ผลของสารลดการเกิดสีน้ำตาลต่อการชักนำโพรโตคอร์มไลค์บอดี้โดยใช้เทคนิคชิ้นบางของรองเท้านารีม่วงสงขลา: *Paphiopedilum callosum* var. *sublaeve*

Effects of anti-browning agents on protocorm-like body induction using thin cell layers of Endangered Lady's Slipper Orchid: *Paphiopedilum callosum* var. *sublaeve*

นรารัตน์ วัฒนาพันธ์[1], วุฒิชัย ศรีช่วย[1], ล้อมพงศ์ กลิ่นนาวี[2], อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์[2]
Nararatn Wattanapan[1], Wutthichai Srichuay[1], Lompong Klinnawee[2], Upatham Meesawat[2]

(Received: October 2, 2018; Revised: November 29, 2018; Accepted; December 17, 2018)

บทคัดย่อ

รองเท้านารีม่วงสงขลา เป็นกล้วยไม้รองเท้านารีประจำถิ่นที่อยู่ทางภาคใต้ของประเทศไทย อยู่ในภาวะใกล้สูญพันธุ์และถูกบันทึกในอนุสัญญาไซเตส (CITES) บัญชี 1 การเพาะเมล็ดต้นกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวน เป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยอนุรักษ์ต้นพันธุ์ที่มีในป่าตามธรรมชาติได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารลดการเกิดสีน้ำตาล (สารละลายกรดแอสคอบิกและผงถ่าน) ในชิ้นส่วนพืชต่อการชักนำ โพรโตคอร์มไลค์บอดี้ (protocorm-like bodies: PLB) โดยใช้เทคนิคชิ้นบางของรองเท้านารีม่วงสงขลา ชิ้นส่วนปลายยอดที่มีความสูง 1-1.5 เซนติเมตร ที่ได้จากการเพาะเมล็ดเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นสำหรับการชักนำ PLBs, ยอด และรากจากชิ้นส่วนชิ้นบางที่ผ่าตามแนวขวางภายใน 1 เดือน ชิ้นส่วนที่ผ่านการจุ่มและไม่จุ่มสารละลายกรดแอสคอบิก (0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) แล้ววางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MVW ที่เติมผงถ่าน (2 กรัมต่อลิตร) หรือสารละลายกรดแอสคอบิก (0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่า ชิ้นส่วนที่จุ่มในสารละลายกรดแอสคอบิก แล้ววางเลี้ยงบนอาหารที่เติมผงถ่าน ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนน้อยที่สุด (45.83 เปอร์เซ็นต์) ชิ้นส่วนที่ไม่จุ่มสารละลายกรดแอสคอบิก แล้ววางเลี้ยงบนอาหารที่เติมผงถ่าน ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด (59.09 เปอร์เซ็นต์) เปอร์เซ็นต์การเกิด PLBs สูงสุด (50.89 เปอร์เซ็นต์) เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงสุด (29.17 เปอร์เซ็นต์) และจำนวนเฉลี่ยของ PLBs/ชิ้นส่วนเริ่มต้นสูงสุด (1.46) ในขณะที่ชิ้นส่วนที่ไม่จุ่มสารละลายกรดแอสคอบิกแล้ววางเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารละลายกรดแอสคอบิกเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนสูงที่สุด (70.83 เปอร์เซ็นต์)

คำสำคัญ: รองเท้านารีม่วงสงขลา ผงถ่าน กรดแอสคอบิก เทคนิคชิ้นบาง โพรโตคอร์มไลค์บอดี้

Abstract

Paphiopedilum callosum var. *sublaeve*, a lady's slipper orchid native to southern Thailand, is under threat of species extinction and listed on Appendix I of CITES. *In vitro* seed germination for its micropropagation provides a beneficial mode to re-establish plants in the wild. The experiments were conducted to study the influence of anti-browning (ascorbic acid and activated charcoal) on PLB induction using thin cell layers of *P. callosum* var. *sublaeve*. Aseptic shoots (1-1.5 cm height) from mature seeds of *P. callosum* var. *sublaeve* was firstly used for adventitious PLBs, shoots, and roots induction from transversed thin section within a month. The explants were pretreatment by soaking with or without ascorbic acid (0.1 mg/L) and inoculated on MVW

[1] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์
[1] Faculty of Science and Technology, Princess of Naradhiwas University
[2] สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
[2] Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University

medium supplemented with activated charcoal (2 g/L) or ascorbic acid (0.1 mg/L). Shoots were pretreated with ascorbic acid and cultured on MVW medium supplemented with activated charcoal gave the lowest percentage of browning (45.83%). The highest percentage of survival rate (59.09 %), PLB induction (50.89%), shoot induction (29.17%), and the number of PLBs/explant (1.46) were obtained from the explants that were pretreated without ascorbic acid (0.1 mg/L) and inoculated on MVW medium supplemented with activated charcoal (2 g/L). Meanwhile, the explants with no ascorbic acid pretreatment cultured on MVW medium containing 0.1 mg/L ascorbic acid provided the highest percentage of browning (70.83%).
Keywords: *Paphiopedilum callosum* var. *sublaeve*, Activated charcoal, Ascorbic acid, Thin cell layer technique, Protocorm-like bodies.

