

ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการพัฒนาตาข้างของวานิลลา (*Vanilla planifolia* Andr.)
Effects of Culture Media on the Development of Lateral Buds of Vanilla
(*Vanilla planifolia* Andr.)

ธารทิพย์ เพชรบูรณ์ ^{1/}
Tharntip Pecharaburanin ^{1/}

ABSTRACT

The lateral buds of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.) were cultured to induce the maximum number of multiple shoot buds at the laboratory of Biotechnology Research and Development Office during 1999-2001. The experiment was designed as CRD with 6 treatments and 10 replications. The lateral buds grown on Murashige and Skoog (MS) media supplemented with 0,1,2,3,4 and 5 mg/l of BA+0.6 mg/l of NAA were assessed to determine the media induced multiple shoot buds, the maximum number of shoot buds initiation and development. The highest number of shoot buds produced 14 shoots per lateral bud, the means of shoot length and leaf number per shoot were 2.41 cm and 3.2 leaves, and the greenish of vigorous shoots from MS+BA 3 mg/l + NAA 0.6 mg/l medium after 10 months in culture. Multiple shoot buds were sub-cultured of the microcutting on MS+BA 3 mg/l + NAA 0.6 mg/l + activated charcoal 2 gm/l medium to induce rooting and vigorous plantlets for transplanting to the greenhouse. In vitro culture techniques can be propagated for the production of a large number of plantlets from 1 bud at a short time.

Key words : vanilla, culture media, lateral bud, development

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงตาข้างวานิลลาพันธุ์แพลนนิโฟเลีย (Planifolia) เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในเวลาสั้น ในสภาพห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.10900

^{1/} Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

การเกษตร ระหว่างปี พ.ศ. 2542-2544 โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี (สูตรอาหาร) 10 ซ้ำ ใช้สูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige และ Skoog (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA อัตรา 1,2,3,4 และ 5 มก./ลิตร ร่วมกับการใช้ NAA 0.6 มก./ลิตร และการใช้สูตรอาหาร Murashige และ Skoog อย่างเดียวเป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าการเพาะเลี้ยงตาข้างวานิลลาบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 3 มก./ลิตรกับ NAA 0.6 มก./ลิตร เกิดตายอดจำนวนมากและพัฒนาเป็นยอดได้ดีที่สุดคือ 14 ยอดต่อตาข้าง มีความยาวของยอด 2.41 ซม. และจำนวนใบ 3.2 ใบต่อยอด เมื่ออายุได้ 10 เดือน ยอดมีลักษณะอวบอ้วนแข็งแรงสีเขียวเข้ม นำยอดที่ได้ไปแยกขยายเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม และเติมผงถ่าน (activated charcoal) 2 กรัม/ลิตร เพื่อช่วยให้ต้นและรากเจริญเติบโตแข็งแรงได้เร็ว พร้อมนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ วิธีนี้สามารถขยายพันธุ์ได้ต้นจำนวนมากจาก 1 ตา ในเวลารวดเร็วกว่าการปักชำ

คำหลัก : วานิลลา อาหารเพาะเลี้ยง ตาข้าง การพัฒนา

คำนำ

วานิลลา (*Vanilla planifolia* Andr.) เป็นพืชวงศ์กล้วยไม้ (Orchidaceae) และมีคุณสมบัติเป็นพืชเครื่องเทศชนิดหนึ่ง ลำต้นเป็นเถาเลื้อย มีถิ่นกำเนิดในประเทศเม็กซิโก เป็น

กล้วยไม้ชนิดเดียวที่สามารถนำฝักมาใช้ประโยชน์ได้ โดยนำฝักมาหมักและบ่มให้เกิดกลิ่นหอม และมีรสชาติแล้วนำฝักไปสกัดสาร สารที่สกัดได้คือ กลูโควานิลลิน (glucovanillin) นำไปปรุงแต่งกลิ่นและรสอาหาร เช่น ไอศกรีม ช็อกโกแลต เบเกอรี่ ขนมหวานต่างๆ รวมทั้งเครื่องดื่มบรันดี เป็นต้น นอกจากนั้นยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอางบางชนิด และน้ำหอม (พิทยา, 2529 ; Anon,1981)

