

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้ง (*Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fischer) ในสภาพปลอดเชื้อ

Effects of Plant Growth Regulator on *in vitro* culture of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fischer

ธวัชชัย ทรัพย์ธีระ (Tawatchai Subthira)^{1*} สุภาพ สุนทรนนท์ (Suphap Suntaranond)**
ดร.สมนทิพย์ บุนนาค (Dr.Sumontip Bunnag)***

บทคัดย่อ

ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเอื้องสายล่องแล้งในหลอดทดลองเพื่อชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มบนอาหารสังเคราะห์ 1/2Murashige and Skoog (1/2MS) โดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มก./ล. เลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าการเพิ่มจำนวนโพรโทคอร์มในอาหาร 1/2MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มได้ดีที่สุดคือ 0.43 กรัม และเมื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ต่อการชักนำให้โพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้งเจริญเป็นต้น โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0, 1 และ 2 มก./ล. ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0, 1 และ 2 มก./ล. พบว่าเติม BA 2 มก./ล. และ NAA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดคือ 180 ยอด อาหารที่ชักนำให้ต้นสูงมากที่สุดคืออาหาร 1/2MS ที่เติม BA 1 มก./ล. และ NAA 2 มก./ล. สามารถชักนำให้ต้นสูงมากที่สุดเท่ากับ 0.93 ซม. ส่วนอาหารที่ชักนำให้เกิดรากมากที่สุดคืออาหาร 1/2MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้เกิดรากมากที่สุดคือ 8.44 ราก และอาหารที่ชักนำให้เกิดรากยาวที่สุดคืออาหาร 1/2MS ที่เติม NAA 1 มก./ล. ให้ความยาวรากคือ 0.60 ซม. ในระยะ 4 เดือน จึงนำอาหารสูตรนี้ไปประยุกต์ชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มและเจริญเป็นต้น เพื่อใช้ในการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ABSTRACT

The present study was established to improve the regeneration of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fischer. Experiments were performed to determine the effect of BA (0, 0.5, 1, 1.5 and 2 mg/L) on the protocorms proliferation. After 2 months, the highest protocorms proliferation of *D. aphyllum* was 0.43 g when cultured on a 1/2Murashige and Skoog (1/2MS) without growth regulator. The highest numbers of shoots per protocorms (180 shoots) was successfully regenerated on 1/2MS medium enriched with 2 mg/L BA and 2 mg/L NAA and

¹ Correspondent author: thaymcs@yahoo.com

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** นักวิชาการระดับ 8 สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ

*** รองศาสตราจารย์ ศูนย์อนุกรมวิธานประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

the highest shoot elongation (0.93 cm) was observed on $\frac{1}{2}$ MS medium enriched with 1 mg/L BA and 2 mg/L NAA. The $\frac{1}{2}$ MS medium without growth regulator induced highest shoot formation of *D. aphyllum* (8.44 roots), whereas $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented 1 mg/L NAA induced the highest root elongation (0.60 cm) after 4 months of culture

คำสำคัญ : กกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล่ง โพรโทคอร์ม การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Key Words : *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fischer, Protocorms, Tissue culture

บทนำ

ประเทศไทยมีความหลากหลายของกล้วยไม้เป็นจำนวนมาก ทั้งกล้วยไม้ป่าและกล้วยไม้ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งกล้วยไม้ป่าในปัจจุบันได้ถูกทำลายโดยการทำลายป่าและลักลอบขนออกมาจำหน่าย ทำให้ปริมาณกล้วยไม้ป่าลดลงอย่างรวดเร็ว งานวิจัยนี้ได้นำเอื้องสายล่องแล่ง (ภาพที่ 1) เป็นกล้วยไม้ป่าชนิดหนึ่ง ซึ่งมีลักษณะต้นเป็นลำพอม ยาวได้ถึง 100 ซม. ส่วนปลายเรียว เส้นผ่าศูนย์กลางต้น 0.5-1 ซม. ใบรูปไข่แกมรูปรีขนาด 5-7 x 2-2.5 ซม. ปลายแหลมมน แผ่นใบ บางและร่วงก่อนถึงฤดูดอก ดอกเกิดตามข้อ ข้อละ 1-2 ดอก เกือบตลอดต้น ขนาดดอก 3-4 ซม. มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ สวยงาม [1] มาเพิ่มจำนวนโดยใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ วิธีนี้จะช่วยในการขยายพันธุ์พืชให้ได้ในปริมาณมากและใช้ระยะเวลาสั้น เพราะปกติผักกล้วยไม้ในธรรมชาติเมื่อแก่จะแตกออก เมล็ดภายในฝักจะปลิวกระจายออกจากฝัก เมล็ดส่วนใหญ่มีโอกาสงอกต่ำเนื่องจากอาหารสะสมในเมล็ดมีน้อยมาก ไม่เพียงพอต่อการงอก หรืออาจได้รับสภาพ แวดล้อมที่ไม่เหมาะสม แต่ Knudson [2] สามารถเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ในอาหารสังเคราะห์ได้เป็นครั้งแรก พบว่าภายหลังจึงมีงานวิจัยค้นคว้าเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ มากมาย การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เพื่อการขยายพันธุ์ ขึ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ส่วนใหญ่เป็นบริเวณที่มีเนื้อเยื่อเจริญของกล้วยไม้ ได้แก่ ปลายยอด ปลายราก ตาข้าง ใบอ่อน ตาที่ก้านช่อดอกอ่อน เป็นต้น [3] มีรายงานการใช้ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงในแต่ละสกุลที่ประสบ

