NU Science Journal 2011; 7(2): 45 - 59

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สิงโตประหลาด

ชัยชาญ มณีรัตนรุ่งโรจน์* ศรีสังวาลย์ ลายวิเศษกุล และอนุพันธ์ กงบังเกิด

Tissue culture of *Bulbophyllum affine* Lindl.

Chaichan Maneerattanarungroj*, Srisangwan Laywisadkul
and Anupan Kongbangkerd

หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000
*Corresponding author. E-mail address: chaichanm@nu.ac.th

บทคัดย่อ

จากการเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้ *Bulbophyllum affine* Lindl. อายุ 8 เดือน บนอาหารกึ่งแข็งดัดแปลงสูตรต่างๆ ได้แก่ สูตร Vacin และ Went (VW) (1949), สูตร ½ Murashige และ Skoog (MS) (1962), สูตร Murashige และ Skoog (1962) และสูตร Knudson C (Kc) (1946) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มล/ล น้ำต้มมันฝรั่ง 100 ก/ล กล้วยหอมบด 50 ก/ล และผงถ่าน 2.0 ก/ล เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด (3.75 ยอดต่อชิ้นส่วน) ในขณะที่อาหารสูตร Kc จะให้ค่าความยาวยอด (1.48 ซม) จำนวนราก (12.57 รากต่อชิ้นส่วน) และความยาวราก (0.93 ซม) เฉลี่ยมากที่สุด และเมื่อย้ายต้นอ่อนเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส ร่วมกับน้ำมะพร้าว ปริมาตรต่างๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 ก/ล ร่วมกับน้ำมะพร้าว 150 มล/ล สามารถชักนำให้มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด (2.65 ยอด) ในขณะที่อาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 10 ก/ล ร่วมกับน้ำ มะพร้าว 150 มล/ล จะให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด (3.21 ซม) ส่วนอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 ก/ล ร่วมกับน้ำมะพร้าว 100 มล/ล และสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 ก/ล ร่วมกับน้ำมะพร้าว 50 มล/ล จะชักนำให้มีจำนวนราก (17.81 ราก) และความยาวราก (2.13 ซม) เฉลี่ยมากที่สุด ตามลำดับ และเมื่อนำย้ายต้นอ่อนเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติม TDZ ร่วมกับ 2,4-D ปริมาณ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร VW ที่เติม TDZ ร่วมกับ 2,4-D เท่ากับ 1.0 และ 2.0, 0.5 และ 2.0 และ 1.0 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้มากที่สุด เท่ากับ 5.7, 5.6 และ 5.5 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ เมื่อนำต้นอ่อนซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงลงปลูกในวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ต้นอ่อน

กล้วยไม้สิงโตประหลาดที่ออก ปลูกในวัสดุปลูกทั้งเวอร์มิคูไลต์ และกาบเฟินชายผ้าสีดา มีเปอร์เซ็นต์มีการรอดชีวิตสูงสุดเท่ากัน คือเท่ากับ 93 %

คำสำคัญ: Bulbophyllum affine Lindl. สภาพหลอดทดลอง ฮอร์โมน

Abstract

In vitro culture of 8 month-old seedling of *Bulbophyllum affine* Lindl. was investigated. Explants were cultured on various medium formulas; Vacin and Went (VW) (1949), ½ Murashige and Skoog (MS) (1962), Murashige and Skoog (1962) and Knudson C (Kc) (1946) supplemented with 150 ml/l coconut water, 100 g/l potato, 50g/l banana and 2.0 g/l activated charcoal for 12 weeks. The results showed that highest number of shoots (3.75 shoots per explant) could be obtained when cultured on VW medium while the highest shoot length (1.48 cm), root number (12.57 roots per explant) and root length (0.93 cm) were observed on Kc medium. *In vitro* shoot culture was also performed on VW medium with a combination of sucrose (5, 10 and 20 g/l) and coconut water (50, 100 and 150 ml/l) for 12 weeks. It was found that the highest number of shoots (2.65 shoots per explant) could obtain on the medium supplemented with 20 g/l sucrose and 150 ml/l coconut water while the highest shoot length (3.21 cm) could be observed on the medium supplemented with 10 g/l sucrose and 150 ml/l coconut water. However, the highest root number (17.81 roots per explant) was observed on the medium containing 20 g/l sucrose and 100 ml/l coconut water whereas the highest root length (2.13 cm) was performed on the medium with 20 g/l sucrose and 50 ml/l coconut water, respectively. Besides, *in vitro* shoots of *Bulbophyllum affine* Lindl. were cultured on the medium with different combinations of TDZ and 2,4-D at 0, 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/l for 8 weeks. The results showed that the medium supplemented with a combinations of TDZ and 2,4-D at 1.0: 2.0, 0.5:2.0 and 1.0 mg/l gave the highest shoot number at 5.7, 5.6 and 5.5 shoots, respectively. *In vitro* young plantlets were transplanted and grew in different planting materials for 12 weeks. The results showed that the highest percentage of survival (93 %) could obtain when transplanted to grow in either vermiculite or dry fern with no significant different.

