รายงานโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้าเพื่อการค้า

Research and Development of Vanda spp. for Commercial Purpose

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

สุปัน ไม้ดัดจันทร์

Supan Maidatchan

ปี พ.ศ. 2563

กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้าเพื่อการค้า

Research and Development of *Vanda* spp. for Commercial Purpose

หัวหน้าโครงการวิจัย

สุปัน ไม้ดัดจันทร์

Supan Maidatchan

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2563

สารบัญ

	หน้า
คณะผู้วิจัย	1
บทนำ	2
บทคัดย่อ	3
กิจกรรมที่ 1 การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้า	
1.1 การประเมินศักยภาพลูกผสมแวนด้าฟ้ามุ่ย	5
1.2 การประเมินศักยภาพลูกผสมแวนด้าสามปอย	25
กิจกรรมที่ 2 การส่งถ่ายยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase)ต่อการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้	
2.1 ศึกษาการแสดงออกของยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) oxidase ในการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้า	45
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	64
บรรณานุกรม	66
ภาคผนวก	68

กรมวิชาการเกษตร

คณะผู้วิจัย

สุปัน	ไม้ดัดจันทร์	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย
ฉัตต์นภา	ข่มอาวุธ	ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่
วาสนา	สุภาพรหม	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร
ศุจิรัตน์	สงวนรังศิริกุล	ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

กล้วยไม้สกุลแวนด้า โดยเฉพาะแวนด้าฟ้ามุ่ยเป็นกล้วยไม้สัญลักษณ์ของประเทศไทย ลักษณะดอกสีฟ้าที่สดใสและลายสมุก (tessellation) มีการนำไปเป็นพ่อแม่เพื่อผลิตลูกผสม สร้างพันธุ์การค้าที่มีชื่อเสียงในปัจจุบันหลายร้อยคู่ผสม นอกจากนี้ยังมีแวนด้าสามปอยที่มีถิ่นกำเนิดเฉพาะทางภาคเหนือของประเทศไทย มีการนำมาเป็นพ่อแม่เพื่อการพัฒนาพันธุ์ เนื่องจากมีเอกลักษณ์โดดเด่นในเรื่องความหอม ซึ่งต่างจากกล้วยไม้สกุลแวนด้าอื่นๆ นโยบายของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์มีการผลักดันให้มีการส่งออกกล้วยไม้ไปยังต่างประเทศเพิ่มขึ้นทุกๆ ปี ณ ปัจจุบันกล้วยไม้สกุลหวายมีการปลูกเลี้ยงเป็นการค้า และมีการส่งออกมากที่สุด แต่กล้วยไม้สกุลแวนด้าเป็นกล้วยไม้ที่สร้างชื่อเสียงให้กับประเทศจนเป็นที่ยอมรับว่าไทยมีความเชี่ยวชาญอันดับหนึ่ง ของโลก แนวทางในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้กลุ่มแวนด้า ยังมีอีกมากมายโดยการผสมภายในกลุ่ม ข้ามกลุ่ม ข้ามสกุล เพื่อสร้างความหลากหลาย แปลกใหม่ โดยมียังคงลักษณะดีเด่นของแวนด้าไทยชนิดต่างๆไว้ และเพิ่มลักษณะที่เหมาะสมในการผลิตเชิงการค้าเข้าไปให้แวนด้าลูกผสมใหม่ปลูกเลี้ยงง่าย ขยายพันธุ์ง่าย ออกดอกเร็ว ออกดอกหลายครั้งต่อปี ให้จำนวนดอกมากบานทน และทนทานโรค

ประเทศไทยส่งออกดอกกล้วยไม้เป็นอันดับ 2 ของโลก ส่วนใหญ่ส่งออกในรูปกล้วยไม้ตัดดอก ปัญหาที่สำคัญของการจัดส่งกล้วยไม้ตัดดอกคือ ดอกเหี่ยว ช้ำ และร่วง ระหว่างการขนส่ง กลไกการทางชีวภาพที่สำคัญในการส่งผลให้ดอกเหี่ยวและร่วงนั้น เกิดจากการผลิตเอทธิลีนในพืชโดยยีน 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACO) เป็นหนึ่งในยีนที่ควบคุมการเกิดกระบวนการดังกล่าวจากกระบวนการ biosynthetic pathway โดยมี methionine เป็นสารตั้งต้น และเปลี่ยน ACC synthase และในสภาวะที่มีออกซิเจนจะเปลี่ยนเป็น ACC Oxidase และกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอทธิลีน ในที่สุด (Yang and Hoffman, 1984) โดยเอทธิลีนเป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่ง ที่พืชสามารถสร้างเองได้ในธรรมชาติ จัดอยู่ในรูปก๊าซ จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ดอกเสื่อมสภาพและเหี่ยวเร็วขึ้น (Nadeau et al., 1993) ในกล้วยไม้แม้เพียงได้รับเอทิลีนในระดับความเข้มข้นต่ำก็สามารถทำให้เกิดการหลุดร่วงของดอกได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกล้วยไม้สกุลแวนด้าจะตอบสนองต่อก๊าซนี้นี้มากที่สุด (ครรชิต ธรรมศิริ, 2541) การชะลอการเหี่ยว และร่วงของพืช ปัจจุบันมีเทคโนโลยีเข้ามาเกี่ยวข้องมากมาย เช่น การแช่หรือรมด้วยสาร1-methycyclopropene (1-MCP) และ silverthiosulfate ซึ่งจะสามารถยืดอายุได้ในระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น และมีปัญหาเรื่องความเป็นพิษของสารเคมีที่ใช้การดัดแปลงพันธุกรรมโดยการยับยั้งการสร้างเอทธิลีนในพืชจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหานี้ ที่อาจจะนำมาพัฒนาให้ได้กล้วยไม้ที่มีระยะเวลาบานของดอกยาวนาน เป็นการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้ได้อีกวิธีหนึ่ง ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการ สร้างฐานพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลแวนด้าสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และ 1 เพื่อสร้างฐานพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลแวนด้าสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ศึกษาการแสดงออกของยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) oxidase ในการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้า

โครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้าเพื่อการค้าประกอบด้วย 2 กิจกรรม 3 การทดลอง

กิจกรรมที่ 1 การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้า

การทดลองที่ 1.1 การประเมินศักยภาพลูกผสมแวนด้าฟ้ามุ่ย

การทดลองที่ 1.2 การประเมินศักยภาพลูกผสมแวนด้าสามปอย

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2 การส่งถ่ายยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase)ต่อการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้

การทดลองที่ 2.1 ศึกษาการแสดงออกของยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) oxidase ในการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้า

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้าเพื่อการค้า

Research and Development of *Vanda* spp.

for Commercial Purpose

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์สกุลแวนด้าเพื่อการค้า ภายใต้ชุดโครงการวิจัยแลพัฒนากล้วยไม้ ดำเนินการระหว่างปี 2559 – 2563 ประกอบด้วย 2 กิจกรรม 3 การทดลอง เป็นการพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้าเพื่อใช้เป็นฐานพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ และศึกษาการส่งถ่ายยีนเพื่อแก้ปัญหาการเหี่ยวและดอกร่วงเร็วของกล้วยไม้สกุลแวนด้าในระหว่างการขนส่ง การวางจำหน่ายและการปักแจกัน ผลการทดลองมีดังนี้ **การปรับปรุงพันธุ์ : การประเมินศักยภาพแวนด้าฟ้ามุ่ย** ดำเนินงานที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงรายระหว่างปี 2559 - 2563 ได้ต้นลูกผสมฟ้ามุ่ยออกปลูก 23 คู่ผสม จำนวน 1,107 ต้น รอดชีวิต 822 ต้น มีต้นที่ออกดอกจำนวน 456 ต้น โดยเริ่มออกดอกช่อแรกเมื่ออายุ 4 ปีหลังออกปลูก ในช่วงเดือนสิงหาคม – กุมภาพันธ์ คัดเลือกต้นลูกผสมที่มีลักษณะดีได้ 17 สายต้นจาก 7 คู่ผสม ส่วนลูกผสมฟ้ามุ่ยน้อยออกปลูก 28 คู่ผสม จำนวน 1,203 ต้น รอดชีวิตและออกดอกจำนวน 794 ต้น โดยเริ่มออกดอกช่อแรกเมื่ออายุ 3 ปีหลังออกปลูกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ – มีนาคม คัดเลือกต้นลูกผสมที่มีลักษณะดีได้ 169 สายต้น จาก 24 คู่ผสม **การประเมินศักยภาพลูกผสมแวนด้าสามปอย** ดำเนินการระหว่างปี 2559 - 2563 ใน 2 สถานที่ คือ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ ศึกษาในลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์ในปี 2554-2558 จากจำนวน 5 คู่ผสม 402 ต้น พบต้นรอดชีวิตจำนวน 4 คู่ผสม 213 ต้น มีการออกดอกจำนวน 3 คู่ผสม 35 ต้น ได้แก่ คู่ผสมที่ 1 จำนวน 10 ต้น คู่ผสมที่ 2 จำนวน 11 ต้น และคู่ผสมที่ 3 จำนวน 14 ต้น ซึ่งคู่ผสมที่ 3 มีการออกดอกมากที่สุด ได้ต้นคัดเลือกที่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนดได้แก่ ฟอร์มดอกกลม ดอกมีขนาดใหญ่ กลีบหนา มีกลิ่นหอม ช่อดอกไม่ยาวมาก มี 5-7 ดอกต่อช่อ และออกดอกง่าย ใบไม่ร่วง ทั้งหมด 3 คู่ผสม 7 ต้น ส่วนศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร ได้ลูกผสมจำนวน 3 คู่ผสม ได้แก่ สามปอยดง สามปอยนก และสามปอยขุนตาน จำนวน 818 ต้น รอดชีวิต 310 ต้น ซึ่งต้นลูกผสมที่ได้มีการเจริญเติบโตช้า และไม่ออกดอก จึงไม่สามารถประเมินศักยภาพลูกผสมได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม **การส่งถ่ายยีน : ศึกษาการแสดงออกของยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) oxidase ในการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้า** ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ระหว่างปี 2559 - 2561 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) oxidase ในการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้แวนด้า ด้วยเทคนิค Cocultivation กับ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิดpCAMBIA1304 ซึ่งมียีน antisense-ACO เชื่อมอยู่ภายในพลาสมิดนี้ พบว่าไม่ประสบความสำเร็จ โปรโตคอร์มไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ และตายทั้งหมดในเวลาต่อมา ซึ่งอาจเกิดจากลักษณะของพืชชนิดนี้ที่ไวต่อการเคลื่อนย้ายอาหาร รวมถึงขั้นตอนและขบวนการถ่ายยีนไม่เหมาะสม ทำให้ไม่สามารถคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเพื่อเพาะเลี้ยงให้เป็นต้นได้

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Research and development of Vanda for commercial purpose project was carried out during 2016 – 2020. This project consisted of 3 experiments within 2 activities including varieties's improvement of Vanda aimed to use as genetic resources for breeding and gene transferring to prolong shelf life. Results were as follow :

Plant breeding : Evaluation of potential Vanda hybrids (*Vanda coerulea* and *V. coerulescens*) was carried out at Chiangrai horticulture research center during 2016-2020. There are two objectives of this study firstly, to select hybrids with good characteristics to substitute the current varieties, secondly, to use as genetic resources for breeding program. Planting 1,107 of *V. coerulea* hybrids from 23 crosses, 822 plants survived and 456 plants gave flowers. First flower was observed after 4 years of planting. Flowering time was during August – February. 17 clones with good characteristics were selected from 7 crosses according to needed criteria. At the same time, 1,203 plants of *V. coerulescens'*s hybrids from 28 crosses were planted. 794 plants survived and started flowering after 3 years of planting during February – March. 169 clones from 24 crosses with good characteristics were selected.

Evaluation of potential Vanda hybrids (*V. liouvillei* *V. brunnea* and *V. denisoniana*) was carried out at Chiang Mai Royal Agriculture Research Center By studying in 5 parental of 402 hybrids which obtained in 2011-2015 and could survived 4 parental of 213 hybrids. The criteria for selection were round flowers, large flowers, thick petals, fragrant, inflorescences about 5 to 7 flowers per branch, easy to bloom and leaves did not fall. According to the selection criteria, 3 parental of 7 hybrid as follow VL2VL1B4 VL2VL1B8 VL2VL1B10 VL3VL2B6 VL3VL2B7 VL3VL4B9 and VL3VL4S3. All hybrids bloom during February to April. The second location is Phichit Agricultural Research and Development Center which assessment of 3 parental of 818 hybrids potential obtained self-pollination and in vitro seeding in 2011-2015. The result showed that they could survived 3 parental of 310 hybrids and could not induce inflorescence and bloom because the environment was unsuitable for growth and flowering.

Gene transfer : Transformation of Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) to Vanda orchids and the effect on inflorescence duration and vase life. The transformation of plasmid pCAMBIA1304 harvested antisense-ACO into 3 Vanda orchids were not success. All transformants turned browning and died eventually. This could caused by sensitivity nature of this plant type as well as improper culturing and transforming techniques.

กรมวิชาการเกษตร

การประเมินศักยภาพลูกผสมแวนด้าฟ้ามุ่ย
Evaluation of Potential Vanda Hybrids

สุปัน ไม้ดัดจันทร์[1/] วัชรพล บำเพ็ญอยู่[1/] สุธามาศ ณ น่าน[1/]
สุภาภรณ์ สาชาติ[2/] อำนวย อรรถลังรอง[2/]
Supan Maidatchan[1/] Watcharaphon Bumphenyoo[1/] Suthamas Na nan[1/]
Supaporn Sachart[2/] Amnuai Adthalungrong[2/]

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

การประเมินศักยภาพลูกผสมแวนด้าฟ้ามุ่ย ดำเนินงานที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงรายระหว่างปี 2559 - 2563 เป็นการคัดเลือกลูกผสมฟ้ามุ่ยและฟ้ามุ่ยน้อยที่มีลักษณะดีเพื่อใช้ปลูกทดแทนพันธุ์เดิม หรือใช้เป็นฐานพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ ได้ต้นลูกผสมฟ้ามุ่ยออกปลูก 23 คู่ผสม จำนวน 1,107 ต้น รอดชีวิต 822 ต้น มีต้นที่ออกดอกจำนวน 456 ต้น โดยเริ่มออกดอกช่อแรกเมื่ออายุ 4 ปีหลังออกปลูก ในช่วงเดือนสิงหาคม – กุมภาพันธ์ คัดเลือกต้นลูกผสมที่มีลักษณะดีได้ 17 สายต้นจาก 7 คู่ผสม ตัวอย่างได้แก่สายต้น VC 55-02-25 มีฟอร์มดอกกลม ดอกขนาดใหญ่ (ความกว้างดอก > 6 เซนติเมตร) ลายตาสมุกและกลีบปากสีฟ้าอมม่วง จำนวนดอกต่อช่อมาก (7 ดอกต่อช่อ) ส่วนลูกผสมฟ้ามุ่ยน้อยออกปลูก 28 คู่ผสม จำนวน 1,203 ต้น รอดชีวิตและออกดอกจำนวน 794 ต้น โดยเริ่มออกดอกช่อแรกเมื่ออายุ 3 ปีหลังออกปลูกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ – มีนาคม คัดเลือกต้นลูกผสมที่มีลักษณะดีได้ 169 สายต้น จาก 24 คู่ผสม ลูกผสมที่คัดเลือกได้มีความหลากหลายของสีและลักษณะของกลีบดอก และขนาดดอก โดยกลีบดอกมีลักษณะแคบ กว้าง บิดและไม่บิด ขนาดดอกมีหลายขนาด โดยดอกขนาดเล็กมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก < 2 เซนติเมตร ดอกขนาดกลางมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก 2 - 3.5 เซนติเมตร และดอกขนาดใหญ่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก > 3.5 เซนติเมตร ส่วนสีกลีบมี 2 กลุ่มคือ กลุ่มสีม่วง และม่วงอมแดง สีกลีบปากเข้มกว่าสีกลีบดอก มีจำนวนดอกภายในช่อมากกว่า 10 ดอกขึ้นไปและดอกมีกลิ่นหอม

คำสำคัญ : แวนด้า การผสมพันธุ์ ลูกผสม

Abstract

Evaluation of potential Vanda hybrids was carried out at Chiangrai horticulture research center during 2016-2020. There are two objectives of this study firstly, to select hybrids with good characteristics to substitute the current varieties, secondly, to use as genetic resources for

breeding program. Planting 1,107 of *Vanda coerulea* hybrids from 23 crosses, 822 plants survived and 456 plants gave flowers. First flower was observed after 4 years of planting. Flowering time was during August – February. 17 clones with good characteristics were selected from 7 crosses. VC 55-02-25, as an example, was selected clone. It was selected due to round flower form, large size of flower (width > 7 cm.), purple blue tessellation and lips and large number of flowers per inflorescence (7 flowers per inflorescence).

At the same time, 1,203 plants of *V. coerulescens'*s hybrids from 28 crosses were planted. 794 plants survived and started flowering after 3 years of planting during February – March. 169 clones from 24 crosses with good characteristics were selected. Within selected clones, there were diversities in sizes, colors and petals of flowers. Petals classified as narrow,

กรมวิชาการเกษตร

wide, twisted or non-twisted. Flower sizes included small (diameter < 2 cm.), middle (diameter 2-3.5 cm.) and large (diameter > 3.5 cm.). There are two groups of Petals color; purple and red purple. Moreover, colour of lips must be darker than petals, more than 10 of flowers per inflorescence and fragrant.

Key words : Vanda Hybridization Hybrid

1/ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย (Chiang Rai Horticultural Research Center)
2/ สถาบันวิจัยพืชสวน (Horticultural Research Institute)

บทนำ

กล้วยไม้สกุลแวนด้า (Vanda) สามารถพบในป่าตามธรรมชาติประมาณ 40 ชนิด มีการกระจายพันธุ์อยู่ในทวีปเอเชียตั้งแต่ อินเดีย ศรีลังกา พม่า ไทย อินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ ในประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลแวนด้าจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ เอื้องสามปอยนก ฟ้ามุ่ย ฟ้ามุ่ยน้อย สามปอยขุนตาล เข็มขาว และสามปอย หางปลา ฟ้ามุ่ย (*Vanda coerulea* Griff) เป็นกล้วยไม้ชนิดที่พบได้ตามป่าดิบเขาทางภาคเหนือของประเทศไทย ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอนและตาก โดยพบที่ความสูงจากระดับน้ำทะเลปานกลางตั้งแต่ 1,000 เมตรขึ้นไป จึงไม่ง่ายเลยที่จะเลี้ยงกล้วยไม้ชนิดนี้ และเมื่อเอ่ยถึงฟ้ามุ่ยไม่มีใครไม่อยากครอบครอง ว่ากันว่าล้ำค่าที่สุดและได้รับการยอมรับว่าเป็นกล้วยไม้ที่สวยที่สุดชนิดหนึ่งของโลก กล้วยไม้ชนิดนี้จึงเป็นอัญมณีสีฟ้าล้ำค่าและเป็นที่ต้องการของนักเลี้ยงกล้วยไม้ ทำให้จำนวนฟ้ามุ่ยในธรรมชาติลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วและใกล้สูญพันธุ์ ส่งผลให้พันธุกรรมอ่อนแอ ไม่เข้มแข็งพอที่จะต่อสู้กับสภาพแวดล้อมที่รุนแรง จำนวนประชากรที่น้อยลงในแหล่งเดียวกันทำให้เกิดการผสมกันในคู่ผสมที่มีสายเลือดชิดกันเกินไป ส่งผลให้ประชากรรุ่นลูกหลานไม่แข็งแรงและต้านทานโรค

สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชได้ทำการสำรวจฟ้ามุ่ยน้อย (*Vanda coerulescens* Griff) ซึ่งเป็นพืชหายาก โดยสำรวจในป่าดิบเขาในพื้นที่ภาคเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง และอุตรดิตถ์ ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดและเคยพบพืชชนิดดังกล่าวขึ้นอยู่ในธรรมชาติ ผลสำรวจไม่พบฟ้ามุ่ยน้อยในธรรมชาติ ซึ่งน่าเป็นห่วงมากและเป็นพืชที่มีสถานะใกล้สูญพันธุ์ เนื่องจากผลสำรวจสอดคล้องกับรายงานของสำนักนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม (สผ.) ที่คาดว่าฟ้ามุ่ยน้อยได้สูญพันธุ์จากถิ่นที่อยู่ตามธรรมชาติแล้ว ไซเตส (CITES) ซึ่งเป็นองค์กรระหว่างประเทศ มีวัตถุประสงค์ที่จะรักษาพันธุ์พืชและสัตว์ป่า จึงขึ้นทะเบียนฟ้ามุ่ยไว้ในบัญชีพืชอนุรักษ์ บัญชี 1 ร่วมกับกล้วยไม้รองเท้านารี แต่ในปี พ.ศ. 2549 มีการประชุมไซเตสที่จังหวัดเชียงใหม่ กรมวิชาการเกษตรได้ยื่นขอมติในที่ประชุมให้ถอนรายชื่อ ฟ้ามุ่ย ออกจาก บัญชี 1 เป็น บัญชี 2 โดยให้เหตุผลว่า ฟ้ามุ่ยได้มีการคัดพันธุ์และขยายพันธุ์โดยวิธีการขยายพันธุ์เทียม ทำให้สามารถส่งออกฟ้ามุ่ยไปต่างประเทศได้มากขึ้น

กล้วยไม้สกุลแวนด้าโดยเฉพาะแวนด้าฟ้ามุ่ย เป็นกล้วยไม้สัญลักษณ์ของประเทศไทย ลักษณะดอกสีฟ้าที่สดใสและลายตาสมุก (tessellation) มีการนำไปเป็นพ่อแม่เพื่อผลิตลูกผสม สร้างพันธุ์การค้าที่มีชื่อเสียงในปัจจุบันหลายร้อยคู่ผสม นโยบายของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มีการผลักดันให้มีการส่งออกกล้วยไม้ไปยัง

สวบิชาการเกษตร

ต่างประเทศเพิ่มขึ้นทุกปี แนวทางในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้า ยังมีอีกมากมายโดยการผสมภายในกลุ่ม ข้ามกลุ่ม ข้ามสกุล เพื่อสร้างความหลากหลายและแปลกใหม่ โดยยังคงลักษณะดีเด่นของกล้วยไม้แวนด้าไทยไว้ และเพิ่มลักษณะที่เหมาะสมในการผลิตเชิงการค้าให้กับลูกผสมแวนด้า ทำให้ปลูกเลี้ยงง่าย ขยายพันธุ์ง่าย ออกดอกเร็ว ออกดอกหลายครั้งต่อปี ให้จำนวนดอกบานยาวนานและทนทานโรค รวมทั้งพัฒนาระบบการผลิตที่มีประสิทธิภาพ เป็นมิตรต่อระบบนิเวศและรูปแบบสินค้าพร้อมบริโภค ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการสร้างฐานพันธุกรรมเพื่อนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ของกล้วยไม้สกุลแวนด้า

ระเบียบวิธีการวิจัย

- อุปกรณ์

- ต้นลูกผสมฟ้ามุ่ยและฟ้ามุ่ยน้อย ที่ได้จากการผสมพันธุ์และเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ จากการทดลองเรื่องการปรับปรุงพันธุ์แวนด้าฟ้ามุ่ยเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ ในโครงการวิจัย และพัฒนากล้วยไม้สกุลแวนด้าเพื่อการค้า (สุปัน, 2558)
- กระเช้าแขวน
- สารป้องกันกำจัดโรคพืช
- ปุ๋ยเคมี
- อุปกรณ์บันทึกข้อมูล

- วิธีการ

1. ดูแลรักษาต้นลูกผสมโดยการให้น้ำและปุ๋ยอย่างสม่ำเสมอ พ่นสารป้องกันกำจัดโรคพืชและยาฆ่าแมลงตามความจำเป็น
2. เมื่อต้นออกดอกทำการประเมินลักษณะและคัดเลือกต้นลูกผสมโดยใช้หลักเกณฑ์ดังนี้

ฟ้ามุ่ย	ฟ้ามุ่ยน้อย
- ก้านช่อดอกยาวประมาณ 1 ฟุต แข็งแรง	- มีดอกมากกว่า 10 ดอกต่อช่อ
- มีดอก 12-15 ดอกต่อช่อ การเรียงของดอกไม่ถี่หรือห่างเกินไป	- การเรียงของดอกไม่ถี่หรือห่างเกินไป
- สีดอกอยู่ในกลุ่มสีฟ้า ม่วงอ่อนถึงฟ้าเข้ม มีลายตาสมุกชัดเจน	- สีดอกอยู่ในกลุ่มสีม่วงหรือม่วงอมแดง
	- ดอกมีกลิ่นหอม

3. ขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณต้นคัดเลือกโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
4. การบันทึกข้อมูล
    - ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลูกผสมต้นคัดเลือก
    - การเจริญเติบโต
    - การระบาดของศัตรูพืช
    - บันทึกภาพ

- เวลา เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2558 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2563

กรมวิชาการเกษตร

- สถานที่ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย อ.เมือง จ.เชียงราย

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ฟ้ามุ่ย ดูแลรักษาต้นลูกผสมฟ้ามุ่ยที่ได้จากการผสมพันธุ์ข้ามต้นภายในชนิดเดียวกัน เพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ จากการทดลองเรื่องการปรับปรุงพันธุ์แวนด้าฟ้ามุ่ยเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ ปี 2554 - 2558 ปลูกเลี้ยงในกระเช้าแขวนภายใต้โรงเรือนพรางแสง 50% (ภาพที่ 1) ได้ลูกผสมฟ้ามุ่ยรวม 23 คู่ผสม โดยแบ่งเป็นลูกผสมฟ้ามุ่ยที่ผสมพันธุ์ในปี 2554 จำนวน 8 คู่ผสม ปี 2555 จำนวน 12 คู่ผสม และปี 2556 จำนวน 3 คู่ผสม รวม 1,029 ต้น มีต้นที่รอดชีวิตทั้งหมด 822 ต้น (ตารางที่ 1)

การเจริญเติบโตของฟ้ามุ่ยและฟ้ามุ่ยน้อยค่อนข้างช้า จากกราฟการเจริญเติบโตของลูกผสมฟ้ามุ่ย VC 55-25 (ภาพที่ 2) และ VCL 55-39 (ภาพที่ 3) พบว่าความกว้างทรงพุ่ม ความกว้างใบ ความยาวใบ VC 55-25

กรมวิชาการเกษตร

และความยาวราก มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจากอายุ 3 ปีถึงอายุ 6 ปี ค่อนข้างน้อย ยกเว้นความสูงทรงพุ่มมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากฟ้ามุ่ยและฟ้ามุ่ยน้อยจัดอยู่ในกล้วยไม้สกุลแวนด้าซึ่งมีลักษณะการเจริญเติบโตทางยอด (monopodial orchid) (อบฉันท์, 2546) ทำให้มีการเจริญเติบโตทางด้านความสูงมากกว่าด้านข้าง

ฟ้ามุ่ย (*V. coerulea* Griff. ex Lindl.) เป็นกล้วยไม้ที่มีลำต้นตรง มีใบเกือบตลอดต้น ช่อดอกตั้ง กลีบดอกสีฟ้าหรือสีฟ้าอมม่วง บางพันธุ์กลีบมีลายเป็นตาราง สีของตารางเข้มกว่าสีพื้น นิยมเรียกกันว่า ลายตาสมุก กลีบปากเล็ก สีเข้มกว่ากลีบอื่นๆ มีความหลากลายของขนาดต้น ใบ ดอก และสีของดอกมาก ปัจจุบันพบน้อยลงในธรรมชาติ พันธุ์ที่ปลูกเลี้ยงกันทั่วไปส่วนมากเป็นพันธุ์ที่มีการปรับปรุงพันธุ์มาแล้ว (อบฉันท์, 2546)

ทำการประเมินและคัดเลือกต้นที่มีลักษณะดีตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยลูกผสมฟ้ามุ่ยเริ่มออกดอกช่อแรกเมื่ออายุ 4 ปีหลังออกปลูกในช่วงเดือนสิงหาคม – กุมภาพันธ์ มีต้นที่ออกดอกทั้งหมด 456 ต้น ได้คัดเลือกต้นลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 17 สายต้นจาก 7 คู่ผสม (ตารางที่ 1) ต้นลูกผสมที่ทำการคัดเลือกเป็นต้นที่ออกดอกช่อแรก ซึ่งอาจจะไม่มีลักษณะตรงตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ แต่ได้คัดเลือกต้นที่มีลักษณะดีเบื้องต้น เช่นฟอร์มดอกกลม กลีบดอกอยู่ในกลุ่มสีฟ้าอมม่วง และสีม่วง ลายตาสมุกชัดเจน จำนวนดอกต่อช่อมาก ซึ่งต้นคัดเลือกมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 4 - 5)

