

บทนำ

กล้วยไม้หวาย (genus *Dendrobium* in Family Orchidaceae) เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและเป็นชนิดที่ได้รับความนิยมเนื่องจากสามารถกระจายพันธุ์กรรมได้ในพื้นที่หลากหลายและลูกผสมมีมูลค่าสูงสำหรับการส่งออกเป็นไม้ดอกไม้ประดับ (Jones *et al.*, 1998)

มีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาการขยายพันธุ์ของกล้วยไม้หวายทั้งการใช้เอ็มบริโออ่อนและแก่ โปรโตคอร์ม เมล็ด ชิ้นส่วนปลายยอด ข้อ ลำต้นเทียม และการใช้ชิ้นส่วนอื่น ๆ ของพืช (Alam *et al.*, 2002; Khentry *et al.*, 2007; Lium *et al.*, 1988; Shiau *et al.*, 2005; Sunitibala and Kishor, 2009; Zhang *et al.*, 1993) กล่าวได้มีการนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาและขยายพันธุ์กล้วยไม้หวายอย่างกว้างขวาง แต่ในกล้วยไม้สกุลอื่น เช่น กล้วยไม้สกุลช้าง ซึ่งเป็นกล้วยไม้สกุลหนึ่งที่พบตามธรรมชาติที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชียมีความโดดเด่นของรูปลักษณะที่มีลำต้น ใบ ราก ข้อดอก และดอกใหญ่กว่ากล้วยไม้ชนิดอื่น และอีกลักษณะคือการมีดอกตูมและมีลักษณะรูปร่างคล้ายหัวช้างและมีเดือยดอกคล้ายวงช้างแต่เป็นสกุลที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์เนื่องจากการลดลงของพื้นที่ป่าไม้ (Le *et al.*, 1999) พบการศึกษากล้วยไม้สกุลช้างโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีรายงานให้เห็นค่อนข้างน้อย ซึ่งส่วนหนึ่งอาจเป็นเพราะไม่พบกระจายอยู่ทั่วโลกหรืออาจกล่าวได้ว่าเป็นกล้วยไม้พื้นเมืองซึ่งมีการออกดอกเพียงปีละ 1 ครั้งทำให้การใช้ประโยชน์ยังไม่แพร่หลาย

จากงานวิจัยเกี่ยวกับกล้วยไม้สกุลช้างที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่ายังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย รวมถึงข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ สารในกลุ่มออกซิน (auxin) และ ไซโตไคนิน (cytokinin) ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากไซโตไคนินมีการนำมาใช้เพื่อการชักนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของยอดโดยการไปหยุดการพักตัวของตาข้าง หรือจุดเจริญอื่น ๆ โดยสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ 6 – benzylaminopurine (BA) (Nayak *et al.*, 2002; Tokuhara and Mii, 1993; Tokuhara and Mii, 2001) thidiazuron (TDZ) (Chen and Piluck, 1995; Roy and Banerjee, 2003) เป็นต้น ขณะที่สารในกลุ่ม ออกซินมีบทบาทหลักสองประการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช นั่นคือช่วยในการชักนำราก ได้แก่ indole acetic acid (IAA) (Dai *et al.*, 1987; Srivastava *et al.*, 1985), indole butyric acid (IBA) (James, 1983) และบทบาทอย่างที่สองในการชักนำให้เกิดแคลลัส ได้แก่ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) (Dunlap *et al.*, 1986) และ naphthalene acetic acid (NAA) (Nissen and Sutter, 1990)

ดังนั้นในการศึกษาข้อมูลระดับการใช้ออกซินและไซโตไคนินที่เหมาะสมในกล้วยไม้สกุลหวายและช้าง จะช่วยในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ตระกูลช้าง สำหรับการศึกษาผลของสารเหล่านี้ที่เกี่ยวข้องในการชักนำให้เกิดแคลลัส ทั้งนี้เป็นเพราะแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอเป็นรูปแบบการเจริญอีกรูปแบบหนึ่งของพืชที่สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในงานพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งในอนาคตจะมีส่วนช่วยในการพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้ทั้งสองสกุลซึ่งมีรูปแบบการขยายพันธุ์ และทำการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการธรรมชาติที่ต้องใช้ระยะเวลายาวนาน

