NU Science Journal 2010; 7(1):124 - 139

รูปแบบการพัฒนาของต้นอ่อนและผลของฮอร์โมนต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ดิน *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. ในสภาพปลอดเชื้อ

อนุพันธ์ กงบังเกิด[1*] ธนากร วงษศา[2] วัชรศักดิ์ มาเกิด[1] และคงศักดิ์ พร้อมเทพ[1]

Pattern of seedling development and effect of hormones on morphological changes of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. *in vitro*

Anupan Kongbangkerd[1*], Thanakorn Wongsa[2], Wacharasak Makoed[1] and Kongsak Promthep[1]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

[2]โปรแกรมชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร กำแพงเพชร

*Corresponding author. E-mail: anupank73@hotmail.com

บทคัดย่อ

จากการนำเมล็ดกล้วยไม้ดิน *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. มาเพาะในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร Vacin and Went (VW) 1949 ที่ดัดแปลงโดยเติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร (mg/l) มันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตร และน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร พบว่า เมล็ดมีกระบวนการงอกแตกต่างกัน 2 รูปแบบ คือ เมล็ดงอกและสร้างโปรโตคอร์ม แล้วเจริญยืดยาวออกพัฒนาเป็นเหง้า (rhizome) แทงลงสู่อาหาร จากนั้นจึงสร้างปลายเหง้า (rhizome tip) เจริญย้อนกลับขึ้นมาบนผิวอาหาร และพัฒนาเป็นต้นอ่อน และเมล็ดงอกและสร้างโปรโตคอร์มที่ยืดยาวออกและแตกแขนง rhizome ใหม่ แล้วเจริญเฉพาะบนผิวอาหาร และจากการเลี้ยงชิ้นส่วนเหง้า (rhizome section) บนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) 1962 ที่เติม BA, TDZ และ Kinetin ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนเหง้าที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดการสร้างแขนง rhizome ใหม่มากที่สุด 2.67 แขนงต่อชิ้นส่วน และในการเลี้ยงชิ้นส่วน rhizome tip บนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วน rhizome tip เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดการสร้างแขนง rhizome ใหม่มากที่สุด 2.68 แขนงต่อชิ้นส่วน และยังสามารถชักนำให้เกิดการสร้างยอดใหม่ได้มากที่สุด 2.25 ยอดต่อชิ้นส่วน และต้นอ่อนขนาดต่างๆ ที่เกิดขึ้น สามารถย้ายปลูกในสภาพแวดล้อมปกติในเรือนเพาะชำ โดยมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 80 %

คำสำคัญ: *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ฮอร์โมน

Abstract

In vitro seed culture of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. was performed on Vacin and Went (1949) medium supplemented with 150 ml/l coconut water, 50 g/l potato and 20 g/l sucrose. The results showed that two types of seed germination were investigated. In the first, the rhizome tip derived from protocorms, curved downward and grew positive orthogravitropically into the culture medium then regenerated into shoot tip and grew reversely back to the surface of medium. In the second, the rhizomes continued their earlier diagravitropic movement above the medium surface. The rhizome sections were also transferred to culture on Murashige and Skoog (MS) 1962 medium supplemented with different concentrations of BA, TDZ and Kinetin at 0, 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/l for 12 weeks. The results showed that the highest number of branches per rhizome (2.67) was obtained when cultured on the medium with 0.1 mg/l TDZ. The rhizome tips were also cultured on MS (1962) medium with different concentrations of NAA at 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/l for 12 weeks. The results indicated that the highest number of branches per rhizome (2.68) and regenerated shoots (2.25) were obtained when cultured on the medium with 0.5 mg/l NAA. However, different sizes of young plantlets grew well in the greenhouse with more than 80% of survival.

Keywords: *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., tissue culture, hormones

บทนำ

กล้วยไม้จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว อยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Family Orchidaceae) ที่นับว่าเป็นวงศ์ใหญ่ที่สุดของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เนื่องจากมีอยู่ไม่ต่ำกว่า 600 สกุล (genus) ประมาณ 25,000 ชนิด (species) กล้วยไม้มีรูปร่างลักษณะของราก ต้น ใบ และดอก แตกต่างกันไปหลายรูปแบบ พบกล้วยไม้ขึ้นอยู่ในที่หลายแห่ง ทั้งดิน โขดหินหรือบนต้นไม้ กล้วยไม้มีการกระจายพันธุ์ไปทั่วโลก ทั้งในแถบร้อน อบอุ่น และหนาวเย็นขนาดเป็นน้ำแข็งในบางฤดูก็ยังมีกล้วยไม้อาศัยอยู่ แหล่งที่พบกล้วยไม้มากที่สุดคือแถบทวีปเอเชีย และประเทศไทยนับว่าเป็นแหล่งที่มีกล้วยไม้ป่ามากแหล่งหนึ่ง (Nanakorn and Indhamusika, 2000) ซึ่งจากการศึกษาสำรวจพืชวงศ์กล้วยไม้ บริเวณพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืช อพ.สธ.-เขื่อนภูมิพล อำเภอสามเงา จังหวัดตาก พบว่า จำนวนกล้วยไม้ที่สำรวจพบนั้น มีความหลากหลายน้อย แต่มีกล้วยไม้บางชนิดที่สำรวจพบเป็นปริมาณมาก คือ กล้วยไม้ดิน *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. (อนุพันธ์ และคณะ, 2551) อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่ากล้วยไม้ดินดังกล่าวจะยังคงมีการสำรวจพบ

ในปริมาณมากก็ตาม แต่ปัจจัยสภาพแวดล้อมบางประการที่เปลี่ยนแปลงไป อาจส่งผลกระทบให้ปริมาณกล้วยไม้ดินดังกล่าวลดลงได้ และจากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการงอกของเมล็ด รวมถึงพัฒนาการของต้นอ่อนและปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของกล้วยไม้ดิน *G. densiflorum* (Lam.) Schltr. ในสภาพปลอดเชื้อ ยังมีรายงานการศึกษาไม่มากนัก ดังนั้น การทดลองในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากระบวนการงอกของเมล็ด พัฒนาการของต้นอ่อน และฮอร์โมนที่มีผลต่อการเจริญพัฒนาของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ดิ *G. densiflorum* (Lam.) Schltr.อันจะเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

สำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้บริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติต่างๆ ในพื้นที่เขื่อนภูมิพล จังหวัดตาก ตั้งแต่เดือนมีนาคม-กันยายน 2550 บันทึกข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและตรวจสอบหาสกุลและชนิด จากนั้นนำมาทำการศึกษากระบวนการงอกและพัฒนาการของต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อดังการทดลองต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษากระบวนการงอกของเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อแบบ asymbiotic germination โดยนำฝักอายุประมาณ 30-40 วัน มาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 15 % โดยปริมาตร นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง จากนั้นทำการผ่าฝักตามแนวขวางออกเป็นสองส่วน เขี่ยเมล็ดกล้วยไม้ลงเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งดัดแปลงสูตร Vacin and Went (VW) 1949 ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตรต่อลิตร (ml/l) น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร (g/l) น้ำต้มมันฝรั่ง 150 g/l และผงวุ้น 8 g/l ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารมีค่าประมาณ 5.2 วางเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการควบคุมความเข้มแสง 40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ ซึ่งได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส สังเกตและบันทึกผลกระบวนการงอกของเมล็ดตั้งแต่เริ่มงอกจนถึงเป็นต้นใหม่

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของฮอร์โมนไซโตไคนินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วน rhizome section โดยนำ rhizome ที่งอกออกมาจากเมล็ดมาตัดให้เป็นชิ้นส่วนที่มีความยาวขนาดประมาณ 1.0 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งดัดแปลงสูตร MS (1962) ที่เติมน้ำตาล 30 g/l และเติมฮอร์โมนไซโตไคนินต่างๆ ได้แก่ BA, Kinetin และ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/l เลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของฮอร์โมน NAA ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วน rhizome tip โดยนำ rhizome tip ที่งอกออกมาจากเมล็ดมาตัดให้มีความยาวขนาดประมาณ 1.0 เซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมน้ำตาล 30 g/l และเติมฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/l เลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง

การทดลองที่ 4 ศึกษาผลการย้ายปลูกและอัตราการรอดชีวิตในสภาพแวดล้อมปกติ โดยนำต้นอ่อนที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาดความสูงประมาณ 2-3 เซนติเมตร และกลุ่มตาข้างที่เจริญเป็นส่วน rhizome tip จำนวน 2-3 rhizome tips ในสภาพปลอดเชื้อ ออกปลูกในวัสดุปลูกที่ประกอบด้วย ทราย แกลบดำ และดินผสม อัตราส่วน 1:1:1 วางเลี้ยงในเรือนเพาะชำ รดน้ำวันละ 2 ครั้ง เช้า และเย็น บันทึกผลการเจริญเติบโต และอัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนหลังจากปลูกเลี้ยงไปเป็นเวลา 12 สัปดาห์

นำข้อมูลจากการบันทึกมาวิเคราะห์ผลทางสถิติและวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษากระบวนการงอกของเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างฝักกล้วยไม้ดิน *G. densiflorum* (Lam.) Schltr. มาศึกษากระบวนการงอกในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำเมล็ดจากฝักที่มีอายุ 30-40 วัน มาเพาะบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW (1949) ที่ดัดแปลงโดยเติมน้ำมะพร้าว 120 ml/l น้ำตาลซูโครส 20 g/l และมันฝรั่ง 50 g/l พบว่า เมื่อทำการเลี้ยงเมล็ดไปได้ 2-3 สัปดาห์ เมล็ดจะมีการบวมขยายขนาดออก และเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนคล้ายโปรโตคอร์มขนาดเล็กจำนวนมาก หลังจากนั้น เมล็ดจะเริ่มขยายขนาดต่อไป จนพัฒนาเกิดเป็นโครงสร้างต่างๆ และมีการสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า rhizome tip เจริญแทงลงสู่อาหารในแนวดิ่งตามแรงโน้มถ่วงของโลก ส่วนผิวด้านบนที่เจริญอยู่เหนือส่วนของอาหารจะมีการสร้างขนบางๆ สีขาวฟูขึ้นมามีลักษณะคล้ายกับสำลี ปกคลุมเกือบทั่วทั้งชิ้นส่วน เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 4-5 สัปดาห์ (รูป 1ก) จากนั้น โครงสร้าง rhizome tip ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับส่วนของ radicle ที่งอกออกจากเมล็ด จะมีการแตกตายอดและสร้างส่วนของ shoot tip ขึ้นมา และสามารถสังเกตเห็นลักษณะโครงสร้างคล้ายใบขนาดเล็ก ที่แทงออกมาจากส่วนปลายของ rhizome tip และค่อยๆ เจริญย้อนกลับขึ้นมาเหนือผิวของอาหารในแนวตั้ง เมื่อเวลาผ่านไป 6-7 สัปดาห์ (รูป 1ข) ต่อมาใบที่ปลายยอดจะเริ่มมีการขยายขนาดและเจริญ และพัฒนาเกิดเป็นยอดใหม่ที่สมบูรณ์เหนืออาหาร เมื่อเวลาผ่านไป 8-10 สัปดาห์ โดยตรงส่วนโคนต้นนั้นจะมีเริ่มการบวมพองออก มีลักษณะคล้ายลำต้นส่วนสะสมอาหาร แล้วจึงมีการสร้างรากที่แท้จริงขึ้นมา ซึ่งรากมีลักษณะอวบสั้น สีขาว ไม่มีขนราก ตรงบริเวณใต้โคนต้นส่วนที่บวมพองออกมา ซึ่งใช้ระยะเวลาทั้งสิ้นประมาณ 12 สัปดาห์ (รูป 1ค)