บทนำ

Paphiopedilum เป็นพืชในวงศ์ Orchidaceae หรือที่รู้จักกันในชื่อ รองเท้านารี เนื่องจากมีลักษณะเด่นคือ มีรูปร่างปากเป็นกระเปาะคล้ายรองเท้าผู้หญิงสมัยก่อน (Chen, Chen & Chang, 2004) กล้วยไม้หลายชนิดที่ได้รับความนิยม ถูกจัดอยู่ในสภาวะใกล้สูญพันธุ์ เนื่องจากมีการเก็บจากป่าในจำนวนมากเกินไป และป่าซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่ ถูกทำลายจนทำให้มีสภาพไม่เหมาะสมต่อการเจริญของต้นกล้วยไม้ (Zeng et al., 2012) สำหรับรองเท้านารีม่วงสงขลา (*Paphiopedilum callosum* var. *sublaeve*) ได้รับการคุ้มครองโดยให้อยู่ในบัญชี 1 ของอนุสัญญาไซเตส (CITES -Conventional on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) (CITES, 2013) โดยพืชชนิดนี้มีลักษณะดอกสวยงาม มีใบเป็นลายหินอ่อน ดึงดูดความสนใจผู้ได้พบเห็น (Ng & Saleh, 2011)

โดยปกติ กล้วยไม้มีการขยายพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ซึ่งวิธีขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อจากต้นแม่ใช้เวลานานกว่าจะได้ต้นใหม่และต้นแม่จะต้องผ่านการออกดอกมาก่อน (Islam, Islam & Saleh, 2015; Ng, Saleh & Zaman, 2010) วิธีการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ เป็นวิธีที่ให้อัตราการรอดชีวิตต่ำและเจริญเติบโตช้า เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้ไม่มีเอนโดสเปิร์ม (Nhut, et al., 2006) ดังนั้น วิธีการขยายพันธุ์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะช่วยให้สามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น และยังเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชชนิดนี้ (Nhut, et al., 2006)

โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (protocorm-like bodies; PLBs) มีลักษณะการเจริญเติบโตและโครงสร้างคล้าย โพรโทคอร์ม (protocorm) (Lee, Hsu, & Yeung, 2013) สามารถเกิดได้โดยตรงไม่ต้องผ่านระยะแคลลัส เรียกว่า โซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสแบบทางตรง (Direct somatic embryogenesis) และเกิดโดยผ่านการเป็นแคลลัสก่อน เรียกว่า โซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสแบบทางอ้อม (Indirect somatic embryogenesis) (Park, Murthy, & Paek, 2003) การชักนำ PLBs มีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนต้นกล้วยไม้ และสามารถชักนำให้เกิดได้จากหลายชิ้นส่วน ดังงานวิจัยการชักนำในเกิด PLBs ในกล้วยไม้ เช่น ส่วนปลายยอดของ *Rhynchostylis gigantea* Lindl. (amethyst-purple) (Prasongsom, Thammasiri, & Chuenboonngarm, 2016), ส่วนตาข่อดอกของ *Phalaenopsis* (Tokuhara, & Mii, 2001), ส่วนปลายรากของ *Doritaenosis* (Park, Murthy, & Paek, 2003) และส่วนใบของกล้วยไม้ลูกผสม (Gantait, & Sinniah, 2012) เป็นต้น

เทคนิคชิ้นบาง (Thin Cell Layers technique – TCLs technique) เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายและปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการตัดชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชให้มีความหนาประมาณ 0.6 มิลลิเมตร เพื่อให้มีการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชได้อย่างรวดเร็ว (Lakshmanan, Loh, & Goh, 1995) โดยได้มีการใช้เทคนิคนี้กับกล้วยไม้หลายๆชนิด เช่น การเพิ่มจำนวน PLBs โดยเริ่มต้นจาก PLBs เก่าของ *Cymbidium* 'Sleeping Nymph' (Vyas, Guha, Kapoor, & Rao, 2010)

การเพิ่มจำนวนต้นของ *Dendrobium malones* 'Victory' จากการนำชิ้นส่วนใบมาทำเป็นชิ้นบาง (Anjum, Zia, & Chaudhary, 2006) และการชักนำ PLBs ชิ้นบางของชิ้นส่วนปลายยอดของ *Xenikophyton smeeanum* (Reichb.f.) (Mulgund, Nataraja, Malabadi, & Kumar, 2011) เป็นต้น