ประเทศไทยได้นำเข้าผลิตภัณฑ์วานิลลา มาใช้บริโภคภายในประเทศ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี เนื่องจากการปลูกภายในประเทศมีปริมาณน้อย และยังไม่แพร่หลายเหมือนพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น จึงควรส่งเสริมขยายการปลูกให้มากขึ้น และเพียงพอกับความต้องการภายในประเทศ ในอนาคตถ้าได้รับการพัฒนาอาจผลิตปลูกเป็นการค้าได้ เพราะประเทศไทยสามารถปลูกพืชชนิดนี้ได้ดี ซึ่งได้มีการปลูกทดลองที่สถานีทดลองและศูนย์วิจัยของสถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร เช่น ศูนย์บริการวิชาการ ด้านพืชและปัจจัยการผลิตตาก ศูนย์วิจัยพืชสวน จันทบุรีและศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ซึ่งให้ผลผลิตสูง วานิลลาเป็นพืชที่มีศักยภาพและราคาแพง ราคาฝักที่บ่มแห้งแล้ว 1,000–15,000 บาท/กก. วานิลลาที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันมีอยู่ 3 พันธุ์คือพันธุ์แพลนนิโฟเลีย (*Planifolia*) พันธุ์ปอมโปมา (*Pompoma*) และพันธุ์ตาฮาเทนซิส (*Tahatensis*) แต่พันธุ์ที่นิยมปลูกกันเป็นส่วนมาก คือพันธุ์แพลนนิโฟเลีย เพราะเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง และคุณภาพของฝักดีที่สุด วานิลลาเป็นพืชที่

ขยายพันธุ์ได้ช้าและยากกว่ากล้วยไม้ทุกชนิด เนื่องจากเป็นพืชที่มีน้ำยางมากอยู่ภายในลำต้น เวลานำไปปักชำทำให้การเจริญเติบโตช้า โดยทั่วไปการขยายพันธุ์ทำได้ด้วยการปักชำโดยใช้เถา ยาวประมาณ 50-90 ซม. จึงทำให้การขยายพันธุ์ ได้ปริมาณน้อยและช้าไม่เพียงพอกับความต้องการ เพราะการเจริญเติบโตช้ากว่าจะได้ต้นที่มีเถายาว พอที่จะตัดได้ (วรารุณ, 2536) ดังนั้น การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงเป็นแนวทางหนึ่ง ที่จะช่วยเพิ่มปริมาณต้นให้ได้จำนวนมากใน เวลาที่รวดเร็วขึ้นกว่าการใช้เถาปักชำ

การขยายพันธุ์วานิลลาด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผลการทดลองที่ผ่านมายังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร คืออาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงยังไม่เหมาะสมต่อการเกิดยอดจำนวนมากได้ อีกทั้งการทดลองเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลลา ยังมีไม่มากเหมือนกับพืชชนิดอื่นๆ ฉะนั้น จึงได้ทำการศึกษาส่วนประกอบของอาหาร ที่ใช้เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และพัฒนาตาข้างของวานิลลา เพื่อให้ได้ปริมาณยอดจำนวนมากในเวลารวดเร็ว โดยทำการเพาะเลี้ยงตาข้างวานิลลาบนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (1962) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ประกอบด้วยธาตุอาหารอย่างครบครัน ต่อการเจริญเติบโตของพืชในปริมาณที่เหมาะสมกว่าสูตรอาหารชนิดอื่นๆ และยังเป็นสูตรอาหารที่ใช้กับพืชได้เกือบทุกชนิด นอกจากนั้น ยังขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ผสมในสูตรอาหารให้เหมาะสมกับชนิดของพืชทดลองด้วย สำหรับการทดลองครั้งนี้ได้ใช้

สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้โดยทั่วไปกับพืชทุกชนิด เพราะว่าเป็นสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การขยาย และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ดี (Skoog and Miller, 1957) สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวานิลลา ยังไม่มีการทดลองที่ชี้ชัดได้ว่าใช้ปริมาณเท่าไร ที่จะช่วยทำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ จึงได้ทดลองใช้ในอัตราตั้งแต่ 1-5 มก./ลิตร ซึ่ง Hitoshi และคณะ (1980) ได้ทำการทดลองกับถั่วเหลืองโดยใช้ BA ในอัตรา 1-5 มก./ลิตร ซึ่งเป็นพืชไม้เนื้ออ่อนเช่นเดียวกัน และเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่ไม่มีผลยับยั้งการพัฒนาราก ส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เป็นสารที่นิยมนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดรากโดยกระตุ้นให้เซลล์บริเวณ vascular cambium มีการแบ่งตัวซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดราก และ NAA เป็นสารที่มีฤทธิ์ของออกซิน (auxin) สูง ถ้าใช้ในความเข้มข้นสูงอาจยับยั้งการเกิดรากได้ (Arteca, 1996) สำหรับการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ NAA อัตรา 0.6 มก./ลิตร ซึ่งเป็นอัตราที่เหมาะสมต่อการงอกของรากกล้วยไม้รองเท้านารี (Huang, 1988) และวานิลลา ก็เป็นพืชวงศ์กล้วยไม้เช่นกัน จึงได้นำมาใช้ในอัตราเดียวกัน ส่วนตาข้างที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงเนื่องจากเป็นส่วนที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญเป็นตา ยอด และจุดกำเนิดใบเป็นส่วนใหญ่ (Gamborg and Wetter, 1975) นอกจากนั้นบนลำต้นมีตาข้างมากกว่าตา ยอด ซึ่งสามารถนำมาทดลองเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ได้ในปริมาณที่มากกว่าด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

นำเถาส่วนยอดวานิลลาที่สมบูรณ์แข็งแรงและปราศจากโรคให้มีข้อติดมา 3 ข้อนับจากยอด ตัดใบออกให้หมดและตัดเป็นท่อนๆ แต่ละท่อนให้มีตา 1 ตายาวประมาณ 1.5 ซม. นำไปล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาและแช่ในน้ำยาล้างผัก 30 นาที ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงพอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ 10% และ 5% ที่เติมสารจับผิวใบ Tween - 20 2-3 หยด แช่ยาวท่อนเป็นเวลานาน 15 และ 10 นาที ตามลำดับ ล้างท่อนพันธุ์ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชือนาน 5 นาที 3 ครั้ง นำมาตัดแต่งเอาส่วนที่ได้รับความเสียหายจากการพอกฆ่าเชื้อออกให้เหลือท่อนพันธุ์มีตาข้างบริเวณข้อยาว 1 ซม. นำไปแช่ในส่วนผสมของ citric acid 150 มก./ลิตร กับ ascorbic acid 150 มก./ลิตร เป็นเวลา 30 นาที เพื่อยับยั้งการปล่อยน้ำยางออกมาของท่อนพันธุ์ (Torres, 1989) ล้างท่อนพันธุ์ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อจากนั้นนำไปปลูกบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (1962) ที่ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโต 6-Benzyladenine (BA) และ Naphthalene acetic acid (NAA) มี 6 สูตร คือ

1. MS (control)
 2. MS+BA 1 มก./ลิตร+NAA 0.6 มก./ลิตร
 3. MS+BA 2 มก./ลิตร+NAA 0.6 มก./ลิตร
 4. MS+BA 3 มก./ลิตร+NAA 0.6 มก./ลิตร
 5. MS+BA 4 มก./ลิตร+NAA 0.6 มก./ลิตร
 6. MS+BA 5 มก./ลิตร+NAA 0.6 มก./ลิตร
- อาหารทั้ง 6 สูตรปรับ pH ที่ 5.6 ก่อน

หนึ่งฆ่าเชื้อ หนึ่งที่อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 20 นาที และนำขวดที่ปลูกเพาะเลี้ยงเสร็จแล้ววางบนชั้นที่ให้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ 16 ชม./วัน อุณหภูมิ 24° - 26°ซ เปลี่ยนอาหารใหม่ให้กับพืชทุกๆ 3 วันในระยะแรกเป็นเวลา 1 เดือน เพื่อให้สีน้ำตาลเกิดกับอาหารเพาะเลี้ยงน้อยที่สุด ซึ่งจะเป็นพิษกับเนื้อเยื่อพืช หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกสัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี (สูตรอาหาร) 10 ข้ำ บันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของตาข้างวานิลลาในอาหารทั้ง 6 สูตร คือ การอยู่รอดของท่อนพันธุ์ การเกิดขึ้นของสีน้ำตาล (browning) การพัฒนาของตา จำนวนยอด ความยาวยอด ลักษณะของยอด ลักษณะการเกิดรากและความแข็งแรงของต้นพร้อมที่จะนำออกปลูก ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ระหว่าง พ.ศ. 2542 - 2544