รูป 1 (ก-ค) ระยะพัฒนาการต่างๆ ของเมล็ดที่เจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยเมล็ดที่พัฒนาเป็นโครงสร้าง rhizome tip แทงลงสู่อาหารในแนวดิ่ง ที่เวลาประมาณ 5 สัปดาห์ (1ก) และเมล็ดที่พัฒนาเป็นโครงสร้าง rhizome tip ที่เจริญย้อนกลับขึ้นมาเหนืออาหาร ที่เวลาประมาณ 7 สัปดาห์ (1ข) และพัฒนาการต่างๆ ของเมล็ดเจริญเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ (1ค)

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของฮอร์โมนไซโตไคนินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วน rhizome section

จากการศึกษาถึงผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา พบว่า rhizome section มีการตอบสนองต่อฮอร์โมนไซโตไคนินที่ความเข้มข้นต่างๆ แตกต่างกันออกไป โดยเมื่อเลี้ยงชิ้นส่วน rhizome section ผ่านไปประมาณ 2 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ มีการเจริญและพัฒนาโดยมีการบวมพองออกโดยเฉพาะบริเวณรอยตัด และพบว่าบางชิ้นส่วนเริ่มมีสีน้ำตาล (browning) บนผิวชิ้นส่วน และมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนในรูปแบบที่แตกต่างกัน และเมื่อเลี้ยงไปได้ประมาณ 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่ไม่เติมฮอร์โมนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลประมาณ 50 % ในขณะที่ชิ้นส่วนบนอาหารสูตรอื่นๆ เริ่มมีการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล ในอัตราที่น้อยกว่า และมีการสร้างโครงสร้างตุ่มโปรโตคอร์มขึ้นตามบริเวณรอยตัด มีลักษณะที่เรียกว่า globular shape และโปรโตคอร์มบางส่วนที่เกิดขึ้นดังกล่าว มีการขยายขนาดบวมออกเป็นโครงสร้างคล้ายปลายยอด ที่เจริญออกมาจากตาเหง้า ที่เรียกว่า rhizome tip หลังจากนั้นอีกประมาณ 2-3 สัปดาห์ จะพบว่า ชิ้นส่วนที่มีการสร้างโครงสร้างที่คล้าย rhizome tip จะมีการพัฒนายืดยาวออก และเจริญยื่นส่วนปลายแทงลงในอาหาร โดยสังเกตพบว่า ในระหว่างที่มีการยืดยาวออกของ

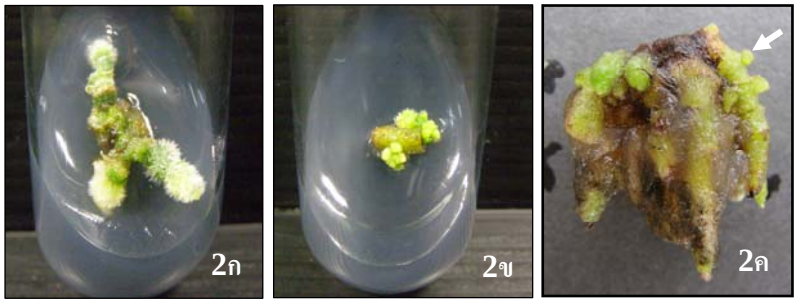
rhizome tip นั้น สัณฐานวิทยาภายนอกของส่วนที่ยืดยาวออกมานั้น มีลักษณะเป็นข้อปล้องสั้นๆ โดยที่ตามบริเวณข้อของ rhizome tip ของบางชิ้นส่วนจะมีการสร้าง primary rhizome tip ขนาดเล็กขึ้นมาใหม่ และแตกแขนงออกไป ในลักษณะที่สลับกันซ้าย-ขวา ตามความยาวของ rhizome tip โดยที่ rhizome tip ที่เจริญออกมาใหม่นั้น อาจมีการสร้าง rhizome tip ขึ้นบน rhizome tip ใหม่ที่แตกออกมาอีก เรียกว่า secondary rhizome tip เมื่อเวลาผ่านไป ประมาณ 9-10 สัปดาห์ และเมื่อ rhizome ที่งอกออกมาแทงลงไปในอาหารกึ่งแข็งดังกล่าวจนมีความยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร แล้ว จะมีการงอกย้อนกลับขึ้นมาเหนือผิวบนอาหาร โดยในระหว่างที่ rhizome tip มีการงอกย้อนกลับขึ้นมานั้น จะมีการสร้างส่วนปลายยอดที่มีลักษณะแหลม คล้ายโครงสร้างใบจริงแรกเกิดขึ้น และมีการเจริญและพัฒนาเป็นใบจริงในที่สุด ทั้งนี้ จากการสังเกตพบว่า rhizome tip ที่งอกเหนือผิวอาหารนั้น มีการเจริญยืดยาวออกเหมือนกับ rhizome tip ที่เกิดขึ้นใต้อาหาร แต่ rhizome tip ที่งอกเหนือผิวของอาหารมีการสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายกับขนรากขึ้นปกคลุม rhizome tip ที่งอกออกมา ซึ่งจะไม่พบลักษณะดังกล่าวใน rhizome tip ที่งอกลงไปในอาหาร และจากการสังเกตเพิ่มเติมพบว่า ชิ้นส่วนที่ไม่มีการสร้าง rhizome tip มักมีการสร้างโครงสร้างคล้ายโปรโตคอร์มขึ้นมาแทน และเกาะกันเป็นกลุ่มอยู่บริเวณเหนือผิวอาหาร ซึ่งที่ผิวโปรโตคอร์มนั้น จะมีการสร้างโครงสร้างคล้ายขนราก ขึ้นกระจายปกคลุมผิวโปรโตคอร์มบางๆ เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนไปจนครบ 12 สัปดาห์