ฟ้ามุ่ยน้อย ดูแลรักษาต้นลูกผสมฟ้ามุ่ยน้อยจากการผสมพันธุ์ข้ามต้นภายในชนิดเดียวกัน เพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อและปลูกเลี้ยงในกระเช้าแขวนภายใต้โรงเรือนพรางแสง 50% (ภาพที่ 6) ได้ลูกผสมฟ้ามุ่ยน้อยออกปลูก 28 คู่ผสม โดยแบ่งเป็นลูกผสมที่ผสมพันธุ์ในปี 2554 จำนวน 6 คู่ผสม ปี 2555 จำนวน 11 คู่ผสม และปี 2556 จำนวน 11 คู่ผสม รวม 1,203 ต้น มีต้นรอดชีวิตและออกดอกจำนวน 794 ต้น โดยเริ่มออกดอกช่อแรกเมื่ออายุ 3 ปีหลังออกปลูกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ - มีนาคม คัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะดีตามเกณฑ์ที่กำหนดได้ 169 สายต้น จาก 24 คู่ผสม

ฟ้ามุ่ยน้อย (*Vanda coerulescens* Griff.) เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย ใบรูปแถบ ออกดอกเป็นช่อตั้งตามข้อ มีกลิ่นหอม กลีบเลี้ยงและกลีบดอกสีม่วงอมฟ้า กลีบปากสีม่วงอมน้ำเงิน ขอบกลีบสีจาง เส้าเกสรเล็กสีนวล พบตามป่าดิบเขาทางภาคเหนือ ออกดอกช่วงเดือนกุมภาพันธ์ - เมษายน (วีระชัย, 2551) ทำการประเมินและคัดเลือกต้นที่มีลักษณะดีตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยฟ้ามุ่ยน้อยเริ่มออกดอกช่อแรกเมื่ออายุ 3 ปีหลังออกปลูก โดยดอกบานช่วงกลางเดือนกุมภาพันธ์ - มีนาคม ซึ่งดอกช่อแรกยังไม่สมบูรณ์ จึงต้องมีการประเมินต่อในปีต่อไป และได้ต้นคัดเลือกต้นลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 169 สายต้นจาก 24 คู่ผสม (ตารางที่ 3) ซึ่งต้นคัดเลือกมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 7)

ฟ้ามุ่ยน้อยลูกผสมที่คัดเลือกได้มีความหลากหลายของลักษณะกลีบดอก สีดอก และขนาดดอก โดยกลีบดอกมีลักษณะแคบ กว้าง บิดและไม่บิด ขนาดดอกมีหลายขนาดโดยดอกขนาดเล็กมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก < 2 เซนติเมตร ดอกขนาดกลางมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก 2 - 3.5 เซนติเมตร และดอกขนาดใหญ่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก > 3.5 เซนติเมตร ส่วนสีของกลีบดอกมี 2 กลุ่มคือ กลุ่มสีม่วง และม่วงอมแดง โดยกลีบปากเข้มกว่าสีดอก (ภาพที่ 8) ดอกมีกลิ่นหอม

กรมวิชาการเกษตร

โรคของกล้วยไม้สกุลแวนด้าฟ้ามุ่ยและฟ้ามุ่ยน้อยที่พบมีการระบาดในระหว่างการปลูกเลี้ยงโดยปรากฏลักษณะอาการที่ใบและลำต้น ทำให้ต้นลูกผสมในโรงเรือนเกิดความเสียหาย ได้แก่

1. โรคแอนแทรกโนสหรือใบไหม้ (Anthracnose) เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. เกิดได้ทั้งที่ปลายใบและกลางใบ แผลมีลักษณะที่สังเกตได้ชัดเจน คือมีแผลสีน้ำตาล เป็นวงเรียงซ้อนกันหลายๆชั้น และจะมีกลุ่มของเชื้อราเป็นสีดำเกิดขึ้น พบโรคนี้ในช่วงฤดูฝนถึงฤดูหนาว (ภาพที่ 9) ป้องกันกำจัด โดยเก็บรวบรวมใบที่เป็นโรคแล้วนำไปเผาทำลายเพื่อไม่ให้เชื้อแพร่ระบาด พ่นด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืชได้แก่

กรมวิชาการเกษตร

โปรคลอราซ (prochloraz) อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร สลับ กับแมนโคแซบ (mancozeb) อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (ทัศนาพรและคณะ, 2553)

2. โรคเน่าดำ หรือโรคยอดเน่า หรือโรคเน่าเข้าไส้ (Black rot) เกิดจากเชื้อรา *Phytopthora palmivora* (Butl) Butl. เกิดได้ทุกส่วนของกล้วยไม้ อาการที่ใบเริ่มแรกเป็นจุดใส ชุ่มน้ำ สีเหลือง ต่อมาสีจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แล้วเป็นสีดำในที่สุด แผลจะขยายใหญ่ลุกลามอย่างรวดเร็ว อาการที่ต้นเชื้อราเข้าทางยอดหรือโคนต้น ใบจะเหลืองหรือเน่าดำหลุดร่วงจากต้นได้ง่าย กรณีที่เชื้อเข้าทางยอดแล้วทำให้ยอดเน่าดำ เมื่อใช้มือดึงยอดจะหลุดติดมือขึ้นมา กรณีที่เชื้อราเข้าทางโคนต้น ใบจะเหลืองแล้วร่วงจากโคนต้นขึ้นไปหาส่วนยอดเรื่อยๆ เกษตรกรเรียกว่า “โรคแก้ผ้า” (นิยมรัฐ, 2544) พบระบาดมากในช่วงฤดูฝนถึงฤดูหนาว (ภาพที่ 10)

ป้องกันกำจัดโดย ปรับสภาพโรงเรือนให้โปร่งอย่าปลูกต้นไม้แน่นเกินไป และเผาทำลายต้นที่เป็นโรค พ่นด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืชได้แก่ ฟอสฟอรัส เอซิด (phosphorus acid) อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นช่วงแดดไม่จัด หรือเมทาแลกซิล (metalaxyl) อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร (ทัศนาพรและคณะ, 2553)

การเพิ่มปริมาณต้นคัดเลือกโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เนื่องจากลูกผสมฟ้ามุ่ยและฟ้ามุ่ยน้อยต้นที่คัดเลือกได้ยังมีลำต้นขนาดเล็ก และมีเพียงต้นเดียวในแต่ละสายต้นที่คัดเลือกได้ จึงนำต้นพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะดีซึ่งมีขนาดลำต้นสมบูรณ์มาใช้เป็นตัวแทนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มปริมาณต้นคัดเลือกต่อไป

ฟ้ามุ่ย

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตายอดและตาข้างของฟ้ามุ่ยต้นพ่อแม่พันธุ์ จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ VCS-44 และ VCS-55 (ภาพที่ 11) ในอาหารสูตร New Dogashima Medium (NDM) (ภาคผนวก ก) โดยเนื้อเยื่อเริ่มเกิดโปรโตคอร์ม หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ย้ายโปรโตคอร์มลงในอาหารสูตรเดิม โปรโตคอร์มมีการเพิ่มปริมาณและพัฒนาเป็นต้นขนาดเล็ก (ภาพที่ 12) จากนั้นจึงย้ายต้นขนาดเล็กลงในอาหารสูตร Vacin and Went (V&W) (ภาคผนวก ก) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิกรัม/ลิตร กล้วยหอมบด 100 กรัม/ลิตร มันฝรั่ง 50 กรัม/ลิตร และผงถ่าน 20 กรัม/ลิตร เพื่อให้พัฒนาเป็นต้นที่มีใบและรากสมบูรณ์ก่อนออกปลูกต่อไป

ฟ้ามุ่ยน้อย

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตายอดและตาข้างของฟ้ามุ่ยน้อยชมพู ในอาหารสูตร NDM ซึ่งในสูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเนื่อส่วนตายอดของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส (Tokumura and Mii, 2001) โดยเนื้อเยื่อจะเริ่มเกิดโปรโตคอร์มหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 - 6 สัปดาห์ ย้ายโปรโตคอร์มลงในอาหารสูตรเดิม โปรโตคอร์มมีการเพิ่มปริมาณและพัฒนาเป็นต้นขนาดเล็ก จากนั้นจึงย้ายต้นขนาดเล็กลงในอาหารสูตร V&W ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร กล้วยหอมบด 100 กรัม/ลิตร มันฝรั่ง 50 กรัม/ลิตร และผงถ่าน 2 กรัม/ลิตร เพื่อให้พัฒนาเป็นต้นที่มีใบและรากสมบูรณ์ก่อนออกปลูก นำต้นออกอนุบาลในตะกร้า ประมาณ 3 - 6 เดือน และย้ายต้นลงปลูกในกระถางขนาด 1.5 นิ้ว ก่อนย้ายปลูกในกระเช้าแขวน (ภาพที่13)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

กรมวิชาการเกษตร

1.ลูกผสมฟ้ามุ่ยและฟ้ามุ่ยน้อยที่ได้จากการผสมข้ามต้นภายในชนิดเดียวกันระหว่างปี 2554-2556 ได้ลูกผสมฟ้ามุ่ยออกปลูก 23 คู่ผสม โดยแบ่งเป็นลูกผสมฟ้ามุ่ยที่ผสมพันธุ์ในปี 2554 จำนวน 8 คู่ผสม ปี 2555 จำนวน 12 คู่ผสม และปี 2556 จำนวน 3 คู่ผสม รวม 1,107 ต้น มีต้นที่รอดชีวิต 822 ต้น โดยลูกผสมฟ้ามุ่ยเริ่มออกดอกช่อแรกเมื่ออายุ 4 ปีหลังออกปลูกในช่วงเดือนสิงหาคม - กุมภาพันธ์ มีต้นที่ออกดอกทั้งหมด 456 ต้น ได้คัดเลือกต้นลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 17 สายต้นจาก 7 คู่ผสม ต้นลูกผสมที่ทำการคัดเลือกเป็นต้นที่ออกดอกช่อแรก ซึ่งอาจจะไม่มีลักษณะตรงตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ทั้งหมด แต่ได้คัดเลือกต้นที่มีลักษณะดีเบื้องต้น เช่น ฟอร์มดอกกลม ดอกมีขนาดใหญ่ (ความกว้างดอก >5 เซนติเมตร) และ มีลายตาสมุกชัดเจนแลมีความหลากหลายของสี เช่น สีฟ้าอมม่วง ม่วง และ จำนวนดอกต่อช่อมาก ซึ่งต้นที่คัดเลือกดังกล่าวจะต้องมีการประเมินลักษณะต่อเมื่อต้นมีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้นในปีถัดไป

2. ลูกผสมฟ้ามุ่ยน้อยได้ต้นออกปลูก 28 คู่ผสม โดยแบ่งเป็นลูกผสมที่ผสมพันธุ์ในปี 2554 จำนวน 6 คู่ผสม ปี 2555 จำนวน 11 คู่ผสม และปี 2556 จำนวน 11 คู่ผสม รวม 1,203 ต้น มีต้นรอดชีวิตและออกดอกจำนวน 794 ต้น โดยเริ่มออกดอกช่อแรกเมื่ออายุ 3 ปีหลังออกปลูกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ - มีนาคม คัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะดีตามเกณฑ์ที่กำหนดได้ 169 สายต้น จาก 24 คู่ผสม ต้นที่คัดเลือกได้มีความหลากหลายของลักษณะกลีบดอก สีดอก และขนาดดอก โดยกลีบดอกมีลักษณะแคบ กว้าง บิดและไม่บิด ขนาดดอกแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ดอกขนาดเล็กมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก <2 เซนติเมตร ดอกขนาดกลางมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก 2 - 3.5 เซนติเมตร และดอกขนาดใหญ่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก >3.5 เซนติเมตร ส่วนสีขอลกลีบดอกแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มสีม่วง และม่วงอมแดง ส่วนของกลีบปากเข้มกว่าสีกลีบดอก และดอกมีกลิ่นหอม

3. จากการเพิ่มปริมาณต้นพ่อแม่พันธุ์ฟ้ามุ่ยและฟ้ามุ่ยน้อยโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่าอาหารสูตร NDM สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนตายอดและตาข้างเกิดโปรโตคอร์มและพัฒนาเป็นต้นขนาดเล็ก จากนั้นย้ายต้นลงสูตรอาหาร V&W ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิกรัม/ลิตร กล้วยหอมบด 100 กรัม/ลิตร มันฝรั่ง 50 กรัม/ลิตร และผงถ่าน 20 กรัม/ลิตร เพื่อให้พัฒนาเป็นต้นที่มีใบและรากสมบูรณ์ก่อนออกปลูก ซึ่งสูตรอาหารดังกล่าวสามารถนำไปปรับใช้ในการเพิ่มปริมาณต้นลูกผสมฟ้ามุ่ยและฟ้ามุ่ยน้อยต้นคัดเลือกที่มีลักษณะดีต่อไป

4. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- ได้กล้วยไม้ลูกผสมฟ้ามุ่ยและฟ้ามุ่ยน้อยที่มีลักษณะดีไปใช้ปลูกสำหรับการผลิตเป็นการค้าทดแทนพันธุ์เดิม
- ได้ต้นพ่อแม่พันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตต้นพันธุ์ดี และต้นที่คัดเลือกได้ ใช้เป็นฐานพันธุกรรม สำหรับการปรับปรุงพันธุ์
- สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตาข้างและตายอดฟ้ามุ่ยและฟ้ามุ่ยน้อย สามารถนำไปปรับใช้ในการเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ดีและต้นตัดเลือก

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 จำนวนต้นลูกผสมฟ้ามุ่ยที่ออกดอกและจำนวนต้นที่ผ่านการคัดเลือก

ปีที่ผสมพันธุ์	รหัสคู่ผสม	จำนวนต้นออกปลูก	จำนวนต้นที่รอดชีวิต	จำนวนต้นที่ออกดอก	จำนวนต้นที่คัดเลือก
ปี 2554	VC54-02	192	160	84	3
	VC54-05	22	14	10	-
	VC54-06	32	28	15	-
	VC54-11	16	15	13	-
	VC54-12	38	32	23	2
	VC54-14	34	26	24	-
	VC54-17	69	60	40	1
	VC54-19	31	26	20	3
ปี 2555	VC55-01	109	65	20	-
	VC55-02	236	168	92	5
	VC55-03	60	60	20	-
	VC55-04	8	8	6	-
	VC55-08	25	21	5	-
	VC55-13	14	12	8	-
	VC55-15	32	18	14	-
	VC55-24	27	23	10	-
	VC55-25	27	20	16	1
	VC55-28	10	9	5	-
	VC55-30	30	24	12	-
	VC55-31	14	12	7	2
ปี2556	VC 56-07	50	50	5	-
	VC 56-13	5	5	1	-
	VC 56-14	26	26	6	-
รวม		1,107	822	456	17

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลูกผสมฟ้ามุ่ย ต้นคัดเลือกจำนวน 17 ต้น จาก 7 คู่ผสม

รหัสคู่ผสม	รหัสต้น	ความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)	ความสูงทรงพุ่ม (ซม.)	จน.ใบ	กว้างใบ (ซม.)	ยาวใบ (ซม.)	จน.ดอก/ช่อ	ขนาดดอก กxส (ซม.)	ความยาวช่อดอก (ซม.)	Ø ก้านช่อดอก (ซม.)	ลักษณะดอก (ภาคผนวก ก)
VC 54-02	VC 54-02-01	16.5	12.3	6	1.8	13.2	4	6.5 x 7.2	22.5	0.25	ฟอร์มดอกค่อนข้างกลม กลีบดอกสีฟ้าอมม่วงอ่อน Violet-Blue group 91D [1/] ลายตาสมุกสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet-Blue group 92A กลีบปากสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 93B
	VC 54-02-13	26.4	19.7	5	2.1	16.7	4	7.3 x 7.2	22.4	0.30	ฟอร์มดอกกลม ดอกขนาดใหญ่ กลีบดอกสีฟ้าอมม่วงอ่อน Violet- Blue group 91D ลายตาสมุกสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 92A กลีบปากสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 93B
	VC 54-02-32	23.2	17.5	6	2.5	17.4	3	7.5 x 8.5	28.5	0.30	ฟอร์มดอกค่อนข้างกลม ดอกขนาดใหญ่ กลีบดอกสีฟ้าอมม่วงอ่อน Violet- Blue group 91D ลายตาสมุกสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 92A กลีบปากสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 93B
VC 54-12	VC 54-12-06	25.2	16.7	8	2.1	14.5	4	7.6 x 8.1	33.0	0.32	ฟอร์มดอกค่อนข้างกลม ดอกขนาดใหญ่ กลีบดอกสีม่วงอ่อน Violet group 85C ลายตาสมุกสีม่วง Violet group 86D กลีบปากสีม่วงเข้ม Violet group 86B
	VC 54-12-17	23.8	15.4	12	2.3	15.2	7	5.6 x 6.4	36.5	0.34	ฟอร์มดอกค่อนข้างกลม กลีบดอกสีม่วงอ่อน Violet group 84C ลายตาสมุกสีม่วง Violet group 83C กลีบปากสีม่วงเข้ม Violet group 83A
VC 54-17	VC 54-17-15	29.5	19.7	7	2.4	16.5	5	7.5 x 6.9	35.8	0.32	ฟอร์มดอกค่อนข้างกลม ดอกขนาดใหญ่ กลีบดอกสีม่วงอ่อน Violet group 84D ลายตาสมุกสีม่วง Violet group 85A กลีบปากสีม่วงเข้ม Violet group 86B
VC 54-19	VC 54-19-01	24.6	15.8	6	1.8	14.7	2	6.0 x 5.7	18.3	0.30	ฟอร์มดอกค่อนข้างกลม กลีบดอกสีม่วงอ่อน Violet group 85D ลายตาสมุกสีม่วง Violet group 86D กลีบปากสีม่วง

กรมวิชาการเกษตร

เข้ม Violet group 86B

1/ เทียบสีโดยใช้ R.H.S Colour Chart

ตารางที่ 2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลูกผสมฟ้ามุ่ย ต้นคัดเลือกจำนวน 17 ต้น จาก 7 คู่ผสม (ต่อ)

รหัสคู่ผสม	รหัสต้น	ความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)	ความสูงทรงพุ่ม (ซม.)	จน.ใบ	กว้างใบ (ซม.)	ยาวใบ (ซม.)	จน.ดอก/ช่อ	ขนาดดอก กxส (ซม.)	ความยาวช่อดอก (ซม.)	Ø ก้านช่อดอก (ซม.)	ลักษณะดอก
	VC 54-19-09	16.3	12.5	6	1.5	11.5	3	6.2 x 6.6	21.2	0.28	ฟอร์มดอกค่อนข้างกลม กลีบดอกสีม่วงอ่อน Violet group 84D ลายตาสมุกสีม่วง Violet group 88D กลีบปากสีม่วงเข้ม Violet group 88B
	VC 54-19-15	18.5	14.4	6	1.9	11.4	2	7.0 x 7.2	20.5	0.31	ฟอร์มดอกค่อนข้างกลม ดอกขนาดใหญ่ กลีบดอกสีฟ้าอมม่วงอ่อน Violet- Blue group 97D ลายตาสมุกสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 96C กลีบปากสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 95A
VC 55-02	VC 55-02-24	28.7	18.4	4	2.5	15.2	6	7.3 x 7.8	35.2	0.40	ฟอร์มดอกค่อนข้างกลม ดอกขนาดใหญ่ กลีบดอกสีฟ้าอมม่วงอ่อน Violet- Blue group 91D ลายตาสมุกสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 91B กลีบปากสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 90B
	VC 55-02-25	25.2	20.5	4	2.5	16.2	8	7.3 x 7.5	38.0	0.35	ฟอร์มดอกค่อนข้างกลม ดอกขนาดใหญ่ กลีบดอกสีฟ้าอมม่วงอ่อน Violet- Blue group 91D ลายตาสมุกสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 91A กลีบปากสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 90B
	VC 55-02-26	20.5	19.7	7	2.0	12.5	6	7.2 x 7.5	27.2	0.33	ฟอร์มดอกค่อนข้างกลม ดอกขนาดใหญ่ กลีบดอกสีฟ้าอมม่วงอ่อน Violet- Blue group 91D ลายตาสมุกสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 91A กลีบปากสีฟ้าอมม่วง

กรมวิชาการเกษตร

										Violet- Blue group 90B
	VC 55-02-27	21.4	19.3	4	2.5	16.2	8	7.3 x 7.6	38.5	0.32	ฟอร์มดอกค่อนข้างกลม ดอกขนาดใหญ่ กลีบดอกสีฟ้าอมม่วงอ่อน Violet- Blue group 92D ลายตาสมุกสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 91A กลีบปากสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 90B

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลูกผสมฟ้ามุ่ย ต้นคัดเลือกจำนวน 17 ต้น จาก 7 คู่ผสม (ต่อ)

รหัสคู่ผสม	รหัสต้น	ความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)	ความสูงทรงพุ่ม (ซม.)	จน.ใบ	กว้างใบ (ซม.)	ยาวใบ (ซม.)	จน.ดอก/ช่อ	ขนาดดอก กxส (ซม.)	ความยาวช่อดอก (ซม.)	Ø ก้านช่อดอก (ซม.)	ลักษณะดอก
	VC 55-02-34	20.8	17.2	5	1.7	11.0	4	6.5 x 7.0	22.5	0.30	ฟอร์มดอกค่อนข้างกลม ดอกขนาดใหญ่ กลีบดอกสีฟ้าอมม่วงอ่อน Violet- Blue group 92D ลายตาสมุกสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 91A กลีบปากสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 90B
VC 55-25	VC 55-25-7	18.5	12.8	8	2.1	10.5	2	8.5 x 8.2	19.5	0.40	ฟอร์มดอกกลม ดอกขนาดใหญ่ กลีบดอกสีม่วงอ่อน Violet group 84D ลายตาสมุกสีม่วง Violet group 85A กลีบปากสีม่วงเข้ม Violet group 86B
VC 55-31	VC 55-31-5	18.2	12.5	5	1.8	10.4	1	7.1 x 7.1	17.0	0.40	ฟอร์มดอกกลม ดอกขนาดใหญ่ กลีบดอกสีฟ้าอมม่วงอ่อน Violet- Blue group 91D ลายตาสมุกสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 92A กลีบปากสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 93B
	VC 55-31-8	20.6	9.4	3	1.8	12.0	2	6.3 x 5.9	18.7	0.32	ฟอร์มดอกค่อนข้างกลม กลีบดอกสีฟ้าอมม่วงอ่อน Violet- Blue group 92D ลายตาสมุกสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 94C กลีบปากสีฟ้าอมม่วงเข้ม Violet- Blue group 93B

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3 จำนวนต้นลูกผสมฟ้ามุ่ยน้อยที่ออกดอกและผ่านการคัดเลือก

ปีที่ผสม	รหัสคู่ผสม	จำนวนต้นออกปลูก	จำนวนต้นที่รอดชีวิต	จำนวนต้นที่ออกดอก	จำนวนต้นที่ผ่านการคัดเลือก
ปี 2554	VCL54-08	65	40	40	15
	VCL54-09	90	49	49	7
	VCL54-10	34	29	29	11
	VCL54-14	89	38	38	12
	VCL54-17	258	150	150	19
	VCL54-18	26	14	14	7
ปี 2555	VCL 55-03	20	15	15	-
	VCL 55-04	23	23	23	1
	VCL 55-05	72	48	48	1
	VCL 55-07	20	14	14	1
	VCL 55-09	105	50	50	3
	VCL 55-11	11	11	11	3
	VCL 55-14	19	17	17	1
	VCL 55-39	20	16	16	11
	VCL 55-41	35	33	33	11
	VCL 55-45	48	39	39	19
	VCL 55-47	18	11	11	-
ปี 2556	VCL 56-03	3	3	3	-
	VCL 56-04	2	2	2	1
	VCL 56-05	27	19	19	-
	VCL 56-06	2	2	2	2
	VCL 56-09	2	2	2	1
	VCL 56-12	17	13	13	8
	VCL 56-13	149	120	120	13
	VCL 56-19	10	8	8	4
	VCL 56-20	12	11	11	8
	VCL 56-22	20	12	12	5
	VCL 56-23	6	5	5	5

กรมวิชาการเกษตร

	รวม	1,203	794	794	169

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4 ตัวอย่างลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลูกผสมฟ้ามุ่ยน้อย ต้นคัดเลือกจำนวน 27 ต้น จาก 9 คู่ผสม

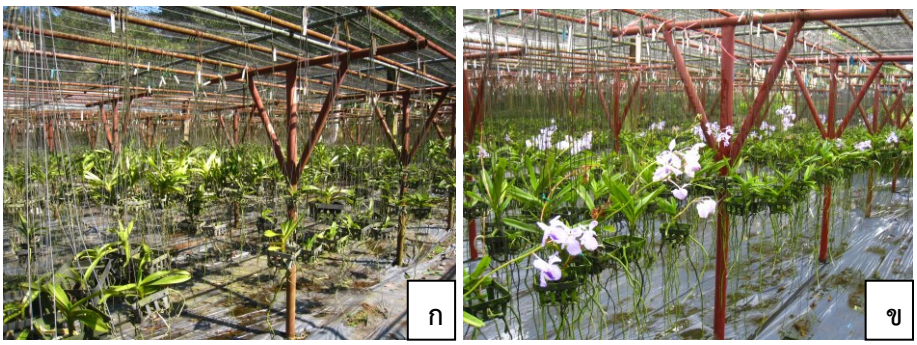
รหัสคู่ผสม	รหัสต้น	ความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)	ความสูงทรงพุ่ม (ซม.)	จน.ใบ	กว้างใบ (ซม.)	ยาวใบ (ซม.)	จน.ดอก/ช่อ	ขนาดดอก (ซม.)	ความยาวช่อดอก (ซม.)	Ø ก้านช่อดอก (ซม.)
VCL 54-08	VCL 54-08-15	31.3	17.1	7	1.2	16.3	17	2.1 x 1.9	21.2	0.21
	VCL 54-08-19	27.8	18.1	7	0.9	16.0	15	2.3 x 1.9	21.5	0.22
	VCL 54-08-29	35.5	18.2	10	1.3	19.3	20	2.1 x 1.9	24.0	0.25
VCL 54-10	VCL 54-10-01	20.1	10.1	7	1.1	11.0	12	2.3 x 2.0	23.0	0.20
	VCL 54-10-03	21.4	17.2	12	1.1	13.2	18	2.0 x 1.8	30.3	0.22
	VCL 54-10-05	23.3	17.1	9	1.1	13.9	18	2.3 x 2.1	18.5	0.22
VCL 54-17	VCL 54-17-05	25.8	14.5	9	1.3	15.2	15	3.5 x 3.0	30.0	0.20
	VCL 54-17-09	24.8	19.2	8	1.4	14.1	19	3.4 x 2.5	32.5	0.25
	VCL 54-17-95	16.3	17.2	7	1.1	10.2	13	3.7 x 3.1	35.5	0.22
VCL 55-39	VCL 55-39-01	15.5	13.4	7	0.8	11.2	13	1.7 x 1.7	17.3	0.15
	VCL 55-39-08	19.6	12.5	6	0.9	11.6	14	2.1 x 1.9	19.5	0.17
	VCL 55-39-10	21.3	10.2	4	1.1	11.7	10	1.8 x 1.8	16.7	0.18
VCL 55-41	VCL 55-41-03	23.2	13.7	5	1.4	13.6	22	2.1 x 1.9	26.5	0.30
	VCL 55-41-05	23.5	14.4	6	1.3	12.2	23	2.0 x 1.8	28.0	0.30
	VCL 55-41-09	19.1	11.8	6	1.1	9.8	21	2.0 x 1.9	26.0	0.28

