

การเพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลองและการผลิตเมล็ดเทียมจากเอื้องไม้เท้าฤๅษี
(*Dendrobium pendulum* Roxb.) ในสภาพปลอดเชื้อ
In Vitro Seed Culture and Artificial Seed Production of *Dendrobium*
pendulum Roxb. in Aseptic Conditions

จิราภรณ์ นิคมทัศน์¹ นิสากกร สุวรรณ² และจรรย์ มากน้อย³
Jiraporn Nikomtat¹, Nisakorn Suwan² and Charun Maknoi³

¹สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์

¹Biology Program, Faculty of Science and Technology, Uttaradit Rajabhat University

²สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรมหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง

²Agricultural Program, Faculty of agricultural technology, Lampang Rajabhat University

³สวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้า พิษณุโลก ในพระราชดำริ

³Ban Romklao Phitsanulok Botanical Garden, Phitsanulok

*Corresponding author email: jnikomtat@uru.ac.th

Received : September 11, 2024

Revised : October 24, 2024

Accepted : November 29, 2024

บทคัดย่อ

นำเมล็ดเอื้องไม้เท้าฤๅษีมาตรวจสอบการมีชีวิตด้วยสาร Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) พบว่าเอมบริโอแสดงสีแดงบางส่วนของเอมบริโอและทั้งเอมบริโอของเมล็ดตัวอย่างศึกษาในเวลา 48 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ (15, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 8 และ 12 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มในอาหารทุกสูตร ทั้งนี้สูตรอาหาร 1/2MS ที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร แสดงการพัฒนาของโปรโตคอร์มเร็วกว่าน้ำตาลระดับอื่น ดังนั้นสูตรอาหาร 1/2MS ที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร จึงถูกเลือกเป็นอาหารในการศึกษาขั้นตอนต่อไป การกำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียม 0-6 ชั่วโมง พบร้อยละ ปริมาณน้ำที่เหลืออยู่ในเมล็ดเทียมชั่วโมงที่ 6 และร้อยละการรอดชีวิตอยู่ที่ 27.98 และ 65 ± 13.7 ตามลำดับ จากนั้นนำต้นอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA (0, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ NAA (0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพาะเลี้ยงต้นอ่อนเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้เอื้องไม้เท้าฤๅษีสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้สมบูรณ์กว่าสูตรอาหารอื่น แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนยอดต่อต้นเท่ากับ 2.07 ± 0.68 ยอด ค่าเฉลี่ยความสูงต่อต้นเท่ากับ 0.87 ± 0.34 เซนติเมตร และค่าเฉลี่ยจำนวนรากต่อต้นสูงสุดเท่ากับ 0.53 ± 0.72 รากโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสูตรอื่น

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเพาะเลี้ยงเมล็ด เมล็ดเทียม กล้วยไม้ *Dendrobium pendulum*

Abstract

Dendrobium pendulum Roxb.'s seed viability was determined using triphenyl tetrazolium chloride (TTC). Partial red staining was observed in the embryos, and the embryos of all examined seeds had completed the dissected perfecting record within 48 hours. Seeds were grown in vitro on MS and 1/2 MS media with various concentrations of sucrose (15, 20, and 30 grams per liter) for periods of 8 and 12 weeks. All of the media successfully supported seed germination and protocorm development. The 1/2 MS medium supplemented with 20 grams per liter of sucrose exhibited faster protocorm development compared to the other sucrose concentrations. Therefore, the 1/2 MS medium with 20 grams per liter of sucrose was selected for further study. Concurrently, we also studied the dehydration time of artificial seeds, ranging from 0 to 6 hours. The water content and survival percentage of the seeds dehydrated for 6 hours were 27.98% and $65 \pm 13.7\%$, respectively. The seedlings were then cultured on media supplemented with BA (0, 0.5, 1, 2, and 4 milligrams per liter) combined with NAA (0, 0.5, and 1 milligram per liter) for 8 weeks. It was found that the medium supplemented with 1 milligram per liter of BA resulted in the most complete development of the orchid, showing an average of 2.07 ± 0.68 shoots per plant, an average height of 0.87 ± 0.34 centimeters per plant, and the highest average of 0.53 ± 0.72 roots per plant, with significant differences at the 95 percent confidence level ($p \leq 0.05$) compared to other media.

Key Words: Tissue Culture, Seed culture, Artificial seed, Orchid, *Dendrobium pendulum*

บทนำ

กล้วยไม้เป็นหนึ่งในกลุ่มพืชที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากที่สุดในโลก โดยมีจำนวนชนิดมากถึง 28,000 ชนิด จัดอยู่ใน 850 สกุล (Kew Gardens, 2022) อย่างไรก็ตาม กล้วยไม้หลายชนิดกำลังเผชิญกับภัยคุกคามจากการทำลายถิ่นที่อยู่อาศัย การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศและการทำเกษตรกรรม (Gale *et al.*, 2018) การอนุรักษ์กล้วยไม้จึงเป็นเรื่องที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยเฉพาะกล้วยไม้ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เช่น เอื้องไม้เท้าฤๅษี (*Dendrobium pendulum* Roxb.) ซึ่งเป็น

กล้วยไม้ที่มีความงดงามและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (Teixeira da Silva *et al.*, 2015) นอกจากนี้ยังอยู่ในบัญชีพืชเสี่ยงสูญพันธุ์ในประเทศบังคลาเทศ (Bhattacharjee *et al.*, 2023) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลองเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์กล้วยไม้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกล้วยไม้ที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (Teixeira da Silva *et al.*, 2015) การเพาะเลี้ยงเมล็ดแบบไม่พึ่งพาเชื้อรา (asymbiotic seed germination) ได้รับการพัฒนามาตั้งแต่การศึกษาของ Knudson (1922) ซึ่งเป็นรากฐานสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ (Liau *et al.*, 2003)

เอื้องไม้เท้าฤๅษี (*D. pendulum* Roxb.) มีความสำคัญในวงการไม้ดอกไม้ประดับ พบได้ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย กัมพูชา เวียดนาม ลาว พม่า และบางส่วนของประเทศจีน (Zhu *et al.*, 2013) นอกจากนี้ยังมีการนำเข้ามาปลูกในพื้นที่ทางตอนเหนือของออสเตรเลีย โดยเจริญเติบโตในป่าฝนเขตร้อนและมักพบตามต้นไม้หรือโขดหิน โดยใช้รากอากาศในการดูดซับความชื้นและสารอาหารจากบรรยากาศและน้ำฝน (Zhu *et al.*, 2013) กล้วยไม้ในสกุล *Dendrobium* มีการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์แผนโบราณ โดยเฉพาะในประเทศจีน ถูกใช้เป็นสมุนไพรสำคัญในตำรายาจีนโบราณมานานนับพันปี สารสำคัญที่พบในกล้วยไม้สกุลนี้ เช่น โพลีแซ็กคาไรด์และอัลคาลอยด์ มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ด้านการอักเสบ ด้านอนุมูลอิสระ และเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังมีการใช้เป็นยาบำรุงร่างกายและยาชูกำลังในตำรายาจีน (Chen *et al.*, 2016)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์กล้วยไม้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกล้วยไม้ที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (Teixeira da Silva *et al.*, 2015) การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ด้วยเทคนิค การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเมล็ดได้อย่างมีนัยสำคัญ การเพาะเลี้ยงเมล็ดแบบไม่พึ่งพาเชื้อราช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกได้ในสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้ซึ่งช่วยเพิ่มอัตราการงอกและลดการสูญเสียเมล็ด (Hossain *et al.*, 2013) การใช้สูตรอาหารที่เหมาะสม เช่น สูตร MS (Murashige and Skoog) และสูตร VW (Vacin and Went) ช่วยให้การพัฒนาของโปรโตคอร์มและต้นกล้าเป็นไปอย่างรวดเร็ว (Utami & Hariyanto, 2019) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืช ทำให้ต้นกล้าที่ได้มีคุณภาพสูงและพร้อมสำหรับการนำไปปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก (Kauth *et al.*, 2008)

