สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การจำแนกสายพันธุ์ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของวานิลา

นางสาว นฤมล ตั้งธีระสุนันท์

นางสาว ศิริพร ขุนศรี

ปพ.
น276ก
2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 72611
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550

b 11770001
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Identification and Tissue Culture of *Vanilla* spp.

Miss Narumon Tangthirasunun

Miss Siriporn Khunsri

A Special Project Submitted in Partial of the Requirement for the Degree

of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การจำแนกสายพันธุ์ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของวานิลา

นักศึกษา นางสาวนฤมล ตั้งธีระสุนันท์ รหัสประจำตัว 46050639

นางสาวศิริพร ขุนศรี รหัสประจำตัว 46050651

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี	
กรรมการ	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การจำแนกสายพันธุ์ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของวานิลา

นักศึกษา นางสาวนฤมล ตั้งธีระสุนันท์ รหัสประจำตัว 46050639

นางสาวศิริพร ขุนศรี รหัสประจำตัว 46050651

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2549

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

การจำแนกสายพันธุ์วานิลา 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. planifolia*, *V. pilifera*, *V. siamensis*, *V. albida*, *V. aphylla* และ *V. planifolia variegata* โดยใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์ 6 ชนิด คือ OPA-07, OPA-20, OPB-14, OPB-18, OPC-04 และ OPC-07 โดยทำการเปรียบเทียบความแตกต่างกับแถบดีเอ็นเอ ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สามารถจำแนกสายพันธุ์วานิลาได้

และในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของวานิลา 2 สายพันธุ์ได้แก่ *V. planifolia* และ *V. pilifera* โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA, IBA และ NAA ที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ผลการทดลองพบว่า *V. planifolia* สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ดีบนอาหารที่มีความเข้มข้นของ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับ *V. pilifera* สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ดีบนอาหารที่มีความเข้มข้นของ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Project Title	Identification and Tissue Culture of *Vanilla* spp.
Name	Miss Narumon Tangthirasunun Student ID 46050639
	Miss Siriporn Khunsri Student ID 46050651
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2006
Project Advisor	Assist. Prof. Dr. Anurug Poeaim

Abstract

Identification of Vanilla six species cultivars, *V. planifolia*, *V. pilifera*, *V. siamensis*, *V. albida*, *V. aphylla* and *V. planifolia variegata* were analyzed by using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Six primers (OPA-07, OPA-20, OPB-14, OPB-18, OPC-04 and OPC-07) were used in the RAPD analysis to identified by comparing differences in DNA banding patterns. The result of DNA fingerprints can separated vanilla species

Vanilla two species, *V. planifolia* and *V. pilifera* were cultured on MS medium supplemented vary with plant growth regulators, BA IBA and NAA. The explants from *V. planifolia* were cultured on BA 0.5 mg/l and IBA 1 mg/l that were produced the best result in regeneration. For the part of explants from *V. pilifera* were cultured on BA 3 mg/l and IBA 0.5 mg/l that were produced the best result in regeneration.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม เป็นอย่างยิ่งที่ได้ให้โอกาสในการค้นคว้า การทำวิจัย การเขียน การตรวจทาน แก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ และคำแนะนำแนวทางปรึกษาทุกๆอย่าง ไม่ว่าเป็นเรื่องใดก็ตามตลอดมา

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานคณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษที่ได้ช่วยตรวจทานแก้ไขในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติผู้ใหญ่ ด้วยความเคารพรักยิ่ง สำหรับโอกาส ความรัก คำแนะนำ กำลังใจ และความเข้าใจในการศึกษาและการทำโครงงานพิเศษ

สุดท้ายขอขอบพระคุณพี่นักวิทย์ฯ และเพื่อนทุกคนที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ ที่ให้คำปรึกษา การสนับสนุน ช่วยเหลือรวมทั้งเป็นกำลังใจในการทำการศึกษาวิจัยมาโดยตลอด รวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

นางสาวนฤมล ตั้งธีระสุนันท์

นางสาวศิริพร ขุนศรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
บทที่ 3 วัสดุ สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	37
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	44
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	59
เอกสารอ้างอิง	60
ภาคผนวก	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 การใส่ปุ๋ยวานิลา 15

2.2 ปฏิทินการผลิตวานิลา 18

3.1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ 6 ชนิดที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ 39

3.2 ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR 41

3.3 ปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนของเทคนิค RAPD 41

3.4 สูตรอาหาร MS ดัดแปลง 43

4.1 แสดงจำนวนตาของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่พัฒนาไปเป็นลักษณะต่างๆ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.5+0.5, 0.5+1, 1+0.5, 1+1, 3+0.5 และ 3+1 มิลลิกรัมต่อลิตร 49

4.2 แสดงร้อยละการเริ่มเจริญเป็นตุ่ม การเจริญเป็นตุ่มเขียว และการเจริญเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.5+0.5, 0.5+1, 1+0.5, 1+1, 3+0.5 และ 3+1 มิลลิกรัมต่อลิตร 50

4.3 แสดงจำนวนตาของวานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่พัฒนาไปเป็นลักษณะต่างๆ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.5+0.5, 0.5+1, 1+0.5, 1+1,3+0.5 และ 3+1 มิลลิกรัมต่อลิตร 51

4.4 แสดงร้อยละการเริ่มเจริญเป็นตุ่ม การเจริญเป็นตุ่มเขียว และการเจริญต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.5+0.5, 0.5+1, 1+0.5, 1+1, 3+0.5 และ 3+1 มิลลิกรัมต่อลิตร 51

4.5 แสดงจำนวนตาของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่พัฒนาไปเป็นลักษณะต่างๆ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5+1, 0.5+3, 1+1, I+3, 3+1 และ 3+3 มิลลิกรัมต่อลิตร 52

4.6 แสดงร้อยละการเจริญเป็นตุ่มเขียว และการเจริญเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5+1, 0.5+3, 1+1, 1+3, 3+1 และ 3+3 มิลลิกรัมต่อลิตร 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.7 แสดงจำนวนตาของวานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่พัฒนาไปเป็นลักษณะต่างๆ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5+1, 0.5+3, 1+1, 1+3, 3+1 และ 3+3 มิลลิกรัมต่อลิตร 54

4.8 แสดงร้อยละการเจริญเป็นตุ่มเขียว และการเจริญต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5+1, 0.5+3, 1+1, 1+3, 3+1 และ 3+3 มิลลิกรัมต่อลิตร 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แผนที่การกระจายที่อยู่ของวานิลาทั่วโลก	5
2.2	ดอกวานิลา แพลนนิโฟเลีย	7
2.3	ลักษณะส่วนต่างตามยาวของวานิลา แพลนนิโฟเลีย	7
2.4	ฝักวานิลา แพลนนิโฟเลีย	8
2.5	ดอกวานิลา ปอมโปนา	8
2.6	ฝักวานิลา ปอมโปนา	9
2.7	ต้นวานิลา ตาฮาเทนซีส	9
2.8	ต้นเถางูเขียว	10
2.9	ดอกเถางูเขียว	10
2.10	ต้นเอาะลบ	11
2.11	ดอกเอาะลบ	11
2.12	ต้นสามร้อยต่อใหญ่	12
2.13	ต้นพลูช้าง หรือ ดองผา	13
2.14	การปลูกวานิลากับต้างมีชีวิต	15
2.15	ลักษณะของฝักที่ผ่านการบ่ม	20
2.16	แสดงขั้นตอนปฏิกิริยา PCR	31
2.17	แถบดีเอ็นเอที่แยกบนแผ่นวุ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทร โฟริซิส	33
2.18	การจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบแบบสุ่ม	36
3.1	ใบวานิลาสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง	40
4.1	แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์วานิลา 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-07	45
4.2	แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์วานิลา 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-20	45
4.3	แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์วานิลา 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-14	46
4.4	แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์วานิลา 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-18	46
4.5	แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์วานิลา 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-04	47
4.6	แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์วานิลา 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-07	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.7	กราฟแสดงร้อยละการเริ่มเจริญเป็นตุ่ม การเจริญเป็นตุ่มเขียว และการเจริญต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS 1, MS 2, MS 3, MS 4, MS 5 และ MS 6	50
4.8	กราฟแสดงร้อยละการเริ่มเจริญเป็นตุ่ม การเจริญเป็นตุ่มเขียว และการเจริญต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรMS 1, MS 2, MS 3, MS 4, MS 5 และ MS 6	52
4.9	กราฟแสดงร้อยละการเจริญเป็นตุ่มเขียว และการเจริญต้นใหม่ จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS 7, MS 8, MS 9, MS 10, MS 11 และ MS 12	53
4.10	กราฟแสดงร้อยละการเจริญเป็นตุ่มเขียว และการเจริญต้นใหม่ จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS 7, MS 8, MS 9, MS 10, MS 11 และ MS 12	55
4.11	ลักษณะการเจริญเป็นต้นใหม่ จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* และ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ IBA ที่ความเข้มข้นต่างๆ	56
4.12	ลักษณะการเจริญเป็นตุ่มสีเขียว จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* และ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ IBA ที่ความเข้มข้นต่างๆ	57
4.13	ลักษณะการเจริญเป็นตุ่มสีเขียว จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* และ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

วานิลา (Vanilla) เป็นพืชเถาไม้เลื้อยจัดอยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Orahidaceae) สกุลวานิลา ประกอบด้วย 110 ชนิด (http://en.wikipedia.org/wiki/Vanilla_%28orchid%29) วานิลามีถิ่นกำเนิดในประเทศเม็กซิโกและอเมริกากลาง แต่ในปัจจุบันได้รับการเพาะปลูกตามส่วนต่างๆ ในประเทศเขตร้อน ฝักวานิลาที่ได้รับการบ่มให้เกิดกลิ่นมีราคาสูงมาก เนื่องจากในปัจจุบันได้รับการยกย่องเป็นกลิ่นหอมของโลก (Divakaran และคณะ, 2006) และในตลาดโลกยังมีความต้องการผลิตภัณฑ์จากวานิลาค่อนข้างสูง จึงทำให้เป็นที่นิยมเพาะปลูกในหลายๆ ประเทศ แต่มีปัจจัยจำกัดในการแพร่ขยายพันธุ์จากธรรมชาติ เนื่องจากลักษณะทางพฤษศาสตร์ของดอกวานิลา (http://www.doa.go.th/public/plibai/plibai_45/noverber%2045/vanilla.html) และปัจจัยจากการผสมพันธุ์เฉพาะสายพันธุ์เดียวกัน จึงไม่ทำให้เกิดความหลากหลายซึ่งมีผลต่อกระทบต่อการปรับปรุงการให้ผลผลิต พร้อมทั้งวานิลาเป็นพืชที่ไวต่อโรคและแมลง (Divakaran และคณะ, 2006) ประเทศผู้ผลิตวานิลาที่สำคัญคือ มาดากัสก้า เม็กซิโก หมู่เกาะโคโมโร และอินโดนีเซีย ส่วนประเทศผู้นำเข้าที่สำคัญ คือ สหรัฐอเมริกา เยอรมัน แคนาดา อังกฤษ ญี่ปุ่น และออสเตรเลีย

การแข่งขันในตลาดโลกในปัจจุบันจากสถิติระบุว่ามาดากัสก้ามีส่วนแบ่งตลาดผลิตภัณฑ์จากวานิลาในตลาดโลกถึงร้อยละ 70 แต่อุปสงค์ของตลาดโลกที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยปีละร้อยละ 18.5 หรือประมาณ 524,063 ตัน ยังเปิดโอกาสให้มีการแข่งขันเพื่อตอบสนองในส่วนนี้ ตลาดในอเมริกาสามารถรองรับผลผลิตได้มากกว่าร้อยละ 50 เป็นตลาดที่นิยมบริโภควานิลาเกรดต่ำมากกว่าเกรดอื่นที่ดีกว่า ประเทศอินโดนีเซียจึงพยายามเข้าแข่งขันกับวานิลาที่มาจากมาดากัสก้าในตลาดสหรัฐอเมริกา โดยอินโดนีเซียได้เข้าไปมีส่วนแบ่งตลาดวานิลาถึงร้อยละ 15 ที่ซึ่งรัฐบาลอินโดนีเซียให้ความสำคัญมากในการพัฒนาการส่งออกวานิลา โดยพยายามขยายพื้นที่การผลิตเพื่อให้เพิ่มปริมาณการส่งออกมากขึ้น แต่ปัญหาเรื่องคุณภาพเป็นปัญหาที่สำคัญในการเพาะปลูก และการผลิตเป็นอย่างมากทำให้วานิลาของอินโดนีเซียมีราคาต่ำ สำหรับเกรด 1 ของประเทศมาดากัสก้า และโคโมโรมีราคาส่งออกถึงกิโลกรัมละ 70-80 เหรียญสหรัฐ (ราคา FOB) ส่วนราคาของฝักวานิลาที่ส่งออกของประเทศอินโดนีเซียกิโลกรัมละ 50-60 เหรียญสหรัฐ เพราะเหตุที่ราคาวานิลาสูงเช่นนี้ ประเทศอินโดนีเซีย เรียกวานิลาว่า ทองสีเขียว หรือ The Green Gold (www.dpu.ac.th/clinictech/download.asp?strFile=wanila.pdf)

จากการสำรวจทางการตลาดพบว่าวานิลาเป็นพืชเศรษฐกิจที่ตลาดให้ความสนใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมผลิตอาหาร สมุนไพร สปา และเครื่องสำอาง จึงพบว่าควรมีการส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาภาคธุรกิจของวานิลาในประเทศไทย เพราะเป็นพืชที่ปลูกยาก และมีราคาสูงมาก ทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มูลนิธิโครงการหลวงจึงได้ผลักดัน และส่งเสริมให้มีการเร่งดำเนินการศึกษาวิจัยพร้อมทั้งดำเนินการขยายผลไปทดลองปลูกที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว โดยให้เจ้าหน้าที่เร่งดำเนินการค้นคว้า และพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ๆ ที่มารองรับการเพาะปลูกวานิลาให้ได้ผลเร็วและมีคุณภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสกัดกลิ่นวานิลาธรรมชาติ ที่เอื้อต่ออุตสาหกรรมต่างๆ

การปลูกวานิลาของมูลนิธิโครงการหลวง เป็นลักษณะของการทดลองวิจัยซึ่งต่อมาได้เล็งเห็นว่าควรมีการส่งเสริมให้เกิดภาคธุรกิจวานิลา เพราะการปลูกวานิลานอกจากต้องใช้ระยะเวลานานแล้ว ปัจจัยด้านภูมิประเทศ และสภาพอากาศก็มีส่วนสำคัญต่อการเพาะปลูก อีกทั้งการผสมพันธุ์วานิลาต้องใช้ความชำนาญในการผสม และต้องทำในโรงเรือน ทำให้มีต้นทุนที่ค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตามฝักแก่ของวานิลาหากทำการสกัดแล้ว ผลที่ได้มีราคาขายที่สูงมาก และคุ้มค่าต่อการลงทุน ทำให้เป็นที่ต้องการของเกษตรกร (http://www.chiangmainews.co.th/viewnews.php?id=1821&lyo=0)

สำหรับประเทศไทย แม้มีการทดลองและทดสอบปลูกวานิลามาเป็นระยะเวลานาน แต่ยังไม่เพียงพอเนื่องจากยังขาดข้อมูล กระบวนการวิจัยและพัฒนาอีกหลายด้านที่สำคัญต่อการเพาะปลูกในเชิงการค้าหรือผลักดันให้เป็นพืชเศรษฐกิจตัวใหม่ที่สำคัญ (www.dpu.ac.th/clinictech/download.asp?strFile=wanila.pdf)

Geetha และ Shetty (2000) ได้ทำการทดลองเลี้ยงวานิลา สกุล *Vanilla planifolia* ในอาหาร 2 สูตร คือ MS (Murashige และ Skoog) มาตรฐานที่มีความเข้มข้นของ BAP (6-Benzylaminopurine) แตกต่างกัน คือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และอาหารสูตร N69 (Nitsch basal medium) ที่เติม d+biotin (0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร) folic acid (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และมีความเข้มข้นของ BAP แตกต่างกัน คือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีการชักนำให้มีการเจริญเติบโตดีที่สุด และมีผลเสียน้อยกว่าอาหารสูตรอื่นๆ

Besse และคณะ (2004) ใช้เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) เพื่อทำการหาสายพันธุ์ของวานิลา สกุล *V. planifolia* ,*V. tahitensi, V. pompona* ที่ได้มาจากอเมริกากลาง มาดากัสกา ฝรั่งเศส ซามัว (Samoa) และเกาะรียูเนียน (Reunion) โดยในการทดลองมีการใช้ Operon Kit C ไพรเมอร์ที่ใช้ คือ OPC-01, -02, -04, -05, -07, -09, -11 และ 13 พบว่า *V. planifolia* มีความสัมพันธ์กับ *V. tahitensis* ส่วนสายพันธุ์ *V. pompona* นั้นไม่มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กัน

Divakaran และคณะ (2006) ได้ทำการผสมรวมคุณสมบัติเฉพาะ (Interspecific hybridization) ระหว่าง *V. planifolia* (ต้นแม่) และ *V. aphylla* (ต้นพ่อ) ที่เป็นสายพันธุ์ประเทศอินเดีย และมีคุณสมบัติในการต้านทานเชื้อรา *Fusarium* การผลิตลูกผสมรวมคุณสมบัติเฉพาะประสบความสำเร็จ หลังจากนั้นได้ทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพ และทำการตรวจสอบระดับโมเลกุลโดยใช้เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs) และ Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) เพื่อตรวจสอบว่ามีการผสมพันธุ์จริงหรือไม่ โดยเครื่องหมายระดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมเลกุลประเมินค่าได้ 319 และ 83 ตำแหน่ง เทคนิคที่ใช้ชี้ให้เห็นถึงความคล้ายคลึงระหว่างต้นพ่อแม่กับลูกผสมตัวเองและลูกผสมคุณสมบัติ เพื่อเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงการให้ผลผลิตของวานิลา

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

1. เพื่อศึกษาและทำการทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการเจริญเติบโตของตาข้าง ตายอด หรือส่วนต่างๆ ของวานิลาเพื่อชักนำให้เจริญเติบโตเป็นต้นใหม่
2. เพื่อศึกษาและวิเคราะห์การจำแนกสายพันธุ์ของวานิลาโดยใช้เทคนิค RAPD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 วานิลา

วานิลาหรือที่เรียก และเขียนกันเป็นส่วนใหญ่นั้น มาจากคำภาษาอังกฤษ Vanilla เขียนเป็นภาษาไทยให้ถูกต้องตามพจนานุกรมไทยของ มานิต มานิตเจริญ พ.ศ. 2537 ว่าวานิลา (http://www.doa.go.th/public/plibai/plibai_45/noverber%2045/vanilla.html)

2.1.1 ถิ่นกำเนิด

วานิลาเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในป่าแถบอเมริกากลาง โดยเฉพาะประเทศเม็กซิโก และกัวเตมาลา ว่ากันว่าชาวสเปนรู้จักวานิลามาตั้งแต่กลางคริสต์ศตวรรษที่ 16 โดยมีชาวสเปนนำฝักวานิลาเข้าไปในประเทศสเปน และมีการตั้งโรงงานขึ้นสำหรับผลิตช็อกโกแลตกลิ่นวานิลา ปี ค.ศ. 1681 วานิลาถูกนำไปปลูกในคอสตาริกา (Costa-Rica) และต่อมามีการนำเอาวานิลาไปใช้ในทางการแพทย์

ในปี ค.ศ. 1733 มีการนำวานิลาเข้าไปปลูกในอังกฤษ จากนั้นได้เงียบสูญหายไปไม่มีใครรู้จักหรือเห็นต้นวานิลาอีกจนกระทั่งต้นศตวรรษที่ 19 มาร์ควิส ออฟแบลนฟอร์ด (Marquis of Blandford) ได้นำวานิลาเข้ามาในอังกฤษอีกครั้งหนึ่ง นำไปไว้ในสวนรวมพันธุ์ไม้ของชาร์ลส์ เกรวิลล์ (Charles Grevilles) ที่เพดดิงตัน (Peddington)

ในปี ค.ศ. 1807 เกรวิลล์ (Greville) ได้ส่งต้นปักชำวานิลาไปยังสวนพฤกษศาสตร์ในปารีส และออองเวิร์ป (Antwerp) วานิลา 2 ต้นที่ ออองเวิร์ป ถูกส่งไปยัง บุยเตนซอง (Buitenzong) ประเทศอินโดนิเซีย ในปี ค.ศ. 1819 แต่อยู่รอดเพียงต้นเดียว และต้นที่เหลือรอดอยู่นี้ออกดอกในปี ค.ศ. 1825 แต่ไม่ติดฝัก ต่อมาในปี 1827 มีการส่งวานิลาไปยังมอริเชียส (Mauritius) เป็นหมู่เกาะในอินโดนิเซีย ซึ่งปัจจุบันประกาศเอกราชเป็นประเทศแล้ว และยังถูกส่งไปสาธารณรัฐมาลากัสซี (Malagascy Republic) ในราวๆ ปี ค.ศ. 1840

ในปี ค.ศ. 1846 เทร์มานน์ (Teysmann) ได้นำเทคโนโลยีการปลูก และการดูแลรักษาวานิลาไปใช้ในอินโดนีเซีย ในรียูเนียน (Reunion) ขณะเดียวกันในระหว่างปี ค.ศ. 1849-1857 ที่ตาฮิติมีปัญหาเรื่องการปลูกอ้อยจึงมีการนำวานิลาเข้าไปส่งเสริมให้ชาวตาฮิติปลูกมีการนำเอาวานิลาเข้าไปปลูกโดยเฮมิลี (Hameli) เป็นผู้นำเข้าไปครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1848 โดยนำพันธุ์วานิลามาจากประเทศฟิลิปปินส์หลังจากนั้นได้มีการพัฒนาการปลูกวานิลาเพื่อเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรม ส่วนการปลูกวานิลาในหมู่เกาะโคโมโร (Comoro) ที่เริ่มเมื่อปี ค.ศ. 1893 ซึ่งเป็นแหล่งที่ทำให้วานิลาแพร่หลายไปยังที่อื่นๆอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 2.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับประเทศไทย ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าใครเป็นผู้นำวานิลามาปลูก และนำเข้ามาเมื่อไร แต่สันนิษฐานว่าคงได้ต้นพันธุ์มาจากประเทศอินโดนิเซีย และนำมาปลูกไว้ที่สถานีทดลองพืชสวนพลิ้ว จังหวัดจันทบุรีเมื่อนานมาแล้ว นอกจากนี้ยังพบว่ามีการปลูกอยู่ที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อปี พ.ศ. 2521 แต่ไม่ได้ปลูกบนค้างโดยเฉพาะ แต่อาศัยค้างของเรือนเพาะชำ และปล่อยให้เกาะเป็นร่มเงาในเรือนเพาะชำ