กรมวิชาการเกษตร

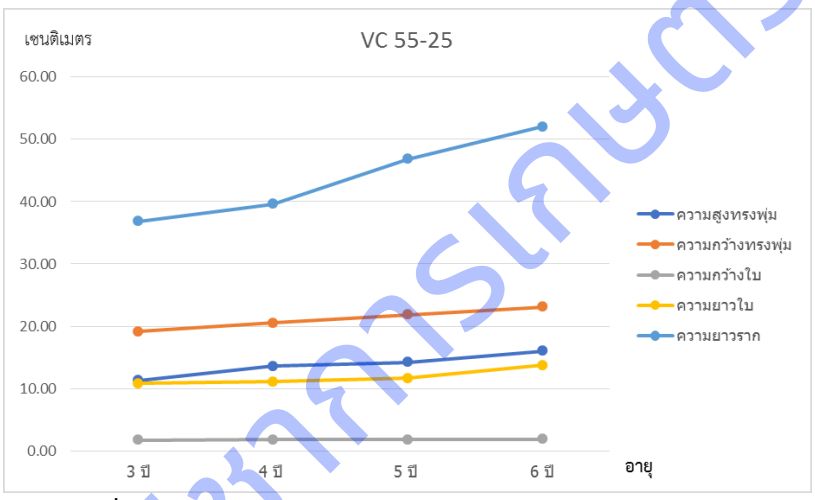
ตารางที่ 4 ตัวอย่างลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลูกผสมฟ้ามุ่ยน้อย ต้นคัดเลือกจำนวน 27 ต้น จาก 9 คู่ผสม (ต่อ)

รหัสคู่ผสม	รหัสต้น	ความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)	ความสูงทรงพุ่ม (ซม.)	จน.ใบ	กว้างใบ (ซม.)	ยาวใบ (ซม.)	จน.ดอก/ช่อ	ขนาดดอก (ซม.)	ความยาวช่อดอก (ซม.)	Ø ก้านช่อดอก (ซม.)
VCL 55-45	VCL 55-45-14	24.1	18.2	7	1.2	17.0	19	2.2 x 2.0	35.5	0.25
	VCL 55-45-20	27.3	13.0	7	1.3	15.5	18	2.3 x 1.9	27.5	0.23
	VCL 55-45-36	24.0	15.3	6	1.1	15.1	12	2.4 x2.4	19.5	0.22
VCL 56-19	VCL 56-19-02	25.5	13.2	11	1.5	14.2	26	2.1 x 1.7	24.5	0.30
	VCL 56-19-09	18.3	13.5	6	1.1	10.9	14	2.3 x 1.6	19.0	0.23
	VCL 56-19-12	19.5	12.6	8	1.1	12.5	18	2.2 x 2.0	17.7	0.20
VCL 56-22	VCL 56-22-11	18.9	11.0	8	1.2	11.0	19	1.8 x 1.8	25.0	0.25
	VCL 56-22-12	20.0	15.3	8	1.4	13.8	21	2.0 x 1.7	21.5	0.22
	VCL 56-22-13	20.6	12.2	9	1.3	10.4	19	2.5 x 2.3	21.0	0.25
VCL 56-23	VCL 56-23-02	29.0	16.4	10	1.3	15.1	30	2.3 x 2.0	32.0	0.25
	VCL 56-23-03	27.4	17.2	7	1.2	14.5	21	2.5 x 2.0	23.5	0.25
	VCL 56-23-04	22.8	12.0	9	1.5	14.3	23	2.3 x 2.2	23.0	0.25

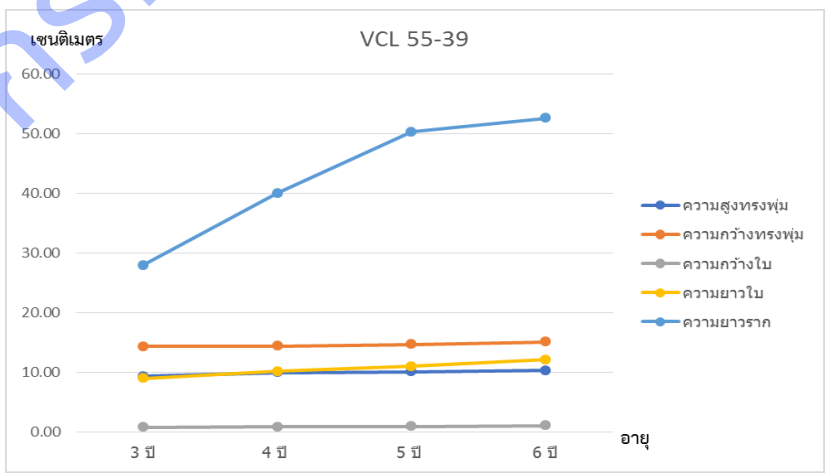
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1 สภาพการปลูกเลี้ยงลูกผสมฟ้ามุ่ยภายใต้โรงเรือนพรางแสง 50% ช่วงการเจริญเติบโตทางลำต้น (ก) ช่วงออกดอก (ข)



ภาพที่ 2 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของลูกผสมฟ้ามุ่ย VC 55-25



ภาพที่ 3 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของลูกผสมฟ้ามุ่ยน้อย VCL 55-39

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

VC 54-02-01

VC 54-02-13

VC 54-02-32

VC 54-12-06

VC 54-12-17

VC 54-17-15

VC 54-19-01

VC 54-19-09

VC 54-19-15

ภาพที่ 4 ลักษณะดอกของลูกผสมฟ้ามุ่ยที่ผ่านการคัดเลือก VC 54-02-01(ก) VC 54-02-13(ข) VC 54-02-32 (ค) VC 54-12-06 (ง) VC 54-12-17 (จ) VC 54-17-15 (ฉ) VC 54-19-01 (ช) VC 54-19-09 (ซ) VC 54-19-15 (ฌ)

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

VC 55-02-24

VC 55-02-26

VC 55-02-27

VC 55-02-34

VC 55-25-07

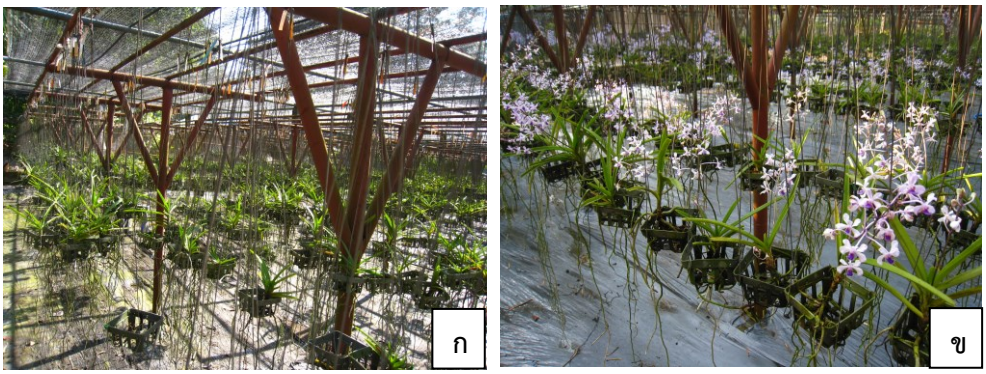
VC 55-31-05

VC 55-31-08

ภาพที่ 5 ลักษณะดอกของต้นลูกผสมแวนด้าฟ้ามุ่ยที่ผ่านการคัดเลือก VC 55-02-24 (ก) VC 55-02-25 (ข) VC 55-02-26 (ค) VC 55-02-27 (ง) VC 55-02-34 (จ) VC 55-25-07 (ฉ) VC 55-31-05 (ช) VC 55-31-08 (ซ)

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 6 สภาพการปลูกเลี้ยงลูกผสมฟ้ามุ่ยน้อยภายใต้โรงเรือนพรางแสง 50% ช่วงการเจริญเติบโตทางลำต้น (ก) ช่วงออกดอก (ข)

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

VCL 54-08-15

VCL 54-10-01

VCL 54-17-09

VCL 55-39-08

VCL 55-41-13

VCL 55-45-36

VCL 56-19- 09

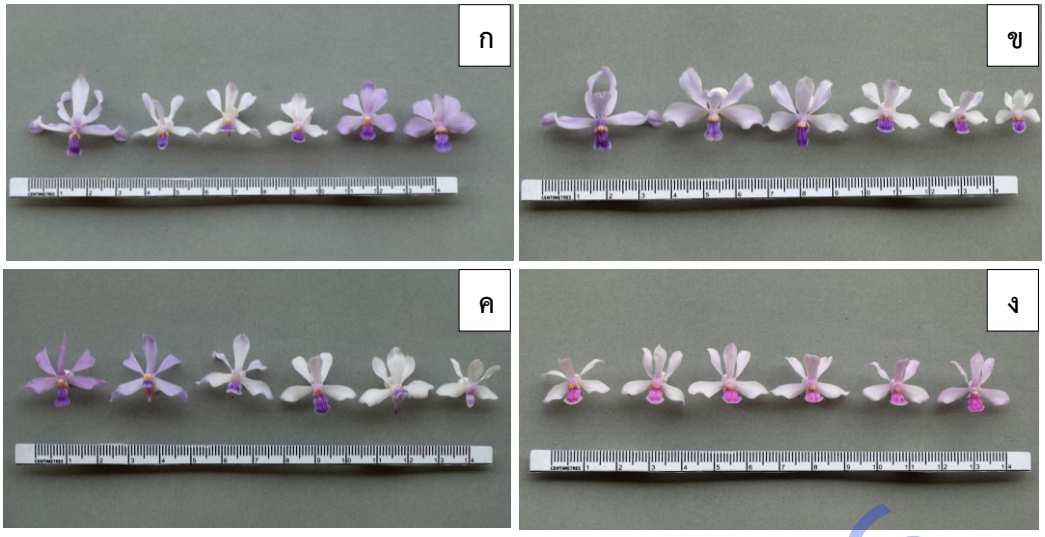
VCL 56-22-12

VCL 56-23-02

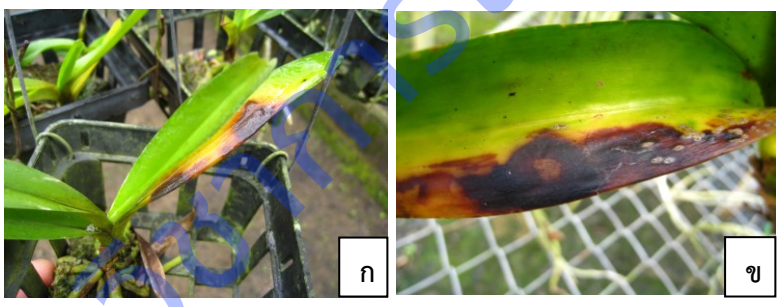
ภาพที่ 7 ตัวอย่างลักษณะช่อดอกของต้นลูกผสมฟ้ามุ่ยน้อยที่ผ่านการคัดเลือก VCL 54-08-15 (ก) VCL 54-10-01 (ข) VCL 54-17-09 (ค) VCL 55-39-08 (ง) VCL 55-41-13 (จ) VCL 55-45-36 (ฉ) VCL 56-19- 09 (ช) VCL 56-22-12 (ซ) VCL 56-23-02 (ฌ)

กรมวิชาการเกษตร

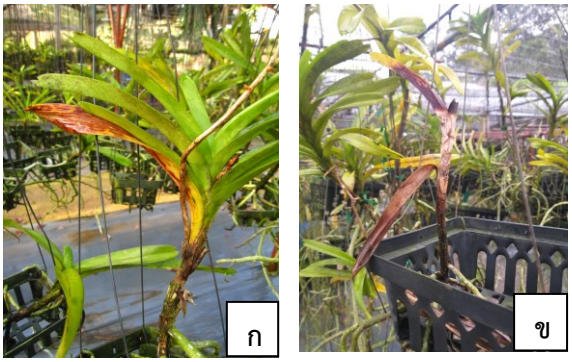
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 8 ลักษณะความหลากหลายของลูกผสมฟ้ามุ่ยน้อย ก. ลักษณะกลีบดอก ข.ขนาดดอก ค. กลุ่มดอกสีม่วง ง. กลุ่มดอกสีม่วงอมแดง



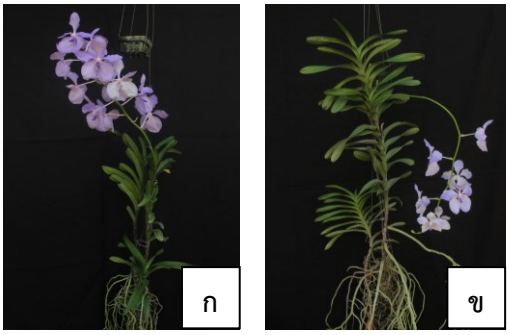
ภาพที่ 9 ลักษณะอาการโรคแอนแทรกโนสที่พบในลูกผสมฟ้ามุ่ย (ก) ลักษณะอาการที่ใบ (ข)



ภาพที่ 10 ลักษณะอาการของโรคเน่าดำที่เกิดกับต้นลูกผสมฟ้ามุ่ย (ก) อาการรุนแรงทำให้ต้นตาย (ข)

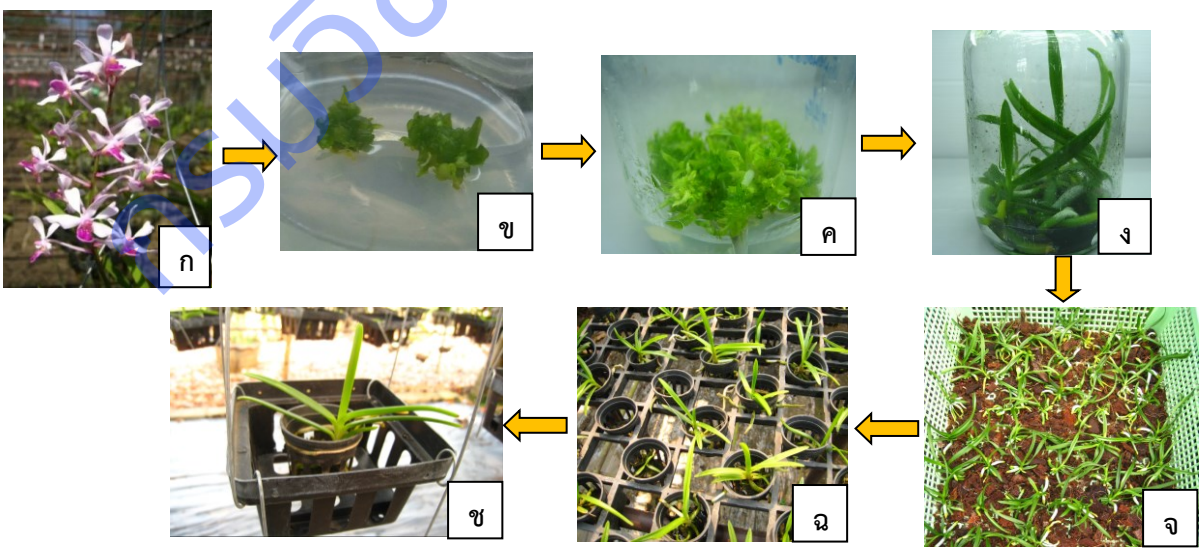
กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 11 ฟ้ามุ่ยต้นพ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ VCS - 44 (ก) และ VCS - 55 (ข)

ภาพที่ 12 ตาข้างของฟ้ามุ่ย VCS-44 เลี้ยงบนอาหารสูตร NDM (ก) พัฒนาเป็นโปรโตคอร์มหลังเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (ข) เพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มในอาหารสูตร NDM (ค)



ภาพที่ 13 ฟ้ามุ่ยน้อยชมพู (ก) ลักษณะโปรโตคอร์มหลังเลี้ยงในอาหาร NDM เป็นเวลา 6 - 8 สัปดาห์ (ข) เพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มในอาหารสูตร NDM (ค) ต้นพร้อมออกปลูก (ง) อนุบาลต้นกล้า (จ) ย้ายปลูกในกระถาง 1.5 นิ้ว (ฉ) ย้ายปลูกในกระเช้าแขวน (ช)

เรียบวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

การประเมินศักยภาพลูกผสมแวนด้าสามปอย
Evaluation of Potential *Vanda* Hybrids

ฉัตต์นภา ข่มอาวุธ[1/] วาสนา สุภาพรหม[2/] สุปัน ไม้ดัดจันทร์[3/]
วราพงษ์ ภิระบรรณ์[2/] มนัสชญา สายพนัส[2/] ดรุณี เพ็งฤกษ์[2/]
Chatnapa Khomarwut[1/] Watsana Supaprom[2/] Supan Maidatchan[3/]
Warapong Priraban[2/] Manuschaya Saipanus[2/] Darunee Phangrerk[2/]

บทคัดย่อ

การประเมินศักยภาพลูกผสมแวนด้าสามปอย มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกลูกผสมแวนด้าสามปอยที่มีลักษณะดีใช้ปลูกทดแทนพันธุ์เดิมหรือใช้เป็นฐานพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ ดำเนินการ ต.ค. 2559 - ก.ย. 2563 ใน 2 สถานที่ คือ 1) ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ (แม่เหียะ : 400 เมตรจากระดับน้ำทะเล) อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ ศึกษาในลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์ในปี 2554-2558 จากจำนวน 5 คู่ผสม 402 ต้น ผลการดำเนินงานคือ พบต้นรอดตายจำนวน 4 คู่ผสม 213 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์รอดตาย 52.99 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ คู่ผสมที่ 1 สามปอยหางปลา 2 X สามปอยหางปลา 1 (VL2VL1) คู่ผสมที่ 2 สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา 2 (VL3VL2) คู่ผสมที่ 3 สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา 4 (VL3VL4) และคู่ผสมที่ 4 สามปอยชมพู 2X สามปอยหลวง 5 (VB2VD5) พบว่า กลุ่มต้นลูกผสมที่ 1 มีความกว้างทรงพุ่มและความกว้างใบ มากที่สุด กลุ่มต้นลูกผสมที่ 2 มีความสูงทรงพุ่ม จำนวนใบ ความกว้างใบ ความยาวใบ จำนวนราก ความยาวรากและเส้นผ่าศูนย์กลางรากมากที่สุด ความต้านทานโรคใบเน่ารากเน่าพบว่า มีความต้านทานโรคเฉลี่ย 77.6-100% โดยคู่ผสมที่ 1 มีความต้านทานโรคใบเน่ารากเน่ามากที่สุดคือ 92.37 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือคู่ผสมที่ 2 และ 3 ตามลำดับที่มีความต้านทานต่อโรคใบเน่ารากเน่า 81.7 และ 77.6 เปอร์เซ็นต์ มีการออกดอกจำนวน 3 คู่ผสม 35 ต้น ได้แก่ คู่ผสมที่ 1 จำนวน 10 ต้น คู่ผสมที่ 2 จำนวน 11 ต้น และคู่ผสมที่ 3 จำนวน 14 ต้น ซึ่งคู่ผสมที่ 3 มีการออกดอกมากที่สุด ได้ต้นคัดเลือกที่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนดได้แก่ ฟอร์มดอกกลม ดอกมีขนาดใหญ่ กลีบหนา มีกลิ่นหอม ช่อดอกไม่ยาวมาก มี 5-7 ดอกต่อช่อ และออกดอกง่าย ใบไม่ร่วง ทั้งหมด 3 คู่ผสม 7 ต้นคือ คู่ผสมที่ 1 จำนวน 3 ต้นได้แก่ VL2VL1B4, VL2VL1B8 และ VL2VL1B10 คู่ผสมที่ 2 จำนวน 2 ต้น ได้แก่ VL3VL2B6 และ VL3VL2B7 และคู่ผสมที่ 3 จำนวน 2 ต้น ได้แก่ VL3VL4B9 และ VL3VL4S3 ที่มีการแทงช่อดอกดอกบานและร่วงในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน 2) ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร อำเภอเมือง จังหวัดพิจิตร ศึกษาลูกผสมตัวเองและเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อในปี 2554-2558 จำนวน 3 คู่ผสม ได้แก่ สามปอยดง สามปอยนก และสามปอยขุนตาน จำนวน 818 ต้น พบว่าลูกผสมกล้วยไม้สกุลแวนด้าสามปอยมีจำนวนต้นรอดตาย 310 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์รอดตาย 38 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตช้า ต้นลูกผสมไม่สมบูรณ์ ทำให้ไม่สามารถเกิดช่อดอกและออกดอกได้

กรมวิชาการเกษตร

เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการออกดอก จึงไม่สามารถประเมินศักยภาพลูกผสมได้

คำสำคัญ : แวนด้า การผสมพันธุ์ ลูกผสม

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Evaluation of potential Vanda hybrids. There are two objectives of this study firstly, to select hybrids with good characteristics to substitute the current varieties, secondly, to use as genetic resources for breeding program. Research on Oct. 2016 – Sept. 2020 at 2 location as follow. The first location is the Chiang Mai Royal Agriculture Research Center (Mae-Hia: 400 above mean sea level), Hangdong district, Chiang Mai, Thailand. By studying in 5 parental of 402 hybrids which obtained in 2011-2015 and could survived 4 parental of 213 hybrids (52.99 percent of survivors). The criteria for selection were round flowers, large flowers, thick petals, fragrant, inflorescences about 5 to 7 flowers per branch, easy to bloom and leaves did not fall. According to the selection criteria, 3 parental of 7 hybrid as follow 1) VL2VL1B4 2) VL2VL1B8 3) VL2VL1B10 which crossing between *V. liouvillei* Finet clone no.2 and *V. liouvillei* Finet clone no.1, 4) VL3VL2B6 and 5) VL3VL2B7 which crossed between *V. liouvillei* Finet clone no.3 and *V. liouvillei* Finet clone no.2, 6) VL3VL4B9 and 7) VL3VL4S3 which crossed between *V. liouvillei* Finet clone no. 3 and *V. liouvillei* Finet clone no. 4. All hybrids bloom during February to April. The second location is the Phichit Agricultural Research and Development Center which assessment of 3 parental of 8 1 8 hybrids potential obtained self-pollination and in vitro seeding in 2011-2015. The result showed that they could survived 3 parental of 310 hybrids (38 percent of survivors) and could not induce inflorescence and bloom because the environment was unsuitable for growth and flowering.

Key words : Vanda Hybridization Hybrid

กรมวิชาการเกษตร

1/ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ (Chiang Mai Agricultural Research Center)

2/ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร (Phichit Agricultural Research and Development Center)

3/ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย (Chiang Rai Horticultural Research Center)

บทนำ

กล้วยไม้สกุลแวนด้า (*Vanda* spp.) โดยเฉพาะแวนด้าฟ้ามุ่ย (*Vanda coerulea*) เป็นกล้วยไม้สัญลักษณ์ของประเทศไทย ลักษณะดอกสีฟ้าที่สดใสและลายสมุก (tessellation) มีการนำไปเป็นพ่อแม่เพื่อผลิตลูกผสม สร้างพันธุ์การค้าที่มีชื่อเสียงในปัจจุบันหลายร้อยคู่ผสม นอกจากนี้ยังมีแวนด้าสามปอยที่มีถิ่นกำเนิดเฉพาะทางภาคเหนือของประเทศไทย มีการนำมาเป็นพ่อแม่เพื่อการพัฒนาพันธุ์ เนื่องจากมีเอกลักษณ์โดดเด่นในเรื่องความหอม ซึ่งต่างจากกล้วยไม้สกุลแวนด้าอื่นๆ

แวนดาสามปอยที่มีถิ่นกำเนิดทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ สามปอยหลวง สามปอยขาว สามปอยดง (*Vanda denisoniana* Benson & Rchb.f.) สามปอยชมพู เอื้องสามปอยแพะ เอื้องนกน้อย (*V. bensonii* Bateman) สามปอยขุนตาล (*V. denisoniana* var. *hebraica*Rchb.f) สามปอยหางปลา (*V. liouvillei* Finet) (สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิตต์, 2551) พบว่ามีความหลากหลาย ทั้งนี้ ฉัตต์นภา และคณะ (2558) ดำเนินการทดลองการ

กรมวิชาการเกษตร

ปรับปรุงพันธุ์แวนดาสามปอยเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ เมื่อเดือนตุลาคม 2553-กันยายน 2558 ณ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ โดยสำรวจ รวบรวม และผสมพันธุ์แวนดาสามปอยต้นต่างๆ พบว่า ได้ต้นลูกผสม สามารถใช้ในการประเมินศักยภาพการเป็นพ่อแม่พันธุ์แวนด้าสามปอยได้จำนวน 5 คู่ผสม 402 ต้น เช่นเดียวกับ สุดาวรรณ และคณะ (2558) ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร อำเภอเมือง จังหวัดพิจิตร ที่ได้สำรวจ รวบรวม และผสมพันธุ์แวนดาสามปอยต้นต่างๆ พบว่า ได้ต้นจำนวน 3 คู่ผสมจากการผสมตัวเองของสามปอยดง สามปอยนก และสามปอยขุนตาล จำนวน 818 ต้น ที่ต้องดำเนินการต่อในปี 2559-2563 เพื่อประเมินคุณค่าลูกผสมด้านการเจริญเติบโตและการออกดอก เกณฑ์การคัดเลือกคือ ฟอร์มดอกกลม ดอกมีขนาดใหญ่ กลีบหนา มีกลิ่นหอม ช่อดอกไม่ยาวมาก มี 5-7 ดอกต่อช่อ และออกดอกง่าย ใบไม่ร่วง เพื่อให้ได้ต้นพ่อแม่พันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้าที่มีศักยภาพในการผลิตต้นพันธุ์ดี

ระเบียบวิธีการวิจัย

- อุปกรณ์

1. วัสดุและอุปกรณ์ทางการเกษตร ได้แก่

1.1 ต้นกล้วยไม้ลูกผสม

1.2 โรงเรือนชั่วคราว

1.3 อื่นๆ ได้แก่ วัสดุปลูก ปุ๋ยทางใบ สารเคมีกำจัดแมลงและโรคพืช เป็นต้น

2. วัสดุสำนักงาน ได้แก่ กล้องถ่ายรูป กระดาษ ดินสอ ปากกา เป็นต้น

3. วัสดุคอมพิวเตอร์ ได้แก่ เครื่องไมโครคอมพิวเตอร์ หมึกพิมพ์ เครื่องพรินท์ เป็นต้น

แบบและวิธีการทดลอง : ไม่มีแบบแผนการทดลอง

- วิธีการ

1. ประเมินคุณค่าลูกผสม กล้วยไม้สกุลแวนด้าสามปอยที่ผสมได้จากปี 2554 - 2558
2. คัดเลือกต้นลูกผสม หลักเกณฑ์การคัดเลือก
   - ฟอร์มดอกกลม ดอกมีขนาดใหญ่ กลีบหนา
   - มีกลิ่นหอม
   - ช่อดอกไม่ยาวมากมี 5 -7 ดอก/ช่อ
   - ออกดอกง่าย ใบไม่ร่วง
3. ขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณต้นคัดเลือกโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
4. การบันทึกข้อมูล ได้แก่ ลักษณะประจำพันธุ์ของลูกผสม การเจริญเติบโต การออกดอก คุณภาพของดอก และการระบาดของศัตรูพืช

- เวลา ระยะเวลาเดือนตุลาคม 2558 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2563

- สถานที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร อำเภอเมือง จังหวัดพิจิตร

ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

ศูนย์วิจัยการเกษตร

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร อำเภอเมือง จังหวัดพิจิตร

การเจริญเติบโต

จากต้นลูกผสมแวนด้าสามปอยที่ได้จากการผสมตัวเอง เมื่อปี 2554-2558 จำนวน 3 คู่ผสม ได้แก่ ลูกผสมสามปอยดง ลูกผสมสามปอยนก และลูกผสมสามปอยขุนตาน ต้นลูกผสมแวนด้าสามปอยทั้ง 3 คู่ผสม ในช่วงอายุ 2-7 ปี มีอัตราการรอดชีวิตน้อยและลดลง ลูกผสมสามปอยดง มีอัตราการรอดชีวิต 100 84.0 68.6 62.0 61.5 59.3 59.0 55.8 55.1 และ 50.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ลูกผสมสามปอยนก มีอัตราการรอดชีวิต 100 88.8 72.0 64.0 62.4 55.2 42.4 32.0 และ 31.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ลูกผสมสามปอยขุนตาน มีอัตราการรอดชีวิต 100 54.7 47.3 44.0 37.0 32.1 29.6 และ 27.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่ออายุ 7 ปี ต้นลูกผสมแวนด้าสามปอยทั้ง 3 คู่ผสม ลูกผสมสามปอยดง มีอัตราการรอดชีวิต 50.6 เปอร์เซ็นต์ ลูกผสมสามปอยนก มีอัตราการรอดชีวิต 31.2 เปอร์เซ็นต์ และลูกผสมสามปอยขุนตาน มีอัตราการรอดชีวิต 27.2 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

