC-09 เกิดแถบความคล้ายคลึง 4 สายพันธุ์ และไม่เกิดแถบ 2 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่เกิดแถบคือ *V. planifolia* (VPLA5), *V. pilifera* (VPIL2), *V. siamemsis* (VS2) และ*V.planifolia varigate* (VVAR1) และไม่เกิดแถบ คือ *V.albida* (VALB2) และ *V.aphylla* (VA1) โดย VPLA5, VPIL2 และ VS2 มีแถบที่เหมือนกัน (รูปที่ 6) และจากการใช้ไพร์เมอร์ 5 ชนิด อาจกล่าวได้ว่า ไพรเมอร์ OPB-18 และ OPA-20 สามารถใช้แยก *V.siamemsis* ได้ และ *V. planifolia* และ *V.planifolia varigate* น่าจะมีความใกล้ชิดกันเนื่องจากมีแถบเกิดขึ้นคล้ายๆกันในหลายไพรเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9. ใบวานิลาสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง(1) *V. planifolia,* (2) *V.pilifera,* (3) *V. siamensis,* (4) *V. albida,* (5) *V.aphylla*, (6) *V. planifolia variegate*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



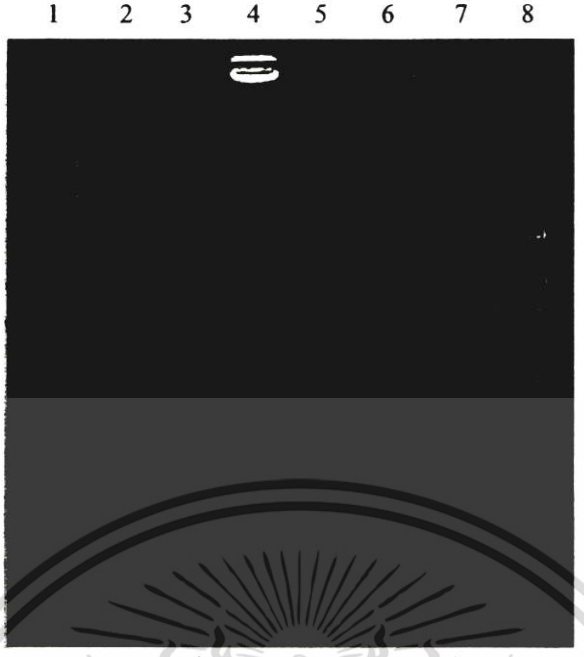
รูปที่ 3. แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4. เทคนิค RAPD คัดแยกสายพันธุ์วานิลา โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-07 ช่อง (1) 100 bp DNA,Ladder, (2) VPLA 5, (3) VPIL 2, (4) VS 2, (5) VALB 2, (6) VA 1, (7) VVAR 1, (8) 50 bp DNA Ladder

รูปที่ 5. เทคนิค RAPD คัดแยกสายพันธุ์วานิลา โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-20 ช่อง (1) 100 bp DNA, Ladder, (2) VPLA 5, (3) VPIL 2, (4) VS 2, (5) VALB 2, (6) VA 1, (7) VVAR 1, (8) 50 bp DNA Ladder

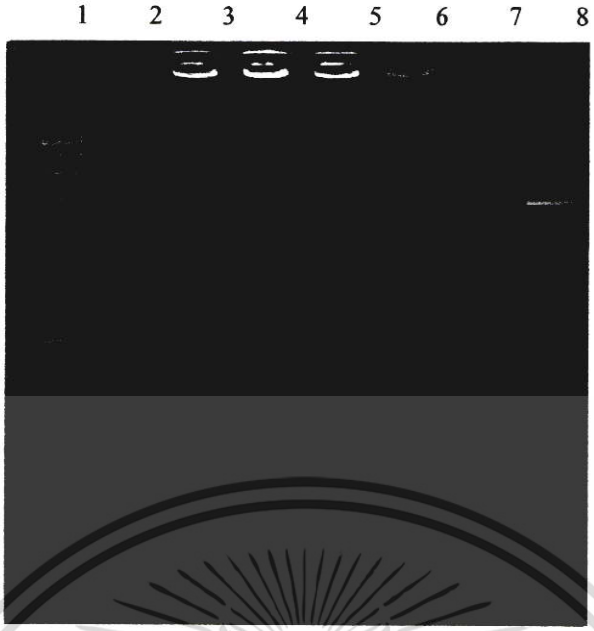
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6. เทคนิค RAPD คัดแยกสายพันธุ์วานิลา โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-14 ช่อง (1) 100 bp DNA, Ladder, (2) VPLA 5, (3) VPIL 2, (4) VS 2, (5) VALB 2, (6) VA 1, (7) VVAR 1, (8) 50 bp DNA Ladder