ปัญหาสำคัญที่มักพบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือชิ้นส่วนเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีดำหรือสีน้ำตาล ซึ่งทำให้เกิดการตายในที่สุด (Madhusudhanan & Rahiman, 2000) โดยเกิดจากสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compound) ซึ่งมักพบทั่วไปในเนื้อเยื่อพืช และพบมากในเซลล์ที่กำลังเติบโตและมีกิจกรรม (active) สูง (Ozyigit, Kahraman, & Ercan, 2007) เนื้อเยื่อที่มีสารประกอบฟีโนลิกเข้มข้นสูงจะเลี้ยงได้ยาก เนื่องจากเมื่อฟีนอลถูกออกซิไดซ์ จะมีการฟอร์มตัวเป็นสารควิโนน ซึ่งเป็นพิษกับเนื้อเยื่อพืช และเป็นสาเหตุให้ชิ้นส่วนเกิดเป็นสีน้ำตาล (Titov, Bhowmik, Mandal, Alam, & Uddin, 2006) ในขณะเดียวกัน ถ้าพืชถูกทำให้เกิดบาดแผล เนื้อเยื่อจะปล่อยสารประกอบฟีโนลิก ซึ่งส่งผลให้เกิดการออกซิเดชันของเอนไซม์ Polyphenol oxidase (PPO) (Kariyana & Nisyawati, 2013) โดยสารประกอบฟีโนลิกนี้ส่งผลให้ชิ้นส่วนยับยั้งการเจริญ (Achakzai, Achakzai, Masood, Kayani & Tareen, 2009)

การลดการเกิดสีดำหรือน้ำตาลของชิ้นส่วน สามารถทำได้โดยการย้ายเลี้ยงลงอาหารใหม่ หรือการเติมสารแอนตี้ออกซิแดนซ์ (anti-oxidants) เช่น กรดแอสคอบิก (ascorbic acid) สามารถลดการผลิตอนุมูลออกซิเจน เมื่อเนื้อเยื่อพืชมีบาดแผลได้ (Thomas, 2008; Titov, Bhowmik, Mandal, Alam, & Uddin, 2006) กรดแอสคอบิกช่วยลดการขับสารฟีนอลและลดความผิดปกติ และสามารถป้องกันการตายจากการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนพืชได้ (Ndakidemi, Mneney, & Ndakidemi, 2014; Ko, Su, Chen, & Chao, 2009) การลดการเกิดสีดำหรือน้ำตาลของชิ้นส่วนอีกวิธีการหนึ่งคือ การเติมตัวดูดซับ เช่น ผงถ่านลงในอาหารเลี้ยง จะสามารถลดการออกซิเดชั่นสารฟีโนลิก และทำให้พืชสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ (Toth, Haapala, & Hohtola, 1994) ช่วยส่งเสริมการเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนพืช ผงถ่านช่วยดูดซับสารพิษที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญ เช่น สารโพลีฟีนอล (polyphenol) ออกจากอาหารเลี้ยง (Fridborg, Pedersen, Landstrom, & Ericksson, 1978; Fernando, Santha, & Hewarathna, 2010) ทั้งนี้ความเข้มข้นของผงถ่านที่ใช้แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของพืช ชนิดของอาหารเลี้ยง ชนิดของชิ้นส่วน และวัตถุประสงค์ของการใช้

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาผลของผงถ่านและกรดแอสคอบิกต่อการลดการดำของชิ้นส่วนยอดของรองเท้านารีม่วงสงขลา (*Paphiopedilum callosum* var. *sublaeve*) โดยใช้เทคนิคชิ้นบาง (Thin Cell Layer technique)

ระเบียบวิธีวิจัย

ชิ้นส่วนยอดรองเท้านารีม่วงสงขลาปลอดเชื้อ อายุ 4 เดือน (สูง 1-1.5 เซนติเมตร) ที่ได้จากการเพาะเมล็ดบนอาหารแข็งสูตร Modified Vacin and Went (MVW) (Vacin & Went, 1949) เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทดลอง นำชิ้นส่วนยอดมาตัดส่วนรากออก แล้วตัดตามแนวขวางให้ได้ชิ้นบางที่มีความหนา 0.5-0.6 มิลลิเมตร 2 ชิ้นโดยเริ่มตัดจากส่วนฐานขึ้นมา จากนั้นนำชิ้นบางมาจุ่มลงในน้ำกลั่นฟอกฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม) หรือสารละลายกรดแอสคอบิก เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 นาที แล้ววางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MVW ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต Thidiazuron (TDZ) เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่านเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร หรืออาหารสูตร MVW ที่เติม TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายกรดแอสคอบิกเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น (Peal mermaid) เข้มข้น 5.5 กรัมต่อลิตร และไฟต้าเจล (Phytagel, Zigma) 1 กรัมต่อลิตร และปรับ pH อาหารเลี้ยงเท่ากับ 5.2±0.1 จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