ลูกผสมแวนด้าสามปอยดง อายุ 2-7 ปี มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เมื่ออายุ 2 ปี มีความสูงต้น 1.03 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 6.15 ซม. จำนวนใบ 5.25 ใบ ใบกว้าง 0.54 ซม. ใบยาว 3.15 ซม. จำนวนราก 5.90 ราก รากยาว 2.67 ซม. เมื่ออายุ 3 ปี มีความสูงต้น 4.38 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 6.54 ซม. จำนวนใบ 4.50 ใบ ใบกว้าง 0.61 ซม. ใบยาว 3.48 ซม. จำนวนราก 4.75 ราก รากยาว 3.83 ซม. เมื่ออายุ 4 ปี มีความสูงต้น 4.56 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 8.06 ซม. จำนวนใบ 4.95 ใบ ใบกว้าง 0.63 ซม. ใบยาว 4.97 ซม. จำนวนราก 4.70 ราก รากยาว 5.23 ซม. เมื่ออายุ 5 ปี มีความสูงต้น 6.55 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 9.75 ซม. จำนวนใบ 4.40 ใบ ใบกว้าง 0.65 ซม. ใบยาว 6.13 ซม. จำนวนราก 4.80 ราก รากยาว 6.40 ซม. เมื่ออายุ 6 ปี มีความสูงต้น 7.59 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 10.1 ซม. จำนวนใบ 4.11 ใบ ใบกว้าง 0.69 ซม. ใบยาว 6.63 ซม. จำนวนราก 4.50 ราก รากยาว 7.17 ซม. เมื่ออายุ 7 ปี มีความสูงต้น 7.87 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 10.8 ซม. จำนวนใบ 4.12ใบ ใบกว้าง 0.75 ซม. ใบยาว 6.88 ซม. จำนวนราก 4.30 ราก รากยาว 7.76 ซม. ในช่วงอายุ 2-7 ปี มีจำนวนใบ 4.00-5.25 ใบ และจำนวนราก 4.10-5.90 ราก (ตารางที่ 2 และภาพที่ 1)

ลูกผสมแวนด้าสามปอยนก อายุ 2-7 ปี มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เมื่ออายุ 2 ปี มีความสูงต้น 1.43 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 7.03 ซม. จำนวนใบ 5.55 ใบ ใบกว้าง 0.60 ซม. ใบยาว 4.33 ซม. จำนวนราก 4.85 ราก รากยาว 2.80 ซม. เมื่ออายุ 3 ปี มีความสูงต้น 5.10 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 7.79 ซม. จำนวนใบ 4.75 ใบ ใบกว้าง 0.68 ซม. ใบยาว 4.80 ซม. จำนวนราก 4.40 ราก รากยาว 4.85 ซม. เมื่ออายุ 4 ปี มีความสูงต้น 5.88 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 9.25 ซม. จำนวนใบ 5.00 ใบ ใบกว้าง 0.77 ซม. ใบยาว 5.40 ซม. จำนวนราก 4.55 ราก รากยาว 5.60 ซม. เมื่ออายุ 5 ปี มีความสูงต้น 6.82 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 9.85 ซม. จำนวนใบ 4.60 ใบ ใบกว้าง 0.84 ซม. ใบยาว 6.09 ซม. จำนวนราก 4.85 ราก รากยาว 5.95 ซม. เมื่ออายุ 6 ปี มีความสูงต้น 7.51 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม

กรมวิชาการเกษตร

10.6 ซม. จำนวนใบ 4.25 ใบ ใบกว้าง 0.91 ซม. ใบยาว 6.81 ซม. จำนวนราก 4.65 ราก รากยาว 6.66 ซม. เมื่ออายุ 7 ปี มีความสูงต้น 8.31 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 11.2 ซม. จำนวนใบ 3.80 ใบ ใบกว้าง 0.97 ซม. ใบยาว 7.50 ซม. จำนวนราก 4.40 ราก รากยาว 7.72 ซม. (ตารางที่ 3 และภาพที่ 2)

กรมวิชาการเกษตร

ลูกผสมแวนด้าสามปอยขุนตาน อายุ 2-7 ปี มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เมื่ออายุ 2 ปี มีความสูงต้น 1.20 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 6.45 ซม. จำนวนใบ 4.85 ใบ ใบกว้าง 0.55 ซม. ใบยาว 3.70 ซม. จำนวนราก 5.75 ราก รากยาว 2.78 ซม. เมื่ออายุ 3 ปี มีความสูงต้น 4.31 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 7.50 ซม. จำนวนใบ 4.95 ใบ ใบกว้าง 0.68 ซม. ใบยาว 4.39 ซม. จำนวนราก 4.30 ราก รากยาว 3.97 ซม. เมื่ออายุ 4 ปี มีความสูงต้น 6.10 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 9.43 ซม. จำนวนใบ 4.80 ใบ ใบกว้าง 0.77 ซม. ใบยาว 5.91 ซม. จำนวนราก 4.60 ราก รากยาว 5.03 ซม. เมื่ออายุ 5 ปี มีความสูงต้น 7.92 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 9.98 ซม. จำนวนใบ 4.10 ใบ ใบกว้าง 0.81 ซม. ใบยาว 6.65 ซม. จำนวนราก 4.35 ราก รากยาว 7.08 ซม. เมื่ออายุ 6 ปี มีความสูงต้น 9.37 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 11.1 ซม. จำนวนใบ 4.25 ใบ ใบกว้าง 0.87 ซม. ใบยาว 7.46 ซม. จำนวนราก 4.00 ราก รากยาว 7.77 ซม. เมื่ออายุ 7 ปี มีความสูงต้น 9.93 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 13.5 ซม. จำนวนใบ 4.05 ใบ ใบกว้าง 0.92 ซม. ใบยาว 7.98 ซม. จำนวนราก 4.30 ราก รากยาว 8.48 ซม. (ตารางที่ 4 และภาพที่ 3)

ในช่วงระยะเวลา 5 ปี ต้นลูกผสมแวนด้าสามปอยทั้ง 3 คู่ผสม มีอัตราการรอดชีวิตลดลงเรื่อยๆ และมีการเจริญเติบโตช้า ต้นลูกผสมไม่สมบูรณ์ ทำให้ไม่สามารถเกิดช่อดอกและออกดอกได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการออกดอก จึงไม่สามารถประเมินศักยภาพลูกผสมได้ แวนด้าสามปอยดงและแวนด้าสามปอยขุนตาน ในประเทศไทยพบที่จังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง ตาก น่าน และเลย เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย พบในป่าเต็งรังและป่าดิบเขาตามที่โล่งแจ้งแสงแดดจัด ที่ความสูง 800-1,400 เมตรจากระดับน้ำทะเล แวนด้าสามปอยนก ในประเทศไทยพบที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ตาก ขอนแก่น สกลนคร ชัยภูมิ นครราชสีมา และสุรินทร์ เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย พบในป่าเต็งรัง (สลิล, 2552)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงต้นที่มีลักษณะดีของลูกผสมแวนด้าสามปอยดง โดยนำชิ้นส่วนใบอ่อนและปลายรากมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร NDM ดัดแปลง พบว่า ชิ้นส่วนใบอ่อน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ใบอ่อนมีสีเขียว แต่ยังไม่เกิดการพัฒนา เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน ใบอ่อนไม่เกิดการพัฒนา แต่มีบางชิ้นส่วนเป็นสีเขียวและบางชิ้นส่วนเป็นสีน้ำตาล เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 เดือน ใบอ่อนมีสีเขียวแต่ไม่เกิดการพัฒนา และมีบางชิ้นส่วนเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 4) เนื้อเยื่อพืชเมื่อเกิดบาดแผลสามารถสร้างสารประกอบฟีนอลขึ้นมาเพื่อให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นตายและเนื้อเยื่อบริเวณรอยแผลที่ตายไปแล้วนั้นจะช่วยปิดรอยแผลไม่ให้เนื้อเยื่อสูญเสียน้ำหรือเป็นตัวกันการเข้าทำลายของเชื้อโรค (สุมนทิพย์, 2540) ชิ้นส่วนปลายราก เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ปลายรากมีสีเขียวและพองตัวเล็กน้อย เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน ปลายรากมีสีเขียว พองตัวเล็กน้อย แต่ไม่เกิดการพัฒนา (ภาพที่ 5)

ธวัชชัย และคณะ (2556) รายงานว่า จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เพื่อการขยายพันธุ์ ชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ส่วนใหญ่เป็นบริเวณที่มีเนื้อเยื่อเจริญของกล้วยไม้ ได้แก่ ปลายยอด

กรมวิชาการเกษตร

ปลายราก ตาข้าง ใบอ่อน ตาที่ก้านช่อดอกอ่อน เป็นต้น มีรายงานการใช้ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงในแต่ละสกุลที่ประสบความสำเร็จแตกต่างกันออกไป เช่น ในกล้วยไม้สกุล *Oncidium* ใช้ส่วนของใบอ่อน และปลายราก สกุล *Cymbidium* ใช้ส่วนของยอด สกุล *Spathoglottis* ใช้ส่วนของปลายใบและตาที่ข้อ สกุล *Doritaenopsis* และ *Phalaenopsis* ใช้ส่วนของตาดอกที่ก้านช่อดอก สกุล *Dendrobium* ใช้ชิ่นส่วนของยอด ปลายราก สกุล *Vanda* ใช้ส่วนปลายยอด สกุล

กรมวิชาการเกษตร

Paphiopedilium ใช้ส่วนของใบ และสกุล *Acampe* ใช้ส่วนปลายใบ เป็นต้น จิตราพรรณ (2536) กล่าวว่า การเลือกชิ้นส่วนพืชจากต้นพืชเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นับว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อความสำเร็จในการขยายพันธุ์ ซึ่งต้องได้จากต้นที่แข็งแรงสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับอายุของต้นพืช การ ปลูกดูแลรักษา สภาพแวดล้อมที่ต้นพืชนั้นได้รับและรวมถึงฤดูกาลด้วย ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดี ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญ ตายอด, ตาข้าง, ช่อดอก, ใบ และราก เช่น กล้วยไม้ในสกุล *Doritis, Oncidium, Phalaenopsis* และลูกผสม ใช้ส่วนของก้านช่อดอกที่มีตาที่ข้อ และการดัดแปลงสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อช่วงการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ในสภาพเพาะเลี้ยง และการเติมสารอื่นที่ต้นกล้วยไม้ต้องการในอาหารสามารถทำให้กล้วยไม้พัฒนาได้เหมาะสมกับช่วงการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น และเนื่องจากความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับชนิดของกล้วยไม้ สายพันธุ์ อายุของต้น การดูแลรักษา สภาพแวดล้อมในการปลูก อาหาร และสภาพในการเพาะเลี้ยง (ประสาท พร, 2541)

2. ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

จากต้นลูกผสมกล้วยไม้สกุลแวนดาสามปอยที่ดำเนินการในปี 2554-2558 ได้ลูกผสมจากการผสมข้ามต้นภายในชนิดเดียวกัน ผสมข้ามชนิด และผสมตัวเอง ในแต่ละคู่ผสม เริ่มแบ่งกลุ่มในปี 2561 แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มต้นขนาดใหญ่ (มีความสูงทรงพุ่ม > 4.9 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม > 10.7 ซม.) 2) กลุ่มต้นขนาดกลาง (มีความสูงทรงพุ่ม 2.8-4.9 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม 6.3-10.7 ซม.) และ 3) กลุ่มต้นขนาดเล็ก (มีความสูงทรงพุ่ม <2.8 ซม. ความกว้างทรงพุ่ม < 6.3 ซม.) (ภาพที่ 6)

ผลจากการดูแลรักษาลูกผสมที่ได้ในปี 2558 จำนวน 5 คู่ผสม 402 ต้น ต่อมาในปี 2561 ดำเนินการจัดกลุ่มขนาดต้น สามารถแบ่งกลุ่มได้ 3 กลุ่ม พบต้นรอดตาย 316 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์รอดตาย 78.61 เปอร์เซ็นต์ และในปี 2563 พบต้นรอดตายจำนวน 4 คู่ผสม 213 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์รอดตาย 52.99 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่า กลุ่มต้นลูกผสมที่ 1 ซึ่งเป็นคู่ผสมระหว่าง สามปอยหางปลา 2 X สามปอยหางปลา 1 มีความกว้างทรงพุ่มและความกว้างใบ มากที่สุด กลุ่มต้นลูกผสมที่ 2 ซึ่งเป็นคู่ผสมระหว่าง สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา 2 มีความสูงทรงพุ่ม จำนวนใบ ความกว้างใบ ความยาวใบ จำนวนราก ความยาวรากและเส้นผ่าศูนย์กลางรากมากที่สุด

คู่ผสมที่ 1 สามปอยหางปลา 2 X สามปอยหางปลา 1 (VL2VL1) มีต้นลูกผสมจำนวน 116 ต้น ในปี 2563 พบว่า รอดตาย 100 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์รอดตาย 86.21 เปอร์เซ็นต์ คือ เป็นต้นขนาดใหญ่จำนวน 13 ต้น ขนาดกลางจำนวน 37 ต้น และขนาดเล็กจำนวน 50 ต้น (ตารางที่ 5) ด้านการเจริญเติบโต พบว่า มีความสูงทรงพุ่มเฉลี่ย 6.6 – 9.9 ซม. ความกว้างทรงพุ่มเฉลี่ย 17.1 – 22.6 ซม. มีจำนวนใบ 5.4 – 6.9 ใบ ความกว้างใบ 1.0 – 1.2 ซม. ความยาวใบ8.8 – 11.3 ซม. มีจำนวนราก 3.6 – 5.4 ราก ความยาวราก 10.3 – 16.2 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางราก 0.3 – 0.4 ซม. (ตารางที่ 6-8)

คู่ผสมที่ 2 สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา 2 (VL3VL2) ซึ่งมีต้นลูกผสมจำนวน 101 ต้น ในปี 2563 พบว่ารอดตาย 60 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์รอดตาย 59.41 เปอร์เซ็นต์ คือ เป็นต้น

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ขนาดใหญ่จำนวน 15 ต้น ขนาดกลางจำนวน 11 ต้น และขนาดเล็กจำนวน 34 ต้น (ตารางที่ 5) ด้านการเจริญเติบโต พบว่า มีความสูงทรงพุ่มเฉลี่ย 4.1-10.6 ซม. ความกว้างทรงพุ่มเฉลี่ย 8.8-23.1 ซม. มีจำนวนใบ 4.3-8.6 ใบ ความกว้างใบ 0.6-1.3 ซม. ความยาวใบ 4.7-12.7 ซม. มีจำนวนราก 2.6-5.2 ราก ความยาวราก 8.9-27.7 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางราก 0.2–0.4 ซม. (ตารางที่ 6-8)

กรมวิชาการเกษตร

คู่ผสมที่ 3 สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา 4 (VL3VL4) ซึ่งมีต้นลูกผสมจำนวน 95 ต้น ในปี 2563 พบว่า รอดตาย 52 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์รอดตาย 54.74เปอร์เซ็นต์ คือ เป็นต้นขนาดใหญ่จำนวน 10 ต้น ขนาดกลางจำนวน 20 ต้น และขนาดเล็กจำนวน 22 ต้น (ตารางที่ 5) ด้านการเจริญเติบโต พบว่า มีความสูงทรงพุ่มเฉลี่ย 4.3-9.7 ซม. ความกว้างทรงพุ่มเฉลี่ย 10.2-22.7 ซม. มีจำนวนใบ 5.0-7.8 ใบ ความกว้างใบ 0.7-1.2 ซม. ความยาวใบ 5.4-11.8 ซม. มีจำนวนราก 2.8-4.8 ราก ความยาวราก 9.0-23.4 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางราก 0.3-0.4 ซม. (ตารางที่ 6-8)

คู่ผสมที่ 4 สามปอยชมพู 2X สามปอยหลวง 5 (VB2VD5) ซึ่งมีต้นลูกผสมจำนวน 1 ต้นในปี 2563 พบว่า รอดตายทั้งหมด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์รอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ คือ เป็นต้นขนาดใหญ่จำนวน 1 ต้น (ตารางที่ 5) ด้านการเจริญเติบโต พบว่า มีความสูงทรงพุ่มเฉลี่ย 4.1-10.6 ซม. ความกว้างทรงพุ่มเฉลี่ย 8.8-23.1 ซม. มีจำนวนใบ 4.3-8.6 ใบ ความกว้างใบ 0.6-1.3 ซม. ความยาวใบ 4.7-12.7 ซม. มีจำนวนราก 2.6-5.2 ราก ความยาวราก 8.9-27.7 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางราก 0.2-0.4 ซม. (ตารางที่ 6-8)

สำหรับคู่ผสมที่ 5 สามปอยดง 4 ผสมตัวเอง (VD4) ซึ่งมีต้นลูกผสมจำนวน 3 ต้น ในปี 2563 พบว่า ตาย 3 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์รอดตาย 0 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากต้นโทรม

ความต้านทานโรค

ความต้านทานโรคใบเน่ารากเน่าพบว่า มีความต้านทานโรคเฉลี่ย 77.6-100% ทั้งนี้คู่ผสมที่ 4 ที่มีเพียง 1 ต้นจะไม่นำมาเปรียบเทียบกับอีก 3 คู่ผสมที่พบว่า คู่ผสมที่ 1 สามปอยหางปลา 2 X สามปอยหางปลา 1 (VL2VL1) มีความต้านทานโรคใบเน่ารากเน่ามากที่สุดคือ 92.37 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือคู่ผสมที่ 2 และ 3 ตามลำดับที่มีความต้านทานต่อโรคใบเน่ารากเน่า 81.7 และ 77.6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9)

การออกดอก

การแทงช่อออกดอกของแวนด้าสามปอยลูกผสมเริ่มแทงช่อดอกเมื่ออายุ 3 ปี 4 ปี และ 5 ปี ตามลำดับหลังจากการปลูกเลี้ยงในสภาพโรงเรือน (ตารางที่ 10) คือ

ปี 2561 เริ่มมีการแทงช่อดอกจำนวน 3 ต้นได้แก่ VL3VL2B1 VL3VL2B4 และ VL3VL2B10 ในเดือน มีนาคม 2561 และดอกบานในเดือนเมษายน 2561 (ตารางที่ 10)

ปี 2562 มีการแทงช่อดอกจำนวน 16 ต้นได้แก่ VL3VL2B2 VL3VL2B4 VL3VL2B9 VL3VL2M1 VL3VL2M5 VL3VL2M6 VL2VL1B2 VL2VL1B4 VL2VL1B8 VL2VL1M6 VL3VL4B2 VL3VL4B3 VL3VL4B9 VL3VL4M2 VL3VL4M3 และVL3VL4M6 ในเดือน มีนาคม 2562 และดอกบานในเดือนเมษายน 2562 (ตารางที่ 10)

ปี 2563 มีการแทงช่อดอกจำนวน 31 ต้นได้แก่ VL3VL2B1 VL3VL2B2 VL3VL2B4 VL3VL2B6 VL3VL2B7 VL3VL2B9 VL3VL2B10 VL3VL2M6 VL3VL2M9 VL2VL1B1 VL2VL1B2 VL2VL1B4 VL2VL1B5 VL2VL1B8 VL2VL1B10 VL2VL1M1 VL2VL1M4 VL2 VL1 S8 VL3VL4B1 VL3VL4B2 VL3VL4B6 VL3VL4B7 VL3VL4B8 VL3VL4B9

กรมวิชาการเกษตร

VL3VL4B10 VL3VL4M2 VL3VL4M3 VL3VL4M5 VL3VL4M6 VL3VL4M10 และ VL3VL4S3 ในเดือน กุมภาพันธ์ 2563 และดอกบานในเดือนเมษายน 2563 (ตารางที่ 10)

โดยพบว่า จากการปลูกเลี้ยงจำนวน 5 คู่ผสม รอดตายเหลือเพียง 4 คู่ผสม 213 ต้น พบว่ามีการออกดอกจำนวน 3 คู่ผสม 33 ต้น ได้แก่ คู่ผสมที่1 สามปอยหางปลา 2 X สามปอยหางปลา 1 (VL2VL1) มีจำนวนต้นที่ออกดอกทั้งหมด 10 ต้น คู่ผสมที่2 สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา

กรมวิชาการเกษตร

2 (VL3VL2) มีจำนวนต้นที่ออกดอกทั้งหมด 11 ต้น และคู่ผสมที่ 3 สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา 4 (VL3VL4) มีจำนวนต้นที่ออกดอกทั้งหมด 14 ต้น ซึ่งพบว่าคู่ผสมที่ 3 มีการออกดอกมากที่สุด (ตารางที่ 10)

ตามที่ลูกผสมมีการออกดอกจำนวน 3 คู่ผสม 35 ต้น ดำเนินการคัดเลือกต้นลูกผสมตามหลักเกณฑ์การคัดเลือกคือ ฟอร์มดอกกลม ดอกมีขนาดใหญ่ กลีบหนา มีกลิ่นหอม ช่อดอกไม่ยาวมากมี 5 -7 ดอกต่อช่อ และออกดอกง่าย ใบไม่ร่วง ได้ต้นที่ผ่านเกณฑ์ทั้งหมด 3 คู่ผสม 7 ต้น โดยพบว่า คู่ผสมที่ 1 สามปอยหางปลา 2 X สามปอยหางปลา 1 (VL2VL1) ได้ต้นที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือก 3 ต้นได้แก่ VL2VL1B4, VL2VL1B8 และ VL2VL1B10 (ตารางที่ 11 และ ภาพที่ 7) สำหรับคู่ผสมที่ 2 สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา 2 (VL3VL2) ได้ต้นที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือก 2 ต้นได้แก่ VL3VL2B6 และ VL3VL2B7 (ตารางที่ 12 และ ภาพที่ 8) และคู่ผสมที่ 3 สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา 4 (VL3VL4)) ได้ต้นที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือก 2 ต้นได้แก่ VL3VL4B9 และ VL3VL4S3 (ตารางที่ 13 และ ภาพที่ 9) ที่มีการแทงช่อดอก ดอกบานและร่วงในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน และนำไปขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณต้นคัดเลือกโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร อำเภอเมือง จังหวัดพิจิตร

ลูกผสมกล้วยไม้สกุลแวนด้าสามปอย มีอัตราการรอดชีวิตน้อยและมีการเจริญเติบโตช้า ต้นลูกผสมไม่สมบูรณ์ ทำให้ไม่สามารถเกิดช่อดอกและออกดอกได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการออกดอก จึงไม่สามารถประเมินศักยภาพลูกผสมได้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลูกผสมกล้วยไม้สกุลแวนด้าสามปอยจากชิ้นส่วนใบอ่อนและปลายรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร NDM ดัดแปลง ไม่สามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ บางชิ้นส่วนเกิดสีน้ำตาลและทำให้ชิ้นส่วนตาย

2. ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

2.1 ดูแลรักษาลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์ในปี 2554-2558 จากจำนวน 5 คู่ผสม 402 ต้น พบต้นรอดตายจำนวน 4 คู่ผสม 213 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์รอดตาย 52.99 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่ากลุ่มต้นลูกผสมที่ 1 ซึ่งเป็นคู่ผสมระหว่าง สามปอยหางปลา 2 X สามปอยหางปลา 1 มีความกว้างทรงพุ่มและความกว้างใบ มากที่สุด กลุ่มต้นลูกผสมที่ 2 ซึ่งเป็นคู่ผสมระหว่าง สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา 2 มีความสูงทรงพุ่ม จำนวนใบ ความกว้างใบ ความยาวใบ จำนวนราก ความยาวรากและเส้นผ่าศูนย์กลางรากมากที่สุด

2.2 ความต้านทานโรคใบเน่ารากเน่าพบว่า มีความต้านทานโรคเฉลี่ย 77.6-100% โดยคู่ผสมที่ 1 สามปอยหางปลา 2 X สามปอยหางปลา 1 รหัส (VL2VL1) มีความต้านทานโรคใบเน่ารากเน่า

กรมวิชาการเกษตร

มากที่สุดคือ 92.37 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือคู่ผสมที่ 2 และ 3 ตามลำดับที่มีความต้านทานต่อโรคใบเน่ารากเน่า 81.7 และ 77.6 เปอร์เซ็นต์

2.3 มีการออกดอกจำนวน 3 คู่ผสม 35 ต้น ได้แก่ คู่ผสมที่ 1 สามปอยหางปลา 2 X สามปอยหางปลา 1 (VL2VL1) มีจำนวนต้นที่ออกดอกทั้งหมด 10 ต้น คู่ผสมที่ 2 สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา 2 (VL3VL2) มีจำนวนต้นที่ออกดอกทั้งหมด 11 ต้น และคู่ผสมที่ 3 สามปอยหาง

กรมวิชาการเกษตร

ปลา 3 X สามปอยหางปลา 4 (VL3VL4) มีจำนวนต้นที่ออกดอกทั้งหมด 14 ต้น ซึ่งพบว่าคู่ผสมที่ 3 มีการออกดอกมากที่สุด

2.4 คัดเลือกต้นลูกผสมตามหลักเกณฑ์การคัดเลือก เพื่อนำไปขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณต้นคัดเลือกโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้ต้นที่ผ่านเกณฑ์ทั้งหมด 3 คู่ผสม 7 ต้นคือ คู่ผสมที่ 1 สามปอยหางปลา 2 X สามปอยหางปลา 1 (VL2VL1) ได้ต้นที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือก 3 ต้นได้แก่ VL2VL1B4, VL2VL1B8 และ VL2VL1B10 คู่ผสมที่ 2 สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา 2 (VL3VL2) ได้ต้นที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือก 2 ต้นได้แก่ VL3VL2B6 และ VL3VL2B7 และคู่ผสมที่ 3 สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา 4 รหัส (VL3VL4) ได้ต้นที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือก 2 ต้นได้แก่ VL3VL4B9 และ VL3VL4S3 ที่มีการแทงช่อดอก ดอกบานและร่วงในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน

ต้นลูกผสมแวนด้าสามปอยที่ผ่านการประเมินคุณลักษณะ จำนวน 7 ต้น สามารถนำไปขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณต้นคัดเลือกโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อผลิตต้นพันธุ์ที่ดีสำหรับปลูกทดแทนพันธุ์เดิมหรือใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และจำนวนต้นรอดตายของลูกผสมแวนด้าสามปอยดง สามปอยนก และสามปอยขุนตานอายุ 2 ปี ถึง 7 ปี หลังออกปลูก

อายุต้น	อัตราการรอดชีวิต (%)		
	สามปอยดง X สามปอยดง	สามปอยนก X สามปอยนก	สามปอยขุนตาน X สามปอยขุนตาน
2 ปี	100	100	100
2 ปี 6 เดือน	84.0	88.8	100
3 ปี	68.6	72.0	54.7
3 ปี 6 เดือน	62.0	64.0	47.3
4 ปี	61.5	62.4	44.0
4 ปี 6 เดือน	59.3	55.2	37.0
5 ปี	59.0	55.2	37.0
5 ปี 6 เดือน	59.0	55.2	37.0
6 ปี	55.8	42.4	32.1
7 ปี	50.6	31.2	27.2

อายุต้น	จำนวนต้นรอดตาย (ต้น)		
	สามปอยดง X สามปอยดง	สามปอยนก X สามปอยนก	สามปอยขุนตาน X สามปอยขุนตาน
2 ปี	450	125	243
2 ปี 6 เดือน	340	111	243
3 ปี	278	90	133
3 ปี 6 เดือน	251	80	115
4 ปี	249	78	107
4 ปี 6 เดือน	240	69	90
5 ปี	239	69	90
5 ปี 6 เดือน	239	69	90
6 ปี	226	53	78
6 ปี 6 เดือน	223	40	72
7 ปี	205	39	66
รวมทั้งหมด		310	

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 การเจริญเติบโตของลูกผสมแวนด้าสามปอยดง อายุ 2 ปี ถึง 7 ปี หลังออกปลูก

อายุต้น	ความสูงต้น (ซม.)	ความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)	จำนวนใบ	ขนาดใบ		จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
				ความกว้าง (ซม.)	ความยาว (ซม.)		
2 ปี	1.03	6.15	5.25	0.54	3.15	5.90	2.67
2 ปี 6 เดือน	3.72	6.40	4.30	0.58	3.20	5.00	3.08
3 ปี	4.38	6.54	4.50	0.61	3.48	4.75	3.83
3 ปี 6 เดือน	4.42	6.90	4.20	0.62	3.99	4.85	4.80
4 ปี	4.56	8.06	4.95	0.63	4.97	4.70	5.23
4 ปี 6 เดือน	6.34	8.74	4.15	0.65	5.11	4.85	6.10
5 ปี	6.55	9.75	4.40	0.65	6.13	4.80	6.40
5 ปี 6 เดือน	7.56	9.86	4.00	0.65	6.54	4.40	6.90
6 ปี	7.59	10.1	4.11	0.69	6.63	4.50	7.17
6 ปี 6 เดือน	7.68	10.6	4.40	0.72	6.79	4.10	7.67
7 ปี	7.87	10.8	4.12	0.75	6.88	4.30	7.76