และจากผลการทดลอง พบว่า ชิ้นส่วน rhizome sections ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ มีพัฒนาการที่แตกต่างกันออกไป โดยชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่ไม่เติมฮอร์โมน จะมีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเพียงเล็กน้อย และมีเปอร์เซ็นต์การเกิด browning สูงที่สุด 86.96 % และชิ้นส่วนตายไปในที่สุด ในขณะที่ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA นั้น มีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อฮอร์โมนเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA และยังให้ผลในการลดอัตราการเกิด browning เมื่อความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้นอีกด้วย ในขณะที่ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม Kinetin และ TDZ นั้นจะมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนในทางตรงกันข้ามกล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของ Kinetin และ TDZ มากขึ้นแล้ว จะมีแนวโน้มทำให้ชิ้นส่วนเกิด browning เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย แต่มีผลทำให้ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อฮอร์โมนลดลง ซึ่งจากการทดลองพบว่า ชิ้นส่วน rhizome sections ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม TDZ 0.1 mg/l จะมีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองสูงที่สุด และมีการสร้าง rhizome tip ขึ้นมาใหม่จากชิ้นส่วนเริ่มต้นมากที่สุด 2.67 ต้นต่อชิ้นส่วน ดังแสดงในตาราง 1 และรูป 2(ก-ค)

ตาราง 1 ผลของฮอร์โมน BA, Kinetin และ TDZ ต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วน rhizome section กล้วยไม้ดิน *G. densiflorum* (Lam.) Schltr. ที่เวลา 12 สัปดาห์

Hormones (mg/l)		% Explant response	% Explant browning	No. of branches/rhizome
No hormones		13.04	86.96	0.00 ± 0.00
BA	0.1	16.00	84.00	0.00 ± 0.00
	0.5	20.00	80.00	2.25 ± 2.25[a]
	1.0	30.43	69.57	1.13 ± 0.89[ab]
	2.0	33.33	66.67	1.29 ± 0.61[ab]
Kinetin	0.1	70.59	29.41	1.80 ± 0.92[ab]
	0.5	60.00	40.00	2.64 ± 1.09[a]
	1.0	45.00	55.00	1.22 ± 0.22[ab]
	2.0	42.11	57.89	0.00 ± 0.00
TDZ	0.1	80.00	20.00	2.67 ± 0.72[a]
	0.5	40.91	59.09	1.11 ± 0.56[ab]
	1.0	36.84	63.16	0.71 ± 0.71[b]
	2.0	27.27	72.73	0.50 ± 0.50[b]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Duncan New Multiple Range Test (DMRT)



รูป 2(ก-ค) การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของ rhizome ที่เลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS (1962) ที่เติมฮอร์โมน TDZ ความเข้มข้น 0.1 mg/l เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยชิ้นส่วน rhizome section มีการแตกแขนงออกมาเหนือผิวอาหาร (2ก) บางชิ้นส่วนมีการสร้างโปรโตคอร์มระยะที่เป็น globular shape ขึ้นบนชิ้นส่วน (2ข) และลักษณะการแตกแขนงของ secondary rhizome tip ใหม่ (ลูกศรชี้) จากชิ้นส่วน primary rhizome tip (2ค)

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของฮอร์โมน NAA ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วน rhizome tip

จากการทดลองนำ rhizome tip วางเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งดัดแปลงสูตร MS (1962) ที่เติมฮอร์โมน NAA ที่มีระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ชิ้นส่วน rhizome tip มีการบวมพองขยายขนาดออกและมีการยืดยาว และส่วนปลาย rhizome เจริญลงสู่อาหารในแนวดิ่ง บนอาหารทุกสูตร โดยเมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงบางชิ้นส่วน บนอาหารบางสูตรเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และมีบางชิ้นส่วนที่เริ่มมีการ สร้าง rhizome tip ขึ้นมาใหม่จากชิ้นส่วนเริ่มต้น และยืดยาวออกมา แล้วเจริญลงในอาหารในแนวดิ่ง เช่นเดียวกัน โดยชิ้นส่วนที่มีการสร้าง rhizome tip ขึ้นมาใหม่นั้น ยืดยาวออก และสร้าง rhizome tip เพิ่มมากขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ ชิ้นส่วนบางชิ้นที่เลี้ยงบนอาหารบางสูตรจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดย พบว่า บริเวณปลาย rhizome tip จะมีการพัฒนาโครงสร้างที่เหมือนปลายยอดของต้นอ่อนเกิดขึ้น และมีการเจริญย้อนกลับขึ้นมาบนผิวอาหาร และพัฒนาเกิดเป็นต้นอ่อนที่โคนต้นมีการบวมพองออกเหมือนลักษณะของหัวเผือก (cormlet) ขนาดเล็กเกิดขึ้น และลักษณะโครงสร้างคล้ายหัวเผือกดังกล่าว จะเจริญขยายขนาดขึ้นตามขนาดของต้นอ่อนที่โตขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป 8-9 สัปดาห์ มีการสร้างรากขึ้นตามบริเวณโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายหัวเผือกดังกล่าว จำนวน 2-5 ราก ซึ่งรากมีขนาดใหญ่ สีขาว ถึง สีน้ำตาลอ่อน มีความยาวเฉลี่ย 0.3–4.5 เซนติเมตร และเมื่อทำการเลี้ยงจนครบ 12 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วน rhizome tip มีการตอบสนองต่อฮอร์โมน NAA ที่แตกต่างกันออกไป ดังตาราง 2 ซึ่งพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NAA มีแนวโน้มทำให้ชิ้นส่วนที่เลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมากขึ้นตามลำดับด้วย และจากผลการทดลอง พบว่า rhizome tip ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้นต่างๆ นั้น มีแนวโน้มทำให้ความยาวของ rhizome tip ที่เกิดขึ้นใหม่ลดลง ตามความเข้มข้นของ NAA ที่เพิ่มขึ้น โดย rhizome tip ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่ไม่เติมฮอร์โมน NAA จะให้ค่าความยาวของ rhizome tip ที่เกิดขึ้นใหม่เฉลี่ยสูงสุด 10.80 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตาม ชิ้นส่วน rhizome tip ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม NAA 0.5 mg/l จะให้จำนวน rhizome tip ที่แตกออกมาจากชิ้นส่วนต้นมากที่สุด 2.68 rhizome tips ต่อชิ้นส่วน และพบว่า rhizome tip ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรควบคุมที่ไม่เติมฮอร์โมน จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่สูงสุด 97 % ในขณะที่ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม NAA 0.5 mg/l จะชักนำให้มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ย และจำนวนใบ มากที่สุด 2.25 ยอด และ 1.46 ใบ ตามลำดับ (ตาราง 2) อย่างไรก็ตาม เมื่อปริมาณของ NAA เพิ่มมากขึ้น มีแนวโน้มทำให้ความยาวยอดเฉลี่ยของต้นอ่อนที่เกิดขึ้นใหม่นั้น ลดลงตามความเข้มข้นของ NAA ที่เพิ่มขึ้นอีกด้วย สำหรับสัณฐานวิทยาของ secondary rhizome tip ที่เป็นจุดกำเนิดยอดใหม่ที่เกิดขึ้น และต้นใหม่ที่เกิดขึ้นจากชิ้นส่วน rhizome tip ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้นต่างๆ นั้น

