

การเพาะเลี้ยงเมล็ดและการศึกษาผลของ BA และ NAA ต่อการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์
ของเอื้องเทียนสามดอก

In vitro Seed Culture and Study Effect of BA and NAA on Plant Regeneration
of *Coelogyne viscosa* Rchb.f.

เกศริน หยี่¹ ธวัชชัย ทธรัตน์¹ อติกานต์ ปล่อยทุม¹ และ จิราภรณ์ นิคมทัศน^{2*}

Ketsarin Yee¹, Thawatchai Thoradee¹, Atikan Ploithum¹, and Jiraporn Nikomtat²

สาขาชีววิทยา คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์¹

Biology Program, Faculty of Education, Uttaradit Rajabhat University¹

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์²

Biology Program, Faculty of Science and Technology, Uttaradit Rajabhat University²

Email: jnikomtat@uru.ac.th

Received : September 10, 2022

Revised : June 25, 2023

Accepted : June 26, 2023

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาไปเป็นโปรโตคอร์มและเพื่อศึกษาผลของสูตรอาหารที่เติม BA และ NAA ต่อการพัฒนาด้านอ่อนเป็นต้นที่สมบูรณ์ของกล้วยไม้เอื้องเทียนสามดอก (*Coelogyne viscosa* Rchb.f.) โดยนำเมล็ดกล้วยไม้เอื้องเทียนสามดอกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ คือ 15, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 และ 12 สัปดาห์ บันทึกค่าคะแนนการเกิดโปรโตคอร์ม ตั้งแต่ 0 ถึง 5 คะแนน จากนั้นนำต้นอ่อนมาศึกษาสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 9 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ผลการศึกษาพบว่า สูตรอาหาร 1/2MS ที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร มีผลต่อการออกเป็นโปรโตคอร์มของเมล็ด แสดงค่าคะแนนสูงสุดตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8 เท่ากับ 4.80 ± 0.42 นอกจากนี้สูตรอาหาร 1/2MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ต้นอ่อนมีการพัฒนาไปเป็นต้นสมบูรณ์ดีที่สุด โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสูตรอาหารอื่น งานวิจัยนี้จึงเป็นการขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยใช้เมล็ดซึ่งเป็นการอนุรักษ์กล้วยไม้ไทยให้มีความหลากหลายทางชีวภาพต่อไป

คำสำคัญ: เอื้องเทียนสามดอก, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, เมล็ดกล้วยไม้, สารควบคุมการเติบโต

ABSTRACT

The objectives of this study were to culture orchid seeds in culture media with different sucrose levels and to study the effects of BA and NAA on plant regeneration of *Coelogyne viscosa* Rchb.f. seedlings. Orchid seeds were inoculated onto Murashige and Skoog (MS) and 1/2MS media with three different sucrose levels (15, 20, and 30 g/L) for 8 and 12 weeks. After that, the seedlings were cultured on 1/2MS medium with 20 g/L sucrose supplemented with different concentrations of BA (0, 1, 2, and 4 mg/L) and NAA (0, 0.5, and 1 mg/L) for 9 weeks. All experiments were conducted under standard conditions: a 16-hour photoperiod with cool white light (3,000 lx) at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A completely randomized design (CRD) was used. The results showed that orchid seeds successfully germinated on 1/2MS medium with 20 g/L sucrose, with a protocorm score of 4.80 ± 0.42 . Additionally, 1/2MS medium with 20 g/L sucrose supplemented with BA 2 mg/L and NAA 0.5 mg/L showed the highest plant regeneration after 9 weeks of culture, with a significant difference ($P \leq 0.05$). Therefore, *Coelogyne viscosa* Rchb.f. seed culture is a promising method for orchid conservation and biodiversity.