โดยแต่ละขวดวางเลี้ยงชิ้นส่วนชิ้นบาง จำนวน 2 ชิ้น แต่ละชุดการทดลองมี 12 ขวด วางเลี้ยงภายใต้สภาวะแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 23 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงเวลาให้แสงสว่าง/มืด เท่ากับ 16/8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนชิ้นส่วนที่เกิดสีน้ำตาล ชิ้นส่วนที่เกิดยอด ราก หรือ PLBs แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ตามสูตรดังนี้ (Zhao, Wang, Feng, Wu, Yang, & Wang, 2007)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดชิ้นส่วนน้ำตาล} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดสีน้ำตาล}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดยอด}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดราก} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดราก}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโตคอร์มไลค์บอดี้} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดโพรโตคอร์มไลค์บอดี้}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

ทำการเก็บตัวอย่างชิ้นส่วนระยะต่างๆ และทำให้คงรูปโดยแช่ในสารละลาย formadehyde (Ajax Finechem, Taren Point, Australia): glacial acetic acid (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA): 70% ethyl alcohol (Merck, Billerica, MA, USA); 5:5:90 v/v/v (FAAII) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Ruzin, 1999) จากนั้นดึงน้ำออกจากเซลล์ของชิ้นส่วนด้วย tertiary-butyl-alcohol series ฝังชิ้นส่วนลงในพาราฟิน (Histoplast PE; Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA) และนำมาตัดด้วยเครื่องโรตารี่ไมโครโทม (rotary microtome) (Shandon Southern Product Ltd., Cheshire, UK). ที่ความหนา 6 ไมโครเมตร แล้วย้อมชิ้นส่วนตัวอย่างที่ได้ด้วย Delafield's hematoxylin และ Safranin (Ruzin, 1999) เพื่อศึกษาโครงสร้างทั่วไปของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Olympus BX 51 TRF (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

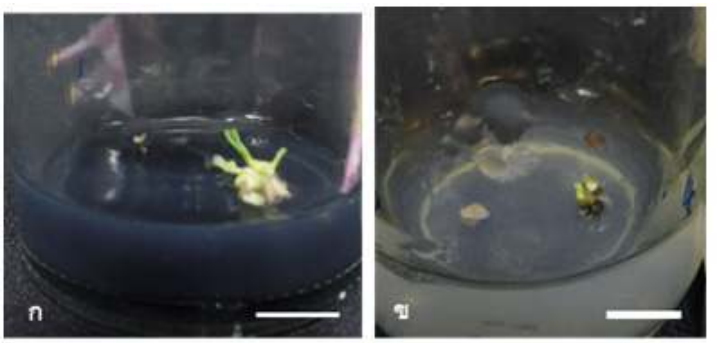
การวางแผนทดลองเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีการทำซ้ำ 3 ครั้ง และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมวิเคราะห์สถิติสำเร็จรูป วิเคราะห์ความแตกต่างข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วน และจำนวน PLBs ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น ด้วยวิธี ANOVA by Duncan's multiple range tests. และวิเคราะห์ความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การเกิด PLBs การเกิดยอด และการเกิดราก ด้วยวิธี Kruskal-Wallis-one-way ANOVA non-parametric test.

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

ชิ้นส่วนชิ้นบางที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MVW ที่เติม TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเกิดเป็น PLB เกิดยอด และราก หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MVW (ชุดควบคุม) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงที่สุด (20.83 เปอร์เซ็นต์) ส่วนชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารที่มีผงถ่านเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด (59.09 เปอร์เซ็นต์) ขณะที่ชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารละลายกรดแอสคอบิกเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนสูงสุด (70.83 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 1) ส่วนการจุ่มชิ้นส่วนชิ้นบางในสารละลายกรดแอสคอบิกเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ แล้ววางเลี้ยงบนอาหารเลี้ยง พบว่า การเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์มากรองลงมา (66.67 เปอร์เซ็นต์) และการจุ่มชิ้นส่วนชิ้นบางในสารละลายกรดแอสคอบิกเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์

