Agricultural Sci. J. 49 : 1 (Suppl.) : 280-283 (2018) ว. วิทย. กษ. 49 : 1 (พิเศษ) : 280-283 (2561)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์วานิลลา
In vitro Propagation of *Vanilla planifolia* Andrew

มนฑิณี กมลธรรม[1] และ สะใบทอง ภูมิคอนสาร[1]
Montinee Kamoltham[1] and Sabaitong Phumkonsan[1]

[1]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) 35 หมู่ 3 คลอง 5 คลองหลวง ปทุมธานี 12120
[1]Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) 35 M. 3 Khlong 5 Khlong Luang Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

วานิลลาเป็นพืชเศรษฐกิจที่สามารถส่งเสริมให้มีการปลูกในทางภาคเหนือตอนบนของไทย จัดเป็นเครื่องเทศที่มีราคาสูงเป็นอันดับสองรองจากหญ้าฝรั่นเท่านั้น โดยฝักแก่ที่ผ่านการบ่มจนหอมสามารถนำไปใช้ทำผลิตภัณฑ์อาหาร เครื่องดื่ม เบเกอรี่ เครื่องสำอางค์ และน้ำหอมที่มีคุณภาพสูงได้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลลาเพื่อการขยายพันธุ์วิธีที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อปลายยอดและตาข้างของวานิลลาคือ ใช้คลอร็อกซ์ความเข้มข้น 15% เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 5% เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS หลังจากแตกยอดใหม่จึงนำยอดอ่อนไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มจำนวนยอดคืออาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มก./ล. โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ รวมทั้งสิ้น 20 สูตร สูตรละ 6 ซ้ำ พบว่าสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการเพิ่มจำนวนยอดคืออาหารสูตร MS ที่เติม BA 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. โดยจำนวนยอดเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 5 ยอดจาก 1 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ยอดวานิลลาเจริญเติบโตขึ้นและเกิดรากได้ดีคือ อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยต่อต้นเท่ากับ 3.2 ราก และมีความสูงของต้นเฉลี่ย 5.7 ซม. เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน และเมื่อนำออกปลูกมีอัตราการรอดชีวิต 100%

คำสำคัญ: วานิลลา, เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ABSTRACT

Vanilla is a commercial plant that can be promote to cultivate in the north of Thailand. This plants has a high value of the market price with the second most expensive spice after saffron. The dried and cured Vanilla beans were widely used in premium grade of food products, beverage, bakery, cosmetics and perfume. Tissue culture was applied for propagation of Vanilla plants (*Vanilla planifolia*). The suitable technique for sterilized shoots and lateral buds of Vanilla vine was bleaching with 15% clorox for 15 minutes followed by 5% clorox for 15 minute then they were cultured on MS medium for produced new shoots and then subculture in to MS medium supplemented with 0, 1, 2, 3, 4 mg/l BA and 0, 0.1, 0.3, 0.5 mg/l NAA. The experiment arranged as completely random design (CRD) totally 20 treatments and 6 replicated of each treatment for shoots induction. The results showed that the suitable media for shoot multiplication was MS medium supplemented with 4.0 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA with five shoots propagated from one shoot after culture for 60 days. The MS medium supplemented with 0.1 mg/l NAA was optimum for shoot elongation and rooting with an average of 3.2 roots per plant and an average of 5.7 centimeters of shoot height after culture for 60 days. After transferring to pot plants, the survival rate was 100%.