Keywords: *Coelogyne viscosa* Rchb.f., Tissue culture, Orchid seed, Plant Growth Regulator

บทนำ

กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของไทย โดยเป็นไม้ดอกส่งออกขายต่างประเทศทำรายได้เข้าประเทศ มีการปลูกเลี้ยงอย่างครบวงจร ตั้งแต่การผสมเกสร เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เลี้ยงลูกกล้วยไม้ เลี้ยงต้นกล้วยไม้จนกระทั่งให้ดอก ตัดดอกบรรจุหีบห่อและส่งออก ซึ่งศาสตราจารย์ ดร.เต็ม สมิตินันท์และศาสตราจารย์ Gunnar Seidenfaden นักการทูต และนักพฤกษศาสตร์ชาวเดนมาร์ก ค้นพบกล้วยไม้ในประเทศไทย จำนวน 177 สกุล (Genus) และจำนวน 1,125 ชนิด (Species) ตั้งแต่ พ.ศ. 2502 จนถึง พ.ศ. 2543 (องอาจ ตัณฑวนิช, 2561) แต่เนื่องจากในสถานการณ์ปัจจุบันกล้วยไม้ในประเทศไทยกำลังอยู่ในภาวะวิกฤติ โดยพบว่ากล้วยไม้หลายชนิดเสี่ยงต่อการคุกคามและใกล้สูญพันธุ์ กล้วยไม้ที่เสี่ยงสูญพันธุ์และหาชมได้ยากสามารถศึกษาได้ที่สวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้า พิษณุโลก

ในพระราชดำริ ซึ่งเป็นสถานที่รวบรวมพันธุ์ไม้ท้องถิ่นที่ใกล้จะสูญพันธุ์และหาชมได้ยากเอาไว้ โดยกล้วยไม้เสี่ยงสูญพันธุ์ที่สวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้า พิษณุโลก ในพระราชดำริมีทั้งหมด 25 สกุล 69 ชนิด เช่น กุหลาบกระเปาะเปิด กุหลาบน่าน สิงโตนันทา สิงโตกลอกตา สิงโตลายภูหลวง สิงโตมุขเอื้องเทียนสามดอก กะระกะร้อนภูหลวง เอื้องลายวิสูตร เขาพระวิหาร เป็นต้น (จรัญ มากน้อย และคณะ, 2562: 43-46)

เอื้องเทียนสามดอก (*Coelogyne viscosa* Rchb.f.) จากการบันทึกลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ณ สวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้า พิษณุโลก ในพระราชดำริ ในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2563 พบว่าเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย มีการเจริญทางข้าง (Sympodial) รากเป็นเส้นฝอยออกจากโคนลำลูกกล้วยมีร่องมีไหล (Stolon) ระหว่างลำลูกกล้วย ใบ 2 ใบต่อลำลูกกล้วย แผ่นใบรูปแถบยาวปลายแหลม โคนใบสีเขียวเข้ม มีร่องกลางชัด ฝักยาวรี ห้อยลง สีเขียวอ่อนอมเหลือง สันสีอ่อนกว่า เมล็ดสีเขียวอ่อน

ทั้งนี้กล้วยไม้ในธรรมชาติมีการลดจำนวนลงเรื่อย ๆ เนื่องจากการตัดไม้ทำลายป่า ทำให้ที่อยู่อาศัยของกล้วยไม้ลดลง อีกทั้งกล้วยไม้ยังต้องการองค์ประกอบอื่นที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เช่น อาหาร เมื่อปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตกล้วยไม้ลดลง ส่งผลให้กล้วยไม้ลดจำนวนลง แพร่ขยายพันธุ์ตามธรรมชาติได้น้อยลงเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ จึงต้องมีการศึกษาเพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์และการเก็บรักษาพันธุ์เพื่ออนุรักษ์ให้กล้วยไม้คงอยู่ต่อไปในธรรมชาติในจำนวนที่มากขึ้น การขยายพันธุ์กล้วยไม้สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตัดแยกกล้วยไม้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเพาะเมล็ดเทียม (ปริมลภ (วสุวัต) ชูเกียรติมัน และคณะ, 2542: 192)

เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้ตามธรรมชาติมีอัตราการงอกต่ำ อาหารสะสมในเมล็ดมีน้อยมาก ไม่เพียงพอต่อการงอกหรือได้รับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป (จตุพร หงส์ทองคำ และคณะ, 2560: 187-201) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้ประสบความสำเร็จจึงต้องมีการคัดเลือกสูตรอาหารให้เหมาะสม รวมถึงการเติมน้ำตาลและการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่จำเป็นต่อการงอกและการพัฒนาของกล้วยไม้ให้เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ (ศุภาวีร์ แสงจันทร์จิระเดช และจักรพงศ์ แห่งทอง, 2558: 109-118) อีกทั้งการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ยังเป็นการรักษาความหลากหลายทางชีวภาพของกล้วยไม้เมื่อนำกลับคืนสู่ป่าธรรมชาติ

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาไปเป็นโปรโตคอร์มของเมล็ดเอื้องเทียนสามดอก
2. เพื่อศึกษาผลของสูตรอาหารที่เติมสารควบคุม BA และ NAA ต่อการพัฒนาดันอ่อนไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ของกล้วยไม้เอื้องเทียนสามดอก

วิธีดำเนินการวิจัย

ตรวจสอบการมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้

ตรวจสอบการมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้โดยดัดแปลงจากวิธีของ Verieysen และคณะ (2004) (อ้างจากอารักษ์ จันศิลป์ และรัตน หิรัญพันธุ์, 2549: 7) โดยใช้สาร TTC (Triphenyl tetrazolium chloride) ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 เติม Tween 20 จำนวน 1 หยด ในสารละลาย 50 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.0 แช่เมล็ดกล้วยไม้ในสารละลายและเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 เมล็ด สุ่มดูเมล็ดกล้วยไม้มาวัดขนาดความยาวและตรวจสอบการติดสีแดงที่เอนบริโอแสดงถึงการมีชีวิตของเมล็ดด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงเลนส์ประกอบแบบ Bright field จากนั้นนำเมล็ดที่มีอยู่ในฝักไปศึกษาสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มต่อไป

ศึกษาสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม

นำฝักกล้วยไม้มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน จุ่มฝักในแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ลนไฟผ่าฝักและแช่เมล็ดเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ (15, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร) รวมจำนวน 6 สูตรอาหาร ๆ ละ 10 ซ้ำ เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์ บันทึกเป็นค่าคะแนนพื้นที่การเกิดต้นอ่อน โดยระดับคะแนนแบ่งเป็น 0 ถึง 5 (ดัดแปลงจาก ศุภาวีร์ แสงจันทร์จิระเดช และจักรพงศ์ แท่งทอง, 2558: 109-118) ดังนี้

- คะแนน 5 หมายถึง เมล็ดเปลี่ยนแปลงเป็นโปรโตคอร์มร้อยละ 100 ของเมล็ดในขวด
- คะแนน 4 หมายถึง เมล็ดเปลี่ยนแปลงเป็นโปรโตคอร์มร้อยละ 75 ของเมล็ดในขวด
- คะแนน 3 หมายถึง เมล็ดเปลี่ยนแปลงเป็นโปรโตคอร์มร้อยละ 50 ของเมล็ดในขวด
- คะแนน 2 หมายถึง เมล็ดเปลี่ยนแปลงเป็นโปรโตคอร์มร้อยละ 25 ของเมล็ดในขวด
- คะแนน 1 หมายถึง เมล็ดเปลี่ยนแปลงเป็นโปรโตคอร์มไม่ถึงร้อยละ 25 ของเมล็ดในขวด
- คะแนน 0 หมายถึง เมล็ดไม่มีเปลี่ยนแปลงเป็นโปรโตคอร์ม

ศึกษาผลของ BA และ NAA ต่อการพัฒนาด้านอ่อนไปเป็นต้นกล้วยไม้ที่สมบูรณ์

นำต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเทียนสามดอก ขนาด 5-6 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA (6-benzyladenine) ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA (1-Naphthaleneacetic acid) ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 12 สูตร ๆ ละ 10 ซ้ำ ๆ ละ 3 ต้นอ่อน

เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 สัปดาห์ จากนั้นวัดความสูงต้น (เซนติเมตร) นับจำนวนยอด และนับจำนวนราก (ดัดแปลงจากฉัตรพร แก้วสาร และคณะ, 2558: 71-75)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design CRD) คำนวณค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD) และวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ผลการวิจัย

