

ความทนเค็มของต้นอ่อนกล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย ‘เอียสกุล’ ในสภาพปลอดเชื้อ *In Vitro* Salt Tolerance of Plantlets in *Dendrobium* Sonia ‘Earsakul’

เพชรสุภางค์ คำแท้¹ ดวงพร บุญชัย² พูนพิภพ เกษมทรัพย์¹ และ พัชรียา บุญกอแก้ว^{1,*}

Petsupang Khamtae¹, Duangporn Boonchai², Poonpipope Kasemsap¹

and Patchareeya Boonkorkaew^{1,*}

¹ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

² สวนกล้วยไม้ระพี สาคริก ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹ Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

² Rapee Sagarik Orchid Garden, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

รับเรื่อง: 29 มิถุนายน 2563 Received: 29 June 2020

ปรับปรุงแก้ไข: 10 กรกฎาคม 2563 Revised: 10 July 2020

รับตีพิมพ์: 15 กรกฎาคม 2563 Accepted: 15 July 2020

* Corresponding author: agrpyb@ku.ac.th

ABSTRACT: *Dendrobium* is an important ornamental plant in Thailand. The main cultivation areas are in Samut Sakhon and Nakhon Pathom provinces that encountered with salinity water problems during the dry season. This study aims to find out the appropriate NaCl concentration for salt tolerance selection of *Dendrobium* Sonia ‘Earsakul’ plantlet which is able to develop into a complete plant by using tissue cultured techniques. The plantlets that cultured under 50 mM NaCl added on modified Vacin and Went (VW) solid medium were subcultured to modified VW solid medium supplemented with 0, 50, 75 and 100 mM NaCl and without NaCl (control; NS) for 4 months. The completely randomized design with 5 treatments was applied. The results exhibited that high vegetative growth and highest root growth were found in 0 mM NaCl following by the control (NS) and 50 mM NaCl. Furthermore, the increase in NaCl concentrations resulted in depletion of chlorophyll a, b, total chlorophyll and carotenoid contents, but proline accumulation and electrolyte leakage in leaf were increased with NaCl higher than 50 mM. These results indicated that the damage in plant cells occurred under excess NaCl. In conclusion, *Dendrobium* Sonia ‘Earsakul’ was able to culture on modified VW solid medium supplemented with 50 mM NaCl that approached to produce the salt tolerance plantlet of *Dendrobium* Sonia ‘Earsakul’ *in vitro* culture.

Keywords: Sodium chloride, salinity stress, growth, tissue culture

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลหวายเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่สำคัญของไทย พื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่ในจังหวัดสมุทรสาคร และนครปฐม ซึ่งประสบปัญหาน้ำเค็มในช่วงฤดูแล้ง การวิจัยนี้จึงศึกษาปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมกับกล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย ‘เอียสกุล’ (*Dendrobium Sonia* ‘Earsakul’) โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อคัดเลือกต้นพันธุ์ที่มีลักษณะทนเค็ม สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ โดยนำต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 50 mM ย้ายลงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 50 75 และ 100 mM และมีชุดควบคุมเป็นต้นอ่อนที่ไม่ได้เลี้ยงในโซเดียมคลอไรด์มาก่อน (NS) เลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design มี 5 ทรีตเมนต์ พบว่า ต้นอ่อนที่เลี้ยงในความเข้มข้น 0 mM มีการเจริญเติบโตทางต้น ใบ ในระดับสูง และรากในระดับสูงที่สุด ส่วนต้นอ่อนที่เลี้ยงในโซเดียมคลอไรด์ 50 mM มีการเจริญเติบโตลดลงมาจากชุดควบคุม (NS) โดยโซเดียมคลอไรด์ที่สูงขึ้นทำให้คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี คลอโรฟิลล์รวม และแคโรทีนอยด์มีค่าลดลง แต่มีการสะสมโปรตีน และเปอร์เซ็นต์การร่วงไหลของอิเล็กโทรไลต์ในใบเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับความเค็มสูงกว่า 50 mM ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความเสียหายจากความเค็มในความเข้มข้นที่สูงเกินไป สรุปได้ว่ากล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย ‘เอียสกุล’ สามารถเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 50 mM ได้ ซึ่งเป็นแนวทางในการผลิตต้นอ่อนกล้วยไม้สกุลหวายทนเค็มในสภาพปลอดเชื้อ

คำสำคัญ: โซเดียมคลอไรด์, ความเครียดจากความเค็ม, การเจริญเติบโต, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