Keywords: Vanilla, propagation

บทนำ

วานิลลามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vanilla planifolia* (Andrews) จัดอยู่ในวงศ์เดียวกับกล้วยไม้คือ Orchidaceae ชื่อสามัญคือ Vanilla มีถิ่นกำเนิดในป่าแถบอเมริกากลางโดยเฉพาะในประเทศเม็กซิโกและกัวเตมาลา มีแหล่งปลูกกระจายอยู่ทั่วไปในเขตร้อนชื้น เช่นประเทศมาดากัสการ์, ตาหิติ และอินโดนีเซีย เป็นต้น (Ketpet, 2002) ส่วนการปลูกวานิลลาในประเทศไทยยังไม่มีบันทึกแน่ชัด พบว่าในปี 2521 มีการปลูกที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และปัจจุบันได้มีการส่งเสริมให้มีการปลูกโดยโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ ในปี 1995 มีรายงานการบริโภควานิลลาทั่วโลกสูงถึง 1900 ตัน/ปี เฉพาะในประเทศอเมริกามีการบริโภคถึง 1400 ตัน (Divakaran *et. al*., 2008) วานิลลาเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเมื่อนำมาบ่มแล้วจะมีกลิ่นหอมจากวานิลลิน (Vanillin) นิยมนำมาใช้ในการปรุงแต่งกลิ่นอาหาร เช่น เค้ก, ไอศครีม และโยเกิร์ต และใช้ในกลุ่มเครื่องสำอาง เช่น ครีมบำรุงผิวและน้ำหอม เป็นต้น วานิลลามีข้อจำกัดในการเพาะปลูกและขยายพันธุ์ การเพิ่มจำนวนในธรรมชาติมีน้อยมาก สามารถขยายพันธุ์ได้โดยการปักชำและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากนี้วานิลลายังมีข้อจำกัดในการติดฝักโดยไม่สามารถผสมตัวเองได้ ต้องอาศัยคนช่วยในการผสมเกสรและต้องเป็นผู้ที่มีความชำนาญ จากข้อจำกัดดังกล่าวข้างต้นทำให้วานิลลาเป็นพืชจำพวกเครื่องเทศที่มีราคาสูงมาก ราคาเป็นรองแค่จากหญ้าฝรั่น (saffron) เท่านั้น

ปัจจุบันมีงานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลาตีพิมพ์เผยแพร่บ้าง แต่ยังมีจำนวนน้อย งานวิจัยในประเทศไทย เช่น วชิระ (2545) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลลา พบว่าอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม N6-benzyladenine (BA) 3.0 มก./ล. ร่วมกับ α-naphthalene acetic acid (NAA) 1.0 มก./ล. สามารถชักนำให้ตาเกิดต้นมากที่สุด คือ 5.2 ต้น/ชิ้นส่วน และพบว่าอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนสามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุดคือ 6.6 ราก/ชิ้นส่วน เมื่อย้ายออกปลูกสามารถรอดชีวิตได้ 100% ในงานวิจัยของ Retheesh and Bhat (2010) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดและตาข้างของต้นวานิลลา พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม thidiazuron (TDZ) 0.45 μM หรือ 6-benzyl aminopurine (BAP) 4.43 μM ร่วมกับ α-naphthalene acetic acid (NAA) 2.68 μM และเติมน้ำตาล 3% สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดี

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพิ่มจำนวนยอดวานิลลา

ตัดส่วนของยอดและตาข้างของเถาวานิลลาโดยตัดชิ้นส่วนขนาดประมาณ 1.5 ซ.ม. นำมาล้างให้สะอาดจากนั้นแช่ในแอลกอฮอร์ 95% เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อในคลอร็อกซ์ 15% เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 5% เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตัดส่วนของปลายยอดและตาข้างนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือนจนเกิดยอดใหม่ จึงตัดยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารเพิ่มจำนวนยอดคือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA (6-benzyladenine) ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA (1-naphthaleneacetic acid) ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มก./ล. โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely random design; CRD) รวมทั้งสิ้น 20 สูตร สูตรละ 6 ซ้ำ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ที่อุณหภูมิ 25±2 °C ให้แสง 12 ชม./วัน ความเข้มแสง 1,600-1,800 ลักซ์ บันทึกการทดลองโดยการนับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี ANOVA วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) และความแตกต่างทางสถิติแบบแยกปัจจัยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

การชักนำให้ยอดเจริญเติบโตขึ้นและเกิดราก

ย้ายยอดอ่อนที่เกิดจากสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดโดยเลือกยอดที่มีความสูงประมาณ 0.5-1.0 ซม. ลงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วันที่อุณหภูมิ 25±2 °C ให้แสง 12 ชม./วัน บันทึกผลการเจริญของต้นโดยวัดความสูงของต้นและนับจำนวนรากของแต่ละต้นวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี ANOVA วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) และความแตกต่างทางสถิติแบบแยกปัจจัยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