ในปี พ.ศ. 2531 คุณอรุณ เลียววสุต นักวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรนำต้นพันธุ์วานิลามาจากศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรีมาปลูกที่สถาบันพืชสวนชุมพร โดยใช้ค้างเสาซีเมนต์ที่ใช้ปลูกพริกไทย และปลูกอยู่ใต้ร่มเงาต้นมะพร้าว จนกระทั่งปี พ.ศ. 2534 วานิลาที่ปลูกเริ่มให้ผลผลิต ปัจจุบันกรมวิชาการเกษตร มีการปลูกวานิลาเพื่อทดสอบในศูนย์วิจัย และสถาบันวิจัยพืชสวนหลายแห่งโดยเฉพาะสถานีทดลองพืชสวนดอยมูเซอจังหวัดตาก ศูนย์วิจัยพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง (http://www.doa.go.th/public/plibai/plibai_45/noverber%2045/vanilla.html)

2.1.2 การจัดหมวดหมู่ของวานิลา

Kingdom Plant
Division Magnoliophyta
Class Asparagales
Family Orchidaceae
Subfamily Vanilloideae
Tribe Vanilleae
Subtribe Vanillinae
Genus Vanilla
Species เช่น *Vanilla aphylla*
V. griffithii
V. pilifera เป็นต้น

รูปที่ 2.1 แผนที่การกระจายที่อยู่ของวานิลาทั่วโลก (สีเขียว) (http://en.wikipedia.org/wiki/Vanilla (Orchid))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของวานิลา

วานิลา เป็นพืชจัดอยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Orchidaceae) สกุลวานิลามีประมาณ 110 ชนิด วานิลาเป็นพืชเถาไม้เลื้อย อายุการให้ผลผลิตหลายปี เถาสามารถเลื้อยพันไปบนค้างหรือไม้ยืนต้นอื่นๆ โดยธรรมชาติอาศัยรากเป็นตัวยึดเกาะ วานิลาที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันซึ่งนำมาใช้ในการสกัดสารหอมเพื่อใช้ในการปรุงแต่งกลิ่นอาหาร หรือเครื่องสำอางนั้นมีอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ วานิลาแพลนนิโฟเลีย (*Vanilla planifolia*) วานิลา ปอมโปนา (*Vanilla pompona*) และวานิลา ตาฮาเทนซีส (*Vanilla tahatensis*) แต่ที่นิยมปลูกมากที่สุด คือ วานิลา แพลนนิโฟเลีย

2.1.3.1 วานิลา แพลนนิโฟเลีย (*Vanilla planifolia*)

ปลูกแถบตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศเม็กซิโก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vanilla plannifolia* Andrew หรือ *Vanilla fargrans (Salish) Ames*

1. ลำต้น มีลักษณะเป็นเถายาวเป็นข้อมีสีเขียว อวบน้ำ ขนาดของลำต้นขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของเถาเมื่อโค้งงอหักง่าย มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 เซนติเมตร ปล้องความยาว 5-15 เซนติเมตร

2. ใบ เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับรูปขอบขนานหรือรูปใบหอก มีลักษณะแบนหนาอวบน้ำ ใบกว้าง 3-6 เซนติเมตร ยาว 10-15 เซนติเมตร ปลายใบเรียว ก้านใบสั้น

3. ราก มีสีเขียว เป็นรากอากาศค่อนข้างยาว รากแตกออกตรงข้ามกับใบ รากบริเวณโคนแตกออกมาเป็นแขนง

4. ช่อดอก ออกจากตรงซอกใบ และที่ปลายกิ่ง ไม่มีก้าน ช่อดอกแตกออกไปแต่ละต้นมีประมาณ 4 ช่อ

5. ดอก กล้วยไม้เป็นดอกสมบูรณ์เพศ (hermaphrodite) มีทั้งเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ดอกวานิลามีสีเหลืองอมเขียวกลีบดอกหนา และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 เซนติเมตร ก้านดอกสั้นหรือแทบไม่มี แต่ละช่อมีดอกย่อย 10-20 ดอก ดอกเป็นแบบที่ไม่เป็นที่ดึงดูดของแมลงจึงต้องช่วยผสมเกสรมิเช่นนั้นไม่ติดฝัก ดอกบานตอนเช้า เวลาที่พร้อมผสมเกสร คือระหว่าง 08.00-10.00 ถ้ามีผู้ชำนาญอาจผสมติดถึงร้อยละ 80-95 ภายหลังผสมติดแล้วรังไข่เจริญอย่างรวดเร็ว ส่วนประกอบที่สำคัญของดอกกล้วยไม้ได้แก่

-กลีบเลี้ยง (sepal) มี 3 กลีบรูปร่างยาวรี ขนาดกว้าง 1.3 เซนติเมตร ยาว 5 เซนติเมตร

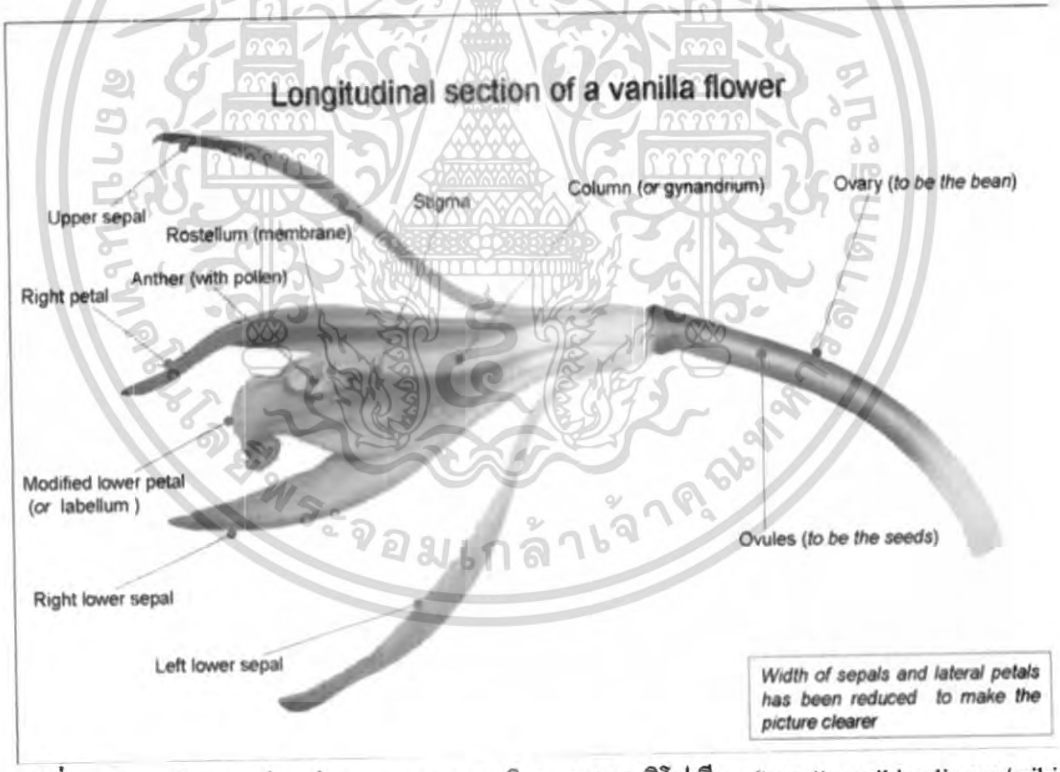
-กลีบดอก (petal) มี 3 กลีบ สองกลีบด้านบน มีลักษณะคล้ายกลีบเลี้ยง อีกกลีบหนึ่งเปลี่ยนเป็นรูปปากแตร เรียกว่า กลีบปาก (lip) มีกลีบดอกสั้นกว่ากลีบดอกอื่น ปลายปากแตรแยกเป็น 3 ส่วน และขอบหยักไม่สม่ำเสมอ

-เกสร เกสรตัวผู้มี 1 อัน ประกอบด้วย อับละอองเกสรตัวผู้อยู่ 2 อัน ส่วนของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียแยกออกจากกัน โดยมีเยื่อบางๆ กั้นอยู่ เยื่อที่กั้นอยู่นี้เรียกว่า โรสเทลลั่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(rosetellum) เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ละอองเกสรตัวผู้ไม่สามารถถ่ายลงไปผสมกับเกสรตัวเมียได้ (รูปที่ 2.2, 2.3) (http://www.doa.go.th/public/plibai/plibai_45/noverber%2045/vanilla.html)

รูปที่ 2.2 ดอกวานิลา แพลนนิโฟเลีย (http://www.watkins.ro/anti_aging.htm)



รูปที่ 2.3 ลักษณะส่วนต่างตามยาวของวานิลา แพลนนิโฟเลีย (http://en.wikipedia.org/wiki/Vanilla)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ฝัก (pod) มีลักษณะคล้ายทรงกระบอกแคบ โป่งตรงปลายฝัก มี 3 มุม ฝักยาว 9.5-14.5 เซนติเมตร กว้าง 1.2-1.4 เซนติเมตร การเจริญเติบโตของฝักวานิลาเป็นไปอย่างรวดเร็ว ภายใน 2 สัปดาห์หลังการผสมติด จากนั้นการเจริญเติบโตค่อนค่างคงที่ ภายในฝักมีเมล็ดอยู่จำนวนมาก (รูปที่ 2.4) (http://www.doa.go.th/public/plibai/plibai_45/noverber%2045/vanilla.html)

รูปที่ 2.4 ฝักวานิลา แพลนนิโฟเลีย (www.iisr.org)

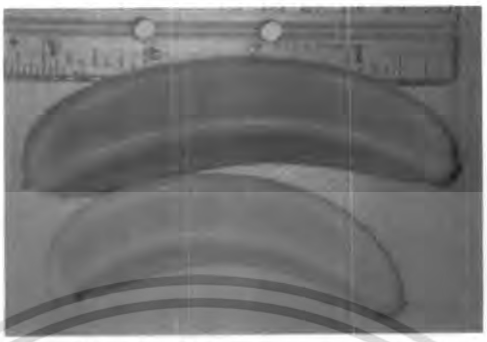
2.1.3.2 วานิลา ปอมโปนา (*Vanilla pompona*) หรือ วานิลลอน (Vanillon) ปลูกในอเมริกากลาง ใบมีขนาดใหญ่กว่าพันธุ์แรก ลักษณะโดยรวมเหมือนกับวานิลา แพลนนิโฟเลีย แต่มีลักษณะที่แตกต่างกัน คือ

1. ดอก มีสีเขียวอมเหลือง กลีบดอกและกลีบเลี้ยง มี 3 กลีบ (รูปที่ 2.5) (http://www.doa.go.th/public/plibai/plibai_45/noverber%2045/vanilla.html)

รูปที่ 2.5 ดอกวานิลา ปอมโปนา (http://www.sdahldtp.com/vplanif.htm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ฝัก มีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมขนาดยาวกว่า และคุณภาพฝักต่ำกว่าพันธุ์แรก แต่ต้านทานโรคเน่าได้ดีกว่า (รูปที่ 2.6) (http://www.doa.go.th/public/plibai/plibai_45/noverber%2045/vanilla.html)



รูปที่ 2.6 ฝักวานิลา ปอมโปนา (http://www.pitcherplant.com)

2.1.3.3 วานิลา ตาฮาเทนซีส (*Vanilla tahatensis*)

หรือเรียกว่า Tahitian vanilla ปลูกมากในประเทศตาฮิติ ลักษณะโดยรวมเหมือนกับวานิลา แพลนนิโฟเลีย (รูปที่ 2.7) แต่มีลักษณะที่แตกต่างกัน คือ

1. ใบ มีลักษณะแคบกว่า 2 พันธุ์แรก
2. ฝัก มีขนาดสั้นกว่า มีสีแดงปนน้ำตาล (http://www.doa.go.th/public/plibai/plibai_45/noverber%2045/vanilla.html)

รูปที่ 2.7 ต้นวานิลา ตาฮาเทนซีส (http://www.Lavanillere.com/nous_eng.htm)

ในจำนวน 3 พันธุ์ โดยพันธุ์แพลนนิโฟเลีย มีคุณภาพฝักดีที่สุด แต่พันธุ์ปอมโปนา ต้านทานโรคเน่าได้ดีกว่าทุกพันธุ์(http://www.doa.go.th/public/plibai/plibai_45/noverber%2045/vanilla.html)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.4 เถางูเขียว (*Vanilla aphylla Rolfe*)

จัดเป็นกล้วยไม้ประหลาดชนิดหนึ่ง เพราะใบลดรูปลงจนเหลือให้เห็นเป็นแค่เกล็ดเล็กๆ อยู่ตามข้อลำต้นที่เป็นเส้นยาวสีเขียวจึงเป็นที่มาของชื่อ เพราะเมื่อเถาของมันเลื้อยไต่อยู่ในป่าดูเหมือนงูมาก จึงจัดว่าเป็นพวกไม่มีใบ (รูปที่ 2.8) ดอกมีสีเขียวออกตามข้อ กลีบปากมีกลุ่มขนสีม่วงออกเป็นช่อ 2-3 ดอก ขนาด 3-4 เซนติเมตร (รูปที่ 2.9) เถางูเขียวออกดอกช่วงฤดูร้อน เดือนมีนาคม-กรกฎาคม มีการกระจายพันธุ์อยู่แถวภาคกลาง ภาคอีสาน และภาคใต้ แหล่งที่สามารถชมกล้วยไม้ประหลาดชนิดนี้ได้ เช่น ที่เส้นทางศึกษาธรรมชาติเขาตะกรุบของสวนพฤกษศาสตร์ 100 ปี กรมป่าไม้ จังหวัดสระแก้ว และเส้นทางศึกษาธรรมชาติในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทรา (http://www.doonokthai.com/modules.php?name=News&file=article&sid=43)

รูปที่ 2.8 ต้นเถางูเขียว

รูปที่ 2.9 ดอกเถางูเขียว (http://www.orchidspecies.com/vanaphylla.htm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.5 เอาะลบ (*Vanilla albida*)

วานิลาชนิดนี้พบทางภาคใต้ ลำต้นเป็นเถา อวบน้ำสีเขียวใบยาวรูปใบหอก หรือรูปขอบขนานปลายแหลมมีลักษณะอวบน้ำเช่นกัน ใบอาจยาวได้ถึง 15 เซนติเมตร (รูปที่ 2.10) ดอกออกเป็นช่อตามข้อสีเขียว กลีบปากสีขาว (รูปที่ 2.11) เอาะลบออกดอกช่วงฤดูร้อน มักพบขึ้นเลื้อยไต่ตามกิ่งไม้ในป่าดิบชื้น ใกล้ลำธารหรือน้ำตก แหล่งที่ขอแนะนำให้ไปชมมีหลายแห่งด้วยกัน เช่น ที่น้ำตกเขาช่อง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาบรรทัด จังหวัดตรัง หรือที่น้ำตกธารโต อุทยานแห่งชาติบางลาง จังหวัดยะลา (http://www.doonokthai.com/modules.php?name=News&file=article&sid=43)

รูปที่ 2.10 ต้นเอาะลบ

รูปที่ 2.11 ดอกเอาะลบ (http://homepage.univie.ac.at/christian.puff/2002-04Thaipics.htm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.6 สามร้อยต่อใหญ่ หรือ งด (*Vanilla pilifera*)

จัดเป็นชนิดที่ค่อนข้างหาชมได้ยาก ลักษณะลำต้นและใบคล้ายกับเอาะลบ ต่างกันที่บริเวณข้อคอดกิ่ว จึงดูเหมือนลำต้นต่อกันเป็นท่อนๆ อันเป็นที่มาของชื่อ สามร้อยต่อใหญ่ (รูปที่ 2.12) ออกดอกช่วงฤดูร้อนดอกมีสีเขียว ยกเว้นส่วนกลีบปากสีชมพูสวยงามมาก ก่อนหน้านี้เคยมีรายงานกล่าวไว้ว่าพบที่จังหวัดปราจีนบุรี และที่เขาขั้นบันได จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ทว่าปัจจุบันแหล่งที่พบกล้วยไม้หายากชนิดนี้ได้ดีที่บริเวณเส้นทางไปเขาปะการัง ตรงกิโลเมตรที่ 15 บ้านกร่างแคมป์ ในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี (http://www.doonokthai.com/modules.php?name=News&file=article&sid=43)

รูปที่ 2.12 ต้นสามร้อยต่อใหญ่

2.1.3.7 พลูช้าง หรือ ตองผา (*Vanilla siamensis*)

กล้วยไม้ชนิดนี้เป็นพรรณไม้ถิ่นเดียว (endemic) ของประเทศไทย จัดเป็นกล้วยไม้ที่มีลำต้นยาวที่สุดชนิดหนึ่งในโลก เถามีขนาดใหญ่กว่าชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับใบซึ่งมีขนาดยาวได้ถึง 10 นิ้ว กว้างถึง 5 นิ้ว และอวบหนามากเป็นพิเศษ (รูปที่ 2.13) พลูช้างออกดอกช่วงปลายฤดูร้อน ช่อดอกขนาดใหญ่เกิดตามข้อในประเทศไทยมีรายงานพบหลายแห่ง เช่น ที่อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพปุย จังหวัดเชียงใหม่ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ และสุดท้ายที่บริเวณน้ำตกสอยดาว เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว จังหวัดจันทบุรี ซึ่งเป็นที่ที่เราจะพบกล้วยไม้พิเศษต้นนี้ห้อยจากกิ่งต้นไม้ใหญ่ริมลำธารน้ำตกช่วงชั้นที่ 5 ถึงชั้นที่ 8 (http://www.doonokthai.com/modules.php?name=News&file=article&sid=43)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.13 ต้นพลูช้าง หรือ ตองผา

2.1.4 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับวานิลา

วานิลา สามารถเจริญเติบโตได้ในเขตร้อนระหว่าง 25 องศาเหนือ ถึง 25 องศาใต้ ของเส้นศูนย์สูตร ตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึงสูงกว่าระดับน้ำทะเล 2,000 ฟุต ปริมาณระหว่าง 850-2,000 มิลลิเมตร/ปี วานิลาต้องการการกระจายตัวของฝนอย่างสม่ำเสมอ สำหรับการออกดอกอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของวานิลาอยู่ที่ 21-23 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 60-80

วานิลาต้องการแสงที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตให้ผลผลิต และแสงยังมีผลต่อน้ำหนักและกลิ่นของวานิลา วานิลาต้องการแสงเพียงเล็กน้อยโดยเฉพาะในช่วงฤดูการออกดอก และช่วงที่ฝักวานิลาเริ่มสุก จากการปลูกทดสอบพบว่าการเจริญเติบโตของเถา และรากดีเมื่อได้รับแสงเพียงร้อยละ 30-50 ถ้าได้รับแสงจัดเกินไปใบวานิลาเป็นสีเหลือง และมีแผลไหม้ เถาอ่อนแอในช่วงขาดน้ำ และอ่อนแอต่อโรครากเน่าในฤดูฝน ในสภาพที่มีร่มเงามากเกินไปใบมีสีเขียวจัด เถาและใบเล็กมีการออกดอกติดฝักน้อย วานิลาไม่ทนต่อสภาพลมแรงจัดในการปลูกวานิลาจึงต้องปลูกพืชทำแนวบังลมด้วย

วานิลาชอบดินที่มีอินทรีย์สูง มีการระบายน้ำดี ความเป็นกรด-ด่างของดินควรอยู่ระหว่าง 6-7 ดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำสามารถปลูกวานิลาได้ แต่ต้องมีการจัดการเรื่องร่มเงาให้เหมาะสม มีความชื้นสม่ำเสมอ มีการใช้วัตถุคลุมดินเพื่อช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ให้กับดิน พื้นที่ปลูกวานิลานั้น โครงสร้าง และเนื้อดินมีความสำคัญกว่าความอุดมสมบูรณ์ของดิน เพราะสภาพดินเหนียวทำให้วานิลามีปัญหาเรื่องโรครากเน่าค่อนข้างสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5 การปลูกวานิลา

การปลูกวานิลาในเชิงการค้าแนะนำให้ขยายพันธุ์โดยการปักชำ ใช้เถายาวประมาณ 1 เมตร ทำให้ออกดอกเร็ว คือ ภายใน 1-2 ปีหลังการปลูก แต่ถ้าใช้เถาสั้นให้ผลผลิตช้า คือ ออกดอกภายใน3-4 ปี

2.1.5.1 การปักชำ

ทำการริดใบบริเวณ 2-3 ข้อล่างออก หลังจากนั้นให้ปักชำในถุงซึ่งสะดวกกว่าการปักชำในกระบะ เพราะต้องย้ายถุงอีกครั้ง ทำให้รากกระทบกระเทือน หลังการปักชำ 1 เดือน จึงออกรากใหม่ และแตกยอดใหม่

2.1.5.2 การเพาะเมล็ด

การขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเมล็ด นิยมใช้เฉพาะการคัดเลือกพันธุ์