ตาราง 2 ผลของฮอร์โมน NAA ต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาและการงอกกลับเป็นต้นใหม่ของ rhizome tips กล้วยไม้ดิน *G. densiflorum* (Lam.)Schltr. ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมฮอร์โมน NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

NAA hormone (mg/l)	% Explant browning	% Explant response	No. of branches per rhizome	Mean length of rhizome (mm)	% Rhizome producing shoot	No. new shoots	Shoot length (mm)	No. leave
No hormone	12	86	1.13 ± 0.27^{b}	10.80 ± 0.13^{a}	97	1.35 ± 0.35^{b}	8.70 ± 0.47^{a}	1.05 ± 0.35^{ab}
0.1	4	86	1.71 ± 0.24^{ab}	9.90 ± 0.13^{a}	94	1.42 ± 0.13^{ab}	8.50 ± 0.37^{a}	1.27 ± 0.24^{a}
0.2	10	88	1.95 ± 0.36^{ab}	9.20 ± 0.16^{a}	90	1.56 ± 0.47^{ab}	7.52 ± 0.24^{ab}	1.20 ± 0.20^{a}
0.5	12	96	2.68 ± 0.66^{a}	8.40 ± 0.16^{a}	90	2.25 ± 0.12^{a}	7.68 ± 0.10^{ab}	1.46 ± 0.22^{a}
1.0	20	78	1.57 ± 0.31^{ab}	8.30 ± 0.10^{a}	86	1.69 ± 0.31^{ab}	6.34 ± 0.60^{b}	1.20 ± 0.68^{a}
2.0	22	76	1.33 ± 0.27^{ab}	6.80 ± 0.13^{b}	82	1.30 ± 0.80^{b}	5.41 ± 0.29^{b}	0.84 ± 0.47^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Duncan New Multiple Range Test (DMRT)

การทดลองที่ 4 ศึกษาผลการย้ายปลูกและอัตราการรอดชีวิตต้นอ่อนในสภาพแวดล้อมปกติ

เมื่อนำต้นอ่อนขนาดต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากเพาะเลี้ยง ได้แก่ ต้นอ่อนที่มีขนาดความสูงประมาณ 1-2 ซม. (ขนาดเล็ก), 2-4 ซม. (ขนาดปานกลาง) และสูงกว่า 4 ซม. (ขนาดใหญ่) และมีราก จำนวน 1-3 รากต่อต้น ย้ายออกปลูกในสภาพแวดล้อมปกติภายในเรือนเพาะชำ โดยมีการควบคุมความชื้น และแสง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ต้นอ่อนทุกขนาดมีการเจริญเติบโตดี มีการเจริญและพัฒนาสร้างโครงสร้างใบ และรากเกิดขึ้น และมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 80 % โดยพบว่า ต้นอ่อนที่มีขนาดใหญ่มีอัตราการอดชีวิตสูงที่สุด คิดเป็น 100 % ในขณะที่ ต้นอ่อนขนาดปานกลาง และต้นอ่อนขนาดเล็ก มีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็น 92% และ 84 % ตามลำดับ ดังแสดงในรูป 3(ก-ค)

รูป 3(ก-ค) ลักษณะของกลุ่มของต้นอ่อน (3ก) ที่ย้ายปลูกในกระถางภายในเรือนเพาะชำ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (3ข) ซึ่งสามารถสังเกตเห็นโครงสร้างโคนต้นอ่อนที่มีลักษณะคล้ายหัวเผือก (cormlet) และมีรากขนาดใหญ่งอกออกมา (3ค)

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษากระบวนการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดิน *G. densiflorum* (Lam.) Schltr. ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เมล็ดสามารถพัฒนาเกิดเป็นโครงสร้างที่มีรูปร่างกลมขนาดเล็ก มีลักษณะเป็น globular shape โดยกระบวนการ somatic embryogenesis หลังจากเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 6 สัปดาห์ โครงสร้างกลมขนาดเล็ก สีเขียวอ่อน ที่ถูกสร้างขึ้นมานั้น จะเกิดเป็นโปรโตคอร์ม และพัฒนาต่อเนื่องเป็นโครงสร้างของกลุ่ม rhizome ที่มีขนฟูสีขาวปกคลุม ซึ่งพบลักษณะดังกล่าวเช่นเดียวกับรายงานของ Bhadra และ Hossain (2003) ที่ศึกษาถึงกระบวนการงอกของเมล็ดและการขยายพันธุ์กล้วยไม้ดิน *G. densiflorum* (Lam.) Schltr. ในสภาพปลอดเชื้อ และพบว่า เมล็ดที่เพาะบนอาหารสูตรจะมีการ

