ห้องสมุด
กรมวิชาการเกษตร

ผลงานฉบับเต็ม

ของ

นางสาวปาริฉัตร สังข์สะอาด
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร 5
ตำแหน่งเลขที่ 1034
กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง
นักวิชาการเกษตร 6 ว. ด้านวิจัยและพัฒนา
ตำแหน่งเลขที่ 1034
กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ห้องสมุด
กรมวิชาการเกษตร

ผลงานลำดับที่ 1

การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมกล้วยในสภาพปลอดเชื้อ

กรมวิชาการเกษตร

การอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยในสภาพปลอดเชื้อ

Conservation of *Musa* spp. Genetic resources *In vitro*

ปาริฉัตร สังข์สะอาด กิ่งกาญจน์ พิชญกุล สมทรง โชติชื่น

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

กล้วยเป็นพืชที่ไม่นิยมอนุรักษ์พันธุกรรมไว้ด้วยการเก็บเมล็ด และถ้าเก็บรักษาด้วยหน่อจะต้องใช้พื้นที่จำนวนมาก จึงได้ทดลองหาเทคนิคที่เหมาะสมในการเก็บรักษาพันธุกรรมกล้วยปลูกในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเก็บไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช โดยทำการศึกษา 2 วิธี คือการเก็บรักษาโดยลดการเจริญเติบโตให้ช้าลง (slow growth) และการเก็บรักษาโดยเก็บในอุณหภูมิที่ต่ำมากหรือเย็นยิ่งยวด (Cryopreservation)

การทดลองที่1 การเก็บรักษาโดยลดการเจริญเติบโตให้ช้าลงโดยทดลองเก็บเนื้อเยื่อปลายยอด (shoot tip) ของกล้วยปลูก จำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ กล้วยน้ำว้า กล้วยมะลิอ่อง กล้วยหอมทอง กล้วยเล็บมือนาง กล้วยไข่ และกล้วยตานี ในขวดทดลองขนาดเล็ก (3x9 cm.) และการลดปริมาณธาตุอาหาร บนอาหารสังเคราะห์เพื่อการอนุรักษ์จำนวน 6 สูตร คือ อาหาร MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร, 1/2MSที่เติมน้ำตาล 15 กรัม/ลิตร, 1/2MSที่เติมน้ำตาล 7.5 กรัม/ลิตร, 1/2MSที่ไม่เติมน้ำตาล, 1/4MSที่เติมน้ำตาล 15 กรัม/ลิตร และ1/4MSที่เติมน้ำตาล 7.5 กรัม/ลิตร ผลจากการเก็บรักษาเนื้อเยื่อกล้วยทั้ง 6 พันธุ์ ในระยะ 3, 6, 9 และ12 เดือน พบว่า กล้วยทุกพันธุ์สามารถเจริญอยู่ได้เป็นเวลา 9-12 เดือน ในสูตรอาหาร MS+ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร, 1/2MSที่เติมน้ำตาล 15 กรัม/ลิตร และ1/4MSที่เติมน้ำตาล 15 กรัม/ลิตร ได้โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหารใหม่ นอกจากนี้ กล้วยเล็บมือนาง กล้วยหอมทอง และกล้วยน้ำว้ายังสามารถเก็บรักษาได้ในอาหาร 1/2MSที่เติมน้ำตาล 7.5 กรัม/ลิตร อีกด้วย

การทดลองที่ 2 การเก็บรักษาเนื้อเยื่อกล้วยในอุณหภูมิเย็นยิ่งยวด (Cryopreservation) โดยนำเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยหอมทอง มาทำการ preculture เพื่อศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะต่อการเตรียมเนื้อเยื่อปลายยอดก่อนนำไปเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำมาก (ในไนโตรเจนเหลว, -196 °C) โดยเลี้ยงปลายยอดกล้วยจากต้นอ่อนที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2-3 เดือน ในอาหาร 1/2 MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.3M, 0.5M, 0.7M และไม่เติมน้ำตาลซูโครส และทดลองเก็บรักษาโดยใช้วิธี Encapsulation-vitrification และ Dehydration-vitrification

รหัสกิจกรรม 05024704

พบว่าปลายยอดกล้วยยังไม่สามารถรอดชีวิตหลังจากการทดลองศึกษาในวิธีดังกล่าว จึงต้องศึกษาเทคนิคที่เหมาะสม และหาเทคนิคอื่นๆเพื่อเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวดต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

กล้วย (*Musa* spp.) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชียตอนใต้ เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Musaceae และเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญอันดับต้นในตลาดผลไม้โลก พบปลูกในประเทศต่างๆ มากกว่า 130 ประเทศ (วิจิตร, 2530) ในประเทศไทย กล้วยจัดเป็นพืชอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่ง สามารถปลูกได้ในทุกภาคของประเทศ เนื่องจากประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดของกล้วยป่า จึงทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง กล้วยเป็นพืชที่มีคุณประโยชน์มากมาย เช่นผลของกล้วยเป็นอาหารสามารถรับประทานได้และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง อวัยวะทุกส่วนของกล้วยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งสิ้น รวมทั้งสามารถแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ สร้างมูลค่าเพิ่มและรายได้ให้กับชุมชนเป็นจำนวนมาก กล้วยบางชนิดสามารถใช้เป็นไม้ประดับนำมาจัดสวนได้อีกด้วย

กล้วยที่รับประทานได้ในประเทศไทยมีมากมายหลายพันธุ์ แต่ที่นิยมบริโภค ได้แก่ กล้วยหอม กล้วยน้ำว้า กล้วยไข่ ฯลฯ กล้วยหลากหลายชนิดนี้ บางชนิดจัดเป็นพืชเศรษฐกิจ ส่งออกทำรายได้ให้กับประเทศ การอนุรักษ์และรวบรวมพันธุ์กล้วยเพื่อการพัฒนาผลผลิตจึงมีความสำคัญ พันธุ์กล้วยปลูกที่เป็นพันธุ์ที่รู้จักกันโดยทั่วไปได้แก่ (เบญจมาศ, 2545)

1. กล้วยหอมทอง (Kluai Hom Thong) จัดอยู่ในกลุ่ม AAA ชื่อสามัญ Gros Michel มีลำต้นเทียมสูง 2.5-3.5 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 20 ซม. กาบลำต้นด้านนอกมีประดำ ด้านในสีเขียวอ่อนมีลายเส้นสีชมพู ก้านใบมีร่องค่อนข้างกว้างและมีปีก เส้นกลางใบสีเขียว ก้านช่อดอกมีขนปลี (ใบประดับ) รูปไข่ค่อนข้างยาว ปลายแหลม ด้านบนสีแดงอมม่วง มีไข ด้านล่างมีสีแดงซีด เครือหนึ่งมี 4-6 หวี หวีหนึ่งมี 12-16 ผล ผลใหญ่กว้าง 3-4 ซม. ยาว 21-25 ซม. ปลายผลมีจุกเห็นได้ชัด เปลือกบาง เมื่อสุกผลเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทอง แต่ที่ปลายจุกจะมีสีเขียวแล้วเปลี่ยนสีภายหลัง เนื้อสีเหลืองเข้ม กลิ่นหอม รสหวาน แหล่งปลูกส่วนใหญ่ อยู่ในภาคกลาง ปลูกมากแถบปทุมธานี และกรุงเทพฯ หรือจังหวัดใกล้เคียง อ่อนแอต่อโรคใบจุด และโรคตายพราย

2. กล้วยน้ำว้า (Kluai Namwa) จัดอยู่ในกลุ่ม ABB ชื่อสามัญ Pisang Awak มีชื่อเรียกอื่นๆ เช่น กล้วยน้ำว้าเหลือง กล้วยใต้ กล้วยอ่อง มีลำต้นเทียมสูงไม่เกิน 3.5 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 15 ซม. กาบลำต้นด้านนอกสีเขียวอ่อน มีประดำเล็กน้อย ด้านในสีเขียวอ่อน ก้านใบมีร่องค่อนข้างแคบ เส้นกลางใบสีเขียวอมชมพู ก้านช่อดอกไม่มีขน ปลีรูปไข่ค่อนข้างป้อม ม้วนงอขึ้นปลายป้าน ด้านบนสีแดงอมม่วง มีนวล ด้านล่างสีแดงเข้ม เครือหนึ่งมีประมาณ 7-10 หวี หวีหนึ่งมี 10-16 ผล ก้านผลยาว เปลือกหนา เมื่อสุกมีสีเหลือง เนื้อสีขาว รสหวาน ไส้กลางมีสีเหลืองชมพูหรือขาว ซึ่งทำให้แบ่งออกได้เป็น กล้วยน้ำว้าเหลือง กล้วยน้ำว้าแดง และกล้วยน้ำว้าขาว

นอกจากนี้ยังมีกล้วยน้ำว้าดำ กล้วยน้ำว้าต้นเตี้ย (น้ำว้าค่อม) กล้วยน้ำว้าเขียว กล้วยน้ำว้านวล และกล้วยน้าว้าลูกไส้ดำ กล้วยน้ำว้าปลูกทั่วไปในทุกๆ ภาคของประเทศไทย ปลูกเป็นการค้าในภาคกลาง ภาคเหนือ ปลูกมากที่จังหวัดพิษณุโลก

3. กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง เป็นสายพันธุ์ย่อยของกล้วยน้ำว้า ลำต้นสูงไม่เกิน 2.5 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 15 ซม. กาบลำต้นด้านนอก มีสีเขียวปนแดง มีประดำค่อนข้างมาก ก้านใบสีเขียวสด ท้องใบมีนวลมาก เครือหนึ่งมี 5-7 หวี ลักษณะผลภายนอกเหมือนกล้วยน้ำว้า กาบขาว ผลสุกมีสีเหลืองปนน้ำตาล เปลือกบาง บางครั้งมีกระที่ผิว เนื้อในมีสีเหลือง รสหวานจัดกว่าทุกพันธุ์ เป็นกล้วยที่นิยมปลูก ในสวนแถบบางกอกน้อย และสวนทุเรียนที่จังหวัดนนทบุรี มีชื่อพ้องว่า กล้วยน้ำว้าสวนทองมาเอง

4. กล้วยไข่ (Kluai Khai) จัดอยู่ในกลุ่ม AA ชื่อสามัญ Pisang Mas ชื่อพ้อง กล้วยกระ กล้วยเจ๊กบอง ลำต้นเทียมสูง 2.5-3 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 16-20 ซม. กาบลำต้นด้านนอกสีเขียวปนเหลือง มีประสีน้ำตาลอ่อน ด้านในสีชมพูอมแดง ก้านใบสีเขียวอมเหลือง มีร่องกว้าง โคนก้านใบมีปีกสีชมพู ก้านช่อดอกมีขนอ่อน ปลีรูปไข่ ม้วนงอขึ้น ปลายค่อนข้างแหลม ด้านบนสีแดงอมม่วง ด้านล่างที่โคนกลีบสีซีด เครือหนึ่งมี 6-7 หวี หวีหนึ่งประมาณ 14 ผล ผลค่อนข้างเล็ก กว้าง 2-3 ซม. ยาว 8-10 ซม. ก้านผลสั้น เปลือกผลบาง เมื่อสุกมีสีเหลืองสดใส บางครั้งมีจุดดำเล็กๆ ประปราย เนื้อสีครีมอมส้ม รสหวาน แหล่งปลูกกระจายอยู่ตามภาคต่างๆ แต่ที่ปลูกเป็นการค้ามาก ได้แก่ จังหวัดกำแพงเพชร สุโขทัย ตาก นครสวรรค์ เพชรบุรี ต้านทานต่อโรคตายพราย แต่ไม่ต้านทานต่อโรคใบจุด

5. กล้วยเล็บมือนาง (Kluai Leb Mu Nang) จัดอยู่ในกลุ่ม AA ชื่อพ้อง กล้วยข้าว กล้วยเล็บมือ กล้วยหมาก ลำต้นเทียมสูงไม่เกิน 2.5 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 15 ซม. กาบลำต้นด้านนอกสีชมพูอมแดง มีประดำหนา ด้านในสีชมพูอมแดง ก้านใบสีชมพูอมแดง ใบตั้งขึ้น มีร่องกว้าง มีปีก เส้นใบสีชมพูอมแดง ก้านช่อดอกมีขน ปลีรูปไข่ค่อนข้างยาว ม้วนงอขึ้น ปลายแหลม ด้านบนสีแดงอมม่วง ด้านล่างสีแดงซีด เครือชี้ออกด้านข้าง เครือหนึ่งมี 7-8 หวี หวีหนึ่ง 10-16 ผล ผลเล็ก กว้าง 2-2.5 ซม. ยาว 110-12 ซม. รูปโค้งงอ ปลายเรียวยาว ก้านผลสั้น เปลือกหนา เมื่อสุกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทอง และยังมีก้านเกสรตัวเมียติดอยู่ กลิ่นหอมแรง เนื้อสีเหลือง รสหวาน นิยมปลูกแถบภาคใต้โดยเฉพาะจังหวัดชุมพร

6. กล้วยตานี (Musa balbisiana Colla) ชื่อพ้อง กล้วยป่า กล้วยพองลา กล้วยงู กล้วยตานีใน กล้วยเมล็ด กล้วยชะนีใน ลำต้นเทียมสูง 3.5-4 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20 ซม. สีเขียว

ไม่มีปื้นดำ กาบลำต้น ด้านในสีเขียว ก้านใบสีเขียว เส้นกลางใบสีเขียวไม่มีร่อง ก้านช่อดอกสีเขียว ไม่มีขน ปลีรูปร่างป้อม ปลายมน ด้านบนสีแดงอมม่วง มีนวล ด้านล่างสีแดงเข้มสดใส เมื่อกาบปลีกางขึ้น จะไม่ม้วนงอ กาบปลีแต่ละใบซ้อนกันลึก เครือหนึ่งมีประมาณ 8 หวี หวีหนึ่งมี 10-14 ผล ผลป้อมขนาดใหญ่มีเหลี่ยมชัดเจน ปลายทู่ก้านผลยาว ผลอ่อนมีทั้งสีเขียวอ่อนและเขียวเข้ม ผลสุกมีสีเหลือง เนื้อมีรสหวาน มีเมล็ดจำนวนมาก เมล็ดใหญ่สีดำ ผนังหนาแข็ง พบได้ทั่วไป แต่ปัจจุบันปลูกเพื่อตัดใบตองเป็นการค้า ธุรกิจส่งออก ที่ อ.คลองกระจง จังหวัดสุโขทัย

การเก็บรักษาพันธุ์กล้วยโดยทั่วไป จะเก็บรวบรวมจากแหล่งต่างๆ ทั้งพันธุ์ป่า พันธุ์ปลูก รวมถึงพันธุ์ที่นำมาจากต่างประเทศ รวบรวมไว้ในสภาพแปลงปลูก เพื่อป้องกันการสูญหายโดยธรรมชาติ และการนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ มักขยายพันธุ์โดยการแยกหน่อ ซึ่งการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในรูปแบบดังกล่าว จำเป็นต้องมีการดูแลรักษาอย่างดี จึงมีความยุ่งยากในเรื่องเนื้อที่ แรงงาน ความเสี่ยงต่อการเข้าทำลายของโรค แมลง และการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมอย่างรุนแรง ตลอดจนความสิ้นเปลืองในการดูแลรักษา (อรดี, 2541) ทางเลือกหนึ่งซึ่งสามารถแก้ปัญหานี้ได้ คือ การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในสภาพปลอดเชื้อ โดยสามารถเก็บในรูปของเนื้อเยื่อ กลุ่มเซลล์ โปรโตพลาส เอ็มบริโอ เป็นต้น (รังสฤษฎ์, 2545) การเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น พืชที่มีเมล็ดที่เมื่อทำให้แห้งแล้วจะสูญเสียความงอกอย่างรวดเร็ว (reculcitran seed) ได้แก่ ทุเรียน กาแฟ โกโก้ เงาะ ขนุน มะพร้าว เป็นต้น พืชที่มีการกระจายพันธุ์สูง เมื่อนำไปปลูกแล้วได้ต้นไม่ตรงตามพันธุ์ ต้องใช้ส่วนอื่นๆ ในการขยายพันธุ์ ได้แก่ มันสำปะหลัง กล้วย เป็นต้น (สุจิตรา, 2541) การเก็บรักษาทำได้ 2 รูปแบบ คือ

1. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในระยะปานกลาง (medium-term preservation) โดยการลดการเจริญเติบโตให้ช้าลง (slow growth) เป็นวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพที่ทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ เพื่อลดปัญหาการตัดแยกเนื้อเยื่อและเปลี่ยนอาหารบ่อยๆ ซึ่งทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงสภาพทางกายภาพ เช่น การลดอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง การลดธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชบางชนิดหรือใช้หลายวิธีร่วมกัน การเก็บรักษาโดยวิธีนี้ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาส่วนยอดของพืชหลายชนิด เช่น กล้วย แอปเปิ้ล ฯลฯ (มณฑา, 2540)

2. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในระยะยาว (long-term preservation) โดยการเก็บเนื้อเยื่อพืชในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำมากๆ (Cryopreservation) การเก็บในไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นวิธีที่ใช้กันมากที่สุด ในสภาพนี้กระบวนการเมตาโบลิซึม (metabolism) ต่างๆ จะหยุดลง เซลล์และเนื้อเยื่อคงสภาพไม่เปลี่ยนแปลง มีชีวิตอยู่ได้ยาวนานไม่สิ้นสุดและชักนำกลับเป็นต้นพืชได้ (ประศาสตร์, 2536; Wilking และ Dodds, 1983) สำหรับงานวิจัยในประเทศไทย มีรายงานว่าได้ดำเนินการศึกษาการเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชโดยใช้เทคนิค Cryopreservation ในพืชหลาย

ชนิด เช่น กล้วยไม้ มะม่วง ขนุน หน่อไม้ฝรั่ง ไผ่ มันฝรั่ง มันสำปะหลัง และพืชสมุนไพรต่างๆ ซึ่งคาดว่าในอนาคตจะมีการศึกษาพัฒนาเทคนิค Cryopreservation ให้ก้าวหน้าและใช้ประโยชน์จากวิธีนี้มากขึ้น (Kirdmanee และคณะ, 2000)

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชทั้งสองวิธีนี้ สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ยาวนาน สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เมื่อต้องการ ซึ่งพบว่าในหลายประเทศได้ใช้วิธีการเก็บรักษาดังกล่าวและประสบความสำเร็จ เช่น เบลเยี่ยม คอสตาริกา ฟิลิปปินส์ เป็นต้น สำหรับประเทศไทย มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับกล้วยมากมาย และมีการทดลองและรวบรวมโดยการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้ออยู่บ้างแต่ไม่ใช่หน่วยงานที่รับผิดชอบโดยตรง และถึงแม้ว่ากล้วยไม่ได้ถูกจัดอันดับอยู่ในพืชเศรษฐกิจสำคัญของของกรมวิชาการเกษตร ทั้งไม่ได้อยู่ในกลุ่มพืชส่งออกที่สำคัญของประเทศ แต่กล้วยก็มีความสำคัญในระดับท้องถิ่น และความต้องการของตลาดโลกยังมีอยู่มาก โดยเฉพาะตลาดในประเทศจีน ซึ่งประเทศไทยน่าจะมีความได้เปรียบและมีศักยภาพในการพัฒนาเพื่อแข่งขันกับประเทศอื่นๆ ได้ อาทิ กล้วยหอม กล้วยไข่ กล้วยน้ำว้าไทย และกล้วยประดับ นอกจากนี้ กรมวิชาการเกษตรยังคงอยู่ในกลุ่มประเทศสมาชิกเครือข่ายผู้ปลูกกล้วยในเอเชียและแปซิฟิก (BAPNET-Banana Asia and Pacific Network) ซึ่งยังดำเนินงานร่วมกัน โดยได้รวบรวมพันธุ์และสายพันธุ์กล้วยไทยจำนวน 120 สายพันธุ์และอีก 22 สายพันธุ์ จาก BAPNET ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร จ.พิจิตร และอีกจำนวนหนึ่งที่ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตสุโขทัย2 จ.สุโขทัย (ไพโรจน์และจรัญ, 2548) และแหล่งรวบรวมอื่นๆ อาทิ สถานีวิจัยปากช่อง จ.นครราชสีมา ศูนย์รวมสายพันธุ์กล้วย พิพิธภัณฑสถานจังหวัดกำแพงเพชรเฉลิมพระเกียรติ จ.กำแพงเพชร สวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ กรุงเทพฯ วัดสวนแก้ว จ.นนทบุรี และชมรมรักษ์กล้วยซึ่งเป็นแหล่งข้อมูลของกล้วยอย่างสมบูรณ์ (เฉลิมศักดิ์, 2548) นอกจากที่กล่าวมานี้มีการปลูกกระจายอยู่ทั่วไปในสภาพธรรมชาติ และถ้าหากแปลงรวบรวมดังกล่าวมีอันต้องสูญเสียไป อาจเนื่องมาจากสภาวะความแปรปรวนที่รุนแรงของธรรมชาติในปัจจุบัน เชื้อพันธุกรรมกล้วยเหล่านี้คงสูญหายไปด้วย โดยพบว่าปัจจุบันก็มีพันธุ์ที่สูญหายไปบ้างแล้วและที่กำลังใกล้สูญพันธุ์ก็มีอีกไม่น้อย ซึ่งเชื้อพันธุกรรมเหล่านี้มีความสำคัญอย่างมากในการใช้ประโยชน์เพื่อศึกษาและปรับปรุงพันธุ์

ธนาคารเชื้อพันธุ์พืช (Gene Bank) ของกรมวิชาการเกษตรมีภารกิจรับผิดชอบโดยตรงในด้านการเก็บรวบรวมและอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาวิจัยเทคนิคและวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมกล้วยในสภาพปลอดเชื้อ และทำการจัดเก็บไว้เพื่อเป็นประโยชน์ในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ และขยายผลในการจัดเก็บพืชอื่นๆ ที่มีความสำคัญต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กล้วยปลูก จำนวน 6 พันธุ์
   1.1 กล้วยหอมทอง
   1.2 กล้วยน้ำว้า
   1.3 กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง
   1.4 กล้วยไข่
   1.5 กล้วยเล็บมือนาง
   1.6 กล้วยตานี
2. อาหารสังเคราะห์สูตร MS (1962) ดัดแปลง
3. เครื่องแก้วและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการทำ Cryopreservation
4. ถังไนโตรเจนเหลว
5. วัสดุปลูกต่างๆ

วิธีการ แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองย่อยที่ 1 การศึกษาการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยปลูกแบบชะลอการเจริญเติบโต (slow growth)

โดยทำการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยปลูก จำนวน 6 พันธุ์ ในอาหาร 6 สูตร ในขวดทดลองขนาดเล็ก (3x9 ซม.)

1.1 นำหน่อกล้วย 6 พันธุ์ (หน่อใบแคบ) ได้แก่ กล้วยหอมทอง กล้วยน้ำว้า กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง กล้วยไข่ กล้วยเล็บมือนาง และกล้วยตานี มาเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำหน่อกล้วยมาทำความสะอาด (เลือกจากหน่อใบแคบ) ลอกกาบใบออก จนเหลือหน่อขนาดเล็ก ให้มีส่วนของปลายยอดหรือจุดเจริญ ฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ หรือฟอกฆ่าเชื้อด้วย คลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที คลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง (ขั้นตอนนี้ปฏิบัติในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ) ตัดปลายยอดให้ได้ขนาด 1x1 เซนติเมตร แล้วผ่าตามยาวให้ผ่านจุดเจริญ เป็น 2-4 ชิ้น นำเนื้อเยื่อเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ที่ทำการทดลอง (สูตร MS ดัดแปลง) จัดวางขวดเนื้อเยื่อในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมสภาพ หลังจากการเก็บรักษาและมีความต้องการนำออกปลูก ให้ย้ายต้นอ่อนลงสูตรอาหาร MS ปกติ ถ้าหากต้นมีจำนวนรากน้อยให้ย้ายลงอาหารสูตรชักนำให้เกิดราก สูตรอาหาร MS + NAA 0.5-1 mg/L หลังจากนั้นย้ายปลูกในวัสดุปลูกในโรงเรือน และนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

1.2 นำเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วย ทั้ง 6 พันธุ์ เลี้ยงบนอาหาร 6 สูตร เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต โดยเติมวุ้น 6 กรัมต่อลิตร pH 5.8 ในอาหารทุกสูตร

อาหารสูตรที่ 1 MS + BA 5 mg/L+ Sucrose 30 g/L

อาหารสูตรที่ 2 1/2MS+ Sucrose 15 g/L

อาหารสูตรที่ 3 1/2MS+ Sucrose 7.5 g/L

อาหารสูตรที่ 4 1/2MS+ non sucrose

อาหารสูตรที่ 5 1/4MS+ Sucrose 15 g/L

อาหารสูตรที่ 6 1/4MS+ Sucrose 7.5 g/L

1.3 เลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสง 1,000 – 2,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

1.4 บันทึกข้อมูล ความสูง จำนวนยอดใหม่ ความสูงของยอดใหม่ อัตราการรอดชีวิต และลักษณะของต้นกล้วยขณะทำการเก็บรักษา ในระยะเวลา 3, 6, 9, และ 12 เดือน

การทดลองย่อยที่ 2 การเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยในสภาพที่มีอุณหภูมิเย็นยิ่งยวด (Cryopreservation)

นำหน่อกล้วยหอมทอง มาทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสูตร MS ดัดแปลง (1962) ที่เติม BA 5 mg/L โดยใช้วิธีการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ชักนำให้เกิดต้นอ่อนเป็นเวลา 2-3 เดือน หรือให้ต้นอ่อนมีความสูง 3-4 ซม. แล้วจึงนำมาตัดเนื้อเยื่อปลายยอด ให้ได้ขนาดประมาณ 1x1 มม. นำเนื้อเยื่อที่ได้ มาทำการทดลองดังนี้

ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ในอาหาร preculture ในอาหารสูตร MS+ non-sucrose, MS+ 0.3M sucrose, MS+ 0.5M sucrose และ MS+ 0.7M sucrose แล้วทำการทดลองเก็บรักษาโดยวิธี Vitrification และ Encapsulation-vitrification (Matsumoto และ Sakai, 1995) เปรียบเทียบอัตราการอยู่รอดของเนื้อเยื่อ

<u>การเก็บรักษาโดยวิธี Vitrification</u> โดยนำเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมตามขั้นตอนข้างต้น ที่ได้ขนาดประมาณ 1x1 มม. เลี้ยงบนอาหาร preculture (MS + น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ) เป็นเวลา 1 วัน นำเนื้อเยื่อแช่ใน Loading Solution ซึ่งมีส่วนผสมของ glycerol 2 โมล และ น้ำตาลซูโครส 0.4 โมล เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเป็นขั้นตอนของการ Dehydration โดยแช่เนื้อเยื่อในสารละลาย PVS2 ซึ่งประกอบด้วย glycerol 30 เปอร์เซ็นต์ Ethylene glycol 15 เปอร์เซ็นต์ และ DMSO 15 เปอร์เซ็นต์ (Sakai และคณะ, 1990) เป็นเวลา 25 นาที นำเนื้อเยื่อแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำเนื้อเยื่อที่ได้มาละลาย

น้ำแข็งโดยแช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 นาที นำ เนื้อเยื่อแช่ใน สารละลายซูโครสเข้มข้น 1.2 โมล เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงย้ายเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยลงในอาหารสูตร MS ปกติ เพื่อดูอัตราการอยู่รอดของเนื้อเยื่อ

การเก็บรักษาโดยวิธี Encapsulation-Vitrification วิธีการเตรียมเนื้อเยื่อและการทำ preculture ทำเช่นเดียวกับวิธี vitrification หลังจากนั้นเป็นขั้นตอนของ Encapsulation โดยการนำเนื้อเยื่อปลายยอดที่ผ่านการ preculture แช่ในสารละลาย loading ที่มีส่วนผสมของ glycerol 2 โมล น้ำตาลซูโครส 0.4 โมล และ Na-alginate 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที แล้วใช้ pipette ดูดเนื้อเยื่อใส่ลงในสารละลาย MS ที่เติม $CaCl_2$ 0.1 โมล และ น้ำตาลซูโครส 0.4 โมล แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จนเนื้อเยื่อมีลักษณะคล้ายมีวุ้นมาห่อหุ้มอยู่ (เม็ด bead) นำเม็ด bead (encapsulated meristems) ที่ได้ แช่ในสารละลาย PVS2 ซึ่งประกอบด้วย glycerol 30 เปอร์เซ็นต์ Ethylene glycol 15 เปอร์เซ็นต์ และ DMSO 15 เปอร์เซ็นต์ (Sakai และคณะ, 1990) เป็นเวลา 25 นาที นำเม็ด bead แช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำ เม็ด bead ที่ได้มาละลายน้ำแข็งโดยแช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 นาที นำ เม็ด bead แช่ใน สารละลายซูโครสเข้มข้น 1.2 โมล เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงย้ายเม็ด bead ที่มีเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยลงในอาหารสูตร MS ปกติ เพื่อดูอัตราการอยู่รอดของเนื้อเยื่อ

ระยะเวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาทำการทดลอง 2 ปี (ตุลาคม 2547 –กันยายน 2549)

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในสภาพหลอดทดลอง
อาคารทรัพยากรพันธุกรรมพืชสิรินธร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การศึกษาทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยปลูกแบบชะลอการเจริญเติบโต (slow growth) ในหลอดทดลองขนาด 3x9 ซม. โดยนำหน่อกล้วยปลูก 6 พันธุ์ ได้แก่ กล้วยหอมทอง กล้วยน้ำว้า กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง กล้วยไข่ กล้วยเล็บมือนาง และกล้วยตานี ตัดเนื้อเยื่อปลายยอดเลี้ยงในอาหาร 6 สูตร ได้แก่ อาหารสูตร MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L , 1/2MS + Sucrose 15 g/L, 1/2MS + Sucrose 7.5 g/L, 1/2MS + non-sucrose , 1/4MS + Sucrose 15 g/L และ 1/4MS + Sucrose 7.5 g/L ตามลำดับ พบว่า

