ผลของสูตรอาหารและสารประกอบอินทรีย์ต่อการเจริญและพัฒนาของลำลูกกล้วยเอื้องหัวเข็มหมุดในสภาพปลอดเชื้อ

Effect of Media and Organic Supplements on Growth and Development from Pseudobulb Explants of *Bulbophyllum moniliforme* C.S.P.Parish & Rchb.f.

อนุพันธ์ กงบังเกิด*

หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

วิทยา ผาคำ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ถนนสุขุมวิท 23 แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110

Anupan Kongbangkerd*

Plant Tissue Culture Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science,
Naresuan University, Tha Pho, Muang, Phitsanulok 65000

Wittaya Pakum

Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University,
Sukhumvit 23 Road, Khlongtoey-nua, Wattana, Bangkok 10110

บทคัดย่อ

การเลี้ยงลำลูกกล้วยเอื้องหัวเข็มหมุด (*Bulbophyllum moniliforme*) บนอาหารกึ่งแข็งที่แตกต่างกัน 6 สูตร ได้แก่ สูตร Knudson C (KC) สูตร ½ KC สูตร Murashige and Skoog (MS) สูตร ½ MS สูตร Vacin และ Went (VW) และสูตร ½ VW เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร VW สามารถชักนำให้ลำลูกกล้วยมีการพัฒนาและเจริญเติบโตเกิดเป็นลำลูกกล้วยใหม่เฉลี่ยดีที่สุด คิดเป็น 2.2 ลำ ในขณะที่อาหารสูตร ½ VW ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนราก (2.9 ราก) และจำนวนใบใหม่ (0.6 ใบ) มากที่สุด และเมื่อนำลำลูกกล้วยเอื้องหัวหมุดมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว (50, 100, 150 และ 200 มิลลิลิตรต่อลิตร) ร่วมกับน้ำต้มมันฝรั่ง (25 และ 50 กรัมต่อลิตร) ในปริมาณที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับมันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนลำลูกกล้วย (2.4 ลำ) ใบ (1.2 ใบ) และราก (2.8 ราก) ใหม่เฉลี่ยได้มากที่สุด และเมื่อย้ายต้นอ่อนออกปลูกในวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนที่ใช้สแฟกนัมมอสเป็นวัสดุปลูกมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** anupank@nu.ac.th

คำสำคัญ : กล้วยไม้สกุลสิงโต; การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช; สารประกอบอินทรีย์

Abstract

Pseudobulb explants of *Bulbophyllum moniliforme* were cultured aseptically on six different media *viz*. Knudson C (KC), ½ KC, Murashige and Skoog (MS), ½ MS, Vacin and Went (VW) and ½ VW. After cultured for 16 weeks, VW medium could promote the highest number of new pseudobulbs (2.2 pseudobulbs) whereas ½ VW medium could promote the highest number of roots (2.9 roots) and leaves (0.6 leaves). To examine the influence of organic additives, pseudobulb explants were culture on VW medium supplemented with varied concentrations of coconut water (50, 100, 150 and 200 ml/L) and potato extract (25 and 50 g/L). After cultured for 8 weeks, the highest number of new pseudobulbs (2.4 pseudobulbs) as well as the number of leaves (1.2 leaves) and roots (2.8 roots) could be observed on VW medium augmented with 100 ml/L coconut water and 50 g/L potato extract. In this study, three different planting materials were chosen to test the survival, growth and development of seedling after transferred to greenhouse condition for 8 weeks. The results indicated that the highest percentage of survival was obtained when sphagnum moss or chopped coconut husk were used as planting materials.

Keywords: *Bulbophyllum*; *in vitro* culture; organic additive

1. บทนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง โดยเฉพาะพืชในวงศ์กล้วยไม้ซึ่งมีรายงานการค้นพบถึง 175 สกุล 1,110 ชนิด [1] ในจำนวนนี้พบว่าเป็นกล้วยไม้ที่ถูกจัดอยู่ในสถานภาพหายากและใกล้สูญพันธุ์จำนวน 173 ชนิด [2] ยิ่งไปกว่านั้นมีกล้วยไม้หลายชนิดที่ยังขาดข้อมูลเพื่อใช้ในการประเมินสถานภาพ [3] กล้วยไม้เอื้องหัวเข็มหมุด (*Bulbophyllum moniliforme* C.S.P.Parish & Rchb.f.) เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย ลำลูกกล้วยกลมขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.0 มิลลิเมตร เรียงชิดต่อกันบนเหง้า มี 1 ใบต่อลำลูกกล้วย ทิ้งใบเมื่อออกดอก ดอกเดี่ยวขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีสีส้มอ่อน กลีบเลี้ยงคู่ข้างมีขนาดใหญ่กว่ากลีบเลี้ยงบน กลีบปากเล็กมีสีส้มอมน้ำตาล ออกดอกช่วงเดือนตุลาคมถึงธันวาคม เป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นที่พบตามป่าดงดิบทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ [4] ปัจจุบันกล้วยไม้ชนิดนี้มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากปัญหาการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศและสังคมพืชในถิ่นอาศัย รวมทั้งการลักลอบนำกล้วยไม้ดังกล่าวออกจากป่า หากไม่มีการวางแผนการอนุรักษ์ที่เหมาะสมอาจส่งผลให้ปริมาณกล้วยไม้ชนิดนี้ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วจนถึงขั้นวิกฤตและสูญพันธุ์ได้ในที่สุด เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่นำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชให้ได้จำนวนมากเพื่อการอนุรักษ์ และประสบความสำเร็จในกล้วยไม้หลายชนิด [5] อย่างไรก็ตาม สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนต้นอ่อนของกล้วยไม้แต่ละชนิดในสภาพปลอดเชื้อนั้นแตกต่างกันออกไป ปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อความสำเร็จในการขยายพันธุ์