กล้วยไม้ในประเทศไทย

กล้วยไม้เป็นพืชที่พบอยู่ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มพืชมีดอก (angiosperms) ซึ่งนับว่าเป็นชนิดพืชที่มีขนาดใหญ่ มีความหลากหลาย และมีความสำคัญทางพฤกษศาสตร์ รวมทั้งเป็นไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ กล้วยไม้เป็นพืชที่จัดอยู่ในอันดับ Orchidales ซึ่งในอันดับนี้มีเพียง 4 ตระกูล สำหรับกล้วยไม้จัดอยู่ในตระกูล Orchidaceae พืชในตระกูลนี้มีอยู่ประมาณ 753 สกุล ในแต่ละสกุลยังแบ่งออกเป็นชนิดต่างๆ รวมแล้วมีประมาณ 30,000 สปีชีส์ (Cronquist, 1981; Dressler, 1981) สำหรับในประเทศไทยซึ่งมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เขตร้อนชื้น พบว่ากล้วยไม้ต่าง ๆ มีการเจริญเติบโตในสภาพพื้นที่แตกต่างกันตั้งแต่สภาพป่าเขาไปจนถึงพื้นที่ระดับน้ำทะเล รวมกล้วยไม้ทั้งสิ้นกว่า 1,125 สปีชีส์ (Thaithong, 1990) โดยจำนวนกว่า 80 เปอร์เซ็นต์เป็นพวงรากอากาศ (epiphytic orchids) และที่เหลือเป็นกลุ่มกล้วยไม้ดิน (terrestrial orchids) ขณะที่พบไม่กี่สปีชีส์ที่ช่วยในการย่อยสลาย (saprophytic orchids) (Nanakorn and Indhamusika, 1999) โดยกล้วยไม้สกุลที่สำคัญ ได้แก่ *Dendrobium* spp., *Bulbophyllum* spp., *Eria* spp., *Habenaria* spp., *Coelogyne* spp., *Cymbidium* spp., *Paphiopedilum* spp., *Vanda* spp., *Aerides* spp., *Rhynchostylis* spp. and *Spathoglottis* spp.

กล้วยไม้สกุลช้างที่พบตามธรรมชาติมี 4 ชนิด ได้แก่ ช้าง (ช้างกระ, *Rhynchostylis gigantea*; ช้างแดง, *R. gigantea* var. *rubrum*; ช้างเผือก, *R. gigantea* var. *harrisonianum*) ไอยเรศหรือพวงมาลัย (*Rhynchostylis retusa*) เขากะ (*Rhynchostylis coelestis*) และช้างฟิลิปปินส์ (*Rhynchostylis violacea*) โดย 3 ชนิดแรกมีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง ส่วนช้างฟิลิปปินส์มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศฟิลิปปินส์ สำหรับกล้วยไม้ช้าง ในประเทศไทย พบกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในแถบภาคเหนือ เช่น เชียงใหม่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น หนองคาย มุกดาหาร สกลนคร เลย นครราชสีมา ต่ำลงมาถึงตอนเหนือของภาคกลาง เช่น นครสวรรค์ ชัยนาท และภาคตะวันออก เช่น ปราจีนบุรี และแถบจังหวัดกาญจนบุรี และพบขึ้นกระจายทั่วไปในป่าที่มีระดับความสูงประมาณ 260-350 เมตรจากระดับน้ำทะเล (นิรนาม, 2552)

ลักษณะของกล้วยไม้ช้างมีความเหมือนเทียบกับกล้วยไม้ในสกุลเดียวกันคือมีการขยายพันธุ์โดยใช้ลำลูกกล้วยหรือหัวเทียม (pseudobulbs) แต่โดยธรรมชาติแล้วการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการนี้เป็นไปได้ช้าเนื่องจากเมล็ดของกล้วยไม้นั้นมีขนาดเล็กและไม่มีเอ็นโดสเปิร์มและในธรรมชาติสามารถดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัย (symbiotic) กับเชื้อราบางชนิดในการงอก (Thomas and Michael, 2007) นอกจากนี้ยังพบการแบ่งตัวเพื่อสร้างลำลูกกล้วยซ้ำ ทำให้ต้องใช้เวลามาก ดังนั้นเทคนิคการงอกแบบไม่พึ่งพา (asymbiotic) โดยการเพาะเลี้ยงแบบปลอดเชื้อจึงน่าจะเข้ามามีบทบาทในการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลช้าง เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น ๆ ที่เริ่มมีการใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกันอย่างกว้างขวางภายหลังจาก Knudson (1946) ได้นำเสนอเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นต้นมา

อย่างไรก็ตามการศึกษากล้วยไม้สกุลช้างโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีรายงานให้เห็นค่อนข้างน้อย ซึ่งส่วนหนึ่งอาจเป็นเพราะเป็นสกุลที่ไม่พบกระจายอยู่ทั่วโลกหรืออาจกล่าวได้ว่าเป็นกล้วยไม้พื้นเมืองซึ่งมีการออกดอกเพียงปีละ 1 ครั้งทำให้การใช้ประโยชน์ยังไม่แพร่หลาย ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยง

กล้วยไม้สกุลช้าง เช่น การศึกษาการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ช้างแดง (วุฒิชัย และ สมปอง, 2551) การศึกษาการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้ชิ้นส่วนของใบและรากของกล้วยไม้ช้างกลุ่มไอยเรศ (Vij *et al.*, 1984, 1987) และการศึกษาการควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดและการชักนำให้เกิดหลายยอดในกล้วยไม้ช้างกลุ่มไอยเรศโดยใช้ immature seeds (Thomas and Michael, 2007) เป็นต้น