1.1 กล้วยหอมทอง เมื่อเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยหอมทองเป็นเวลา 3 เดือน ปลายยอดที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L และ 1/2MS + Sucrose 15 g/L เจริญเป็นต้นอ่อนและแตกยอดใหม่ได้ดี ในขณะที่ปลายยอดที่เลี้ยงในอาหารสูตร 1/2MS + Sucrose 7.5 g/L เพิ่งเริ่มเจริญเป็นต้นอ่อน และในอาหารสูตร 1/4MS + Sucrose 15 g/L และ 1/4MS + Sucrose 7.5 g/L เริ่มแตกเป็นยอดเล็กๆ ส่วนในอาหารสูตร 1/2MS ที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครสยังไม่แตกยอด สำหรับการอนุรักษ์ในระยะเวลา 6 และ 9 เดือน กล้วยที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L ใบเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและมีรากยาว ในอาหารสูตร 1/2MS + Sucrose 15 g/L ใบเริ่มมีสีเหลืองซีด และมีการแตกยอดใหม่จำนวนมาก ในสูตร 1/2MS + Sucrose 7.5 g/L ความสูงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย มีการแตกยอดใหม่เพิ่ม ในอาหารสูตร 1/2MS ที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครสยังคงไม่แตกยอด ในอาหาร 1/4MS + Sucrose 15 g/L ต้นอ่อนเจริญและแข็งแรงดี มีบางต้นที่เริ่มมีสีดำ และในอาหารสูตร 1/4MS + Sucrose 7.5 g/L เจริญเป็นต้นอ่อนขนาดเล็ก ไม่พบการแตกยอดใหม่ กล้วยหอมทองสามารถเก็บรักษาได้นานถึง 12 เดือน โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหาร ในสูตรอาหาร MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L, อาหาร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 15 และ 7.5 กรัมต่อลิตร และ อาหาร 1/4MS ที่เติมซูโครส 15 กรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 90, 90, 80 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) (ภาพที่ 1)

1.2 กล้วยน้ำว้า เมื่อทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยน้ำว้าเป็นเวลา 3 เดือน เริ่มเห็นการเจริญเป็นต้นอ่อนในอาหารสูตร 1/2MS + Sucrose 15 g/L ส่วนที่เก็บในอาหารสูตรอื่นๆ ยังไม่แตกยอดอ่อน เมื่อเก็บรักษาต่อไปเป็นเวลา 6 และ 9 เดือน ในอาหารสูตร MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L ต้นสูงเฉลี่ยถึง 8 ซม. ใบเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีการแตกยอดใหม่เล็กน้อย ในอาหารสูตร 1/2MS + Sucrose 15 g/L ปลายยอดกล้วยเจริญเป็นต้นอ่อนดีแต่ยังมีบางต้นที่ยังไม่แตกยอด ในอาหารสูตร 1/2MS + Sucrose 7.5 g/L ต้นเริ่มซีดเหลือง แตกยอดใหม่เล็กน้อยเช่นกัน ในอาหารสูตร 1/2MS + non-sucrose และ 1/4MS + Sucrose 7.5 g/L ปลายยอดยังไม่แตกยอดและเริ่ม

เปลี่ยนเป็นสีดำ ส่วนในอาหารสูตร 1/4MS + Sucrose 15 g/L ปลายยอดยังมีส่วนที่เป็นสีเขียวอยู่ และเมื่อเก็บรักษาต่อไปเป็นระยะเวลา 12 เดือน มีเพียงในอาหารสูตร MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L ที่ยังมีต้นที่เจริญได้แต่เริ่มซีดเหลือง และในอาหารสูตร 1/4MS + Sucrose 15 g/L ที่ยังมีส่วนปลายยอดสีเขียว (ตารางที่ 2) (ภาพที่ 2)

1.3 กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง เมื่อเก็บรักษาปลายยอดเป็นเวลา 3 เดือน มีเพียงปลายยอดในอาหาร MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L และ 1/4MS + Sucrose 15 g/L กำลังเริ่มแทงยอดอ่อน ในระยะ 6 และ 9 เดือน ในอาหารสูตร MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L ต้นอ่อนมีใบเริ่มซีด ส่วนในอาหารสูตร 1/4MS + Sucrose 15 g/L ปลายยอดยังมีสีเขียว แต่มีบางปลายยอดเริ่มเปลี่ยนเป็นสีดำ และตาย ส่วนปลายยอดที่เลี้ยงในอาหารสูตรอื่นๆ ไม่แตกยอด และไม่พบการแตกยอดใหม่ในอาหารทุกสูตร เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน ในอาหารสูตร MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L ต้นเริ่มซีดช้ำ และในอาหาร 1/4MS + Sucrose 15 g/L ต้นอ่อนขนาดเล็กยังมีสีเขียวอยู่ (ตารางที่ 3) (ภาพที่ 3)

1.4 กล้วยไข่ เก็บรักษาปลายยอดกล้วยไข่เป็นเวลา 3 เดือน MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L, 1/2MS + Sucrose 15 g/L, 1/2MS + Sucrose 7.5 g/L และ 1/4MS + Sucrose 15 g/L ปลายยอดเจริญเป็นต้นอ่อน และในสูตรอาหาร 1/2MS + non-sucrose, 1/4MS + Sucrose 7.5 g/L ปลายยอดไม่เจริญยอดอ่อน เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 6 และ 9 เดือน ในสูตรอาหาร MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L และ 1/2MS + Sucrose 15 g/L ต้นอ่อนเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองบ้าง ส่วนในสูตรอาหาร 1/4MS + Sucrose 15 g/L ต้นอ่อนเริ่มมีสีเขียวซีด มีการแตกยอดใหม่เล็กน้อยในอาหารทั้ง 3 สูตร เมื่อทดลองเก็บรักษาต่อไปเป็นเวลา 12 เดือน ต้นอ่อนในอาหารสูตร MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L และ 1/2MS + Sucrose 15 และ 1/4MS + Sucrose 15 g/L ยังสามารถเจริญอยู่ได้แต่ใบเริ่มมีสีซีดลง (ตารางที่ 4) (ภาพที่ 4)

1.5 กล้วยเล็บมือนาง การเก็บรักษาปลายยอดกล้วยเล็บมือนางเป็นเวลา 3 เดือน ในอาหารสูตร MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L เจริญเป็นต้นอ่อนได้ดีและเริ่มแตกยอดใหม่เล็กๆ ในอาหารสูตร 1/2MS + Sucrose 15 g/L, 1/2MS + Sucrose 7.5 g/L และ 1/4MS + Sucrose 15 g/L ปลายยอดเจริญเป็นต้นอ่อนดี ในอาหารสูตร 1/2MS + Sucrose 15 g/L พบการแตกยอดใหม่ ส่วนในอาหารสูตร 1/2MS + non-sucrose, 1/4MS + Sucrose 7.5 g/L ปลายยอดไม่เจริญเป็นต้นอ่อน ในระยะการเก็บรักษา 6 และ 9 เดือน กล้วยเล็บมือนางที่เลี้ยงในสูตร MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L, 1/2MS + Sucrose 15 g/L, 1/2MS + Sucrose 7.5 g/L และ 1/4MS + Sucrose 15 g/L ต้นอ่อนเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ส่วนในอาหารสูตร 1/2MS + non-sucrose, 1/4MS +

Sucrose 7.5 g/L ปลายยอดไม่แตกยอดอ่อนและเริ่มเปลี่ยนเป็นสีดำ ไม่สามารถเจริญอยู่ได้ถึง 12 เดือน (ตารางที่ 5) (ภาพที่ 5)

1.6 กล้วยตานี ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือน ปลายยอดอ่อนไม่แตกยอดอ่อนในอาหารทุกสูตร แต่ยังมีสีเขียวอยู่ เมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 6 และ 9 เดือน พบว่าปลายยอดที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L, 1/2MS + Sucrose 15 g/L, 1/2MS + Sucrose 7.5 g/L และ 1/4MS + Sucrose 15 g/L ยังมียอดเป็นสีเขียวอยู่แต่ไม่แตกเป็นต้นอ่อน ส่วนในอาหารสูตร 1/2MS + non-sucrose และ 1/4MS + Sucrose 7.5 g/L ปลายยอดเปลี่ยนเป็นสีดำ เมื่อทดลองเก็บต่อไปเป็นเวลา 12 เดือน ปลายยอดกล้วยสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสูตรอาหาร 1/4MS + Sucrose 15 g/L (ตารางที่ 6) (ภาพที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองจากสูตรอาหาร (ตารางที่ 1-6) การใช้อาหารสูตร MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L สามารถใช้ในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยได้ทุกพันธุ์เป็นเวลาอย่างน้อย 9-12 เดือน โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหารใหม่ ความสูงเฉลี่ยของต้นอ่อนประมาณ 7 ซม. พบว่าในกล้วยหอมทอง กล้วยน้ำว้า กล้วยไข่ และกล้วยเล็บมือนาง มีการแตกยอดใหม่เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 1-2 ยอด และกล้วยหอมทอง กล้วยน้ำว้า กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง และกล้วยไข่ เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน มีอัตราการอยู่รอดโดยเนื้อเยื่อยังคงมีสีเขียว 90, 90, 80 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กล้วยเล็บมือนางและกล้วยตานี เก็บรักษาได้เป็นเวลา 9 เดือน เนื้อเยื่อยังคงมีสีเขียว 60 ละ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สูตรอาหาร 1/2MS + Sucrose 15 g/L สามารถใช้ในการเก็บเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยหอมทองและกล้วยไข่ เป็นเวลาอย่างน้อย 9-12 เดือน โดยไม่เปลี่ยนอาหาร โดยมีความสูงเฉลี่ยของต้นประมาณ 4-5 ซม. แตกยอดใหม่ได้ดี และมีเนื้อเยื่อที่ยังคงมีสีเขียว 90 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เก็บรักษาปลายยอดกล้วยน้ำว้า กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง กล้วยเล็บมือนาง และกล้วยตานี เป็นเวลา 9 เดือน โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหาร โดยเนื้อเยื่อที่ยังคงมีสีเขียว 80, 60, 100 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กล้วยน้ำว้าและกล้วยเล็บมือนาง มีความสูงเฉลี่ย 2.25 และ 6 ซม. ตามลำดับ มีการแตกยอดใหม่ได้ดี ส่วนในกล้วยน้ำว้ามะลิอ่องและกล้วยตานี ปลายยอดไม่เจริญเป็นต้นอ่อน

สูตรอาหาร 1/2MS + Sucrose 7.5 g/L สามารถใช้เก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยหอมทอง เป็นเวลา 12 เดือน โดยไม่เปลี่ยนอาหาร มีความสูงเฉลี่ย 2.5 ซม. แตกยอดใหม่ได้ดี โดยเนื้อเยื่อยังคงมีสีเขียว 80 เปอร์เซ็นต์ กล้วยน้ำว้า กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง กล้วยไข่ กล้วยเล็บมือนาง และกล้วยตานี สามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลา 9 เดือน เนื้อเยื่อที่ยังคงมีสีเขียว 60, 70, 50, 90 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยในกล้วยน้ำว้าและกล้วยเล็บมือนาง มีความสูงเฉลี่ย 5 และ 7.8 ซม.

ห้องสมุด กรมวิชาการเกษตร

ตามลำดับ แตกยอดใหม่ได้ดี กล้วยไข่ ไม่มีจำนวนยอดเกิดขึ้นใหม่ กล้วยน้ำว้ามะลิอ่องและกล้วยตานี ไม่เจริญเป็นต้นอ่อน

สูตรอาหาร 1/4MS + Sucrose 15 g/L กล้วยหอมทอง กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง และกล้วยไข่ สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนและเจริญอยู่ได้เป็นเวลา 9-12 เดือน โดยไม่เปลี่ยนอาหาร โดยเนื้อเยื่อยังคงมีสีเขียว 80, 90, และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่ากล้วยหอมทองและกล้วยไข่ มีจำนวนยอดใหม่เพิ่มขึ้น กล้วยน้ำว้าและกล้วยตานี ปลายยอดไม่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อน แต่เก็บรักษาได้นาน 9-12 เดือน โดยเนื้อเยื่อยังคงมีสีเขียวอยู่ 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกล้วยเล็บมือนางเก็บได้เพียง 9 เดือน ปลายยอดไม่เจริญเป็นต้นอ่อน และเนื้อเยื่อยังคงเป็นสีเขียว 80 เปอร์เซ็นต์

สูตรอาหาร 1/4MS + Sucrose 7.5 g/L สามารถใช้เก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วย กล้วยหอมทอง กล้วยน้ำว้า กล้วยน้าว้ามะลิอ่อง กล้วยไข่ และกล้วยเล็บมือนาง ได้เป็นเวลา 9 เดือน โดยที่เนื้อเยื่อปลายยอดไม่เจริญเป็นต้นอ่อน และเนื้อเยื่อยังคงมีสีเขียว 80, 50, 70, 70 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และกล้วยตานี สามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดที่ไม่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อน ได้เพียง 3-6 เดือน

สำหรับสูตรอาหาร 1/2MS + non-sucrose ให้ผลคล้ายกับสูตรอาหาร 1/4MS + Sucrose 7.5 g/L คือ สามารถใช้เก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วย กล้วยหอมทอง กล้วยน้ำว้า กล้วยน้าว้ามะลิอ่อง กล้วยไข่ และกล้วยเล็บมือนาง ได้เป็นเวลา 9 เดือน โดยที่เนื้อเยื่อปลายยอดไม่เจริญเป็นต้นอ่อน และเนื้อเยื่อยังคงมีสีเขียว 60, 50, 40, 40 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในกล้วยตานีสามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดที่ไม่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อน ได้ประมาณ 3-6 เดือน

จากผลการทดลองการเก็บรักษาพันธุ์กล้วยปลูกต่างๆ ในอาหารทั้ง 6 สูตร จะเห็นได้ว่าสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส จะยืดอายุการเจริญของปลายยอดและต้นอ่อนได้ดี กว่าที่อนุรักษ์ในสูตรอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส หรือมีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่น้อยกว่า โดยพบว่าการเติมน้ำตาล 7.5 กรัมต่อลิตรในอาหารอนุรักษ์ไม่พอเพียงต่อการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อกล้วยทั้ง 6 พันธุ์ เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน เนื่องจาก ซูโครส เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก สามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ดี ทำให้เซลล์รับสารอาหารได้มากขึ้น เป็นแหล่งคาร์บอนให้เซลล์ไปใช้สร้างผนังเซลล์หรือไปเปลี่ยนขนาดของเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์มีความยืดหยุ่นมากขึ้น ป้องกันการดึงน้ำออกจากเซลล์ และช่วยรักษาแรงดันออสโมซิส ทำให้ต้นพืชแข็งแรงขึ้น สามารถทนต่อความเครียด (stress) ต่างๆ นอกจากนี้ยังเป็นสารอาหารที่ให้พลังงาน ทำให้เซลล์สามารถนำพลังงานไปใช้ผลักดันขบวนการเมตาโบลิซึมต่างๆ ในเซลล์ได้ ทำให้เนื้อเยื่ออยู่ในสภาพที่ดี และการลดปริมาณสารอาหาร หรือการจำกัดอาหารโดยลดน้ำตาลร่วมกับการลดเกลือแร่สามารถชะลอการเจริญเติบโตของพืชได้ ทำให้พืชสามารถเก็บได้ในระยะปานกลาง และอาหารที่ใช้ในการชะลอการเจริญเติบโตอาจลดความเข้มข้นลงเหลือเพียงครึ่งหรือหนึ่งในสี่ ก็สามารถทำให้พืชเจริญเติบโตช้าลงได้ทั้งนี้