* ค่าเฉลี่ยจาก 20 ต้น

ตารางที่ 3 การเจริญเติบโตของลูกผสมแวนด้าสามปอยนก อายุ 2 ปี ถึง 7 ปี หลังออกปลูก

อายุต้น	ความสูงต้น (ซม.)	ความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)	จำนวนใบ	ขนาดใบ		จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
				ความกว้าง (ซม.)	ความยาว (ซม.)		
2 ปี	1.43	7.03	5.55	0.60	4.33	4.85	2.80
2 ปี 6 เดือน	4.53	7.08	4.45	0.64	4.48	4.70	3.88
3 ปี	5.10	7.79	4.75	0.68	4.80	4.40	4.85
3 ปี 6 เดือน	5.41	8.22	4.48	0.74	4.91	4.85	5.22
4 ปี	5.88	9.25	5.00	0.77	5.40	4.55	5.60
4 ปี 6 เดือน	6.29	9.35	4.00	0.82	5.83	4.65	5.88
5 ปี	6.82	9.85	4.60	0.84	6.09	4.85	5.95
5 ปี 6 เดือน	7.33	10.2	4.10	0.88	6.51	4.70	6.48
6 ปี	7.51	10.6	4.25	0.91	6.81	4.65	6.66
6 ปี 6 เดือน	8.11	10.9	3.65	0.96	7.28	4.15	7.50
7 ปี	8.31	11.2	3.80	0.97	7.50	4.40	7.72

* ค่าเฉลี่ยจาก 20 ต้น

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4 การเจริญเติบโตของลูกผสมแวนด้าสามปอยขุนตาน อายุ 2 ปี ถึง 7 ปี หลังออก

อายุต้น	ความสูงต้น (ซม.)	ความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)	จำนวนใบ	ขนาดใบ		จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
				ความกว้าง (ซม.)	ความยาว (ซม.)		
2 ปี	1.20	6.45	4.85	0.55	3.70	5.75	2.78
2 ปี 6 เดือน	3.35	6.70	4.40	0.63	3.98	4.50	2.93
3 ปี	4.31	7.50	4.95	0.68	4.39	4.30	3.97
3 ปี 6 เดือน	4.65	8.77	4.58	0.74	5.51	4.88	4.90
4 ปี	6.10	9.43	4.80	0.77	5.91	4.60	5.03
4 ปี 6 เดือน	7.48	9.60	4.54	0.79	6.45	4.40	5.26
5 ปี	7.92	9.98	4.10	0.81	6.65	4.35	7.08
5 ปี 6 เดือน	8.57	10.1	4.05	0.84	6.85	4.15	7.18
6 ปี	9.37	11.1	4.25	0.87	7.46	4.00	7.77
6 ปี 6 เดือน	9.79	12.0	4.45	0.90	7.67	4.05	8.05
7 ปี	9.93	13.5	4.05	0.92	7.98	4.30	8.48

* ค่าเฉลี่ยจาก 20 ต้น

ตารางที่ 5 จำนวนต้นของลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามต้นภายในชนิดเดียวกัน ผสมข้ามชนิด และผสมตัวเองจำนวน 5 คู่ผสม

คู่ผสมที่	รหัสคู่ผสม	แม่Xพ่อ (ภาคผนวก)	จำนวนต้นปลูก	จำนวนต้นรอดตาย	ขนาดต้น		
					ขนาดใหญ่	ขนาดกลาง	ขนาดเล็ก
1	VL2VL1	สามปอยหางปลา 2 X สามปอยหางปลา 1	116	100	13	37	50
2	VL3VL2	สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา 2	101	60	15	11	34
3	VL3VL4	สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา 4	95	52	10	20	22
4	VB2VD5	สามปอยชมพู 2 X สามปอยหลวง 5	1	1	1	-	-
5	VD4	สามปอยดง 4 (ผสมตัวเอง)	3	-	-	-	-
		รวม	316	213			

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 6 การเจริญเติบโตของแวนด้าสามปอยลูกผสม กลุ่มต้นขนาดใหญ่

รหัสคู่ผสม	ทรงพุ่ม		ใบ			ราก		
	ความสูง (ซม.)	ความกว้าง (ซม.)	จำนวน (ใบ)	ความกว้าง (ซม.)	ความยาว (ซม.)	จำนวน (ราก)	ความยาว (ซม.)	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม.)
VL2VL1	9.9	22.6	6.9	1.2	11.3	5.4	16.2	0.4
VL3VL2	10.6	23.1	8.6	1.3	12.7	5.2	27.7	0.4
VL3VL4	9.7	22.7	7.8	1.2	11.8	4.9	23.4	0.4
VB2VD5	6.9	16.0	4.8	0.9	7.0	3.8	14.0	0.3

ตารางที่ 7 การเจริญเติบโตของแวนด้าสามปอยลูกผสม กลุ่มต้นขนาดกลาง

รหัสคู่ผสม	ทรงพุ่ม		ใบ			ราก		
	ความสูง (ซม.)	ความกว้าง (ซม.)	จำนวน (ใบ)	ความกว้าง (ซม.)	ความยาว (ซม.)	จำนวน (เส้น)	ความยาว (ซม.)	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม.)
VL2VL1	6.9	17.0	5.9	1.1	8.9	4.7	14.2	0.3
VL3VL2	5.7	14.3	5.6	0.9	7.4	3.4	14.2	0.3
VL3VL4	8.2	19.8	7.9	1.2	10.1	4.3	20.0	0.4
VB2VD5	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 8 การเจริญเติบโตของแวนด้าสามปอยลูกผสม กลุ่มต้นขนาดเล็ก

รหัสคู่ผสม	ทรงพุ่ม		ใบ			ราก		
	ความสูง (ซม.)	ความกว้าง (ซม.)	จำนวน (ใบ)	ความกว้าง (ซม.)	ความยาว (ซม.)	จำนวน (เส้น)	ความยาว (ซม.)	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม.)
VL2VL1	6.6	17.1	5.4	1.0	8.8	3.6	10.3	0.3
VL3VL2	4.1	8.8	4.3	0.6	4.7	2.6	8.9	0.2
VL3VL4	4.3	10.2	5.0	0.7	5.4	2.8	9.0	0.3
VB2VD5	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 9 ความต้านทานโรคใบเน่ารากเน่า หน่วย : เปอร์เซ็นต์

รหัสคู่ผสม	จำนวนต้นที่รอดตาย	กลุ่มต้นขนาดใหญ่	กลุ่มต้นขนาดกลาง	กลุ่มต้นขนาดเล็ก	เฉลี่ย
VL2VL1	100	88.2	100	88.9	92.37
VL3VL2	60	75	100	70.1	81.70

กรมวิชาการเกษตร

VL3VL4	52	100	50	82.8	77.60
VB2VD5	1	100	-	-	100.00

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 10 การออกดอกของลูกผสมแวนด้าสามปอย

คู่ผสมที่	รหัสต้น	แม่ x พ่อ (ภาคผนวก ข)	ปี 2561	ปี 2562	ปี 2563
1	VL2VL1B1	สามปอยหางปลา 2 x สามปอยหางปลา 1			/
	VL2VL1B2	สามปอยหางปลา 2 x สามปอยหางปลา 1		/	/
	VL2VL1B4	สามปอยหางปลา 2 x สามปอยหางปลา 1		/	/
	VL2VL1B5	สามปอยหางปลา 2 x สามปอยหางปลา 1			/
	VL2VL1B8	สามปอยหางปลา 2 x สามปอยหางปลา 1		/	/
	VL2VL1B10	สามปอยหางปลา 2 x สามปอยหางปลา 1			/
	VL2VL1M6	สามปอยหางปลา 2 x สามปอยหางปลา 1		/	
	VL2VL1M1	สามปอยหางปลา 2 x สามปอยหางปลา 1			/
	VL2VL1M4	สามปอยหางปลา 2 x สามปอยหางปลา 1			/
	VL2VL1S8	สามปอยหางปลา 2 x สามปอยหางปลา 1			/
2	VL3VL2B1	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 2	/		/
	VL3VL2B2	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 2		/	/
	VL3VL2B4	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 2	/	/	/
	VL3VL2B6	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 2			/
	VL3VL2B7	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 2			/
	VL3VL2B9	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 2		/	/
	VL3VL2B10	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 2	/		/
	VL3VL2M1	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 2		/	
	VL3VL2M5	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 2		/	
	VL3VL2M6	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 2		/	/
	VL3VL2M9	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 2			/
3	VL3VL4B1	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 4			/
	VL3VL4B2	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 4		/	/
	VL3VL4B3	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 4		/	
	VL3VL4B6	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 4			/
	VL3VL4B7	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 4			/
	VL3VL4B8	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 4			/
	VL3VL4B9	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 4		/	/
	VL3VL4B10	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 4			/
	VL3VL4M2	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 4		/	/
	VL3VL4M3	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 4		/	/
	VL3VL4M5	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 4			/
	VL3VL4M6	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 4		/	/
	VL3VL4M10	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 4			/
	VL3VL4S3	สามปอยหางปลา 3 x สามปอยหางปลา 4			/

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 11 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลูกผสมต้นคัดเลือกคู่ผสมที่ 1 (สามปอยหางปลา 2 X สามปอยหางปลา) ณ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

รหัสลูกผสม	จน.ใบ	ขนาดใบ (กxย) (ซม.)	จน.ดอก/ช่อ	ขนาดดอก(กxส) (ซม.)	กลีบดอก (กxย) (ซม.)	กลีบนอกบน (กxย)(ซม.)	กลีบนอกด้านข้าง (กxย)(ซม.)	ยาวก้านดอก (ซม.)	ยาวช่อดอก (ซม.)	กลีบปาก (กxย) (ซม.)	ยาวเส้าเกสร (ซม.)	ลักษณะดอก
VL2VL1B4	7.2	1.3x16.5	7	2.0x2.5	0.6x1.0	0.8x1.0	0.8x1.0	3.5	28.0	1.0x1.4	0.5	กลีบทั้งห้าเล็กเรียวยาว ขอบกลีบบิดริ้ว กลีบดอกเหลืองอมเขียว มีลายสีแดงปะเป็นทางโคนกลีบมีจุดประสีแดง ดอกลักษณะยาว ขอบกลีบสีเหลืองอมเขียว กลีบปากโคนกลีบสีม่วงเข้มมีร่อง ไม่ยาวมาก คล้ายหางปลาปลายแยกเป็น2แฉก สีม่วงอมน้ำตาลแดง เส้าเกสรโคนสีขาวยอดสีม่วง ฝาครอบและเกสรตัวผู้สีเหลือง ระยะเวลาการออกดอก ครั้งที่ 1 ปี 2562 ครั้งที่ 2 ปี 2563 ในช่วงเดือนมีนาคม – เมษายน
VL2VL1B8	8.1	1.4x11.7	8	2.5x3.5	0.6x1.0	0.7x1.0	0.8x1.0	4.5	42.0	0.7x1.5	0.5	กลีบทั้งห้าเล็กเรียวยาว ขอบกลีบบิดริ้ว กลีบดอกเหลืองอมเขียว มีลายสีแดงประเป็นทาง ดอกกลมยาว ขอบกลีบสีเหลืองอมเขียว กลีบปากโคนกลีบสีม่วงเข้มมีร่อง ยาวคล้ายหางปลาปลายแยกเป็น2แฉก สีม่วงอมน้ำตาลแดง เส้าเกสรโคนสีขาวยอดสีม่วง ฝาครอบและเกสรตัวผู้สีเหลือง **ระยะเวลาการออกดอก** ครั้งที่ 1 ปี 2562 ครั้งที่ 2 ปี 2563 ในช่วงเดือนมีนาคม – เมษายน
VL2VL1B10	7.5	1.2x11.6	7	2.5x2.5	0.5x0.8	0.7x1.0	0.8x1.2	3.5	40.0	0.8x1.5	0.5	กลีบทั้งห้าเล็กเรียวยาว ขอบกลีบบิดริ้ว กลีบดอกพื้นสีม่วงแดงกระจายทั่ว โคนกลีบมีจุดประสีแดง ดอกลักษณะยาว ขอบกลีบสีเหลืองอมเขียว กลีบปากโคนกลีบสีม่วงเข้มมีร่อง ไม่ยาวมากคล้ายหางปลาปลายแยกเป็น2แฉก สีม่วงอมน้ำตาลแดง เส้าเกสรโคนสีขาวยอดสีม่วง ฝาครอบและเกสรตัวผู้สีเหลือง กลิ่นหอมอ่อนในช่วงสาย **ระยะเวลาการออกดอก** ครั้งที่ 1 ปี 2563 (22 ก.พ. – 3 พ.ค.63)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 12 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลูกผสมต้นคัดเลือกคู่ผสมที่ 2 (สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา) ณ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

รหัสลูกผสม	จน.ใบ	ขนาดใบ (กxย) (ซม.)	จน.ดอก	ขนาดดอก(กxส) (ซม.)	กลีบดอก (กxย) (ซม.)	กลีบนอกบน (กxย)(ซม.)	กลีบนอกด้านข้าง (กxย)(ซม.)	ยาวก้านดอก (ซม.)	ยาวช่อดอก (ซม.)	กลีบปาก (กxย) (ซม.)	ยาวเส้าเกสร (ซม.)	ลักษณะดอก
VL3VL2B6	7.7	1.2x12.9	8	2.5x2.0	0.6x1.2	0.7x1.3	1.0x1.1	4.0	43.0	0.6x1.5	0.5	กลีบทั้งห้าเล็กเรียวขอบบิดริ้ว กลีบดอกสีม่วงแดงอมน้ำตาลประสีแดงทั่วกลีบขอบกลีบสีเหลือง กลีบปากโคนกลีบสีม่วงเข้ม ปลายแยกเป็น2แฉก คล้ายหางปลา สีม่วงแดง เส้าเกสรโคนสีขาวยอดสีม่วง ฝาครอบและเกสรตัวผู้สีเหลือง กลิ่นหอมอ่อนในช่วงสาย ระยะเวลาการออกดอก ครั้งที่ 1 ปี 2563 (3 มี.ค.- 28 เม.ย.63)
VL3VL2B7	7.8	1.2x11.0	8	2.3x2.5	0.6x1.1	0.5x1.0	0.6x1.0	4.0	25.0	0.5x1.5	0.5	ดอกยาว กลีบทั้งห้าเล็กเรียวขอบบิดริ้ว กลีบดอกสีแดงลายตารางชัดเจน กลีบปากโคนกลีบสีม่วงเข้ม ปลายแยกเป็น2แฉก คล้ายหางปลา สีม่วงแดง เส้าเกสรโคนสีขาวยอดสีม่วง ฝาครอบและเกสรตัวผู้สีเหลือง กลิ่นหอมอ่อนในช่วงสาย **ระยะเวลาการออกดอก** ครั้งที่ 1 ปี 2563 (20 มี.ค.- 28 เม.ย.63)

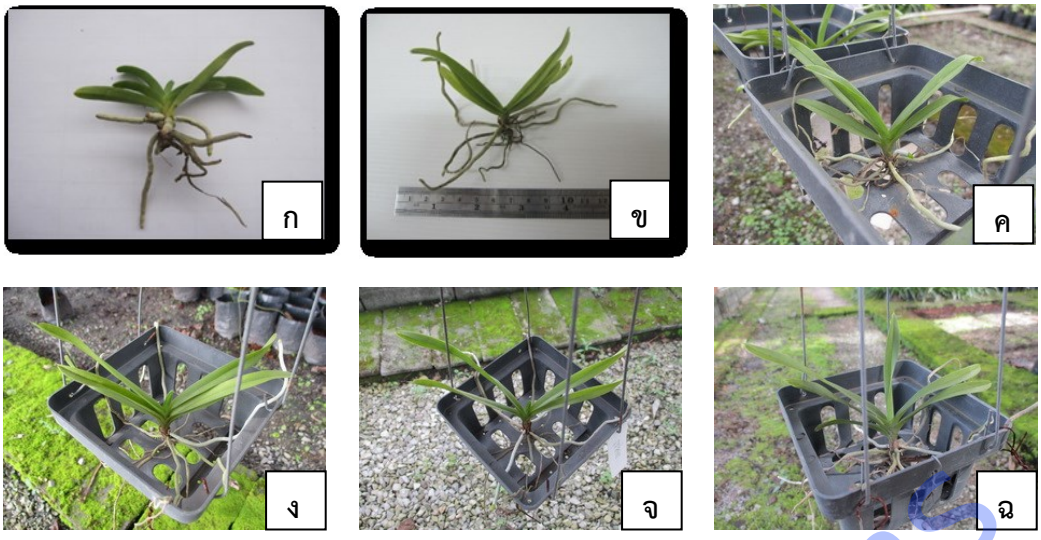
ตารางที่ 13 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลูกผสมต้นคัดเลือกคู่ผสมที่ 3 (สามปอยหางปลา 3 X สามปอยหางปลา) ณ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

รหัสลูกผสม	จน.ใบ	ขนาดใบ (กxย) (ซม.)	จน.ดอก	ขนาดดอก(กxส) (ซม.)	กลีบดอก (กxย) (ซม.)	กลีบนอกบน (กxย)(ซม.)	กลีบนอกด้านข้าง (กxย)(ซม.)	ยาวก้านดอก (ซม.)	ยาวช่อดอก (ซม.)	กลีบปาก (กxย) (ซม.)	ยาวเส้าเกสร (ซม.)	ลักษณะดอก
VL3VL4B9	7.5	1.4x12.2	6	2.0x2.5	0.5x1.0	0.5x1.0	0.7x1.0	3.0	25.0	1.0x1.2	0.5	ทรงดอกกลม กลีบทั้งห้าเล็กเรียวยาว ขอบกลีบบิดริ้ว กลีบดอกสีเหลืองอมเขียว จุดประสีม่วงแดง ขอบกลีบสีเหลือง กลีบปากโคนกลีบสีม่วงเข้มมีร่อง ยาวคล้ายหางปลาปลายแยกเป็น2แฉก สีม่วงอมน้ำตาลแดง เส้าเกสรโคนสีขาวยอดสีม่วง ฝาครอบและเกสรตัวผู้สีเหลือง ระยะเวลาการออกดอก ครั้งที่ 1 ปี 2562 ครั้งที่ 2 ปี 2563 ในช่วงเดือนมีนาคม – เมษายน
VL3VL4S3	7.7	1.0x8.1	7	3.0x2.3	0.6x1.0	0.7x1.1	0.8x1.3	4.0	24.0	1.2x1.3	0.5	ดอกกลม กลีบทั้งห้าเล็กเรียวยาว ขอบกลีบบิดริ้ว กลีบดอกพื้นสีแดง

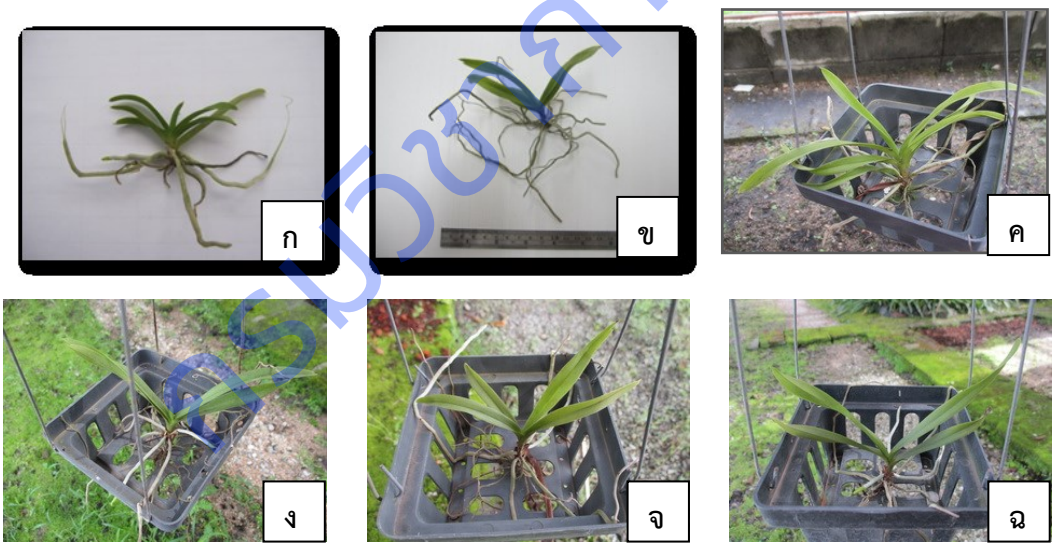
กรมวิชาการเกษตร

	ขอบกลีบสีเหลือง กลีบปากโคนกลีบสีม่วงเข้มมีร่อง ไม่ยาวมากคล้ายหางปลาปลายแยกเป็น2แฉก สีม่วงอมน้ำตาลแดง เส้าเกสรโคนสีขาวยอดสีม่วง ฝาครอบและเกสรตัวผู้สีเหลือง ระยะเวลาการออกดอก ครั้งที่ 1 ปี 2563 (20 มี.ค.-24 เม.ย.63)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1 ลักษณะของลูกผสมกล้วยไม้แวนด้าสามปอยดง อายุ 2 ปี (ก) 3 ปี (ข) 4 ปี (ค) 5 ปี (ง) 6 ปี (จ) และ 7 ปี (ฉ) หลังออกปลูก

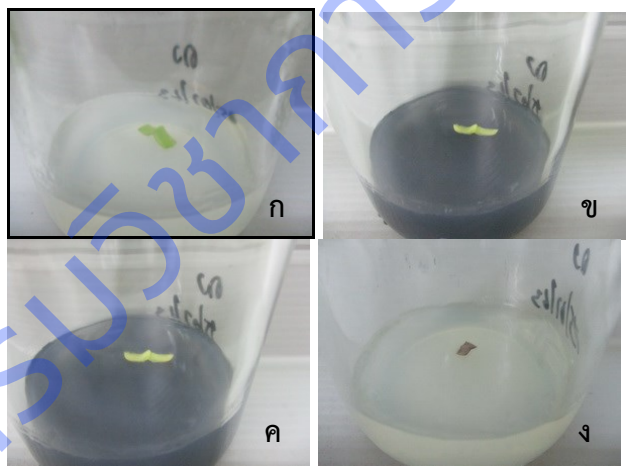


ภาพที่ 2 ลักษณะของลูกผสมกล้วยไม้แวนด้าสามปอยนก อายุ 2 ปี (ก) 3 ปี (ข) 4 ปี (ค) 5 ปี (ง) 6 ปี (จ) และ ฉ) 7 ปี หลังออกปลูก

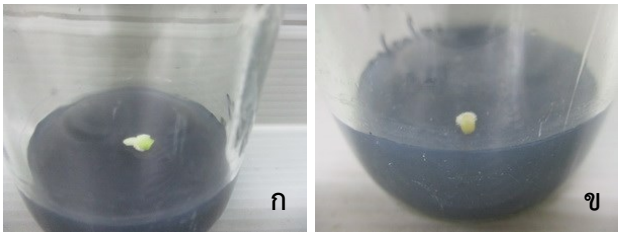
ลิขสิทธิ์เกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 3 ลักษณะของลูกผสมกล้วยไม้แวนด้าสามปอยขุนตาน อายุ 2 ปี (ก) 3 ปี (ข) 4 ปี (ค) 5 ปี (ง) 6 ปี (จ) และ ฉ) 7 ปี หลังออกปลูก



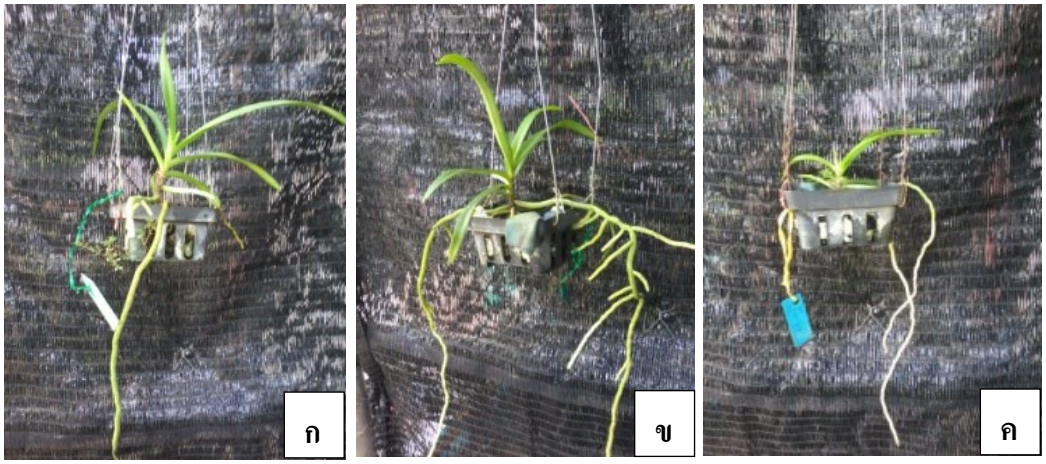
ภาพที่ 4 ลักษณะชิ้นส่วนใบอ่อนลูกผสมแวนด้าสามปอยดงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร NDM ดัดแปลง เป็นเวลา 1 เดือน (ก) 5 เดือน (ข) 8 เดือน (ค) ชิ้นส่วนที่ตาย (ง)



กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 5 ลักษณะชิ้นส่วนปลายรากลูกผสมแวนด้าสามปอยดงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร NDM ดัดแปลง เป็นเวลา 1 เดือน (ก) 4 เดือน (ข)

กรมวิชาการเกษตร

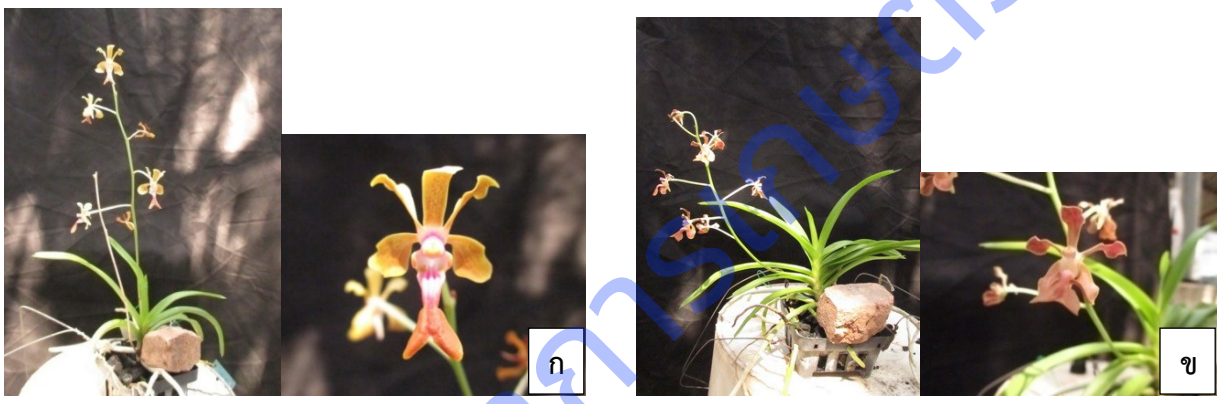


ภาพที่ 6 การแบ่งกลุ่มต้นของแวนด้าสามปอยลูกผสม กลุ่มขนาดใหญ่ (ก) กลุ่มขนาดกลาง (ข) และกลุ่มขนาดเล็ก (ค) ณ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

ภาพที่ 7 ลูกผสมต้นคัดเลือกจากคู่ผสมที่ 1 VL2VL1B4 (ก) VL2VL1B8 (ข) VL2VL1B10 (ค) ณ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 8 ลูกผสมต้นคัดเลือกจากคู่ผสมที่ 2 VL3VL2B6 (ก) VL3VL2B7 (ข) ณ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 9 ลูกผสมต้นคัดเลือกจากคู่ผสมที่ 3 VL3VL4B9 (ก) VL3VL4S3 (ข) ณ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ศึกษาการแสดงออกของยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) oxidase ในการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้า

Transformation of Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) to Vanda orchids and the effect on inflorescence duration and vase life

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล[1/] Suchirat Sakuanrungsirikul[1/]
ยุพิน กสินเกษมพงษ์[2/] Yupin Kasinkasaempong[2/]
สุปัน ไม้ดัดจันทร์[3/] Supan Maidatchan[3/]

บทคัดย่อ

กล้วยไม้แวนด้ามีปัญหาที่สำคัญคือการเหี่ยวและดอกร่วงเร็วในระหว่างการขนส่ง การวางจำหน่ายและการปักแจกัน การเหี่ยวและหลุดร่วงของดอกเกิดเนื่องจากก๊าซเอทีลีนที่พืชสร้างขึ้นโดยยีน 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACO) เป็นหนึ่งในยีนที่ควบคุมกระบวนการผลิตก๊าซดังกล่าวการยับยั้งการทำงานของยีนนี้โดยการส่งถ่ายยีนต้านการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค antisense มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้ได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) oxidase ในการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้แวนด้าการทดลองส่งถ่ายยีนดังกล่าวเข้าสู่โปรโตคอร์มกล้วยไม้แวนด้า 3 สายพันธุ์ได้แก่ จักรกฤษณ์ (JK) เหลืองสุรัช(YS) และลุมพินีเรด (LR) ด้วยเทคนิค Cocultivationกับ *Agrobacterium tumefaciens*สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 ซึ่งมียีน antisense-ACO เชื่อมอยู่ภายในพลาสมิดนี้ พบว่าไม่ประสบความสำเร็จ โปรโตคอร์มไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ และตายทั้งหมดในเวลาต่อมา ซึ่งอาจเกิดจากลักษณะของพืชชนิดนี้ที่ไวต่อการเคลื่อนย้ายอาหาร รวมถึงขั้นตอนและขบวนการถ่ายยีนไม่เหมาะสม ทำให้ไม่สามารถคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเพื่อเพาะเลี้ยงให้เป็นต้นได้

คำสำคัญ : พันธุวิศวกรรม การถ่ายยีน แอนติเซ็นส์ กล้วยไม้

Abstract

The most important problem in commercially production of Vanda orchid is premature senescence due to endogenous ethylene gaseous production. 1 -aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACO), is one of a gene responsible for ethylene production in plant. Inhibition of this gene by antisense technology was reported to reduce its expression. The objective of this report was to study the effect of antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) oxidase in Vanda orchids on its inflorescence duration and vase life. The transformation of plasmid pCAMBIA1304 harvested antisense-ACO into 3 Vanda orchids ;Jakrid, Yellow-Surat and Lumpini-red were not success. All transformantsturned browning and died eventually. This

กรมวิชาการเกษตร

could caused by sensitivity nature of this plant type as well as improper culturing and transforming techniques.