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเจริญเติบโตและพัฒนาของตาข้าง

การเพาะเลี้ยงตาข้างวานิลลาลงบนอาหารสังเคราะห์ทั้ง 6 สูตร เมื่ออายุได้ 6 เดือน พบว่าจะมีลักษณะการเจริญเติบโตและพัฒนาแตกต่างกัน คือ ความมีชีวิตอยู่รอดของตาข้างจะมีชีวิตอยู่รอดได้ทุกตาเหมือนกันในทุกสูตรอาหารยกเว้นสูตรที่ 1 (Table 1) เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงได้ใช้ตาข้างของข้อที่ยังอ่อนและน้ำยางที่มีสาร phenols ออกมาทำปฏิกิริยากับ

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีเพียงเล็กน้อย จึงทำให้เกิดสีน้ำตาลไม่มากนัก ความเป็นพิษกับเนื้อเยื่อจึงน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Claudebon และคณะ(1988) ที่พบว่าบริเวณส่วนยอดของพืชจะมีสาร phenols น้อยกว่าส่วนล่างที่แก่กว่า ซึ่งสารชนิดนี้เป็นตัวที่ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเป็นพิษกับเนื้อเยื่อพืช ทำให้เนื้อเยื่อพืชไม่เจริญเติบโต การป้องกันไม่ให้เกิดสีน้ำตาลกับเนื้อเยื่อหรือให้เกิดน้อยที่สุด โดยการเปลี่ยนอาหารใหม่บ่อยๆ จนกว่าน้ำยางจะหยุดไหลหรือผสมผงถ่าน (activated charcoal) ลงไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง เพื่อช่วยดูดซับสาร phenols ไม่ให้ทำปฏิกิริยากับอาหาร (Johansson,1983)

ข้อดีของการที่มีสาร phenols ในระดับต่ำและอยู่ในระหว่างการเกิดยอดมีผลช่วยสนับสนุนในการเกิดขึ้นของรากได้ด้วย (Fadi et al.,1979) นอกจากนั้นสีของตาข้างที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีสีเหลือง ซึ่งแตกต่างกับสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีสีเขียวทุกสูตรและสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 3 และ 4 มก./ลิตร มีสีเขียวเข้มกว่าทุกสูตรอาหาร สำหรับสูตรอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตตาข้างจะไม่พัฒนาและมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กที่สุดคือ 0.21 ซม. เท่านั้น ซึ่งแตกต่างกับทุกสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือตาข้างจะพัฒนาขยายขนาดโตขึ้น และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแตกต่างกันตามนัยทางสถิติ (Table 1) สูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการ

เจริญเติบโต BA 4 มก./ลิตร กับ NAA 0.6 มก./ลิตร ตาข้างมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ที่สุดคือ 1.51 ซม. ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะว่า BA มีคุณสมบัติกระตุ้นการขยายขนาดและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ จึงทำให้ตาข้างมีขนาดใหญ่เมื่อใช้ในอัตราที่เหมาะสมกับความต้องการของพืช ซึ่งตาที่อุดมสมบูรณ์และมีขนาดใหญ่เจริญเติบโตเร็วและมีอัตราการรอดตายสูง สำหรับสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 3 มก./ลิตร กับ NAA 0.6 มก./ลิตร ตาข้างมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.22 ซม.

การเกิดตายอด

การเพาะเลี้ยงตาข้างบนสูตรอาหารที่เติม BA 3 มก./ลิตร กับ NAA 0.6 มก./ลิตร ชักนำให้เกิดตายอดเป็นจำนวนมาก (Figure 1) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Das และคณะ (1996) ที่พบว่าตาข้อที่ได้จากยอดอ่อนจะให้ปริมาณยอดมากกว่าชิ้นส่วนอื่นๆ และตายอดจะพัฒนาเกิดเป็นยอดจำนวนมากที่สุดโดยเฉลี่ย 14 ยอดต่อตาข้าง (Figure 2c) และมากกว่าทุกสูตรอาหารซึ่งให้ยอด 1 ยอดต่อตาข้างเท่านั้น (Table 2) ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะว่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมี BA และ NAA ในอัตราที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และการเกิดตายอดเป็นจำนวนมากได้ดีที่สุด ซึ่งการทดลองของ Ringe และ Nitsch (1968) ที่พบว่า BA เพียงอย่างเดียวไม่สามารถกระตุ้นการเกิดตายอดจำนวนมากได้ ต้องมี NAA ในอัตราที่เหมาะสมต่อชนิดของพืชด้วย สำหรับตาข้างที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร

ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีสีเหลืองและตายไปเมื่ออายุได้ 10 เดือน

ส่วนความยาวของยอดและจำนวนใบต่อยอดนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 3,4 มก./ลิตร และ NAA 0.6 มก./ลิตร จะมีความยาวของยอด 2.41 และ 2.45 ซม. และจำนวนใบ 3.2 และ 3.5 ใบต่อยอดตามลำดับ ยอดจะอวบอ้วนแข็งแรงสีเขียวเข้ม (Figure 2c) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มก./ลิตร และ NAA 0.6 มก./ลิตร มีความยาวของยอดต่ำที่สุดคือ 1.65 ซม. และจำนวนใบ 2 ใบต่อยอด ยอดจะพอมเล็ก จากนั้น

นำยอดที่ได้จากสูตรที่ 4 ไปแยกขยายเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 3 มก./ลิตร NAA 0.6 มก./ลิตร และผงถ่าน 2 ก./ลิตร จะได้ต้นกล้าที่แข็งแรงพร้อมรากจำนวนมาก เพื่อขยายพันธุ์ปลูกต่อไปในเวลาที่เหมาะสมกว่าการปักชำ (Figure 3a)

การเติมผงถ่านลงไปในการเพาะเลี้ยงเพื่อช่วยอัตราการเกิดรากและทำให้ต้นแข็งแรงพร้อมที่จะนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้ (อารีย์, 2541) การชักนำให้เกิดยอดโดยไม่ผ่านการเกิดเป็นแคลลัสก่อน จะทำให้ได้ต้นที่ตรงตามพันธุ์เหมาะที่จะนำไปขยายพันธุ์เพื่อให้ได้พืชพันธุ์แท้ตามต้องการ

Table 1. Effect of different medias on stimulation of lateral bud formation after 6 months in culture

Media	Percent responded	Phenol levels	Observation of buds (cm)	Diameter (cm)
1. MS (Control)	0	+	Most buds turned yellow	0.21 f
2. MS+BA 1.0 mg/l + NAA 0.6 mg/l	100	+	Buds remained green and any proliferation	0.70 e
3. MS+BA 2.0 mg/l + NAA 0.6 mg/l	100	+	Buds remained green and little proliferation	0.75 d
4. MS+BA 3.0 mg/l + NAA 0.6 mg/l	100	+	Buds more vigorous proliferation and subsequent induced the multiple shoot bud cluster	1.22 b
5. MS+BA 4.0 mg/l + NAA 0.6 mg/l	100	+	Buds more vigorous proliferation followed by shoot bud formation	1.51 a
6. MS+BA 5.0 mg/l + NAA 0.6mg/ l	100	+	Proliferation of buds followed by shoot bud formation	0.81 a
CV (%)		2.5		

Phenol levels

– = no browning ++ = medium browning
+ = little browning +++ = most browning

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

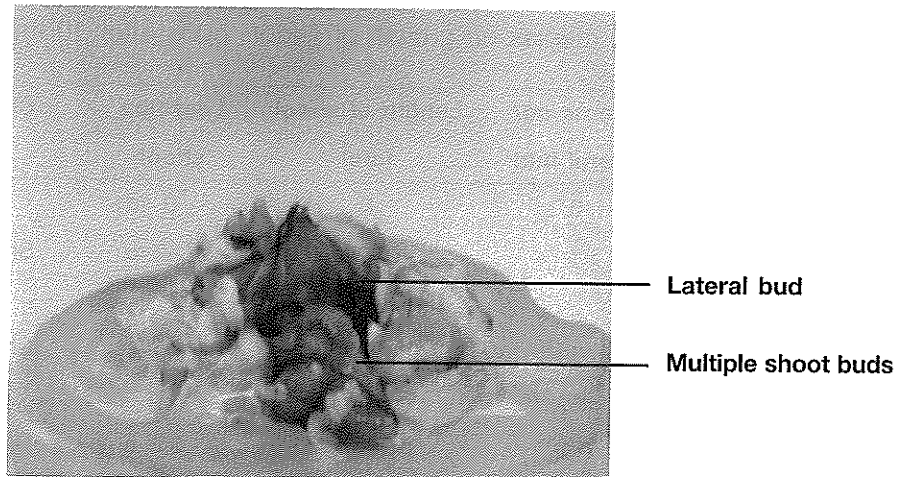


Figure 1. Formation of multiple shoot bud in lateral bud cultures of vanilla on MS+BA 3.0 mg/l + NAA 0.6 mg/l media after 6 months