ขึ้นกับชนิดของพืช (รังสฤษฎ์, 2545) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ สุจิตรา (2541) ที่รายงานว่าในกล้วย Abaca ที่นำมาเลี้ยงในอาหาร 1/2 MS สามารถยืดอายุการย้ายเนื้อเยื่อ (subculture) หนึ่งปีและการเติมน้ำตาลซูโครสในอาหารสูตร 1/2 MS ทำให้อัตราการรอดชีวิตของกล้วย Abaca สูงกว่าในสูตร 1/2 MS ที่ไม่เติมน้ำตาล โดยการเติมน้ำตาลซูโครส 15 และ 30 กรัมต่อลิตร มีผลของอัตราการรอดชีวิต 60 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานของ อรดี (2541) ซึ่งรวบรวมพันธุ์กล้วยโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเก็บในหลอดทดลองที่มีฝาปิด ขนาด 2.5x10 ซม. บรรจุอาหาร MS+ น้ำมะพร้าว 15%+ BA 5 mg/L หลอดละ 10 ซีซี ในห้องอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน สามารถอยู่รอดได้ 1 ปี ไม่ต้องเปลี่ยนอาหารและไม่ต้องใช้สารชะลอการเจริญเติบโต และการเก็บรักษาในขวดทดลองขนาดเล็กเป็นการจำกัดอากาศ โดยสัดส่วนออกซิเจนมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต คือ อัตราการเจริญเติบโตของต้นพืชจะลดลงเมื่ออัตราส่วนของออกซิเจนต่ำกว่า 50 มิลลิเมตรของปรอท และพบว่าไม่มีผลต่อการเจริญและลักษณะของพืชหลังย้ายออกปลูกในธรรมชาติ (Dodds, 1991)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 ความสูงเฉลี่ย จำนวนยอดใหม่ ความสูงเฉลี่ยยอดใหม่ และเนื้อเยื่อที่ยังคงมีสีเขียวของกล้วยหอมทองเมื่อทำการเก็บรักษาในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 3, 6, 9 และ 12 เดือน

สูตรอาหาร	ความสูงเฉลี่ย (ซม.)				จำนวนยอดใหม่				ความสูงเฉลี่ยยอดใหม่ (ซม.)				เนื้อเยื่อที่ยังคงมีสีเขียว (%)			
	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน
MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L	4	6	7.17	4.8	1.5	1.25	1.25	1.5	3	3.17	3.13	2.5	100	100	100	90
1/2MS + Sucrose 15 g/L	5	6.13	7.83	4.38	1.66	3.25	4.33	4.25	3.2	3.86	3.83	3.2	100	100	100	90
1/2MS + Sucrose 7.5 g/L	4.33	4.4	6	2.5	1	2	3	4	2	3.25	4.25	3	100	100	80	80
1/2MS + non- sucrose	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	60	-
1/4MS + Sucrose 15 g/L	2	4	6.5	7	-	1	2	-	-	2	2	-	100	100	80	80
1/4MS + Sucrose 7.5 g/L	1.33	1.83	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	80	-

* ยังไม่งอกยอดหรือต้นอ่อน แต่ยังมีสีเขียวอยู่

ตารางที่ 2 ความสูงเฉลี่ย จำนวนยอดใหม่ ความสูงเฉลี่ยยอดใหม่ และเนื้อเยื่อที่ยังคงมีสีเขียวของกล้วยน้ำว้าเมื่อทำการเก็บรักษาในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 3, 6, 9 และ 12 เดือน

สูตรอาหาร	ความสูงเฉลี่ย (ซม.)				จำนวนยอดใหม่				ความสูงเฉลี่ยยอดใหม่ (ซม.)				เนื้อเยื่อที่ยังคงมีสีเขียว (%)			
	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน
MS+ BA 5 mg/L+ Sucrose 30 g/L	*	5.67	8	7	-	1	1	1	-	2	2	-	100	100	90	90
1/2MS + Sucrose 15 g/L	1.5	2	2.25	-	-	2	3	-	-	1	2	-	100	100	80	-
1/2MS + Sucrose 7.5 g/L	*	4	5	-	-	1	1	-	-	0.5	4	-	100	100	60	-
1/2MS + non- sucrose	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	50	-
1/4MS + Sucrose 15 g/L	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	70	60
1/4MS + Sucrose 7.5 g/L	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	50	-

* ยังไม่งอกยอดหรือต้นอ่อน แต่ยังมีสีเขียวอยู่

ตารางที่ 3 ความสูงเฉลี่ย จำนวนยอดใหม่ ความสูงเฉลี่ยยอดใหม่ และเนื้อเยื่อที่ยังคงมีสีเขียวของกล้วยน้ำว้ามะลิอ่องเมื่อทำการเก็บรักษาในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 3, 6, 9 และ 12 เดือน

สูตรอาหาร	ความสูงเฉลี่ย (ซม.)				จำนวนยอดใหม่				ความสูงเฉลี่ยยอดใหม่ (ซม.)				เนื้อเยื่อที่ยังคงมีสีเขียว (%)			
	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน
MS+ BA 5 mg/L+ Sucrose 30 g/L	*	3.17	6.83	7	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	80	80
1/2MS + Sucrose 15 g/L	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	60	-
1/2MS + Sucrose 7.5 g/L	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	70	-
1/2MS + non- sucrose	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	40	-
1/4MS + Sucrose 15 g/L	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	90	90
1/4MS + Sucrose 7.5 g/L	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	70	-

* ยังไม่งอกยอดหรือต้นอ่อน แต่ยังมีสีเขียวอยู่

ตารางที่ 4 ความสูงเฉลี่ย จำนวนยอดใหม่ ความสูงเฉลี่ยยอดใหม่ และเนื้อเยื่อที่ยังคงมีสีเขียวของกล้วยไข่เมื่อทำการเก็บรักษาในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 3, 6, 9 และ 12 เดือน

สูตรอาหาร	ความสูงเฉลี่ย (ซม.)				จำนวนยอดใหม่				ความสูงเฉลี่ยยอดใหม่ (ซม.)				เนื้อเยื่อที่ยังคงมีสีเขียว (%)			
	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน
MS+ BA 5 mg/L+ Sucrose 30 g/L	6	3.66	5	7	-	1	1	1	-	0.5	1	1.5	100	100	70	60
1/2MS + Sucrose 15 g/L	3	2.64	3.5	4.75	1	1	1	-	1	0.5	0.5	-	100	100	100	50
1/2MS + Sucrose 7.5 g/L	2.5	1	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	50	-
1/2MS + non- sucrose	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	40	-
1/4MS + Sucrose 15 g/L	1.9	2.1	2.88	2.5	-	1	1	2	-	0.5	0.5	0.5	100	100	100	90
1/4MS + Sucrose 7.5 g/L	*	*	1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	70	-

* ยังไม่งอกยอดหรือต้นอ่อน แต่ยังมีสีเขียวอยู่

ตารางที่ 5 ความสูงเฉลี่ย จำนวนยอดใหม่ ความสูงเฉลี่ยยอดใหม่ และเนื้อเยื่อที่ยังคงมีสีเขียวของกล้วยเล็บมือนางเมื่อทำการเก็บรักษาในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 3, 6, 9 และ 12 เดือน

สูตรอาหาร	ความสูงเฉลี่ย (ซม.)				จำนวนยอดใหม่				ความสูงเฉลี่ยยอดใหม่ (ซม.)				เนื้อเยื่อที่ยังคงมีสีเขียว (%)			
	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน
MS+ BA 5 mg/L+ Sucrose 30 g/L	5.57	6.88	7.5	-	-	1	1	-	-	3	3	-	100	100	60	-
1/2MS + Sucrose 15 g/L	3.4	4.5	6	-	2	4	7	-	1.75	2.6	3.5	-	100	100	100	-
1/2MS + Sucrose 7.5 g/L	2.33	6.29	7.8	-	-	2.5	3	-	-	4	4	-	100	100	90	-
1/2MS + non- sucrose	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	40	-
1/4MS + Sucrose 15 g/L	4	4.25	3.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	80	-
1/4MS + Sucrose 7.5 g/L	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	40	-

* ยังไม่งอกยอดหรือต้นอ่อน แต่ยังมีสีเขียวอยู่

ตารางที่ 6 ความสูงเฉลี่ย จำนวนยอดใหม่ ความสูงเฉลี่ยยอดใหม่ และเนื้อเยื่อที่ยังคงมีสีเขียวของกล้วยตานีเมื่อทำการเก็บรักษาในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 3, 6, 9 และ 12 เดือน

สูตรอาหาร	ความสูงเฉลี่ย (ซม.)				จำนวนยอดใหม่				ความสูงเฉลี่ยยอดใหม่ (ซม.)				เนื้อเยื่อที่ยังคงมีสีเขียว (%)			
	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน
MS+ BA 5 mg/L+ Sucrose 30 g/L	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	70	-
1/2MS + Sucrose 15 g/L	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	90	-
1/2MS + Sucrose 7.5 g/L	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	60	-
1/2MS + non- sucrose	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	-	-
1/4MS + Sucrose 15 g/L	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	60	60
1/4MS + Sucrose 7.5 g/L	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	-	-

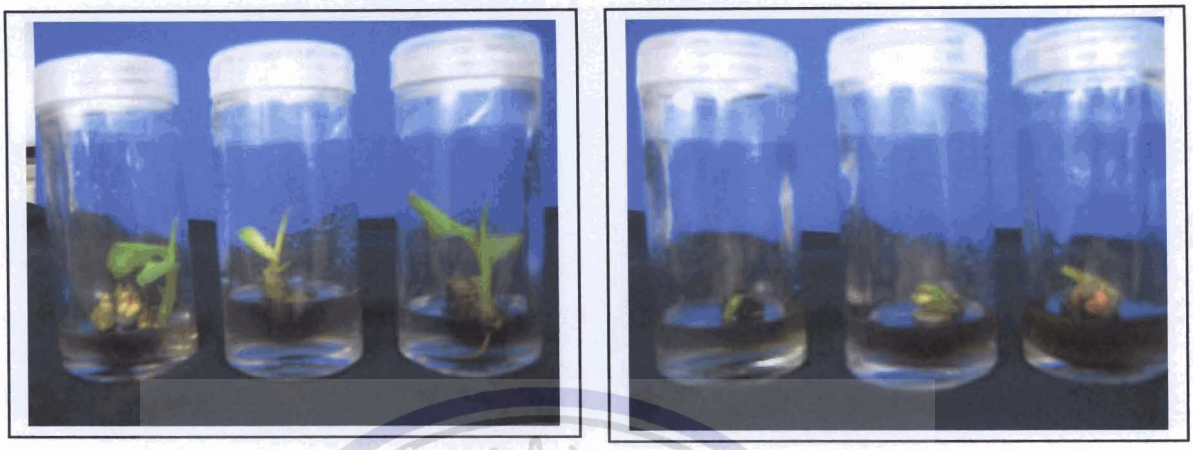
* ยังไม่งอกยอดหรือต้นอ่อน แต่ยังมีสีเขียวอยู่

ภาพที่ 1 เนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยหอมทองที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 5 mg/L + Sucrose 30 g/L , 1/2MS + Sucrose 7.5 g/L, 1/2MS + Sucrose 15 g/L, 1/2MS + non-sucrose, 1/4MS + Sucrose 7.5 g/L และ 1/4MS + Sucrose 15 g/L ตามลำดับ เป็นเวลา 3 เดือน

ภาพที่ 2 เนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยน้ำว้าที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 5 mg/L+ Sucrose 30 g/L , 1/2MS + Sucrose 7.5 g/L, 1/2MS + Sucrose 15 g/L, 1/2MS + non-sucrose , 1/4MS + Sucrose 7.5 g/L และ 1/4MS + Sucrose 15 g/L ตามลำดับ เป็นเวลา 3 เดือน

ภาพที่ 3 เนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยมะลิอ่องที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 5 mg/L+ Sucrose 30 g/L , 1/2MS + Sucrose 7.5 g/L, 1/2MS + Sucrose 15 g/L, 1/2MS + non-sucrose , 1/4MS + Sucrose 7.5 g/L และ 1/4MS + Sucrose 15 g/L ตามลำดับ เป็นเวลา 3 เดือน

ภาพที่ 4 เนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยไข่ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 5 mg/L+ Sucrose 30 g/L , 1/2MS + Sucrose 7.5 g/L, 1/2MS + Sucrose 15 g/L, 1/2MS + non-sucrose , 1/4MS + Sucrose 7.5 g/L และ 1/4MS + Sucrose 15 g/L ตามลำดับ เป็นเวลา 3 เดือน



ภาพที่ 5 เนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยเล็บมือนางที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 5 mg/L+ Sucrose 30 g/L , 1/2MS + Sucrose 7.5 g/L, 1/2MS + Sucrose 15 g/L, 1/2MS + non-sucrose , 1/4MS + Sucrose 7.5 g/L และ 1/4MS + Sucrose 15 g/L ตามลำดับ เป็นเวลา 3 เดือน

ภาพที่ 6 เนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยตานีที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 5 mg/L+ Sucrose 30 g/L , 1/2MS + Sucrose 7.5 g/L, 1/2MS + Sucrose 15 g/L, 1/2MS + non-sucrose , 1/4MS + Sucrose 7.5 g/L และ 1/4MS + Sucrose 15 g/L ตามลำดับ เป็นเวลา 3 เดือน

การทดลองที่ 2 การทดลองเก็บเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยในสภาพเย็นยิ่งยวด (Cryopreservation)

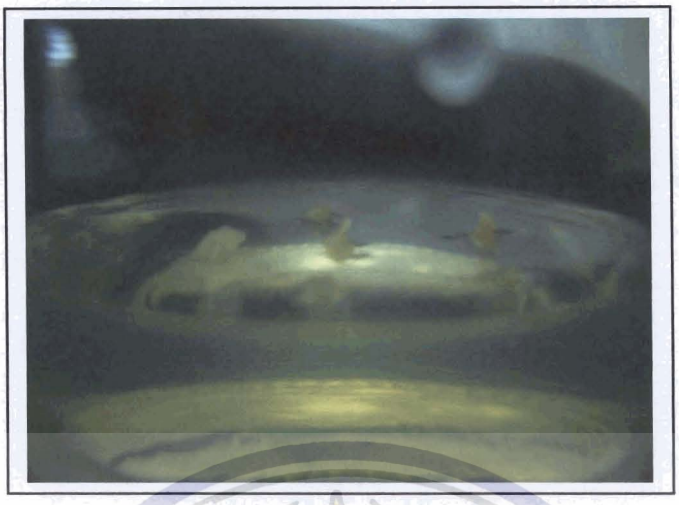
จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยหอมทอง ในอาหารปรับสภาพเนื้อเยื่อก่อนทำการทดลอง (Preculture) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.3 โมล, 0.5 โมล, 0.7 โมล และ ไม่ได้เติมน้ำตาลซูโครส เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงนำมาทดลองเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำมาก โดยวิธี Vitrification และวิธี Encapsulation-Vitrification ด้วยการห่อหุ้มเนื้อเยื่อด้วย Na-alginate พบว่า เนื้อเยื่อปลายยอดที่เก็บรักษาโดยวิธี Vitrification หลังจากนำออกจากการเก็บในไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส มีสีเขียวซีดลงหรือเป็นสีขาว และเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหาร MS สูตรปกติ เนื้อเยื่อปลายยอดดังกล่าวจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและกลายเป็นสีดำในที่สุด ไม่สามารถรอดชีวิตได้ (ภาพที่ 7) โดยให้ผลการทดลองเหมือนกับการทดลองเก็บรักษาโดยวิธี Encapsulation-Vitrification (ตารางที่ 7) ซึ่งถึงแม้ว่าจะมีการห่อหุ้มเนื้อเยื่อปลายยอดด้วย Na-alginate ที่ช่วยป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อได้รับอันตราย (ภาพที่ 8) ซึ่งสอดคล้องกับการเก็บเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยในไนโตรเจนเหลว โดยวิธีการผึ่งให้แห้ง (air dry), วิธี Vitrification และ Encapsulation-dehydration ปลายยอดอ้อยไม่สามารถอยู่รอดหลังผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว (น้องนุช, 2542) แต่ในการทดลองของ สุจิตรา (2541) ซึ่งทดลองเก็บรักษาด้วย 2 วิธี ดังกล่าวข้างต้น ในกล้วย Abaca รายงานว่า การเก็บรักษาโดยวิธี Encapsulation-Vitrification มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมากกว่า วิธี Vitrification หลังจากย้ายเนื้อเยื่อมาเลี้ยงในอาหาร MS สูตรปกติ เป็นเวลา 30 วัน และพบว่าการเก็บโดยวิธี Encapsulation-dehydration มีความสะดวกในการปฏิบัติงานมากกว่า