ความสำเร็จแตกต่างกันออกไป เช่น ในกล้วยไม้สกุล *Oncidium* ใช้ส่วนของใบอ่อน [4] และปลายราก [5] สกุล *Cymbidium* ใช้ส่วนของยอด [6, 7] สกุล *Spathoglottis* ใช้ส่วนของปลายใบและตาที่ข้อ [8] สกุล *Doritaenopsis* และ *Phalaenopsis* ใช้ส่วนของตาดอกที่ก้านช่อดอก [9] สกุล *Dendrobium* ใช้ชิ้นส่วนของยอด [6, 10] ปลายราก [6, 7] สกุล *Vanda* ใช้ส่วนปลายยอด [11] สกุล *Paphiopedilum* ใช้ส่วนของใบ [12] และสกุล *Acampe* ใช้ส่วนปลายใบ [13] เป็นต้น การเพาะเมล็ดกล้วยไม้แต่ละชนิดสามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญได้แตกต่างกันในอาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ ซึ่งมีส่วนประกอบของอาหารที่ต่างกันตามความเหมาะสม และจำเป็นต้องใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) หรือฮอร์โมนร่วมด้วย ซึ่งกลุ่มที่นิยมใช้ ได้แก่ กลุ่มออกซินและไซโตไคนิน เพื่อกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชเกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน เจริญพัฒนาเป็นเอ็มบริโอ โพรโทคอร์ม และเป็นต้นในที่สุด ออกซินที่นำมาใช้ในกล้วยไม้ ได้แก่ naphthalene acetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), indole-3-acetic acid (IAA) และ indole-3-butyric acid (IBA) เป็นต้น ส่วนในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ Benzyladenine (BA), benzylaminopurine (BAP) และ 6-furfurylaminopurine (kinetin) เป็นต้น [14] ปริมาณของออกซินและไซโตไคนินที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชิ้นส่วนพืช และจุดประสงค์ของงานวิจัย ยกตัวอย่าง เช่น รายงานวิจัยโดย Teng *et al.* [8] นำส่วนใบของกล้วยไม้ *Spathoglottis plicata* มา

เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ควบคุมปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA พบว่า อัตราส่วนของ NAA ต่อ BA ที่เหมาะสมในการชักนำให้ตาที่ข้อเกิดโพโทคอร์มและชักนำโพโทคอร์มให้เจริญเป็นต้น คือ 12.2 และ 0.3-1.2 ตามลำดับ และธารทิพย์[15]เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์ *Paphiopedilum godefroyae* (Godefr.) Pfitz. บนอาหาร MS ที่ควบคุมปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA พบว่า อัตราส่วนของ NAA ต่อ BA ที่เหมาะสมในการชักนำต้นอ่อนให้เกิดใบและรากได้ดีคือ เติม NAA 0.5 และ BA 2.0 มก./ล. จึงมีการคิดค้นสูตรอาหารและพัฒนาสูตรอาหารขึ้นหลายสูตร เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญพัฒนาของกล้วยไม้แต่ละชนิดซึ่งสูตรอาหารแต่ละสูตรจะมีความแตกต่างกันในองค์ประกอบของธาตุอาหารและปริมาณ สูตรอาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายเป็นจำนวนหลายสายพันธุ์และได้ผลดีได้แก่ สูตร Murashige and Skoog [16] จึงนำอาหารสูตรนี้ไปประยุกต์ชักนำให้เกิดโพโทคอร์มและเจริญเป็นต้นของกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้ง เพื่อใช้ในการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ต่อการเจริญของเนื้อเยื่อกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้ง

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้งให้เจริญเป็นโพโทคอร์ม

ตัดฝักกล้วยไม้ที่ได้จากการผสมตัวเองอายุ 2 เดือน มาทำความสะอาดโดยตัดส่วนหัวและส่วนปลายของฝักกล้วยไม้ออกเล็กน้อย ระวังอย่าให้ฝักกล้วยไม้แตก จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวฝักโดยแช่ในสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ ($\text{Ca}(\text{OCl}_2)$)

ความเข้มข้น 1% (w/v) ที่เติม tween-20 ประมาณ 2-3 หยด แช่เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำฝักกล้วยไม้ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว มาผ่าตามแนวยาว แล้วใช้ปากคีบค่อย ๆ เชี่ยเมล็ดกล้วยไม้ลงในอาหารสังเคราะห์สูตร $1/2$ Murashige and Skoog ($1/2\text{MS}$) ที่มีน้ำตาล 20 ก./ล. และผงวุ้น 8 ก./ล. pH 5.5-5.8 เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสงประมาณ $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 1 เดือน เมื่อเมล็ดงอกจะสังเกตเห็นเมล็ดมีสีเขียวอ่อน เพาะเลี้ยงต่อไปจนกระทั่งเมล็ดเจริญเป็นโพโทคอร์ม ย้ายโพโทคอร์มขนาด 2-3 มม. จำนวน 1 โพโทคอร์มไปเลี้ยงบนอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร $1/2\text{MS}$ เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่า เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเดียวกันกับเลี้ยงบนอาหารแข็ง เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อนำโพโทคอร์มที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ต่อการเพิ่มจำนวนโพโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้ง