Keywords: *Bulbophyllum affine* Lindl., *In vitro*, hormones

บทนำ

สิงโตประหลาด (*Bulbophyllum affine* Lindl.) เป็นกล้วยไม้ประเภทพืชอิงอาศัย (epiphyte) พบในป่าดิบเขา ป่าสนเขา และป่าเต็งรังผสมป่าสน อิงอาศัยบนไม้ยืนต้นในวงศ์ยาง วงศ์ก่อ และวงศ์สน ที่ระดับความสูง 800-1800 เมตรจากระดับน้ำทะเล (สลิล สิทธิสัจจธรรม, 2549) เป็นที่นิยมปลูกเลี้ยงกันทั่วไปในกลุ่มผู้นิยมกล้วยไม้พันธุ์แท้ โดยจะนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ไม้ สำหรับใช้ในการผสมให้ได้พันธุ์ใหม่ๆ ที่เป็นที่ต้องการในตลาดกล้วยไม้ลูกผสม อันเป็นเหตุให้ความต้องการนำกล้วยไม้สิงโตประหลาดจากธรรมชาติมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์มากยิ่งขึ้น ส่งผลต่อปริมาณกล้วยไม้กล้วยไม้สิงโตประหลาดที่มีอยู่ป่าตามธรรมชาติได้ลดจำนวนลงอย่างมาก อันเนื่องมาจากการลักลอบเก็บและนำกล้วยไม้ออกมาจากป่า รวมไปถึงการตัดไม้ทำลายป่า จึงเป็นที่น่าเป็นห่วงว่ากล้วยไม้สิงโตประหลาดดังกล่าว อาจเข้าสู่ภาวะสูญพันธุ์จากธรรมชาติได้ในไม่ช้า โดยทั่วไปแล้วการขยายพันธุ์กล้วยไม้ในธรรมชาตินั้น ขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ด อย่างไรก็ตาม ปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อการงอกและพัฒนาของกล้วยไม้ ในธรรมชาตินั้น ยังคงเป็นตัวจำกัดปริมาณการแพร่กระจายพันธุ์กล้วยไม้ให้คงอยู่ต่อไป ดังนั้นการใช้เทคนิค และวิธีการในการช่วยขยายพันธุ์กล้วยไม้ นอกจากจะได้ต้นกล้วยไม้เป็นจำนวนมากแล้ว ยังเป็น การช่วยอนุรักษ์สายพันธุ์กล้วยไม้ให้คงอยู่ต่อไปได้อีกด้วย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเทคนิคหนึ่ง ที่ปัจจุบันนิยมนำมาใช้ช่วยขยายพันธุ์พืชอย่างรวดเร็วให้ได้เป็นจำนวนมาก และประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิดโดยเฉพาะพืชวงศ์กล้วยไม้ (Arditti and Ernst, 1993) สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้นั้น พบมีรายงานไม่มากนัก ดังตัวอย่างรายงานของธันว์ ขำทอง (2546) ที่รายงานการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สิงโตก้ามปูแดงและสิงโตเคราแพะ อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการเลี้ยงเนื้อเยื่อสิงโตประหลาด แต่อย่างใด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเบื้องต้นถึงผลของอาหารและสารอินทรีย์ ต่อการเพิ่มจำนวนต้นกล้วยไม้สิงโตประหลาดได้อย่างรวดเร็วในเวลาอันสั้นและอนุรักษ์สายพันธุ์ เพื่อนำกลับคืนสู่สภาพธรรมชาติต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การศึกษาระยะพัฒนาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้สิงโตประหลาด

นำเมล็ดกล้วยไม้ที่ทำการเพาะเลี้ยงในระยะต่างๆ มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ เพื่อศึกษาระยะพัฒนาการในการงอก บันทึกการพัฒนาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดังกล่าว

2. การศึกษาผลของอาหารกึ่งแข็งดัดแปลงสูตรต่างๆ ต่อการเจริญของกล้วยไม้สิงโตประหลาด

นำต้นอ่อนอายุ 8 เดือน ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ มาเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ได้แก่ Vacin และ Went (VW) (1949), ½ Murashige และ Skoog (MS) (1962), Murashige และ Skoog (1962) และ Knudson C (Kc) (1946) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มก/ล, กล้วยหอมบด 50 ก/ล และน้ำ ต้มมันฝรั่ง 100 ก/ล จากนั้นบันทึกการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตประหลาด ทุก 2 สัปดาห์ จนครบ 12 สัปดาห์

3. การศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสร่วมกับน้ำมะพร้าวต่อการเจริญของกล้วยไม้ ประหลาด

นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 8 เดือนมาเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส ปริมาณ 5, 10 และ 20 ก/ล ร่วมกับน้ำมะพร้าวปริมาตร 50, 100 และ 150 มล/ล บันทึกการเจริญเติบโตของต้นอ่อนทุก 2 สัปดาห์ จนครบ 12 สัปดาห์

4. การศึกษาผลของฮอร์โมน TDZ ร่วมกับ 2,4-D ต่อการเจริญของกล้วยไม้ประหลาด

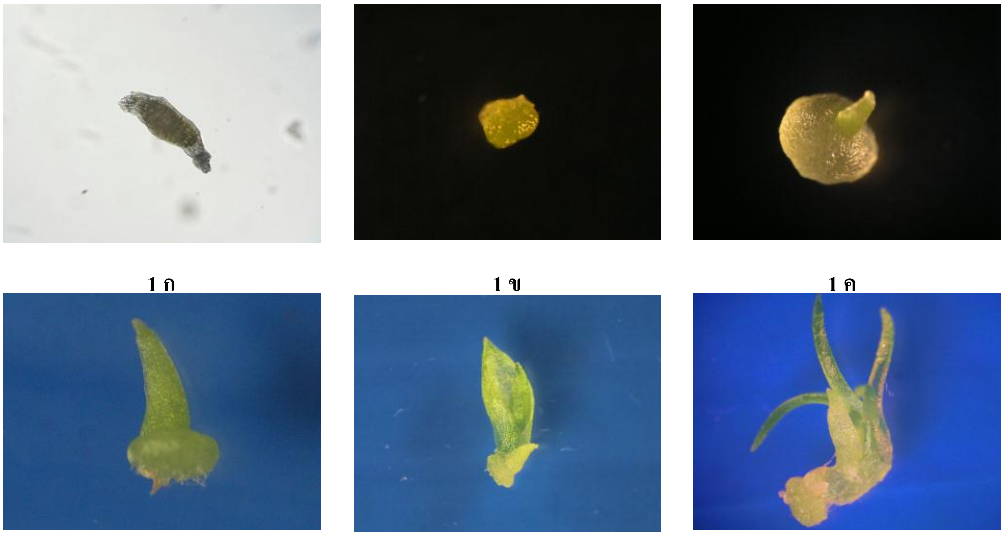
นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 8 เดือนมาเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมฮอร์โมน TDZ ที่ปริมาณ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 มก/ล ร่วมกับ 2,4-D ที่ปริมาณ 0, 0.1 0.5 ,1.0 และ 2. 0 มก/ล บันทึกการเจริญเติบโตของต้นอ่อนทุก 2 สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์