จากผลการทดลองที่ยังไม่ประสบผลสำเร็จนั้น พบว่ามีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้อง ซึ่งปัจจัยที่จะทำให้เกิดความสำเร็จ ได้แก่ ธรรมชาติและสรีระวิทยาของเนื้อเยื่อก่อนทำการเก็บ โดยอายุของเนื้อเยื่อที่อ่อนจะให้ผลดีกว่า พืชที่เจริญในเขตหนาวจะมีความสำเร็จในการเก็บในอุณหภูมิต่ำมากกว่า ลักษณะของพืชที่อวบน้ำ เนื้อเยื่อจะเกิดความเสียหายได้มากกว่าในขั้นตอนของการเก็บรักษา เนื่องจากน้ำในเซลล์จะเปลี่ยนเป็นผลึกน้ำแข็ง ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ในขั้นตอนของการเตรียมเนื้อเยื่อ (preculture) การเติมน้ำตาลซูโครสในอาหาร preculture มีผลทำให้ปริมาณน้ำในเซลล์ลดลง โดยหากความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมากขึ้น น้ำภายในเซลล์ก็จะยิ่งลดลง และขนาดของเนื้อเยื่อก็มีผลเช่นกัน ในการตัดเนื้อเยื่อปลายยอดขนาดเล็กต้องมีความชำนาญ เพื่อให้ได้เนื้อเยื่อที่มีขนาดที่เหมาะสมและมีคุณภาพดี อาจต้องทำการตัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีรายงานว่าในการตัดเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยให้มีขนาด 0.8-1 มิลลิเมตร นั้น สำหรับผู้ปฏิบัติที่มีความชำนาญจะสามารถตัดเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยได้ 6-8 ชิ้นต่อชั่วโมง (Panis และ Nguyen, 2001) ในขั้นตอนของการทำ dehydration หรือการดึงน้ำออกจากเซลล์ ชนิดของสาร cryoprotectant ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการดึงน้ำออกจากเซลล์มีความสำคัญ โดยถ้าใช้ชนิดของ cryoproectant และความเข้มข้นที่เหมาะสม จะเป็นตัวช่วยป้องกันอันตรายจากการตกผลึกของน้ำแข็ง ป้องกันความเสียหาย

ที่จะเกิดกับ cell membrane และต้องคำนึงถึงความสามารถในการซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อของสาร การป้องกันบาดแผลที่เกิดจากแรงดันออสโมติคมากเกินไปตลอดจนความเป็นพิษของสารเคมี (Rall, 1987) เช่น PVS2 ซึ่งเป็น cryoprotectant ที่นิยมใช้นั้น สุจิตรา (2541) กล่าวว่า PVS2 ที่ซึมเขาสู่เซลล์เนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยในปริมาณที่ไม่เหมาะสมอาจใช้เวลาน้อยเกินไป จึงทำให้สารไม่สามารถปกป้องเซลล์ให้ทนทานต่อการเก็บในอุณหภูมิต่ำมากๆ ได้ หรืออาจใช้เวลามากเกินไปจนมีผลทำให้เกิดพิษต่อเนื้อเยื่อและตายก่อนที่จะเก็บในไนโตรเจนเหลว นอกจากนี้ยังมีขั้นตอนของการนำเนื้อเยื่อออกสู่อุณหภูมิปกติที่เป็นปัจจัยแห่งความสำเร็จในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อในอุณหภูมิต่ำมากๆ อีกประการหนึ่ง

ตารางที่ 7 การรอดชีวิตของเนื้อเยื่อปลายยอด ที่ทำการ Preculture ในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 0.3M, 0.5M, 0.7M และไม่เติมน้ำตาลซูโครส และเก็บรักษาโดยวิธี Vitrification และ Encapsulation-Vitrification

ความเข้มข้นของ Sucrose	อัตราการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อปลายยอด	
	Vitrification	encapsulation-Vitrification
Non-sucrose	0	0
0.3 M	0	0
0.5 M	0	0
0.7 M	0	0
ลักษณะเนื้อเยื่อ	หลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว เนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีขาวเมื่อนำลงเลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติ และจะเปลี่ยนเป็นสีดำในเวลาต่อมา	เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในเม็ด bead และเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติ



ภาพที่ 7 เนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยที่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี Vitrification

ภาพที่ 8 เนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยที่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-Vitrification

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและแนะนำ

การทดลองย่อยที่1 การเก็บรักษาพันธุกรรมกล้วยแบบชะลอการเจริญเติบโต (slow growth) ในสูตรอาหารต่างๆ พบว่า ต้นกล้วยทุกพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารสูตร MS+BA 5mg/L+Sucrose 30 mg/L เป็นเวลา 9-12 เดือน และเมื่อลดความเข้มข้นสารอาหารลง (1/2 MS และ 1/4 MS) ต้นกล้วยสามารถเจริญได้ในอาหาร 1/2MS+Sucrose 15 g/L และ 1/4MS+Sucrose 15 g/L โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหาร โดยเฉพาะอาหารสูตร 1/4MS+Sucrose 15 g/L ควรนำมาใช้ในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วย เนื่องจากประหยัดสารอาหารลงได้ 1/4 ของความเข้มข้นเดิม สามารถชะลอการเจริญเติบโตได้ดี และพร้อมที่จะนำออกไปขยายพันธุ์ได้เมื่อต้องการ นอกจากนี้ กล้วยหอมทอง กล้วยน้ำว้า กล้วยเล็บมือนาง และกล้วยตานี ยังสามารถเจริญได้ในอาหาร 1/2MS+Sucrose 7.5 g/L อีกด้วย แต่ในสูตรอาหารที่มีการลดสารอาหารลงควรเปลี่ยนอาหารเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลา 9 เดือน ต้นจะแข็งแรงกว่า และการลดปริมาณสารอาหารลง นอกจากจะเป็นการช่วยชะลอการเจริญเติบโตแล้ว ยังช่วยลดงบประมาณ เวลา และแรงงานในการย้ายเนื้อเยื่ออีกด้วย สำหรับในปลายยอดกล้วยที่ไม่แตกเป็นต้นอ่อนแต่สามารถเก็บในระยะเวลา 9-12 เดือน นั้นต้องศึกษาถึงสูตรอาหารในการชักนำให้เกิดต้นอ่อนต่อไปหรือเลี้ยงในสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นอ่อนก่อนที่จะอนุรักษ์ในสูตรอาหารชะลอการเจริญเติบโต

การเก็บรักษาแบบชะลอการเจริญเติบโต (slow growth) โดยการจำกัดปริมาณสารอาหารนี้ อาจทำการศึกษาเพิ่มเติม ในการชักนำให้เกิดรากและนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ รวมทั้งทดลองศึกษาการเก็บพันธุกรรมกล้วยป่าและกล้วยประดับในประเทศไทย และสามารถนำไปใช้ในการรวบรวมสายพันธุ์กล้วยที่กรมวิชาการเกษตรเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในแปลงปลูก มาอนุรักษ์ไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช ควบคู่กับการศึกษาการทดลองเก็บรักษาแบบอุณหภูมิต่ำมากๆ ซึ่งหากประสบความสำเร็จก็จะใช้การเก็บโดยวิธีดังกล่าวต่อไป

การทดลองย่อยที่2 การเก็บรักษาเนื้อเยื่อกล้วยในสภาพเย็นยิ่งยวด (Cryopreservation) เนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยหอมทอง นำมาปรับสภาพเนื้อเยื่อในอาหาร preculture ได้แก่ MS+0.3M sucrose, MS+0.5M sucrose, MS+0.7M sucrose และ MS+non-sucrose ทดลองเก็บในอุณหภูมิต่ำมากๆ โดยวิธี Vitrification และ Encapsulation-Vitrification พบว่าปลายยอดกล้วยไม่สามารถอยู่รอดได้หลังจากเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (- 196 องศาเซลเซียส) จึงต้องมีการศึกษาปรับเปลี่ยนเทคนิคของขั้นตอนในการเก็บรักษา อาทิ ขั้นตอนการ Preculture ขั้นตอนในการ Dehydration การศึกษาชนิดของ Cryoprotectant และระยะเวลาในการซึมเข้าสู่เซลล์ของ Cryoprotectant ตลอดจนการนำเนื้อเยื่อในรูปแบบของ Cell Suspension (การทำเซลล์แขวนลอย) Embryogenic callus ทดลองเก็บรักษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

เฉลิมศักดิ์ บุญทวี. 2548. กล้วยจัดสวน. สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ. 206 หน้า

น้องนุช พจน์ชัยกุล. 2542. การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมอ้อยในหลอดทดลอง.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 88 หน้า

เบญจมาศ ศิลาย้อย. 2545. กล้วย. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 357 หน้า

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 196 หน้า

ไพโรจน์ สุวรรณจินดา และจรัญ ดิษฐ์ไชยวงศ์. 2548. เรื่อง กล้วย กล้วย ใน นสพ.กสิกร ปีที่ 78 ฉบับที่ 6 หน้า 33-42

มณฑา วงศ์มณีโรจน์. 2540. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ. น. 31-39 *ใน* เอกสารประกอบการอบรมทางวิชาการ เรื่อง เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขั้นสูง. ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , กรุงเทพฯ. 84 หน้า.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2545. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช:หลักการและเทคนิค.สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 219 หน้า

วิจิตร วังใน. 2530.กล้วย. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 339 น. (อัดสำเนา)

สุจิตรา โพธิ์ปาน. 2541.การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมกล้วย Abaca (*Musa textilis Nee.*) ในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 84 หน้า

อรดี สหวัชรินทร์. 2541. การอนุรักษ์และขยายพันธุ์กล้วยที่มีความสำคัญต่อวัฒนธรรมและประเพณีไทย . การอนุรักษ์และพัฒนาพรรณพืชทางศิลปวัฒนธรรมไทย, สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 66-93 น.

Dodds, J.H. 1991. *In vitro* Methods for Conservation of Plant Genetic Resources. Chapman and Hall Publishers, London. 247 p.

Kirdmanee C. and K. Supaibulwatana. 2000. Current status and future perspective of cryopreservation in Thailand. *In* F. Engelmann and H. Takagi (ed.). pp. 297-298.

Masumoto, T., A. Sakai, C. Takahashi and K. Yamada. 1995. Cryopreservation of *In vitro* grown apical meristem of wasabi (*Wasabi japonica*) by encapsulation-vitrification method. Cryo-Letters 16:189-196

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-497

Panis B., Nguyen Tien Thinh. 2001. Cryopreservation of Musa germplasm. INIBAP Technical Guideline5 (J.V. Escalant and S. Sharrock, eds.). International Net work for the Improvement of Banana and Plantain. 44 pp.

Rall, W.F. 1987. Factor affecting the survival of mouse embryo cryopreserved by vitrification. Cryobiology. 24: 367-402

Sakai, A., S. Kobayashi and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of novel orange (Citrus Sinensis Osb. Var. brasilrensis Tanaka) by Vitrification. Plant Cell Rep. 9: 30-33.

Wilkin, C.P. and J.H. Dodds. 1983. Tissue culture conservation of woody species. *In* J.H. Dodds (ed.) .Tissue culture of trees. The AVI Publishing Company, Westport, Connecticus. pp. 113-136.

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก

กรมวิชาการเกษตร

สูตรอาหาร MS

องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์พื้นฐานสูตร MS

Macronutrient	**mg/L**
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2 . 2H_2O$	440
$MgSO_4 .7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Micronutrient	
H_3Bo_3	6.2
$MnSO_4 . 4H_2O$	22.3
KI	0.83
$ZnSO_4 . 7H_2O$	8.6
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0. 25
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.025
$CoCl_2 6H_2O$	0.025
Fe-EDTA	
$FeSO_4 . 7H_2O$	27.85
Na_2EDTA	37.25
Vitamin and organic	
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxin HCl	0.5
Thiamine HCl	0.1
Myo-inositol	100
Other	
Sucrose	30 g/L
pH 5.8	

ที่มา Murashige and Skoog (1962)

ผลงานลำดับที่ 2

การศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis*

กรมวิชาการเกษตร

ศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis*

Study on Technique of preservation of *Spathoglottis sp.*

กิ่งกาญจน์ พิชญกุล สมทรง โชติชื่น ปาริฉัตร สังข์สะอาด

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

กล้วยไม้เป็นพืชวงศ์ใหญ่มีมากชนิด สามารถแพร่กระจายได้ในสภาพพื้นที่ทั่วประเทศ กล้วยไม้ในสภาพธรรมชาติมีมากกว่า 25,000 ชนิด และมีไม่น้อยกว่า 1,000 ชนิดที่พบในประเทศไทย เพราะประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดที่สำคัญของกล้วยไม้ป่าเขตร้อน ปัจจุบันกล้วยไม้ไทยหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไปแล้ว และอีกหลาย ๆ ชนิดกำลังจะสูญพันธุ์ เนื่องจากป่าไม้ถูกทำลาย การนำกล้วยไม้ออกจากป่าและปลูกในสภาพที่ไม่เหมาะสม การลักลอบส่งกล้วยไม้ป่าไปยังต่างประเทศ จึงจำเป็นต้องอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ไว้ไม่ให้สูญพันธุ์ การอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ในสภาพหลอดทดลอง (*in vitro*) เป็นการอนุรักษ์นอกถิ่นเดิม (*ex situ*) ซึ่งจะเป็นแหล่งเก็บรักษาพันธุกรรมที่ใช้พื้นที่น้อยในการเก็บรักษา พืชที่เก็บรักษาจะปลอดจากโรค แมลง และไวรัส ภายใต้สภาวะการเก็บรักษา พืชไม่ต้องทำการแยกหรือตัด แต่ถ้าต้องการไปขยายพันธุ์ก็สามารถนำชิ้นส่วนพืชออกปลูกหรือแลกเปลี่ยนกับต่างประเทศได้เนื่องจากปลอดโรค จึงทำการศึกษาพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาหรืออนุรักษ์กล้วยไม้ให้เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ การศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis* เริ่มดำเนินการโดยรวบรวมต้นกล้วยไม้ดินสกุลนี้ 4 ชนิด คือ *S. pubescens* Lind l (เอื้องดินลาว) *S. affinis* de Vriese (เอื้องหัวข้าวเหนียว) *S. eburnea* Gagnep (บานดึก) และ *S. plicata* (ว่านจุก) แล้วทำการผสมเกสรด้วยการผสมตัวเองในดอกไม้สกุล *Spathoglottis* ทั้ง 4 ชนิด เมื่อเกิดฝัก (pod) นานประมาณ 1-2 เดือน ฝักแก่นำฝักมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW จนเกิดโปรโตคอม เพาะเลี้ยงโปรโตคอมจนได้ต้นอ่อน นำต้นอ่อนกล้วยไม้มาเพาะเลี้ยงในอาหารชะลอการเจริญเติบโต 2 ประเภท คือ (1) ศึกษาการลดปริมาณสารอาหารที่เพาะเลี้ยง คือ อนุรักษ์บนอาหาร 1/2 VW 1/3 VW และ 1/4 VW (2) ศึกษาการใช้สารยับยั้งออสโมซิสที่เติมในอาหาร คือ manitol ปริมาณ 15 และ 30 กรัมต่อลิตร ผลการทดลอง พบว่า กล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis* ทั้ง 4 ชนิด สามารถอนุรักษ์บนอาหารสูตร 1/4 VW ได้นาน 7-8 เดือน โดยไม่ต้อง subculture ใหม่ และการศึกษาการใช้สารยับยั้งออสโมซิส manitol 15 กรัมต่อลิตร พบว่า *S. pubescens* และ *S. eburnea* สามารถอนุรักษ์นาน

