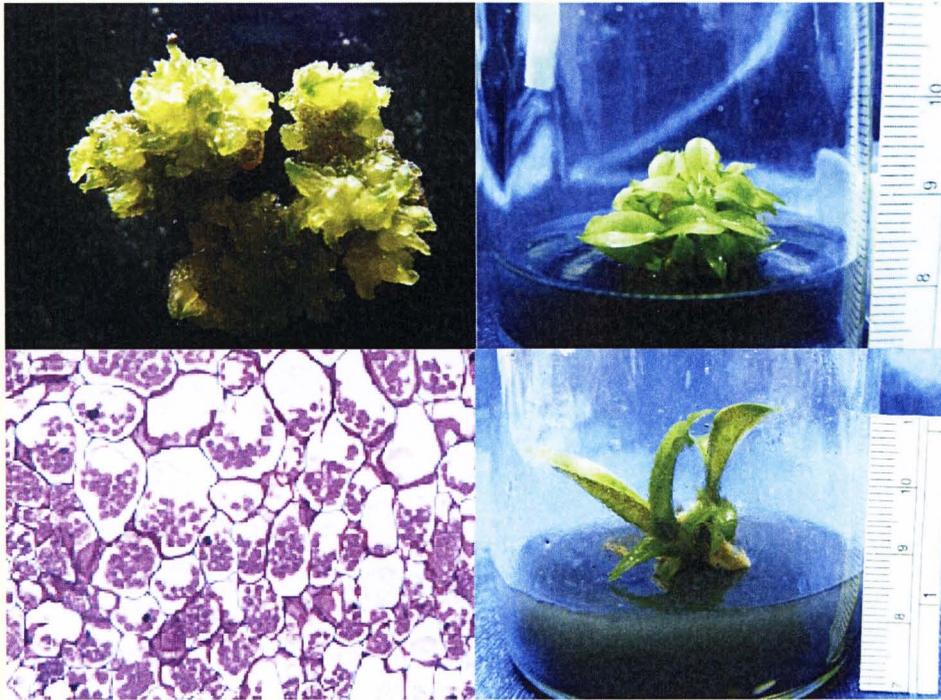




รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเก็บรักษาและการเกิดเป็นต้นของโปรโทคอร์มไลค์บอดีของ
กล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล : *Paphiopedilum niveum* (Rchb. f.) Pfitz.

Preservation and Regeneration of Protocorm-like Bodies of
Lady's Slipper Orchid : *Paphiopedilum niveum* (Rchb. f.) Pfitz



โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์¹

รองศาสตราจารย์ ดร. ครรชิต ธรรมศิริ²

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา

² ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พญาไท กรุงเทพมหานคร

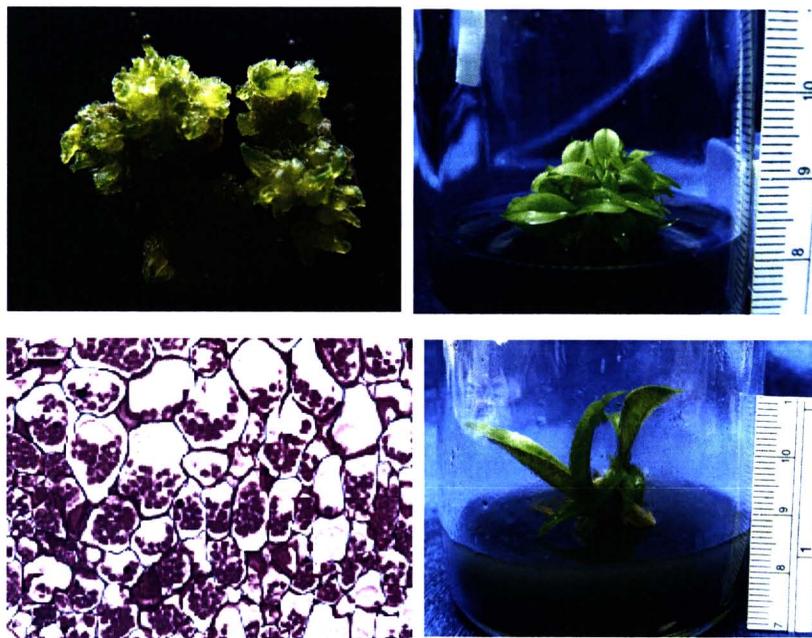
งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททั่วไป จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเก็บรักษาและการเกิดเป็นต้นของโพรโทคอร์มไลค์บอดีของ
กล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล : *Paphiopedilum niveum* (Rchb. f.) Pfitz.