การออกขวดปลูกวานิลลา

นำต้นวานิลลาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อความสูง 10-15 เซ็นติเมตร และมีรากเกิดขึ้น 5-10 ราก น้ำออกจากขวด ล้างวุ้นอาหารออกให้หมดวางรวมกันในตะกร้าก่อนนำไปปลูก หากยังไม่ปลูกทันทีให้คลุมด้วยพลาสติกกันการสูญเสียน้ำ วัสดุปลูกใช้กาบมะพร้าวสับแช่น้ำไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมงและกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 นิ้ว การให้ปุ๋ยใช้ปุ๋ยกล้วยไม้แบบ

เกล็ดละลายน้ำสูตร 50-30-10 ฉีดพ่นเดือนละ 2 ครั้ง ปลูกเลี้ยงในโรงเรือนพลางแสงด้วยซาแรน 50% รดน้ำวันละ 1 ครั้งช่วงเช้า สังเกตการเจริญเติบโตและบันทึกผลการรอดชีวิต

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเพิ่มจำนวนยอดวานิลลา

จากการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนของวานิลลาในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.0 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. และอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.0 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล. โดยจำนวนยอดเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 5 ยอดจาก 1 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน (Table 1, Figure 1) และสูตรที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีรองลงมาคืออาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล. และอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.0 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 4.5 ยอดจาก 1 ยอด โดยทั้ง 4 สูตรให้จำนวนยอดได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่ากลุ่มควบคุมไม่มีการเพิ่มจำนวนยอดขึ้นเลย มีเพียงยอดเจริญเติบโตขึ้น การทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของวชิระ (2545) ซึ่งศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลลา พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3.0 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1.0 มก./ล. สามารถชักนำให้ตาเกิดต้นมากที่สุด คือ 5.2 ต้น/ชิ้นส่วน

การชักนำให้ยอดเจริญเติบโตขึ้นและเกิดรากและการออกขวดปลูกวานิลลา

จากการย้ายยอดอ่อนลงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน พบว่ายอดอ่อนสามารถเจริญเติบโตได้ดีและมีความสูงที่สุดในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน โดยมีความสูงเฉลี่ย 6.2 เซ็นติเมตร รองลงมาคืออาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร โดยมีความสูงเฉลี่ย 5.7 เซ็นติเมตร โดยทั้ง 2 สูตรมีค่าความสูงไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 2) และจากผลการทดลองพบว่าฮอร์โมน NAA ความเข้มข้นต่ำๆ มีผลช่วยในการเพิ่มจำนวนรากโดยที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนรากเฉลี่ยต่อต้นเท่ากับ 3.2 รากซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้ 2.8 รากต่อต้น แต่จำนวนรากจากทั้ง 2 สูตรก็ไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปอีกประมาณ 2 เดือนจะมีความสูงประมาณ 10-15 ซม. และมีรากประมาณ 5-10 รากพร้อมออกปลูก หลังจากล้างวุ้นออกจากรากจนหมดแล้วปลูกพบอัตราการรอดชีวิต 100% โดยในช่วงแรกไม่จำเป็นต้องใส่ปุ๋ยเลย ผ่านไปประมาณ 1 เดือนจึงเริ่มให้ปุ๋ยเกร็ดละลายน้ำฉีดพ่นเดือนละ 2 ครั้ง สามารถเจริญเติบโตได้ดี หลังจากปลูกเป็นเวลา 2 เดือนจึงเริ่มทำค้างให้ได้

สรุป

สูตรอาหารที่ดีที่สุดในการเพิ่มจำนวนยอดวานิลลาคือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.0 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. โดยจำนวนยอดเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 5 ยอดจาก 1 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน และสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการชักนำให้ยอดวานิลลาเติบโตขึ้นและเกิดรากได้ดีคืออาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยต่อต้นเท่ากับ 3.2 รากซึ่ง และมีความสูงต้นเฉลี่ย 5.7 ซม. เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน และต้นวานิลลาที่มีความสูงประมาณ 10-15 ซม. และมีรากประมาณ 5-10 รากต่อต้น เมื่อออกปลูกพบอัตราการรอดชีวิต 100% โดยในช่วงแรกไม่จำเป็นต้องใส่ปุ๋ยเลย

เอกสารอ้างอิง

Divakaran, M., Pillai, S.G., Nirmal Babu, K. and Peter, V.K. 2008. Isolation and fusion of protoplasts in Vanilla species. Current Science, 94: 115-120.