2.1.5.3 การเตรียมพื้นที่ปลูกวานิลา

ควรเตรียมไว้ตั้งแต่ช่วงฤดูแล้ง และเตรียมปักชำต้นไม้ที่วานิลาเลื้อยเกาะ ในช่วงกลางฤดูฝน หรือปลูกไว้ 1 ปี ก่อนนำวานิลามาปลูก แต่ถ้าใช้ค้างแบบพริกไทยสามารถทำการปลูกวานิลาได้แต่การใช้ค้างโดยเฉพาะต้องใช้ตาข่ายพรางแสงร้อยละ 50 ช่วยพรางแสงให้วานิลาด้วย ค้างที่ไม่มีชีวิตนี้อาจเป็นเสาซีเมนต์สูง 2.5 เมตร ฝังดินลึก 0.5 เมตร เพื่อให้ค้างสูงประมาณ 2 เมตร เพราะถ้าสูงกว่านี้อาจมีปัญหาในการเก็บเกี่ยวผลผลิต และการดูแลรักษา โดยเฉพาะในช่วงที่วานิลาออกดอก ควรใช้เสาซึ่งเป็นไม้ยืนต้นอื่นๆ เช่น แคฝรั่ง กระถินยักษ์ และยอป่า เป็นต้น

2.1.5.4 ระยะปลูก

ระยะที่เหมาะสมของวานิลา ควรใช้ระยะ 1.5 x 2 เมตร ขุดหลุมที่กว้าง ยาว ลึกประมาณด้านละ 1 ฟุต นำหลุมที่ขุดขึ้นมาผสมกับปุ๋ยหมัก และปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-5 และ 0-3-0 รวมกับโดโลไมท์ อัตราอย่างละ 100 กรัม (ตารางที่ 2.1) ก่อนเตรียมดิน ที่สำคัญคืออย่าลืมทำค้างการเตรียมก่อนดินถ้าเป็นค้างมีชีวิต (ต้นไม้) ต้องทำการปลูกล่วงหน้าประมาณ 1 ปี ดังที่กล่าวมาแล้ว

2.1.5.5 วิธีการปลูกวานิลา

ให้นำกิ่งวานิลาที่ได้จากการปักชำ โดยใช้ความยาวของเถาจำนวน 5-7 ข้อ ปลูกลงหลุมปลูกที่เตรียมไว้หลุมละ 2-3 ก้าน ควรยกเป็นโคกให้สูงกว่าพื้นดินเล็กน้อย ปลูกกิ่งวานิลาให้ชิดโคนต้นหลุมละ 2-3 ต้น ส่วนเถาที่เหลือใช้เชือกผูกติดไว้กับค้างเพื่อช่วยให้เกาะกับค้างเพื่อช่วยให้เกาะกับค้างได้ดีขึ้น (รูปที่ 2.14) เมื่อปลูกให้นำวัสดุ เช่น เศษหญ้า ฟาง ขุยมะพร้าว มาคลุมรอบๆ โคนต้น เพื่อรักษาความชื้นในดิน (http://www.doa.go.th/public/plibai/plibai_45/noverber%2045/vanilla.html)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.14 การปลูกวานิลากับต้นไม้มีชีวิต (http://www.biologie.de/biowiki/Orchideen)

ตารางที่ 2.1 การใส่ปุ๋ยวานิลา

ปุ๋ยสูตร	ช่วงเดือน
15-15-15	พฤษภาคม-มิถุนายน
13-13-21	กันยายน-ตุลาคม
12-24-12	มกราคม-ธันวาคม
0-3-0	ธันวาคม-มกราคม
ปุ๋ยทางใบสูตร 21-21-21	มิถุนายน-สิงหาคม
ปุ๋ยทางใบสูตร 15-30-15	ธันวาคม-กุมภาพันธ์
ปุ๋ยทางใบสูตร 10-20-30	กันยายน-ตุลาคม

นอกจากนี้ควรใส่ปุ๋ยคอก หรือปุ๋ยหมักเพื่อช่วยระบายน้ำ สำหรับอัตราการใส่ปุ๋ยแต่ละครั้งประมาณต้นละ 50 กรัม

2.1.5.6 การกำจัดวัชพืช

การกำจัดวัชพืชรอบๆ โคนต้นไม่ควรกระทำเพราะทำให้ระบบรากกระทบกระเทือน ใช้วิธีถอนหญ้าออกบ้าง ไม่ควรพรวนดินรอบๆ โคนต้น ควรใช้วัสดุคลุมดินรอบๆ เพื่อรักษาความชื้นในดิน ใช้หญ้าแห้ง ฟางข้าว กาบมะพร้าว คลุมดินบริเวณต้นอย่างสม่ำเสมอตลอดปี

2.1.5.7 การให้น้ำ

ในช่วงเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม ไม่ควรให้น้ำวานิลามากเกินไป เพราะวานิลาต้องการสภาพขาดน้ำบ้างเพื่อกระตุ้นการออกดอกในช่วงเดือนมกราคม-เมษายน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5.8 การแต่งทรงพุ่ม

การแต่งทรงพุ่มควรทำการตัดเถาที่ไม่สมบูรณ์ เถาที่ไม่ให้ผลผลิตอีกแล้วออกให้หมด เพื่อควบคุมให้ยอดมีความอุดมสมบูรณ์แข็งแรง ควรทำการจัดเถาวานิลาที่สูงขึ้นเรื่อยๆ ให้โน้มเถามาแนบค้างขึ้นๆ ลงๆ อย่าให้เถาสูงเกินค้างทำให้ไม่สะดวกเวลาผสมเกสร การตัดแต่งทำโดยวิธีตัดยอดของต้นวานิลาประมาณ 10-15 เซนติเมตร ในช่วงและหลังฤดูกาลออกดอก และหลังการเก็บเกี่ยวฝักแล้ว ต้นแก่และเถาที่ไม่แข็งแรงควรตัดทิ้ง และควรตัดแต่งพืชที่เป็นร่มเงาให้วานิลาได้รับแสงแดดเพียงร้อยละ 30-50 ควรจำหน่ายหน่อของวานิลาไม่ให้แตกมากเกินไป เพื่อช่วยให้หน่อที่รักษาไว้สมบูรณ์แข็งแรง

2.1.5.9 การดูแลรักษาแปลงวานิลา

ควรดูอย่างสม่ำเสมออย่างน้อยสัปดาห์ละครั้ง เพื่อการแต่งเถาวานิลาให้อยู่ในรูปทรงที่สะดวกในการทำงาน ควรตรวจสังเกตการเกิดโรคและศัตรูพืช รวมทั้งการคลุมโคนต้นในบริเวณที่รากไปไม่ถึง

2.1.5.10 การดูแลวานิลาบนดิน

รากถูกรบกวนหรือกระทบกระเทือนจากการดูแลรักษาบนดิน แม้ว่าเถาวานิลาได้ขึ้นข้างบน อาจไม่ให้ดอกถ้ารากถูกกระทบกระเทือน เมื่อวานิลาออกดอกต้องเข้าไปดูแลทุกๆ วัน

2.1.5.11 การดูแลภายหลังจากติดฝัก

เมื่อติดฝักแล้วให้ดูช่อ หากช่อใดมีฝักดกเกินไปให้ปลิดออกบ้าง ให้เหลือจำนวนฝักเท่าที่ต้องการ เถาวานิลาให้ผลผลิตสูงสุดในปีที่ 7-8 ถ้าหากมีการดูแลที่ดีสามารถออกให้ผลผลิตที่ดีต่อออกไปอีก 2-3 ปี

2.1.5.12 การผสมเกสร

วานิลาเป็นพืชตระกูลกล้วยไม้ที่ไม่สามารถผสมเกสรเองได้ เนื่องจากลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของดอกวานิลา ทำให้แม้แต่แมลงมีโอกาสช่วยผสมเกสรได้น้อยมาก สำหรับแหล่งกำเนิดของวานิลาแถบอเมริกากลางนั้น มีแมลงตระกูลผึ้งหรือนกฮัมมิ่ง ซึ่งเป็นนกตัวเล็กที่มีจะงอยปากยาว สามารถช่วยผสมเกสรได้บ้าง แต่การติดผลอันเนื่องจากธรรมชาติต่ำมากจากการทดลองนำผึ้งมาเลี้ยงในแปลงปลูกวานิลา ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ปรากฏว่าไม่สามารถช่วยผสมเกสรได้ ดังนั้นจึงต้องช่วยผสมเกสรด้วยมือ ซึ่งทำได้ตั้งแต่เช้า-เที่ยงวัน แต่ถ้าในช่วงเดือนเมษายน ซึ่งเป็นช่วงฤดูร้อนอุณหภูมิค่อนข้างสูง ดอกวานิลาปิดก่อนเที่ยง ถ้าให้ดีควรผสมเกสรในช่วงก่อน 10 โมงเช้า

1. การผสมเกสรด้วยมือ แบบถ่ายเรณูในดอกเดียวกัน (Self-pollination)

-ใช้ไม้ไผ่หรือไม้จิ้มฟันปลายแหลมเล็กๆ เขี่ยละอองเกสรเขี่ยตัวผู้ออกจากอับละอองเกสรตัวผู้ทั้ง 2 อันลงไปฝ่ามือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-ใช้น้ำหยดบนลงละอองเกสรตัวผู้ ใช้ปลายไม้เขี่ยให้ละอองเกสรตัวผู้กระจายทั่วและแตะละอองเกสรให้ติดปลายไม้

-ใช้ไม้อีกอันหนึ่งเขี่ยผนังโรสเทลลั่มให้เปิดออก แล้วเอาไม้ที่มีละอองเกสรตัวผู้อยู่ตรงปลายแตะบนยอดเกสรตัวเมีย

2. การผสมเกสรด้วยมือ แบบถ่ายเรณูข้ามดอก (Cross-pollination)

-ใช้ไม้ไผ่หรือไม้จิ้มฟันปลายแหลมเล็กๆ เขี่ยละอองเกสรตัวผู้ออกจากอับละอองเสรตัวผู้ของต้นแม่พันธุ์ออกจากดอก

-ใช้ไม้อีกอันหนึ่งเขี่ยละอองเกสรตัวผู้ของต้นพ่อพันธุ์ ออกจากอับละอองเกสรตัวผู้ทั้งสองอันลงไปฝ่ามือ

-ใช้น้ำหยดบนลงละอองเกสรตัวผู้ ใช้ปลายไม้เขี่ยให้ละอองเกสรตัวผู้กระจายทั่วและแตะละอองเกสรให้ติดปลายไม้

-เขี่ยผนังโรสเทลลั่มของต้นแม่พันธุ์ให้เปิดออก แล้วเอาไม้ที่มีละอองเกสรตัวผู้จากต้นพ่อพันธุ์อยู่ตรงปลายแตะบนยอดเกสรตัวเมียของต้นแม่พันธุ์

-เขียนป้ายระบุชื่อ ต้นแม่พันธุ์ x พ่อพันธุ์ และวันที่ผสม แล้วติดไว้บนก้านดอก

สำหรับเวลาในการผสมแต่ละดอกนั้น ถ้าอยู่ในระดับความสูงปกติโดยไม่ต้องใช้บันได ใช้เวลาประมาณ 45 วินาที ถึง 1 นาทีขึ้นอยู่กับความสูง และตำแหน่งของดอก สำหรับประสิทธิภาพการผสมติดค่อนข้างสูง และเมื่ออุณหภูมิไม่สูงเกินไป พบว่าการผสมเกสรประสบความสำเร็จถึงร้อยละ 52-94

หลังจากดอกวานิลาได้รับการผสม หากผสมติดรังไข่เริ่มมีการเจริญเติบโตอย่างสม่ำเสมอทั้งด้านความกว้าง และความยาว การเจริญทางด้านความยาวนั้นค่อนค่างคงที่หลังจากสัปดาห์ที่ 6 หลังการผสม แต่การเจริญทางด้านความกว้างคงที่ต่อไปจนถึงสัปดาห์ที่ 8 หลังการผสมแล้วจึงคงที่ มีข้อมูลยืนยันว่าในประเทศเม็กซิโกซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของวานิลา มีการผสมเกสรด้วยธรรมชาติมีประสิทธิภาพการติดฝักน้อยมาก

การบานของดอกวานิลาบานเพียง 1-2 วัน ซึ่งนับเป็นเวลาที่มีความสำคัญในการปฏิบัติงานของเกษตรกรที่ปลูกวานิลา ดอกบานตั้งแต่เช้าตรู่ถึงตอนบ่าย พอเช้าของวันรุ่งขึ้นดอกเหี่ยว เวลาที่ดีที่สุดของการถ่ายละอองเกสร คือ วันที่สว่างและมีฝน วานิลาติดฝักมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับช่วงเวลาการผสมเกสรสามารถทำได้มากหรือน้อยในประเทศเม็กซิโก คนงานมีความสามารถที่สามารถผสมเกสรได้เฉลี่ยคนละ 1,000–2,000 ดอก/วัน ถ้าการถ่ายละอองเกสรหรือการผสมเกสรประสบความสำเร็จ ดอกติดอยู่บนก้านช่อ แต่ถ้าไม่ติด ดอกร่วงภายใน 2-3 วัน

2.1.6 การติดฝัก

ข้อมูลจากการสำรวจพบว่าวานิลาที่เกิดจากต้นที่แข็งแรง มีช่อดอกต้นละประมาณ 200 ช่อ แต่ละช่อมีดอก 15-20 ดอก ต้นวานิลาที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ดีผลิตดอกต้นละ 4,000 ดอก การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

72611

ติดฝัก 10 ฝัก/ช่อ หรือ 2,000 ฝัก/ช่อ มีฝักที่สมบูรณ์มากกว่า 25 ฝัก ในฤดูหรือในปีใดที่วานิลาติดฝักดกมากในปีหรือในฤดูถัดไปติดฝักน้อย

ภายหลังการผสมเกสร รังไข่ของดอกวานิลายาวอย่างรวดเร็ว และมีการเจริญเติบโตประมาณ 1 นิ้วในสัปดาห์แรก และยาวเต็มที่ใน 4-8 สัปดาห์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับต้นวานิลา หากต้นเจริญเติบโตดีฝักแก่เต็มที่ใน 3-4 เดือน ในประเทศเม็กซิโกฝักวานิลาเก็บเกี่ยวได้ในเดือนพฤศจิกายนถึงปลายกุมภาพันธ์

การสังเกตฝักวานิลาว่าสามารถทำการเก็บเกี่ยวได้หรือไม่ ให้สังเกตฝักวานิลามีลักษณะแข็ง หนา มีสีเขียวออกเหลือง และฝักไม่มีกลิ่น สิ่งที่แสดงว่าสุก คือ ฝักทั้งหมดมีสีเหลืองเล็กน้อย ต้องทำการตรวจดูอย่าให้ฝักสุกเกินไป ปกติฝักวานิลาเก็บเกี่ยวได้เมื่ออายุ 8 เดือนนับจากดอกบาน (http://www.doa.go.th/public/plibai/plibai_45/noverber%2045/vanilla.html)

2.1.7 ปฏิทินการผลิตวานิลา (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 ปฏิทินการผลิตวานิลา

ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	กิจกรรม
												ปลูก
												ให้น้ำ
												ตัดแต่งกิ่ง
												ออกดอกผสมเกสร
												ทยอยเก็บฝักแก่ไปบ่ม

หมายเหตุ

- ระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมต่างๆ ของวานิลา
- ระยะเวลาที่ไม่เหมาะสมในการทำกิจกรรมต่างๆ ของวานิลา

ช่วงเวลาที่ผลผลิตออกสู่ตลาด : ตั้งแต่เดือนสิงหาคมเป็นต้นไป

2.1.8 คุณภาพฝัก รส และกลิ่นของวานิลา

คุณภาพของฝักวานิลาที่ดีนั้น เมื่อผ่านการบ่ม และหมักแล้วนั้นต้องมีกลิ่นและรสชาติดี นอกจากนี้ต้องมีการยืดหยุ่น ความยาวตามขนาด อยู่ในเกรดที่ดี และมีปริมาณความชื้นตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของการใช้ในแต่ละประเภทของอุตสาหกรรม ขนาด และความยืดหยุ่นของฝักนั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารที่สกัดได้ ที่เรียกว่า วานิลลิน (Vanillin) และกลิ่น ดังต่อไปนี้

2.1.8.1 ฝักคุณภาพดี

ฝักยาว อ่อนนิ่ม สีออกดำ มีน้ำมันเยิ้ม มีกลิ่นแรง ไม่มีรอยแผล ความชื้นของฝักร้อยละ 30-40

2.1.8.2 ฝักคุณภาพต่ำ

ฝักแข็ง แห้งเกินไป ผอม มีสีน้ำตาล หรือสีน้ำตาลออกแดง มีกลิ่นน้อย ความชื้นของฝักร้อยละ 40–50

ปัจจัยที่มีส่วนชักนำในการพัฒนากลิ่น รส และคุณภาพของฝักวานิลา มีดังนี้

-อายุ และฤดูกาลของการเก็บเกี่ยวฝักวานิลา

-กระบวนการหมักบ่ม

-ปริมาณออกซิเจนในอากาศซึ่งเป็นตัวทำปฏิกิริยาในระหว่างการหมักบ่ม

-การควบคุมอุณหภูมิระหว่างขั้นตอนการทำให้แห้ง

-ปริมาณความชื้นของฝักระหว่างการทำให้แห้ง

2.1.9 กรรมวิธีในการบ่มฝักวานิลา และทำให้แห้ง มีหลายวิธีดังนี้

2.1.9.1 วิธีที่ 1

แช่ฝักวานิลาในน้ำร้อน 63-65 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วผึ่งให้สะเด็ดน้ำ ห่อด้วยผ้าฝ้ายสีดำ แล้วนำมาเก็บไว้ในกล่อง (cloth lined sweeting box) นาน 2-3 วัน จากนั้นนำมาผึ่งแดดบนผ้าสีดำนาน 3-4 ชั่วโมง ทุกวันทำซ้ำเช่นนี้ 6-8 วัน แล้วนำมาบ่มในลังไม้ที่ร่มนาน 3 เดือน โดยมัดรวมกัน

2.1.9.2 วิธีที่ 2

แช่ฝักวานิลาในน้ำร้อน 63-65 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วผึ่งให้แห้ง ห่อไว้ในผ้าฝ้ายสีดำ แล้วนำมาเก็บไว้ในกล่อง 2-3 วัน จากนั้นนำมาอบที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง ทุกวันนาน 8 วัน แล้วนำมาบ่มในลังไม้ที่ร่มนาน 3 เดือน

2.1.9.3 วิธีที่ 3

แช่ฝักวานิลาในน้ำร้อน 80 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที ทำ 3 ครั้ง ทุก 30 นาที ผึ่งในแห้งแล้วห่อด้วยผ้าฝ้ายสีดำใส่ในลังไม้นาน 2-3 วัน นำมาตากแดด 2 ชั่วโมงทุกวันนาน 7 วัน จนกระทั่งฝักเริ่มนิ่ม หลังจากนั้นบ่มในร่มจนกระทั่งน้ำหนักลดลงเหลือ 1/3 นาน 3 เดือน

2.1.9.4 วิธีที่ 4

นึ่งฝักวานิลาที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส นาน 36-48 ชั่วโมง นำไปม้วนในผ้าฝ้ายสีดำนาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาตากแดดวันละ 2-3 ชั่วโมง นาน 5-6 วัน หลังจากนั้นเก็บไว้ในลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม้ที่ร่ม ที่มีการระบายอากาศได้ดีนาน 2-3 เดือน (รูปที่ 2.15) (http://www.doa.go.th/public/plibai /plibai_45/noverber%2045/vanilla.html)

รูปที่ 2.15 ลักษณะของฝักที่ผ่านการบ่ม (http://www.glenbrookfarm.com/store/bunchbeans.jpg)

2.1.10 โรคที่สำคัญของวานิลา ที่พบอยู่เสมอๆ คือ

2.1.10.1 โรคเน่า ได้แก่ โรครากเน่า (root rot) โรคต้นเน่า (steam rot) โรคผลเน่า (fruit rot)

-*Fusarium batatis wollenw.*var.*vanillae* Taucker เป็นสาเหตุให้เกิดโรครากเน่า

มีการรายงานว่า เป็นสาเหตุที่สำคัญที่มีผลในการผลิตวานิลาในประเทศเปอโตริโก (http://www.geocities.com/greenlandvanilla/diseases.htm) ลักษณะอาการในระยะแรก คือ เชื้อรา เข้าไปทำลายท่อน้ำ ท่ออาหารหรือบริเวณตาหน่อตรงโคนต้น เกิดสีน้ำตาลบริเวณโคนต้น และค่อยๆ ลุกลาม เป็นสาเหตุการตายของรากในดิน หลังจากนั้นไปถึงรากอากาศ ใบอ่อนแอลงในที่สุด แห้งเหี่ยวเกิดการสูลงหรือแห้งตาย โรคนี้พบได้ในเดือนสิงหาคม-กันยายน ซึ่งมีความชื้นในอากาศสูง

-*Phytopthora parasitica* Dast เป็นสาเหตุให้เกิดโรคผลเน่า

2.1.10.2 โรคแอนแทรกโนส (anthracnose) หรือ โรคใบไม้

สาเหตุ เกิดจากเชื้อรา *Calospora vanillae* Massee เป็นโรคที่เข้าทำลายที่ยอด ใบ ฝัก และรากบริเวณโคนต้น ทำให้ผลร่วงภายใน 1-3 วัน เชื้อระบาดในช่วงฤดูฝน โดยเฉพาะในแปลงที่ปลูกที่ร่มเงามากเกินไป และดินระบายน้ำไม่ดี

2.1.10.3 โรคจุดไหม้สีน้ำตาล (brown spot)

โรคจุดไหม้สีน้ำตาลบนลำต้นและใบ ต้นวานิลาที่ถูกโรคนี้ทำลายต้องตัดทิ้ง และทำลายซาก

2.1.10.4 โรคจุดสีดำ (black spot)

โรคจุดสีดำบนฝักแก่ โรคนี้ควบคุมได้โดยใช้สารผสมบอร์โด (bordeux mixture) ไดแทน เอ็ม 45 หรือ เอนทราโคล 200 (ร้อยละ 0.3) พ่นในระยะห่างกัน 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังมีศัตรูที่สำคัญที่ต้องควบคุมอีก คือ หอยทาก และเพลี้ยกระโดด โดยทำลายส่วนใบ และยอดของต้นวานิลา หอยทากสามารถควบคุมได้โดยการจับทำลาย ส่วนเพลี้ยกระโดดควบคุมโดยการฉีดพ่นสารเคมี