บทนำ

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium orchid*) เป็นไม้ตัดดอกที่มีความสำคัญของไทย มีมูลค่าการส่งออกกว่า 3,200 ล้านบาทต่อปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสกุลหวาย โซเนีย ‘เอียสกุล’ เป็นพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกเลี้ยงและมีการส่งออกมากที่สุด (Office of Agricultural Economics, 2020) พื้นที่ปลูกที่สำคัญอยู่เขตภาคกลางแถบลุ่มแม่น้ำท่าจีน ได้แก่ จังหวัดสมุทรสาคร และ นครปฐม ทั้งนี้ เมื่อปี พ.ศ. 2558 พื้นที่ดังกล่าว เกิดผลกระทบจากภัยแล้ง น้ำทะเลหนุนเข้ามาในพื้นที่น้ำจืด ทำให้น้ำมีปริมาณเกลือสูงถึง 11.5 กรัมต่อลิตร หรือ 196.5 mM (Pollution Control Department, 2015) ซึ่งระดับคุณภาพน้ำที่เหมาะสมแก่กล้วยไม้ควรมีค่าการนำไฟฟ้า (EC) ไม่เกิน 750 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (Department of Agriculture, 2004) หรือมีปริมาณเกลือไม่เกิน 8.20 mM และยังคงเป็นปัญหาต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบันในทุกปี (Royal Irrigation Department, 2020) ซึ่งเมื่อเกษตรกรนำน้ำที่มีความเค็มเจือปนไปรดต้นกล้วยไม้ ทำให้เกิดอาการใบเหลือง ลำต้นเหี่ยวแห้ง และตายในที่สุด (Department of Agricultural Extension, 2008) เนื่องจากกล้วยไม้เป็นพืชที่ไม่ทนเค็ม (Yuwanityom, 2003)

ความเค็มที่พืชได้รับทำให้เกิดการสะสมของไอออนบางชนิดที่เป็นพิษ เช่น Na^+ และ Cl^- มีผลทำให้ค่า water potential (Ψ_w) ลดลง ส่งผลให้พืชดูดน้ำได้ยากขึ้น (McKersie and Leshem, 1994) เกิดการสะสมไอออนในส่วนของราก ต้น และใบ ทำให้ใบไหม้และปลายใบแห้ง (Lutts *et al.*, 1996) และยังส่งผลกระทบต่อกระบวนการสำคัญต่าง ๆ ภายในเซลล์พืช เช่น การเจริญเติบโต การสังเคราะห์ด้วยแสง ปริมาณสารสื่อการร่วงไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ และการสะสมกรดอะมิโนบางชนิด เช่น โพรลีน เป็นต้น (Fridovich,

1995; Laloknam *et al.*, 2006; Shukla *et al.*, 2012) การศึกษาเกี่ยวกับการนำน้ำที่มีความเค็มมารดกล้วยไม้สกุลหวาย พบว่า ต้นกล้วยไม้อายุ 3 เดือน สามารถใช้น้ำเค็มที่มีค่า EC ไม่เกิน 2 ds m^{-1} รดได้นาน 1 เดือน (Sonsud, 2015) ในขณะที่ต้นอายุ 9–24 เดือน สามารถรดด้วยน้ำเค็มที่มีค่า EC $1\text{--}2 \text{ ds m}^{-1}$ ติดต่อกันเป็นเวลา 2 เดือนได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อผลผลิต (Chiewchookul, 2018)

การทนเค็มของพืช คือ ความสามารถของพืชที่เจริญได้ภายใต้ภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลง ความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้น โดยพืชอาจมีการปรับตัวให้เหมาะสมในรูปแบบต่าง ๆ (Yuwanityom, 2003) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอีกวิธีหนึ่ง ที่สามารถใช้ทดสอบเพื่อคัดเลือกพืชที่สามารถทนกับความเค็มได้ เช่น การปรับสภาพพืชโดยการทดสอบให้พืชได้รับความเค็มในระดับต่ำ และเพิ่มความเข้มข้นเมื่อย้ายเนื้อเยื่อ (Subculture) ถ้าพืชนั้นยังสามารถเจริญได้ เป็นไปได้ว่า ลักษณะของเซลล์นี้จะช่วยเพิ่มความทนเค็มให้พืชได้ (Smith, 2013) ในปี ค.ศ. 2015 Teixeira da Silva ศึกษาความทนเค็มของโปรโตคอร์มไลค์บอดี (PLBs) ของกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นต่ำ (5–10 mM) และเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 1 เดือน โดยเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเดือนละ 5 mM จนถึง 40 mM พบว่า PLBs ที่เกิดขึ้นใหม่ทนต่อโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำได้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ PLBs ที่เลี้ยงในความเข้มข้นสูง (20–200 mM) โดยไม่มีการปรับสภาพ ทำให้ PLBs แสดงอาการ necrosis และตายในที่สุด นอกจากนี้มีรายงานในกล้วยไม้สกุลหวายโซเนียพันธุ์โจแดง พบว่า ต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำ (5–40 mM) ทำให้ต้นอ่อนมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ และมีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นสูงกว่า 100 mM ทำให้การเจริญเติบโต ความยาวรากลดลง และมีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (Obsuwan *et al.*, 2019)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาการตอบสนองของพืชต่อความเค็ม และการคัดเลือกต้นพันธุ์ที่มีลักษณะทนเค็มในกล้วยไม้สกุลหวายยังพบน้อย ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาหาความเค็มที่เหมาะสมในกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อคัดเลือกต้นพันธุ์ที่มีลักษณะทนเค็ม สามารถเจริญเติบโตต่อไปจนได้ต้นที่สมบูรณ์ และให้ดอกได้ และนำไปสู่การพัฒนาจนได้ต้นพันธุ์กล้วยไม้ทนเค็ม ซึ่งจะส่งผลดีกับเกษตรกรผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ เมื่อประสบปัญหาน้ำเค็ม จึงเป็นแนวทางแก้ไข และการจัดการกับปัญหาแนวทางหนึ่ง ซึ่งจะเป็นประโยชน์แก่เกษตรกรต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง

ต้นอ่อนของกล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย ‘เอียสกุล’ (*Dendrobium Sonia* ‘Earsakul’) ที่ได้จากการชักนำ protocorm like bodies (PLBs) อายุ 8 เดือน บนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went (VW) (1949) ดัดแปลง ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 50 mM (จากน้ำที่มีส่วนผสมของเกลือสมุทรความเข้มข้น 50 mM) น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร มันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร และ Gellan gum 3 กรัมต่อลิตร (50 mM) และต้นอ่อนซึ่งเกิดจากการเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ดัดแปลงสูตรเดียวกัน แต่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NS) เพาะเลี้ยงต้นอ่อนเป็นเวลานาน 3 เดือน จึงคัดเลือกต้นซึ่งมีความสูง 1.0 เซนติเมตร ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลง ซึ่งเติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร Gellan gum 3 กรัมต่อลิตร กล้วยบด 100 กรัมต่อลิตร น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร

แผนการทดลองและทรีตเมนต์

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) จำนวน 5 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ขวด ดังนี้ ทรีต

เมเนต์ที่ 1 ต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ และย้ายมาเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ดัดแปลงซึ่งไม่เติมโซเดียมคลอไรด์เช่นกัน (NS: 0-0) ทริตเมเนต์ที่ 2 ถึง 5 เป็นต้นอ่อนซึ่งได้จากอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 50 mM จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ดัดแปลงที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างกัน ได้แก่ ทริตเมเนต์ที่ 2 ความเข้มข้น 0 mM (50-0) ทริตเมเนต์ที่ 3 ความเข้มข้น 50 mM (50-50) ทริตเมเนต์ที่ 4 ความเข้มข้น 75 mM (50-75) และทริตเมเนต์ที่ 5 ความเข้มข้น 100 mM (50-100) ซึ่งทุกทริตเมเนต์เลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด cool day light ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน (06:00-18:00 น.) เลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน ณ สวนกล้วยไม้ระพี สาคริก ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต

บันทึกอัตราการรอดชีวิต และการเจริญเติบโตหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน โดยนำต้นออกมาวัดจำนวนต้นตอ ความสูงต้น เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น น้ำหนักสดต้น จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ จำนวนราก ความยาวราก และวัดค่าความเขียวใบด้วยเครื่อง Chlorophyll meter รุ่น SPAD 502 ของใบที่ 2 นับจากใบยอดลงมา

การศึกษาปริมาณสารสี โปรตีน และการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์

ปริมาณสารสี (Pigment)

นำใบกล้วยไม้ที่มีน้ำหนักสด 1 กรัม ใส่ลงในสารละลาย N,N' -dimethylformamide (DMF) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Hughes *et al.*, 2007) แล้วดูดสารสกัดที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ A_{480} , A_{647} และ A_{664} เพื่อคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (Chl a = $12 * A_{664} - 3.11 * A_{647}$) คลอโรฟิลล์ บี (Chl b = 20.78

* $A_{647} - 4.88 * A_{647}$) คลอโรฟิลล์รวม (Total Chl = Chl a + Chl b) และแคโรทีนอยด์ ($C_{x+c} = (1000 A_{480} - 1.12 \text{ Chl a} - 34.07 \text{ Chl b})/245$) (Porra *et al.*, 1989; Wellburn, 1994) โดยวิเคราะห์ทริตเมเนต์ละ 4 ซ้ำ

ปริมาณโพรลีน (Proline)

ชั่งตัวอย่างสดของใบกล้วยไม้ น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม แช่ในสารละลาย 3% aqueous sulfosalicylic acid 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuged ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ใช้ความเร็วรอบ 4,800 g จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโพรลีนในใบพืชตามวิธีการของ Bates *et al.* (1973) โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ซึ่งมี toluene เป็นตัวเปรียบเทียบ (blank) นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับความเข้มข้นจาก standard curve ของโพรลีน จากนั้น คำนวณหาปริมาณโพรลีนเป็นเปอร์เซ็นต์น้ำหนักสด โดยใช้สมการ [1]

$$[(\mu\text{g proline/ml} \times \text{ml toluene}) / (115.5 \mu\text{g}/\mu\text{mol})] / [(\text{g sample}) / 5] = \mu\text{mol g}^{-1} \text{FW} \dots \dots \dots [1]$$

เปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyte Leakage; %EL)

ละลายใบอ่อนออกจากเนื้อเยื่อด้วยการล้างลำต้นและแผ่นใบในน้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionized water) หลังจากนั้น จึงนำชิ้นส่วนจากลำต้น และใบที่มีน้ำหนักสด 50 มิลลิกรัม ตัดให้เหลือชิ้นบางขนาด 1 มิลลิเมตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำน้ำที่แช่ตัวอย่างมาวัดค่า electrical conductivity (EC_1) ด้วยเครื่องวัดการนำไฟฟ้า และต้มตัวอย่างใน water bath 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เป็นการทำลายตัวอย่างและทำให้เกิดการปล่อยอิเล็ก

โทรไลต์ออกมา ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้น วัดค่า electrical conductivity (EC_2) และคำนวณค่า %EL สูตร [2] โดยวิเคราะห์ที่รีดเมนส์ละ 4 ซ้ำ

$$\%EL = (EC_1/EC_2) \times 100 \text{ (Barbara et al., 2016) ...[2]}$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 22