รหัสกิจกรรม 05024704

5 เดือน จึงจะ subculture *S. affinis* อนุรักษ์นาน 4 เดือน และ *S. plicata* อนุรักษ์ได้นาน 3 เดือน ส่วน manitol 30 กรัมต่อลิตร ทำให้ต้นกล้วยไม้ใบเหลือง ขอบใบไหม้และตายใน 1 เดือน ดังนั้น เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการอนุรักษ์ จึงควรเลือกวิธีการลดปริมาณสารอาหารพื้นฐานแล้วเติมชิ้นมันฝรั่งในอาหาร ทำให้สามารถอนุรักษ์ได้นานถึง 1 ปี โดยไม่ต้องทำการย้ายไปเลี้ยงบนอาหารใหม่

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกที่นิยมของคนทั่วโลก พบมากมายหลายประเภท มีการเจริญเติบโตในธรรมชาติที่แตกต่างกันเป็นอย่างมาก กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Subclass Monocotyledoneae) อยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Family Orchidaceae) ซึ่งเป็นวงศ์ใหญ่ที่สุดวงศ์หนึ่งของพืชมีดอก (Class Angiospermae) กล้วยไม้มีประมาณ 25,000 ชนิด (species) (Dressler, 1981. อ้างโดย ครรชิต, 2547) เจริญเติบโตได้ในทุกทวีปยกเว้นแอนตาร์กติก มีรูปแบบการเจริญเติบโตหลายแบบ เช่น เจริญเติบโตบนกิ่งไม้ พื้นหิน พื้นดิน และที่ชื้นแฉะ ความแตกต่างของชนิดกล้วยไม้จะพบมากในเขตร้อน (tropic) และมักเป็นกล้วยไม้อากาศ (epiphyte) ส่วนกล้วยไม้ที่อยู่ในเขตอบอุ่น (temperate) มักเป็นกล้วยไม้ดิน (terrestrial) กล้วยไม้มีขนาดต้นตั้งแต่ขนาดเล็กที่สุดที่สั้นกว่า 1 นิ้ว และให้ดอกมีขนาดเท่าหัวเข็มหมุดไปจนถึงขนาดใหญ่ที่สุด โดยมีลำต้นตั้งแต่ 5 ฟุต ไปจนถึง 10 ฟุต ให้ช่อดอกยาวถึง 15 ฟุต (Shuttleworth et al., 1970. อ้างโดย ครรชิต, 2547) รูปร่างดอกกล้วยไม้มีมากมายหลายแบบ สีของดอกพบแทบทุกสียกเว้นสีดำ และสารที่สกัดจากฝักกล้วยไม้สกุลวานิลลา (*Vanilla* spp.) ใช้ผสมในอาหารโดยเฉพาะของหวานที่มีกลิ่นหอมวานิลลาเป็นที่รู้จักกันแพร่หลาย

สำหรับประเทศไทยมีกล้วยไม้พันธุ์พื้นเมืองที่มีความสวยงามและหลากหลาย (สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม 6, 2542) เนื่องจากเป็นถิ่นกำเนิดของกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก โดยมีกล้วยไม้พื้นเมืองมากถึง 167 สกุล 1,140 ชนิด จากจำนวนกล้วยไม้ที่พบกันแล้วทั่วโลกมากกว่า 796 สกุล ประมาณ 19,000 ชนิด (ประมวล, 2546) กล้วยไม้ไทยสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มตามลักษณะการเจริญเติบโตได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

1. กลุ่มกล้วยไม้อิงอาศัย (epiphytic) คือกล้วยไม้ที่เกาะอาศัยอยู่บนต้นไม้อื่น ๆ โดยมีรากเกาะติดกับกิ่งไม้หรือลำต้น กล้วยไม้อากาศมีจำนวนประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ของกล้วยไม้ทั้งหมด กล้วยไม้อากาศที่ส่วนใหญ่ปลูกเป็นการค้า แยกได้เป็นกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตเป็นลำต้นเดี่ยวไม่มีการแตกกอ (monopodial) เช่น สกุลแวนด้า (*Vanda*) สกุลเข็ม (*Ascocentrum*) สกุลช้าง (*Rhynchostylis*) สกุลกุหลาบ (*Aerides*) สกุลฟาเลนอปซิส (*Phalaenopsis*) ฯลฯ กล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตเป็นกอ (sympodial) เช่น สกุลหวาย (*Dendrobium*) สกุลออนซิเดียน (*Oncidium*) กลุ่มแคทลียา (*Cattleya alliance.*)

2. กล้วยไม้ดิน (terrestrial) มีจำนวน 35 เปอร์เซ็นต์ พบขึ้นอยู่ตามพื้นดินที่ปกคลุมด้วยอินทรียวัตถุ ส่วนมากเป็นพวกที่มีหัวอยู่ใต้ดิน และเป็นพวกที่มีการพักตัวตลอดฤดูแล้งโดยเหลือเพียงหัวอยู่ใต้ดิน เมื่อเริ่มเข้าสู่ฤดูฝนจะผลิใบและช่อดอก พร้อมสร้างหัวใหม่ เช่น สกุลฮาบีนาเรีย (*Habenaria*) สกุลเอื้องลีลา (*Tainia*) สกุลนกคุ้มไฟ (*Anoectochilus*) สกุลเอื้องดินใบ

หมาก (*Spathoglottis*) กล้วยไม้อีกประเภทคือ พวกรากกึ่งดิน คือกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum* spp.) พวกนี้จะขึ้นอยู่ตามซอกหินที่มีใบไม้ผุทับถมกันอยู่ และเป็นพวกไม่ทิ้งใบ มีสีเขียวตลอดปี

กล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis* อยู่ในวงศ์ย่อย Epidendroideae ซึ่งวงศ์ย่อยนี้มีความหลากหลายทางด้านที่อยู่อาศัยและรูปร่างลักษณะ และมีจำนวนชนิดมากกว่าครึ่งหนึ่งของกล้วยไม้ทั้งหมดบนโลก มีกล้วยไม้หลายสกุลในวงศ์ย่อยนี้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ได้แก่ สกุลวานิลลา (*Vanilla*) สกุลหวาย (*Dendrobium*) สกุลต่าง ๆ ที่อยู่ในกลุ่มแคทรียา และสกุล *Spathoglottis* เป็นกล้วยไม้สกุลหนึ่งที่นิยมปลูกเลี้ยง (ดรรชิต, 2547) เนื่องจากเป็นกล้วยไม้ที่พบเกือบทั่วประเทศทั้งภาคเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันตก เป็นพวกที่มีดอกสีเหลืองหรือขาวนวล ส่วนชนิดที่พบทางภาคใต้ดอกสีม่วง ในประเทศไทยมี 5 ชนิด โดยทั่วไปชอบขึ้นในที่โล่งแจ้ง หัวมักอยู่บนดินและแตกหน่อใหม่ชิดกับหัวเดิม ใบยาวและมีรอยพับจีบตามยาว แต่ละหัวมี 2-4 ใบ ช่อดอกเกิดด้านข้างของหัว ยาวตั้งแต่ 20 เซนติเมตรขึ้นไป บางชนิดยาวเกือบ 1 เมตร ดอกเกิดที่ปลายช่อกลีบเลี้ยงและกลีบดอกรูปร่างคล้ายกัน และกางออกเกือบอยู่ในระนาบเดียวกัน กลีบปากช่วงกลางมักจะคอดกิ่ว ช่วงปลายกว้าง ส่วนโคนมีหูกลีบปากพับตั้งขึ้น เส้าเกสรผอมยาว โค้งเล็กน้อย กลุ่มเรณูมี 2 ชุด ชุดละ 4 กลุ่ม แต่ละกลุ่มคล้ายกระบอง แบ่งออกเป็น 4 ชนิด ดังนี้

1. *Spathoglottis affinis* de Vriese (เอื้องหัวข้าวเหนียว, หัวข้าวเหนียว)

หัวแป้น รูปร่างไม่แน่นอน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-3 เซนติเมตร ผิวเรียบมีเยื่อบางใสคลุมใบเป็นแถบ ขนาด 20-30 x 1.5-2 เซนติเมตร ปลายแหลม แผ่นใบค่อนข้างบาง ช่อดอกตรงสูง 20-40 เซนติเมตร ก้านช่อกลมผอม แต่แข็ง มีใบประดับเล็ก ๆ ติดเป็นระยะ ช่อดอกโปร่งเกิดจากกลางช่อขึ้นไป ก้านดอกยาว 2-3 เซนติเมตร ขนาดดอก 2.5-3 เซนติเมตร กลีบสีเหลืองหรือมีขีดสีม่วงที่โคนกลีบ กลางกลีบใบตรงส่วนโคนที่คอดมีตุ่มเนื้อเยื่อรูปเกือบกลม 2 ตุ่ม จะพักตัวเหลือแต่หัวในฤดูแล้ง ในฤดูฝนจึงสร้างใบและดอก ออกดอกตุลาคม-พฤศจิกายน พบตามป่าโปร่งหรือชายป่าตามลานหินที่มีน้ำซึมเกือบทุกภาคของประเทศ ยกเว้นภาคกลาง (อบ ฉันท์, 2543) (ภาพที่ 1)

2. *Spathoglottis pubescens Lindl.* (เอื้องเงินลาว)

มีรูปร่างคล้ายเอื้องหัวข้าวเหนียว (*S. affinis*) มาก แต่ต่างกันตรงที่กลีบปากของเอื้องดินลาวตรงโคนส่วนที่คอดมีแผ่นสันโค้งสูงขึ้นมาในแนวตั้ง กว้าง 1-1.5 เซนติเมตร ยาว 40-60 เซนติเมตร จำนวน 2-4 ใบต่อต้น ดอกออกเป็นช่อตั้งจากโคนกอ ก้านช่อยาว 60-80 เซนติเมตร จำนวน 5-10 ดอกต่อช่อ กลีบเลี้ยงมีขีดตามยาวสีน้ำตาล กลีบปากสีเหลืองเข้มมีประสีน้ำตาลที่โคนกลีบ ดอกบานเต็มที่กว้าง 3.5 – 4 เซนติเมตร ออกดอกช่วงเดือนตุลาคม – ธันวาคม พบตามชายป่าหรือทุ่งโล่งที่ชื้นแฉะ (สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์, 2543) (ภาพที่ 2)

3. *Spathoglottis eburnea* Gagnep. (บานดึก)

หัวและใบคล้ายเอื้องหัวข้าวเหนียวและเอื้องดินลาว ลักษณะหัวแป้นมีจุกและรูปร่างไม่แน่นอน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 เซนติเมตร ใบมีลักษณะเป็นจีบตื้น ๆ ยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ปลายใบแหลม โคนเรียวเล็กน้อย ช่อดอกสูง 20-30 เซนติเมตร ดอกเกิดที่ปลายช่อ ดอกในช่อน้อยและจะทยอยบานครั้งละ 1-2 ดอก ก้านดอกยาว 2-3 เซนติเมตร ขนาดดอกประมาณ 3 เซนติเมตร ดอกมีสีนวลอมเหลืองอ่อนหรือเกือบขาวออกดอกเดือนตุลาคม – พฤศจิกายน พบตามชายทุ่งหญ้าทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (อบ ฉันท์, 2543) (ภาพที่ 3)

4. *Spathoglottis plicata* Blume (กล้วยไม้ดิน เอื้องดิน ว่านจุก กระเทียมป่า)

กล้วยไม้ดินสูง 40-60 เซนติเมตร โคนต้นเป็นกระเปาะค่อนข้างกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-5 เซนติเมตร มีกาบใบหุ้ม ใบรูปรีแกมขอบขนานกว้าง 5-12 เซนติเมตร ยาว 800 เซนติเมตร ถึง 1 เมตร ผิวใบเป็นจีบตื้น ๆ ดอกออกเป็นช่อตั้งจากโคนกอ ช่อดอกยาว 60-100 เซนติเมตร (สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์, 2543) ก้านช่อกลมแข็ง ดอกเกิดที่ปลายช่อค่อนข้างแน่น ทยอยบานเป็นเวลานาน ก้านดอกยาว 3-4 เซนติเมตร มีใบประดับสีม่วงรองรับ ขนาดดอก 2-4 เซนติเมตร กลีบปากสั้นและผอม แต่สีเข้มกว่ากลีบอื่น ๆ เป็นกล้วยไม้ที่ไม่ทิ้งใบและสร้างหัวใหม่ขยายออกไปเรื่อย ๆ มีดอกเกือบตลอดปี ออกดอกเดือนพฤษภาคม – ตุลาคม หรือเกือบตลอดปี พบขึ้นตามที่ดินร่วนและชุ่มชื้นตามป่าโปร่งทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ และภาคใต้ (อบฉันท์, 2543) (ภาพที่ 4)

ปัจจุบันมีการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลนี้กับพันธุ์ต่างประเทศ เพื่อให้มีดอกขนาดใหญ่ขึ้น สีของดอกหลากหลายเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ ในขณะที่กล้วยไม้พันธุ์เดิมกำลังสูญพันธุ์ เพราะได้รับความสนใจที่จะอนุรักษ์พันธุ์ไว้น้อยมาก จำเป็นต้องมีการดำเนินการอนุรักษ์อย่างรวดเร็วและจริงจัง เนื่องจากความกดดันจากสภาพแวดล้อมเพิ่มขึ้นทุกวัน เพราะการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในระบบนิเวศอันเนื่องจากธรรมชาติเปลี่ยนไป เช่น เกิดฝนแล้ง น้ำท่วม เป็นต้น และอีกประการหนึ่ง คือ การเปลี่ยนแปลง

โดยมนุษย์ เนื่องจากมนุษย์เปลี่ยนแปลงที่อยู่อาศัยทำลายพื้นที่ป่า เก็บต้นกล้วยไม้จากป่าเพื่อการค้า ทำให้ประชากรกล้วยไม้ลดลงและอาจสูญพันธุ์

แนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ ทำได้หลายวิธี แบ่งออกได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ

1. การอนุรักษ์ในสภาพป่าหรือในแหล่งธรรมชาติ (*in situ* conservation) เป็นการเก็บอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ให้เจริญเติบโตอยู่ในสภาพธรรมชาติ ซึ่งเป็นวิธีการอนุรักษ์ที่ดีที่สุดในการรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) แต่กระทำได้ยาก วิธีนี้ใช้ทั่วโลกน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากขาดข้อมูลแหล่งนิเวศของกล้วยไม้แต่ละสกุล รวมไปถึงสามารถควบคุมสภาพธรรมชาติในระยะยาวได้

2. การอนุรักษ์ในสภาพนอกแหล่งธรรมชาติ (*ex situ* conservation) ส่วนใหญ่จะเก็บในสวนพฤกษศาสตร์ เรือนกล้วยไม้ทั้งของราชการและเอกชน ซึ่งเป็นการยากที่จะรักษาเพราะปัญหาจากงบประมาณและบุคลากรที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นการทำงานในระยะยาวนาน การเก็บรักษาในสภาพนอกแหล่งธรรมชาติ ทำได้หลายวิธี