2.1.11การใช้ประโยชน์จากวานิลา

ผลิตภัณฑ์จากวานิลาที่จำหน่ายอยู่ในตลาดโลกนั้นมีหลายชนิดแตกต่างกัน แล้วแต่วัตถุประสงค์ของการใช้แต่ละประเทศ ความต้องการผลิตภัณฑ์จากวานิลลาของประเทศผู้บริโภคส่วนใหญ่ คือ การนำสารสกัดจากวานิลาไปปรุงแต่งกลิ่น รสอาหาร โดยเฉพาะไอศกรีม ช็อคโกแลต ขนมหวานต่างๆ รวมทั้งเครื่องดื่ม โดยแบ่งผลิตภัณฑ์จากวานิลาออกเป็น

2.1.11.1 สารสกัดวานิลา

เป็นสารละลายน้ำผสมแอลกอฮอล์ที่ประกอบด้วยกลิ่น และรสชาติจากฝักวานิลา อาจมีการเพิ่มความหวานจากน้ำตาล สารประเภทนี้เป็นสารที่มีปริมาณเอทิลแอลกอฮอล์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 35

2.1.11.2 วานิลาทิงเจอร์

วิธีการสกัดคล้ายวานิลาสกัด แต่แตกต่างกันตรงวานิลาทิงเจอร์มีปริมาณเอทิลแอลกอฮอล์มากกว่า ร้อยละ 38 วานิลาทิงเจอร์นิยมในกันมากในอุตสาหกรรมยา

2.1.11.3 วานิลาโอลีโอเรซิน (vanilla oleoresin)

เป็นของเหลวข้นที่ได้จากการสกัดด้วยสารชนิดหนึ่ง แทนที่ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ผลิตภัณฑ์จากวานิลาชนิดนี้มีกลิ่น และรสชาติด้อยกว่าสารสกัดวานิลาผสมกับสารวานิลาสังเคราะห์ นำไปใช้ในการปรุงแต่งกลิ่น

2.1.11.4 วานิลาผง

ได้จากการเอาฝักวานิลาที่ผ่านการหมักและบ่ม นำมาทำให้แห้ง บดเป็นผงละเอียด ใช้สำหรับผสมลงในอาหาร ขนมและยาต่างๆ (http://www.doa.go.th/public/plibai/plibai_45/noverber%2045/vanilla.html)

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เป็นศาสตร์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพสาขาหนึ่ง โดยนำเซลล์เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ในสภาพปราศจากเชื้อภายใต้การควบคุมสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ แสงสว่าง และความชื้นเป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกำเนิดมาจากหลักการ Totipotency ที่ว่า เซลล์พืชเดี่ยวๆ ทุกเซลล์มีลักษณะ และองค์ประกอบทางพันธุกรรมสมบูรณ์เหมือนต้นแม่ ซึ่งสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นพืชทั้งต้น (whole plant) ได้ (ประภัสสร, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (http://eduonline.udru.ac.th/rudonline/courses/4034201/)

2.2.1.1 การขยายพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถขยายพันธุ์พืชที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีอื่นได้ยากหรือขยายได้ช้า เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้จำนวนมากได้อย่างรวดเร็ว สามารถผลิตต้นพันธุ์ได้ตลอดปี ซึ่งต้นพันธุ์ที่ได้มีลักษณะเหมือนเดิมทุกประการและให้ผลผลิตคุณภาพดี

2.2.1.2 การผลิตต้นพันธุ์ที่ปราศจากโรค พืชหลายชนิดมีเชื้อไวรัสแฝงตัวอยู่ในท่อลำเลียง จึงเป็นการยากต่อการผลิตพันธุ์พืชที่ปราศจากโรค ดังนั้นการเพาะเลี้ยงส่วนของปลายยอดที่ยังไม่มีท่อลำเลียงสามารถขจัดการปนเปื้อนของไวรัสเหล่านั้นได้

2.2.1.3 การผลิตสารสำคัญหรือสารทุติยภูมิ พืชหลายชนิดสามารถผลิตสารสำคัญได้ ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้ เช่น สารตัวยารักษาโรค สีที่ใช้ในอุตสาหกรรม ซึ่งการนำพืชเหล่านี้มาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมได้ทำให้สามารถชักนำให้เซลล์ของพืชผลิตสารในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น

2.2.1.4 การอนุรักษ์พันธุกรรมและการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืช เป็นการเก็บรวบรวมพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงไว้ในขวด และบังคับให้เติบโตอย่างช้าๆ ซึ่งทำให้สามารถเก็บรักษาพันธุ์พืชไว้ได้นาน ประหยัดพื้นที่ และแรงงาน นอกจากนี้ยังมีความสะดวกต่อการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชกับต่างประเทศ เพราะอยู่ในขวดเพาะเลี้ยง และปราศจากเชื้อโรค

2.2.1.5 การปรับปรุงพันธุ์พืช เป็นการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาประยุกต์ใช้ เช่น การสร้างพืชโครโมโซมชุดเดียว การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ การรวมเซลล์พืช (protoplast fusion) และพันธุวิศวกรรมของพืช

2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และพัฒนาของเนื้อเยื่อ (http://gis.agr.ku.ac.th/e_learning/tissue/document/lession4.pdf)

2.2.2.1 ปัจจัยทางด้านเคมี

1. ธาตุอาหาร

ธาตุอาหารที่จำเป็น 12 ธาตุซึ่งใช้ในอาหารสังเคราะห์มีหน้าที่ต่างๆ ดังนี้

-ไนโตรเจน เป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิค เอนไซม์ โคเอนไซม์ คลอโรฟิลล์ และสารประกอบสำคัญอื่นๆ รวมประมาณร้อยละ 18 นอกจากนี้ไนโตรเจนอาจอยู่ในรูปของแอมโมเนียมหรือไนเตรทอิสระประมาณร้อยละ 10-20 ปกติในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นพืชดูดธาตุไนโตรเจนในรูปไนเตรทได้ดีกว่ารูปแอมโมเนียม ทำให้พืชสะสมไนโตรเจนในรูปกลูตามีนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งขบวนการเปลี่ยนไนเตรทเป็นกลูตามีนนั้นมีโมลิบดินัมเกี่ยวข้องด้วย ธาตุไนโตรเจนช่วยการเติบโตของส่วนยอดทำให้การเติบโตของรากลดลง

-ฟอสฟอรัส เป็นองค์ประกอบของนิวคลีโอโปรตีน (Neucleoprotein) ฟอสฟอไลปิด (Phospholipid) NADP ATP กรดไฟติค (Phytic acid) ซึ่งเป็น Hexaphosphate ester ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Myo-inosital และไพริดอกซอล ฟอสเฟต (Pyridoxzl phosphate) ปกติฟอสฟอรัสอยู่ในไซโตรพลาสซึม และเกี่ยวข้องกับแมตาบอลิสซึมเพียงร้อยละ 12 ส่วนอีกร้อยละ 88 อยู่ในแวคิวโอล พืชที่ขาดฟอสฟอรัสทำให้เกิดสีเขียวเข้ม อัตราการหายใจต่ำ และหยุดการเจริญเติบโต แต่ถ้ามีฟอสฟอรัสในปริมาณมากอาจเป็นพิษต่อพืชได้ ธาตุฟอสฟอรัสช่วยการเติบโตของราก และช่วยให้พืชดูดใช้ธาตุโปแตสเซียมได้ดีขึ้นด้วย

-โปแตสเซียม เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการมากรองจากไนโตรเจน แต่พืชเติบโตได้เป็นปกติเมื่อมีโปแตสเซียมเพียง 10 ไมลาร์ ความต้องการโปแตสเซียมนั้นแตกต่างกันตามชนิดของพืช โดยยาสูบมีความต้องการโปแตสเซียมสูงกว่าพืชอื่นๆ โปแตสเซียมไม่ได้อยู่ในพืชในรูปของมาโครโมเลกุลใดๆ แต่มีส่วนสำคัญในขบวนการสังเคราะห์แสง การหายใจ การคายน้ำ และการเคลื่อนย้ายน้ำตาล ตลอดเป็นโคเฟคเตอร์ของเอนไซม์ ธาตุโปแตสเซียมช่วยให้พืชใช้ธาตุเหล็กได้อย่างมีประสิทธิภาพ และช่วยให้เซลล์สะสมน้ำได้มาก

-แคลเซียม เป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อต่างๆ และคลอโรพลาสต์ในพืชปกติร้อยละ 60 ของแคลเซียมในใบสะสมอยู่ในคลอโรพลาสต์ พืชที่ขาดแคลเซียมเกิดความผิดปกติในการแบ่งเซลล์ และเยื่อพวกนิวเคลียเมมเบรนและพลาสมาเล็มมาขาดตอน นอกจากนี้แคลเซียมยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับเอนไซม์และลดความเป็นพิษของทองแดงได้ ธาตุแคลเซียมมีสภาวะปฏิปักษ์กับธาตุโปแตสเซียม

-แมกนีเซียม เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของคลอโรฟิลล์ และมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไม่น้อยกว่า 14 ชนิด เนื่องจากแมกนีเซียมมีสภาวะปฏิปักษ์กับโปแตสเซียม แคลเซียม และแอมโมเนียม จึงทำให้อาจพบแมกนีเซียมอยู่ในปริมาณน้อย โดยอาจพบในรูปเกลือของกรดไฟติค แต่แมกนีเซียมมีสภาวะเสริมกับฟอสฟอรัส โดยแมกนีเซียมทำให้พืชใช้ฟอสฟอรัสได้มีประสิทธิภาพขึ้น

-กำมะถัน เป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ ซิสทีน ซิสเทอีน และเมไทโอนีน โดยโปรตีนที่มีกรดอะมิโนเหล่านี้ เช่น ไวตามินบี 1 ไบโอติน โคเอนไซม์เอ และ Ferridoxins ซึ่งเป็นโปรตีนในขบวนการสังเคราะห์แสง และเคลื่อนย้ายอิเล็คตรอน ปกติแล้วโปรตีนของพืชมีกำมะถัน 1 อะตอม ทุกๆไนโตรเจน 36 อะตอม ดังนั้นพืชที่ขาดกำมะถันทำให้ขบวนการสร้างโปรตีนชะงักลงเหมือนกับการขาดไนโตรเจน และฟอสฟอรัส นอกจากนี้พืชที่ขาดกำมะถันยังมีคาร์โบไฮเดรตต่ำอีกด้วย อนึ่งลำต้นของพืชทั่วๆ ไปอาจมีปริมาณกำมะถันมากเป็น 2 เท่าของปริมาณฟอสฟอรัส

-สังกะสี เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์คาร์โบนิค แอนไฮเดรต (Carbonic anhydrase) ซึ่งช่วยตรึงแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ทริปโตเฟน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารออกซิน พืชอาจมีปริมาณสังกะสีสูงถึง 300 พีพีเอ็ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-เหล็ก เป็นส่วนประกอบของโปรตีนหลายชนิด ซึ่งมีบทบาทในขบวนการสังเคราะห์แสงและหายใจ พืชที่ขาดเหล็กมีอาการเหลืองซีด เนื่องจากเหล็กมีส่วนเกี่ยวข้องกับอาร์เอ็นเอในคลอโรพลาสด้วย ปกติพืชมีเหล็กอยู่ราว 10-100 พีพีเอ็ม ธาตุเหล็กมีสภาวะปฏิปักษ์กับธาตุโปแตสเซียม สังกะสี แมงกานีส และทองแดง

-โบรอน เป็นที่ต้องการของพืชแต่ละชนิดในปริมาณที่ต่างกันมาก โดยพืชใบเลี้ยงคู่มีความต้องการธาตุนี้สูงกว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายเท่า โบรอนมีบทบาทในการสร้างสารเพคตินในผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญ และการเคลื่อนย้ายน้ำตาล ดังนั้นเมื่อพืชขาดโบรอนทำให้ผนังเซลล์แตกได้ง่าย และเกิดการสะสมน้ำตาลในใบ ธาตุโบรอนนี้มีสภาวะเสริมกับธาตุไนโตรเจนและโปแตสเซียม และช่วยให้พืชใช้ธาตุแคลเซียมได้อย่างมีประสิทธิภาพปกติพืชมีโบรอนอยู่ราว 3-100 พีพีเอ็ม

-แมงกานีส มีบทบาทโดยตรงกับขบวนการสังเคราะห์แสง และเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ 4 ชนิด ซึ่งแมงกานีสหรือแมกนีเซียมทำงานแทนกันได้ การขาดแมงกานีสทำให้เกิดผลกระทบกับขบวนการสังเคราะห์แสงอย่างมากซึ่งมากกว่าการขาดธาตุเหล็ก เนื่องจากแมงกานีสมีผลต่อการใช้ไนโตรเจน และเหล็กในพืช พืชอาจมีแมงกานีสสูงถึง 2,000 พีพีเอ็ม

-ทองแดง เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ในไมโตคอนเดีย และคลอโรพลาส ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง การหายใจ และการป้องกันตัวเองเมื่อพืชเกิดบาดแผล ทองแดงช่วยให้พืชใช้ธาตุเหล็กได้ดีขึ้นด้วย ปกติพืชมีทองแดงอยู่ประมาณ 10 พีพีเอ็ม เท่านั้น

สำหรับธาตุอื่นๆ ในอาหารสังเคราะห์ซึ่งมีบทบาทบางประการกับการเจริญเติบโตของพืช คือ คลอรีนมีบทบาทในการสร้างน้ำตาล ซิลิกอนมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการใช้ฟอสฟอรัส แมงกานีส และเหล็ก โคบอลมีบทบาทเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในขบวนการตรึงไนโตรเจน ไอโอดีน อลูมิเนียม และนิเกิล ซึ่งพบในพืชเพียงเล็กน้อย และเป็นพิษต่อพืชได้ง่าย

2. สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นสารอินทรีย์ ที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา โดยสารกลุ่มนี้เพียงเล็กน้อยอาจเร่งการเจริญเติบโตชะลอการเจริญเติบโต หรือเร่งการพัฒนาของอวัยวะต่างๆ ของพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นปัจจัยที่สำคัญมากสำหรับงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สารกลุ่มนี้อาจแบ่งเป็น 8 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

-ออกซิน (auxins) สารกลุ่มนี้ทำให้เซลล์ยืดตัว เนื้อเยื่อบวม เกิดแคลลัส ยับยั้งการเกิดยอด แต่ส่งเสริมการเกิดราก และชักนำให้เนื้อเยื่อเกิด embryogenesis ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปกติพืชสร้างออกซินได้มากที่ปลายยอดที่กำลังเติบโต และเนื้อเยื่อเจริญอื่นๆ IAA (Indol-3-yl acetic acid) เป็นสารที่พืชสร้างตามธรรมชาติ สารนี้มีฤทธิ์ของออกซินสูง แต่เสื่อมคุณสมบัติได้ง่าย เช่น สลายตัวเมื่อได้รับแสง ความร้อน และรังสี เปลี่ยนรูปโดย IAA-oxidase และ Peroxidase และหมดประสิทธิภาพชั่วคราวเมื่อรวมตัวกับสารอื่น เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล และ Myo-inositol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากออกซินธรรมชาติแล้วสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ของออกซิน เช่น NAA (Naphthaleneacetic acid) IBA (Indolebutyric acid) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid และ Dicamba (2-Methoxy-3,6-dichorobenzoic acid) ได้ถูกใช้ในอาหารสังเคราะห์ราว 0.005-50 ไมลาร์ การใช้ออกซินความเข้มข้นต่ำทำให้เกิดราก ขณะที่ความเข้มข้นสูงชักนำให้เกิดแคลลัส การ ใช้ 2,4-D ต้องระมัดระวังกว่าการใช้ออกซินชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อนึ่ง 2,4-D เหมาะกับพืชใบเลี้ยงคู่ ขณะที่ Dicamba เหมาะกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

-ไซโตไคนิน (cytokinin) สารกลุ่มนี้กระตุ้นให้พืชเจริญเติบโต ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ กระตุ้นการเกิดยอดขณะที่ยับยั้งการเกิดราก และกระตุ้นให้เกิดแคลลัสเมื่อถูกใช้ร่วมกับออกซิน ไซโตไคนินเป็นสารประเภท 6-Substituted purine ที่ถูกสร้างขึ้นจากบริเวณปลายรากและใบอ่อนเป็นส่วนใหญ่ Zeatin เป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเองตามธรรมชาติ พบในเมล็ดอ่อนของข้าวโพดและน้ำมะพร้าวอ่อน สารนี้มีฤทธิ์ของไซโตไคนินสูง แต่มีราคาแพงมากจึงไม่นิยมใช้ในรูปสารบริสุทธิ์ น้ำมะพร้าวซึ่งมีไซโตไคนินหลายชนิด เช่น Diphenylurea ribofuranosyl zeatin และ Zeatin riboside นอกเหนือจาก Zeatin จึงเป็นที่นิยมใช้กันมากในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สำหรับไซโตไคนินสังเคราะห์เช่น ไคเนติน (Kinetin, 6-Furfurylamino-purine) BA (Benzyladenine) หรือ BAP (Benzylaminopurine) และ Adenine sulphate คลอดจนสารที่มีฤทธิ์ของไซโตไคนิน เช่น Myo-inositol นั้นได้ถูกใช้ในอาหารสังเคราะห์กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากสารบริสุทธิ์มีราคาถูกโดยนิยมใช้ไซโตไคนินสังเคราะห์ประมาณ 5-45 ไมลาร์ ขณะที่ Myo-inositol ถูกใช้ที่ระดับความเข้มข้นประมาณ 500 ไมลาร์ เป็นส่วนใหญ่ ปกติพืชในสภาพปลอดเชื้อต้องการไซโตไคนินจากอาหารไม่มากนัก

-จิบเบอเรลลิน (gibberellins) สารกลุ่มนี้กระตุ้นให้เซลล์ยืดตัว ส่งผลให้ยอดและปล้องของพืชยืดตัวออก และอาจช่วยทำลายการพักตัวของเอ็มบริโอและเมล็ด ปกติจิบเบอเรลลินยับยั้งการเกิดรากและยอด จิบเบอเรลลินที่อาจถูกใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ GA 3 และ GA 7 ซึ่งควรขจัดเชื้อด้วยการกรอง เนื่องจากสลายตัวง่ายเมื่อถูกความร้อน (สูญเสียประสิทธิภาพร้อยละ 90 หลังการนึ่งฆ่าเชื้อ) การใช้จิบเบอเรลลินมีอยู่ในวงจำกัดมาก เช่น อาจใช้กระตุ้นเอ็มบริออยด์ (embryoid) งอก เป็นต้น

-เอทิลีน (ethylene) แก๊สเอทิลีนกระตุ้นให้พืชแตกกอ ลดการยืดตัวของต้นและราก ทำให้ลำต้นและใบอวบน้ำ ชักนำให้เกิดรากขนอ่อน (root hair) และทำให้พืชเกิดรากอย่างผิดปกติ เช่น เกิดรากตามกิ่งและลำต้น แก๊สเอทิลีนถูกสร้างมากที่สุดบริเวณเนื้อเยื่อเจริญและบริเวณข้อโดยพืชสร้างเอทิลีนเพียงเล็กน้อยในภาวะปกติ แต่สร้างเอทิลีนมากอย่างผิดปกติเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียด เช่น เมื่อเกิดบาดแผล เป็นต้น ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เอทิลีนอาจเข้าไปอยู่ในภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงขณะที่ใช้ไฟลนปากขวดเนื่องจากตะเกียง โดยเฉพาะตะเกียงแก๊สผลิตเอทิลีนขึ้นมาขณะเกิดการสันดาป การปิดภาชนะให้แน่นจะทำให้เอทิลีนซึ่งพืชผลิตเมื่อเกิดบาดแผลสะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมอยู่ภายในภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยง ซึ่งอาจทำให้เกิดผลเสียต่อพืชหลายประการ เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโต ยับยั้งการเกิด embryogenesis ตลอดจนทำให้เกิดอาการฉ่ำใส (vitrification) เอทิลีนอาจมีผลให้เซลล์แขวนลอยเติบโตดี และช่วยการเกิดหัวของพืชหัวได้ ปัจจุบันนักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้พยายามลดปริมาณเอทิลีนในภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยง โดยการใช้ฝาปิดภาชนะซึ่งยอมให้แก๊สเอทิลีนซึมเบากว่าอากาศผ่านออกไปได้หรือปิดฝาภาชนะเพียงหลวมๆ เท่านั้น

-กรดแอ็บซิซิค (abscisic acid) สารกลุ่มนี้เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโต และกระตุ้นให้ปากใบปิด ปกติพืชสร้างกรดชนิดนี้ (ABA) ในปริมาณมากขึ้นเมื่อพืชอยู่ในสภาพแห้งแล้ง ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ABA มีผลเสียต่อการเจริญเติบโตของพืชเป็นส่วนใหญ่แต่อาจถูกใช้เพื่อลดจำนวนเอ็มบริออยด์ที่ผิดปกติทำให้เอ็มบริออยด์ส่วนใหญ่ สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ การใช้ ABA นั้นถูกจำกัดด้วยราคาที่แพงมากของสารบริสุทธิ์

-น้ำตาล (oligosaccharins) สารกลุ่มนี้เพิ่งถูกค้นพบในราวปี ค.ศ. 1985 สารกลุ่มนี้ถูกพืชใช้ควบคุมอัตราการเจริญเติบโต การเกิดตา และราก

-สารชะลอการเจริญเติบโต (growth retardants) สารกลุ่มนี้เป็นสารสังเคราะห์เพื่อใช้ทำให้พืชแบ่งเซลล์ และยืดตัวน้อยลง โดยสารกลุ่มนี้มีผลต่อเซลล์บริเวณใกล้ปลายยอดเท่านั้น ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจใช้สารกลุ่มนี้ เช่น daminozide และ paclobutrazol ความเข้มข้นต่ำเพื่อให้พืชมีการสร้างคลอโรฟิลล์ สะสมอาหารบริเวณโคนต้น ราก และช่วยให้มีการแตกกอได้ดีขึ้น