ผลการทดลองและวิจารณ์

อัตราการรอดชีวิต และการเจริญเติบโต

จากการศึกษาความทนเค็มของต้นอ่อนกล้วยไม้สกุลหวายชนิดช่อในสภาพปลอดเชื้อ โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลง ที่เลี้ยงภายใต้โซเดียมคลอไรด์ที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 เดือน

(Figure 1) พบว่า อัตราการรอดชีวิตลดลง 20–30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ 50–100 mM และการเจริญเติบโตทางลำต้น ใบ และรากลดลง เมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 50 mM ส่งผลให้น้ำหนักสด ความสูงต้น ความยาวใบลดลง 30–50 เปอร์เซ็นต์ และลดลงมากกว่า 70–80 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 75–100 mM (Table 1) สอดคล้องกับการศึกษาของ Obsuwan et al. (2019) ที่รายงานว่า ต้นกล้วยไม้สกุลหวาย ชนิดพันธุ์เรดโจ (*Dendrobium Sonia 'Red Jo'*) ในสภาพปลอดเชื้อมีอัตราการรอดชีวิต น้ำหนักสด ความยาวต้นและรากลดลง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงกว่า 80 mM เป็นเวลา 10 สัปดาห์ ทั้งนี้เนื่องจากความเค็มที่พืชได้รับทำให้เกิดความเครียดจากแรงดันออสโมติก (Osmotic stress) ความเป็นพิษของธาตุบางชนิด (Ion toxicity) และเกิดการสร้างหรือสะสมสารอนุมูลอิสระ (Chukampaeng, 2012) ทำให้เกิดความเสียหายบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) จึงทำให้ความสามารถในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์และ

การสังเคราะห์โปรตีนลดลง (Wyn Jones *et al.*, 1979) เป็นผลให้การเจริญเติบโตลดลง และพบการตายมากขึ้นเมื่อได้รับความเค็มที่สูงขึ้น

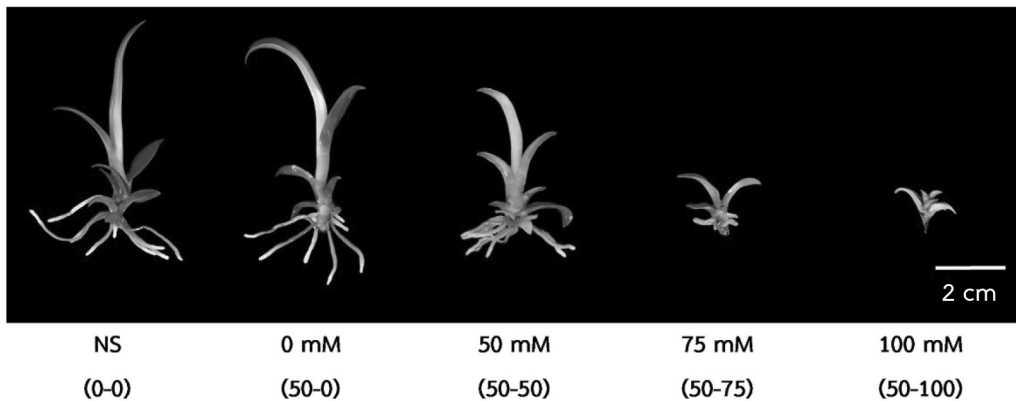
Table 1 Growth characteristic and survival rate of *Dendrobium Sonia* 'Earsakul' in response to different concentration of NaCl after cultured for 4 months

NaCl concentration (mM)	Survival Rate (%)	Fresh Weight (g)	Pseudobulb			Leaves			Root	
			Number/clump	Height (cm)	Diameter (cm)	Number	Length (cm)	Number/clump	Length (cm)	
NS (0-0)	100	1.00 ± 0.12 ^b	2.50 ± 0.46 ^a	1.62 ± 0.13 ^a	4.29 ± 0.28 ^{ab}	5.64 ± 0.30 ^{ab}	1.85 ± 0.28 ^a	7.13 ± 0.45 ^b	1.99 ± 0.13 ^b	
0 (50-0)	100	1.84 ± 0.08 ^a	1.95 ± 0.27 ^{ab}	1.92 ± 0.17 ^a	5.44 ± 0.33 ^a	6.79 ± 0.76 ^a	1.84 ± 0.13 ^a	10.83 ± 0.20 ^a	2.80 ± 0.20 ^a	
50 (50-50)	83	0.69 ± 0.05 ^b	2.08 ± 0.21 ^{ab}	1.06 ± 0.11 ^b	4.35 ± 0.13 ^{ab}	5.48 ± 0.30 ^{ab}	1.30 ± 0.08 ^{ab}	8.63 ± 0.55 ^b	1.83 ± 0.24 ^b	
75 (50-75)	83	0.30 ± 0.07 ^c	1.58 ± 0.16 ^b	0.63 ± 0.04 ^{bc}	3.33 ± 0.22 ^c	5.16 ± 0.64 ^b	0.94 ± 0.06 ^b	4.83 ± 0.32 ^c	0.79 ± 0.05 ^c	
100 (50-100)	75	0.16 ± 0.02 ^c	1.33 ± 0.12 ^b	0.47 ± 0.04 ^c	3.25 ± 0.36 ^c	4.62 ± 0.24 ^b	1.03 ± 0.11 ^b	1.75 ± 0.32 ^d	0.54 ± 0.07 ^c	
F-Test	ns	**	*	**	**	*	**	**	**	**

ns=not significant, *, ** = significantly different at 0.05 and 0.01 probability level, respectively