Key words : Genetic engineering Gene transformation Antisense Orchids

กรมวิชาการเกษตร

1/ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น (Khon Kaen Field Crops Research Center)
2/ สถาบันวิจัยพืชสวน (Horticultural Research Institute)
3/ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย (Chiang Rai Horticultural Research Center)

บทนำ

ประเทศไทยส่งออกดอกกล้วยไม้เป็นอันดับ 2 ของโลก ส่วนใหญ่ส่งออกในรูปกล้วยไม้ตัดดอก ปัญหาที่สำคัญของการจัดส่งกล้วยไม้ตัดดอกคือ ดอกเหี่ยว ช้ำ และร่วง ระหว่างการขนส่ง กลไกการทางชีวภาพที่สำคัญในการส่งผลให้ดอกเหี่ยวและร่วงนั้น เกิดจากการผลิตเอทธิลีนในพืชโดยยีน 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACO) เป็นหนึ่งในยีนที่ควบคุมการเกิดกระบวนการดังกล่าวจากกระบวนการ biosynthetic pathway โดยมี methionine เป็นสารตั้งต้น และเปลี่ยน ACC synthase และในสภาวะที่มีออกซิเจนจะเปลี่ยนเป็น ACC Oxidase และกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอทธิลีน ในที่สุด (Yang and Hoffman, 1984) โดยเอทธิลีนเป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่ง ที่พืชสามารถสร้างเองได้ในธรรมชาติ จัดอยู่ในรูปก๊าซ จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ดอกเสื่อมสภาพและเหี่ยวเร็วขึ้น (Nadeau et al., 1993)ในกล้วยไม้แม้เพียงได้รับเอทิลีนในระดับความเข้มข้นต่ำก็สามารถทำให้เกิดการหลุดร่วงของดอกได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกล้วยไม้สกุลแวนด้าจะตอบสนองต่อก๊าซนี้นี้มากที่สุด (ครรชิต ธรรมศิริ, 2541) การชะลอการเหี่ยว และร่วงของพืช ปัจจุบันมีเทคโนโลยีเข้ามาเกี่ยวข้องมากมาย เช่น การแช่หรือรมด้วยสาร1-methycyclopropene (1-MCP) และ silverthiosulfate ซึ่งจะสามารถยืดอายุได้ในระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น และมีปัญหาเรื่องความเป็นพิษของสารเคมีที่ใช้การดัดแปลงพันธุกรรมโดยการยับยั้งการสร้างเอทธิลีนในพืชจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหานี้ ที่อาจจะนำมาพัฒนาให้ได้กล้วยไม้ที่มีระยะเวลาบานของดอกยาวนาน เป็นการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้ได้อีกวิธีหนึ่ง

ในช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาการส่งถ่ายยีน antisense ACC syntaseและ antisense ACC oxidase เข้าสู่พืชเพื่อยืดอายุการใช้งานของดอกไม้หลายชนิด Aida *et al*. (1998) ได้ศึกษาการส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase เข้าสู่ Cell ของ Toreniaโดยใช้ Agrobacterium พบว่า Toreniaที่ดัดแปลงพันธุ์สามารถออกดอกที่บานนานกว่าพันธุ์เดิม 2 วัน การสร้างคาร์เนชั่นดัดแปลงพันธุ์ เพื่อเพิ่มระยะเวลาการบานของดอก โดยการสกัดยีนที่ควบคุมการสร้าง ACC oxidase จากคาร์เนชั่น ร่วมกับ ACC synthase จากพืชหลายชนิดแล้วนำมาต่อกับ Vector แบบกลับทิศทาง เพื่อให้เกิดการถอดรหัสเป็น antisense RNA โดยมี cauliflower mosaic virus 25S RNA promoter (CAMV 25S promoter) เป็นตัวควบคุมการถอดรหัสแล้วจึงส่งถ่ายยีนชุดนี้เข้าสู่คาร์เนชั่น ผลปรากฏว่า ดอกคาร์เนชั่นที่เกิดจากการดัดแปลงพันธุ์มีการผลิต gas ethyline ลดลง และสามารถบานได้นานกว่าดอกคาร์เนชั่นปกติ (Adam and Yang, 1979 อ้างถึงใน Mol*et al.,* 1995) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนดังกล่าวนี้สามารถยืดอายุการหลุดร่วงของดอกและใบได้นานกว่ามะเขือเทศที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (L. Zacrias*et al*., 1999) ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการแสดงออกของยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) oxidase ในการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้า ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Cocultivation

กรมวิชาการเกษตร

ระเบียบวิธีการวิจัย

- อุปกรณ์

- ตู้เขี่ยเชื้อ
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- เครื่องเขย่า

กรมวิชาการเกษตร

- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
- เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอ
- เครื่องตรวจดีเอ็นเอ
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- อุปกรณ์ดูดจ่ายสารละลาย
- เครื่องแก้ว
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
- ชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- ตู้แช่แข็ง
- แวนด้า 3 พันธุ์ได้แก่ จักรกฤชโกลด์ (JK) เหลืองสุรัตน์(YS) และลุมพินีเรด (LR)

- วิธีการ

1.การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้แวนด้า

นำโปรโตคอร์มไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร NDM ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตฮอร์โมน NAA 0.1 mg/L ร่วมกับ BA 1.0 mg/L ซึ่งเติมผงมันฝรั่ง 10 g/L น้ำตาลมอลโทส 10 ก./ล. และเติมผงวุ้น 8 ก./ล. pH 5.4 เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 °C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสงประมาณ 40 $\mu molm^{-2}s^{-1}$

2. การส่งถ่ายยีน ACC oxidase เข้าสู่ Agrobacterium

2.1 การเตรียม competent cell ของเชื้อ *Agrobacterium tumefacient*

วิธีการเตรียม competent cells ของเชื้อ *Agrobacterium tumefacien* สำหรับการส่งถ่าย plasmid เข้าสู่เซลล์ *A. tumefacien* ด้วยวิธี Electroporation ดังนี้

1. นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่ 28 °C นาน 24 ชั่วโมง ความเร็ว 200 rpm

2. ดูดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่ 28 °C นาน 3-4 ชั่วโมง ความเร็ว 200 rpm วัด OD ที่ 600 nm ให้ได้ระหว่าง 0.6-0.8

3. ดูดเชื้อใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปวางบนน้ำแข็ง 15 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm นาน 5 นาที 4 °C เทอาหารออกให้หมด

4. เติม TE bufer ปริมาตร 1,00 µl ปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm นาน 1 นาที 4 °C เทสารละลายทิ้ง

5. เติม TE bufer ปริมาตร 500 µl ปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm นาน 1 นาที 4 °C เทสารละลายทิ้ง

6. นำ competent cell ไปใช้ทันที หรือเก็บใน 40 % glycerol ที่ -70 °C

2.2 การสกัดพลาสมิดสายผสม (recombinant plasmid) ด้วยเทคนิค Alkaline lysis โดยใช้ GF-1 Plasmid DNA Extraction Kit ของ Vivantis

1. นำเชื้อที่เก็บเป็น stock มาเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหาร nutrient broth 1.5 ml ที่เติม 100 µg/µl Amplicilin เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

กรมวิชาการเกษตร

2. ตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 3 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากตะกอนเซลล์แบคทีเรีย

3. ละลายเซลล์ในสารละลาย solution I ปริมาตร 250 µl ดูดขึ้นลงให้ตะกอนละลาย

4. เติมสารละลาย solution II ปริมาตร 250 µl ดูดขึ้นลงให้เข้ากัน

5. เติมสารละลาย buffer NB ปริมาตร 400 µl ดูดขึ้นลงให้เข้ากัน

6. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

กรมวิชาการเกษตร

7. ดูดส่วนใสใส่หลอด column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm 1 นาที เทส่วนชะล้างทิ้ง

8. เติม Wash Buffer ปริมาตร 650 µL ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm 1 นาทีเทส่วนชะล้างทิ้ง

9. Dry Column โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm 1 นาที

10. เติม Elution Buffer ปริมาตร 60 µL ตั้งไว้ 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm 1 นาที นำไปใช้ทันที หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

2.3 การนำพลาสมิดลูกผสม และเวกเตอร์ pCambia 1305 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*EIIและ *NCO*I ดังนี้

1. นำพลาสมิด pCambia 1305 ที่สกัดได้จากเซลล์ *E. coli* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*EII และ *Nco*I ดังนี้

การตัดพลาสมิด pCambia 1305 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*EII และ *Nco*I มีส่วนผสมดังนี้

- 10X Tango buffer 4 µl
- พลาสมิด 1µg/ µl 12 µl
- เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*EII และ *Nco*I (10 U/ µl) หลอดละ 2 µl
- nuclease – free water 2 µl

บ่มที่ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง

2. นำพลาสมิดที่มียีน ACC oxidase ที่สกัดจากเซลล์ *E. coli* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BstEII* และ *NcoI* การตัดพลาสมิดที่มียีน ACC oxidase ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BstEII* และ *NcoI* มีส่วนผสม ดังนี้

- 10X Tango buffer 4 µl
- พลาสมิด 1µg/µl 14 µl
- เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BstEII* และ *NcoI* (10 U/µl) หลอดละ 2 µl
- nuclease – free water 0 µl

บ่มที่ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง

2.4 การแยกชิ้นส่วนยีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด Gel /PCR DNA Fragments Extraction kit ของ Real Genomics ดังนี้

1. นำพลาสมิดที่ตัดแล้ว 100 µl ผสม loading dye 20 µl ไปวิเคราะห์ใน 0.8 % agarose gel ที่ 100 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง หรือจนกว่า band ของยีนที่ต้องการจะแยกชัดเจน
2. นำเจลไปตัดภายใต้แสง UV ตามขนาดที่ต้องการ ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml
3. เติมสาร DF ให้ท่วมเจลนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 °C ให้เจลละลายหมด
4. ดูดสารละลายเจลไปใส่ในหลอด Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว10,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที เทส่วนชะล้างลงมาทิ้ง
5. เติม wash solution ลงในหลอด Column ปริมาตร 600 µl ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 Rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1นาที เทส่วนชะล้างลงมาทิ้ง
6. เติม wash solution ลงในหลอด Column ปริมาตร 600 µl ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1นาที เทส่วนชะล้างลงมาทิ้ง

กรมวิชาการเกษตร

7. Dry colum โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ เวลา 2 นาที ใช้งานทันที หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

2.5 การเชื่อมยีน ACC oxidase เข้ากับ พลาสมิด pCAMBIA 1305

ทำการเชื่อมชิ้นส่วนยีน ACC oxidase ที่ตัด เข้ากับพลาสมิด pCambia 1305 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *BstEII* และ *NCOI* ด้วยเอนไซม์ T4 ligase ของ Fermentas ดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

- pCambia 1304 (*Bst*EII และ *NCO*I) 20 ng	5	µl
- Insert DNA (*Bst*EII และ *NCO*I) 20 ng	12	µl
- 10x T4 ligase Buffer	2	µl
- T4 ligase	1	µl
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	0	µl

- บ่มที่ 22 °C นาน 18 ชั่วโมง

2.6 การส่งถ่ายยีนโดยวิธี electroporation

1. นำ competent cells ของเชื้อ *Agrobacterium tumefacien* ที่ได้เตรียมไว้แล้ว ปริมาตร 100 µl มาผสมกับ Recombinant พลาสมิด (pCambia 1305) ปริมาตร 4 µl บ่มไว้ในน้ำแข็งนาน 15 นาที
2. ดูดเชื้อที่ได้ใส่ใน Electroporation cuvette ขนาด 0.2 cm. นำไปเข้าเครื่อง electroporator โดยตั้งค่าของเครื่องดังนี้

Capacitor	25	µF
Voltage	2.5	kV.
Resistor	400	โอห์ม

3. หลังจาก pulse เติมอาหารLB ปริมาตร 1 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่านาน 4 ชม.
4. นำเชื้อมาตกตะกอนแล้วเทสารละลายทิ้ง
5. เติมอาหาร LB ปริมาตร 200 µl ผสมเชื้อให้เข้ากันแล้วดูดใส่อาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะ Kanamycin 50 mg/L ทำการเกลี่ยเชื้อให้ทั่วเพลตอาหาร
6. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C นาน 1 วัน ตรวจสอบเชื้อที่ขึ้น

3. การคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่มี recombinant plasmid

3.1 การตรวจสอบเชื้อที่ขึ้นด้วยวิธี PCR Colony (ตรวจสอบยีน ACO)

1. เตรียม Master mix ของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

สาร	ปริมาตร
dH_2O	10.82
10x Taq buffer	1.5
25 mM $MgCl_2$	0.6
10 mMdNTP	0.3
20 µM Primer 1	0.375
20 µM Primer 1	0.375
Taq DNA polrmerase	0.15
DNA	1

กรมวิชาการเกษตร

ปริมาตรทั้งหมด	15

กรมวิชาการเกษตร

2. ใช้ไม้จิ้มฟันฆ่าเชื้อ จิ้มเชื่อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวมาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื่อเพื่อเป็น Master plate แล้วจุ่มลงใน หลอดปฏิกิริยา PCR โปรแกรมในการทำปฏิกิริยา PCR เป็นดังนี้

94 °C 5 นาที
94 °C 1 นาที ┐
54 °C 1 นาที ├ 30รอบ
72 °C 1 นาที ┘
72 °C 10 นาที
25 °C ∞

3. ตรวจผลของปฏิกิริยา PCR ด้วยทคนิค agarose gel electrophoresis
4. นำโคลนที่ตรวจพบยีน มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB ที่เติม Kanamycin 50 µg/ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C พร้อมเขย่า เพื่อใช้ในขั้นตอนการถ่ายยีนต่อไป

3.2 การทดสอบอิทธิพลของสารปฏิชีวนะ Cefotaxime ต่อการเจริญของ *A. tumefaciens* (pCAMBIA1305)

1. เลี้ยง *A. tumefaciens*(pCAMBIA1305) ในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 mg/L เวลา 18 ชั่วโมง
2. นำมาวัดค่าความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (OD_{550}) ให้มีค่าเท่ากับ 1.5-1.8
3. นำไปศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ Cefotaxime ต่อการเจริญของ *A. tumefaciens* โดยทดสอบความไวของจุลินทรีย์ (Microbial susceptibility) ต่อสารปฏิชีวนะโดยวิธี Disc plate technique โดยดูดอาหารที่มี *A. tumefaciens* ลงในหลอด 1.5 ml ปลอดเชื้อทำการ Swab เชื้อบนอาหาร LB
4. จากนั้นนำกระดาษกรองที่ปลอดเชื้อขนาด 5 มม. จุ่มสารละลาย Cefotaxime ความเข้มข้น ต่าง ๆ คือ 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มก./ล.
5. นำมาวางบนอาหารแข็ง LB ที่มี *A. tumefaciens* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบทั้งหมด 5 ซ้ำ
6. บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ *A. tumefaciens*ถูกยับยั้งหรือบริเวณวงใส (Clear zone)

3.3 การส่งถ่ายยีนด้วยวิธี Cocultivation ร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 (pCAMBIA1305)

1. เลี้ยง *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 (pCAMBIA1304) ในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 mg/L เป็นเวลา 14 ชั่วโมง
2. เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที แล้วนำมาวัดค่า OD_{550}ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 1.5-1.8
3. นำสารละลาย *A. tumefaciens* มาผสมกับอาหารเหลวสูตร ½ MS ในอัตราส่วน 2 : 1 และเติม *Acetosyringone* 100mg/L ก่อนบ่มร่วมกับโปรโตคอร์มกล้วยไม้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้ขนาด 2-3 มม. บ่มร่วมกับสารละลาย *A. tumefaciens* ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 60 นาที เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที
5. ซับโปรโตคอร์มกล้วยไม้ให้แห้งด้วยกระดาษปลอดเชื้อ
6. นำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะเป็นเวลา 3 วัน จนกระทั่งสังเกตเห็นการเจริญของ *A. tumefaciens*

กรมวิชาการเกษตร

7. นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้มาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 30 นาที
8. นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้มาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม 400 mg/L เป็นเวลา 60 นาที 2 รอบ
9. ซับโปรโตคอร์มให้แห้งด้วยกระดาษปลอดเชื้อ
10. เลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ บนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม ความเข้มข้น 400 มก./ล. ร่วมกับสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 20 มก./ล. ตามลำดับ เป็นเวลา 1 เดือน
11. เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 °C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 µmol $m^{-2}s^{-1}$
12. ครบ 1 เดือน ย้ายโปรโตคอร์มกล้วยไม้ บนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ

3.4 การตรวจยีนเครื่องหมายด้วยเทคนิค PCR ในกล้วยไม้ที่เจริญเป็นต้นวิธีการสกัดดีเอนเอด้วยวิธี CTAB

1. บดตัวอย่างให้ละเอียด เติม extraction buffer 700 µl ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองพลาสติก ขนาด 1.5 ml
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10นาที
3. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่
4. เติม Dichloromethane : Isoamyl (24 : 1) 500 µl ผสมให้เข้ากัน
5. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่
6. เติม Isopropanol 500 µl พลิกหลอดไปมาจนกระทั่งเห็นสายดีเอ็นเอ
7. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 5 นาที เทสารละลายทิ้ง
8. เติม 70% ethanol 500 µl ดีดให้ตะกอนลอย นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 3 นาที เทสารละลายทิ้ง
9. เติม 70% ethanol 500 µl ดีดให้ตะกอนลอย นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 3 นาที เทสารละลายทิ้งตากตะกอนให้แห้ง
11. เติม dH_2O 180 µl ละลายตะกอน
12. เติม 5 M NaCl 20 µl
13. เติม 95 %ethanol 200 µl พลิกหลอดไปมา นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 3 นาที เทสารละลายทิ้ง
14. เติม 70% ethanol 500 µl ดีดให้ตะกอนลอย นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 3 นาที เทสารละลายทิ้ง
15. เติม 70% ethanol 500 µl ดีดให้ตะกอนลอย นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 3นาทีเท

กรมวิชาการเกษตร

สารละลายทิ้ง ตากตะกอนให้แห้ง

16. เติม dH_2O50 - 70µl ละลายตะกอนให้เป็นเนื้อเดียว นำไปใช้ หรือเก็บที่ -20 ℃

17. ตรวจปริมาณและคุณภาพดีเอนเอด้วย Nanometer

3.5 การตรวจยีนเครื่องหมายด้วยเทคนิค PCR

ในการตรวจยีนเครื่องหมายด้วยวิธี PCR มีองค์ประกอบและโปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR ดังนี้องค์ประกอบในการตรวจยีน 35S promoter (Primer 35S /antisene 35S)

กรมวิชาการเกษตร

สารเคมี	ปริมาตร (µl) (1X)	ความเข้มข้นสุดท้าย
H_2O	10.82	-
10X Taq buffer	1.5	1.5 X
25 mM $MgCl_2$	0.6	1mM
10 mMdNTP	0.3	0.2mM
20 µM Primer1	0.375	0.5pmol/µl
10 µM Primer2	0.375	0.5pmol/µl
Taq DNA polymerase	0.15	0.05 U
DNA	1	-
Total	15	-

PCR reaction

94°C 3นาที

94°C 20วินาที
60°C 40 วินาที } 40 รอบ
72°C 1 นาที

94°C 3นาที

25°C ∞

องค์ประกอบในการตรวจ NOS terminater (PrimerNOS/antisene NOS)

สารเคมี	ปริมาตร (µl) (1X)	ความเข้มข้นสุดท้าย
H_2O	10.82	-
10X Taq buffer	1.5	1.5 X
25 mM $MgCl_2$	0.6	1mM
10 mMdNTP	0.3	0.2mM
10 µM Primer1	0.375	0.5pmol/µl
10 µM Primer2	0.375	0.5pmol/µl
Taq DNA polymerase	0.15	0.05 U
DNA	1	-
Total	15	-

PCR reaction

94°C 3 นาที

94°C 20 วินาที
54°C 40 วินาที } 40 รอบ
72°C 1 นาที

กรมวิชาการเกษตร

94°C 3 นาที

25°C ∞

กรมวิชาการเกษตร

องค์ประกอบในการตรวจ NOS terminater ถึง ACO (Primer antisense NOS /ACOFB)

สารเคมี	ปริมาตร (µl) (1X)	ความเข้มข้นสุดท้าย
H_2O	10.43	-
10X Taq buffer	1.5	1.5 X
25 mM $MgCl_2$	1.2	2 mM
10 mMdNTP	0.15	0.25 mM
10 µM Primer1	0.3	0.5 pmol/µl
10 µM Primer2	0.3	0.5 pmol/µl
Taq DNA polymerase	0.12	0.2 U
DNA	1	-
Total	15	-

PCR reaction

94°C 5 นาที

94°C 1 นาที
54°C 1นาที } 30รอบ
72°C 1 นาที

94°C 10 นาที

25°C ∞

3.6 การตรวจผลด้วย Electrophoresis

ตรวจผลการส่งถ่ายยีน ACC Oxidase โดยตรวจยีนตำแหน่ง 35S Promoter, NOS terminator และ NOS terminator ถึง ACO ด้วยวิธี direct PCR ตรวจผลด้วย electrophoresis ที่สภาวะ 1% agarose gel ; 100 โวลต์ 45 นาที แล้วบันทึกผลด้วย Gel documentation และรายงานผล

- เวลา เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2559 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2561

- สถานที่ สถานที่ดำเนินการ : ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการส่งถ่ายยีน *ACC oxidase* สู่ *A.tumefacien* ด้วยวิธี electroporation แล้วคัดเลือกบนอาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะ Kanamycin 50 mg/l พบโคโลนีทั้งหมด 18 โคโลนี (ภาพที่ 1)

ผลการตรวจยีน ACO ในเชื้อ *A. tumefacien* ที่คัดเลือกได้ในภาพที่ 1 ด้วยวิธี PCR Colonyสามารถตรวจพบยีน *ACC oxidase* ขนาดประมาณ 297 bpในโคโลนีที่นำมาตรวจสอบทั้ง 5 โคโลนีที่คัดเลือก (ภาพที่ 2)

กรมวิชาการเกษตร

ในการศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะ Cefotaxime ต่อการเจริญของ *A. tumefaciens* โดยศึกษาความเข้มข้นต่างๆ ของสารปฏิชีวนะ Cefotaxime ที่จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* ซึ่งสังเกตการยับยั้งการเจริญของ *A. tumefaciens* จากการเกิดวงใสรอบ ๆ กระดาษกรองที่ซับยาปฏิชีวนะ (ภาพที่ 3 และ 4) ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของ Cefotaxime ที่ 100 mg/L เกิดวงใสเฉลี่ย 5.25 mm. เข้มข้นของ 200 mg/L เกิดวงใส

กรมวิชาการเกษตร

เฉลี่ย 6.16 mm. เข้มข้นของ 300 mg/L เกิดวงใสเฉลี่ย 6.49 mm. เข้มข้นของ 400 mg/L เกิดวงใสเฉลี่ย 7.27 mm. และ เข้มข้นของ 500 mg/L เกิดวงใสเฉลี่ย 8.56 mm. (ตารางที่ 1)

การเลือกระดับความเข้มข้นของ Cefotaxime ที่จะใช้โดยเปรียบเทียบกับผลของวิธีการทดลองระดับความเข้มข้นมีผลต่อการเจริญของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ โดยใช้ระดับความเข้มข้นที่ไม่ต่ำเกินไปเพื่อให้สามารถกำจัดเชื้อได้หมด และไม่ควรสูงเกินไปเพราะจะไปทำลายโปรโตคอร์มกล้วยไม้ จึงเลือกใช้ระดับความเข้มข้นของ Cefotaxime ที่ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เพราะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Agrobacterium* ได้ในรัศมี 7.27 มิลลิเมตร และระดับความเข้มข้นระดับนี้โปรโตคอร์ม ของกล้วยไม้เอียสกุลสามารถมีชีวิตรอดที่ 96% (ธวัชชัย ทรัพย์ถิระ, 2554)

ผลการทดลองการส่งถ่ายยีน ACO เข้าสู่กล้วยไม้สกุลแวนด้า ดำเนินการใน 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ JK และ YS มีการดำเนินงานในแต่ละพันธุ์ ดังนี้

1. การขยายพันธุ์โปรโตคอร์มของพันธุ์ JK

ได้รับโปรโตคอร์มเริ่มต้นสำหรับทำการขยายพันธุ์จำนวน 6 ขวด แต่พบว่าเมื่อทำการย้ายโปรโตคอร์มจากอาหารแข็งไปอาหารเหลว เพื่อขยายจำนวน จะเกิดการชะงักของโปรโตคอร์ม เกิดเป็นสีเหลืองอมน้ำตาล หรือสีน้ำตาลเข้ม ประมาณ 2-4 สัปดาห์ จึงค่อย ๆ มีชิ้นส่วนสีเขียวเกิดขึ้นและอีกส่วนหนึ่งเกิดสีน้ำตาลดำและตายในที่สุด (ภาพที่ 5)

เมื่อย้ายโปรโตคอร์มที่มีจำนวนมากพอที่จะทำการทดลองจากอาหารเหลวลงบนอาหารแข็ง เพื่อปรับสภาพรอการส่งถ่ายยีนโปรโตคอร์มจะมีสีน้ำตาลประมาณ 4 สัปดาห์ จึงสังเกตเห็นการเจริญของโปรโตคอร์มสีเขียว แต่ส่วนใหญ่จะเป็นโปรโตคอร์มที่มีสีน้ำตาล (ภาพที่ 6) มักพบว่าการย้ายอาหารขวดใหม่ จะเกิดเหตุการณ์เดียวกัน คือ มีบางส่วนกลายเป็นสีน้ำตาล แต่การตาย จะไม่มากเท่าการย้ายจากอาหารแข็งไปอาหารเหลว หรือย้ายจากอาหารเหลวไปอาหารแข็ง