5. การศึกษาชนิดของวัสดุปลูกที่มีผลต่อการรอดชีวิตและการเจริญของกล้วยไม้ประหลาด

นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลงปลูกในกระบะหลุมที่มีวัสดุปลูกชนิดต่างๆ ได้แก่ กาบมะพร้าว ถ่านทุบ สแฟกนัมมอส เวอร์มิคูไลต์ และกาบเฟินชายผ้าสีดา ทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเป็นเวลา 12 สัปดาห์

ผลการทดลอง

จากการศึกษาระยะพัฒนาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้สิงโตประหลาด พบว่า สามารถแบ่งพัฒนาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ ได้เป็น 6 ระยะตามแบบการแบ่งระยะพัฒนาการของ Arditti (1967) ดังรูปที่ 1 (ก-ฉ)



1 ก 1 ข 1 ค

1 ง 1 จ 1 ฉ

รูป 1 (ก-ฉ) ระยะพัฒนาการของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตประหลาด (*Bulbophyllum affine*)

1ก – ระยะพัฒนาการที่ 1 เมล็ดสมบูรณ์แต่ไม่งอก

1ข – ระยะพัฒนาการที่ 2 เมล็ดขยายขนาดจากเดิม 5-10 เท่าโดยเอมบริโอมีขนาดเพิ่มขึ้น อาจมีหรือไม่มีสีเขียวของคลอโรฟิลล์และจะดันเปลือกเมล็ดแตกออก

1ค – ระยะพัฒนาการที่ 3 เอมบริโอเจริญเป็นลูกกลมปลายแหลมเรียกว่าโปรโตคอร์มและมีไรซอยด์

1ง – ระยะพัฒนาการที่ 4 ต้นอ่อนมีใบยอดที่เห็นชัดเจน 1 ใบ งอกขึ้นมาทางด้านบนของโปรโตคอร์ม

1จ – ระยะพัฒนาการที่ 5 ต้นอ่อนมีใบยอด 2 ใบ

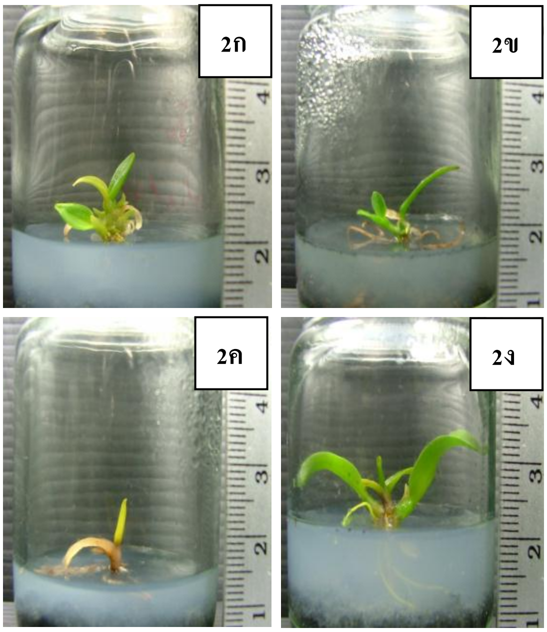
1ฉ – ระยะพัฒนาการที่ 6 ต้นอ่อนมีใบยอด 3-4 ใบ และมีรากอย่างน้อย 1 ราก

การศึกษาผลของอาหารกึ่งแข็งดัดแปลงสูตรต่างๆ พบว่า ต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยได้มากที่สุด (3.75 ยอดต่อชิ้นส่วน) ในขณะที่ต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร Kc จะให้ค่าความยาวยอด (1.48 ซม.) จำนวนราก (12.57 รากต่อชิ้นส่วน) และความยาวราก (0.93 ซม.) เฉลี่ยมากที่สุด ดังแสดงในตาราง 1 และรูป 2 (ก-ง)

ตาราง 1 ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ จำนวนราก และความยาวราก ของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตประหลาด เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ในอาหารสูตรต่างๆ

สูตรอาหาร	**จำนวนยอดเฉลี่ย**	**ความยาวยอดเฉลี่ย (cm)**	**จำนวนใบเฉลี่ย**	**จำนวนรากเฉลี่ย**	**ความยาวรากเฉลี่ย (cm)**
VW	3.75±1.53 ^{a}	0.97±0.41 ^{b}	1.00±0.63 ^{b}	11.33±6.36 ^{a}	0.85±0.43 ^{a}
½MS	3.42±1.24 ^{a}	0.90±0.25 ^{b}	1.23±0.73 ^{ab}	10.30±4.50 ^{a}	0.49±0.18 ^{c}
MS	1.43±0.53 ^{b}	0.91±0.29 ^{b}	1.57±0.79 ^{a}	0 ^{b}	0 ^{b}
Kc	3.18±0.95 ^{a}	1.48±0.52 ^{a}	1.36±0.55 ^{ab}	12.57±4.05 ^{a}	0.93±0.49 ^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % วิเคราะห์โดยวิธี DMRT