^{a,b,c} Means with different letters within column indicate significant difference according to DMRT เมื่อพิจารณาจากอัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนพบว่า ต้นที่เลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 50–100 mM อัตราการรอดชีวิตลดลง 20–25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับในกล้วยไม้สกุลเข็มบีเดียมลูกผสมที่ได้ศึกษาการตอบสนองต่อความเค็มในระยะ PLBs

พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นมากกว่า 10 mM มีอัตราการรอดชีวิตลดลงมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า 20 mM (Teixeira da Silva, 2015) แสดงให้เห็นว่า กล้วยไม้สกุลหวายโซเนียพันธุ์เอียสกุลมีแนวโน้มการทนเค็มได้สูงกว่า แม้ว่ากล้วยไม้ทั้ง 2 สกุลนี้มีลักษณะการเจริญเติบโตแบบฐานร่วม



(Sympodial) เหมือนกัน

Figure 1 Plantlet characteristic of *Den. Sonia* ‘Earsakul’ after treated with NaCl for 4 months จาก Figure 1 แสดงลักษณะต้นกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเค็มระดับต่าง ๆ นาน 4 เดือน จะเห็นได้ว่า ต้นอ่อนในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50 mM ถึงแม้ว่าจะมีขนาดต้นและราก เล็กกว่าต้นที่ไม่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NS และ 0 mM (50-0)) แต่โดยภาพรวมสามารถเจริญเติบโตและนำออกปลูกได้ ในขณะที่ต้นอ่อนในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 75 และ 100 mM มีลักษณะข้อถี่สั้น พบอาการใบเหลือง และปลายใบไหม้ โดยเฉพาะที่ใบล่างสุด รากหดสั้น ลีบแบน และในบางต้นไม่สามารถเกิดรากได้หรือรากบางส่วนกลายเป็นสีน้ำตาล และไม่พัฒนา ลักษณะอาการที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับการใช้น้ำเค็มรด

ต้นกล้วยไม้สกุลหวาย และสกุลแวนด้า ซึ่งพบว่า นอกจากความเค็มจะทำให้การเจริญเติบโตลดลงแล้วยังส่งผลต่อการเหี่ยวและร่วงเหลืองของใบด้วย (Abdullakasim *et al.*, 2018; Chiewchookul, 2018) อีกทั้งรากมักจะหดสั้นลง ทั้งนี้ เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปลายรากของกล้วยไม้สกุลแวนด้า พบว่า มีการแบ่งเซลล์บริเวณส่วนปลายรากลดลง และบริเวณหุ้มรากมีชั้นเซลล์ที่ลดลงด้วย (Chiewchookul, 2018) เนื่องจากความเค็มไปยับยั้งการเจริญของรากพืช ทำให้การแพร่ของคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง จนอาจเกิดความเป็นพิษของธาตุโซเดียม คลอรีน และแรงดันออสโมติกภายในเซลล์พืช (Meekaew *et al.*, 2010) ในพืชที่ไม่ทนเค็ม หรือทนเค็มได้น้อยจะไม่มีต่อมสะสมเกลือในต้น แต่จะผลิตน้ำตาลหรือกรดอินทรีย์บางชนิดขึ้นมาเพื่อเพิ่ม

ความเข้มข้นในเซลล์ของราก ซึ่งต้องใช้พลังงานมาก ทำให้การเจริญเติบโตลดลง (Glenn, 1987)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า ต้นอ่อนที่เลี้ยงในโซเดียมคลอไรด์มาก่อน และได้ฟื้นฟูด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรปกติ (0 mM (50–0)) มีการเจริญเติบโตทั้งทางลำต้น ใบ ในระดับสูง และมีการเจริญทางรากสูงที่สุด (Table 1) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (NS) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chiewchookul (2018) ในกล้วยไม้สกุลแวนด้า และสกุลหวาย รายงานว่า เมื่อรดต้นกล้วยไม้ด้วยน้ำเค็มในระยะเวลาหนึ่ง และฟื้นฟูต้นโดยการให้น้ำเปล่า (EC ต่ำกว่า $250 \mu\text{S cm}^{-1}$) เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่า สามารถทำให้ต้นมีการเจริญเติบโต และพารามิเตอร์ของการสังเคราะห์ด้วยแสงมีค่าเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้ การฟื้นฟูต้นด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ ต้นสามารถปรับสมดุล water potential (Ψ) ทำให้พืชสามารถดูดน้ำเข้ามาในเซลล์ได้ ทำให้เกิดกระบวนการทางเมแทบอลิซึมได้ดีขึ้น (Hare *et al.*, 1998) จึงทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม้ที่ได้รับการฟื้นฟูจากโซเดียมคลอไรด์ มีการเจริญเติบโตได้เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นอ่อนที่ไม่ได้เลี้ยงในโซเดียมคลอไรด์ (NS)