นำโพโทคอร์มขนาด 2-3 มม. ต่อ 1 ขวดอาหาร เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร $1/2\text{MS}$ ที่มีน้ำตาล 20 ก./ล. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มก./ล. รวมทั้งหมด 5 ระดับ ๆ ละ 10 ข้าง เติมผงวุ้น 8 ก./ล. pH 5.5-5.8 เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสงประมาณ $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน บันทึกผลโดยชั่งน้ำหนักโพโทคอร์มที่ได้และนำไปคำนวณหาน้ำหนักโพโทคอร์มที่เพิ่มขึ้นต่อน้ำหนัก โพโทคอร์มเริ่มต้น 0.1 กรัม

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ต่อการชักนำให้โพโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้งเจริญเป็นต้น

เพาะเลี้ยงโพโทคอร์มของกล้วยไม้ ขนาด 2-3 มม. ต่อ 1 ขวดอาหาร บนอาหารสังเคราะห์สูตร

$1/2MS$ ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0, 1 และ 2 มก./ล. ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0, 1 และ 2 มก./ล. ตามลำดับ รวมทั้งหมด 9 ระดับ ๆ ละ 10 ซ้ำ เปรียบเทียบผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต และการชักนำให้โพรโทคอร์มกลายไม้เจริญเป็นต้น โดยทำการทดลองเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มในอาหารสูตรต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}C$ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสงประมาณ $40 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ เป็นเวลา 4 เดือน จากนั้นทำการบันทึกผลเปรียบเทียบผลการทดลองโดยสังเกตการเจริญเติบโต วัดความสูงของต้น นับจำนวนยอดนับจำนวนราก และวัดความยาวราก

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม SPSS 16.0 โดยใช้การวิเคราะห์แบบ ANOVA วิเคราะห์ผลความแตกต่างระหว่างสูตรอาหาร และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างคู่ด้วย LSD

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

การเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้งให้เจริญเป็นโพรโทคอร์ม

การเตรียมโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้ง พบว่าเมื่อแช่เมล็ดกล้วยไม้ลงในอาหารสังเคราะห์สูตร $1/2MS$ (ภาพที่ 2ก) เพาะเลี้ยง เป็นเวลา 1 เดือน เมล็ดเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อโพรโทคอร์มจำนวนมาก โพรโทคอร์ม มีลักษณะเม็ดกลมขนาดต่าง ๆ สีเขียวอ่อน (ภาพที่ 2ข) สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Lo *et al.* [17] ทดลองเลี้ยงกล้วยไม้ *Dendrobium tosaense*, *D. moniliforme* และ *D. linawianum* ในอาหาร $1/2MS$ สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ด เมื่อเมล็ดงอกจะสังเกตเห็นเมล็ดมีสีเขียว โพรโทคอร์มที่ได้นำไปขยายให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นโดยย้ายลงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร $1/2MS$ เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่า

เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเดียวกันกับเลี้ยงบนอาหารแข็งเป็นเวลา 1 เดือน

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ต่อการเพิ่มจำนวนโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้ง

จากการทดลองเลี้ยงโพรโทคอร์มเริ่มต้น (ภาพที่ 3 ก) เป็นระยะเวลา 2 เดือนพบว่า อาหาร $1/2MS$ ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโพรโทคอร์มได้ดีที่สุดคือ 0.43 กรัม (ภาพที่ 3 ข) อาหาร $1/2MS$ ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.5 มก./ล. ชักนำให้เกิดโพรโทคอร์ม 0.18 กรัม (ภาพที่ 3 ค) อาหาร $1/2MS$ ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1.0 มก./ล. ชักนำให้เกิดโพรโทคอร์ม 0.31 กรัม (ภาพที่ 3 ง) อาหาร $1/2MS$ ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1.5 มก./ล. ชักนำให้เกิดโพรโทคอร์ม 0.27 กรัม (ภาพที่ 3 จ) และอาหาร $1/2MS$ ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2.0 มก./ล. ชักนำให้เกิดโพรโทคอร์ม 0.20 กรัม (ภาพที่ 3 ฉ) เห็นว่าน้ำหนัโพรโทคอร์มเฉลี่ยในอาหาร $1/2MS$ ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 มก./ล. มีน้ำหนักโพรโทคอร์มเพิ่มขึ้นน้อยกว่าในอาหาร $1/2MS$ ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA (ภาพที่ 4) ทั้งนี้อาจเพราะโพรโทคอร์มเอื้องสายล่องแล้งได้รับการกระตุ้นจากฮอร์โมนที่พืชสร้างขึ้นเอง ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานวิจัยในกล้วยไม้สกุลหวาย *D. fimbriatum* ซึ่งพบว่าเมื่อเลี้ยงโพรโทคอร์มในอาหาร Knudson C ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถเพิ่มจำนวนโพรโทคอร์มได้ดี [18] เช่นเดียวกับการวิจัยในกล้วยไม้เอื้องสายน้ำผึ้งพบว่าน้ำหนักโพรโทคอร์มเอื้องสายน้ำผึ้งในอาหารที่เติม BA น้อยกว่าในอาหารที่ไม่เติม BA [19]