กล้วยไม้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีหลากหลาย โดยเฉพาะเรื่องขององค์ประกอบของอาหาร อาทิ ชนิดและสัดส่วนของธาตุอาหาร [6-9] สารควบคุมการเจริญเติบโต [10-16] และสารประกอบอินทรีย์ที่พบว่ามีรายงานความสำเร็จของการศึกษาผลของสารดังกล่าวในการกระตุ้นให้เกิดการงอกกลับเป็นต้นใหม่ในกล้วยไม้หลายชนิด [17-20] แม้ว่ากล้วยไม้สกุลสิงโตมีสมาชิกจำนวนหลายชนิด แต่รายงานการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในกล้วยไม้สกุลนี้กลับมีจำนวนน้อยมาก อาทิ รายงานการศึกษากระบวนการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *Bulbophyllum lilacinum* ในสภาพปลอดเชื้อ [21] การชักนำให้ออกดอกในหลอดทดลองใน *B. auricomum* [22] การศึกษาผลขององค์ประกอบอาหารต่อการเจริญและพัฒนาของต้นอ่อน *B. nipondhii* [23] และการศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์ต่อการเจริญและพัฒนาของ *B. dhaninivatii* ในหลอดทดลอง [24] เป็นต้น นอกจากนี้ยังไม่เคยมีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในกล้วยไม้เอื้องหัวเข็มหมุดมาก่อน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบผลของสูตรอาหารและสารประกอบอินทรีย์ต่อการเจริญและพัฒนาเกิดเป็นต้นใหม่ของเอื้องหัวเข็มหมุดในสภาพปลอดเชื้อ รวมถึงหาวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการย้ายต้นอ่อนออกปลูก ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะเป็นช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์กล้วยไม้ชนิดนี้เพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนต่อไป

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมชิ้นส่วนเริ่มต้นสำหรับใช้ในการทดลอง

ชิ้นส่วนลำลูกกล้วยที่ใช้ในการศึกษาทดลองนี้ ได้จากการเพาะเมล็ดเอื้องหัวเข็มหมุดในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร วุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร และเติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร ร่วมกับมันฝรั่งสกัด 50 กรัมต่อลิตร เมื่อเมล็ดงอกและพัฒนาเกิดเป็นโปรโตคอร์มแล้ว ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่มีการเติมผงถ่าน 2.0 กรัมต่อลิตร เลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 4 เดือน จนโปรโตคอร์มพัฒนาเกิดเป็นต้นอ่อนที่สร้างลำลูกกล้วยที่มีใบ 1 ใบ และราก 1-2 ราก จากนั้นนำลำลูกกล้วยที่ได้ไปใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทดลอง

2.2 การศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนลำลูกกล้วยเอื้องหัวเข็มหมุด

นำลำลูกกล้วยเอื้องหัวเข็มหมุดที่มีขนาดของหัวประมาณ 3-4 มิลลิเมตร มาตัดรากออก ย้ายเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร 6 สูตร ดังนี้ สูตร Murashige และ Skoog (MS) [25] สูตร ½ MS สูตร Vacin และ Went (VW) [26] สูตร ½ VW สูตร Knudson C (KC) [27] และสูตร ½ KC หลังจากเพาะ เลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง

2.3 การศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์ต่อการเจริญและพัฒนาของลำลูกกล้วยเอื้องหัวเข็มหมุด

นำลำลูกกล้วยเอื้องหัวเข็มหมุดที่มีขนาดของหัวประมาณ 3-4 มิลลิเมตร มาตัดรากออก ย้ายเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และเติมน้ำมะพร้าวปริมาตร 50, 100, 150 และ 200 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับมันฝรั่งสกัดปริมาณ 25 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 8 สูตร และสูตรควบคุมที่ไม่มีการเติมน้ำมะพร้าวและมันฝรั่งสกัด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง

2.4 การศึกษาผลของวัสดุปลูกต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนเอื้องหัวเข็มหมุด