Ketpet, W. 2002. Tissue Culture of Vanilla (*Vanilla planifolia*) from Bud Leaf and Root. MS thesis, Khon Kaen University, Khon Kean. (in Thai)

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

Retheesh, S.T. and Bhat, A.I. 2010. Simultaneous elimination of *Cucumber mosaic virus* and *Cymbidium mosaic virus* infecting *Vanilla planifolia* through meristem culture. Crop Protection, 29: 1214-1217.

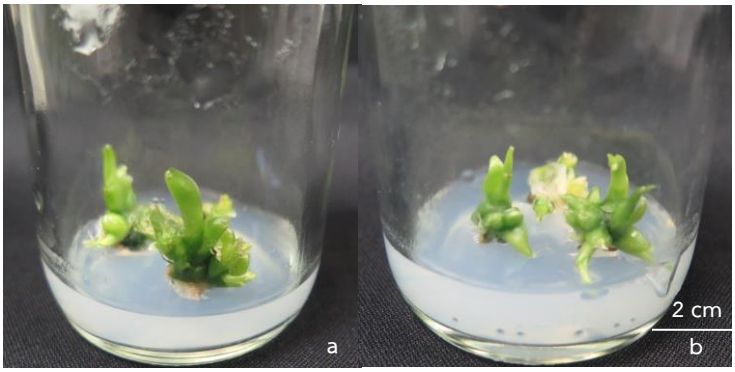

Figure 1 Shoots induction from *Vanilla planifolia* explants on MS medium supplemented with 4.0 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA (a) and MS medium supplemented with 4.0 mg/l BA and 0.3 mg/l NAA (b) after culture for 60 days.

Table 1 Effect of BA and NAA at different concentrations on new shoots production of *Vanilla planifolia* explants after 60 days of culture.

MS medium		Average number of new shoots production±SE (n=6)	MS medium		Average number of new shoots production±SE (n=6)
BA (mg/l)	NAA (mg/l)		BA (mg/l)	NAA (mg/l)	
0	0	1.00 ± 0.00^{a}	0	0.3	1.0 ± 0.00^{a}
1	0	2.16 ± 0.16^{b}	1	0.3	2.16 ± 0.16^{b}
2	0	3.16 ± 0.16^{cde}	2	0.3	2.50 ± 0.22^{bc}
3	0	3.33 ± 0.21^{de}	3	0.3	4.5 ± 0.22^{fg}
4	0	3.16 ± 0.41^{cde}	4	0.3	5.00 ± 0.25^{g}
0	0.1	1.00 ± 0.00^{a}	0	0.5	1.0 ± 0.00^{a}
1	0.1	3.0 ± 0.25^{cd}	1	0.5	2.5 ± 0.22^{bc}
2	0.1	2.83 ± 0.30^{bcd}	2	0.5	2.80 ± 0.30^{bcd}
3	0.1	3.83 ± 0.30^{ef}	3	0.5	3.30 ± 0.21^{de}
4	0.1	5.0 ± 0.36^{g}	4	0.5	4.50 ± 0.22^{fg}

Number showed mean±SE with different superscript letters in column mean significantly different by DMRT ($p\leq0.05$)

Table 2 Effect of NAA at different concentrations on new roots production and shoot elongated of *Vanilla planifolia* explants after 60 days of culture.

MS medium NAA (mg/l)	Number of root mean±SE (n=5)	Shoot elongated (cm) mean±SE (n=5)
0	2.8 ± 0.20^{ab}	6.2 ± 0.73^{b}
0.1	3.2 ± 0.20^{b}	5.7 ± 0.51^{ab}
0.3	2.4 ± 0.54^{a}	4.4 ± 0.24^{a}
0.5	2.2 ± 0.44^{a}	4.2 ± 0.37^{a}

Number showed mean+SE with different superscript letters in column mean significantly different by DMRT ($p\leq0.05$)