รูปที่ 7. เทคนิค RAPD คัดแยกสายพันธุ์วานิลา โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-18 ช่อง (1) 100 bp DNA, Ladder, (2) VPLA 5, (3) VPIL 2, (4) VS 2, (5) VALB 2, (6) VA 1, (7) VVAR 1, (8) 50 bp DNA Ladder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8. เทคนิค RAPD คัดแยกสายพันธุ์วานิลา โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-09 ช่อง (1) 100 bp DNA,Ladder, (2) VPLA 5, (3) VPIL 2, (4) VS 2, (5) VALB 2, (6) VA 1, (7) VVAR 1, (8) 50 bp DNA Ladder

จากการศึกษาทำการจำแนกวานิลาสายพันธุ์ต่างๆ ออกจากกัน ด้วยเทคนิค ITS-PCR โดยทำการศึกษาจำนวน 6 ตัวอย่าง เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสโดยใช้ Universal primer ITS1 และ ITS4 พบชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 750 bp ซึ่งผลที่ได้ยังไม่สามารถจำแนกตัวอย่างออกจากกันได้ตามขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ จึงทำการศึกษาต่อด้วยการหาลำดับเบส (DNA sequencing) และเมื่อนำลำดับเบสที่ได้ ผลที่ได้พบว่าสามารถแยกตัวอย่างออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดย *V.aphylla* และ *V. siamensis* มีความใกล้ชิดกว่า *V. planifolia*

การศึกษาวิธีการสกัดและหาปริมาณของสารวานิลินจากฝักวนิลา

ศึกษาวิธีการสกัดสารวานิลินจากฝักวานิลา ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ปริมาณสารวานิลินในปริมาณสูงสุด และวิธีการแยกสารวานิลินโดยวิธีทางโครมาโทรกราฟฟีและวิธีการสกัดแยก พิสูจน์ยืนยันโครงสร้างทางสเปกโตรสโคปี และหาปริมาณสารวานิลิน

การสกัดสารวานิลินในเชิงอุตสาหกรรม กำลังอยู่ในระหว่างการวิจัยเนื่องจากต้องรอให้มีปริมาณฝักวนิลาให้มีจำนวนมากพอก่อน จึงจะสามารถพัฒนาการสกัดแยกสารวานิลินที่เหมาะสมในการแยกในปริมาณมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการเจริญเติบโตของตาข้างของวานิลา เพื่อชักนำให้เจริญเติบโตเป็นต้นใหม่

โดยทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อส่วนตาข้างของวานิลาจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *V. planifolia* และ *V. pilifera* และคำนวณอัตราการเจริญเป็นต้นใหม่ พร้อมทั้งนำผลที่ได้ของการเพาะเลี้ยงในแต่ละสูตรอาหารมาเปรียบเทียบเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้ โดยทำการทดลองเปรียบเทียบอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA และ IBA แตกต่างกัน 6 สูตร ได้แก่ 0.5+0.5, 0.5+1, 0.5+3, 1+0.5, 1+1, 1+3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่าวานิลาทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถพัฒนาส่วนตาข้างไปเป็นต้นใหม่ได้ ซึ่งต้นที่เกิดขึ้นมีสีเขียวเข้ม และสีเขียวอมเหลืองแตกต่างกันไปในแต่ละสูตรอาหาร โดยขั้นตอนมีลำดับดังภาพที่แสดง

วานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้น 0.5+0.5, 0.5+1 และ 0.5+3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำตาข้างของวานิลาให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้ ส่วนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้น 1+0.5, 1+1 และ 1+3 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถชักนำตาข้างของวานิลาให้เป็นต้นใหม่ได้ (ตารางที่ 2) โดยอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้น 0.5+1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุด

วานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่ทำการเพาะเลี้ยงมีเฉพาะเพียงอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้น 1+1 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้นที่สามารถชักนำตาข้างให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนและร้อยละตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่พัฒนาไปเป็นลักษณะต่างๆบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ IBA ทั้ง 6 สูตร

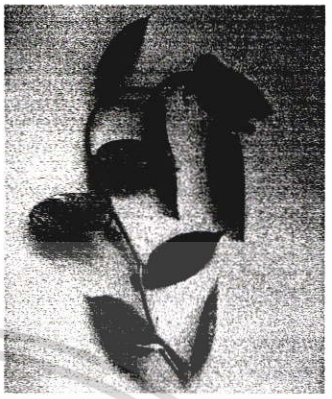
สูตรอาหาร	จำนวนตาข้างเริ่มต้น	จำนวนตาที่เป็นตุ่มในระยะเวลา 1 เดือน (เปอร์เซนต์)	จำนวนตาที่เป็นตุ่มในระยะเวลา 3 เดือน (เปอร์เซนต์)	จำนวนตาที่เป็นต้นในระยะเวลา 4 เดือน (เปอร์เซนต์)
MS 1	5	2 (40)	3 (60)	1 (20)
MS 2	3	2 (66.7)	1 (33.33)	2 (66.7)
MS 3	4	2 (66.7)	1 (25)	2 (50)
MS 4	4	- (0)	3 (75)	- (0)
MS 5	3	- (0)	2 (66.7)	- (0)
MS 6	2	1 (50)	- (0)	- (0)

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนและร้อยละตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่พัฒนาไปเป็นลักษณะต่างๆบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ IBA ทั้ง 6 สูตร

สูตรอาหาร	จำนวนตาข้างเริ่มต้น	จำนวนตาที่เป็นตุ่มในระยะเวลา 1 เดือน (เปอร์เซนต์)	จำนวนตาที่เป็นตุ่มในระยะเวลา 3 เดือน (เปอร์เซนต์)	จำนวนตาที่เป็นต้นในระยะเวลา 4 เดือน (เปอร์เซนต์)
MS 1	5	- (0)	2 (40)	- (0)
MS 2	5	- (0)	2 (40)	- (0)
MS 3	5	- (0)	2 (40)	- (0)
MS 4	3	- (0)	- (0)	- (0)
MS 5	4	- (0)	2 (50)	1 (25)
MS 6	3	- (0)	- (0)	- (0)

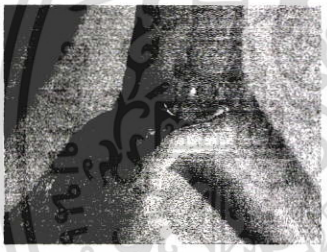
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลา



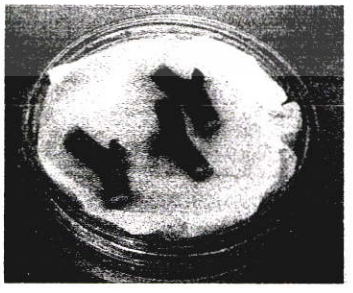
ต้นวานิลา

ตัดกิ่งออกจากต้น



ตัดบริเวณระหว่างตาข้าง

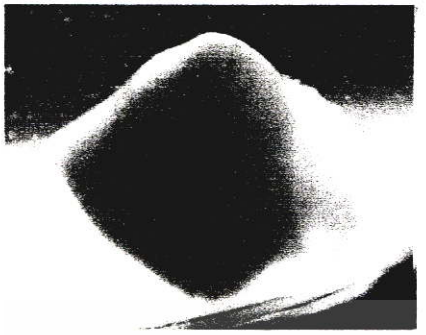
ฟอกฆ่าเชื้อ



ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

ซับน้ำให้แห้งบนกระดาษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ตัดบริเวณตาข้างออกมาเพาะเลี้ยง