2.1 เก็บในรูปต้นที่มีชีวิต (living collection)

เป็นการปลูกและเลี้ยงในโรงเรือนที่มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม มีการบำรุงดูแลรักษาอย่างดี มีบุคลากรที่มีความรู้ความสนใจและอุทิศเวลา รวมทั้งงบประมาณที่พอเพียง จึงจะประสบความสำเร็จในการอนุรักษ์แบบนี้

2.2 เก็บในรูปเมล็ด (seed storage, seed banks)

การเก็บแบบนี้มีข้อดี คือ ใช้พื้นที่น้อย เมล็ดกล้วยไม้ส่วนใหญ่มีอายุสั้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความชื้นในเมล็ด จึงต้องมีการผสมเกสรและเก็บฝัก (เมล็ด) ทุกปี

2.3 เก็บในรูปเรณู (pollen bank)

เป็นการเก็บเรณูรวมในรูปกลุ่มเรณู (pollinia) ซึ่งทำได้ง่าย โดยนำขวดที่เก็บเรณูเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จึงจะเก็บรักษาไว้ได้นาน 1 ปี โดยไม่เสียคุณสมบัติ (Seaton, 1994)

2.4 เก็บในหลอดแก้ว (*in vitro* conservation)

เป็นการเก็บอนุรักษ์โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้าช่วย สามารถอนุรักษ์พันธุ์ได้ตั้งแต่ระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และต้นอ่อน โดยเก็บและเลี้ยงไว้ในหลอดแก้ว วิธีนี้นิยมใช้กันมากเนื่องจากใช้พื้นที่แรงงานและการดูแลรักษาน้อย ลดการเสี่ยงอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ การทำลายของศัตรูพืช และการดูแลรักษาที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังสะดวกในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์พืชระหว่างประเทศ เนื่องจากมีขนาดเล็ก สะดวกในการขนส่งและปลอดศัตรูพืช

2.5 การเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (cryopreservation)

สามารถช่วยเก็บรักษาได้ยาวนาน (ครรชิตและศุภกิจ, 2540 ; Thammasiri, 2002) โดยการเก็บรักษาในตู้แช่แข็ง (freezer) ที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส หรือ -40 องศาเซลเซียส (koopowitz and Thornwill, 1994) และในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) (Pritchard, 1984 ; Thammasiri, 2002) ซึ่งขณะนี้มีการศึกษากันมากเกี่ยวกับเทคนิคในการเก็บรักษาเซลล์เนื้อเยื่อต้นอ่อนและเมล็ด ซึ่งกล้วยไม้ที่ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษา ได้แก่ กล้วยไม้ดินของญี่ปุ่น (*Bletilla striata*) (Ishikawa et.al., 1987) กล้วยไม้ไทยม้าบิน (*Doritis pulcherrima*) (Thammasiri, 2002) จึงทำการทดลองศึกษาหาเทคโนโลยีการอนุรักษ์กล้วยไม้ดินสกุล (*Spathoglottis*) ในสภาพปลอดเชื้อหรือในหลอดแก้ว (*in vitro* conservation) สำหรับเป็นเทคโนโลยีเพื่อการอนุรักษ์กล้วยไม้ใกล้สูญพันธุ์สกุลอื่นต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ต้นกล้วยไม้สกุล *Spathoglottis* ทั้ง 4 ชนิด (species) คือ
   1.1 *Spathoglottis pubescens* Lindl (เอื้องดินลาว)
   1.2 *Spathoglottis affinis* de Vriese (เอื้องหัวข้าวเหนียว)
   1.3 *Spathoglottis eburnea* Gagnep. (บานดึก)
   1.4 *Spathoglottis plicata* (เอื้องดิน ว่านจุก กระเทียมป่า)
2. อาหารสังเคราะห์สูตร VW (1949)
3. เครื่องแก้วและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้
4. สารยับยั้งออสโมซิส (osmotic inhibitor) เช่น manitol
5. เครื่องปลูกกล้วยไม้ในโรงเรือนเพาะชำ

วิธีการ

แบ่งขั้นตอนเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

1. การศึกษาการผสมตัวเองและเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้สกุล *Spathoglottis* 4 ชนิด

การทดลองนี้ต้องการศึกษาความพร้อมของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียของกล้วยไม้ดินสกุลนี้ โดยการนำเอากลุ่มเรณูวางบนเกสรตัวเมีย หลังการผสมเกสรประมาณ 12 ชั่วโมง แอ่งยอดเกสรตัวเมียจะขยายตัวใหญ่ขึ้น น้ำเหนียว ๆ ในแอ่งจะข้นคล้ายแป้งเปียก และมีปริมาณเพิ่มขึ้น สีของดอกจะซีดลงและดอกเหี่ยว ถ้าผสมไม่ติดดอกจะร่วงหลุดไป ถ้าผสมติดก้านดอกส่วนที่เป็นรังไข่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวและขยายตัวเจริญไปเป็นฝัก อายุของฝักจะนับจากวันผสมเกสร จนถึงวันที่เมล็ดแก่ตามธรรมชาติ ซึ่งมีระยะเวลาเร็วช้าแตกต่างกันตามชนิดกล้วยไม้ บันทึก

เปอร์เซ็นต์การติดฝัก ขนาดของฝัก เมื่อทำการผสมเกสรภายในดอกเดียวกันของกล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด

2. ศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ดินที่ได้จากการทดลองที่ 1

การทดลองนี้ต้องการศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ลูกผสมตัวเองทั้ง 4 ชนิด โดยใช้อาหารสูตร Vacin and Went (1949) เป็นสูตรอาหารพื้นฐาน และดัดแปลงเป็น 3 สูตร ดังนี้

สูตร A : อาหารสังเคราะห์ VW (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 70 มิลลิกรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด (P) 70 กรัมต่อลิตร และผงถ่านกัมมันต์ (AC) 1 กรัมต่อลิตร agar 8 กรัมต่อลิตร

สูตร B : อาหารสังเคราะห์ VW (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด 50 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1 กรัมต่อลิตร sucrose 20 กรัมต่อลิตร agar 8 กรัมต่อลิตร pH 4.8

สูตร C : อาหารสังเคราะห์ VW (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 30 มิลลิกรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด 30 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1 กรัมต่อลิตร sucrose 20 กรัมต่อลิตร agar 8 กรัมต่อลิตร pH 4.8

นำฝักกล้วยไม้มาล้างให้สะอาด ฆ่าเชื้อผิวของฝักกล้วยไม้ด้วยการแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที จุ่มฝักกล้วยไม้ในเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลนไฟจากเปลวไฟของตะเกียงแอลกอฮอล์ ตัดหัวท้ายฝักกล้วยไม้ ผ่าฝักออกตามยาวเป็น 2 ส่วน ใช้ปลายคีบขูดเมล็ดออกจากฝัก นำเมล็ดไปเพาะบนอาหารสังเคราะห์ จำนวน 4 สูตร นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเลี้ยงอุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเมล็ดงอกเป็นเวลา 9 สัปดาห์ บันทึกระยะเวลาการงอก

3. ศึกษาเทคนิคการอนุรักษ์กล้วยไม้ในสภาพลดการเจริญเติบโต ในหลอดทดลอง

โดยทำการทดลองเพาะเลี้ยงต้นอ่อนของกล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis* ทั้ง 4 ชนิด ในอาหาร VW ที่จำกัดการเจริญเติบโต 2 วิธี คือ

3.1 ศึกษาการลดปริมาณสารอาหารพื้นฐานในการอนุรักษ์ต้นอ่อน

นำต้นอ่อนกล้วยไม้ที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาเลี้ยง (อนุรักษ์) บนอาหาร 1/2 VW 1/3 VW และ 1/4 VW โดยอาหารเหล่านี้มีปริมาณสารอาหารเหลืออยู่ 1/2, 1/3 และ 1/4 ของปริมาณสารอาหารปกติ บันทึกอัตราการอยู่รอด และระยะเวลาในการอนุรักษ์โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหารใหม่ (subculture)

3.2 ศึกษาการใช้สารยับยั้งออสโมซิสเพื่อชะลอการเจริญเติบโต

นำต้นอ่อนกล้วยไม้ที่ได้จากการทดลองที่ 2 ทั้ง 4 ชนิด มาอนุรักษ์บนอาหาร VW ที่เติม manitol ปริมาณ 15, 30 กรัมต่อลิตร บันทึกอัตราการเจริญเติบโต และระยะเวลาในการอนุรักษ์โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหารใหม่ (subculture)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาการผสมตัวเองและเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้สกุล *Spathoglottis* 4 ชนิด

จากการผสมเกสรภายในดอกเดียวกันของกล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด พบว่า

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้ *S. affinis de Vriese* (เอื้องหัวข้าวเหนียว)

เอื้องหัวข้าวเหนียว ช่อดอกเกิดจากตาข้างหัวตั้งตรง ดอกเกิดจากกลางช่อดอก ก้านช่อดอกยาว 20-40 เซนติเมตร ก้านดอกยาว 2-3 เซนติเมตร ขนาดดอก 2.5-3 เซนติเมตร กลีบสีเหลืองหรือมีขีดสีม่วงที่โคนกลีบ เกสรตัวเมียพร้อมผสมในวันที่ 2 หลังจากดอกบาน โดยจะเห็นจากน้ำเมือกเหนียว และพร้อมผสมในวันที่ 3 หลังดอกบาน โดยมีลักษณะเป็นก้อนสีเหลืองจนถึง 5 วัน หลังจากนั้นเกสรตัวผู้จะฝ่อแห้งและหลุดจากฝาครอบเกสร จากการผสมเกสรพบว่า มีการติดฝัก 100 เปอร์เซ็นต์ ฝักเริ่มแตกหลังจากการผสมเกสรเป็นเวลา 27-28 วัน ฝักมีขนาด (กว้าง x ยาว) เท่ากับ 0.8 x 2.5 เซนติเมตร มีขนาดเมล็ด 168 x 926 ไมครอน ขนาดเอ็มบริโอ 129x 342 ไมครอน เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่มีเอ็มบริโอเท่ากับ 19.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1, 2)

1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้ *S. pubescens* (เอื้องดินลาว)

เอื้องดินลาวมีลักษณะทาง phenotype ที่คล้ายกับ เอื้องหัวข้าวเหนียวมาก จะต่างกันแค่ กลีบปากของดอกเอื้องดินลาว ตรงโคนที่คอด มีแผ่นสันโค้งสูงขึ้นมาในแนวตั้งคล้ายปีกเท่านั้น ช่อดอกจะออกจากโคนกอ ก้านช่อดอกยาว 60-80 เซนติเมตร ขนาดดอก 3.5-4 เซนติเมตร เกสรตัวเมียเริ่มพร้อมผสมในวันที่ 2 หลังดอกบาน และพร้อมผสมต่อเนื่องไปจนกระทั่งดอกเหี่ยว เกสรตัวผู้เป็นกลุ่ม โดยมีลักษณะเป็นก้อนเหลือง มีการติดฝัก 37.5 เปอร์เซ็นต์ ฝักเริ่มแตกหลังจากผสมเกสรเป็นเวลา 25 วัน ฝักมีขนาด (กว้าง x ยาว) เท่ากับ 0.75 x 2.3 เซนติเมตร มีขนาดเมล็ด 182 x 574 ไมครอน ขนาดเอ็มบริโอ 147x199 ไมครอน เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่มีเอ็มบริโอเท่ากับ 13.2 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1,2)

1.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้ *S. eburnea* (บานดึก)

บานดึกมีช่อดอกเกิดจากตาข้างของหัวตั้งตรง ช่อดอกเกิดที่ปลายช่อค่อนข้างบาง ความยาวช่อดอก 68.20 เซนติเมตร จำนวนดอกต่อช่อ 29 ดอก ดอกมีขนาด 4.2 เซนติเมตร กลีบดอกสีขาว เกสรตัวเมียพร้อมผสมในวันที่ 3 หลังดอกบาน และพร้อมผสมต่อเนื่องไปจนดอกเหี่ยว เกสรตัวผู้พร้อมผสมในวันที่ 1 หลังดอกบาน โดยมีลักษณะเป็นก้อนสีเหลือง จนถึง 5 วัน หลังจากนั้นเกสรตัวผู้จะฝ่อแห้งและหลุดจากฝาคลอบเกสร มีการติดฝัก 60 เปอร์เซ็นต์ ฝักเริ่มแตกหลังการผสมเกสรเป็นเวลา 24 วัน ฝักขนาด (กว้าง x ยาว) เท่ากับ 0.8 x 2.5 เซนติเมตร ขนาดเมล็ด 175 x 667.5 ไมครอน ขนาดเอ็มบริโอ 115 x 215 ไมครอน เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่มีเอ็มบริโอเท่ากับ 82.0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1,2)

1.4 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้ *S. plicata* (เอื้องดิน)

ช่อดอกเกิดจากตาข้างของหัว ช่อดอกตั้งตรง ดอกเกิดที่ปลายช่อค่อนข้างแน่น ความยาวช่อดอก 64.60 เซนติเมตร จำนวนดอกต่อช่อ 26 ดอก ดอกมีขนาด 2.5 เซนติเมตร กลีบดอกสีม่วงเกสรตัวเมียเริ่มพร้อมผสมในวันที่ 3 หลังดอกบาน และพร้อมผสมต่อเนื่องจนกระทั่งดอกเริ่มเหี่ยว เกสรตัวผู้อยู่รวมกันเป็นก้อน เริ่มพร้อมผสมในวันที่ 1 หลังดอกบาน มีลักษณะเป็นก้อนสีเหลืองอ่อน มีการติดฝัก 40 เปอร์เซ็นต์ ฝักจะแตกหลังผสมเกสรเป็นเวลา 24 วัน ฝักมีขนาด (กว้าง x ยาว) เท่ากับ 0.7 x 217.5 ไมครอน เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่มีเอ็มบริโอเท่ากับ 83.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1,2)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การติดฝัก อายุ และขนาด ของฝักของคู่ผสมต่าง ๆ

คู่ผสม	เปอร์เซ็นต์การติดฝัก	อายุฝัก (วัน)	ขนาดฝัก (ซม.)
S. affinis ⊗	100	27.5	0.8 x 2.5
S .pubescens ⊗	37.5	25	0.7 x 2.5
S. eburnea ⊗	60	24	0.8 x 2.5
S. plicata ⊗	40	24	0.7 x 3.1

ตารางที่ 2 ขนาดเมล็ด ขนาดเอ็มบริโอ และเปอร์เซ็นต์เอ็มบริโอของคู่ผสมต่าง ๆ

คู่ผสม	ขนาดเมล็ด (ไมครอน)	ขนาดเอ็มบริโอ (ไมครอน)	เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่มีเอ็มบริโอ
S. affinis ⊗	168x926	129x342	19.5
S. pubescens ⊗	182x574	147x199	13.2
S. eburnea ⊗	173x667.5	115x215	82.00
S. plicata ⊗	160x660	117.5x217.5	83.33

1. ศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ดินที่ได้จากการทดลองที่ 1

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้บนอาหารสังเคราะห์ VW (1994) ดัดแปลง จำนวน 3 สูตร ผลการทดลอง พบว่า