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ต่อการชักนำให้โพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้งเจริญเป็นต้น

ผลของ BA และ NAA ต่อการชักนำให้

โพโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องสายล่องแสงเจริญเป็นต้น (ภาพที่ 5) ผลการชักนำให้เกิดยอด (ภาพที่ 6) พบว่าอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 17.4 ยอด (ภาพที่ 5ก) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 32.5 ยอด (ภาพที่ 5ง) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม สารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 119 ยอด (ภาพที่ 5จ) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 29.5 ยอด (ภาพที่ 5ข) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 32.7 ยอด (ภาพที่ 5ฉ) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS สูตรที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 59 ยอด (ภาพที่ 5ค) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 59.3 ยอด (ภาพที่ 5ด) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มก./ล. และ NAA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 100 ยอด (ภาพที่ 5ช) และอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดจำนวนยอดมากที่สุดคืออาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มก./ล. และ NAA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 180 ยอด (ภาพที่ 5ม) สอดคล้องกับ Puchooa [20] พบว่าการใช้ BA ร่วมกับ NAA สามารถชักนำให้โพโทคอร์มเกิดยอดได้ดีในกล้วยไม้สกุลหวาย

การชักนำให้เกิดความยาวยอด (ภาพที่ 7) พบว่าอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชักนำให้เกิดความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 0.29 ซม. (ภาพที่ 5ก) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.32 ซม. (ภาพที่ 5ง) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.37 ซม. (ภาพที่ 5จ) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.76 ซม. (ภาพที่ 5ข) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS

ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.87 ซม. (ภาพที่ 5ฉ) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.88 ซม. (ภาพที่ 5ค) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.86 ซม. (ภาพที่ 5ด) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มก./ล. และ NAA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.81 ซม. (ภาพที่ 5ม) และอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดความยาวยอดมากที่สุดคืออาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มก./ล. และ NAA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.93 ซม. (ภาพที่ 5ช) ผลการทดลองการชักนำให้เกิดยอดสอดคล้องกับผลการทดลองของ Nayak *et al.* [13] พบว่าเมื่อเติม NAA สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดี เมื่อเพิ่ม BA ร่วมกับ NAA ส่งผลให้ปริมาณยอดเพิ่มขึ้นจากเดิม และทำให้ความยาวของยอดเพิ่มขึ้น

การชักนำให้เกิดราก (ภาพที่ 8) พบว่าอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดจำนวนรากมากที่สุดคืออาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชักนำให้เกิดจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 8.44 ราก (ภาพที่ 5ก) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.89 ราก (ภาพที่ 5ง) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มก./ล. ไม่ชักนำให้เกิดราก (ภาพที่ 5จ) อาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 4.56 ราก (ภาพที่ 5ข) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS BA 1 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 2.78 ราก (ภาพที่ 5ฉ) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 3.11 ราก (ภาพที่ 5ค) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.22 ราก (ภาพที่ 5ด) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มก./ล. และ NAA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ

2.15 ราก (ภาพที่ 5ข) และอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุม การเจริญเติบโต BA 2 มก./ล และ NAA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.78 ราก (ภาพที่ 5ฉ) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่ชักนำให้เกิดรากมากที่สุดคืออาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้เกิดรากโดยเฉลี่ยมากที่สุดคือ 8.44 รากซึ่งสอดคล้องกับ Huan *et al.* [7] รายงานว่ากล้วยไม้สกุลเข็มปเตียมที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีฮอร์โมนสามารถพัฒนาโพรโทคอร์มให้เกิดรากจำนวนมากกว่าอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

การชักนำให้เกิดความยาวราก (ภาพที่ 9) พบว่าอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชักนำให้เกิดความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 0.22 ซม. (ภาพที่ 5ก) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.22 ซม. (ภาพที่ 5ง) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มก./ล. ไม่ชักนำให้เกิดราก (ภาพที่ 5จ) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.6 ซม. (ภาพที่ 5ข) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.19 ซม. (ภาพที่ 5ฉ) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.16 ซม. (ภาพที่ 5ช) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.06 ซม. (ภาพที่ 5ค) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มก./ล. และ NAA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.14 ซม. (ภาพที่ 5ฉ) และอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เหมาะสม ในการชักนำให้เกิดความยาวรากมากที่สุดคืออาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มก./ล. และ NAA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดเท่ากับ 0.32 ซม. (ภาพที่ 5ช) อาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่ชักนำให้เกิดรากยาวที่สุดคืออาหารที่เติม NAA 1 มก./ล. ให้ความยาวรากโดยเฉลี่ยคือ 0.60 ซม. เห็นว่าอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด

และเมื่อเติม BA ในอาหารเพียงอย่างเดียวพบว่าไม่มีรากเกิดขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าในกล้วยไม้มีการสร้าง BA ในปริมาณที่เหมาะสมกับการสร้างรากได้ตั้งอยู่แล้ว เมื่อเติม BA เพิ่มเข้าไปจึงเป็นการยับยั้งการสร้างราก ผลการทดลองคล้ายกับผลของ Sheelavantmath *et al.* [21] ทำการทดลองกับกล้วยไม้ดินพบว่าปริมาณ NAA 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดรากได้ดี แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงกว่านั้นกลับยับยั้งการเกิดราก ดังนั้นการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมนกลุ่มออกซินและไซโตไคนินมีส่วนช่วยกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน เจริญพัฒนาเป็นเอ็มบริโอโพรโทคอร์ม และเป็นต้นได้ ขึ้นกับการใช้สูตรอาหารพื้นฐานแตกต่างกันร่วมกับความเข้มข้น ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต อีกทั้งขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ด้วย [13, 22]

ผลการทดลองที่ได้นี้สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้งให้มีมากขึ้น สามารถนำออกปลูกเพื่อลดการนำกล้วยไม้จากป่าเข้ามาปลูก และเป็นการอนุรักษ์เก็บรักษาพันธุ์กล้วยไม้ในหลอดทดลอง เช่น การเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง หรือสามารถใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ให้ได้ลักษณะตามต้องการโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น การส่งถ่ายยีน หรือการทำโพลีพอยด์ได้อีกด้วย

สรุปผลการวิจัย

การเพิ่มจำนวนโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้งในอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถ ชักนำให้เกิด โพรโทคอร์มได้ดีที่สุดคือได้ 0.43 กรัมในระยะเวลา 2 เดือน การชักนำให้โพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้งเจริญเป็นต้นในอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม BA 2 มก./ล.และ NAA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดคือ 180 ยอด อาหารที่ชักนำให้ต้นสูงมากที่สุดคืออาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม BA 1 มก./ล.และ NAA 2 มก./ล. สามารถชักนำให้ต้นสูงมากที่สุดเท่ากับ 0.93 ซม. ส่วนอาหารที่ชักนำให้เกิดรากมากที่สุดคืออาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้เกิดราก

มากที่สุดคือ 8.44 ราก และอาหารที่ชักนำให้เกิดรากยาวที่สุดคืออาหาร 1/2MS ที่เติม NAA 1 มก./ล. ให้ความยาวรากคือ 0.60 ซม. การไม่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเหมาะสมกับการเพิ่มจำนวนโพรโทคอร์มและจำนวนราก ส่วนอาหารที่มี สารควบคุมการเจริญ NAA และ BA ความเข้มข้น 2.0 มก./ล. สามารถเพิ่มจำนวนและความยาวยอดได้ดี จึงใช้ทั้ง 2 สูตรนี้ในการขยายพันธุ์กล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้ง

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ปทุมธานี ที่สนับสนุนสถานที่ และสารเคมีในการวิจัย และขอบคุณทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่สนับสนุนทุนสำหรับงานวิจัยนี้

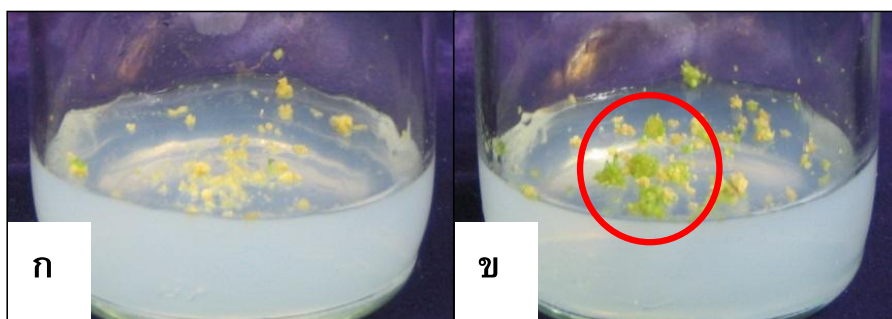
เอกสารอ้างอิง

1. Thaitong O. Orchids of Thailand. 4th ed. Bangkok; 2003. 163 p. Thai.
2. Knudson L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Botanical Gazette. 1922; 73: 1-25.
3. Arditti J, Ernst R. Micropropagation of orchid. John Wiley & Sons INC: New York; 1993.
4. Chen J, Chang C, Chang W. Direct somatic embryogenesis on leaf explant of *Oncidium* Gower Ramsey and subsequent plant regeneration. Plant Cell Reports. 1999; 19: 143-149.
5. Chen J, Chang W. Effect plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). Plant Science. 2000; 160 (2160): 87-93.
6. Nayak NR, Sahoo S, Patnaik S, Rath SP. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). Scientia Horticulture. 2002; 94: 107-116.
7. Huan LVT, Takamura T, Tanaka M. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. Plant Science. 2004; 166(6): 1443-1449.
8. Teng W, Nicholson L, Teng M. Micropropagation of *Spathoglottis plicata*. Plant Cell Reports. 1997; 16: 831-835.
9. Tokuhara K, Mii M. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. Plant Cell Reports. 1993; 13: 7-11.
10. Roy J, Banerjee N. Rhizome and shoot development during *in vitro* propagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. Scientia Horticulture. 2002; 94(1): 181-192.
11. Malabadi RB, Mulgaund GS, Nataraja K. Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, an endangered orchid using thidiazuron. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2004; 76(3): 289-293.
12. Chen T, Chen J, Chang W. Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2004; 76(1): 11-15.