อย่างไรก็ตามการเจริญของโปรโตคอร์มJk ในอาหารแข็งค่อนข้างช้า นอกจากนี้การพัฒนาจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่สมบูรณ์ ก็ค่อนข้างช้าด้วย โดยใช้เวลาประมาณ 6 เดือนถึงจะเต็มหน้าอาหารขวดขนาด 8 *ออนซ์* เนื่องจากการเจริญของโปรโตคอร์มในอาหารแข็งเป็นไปค่อนข้างช้า จึงทำให้ยังไม่สามารถทำการทดลองขั้นต่อไปได้ จากการขยายพันธุ์พบว่าสามารถขยายพันธุ์โปรโตคอร์ม LR ที่ได้รับจาก ศวส. เชียงราย ได้ปริมาณมากขึ้น โดยพบว่าในการเพาะเลี้ยงภายในขวดที่มีการว่างกลุ่มโปรโตคอร์มใกล้กัน จะมีการขยายพันธุ์ได้มากกว่ากลุ่มที่มีการวางโปรโตคอร์มห่างกัน (ภาพที่ 7)

2. การขยายพันธุ์โปโตคอร์มของพันธุ์ YS และ JKชุดที่ 2

ได้รับโปรโตคอร์ม จำนวน 11 ขวดแล้วดำเนินการขยายเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์ม โดยพบว่าการเลี้ยงในอาหาร เมื่อเลี้ยงบนอาหารเหลว 1/2 MS และ อาหาร ND ที่เติมผงมันฝรั่ง พบว่าทำให้โปรโตคอร์มมีสีน้ำตาลและตายในที่สุด แต่จากการทดลองในอาหารแข็งพบว่า อาหาร ND ที่ไม่เติมผงมันฝรั่งมีการเจริญของโปรโตคอร์มได้ (ภาพที่ 8)

กรมวิชาการเกษตร

การเจริญของโปรโตคอร์ม YS ในอาหารแข็งค่อนข้างช้า และมีการพัฒนาจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่สมบูรณ์ช้าด้วย เช่นเดียวกับแวนด้าพันธุ์ JK โดยใช้เวลาประมาณ 6 เดือนถึงจะเต็มหน้าอาหารขวดขนาด 8 *ออนซ์* รวมทั้งเมื่อมีการเปลี่ยนขวดอาหารจะมีการหยุดการเจริญ และเป็นสีน้ำตาลประมาณ 2-3 สัปดาห์ จึงสังเกตเห็นการเจริญได้ (ภาพที่ 9) เนื่องจากการเจริญของโปรโตคอร์มในอาหารแข็งเป็นไปค่อนข้างช้า จึงทำให้ยังไม่สามารถทำการทดลองขั้นต่อไปได้ได้รับโปรโตคอร์มพันธุ์ YS เพิ่มจาก ศวร. ชร. รวมเป็นจำนวน 81 ขวด และต้นอ่อน

กรมวิชาการเกษตร

จำนวน 21 ขวด พันธุ์ LR รับโปรโตคอร์มใหม่จำนวน 40 ขวด ทั้งสองพันธุ์มีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า

จากการขยายพันธุ์พบว่าสามารถขยายพันธุ์โปรโตคอร์ม YS ที่ได้รับมาจาก ศวร. ชร. ได้ปริมาณมากขึ้น แต่ยังมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่า LR และพบว่าบางกลุ่มมีการพัฒนาเป็นต้น (ภาพที่ 10) ทั้งนี้อาจเกิดจากลักษณะการวางกลุ่มโปรโตคอร์มและแสงที่ได้รับ ส่วนพันธุ์ JK นั้นพบว่ามีการเจริญเติบโตที่ช้ากกว่า 2 พันธุ์ และอยู่ระหว่างการขยายพันธุ์ (ภาพที่ 11)

เนื่องจากแวนด้าเป็นกล้วยไม้ที่ใช้เวลานานและมีปัญหามากในการขยายพันธุ์ โดยมีการย้ายอาหารใหม่และมีกล้วยไม้แวนด้าเหลืองสุรัตน์ (YS) ที่เจริญเป็นต้นใหญ่จำนวน 5 ขวด และต้นอ่อน 97 ขวด กล้วยไม้แวนด้าลุมพินีเรด (LR) มีจำนวนทั้งหมด 88 ขวด และกล้วยไม้แวนด้า (JK) มีจำนวนทั้งหมด 19 ขวด ที่รอการขยายพันธุ์และส่งถ่ายยีน (ภาพที่ 12)การเพาะเลี้ยงแวนด้ามักประสบปัญหา ไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ และเป็นอุปสรรคต่อการดำเนินงานถ่ายยีน เนื่องจากการเคลื่อนย้ายเปลี่ยนอาหาร ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ชนิดนี้

จากการเลี้ยงโปรโตคอร์มในอาหารเหลว ND พบว่า เมื่อเลี้ยงกล้วยแวนด้า LR และ JK ในอาหารสูตรดังกล่าว เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าเกิดเป็นสีดำและทำให้ต้นกล้วยไม้ที่ทำการเพาะเลี้ยงเกิดการตาย (ภาพที่ 13)

การทดลองปรับสูตรอาหารเหลวใหม่ในการเพาะเลี้ยงแวนด้า พบว่าเริ่มมีการขยายเพิ่มจำนวนได้ แต่เนื่องจากมีการตัดไฟฟ้าในวันที่ 11 และ 18 ธันวาคม 2560 ตลอดทั้งวัน ทำให้ต้นที่เพิ่งเริ่มฟื้นตัว ตายไปทั้งหมด ขณะนี้อยู่ระหว่างการดำเนินการทดสอบซ้ำ

การทดลองส่งถ่ายยีน *antisense ACC oxidase* เข้าสู่โปรโตคอร์ม

การส่งถ่ายยีน *antisense ACC oxidase*โดยการเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* EHA 105 ที่มียีน *antisense ACC oxidase* บนอาหารแข็ง LB+Kanamycin 50 mg/L เมื่อได้โคโลนีที่มี DNA ย้ายโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB+kanamycin 50 mg/L เป็นเวลา 18-21 ชั่วโมง นำเชื้อวัดค่า OD_{550}ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 1.5-1.8 จากนั้นนำโปรโตคอร์มมาซับด้วยกระดาษปลอดเชื้อและทำให้โปรโตคอร์มเกิดบาดแผลเพื่อให้เชื้อเข้าสู่โปรโตคอร์มได้มากขึ้น บ่มโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในอาหารเหลว ½ MS ที่มีเชื้อ *A. tumefaciens* EHA105 เติม acetosyringone 100 µM เป็น 2:1 นำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นตักโปรโตคอร์มซับด้วยกระดาษปลอดเชื้อให้แห้งแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารเหลวที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะบ่มเชื้อในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน นำโปรโตคอร์มมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติม cefotaxime 300 mg/L เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซับให้แห้งด้วยกระดาษปลอดเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติม hygromycin 20 mg/ml เป็นเวลา 1 เดือน รอการตรวจสอบผลโดยวิธี PCR

ผลการทดลองถ่ายยีนเข้าสู่โปโตคอร์มแวนด้าทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าไม่ประสบความสำเร็จ โปรโตคอร์มที่ได้หลังการส่งถ่ายยีนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังการเพาะเลี้ยงในที่มืดนาน 3 วัน (ภาพที่ 14)

ในส่วนการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แวนด้า อยู่ระหว่างการเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มด้วยสูตรอาหารใหม่ และการเพาะขยายพันธุ์เชื้อ *A. tumefaciens* ที่มียีน anti-ACO ที่เก็บไว้ในอาหารเหลวผสม
กลีเซอรอล 50% โดยการเพาะขยายด้วยอาหารแข็ง และอาหารเหลว เพื่อรอการส่งถ่ายยีน (ภาพที่ 15)
การเตรียมโปรโตคอร์มที่ใช้ในการส่งถ่ายยีนโดยการขยายเพิ่มในอาหารเหลวและอาหารแข็ง

ลิขสิทธิ์การเกษตร

การขยายโปรโตคอร์มของกล้วยไม้แวนด้าลุมพินีเรด (LR) ในช่วงวันที่ 12 เดือนมกราคม 2561 ได้ทำการเก็บผลการทดลองการขยายพันธุ์ต่อจากเดือนธันวาคม 2560 ที่ได้เลี้ยงโปรโตคอร์มในอาหารเหลวเป็นเวลา 1 เดือน 2 สัปดาห์ จากเดือนธันวาคม 2560 ถึง 12 มกราคม 2561 พบว่ามีการเพิ่มปริมาณของโปรโตคอร์มกล้วยไม้แวนด้าลุมพินีเรด (LR) ได้เพิ่มมาขึ้นและมีขนาดของโปรโตคอร์มใหญ่ขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน จึงได้นำไปขยายต่อบนอาหารแข็งสูตร NDM ที่ไม่เติมฮอร์โมนพืชทำให้สามารเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มได้เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 16)

กรมวิชาการเกษตร

การขยายโปรโตคอร์มกล้วยไม้แวนด้าเหลืองสุรัชและแวนด้าลุมพินีเรดในช่วงวันที่ 13 มีนาคม 2561 ซึ่งได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NDM ที่ไม่เติมฮอร์โมนพืชและผงมันฝรั่ง ดังนี้ คือ 1) การเลี้ยงแวนด้าเหลืองสุรัชในอาหารเหลว 2 flask ปริมาตร 500 ml ที่มีอาหารเหลว NDM 100 ml มีโปรโตคอร์มขนาดเล็กในปริมาณเท่าๆ กันใน 2 flask เขย่าได้ 1 สัปดาห์ พบว่าโปรโตคอร์มเป็นสีน้ำตาล 1- 2 โปรโตคอร์ม การขยายโปรโตคอร์มของกล้วยไม้แวนด้าลุมพินีเรดในอาหารเหลวจานวน 4 flask ปริมาตร 500 ml ที่มีอาหารเหลว NDM 100 ml มีโปรโตคอร์มขนาดเล็กเท่าๆ กันในทุก flask เขย่าได้ 1 สัปดาห์พบว่า flask ที่ 2 เกิดการ contaminated และเกิดสีน้าตาลมากที่สุดจึงได้นาออกจากห้องทดลองและอีก 3 flask ยังคงเลี้ยงต่อบนอาหารเหลวได้ (ภาพที่ 17) และรอบันทึกผลการทดลองต่อไป

การตรวจสอบเชื้อ *A. tumefaciens* ที่มียีน ACO ในการส่งถ่ายยีนเข้ากล้วยไม้

การเลี้ยง *A. tumefaciens* ในอาหาร LB เพื่อทดสอบว่าเชื้อยังมีชีวิตและมียีนในพลาสมิดที่พร้อมส่งถ่ายยีนได้นาเชื้อจาก stock มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ Kanamycin เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงแล้วนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว 2X LB เพื่อให้เชื้อมีการเจริญได้เร็วขึ้นเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อยังมีชีวิตเนื่องจากมีการขุ่นของอาหารมากขึ้นจากปกติอย่างเห็นได้ชัดทำการเก็บเชื้อไว้ใช้ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ต่อไป (ภาพที่ 18) ทำการตรวจยีน 35S, NOS terminator, และ NOS-ACO เพื่อคัดเลือกโคโลนี

การทดลองส่งถ่ายยีนเข้าสู่ต้นแวนด้าที่เจริญแล้ว

ทดลองเพาะเลี้ยงกล้วยไม้แวนด้าเหลืองสุรัชที่เจริญเป็นต้นแล้ว นำมาทำให้เกิดบาดแผล และแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี *A. tumefaciens*ที่ได้รับการถ่ายยีนแล้ว แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร NDM ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin 20 mg/L ระยะ 1 สัปดาห์ พบว่าต้นตายในที่สุด (ภาพที่ 19)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การขยายพันธุ์โปรโตคอร์มของแวนด้าทั้ง 3 พันธุ์ พบว่ามีปัญหาขยายได้ช้า ต้นตายหลังจากการถ่ายอาหาร ทั้งในสภาพอาหารแข็งและอาหารเหลว การย้ายอาหารมักทำให้เกิดการหยุดชะงักการเจริญเติบโตระยะหนึ่งก่อนจะเริ่มฟื้นตัว การทดลองส่งถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตคอร์มแวนด้าทั้ง 3 พันธุ์ ยังไม่ประสบความสำเร็จ พบว่าโปรโตคอร์มตายหลังการเพาะเลี้ยงในที่มืด การทดลองปรับสูตรอาหารเหลวใหม่เพื่อการขยายพันธุ์โปรโตคอร์มพบว่ามีการเจริญเติบโตโดยสังเกตจากมีสีเขียวเพิ่มขึ้น แต่ประสบปัญหาการตัดไฟ 2 ครั้งในระหว่างสัปดาห์ ในช่วงที่มีการเพาะเลี้ยงทำให้ต้นที่ได้ตาย

การขยายโปรโตคอร์มกล้วยไม้แวนด้าเหลืองสุรัชในอาหารเหลวสูตร NDM ที่ไม่เติมฮอร์โมนพืชและผงมันฝรั่งพบว่าโปรโตคอร์มมีขนาดเล็กและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังเขย่าได้ 1 สัปดาห์การทดสอบ *A. Tumefaciens* ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนแล้ว ทำการเพาะในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ Kanamycin เพื่อทดสอบความมีชีวิตและมียีนในพลาสมิดที่พร้อมส่งถ่ายยีนได้พบว่า เชื้อยังมีชีวิตและสามารถตรวจพบยีน 35S, NOS terminator, และ NOS-ACO ได้ แต่การทดลองส่งถ่ายยีนเข้าสู่แวนด้าเหลืองสุรัชต้นที่เจริญแล้ว พบว่าไม่ประสบความสำเร็จ โปรโตคอร์มที่รับการส่งถ่ายยีนแล้ว ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ ทุกตัวอย่างเกิด browing และ necrosis ตามมาในที่สุด แนว

กรมวิชาการเกษตร

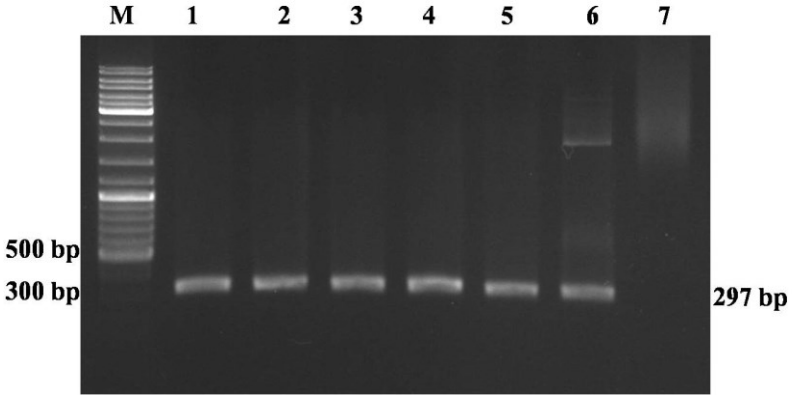
ทางแก้ไขต้องทำการปรับสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยง รวมทั้งปรับขบวนการถ่ายยีนทั้งหมด ให้เหมาะสมกับพืชชนิดนี้ ผลการทดลองที่ได้สามารถนำไปปรับใช้ในการถ่ายยีน ACO เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 สรุปผลอิทธิพลของสารปฏิชีวนะ Cefotaxime ต่อการเจริญของ *A. tumefaciens* (pCAMBIA1305)

ความเข้มข้นของสาร Cefotaxime (mg/L)	ผลของสารCefotaxime ต่อ*A. tumefacian*											
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3		ซ้ำที่ 4		ซ้ำที่ 5		รวม	เฉลี่ย
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	5.5	5	5	5.5	5	5	5.6	5.5	5	5.4	52.5	5.25
200	6.4	6	5.5	7	6.1	6.8	5.5	5.7	6.6	6	61.6	6.16
300	6	5.5	6.2	7.3	6.7	7.5	6.4	5.8	5.7	7.8	64.9	6.49
400	8	7.6	7.8	6.9	5.9	7.4	8.9	4.8	8.7	6.7	72.7	7.27
500	8	9.5	9.8	10	7.9	8	8.1	7.4	8	8.9	85.6	8.56

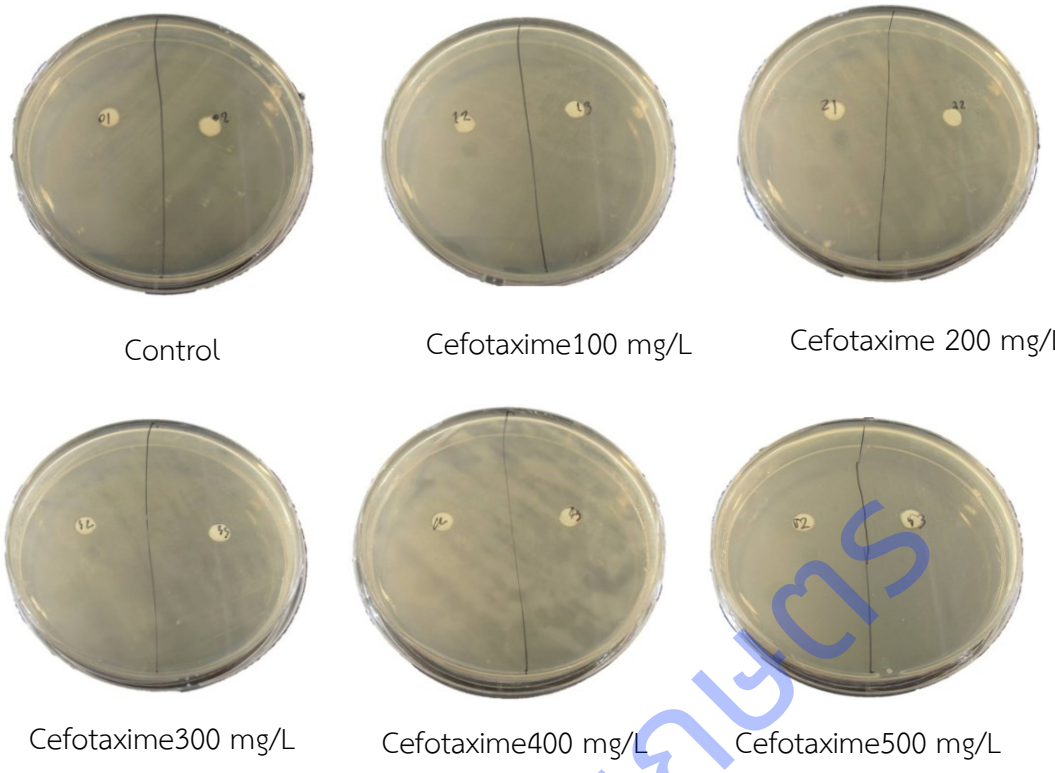
ภาพที่ 1 *A. tumefacien*ที่เจริญบนอาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะ Kanamycin 50 mg/l



ภาพที่ 2 ผลการตรวจโคโลนีด้วยเทคนิค PCR M= DNA ladder mix 1-5 : colony ที่ 1-5, 6 : positve (plasmid ligate) 7: negative (dH_2O)

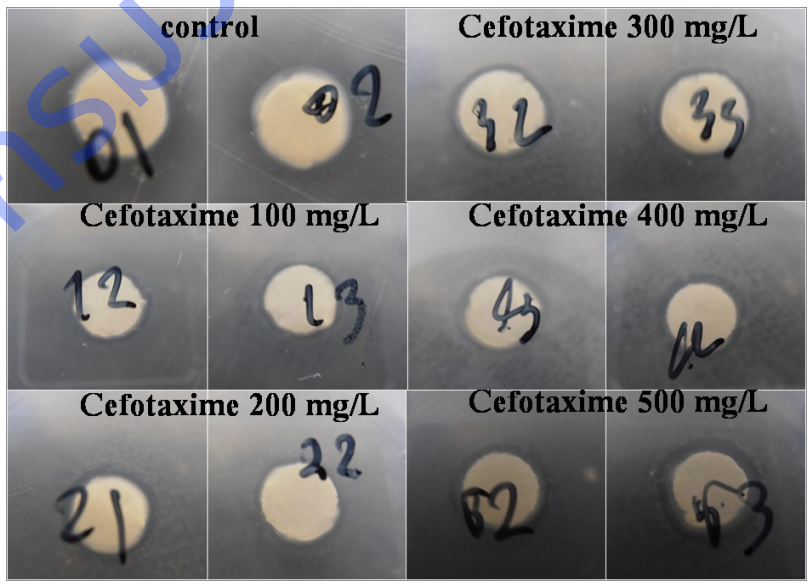
กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร



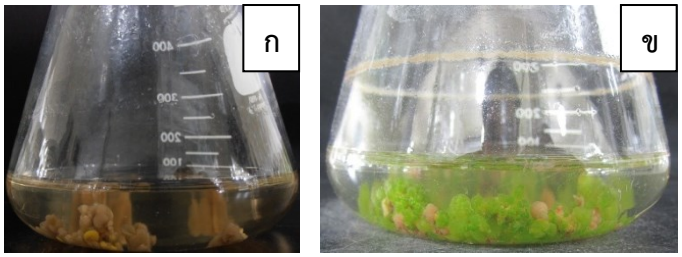
ภาพที่ 3 การเกิดบริเวณวงใส (Clear zone) จากการถูกยับยั้งการเจริญของ *A. tumefaciens* จาก Cefotaximeความเข้มข้นต่างๆ

กรมวิชาการเกษตร

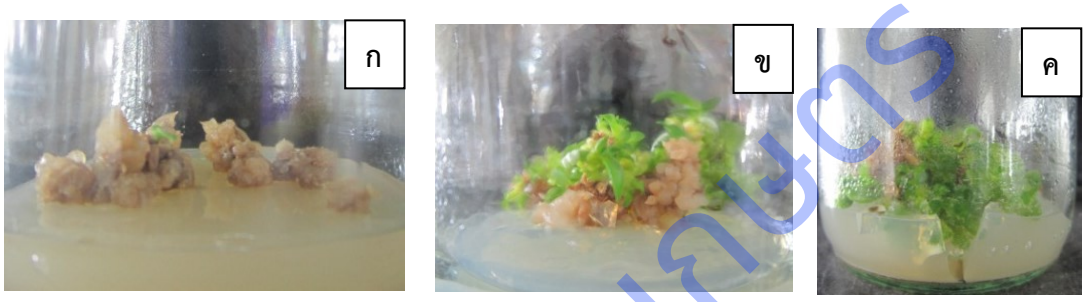


ภาพที่ 4 ขยายการเกิดบริเวณวงใส (Clear zone)จากการถูกยับยั้งการเจริญของ *A. tumefaciens* จาก Cefotaxime ความเข้มข้น 0 (control) -500 mg/L

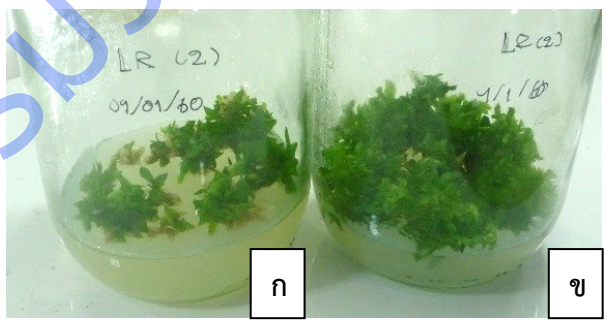
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 5 โปรโตคอร์มของกล้วยไม้แวนดาพันธุ์ JK เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ลักษณะเมื่อเริ่มย้ายอาหาร (ก) หลังเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวนาน 2-4 สัปดาห์ (ข)



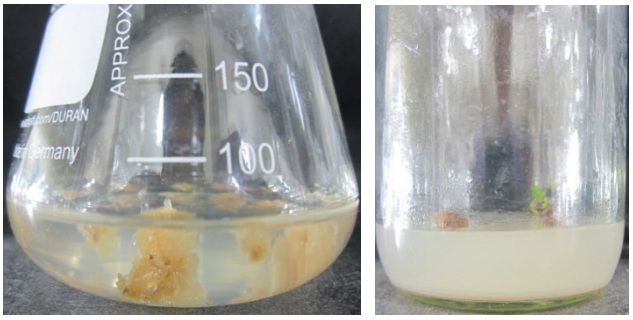
ภาพที่ 6 ลักษณะการเจริญของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้แวนดาพันธุ์ JK เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง ลักษณะเมื่อเริ่มย้ายอาหาร (ก) การเจริญของโปรโตคอร์มหลังการฟื้นตัวเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง (ข) การเจริญของโปรโตคอร์มหลังการฟื้นตัวเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง 6 เดือน (ค)



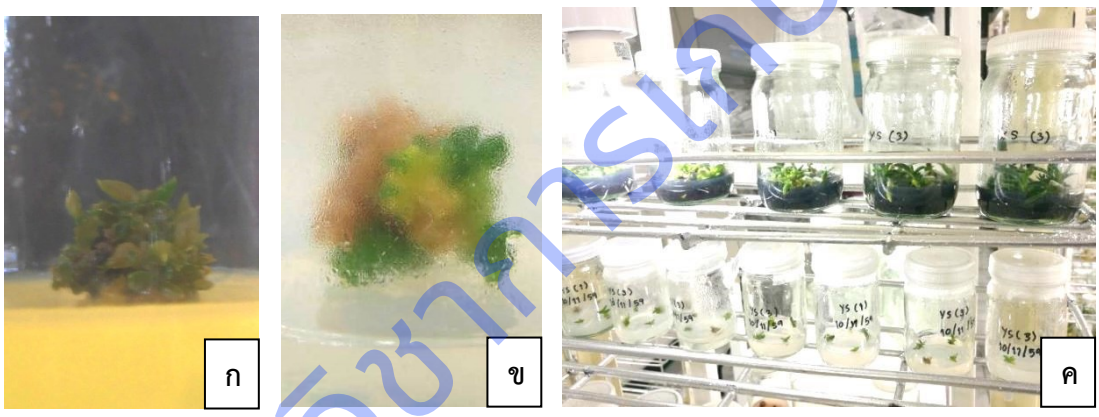
ภาพที่ 7 ลักษณะการเจริญของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้แวนดาพันธุ์ LR เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง การเจริญของโปรโตคอร์มที่วางกลุ่มห่างกัน (ก) การเจริญของโปรโตคอร์มที่วางกลุ่มใกล้ชิดกัน (ข)

กรมวิชาการเกษตร

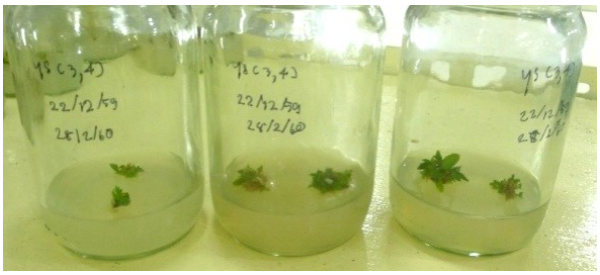
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 8 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้แวนดาพันธุ์ YS เพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ลักษณะ การเจริญของโปรโตคอร์มหลังในอาหารเหลว (ก) การเจริญของโปรโตคอร์มเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง 6 เดือน (ก)



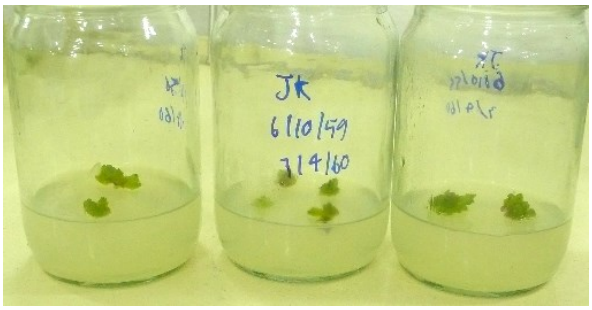
ภาพที่ 9 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้แวนดาพันธุ์ YS เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง ลักษณะการเจริญของโปรโตคอร์มหลังการย้ายขวด (ก) การเจริญของโปรโตคอร์มเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง 6 เดือน (ข) ต้นอ่อนพันธุ์ YS ในอาหารแข็ง (ค)