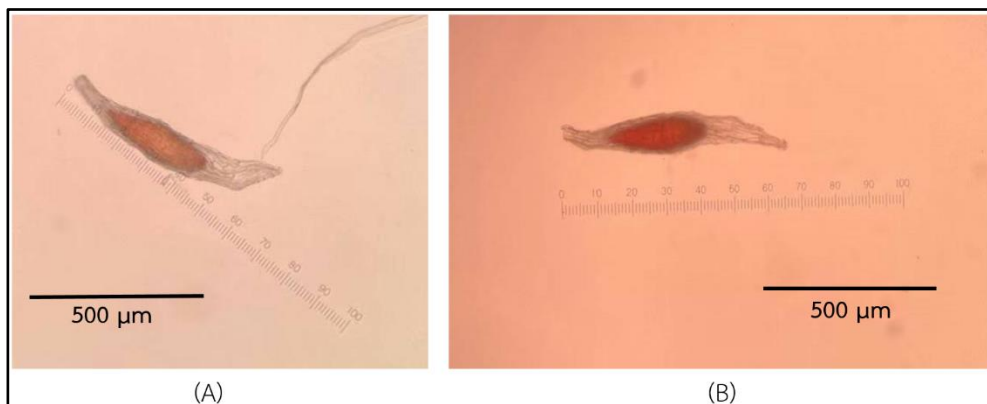
ตรวจสอบการมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้

ตรวจสอบการมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้ โดยใช้สาร TTC (Triphenyl tetrazolium chloride) ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 ใส่ Tween 20 ปรับ pH 7.0 แช่เมล็ดในสารละลายและเก็บไว้ในอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการติดสีแดงของเอ็มบริโอแสดงถึงการมีชีวิตของเมล็ดหลังแช่เมล็ดไว้ 24 และ 48 ชั่วโมง พบการย้อมติดสีมีเอ็มบริโอที่ย้อมติดสีแดงบางเมล็ด ทั้งนี้สามารถพบการออกเป็นโปรโตคอร์มของเมล็ดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารภายใน 8 สัปดาห์ แสดงดังตารางที่ 1 และภาพประกอบ 1

ตารางที่ 1 การย้อมติดสีของเอ็มบริโอกล้วยไม้เอื้องเทียนสามดอก

ความยาว เมล็ด (มิลลิเมตร)	การย้อมติดสี มีชีวิตของเมล็ด*	การออกเป็นโปรโตคอร์มที่ 8 สัปดาห์		การออกเป็นโปรโตคอร์มที่ 12 สัปดาห์	
		งอก	ไม่งอก	งอก	ไม่งอก
0.15-0.70	+	✓		✓	

*หมายเหตุ: การติดสีของเอ็มบริโอเอื้องเทียนสามดอก; ++ หมายถึง เอ็มบริโอทุกเมล็ดย้อมติดสีแดง, + หมายถึง เอ็มบริโอบางเมล็ดติดสีแดง และ - หมายถึง เอ็มบริโอทุกเมล็ดย้อมไม่ติดสีแดง



ภาพประกอบ 1 การติดสีแดงของเมล็ดเอื้องเทียนสามดอก; ตรวจสอบการติดสีที่ 24 ชั่วโมง (A) ; scale bar = 500 ไมโครเมตร, ตรวจสอบการติดสีที่ 48 ชั่วโมง (B); scale bar = 500 ไมโครเมตร

ศึกษาสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม

เมล็ดกล้วยไม้ไม่สามารถงอกได้บนสูตรอาหาร MS และ 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ (15, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร) โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 2 และภาพประกอบ 2)

อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร มีค่าคะแนนการเกิดโปรโตคอร์มที่ 8 และ 12 สัปดาห์ เท่ากับ 3.80 ± 1.16 และ 4.60 ± 1.26 ตามลำดับ อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร มีค่าคะแนนการเกิดโปรโตคอร์มที่ 8 และ 12 สัปดาห์ เท่ากับ 4.30 ± 1.57 และ 4.50 ± 1.58 ตามลำดับ อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีค่าคะแนนการเกิดโปรโตคอร์มที่ 8 และ 12 สัปดาห์ เท่ากับ 4.60 ± 0.52 และ 5.00 ± 0.00 ตามลำดับ

อาหารสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร มีค่าคะแนนการเกิดโปรโตคอร์มที่ 8 และ 12 สัปดาห์ เท่ากับ 4.20 ± 1.55 และ 4.50 ± 1.58 ตามลำดับ อาหารสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร มีค่าคะแนนการเกิดโปรโตคอร์มที่ 8 และ 12 สัปดาห์ เท่ากับ 4.80 ± 1.55 และ 5.00 ± 0.00 ตามลำดับ และอาหารสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีค่าคะแนนการเกิดโปรโตคอร์มที่ 8 และ 12 สัปดาห์ เท่ากับ 4.30 ± 1.57 และ 5.00 ± 0.00 ตามลำดับ

ดังนั้น สูตรอาหาร 1/2MS ที่เติมน้ำตาล 15, 20 และ 30 กรัมต่อลิตรมีผลต่อการงอกเป็นโปรโตคอร์มของเมล็ดเอื้องเทียนสามดอกได้เป็นอย่างดี โดยสูตรอาหาร 1/2MS ที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร มีผลต่อการงอกเป็นโปรโตคอร์มของเมล็ดเอื้องเทียนสามดอกดีที่สุด โดยแสดงค่าคะแนนสูงสุดตั้งแต่

สัปดาห์ที่ 8 ทั้งนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสูตรอาหารอื่น

ตารางที่ 2 การเกิดโปรโตคอร์มของเมล็ดเอื้องเทียนสามดอกบนอาหารและระดับน้ำตาลซูโครสที่ต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 และ 12 สัปดาห์

สูตรอาหาร	น้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ค่าคะแนนของการเกิดโปรโตคอร์ม* $\pm$ SD	
		8 สัปดาห์	12 สัปดาห์
MS	15	3.80 $\pm$ 1.36 ^{ns}	4.60 $\pm$ 1.26 ^{ns}
	20	4.30 $\pm$ 1.57	4.50 $\pm$ 1.58
	30	4.60 $\pm$ 0.52	5.00 $\pm$ 0.00
1/2MS	15	4.20 $\pm$ 1.55	4.50 $\pm$ 1.58
	20	4.80 $\pm$ 0.42	5.00 $\pm$ 0.00
	30	4.30 $\pm$ 1.57	5.00 $\pm$ 0.00

*ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD โดยคะแนนเต็มของการเกิดโปรโตคอร์มเท่ากับ 5 คะแนน

ns : not significant หมายถึง ทุกสูตรอาหารในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ศึกษาผลของ BA และ NAA ต่อการพัฒนาดันอ่อนไปเป็นต้นกล้วยไม้ที่สมบูรณ์

เพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเทียนสามดอกบนอาหารสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตรและเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 12 สูตร เป็นเวลา 9 สัปดาห์ โดยวัดความสูงต้น นับจำนวนยอดและนับจำนวนราก พบว่าอาหารสูตร 1/2MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ดีที่สุด โดยแสดงความสูงต้นเท่ากับ 1.71 $\pm$ 0.40 เซนติเมตร โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสูตรอาหารอื่น ๆ จำนวนยอดเท่ากับ 3.46 $\pm$ 0.77 ยอดโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสูตรอาหารอื่น ๆ และสามารถชักนำรากได้ 0.23 $\pm$ 0.43 ราก โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสูตรอาหาร 1/2MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงที่สุด 0.43 $\pm$ 0.50 ราก (ตารางที่ 3 และภาพประกอบ 3)

ดังนั้นอาหารสูตร 1/2MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ดีที่สุด โดยแสดงความสูงต้นเท่ากับ 1.71 ± 0.40 เซนติเมตร จำนวนยอดเท่ากับ 3.46 ± 0.77 ยอด ชักนํารากได้ 0.23 ± 0.43 ราก โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงที่สุด

อาหาร \ น้ำตาล	การพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มของเมล็ดเอื้องเทียนสามดอก		
	15 กรัมต่อลิตร	20 กรัมต่อลิตร	30 กรัมต่อลิตร
สัปดาห์ที่ 8			
MS			
1/2MS			
สัปดาห์ที่ 12			
MS			
1/2MS			