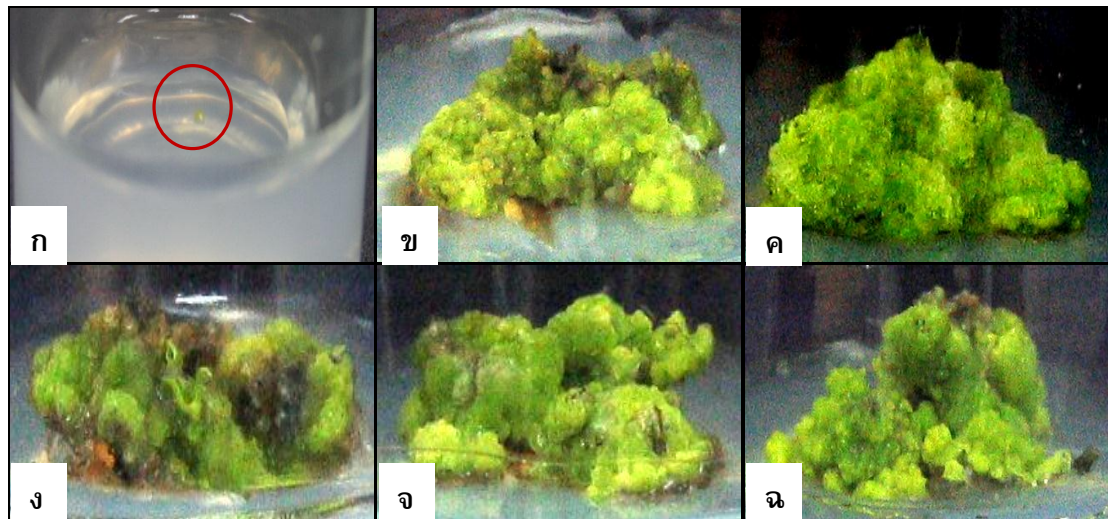
13. Nayak NR, Sahoo S, Patnaik S, Rath SP. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) SW., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) SW. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. *Scientia Horticulture*. 1997; 71: 243-250.
14. Bunnag S. Plant growth, development and plant hormones. Khon Kaen: Khon Kaen University ; 1998. 353 p. Thai.
15. Phetcharaburanin T. *In vitro* propagation of venus' slipper (*Paphiopedilum godefroyae* (Godefr.) Pfitz.). *Thai Agricultural Research Journal*. 2006; 24(3): 230-246. Thai.
16. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962; 15: 473-97.
17. Lo SF, Nalawade SM, Mulabagal V, Matthew S, Chen CL, Kuo CL, *et al*. *In Vitro* propagation by asymbiotic seed germination and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity studies of tissue culture raised plants of three medicinally important species of *Dendrobium*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2004; 27(5): 731-735.
18. Roy J, Banerjee N. Induction of callus and plant regeneration from shoot tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. f. *Scientia Horticulture*. 2003; 97(3): 333-340.
19. Duangsee K. Highly efficient transformation of *Doritis Pulcherrima* Lindl. and *Dendrobium Primulinum* Lindl. with antisense ACC Oxidase [MSc thesis]. Khon Kaen: Khon Kaen University; 2007. Thai.
20. Puchooa D. Comparison of different culture media for the *in vitro* culture of *Dendrobium* (Orchidaceae). *International Journal of Agriculture and Biology*. 2004; 6(5): 884-888.
21. Sheelavantmath SS, Murthy HN, Pyati AN, Ashok KHG, Ravishankar BV. *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. through rhizome section culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2000; 60(2): 151-154.
22. Chowdhury I, Rahman ARM, Islam MO, Matsui S. Effects of plant growth regulators on callus proliferation, plantlet regeneration and growth of plantlets of *Doritaenopsis* orchid. *Biotechnology*. 2003; 3(2): 214-221.



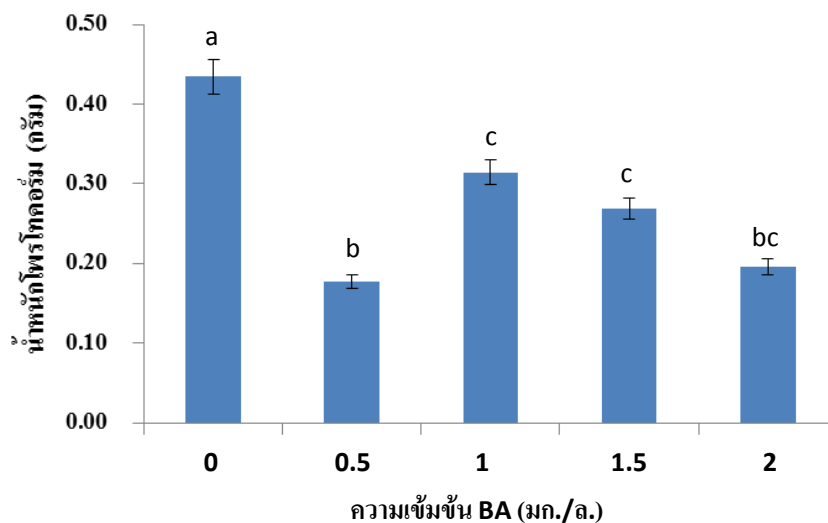
ภาพที่ 1 ดอกและฝักของกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้ง โดย ก และ ข คือดอกกล้วยไม้ และ ค คือฝักกล้วยไม้