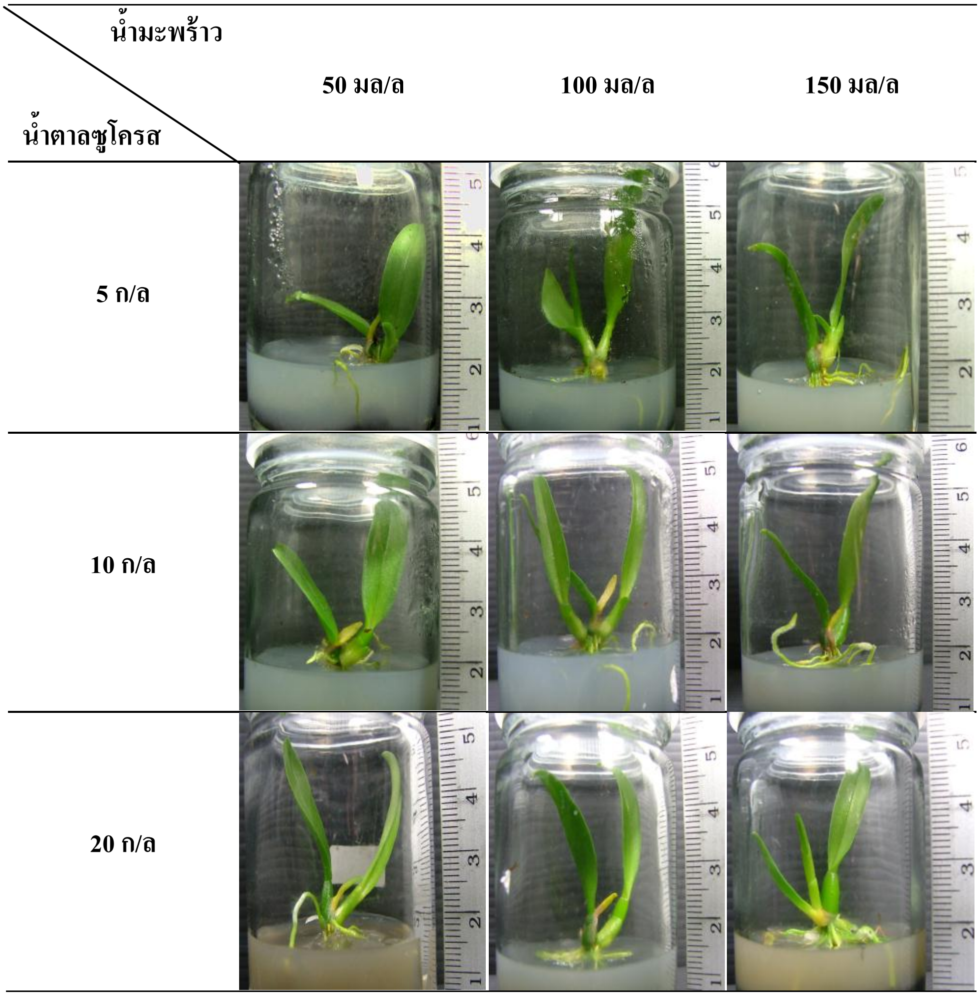
รูป2 (ก-ง) ตัวอย่างลักษณะการเจริญของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตประหลาดบนอาหารกึ่งแข็ง ดัดแปลงสูตร VW (1949) (2ก), สูตร 1/2MS (1962) (2ข), สูตร MS (1962) (2ค), สูตร Kc (1965) (2ง) เป็นเวลา 12 สัปดาห์

จากการศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสร่วมกับน้ำมะพร้าวต่อการเจริญของ กล้วยไม้สิงโตประหลาด พบว่า ชิ้นส่วนต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 ก/ล ร่วมกับน้ำมะพร้าว 150 มล/ล สามารถชักนำให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด (2.7 ยอดต่อชิ้นส่วน) ในขณะที่อาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 10 ก/ล ร่วมกับน้ำมะพร้าว 150 มล/ล จะให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด (3.21 ซม.) และชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 ก/ล ร่วมกับน้ำมะพร้าว 100 มล/ล และสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 ก/ล ร่วมกับน้ำมะพร้าว 50 มล/ล จะชักนำให้มีจำนวนราก (17.8 ราก) และความยาวราก (2.13 ซม) เฉลี่ยมากที่สุด ตามลำดับ ดังตาราง 2 และรูป 3

ตาราง 2 ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ จำนวนราก และความยาวรากของกล้วยไม้สิงโตประหลาด ที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสร่วมกับน้ำมะพร้าวในปริมาณต่างๆ กัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์

น้ำตาลซูโครส (ก/ล)	น้ำมะพร้าว (ก/ล)	จำนวนยอดเฉลี่ย	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม)	จำนวนใบเฉลี่ย	จำนวนรากเฉลี่ย	ความยาวรากเฉลี่ย (ซม)
5	50	2.23±0.81 [ab]	2.53±0.57 [d]	1.73±0.98 [a]	16.18±3.71 [ab]	1.32±0.35 [b]
	100	2.31±0.74 [ab]	2.76±0.61 [cd]	1.19±0.49 [bc]	14.16±3.35 [b]	1.41±0.50 [b]
	150	2.27±0.64 [ab]	2.97±0.61 [abc]	1.37±0.67 [abc]	11.83±2.93 [c]	1.49±0.38 [b]
10	50	1.96±0.43 [b]	2.73±0.67 [cd]	1.57±0.74 [ab]	14.21±3.72 [b]	1.48±0.47 [b]
	100	2.39±0.50 [ab]	3.18±0.54 [ab]	1.39±0.70 [abc]	16.28±2.40 [ab]	1.83±0.39 [a]
	150	2.24±0.66 [ab]	3.21±0.84 [a]	1.24±0.52 [bc]	14.00±4.33 [bc]	1.84±0.55 [a]
20	50	2.33±0.56 [ab]	2.97±0.45 [abc]	1.14±0.45 [c]	15.76±3.55 [ab]	2.13±0.69 [a]
	100	2.52±0.68 [a]	2.79±0.78 [bcd]	1.48±0.77 [abc]	17.81±5.87 [a]	1.97±0.55 [a]
	150	2.65±0.95 [a]	2.79±0.78 [bcd]	1.30±0.53 [bc]	15.26±3.81 [b]	1.91±0.56 [a]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % วิเคราะห์โดยวิธี DMRT