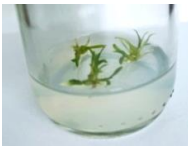
ภาพประกอบ 2 การเกิดโปรโตคอร์มของเมล็ดเอื้องเทียนสามดอกบนสูตรอาหาร MS และ 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสระดับที่ต่างกัน (15, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 8 และ 12 สัปดาห์

ตารางที่ 3 ผลของ BA และ NAA ต่อการพัฒนาต้นอ่อนไปเป็นต้นกล้วยไม้เอื้องเทียนสามดอกที่สมบูรณ์บนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างกัน เป็นเวลา 9 สัปดาห์

สูตรอาหาร	BA (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	NAA (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ความสูงต้น* (เซนติเมตร) $\pm$ SD	จำนวน ยอด* $\pm$ SD	จำนวน ราก* $\pm$ SD
1	0	0	0.73 $\pm$ 0.58 ^e	1.33 $\pm$ 0.87 ^d	0.13 $\pm$ 0.34 ^b
2	0	0.5	0.06 $\pm$ 0.19 ^f	1.13 $\pm$ 0.43 ^e	0.00 $\pm$ 0.00 ^b
3	0	1	0.08 $\pm$ 0.32 ^f	1.16 $\pm$ 0.46 ^e	0.00 $\pm$ 0.00 ^b
4	1	0	1.02 $\pm$ 0.60 ^d	2.00 $\pm$ 1.39 ^c	0.20 $\pm$ 0.40 ^{ab}
5	1	0.5	1.42 $\pm$ 0.41 ^{bc}	2.93 $\pm$ 1.57 ^{ab}	0.43 $\pm$ 1.16 ^a
6	1	1	1.58 $\pm$ 0.40 ^{ab}	2.97 $\pm$ 1.24 ^{ab}	0.30 $\pm$ 0.46 ^{ab}
7	2	0	1.20 $\pm$ 0.26 ^{cd}	2.70 $\pm$ 0.95 ^b	0.16 $\pm$ 0.37 ^{ab}
8	2	0.5	1.71 $\pm$ 0.40 ^a	3.46 $\pm$ 0.77 ^a	0.23 $\pm$ 0.43 ^{ab}
9	2	1	1.38 $\pm$ 0.60 ^{bc}	2.80 $\pm$ 1.34 ^b	0.26 $\pm$ 0.44 ^{ab}
10	4	0	0.98 $\pm$ 0.46 ^d	1.43 $\pm$ 0.93 ^{cd}	0.23 $\pm$ 0.43 ^{ab}
11	4	0.5	1.19 $\pm$ 0.68 ^{cd}	1.60 $\pm$ 1.30 ^{cd}	0.23 $\pm$ 0.43 ^{ab}
12	4	1	1.21 $\pm$ 0.78 ^{cd}	1.20 $\pm$ 0.80 ^d	0.43 $\pm$ 0.50 ^a

*ค่าเฉลี่ยจากต้นอ่อนกล้วยไม้จำนวน 10 ซ้ำ ๆ ละ 3 ต้นอ่อน $\pm$ SD

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	0	1	2	4
0				
0.5				
1				

ภาพประกอบ 3 การพัฒนาต้นอ่อนไปเป็นต้นกล้วยไม้ที่สมบูรณ์บนสูตรอาหาร ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นที่ระดับแตกต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 สัปดาห์