นำต้นอ่อนเอื้องหัวเข็มหมุดที่เลี้ยงในสภาพ

ปลอดเชื้อที่มีลำลูกกล้วยต่อกัน 3 ลำ มีราก 1-2 ราก และใบ 1 ใบต่อลำ มาแช่ในสารละลายผสมป้องกันกำจัดเชื้อราแคปเทน 10 กรัม และคาร์เบนดาซิม 10 กรัม ละลายในน้ำ 20 ลิตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย้ายปลูกบนวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ ถ่านทุบ สแฟกนัมมอส และมะพร้าวสับที่แช่สารละลายผสมป้องกันกำจัดเชื้อราดังกล่าว นำไปเลี้ยงในห้องที่ให้ได้รับแสงสว่างตลอดวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง

2.5 สภาวะการเพาะเลี้ยงและการวิเคราะห์ข้อมูล

ศึกษาในสภาพปลอดเชื้อทุกการทดลอง โดยชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงลงบนอาหารเรียบร้อยแล้วจะถูกนำมาวางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ และได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในการทดลองในแต่ละสิ่งทดลองจะใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นจำนวน 15 ชิ้นส่วน โดยแต่ละสิ่งทดลองจะทดลองซ้ำ 3 ครั้ง วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีของดันแคน (Duncan's new multiple range test, DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

3.1 ผลของสูตรอาหารต่อการพัฒนาและการเจริญของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตหัวเข็มเข็มหมุด

การเลี้ยงลำลูกกล้วยของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องหัวเข็มหมุดบนอาหารกึ่งแข็งดัดแปลงที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าลำลูกกล้วยมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานที่แตกต่างกันออกไปในอาหารแต่ละสูตร โดยสัปดาห์ที่ 1-2 พบว่าต้นอ่อนมีการเจริญและพัฒนาที่ไม่ต่างกันมากนัก ลำลูกกล้วยที่เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทดลองยังคงมีลักษณะปกติ และมีใบสีเขียวสด เริ่มสังเกตพบการแตกหน่อใหม่จากลำลูกกล้วยเดิมขึ้นในอาหารทุกสูตรที่ทดลองช่วงต้นสัปดาห์ที่ 3 ของการเลี้ยง แต่ยังไม่พบการเกิดและพัฒนาเป็นราก ลำต้น และใบใหม่ เมื่อเลี้ยงต่อเนื่องไปจนถึงสัปดาห์ที่ 4 สามารถสังเกตเห็นการแตกรากใหม่ขึ้นบริเวณลำลูกกล้วยของต้นเดิมในเกือบทุกสูตรอาหาร โดยรากมีสีขาว ไม่มีขนราก จากนั้นต้นอ่อนที่แตกมาจากลำลูกกล้วยจะมีการเจริญและพัฒนาต่อเนื่องไปจนถึงสัปดาห์ที่ 6 พบว่าลำลูกกล้วยบางชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารบางสูตรโดยเฉพาะสูตร MS, ½ MS, KC และ ½ KC เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของสีลำลูกกล้วยและใบเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาล เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 8 พบว่าลำลูกกล้วยที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW มีอัตราการเกิดต้นใหม่สูงที่สุด (2.2 ต้นต่อชิ้นส่วน) และให้แนวโน้มในการกระตุ้นให้เกิดต้นใหม่ที่ดีกว่าอาหารสูตร MS และ KC ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าอาหารสูตร VW ที่ประกอบด้วยสัดส่วนของธาตุฟอสฟอรัสในปริมาณที่สูงกว่าสูตรอาหารอื่น ซึ่งธาตุอาหารดังกล่าวช่วยส่งเสริมการเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้ *Bletia purpurea* ได้ดี [28] เช่นเดียวกันกับการศึกษาการงอกและพัฒนาการของกล้วยไม้สิงโตนิพนธ์ (*B. nipondhii*) ที่พบว่าพัฒนาการและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตนิพนธ์เกิดขึ้นได้ดีเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร VW และต้นอ่อนสิงโตนิพนธ์สามารถสร้างรากได้ดีเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ VW [23] รวมถึงรายงานการศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตประหลาดที่แสดงให้เห็นว่าต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW นั้นสามารถกระตุ้นให้เกิดการแตกหน่อใหม่ได้ดีที่สุด [29-30] ในขณะที่อาหารสูตร MS นั้น มีสัดส่วนของธาตุไนโตรเจนในปริมาณที่มากกว่าอาหารสูตรอื่น ๆ กลับมีผลทำให้การเจริญเติบโตและ