การพัฒนาของตาข้างระยะเวลา 1 เดือน

พัฒนาของตาข้างระยะเวลา 2 เดือน

การพัฒนาของตาข้างระยะเวลา 3 เดือน

การพัฒนาของตาข้าง

ระยะเวลา 4-5 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2548. **เทคโนโลยีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เต็ม สมิตินันทน์. 2523. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ฟันนี่พับลิชชิ่ง.

วราวุธ ชูธรรมธัช. 2536. **วนิลา**. ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร กรมวิชาการเกษตร.

แสงมณี ชิงดวง, เอี่ยน ศิลาน้อย, ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกสาร, สมถวิล ศศิผลิน และเสริมศักดิ์ รักธรรม. 2536. "โรคเน่าดำของวานิลา." **เคหการเกษตร**. 17(5) : 170-172.

แสงมณี ชิงดวง, ประเสริฐ เคร่งเปี่ยม และสุชาติ วิจิตรานนท์. 2540. "ผลของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่มีผลต่อเชื้อรา *Phytophthora parasitica* และ *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าดำของวานิลา." **วารสารโรคพืช** 12(-) : 13-25.

อบฉันท์ ไทยทอง. 2543. **กล้วยไม้เมืองไทย**. กรุงเทพฯ : อมรินทร์พิ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

Bhai, R.S. and Thomas, J. 2000. "Phytophthora Rot a New Disease of Vanilla (*Vanilla phanifolia* Andr.) in India." **Journal of Spices and Aromatic Crops**. 9(1) : 73-75.

Comber, J.B. 1990. **Orchids of Java**. Bangkok : Charoen Slip Press.

Divakaran, M., Babu, K.N. and Peter, K.V. 2006. "Conservation of *Vanilla* species, in vitro." **Scientia Horticulturae**. 110(2) : 175-180.

Geetha , S. and Shetty S.A. 2000. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia* , a tropical orchid. *Current Science*. 79 (6): 886 – 889.

George, F.N. 1973. **Bacterial and Fungi Disease of Plants in the Tropics**. U.S.A.: University of Florida Press.

George P.S and Ravishankar G.A. 1997. In vitro multiplication of Vanilla planifolia axillary bud explants. Plant cell report. 16: 490-494.

Giridhar P.,Ramu D.V. and Ravishankar G.A. 2002. Plenyl acetic acid-induced *in vitro* shoot multiplication of vanilla planifolia. Tropical Science. 43(2): 92-95.

Hawkes, A.D. 1965. **Encyclopaedia of Cultivated Orchids**. London : Faber and Faber Limited.

Havkin-Frenkel, D., Podstolski, A. and Knorr, D. 1996. "Effect of light on vanillin precursors formation by in vitro cultures of *Vanilla planifolia*." **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 45(2) : 133-136.

Heywood, V.H. 1985. **Flowering Plants of The World**. London : Croom Helm Publishers.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

International Trade Center. 2550. List of importing countries. [online]. Available : http://www.Trademap.net.

Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Nasomjai, P., Louangsysouphanh, S., Soytong, K., Kongsaeree. P., Prabpai. S. and Suksamrarn, A. 2006. "Antifungal azaphilones from the fungus *Chaetomium cupreum* CC3003." **Journal Natural Products**. 69(6) : 891-895.

Lu, H., Zou, W.X., Meng, J.C., Hu, J. and Tan, R.X. 2000. "New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*." **Plant Science**. 151(1) : 67-73.

Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physio. Plant 15: 473 – 497.

Sasikumar, B., Rema, J. and Ravindran, P.N. 1992. "Vanilla." **Indian Cocoa, Arecanut and Species Journal**. 16(1) : 6-10.

Seidenfaden, G. and Smitinand, T. 1958. **The Orchids of Thailand**. Bangkok : The Siam Society.