Preservation and Regeneration of Protocorm-like Bodies of
Lady's Slipper Orchid : *Paphiopedilum niveum* (Rchb. f.) Pfitz



โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อูปถัมภ์ มีสวัสดิ์¹

รองศาสตราจารย์ ดร. ครรชิต ธรรมศิริ²

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา

² ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พญาไท กรุงเทพมหานคร

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททั่วไป จากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ

คำนำ

รายงานฉบับนี้คณะผู้วิจัยได้รายงานเฉพาะส่วนประเด็นสำคัญ ที่อยู่ในขอบเขตการศึกษาเท่านั้น เนื่องจากมีประเด็นที่ละเอียดอ่อน และมีความต่อเนื่องกับงานวิจัยอีกเรื่องหนึ่งที่ผู้วิจัยได้ดำเนินไว้ จึงอาจไม่มีรายละเอียดชัดเจนในบางส่วนเนื่องจากอาจมีผลเชิงพาณิชย์ เช่นสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งรายงานครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการปรับปรุง ขั้นตอนและรายละเอียดการเพาะเลี้ยง (เป็นการต่อยอดจากผลงานงานวิจัยอีกเรื่องหนึ่ง ที่ผู้วิจัยได้ทำการวิจัยเบื้องต้นไว้) ซึ่งทำให้สามารถผลิตต้นอ่อนกล้วยไม้รองเท้านารีได้สมบูรณ์

ผู้วิจัยมีความคิดที่จะพัฒนาปรับปรุงการเกิดเป็นต้นของรองเท้านารี ในปริมาณมาก และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น จึงได้ทำการวิจัย และหาวิธีการ ในการเก็บรักษาสายพันธุ์ของรองเท้านารี ทั้งนี้เพื่อประโยชน์เชิงอนุรักษ์และเชิงพาณิชย์ จึงเป็นที่มาของโครงการวิจัยที่ได้รายงานในครั้งนี้

เนื่องจากสูตรอาหารในการเจริญของกล้วยไม้รองเท้านารีแต่ละระยะมีความสำคัญเชิงการค้า อีกทั้งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับระยะเวลาการเจริญเติบโต ผู้วิจัยจึงขอสงวนสิทธิ์เผยแพร่รายละเอียดของสูตรอาหารดังกล่าวไว้ ณ. ที่นี้ (เนื่องจากเป็นผลต่อเนื่องจากงานวิจัยอีกเรื่องหนึ่ง) หากท่านใดสนใจเพื่อหาแนวทางทำวิจัย สามารถติดต่อผู้วิจัยได้เป็นกรณีส่วนตัว ทั้งนี้สามารถแลกเปลี่ยนความรู้ได้และต้องไม่มีผลประโยชน์เชิงการค้าเท่านั้น

อึ้งผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) ที่ได้ให้ทุนในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ คุณวันชัย มุกดาร์ศมี อดีตผู้อำนวยการศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร (พันธุ์พืชเพาะเลี้ยง) จ. ตรัง (ปัจจุบันเป็นผู้อำนวยการศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร พันธุ์พืชเพาะเลี้ยง จ. สุพรรณบุรี) และคุณนพรัตน์ ถวิลเวทิน นักวิชาการส่งเสริมการเกษตร สำหรับความช่วยเหลือเกี่ยวกับต้นพันธุ์และฝักของกล้วยไม้รองเท้านารี และขอบคุณนักศึกษา เจ้าหน้าที่ ทุกท่าน ที่มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา ที่ช่วยเหลือและดูแลทุกอย่างเมื่อคณะทำงานได้ไปทำการปฏิบัติงาน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ ทั้งในความรู้ด้านกายวิภาคการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลง (developmental anatomy and differentiation) ตลอดจนความรู้เกี่ยวกับแผนการเจริญของกล้วยไม้ เพื่อที่จะสามารถปรับปรุงและต่อยอดงานวิจัย และเพื่อแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดจากกระบวนการเพาะเลี้ยงต่อไปได้ หรือประยุกต์ใช้ในกลุ่มกล้วยไม้ชนิดอื่นๆต่อไป หากรายงานมีข้อบกพร่องประการใดคณะผู้วิจัยขออภัยมา ณ. โอกาสนี้