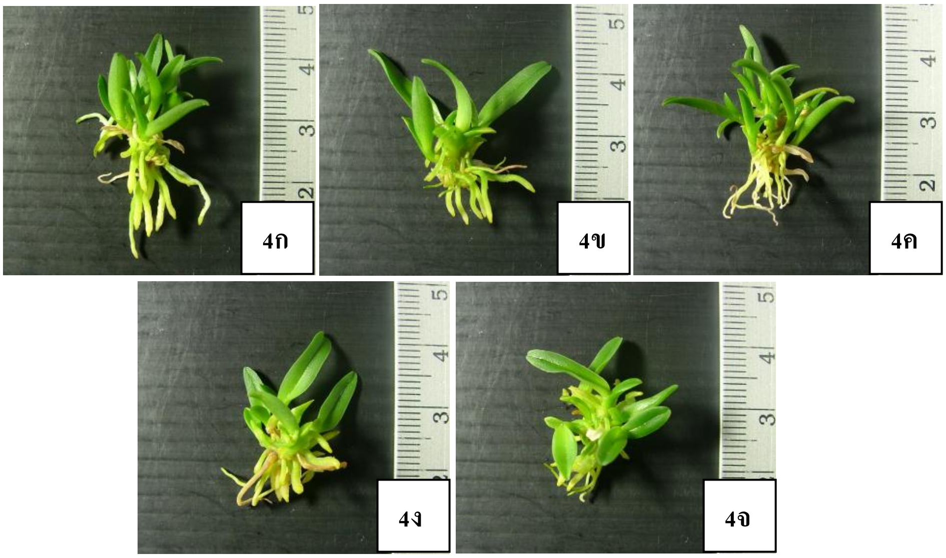
รูป 3 การเจริญของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตประหลาดบนอาหารกึ่งแข็งดัดแปลงสูตร VW ที่เติมน้ำตาล ร่วมกับน้ำมะพร้าว ในปริมาณต่างๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

จากการศึกษาผลของฮอร์โมน TDZ ร่วมกับ 2,4-D ต่อการเจริญของกล้วยไม้ สิงโตประหลาด พบว่า ต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่มีการเติม TDZ 1.0 มก/ล ร่วมกับ 2,4-D 2.0 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่เฉลี่ยได้มากที่สุด (5.7 ยอดต่อชิ้นส่วน) ส่วนต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติม 2,4-D มก/ล เพียงอย่างเดียวกลับให้ค่าจำนวนรากมากที่สุด (25.3 รากต่อชิ้นส่วน)

ตาราง 3 ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ จำนวนราก และความยาวของกล้วยไม้สิงโตประหลาด บนอาหารที่เติม TDZ ร่วมกับ 2,4-D ในปริมาณต่างกัน เมื่อเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์

TDZ (มก/ล)	**2,4-D (มก/ล)**	**จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด)**	**ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม)**	**จำนวนใบเฉลี่ย (ใบ)**	**จำนวนรากเฉลี่ย (ราก)**	**ความยาวรากเฉลี่ย (ซม)**
0	0	5.3±1.61^{ab}	0.96±0.21^{abcd}	8.8±2.89^{abc}	21.8±8.47^{abcde}	0.56±0.13^{ab}
0.1	0	5.4±2.15 ^{ab}	0.81±0.22^{defg}	9.5±3.74^{a}	21.9±11.43^{abcde}	0.56±0.14^{ab}
0.5	0	4.0±1.16^{cde}	0.80±0.19^{defg}	5.9±2.12^{defg}	16.6±7.95^{bcdef}	0.54±0.17^{abc}
1.0	0	4.0±1.29^{cde}	0.76±0.28^{defgh}	5.3±1.78^{efgh}	19.3±7.30^{abcde}	0.47±0.17^{abcdef}
2.0	0	3.9±1.06^{cde}	0.97±0.26^{abcd}	6.6±2.71^{cdef}	16.0±7.06^{cdef}	0.50±0.14^{abcdef}
0	0.1	3.3±0.88^{e}	0.64±0.25^{ghi}	4.4±1.43^{fgh}	17.4±7.67^{bcdef}	0.39±0.15^{efgh}
0.1	0.1	3.4±0.73^{de}	0.77±0.24^{defgh}	4.3±1.04^{gh}	16.2±3.52^{bcdef}	0.41±0.15^{defgh}
0.5	0.1	3.5±1.21^{cde}	0.87±0.72^{cdef}	4.2±2.08^{gh}	16.3±13.61^{bcdef}	0.34±0.16^{ghi}
1.0	0.1	3.8±1.09^{cde}	0.63±0.19^{ghi}	4.6±2.09^{fgh}	15.5±7.18^{cdef}	0.37±0.15^{fgh}
2.0	0.1	3.3±0.90^{e}	0.71±0.27^{efgh}	4.5±1.86^{fgh}	15.2±8.66^{def}	0.43±0.23^{cdefgh}
0	0.5	3.7±1.59^{cde}	1.11±0.26^{ab}	7.2±2.48^{bcde}	14.6±5.13^{def}	0.50±0.20^{abcdef}
0.1	0.5	3.8±1.77^{cde}	1.11±0.34^{ab}	7.2±3.70^{abcde}	15.1±6.91^{def}	0.46±0.10^{bcdefg}
0.5	0.5	3.9±1.89^{cde}	1.11±0.29^{ab}	7.4±3.57^{abcde}	16.1±6.30^{bcdef}	0.56±0.16^{ab}
1.0	0.5	4.7±1.78^{abcde}	1.05±0.42^{abc}	8.9±3.73^{ab}	18.0±9.94^{abcdef}	0.43±0.20^{cdefgh}
2.0	0.5	4.3±1.61^{bcde}	1.17±0.35^{a}	7.9±3.26^{abcd}	20.1±8.32^{abcde}	0.51±0.14^{abcde}
0	1.0	4.6±2.40^{abcd}	0.72±0.33^{efgh}	7.3±4.84^{abcde}	25.1±17.64^{a}	0.41±0.18^{defgh}
0.1	1.0	4.0±1.03^{cde}	0.64±0.17^{ghi}	6.1±3.10^{defg}	14.3±10.27^{ef}	0.32±0.22^{hi}
0.5	1.0	3.5±1.25^{cde}	0.56±0.24^{hi}	4.7±2.21^{fgh}	10.8±10.87^{fg}	0.25±0.20^{ij}
1.0	1.0	4.3±1.81^{bcde}	0.92±0.39^{bcde}	7.3±3.46^{abcde}	20.5±13.23^{abcde}	0.48±0.22^{abcdef}
2.0	1.0	5.5±2.79^{a}	0.78±0.22^{defg}	8.5±4.77^{abc}	23.0±18.07^{abc}	0.47±0.19^{abcdef}
0	2.0	4.7±1.49^{abc}	0.93±0.32^{bcde}	8.3±3.06^{abc}	25.3±12.84^{a}	0.57±0.13^{ab}
0.1	2.0	4.6±1.35^{abc}	0.78±0.18^{defg}	8.0±2.46^{abcd}	22.1±10.45^{abcd}	0.53±0.18^{abcd}
0.5	2.0	5.6±2.85^{a}	0.86±0.30^{cdef}	9.1±4.19^{ab}	23.7±11.51^{ab}	0.59±0.16^{a}
1.0	2.0	5.7±2.36^{a}	0.69±0.21^{fghi}	7.5±3.87^{abcde}	20.8±10.21^{abcde}	0.41±0.18^{defgh}
2.0	2.0	3.6±1.95^{cde}	0.49±0.23^{i}	3.5±2.25^{h}	6.0±8.66^{g}	0.20±0.22^{j}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % วิเคราะห์โดยวิธี DMRT