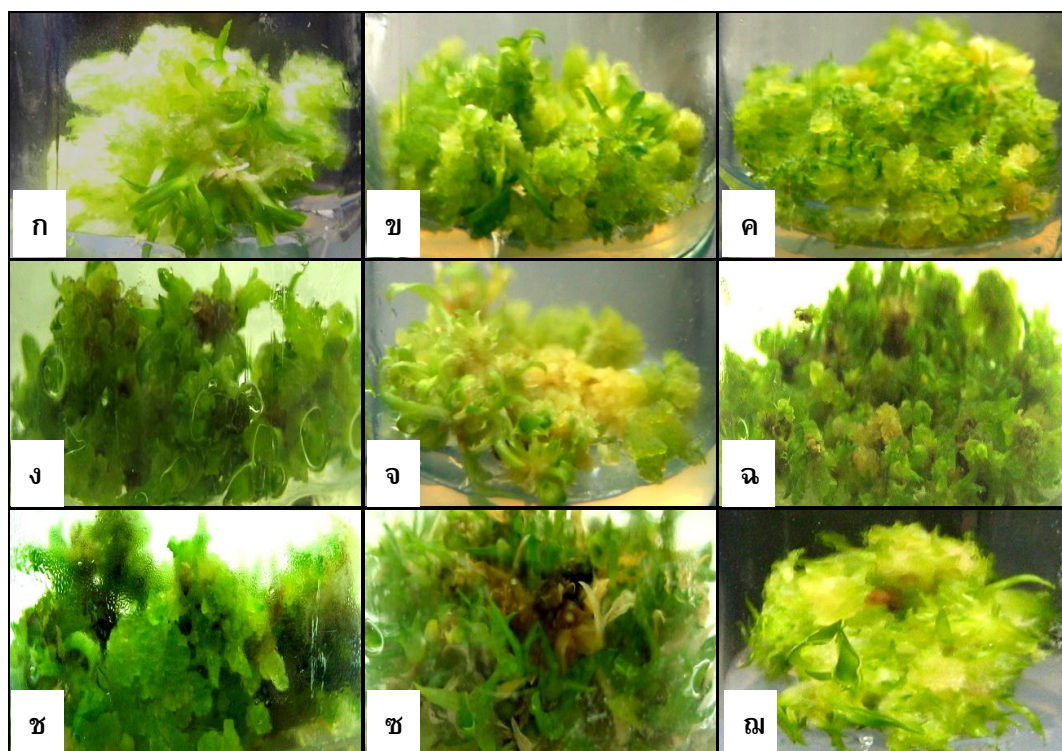
ภาพที่ 2 เมล็ดของกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล้งที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ $\frac{1}{2}$ MS ระยะ 30 วัน โดย ก คือเมล็ดที่เริ่มเพาะเลี้ยง และ ข คือโพรโทคอร์มที่กำลังเจริญจากเมล็ด



ภาพที่ 3 ผลของ BA ต่อการเพิ่มจำนวนโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องสายล่องแสง โดย
 ก คือขนาดโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องสายล่องแสงเริ่มต้น
 ข คือ อาหาร $1/2MS$ ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต
 ค คือ อาหารที่เติม BA 0.5 มก./ล.
 ง คือ อาหารที่เติม BA 1 มก./ล. จ คือ อาหารที่เติม BA 1.5 มก./ล. และ
 ฉ คือ อาหารที่เติม BA 2 มก./ล.



ภาพที่ 4 กราฟการชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มของเอื้องสายล่องแสงระยะ 2 เดือนในอาหาร $1/2MS$ ที่แปรผันความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA (ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)



ภาพที่ 5 ผลของ BA และ NAA ต่อการชักนำให้โพโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องสายล่องแสงเจริญเป็นต้น
ในอาหาร $\frac{1}{2}$ MS โดย

ก คือ อาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

ข คือ อาหารที่เติม NAA 1 มก./ล.

ค คือ อาหารที่เติม NAA 2 มก./ล.

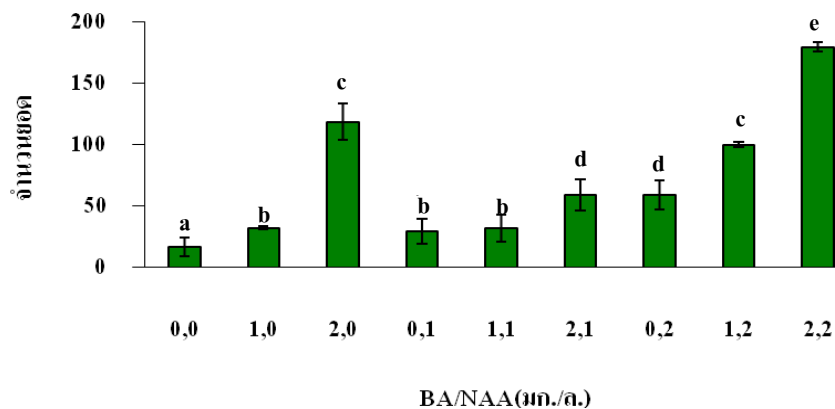
ง คือ อาหารที่เติม BA 1 มก./ล. จ คือ อาหารที่เติม BA 2 มก./ล.