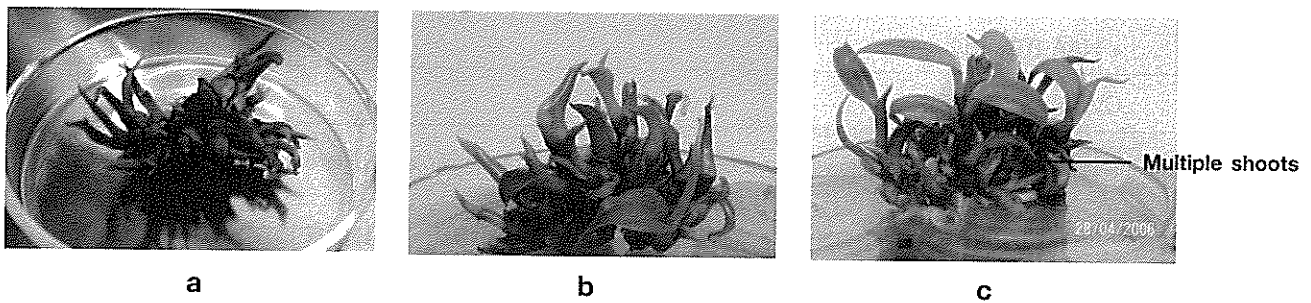


Figure 2. Multiple shoot bud development after 8 (a), 9 (b) and 10 months (c) in culture

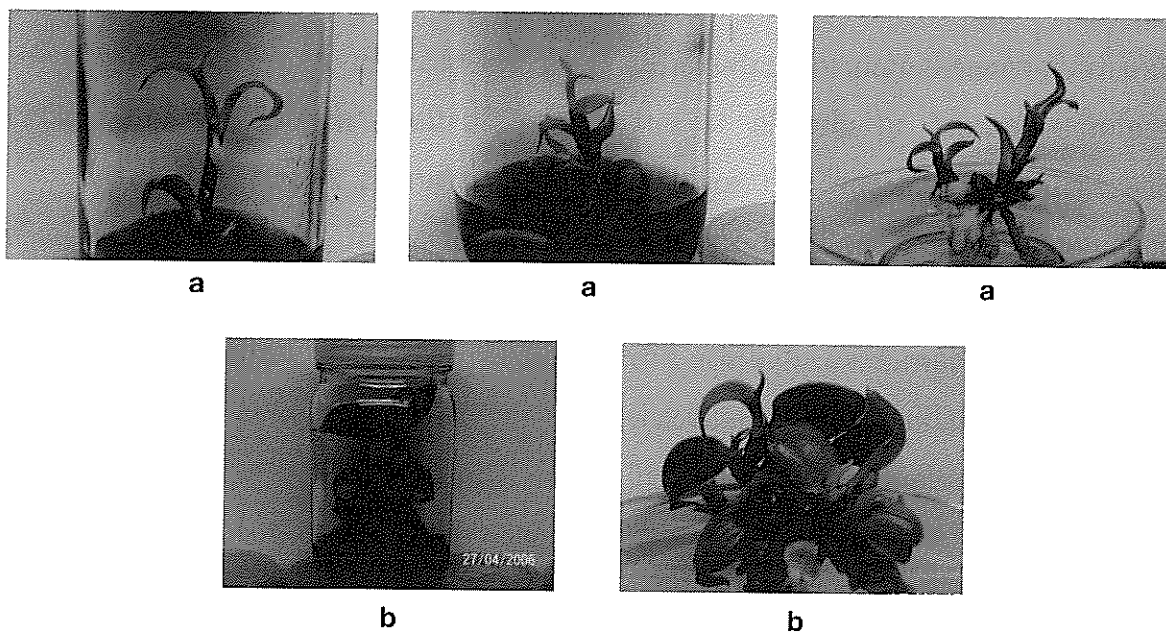


Figure 3. Plantlet with developing roots grown on MS+BA 3.0 mg/l + NAA 0.6 mg/l + activated charcoal 2 gm/l media after 12 (a) and 14 months (b) in culture