พัฒนา และเจริญเป็นโครงสร้าง rhizome โดยไม่เกิดเป็นต้นอ่อนโดยตรง แต่จะสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะเป็น globular shape นั้น จากนั้นจึงจะเจริญเป็น rhizome และพัฒนาเป็นต้นอ่อนใหม่ และผลจากการศึกษารูปแบบการเจริญและพัฒนาของกลุ่ม rhizome ที่งอกจากโปรโตคอร์ม ซึ่งพัฒนามาจากโครงสร้าง globular shape ของกล้วยไม้ดิน *G. densiflorum* (Lam.) Schltr. ยังสอดคล้องกับรายงานของ Sheelavantmath และคณะ (2000) และ Roy และ Banerjee (2002) ที่พบว่าการพัฒนาการเกิด rhizome จากโปรโตคอร์ม สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 รูปแบบ คือ แบบที่ rhizome เจริญแทงลงไปในอาหารแนวดิ่งตามแรงโน้มถ่วงโลก ที่เรียกว่า positive orthogravitropically (POG) และแบบที่เจริญตามแนวนอนอยู่บนผิวของอาหาร ที่เรียกว่า diagravitropic (DG) รวมไปถึงรายงานของ Kunthonluxsamee และคณะ (2005) ที่ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเมล็ดและการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดิน *Spathoglottis plicata* Bl. พบว่า เมล็ดกล้วยไม้ดิน *S. plicata* Bl. มีการเจริญเติบโตเป็นโปรโตคอร์มและยืดยาวออกภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน เกิดเป็นกลุ่มเซลล์เดี่ยวที่มีขนอ่อนปกคลุมอยู่บริเวณด้านล่างของฐานโปรโตคอร์มและเกิดกาบใบขึ้น ต่อมาโปรโตคอร์มจะมีการพัฒนาเกิดเหง้า (rhizome) ขึ้นที่ข้อและตาข้าง แล้วตาข้างจึงเจริญพัฒนาไปเป็นยอด รวมไปถึงผลการวิจัยของ Nayak และคณะ (1998) ที่ศึกษาถึงผลของฮอร์โมนต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของ rhizome ที่พัฒนามาจากโปรโตคอร์มของเมล็ดกล้วยไม้ *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. ซึ่งพบว่า การพัฒนาของเมล็ดนั้น จะเจริญและพัฒนากลายเป็นโปรโตคอร์ม และมีการแปรสภาพเกิดเป็น rhizome ได้ในที่สุด และจากการสังเกตผลการทดลองในเวลาต่อมาพบว่า ต้นอ่อนที่เกิดขึ้นจากส่วนของ rhizome tip ที่พัฒนาขึ้นมานั้น มีการสร้างส่วนสะสมอาหารที่โครงสร้างคล้ายหัวเผือกขนาดเล็ก (cormlet) บริเวณส่วนโคนของต้นที่ซึ่งติดกับส่วนของ rhizome โดยมีการสร้างรากขนาดใหญ่ สีขาวขุ่น จำนวน 2-3 ราก มีความยาวประมาณ 2-5 เซนติเมตร ซึ่งกระบวนการในการพัฒนาของต้นอ่อนจนเกิดเป็น cormlet นั้นเหมือนกับกระบวนการเจริญและพัฒนาการเกิดเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้ดิน *Aplectrum hyemale* (Muhl. ex Willd.) Torr. ที่รายงานโดย Lauzer และคณะ (2007) และยังมีรายงานวิจัยหลายฉบับที่กล่าวถึงผลของฮอร์โมนไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดต้นจากการเลี้ยงชิ้นส่วน rhizome (Chung *et al*, 1985; Hasegawa and Goi, 1987; Paek *et al*, 1990; Paek and Kozai, 1998)

จากการศึกษาผลของฮอร์โมน BA, TDZ และ Kinetin ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วน rhizome section ที่ตัดแยกมาจาก rhizome tip ของกล้วยไม้ดิน *G. densiflorum* (Lam.) Schltr. พบว่า rhizome section ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ นั้น มีการตอบสนองต่อฮอร์โมนไซโตไคนินที่แตกต่างกันออกไป โดยเมื่อเลี้ยงไปประมาณ 2 สัปดาห์ จะเห็นว่า ชิ้นส่วนจะมีการเจริญและพัฒนาและบวมพองออกโดยเฉพาะบริเวณรอยตัด และบางชิ้นส่วนเริ่มมีสีน้ำตาลบนผิวชิ้นส่วน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนจากสีเขียวกลายเป็นสีน้ำตาลนั้น เกิดขึ้นเนื่องจากบริเวณรอยตัดของ rhizome section มีการปลดปล่อยสารในกลุ่ม phenolic compounds ออกมา และซึมลงสู่อาหาร ทำให้

อาหารมีสีดำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sheelavantmath และคณะ (2000) ที่พบว่า การตัดย้ายชิ้นส่วน rhizome section กล้วยไม้ดิน *G. densiflorum* (Lam.) Schltr. ลงเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง จะมีการปลดปล่อยสาร phenolic compounds ทำให้อาหารกลายเป็นสีดำ ทั้งนี้ จากผลการทดลองพบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่ไม่เติมฮอร์โมน จะมีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเพียงเล็กน้อย และมีเปอร์เซ็นต์การเกิด browning สูงที่สุดถึง 86.96 % และชิ้นส่วนตายไปในที่สุด ในขณะที่ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA นั้น พบว่า ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การเกิด browning ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA มากขึ้น ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกันกับงานของ Sheelavantmath และคณะ (2000) ในขณะที่ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม Kinetin และ TDZ นั้น จะมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนในทางตรงกันข้ามกล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของ Kinetin และ TDZ มากขึ้น จะมีแนวโน้มทำให้ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การเกิด browning เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกับรายงานของ Shimasaki และ Uemoto (1991) และสอดคล้องกับรายงานของ Nayak และคณะ (1998) ที่แสดงถึงการเพิ่มปริมาณ Kinetin จะมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การตอบสนอง และจำนวน rhizome ที่แตกใหม่ของ *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. ลดลงตามปริมาณของ kinetin ที่เพิ่มขึ้น และจากการทดลองยังพบว่าตามบริเวณรอยตัดของ rhizome section จะมีการสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะเป็น globular shape และพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Datta และคณะ (1999), Sheelavantmath และคณะ (2000), Roy และ Banerjee (2002) และ Bhadra และ Hossain (2003) และเมื่อพิจารณาถึงจำนวน rhizome ที่เกิดขึ้นใหม่ต่อชิ้นส่วนเพาะเลี้ยง จะพบว่า ในอาหารสูตรที่ไม่เติมฮอร์โมน และสูตรที่เติม BA ความเข้มข้นต่ำนั้น ไม่มีผลในการชักนำให้เกิดการสร้าง rhizome ใหม่ ในขณะที่ อาหารสูตรที่เติม BA และ TDZ ที่เพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้น มีแนวโน้มจะทำให้การสร้าง rhizome ใหม่ลดลง ในขณะที่อาหารสูตรที่เติม Kinetin เพิ่มความเข้มข้นขึ้น กลับมีแนวโน้มทำให้เกิดการสร้าง rhizome ใหม่ได้ดี อย่างไรก็ตาม rhizome ที่เกิดขึ้นใหม่จากชิ้นส่วน rhizome section นั้น มีการเจริญและพัฒนาเป็นโครงสร้าง rhizome tip และมีการแตกแขนงของ primary rhizome tip และ secondary rhizome tip ซึ่งให้ผลเหมือนกับรายงานของ Roy และ Banerjee (2002) ที่แสดงให้เห็นว่า rhizome ที่สร้างขึ้นมาจากการงอกกลับเป็นอวัยวะใหม่ของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยง rhizome section นั้นสามารถแตกแขนงออกเป็น secondary rhizome branch ได้ เมื่อเวลาผ่านไป และจากผลการสังเกตพบว่า ชิ้นส่วน rhizome section ที่เพาะเลี้ยงนั้น มีการเจริญและพัฒนายืดยาวออกไป และมีรูปแบบการแตกแขนงของ rhizome ใหม่ที่เกิดขึ้นคล้ายกับการแตกแขนงแบบ dichotomous branching ซึ่งมีรายงานการศึกษานี้ในกล้วยไม้ดินสกุลอื่นๆ เช่นกัน (Roy and Banerjee, 2002)

จากการศึกษาผลของ NAA ต่อการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยง rhizome tip พบว่า ชิ้นส่วน rhizome tip มีสีน้ำตาล เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้นมากขึ้น โดยชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ทุกความเข้มข้น มีแนวโน้มชักนำให้เกิด

rhizome ใหม่ได้ดีกว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรควบคุมที่ไม่เติมฮอร์โมน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NAA มากขึ้นจะมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิด rhizome ใหม่มีแนวโน้มสูงขึ้นเช่นกัน ซึ่งให้ผลเหมือนกับรายงานของ Roy และ Banerjee (2002) ที่พบว่า การเติม NAA ลงในอาหาร จะทำให้ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยง rhizome section ของกล้วยไม้ดิน *G. densiflorum* (Lam.) Schltr. สามารถชักนำให้เกิดการสร้าง rhizome ใหม่ได้ดีขึ้น รวมไปถึงการศึกษาของ Nayak และคณะ (1998) ที่พบว่า ชิ้นส่วน rhizome ของกล้วยไม้ *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด rhizome ใหม่มากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ NAA เพิ่มมากขึ้น โดยทั่วไปแล้ว ฮอร์โมน NAA นั้นมีผลกระตุ้นและชักนำให้เกิดการสร้าง rhizome ใหม่ ในกล้วยไม้ดินหลายชนิด (Shimasaki and Uemoto, 1990; Paek and Yeung, 1991; Paek and Kozai, 1998 และ Ogura-Tsujita *et al*, 2007) อย่างไรก็ตาม จำนวน rhizome ใหม่ที่แตกแขนงออกมานั้น มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ NAA เพิ่มขึ้นถึง 0.5 mg/l และจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ NAA เพิ่มขึ้นมากกว่า 0.5 mg/l ซึ่งให้ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานบางฉบับที่พบว่า จำนวน rhizome ใหม่ที่แตกแขนงออกมาจากชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ดิน *G. densiflorum* (Lam.) Schltr. (Roy and Banerjee, 2002) และกล้วยไม้ดิน *Cymbidium faberi* (Chen *et al*, 2005) นั้น มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ NAA เพิ่มขึ้นถึงปริมาณที่เหมาะสม และจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ NAA เพิ่มขึ้นมากเกินไป อย่างไรก็ตาม จากรายงานการทดลองพบว่า การเพิ่มปริมาณ NAA มีแนวโน้มทำให้ความยาวของ rhizome ที่แตกแขนงออกมาใหม่นั้นลดลง ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับรายงานของ Sheelavantmath และคณะ (2000) ที่แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณ NAA ลงในอาหารจะมีผลทำให้ความยาวของ rhizome ที่ชักนำให้เกิดขึ้นนั้นลดลง อย่างไรก็ตามจากผลการทดลอง พบว่า ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นนั้น เจริญและพัฒนามาจาก secondary rhizome tip ที่เป็นจุดกำเนิดยอดใหม่ (Shoot primordia) แล้วเจริญขึ้นมาเป็นยอดพร้อมกับ rhizome tip จากชิ้นส่วนเริ่มต้น ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่สังเกตพบได้จากรายงานการทดลองของ Roy และ Banerjee (2002) และเมื่อนำยอดใหม่ที่เกิดขึ้น ออกปลูกลงในวัสดุปลูก แล้วย้ายเลี้ยงในเรือนเพาะชำ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ต้นอ่อนของกล้วยไม้ดิน *G. densiflorum* (Lam.) Schltr. ที่ได้จากการนำเอาต้นในสภาพปลอดเชื้อออกปลูกนั้น มีการเจริญเติบโตที่ดี และให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูง และมีการพัฒนาโครงสร้างของ cormlet บริเวณโคนต้นที่ใหญ่เพื่อสะสมอาหารไว้สำหรับการเจริญเติบโตในฤดูกาลต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากการนำเมล็ดกล้วยไม้ดิน *G. densiflorum* (Lam.) Schltr. มาเพาะในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร VW (1949) ที่ดัดแปลงโดยเติมน้ำมะพร้าว 150 ml/l มันฝรั่ง 50 g/l และน้ำตาลซูโครส 20 g/l พบว่า เมล็ดมีกระบวนการงอกที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ คือ เมล็ดงอกและสร้างโปรโตคอร์มแล้ว