การผลิตเมล็ดเทียมจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ โดยเฉพาะในกล้วยไม้ที่มีการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติที่ยากลำบาก เมล็ดเทียมถูกสร้างขึ้นโดยการห่อหุ้ม โปรโตคอร์มและโปรโตคอร์มไลค์บอดี (PLBs) ด้วยโซเดียมอัลจิเนต ซึ่งช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำและสารอาหาร อีกทั้งยังช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่ไม่ปลอดเชื้อ (Gantait & Sinniah, 2012) มีรายงานแสดงให้เห็นว่าเมล็ดเทียมสามารถพัฒนาเป็นต้นกล้าได้อย่างสมบูรณ์เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม การใช้สารห่อหุ้มที่เหมาะสม เช่น โซเดียมอัลจิเนต เป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างเมล็ดเทียมที่มีคุณภาพ (Miyoshi & Mii, 1995) การใช้เมล็ดเทียมยังช่วยลดการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืช (Saiprasad,

2001) นอกจากนี้การศึกษายังพบว่าเมล็ดเทียมจากกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* สามารถเก็บรักษาในสภาพเย็นได้เป็นระยะเวลานานโดยไม่สูญเสียความสามารถในการงอก (Kauth *et al.*, 2006) การผลิตเมล็ดเทียม จึงเป็นวิธีที่มีประโยชน์ในการเก็บรักษาและการขนส่งพันธุ์พืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและการอนุรักษ์ (Gantait & Sinniah, 2012)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสนองโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
2. เพื่อศึกษาชนิดของสูตรอาหารและระดับน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม
3. เพื่อศึกษาระยะเวลาต่อการกำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียม
4. เพื่อศึกษาความเข้มข้นของ BA และ NAA ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

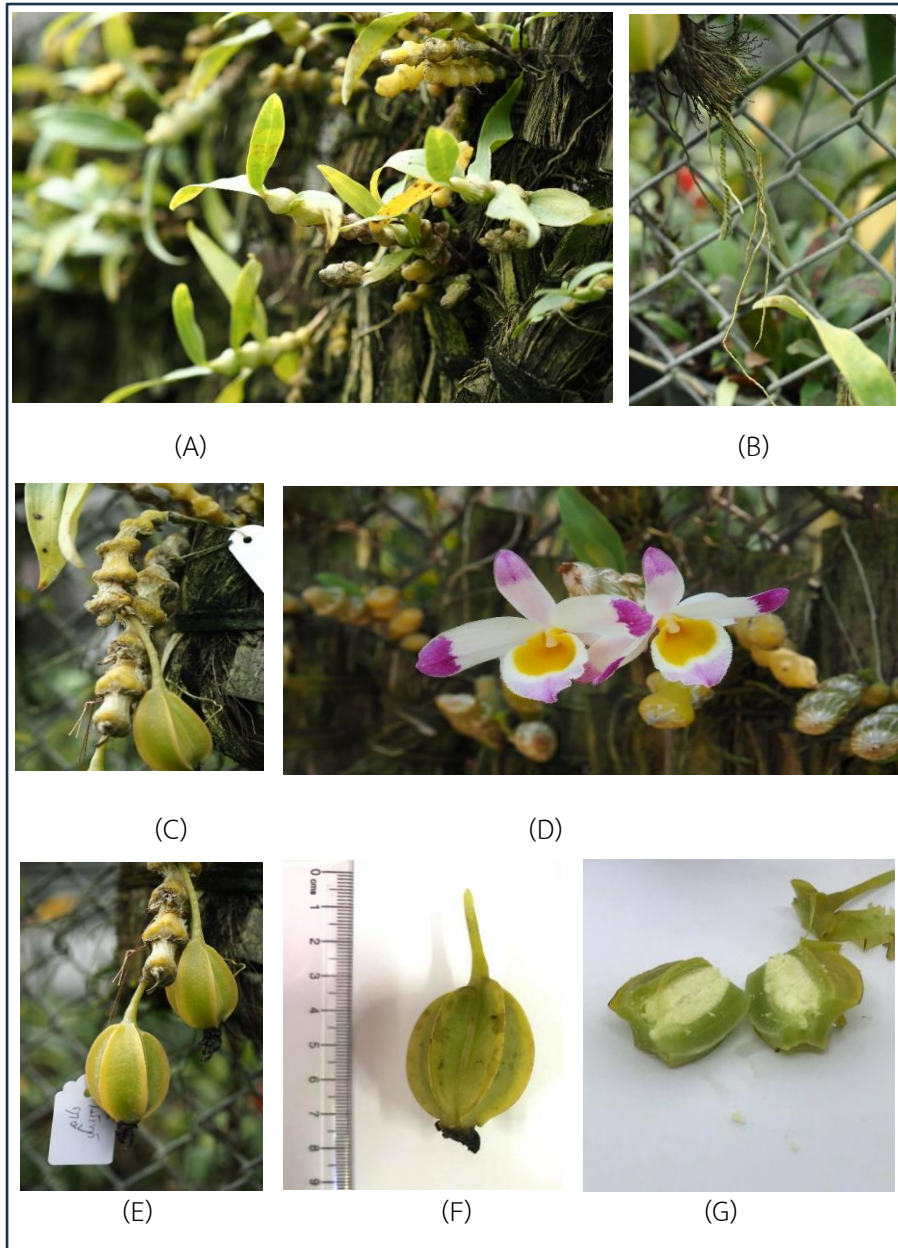
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กล้วยไม้เป็นพืชวงศ์ใหญ่วงศ์หนึ่งของพืชมีดอก (class Angiospermae) ประกอบด้วยสกุล (genera) มากกว่า 800 สกุล และมีประมาณ 30,000 ชนิด (species) ในธรรมชาติมีแหล่งกำเนิดที่สำคัญ 2 แหล่ง คือ ลาตินอเมริกา และเอเชียแปซิฟิก โดยประเทศไทยเป็นศูนย์กลางของแหล่งเอเชียแปซิฟิก ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของกล้วยไม้เขตร้อนที่มีมากกว่า 1,100 ชนิด พบทั้งที่ขึ้นอยู่บนต้นไม้ ฝังดินบนภูเขา และพื้นดิน (ครุฑจิต ธรรมศิริ, 2550) ส่งผลให้มีความหลากหลายของพันธุ์กล้วยไม้สูง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้มาก โดยเฉพาะกล้วยไม้ป่าที่พบในภูมิภาคนี้มีลักษณะเด่นที่เป็นเอกลักษณ์ กล้วยไม้ป่าของไทยมีประมาณ 177 สกุล 1,136 ชนิด (อบฉันทน์ ไทยทอง, 2548)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเอื้องไม้เท้าฤๅษี (*D. pendulum* Roxb.)