แล้ววางเลี้ยงบนอาหารที่มีกรดแอสคอบิกเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ (62.50 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ซึ่งพบว่าชิ้นส่วนชิ้นบางที่วางเลี้ยงมีการพัฒนาหลากหลายแบบ เช่น เกิดยอด ราก และ PLBs โดยไม่ผ่านการเป็นแคลลัส ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนเริ่มต้นและสภาวะที่ใช้เลี้ยง (Meilasari & Iriawati, 2016) จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า ผงถ่านเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนได้มากกว่าสารละลายกรดแอสคอบิกเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร แม้ว่าสารละลายกรดแอสคอบิกจะสามารถลดการเกิดควิโนนที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีโนลิก โดยเอนไซม์ PPO แต่การทดลองนี้ยังไม่สามารถลดการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนได้ เนื่องมาจากความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสคอบิกที่ใช้ทดลองอาจจะน้อยเกินไป และเกิดจากการเสื่อมสภาพได้ง่ายในอาหารเพาะเลี้ยง โดยจะถูกออกซิไดส์โดยปฏิกิริยา catalyzed โดย Cu (II) และ Fe (III) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS นอกจากนี้ยังพบว่า แสง และค่า pH มีผลต่อความคงตัวของสารละลายกรดแอสคอบิกด้วย (Elmore, Samples, Sharma & Harrison, 1990) โดยในที่มืดสารละลายกรดแอสคอบิกจะสามารถคงตัวอยู่ได้ และพบว่ามีความคงตัวสูงสุดที่ pH 4.5 แต่การทดลองนี้ใช้อาหารที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 5.2±0.1 และเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง จึงอาจเป็นปัจจัยสำคัญให้สารละลายกรดแอสคอบิกสลายตัว นอกจากนี้ผลการทดลองยังสอดคล้องกับ Kariyana & Nisyawati (2013) ซึ่งรายงานว่า ชิ้นส่วนหน่อกล้วยที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมผงถ่านเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร สามารถลดการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนได้ดีกว่าการใช้สารละลายกรดแอสคอบิก และ Linington (1991) รายงานว่าการเติมผงถ่านเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ หรือสารละลายกรดแอสคอบิกเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารจะช่วยแก้ปัญหาการเกิดสารประกอบฟีโนลิคของชิ้นส่วนที่เลี้ยงได้ โดยผงถ่านจะมีประสิทธิภาพในการลดการเกิดชิ้นส่วนสีน้ำตาลมากกว่าการใช้สารละลายกรดแอสคอบิก ทั้งนี้ ข้อสรุปดังกล่าวขัดแย้งกับ Ko et al. (2009) ซึ่งรายงานว่าการเติมสารละลายกรดแอสคอบิก 0.01 เปอร์เซ็นต์ในอาหารแข็ง จะช่วยลดการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนได้ดีกว่าผงถ่าน

นอกจากนี้ชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารที่เติมผงถ่านเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด และการเกิด PLB สูงสุด เท่ากับ 29.17 เปอร์เซ็นต์ และ 50.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยังให้ค่าจำนวน PLBs ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้นสูงสุด เท่ากับ 1.46 PLBs/ชิ้นส่วน โดยพบว่าเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมผงถ่านมีการพัฒนาดีกว่าชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารละลายกรดแอสคอบิก (ภาพที่ 1) สำหรับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยย้อมด้วย Delafield's hematoxylin และ Safranin เพื่อดูโครงสร้างทั่วไป พบว่าหลังจากวางเลี้ยงได้ 1 สัปดาห์ เกิดกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กที่ชั้นอิพิเดอร์มิส (epidermis) โดยกลุ่มเซลล์เหล่านี้เรียงตัวกันหนาแน่น มี ไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ค่อนข้างแน่น และมีนิวคลีไอ (nuclei) ขนาดใหญ่ (ภาพที่ 2ก) คล้ายกับกรณีของกล้วยไม้ *Oncidium flexuosum* Sims ซึ่งมีการฟอร์มโครงสร้างที่เรียกว่า Pro-embryo-like structure บนชั้นผิวอิพิเดอมิส และเซลล์ซับอิพิเดอมิส (subepidermal cell) (Mayer, Stancato, & Appezzato-Da-Gloria, 2010) และสอดคล้องกับ Julkifle, Poobathy, Samian & Subramaniam (2012) เกี่ยวกับพัฒนาการการเกิด PLBs ของกล้วยไม้ *Dendrobium* Sonia-28 หลังจากการเลี้ยง 2 สัปดาห์ เนื้อเยื่อเริ่มบวม มีโครงสร้างเป็นรูปร่างกลม (Globular shape structures) (ภาพที่ 2ข) เนื้อเยื่อเหล่านี้เริ่มขยายและกลายเป็น PLBs ในสัปดาห์ที่ 3 (ภาพที่ 2ค) เซลล์ที่ส่วนปลายยอดแสดงการมีกิจกรรม (active) โดยเพิ่มจำนวน ซึ่ง PLBs บางส่วนเริ่มพัฒนาเป็นไพรโมเดียล (primordial) และใบอ่อน หลังจากการเลี้ยง 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 2ง)



ภาพที่ 1 การพัฒนาของชิ้นส่วนชิ้นบางที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MVW ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับผงถ่านความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร (ก) และร่วมกับสารละลายกรดแอสคอบิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ข) (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