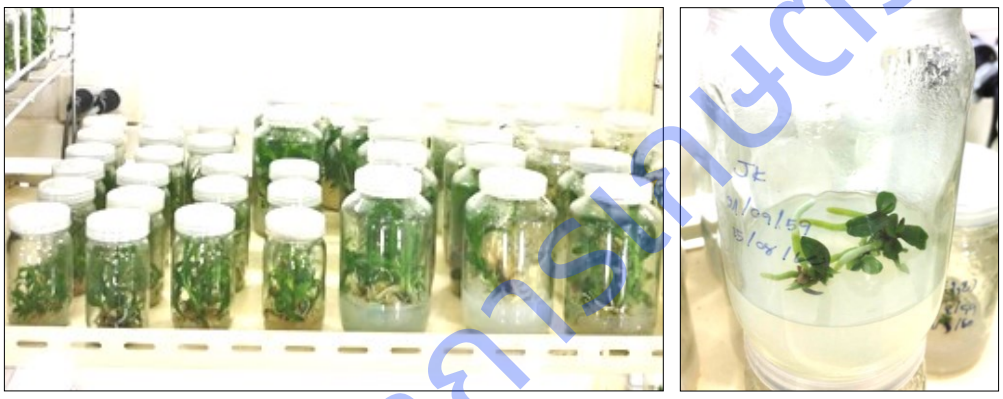
ภาพที่ 10 ลักษณะการเจริญของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้แวนด้าพันธุ์ YS เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง ที่บางกลุ่มมีการพัฒนาเป็นต้น

กรมวิชาการเกษตร

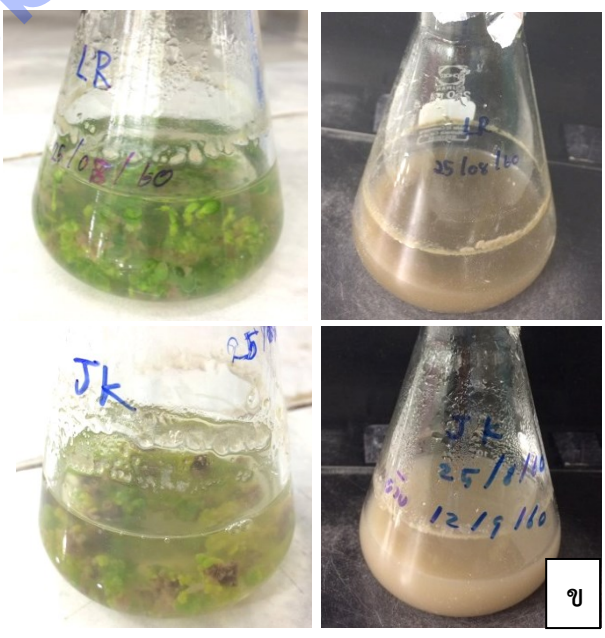
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 11 ลักษณะการเจริญของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้แวนด้าพันธุ์ JK เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง



ภาพที่ 12 กล้วยไม้แวนด้าที่ขยายเปลี่ยนอาหารใหม่แล้วเจริญเป็นต้น

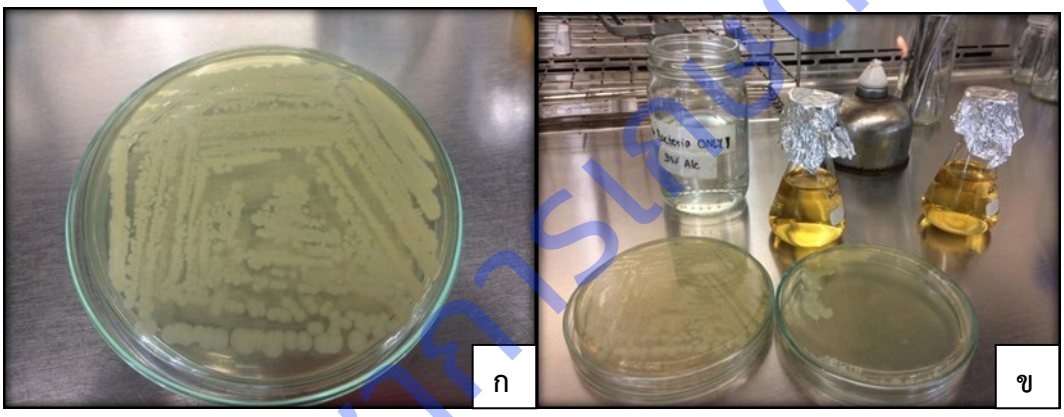


ภาพที่13 ผลของการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้แวนด้า 2 พันธุ์ในอาหารเหลว ND
แวนด้า LR หลังการเพาะเลี้ยงระยะเวลา 1 สัปดาห์ (ก)
แวนด้า JK หลังการเพาะเลี้ยงระยะเวลา 1 สัปดาห์ (ข)

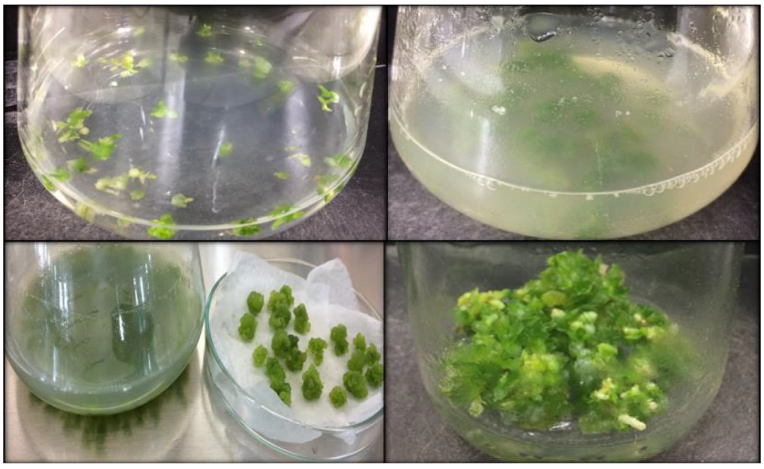
กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของโปรโตคอร์มกล้วยไม้แวนด้า JK หลังการถ่ายยีน ACO และเพาะเลี้ยงในที่มืด 3 วัน



ภาพที่ 15 การเตรียมเชื้อ *A. tumefaciens*ที่มียีน *ACC oxidase* โคโลนีเชื้อ *A. tumefaciens* ที่มีดีเอ็นเอ(ก) เลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* ในอาหารเหลว LB+ kanamycin 50 mg/L(ข)

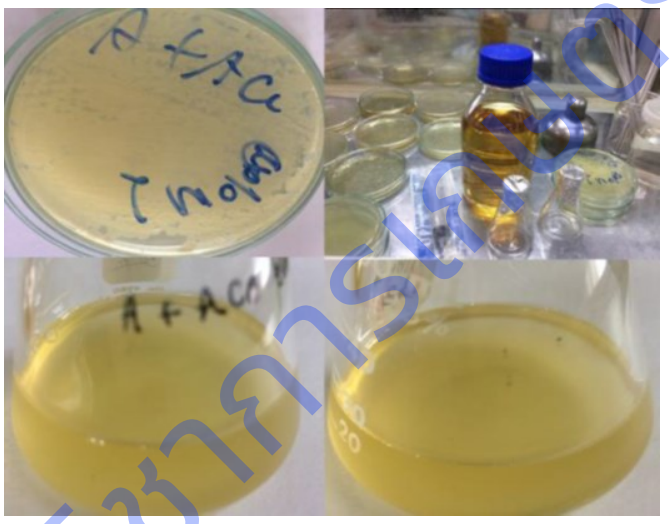


ภาพที่ 16 กล้วยไม้แวนดาลุมพินีเรดที่สามารถขยายโปรโตคอร์มในอาหารเหลวสูตร NDM ที่ไม่เติมฮอร์โมนพืชและผงมันฝรั่ง

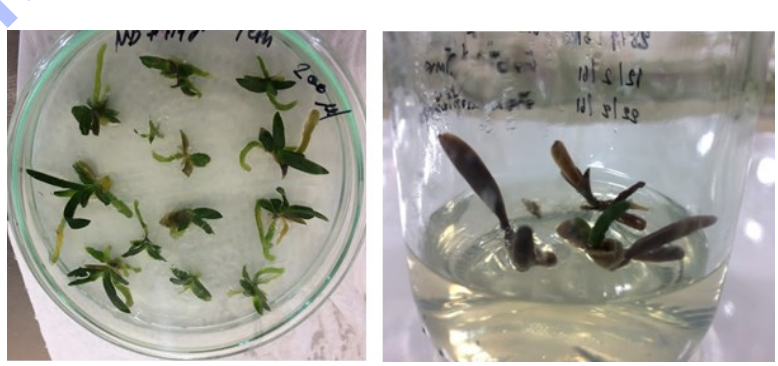
กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 17 การขยายโปรโตคอร์ม YS และ LR ในอาหารเหลวสูตร NDM ที่ไม่เติมฮอร์โมนพืช และผงมันฝรั่ง



ภาพที่ 18 การเลี้ยงเชื้อ*A. tumefaciens* EHA105ที่มียีน ACO ในอาหารเหลว LB ที่เติม Kanamycin



ภาพที่ 19 กล้วยไม้แวนด้าเหลืองสุรัชที่ได้รับการถ่ายยีน ในอาหาร NDM ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin 20 mg/L ระยะ 1 สัปดาห์

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้าเพื่อการค้า ดำเนินการในปี 2559 – 2563 เป็นการพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้าซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่มีการกระจายพันธุ์ทางภาคเหนือของประเทศไทย โดยเฉพาะฟ้ามุ่ยและสามปอยเนื่องจากมีเอกลักษณ์ที่โดดเด่นต่างจากกล้วยไม้สกุลแวนด้าอื่นๆ และศึกษาการส่งถ่ายยีนเพื่อแก้ปัญหาการเหี่ยวและดอกร่วงเร็วของกล้วยไม้สกุลแวนด้าในระหว่างการขนส่ง การวางจำหน่ายและการปักแจกัน 1. การปรับปรุงพันธุ์ การพัฒนากล้วยไม้สกุลแวนด้าพันธุ์แท้ทำได้โดยการผสมพันธุ์ข้ามต้นจากแวนด้าชนิดเดียวกัน (Interclonal) ลูกที่ได้ยังคงเป็นพันธุ์แท้เหมือนเดิมแต่จะมีลักษณะที่หลากหลายมากขึ้น ถ้าต้นที่นำมาผสมมีลักษณะดีโอกาสที่จะได้ลูกที่มีลักษณะดีก็มีมากขึ้นด้วย

1.1 การประเมินศักยภาพลูกผสมแวนด้าฟ้ามุ่ย จากการปลูกลูกผสมฟ้ามุ่ยและฟ้ามุ่ยน้อยที่ได้จากการผสมข้ามต้นภายในชนิดเดียวกันระหว่างปี 2554-2556 ได้ลูกผสมฟ้ามุ่ยออกปลูก 23 คู่ผสม โดยแบ่งเป็นลูกผสมฟ้ามุ่ยที่ผสมพันธุ์ในปี 2554 จำนวน 8 คู่ผสม ปี 2555 จำนวน 12 คู่ผสม และปี 2556 จำนวน 3 คู่ผสม รวม 1,107 ต้น มีต้นที่รอดชีวิต 822 ต้น โดยลูกผสมฟ้ามุ่ยเริ่มออกดอกช่อแรกเมื่ออายุ 4 ปีหลังออกปลูกในช่วงเดือนสิงหาคม - กุมภาพันธ์ มีต้นที่ออกดอกทั้งหมด 456 ต้น ได้คัดเลือกต้นลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 17 สายต้นจาก 7 คู่ผสม ต้นลูกผสมที่ทำการคัดเลือกเป็นต้นที่ออกดอกช่อแรก ซึ่งอาจจะไม่มีลักษณะตรงตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ทั้งหมด แต่ได้คัดเลือกต้นที่มีลักษณะดีเบื้องต้น เช่นฟอร์มดอกกลม ดอกมีขนาดใหญ่ (ความกว้างดอก >5 เซนติเมตร) และ มีลายตาสมุกชัดเจนแลมีความหลากหลายของสี เช่น สีฟ้าอมม่วง ม่วง และ จำนวนดอกต่อช่อมาก ซึ่งต้นที่คัดเลือกดังกล่าวจะต้องมีการประเมินลักษณะต่อเมื่อต้นมีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้นในปีถัดไป ส่วนลูกผสมฟ้ามุ่ยน้อยได้ต้นออกปลูก 28 คู่ผสม โดยแบ่งเป็นลูกผสมที่ผสมพันธุ์ในปี 2554 จำนวน 6 คู่ผสม ปี 2555 จำนวน 11 คู่ผสม และปี 2556 จำนวน 11 คู่ผสม รวม 1,203 ต้น มีต้นรอดชีวิตและออกดอกจำนวน 794 ต้น โดยเริ่มออกดอกช่อแรกเมื่ออายุ 3 ปีหลังออกปลูกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ - มีนาคม คัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะดีตามเกณฑ์ที่กำหนดได้ 169 สายต้น จาก 24 คู่ผสม ต้นที่คัดเลือกได้มีความหลากหลายของลักษณะกลีบดอก สีดอก และขนาดดอก โดยกลีบดอกมีลักษณะแคบ กว้าง บิดและไม่บิด ขนาดดอกแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ดอกขนาดเล็กมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก <2 เซนติเมตร ดอกขนาดกลางมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก 2 - 3.5 เซนติเมตร และดอกขนาดใหญ่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก >3.5 เซนติเมตร ส่วนสีขอลกลีบดอกแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มสีม่วง และม่วงอมแดง ส่วนของกลีบปากเข้มกว่าสีกลีบดอก และดอกมีกลิ่นหอม

1.2 การประเมินศักยภาพลูกผสมแวนด้าสามปอย ดำเนินการ ระหว่างปี 2 สถานที่ คือ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ ศึกษาในลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์ในปี 2554-2558 จากจำนวน 5 คู่ผสม 402 ต้น มีต้นรอดชีวิตจำนวน 4 คู่ผสม 213 ต้น ได้แก่ VL2VL1 VL3VL2 VL3VL4 และ VB2VD5 มีการออกดอกจำนวน 3 คู่ผสม 35 ต้น ได้แก่ VL2VL1 จำนวน 10 ต้น VL3VL2 จำนวน 11 ต้น และ VL3VL4 จำนวน 14 ต้น ซึ่งมีการออกดอกมากที่สุด ได้ต้นคัดเลือกที่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนดได้แก่ ฟอร์มดอกกลม ดอกมีขนาดใหญ่ กลีบหนา มีกลิ่นหอม ช่อดอกไม่ยาวมาก มี 5-7 ดอกต่อช่อ และออกดอกง่าย ใบไม่ร่วง ทั้งหมด 3 คู่ผสม 7 ต้นได้แก่ VL2VL1B4 VL2VL1B8 VL2VL1B10 VL3VL2B6 VL3VL2B7 VL3VL4B9 และ VL3VL4S3 ที่มีการแทงช่อดอก ดอกบานและร่วงในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน ส่วนศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร ศึกษาลูกผสมตัวเอง

กรมวิชาการเกษตร

และเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อในปี 2554-2558 จำนวน 3 คู่ผสม ได้แก่ สามปอยดง สามปอยนก และสามปอยขุนตาน จำนวน 818 ต้น พบว่า ลูกผสมกล้วยไม้สกุลแวนด้าสามปอยมีจำนวนต้นรอดตาย 310 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์รอดตาย 38 เปอร์เซ็นต์ ต้นลูกผสมไม่สมบูรณ์มีการเจริญเติบโตช้า ไม่สามารถเกิดช่อดอกได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการออกดอก จึงไม่สามารถประเมินศักยภาพลูกผสมได้

กรมวิชาการเกษตร

ต้นพ่อแม่พันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตต้นลูกที่มีลักษณะดีรวมทั้งลูกผสมฟ้ามุ่ย ฟ้ามุ่ยน้อยและสามปอยที่ผ่านการประเมินลักษณะสามารถนำไปใช้ในการขยายพันธุ์เพื่อปลูกทดแทนพันธุ์เดิมหรือใช้เป็นฐานพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุ์ ฟ้ามุ่ยและฟ้ามุ่ยน้อยเพิ่มปริมาณได้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนตายอดและตาข้าง ในอาหารสูตร NDM ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มและพัฒนาเป็นต้นขนาดเล็ก จากนั้นย้ายต้นลงสูตรอาหาร V&W ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิกรัม/ลิตร กล้วยหอมบด 100 กรัม/ลิตร มันฝรั่ง 50 กรัม/ลิตร และผงถ่าน 20 กรัม/ลิตร เพื่อให้พัฒนาเป็นต้นที่มีใบและรากสมบูรณ์ก่อนออกปลูก ซึ่งสูตรอาหารดังกล่าวสามารถนำไปปรับใช้ในการเพิ่มปริมาณกล้วยไม้สกุลแวนด้าชนิดอื่นๆ ได้

2. การส่งถ่ายยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) ต่อการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้ โดยศึกษาการแสดงออกของยีนในการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้าด้วยเทคนิค Cocultivation กับ *Agrobacterium tumefaciens* พบว่าไม่ประสบความสำเร็จ โปรโตคอร์มไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ และตายทั้งหมดในเวลาต่อมา ซึ่งอาจเกิดจากลักษณะของพืชชนิดนี้ที่ไวต่อการเคลื่อนย้ายอาหาร รวมถึงขั้นตอนและขบวนการถ่ายยีนไม่เหมาะสม ทำให้ไม่สามารถคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเพื่อเพาะเลี้ยงให้เป็นต้นได้

กรมวิชาการเกษตร

บรรณานุกรม

กิจกรรมที่ 1 การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้า

1.1 การประเมินศักยภาพลูกผสมแวนด้าฟ้ามุ่ย

ทัศนาพร ทัศคร ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และสุรภี กีรติยะอังกูร. 2553. กล้วยไม้. หน้า 3 - 44. ใน : โรคไม้ดอกไม้ประดับ. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 90 หน้า.

วีระชัย ณ นคร.2551. กล้วยไม้ไทย 2. สวนพฤกษศาสตร์พระนางเจ้าสิริกิติ์. องค์การสวนพฤกษศาสตร์ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 324 หน้า.

สุปัน ไม้ดัดจันทร์. 2558. การวิจัยและพัฒนากล้วยไม้สกุลแวนด้าเพื่อการค้า. รายงานโครงการวิจัย กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 61 หน้า.

อบฉันท์ ไทยทอง. 2546. กล้วยไม้เมืองไทย. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. กรุงเทพฯ. 461 หน้า.

Tokumura K. and M. Mii. 2001. Induction of embryogenesis callus and cell suspention culture from shoot tips excised from flower buds of Phalaenopsis (Orchidaceae). In Vitro Cell. Biol.-Plant 37:457-461.

Vacin, E. & F. Went. 1949. Some pH changes in nutrients solutions. Bot. Gaz. 110: 605-613.

1.2 การประเมินศักยภาพลูกผสมแวนด้าสามปอย

จิตราพรรณ พิลึก. 2536. การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ. 82 หน้า.

ฉัตรนภา ข่มอาวุธ สมคิด รัตนบุรี สุปัน ไม้ดัดจันทร์ ไพรินทร์ วงค์กันทะ และสาคร ยังผ่อง. 2558. การปรับปรุงพันธุ์แวนดาสามปอยเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์. ผลงานวิจัยโครงการสิ้นสุด ปี 2558. ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ธวัชชัย ทรัพย์ถิระ สุภาพ สุนทรนนท์ และสุมนทิพย์ บุนนาค. 2556. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล่ง (*Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fischer) ในสภาพปลอดเชื้อ วารสารวิจัย มข 13 หน้า.

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

สลิล สิทธิสัจจธรรม. 2552. กล้วยไม้ป่าเมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 7. บ้านและสวน, กรุงเทพฯ. 495หน้า.

สุมนทิพย์ บุนนาค. 2541. การเจริญเติบโตและฮอร์โมนพืช. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

กรมวิชาการเกษตร

มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น. 354 หน้า.

สุดาวรรณ มีเจริญ สุปัน ไม้ดัดจันทร์ และจงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2558. การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนดาสามปอยเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์. รายงานเรื่องเต็มผลการทดลองสิ้นสุดปี 2558 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร กรมวิชาการเกษตร.

กรมวิชาการเกษตร

สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติต์. 2551. กล้วยไม้ไทย 1. องค์การสวนพฤกษศาสตร์ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. ISBN 9789742863845.

กิจกรรมที่ 2 การส่งถ่ายยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) ต่อการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้

2.1 ศึกษาการแสดงออกของยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) oxidase ในการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้า

ครรชิต ธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้ โรงพิมพ์อัมรินทร์พริ้นติ้ง แอน พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน) กรุงเทพฯ. 283 หน้า.

Aida, R., T. Yoshida, K. Inchimura, R. Goto and M. Shibata. 1998. Extension of flower longevity intransgenicTorenia plant in cooperating ACC oxidase transgene. Plant Science 138:91-101.

Glick, B.R. and J.J. Pasternak. 1998. Molecular biotechnology: principle and application of Recombinant DNA. 2nd ed. Washington: ASM Press.

Mol, J.N.M., T.A. Holton and R.E. Kose. 1995. Floriculture: Genetic engineering of commercial Strains. Tibtech Sep; 13:31-39.

Zacrias L., C. Withelaw, D. Grierson, J.A. Roberth. 1999. Physiological analysis of flower and leaf abscission in antisense ACC oxidase tomato plants. In Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene II 1999.pp381-386

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก ก

1. สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อฟ้ามุ่ยและฟ้ามุ่ยน้อย

สูตรอาหาร New Dogashima Medium (NDM)

Macro elements	Mg/l	Macro elements (modified Nitsch 1954)	Mg/l
NH_4NO_3	480	$MnSO_4$ $4H_2O$	3
KNO_3	200	$ZnSO_4$ $7H_2O$	0.5
$Ca(NO_3)$ $4H_2O$	470	H_3BO_3	0.5
KCI	150	$CaSO_4$ $5H_2O$	0.025
$MgSo_4$ $7H_2O$	250	Na_2MoO_4 $2H_2O$	0.025
KH_2PO_4	550	$CoCl_2$ $6H_2O$	0.025
		Conc.H_2SO_4	0.5

Organic compounds (modified Morel & Wetmore 1951)	Mg/l		Mg/l
Myo-inosital	100	Adenine	1.0
Niacin	1.0	I-Cystein	1.0
Pgridoxine hydrochloride	1.0	d-Biotin, cryst	0.1
Thianine hydrochloride	1.0	Fe-EDTA	42
Calcium pantothenate	1.0		

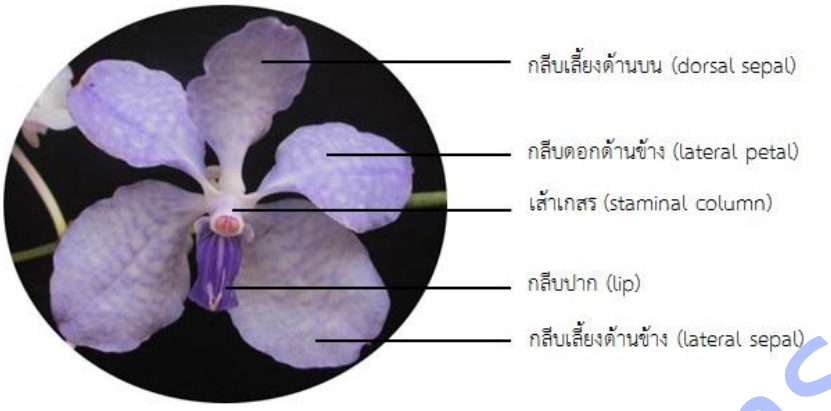
สูตรอาหาร Vacin & Went (1949)

Macronutrients	Mg/l	Micronutrients	Mg/l
$Ca_3(PO_4)_2$	200	$MnSO_4.H_2O$	5.7
KNO_3	525	Iron	Mg/l
KH_2PO_4	250	$Fe_2(C_4H_4O_6)_3.2H_2O$	28
$MgSO_4.7H_2O$	250		
$(NH_4)_2SO_4$	500	pH 4.8 – 5.0	
Sucrose	20 g		

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

2. ส่วนประกอบดอกฟ้ามุ่ย



กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก ข

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของ *Vanda liouvillei* Finet (แวนด้าสามปอยหางปลา) ที่เป็นต้นพ่อแม่พันธุ์ ณ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

รหัสต้น	จน. ใบ	ขนาดใบ (กxย) (ซม.)	จน. ดอก	ขนาด ดอก(กxส) (ซม.)	กลีบดอก (กxย) (ซม.)	กลีบนอกบน (กxย)(ซม.)	กลีบนอก ด้านข้าง (กxย)(ซม.)	ยาวก้าน ดอก (ซม.)	ยาวช่อ ดอก (ซม.)	กลีบปาก (กxย) (ซม.)	ยาวเส้า เกสร (ซม.)	ลักษณะดอก
สามปอยหาง ปลา 01	6.0	2.1x16.8	12	2.7x2.9	0.7x1.4	0.7x1.3	0.7x1.3	4.3	26.0	1.1x2.1	0.5	กลีบทั้งห้าเล็กเรียวและกลีบดอกดูคล้ายปีกนั้นปิดลู่ สีน้ำตาลแดง พบลายตารางบนกลีบดอก มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ปากดอกสีน้ำตาลแดง บริเวณปลายสุดของปาก คล้ายหางปลา บริเวณโคนของปากสีชมพูอมม่วงเส้าเกสรสีชมพูอมม่วง อับเรณูสีเหลือง ระยะเวลาการออกดอก เดือน มี.ค.
สามปอยหาง ปลา 02	6.0	1.5x12.5	9	2.5x2.5	0.7x1.4	0.7x1.5	0.8x1.5	5.0	23.5	0.7x1.7	0.5	กลีบทั้งห้าเล็กเรียวและกลีบดอกดูคล้ายปีกนั้นปิดลู่ สีน้ำตาลแดง พบลายตารางบนกลีบดอก มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ปากดอกสีน้ำตาลแดง บริเวณปลายสุดของปาก มีลักษณะคล้ายกับหางปลา บริเวณโคนของปากสีชมพูเส้าเกสรสีชมพูอมม่วง อับเรณูสีเหลือง ระยะเวลาการออกดอก เดือน เม.ย.
สามปอยหาง ปลา 03	6.0	1.6x12.6	12	2.5x2.5	0.7x1.4	0.6x1.5	0.7x1.5	4.5	16.6	0.7x1.3	0.5	กลีบทั้งห้าเล็กเรียวและกลีบดอกดูคล้ายปีกนั้นปิดลู่ สีน้ำตาลแดง พบลายตารางบนกลีบดอก มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ปากดอกสีน้ำตาลแดง บริเวณปลายสุดของปาก มีลักษณะคล้ายกับหางปลา บริเวณโคนของปากสีชมพูอมม่วงเส้าเกสรสีชมพูอมม่วง อับเรณูสีเหลือง_ะยะเวลาการออกดอก เดือน เม.ย.
สามปอยหาง ปลา 04	9.0	1.4x15.2	16	2.7x3.0	0.7x1.5	0.5x1.5	0.7x1.5	6.0	36.8	1.0x2.0	0.6	กลีบทั้งห้าเล็กเรียวและกลีบดอกดูคล้ายปีกนั้นปิดลู่ สีน้ำตาลแดง พบลายตารางบนกลีบดอก มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ปากดอกสีน้ำตาลแดง บริเวณปลายสุดของปาก มีลักษณะคล้ายกับหางปลา บริเวณโคนของปากสีชมพูอมม่วง เส้าเกสรสีชมพูอมม่วง อับเรณูสีเหลือง **ระยะเวลา**

กรมวิชาการเกษตร

												การออกดอก เดือน เม.ย.

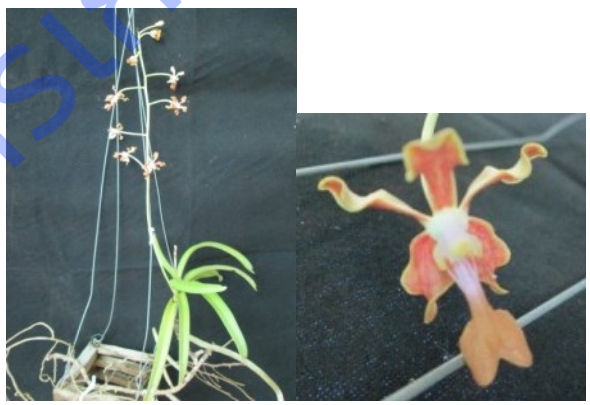
กรมวิชาการเกษตร

2. แวนด้าสามปอยหางปลาที่ใช้เป็นต้นพ่อแม่พันธุ์ ณ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

สามปอยหางปลา 01

สามปอยหางปลา 02

สามปอยหางปลา 03



สามปอยหางปลา 04

กรมวิชาการเกษตร