กล้วยไม้เอื้องอาศัย มีการเจริญทางข้าง (sympodial) รากสีขาวชุ่น กว้าง 0.1 เซนติเมตร ยาว 22.5-31.5 เซนติเมตร ลำลูกกล้วยยาว 6-17 เซนติเมตร สีเหลือง ใส ส่วนข้อกว้าง 1.5-2.0 เซนติเมตร ปล้องกว้าง 1.0-1.2 เซนติเมตร จำนวน 5-9 ใบต่อดัน แผ่นใบ กว้าง 1.2-1.8 เซนติเมตร ยาว 5.2-9.0 เซนติเมตร ปลายเรียวแหลม สีเขียวออกตามข้อเรียงเวียนรอบต้น (จิราภรณ์ นิคมทัศน และคณะ, 2565) ช่อดอกสั้นที่ออกตามข้อของลำต้นที่ไม่มีใบ ดอกมีขนาดประมาณ 2.5 ถึง 3 นิ้ว สีขาวอมชมพูหรือม่วง กลีบเลี้ยงหลักสีขาวมีสีม่วงแต้ม โดยกลีบปากของดอกมีลักษณะเป็นรูปไต มีสีขาวและมีลวดลายสีเหลืองและม่วงที่ปลายกลีบ (Bhattacharjee *et al.*, 2023) ฝักรูปไข่ ห้อยลง กว้าง 2.4-3.2 เซนติเมตร ยาว 3-4 เซนติเมตร สีเขียวอ่อน สันแหลมเป็นปีกสีเหลืองอ่อน 6 สัน สันกว้าง 0.2-0.3 เซนติเมตร

รอยตะเข็บสีออกเหลือง ก้านผลยาว 2.4-3.0 เซนติเมตร เมล็ดสีครีม ขนาด 0.45-0.53 มิลลิเมตร (จิราภรณ์ นิคมทัศน์และคณะ, 2565) (ภาพประกอบ 1)



ภาพประกอบ 1 ลักษณะของเอื้องไม้เท้าฤๅษี (*Dendrobium pendulum* Roxb.): ลักษณะวิสัยและใบ (A), ราก (B), ลำลูกกล้วย (C), ดอก (D), ฝัก (E-F), และเมล็ด (G)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นการนำชิ้นส่วนของพืช (explant) ซึ่งอาจเป็นปลายยอด ปลายราก ใบ ตาข้าง อวัยวะต่าง ๆ (organ) เนื้อเยื่อเจริญ (meristem) อับเรณู (pollen หรือ microspore) เซลล์เดี่ยว (single cell) เซลล์ไร้ผนัง (protoplast) หรือเนื้อเยื่อชนิดใด ๆ ของพืช มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบของ ธาตุอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสารอื่น ๆ ในปริมาณที่เหมาะสม เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อและ เก็บรักษาในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและควบคุมได้ จะมีผลทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญและพัฒนาในรูปแบบต่าง ๆ ได้ และอาจพัฒนาขึ้นเป็นต้นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ การที่ชิ้นส่วนพืชหรือเซลล์เดี่ยว ๆ ที่นำมาเพาะเลี้ยงสามารถพัฒนาขึ้นเป็นพืชต้นใหม่ได้ เรียกคุณสมบัตินี้ว่า โททิโพเทนซี (totipotency) (ชนากานต์ ลักษณะ, 2567)

เทคโนโลยีการผลิตเมล็ดเทียม

เมล็ดพืชเทียมเป็นเมล็ดที่มนุษย์สร้างขึ้นโดยนำเอาไซมาติกเอ็มบริโอ (somatic Embryo) มาหุ้มด้วยสารอื่นเพื่อให้มีโครงสร้างคล้ายเมล็ดจริงบางที่เรียกว่า เอนแคปซูเลตไซมาติก เอ็มบริโอ (encapsulate somatic embryo) การหุ้มเอ็มบริโอยด์มีหลายวิธีด้วยกัน วิธีที่นิยมมากคือหุ้มด้วยสารไฮโดรเจล (hydrogel) เช่น โซเดียมแอลจิเนต (sodium Alginate) เจลาติน (gelatin) คาราจีแนน (carrageenan) หรือโลคัสบีนกัน (locusbean gum) เป็นต้น โดยเตรียมอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการเจริญของเนื้อเยื่อ เช่น สูตรมูราชิกและสคูคผสมสารไฮโดรเจลที่เหมาะสมจะได้สารละลายที่มีลักษณะเหนียวคล้ายคอลลอยด์ จากนั้นจึงนำเอ็มบริโอยด์ที่เตรียมไว้ผสมลงไปคนให้กระจายทั่วกัน จากนั้นดูดสารละลายไฮโดรเจลที่มีเอ็มบริโอยด์อยู่หยดลงไปบนสารคอมเพล็กซิงเอเจนต์ (complexing agent) ได้แก่ แกลือแคลเซียม (calcium salt) โพแทสเซียม (potassium) หรือแอมโมเนียมคลอไรด์ (ammonium chloride) หรือใช้อุณหภูมิต่ำ สารอาหารที่ผสมกับไฮโดรเจนนี้จะเป็นอาหารเลี้ยงเอ็มบริโอยด์ จึงทำหน้าที่คล้ายเอนโดสเปิร์ม เรียกส่วนนี้ว่าอาหารสะสมเทียม (artificial endosperm) แคลเซียมแอลจิเนตซึ่งเป็นสารที่ค่อนข้างแข็งสารนี้จะหุ้มส่วนของไฮโดรเจลไว้ ทำหน้าที่เป็นเปลือกเมล็ดเทียม (artificial seed coat) โครงสร้างของเมล็ดพืชเทียมที่หุ้มด้วยแคลเซียมแอลจิเนตมีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ ไซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) หรือเอ็มบริโอยด์ทำหน้าที่แทนไซโกติกเอ็มบริโอ (zygotie embryo) อาหารสะสมเทียม (artificial endosperm) ทำหน้าที่หุ้มเอ็มบริโอยด์และเปลือกเมล็ดเทียม (artificial seed coat) เป็นส่วนนอกที่ค่อนข้างแข็ง ทำหน้าที่แทนเปลือกเมล็ด (จิรา ณ หนองคาย, 2551)

การผลิตเมล็ดเทียมถือเป็นการเก็บรักษาพันธุ์พืชไว้ในรูปแบบของการอนุรักษ์ในสภาพนอกธรรมชาติ เป็นการเลียนแบบเมล็ดพืชที่ได้จากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ เมล็ดเทียมสามารถเก็บรักษาไว้ภายใต้อุณหภูมิต่ำและสถานะแห้ง ถือเป็นวิธีที่ง่ายต่อการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืช ซึ่งเป็นการเก็บเมล็ดเทียมไว้ได้นานเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัย ทั้งอายุของชิ้นส่วนพืช อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บ เวลา

ที่ใช้ในการเคลือบเมล็ด และอาหารที่ใช้ในการทำเอนโดสเปิร์มเทียม เนื้อเยื่อที่เก็บรักษาอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงในขวดแก้วลดลง สามารถนำเมล็ดเทียมลงแปลงปลูกได้โดยตรง ต้นที่ได้จากเมล็ดเทียมจะมีความเป็นแบบเดียวกัน ซึ่งถือเป็นข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับเมล็ดจากธรรมชาติ ทำให้ได้ผลผลิตที่ได้มีราคาต่อหน่วยต่ำลงมากและยังสะดวกต่อการเคลื่อนย้ายด้วย (นิอร คงประดิษฐ์, 2550)

วิธีดำเนินงานวิจัย

ตรวจสอบการมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้

เก็บฝักกล้วยไม้ทำฤๅษีจากสวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้า พิษณุโลก ในพระราชดำริ จังหวัดพิษณุโลกในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2563 เตรียมสาร TTC (triphenyl tetrazolium chloride) ร้อยละ 0.8 เติมน้ำ Tween 20 ปรับ pH เป็น 7.0 ใส่ในขวดสีชา เชื่อมเมล็ดแช่ในสารละลาย TTC นำไปเก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นำไปส่องดูการติดสีด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเลนส์ประกอบ จากนั้นตรวจสอบการติดสีแดงของเมล็ดกล้วยไม้หลังแช่เมล็ดไว้ 24 และ 48 ชั่วโมง บันทึกการติดสีแดง วิธีการดัดแปลงมาจากวิธีของ Verleysen และคณะ (2004) (อ้างอิงจากอารักษ์ จันทศิลป์และรัตน หิรัญพันธุ์, 2549)

ศึกษาสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม

นำฝักกล้วยไม้มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจานและล้างน้ำประปาไหลผ่านให้สะอาด นำฝักที่ล้างสะอาดฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 ก่อนนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ ซ้ำเชื้อฝักกล้วยไม้โดยจุ่มแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 และผ่านไฟ รอกให้ไฟเผาที่ฝักดับจึงฆ่าเชื้อโดยการเผาไฟอีกครั้ง ฆ่าฝักและเชื่อมเมล็ดลงในอาหารเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ (15, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร) เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 และ 12 สัปดาห์ (ดัดแปลงจาก ศุภาวีร์ แสงจันทร์จิระเดชและจักรพงษ์ แท่งทอง, 2015) ถ่ายภาพและบันทึกค่าคะแนนพื้นที่การเกิดโปรโตคอร์ม โดยระดับคะแนน 0 - 5 แบ่งค่าระดับคะแนน ดังนี้

- คะแนน 5 หมายถึง เมล็ดพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มจำนวนร้อยละ 100 ของเมล็ดในขวด
- คะแนน 4 หมายถึง เมล็ดพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มจำนวนร้อยละ 75 ของเมล็ดในขวด
- คะแนน 3 หมายถึง เมล็ดพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มจำนวนร้อยละ 50 ของเมล็ดในขวด
- คะแนน 2 หมายถึง เมล็ดพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มจำนวนร้อยละ 25 ของเมล็ดในขวด
- คะแนน 1 หมายถึง เมล็ดพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มไม่ถึงร้อยละ 25 ของเมล็ดในขวด
- คะแนน 0 หมายถึง เมล็ดไม่มีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม

ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการกำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียม

นำโปรโตคอร์มขนาด 2-3 มิลลิเมตร แช่ในอาหารเหลวที่เติมโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้นร้อยละ 3 หยด โปรโตคอร์มลงในแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ล้างเมล็ดเทียมด้วยน้ำกลั่นซับให้แห้ง นำเมล็ดเทียมมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาจัดน้ำออก โดยวางบนกระดาษกรองในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง คำนวณปริมาณน้ำที่เหลือน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเมล็ดเทียมจำนวน 20 เมล็ดต่อการกำจัดน้ำออกแต่ละชั่วโมง ตามสูตรด้านล่าง เพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมที่กำจัดน้ำออกแต่ละชั่วโมงบนอาหาร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

$$\text{ปริมาณน้ำที่เหลือในเมล็ดเทียม (\%)} = 100 - \left[\frac{\text{FW} - \text{DW} \times 100}{\text{FW}} \right]$$

เมื่อ FW = น้ำหนักเมล็ดเทียมสดก่อนกำจัดน้ำออก (fresh Weight)
DW = น้ำหนักเมล็ดเทียมเมื่อกำจัดน้ำออกแต่ละชั่วโมง (dry Weight)

เมื่อครบแต่ละเวลานำเมล็ดเทียม 20 เมล็ด มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2MS (น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร) ขวดละ 4 เมล็ด ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อครบ 4 สัปดาห์ ถ่ายภาพและบันทึกจำนวนเมล็ดเทียมที่มีชีวิต โดยสังเกตจากต้นอ่อนมีสีเขียว บันทึกลักษณะของต้นอ่อน ได้แก่ สีของต้นอ่อน การเกิดรากและการเกิด protocorm-like body (PLBs) (ดัดแปลงจาก จตุพร หงส์ทองคำและคณะ, 2560)

ศึกษาความเข้มข้นของ BA และ NAA ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

นำต้นอ่อนเอื้องไม้เท้าฤษีขนาดความสูงประมาณ 5 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2MS (น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร) ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA (0, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ NAA (0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) รวม 12 สูตรอาหาร สูตรอาหารละ 5 ขวด ต้นอ่อนขวดละ 3 ต้น รวมเป็นจำนวน 15 ต้นต่อสูตรอาหาร เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง ประมาณ 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกความสูงต้น (เซนติเมตร) จำนวนยอดต่อต้นและจำนวนรากต่อต้น (ดัดแปลงจากศุภาวีร์ แสงจันทร์จิระเดช และจักรพงษ์ แห่งทอง, 2015)

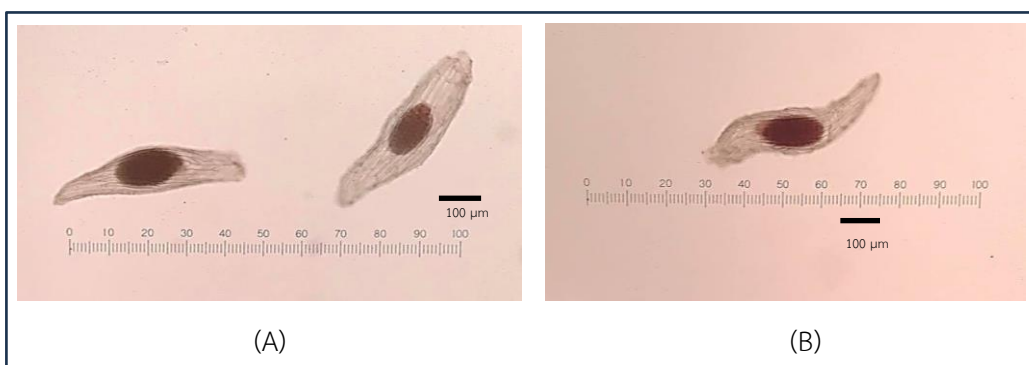
วิเคราะห์ข้อมูลและผลการวิจัย

ทุกการทดลองวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) คำนวณค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD) ค่าร้อยละ นำค่าเฉลี่ยมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนแบบทางเดียว One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Rang test (DMRT)

ผลการวิจัย

ผลการตรวจสอบการมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้

การตรวจสอบการติดสีแดงของเมล็ดกล้วยไม้หลังแช่เมล็ดไว้ในสารละลาย TTC เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าทั้ง 24 และ 48 ชั่วโมง เอ็มบริโอแสดงสีแดงบางส่วนของเอ็มบริโอและทั้งเอ็มบริโอของเมล็ดตัวอย่างศึกษา (ภาพประกอบ 2)



ภาพประกอบ 2 การติดสีของเมล็ดกล้วยไม้: ตรวจสอบการติดสีของเมล็ดที่ 24 ชั่วโมง (A), ตรวจสอบการติดสีของเมล็ดที่ 48 ชั่วโมง; scale bar= 100 ไมโครเมตร (B)

ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม

เชื้อเมล็ดลงบนอาหารเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ (15, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 8 และ 12 สัปดาห์ บันทึกค่าคะแนนพื้นที่การเกิดโปรโตคอร์ม 0 - 5 แบ่งค่าระดับคะแนน เอื้องไม้เท้าฤๅษีเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าทุกสูตรอาหารที่สามารถแสดงค่าคะแนนการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มได้เป็นอย่างดี มีค่าคะแนนตั้งแต่ 4.00 ± 0.00 ถึง 5.00 ± 0.00 โดยสูตรอาหาร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 15, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร มีค่าคะแนนอยู่ที่ 5.00 ± 0.00 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ขณะที่สัปดาห์ที่ 12 พบว่าอาหารทุกสูตรมีค่าคะแนน 5.00 ± 0.00 (ตารางที่ 1 และภาพประกอบ 3) ทั้งนี้สูตรอาหาร