การสร้างหน่อใหม่ของเอื้องหัวเข็มหมุดน้อยกว่าอาหารสูตร VW ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากปริมาณไนโตรเจนอนินทรีย์ในอาหารสูตร MS ที่มีปริมาณมากเกินความต้องการของกล้วยไม้ เซลล์พืชจึงต้องใช้พลังงานส่วนหนึ่งไปในการกำจัดปริมาณของไนเตรตที่มีมากเกินไป ทำให้พืชมีพัฒนาการและการเจริญที่ลดลง) [31-32] นอกจากนี้ผลจากการทดลองยังพบว่าชิ้นส่วนลำลูกกล้วยเอื้องหัวเข็มหมุดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร ½ VW มีอัตราการเกิดรากใหม่เฉลี่ยมากที่สุด (2.9 รากต่อชิ้นส่วน) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากสูตร MS และ KC อีกทั้งมีรายงานการศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้หวายพบว่าต้นอ่อนกล้วยไม้หวายที่เลี้ยงบนอาหารสูตร KC นั้นมีพัฒนาการและการเกิดยอดใหม่น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร VW และ MS ตามลำดับ [33] อย่างไรก็ดี ต้นอ่อนเอื้องหัวเข็มหมุดที่แตกใหม่จากชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เป็นลำลูกกล้วยนั้น สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่มีลำลูกกล้วยสมบูรณ์ได้ เมื่อเลี้ยงไปจนครบ 8 สัปดาห์ (ตารางที่ 1)

3.2 ผลของสารประกอบอินทรีย์ต่อการเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนสิงโตหัวเข็มเข็มหมุด

การเลี้ยงลำลูกกล้วยเอื้องหัวเข็มหมุดบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว (50, 100, 150 และ 200 มิลลิลิตรต่อลิตร) ร่วมกับมันฝรั่งสกัด (25 และ 50 กรัมต่อลิตร) และน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าในสัปดาห์ที่ 1-3 ลำลูกกล้วยที่เลี้ยงในอาหารแต่ละสูตรยังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น แต่เมื่อเลี้ยงจนถึงสัปดาห์ที่ 4 พบว่าลำลูกกล้วยที่เลี้ยงบนอาหารทุกสูตรเริ่มมีการเจริญและพัฒนา มีการแตกใบและยอดใหม่เกิดขึ้น แต่ไม่พบการเกิดรากใหม่ และยังคงมีพัฒนาการต่อเนื่องไปจนถึงสัปดาห์ที่ 8 พบว่าลำลูกกล้วยที่เลี้ยงในอาหารแต่ละสูตรมีการเจริญและพัฒนาเพิ่มขึ้นแตกต่างกันออกไป โดยพบว่าอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับมันฝรั่งสกัด 50 กรัมต่อลิตร มีแนวโน้มชักนำให้ลำลูกกล้วยเอื้องหัวเข็มหมุดสร้างต้นใหม่ (2.4 ต้นต่อชิ้นส่วน) ได้มากที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากสูตรอื่น ในขณะที่อาหารสูตรเดียวกันนี้ มีผลชักนำให้เกิดใบ (1.2 ใบต่อชิ้นส่วน) และรากใหม่ (2.8 รากต่อชิ้นส่วน) เฉลี่ยดีที่สุดซึ่งแตกต่างจากอาหารสูตรที่ไม่เติมสารประกอบอินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) ทั้งนี้ในน้ำมะพร้าวประกอบด้วยสารส่งเสริมการเจริญเติบโตหลายชนิด เช่น น้ำตาล วิตามิน และฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินและออกซินที่มีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ [34] ในขณะที่มันฝรั่งนั้นประกอบด้วยกรดอะมิโน วิตามิน ไขมัน และน้ำตาลที่ส่งเสริมให้พืชมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ดี [35] จึงส่งผลทำให้ลำลูกกล้วยเอื้องหัวเข็มหมุดเจริญและพัฒนาเกิดเป็นต้นใหม่ได้ดี โดยเฉพาะการส่งเสริม

ตารางที่ 1 การเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตหัวเข็มเข็มหมุดที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนต้นใหม่ (mean ± SD)	จำนวนราก (mean ± SD)	จำนวนใบ (mean ± SD)
MS	1.4±0.1 b	1.1±0.2 b*	0.2±0.0 b
½ MS	1.8±0.1 a	1.3±0.3 b	0.5±0.1 ab
VW	2.2±0.1 a	0.9±0.2 b	0.5±0.1 ab
½ VW	2.0±0.1 a	2.9±0.4 a	0.6±0.1 a
KC	1.9±0.1 a	1.2±0.2 b	0.5±0.1 ab
½ KC	1.4±0.1 b	0.6±0.1 b	0.3±0.1 ab

*ตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.05$ วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี DMRT