ปริมาณสารสี

เมื่อพิจารณาปริมาณสารสีในใบ พบว่า อาหาร

สูตรที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงขึ้นเกินกว่า 75 mM ทำให้คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี คลอโรฟิลล์ รวมมีค่าลดลง ในขณะที่ต้นอ่อนที่ได้รับการปรับสภาพให้ทนเค็มโดยเลี้ยงบนโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50 และ 75 mM ไม่ส่งผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์รวม เมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์ที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ (NS) (Table 2) สอดคล้องกับ Yasar *et al.* (2008) พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์ในกล้วยพันธุ์ที่ไม่ทนเค็ม มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเค็มสูงกว่า 50 mM เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) และ glutathione reductase (GR) ซึ่งเป็นตัวช่วยในการต้านสารอนุมูลอิสระลดลง ส่งผลให้อนุมูลอิสระ superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hydroxyl radicle ($\text{OH}^\cdot$) เข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ทำให้เกิดการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ ซึ่งแตกต่างกับกล้วยพันธุ์ทนเค็ม พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบไม่แตกต่างกับชุดควบคุม และยังสอดคล้องกับการศึกษาในกล้วยไม้ ของ Sonsud (2015) และ Chiewchookul (2018) ที่พบว่า กล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย พันธุ์เอียสกุล มีปริมาณสารสีลดลงเมื่อความเค็มเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความเป็นพิษของ Na^+ ที่เข้าไปสะสมในเซลล์พืชจนถึงระดับที่เป็นพิษต่อเซลล์ โดย Na^+ ที่สะสมในปริมาณมากทำให้เกิดอาการขาด Ca^{2+} , K^+ และ Mg^{2+} ส่งผลต่อ

การสลายตัวของคลอโรฟิลล์ มีผลทำให้ใบไหม้ และเนื้อเยื่อบริเวณขอบใบตาย (FAO, 1976; Apse *et al.*, 2007)

Table 2 Effect of NaCl on chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoid of *Den. Sonia* ‘Earsakul’ after treated with NaCl for 4 months

NaCl Concentration (mM)	Chlorophyll a (mg/cm ²)	Chlorophyll b (mg/cm ²)	Total Chlorophyll (mg/cm ²)	Carotenoid (mg/cm ²)
NS (0-0)	13.37 ± 1.63 ^{ab}	5.54 ± 0.71 ^{ab}	18.91 ± 2.34 ^{ab}	1.28 ± 0.03
0 (50-0)	17.29 ± 1.55 ^a	7.89 ± 1.04 ^a	25.19 ± 2.56 ^a	1.24 ± 0.10
50 (50-50)	13.75 ± 1.25 ^{ab}	5.24 ± 0.47 ^{ab}	18.99 ± 1.72 ^{ab}	1.37 ± 0.02
75 (50-75)	13.89 ± 1.40 ^{ab}	4.23 ± 0.48 ^b	18.12 ± 0.95 ^{ab}	1.46 ± 0.73
100 (50-100)	8.66 ± 0.60 ^b	3.60 ± 0.28 ^b	12.26 ± 0.88 ^b	1.29 ± 0.06
F-Test	**	**	**	ns

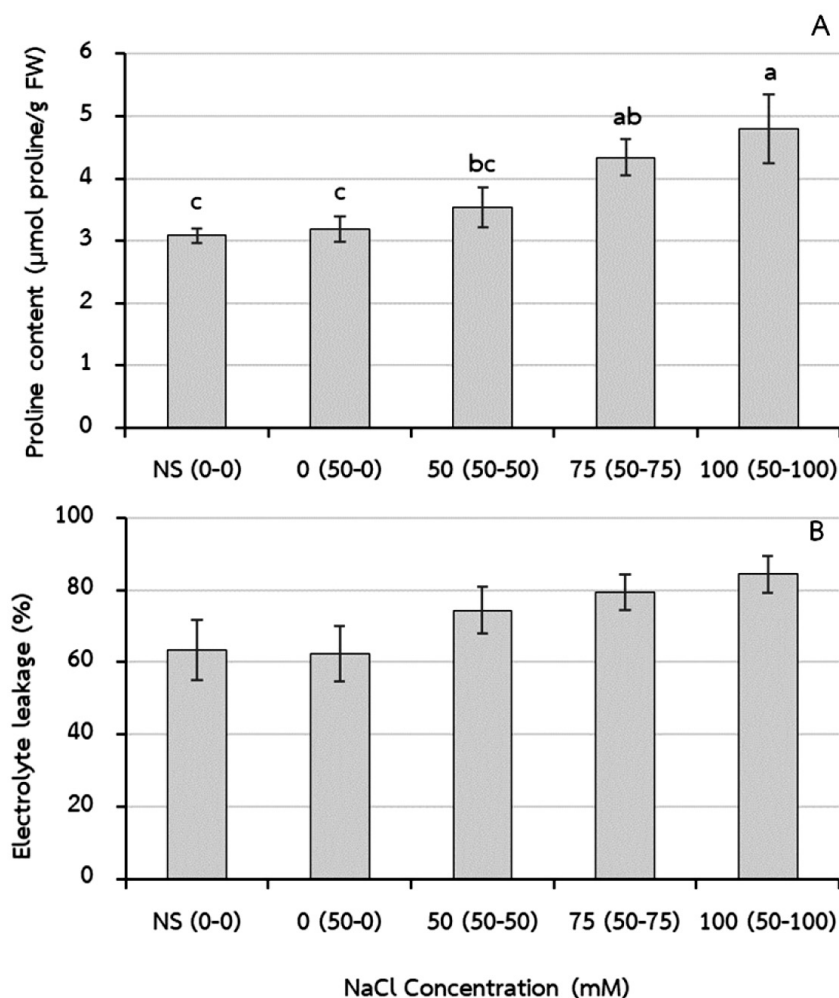
ns=not significant, ** = significantly different at 0.01 probability level