-phynylurea สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์เหมือนไซโตไคนินแต่มีประสิทธิภาพสูงกว่า เช่น BA เข้มข้น 4-10 โมลาร์ มีผลต่อการแตกกอน้อยกว่า thidiazuron 0.05-0.1 โมลาร์ สารกลุ่มนี้จึงถูกใช้กับพืชซึ่งแตกกอได้ยาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชที่มีเนื้อไม้ อย่างไรก็ตามสารกลุ่มนี้อาจมีผลยับยั้งการพัฒนาของยอดที่เกิดขึ้น

การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตต้องคำนึงถึงความสามารถของเนื้อเยื่อในการสร้างสารนั้นเองด้วย ปัจจัยทางด้านพืช

1. ลักษณะทางพันธุกรรม (genetic factor) การเจริญและพัฒนาไปเป็น และ/หรือ ราก ของพืชแต่ละชนิดมีความสามารถเจริญและพัฒนาได้ไม่เหมือนกัน พืชบางชนิดสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นและ/หรือรากได้ง่าย บางชนิดยากแม้ว่าได้เลี้ยงบนหรือในอาหารที่เหมาะสม พืชบางชนิดการเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นและ/หรือราก โดยผ่านกระบวนการออร์แกนโนเจเนซิส บางชนิดผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส

2. ฮอร์โมน (hormones) ที่มีอยู่ภายในพืช มีบทบาทอย่างมากกับขบวนการเกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง จากทฤษฎีของโฮบ ได้มีผู้พยายามพิสูจน์ว่า การเกิดลักษณะรูปร่าง ควบคุมด้วยชนิด และระดับของฮอร์โมน ดังนั้นภายในเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเลี้ยงจึงมีฮอร์โมนบางชนิดส่งเสริมการเกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง และมีฮอร์โมนอีกบางชนิดที่ยับยั้งการเกิดขบวนการนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สภาพของเนื้อเยื่อ เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชมีการเจริญและพัฒนาอยู่เสมอ ดังนั้น ชนิดและระดับของฮอร์โมนที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อจึงมีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพของเนื้อเยื่อ ในระยะนั้นๆ เป็นที่เชื่อกันว่าการเปลี่ยนแปลงชนิดและระดับของฮอร์โมนภายในเนื้อเยื่อ เป็นสาเหตุให้เนื้อเยื่อมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระ จึงทำให้การเปลี่ยนชนิดและระดับฮอร์โมนกับการเปลี่ยนแปลงทางสรีระเกิดควบคู่กันไปเสมอ

2.2.2.2 ปัจจัยทางด้านกายภาพ

1. แสง (light) แสงที่ให้กับพืชเป็นปัจจัยที่สำคัญ พืชที่เจริญในแปลงปลูกกับที่เจริญในหลอดทดลองมีความต้องการแสงที่แตกต่างกัน พืชที่เจริญในหลอดทดลองยังไม่มีการสังเคราะห์แสงเนื่องจากได้รับคาร์โบไฮเดรตจากน้ำตาล อย่างไรก็ตามแสงยังมีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืชในหลอดทดลอง เช่น ช่วยในการสร้างราก การสร้างต้นใหม่จากแคลลัส เป็นต้น และต้นพืชที่อยู่ในช่วงย้ายออกจากหลอดทดลองจำเป็นต้องมีการสังเคราะห์แสงเพื่อเตรียมพร้อมออกสู่ภายนอกหลอดทดลอง แต่ถ้าความเข้มแสงมากเกินไปอาจทำให้พืชตายได้ ลักษณะของแสงที่เกี่ยวข้องได้แก่ ความเข้มแสง (light intensity) ช่วงแสง (photoperiod) และคุณภาพของแสง (light quality)

-ความเข้มแสง มีรายงานความเข้มแสงที่มีผลต่อ การเจริญเติบโตของพืชในสภาพหลอดแก้วมากกว่าทางด้านช่วงแสง หากพืชในสภาพหลอดแก้วได้รับความเข้มแสงสูงเท่าในแปลงปลูกพืชอาจเป็นอันตรายได้ เนื่องจากทำให้พืชได้รับอุณหภูมิสูงไปด้วย ควรเลี้ยงภายใต้สภาพแสงประมาณ 1,000-4,000 ลักซ์ (1 ฟุตกำลังเทียนเท่ากับ 10.75 ลักซ์) การที่พืชต้องการความเข้มแสงต่ำ สันนิษฐานว่าการสังเคราะห์แสงในสภาพหลอดแก้ว ถูกจำกัดด้วยปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่ำ ในหน่อไม้ฝรั่ง เยอบีร่า และสับปะรด ความเข้มแสงที่เหมาะสมในระยะเพิ่มจำนวนคือ 1,000 ลักซ์ ส่วนในระยะที่ต้องการให้ต้นพืชเจริญเตรียมออกรากต้องการความเข้มแสงคือ 1,000-3,000 ลักซ์ โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน การให้แสงที่มีความเข้มในระดับนี้มีร้อยละการรอดตายสูงเมื่อย้ายปลูกลงดิน

-ระยะเวลาในการให้แสง ไม่ค่อยมีนักวิจัยทดลองด้านช่วงแสง กับการเจริญของเนื้อเยื่อในสภาพหลอดแก้วมากนัก โดยทั่วไปมักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้รับแสง 14-16 ชั่วโมง บางครั้งได้รับตลอด 24 ชั่วโมง หรือเลี้ยงในที่มืด เช่น การเลี้ยงแคลลัส การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ โดยหลักการแล้วช่วงแสงที่เหมาะสมควรเป็นช่วงแสงที่พืชนั้นเจริญอยู่ในธรรมชาติ ช่วงแสงมีอิทธิพลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อ ในการเจริญเป็นราก และยอดของเนื้อเยื่อแคลลัสยาสูบ และเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของหน่อไม้ฝรั่ง ช่วงแสงที่เหมาะสมคือ 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยใช้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกะหล่ำเพื่อให้สร้างยอดใช้ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ โดยรับช่วงแสง 9 ชั่วโมงต่อวัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลำต้นขององุ่นพันธุ์ที่เป็นวันสั้นเกิดรากเมื่อได้รับวันสั้น แต่ถ้าเพาะเลี้ยงองุ่นวันยาวออกรากเมื่อพืชได้รับวันยาว อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการให้แสงกับความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มของแสงมีความสัมพันธ์กัน เช่น ถ้าให้แสงที่มีความเข้มสูงอาจใช้ระยะเวลาในการให้แสงน้อยลง เป็นต้น

-คุณภาพของแสง จากการทดลองพบว่าแสงสีแดง (red light) และแสงสีน้ำเงิน (blue light) เป็นต้นกระตุ้นให้เกิดยอดของพืชหลายชนิด

2. อุณหภูมิ (temperature) อุณหภูมิที่ใช้มักคงที่ประมาณ 24-26 องศาเซลเซียส ในการทดลองอาจเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส หรือสูงถึง 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช มักต่ำกว่าในธรรมชาติจึงควรเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต่ำกว่าธรรมชาติ อุณหภูมิที่ต่ำมากเกินไปเช่นเย็นจัดถึง 4 องศาเซลเซียส ทำให้พืชหยุดการเจริญเติบโต บางครั้งพืชต้องการอุณหภูมิต่ำสลับการอุณหภูมิสูง เช่น การสร้างรากของทานตะวันจะดีขึ้นถ้าเพาะเลี้ยงให้ได้รับอุณหภูมิกลางวัน 26 องศาเซลเซียส กลางคืน 15 องศาเซลเซียส การเลี้ยงแคลลัสของพืชบางชนิดให้ผลเช่นเดียวกัน อุณหภูมิทำให้พืชเกิดการพ้นระยะการพักตัว (break dormancy) ใน gladiolus hortulans หัวหรือต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพัฒนาเป็นต้นพืชที่ปลูกลงดินได้ต้องเลี้ยงที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส นาน 4-6 สัปดาห์ ก่อนการย้ายลงดินเช่นเดียวกับต้นลิลี่พักตัวจึงต้องทำให้พ้นระยะการพักตัวโดยเลี้ยงที่ในที่มีคอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ก่อนย้ายปลูก

3. ความชื้น (humidity) เนื่องจากความชื้นในหลอดแก้วค่อนข้างสูง ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงต่ำ เกิดการสูญเสียน้ำภายในหลอดส่งผลทำให้อาหารแห้งเร็ว แต่ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงสูงเกิดไปเอื้ออำนวยให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ดี เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย และในบางครั้งถ้าความชื้นภายในหลอดทดลองสูงมากทำให้พืชเกิดอาการฉ่ำน้ำ

4. ออกซิเจน (oxygen) เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ การเลี้ยงบนอาหารเหลวอาจใช้วิธีเพาะเลี้ยงบนสะพานกระดาษ หรือ วางบนเครื่องเขย่า คาร์บอนไดออกไซด์แม้ว่าเป็นแหล่งพลังงานของพืชซึ่งเกิดการสังเคราะห์แสงแต่ถ้าเกิดการสะสมมากเกินไปทำให้เป็นอันตราย

2.2.2.3 ปัจจัยอื่นๆ ได้แก่

1. ขนาดของชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง (size of explant) ขนาดของชิ้นส่วนมีความสำคัญต่อการประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือการเกิดการเกิดลักษณะรูปร่างมาก การใช้ชิ้นส่วนขนาดใหญ่มีโอกาสประสบความสำเร็จมากกว่าการใช้ชิ้นส่วนขนาดเล็ก

2. สภาพของการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture condition) หมายถึง สภาพภายในภาชนะที่เลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น สภาพของอาหารเป็นอาหารแข็งหรืออาหารเหลว เนื้อเยื่อบางชนิดเกิดลักษณะรูปร่างได้บนอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารวุ้น แต่ไม่เกิดลักษณะรูปร่างในอาหารเหลว เช่น กล้วยไม้ แต่เนื้อเยื่อบางชนิดสามารถเกิดลักษณะรูปร่าง ได้ทั้งบนอาหารกึ่งแข็ง และในอาหารเหลว หรือถ้าปริมาณออกซิเจนภายนภาชนะที่ใช้เลี้ยงมาก คาร์บอนไดออกไซด์น้อย เนื้อเยื่อเจริญเป็นราก แต่ถ้าปริมาณออกซินน้อย คาร์บอนไดออกไซด์มากเนื้อเยื่อเจริญเป็นยอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การเปลี่ยนอาหาร (subculture) การย้ายเนื้อเยื่อจากอาหารเก่าไปยังอาหารใหม่หลายๆ ครั้งมีผลทำให้การเกิดการเกิดลักษณะรูปร่างลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซมขึ้น ซึ่งสาเหตุที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด

2.2.3 ส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.2.3.1 สารอนินทรีย์ อันได้แก่ ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง ซึ่งต้องเป็นสารที่มีความบริสุทธิ์สูง

2.2.3.2 สารอินทรีย์ ได้แก่

1. สารที่ให้พลังงาน เช่น น้ำตาลซูโครส นิยมใช้ในปริมาณ 20-40 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร

2. วิตามิน ได้แก่ วิตามินบี 1 ไนอาซิน กรดนิโคตินิก มายโยอินโนซิตอล ในสภาพธรรมชาติ พืชส่วนใหญ่สังเคราะห์ได้เองบางส่วน แต่ยังไม่มากพอที่ช่วยให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดีได้ จึงต้องเติมวิตามินลงไป

3. สารควบคุมการเจริญเติบโต กลุ่มที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ สารกลุ่มออกซิน และไซโทไคนิน

-สารกลุ่มออกซิน มีหน้าที่กระตุ้นให้เกิดราก ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ เช่น Indole-3-acetic acid (IAA), Indole-3-butyric acid (IBA), 1-Naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เป็นต้น

-สารกลุ่มไซโทไคนิน มีหน้าที่กระตุ้นให้เกิดยอดจำนวนมาก ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ เช่น N6-benzylaminopurine (BAP) หรือ Benzyladenine (BA), Kinetin (KN), Thidiazuron (TDZ), Zeatin (ZN) เป็นต้น

4. สารอินทรีย์อื่นๆ จากธรรมชาติ เช่น น้ำผลไม้ น้ำมะพร้าวอ่อน น้ำมะเขือเทศ มันฝรั่ง กล้วยบด สารสกัดจากยีสต์ เป็นต้น

2.2.3.3 สารประกอบที่ทำให้อาหารแข็งตัว ได้แก่ วุ้น เจลไรต์ (gelrite) ไฟต้าเจล (phytagel) ดิฟโคแบคโตอะก้า (difo-bacto agar) เป็นต้น

2.2.3.4 สารประกอบอื่นๆ ได้แก่ ผงถ่าน (activated charcoal) ช่วยดูดซับสารพิษสีน้ำตาลหรือดำ (phenolic compound) ที่ขับออกมาจากชิ้นส่วนพืชลงสู่อาหารเพาะเลี้ยง อะดีนีนซัลเฟต (adenine sulfate) ช่วยกระตุ้นการเกิดยอดในพืชบางชนิด สารพีวีพี (polyvinyl pyrrolidone) และกรดแอสโคบิค (ascorbic acid) ช่วยป้องกันการเกิดสารสีน้ำตาลในชิ้นส่วนพืช

2.2.3.5 น้ำ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปกติทั่วไปมักนิยมใช้น้ำกรอง ในขณะที่ในสภาพการทดลองวิจัย ต้องใช้น้ำกลั่น

2.2.4 สูตรอาหาร (http://www.nstrc.rmutsv.ac.th/Departments/plantscience/medium.htm)

2.2.4.1 อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) สามารถใช้ได้ในพืชเกือบทุกชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4.2 อาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949) นิยมใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

2.2.4.3 อาหารสูตร WPM (Woody Plant Medium; Lloyd and McCown, 1980) นิยมใช้เพาะเลี้ยงพืชที่เป็นไม้เนื้อแข็ง

2.2.4.4 อาหารสูตร Y3 (Eeuwens, 1967) นิยมใช้ในพืชตระกูลปาล์ม

2.2.4.5 อาหารสูตร B5 (Gamborg, 1970) นิยมใช้เพาะเลี้ยงพืชไร่ที่สำคัญทางเศรษฐกิจ

2.2.4.6 อาหารสูตร Miller (1963) ใช้เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าว

2.3 เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) (http://web.ku.ac.th/schoolnet/snet4/genetics/pcr.htm)

Polymerase Chain Reaction หรือ PCR เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้น และได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation

จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลายๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุล และพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น

2.3.1 หลักการของพีซีอาร์

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่เทคนิค PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ปฏิกิริยาพีซีอาร์มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียน ต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

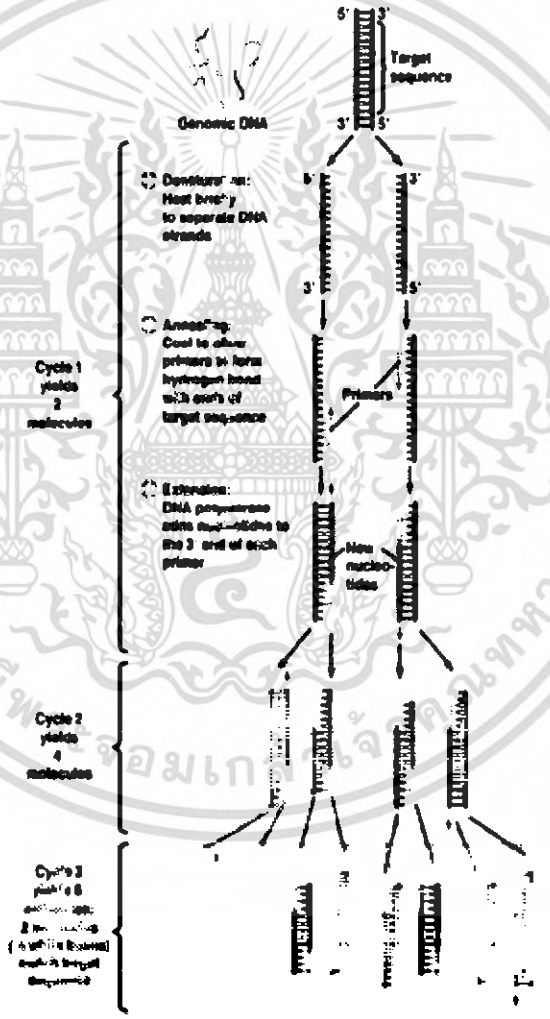
ขั้นแรก เรียกว่า Denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95 องศาเซลเซียส

ขั้นที่สอง เรียกว่า Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลง และจัดให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-13 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นที่สาม เรียกว่า Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสที่ใช้ควรคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ ให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลายๆ รอบสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย โดยปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอได้ไม่น้อยกว่า 100,000 เท่า (รูปที่ 2.16)



รูปที่ 2.16 แสดงขั้นตอนปฏิกิริยา PCR (http://www.copernicusproject.ucr.edu/ssi/HSBiologyResources.htm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เนื่องจากการทำเทคนิค PCR เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในหลอดทดลอง จึงต้องมีการเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้

2.3.2.1 Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (DNA polymerase)

2.3.2.2 ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์

2.3.2.3 ไพรเมอร์ เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ

2.3.2.4 PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น ความเป็นกรด-ด่าง และเกลือต่างๆ ซึ่งต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม (Mg^{++}) อยู่ด้วย

2.3.2.5 ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) หรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ

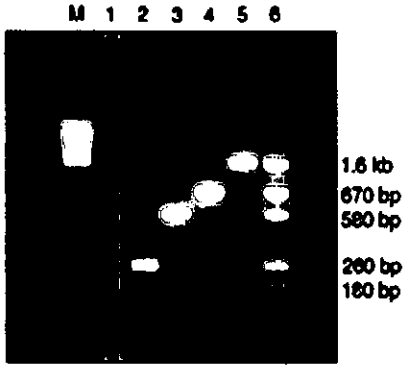
2.3.3 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine)

เครื่อง Thermal cycle หรือ PCR machine เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำ PCR ซึ่งเครื่องนี้มีอยู่หลายแบบและหลายระบบ ขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัทผู้ผลิต ข้อสำคัญคือ ต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้ และทำงานหมุนเวียนกันหลายๆ รอบได้ตั้งโปรแกรมการทำงานได้ และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนัก ระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นคือ denaturing annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง (http://www.barascientific.com/bscnews/forum/DNA/dna_6.php?poll_id=10)

2.3.4 การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

ดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลอง ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิตต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหาดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า อะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟริซิส (agarose Gel electrophoresis) ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ไปได้ขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอ และกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งเกิดการเรืองแสงเมื่อเจอกับแสงอุลตร้าไวโอเลต และเห็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสงบนแผ่นวุ้น (รูปที่ 2.17) (http://www.barascientific.com/bscnews/forum/DNA/dna_6.php?poll_id=10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.17 แถบดีเอ็นเอที่แยกบนแผ่นวุ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟริซิส (http://www.zenon bio .hu/viogene/pf.html)

2.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์พืชในระดับโมเลกุล (http://cropthai.ku.ac.th/biotech/abs/mole.html)

การแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ โดยอาศัยลักษณะทางกายภาพหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชนั้นอาจมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคต่างๆ ในการหาความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยความแตกต่างในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ ได้แก่ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), STS (Sequence-Tagged Site), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism DNA) และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) เทคนิคเหล่านี้ทำให้เกิดความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอซึ่งใช้ในการบ่งชี้และจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนหรือเครื่องหมายของลักษณะใดลักษณะหนึ่งที่เรียกว่า เครื่องหมายระดับโมเลกุล (molecular marker)

เครื่องหมายระดับโมเลกุล เป็นเครื่องหมายที่ใช้ในการตรวจสอบหรือบอกตำแหน่งภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ที่ใช้กันทั่วไปมี 2 ชนิดคือ

1. โปรตีน (ในรูปไอโซไซม์)
2. กรดนิวคลีอิค (ในรูปของดีเอ็นเอ)

สำหรับการใช้เครื่องหมายระดับโมเลกุลในรูปของดีเอ็นเอได้พัฒนาไปมาก มีการดัดแปลงเทคนิคต่างๆ ให้สามารถใช้ในการตรวจสอบพืชซึ่งมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป ในงานทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถนำมาใช้ได้ดังนี้

1. การตรวจสอบเชื้อพันธุกรรมพืช เพื่อกำจัดพันธุ์พืชที่ซ้ำๆ กันจากการจดบันทึกที่ผิดพลาดได้ และยังสามารถใช้เป็นตัวชี้เชื้อพันธุกรรมที่มีความหลากหลาย ที่เป็นแหล่งยีนสำหรับแผนการปรับปรุงพันธุ์ที่มีเป้าหมายให้ได้ลักษณะที่มีความเฉพาะเจาะจง และการจำแนกพ่อแม่และลูกได้อย่างถูกต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ใช้เป็นเครื่องหมายในการทำแผนผังจีโนมของพืช เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เฉพาะของพืชแต่ละพันธุ์ และสร้างเป็นระบบฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ได้

3. การศึกษายีนควบคุมลักษณะปริมาณ

4. ตรวจสอบรุ่นลูกที่ได้จากการผสมกลับ

5. ตรวจสอบ homology ของพืชชนิดต่างๆ

6. ใช้ในการโคลนยีนที่ต้องการ

2.4.1 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) (http://www.rspg.thaigov.net/information/information_11-2.htm)

คือ รูปแบบของแถบชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกแยกจากกันบนตัวกลาง ตามโครงสร้างของดีเอ็นเอของพืช ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะต้น ยกเว้นฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียว (monozygotic twin) หรือพืชโคลนเดียวกันหรือสายพันธุ์บริสุทธิ์ หรือลูกผสมเดียวกัน ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังกล่าวในพืชแต่ละต้นสามารถตรวจสอบซ้ำและให้ผลที่เหมือนกันตลอด ดังนั้นข้อดีของการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือ สามารถตรวจสอบหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของพืชแต่ละต้นได้ สามารถทำซ้ำๆ กัน และได้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง

2.4.1.1 วัตถุประสงค์ของการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อจำแนกพันธุ์พืช

1. เพื่อใช้ไมเลกุลเครื่องหมายในการจำแนกพันธุ์พืช

2. เพื่อให้เห็นความแตกต่างทางชีวไมเลกุลของพืชซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างได้โดยการมองด้วยสายตา

3. เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคตได้ โดยช่วยในการตรวจสอบ somaclonal variation ในกรณีที่มีการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

4. ช่วยในการตรวจสอบ linkage ระหว่างตำแหน่งดีเอ็นเอ (DNA marker) กับลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อพันธุ์พืช เช่น ต้านทานโรค แมลง ฯลฯ เพื่อช่วยในการคัดเลือก และหาตำแหน่งยีนบนโครโมโซม

5. ช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการ ได้เร็วยิ่งขึ้น โดยไม่ต้องรอออกดอก หรือผล

6. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจดสิทธิบัตรรับรองพันธุ์พืช

2.4.1.2 ข้อดีของการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการตรวจสอบพันธุ์พืช

1. สามารถทำซ้ำได้ง่ายให้ผลแม่นยำ

2. สามารถทำได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจหาเอนไซม์หรือโปรตีนซึ่งต้องมีการแสดงออกของยีน จึงต้องเลือกชนิดของเนื้อเยื่อ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการศึกษา ตัวอย่างเช่น โปรตีนบางชนิดพบในส่วนดอกหรือผล จึงทำได้ในระยะที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่เท่านั้น

3. ใช้ตัวอย่างปริมาณน้อย กรณีการปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถคัดเลือกพันธุ์ได้ตั้งแต่ระยะต้นอ่อน โดยไม่จำเป็นต้องปลูกและรอให้ต้นโตเสียก่อน

4. เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งมีเท่ากันในทุกเซลล์ จึงสามารถใช้ส่วนใดของพืชในการศึกษาก็ได้ เช่น ดอก ใบ เมล็ด และเหง้า เป็นต้น

5. สามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ (trait) ได้ เช่น การต้านทานต่อแมลง โดยที่ไม่ต้องทำการปลูกพืชให้โตแล้วรอสังเกตผลในแปลงทดลองช่วยให้ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่าย

6. ช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ เนื่องจากไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม ส่วนของพืชที่ใช้ตรวจ หรือพื้นที่การเพาะปลูกมาเกี่ยวข้อง

7. ใช้ตรวจสอบพืชว่าเป็นพันธุ์พื้นเมือง หรือพันธุ์ที่ได้รับการคุ้มครองสิทธิบัตร หรือตรวจสอบระหว่างพันธุ์แท้กับพันธุ์ลูก

8. เทคโนโลยีมีการพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว ทำให้ค่าใช้จ่ายถูกลง และทำได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

2.4.2 เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

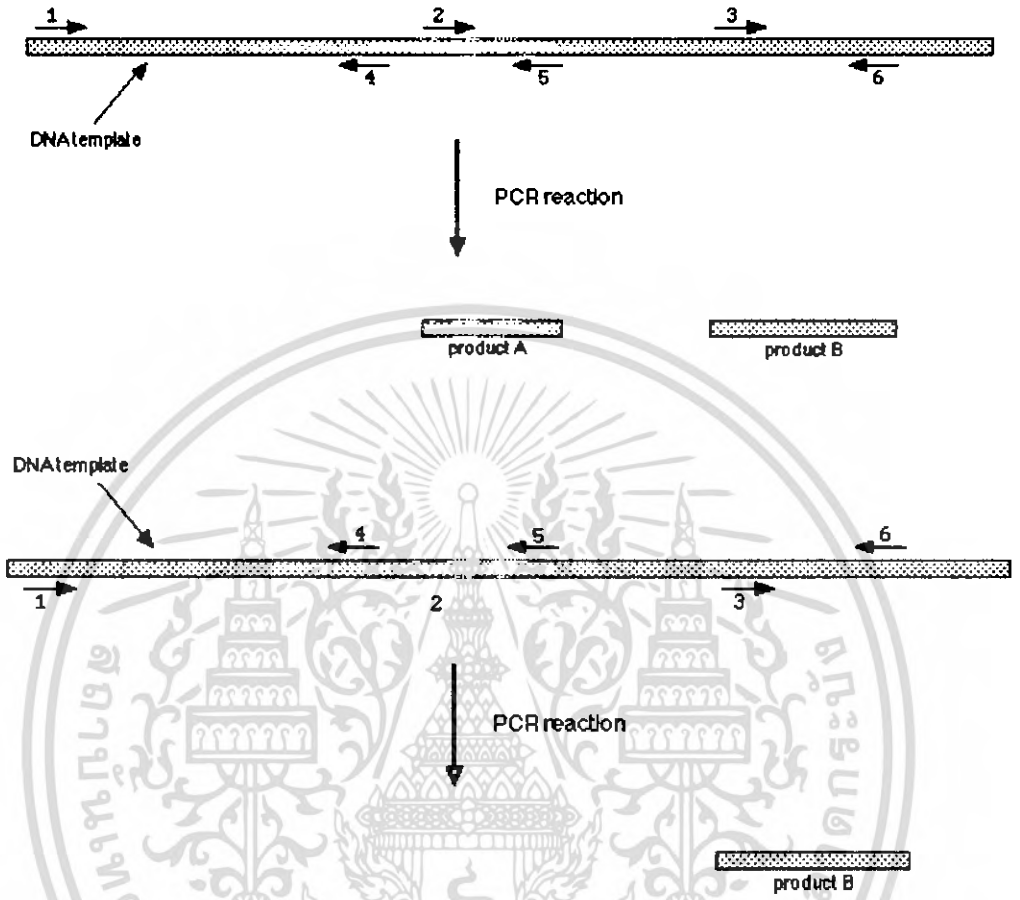
เป็นเทคนิคที่ระบุตำแหน่งชนิด dominant marker ที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เป็นเทคนิคที่อาศัยพื้นฐานของการทำพีซีอาร์ เพื่อแก้ปัญหาการขาดไพรเมอร์ โดยการสร้างไพรเมอร์ขึ้นมาเองจากการสุ่มลำดับเบส โดยไพรเมอร์ที่ใช้เป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (arbitrary primer) และมีขนาดสั้นๆ 10-20 นิวคลีโอไทด์ เนื่องจากไพรเมอร์เป็นเส้นสั้นๆ จึงเป็นการเปิดโอกาสให้สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้มากขึ้นและเป็นไปแบบสุ่ม (รูปที่ 2.18) ทำให้มีโอกาสที่จะเพิ่มส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ทราบข้อมูลใดเลย ดังนั้นการทำซ้ำแต่ละครั้งอาจได้ผลไม่เหมือนกัน หลังจากนั้นแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟริซิส และตรวจสอบโดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ในทางปฏิบัติต้องทดลองใช้ไพรเมอร์หลายๆ ชนิด เพื่อดูว่าไพรเมอร์ใดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ (http://cropthai.ku.ac.th/biotech/abs/mole.html), (http://web.ku.ac.th/schoolnet/snet4/july8/pl_gen.htm)

แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเป็นผลจากการที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ 2 บริเวณที่อยู่ไม่ไกลกันมาก โดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางเข้าหากัน (5' --> 3') จึงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวได้ แต่ถ้าไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอสายเดียวกันในทิศทางเดียวกัน หรือเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายแต่ทิศทางแยกจากกัน ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

ข้อดี ของเทคนิค RAPD คือ ง่าย ไม่ซับซ้อนยุ่งยาก สะดวก รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายค่อนข้างต่ำ ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจำนวนน้อย และไม่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสีย เมื่อทำซ้ำมักให้ผลที่ไม่เหมือนเดิม และในการทำต้องการความสม่ำเสมอ พร้อมทั้งความถูกต้องในแต่ละครั้งมาก (http://cropthai.ku.ac.th/biotech/abs/mole.html)



รูปที่ 2.18 การจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบแบบสุ่ม (http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapd.html)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุ สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ สารเคมี และอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุ

3.1.1.1 วัสดุสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

วานิลา 2 สายพันธุ์ คือ *V. planifolia*, *V. pilifera*

3.1.1.2 วัสดุสำหรับเทคนิค RAPD

วานิลา 6 สายพันธุ์ คือ *V. planifolia* (VPLA), *V. pilifera* (VPIL), *V.*siamemsis (VS), *V.albida* (VALB), *V.aphylla* (VA), *V.planifolia varigata* (VVAR)

3.1.1.3 DNA Template

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารเคมีสำหรับเทคนิค RAPD

1. Deoxynucleotides (dNTPs)
2. Taq DNA Polymerase
3. Primer

   OPA-07, OPA-20, OPB-14, OPB-18, OPC-04 และ OPC-07 (ตารางที่ 3.1)
4. PCR buffer
5. Sterile water for injection

3.1.2.2 สารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร MS
2. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ BA IBA และ NAA
3. สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่

   -คลอรอกซ์

   -Tween 20
4. แอลกอฮอล์ร้อยละ 95
5. น้ำตาลซูโครส
6. วุ้นอะกาโรส

3.1.3 อุปกรณ์

3.1.3.1 บีกเกอร์ ขนาด 250 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.3.2 แท่งแก้วคนสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3.3 กระบอกตวง ขนาด 200 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.3.4 ช้อนตักสารเคมี (spatula)

3.1.3.5 ขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 100 200 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.3.6 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1.3.7 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 150 250 มิลลิลิตร

3.1.3.8 จานแก้ว

3.1.3.9 หลอดทดลอง

3.1.3.10 ปิเปตต์แก้ว 1 5 และ 10 มิลลิลิตร

3.1.3.11 ปากคีบขนาดต่างๆ

3.1.3.12 มีดผ่าตัด

3.1.3.13 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Bunsen burner)

3.1.3.14 ไมโครเวฟ (Microwave oven)

3.1.3.15 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air-flow cabinet)

3.1.3.16 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

3.1.3.17 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

3.1.3.18 ไมโครปิเปตต์ และทิปขนาดต่างๆ (Micropipet and Tips)

3.1.3.19 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด และหยาบ (Balance)

3.1.3.20 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.1.3.21 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal Cycle machine)

3.1.3.22 เครื่องเขย่า (Shaker or Rotator)

3.1.3.23 ชุดสกัดดีเอ็นเอ DNeasy Plant Mini Kit

3.1.3.24 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.1.3.25 โกร่ง

3.1.3.26 เจลอิเล็คโทรโฟริซิส

3.1.3.27 กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (Stereo Microscope)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ 6 ชนิดที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์

ไพรเมอร์	ลำดับเบส
OPA-07	5 ' GAAACGGGTG 3 '
OPA-20	5 ' GTTGCGATCC 3 '
OPB-14	5 ' TCCGCTCTGG 3 '
OPB-18	5 ' CCACAGCAGT 3 '
OPC-04	5 ' CCGCATCTAC 3 '
OPC-07	5 ' GTCCCGACGA 3 '

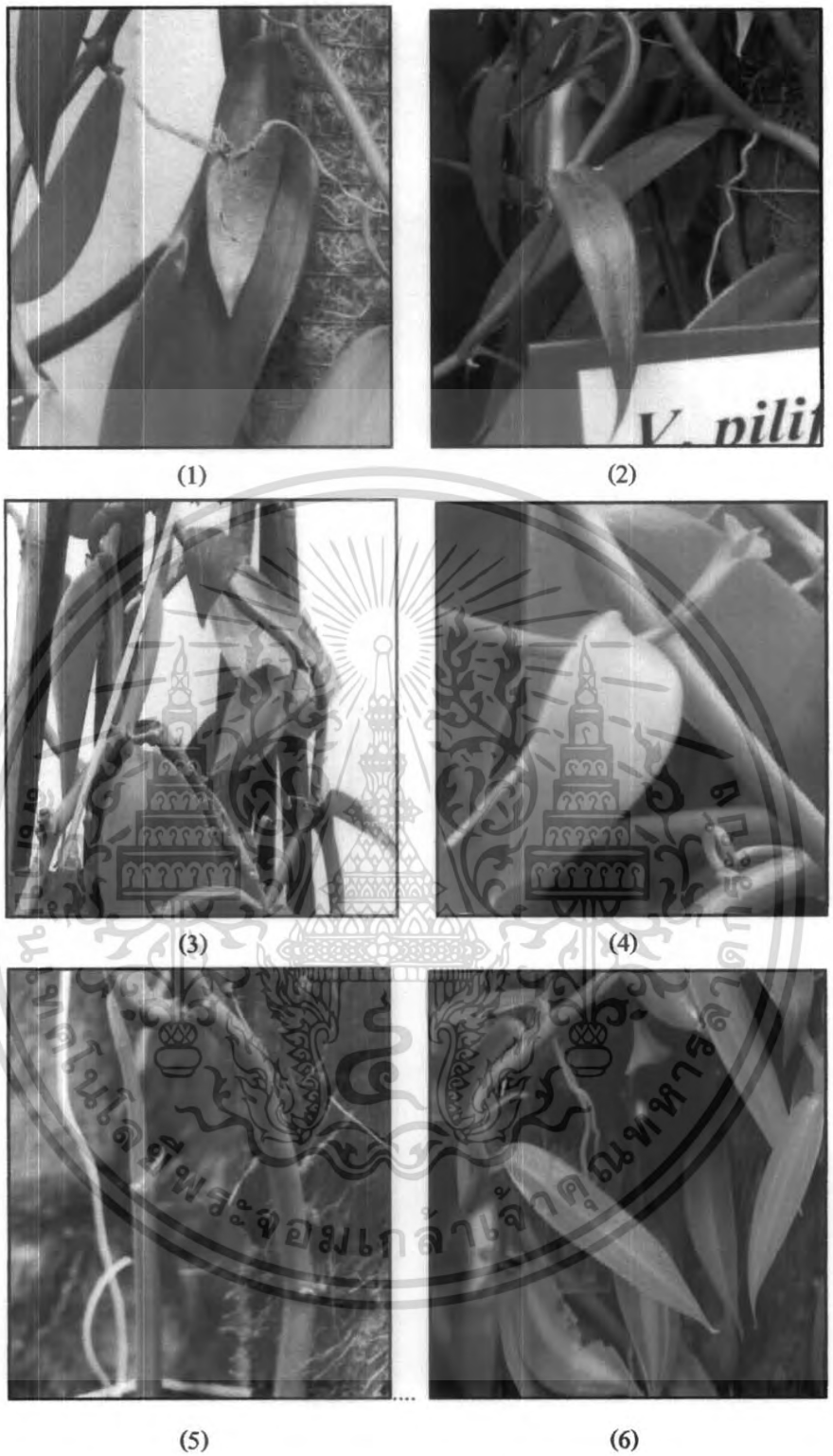
3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การคัดแยกสายพันธุ์วานิลาโดยใช้เทคนิค RAPD

3.2.1.1 สกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากส่วนใบของวานิลาทั้ง 6 สายพันธุ์ (รูปที่ 3.1) โดยใช้ DNeasy Plant Mini Kit

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 ใบวานิลาสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง (1) *V. planifolia,* (2) *V.pilifera,* (3) *V. siamensis,* (4) *V. albida,* (5) *V.aphylla*, (6) *V. planifolia variegata*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.2 เทคนิค RAPD

ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR

ในปฏิกิริยาเตรียมสารรวมทั้งหมด 15 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย sterile water, 10X PCR buffer, Mix dNTP, ไพรเมอร์ที่ใช้มี 6 ชนิด คือ OPA-07, OPA-20, OPB-14, OPB-18, OPC-04 และ OPC-07 ซึ่งเป็นที่มีลำดับเบสเป็นแบบสุ่มไม่จำเพาะเจาะจง, Magnesium Chloride, Taq DNA polymerase และ DNA template 100 นาโนกรัม (ตารางที่ 3.2) หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR

สาร	ปริมาตร
1. 10X PCR buffer	2.0 ไมโครลิตร
2. Mix dNTP (1.25 มิลลิโมลาร์)	3.2 ไมโครลิตร
3. ไพรเมอร์ (20 พิโคโมล)	1.0 ไมโครลิตร
4. Magnesium Chloride (50 มิลลิโมลาร์)	1.2 ไมโครลิตร
5. Tag DNA Polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.2 ไมโครลิตร
6. DNA template (100 นาโนกรัม)	X ไมโครลิตร
7. Sterile water	15-X ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	15

ตารางที่ 3.3 ปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนของเทคนิค RAPD

ปฏิกิริยาในแต่ละขั้น	อุณหภูมิและเวลา	จำนวนรอบซ้ำ
Initiation Denaturing Step	94 องศาเซลเซียส 5 นาที	1
Denaturing Step	94 องศาเซลเซียส 1 นาที	45
Annealing Step	36 องศาเซลเซียส 1 นาที	
Extention Step	72 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที	
Final Extention Step	72 องศาเซลเซียส 10 นาที	1

3.2.1.3 การวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณดีเอ็นเอ

1. ปริมาณดีเอ็นเอ

โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร หลังจากนั้นทำการคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอ โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณดีเอ็นเอ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร x 50 x Dilution Factor

2. ความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ

ค่า O.D.260/O.D.280 = 1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอบริสุทธิ์

ค่า O.D.260/O.D.280 < 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีน และสารประกอบฟีนอล

ค่า O.D.260/O.D.280 > 2.0 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ

3. ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟริซีสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder) ขนาด 50 และ 100 bp

3.2.2 ทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการเจริญเติบโตของตาข้าง ของวานิลาเพื่อชักนำให้เจริญเติบโตเป็นต้นใหม่

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ดัดแปลงที่มีการเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร วุ้นอะกาโรส 0.7 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ ไซโตไคนิน (BA) และออกซิน (IBA และ NAA) โดยมีความเข้มข้น 0.5-3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.4) ทำการปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 5.8 ก่อนนำเข้าเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบใช้ความดัน (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนตาข้าง และตายอดของ *V. planifolia* และ *V. pilifera* ล้างทำความสะอาด นำไปแช่แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกภายนอกออกเป็นเวลา 1-2 นาที ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ โดยใช้ความเข้มข้นคลอรอกซ์ร้อยละ 30-40 ที่มีการเติม Tween-20 ผสมให้เข้ากันและแช่ตลอด 30 นาที นำเข้าตู้ปลอดเชื้อหลังจากนั้นทำการล้างชิ้นส่วนเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้งๆ ละ 4-6 นาที นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อวางบนจานแก้วที่มีทิชชูผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ พร้อมทั้งทำการตัดแต่งชิ้นส่วนเนื้อเยื่อให้เหลือเฉพาะส่วนตาข้างที่ต้องการนำส่วนตาข้างและตายอดที่ได้เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สังเกตการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อวานิลาพร้อมทั้งทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเหลว (อาหารที่ไม่มีการเติมวุ้น) ทุกๆ 1-2 สัปดาห์ ประมาณ 2-3 ครั้ง สุดท้ายทำการย้ายเนื้อเยื่อลงในอาหารแข็ง (อาหารที่มีการเติมวุ้น)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 สูตรอาหาร MS ดัดแปลง

สูตร	BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)
MS 1	0.5	0.5	-
MS 2	0.5	1	-
MS 3	1	0.5	-
MS 4	1	1	-
MS 5	3	0.5	-
MS 6	3	1	-
MS 7	0.5	-	1
MS 8	0.5	-	3
MS 9	1	-	1
MS 10	1	-	3
MS 11	3	-	1
MS 12	3	-	3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การทดลองเพื่อศึกษาและวิเคราะห์การจำแนกสายพันธุ์ของวานิลาโดยใช้เทคนิค RAPD

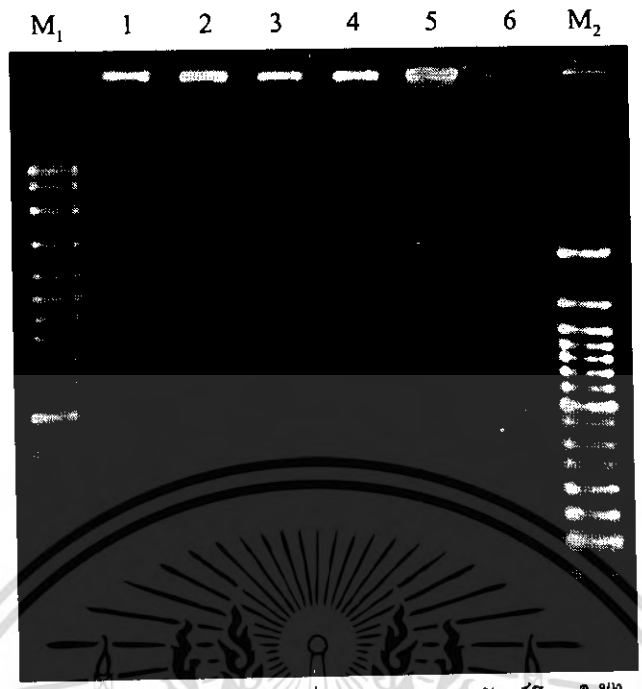
ในการทดลองได้ทำการศึกษาและจำแนกสายพันธุ์วานิลา 6 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 6 ชนิด จากการทดลองสามารถจัดจำแนกได้ 4 สายพันธุ์ที่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ส่วน 2 สายพันธุ์ไม่สามารถจัดจำแนกได้เนื่องจากไม่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือ VALB 2 และ VVAR 1

สามารถจัดจำแนกไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองได้ 2 กลุ่ม คือ ไพรเมอร์ที่สามารถใช้ในการแยกสายพันธุ์ได้มี 5 ชนิด คือ OPA-07, OPA-20, OPB-18, OPC-04 และOPB-07 ส่วนไพรเมอร์ที่ไม่สามารถจำแนกได้มี 1 ชนิด คือ OPB-14 (รูปที่ 4.3)