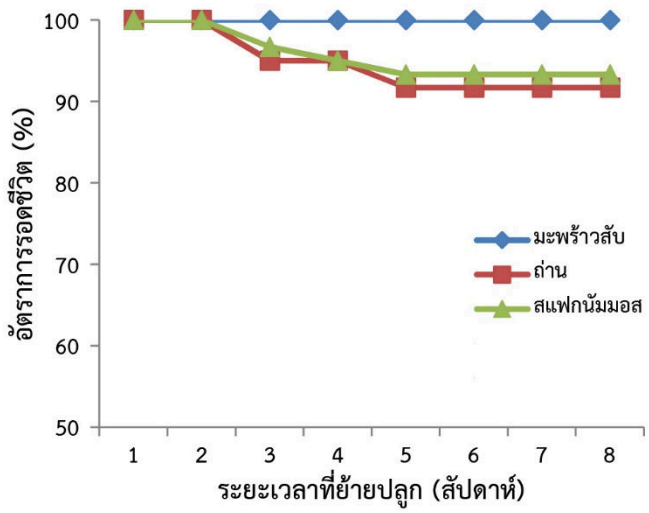
ตารางที่ 2 การเจริญและพัฒนาของลำลูกกล้วยเอื้องหัวเข็มหมุดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าวร่วมกับมันฝรั่งสกัดปริมาณแตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

น้ำมะพร้าว (ml/l)	มันฝรั่ง (g/l)	จำนวนต้นใหม่ (mean ± SD)	จำนวนราก (mean ± SD)	จำนวนใบ (mean ± SD)
0	0	2.2±0.1 a	0.9±0.2 b	0.5±0.1 b
50	25	1.7±0.2 a	1.2±0.3 b*	0.9±0.1 ab
	50	2.1±0.1 a	1.8±0.3 ab	0.9±0.1 ab
100	25	2.1±0.1 a	1.7±0.2 ab	0.7±0.1 ab
	50	2.4±0.3 a	2.8±0.5 a	1.2±0.2 a
150	25	1.9±0.2 a	2.1±0.4 ab	0.6±0.2 ab
	50	2.0±0.2 a	2.4±0.4 ab	0.5±0.1 b
200	25	1.9±0.1 a	1.9±0.4 ab	0.8±0.1 ab
	50	2.1±0.1 a	2.1±0.3 ab	1.1±0.1 ab

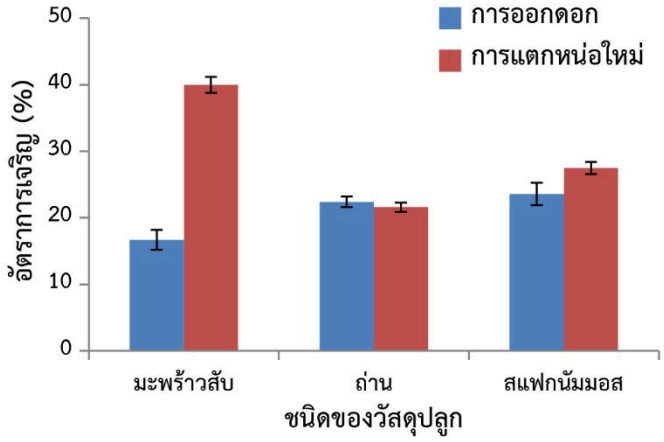
*ตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.05$ วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี DMRT

ให้เกิดการสร้างราก และใบใหม่จากต้นอ่อน เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรควบคุมที่ไม่มีการเติมน้ำมะพร้าวและมันฝรั่งสกัด สอดคล้องกับรายงานการศึกษาผลของน้ำมะพร้าวร่วมกับมันฝรั่งต่อการเจริญและการพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้ *Vanda roxburgii* [36] *Cymbidium pendulum* [19] และ *Dendrobium officinale* [20] เป็นต้น รวมไปถึงการ ศึกษาผลการเติมน้ำมะพร้าวร่วมกับมันฝรั่งสกัดลงในอาหารที่เลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตนิพนธ์ (*B. nipondhii*) พบว่ามีผลทำให้การเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของน้ำมะพร้าวและมันฝรั่งสกัดกลับมีแนวโน้มทำให้การเจริญเติบโตและพัฒนาลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความหนืดของอาหารเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นตามปริมาณของน้ำมะพร้าวและมันฝรั่งสกัดที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ความสามารถในการดูดซับอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตของต้นอ่อนนั้นลดลง [23] และการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าต้นอ่อนของกล้วยไม้สิงโตธานีนิวัต (*B. dhaninivatii*) [37] และสิงโตก้ามปูแดง (*B. patens*) [38] สามารถชักนำให้การสร้างยอดใหม่ได้ดีขึ้นเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมน้ำมะพร้าวร่วมกับมันฝรั่งสกัดในปริมาณและสัดส่วนที่เหมาะสม แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของน้ำมะพร้าวและในฝรั่งสกัดกลับมีแนวโน้มทำให้การเจริญเติบโตของต้นอ่อนของกล้วยไม้สิงโตทั้งสองชนิดนั้นลดลง อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาการเติมน้ำมะพร้าวร่วมกับมันฝรั่งสกัดและน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตนกเหยี่ยว (*B. fascinator*) กลับให้ผลในทางตรงกันข้าม โดยพบว่าการเจริญและพัฒนาเกิดเป็นยอดใหม่มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตนกเหยี่ยวในอาหารสูตรที่เติมน้ำมะพร้าวในปริมาตรลดลง [39]