ฉ คือ อาหารที่เติม NAA 1 มก./ล. BA 1 มก./ล.

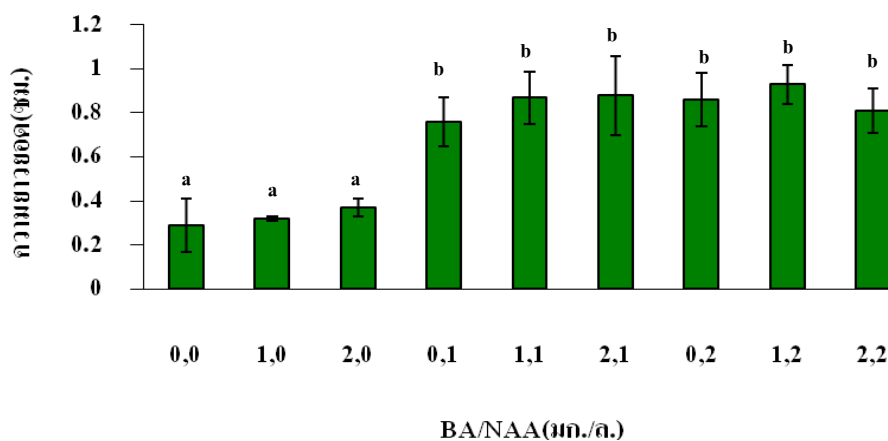
ช คือ อาหารที่เติม NAA 1 มก./ล. BA 2 มก./ล.

ซ คือ อาหารที่เติม NAA 2 มก./ล. BA 1 มก./ล. และ

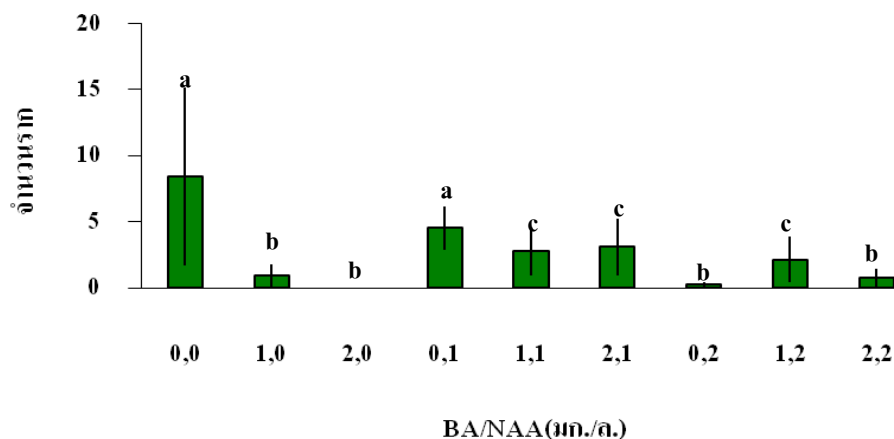
ฅ คือ อาหารที่เติม NAA 2 มก./ล. BA 2 มก./ล.



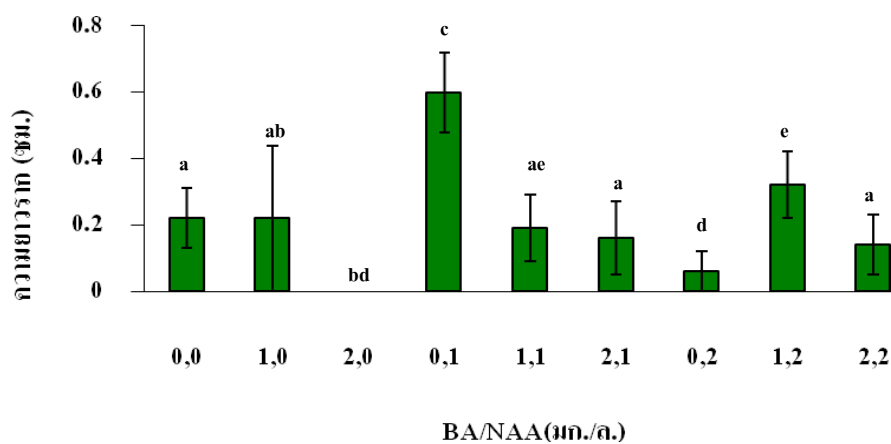
ภาพที่ 6 จำนวนยอดของ BA และ NAA ต่อการชักนำให้โพโทคอร์มกล้ายไม้เอื้องสายล่องแล่งเจริญเป็นต้นในอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่แปรผันความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA (ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)



ภาพที่ 7 ความยาวยอดของ BA และ NAA ต่อการชักนำให้โพโทคอร์มกล้ายไม้เอื้องสายล่องแล่งเจริญเป็นต้นในอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่แปรผันความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA (ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)



ภาพที่ 8 จำนวนรากของ BA และ NAA ต่อการชักนำให้โพธิ์โทคอร์มกล้ายไม้เอื้องสายล่องแล่งเจริญเป็นต้นในอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่แปรผันความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA (ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกักัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)



ภาพที่ 9 ความยาวรากของ BA และ NAA ต่อการชักนำให้โพธิ์โทคอร์มกล้ายไม้เอื้องสายล่องแล่งเจริญเป็นต้นในอาหาร $\frac{1}{2}$ MS ที่แปรผันความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA (ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกักัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)