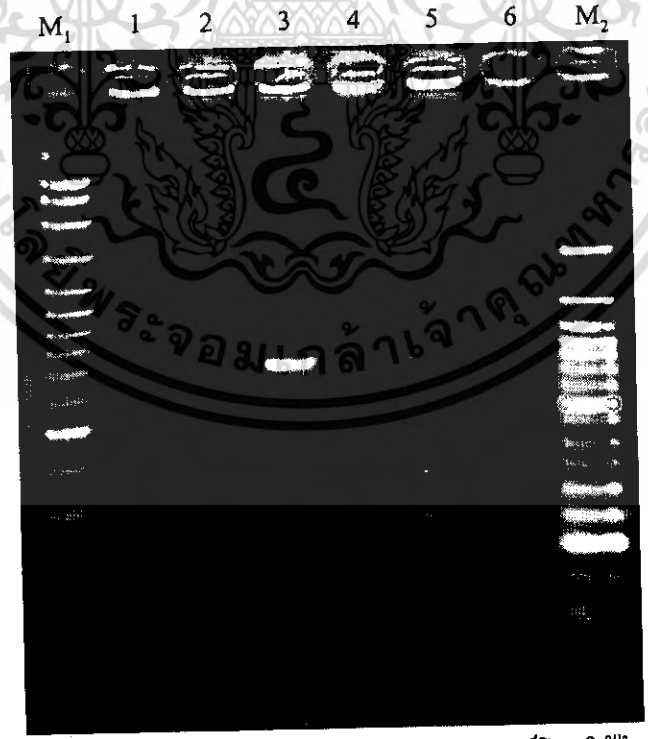
สำหรับไพรเมอร์ที่สามารถใช้ในการแยกสายพันธุ์ได้โดยไพรเมอร์ OPA-07 ได้ผลแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ 2 สายพันธุ์ ระหว่าง VPLA 5 และ VVAR 1 (รูปที่ 4.1) ไพรเมอร์ OPA-20 เกิดแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน 4 สายพันธุ์ คือ VPLA 5, VPIL 2, VS 2, และ VVAR 1 (รูปที่ 4.2) ไพรเมอร์ OPB-18 เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ VPLA 5, VS 2 และ VVAR 1 (รูปที่ 4.4) ไพรเมอร์ OPC-04 เกิดแถบดีเอ็นเอแตกต่าง 5 สายพันธุ์ คือ VPLA 1, VPIL 1, VPIL 2, VAS 1 และ VVAR 1 (รูปที่ 4.5) และไพรเมอร์ OPC-07 ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีแถบดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกันได้แก่ VPLA 5, VPIL 2, VS 2 และกลุ่มที่มีแถบดีเอ็นเอต่างจากกลุ่มแรก คือ VVAR 1 (รูปที่ 4.6)

ในปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของวานิลาด้วยวิธี RAPD โดยการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น ที่ยังไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของวานิลาได้ ทั้งนี้เนื่องมาจากไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนน้อย คือ 6 ชนิด แต่ก็สามารถเป็นแนวทางในการศึกษาต่อไปได้ ดังเช่น Besse และคณะ (2004) ใช้เทคนิค RAPD ไพรเมอร์ที่ใช้ คือ OPC-01, -02, -04, -05, -07, -09, -11 และ 13 พบว่า *V. planifolia* มีความสัมพันธ์กับ *V. tahitensis* ส่วนสายพันธุ์ *V. pompona* นั้นไม่มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กัน ซึ่งสามารถแยกวานิลา 3 สายพันธุ์นี้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



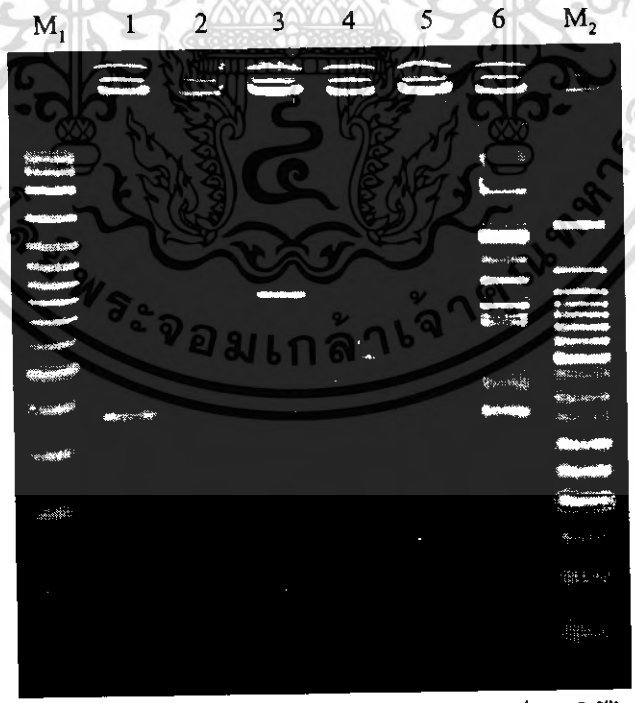
รูปที่ 4.1 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์วานิลา 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-07 ช่อง (M_1) 100 bp DNA Ladder, (1) VPLA 5, (2) VPIL 2, (3) VS 2, (4) VALB 2, (5) VA 1, (6) VVAR 1 และ (M_2) 50 bp DNA Ladder



รูปที่ 4.2 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์วานิลา 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-20 ช่อง (M_1) 100 bp DNA Ladder, (1) VPLA 5, (2) VPIL 2, (3) VS 2, (4) VALB 2, (5) VA 1, (6) VVAR 1 และ (M_2) 50 bp DNA Ladder

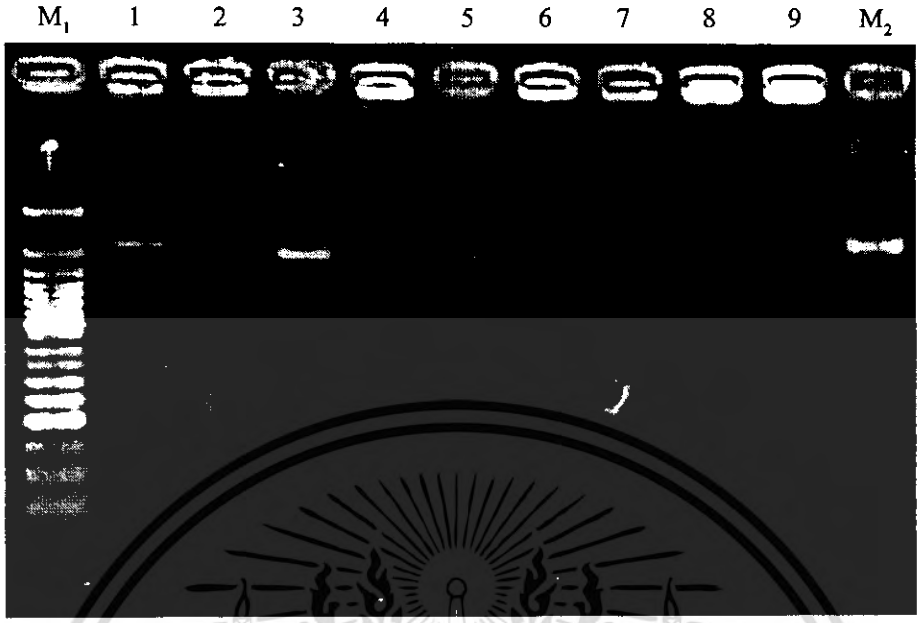
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.3 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์วานิลา 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-14 ช่อง (M_1) 100 bp DNA Ladder, (1) VPLA 5, (2) VPIL 2, (3) VS 2, (4) VALB 2, (5) VA 1, (6) VVAR 1 และ (M_2) 50 bp DNA Ladder



รูปที่ 4.4 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์วานิลา 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-18 ช่อง (M_1) 100 bp DNA Ladder, (1) VPLA 5, (2) VPIL 2, (3) VS 2, (4) VALB 2, (5) VA 1, (6) VVAR 1 และ (M_2) 50 bp DNA Ladder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์วานิลา 9 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-04 ช่อง (M_1) 50 bp DNALadder, (1) VPLA 1, (2) VPLA 5, (3) VPIL 1, (4) VPIL 2, (5) VS 1, (6) VS 2, (7) VALB 2, (8) VA 1, (9) VAS 1 และ (M_2) VVAR 1

รูปที่ 4.6 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์วานิลา 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-07 ช่อง (M_1) 100 bp DNA Ladder, (1) VPLA 5, (2) VPIL 2, (3) VS 2, (4) VALB 2, (5) VA 1, (6) VVAR 1 และ (M_2) 50 bp DNA Ladder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการเจริญเติบโตของตาข้าง ตายอดของวานิลาเพื่อชักนำให้เจริญเติบโตเป็นต้นใหม่

โดยทำการสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตาข้าง และตายอดของวานิลาจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *V. planifolia* และ *V. pilifera* และคำนวณอัตราการเจริญเป็นต้นใหม่ พร้อมทั้งนำผลที่ได้ของการเพาะเลี้ยงในแต่ละสูตรอาหารมาเปรียบเทียบเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้ โดยทำการทดลองเปรียบเทียบอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA และ IBA แตกต่างกัน 6 สูตรได้แก่ 0.5+0.5, 0.5+1, 1+0.5, 1+1, 3+0.5 และ 3+1 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ และอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA และ NAA แตกต่างกัน 6 สูตร ได้แก่ 0.5+1, 0.5+3, 1+1, 1+3, 3+1 และ 3+3 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งพบว่าวานิลาทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถพัฒนาส่วนตาข้างไปเป็นต้นใหม่ได้ ซึ่งต้นที่เกิดขึ้นมีสีเขียวเข้ม และสีเขียวอมเหลืองแตกต่างกันไปในแต่ละสูตรอาหาร (รูปที่ 4.11) และลักษณะการเจริญเป็นตุ่มเขียวจากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาทั้ง 2 สายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีปริมาณ BA, IBA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆมีลักษณะแตกต่างกันไป (รูปที่ 4.12 และ 4.13)

วานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้น 0.5+0.5, 0.5+1 และ 1+0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำตาข้างของวานิลาให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้ ส่วนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้น 1+1, 3+0.5 และ 3+1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถชักนำตาข้างของวานิลาให้เป็นต้นใหม่ได้ แต่สามารถชักนำตาข้างให้เจริญเป็นตุ่มสีเขียวได้ (ตารางที่ 4.1) เมื่อนำผลการทดลองมาคำนวณร้อยละการเจริญต้นใหม่ พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้น 0.5+1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4.2) จากนั้นนำข้อมูลมาเขียนกราฟได้ดังรูปที่ 4.7

วานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่ทำการเพาะเลี้ยงมีเฉพาะเพียงอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้น 3+0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้นที่สามารถชักนำตาข้างให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้ (ตารางที่ 4.3) เมื่อนำผลการทดลองมาคำนวณร้อยละการเจริญเป็นต้นใหม่ พบว่า อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้น 3+0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญเป็นต้นใหม่คิดเป็นร้อยละ 25 (ตารางที่ 4.4) จกนั้นนำข้อมูลมาเขียนกราฟได้ดังรูปที่ 4.8

วานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้น 0.5+1, 0.5+3, 1+1, 1+3, 3+1 และ 3+3 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ไม่สามารถชักนำตาข้างให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้ แต่อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้น 0.5+1, 0.5+3, 1+1และ 1+3 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ สามารถชักนำตาข้างให้เจริญเป็นตุ่มสีเขียวได้ (ตารางที่ 4.5) เมื่อนำผลการทดลองมาคำนวณร้อยละการเจริญเป็นตุ่มสีเขียว พบว่า อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BA และ NAA ความเข้มข้น 0.5+1 และ 1+1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญของตุ่มสีเขียวเท่ากัน คือ ร้อยละ 66.67จากนั้นนำข้อมูลมาเขียนกราฟได้ดังรูปที่ 4.9 ส่วนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้น 0.5+3 และ 1+3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญของตุ่มสีเขียวร้อยละ 50 และร้อยละ 33.33 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) จากนั้นนำข้อมูลมาเขียนกราฟได้ดังรูปที่ 4.9

วานิลสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้น 0.5+1, 0.5+3, 1+1, 1+3, 3+1 และ 3+3 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ไม่สามารถชักนำตาข้างให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้ แต่อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้น 0.5+1 และ 0.5+3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำตาข้างของวานิลาให้เจริญเป็นตุ่มสีเขียวได้เท่านั้น (ตารางที่ 4.7) เมื่อนำผลการทดลองมาคำนวณร้อยละการเจริยเป็นตุ่มสีเขียว พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้น 0.5+1 และ 0.5+3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดตุ่มสีเขียวร้อยละ 66.67 และร้อยละ 50 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8) จากนั้นนำข้อมูลมาเขียนกราฟได้ดังรูปที่ 4.10

ในปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของวานิลา โดยการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งยังไม่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมากนัก แต่ก็สามารถเป็นแนวทางในการศึกษาต่อไปได้ ดังเช่น การศึกษาของ Geetha และ Shetty (2000) ได้ทำการทดลองเลี้ยงวานิลา สกุล *Vanilla planifolia* ในอาหารสูตร MS มีการชักนำให้มีการเจริญเติบโตดีที่สุด และมีผลเสียน้อยกว่าอาหารสูตรอื่นๆ

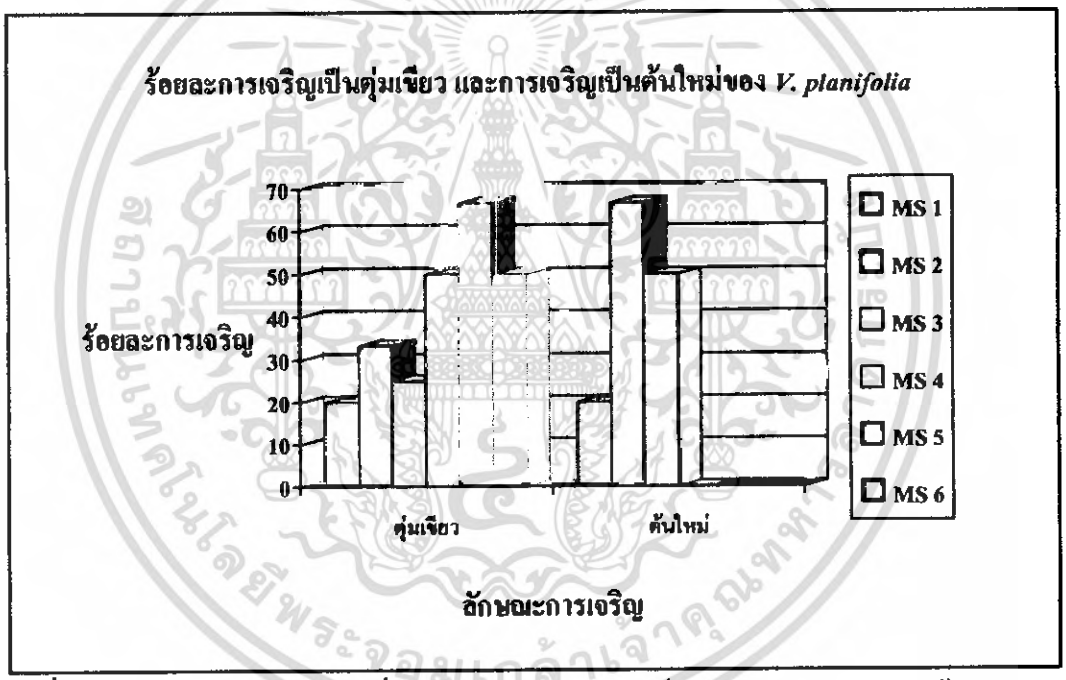
ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนตาของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่พัฒนาไปเป็นลักษณะต่างๆ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ 1BA ที่ความเข้มข้น 0.5+0.5, 0.5+1, 1+0.5, 1+1, 3+0.5 และ 3+1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหาร	จำนวนตาเริ่มต้น (ชิ้น)	จำนวนตาที่เริ่มเป็นตุ่มในระยะเวลา 1 เดือน (ชิ้น)	จำนวนตาที่เริ่มเป็นตุ่มในระยะเวลา 3 เดือน (ชิ้น)	จำนวนตาที่เป็นตุ่มสีเขียว (ชิ้น)	จำนวนตาที่เป็นตุ่มสีน้ำตาล (ชิ้น)	จำนวนตาที่เป็นต้น (ชิ้น)
MS 1	5	2	3	1	3	1
MS 2	3	2	1	1	-	2
MS 3	4	2	1	1	-	2
MS 4	4	-	3	2	1	-
MS 5	3	-	2	2	-	-
MS 6	2	1	-	1	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงร้อยละการเริ่มเจริญเป็นตุ่ม การเจริญเป็นตุ่มเขียว และการเจริญเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.5+0.5, 0.5+1, 1+0.5, 1+1, 3+0.5 และ 3+1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหาร	ร้อยละการเจริญเป็นตุ่มเขียว	ร้อยละการเจริญเป็นต้นใหม่
MS 1	20	20
MS 2	33.33	66.67
MS 3	25	50
MS 4	50	0
MS 5	66.67	0
MS 6	50	0



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงร้อยละการเริ่มเจริญเป็นตุ่ม การเจริญเป็นตุ่มเขียว และการเจริญต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS 1, MS 2, MS 3, MS 4, MS 5 และ MS 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

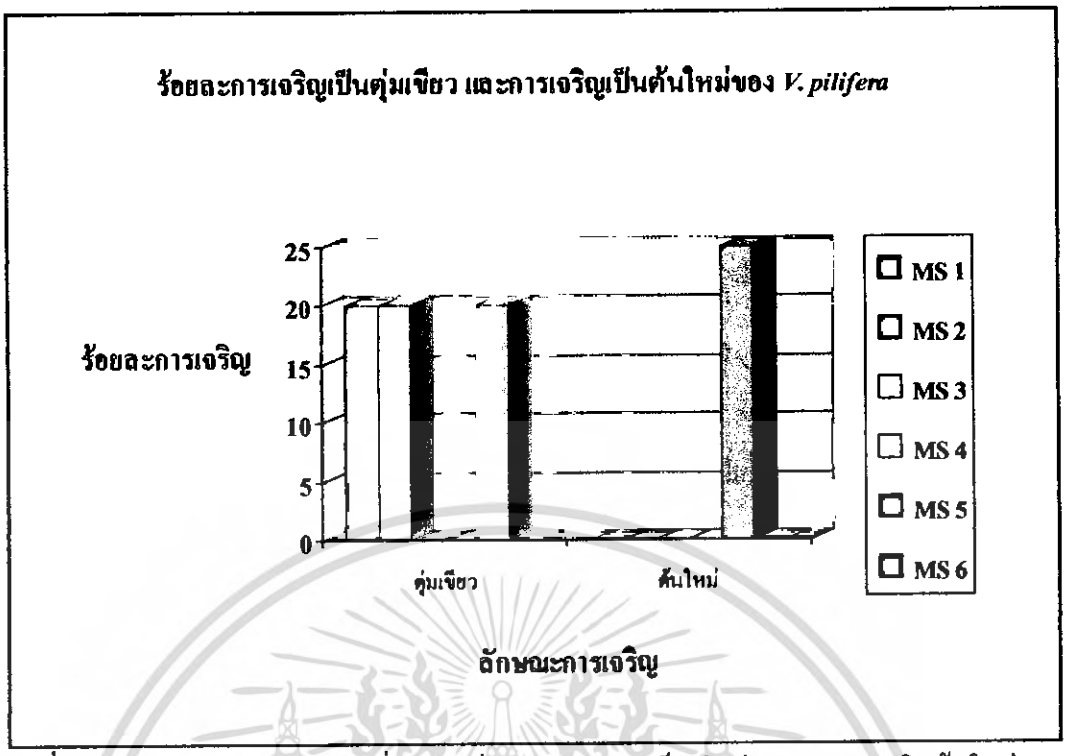
ตารางที่ 4.3 แสดงจำนวนตาของวานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่พัฒนาไปเป็นลักษณะต่างๆ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.5+0.5, 0.5+1, 1+0.5, 1+1,3+0.5 และ 3+1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหาร	จำนวนตาเริ่มต้น (ชิ้น)	จำนวนตาที่เริ่มเป็นตุ่มในระยะเวลา 1 เดือน (ชิ้น)	จำนวนตาที่เริ่มเป็นตุ่มในระยะเวลา 3 เดือน (ชิ้น)	จำนวนตาที่เป็นตุ่มสีเขียว (ชิ้น)	จำนวนตาที่เป็นตุ่มสีน้ำตาล (ชิ้น)	จำนวนตาที่เป็นต้นใหม่ (ชิ้น)
MS 1	5	-	2	1	1	-
MS 2	5	-	2	1	1	-
MS 3	5	-	2	-	2	-
MS 4	3	-	-	-	-	-
MS 5	4	-	2	1	1	1
MS 6	3	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.4 แสดงร้อยละการเริ่มเจริญเป็นตุ่ม การเจริญเป็นตุ่มเขียว และการเจริญต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.5+0.5, 0.5+1, 1+0.5, 1+1, 3+0.5 และ 3+1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหาร	ร้อยละการเจริญเป็นตุ่มเขียว	ร้อยละการเจริญต้นใหม่
MS 1	20	0
MS 2	20	0
MS 3	0	0
MS 4	0	0
MS 5	20	25
MS 6	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงร้อยละการเริ่มเจริญเป็นตุ่ม การเจริญเป็นตุ่มเขียว และการเจริญต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS 1, MS 2, MS 3, MS 4, MS 5 และ MS 6