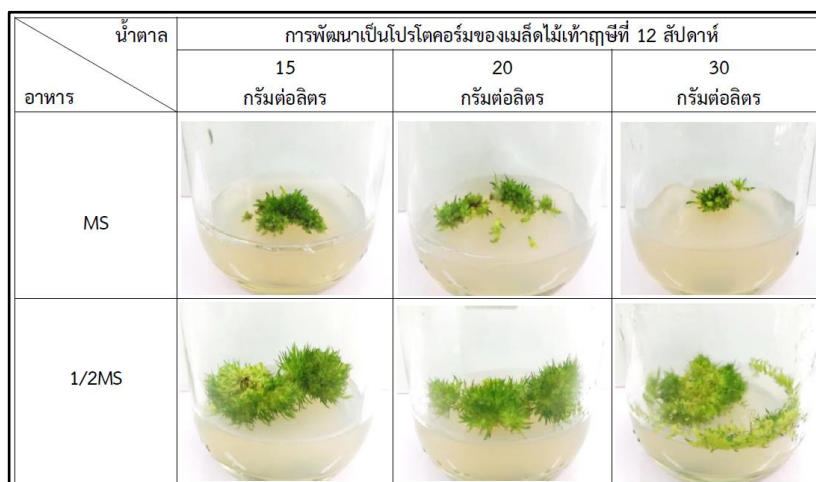
1/2MS ที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร แสดงการพัฒนาของโปรโตคอร์มเร็วกว่าน้ำตาลระดับอื่น ดังนั้นสูตรอาหาร 1/2MS ที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร จึงถูกเลือกเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเอ็มเอ็มแท่งพืช

ตารางที่ 1 การเกิดโปรโตคอร์มของเมล็ดเอ็มเอ็มแท่งพืชบนอาหารและระดับน้ำตาลซูโครสที่ต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 และ 12 สัปดาห์

สูตรอาหาร	น้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ค่าคะแนนของการเกิดโปรโตคอร์ม* $\pm$ SD	
		8 สัปดาห์	12 สัปดาห์
MS	15	4.70 $\pm$ 0.46 ^b	5.00 $\pm$ 0.00 ^{ns}
	20	4.10 $\pm$ 0.70 ^a	5.00 $\pm$ 0.00
	30	4.00 $\pm$ 0.00 ^a	5.00 $\pm$ 0.00
1/2MS	15	5.00 $\pm$ 0.00 ^b	5.00 $\pm$ 0.00
	20	5.00 $\pm$ 0.00 ^b	5.00 $\pm$ 0.00
	30	5.00 $\pm$ 0.00 ^b	5.00 $\pm$ 0.00

*ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD คะแนนการเกิดโปรโตคอร์มเต็ม 5 คะแนน

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในกลุ่มนี้ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ns: not significant หมายถึงทุกสูตรอาหารไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพประกอบ 3 การเกิดโปรโตคอร์มของเอ็มเอ็มแท่งพืชบนอาหารสูตร MS และ 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสระดับที่ต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์

ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการกำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียม

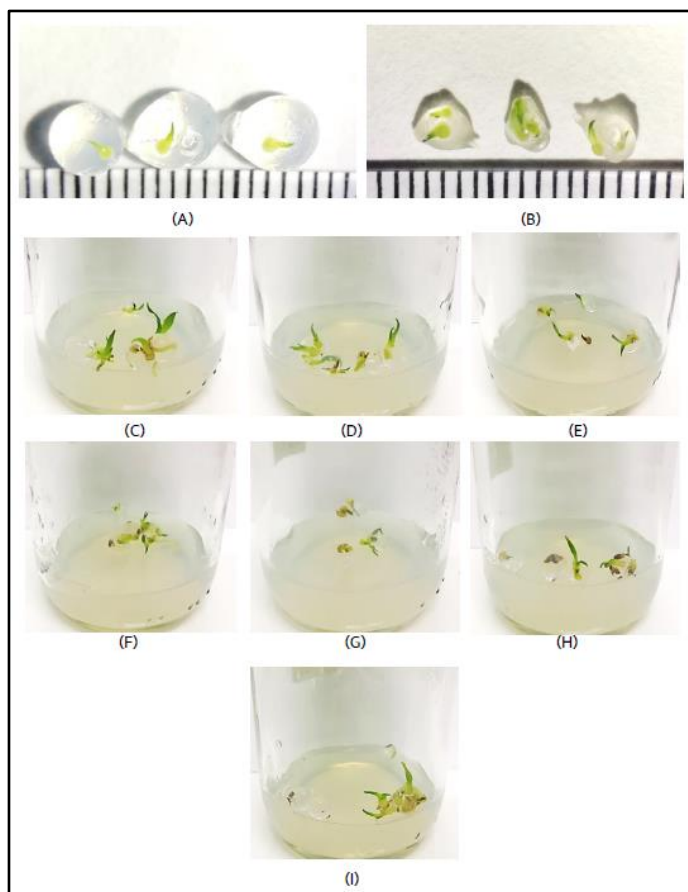
นำเมล็ดเทียมที่มีโปรโตคอร์มขนาด 2-3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมน้ำตาลซูโครส จากนั้นนำมากำจัดน้ำออก ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการกำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียมของเอื้องไม้เท้าฤๅษี พบร้อยละปริมาณน้ำที่เหลืออยู่ในเมล็ดเทียมชั่วโมงที่ 6 อยู่ที่ 27.98 เมื่อตรวจสอบร้อยละการรอดชีวิตของเมล็ดเทียมหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร พบว่าแสดงร้อยละการรอดชีวิตอยู่ที่ 65 ± 13.69 ซึ่งต่ำกว่าร้อยละ 90 ในทุกชั่วโมงของการกำจัดน้ำออก (ตารางที่ 2)

การตรวจสอบลักษณะของโปรโตคอร์มที่เจริญเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ของเมล็ดเทียม พบว่าต้นอ่อนจากเมล็ดเทียมเอื้องไม้เท้าฤๅษีที่รอดชีวิตแสดงลักษณะใบสีเขียวเข้ม พบการเกิดราก และ PLBs ในเมล็ดเทียมชั่วโมงที่ 0 และ 1 (ภาพประกอบ 4)

ตารางที่ 2 ปริมาณน้ำที่เหลือในเมล็ดเทียมจากการกำจัดน้ำออกที่ 0-6 ชั่วโมง ร้อยละการรอดชีวิตและลักษณะของต้นอ่อนกล้วยไม้เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

	เวลาในการกำจัดน้ำออก (ชั่วโมง)*							ลักษณะของต้นอ่อน
	0	1	2	3	4	5	6	
ปริมาณน้ำที่เหลือในเมล็ดเทียม (ร้อยละ)	100.00	74.19	61.35	53.81	38.32	31.45	27.98	ส่วนใหญ่ใบอ่อนมีสีเขียวเข้ม พบการเกิดรากและพบ PLBs
การรอดชีวิต* (ร้อยละ)	65 ± 28.5	70 ± 32.6	50 ± 30.6	60 ± 37.9	55 ± 27.4	35 ± 22.4	65 ± 13.7	ในเมล็ดเทียมชั่วโมงที่ 0 และ 1