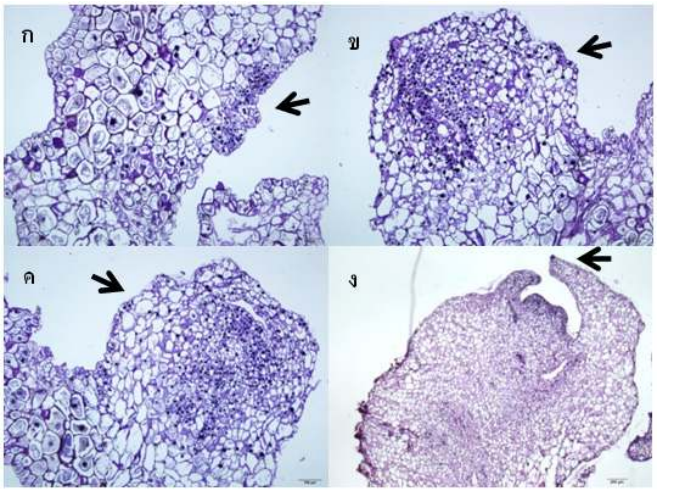
ตารางที่ 1 ผลการใช้ผงถ่านและกรดแอสคอบิกต่อการเกิดสีน้ำตาลในชิ้นส่วนปลายยอดรองเท้านารีม่วงสงขลา (*Paphiopedilum callosum* var. *sublaeve*) หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	%การตำของชิ้นส่วน ± SE	% การเกิด PLB ± SE	% การเกิดยอด ± SE	% การเกิดราก ± SE	% การรอดชีวิต ± SE	จำนวน PLB/ชิ้นส่วน ± SE
1) MVW (ควบคุม)	50.00 ± 10.43^{ab}	46.43 ± 9.48	20.83 ± 8.47	20.83 ± 8.47	45.83 ± 10.39	0.46 ± 0.17^{b}
2) MVW จุ่มใน AA	66.67 ± 9.83^{a}	25.00 ± 9.03	12.50 ± 6.89	4.17 ± 4.17	37.50 ± 10.09	0.33 ± 0.14^{b}
3) MVW+AA จุ่มใน AA	62.50 ± 10.09^{a}	44.23 ± 9.03	12.50 ± 6.89	4.17 ± 4.17	45.00 ± 11.41	0.79 ± 0.37^{ab}
4) MVW+AA	70.83 ± 9.48^{a}	41.49 ± 8.47	8.33 ± 5.76	8.33 ± 5.76	45.00 ± 11.41	0.33 ± 0.14^{b}
5) MVW+AC จุ่มใน AA	45.83 ± 10.39^{ab}	44.23 ± 9.03	20.83 ± 8.47	16.67 ± 7.77	54.54 ± 10.86	0.71 ± 0.23^{ab}
6) MVW +AC	46.43 ± 9.48^{ab}	50.89 ± 10.39	29.17 ± 9.48	12.50 ± 6.89	59.09 ± 10.73	1.46 ± 0.37^{a}
F-test	*					*
The Kruskal-Wallis-test		ns	ns	ns	ns	
C.V. (%)	14.736	5.920	6.020	10.739	1.779	0.528

*มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า P≤0.05, ns -ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ, AA-ascorbic acid, AC-activated charcoal

[1]ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การตำ, จำนวน PLB/ชิ้นส่วน แสดงถึงความไม่แตกต่างที่ระดับค่า P≤0.05 วิเคราะห์โดยใช้ DMRT

[2]วิธีทดสอบแบบ The Kruskal-Wallis test ใช้จำแนกความแตกต่างของค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด PLB, การเกิดยอด, การเกิดราก และการรอดชีวิต



ภาพที่ 2 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของชิ้นส่วนพืชชิ้นบางที่วางเลี้ยงบนอาหารที่เติมผงถ่านเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร
ก) เกิดตุ่มเล็กๆที่ชั้นอิพิเดอมิส หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ลูกศรชี้)
ข) เซลล์เพิ่มจำนวนและมีความแอคทีฟ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ลูกศรชี้)
ค) เซลล์ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ลูกศรชี้)
ง) เกิดส่วนปลายยอด (apical shoot) และใบเลี้ยง (leaf primodia) เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ลูกศรชี้)

สรุป

ชิ้นส่วนชิ้นบางที่ไม่จุ่มในสารละลายกรดแอสคอบิก แล้ววางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MVW ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่านความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำ PLBs และการชักนำยอดของรองเท้านารีม่วงสงขลา โดยใช้เทคนิคชิ้นบางซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด (59.09 เปอร์เซ็นต์) เปอร์เซ็นต์การเกิด PLBs สูงสุด (50.89 เปอร์เซ็นต์) เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด (29.17 เปอร์เซ็นต์) และจำนวนเฉลี่ยของ PLB ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้นสูงสุด (1.46 PLBs ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น)