ในคู่ผสม *S. affinis* เมล็ดเริ่มงอกมีสีเขียวบนอาหารสังเคราะห์ VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 70 มิลลิกรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด 70 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1 กรัมต่อลิตร agar 8 กรัมต่อลิตร ได้เร็วที่สุด คือ 26 วัน และรองลงมาคืองอกบนอาหารที่เติมน้ำตาล sucrose ซึ่งใช้เวลาเท่ากันในการงอกคือ 28 วัน แต่ไม่พบการเกิด protocorm บนต้น (ตารางที่ 3)

S. pubescens เมล็ดเริ่มงอกมีสีเขียวบนอาหารสังเคราะห์ VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 70 มิลลิกรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด 70 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1 กรัมต่อลิตร agar 8 กรัมต่อลิตร ได้เร็วที่สุด คือ 26 วัน และรองลงมาคืองอกบนอาหารที่เติม sucrose มีน้ำมะพร้าว 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งใช้เวลา 28 วัน และใช้เวลานานที่สุดคือ 30 วัน บนอาหารที่เติม sucrose และเติมน้ำมะพร้าวเพียง 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3)

S. eburnea และ *S. plicata* เมล็ดเริ่มงอกมีสีเขียวบนอาหารสังเคราะห์ VW ดัดแปลงเท่ากันทั้ง 3 สูตร โดย *S. eburnea* เมล็ดงอกใช้เวลานาน 21 วัน (ตารางที่ 3) *S. plicata* ใช้เวลานาน 26 วัน (ตารางที่ 3)

การงอกของเมล็ดของกล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด สามารถงอกได้ดีบนอาหารทุกสูตร โดย *S. eburnea* ใช้เวลาในการงอกสั้นที่สุด เท่ากับ 21 วัน ทั้งนี้เนื่องจาก *S. eburnea* เอ็มบริโอมีความแก่ที่สมบูรณ์

ตารางที่ 3 อายุการงอกของกล้วยไม้ดินหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW (1949)

พันธุ์	อายุการงอก (วัน)		
	สูตรอาหาร		
	A	B	C
S. affinis	26	28	28
S. pubescens	26	28	30
S. eburnea	21	21	21
S. plicata	26	26	26

2. ศึกษาการอนุรักษ์ต้นอ่อนกล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis* ในหลอดแก้ว

การทดลองอนุรักษ์ต้นอ่อนกล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis* ทั้ง 4 ชนิด ในหลอดทดลองหรือสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* conservation) แบ่งการทดลองย่อย ดังนี้

2.1 ศึกษาการลดปริมาณสารอาหารพื้นฐานในการอนุรักษ์ต้นอ่อน

นำต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องหัวข้าวเหนียว (*S. affinis*) จำนวน 210 ต้น เลี้ยงในอาหาร 1/2 VW ,1/3 VW และ 1/4 VW อย่างละ 70 ต้น เอื้องดินลาว (*S. pubescens*) จำนวน 140 ต้น แบ่งเป็น 46 ต้นต่ออาหาร 1 สูตร บานดึก (*S. eburnea*) จำนวน 540 ต้น แบ่งเป็น 180 ต้นต่ออาหาร 1 สูตร และเอื้องดินหรือว่านจุก (*S. plicata*) จำนวน 840 ต้น แบ่งออกเป็น 280 ต้นต่ออาหาร 1 สูตร (ตารางที่ 4) ผลการทดลองพบว่า กล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารทั้ง 3 สูตร เฉลี่ยความสูงของต้นอ่อนของกล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด บนอาหาร 3 สูตร ในระยะเวลา 1 เดือน คือ 3.81 3.66 และ 2.75 เซนติเมตร (ตารางที่ 5) ดังนั้น จึงทำการย้ายต้นกล้วยไม้ทั้งหมดเลี้ยงบนอาหาร 1/4 VW เพียงอย่างเดียว พบว่า กล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด สามารถอนุรักษ์ได้นาน 7-8 เดือน โดยใบไม่เหลือง และจะ subculture ในเดือนที่ 9 และกล้วยไม้จะหยุดการเจริญเติบโตในเดือนที่ 5 หลังการเพาะเลี้ยง

2.2 ศึกษาการใช้สารยับยั้งออสโมซิส เพื่อชะลอการเจริญเติบโต

จากการอนุรักษ์กล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด บนอาหารสูตร VW ที่เติม manitol ปริมาณ 15 และ 30 กรัมต่อลิตร ผลการทดลอง พบว่า กล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด ชะงักการเจริญเติบโตบนอาหารที่เติม manitol โดยอาหารที่เติม manitol 15 กรัมต่อลิตร สามารถอนุรักษ์ *S. pubescens* และ *S. eburnea* ได้นาน 5 เดือน ใบจะเริ่มเหลืองจึงต้องเปลี่ยนอาหารใหม่ ส่วน *S. affinis* อนุรักษ์ได้นาน 4 เดือน และ *S. plicata* อนุรักษ์ได้นานแค่ 3 เดือน ต้องเปลี่ยนอาหารใหม่ สำหรับอาหารที่เติม manitol 30 กรัมต่อลิตร กล้วยไม้

ทั้ง 4 ชนิด จะชะงักการเติบโตตั้งแต่เดือนแรก และใบจะเริ่มเหลืองขอบใบไหม้ ต้นจะตายในเดือนที่ 2 (ตารางที่ 6)

การใช้ manitol เป็นพวก non-reducing sugar ซึ่งใช้เป็นสารออสโมติคัม ควบคุมการเกิด osmosis ระหว่างพืชและน้ำใช้เพื่อชะลอการเจริญเติบโตของต้นพืช เนื่องจาก manitol เป็นสาร inert ไม่เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อ manitol สามารถซึมเข้าไปในต้นพืชและเคลื่อนย้าย (translocated) ได้ในท่อลำเลียงอาหารของพืช แต่ manitol ที่มีความเข้มข้นมากจะทำให้พืชเกิดอาการขาดน้ำและตายไปในที่สุด (Michael, 1970)

ตารางที่ 4 จำนวนต้นอ่อนกล้วยไม้ 4 ชนิด ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร VW ที่ลดปริมาณสารอาหาร 3 ระดับ

พันธุ์	อาหาร		
	1/2 VW	1/3 VW	1/4 VW
S. affinis	70	70	70
S. pubescens	46	46	46
S. eburnea	180	180	180
S. plicata	280	280	280

ตารางที่ 5 ความสูงเฉลี่ยต่อเดือนของต้นอ่อนกล้วยไม้ที่อนุรักษ์บนอาหารสูตร VW ที่ลดปริมาณสารอาหาร 3 ระดับ

พันธุ์	ความสูง (เซนติเมตร)		
	1/2 VW	1/3 VW	1/4 VW
S. affinis	3.92	3.68	2.95
S. pubescens	3.97	3.82	3.01
S. eburnea	3.76	3.64	2.63
S. plicata	3.61	3.53	2.41
เฉลี่ย	3.81	3.66	2.75

ตารางที่ 6 ระยะเวลาในการอนุรักษ์ต้นอ่อนกล้วยไม้ 4 ชนิด บนอาหาร VW ที่เติม manitol 15 และ 30 กรัมต่อลิตร

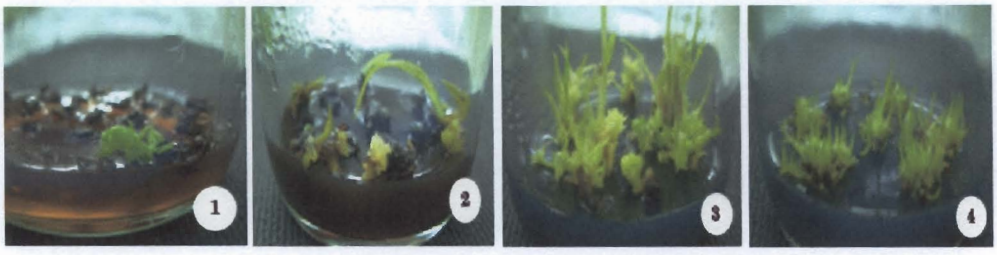
	ระยะเวลาการอนุรักษ์ (เดือน)	
	VW+manitol 15 กรัม/ลิตร	VW+manitol 30 กรัม/ลิตร
S. affinis	4	1
S. pubescens	5	1
S. eburnea	5	1
S. plicata	3	1

ภาพที่ 1 ลักษณะของต้นกล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis*

1. *S. affinis*
2. *S. pubescens*
3. *S. eburnea*
4. *S. plicata*

ภาพที่ 2 ลักษณะของดอกกล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis*

1. *S. affinis*
2. *S. pubescens*
3. *S. eburnea*
4. *S. plicata*

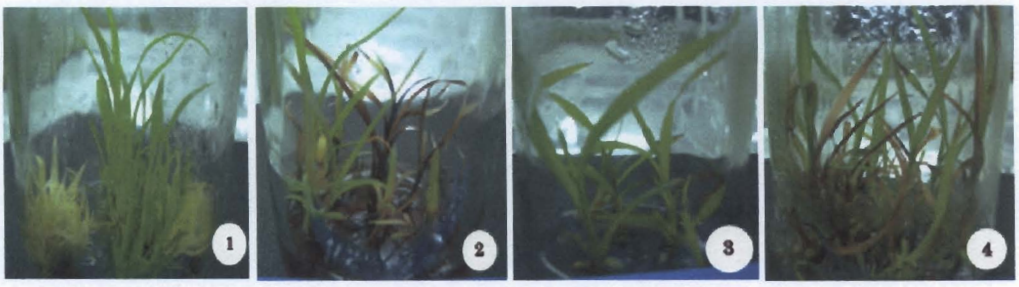


ภาพที่ 3 โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis*

1. *S. affinis*
2. *S. pubescens*
3. *S. eburnea*
4. *S. plicata*

ภาพที่ 4 ฝักของกล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis*

1. *S. affinis*
2. *S. pubescens*
3. *S. eburnea*
4. *S. plicata*



ภาพที่ 5 การอนุรักษ์ต้นกล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis* ในอาหาร 1/4 VW

1. *S. affinis*
2. *S. pubescens*
3. *S. eburnea*
4. *S. plicata*

ภาพที่ 6 การอนุรักษ์ต้นกล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis* ในอาหาร VW ที่เติม manitol 15 กรัมต่อลิตร

1. *S. affinis*
2. *S. pubescens*
3. *S. eburnea*
4. *S. plicata*

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการทดลองศึกษาเทคโนโลยีการอนุรักษ์กล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis* 4 ชนิด คือ *S. affinis* *S. pubescens* *S. eburnea* และ *S. plicata* โดยเริ่มจากการเตรียมต้นอ่อนกล้วยไม้เพื่อนำมาอนุรักษ์ ด้วยการผสมเกสรดอกกล้วยไม้ พบว่า กล้วยไม้ดินทั้ง 4 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์การติดฝัก 37.5-100 เปอร์เซ็นต์ แล้วแต่ชนิดของกล้วยไม้ อายุของฝัก 24-27 วัน ฝักและเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กแตกต่างกันบ้างเล็กน้อย อาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้สกุลนี้คือ VW (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 70 มิลลิลิตรต่อลิตร มันฝรั่งบด 70 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1 กรัมต่อลิตร วุ้น 8 กรัมต่อลิตร pH4.8 เมื่อนำมาอนุรักษ์ในอาหารที่ชะลอการเจริญเติบโต 2 แบบ คือ การลดปริมาณสารอาหารลงเหลือ 1 ใน 4 (1/4 VW) พบว่า สามารถอนุรักษ์กล้วยไม้ดินทั้ง 4 ชนิดได้นาน 7-8 เดือน จึงจะเปลี่ยนอาหารใหม่ ส่วนการอนุรักษ์บนอาหารที่เติมสารยับยั้งออสโมซิส ได้แก่ manitol เพื่อลดการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้ พบว่า manitol ปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร จะไปหยุดการเจริญเติบโตของต้นอ่อนแบบฉับพลัน ทำให้ต้นกล้วยไม้ขาดน้ำอย่างรุนแรง และตายในที่สุด ส่วน manitol ปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร จะยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นอ่อนในเดือนที่ 2-3 แล้วกล้วยไม้จึงจะแสดงอาการขาดน้ำ โดย *S. pubescens* และ *S. eburnea* อนุรักษ์ได้นาน 5 เดือน *S. affinis* อนุรักษ์ได้นาน 4 เดือน *S. plicata* อนุรักษ์ได้นาน 3 เดือน

ดังนั้น จะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาพันธุ์หรือการอนุรักษ์ กล้วยไม้ดินสกุล *Spathogolttis* ทั้ง 4 ชนิด ในหลอดทดลอง *(in vitro* conservation) โดยทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตช้า ๆ โดยที่ต้นอ่อนของกล้วยไม้ยังคงมีชีวิตอยู่ และมีการย้ายอาหารเป็นครั้งคราว ทำให้ไม่เปลืองเนื้อที่และไม่เสี่ยงต่อการสูญหาย หรือถูกทำลายโดยภัยธรรมชาติ นอกจากนี้ยังทำให้สะดวกในการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชกับต่างประเทศ เพราะสะอาดปราศจากโรค และควรเลือกวิธีการลดปริมาณสารอาหารพื้นฐาน แล้วเติมมันฝรั่งหั่นเป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาด 0.1-0.3 เซนติเมตร ในอาหารทำให้สามารถอนุรักษ์ได้นานถึง 1 ปี โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหารใหม่ เป็นการประหยัดงบประมาณในการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืช ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการใช้ปัจจัยหลาย ๆ อย่างร่วมกัน อาจจะอนุรักษ์ได้เวลานานมากขึ้น และควรมีการศึกษาการอนุรักษ์ในสภาพแช่แข็ง (Cryopreservation) เพราะจะทำให้ประหยัดเนื้อที่ในการเก็บรักษา และเก็บรักษาได้ในระยะเวลาที่ยาวนาน

เอกสารอ้างอิง

ครรชิต ธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์ พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน), กรุงเทพฯ. 283 หน้า.

องค์การสวนพฤกษศาสตร์ สำนักนายกรัฐมนตรี. 2543. สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่มที่ 6: กล้วยไม้ไทย. โอ เอส พริ้นติ้งเฮ้าส์. กรุงเทพฯ. 291 หน้า.

อบฉันท์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. กรุงเทพฯ. 464 หน้า.

Ishikawa,K.,K. Harata, M.Mii, A.Sakai, Y. Yoshimatsu and K. Shimonura. 1997. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. Plant Cell Reports. 16 : 754-757.

Koopowiz, H. and A. Thornhill. 1994. Gene banking and orchid seeds. Amer. Orchid Soc. Bull. 63 (12) : 1383-1386.

Michael, B.E. 1970. Carbowex compare with manitol as a suppressant of cucumber hypocotyls elongation. Plant Physiology. 45: 507-509.

Pritchard, H.W. 1984. Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seed. Cryo-Letters 5:295-300.

Thammasiri, k. 2002. Preservation of seeds of some Thai orchid species by vitrification. Proc. 16th World Orchid Conference : 248-251.

Seaton, Philip. 1994. Orchid seed and pollen storage. Amer. Orchid Soc. Bull. 63(8) : 918-922.

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก

กรมวิชาการเกษตร

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์พื้นฐานสูตร VW

องค์ประกอบ	ปริมาณ
Macronutrient	mg/l
$(NH_4)_2SO_4$	500
KNO_3	525
$Ca_3(PO_4)_2$	200
$MgSO_4.7H_2O$	250
KH_2PO_4	250
Micronutrient	
$MnSO_4.4H_2O$	7.5
$Fe_2(C_4H_4O_6)_3$	28
Others	
Sucrose	20 g/l
Coconut milk	150 ml
pH	4.8-5.0

ที่มา : (Vacin และ Went, 1949)

กรมวิชาการเกษตร