*ค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิต $\pm$ SD จากเมล็ดเทียมจำนวน 20 เมล็ด (n=20) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพประกอบ 4 เมล็ดเหียงเนื้อไม้เท้าฤๅษี: เมล็ดเหียงชั่วโมงที่ 0 (A), เมล็ดเหียงที่กำลังงอกชั่วโมงที่ 6 (B), ต้นอ่อนจากเมล็ดเหียงที่กำลังงอกชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 เพาะเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (C-I) ตามลำดับ

ผลการศึกษาความเข้มข้นของ BA และ NAA ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

นำต้นอ่อนขนาดความสูง 5 มิลลิเมตรมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2MS (น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร) ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA (0, 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ NAA (0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) รวม 12 สูตรอาหาร ๆ ละ 15 ต้น เพาะเลี้ยงต้นอ่อนเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหารที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้กล้วยไม้เนื้อไม้เท้าฤๅษีแสดงการเจริญเติบโตได้ดีกว่าสูตรอื่น โดยมีลักษณะต้นแข็งแรง มีรากสมบูรณ์ แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนยอดต่อต้น จำนวนรากต่อต้นและความสูงต้น เท่ากับ 2.07 ± 0.68 ยอด 0.53 ± 0.72 ราก และ 0.87 ± 0.34 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมา

ได้แก่ สูตรอาหารที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแสดงจำนวนยอดต่อต้น จำนวนรากต่อต้นและความสูงต้น เท่ากับ 2.13 ± 0.62 ยอด 0.13 ± 0.50 ราก และ 0.89 ± 0.24 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลของ BA และ NAA ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นเหมาะสมต่อจำนวนยอด จำนวนรากและความสูงต้นของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องไม้เท้าฤๅษี เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		การพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์*		
BA	NAA	จำนวนยอด/ต้น	จำนวนราก/ต้น	ความสูงต้น (เซนติเมตร)
0	0	1.87 ± 0.50^{cde}	0.40 ± 0.61^{bc}	0.74 ± 0.20^{abcde}
0	0.5	1.33 ± 0.60^{ab}	0.07 ± 0.25^a	0.72 ± 0.24^{abcde}
0	1	1.07 ± 0.25^a	0.00 ± 0.00^a	0.63 ± 0.22^{abc}
1	0	2.07 ± 0.68^{de}	0.53 ± 0.72^c	0.87 ± 0.34^{de}
1	0.5	1.60 ± 0.49^{bcd}	0.07 ± 0.25^a	0.66 ± 0.22^{abcd}
1	1	2.00 ± 0.97^{cde}	0.13 ± 0.34^{ab}	0.83 ± 0.44^{cde}
2	0	1.87 ± 0.50^{cde}	0.00 ± 0.00^a	0.59 ± 0.11^{ab}
2	0.5	2.13 ± 0.62^e	0.13 ± 0.50^{ab}	0.89 ± 0.24^e
2	1	1.53 ± 0.50^{bc}	0.00 ± 0.00^a	0.64 ± 0.19^{abc}
4	0	2.00 ± 0.00^{cde}	0.00 ± 0.00^a	0.57 ± 0.23^a
4	0.5	2.27 ± 0.57^e	0.07 ± 0.25^a	0.81 ± 0.22^{bcde}
4	1	1.93 ± 0.57^{cde}	0.00 ± 0.00^a	0.74 ± 0.24^{abcde}

*ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD จากต้นอ่อนกล้วยไม้ 15 ต้น (n=15) ที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในกลุ่มหนึ่ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสนองพระราชดำรินโยบายอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เพื่อศึกษาชนิดของสูตรอาหารและระดับน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม และเพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการกำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียมของกล้วยไม้เอื้องไม้เท้าฤๅษี การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์และเก็บรวบรวมฝักของกล้วยไม้ ณ โรงเรือนรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้สวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้า พิษณุโลก ในพระราชดำรินเดือนตุลาคม พ.ศ. 2563 (จิราภรณ์ นิคมทัศนและคณะ, 2565) นำเมล็ดเอื้องไม้เท้าฤๅษีมาตรวจสอบการมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้ ส่งผลต่อความสามารถในการออกของเมล็ด โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของเอ็มบริโอหลังจากการแช่เมล็ดในสาร TTC เมล็ดที่สมบูรณ์จะมี

เอมบริโอที่มีชีวิต ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีแดงซึ่งเป็นวิธีทางชีวเคมีที่ใช้ประเมินความมีชีวิตของเมล็ดได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากการตรวจสอบการหายใจในเซลล์เมล็ดที่มีชีวิต เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ดีไฮโดรเจนเนส ช่วยในการปล่อยไอออนไฮโดรเจนซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารละลาย TTC ที่ไม่มีสี ส่งผลให้เกิดสารประกอบสีแดง 1,3,5-triphenylformazan (TPF) ขึ้น เมล็ดที่มีเอมบริโอสีแดงถือว่ามีชีวิต (จุฑารัตน์ กรดสันและคณะ, 2562) พบว่าเมื่อแช่เมล็ดจนถึง 48 ชั่วโมง เอมบริโอแสดงสีแดงบางส่วนของเอมบริโอและทั้งเอมบริโอของเมล็ดตัวอย่างศึกษา

การศึกษาสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มจากเมล็ดกล้วยไม้ เขี่ยเมล็ดลงบนอาหารเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ (15, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 และ 12 สัปดาห์ พบว่าเอื้องไม้เท้าฤๅษีสามารถออกเป็นโปรโตคอร์มได้ดี ทั้งนี้ปัจจัยในการงอกของเมล็ดกล้วยไม้แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับสูตรอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยง โดยมีรายงานว่ากล้วยไม้ชนิดเดียวกัน เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่างกันก็จะแสดงการงอกที่แตกต่างกันได้ มีรายงานการศึกษาสูตรอาหารต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ สูตรอาหาร MS, 1/2MS, VW (Vacin and Went, 1949), ND (Tokuhara and Mii, 1993), MT, Hyponex, KC (Knudson C) (กุลนาถ อบสุวรรณ และสุนทร ทารพันธ์, 2559; ศุภาวีร์ แสงจันทร์จิระเดชและจักรพงศ์ แห่งทอง, 2015; ไชนิยะ สะมาลาและคณะ, 2559; จตุพร หงษ์ทองคำและรชยา พรหมวงศ์, 2560; จุฑารัตน์ กรดสันและคณะ, 2562; Wongrasee & Bunnag, 2018 ; Tikendra *et al.*, 2018) นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้ประสบความสำเร็จต้องมีการคัดเลือกสูตรอาหารให้เหมาะสม รวมถึงการเติมน้ำตาลและการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่จำเป็นต่อการงอกและการพัฒนาของกล้วยไม้ให้เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ (ศุภาวีร์ แสงจันทร์จิระเดช และจักรพงศ์ แห่งทอง, 2015; Tikendra *et al.*, 2018) จากผลการศึกษาน้ำตาลที่เหมาะสม พบว่าเอื้องไม้เท้าฤๅษีสามารถงอกได้ดีที่สูตรอาหารที่เติมน้ำตาลทั้ง 3 ระดับ คือ 15, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้ระหว่างการศึกษาคณะผู้วิจัยได้สังเกตระยะเวลาการงอกของโปรโตคอร์ม พบว่าอาหารที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตรเกิดการพัฒนาของโปรโตคอร์มได้เร็วกว่าระดับน้ำตาล 15 และ 30 กรัมต่อลิตร คณะผู้วิจัยจึงเลือกอาหารที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ในการเติมลงในอาหารเพื่อศึกษาขั้นตอนต่อไปสอดคล้องกับ Takano *et al.* (1990) ศึกษาผลของซูโครสต่อการเพิ่มโปรโตคอร์มของ *Cymbidium Mini Drea* ‘Golden Color’ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมควรอยู่ในระดับต่ำกว่า 30 กรัมต่อลิตร และรายงานของอำนาจวิทย์ ขาววิทย์พันธุ์ (1977) (อ้างจากศุภาวีร์ แสงจันทร์จิระเดช และจักรพงศ์ แห่งทอง, 2015) พบว่าปริมาณน้ำตาลมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนของหาวายลูกผสม เมื่อไม่เติมน้ำตาลซูโครสหรือเติมน้ำตาลซูโครสเพียง 5 กรัมต่อลิตร ต้นอ่อนเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นน้อย นอกจากนี้มีรายงานอาหารสูตร MS และ 1/2MS ที่เติมน้ำตาล 15, 20 และ 30 กรัม ต่อลิตร ชักนำให้เกิดร้อยละการงอกของเมล็ดเอื้องดอกมะขาม (*D. delacourii* Guillaumin) ได้ร้อยละ 100 ทั้งนี้