3.3 ผลของวัสดุปลูกต่อการเจริญและอัตราการรอดชีวิตของเอื้องหัวเข็มหมุดในสภาพเรือนเพาะชำ



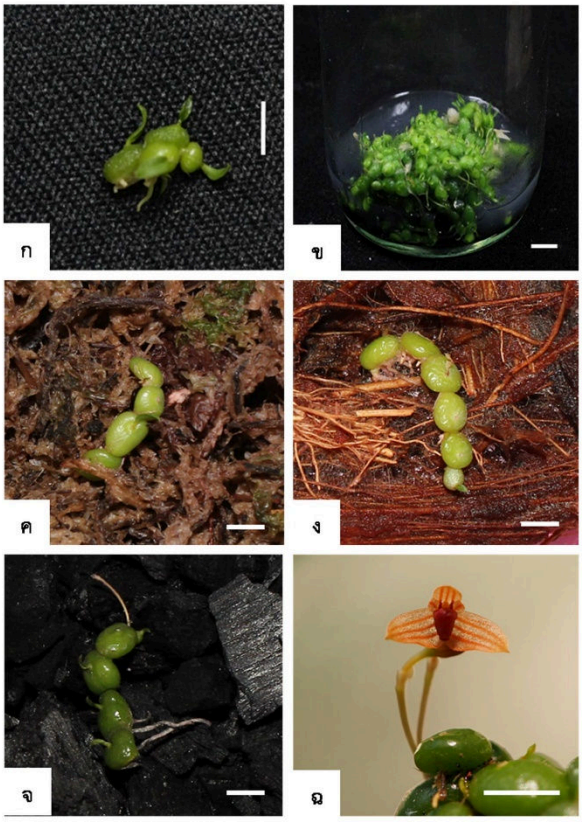
รูปที่ 1 อัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตหัวเข็มหมุด หลังจากย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำโดยบนวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ มะพร้าวสับ ถ่านทุบ และ สแฟกนัมมอส เป็นเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ 2 ผลของวัสดุปลูกต่ออัตราการออกดอกและการแตกหน่อใหม่ของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตหัวเข็มหมุด หลังจากย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำโดยบนวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ มะพร้าวสับ ถ่านทุบ และสแฟกนัมมอส เป็นเวลา 8 สัปดาห์

นำเอื้องหัวเข็มหมุดที่มีการสร้างลำลูกกล้วยเฉลี่ย 3 ลำ ออกปลูกบนวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน 3 วัสดุปลูก ได้แก่ ถ่านทุบ สแฟกนัมมอส และมะพร้าวสับ ย้ายปลูกในห้องที่มีการควบคุมอุณหภูมิ แสง และความชื้น เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเมื่อย้ายปลูกไปเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ต้นอ่อนเอื้องหัวเข็มหมุดที่ใช้ถ่านทุบเป็นวัสดุปลูกมีการเปลี่ยนแปลง โดยใบ และลำลูกกล้วยเริ่มมีการเปลี่ยนสีจากสีเขียวอ่อนเป็นสีเหลืองซีด ในขณะที่ต้นอ่อนที่ใช้กาบมะพร้าวสับละเอียดกับสแฟกนัมมอสเป็นวัสดุปลูกพบว่าต้นอ่อนยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงยังคงมีสีเขียวอยู่ และเมื่อปลูกเลี้ยงต่อเนื่องไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าลำลูกกล้วยของ

ต้นที่ปลูกในวัสดุปลูกที่เป็นถ่านทุบมีการตายเกิดขึ้น ในขณะที่ต้นอ่อนที่ปลูกในสแฟกนัมมอสและมะพร้าวสับยังคงมีอัตราการรอดชีวิตสูง ทั้งนี้เนื่องมาจากสมบัติการดูดซับน้ำของวัสดุปลูก แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน [40] โดยเฉพาะถ่านทุบที่มีความสามารถในการดูดซับน้ำหรือความชื้นได้น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสแฟกนัมมอสและมะพร้าวสับ จึงทำให้ต้นอ่อนได้รับความชื้นไม่เพียงพอ กอปรกับธรรมชาติของกล้วยไม้เอื้องหัวเข็มหมุดนั้น พบมีการกระจายพันธุ์ตามแหล่งธรรมชาติในป่าดิบเขาและป่าดิบชื้นที่สภาพ แวดล้อมมีความชื้นค่อนข้างสูง [4] จึงทำให้ต้นอ่อนเอื้องหัวเข็มหมุดที่ปลูกโดยใช้สแฟกนัมมอสและมะพร้าวสับซึ่งมีสมบัติดูดซับความชื้นได้ดีเป็นวัสดุปลูก เจริญเติบโตและพัฒนาต่อไปได้และมีอัตราการรอดชีวิตสูงนั่นเอง และจากการย้ายปลูกต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตหัวเข็มหมุดเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนที่ปลูกบนมะพร้าวสับมีเปอร์เซ็นต์การแตกหน่อใหม่สูงที่สุด คิดเป็น 40.0 % อีกทั้งต้นอ่อนบางต้นที่ย้ายปลูกมีการสร้างดอกได้ โดยต้นอ่อนที่ปลูกบนสแฟกนัมมอสมีแนวโน้มสามารถสร้างดอกใหม่ได้ดีที่สุดคิดเป็น 23.6 % (รูปที่ 1 - 3)