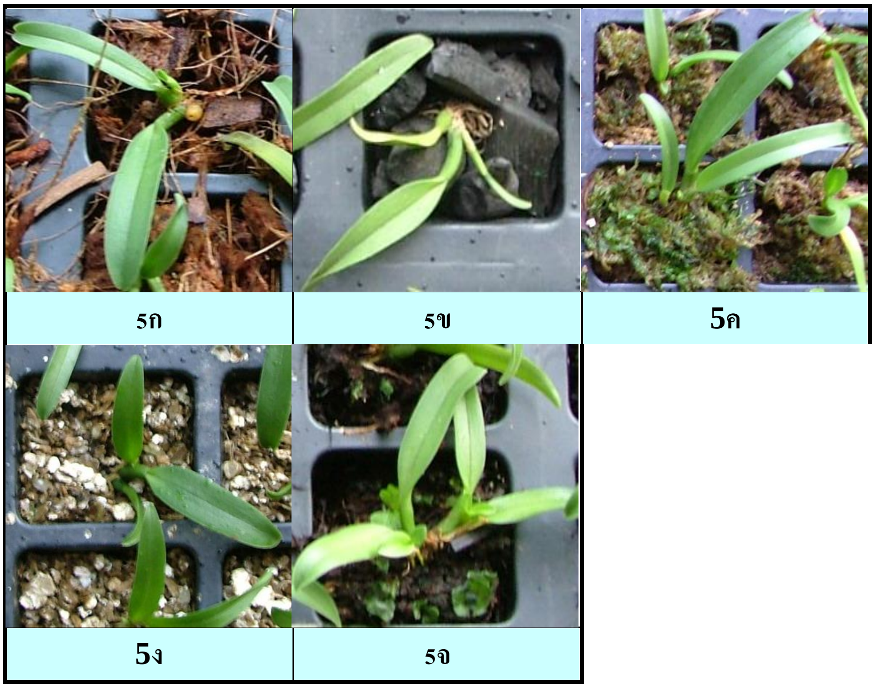
รูป 4 (ก-จ) ตัวอย่างการเจริญของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตประหลาด บนอาหารกึ่งแข็งดัดแปลง สูตร VW ที่เติมฮอร์โมน TDZ ร่วมกับ 2,4-D ในอัตราส่วน 1.0: 2.0 (4ก) 2.0 : 0.5 (4ข) 0.1 : 0.0 (4ค) 0.0 : 2.0 (4ง) และ 0.5 : 2.0 มก/ล (4จ) เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการทดลอง พบว่า ต้นอ่อนกล้วยไม้มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด (93 %) เมื่อใช้เวอร์มิคูไลต์ และกาบเฟินชายผ้าสีดา เป็นวัสดุปลูก ในขณะที่ถ่านทุบ เหลือเพียง (56 %) และต้นอ่อนที่ใช้เวอร์มิคูไลต์ เป็นวัสดุปลูกจะให้จำนวนยอด (3.5 ยอดต่อต้น) และความยาวยอด (3.55 ซม) เฉลี่ยมากที่สุด ส่วนต้นอ่อนที่ใช้เวอร์มิคูไลต์ และกาบเฟินชายผ้าสีดาเป็นวัสดุปลูกจะให้ค่าจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด (3.1 ใบต่อต้น) ไม่แตกต่างกัน หลังจากปลูกเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

ตาราง 4 ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ จำนวนราก และความยาวรากของกล้วยไม้สิงโตประหลาด ที่มีขนาดต้น 4-5 ซม. ในวัสดุปลูกชนิดต่างๆ เมื่อปลูกเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