อภิปรายผลการวิจัย

การมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้โดยตรวจสอบการย้อมติดสีของเอมบริโอด้วยสาร TTC (Triphenyl tetrazolium chloride) เมล็ดที่สมบูรณ์จะประกอบด้วยเอมบริโอที่มีชีวิตซึ่งติดสีแดงหลังจากทดสอบด้วยสาร TTC ซึ่งเป็นวิธีการทางชีวเคมีที่สามารถประเมินความมีชีวิตของกล้วยไม้ได้ภายในเวลารวดเร็ว เนื่องจากเซลล์ภายในเมล็ดที่มีชีวิตมีกระบวนการหายใจของเซลล์เกิดขึ้น เป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่มีเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (Dehydrogenase) เข้ามาเกี่ยวข้อง ทำให้มีการปลดปล่อยอนุมูลไฮโดรเจนซึ่งจะเกิดปฏิกิริยารีดักชันกับสารละลาย TTC ที่เป็นสารใสไม่มีสี เปลี่ยนเป็นสาร 1,3,5-triphenylformazan (TPF) ที่มีสีแดง โดยเมล็ดที่มีเอมบริโอสีแดงจัดเป็นเมล็ดที่ยังมีชีวิต (Viable seed) (จุฑารัตน์ กรดสันและคณะ, 2562: 141-150)

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดเอื้องเทียนสามดอกบนอาหารสูตร MS และ 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส ที่ความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ (15, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 8 และ 12 สัปดาห์ ผลการวิจัย

พบว่าการงอกเป็นโปรโตคอร์มจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารทุกสูตรไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่ทั้งนี้สูตรอาหาร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มได้ดีที่สุด พบว่ายอดที่เกิดขึ้นมีลักษณะปลายแหลม เรียว และมีสีเขียว ค่าคะแนนสูงสุดที่ 8 สัปดาห์ คือ 4.80 ± 0.42 ค่าคะแนนสูงสุดที่ 12 สัปดาห์ คือ 5.00 ± 0.00 สอดคล้องกับ Takano *et al.* (1990) ศึกษาผลของซูโครสต่อการเพิ่มโปรโตคอร์มของ *Cymbidium Mini Drea* 'Golden Color' พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมควรอยู่ในระดับต่ำกว่า 30 กรัมต่อลิตร (อ้างจากศุภาวีร์และจักรพงศ์ แห่งทอง, 2558: 109-118)

ต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเทียนสามดอกมาเพาะเลี้ยงเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ดี เนื่องจากแสดงถึงความสูงและจำนวนยอดได้สูงที่สุด อีกทั้งรูปร่าง ลักษณะของต้น ใบ ราก และลำต้นมีสีเขียว มีความสมบูรณ์กว่าอาหารสูตรอื่น ๆ ทั้งนี้มีการศึกษากล้วยไม้ชนิดอื่นที่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA เช่นกันโดยสุมิตรา สุปินราช และอิศร์ สุปินราช (2557: 84-92) ได้ศึกษาผลของ BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าเอื้องผึ้งในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้จำนวนราก จำนวนใบ จำนวนหน่อ และน้ำหนักสูงสุด อีกทั้งฉัตรพร แก้วสาร และคณะ (2558: 71-75) ศึกษาผลของ BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ไอยเรศ (*Rhynchostylis retusa* (L.) Blume) พบว่าอาหารสูตรที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มสูงสุด 2.80 โปรโตคอร์ม นอกจากนี้สูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำโปรโตคอร์มให้เกิดยอดสูงสุด 3.40 ยอดต่อโปรโตคอร์ม และทำให้เกิดจำนวนรากสูงสุด 4.00 รากต่อโปรโตคอร์ม ดังนั้นความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตจึงมีผลต่อการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ของโปรโตคอร์ม อีกทั้งรายงานจากศุภาวีร์ แสงจันทร์จิระเดชและจักรพงศ์ แห่งทอง (2558: 109-118) กล่าวว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ในช่วงแรก การพัฒนาส่วนของโปรโตคอร์มนั้นนิยมใช้สารควบคุมการเจริญกลุ่มไซโตไคนินอย่างเดียว หรือไซโตไคนินความเข้มข้นสูงร่วมกับออกซินความเข้มข้นต่ำเพื่อเพิ่มจำนวนยอด แต่ถ้าเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินอย่างเดียวหรือมีสัดส่วนระหว่างไซโตไคนินต่อออกซินในระดับสูงขึ้น จะพัฒนารากได้ดีขึ้น