รูปที่ 3 การเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนสิงโตหัวเข็มหมุดที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับมันฝรั่งสกัด 50 กรัมต่อลิตร (ก) และการทวีจำนวนต้นอ่อนของสิงโตหัวเข็มหมุดเมื่อเลี้ยงต่อเนื่องไปเป็นระยะเวลา 20 สัปดาห์ (ข) โดยต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตหัวเข็มหมุดที่ย้ายปลูกบนวัสดุปลูกที่เป็นสแฟกนัมมอส (ค) มะพร้าวสับ (ง) และถ่าน (จ) สามารถเจริญเติบโตได้ดีและแตกหน่อใหม่ได้ อีกทั้งยังมีการสร้างดอกได้ (ฉ) เมื่อปลูกเลี้ยงไปเป็นเวลา 8 สัปดาห์

4. สรุปผลการทดลอง

ความสำเร็จในการขยายพันธุ์กล้วยไม้สิงโตหัวเข็มหมุดโดยใช้สูตรอาหาร VW ซึ่งเป็นสูตรที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้ต้นอ่อนสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่น และการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับมันฝรั่งสกัด 50 กรัมต่อลิตร เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีผลชักนำให้ต้นอ่อนเกิดการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเป็นหน่อใหม่ จำนวนใบ จำนวนราก และลำลูกกล้วยใหม่ดีที่สุด และในการย้ายปลูกต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตหัวเข็มหมุดโดยใช้มะพร้าวสับเป็นวัสดุปลูกนั้นมีความเหมาะสมและให้อัตราการรอดชีวิตดีที่สุด และชักนำให้ต้นอ่อนมีการแตกหน่อใหม่ได้ดี

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่จัดสรรงบประมาณรายได้ ปี 2560 เพื่อดำเนินโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการดำเนินการวิจัย รวมทั้งผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

5. รายการอ้างอิง

[1] Pedersen, H.A., Kurzweil, H., Suddee, S. and Cribb, P.J., 2011, Orchidaceae 1 (Cypripedioideae, Orchidoideae, Vanilloideae), Flora Thai. 12: 1-302.

[2] Santisuk, T., Chayamarit, K., Pooma, R. and Suddee, S., 2006, Thailand Red Data: Plants, Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning (ONEP), Thailand.

[3] IUCN, 2014, The IUCN Red List of Threatened Species Version 2014.2, Available source: http://www.iucnredlist.org, July 30, 2017.

[4] Nanakorn, W. and Watthana, S., 2008, Queen Sirikit Botanical Garden (Thai Native Orchids 1), Wanida Press, Chiang Mai, 312 p.

[5] Cribb, P.J., Kell, S.P., Dixon, K.W. and Barret, R.L., 2003, Orchid Conservation: A Global Perspective, pp. 1-24, In Dixon, K.W., Kell, S.P., Barrett, R.L. and Cribb, P.J. (Eds.), Orchid Conservation, Natural History Publications (Borneo), KotaKinabalu, Sabah.

[6] Churchill, M.E., Ball, E.A. and Arditti, J., 1972, Tissue culture of orchids II: Methods for root tips-orchid notes from U.C.I., Amer. Orchid Soc. Bull. 41: 726-730.

[7] Rustaei, M., Nazeri, S., Ghadimzadeh M. and Hemmati, S., 2009, Effect of phloroglucinol, medium type and some component on *in vitro* proliferation of dwarf rootstock of apple (*Mallus domestica*), Int. J. Agric. Biol. 11: 193-196.

[8] Halloran, S. and Adelberg, J., 2011, A macronutrient optimization platform for micropropagation and acclimatization: using turmeric (*Curcuma longa* L.) as a model plant, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 47: 257-273.

[9] Sokolov, R.S., Atanassova, B.Y. and Iakimova, E.T., 2014, Physiological

response of *in vitro* cultured *Magnolia* sp. to nutrient medium composition, J. Hort. Res. 22: 49-61.

[10] Chang, C. and Chang, W.C., 1998, Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. misericors, Plant Cell Rep. 17: 251-255.

[11] Roy, J. and Banergee, N., 2003, Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. oculatum Hk. F, Sci. Hort. 97: 333-340.

[12] Tokuhara, K. and Mii, M., 2003, Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant, 39: 635-639.

[13] Chen, J.T. and Chang, W.C., 2004, TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium*, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 79: 315-320.

[14] Malabadi, R.B., Mulgund, G.S. and Nataraja, K., 2004, Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, and endangered orchid using thidiazuron, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 76: 289-293.

[15] Shimura, H. and Koda, Y., 2004, Micro-propagation of *Cypripedium macranthos* var. rebunense through protocorm-like bodies derived from mature seeds, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 78: 273-276.