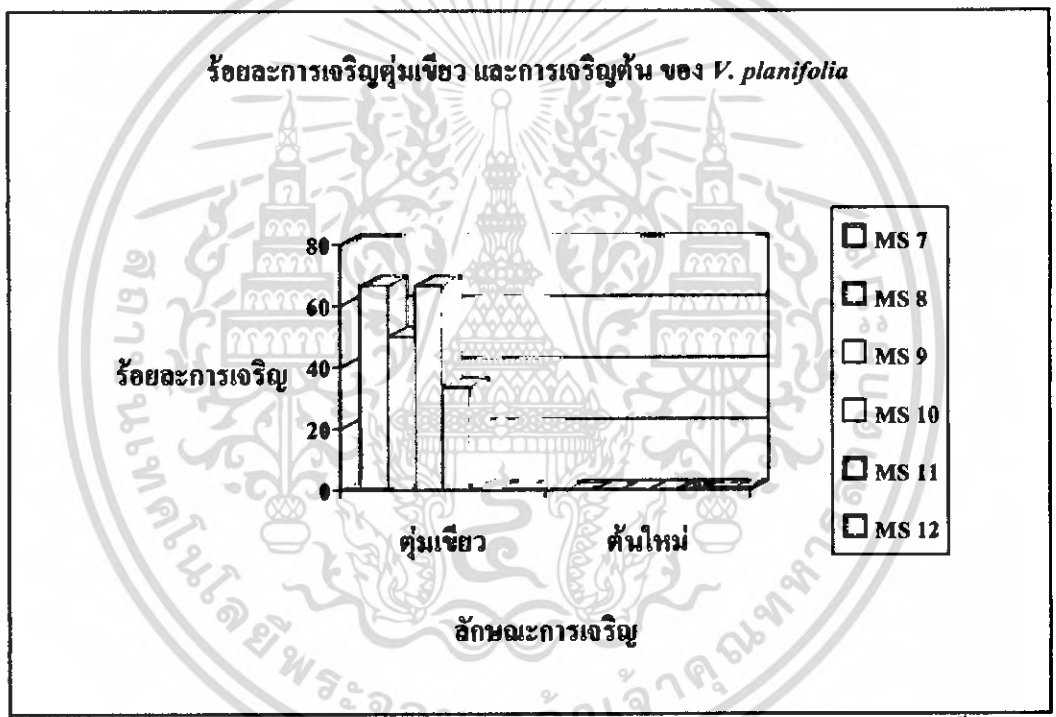
ตารางที่ 4.5 แสดงจำนวนตาของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่พัฒนาไปเป็นลักษณะต่างๆ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5+1, 0.5+3, 1+1, 1+3, 3+1 และ 3+3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหาร	จำนวนตาเริ่มต้น (ชิ้น)	จำนวนตาที่เป็นตุ่มสีเขียว (ชิ้น)	จำนวนตาที่เป็นตุ่มสีน้ำตาล (ชิ้น)	จำนวนตาที่เป็นต้นใหม่ (ชิ้น)
MS 7	3	2	1	-
MS 8	2	1	1	-
MS 9	6	4	2	-
MS 10	3	1	2	-
MS 11	2	-	-	-
MS 12	2	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงร้อยละการเจริญเป็นตุ่มเขียว และการเจริญเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5+1, 0.5+3, 1+1, 1+3, 3+1 และ 3+3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหาร	ร้อยละการเจริญเป็นตุ่มเขียว	ร้อยละการเจริญเป็นต้นใหม่
MS 7	66.67	0
MS 8	50	0
MS 9	66.67	0
MS 10	33.33	0
MS 11	0	0
MS 12	0	0



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงร้อยละการเจริญเป็นตุ่มเขียว และการเจริญต้นใหม่ จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS 7, MS 8, MS 9, MS 10, MS 11 และ MS 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

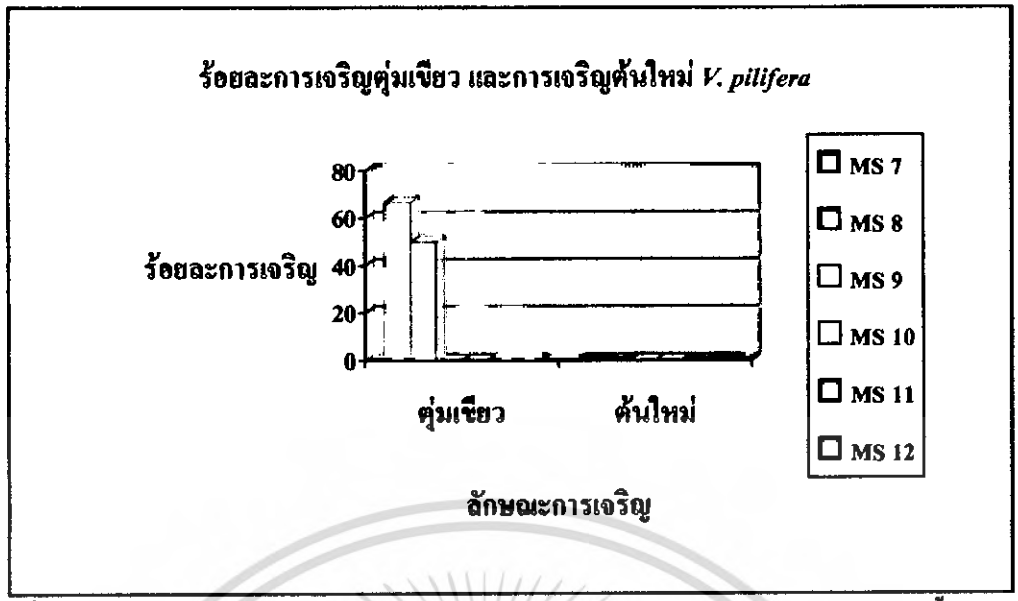
ตารางที่ 4.7 แสดงจำนวนตาของวานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่พัฒนาไปเป็นลักษณะต่างๆ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5+1, 0.5+3, 1+1, 1+3, 3+1 และ 3+3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหาร	จำนวนตาเริ่มต้น (ชิ้น)	จำนวนตาที่เป็นตุ่มสีเขียว (ชิ้น)	จำนวนตาที่เป็นตุ่มสีน้ำตาล (ชิ้น)	จำนวนตาที่เป็นต้นใหม่ (ชิ้น)
MS 7	3	2	-	-
MS 8	2	1	-	-
MS 9	3	-	-	-
MS 10	3	-	-	-
MS 11	2	-	-	-
MS 12	2	-	-	-

ตารางที่ 4.8 แสดงร้อยละการเจริญเป็นตุ่มเขียว และการเจริญต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และNAA ที่ความเข้มข้น 0.5+1, 0.5+3, 1+1, 1+3, 3+1 และ 3+3 มิลลิกรัมต่อลิตร

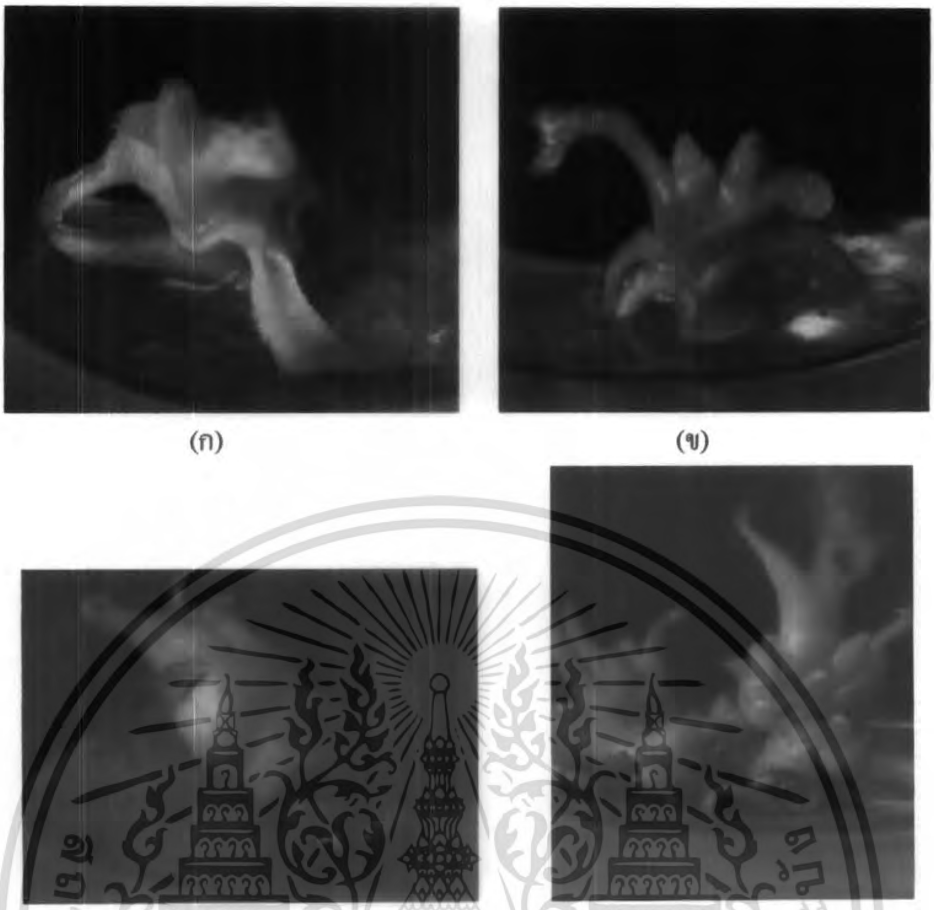
สูตรอาหาร	ร้อยละการเจริญเป็นตุ่มเขียว	ร้อยละการเจริญต้นใหม่
MS 7	66.67	0
MS 8	50	0
MS 9	0	0
MS 10	0	0
MS 11	0	0
MS 12	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงร้อยละการเจริญเป็นตุ่มเขียว และการเจริญต้นใหม่ จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS MS 7, MS 8, MS 9, MS 10, MS 11 และ MS 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

(ค) (ง)

รูปที่ 4.11 ลักษณะการเจริญเป็นต้นใหม่ จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* และ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ IBA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

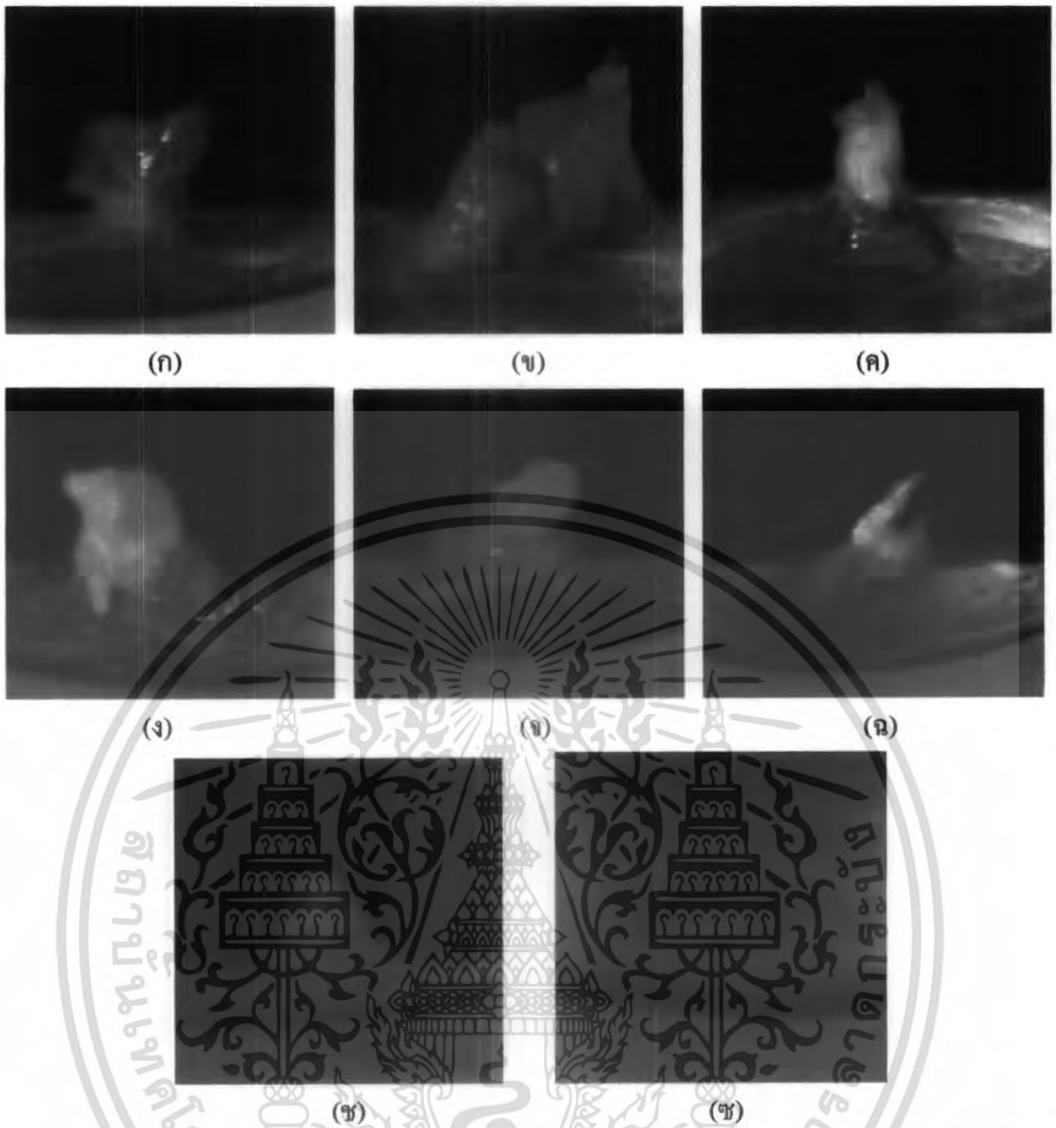
ก. สายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 1

ข. สายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 2

ค. สายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 3

ง. สายพันธุ์ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 ลักษณะการเจริญเป็นตุ่มสีเขียว จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* และ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ IBA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ก. สายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 1

ข. สายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 2

ค. สายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 3

ง. สายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 4

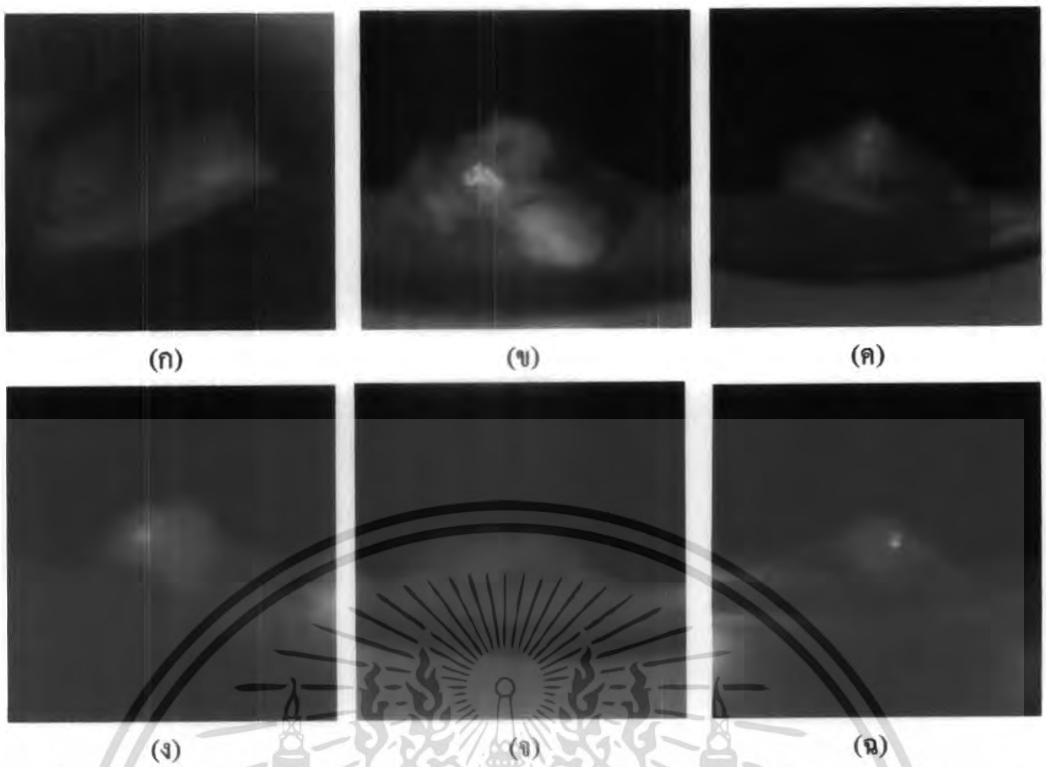
จ. สายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 5

ฉ. สายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 6

ช. สายพันธุ์ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 1

ซ. สายพันธุ์ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 ลักษณะการเจริญเป็นตุ่มสีเขียว จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* และ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณ BA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ก. สายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 7

ข. สายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 8

ค. สายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 9

ง. สายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 10

จ. สายพันธุ์ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 7

ฉ. สายพันธุ์ *V. pilifera* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 การทดลองเพื่อศึกษาและวิเคราะห์การจำแนกสายพันธุ์ของวานิลาโดยใช้เทคนิค RAPD

จากการทดลองในการจัดจำแนกสายพันธุ์วานิลา 6 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 6 ชนิด คือ OPA-07, OPA-20, OPB-14, OPB-18, OPC-04 และ OPC-07 ผลการทดลองที่ได้สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ 4 สายพันธุ์ คือ VPLA 5, VPIL 2, VS 2, และ VVAR 1 โดยเกิดแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และมี 2 สายพันธุ์ คือ VALB 2 และ VVAR 1 ที่ไม่เกิดแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอไม่ว่าใช้ไพรเมอร์ชนิดใด ดังนั้นจึงไม่สามารถจัดจำแนกออกจากสายพันธุ์อื่นได้ และไพรเมอร์ OPB-14 เท่านั้นที่ไม่เกิดแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุกสายพันธุ์

5.2 การทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการเจริญเติบโตของตาข้างของวานิลาเพื่อชักนำให้เจริญเติบโตเป็นต้นใหม่

จากการทดลองเพาะเลี้ยงวานิลา 2 สายพันธุ์บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าวานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ดีที่สุด สำและวานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เจริญต้นใหม่ได้ดีที่สุด สำหรับการเพาะเลี้ยงวานิลา 2 สายพันธุ์บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆไม่สามารถชักนำวานิลาทั้ง 2 สายพันธุ์ให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้ แต่วานิลาสายพันธุ์ *V. planifolia* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเจริญเป็นตุ่มเขียวมากที่สุดที่ร้อยละ 66.67 และวานิลาสายพันธุ์ *V. pilifera* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเจริญเป็นตุ่มเขียวมากที่สุดที่ร้อยละ 66.67 เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

โครงการหลวงขุนวาง. 2549. วานิลลาพืชเศรษฐกิจอนาคตสดใส. [Online]. Available : http://ndoae.doae.go.th/news/news_024.html

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ. 2549. การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. [Online]. Available : http://www.rspg.thaigov.net/information/information_11-2.htm

ชนินทร์ โถรัตน์. 2549. วานิลลา. [Online]. Available : http://www.whalesharkthai.com/html/florasbotanicus1.htm

ณัฐพล มณีวรรณ์. 2548. วานิลลาพืชเศรษฐกิจอนาคตสดใส. [Online]. Available : http://www.thainews70.com/news/news-agri/view.php?topic=667

ธีรวรรธน์ ขันทอง. 2549. DNA evidence. [Online]. Available : http://www.thirawat.com/ge/DNAevid.html

ประภัสสร สูทกวาทิน. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. [Online]. Available : http://www.gpo.or.th/rdi/html/tissue.html

ประภัสสร สุรวัฒนาวรรณ. 2549. การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืช. [Online]. Available : http://www.gpo.or.th/rdi/htmls/DNAfingerprinting.html

พรรณนีย์ วิชชาชู. 2549. พืชเครื่องเทศตระกูลกล้วยไม้ "วานิลลา". [Online]. Available : http://www.doa.go.th/public/plibai/plibai_45/noverber%2045/vanilla.html

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2549. [Online]. Available : http://gis.agr.ku.ac.th/e_learning/tissue/document/lession4.pdf

อารยา หงส์เพชร. 2545. [Online], http://www.dss.go.th/dssweb/starticles/files/ct_8_2545_plant_tissue.pdf

Besse, P., Silva, D.D., Bory, S., Grisoni, M., Bellec, F.L., Buval, M.F. 2004. RAPD genetic diversity in cultivated vanilla : *Vanilla planifolia* , and relationships with *V. tahitensis* and *V. pompona*. Plant Science *An international journal of experimental plant biology*. 167, 379-385

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

Geetha and Shetty. 2000. In vitro propagation of Vanilla planifolia,a tropical orchid. Current science. 79, 886-889

[Online]. Available : http://www.barascientific.com/bscnews/forum/DNA/dna_6.php?poll_id=10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online]. Available : http://www.biologie.de/biowiki/Orchideen

[Online]. Available : http://cropthai.ku.ac.th/biotech/abs/mole.html

[Online]. Available : http://www.chiangmainews.co.th/viewnews.php?id=1821&lyo=0

[Online]. Available : http://www.copernicusproject.ucr.edu/ssi/HSBiologyResources.htm

[Online]. Available : http://www.doonokthai.com/modules.php?name=News&file=article&sid=43

[Online]. Available : www.dpu.ac.th/clinictech/download.asp?strFile=wanila.pdf

[Online]. Available : http://en.wikipedia.org/wiki/Vanilla

[Online]. Available : http://eduonline.udru.ac.th/rudonline/courses/4034201/

[Online]. Available : http://www.geocities.com/greenlandvanilla/diseases.htm

[Online]. Available : http://gis.agr.ku.ac.th/e_learning/tissue/document/lession4.pdf

[Online]. Available : http://www.glenbrookfarm.com/store/bunchbeans.jpg

[Online]. Available : http://homepage.univie.ac.at/christian.puff/2002-04Thaipics.htm

[Online]. Available : www.iisr.org

[Online]. Available : http://www.indianspices.com/html/spfarm_van.htm

[Online]. Available : http://www.nstrc.rmutsv.ac.th/Departments/plantscience/medium.htm

[Online]. Available :http://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/filepdf/Assistant%20professor/caption%203.pdf

[Online]. Available : http://www.Lavanillere.com/nous_eng.htm

[Online]. Available : http://www.orchidspecies.com/vanaphylla.htm

[Online]. Available : http://www.pitcherplant.com

[Online]. Available : http://www.sdahldtp.com/vplanif.htm

[Online]. Available : http://www.suanlukchan.com/discussion.php?suan_chanruean_id=38

[Online]. Available : http://www.watkins.ro/anti_aging.htm

[Online]. Available : http://web.ku.ac.th/schoolnet/snet4/genetics/pcr.htm

[Online]. Available : http://www.zenonbio .hu/viogene/pf.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

สูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_2	1,650
KNO_3	1,900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.H_2O$	6.9
$Zn_4SO_4.H_2O$	6.14
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Na_2EDTA	37.25
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thyamine-HCl	0.1
Sucrose	30,000
pH5.6	

ที่มา ttp://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/filepdf/Assistant%20professor/caption%203.pdf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้