Silva, G.H., Teles, H.L., Zanardi, L.M., Young, M.C., Eberlin, M.N., Hadad, R., Pfenning, L.H., Costa-Neto, C.M., Castro-Gamboa, I., Bolzani, V.da.S. and Araújo, Â.R. 2006. "Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae)." **Phytochemistry**. 67(17) : 1964-1969.

Soytong, K., Kanokmedhakul, S., Kukongviriyapan, V. and Isobe, M. 2001. "Application of *Chaetomium* species (Ketomium) as a New Broad Spectrum Biological Fungicide for Plant Disease Control: A Review Article." **Fungal Diversity**. 7(-) : 1-15.

Tombe, M., Komot, Y. and Tezuka, N. 1991. "Identification and Cultural Type of *Fusarium* isolates from Vanilla in Indonesia." **Industrial Crops Research Journal**. 6(1) : 1-5.

Waliszewski, K.N., Pardio, V.T. and Ovando, S.L. 2007. "A simple and rapid HPLC technique for vanillin determination in alcohol extract." **Food Chemistry**. 101(3) : 1059-1062.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Determination of the genetic relationship of Vanilloideae (Orchidaceae) based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA

S. Poeaim[1], A. Poeaim[1], K. Soytong[2] and W. Pongnak[2]

[1]Department of Applied Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand
[2]Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

The genetic relationship of 4 Vanilloideae (two *V. planifolia* location, one *V. pilifera*, one *V. siamemsis* and two *V. aphylla* phenotypes) from Suan-Pa-Tum palace and South of Thailand were determined based on sequence analysis of ribosomal DNA (rDNA). DNA was extracted and their genetic variability was investigated using internal transcribed spacer region (ITS) and ITS sequencing. The ITS band was not be distinguished in all of them showed the same banding pattern. However, the ITS sequence provided more information on polymorphism and a phylogenetic tree were constructed.

Key words : Vanilloideae, internal transcribed spacer region (ITS)

Introduction

The genus *Vanilla* belonging to the Orchidaceae family is consisted of 110 species, amongst which 15 are considered as aromatic. Cultivated vanilla is mainly produced from plant material belonging to the species *Vanilla planifolia* G. Jackson, Syn. *V. fragrans* (Salisb.) Ames, cultivated in humid tropical areas. Native to Mexico and Central America, but now cultivated in other parts of the tropics because it is now considered the aroma of the planet. In Thailand, the origin of *Vanilla* species is still confused, interspecific hybridization have been made to increase the variability for improve number of pod, susceptible to diseases and pests and aromatic characteristics by artificial hybrids and tissue culture technology. Recently, the genetic diversity of *V. planifolia* progenies and interspecific hybrids obtained from crosses between *V. planifolia* (female) and *V. aphylla* (male) was evaluated using amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) and random amplified polymorphic (RAPDs)(Divakaran *et al.*,2006).

Orchid phylogenetics, including the genus *Vanilla*, has been largely studied using botanical characters and allozyme marker (Nielson and Siegismund,1999; Stern and Judd, 1999) and molecular sequencing (Divakarm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

et al., 2006 and Cameron, 1996). Especially, for evaluates these interspecific hybrids to estimate and confirm the extent of hybridity using both morphological as well as molecular characterization. Nevertheless, the genetics of some *Vanilla* species suffers from a considerable lack of knowledge such as *V. siamensis*.

The nucleotide sequences of the internal transcribed spacers 1 and 2 (ITS-1 and ITS-2) from the nuclear 18S–26S ribosomal DNA (rDNA) region with repeated sequences are organized as families in tandem arrays at the nucleolar organizer regions of chromosomes in all eukaryotes. ITS are widely used in molecular phylogenetics at the species and genus levels and provide a valuable source of variable characters that can be used in phylogenetic analyses[6] such as the monophyly of *Ophrys* has been strongly supported by a study using ITS sequences (Pridgeon *et al.*, 1997), and the intrageneric relationships were discussed by Bateman *et al.* (1997). In the present study, direct DNA sequencing of ITS-PCR amplified products was used to analyze of phylogenetic relationships among lineages f of 4 *Vanilla* species in introduction areas in Thailand could be determined as a guide for future isolate selection programmes.