สำหรับเมล็ด เอื้องดอกมะขามอาหารสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาล 15 กรัมต่อลิตรมีการให้ค่าคะแนนของพื้นที่การเกิดต้นอ่อนเฉลี่ยสูงสุด (ศุภาวีร์ แสงจันทร์จิรเดชและจักรพงศ์ แห่งทอง (2015) การใช้น้ำตาล ความเข้มข้นสูงอาจมีผลยับยั้งการเจริญของกล้วยไม้เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสทำให้เกิด osmotic stress เนื้อเยื่อพืชต้องนำพลังงานส่วนหนึ่งไปใช้ปรับแรงดันออสโมซิสภายในและภายนอกเซลล์ พืชให้สมดุลกัน ทำให้สูญเสียพลังงานส่วนนี้แทนที่จะนำพลังงานไปใช้ในการเจริญเติบโตทั้งหมด อีกทั้งการใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงยังยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้อีกด้วย (จตุพร หงส์ทองคำ และรชยา พรมงศ์, 2560) ดังนั้น จากการศึกษาสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาเป็น โปรโตคอร์มจากเมล็ดกล้วยไม้ จึงมีความเกี่ยวข้องกับ 3 ปัจจัย ได้แก่ สูตรอาหาร ความเข้มข้นของอาหาร และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส

นำเมล็ดเทียมมาการจัดน้ำออกผลการศึกษา พบว่าเมื่อถึงชั่วโมงที่ 6 มีปริมาณน้ำที่เหลืออยู่ใน เมล็ดเทียมอยู่ร้อยละ 27.98 โดยพบว่าปริมาณน้ำที่เหลืออยู่แต่ละชั่วโมงในเมล็ดเทียมยังมีปริมาณ มากกว่ารายงานของจตุพร หงส์ทองคำและคณะ (2560) ซึ่งพบปริมาณน้ำที่เหลืออยู่ในเมล็ดเทียม กล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเปาะเปิดชั่วโมงที่ 1-6 เท่ากับร้อยละ 37.51, 30.30, 28.95, 21.98, 14.90 และ 14.06 ตามลำดับ ทั้งนี้ในการเก็บรักษาเมล็ดเทียมที่อุณหภูมิต่ำกว่าการมีปริมาณน้ำที่สูงภายในเมล็ดเทียม อาจก่อให้เกิดการสร้างความเค็มขึ้นภายในเมล็ดเทียม ในระหว่างการเก็บรักษาและเป็นอันตรายต่อ ขึ้นส่วนพืชที่อยู่ภายใน จึงจำเป็นต้องกำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียมให้ได้มากที่สุด โดยที่พืชที่อยู่ภายใน ยังคงมีชีวิตอยู่ เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของตัวอย่างพืชภายหลังจากการเก็บรักษา (จตุพร หงส์ทองคำ และคณะ, 2560 และ Wongrasee & Bunnag, 2018) เมื่อตรวจสอบร้อยละการรอดชีวิตของ เมล็ดเทียมหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเอื้องไม้เท้าฤๅษีแสดงร้อยละการรอดชีวิตอยู่ ระหว่าง 35-70 ซึ่งต่ำกว่าร้อยละ 90 ในทุกชั่วโมงของการกำจัดน้ำออก ลักษณะของโปรโตคอร์มที่เจริญ เป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ของเมล็ดเทียม พบว่า ต้นอ่อนจากเมล็ดเทียมที่รอดชีวิต พบ PLBs ในเมล็ดเทียม ชั่วโมงที่ 0 และ 1 ทั้งนี้กล้วยไม้สามารถพบการเกิด PLBs ซึ่งเป็นลักษณะของการเจริญเติบโตที่มีโครงสร้าง คล้ายโปรโตคอร์มสามารถเกิดได้โดยตรงไม่ต้องผ่านแคลลัสเรียกว่า โซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสแบบทางตรง และการเกิดโดยผ่านแคลลัสก่อนเรียกว่าโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสแบบทางอ้อม นอกจากนี้ PLBs ยังมี บทบาทสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนต้นกล้วยไม้ได้โดยตรง ประหยัดเวลา ขนาดรูปร่างเป็นแบบเดียวกัน และสามารถทำการปรับสภาพพืชได้ดี (Hossain *et al.*, 2010 และนรรรัตน์และคณะ, 2562)

การเพาะเลี้ยงเอื้องไม้เท้าฤๅษี บนสูตรอาหารที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้กล้วยไม้ พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์โดยใช้เพียง BA เติมนลงในอาหารเพาะเลี้ยง ทั้งนี้รายงานจากศุภาวีร์ แสงจันทร์จิรเดชและจักรพงศ์ แห่งทอง (2015) กล่าวว่า การเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ในช่วงแรกการพัฒนา ส่วนยอดของโปรโตคอร์มนั้นนิยมใช้สารควบคุมการเจริญกลุ่มไซโตไคนิน อย่างเดียวหรือไซโตไคนิน ความเข้มข้นสูงร่วมกับออกซินความเข้มข้นต่ำเพื่อเพิ่มจำนวนยอด แต่ถ้าเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสาร ควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินอย่างเดียว หรือมีสัดส่วนระหว่างไซโตไคนินต่อออกซินในระดับสูง ขึ้นจะพัฒนารากได้ดีขึ้น ดังนั้น จากการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในสูตร

อาหารต่อการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ของกล้วยไม้ จึงมีความเกี่ยวข้องกับ 4 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดพืช สูตรอาหารชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาการกระตุ้นการงอกของโปรโตคอร์มให้เกิดในระยะเวลาที่เร็วขึ้น
2. ศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดเทียมเอื้องไม้ให้พืชให้เก็บรักษาได้ยาวนานขึ้น เช่น การเก็บรักษาในอุณหภูมิต่าง ๆ การเติมสารชะลอการเจริญเติบโต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ สวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้า พิษณุโลก ดร.บัวหลวง ฝ่ายเยื่อแห่ง สถาบันวิจัยสิ่งแวดล้อมเพื่อความยั่งยืน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หลักสูตรชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ และศูนย์ประสานงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์

เอกสารอ้างอิง

- กุลนาถ ออบสุวรรณ และสุนทรี ทารพันธ์. (2559). ผลของสูตรอาหารต่อการเติบโตของต้นกล้วยไม้สกุลหวาย *D. Fleischeri* และ *D. Judy Rutz. Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University*, 3(6), 340-348.
- ครรชิต ธรรมศิริ. (2550). *เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้* (ปรับปรุงครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: อัมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.
- จตุพร หงส์ทองคำ, รชยา พรหมวงศ์ และสุรัชย์ รัตนสุข. (2560). การขยายพันธุ์และการเก็บรักษาพันธุ์กล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเปาะเปิด โดยเทคนิคเมล็ดเทียม. *SDU Research Journal*, 10(3), 187-201.
- จตุพร หงส์ทองคำ และรชยา พรหมวงศ์. (2560). การขยายพันธุ์กล้วยไม้ในหลอดแก้วของกล้วยไม้กระแจะร้อน (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.) กล้วยไม้ป่าใกล้สูญพันธุ์ในกลุ่มป่าชุมชน. *วารสารเกษตรพระวรุณ*, 14(2), 146-154.
- จิรา ณ หนองคาย. (2551). *หลักและเทคนิคการขยายพันธุ์พืชในประเทศไทย* (พิมพ์ครั้งที่ 1).

- กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- จิราภรณ์ นิคมทัศน, จริญญา มากน้อย, พิชัย ใจกล้า, บัวหลวง ฝ้ายเหื้อ, นิศากร สุวรรณ, วิทยา ภิระ, ธนิกานต์ หลิมเจริญ, ศุภวัฒน์ ไสแจ่ม และสุภานัน พุทธา. (2565). การขยายพันธุ์และการเก็บรักษาพันธุ์กล้วยไม้เลี้ยงสูงพันธุ์บางชนิด ในสวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้า พิษณุโลก ในพระราชดำริ. (รายงานการวิจัย) สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ.
- จุฑารัตน์ กรดสัน, ศุทธิณัฐ์ สุนทรกลัมภ์ และปวีณา แก้วอุบล. (2562). ผลของโคโตซานต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของโพโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องเทียนส้ม (*Coelogyne brunnea* Lindl. (Orchidaceae)). *แก่นเกษตร*, 47(1), 141-150.
- ชนากานต์ ลักษณะ. (2567). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเศรษฐกิจและพืชสมุนไพร*. ชลบุรี: คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ไชนียะ สะมาลา, สิริรัตน์ พรหมทอง, ครรชิต ธรรมศิริ, ศศิกานต์ ประสงค์สม และฐกฤต อิมสมบุรณ์. (2559). การศึกษาสูตรอาหารที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูร. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์*, 3(ฉบับพิเศษ), M02/43-47.
- นิอร คงประดิษฐ์. (2550). *การขยายพันธุ์ในหลอดทดลองและการเก็บรักษาโพโทคอร์ม โดยเทคโนโลยีการผลิตเมล็ดเทียมของกล้วยไม้กะเหรี่ยงปากเป็ด (Cymbidium finlaysonianum Lindl.)* (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต). สงขลา: สาขาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ศุภาวีร์ แสงจันทร์จิรเดช และจักรพงศ์ แท่งทอง. (2015). การเพาะเมล็ดเอื้องดอกมะขาม (*Dendrobium delacourii* Guillaumin) ในสภาพปลอดเชื้อ. *SDU Research Journal*, 8(1), 109-118.
- อบฉันท ไทยทอง. (2548). *กล้วยไม้เมืองไทย*. กรุงเทพฯ: อัมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.
- อารักษ์ จันศิลป์ และรัตนา ทิรัญพันธุ์. (2549). การเก็บรักษากล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) ในหลอดทดลอง โดยการเก็บรักษาเมล็ดและวิธีชะลอการเจริญเติบโต. (รายงานการวิจัย) สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Bhattacharjee, B., Hossain, M.E., Ayesha, M.N. & Islam, S.M.S. (2023). Morphological diversity analysis of some existing and endangered *Dendrobium* orchid species in Bangladesh. *Journal of Botanical Sciences*, 14(2), 146-154. Retrieved from <https://www.banglajol.info/index.php/JBS/article/download/68911/46102>.
- Chen, N.D., You, T., Li, J., Bai, L.T., Hao, J.W. & Xu, X.Y. (2016). A comparative study of three tissue-cultured *Dendrobium* species and their wild correspondences by headspace gas chromatography-mass spectrometry combined with chemometric methods. *Journal of Chromatography B*, 1022, 73-82.

- Gale, S.W., Fay, M.F. & Chase, M.W. (2018). Orchid conservation: How can we meet the challenges in the twenty-first century? *Journal of Experimental Botany*, 70(22), 6611–6625. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz334>.
- Gantait, S. & Sinniah, U.R. (2012). Encapsulation technology for artificial seed production of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson. *Scientia Horticulturae*, 139, 47-52.
- Hossain, M.M., Kant, R., Van, P.T., Winarto, B., Zeng, S. & Teixeira da Silva, J.A. (2013). The application of biotechnology to orchids. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32, 69–139.
- Hossain, M.M., Sharma, M., Teixeira da Silva, J. & Pathak, P. (2010). Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. *Scientia Horticulturae*, 123, 479-487.
- Kauth, P.J., Dutra, D., Johnson, T.R., Stewart, S.L., Kane, M.E. & Vendrame, W.A. (2006). Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*, 9, 375–393.
- Kauth, P.J., Dutra, D., Johnson, T.R., Stewart, S.L., Kane, M.E. & Vendrame, W. (2008). Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. In J. A. Teixeira da Silva (Ed.), *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues* (pp. 375-393). Global Science Books.
- Kew Gardens. (2022). *Exploring the orchid family tree*. from <https://www.kew.org/read-and-watch/orchid-family-tree>.
- Liau, C.H., You, S.J., Prasad, V., Hsiao, H.H., Lu, J.C., Yang, N.S. & Chan, M. T. (2003). Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of an *Oncidium* orchid. *Plant Cell Reports*, 21(10), 993–998.
- Miyoshi, K. & Mii, M. (1995). Stimulatory effects of sodium alginate on the conversion of somatic embryos in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Science*, 107(2), 219-226.
- Saiprasad, G.V.S. (2001). Artificial seeds and their applications. *Resonance*, 6(5), 39-47.
- Takano, T., Oyamada, T. & Hirai, J. (1990). Improvement in nutrient composition of culture media for the growth and multiplication of PLB in *Cymbidium*. In *Proceedings of the Nagoya International Orchid Show* (pp. 95-101). Nagoya, Japan.
- Teixeira da Silva, J.A., Cardoso, J.C., Dobránszki, J. & Zeng, S. (2015). *Dendrobium* micropropagation: A review. *Plant Cell Reports*, 34(5), 671–704.

- Tikendra, L., Amom, T. & Nongdam, P. (2018). Effect of phytohormones on rapid in vitro propagation of *Dendrobium thyrsiflorum* Rchb.f.: An endangered medicinal orchid. *Pharmacognosy Magazine*, 14(58), 495-500.
- Tokuhara, K. & Mii, M. (1993). Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Reports*, 13(1), 7-11. <https://doi.org/10.1007/BF00233397>.
- Utami, E.S.W. & Hariyanto, S. (2019). In vitro seed germination and seedling development of a rare Indonesian native orchid *Phalaenopsis amboinensis* J.J. Sm. *Scientifica*, 2019, 8105138.
- Vacin, E.F. & Went, F.W. (1949). Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette*, 110(4), 605–613. <https://doi.org/10.1086/335561>.
- Verleysen, H., Samyn, G., Van Bockstaele, E. & Debergh, P. (2004). Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(1), 11-21. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000016468.78464.36>.
- Wongrasee, N. & Sumontip, B. (2018). A simple and reproducible protocol for plant regeneration and cryopreservation of *Grammatophyllum speinocum* BL. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 40(1), 251-257.
- Zhu, G., Li, J. & Zhang, X. (2013). Photosynthetic characteristics of four wild *Dendrobium* species in China. *HortScience*, 49(8), 1023-1030.