Table 2. Effect of different medias on growth of shoot buds after 10 months in culture

Media	Shoots no/ lateral bud	Length of shoot (cm)	Leaf no./ shoot	Characteristic of shoot observation
1. MS (Control)	0	0 d	0 d	-
2. MS + BA 1.0 mg/l + NAA 0.6 mg/l	1	1.65 c	2.0 c	Short and thin
3. MS + BA 2.0 mg/l + NAA 0.6 mg/l	1	1.95 b	2.5 b	Short and thin
4. MS + BA 3.0 mg/l + NAA 0.6 mg/l	14	2.41 a	3.2 a	Big and plump
5. MS + BA 4.0 mg/l + NAA 0.6 mg/l	1	2.45 a	3.5 a	Big and plump
6. MS + BA 5.0 mg/l + NAA 0.6 mg/l	1	1.98 b	2.6 b	Short and thin
CV(%)	-	7.7	18.9	

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงตาข้างวานิลลาบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 3 มก./ลิตร กับ NAA 0.6 มก./ลิตร ชักนำให้เกิดตายอดจำนวนมากและพัฒนาเป็นยอดได้ที่สุดเมื่ออายุได้ 10 เดือน คือ 14 ยอดต่อตาข้างมีความยาวของยอด 2.41 ซม. และจำนวนใบ 3.2 ใบ/ยอด ยอดมีลักษณะอวบอ้วนแข็งแรงสีเขียวเข้ม นำยอดที่ได้ไปแยกขยายเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมและเติมผงถ่าน 2 ก./ลิตร เพื่อช่วยให้ต้นและรากเจริญเติบโตแข็งแรงได้เร็วพร้อมนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติวิธีนี้สามารถขยายพันธุ์ได้ต้นจำนวนมากจาก 1 ตาในเวลารวดเร็วกว่าการปักชำ

เอกสารอ้างอิง

- พิทยา สรวมศิริ. 2529. วานิลลา: พืชเครื่องเทศ. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 209 หน้า.
- วรารุช ชูธรรมรัช. 2536. เอกสารวิชาการเรื่อง วานิลลา. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 22 หน้า.
- อารีย์ วรรณวุฒิก. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา. 60 หน้า.
- Anon. 1981. *Vanilla Production in Solomon Islands Feasibility Studies*. Food and Agriculture Organization (FAO) of the

- United Nations, No. RAPA 49, Bangkok. 32 p.
- Arteca, R.N.1996. *Application Growth Substances*. The Pennsylvania State University. International Thomson Publishing, New York. 332 p.
- Claudebon, M., M., Gendraud, and A., Franclet. 1988. Roles of phenolic compounds on micropropagation of juvenile and mature clones of *Sequoiadendron giganteum*: influence of activated charcoal. *Scientia Hortic.* 34 : 283 -291.
- Das, s., A.J., Abbott, and K.C., Hall. 1996. In vitro plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L. *Plant Cell Rep.* 15 : 615-619.
- Fadl, M.S., S.A., Sari El Deen, and M.A., El Madhy. 1979. Physiological and chemical factors controlling adventitious root initiation in carob *Ceratonia siliqua* L. stem cutting. *Egypt. J. Hortic.* 6 : 55-68.
- Gamborg, O.L. and L.R.,Wetter. 1975. *Plant Tissue Culture Methods*. Ottwa : National Res. Council of Canada. 254 p.
- Hitoshi,s., H., Thanh, Vogui-Dinh, and Tsai-Ying Cheng. 1980. Stimulation of multiple shoot formation on soybean stem nodes in culture. *Plant Sci. Letters*, 19 : 193-201.
- Huang, L.C. 1988. A procedure for asexual multiplication *Paphiopedilums* in vitro. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 57:274-278.
- Johansson, L. 1983. Effects of activated charcoal in anther cultures. *Plant Physiol.* 59 : 397- 403.
- Murashige,T. and F., Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15 : 473 - 497.
- Ringe. F. and J.P. Nitsch. 1968. Effect of growth substances on the development of shoots from axillary bud. *Plant Cell Physiol.* 9 : 639-652.
- Skoog, F. and C.O., Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. symp.soc. *Expt. Biol.* 11 : 118-131.
- Torres, K.C. 1989. *Tissue culture techniques for horticultural crops*. van Nostrand Reinhold. Cumming Publishing Company, Inc. 346 p.