Materials and methods

Materials

The phenotypes used in the present study included 4 species of Vanilla that were cultivated in the Suan-Pa-Tum palace and South of Thailand. Leaf samples were included two different *V. planifolia* location (VPLA1 and VPLA2), *V. pilifera* (VPIL), *V. siamemsis* (VS) and two different *V. aphylla phenotypes* (VAL and VAS).

DNA extraction, ITS-PCR amplification and DNA sequencing

Fresh leaves (1 g per sample) were ground in liquid nitrogen and total DNA was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Germany) according to the manufacturer instructions. The approximate DNA concentration was determined using a spectrophotometer. The internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal DNA was amplificaed using the primers ITS1 (5' TCGGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') described by White *et al.*(1990). The amplification reactions were carried out in a 25 µl volume containing 50-100 ng of template DNA, 1.25mM dNTPs, 3 mM $MgCl_2$, 20 pmol of each primer,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 units of Taq DNA-polymerase and the appropriate buffer supplied by the manufacturer. Negative controls with sterile water instead of the template DNA were used for each set of experiments to test for the presence of contaminants in the reagents and reaction mixtures. PCR amplification was performed in a PTC-200 thermal cycler (MJRese arch). The PCR amplification condition consisted of an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by a sequence of 30 cycles of denaturation at 94°C for 1.5 min, annealing at 55°C for 2 min and extension at 72°C for 1 min, and a final extension step at 72°C for 10 min. Reaction tubes were held at 4°C prior to visualization of PCR products in a 1.0% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized on a UV transilluminator to assess PCR amplification. The 100 bp was used as a molecular size marker.

Data analysis

Then, sequencing was conducted by commercial sequencing units at the Bioservice Unit (BSU) National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand. Sequences were aligned and a neighbour-joining dendrogram was generated using Clustal W. The alignments were then checked, the boundaries of ITS-1 and ITS-2 were determined by comparison with other published plant sequences (ingroup and outgroup of Vanilloideae) of the variable section of the ITS region were obtained from GenBank. To assess the certainty of clades in the phylogenetic trees, the bootstrap test was performed with 1000 resembling.

Results and discussion

Determination of rDNA, the ITS1/ITS4 primers were used for PCR and sequencing. Each ITS-PCR product of the all sample was separately analyzed by agarose gel electrophoresis, and a single fragment (approximately 750 bp in length) appeared. Those samples could not be distinguished using the ITS-PCR technique as all of them showed the same banding pattern. Figure 1 shows the sizes of the fragments. These results confirm that ITS regions have limited value as markers within *Vanilla* sp. since there is not enough variation at that level. The nucleotide sequence of the fragment was determined, and we found that they were comprised of a partial sequence of the 26S rRNA gene, the ITS region, and a partial sequence of the 18S rRNA gene. The boundaries of the internal transcribed spacers (ITS1, ITS2) and nuclear rDNA coding regions in the 6 taxa (isolates) included here were determined by comparison to several published sequences. All isolates revealed similar sequences, and the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

differences were concentrated within ITS regions. When the sequence was subjected to database homology search, *Vanilla* sp. was retrieved with high scores in similarity. Molecular phylogenetic analyses based on ITS sequence demonstrated that *V. siamensis* belongs to the Vanilloideae subfamily and identical to ITS sequences of *V. aphylla.* Sequence data on the rDNA demonstrated a tremendous homology among *V. planifolia isolates* collected from distant locations. A homology dendrogram generated from the ITS sequence data demonstrated that *V. pilifera* are more closely related to various *V. planifolia* species than *V. aphylla* (Figure 2). Including, branch phenotype of *V. aphylla* are highly diverse, DNA sequences did not reflect this diversity. So, studies searching for nucleotide additivity in the ITS sequences and/or scoring of more variable DNA regions are necessary for a better understanding of the role of hybridization in the evolution of Brassicaceae (Widmer and Baltisberger,1999). So, the identical sequences among Vanilloideae could be partly due to past hybridization events.