ข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยพบว่า การใช้เทคนิคชิ้นบางเพื่อชักนำ PLBs, ยอด และรากจากชิ้นส่วนยอดรองเท้านารีม่วงสงขลา โดยใช้สารลดการเกิดสีน้ำตาล ได้แก่ กรดแอสคอบิก และผงถ่าน จากการทดลอง ดังกล่าวมีข้อเสนอแนะดังนี้

1. เพิ่มความเข้มข้นของกรดแอสคอบิก เนื่องจากความเข้มข้นในการทดลองนี้อาจน้อยเกินไป จึงไม่มีผลในการลดการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนได้

2. ควรเพิ่มสภาวะการวางเลี้ยงชิ้นส่วน โดยวางเลี้ยงในที่มืดเพื่อรักษาสภาพของกรดแอสคอบิกไม่ให้ถูกทำลายโดยแสง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ที่สนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

รายการอ้างอิง (References)

Achakzai, A. K. K., Achakzai, P., Masood, A., Kayani, S. A., & Tareen, R. B. (2009). Response of Plant Parts and Age on the Distribution of Secondary Metabolites on Plants Found in Quetta. *Pakistan Journal of Botany, 41*(5), 2129-2135.

Anjum, S., Zia, M., & Chaudhary, M. F. (2006). Investigations of Different Strategies for High Frequency Regeneration of Dendrobium malones 'Victory'. *African Journal of Biotechnology, 5*(19), 1738-1743.

CITES. (2013). *Conventional on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, Appendices I. Geneva, Switzerland.* Retrieved March 9, 2018, Retrieved from https://www.cites.org/eng/disc/text.php

Chen, T. Y., Chen, J. T., & Chang, W. C. (2004). Plant Regeneration through Direct Shoot Bud Formation from of *Paphiopedilum* Orchids. *Plant Cell Tissue and Organ Culture, 76*, 11-15.

Elmore, H. W., Samples, B., Sharma, S., & Harrison, M. (1990). Influence of Cultural and Physiochemical Factors on Ascorbate Stability in Plant Tissue Culture Media. *Plant Cell Tissue and Organ Culture, 20*, 131-135.

Fernando, S. C., Santha, E. S., & Hewarathna, D. J. A. (2010). Activated Coconut Shell Charcoal as a Component of Tissue Culture Media of *Cocos nucifera* L. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, 38*, 181-185.

Fridborg, G., Pedersen, M., Landstrom, L., & Ericksson, T. (1978). The Effect of Activated Charcoal on Tissue Cultures: Adsorption of Metabolites Inhibiting Morphogenesis. *Physiologia Plantarum, 43*, 104-106.

Gantait, S., & Sinniah, U. R. (2012). Rapid Micropropagation of Monopodial Orchid Hybrid (*Aranda* Wan Chark Kuan 'Blue' x *Vanda coerulea* Grifft. Ex. Lindl.) through Direct Induction of Protocorm-like Bodies from Leaf Segments. *Plant Growth Regulation, 68*, 129-140.

Islam, M. O., Islam, Md. S., & Saleh, A. (2015). Effect of Banana on Growth and Development of Protocorm like Bodies in *Dendrobium*, sp. orchid. *The Agriculturists, 13*(1), 101-105.

Julkifle, A. L., Poobathy, R., Samain, R. & Subramaniam, S. Histological Analyses of PLBs of *Dendrobium Sonia-28* in the Recognition of Cell Competence for Regeneration and Agrobacterium infection. *Plant Omics, 5*(6), 514-517.

Kariyana, K., & Nisyawati. (2013). Effect of Ascorbic Acid, Activated Carbon and Light Duration on Explant Browning of Banana Cultivar barangan (*Musa acuminate* L.). *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences, 16*(1), 118-123.

Ko, W. H., Su, C. C., Chen, C. L., & Chao, C. P. (2009). Control of Lethal Browning of Tissue Culture Plantlets of Cavendish Banana cv. Formosana with Ascorbic acid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture, 96*, 137-141.

Lakshmanan, P., Loh, C., & Goh, C. (1995). An in vitro Method for Rapid Regeneration of a Monopodial Orchid Hybrid *Aranda* Deborah Using Thin Section Culture. *Plant Cell Reports, 14*, 510-514.

Lee, Y., Hsu, S., & Yeung, E. C. (2013). Orchid Protocorm-like Bodies are Somatic Embryos. *American Journal of Botany, 100*(11), 1211-1231.

Linington, I. M. (1991). *In vitro Propagation* of *Dipterocarpus alatus* and *Dipterocarpus intricatus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture, 27*, 81-88.