เจริญยืดยาวออกพัฒนาเป็น rhizome แทงลงสู่อาหาร จากนั้นจึงสร้าง rhizome tip เจริญย้อนกลับขึ้นมาบนผิวอาหาร แล้วพัฒนาเป็นต้นอ่อน กับเมล็ดที่งอกและสร้างโปรโตคอร์มที่ยืดยาวออกและแตกแขนง rhizome ใหม่ แล้วเจริญเฉพาะบนผิวอาหาร และจากการนำชิ้นส่วน rhizome section เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA, TDZ และ Kinetin ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/l เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วน rhizome section เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม TDZ 0.1 mg/l ชักนำให้เกิดการสร้าง rhizome ใหม่มากที่สุด (2.67 แขนงต่อชิ้นส่วน) และจากการเลี้ยงชิ้นส่วน rhizome tip บนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/l เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม NAA 0.5 mg/l ชักนำให้เกิดการสร้างแขนง rhizome ใหม่ มากที่สุด (2.68 แขนงต่อชิ้นส่วน) และยังชักนำให้เกิดการสร้างยอดใหม่ได้มากที่สุด (2.25 ยอดต่อชิ้นส่วน) และต้นอ่อนขนาดต่างๆ ที่เกิดขึ้น และย้ายปลูกในสภาพแวดล้อมปกติในเรือนเพาะชำ มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 80 %

เอกสารอ้างอิง

อนุพันธ์ กงบังเกิด, ธนากร วงษศา, วัชรศักดิ์ มาเกิด และคงศักดิ์ พร้อมเทพ. (2551). การสำรวจกล้วยไม้บริเวณพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืช อพ.สธ.- เขื่อนภูมิพล จังหวัดตาก. รายงานการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี 2551 มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก, 59 หน้า.

Bhadra, S.K. and Hossain, M.M. (2003). *In vitro* germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an endangered orchid species. *Plant Tissue Culture*, *13(2)*, 165-171.

Chen, Y., Liu, X. and Liu,Y. (2005). *In vitro* plant regeneration from the immature seeds of *Cymbidium faberi*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture, 81*, 247–251.

Chung, J.D., Chun, C.K., Kim, S.S. and Lee, J.S. (1985). Factors affecting growth of rhizomes and organogenesis of Korean native *Cymbidium kanran*. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 26*, 281-288.

Datta, K.B., Kanjilal, B. and de Sarker, D. (1999). Artificial seed technology: Development of a protocol in *Geodorum densiflorum* (Lam) Schltr. – An endangered orchid. *Current Science*, *76* , 1142-1145.

Hasegawa, A. and Goi, M. (1987). Rhizome formation in *Cymbidium goeringii* Reichenbach fil and *Cymbidium kanran* Makino in shoot tip culture. *Journal of the Japanese for Horticultural Science*, *56*, 70-78.

Kunthonluxsamee, T., Puangsomlee Wangsomnuk, P. and Kitichantaropas, Y. (2005). The morphology of seed and seed germination of *Spathoglottis plicata*. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005.

Lauzer, D., Renaut, S., St-Arnaud, M. and Barabe, D. (2007). *In vitro* asymbiotic germination, protocorm development, and plantlet acclimatization of *Aplectrum hyemale* (Muhl. ex Willd.) Torr. (Orchidaceae). *Journal of the Torrey Botanical Society, 134(3)*, 344-348.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum, 15*, 473-497.

Nanakorn, W. and Indhamusika, S. (2000). Queen Sirikit Botanical Garden (Vol.6). O.S. Printing House, Bangkok, 291 pp.

Nayak, N. R., Chand, P. K., Rath, S. P. and Patnaik, S. N. (1998). Influence of some plant growth regulators on the growth and organogenesis of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. seed-derived rhizomes *in vitro*. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 34*, 185-188.

Ogura-Tsujita, Y., Tatsumi, A., Hayashida, S. and Okubo, H. (2007). Interconversion between protocorm-like-bodies (PLBs) and rhizome in *Cymbidium*. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University, 52(2)*, 325-330.

Paek, K.P. and Kozai, T. (1998). Micropropagation of temperate Cymbidium via rhizome culture. *HortTechnology, 8(3)*, 175-180.

Paek, K.P., Shim, G.B. and Kim, J.J. (1990). Effect of natural products and BAP exposing periods on organogenesis of temperate cymbidiums using rhizomes. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 31*, 74-80.

Paek, K.P. and Yeung, E.C. (1991). The effect of 1-naphthalene acetic acid and N^6-Benzyladenine on the growth of *Cymbidium forestii* rhizomes in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 24*, 65–71.

Roy, J. and Banerjee, N. (2002). Rhizome and shoot development during in vitro propagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. *Scientia Horticulturae, 94*, 181-192.

Sheelavantmath, S.S., Murthy, H.N., Pyati, A.N., Ashok Kumar, H.G. and Ravishankar, B.V. (2000). *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. through rhizome section culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60*, 151–154.

Shimasaki, K. and Uemoto, S. (1991). Rhizome induction and plantlet regeneration of *Cymbidium goeringii* from flower bud cultures in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 25*, 49-52.

Vacin, E. and Went, F. (1949). Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette, 110*, 605-613.