[16] Wu, I.F., Chen, J.T. and Chang, W.C., 2004, Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium* 'Gower Ramsey', Plant Cell Tiss. Org. Cult. 77: 107-109.

[17] Rahman, A.R.M.M., Islam, M.O., Pradhan, A.K.M.A. and Ichihashi, S., 2004, Effects of complex organic extracts on plantlet regeneration from PLBs and plantlet growth in the *Doritaenopsis* orchid, Jap. Agric. Res. Quart. 38: 55-59.

[18] Baque, M.A., Shin, Y.K., Elshmar, T., Lee, E.J. and Paek, K.Y., 2011, Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the microporpagation of *Calanthe* hybrids ('Bukduseong' × 'Hyesung' and 'Chunkwang' ×'Hyesung'), Aust. J. Crop Sci. 5: 1247-1254.

[19] Kaur, S. and Bhutani, K.K., 2012, Organic growth supplements stimulant for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) SW, Hort. Sci. 39: 47-52.

[20] Chen, B., Trueman, S.J., Li, J., Li, Q., Fan, H. and Zhang, J., 2014, Micropropagation of the endangered medicinal orchid, *Dendrobium officinale*, Life Sci. 11: 526-530.

[21] Bhadra, S.K., Barua, H. and Hossain, M.M., 2004, *In vitro* germination and rapid micro-propagation of *Bulbophyllum lilacinum* Ridley, Bangl. J. Bot. 33: 103-107.

[22] Than, M.M.M., Pal, A. and Jha, S., 2009, *In vitro* flowering and propagation of

Bulbophyllum auricomum Lindl., the royal flower of Myanmar, Acta Hort. 829: 105-111.

[23] Pakum, W., Wattana, S., Srimuang, K. and Kongbangkerd, A., 2016, Influence of medium component on *in vitro* propagation of Thai's endangered orchid: *Bulbophyllum nipondhii* Seidenf, Plant Tiss. Cult. Biotechnol. 25: 37-46.

[24] Kongbangkerd, A., Watthana, S. and Srimuang, K., 2017, Influence of organic supplements on growth and development of *in vitro* shoots of *Bulbophyllum dhaninivatii* Seidenf, Appl. Mech. Mat. 855: 42-46.

[25] Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant 15: 473-497.

[26] Vacin, E.F. and Went, F.W., 194, Some pH changes in nutrient solution, Bot. Gazette 110: 605-613.

[27] Knudson, L., 1946, A new nutrient solution for the germination of orchid seed, Amer. Orchid Soc. Bull. 15: 214-217.

[28] Dutra, D., Johnson, T., Kauth, P., Stewart, S., Kane, M. and Richardson, L., 2008, Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 94: 11-21.

[29] ธีรภัทร เหลืองศุภบูลย์, 2549, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สิงโตประหลาด, ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก

[30] ชัยชาญ มณีรัตนรุ่งโรจน์, ศรีสังวาลย์ ลายวิเศษกุล และอนุพันธ์ กงบังเกิด, 2011, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สิงโตประหลาด, ว.วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร 7(2): 45-59.

[31] Raghavan, V. and Torrey, J.G., 1964, Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid, *Cattleya*, Am. J. Bot. 51: 264-274.

[32] van Waes, J.M. and Debergh, P.C., 1986, *In vitro* germination of some Western European orchids, Physiol. Plant 67: 253-261.

[33] Aktar, S., Nasiruddin, K.M. and Hossain, K., 2008, Effects of different media and organic additives nteraction on in vitro regeneration of *Dendrobium* orchid, J. Agric. Rural Dev. 6: 69-74.

[34] Yong, J.W.H., Ge, L., Ng, Y.F. and Tan, S.N., 2009, The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water, Molecules 14: 5144-5164.

[35] Bartova, V. and Barta, J., 2009, Chemical composition and nutritional value of protein concentrates isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) fruit juice by precipitation with ethanol or ferric chloride, J. Agric. Food Chem. 57: 9028-9034.

[36] Islam, M., Aktar, M. and Pradhan, A.K.M.A., 2011, Effect of potato extract on *in vitro*

seed germination and seedling growth of local *Vanda roxburgii* orchid, J. Bangl. Agric. Univ. 9: 211-215.

[37] อารีรัตน์ ภู่สอน, 2556, ผลสารประกอบอินทรีย์และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีผลต่อการเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตธานีนิวัต (*Bulbophyllum dhaninivatii* Seidenf.), ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก

[38] ธันว์ ขำทอง, 2546, การขยายพันธุ์กล้วยไม้สิงโตก้ามปูแดงและสิงโตเครายาวโดยการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

[39] อานนท์ พึ่งอบ, 2555, องค์ประกอบของอาหารต่อการเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตนกเหยี่ยว, ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก

[40] มุกดา สุขสวัสดิ์, 2547, วัสดุปลูกไม้ดอกไม้ประดับ, สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.