Madhasudhanan, K., & Rahiman, B. A. (2000). The Effect of Activated Charcoal Supplemented Media to Browning of *in vitro* Cultures of *Piper* species. *Biologia Plantarum, 43*(2), 297-299.

Mayer, J. L. S., Stancato, G. C. & Appezzato-Da-Gloria, B. (2010). Direct Regeneration of Protocorm-like Bodies (PLBs) from Leaf Apices of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. DOI 10.1007/s11240-010-9782-9.

Meilasari, D. & Iriawati. 2016. Regeneration of Plantlets Through PLB (Protocorm-Like Body) Formation in *Phalaenopsis* 'Join Angle X Sogo Musadian. *Journal of Mathematical and Fundamental Sciences, 48*(3), 204-212.

Mulgund, G. S., Nataraja, K., Malabadi, R. B., & Kumar, S. V. (2011). TDZ induced in vitro Propagation of an Epiphytic Orchid *Xenikophyton smeeanum* (Reichb.f.). *Research in Plant Biology, 1*(4), 7-15.

Ndakidemi, C. F., Mneney, E., & Ndakidemi, P. A. (2014). Effects of Ascorbic Acid in Controlling Lethal Browning in *in vitro* Culture of *Brahylaena huillensis* Using Nodal Segments. *American Journal of Plant Sciences, 5*, 187-191.

Ng, C., Saleh, N. M., & Zaman, F. Q. (2010). *In vitro* Multiplication of the Rare and Endangered Slipper Orchid, *Paphiopedilum rothschildianum* (Orchidaceae). *African Journal of Biotechnology, 9*(14), 2062-2068.

Ng, C., & Saleh, N. M. (2011). *In vitro* Propagation of *Paphiopedilum* Orchid through Formation of Protocorm-like Bodies. *Plant Cell Tissue and Organ Culture, 105*, 193-202.

Nhut, D. T., Don, N. T., Vu, N. H., Thien, N. Q., Thuy, D. T. T., Duy, N., & Teixeira da Silva, J. A. (2006). *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*. Volume II. Global Science Books Publishers, UK.

Ozyigit, I., Kahraman, M. V., & Ercan, O. (2007). Relation Between Explant Age, Total Phenols and Regeneration Response in Tissue Cultured Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology, 6*(1), 3-8.

Park, S. Y., Murthy, H. N., & Paek, K. Y. (2003). Protocorm-like Body Induction and Subsequent Plant Regeneration from Root Tip Cultures of *Doritaenopsis*. *Plant Science, 164*, 919-923.

Prasongsom, S., Thammasiri, K., & Chuenboonngarm, N. (2016). Efficient Adventitious Shoot Regeneration from Shoot Tip Culture of *Rhynchostylis gigantea* Lindl. (amethyst-purple), a Rare Thai Orchid Species. *Walailak Journal, 13*(9), 757-767.

Ruzin, S. (1999). *Plant Microtechnique and Microscopy*. New York: Oxford University Press

Thomas, T. D. (2008). The Role of Activated Charcoal in Plant Tissue Culture. *Biotechnology Advances, 26*, 618-631.

Titov, S., Bhowmik, S. K., Mandal, A., Alam, Md. S., & Uddin, S. N. (2006). Control of Phenolic Compound Secretion and Effect of Growth Regulators for Organ Formation from *Musa* spp. cv. Kanthali Bud Explants. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 2*(3), 97-104..

Tokuhara, K., & Mii, M. (2001). Induction of Embryogenic Callus and Cell Suspension Culture from Shoot Tips Excised from Flower Stalk Buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). In *Vitro Cell Developmental Biology-Plant, 37*, 457-461.

Toth, K. , Haapala, T., & Hohtola, A. (1994). Alleviation of Browning in Oak Explants by Chemical Pretreatments. *Biologia Plantarum, 36*(4), 511-517.

Vacin, E. F., & Went, F. W. (1949). Some pH Change in Nutrient Solutions. *Botanical Gazette, 110*, 605-613.

Vyas, S., Guha, S., Kapoor, P., & Rao, I. U. (2010). Micropropagation of *Cymbidium* Sleeping Nymph Through Protocorm-like Bodies Production by Thin Cell Layer Culture. *Scientia Horticulturae, 123*, 551-557.

Zeng, S., Wu, K., Teixeira da Silva, J. A. Zhang, J., Xia, N., & Duan, J. (2012). Asymbiotic Seed Germination Seedling Development and Reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an Endangered Terrestrial Orchid. *Scientia Horticulturae, 138*, 198-209.

Zhao, P., Wang, W., Feng, F.S., Wu, F., Yang, Z. Q., & Wang, W. J. (2007). High-Frequency Shoot Regeneration Transvers Thin Cell Layer Culture in *Dandrobium Candidum* Wall Ex Lindl. *Plant Cell Tissue and Organ Culture, 90*, 131-139.