ผศ.ดร. อุปัทม์ภ มีสวัสดิ์

รศ. ดร. ครรชิต ธรรมศิริ

เมษายน 2554

242380

บทคัดย่อ

ทำการชักนำแคลลัสกล้วยไม้รองเท้านารีจากเมล็ดและเพิ่มปริมาณแคลลัสที่มีอยู่เดิมบนอาหารสูตร CIM ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร PLBIM ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครส 10 % สามารถเกิดเป็นโพโทคอร์มไลด์บอดีได้ดีกว่าสูตรอาหาร PLBIM ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตใดๆแม้ว่าจะมีหรือไม่มีน้ำตาลซูโครส การเพาะเลี้ยงโพโทคอร์มไลด์บอดีบนอาหารสูตร SLIM ร่วมกับสารอินทรีย์ (โดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้วยหอม) สามารถพบการเจริญเป็นต้นอ่อนได้ดี ส่วนอาหารสูตร SLIM ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่เหมาะกับระยะการเจริญเป็นต้นอ่อน การเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชด้วยวิธี vitirfication โดยเก็บในรูปแบบแคลลัสไม่ประสบความสำเร็จเมื่อเปรียบเทียบกับ การเก็บรักษาในรูปแบบโพโทคอร์มไลด์บอดี การแช่โพโทคอร์มไลด์บอดีในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 120 นาที ก่อนนำไปเก็บในอุณหภูมิต่ำ สามารถเก็บรักษาสารคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์ไว้ได้ และมีแนวโน้มที่เซลล์สามารถมีชีวิตอยู่และเจริญเติบโตต่อไปได้หลังการเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ การตรวจสอบสารจำเป็นต่อการเจริญเติบโตชนิดอื่นควรมีการปรับปรุง

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ii
บทคัดย่อ	iii
สารบัญ	iv
รายการตาราง	v
รายการตารางภาคผนวก	vi
รายการภาพ	vii
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	viii
1. บทนำ	1
2. บทตรวจเอกสาร	3
2.1. ข้อมูลทั่วไปของกล้วยไม้รองเท้านารี	3
2.2. ข้อมูลสิทธิบัตร	6
2.3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
3. วิธีการทดลอง	11
4. ผลการทดลอง	20
5. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	34
6. เอกสารอ้างอิง	41
7. ภาคผนวก	49

รายการตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นแคลลัสและโพโทคอร์ม หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน บนอาหารแข็งสูตร CIM	22
ตารางที่ 2 แสดงน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และความเขียวสดของ PLBs หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน บนอาหารแข็งสูตร PLBIM	24
ตารางที่ 3 ผลของน้ำตาลซูโครสและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดโพโทคอร์มไลค์บอดีของแคลลัสกล้วยไม้รองเท้านารีชาวดุสิต หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน	25
ตารางที่ 4 ผลของไขมันฝรั่งบดและกล้วยหอมบดต่อการเจริญของโพโทคอร์มไลค์บอดีไปเป็นต้นของกล้วยไม้รองเท้านารีชาวดุสิต หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน	28

รายการตารางภาคผนวก

	หน้า
ตารางที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949)	49
ตารางที่ 2 องค์ประกอบของอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)	50
ตารางที่ 3 องค์ประกอบของอาหารสูตร Knudson C (Knudson, 1946)	51
ตารางที่ 4 สูตรน้ำยาดังน้ำออกจากเซลล์พืช 12 ขั้นตอน	52

รายการภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกกล้วยไม้รองเท้านารี	5
ภาพที่ 2 ไดอะแกรมแสดงแผนการทดลอง	12
ภาพที่ 3 แสดงลักษณะแนวโน้มการเกิดไฟโรโทคอร์มหลังการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีชาวสตูลบนอาหารสูตร CIM	20
ภาพที่ 4 แสดงการเกิดเป็นแคลลัสและต้นหลังการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นเวลา 4 เดือน	21
ภาพที่ 5 แสดงแคลลัสที่มีอยู่แล้ว เพื่อใช้ทำการศึกษา	23
ภาพที่ 6 แสดงไฟโรโทคอร์มไลค์บอดี หลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือนบนอาหารแข็งสูตร PLBIM ร่วมกับ 0.5 mg/l TDZ และ 0.1 mg/l NAA	24
ภาพที่ 7 แสดงลักษณะไฟโรโทคอร์มไลค์บอดีของกล้วยไม้รองเท้านารีชาวสตูลหลังการเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 4 เดือน บนอาหารสูตร PLBIM ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครส	26
ภาพที่ 8 แสดงไฟโรโทคอร์มไลค์บอดี หลังการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร PLBIM (สูตรเดิม) เป็นเวลา 1-2 เดือน	27
ภาพที่ 9 แสดงลักษณะต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีชาวสตูล หลังจากเพาะเลี้ยง 29 ไฟโรโทคอร์ม-ไลค์บอดีบนอาหารสูตร SLIM นาน 4 เดือน	29
ภาพที่ 10 แสดงต้นอ่อนที่เจริญจากไฟโรโทคอร์มไลค์บอดี	29
ภาพที่ 11 แสดงลักษณะต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีชาวสตูลที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SLIM ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล.	30
ภาพที่ 12 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงลักษณะของไฟโรโทคอร์มไลค์บอดีและสารคาร์โบไฮเดรต ก่อนและหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ	31
ภาพที่ 13 แสดงสารสะสมประเภทคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์ของไฟโรโทคอร์มไลค์บอดี	33

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2iP	=	2-isopentyladenine
AC	=	Activated charcoal
BA	=	6-benzyladenine
BAP	=	6-benzylamino purine
IAA	=	Indole-3-acetic acid
IBA	=	Indole-3-butyric acid
NAA	=	1-naphthaleneacetic acid
TDZ	=	Thidiazuron