^{a,b} Means with different letters within column indicate significant difference according to DMRT

ปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนภายในใบกล้วยไม้เพิ่มขึ้น เมื่อได้รับโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น (Figure 2A) โดยเฉพาะในใบที่เลี้ยงในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 75 และ 100 mM มีปริมาณโปรตีนในใบเพิ่มขึ้นมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ (4.33–4.80 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) (Figure 2A) ซึ่งโปรตีนเป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์ (Osmoprotectant) (Ueda *et al.*, 2007) ที่ช่วย

ลดแรงดันออสโมติก การดูดน้ำ และแรงดันเต่งภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยทางสรีรวิทยาของพืช (Blum *et al.*, 1989) มีรายงานว่า ผลของการสะสมโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในพืชบางชนิด เป็นผลมาจากภาวะที่พืชได้รับความเครียด แต่ไม่ได้ทำให้พืชสามารถทนเค็มได้เพิ่มขึ้น (Moftah and Michel, 1987) สังเกตได้จากต้นอ่อนที่เลี้ยงบนความเข้มข้น 50 mM มีปริมาณโปรตีนในใบ 3.53 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (NS) (3.08 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) จึงมักพบการสะสมโปรตีนมากขึ้นเมื่อพืชเกิดความเครียดจากแรงดันออสโมติก สอดคล้องกับงานทดลองของ Pakdeevaporn (2000) ได้ศึกษาการ



สะสมโพรลีนในแก้วเหวี่ยง พบว่า ปริมาณโพรลีนที่เพิ่มขึ้นในแก้วเหวี่ยงเป็นลักษณะอาการที่ได้รับความเสียหายจากความเค็มมากกว่าเป็นกลไกการทนเค็ม เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของ Na^+ และ Cl^- ภายในเซลล์

Figure 2 Effect of NaCl on proline content (A) and electrolyte leakage (B) of *Den. Sonia* 'Earsakul' plantlets after treated with NaCl for 4 months

Letters (a, b, c, d) indicate statistically significant differences between the means ($P < 0.05$)

using DMRT

เปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์

เปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ในใบต้นอ่อนกล้วยไม้ที่เลี้ยงในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มพบการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์มากขึ้นเมื่อเลี้ยงต้นอ่อนในความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่สูงขึ้น (Figure 2B) สอดคล้องกับการศึกษาในข้าวพบว่า ในข้าวหอมมะลิที่ไม่ทนเค็มจะมีการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์เพิ่มมากขึ้นมากกว่าข้าวพันธุ์พอคคาลิที่ทนเค็มเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียดจากความเค็ม (Homwong and Kong-ngern, 2014) ทั้งนี้ Na^+ ซึ่งเป็นไอออนที่มีความเป็นพิษอาจเข้าทำลายองค์ประกอบภายในเซลล์มีผลทำให้เกิดการสูญเสียสภาพของเซลล์จนนำไปสู่การเกิดการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในใบ (Ashraf, 2004) จึงเป็นผลทำให้ต้นอ่อนที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณที่มากเกินไปทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายเพิ่มขึ้น

จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่า ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 50 mM ทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย พันธุ์เอียสกุลสามารถเจริญเติบโตได้ใกล้เคียงกับการเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ แต่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงระยะหลังนำต้นอ่อนออกปลูกในโรงเรือน และลักษณะทางกายวิภาคของกล้วยไม้ ว่าผลกระทบของความ

เค็มส่งผลต่อความผิดปกติ หรือทำให้เกิดการปรับตัวเพื่อให้ทนต่อความเค็มได้มากน้อยเพียงใด เพื่อทราบผลกระทบได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น และนำไปสู่แนวทางในการผลิตต้นกล้วยไม้สกุลหวายทนเค็ม และแนวทางการฟื้นฟูกล้วยไม้ที่ได้รับความเสียหายจากความเค็ม เป็นต้น

สรุป

การเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลง ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50 mM ทำให้ต้นอ่อนมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวนต้น เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น จำนวนใบ และความยาวใบไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ส่วนน้ำหนักสด ความสูงต้น จำนวน และความยาวราก ลดลงเฉลี่ย 20 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับปริมาณสารสีการสะสมโพรงในใบ และการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ดังนั้น การเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50 mM จึงเป็นแนวทางในการผลิตต้นอ่อนกล้วยไม้สกุลหวายทนเค็มในสภาพปลอดเชื้อได้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยภายใต้แผนงานเสริมสร้างศักยภาพและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ตามทิศทางการยุทธศาสตร์การวิจัยและนวัตกรรม

ประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2562

เอกสารอ้างอิง

- Abdullakasim, S., P. Kongpaisan, P. Thongjang and P. Saradhuldhat. 2018. Physiological responses of potted *Dendrobium* orchid to salinity stress. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 59: 491–498.
- Apse, M.P. and E. Blumwal. 2007. Na^+ transport in plants. *FEBS Lett.* 581: 2247–2254.
- Ashraf, M. 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora* 199(5): 361–376.
- Barbara, P., T. Krzysztof and K. Iwona. 2016. Responses of grass pea seedlings to salinity stress in *in vitro* culture conditions. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 124: 227–240.
- Bates, L.S., R.P. Waldren and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205–207.
- Blum, A. 1989. Osmotic adjustment and growth of barley genotype under drought stress. *Crop Sci.* 29: 230–233.
- Chiewchookul, N. 2018. Water salinity effects on growth and flower quality of *Vanda* ‘Jai Ruk Pink’ and *Dendrobium* Sonia ‘Earsakul’. MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Chukampaeng, S. 2012. Plant salt stress. *Warasan Phrueksasat Thai* 4(1): 15–24. (in Thai)
- Department of Agricultural Extension. 2008. *Agricultural Extension Academic Handbook Dendrobium Orchid*. 1st Edition. Bureau of Agricultural Commodities Promotion and Management, Department of Agricultural Extension, Bangkok. (in Thai)
- Department of Agriculture. 2004. *Orchids*. 1st Edition. The Agricultural Co-operative Federation of Thailand, Bangkok. (in Thai)
- FAO. 1976. Prognosis of salinity and alkalinity. *FAO Soil Bulletin* 31. FAO, Rome, Italy.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97–112.
- Glenn, E.P. 1987. Relationship between cation accumulation and water content of salt-tolerant grasses and sedge. *Plant Cell Environ.* 10: 205–212.
- Hare, P.D., W.A. Cress and J. Van Staden. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation

- during stress. *Plant Cell Environ.* 21(6): 535–553.
- Homwong, C. and K. Kong-ngern. 2014. Some biochemical changes under salt stress in rice. *In Proceedings Graduate Research Conference 15.* Khon Kaen University, Khon Kaen. (in Thai)
- Hughes, N.M., C.B. Morley and W.K. Smith. 2007. Coordination of anthocyanin decline and photosynthetic maturation in juvenile leaves of three deciduous tree species. *New Phytol.* 175(4): 675–685.
- Laloknam, S., K. Tanaka, T. Buaboocha, R. Waditee, A. Incharoensakdi, T. Hibino, Y. Tanaka and T. Takabe. 2006. Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains a betaine transporter active at alkaline pH and high salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(9): 6018–6026.
- Lutts, S., J.M. Kinet and J. Bouharmont. 1996. Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Plant Growth Regul.* 19: 207–218.
- McKersie, B.D. and Y.Y. Leshem. 1994. *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants.* Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Meekaew, W., N. Khanpharb and S. Laloknam. 2010. Adaptation of plants under salinity. *Adv. Sci. J.* 10(2): 28–37. (in Thai)
- Moftah, A.E. and B.E. Michel. 1987. The effect of sodium chloride on solute potential and proline accumulation in soybean leaves. *Plant Physiol.* 83(2): 238–240.
- Obsuwan, K., K. Seraypheap and C. Thepsithar. 2019. Effects of calcium silicate and proline-induced salt tolerance on the *in vitro* propagation of *Dendrobium Sonia* ‘Red Jo’, pp. 87–92. *In Proceedings III International Orchid Symposium.* Acta Hort. 1262. Seoul, Korea.
- Office of Agricultural Economics. 2020. *Agricultural statistics of Thailand 2019.* Office of Agricultural Economics, Bangkok. (in Thai)
- Pakdeevaporn, P. 2000. Effects of sodium chloride on growth and accumulation of proline, sodium ion and chloride ion in soybeans *Glycine max* (L.) Merrill. MS Thesis, Chulalongkorn University, Bangkok. (in Thai)
- Pollution Control Department. 2015. *Daily situation summary report water quality.* Pollution

- Control Department, Ministry of Natural Resources and Environment, Bangkok. (in Thai)
- Porra, R.J., W.A. Thompson and P.E. Kriedemann. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* 975: 384–394.
- Royal Irrigation Department. 2020. Report on the salinity water content of Tha Chin river. Sediment and Water Quality Branch, Royal Irrigation Department, Bangkok. (in Thai)
- Shukla, N., R.P. Awasthi, L. Rawat and J. Kumar. 2012. Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* under drought stress. *Plant Physiol. Plant Biochem.* 54: 78–88.
- Smith, R. 2013. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. 3rd Edition. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Sonsud, T. 2015. Effect of water salinity on growth and photosynthesis in *Dendrobium Sonia* ‘Earsakul’. MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Teixeira da Silva, J.A. 2015. Sensitivity of hybrid *Cymbidium* to salt stress and induction of mild NaCl stress tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 13: 89–92.
- Ueda, A., Y. Yamamoto–Yamane and T. Takabe. 2007. Salt stress enhances proline utilization in the apical region of barley roots. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355(1): 61–66.
- Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Plant Physiol.* 144: 307–313.
- Wyn Jones, R.G., C.G. Brady and J. Speirs. 1979. Ionic and osmotic relations in plant cells, pp. 63–103. *In* D.L. Laidman, R.G. Wyn Jones., eds. *Recent Advances in Cereal Biochemistry*. Academic Press, London.
- Yasar, F., S. Ellialtioglu and K. Yildiz. 2008. Effect of salt stress on antioxidant defense systems, lipid peroxidation, and chlorophyll content in green bean. *Russ. J. Plant Physiol.* 55(6): 782–786.
- Yuwanियom, A. 2003. *Management of Saline Soil*. Land Development Department, Bangkok. (in Thai)