ข้อเสนอแนะเพื่อนำผลการวิจัยไปใช้

การงอกของเมล็ดกล้วยไม้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขึ้นอยู่กับสูตรอาหารและปริมาณน้ำตาล การใช้สูตรอาหารที่ต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ อาจมีผลต่อปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร.จรัญ มากน้อย หัวหน้าสวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้า พิษณุโลก ในพระราชดำริและเจ้าหน้าที่ ณ สวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้า พิษณุโลก ในพระราชดำริ ในการสนับสนุนข้อมูลกล้วยไม้และฝักกล้วยไม้ ขอขอบคุณคณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ ที่สนับสนุนทุนวิจัย ขอขอบคุณศูนย์ประสานงาน อพ.สธ.-มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ และหลักสูตรชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ ที่สนับสนุน อุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- จตุพร หงส์ทองคำ, รชยา พรหมวงศ์ และสุรัชย์ รัตนสุข. (2560). การขยายพันธุ์และการเก็บรักษาพันธุ์กล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเปาเปิด โดยเทคนิคเมล็ดเทียม. *SDU Research Journal*, 10(3), 187-201.
- จรัญ มากน้อย, นาวัน อินทกุล, และเกรียงไกร อินท่ามา. (2562). รายชื่อพรรณไม้ในสวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้า พิษณุโลก ในพระราชดำริ. พิษณุโลก: บริษัท โฟกัส พรินต์ จำกัด.
- จุฑารัตน์ กรดสัน ศุทธิณัฐ์ สุนทรกลัมภ์ และปวีณา แก้วอุบล. (2562). ผลของโคโตซานต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการออกของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องเทียนส้ม (*Coelogyne brunnea* Lindl. (Orchidaceae)). *แก่นเกษตร*, 47(1), 141-150.
- ฉัตรพร แก้วสาร, สุรเชษฐ เอี่ยมสำออง, และกาญจน์ คัมทรัพย์. (2558). ผล BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ไอยเรศ (*Rhynchostylis retusa* (L.) Blume) ในสภาพปลอดเชื้อ [ข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์]. *การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์*, 71-75.
- นวลทิพย์ ชัยลีนฟ้า, เบญจา บำรุงเมือง และ จิระนันท์ ตาคำ. (2553). การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วยไม้พื้นเมืองไทย (รายงานการวิจัย). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ปริมลภ (วสุวัต) ชูเกียรติมัน, คมกฤษ ชูเกียรติมัน, เสริมลภ วสุวัต, ทวีศักดิ์ บุญเกิด, อบฉันท ไทยทอง และมานิต คีตอยู่. (2542). สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว ฉบับเสริมการเรียนรู้ เล่มที่ 13. กรุงเทพฯ: โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว.
- ศุภาวีร์ แสงจันทร์จิรเดช และจักรพงศ์ แท่งทอง. (2558). การเพาะเมล็ดเอื้องดอกมะขาม (*Dendrobium delacourii* Guillaumin) ในสภาพปลอดเชื้อ. *SDU Research Journal*, 8(1), 109-118.

- สุมิตรา สุป็นราช และอิศร์ สุป็นราช. (2557). ผลของ BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของของต้นกล้าเอื้องผึ้งในสภาพปลอดเชื้อ. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 19(2), 84-92.
- องอาจ ตัณพวนิช.(2561).*กล้วยไม้ในเมืองไทย*. สืบค้นจาก https://www.technologychaoban.com/bullet-news-today/article_85112.
- อัญชลี จาละ และยงค์กิตติ ขจรผดุงกิตติ. (2557). ความเข้มข้นของเจลไรต์น้ำตาลและมูมเอียงลาดในการปักชำส่วนบนอาหารต่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของต้นพรมมีในสภาพปลอดเชื้อ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 22(3), 358-365.
- อารักษ์ จันศิลป์ และรัตนา หิรัญพันธุ์. (2549). *การเก็บรักษากล้วยไม้ม้าวัง (Doritis pulcherrima Lindl.) ในหลอดทดลอง โดยการเก็บรักษาเมล็ดและวิธีชะลอการเจริญเติบโต* (รายงานการวิจัย). สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Takano, T., Oyamada, T., & Hira, J. (1990). Improvement in nutrient composition of culture medium for growth and multiplication of PLB in Cymbidium. *Proc. of Nagoya Intl. Orch. Cong*, 95-101.