วัสดุปลูก	% การรอดชีวิต	จำนวนยอดเฉลี่ย	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม)	จำนวนใบเฉลี่ย
กาบมะพร้าว	81	2.5 ± 1.02^{b}	3.26 ± 0.77^{ab}	2.2 ± 0.86^{b}
ถ่านทุบ	56	2.9 ± 0.36^{ab}	2.98 ± 0.43^{b}	2.3 ± 0.61^{b}
สแฟกนั่มมอส	83	3.2 ± 1.27^{ab}	3.45 ± 0.65^{a}	3.0 ± 0.97^{a}
เวอร์มิคูไลท์	93	3.5 ± 1.00^{a}	3.55 ± 0.70^{a}	3.1 ± 0.94^{a}
กาบเชายผ้าสีดา	93	3.0 ± 1.05^{ab}	3.24 ± 0.64^{ab}	3.1 ± 1.26^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % วิเคราะห์โดยวิธี DMRT



รูป 5 (ก-จ) แสดงการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตประหลาดที่ปลูกเลี้ยงในวัสดุปลูกชนิดต่างๆ ได้แก่ กาบมะพร้าว (5ก), ถ่านทุบ (5ข), สแฟกนั่มมอส (5ค), เวอร์มิคูไลต์ (5ง) และ กาบเฟินชายผ้าสีดา (5จ) เป็นเวลา 12 สัปดาห์

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษา พบว่า อาหารสูตร VW เป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้ต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตประหลาด (*Bulbophyllum affine* Lindl.) มีการเพิ่มจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับที่ (จิตราพรรณ พิลึก, 2536; Arditti, 1977; Prichard, 1989) ได้กล่าวว่า อาหารสูตร VW นิยมนำมาใช้เพาะเลี้ยงกล้วยไม้มากที่สุด เนื่องมาจากการที่อาหารสูตร VW มีความเข้มข้นของธาตุอาหารต่ำๆ และเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับพืช โดยเฉพาะกล้วยไม้ที่ไม่จำเป็นต้องใช้ธาตุอาหารมากนัก เนื่องจากสามารถตรึงธาตุอาหารบางส่วนได้จากอากาศอยู่แล้ว ดังนั้นจึงเป็นอาหารสูตรที่ต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตประหลาดสามารถดูดธาตุอาหารไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ (แสงเดือน วรรณชาติ, 2549) จึงทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตประหลาดมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนยอดได้อย่างรวดเร็ว และจากการเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตประหลาด บนอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 ก/ล ร่วมกับน้ำมะพร้าว 150 มล/ล พบว่าสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด สอดคล้องกับรายงานของ อัจจิมา เมืองชื่น (2548) ที่รายงานว่า อัตราการเจริญของ apical meristem ของกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของซูโครสเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช (Dantu and Bhojwani, 1987) รวมทั้งในน้ำ มะพร้าวยังประกอบไปด้วยสารอินทรีย์ และอนินทรีย์หลายชนิด สารสำคัญคือสารกลุ่มไซโตไคนิน เช่น zeatin และ zeatin riboside ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทในการชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์และส่งเสริมการขยายขนาดของเซลล์ (Letham, 1973) จึงส่งเสริมให้ต้นอ่อนกล้วยไม้มีการเจริญ และการพัฒนาให้เกิดยอดใหม่เพิ่มขึ้น และจากการทดลองเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตประหลาดบนอาหารที่เติม TDZ ร่วมกับ 2,4-D พบว่า อาหารที่มีการเติม TDZ 1.0 มก/ล ร่วมกับ 2,4-D 2.0 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่เฉลี่ยได้มากที่สุด สอดคล้องกับการทดลองของกำแพง ศรีวิยะ (2547) พบว่า อาหารที่เติม TDZ 1.0 มก/ล สามารถชักนำให้กล้วยไม้สกุลช้างสร้างเกิดยอดใหม่มากที่สุด ซึ่ง Sankhla และคณะ (1996) กล่าวว่า การเติมฮอร์โมนไซโตไคนินที่ความเข้มข้นต่ำ (0.5 μM) อาจไม่มีผลต่อการเกิดยอด และถ้าใช้ความเข้มข้นสูง (5 μM) สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก โดยการเติม TDZ ที่ความเข้มข้นต่ำ (น้อยกว่า 1 μM) สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้มากกว่าที่ความเข้มข้นสูง และจากการศึกษาของ Nayak และคณะ (1997) พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้กะเรกะร่อน (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.) กล้วยไม้เอื้องสายล่องแล่ง (*Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch.) และกล้วยไม้เอื้องจำปา (*Dendrobium moschatum* (Buch-Ham.) Sw.) บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 2.2-4.5 μM สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดมากที่สุด และอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม 2,4-D 4.52 μM ร่วมกับ TDZ 0.45 μM สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด ทั้งนี้เนื่องจาก TDZ ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ นั้น สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้มากกว่า