However, to obtain a better resolution of phylogenetic relationships, it will be necessary to sequence more variable DNA regions such as the nuclear gene *Adh* or the cpDNA gene *matK* and more variable genetic markers such as AFLP and RAPD markers could be scored. Such as Divakaran *et. al.*(2006) were studied *V. aphylla*, the wild leafless species, indicated that *V. aphylla* is the most divergent from *V. planifolia* with a similarity index of only 44.4% in AFLP profiles. However, that report was successed for interspecific hybridization and production of hybrids between *V. planifolia* and *V. aphylla.* As a result, molecular technique has become widely used for the identification of genetic variation and used for genotyping in interspecific hybrid crosses which can be exploited for crop improvement in vanilla.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the ITS-PCR amplification product of *Vanilla* sp. using primers TIS1/ITS4. Lane M: DNA size marker, 100 bp ladder.

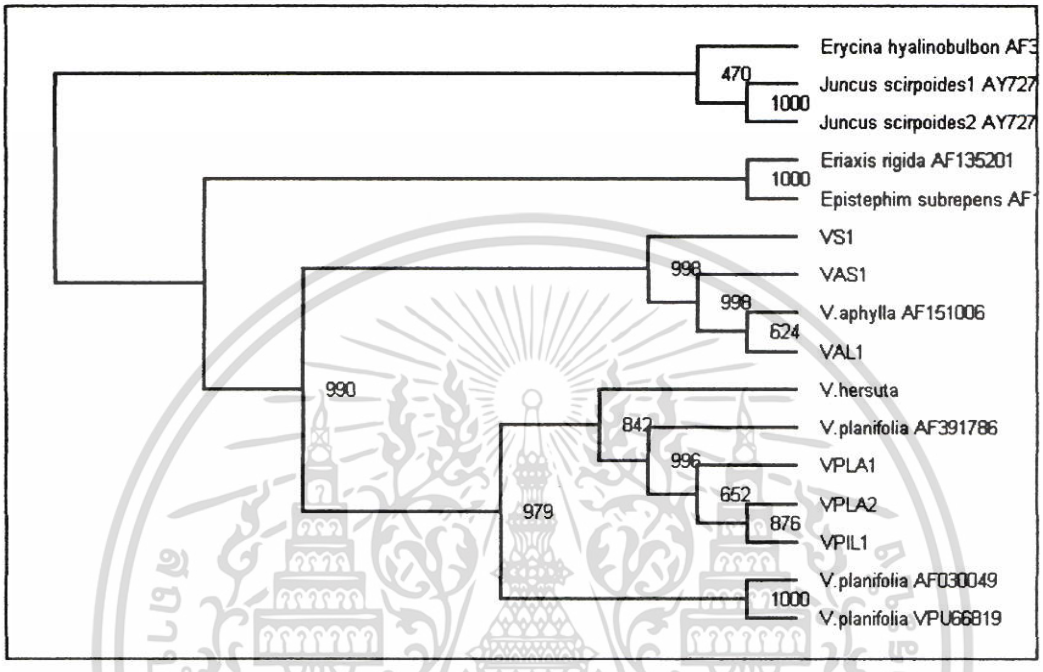


Fig. 2. Molecular phylogenetic tree for 16 sequences of ITS regions, including ITS1-5.8S-ITS2, using the neighbor-joining methods. Numbers represent percentages of 1000 bootstrap repetitions.

Acknowledgments

We thank Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn for providing us with Vanilla samples from Suan-Pa-Tum palace.

References

Divakaran, M., Babu K.N., Ravindran P.N. and Peter K.V. 2006. Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. Scientia Hort. 108: 414–422.

Nielsen L.R. and Siegismund H.R. 1999. Interspecific differentiation and hybridization in *Vanilla* species (Orchidaceae). Heredity. 83: 560–567.

Stern W.L. and Judd W.S. 1999. Comparative vegetative anatomy and systematics of *Vanilla* (Orchidaceae), Bot. J. Linn. Soc. 131: 353–382.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้