ฮอร์โมนชนิดอื่นๆ ในกลุ่มไซโตไคนิน แต่มีผลไปยับยั้งการยืดยาวออกของยอด (Huetteman and Preece, 1993) จากการทดลองยัง พบว่า อาหารที่เติม 2,4-D 2.0 มก/ล เพียงอย่างเดียวให้ค่าจำนวนรากมากที่สุด เนื่องจาก 2,4-D เป็นที่นิยมนำมาใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อกระตุ้นให้เกิดรากและแคลลัส (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์, 2546) โดย ถ้าใช้ในความเข้มข้นต่ำๆ จะมี ผลช่วยกระตุ้นการแตกราก (วงจันทร์ วงศ์แก้ว, 2535) และจากการนำต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตประหลาดออกปลูกในสภาพแวดล้อมปกติภายนอก ที่ใช้วัสดุปลูกแตกต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า เวอร์มิคูไลต์ และกาบเฟินชาผ้าสีดา มีผลทำให้ต้นอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด ไม่แตกต่างกัน โดยเวอร์มิคูไลต์ ยังทำให้มีการเกิดจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากสุดด้วย ซึ่งโครงสร้างของสอดคล้องกับรายงานของเวอร์มิคูไลต์ และกาบเฟินชายผ้าสีดา นั้นมีความพรุนและสามารถอุ้มน้ำได้ดีกว่าถ่านทุบ และมะพร้าวสับ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าสแฟกนัมมอส ซึ่งเป็นวัสดุปลูกที่มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดีกว่า เวอร์มิคูไลต์ และกาบเฟินชายผ้าสีดา แต่จากการทดลองพบว่า กลับให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ต่ำกว่า การ ใช้มิคูไลต์ และกาบเฟินชายผ้าสีดา อาจเนื่องมาจากสแฟกนัมมอสดูดน้ำไว้มากเกินความต้องการ จึงทำให้ต้นอ่อนเจริญเติบโตได้ไม่ดีเท่าที่ควร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของธีราพร เมืองแก้ว และคณะ (2548) ที่พบว่า การใช้เวอร์มิคูไลต์เป็นวัสดุปลูก ทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องชะนีมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด ทั้งนี้เป็นผลมาจากการที่ เวอร์มิคูไลต์ มีคุณสมบัติต้านทานการเปลี่ยนแปลง pH ได้ดี และมีความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวกสูง จึงสามารถดูดซับธาตุอาหารไว้ แล้วค่อยๆ ปลดปล่อยให้พืชในภายหลัง (มุกดา สุขสวัสดิ์, 2547) รวมทั้งยังมีการระบายน้ำและรักษาความชื้นได้ดี จึงทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม้มีการรอดชีวิตที่สูง ทั้งยังมีการเจริญและพัฒนาได้ดีอีกด้วย

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สิงโตประหลาดในสภาพปลอดเชื้อ สามารถสรุปได้ว่า การงอกของเมล็ดกล้วยไม้มีระยะพัฒนาการแบ่งได้เป็น 6 ระยะ ตั้งแต่เป็นเมล็ดจนกลายเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ โดยอาหารกึ่งแข็งสูตรดัดแปลง VW เป็นอาหารสูตรที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้ต้นอ่อนมีการเพิ่มจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด ในขณะที่อาหารสูตร Kc จะชักนำให้ต้นอ่อนมีการเจริญและการพัฒนาของความยาวยอด จำนวนราก และความยาวราก เฉลี่ยมากที่สุด และเมื่อเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 ก/ล ร่วมกับน้ำมะพร้าว 150 มล/ล จะชักนำให้มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด โดยต้นอ่อนที่ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติม TDZ 1.0 มก/ล ร่วมกับ 2,4-D 2.0 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่เฉลี่ยได้มากที่สุด (5.7 ยอดต่อชิ้นส่วน) ในขณะที่ต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม 2,4-D มก/ล เพียงอย่างเดียวกลับให้ค่าจำนวนรากมากที่สุด (25.3 ราก) ต้นอ่อนกล้วยไม้ที่ย้ายออกปลูกในวัสดุปลูกที่เป็นเวอร์มิคูไลต์ และกาบเฟินชายผ้าสีดา จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด (93 %)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้จัดสรรเงินงบประมาณรายได้ประจำปี 2552 เพื่อเป็นทุนสนับสนุนการศึกษาและทำวิจัย จนทำให้การวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กำแพง ศรีวิยะ. (2547). ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลช้าง. การศึกษาอิสระปริญญาตรี. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยนเรศวร.

จิตราพรรณ พิลึก. (2536). การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ธีราพร เมืองแก้ว, ลัมภู สุวรรณชุมภู และสิรี ชำนิบรรณการ. (2548). ผลของฮอร์โมน BAP ร่วมกับ NAAต่อ การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกล้วยไม้เอื้อง ชะนี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ธันว์ ขำทอง.(2546). การขยายพันธุ์กล้วยไม้สิงโตก้ามปูแดงและสิงโตเคราแพะโดยการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มุกดา สุขสวัสดิ์. (2547). วัสดุปลูกไม้ดอกไม้ประดับ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์บ้านและสวน บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด มหาชน, กรุงเทพฯ.

วงจันทร์ วงศ์แก้ว. (2535). หลักสรีรวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. (2546). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. สถาบันราชภัฏอุดรธานี.

สลิล สิทธิสัจจธรรม. (2549). กล้วยไม้ป่าเมืองไทย .พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์บ้านและสวน บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด มหาชน, กรุงเทพฯ.

แสงเดือน วรรณชาติ. (2549). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์กล้วยไม้เอื้องคำผักปราบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

อัจจิมา เมืองชื่น . (2548). ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการพัฒนาต้นอ่อนเอื้องชะนีในสภาพปลอดเชื้อ. การศึกษาอิสระปริญญาตรี. ภาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

Arditti, J. (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. Bot. Rev., *33*(1), 1-97.

Arditti, J. (1977). Orchid biology. Cornell University press, England.

Arditti, J. and Ernst, R. (1993). Micropropagation of Orchids. New York: John Wiley & Sons.

Dantu, P.K. and Bhojwani, S.S. (1987). *In vitro* propagation and corm formation in *Gladiolus*. Gart., *52*, 90-93.

Huetteman, C.A. and Preece, J.E. (1993*)*. Thidiazuron : A potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult., 33*, 105-119.

Knudson, L. (1946). A new nutrient for the germination of orchid seeds. Amer. *Orchid. Soc. Bull., 15*, 214-217.

Letham, D.S. (1973). Cytokinin from *Zea mays*. *Phytochemistry, 12*, 2445-2455.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*., *15*(3), 473-497.

Nayak, N.R., Rath, S.P. and Patnaik, S.N. (1997). *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium*(L.) SW., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham)SW. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. *Sci. Hortic., 71*, 243-250.

Prichard, H.W. (1989). Modern method in orchid conversation. Cambridge, Cambridge University Press, New York.

Sankhla, D. Davis, T.D. and Sankhla, N. (1996). *In vitro* regeneration of silktree (*Albizzia julibrissin*) from excised roots. Plant Cell Tiss. *Org. Cul., 44*, 83-86.

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