การสร้างแคลลัส

แคลลัส (callus) หมายถึงเซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์พาราเมตาไคมาแต่เพียงอย่างเดียว มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอลจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรพลาสต์ สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ และฟลาโวกินีอยด์ หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน โดยปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดพืช ธาตุอาหาร สภาพในการเพาะเลี้ยง แสง โดยเซลล์ที่เกาะกันแน่น เรียกว่า compact callus แต่ถ้าเกาะกันอย่างหลวม ๆ เรียกว่า friable callus โดยประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงแคลลัสมีมากมาย ทั้งเพื่อการขยายพันธุ์ การผลิตโปรโตพลาสต์ เพื่อการผลิตสารเคมีที่ได้จากกระบวนการเมตาโบลิซึม การผลิตพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด การผลิตพืชเพื่อให้ทนทานหรือพืชต้านทาน และการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กรรมเป็นต้น (รังสฤษดิ์, 2541) โดยเนื้อเยื่อที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัส ควรเป็นเนื้อเยื่อที่มีอายุน้อย ซึ่งในทางปฏิบัตินิยมใช้เนื้อเยื่อจากเมล็ด โดยการชักนำให้เกิดแคลลัสโดยตรง หรือโดยการชักนำให้เกิดส่วนของราก ยอด และใบในที่ปลอดเชื้อ เพื่อนำมาชักนำแคลลัส หรือการแยกเอาเนื้อเยื่อจากส่วนของรากและปลายยอด ออกมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำแคลลัสโดยตรง เช่น การชักนำให้เกิดแคลลัสในกล้วยไม้มีการศึกษาจากหลายแหล่ง ได้แก่ ใบ ปลายราก และ ลำต้น (Chen and Chang, 2000b; Wu *et al.*, 2004) แต่ไม่พบการศึกษาในสกุลช้าง ซึ่งแต่ละวัตถุดิบที่นำมาทำการเพาะเลี้ยงต้องอาศัยปัจจัยหลายด้าน ทั้งในส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งพบว่าหากสัดส่วนของฮอร์โมนออกซิน มีความสมดุลกับฮอร์โมนไซโตไคนินแล้วจะมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัส โดยที่ความเข้มข้นที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่าง ๆ นั้นพบว่า ออกซินจะอยู่ในช่วง 0.01-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนตินซึ่งเป็นไซโตไคนินสังเคราะห์จะอยู่ในช่วง 0.1-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นกับชนิดพืช ชนิดชิ้นส่วน และระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ประโยชน์ (รังสฤษดิ์, 2541)

การศึกษาการควบคุมการเจริญเติบโตในกล้วยไม้เพื่อชักนำแคลลัส

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ฮอร์โมนหรือสารเร่งการเจริญเติบโต (growth regulator) ที่นิยมใช้กันมากมี 2 กลุ่ม ได้แก่ ออกซิน และไซโตไคนิน ออกซินช่วยให้เซลล์ยึดตัวและเกิดราก ส่วนไซโตไคนินช่วยให้เกิดการแบ่งเซลล์และเกิดยอด โดยทำหน้าที่ในการไปทำให้พืชหลุดจากการพักตัวของตาข้าง หรือเนื้อเยื่อเจริญที่เกิดภายหลัง ความจริงแล้วสารทั้งสองกลุ่มนี้จะมีปฏิกริยาร่วมกันและยังได้รับอิทธิพลจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อมอีกด้วย เช่น แสงและอุณหภูมิ ไม่ว่าจะเป็นกรณีใดก็ตามสิ่งที่สำคัญที่สุดคือ อาหารจะต้องมีอัตราส่วนและชนิดของฮอร์โมนที่เหมาะสมที่สุด สำหรับพืชแต่ละชนิดที่นำมาเพาะเลี้ยง ชิ้นพืชที่นำมาเลี้ยง

อาจมีออกซินหรือไซโตไคนินอยู่ในเนื้อเยื่ออยู่แล้วจำนวนหนึ่ง หรือเนื้อเยื่อเหล่านั้นสามารถสังเคราะห์ฮอร์โมนขึ้นมาเองก็ได้ การเจริญของชิ้นพืชในอาหารเพาะเลี้ยง อาจจะมีขึ้นโดยไม่ต้องมีออกซินหรือไซโตไคนิน หรืออาจจะต้องการออกซินหรือไซโตไคนินอย่างใดอย่างหนึ่ง หรืออาจจะต้องการทั้งออกซินและไซโตไคนินก็ได้ (ศิวพงศ์, 2546)

Nasiruddin *et al.* (2003) รายงานว่าการชักนำแคลลัสจากใบของกล้วยไม้ *Dendrobium formosum* จะเกิดได้เร็วที่สุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่มีการเติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนกล้วยไม้ *Cymbidium* พบว่าในการเพาะเลี้ยงด้วยสูตร VW (Vacin and Went, 1949) ที่มีการเติมด้วย NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (Thidiazuron) จะสามารถชักนำให้กล้วยไม้สร้างแคลลัสได้ดีที่สุด (Huan *et al.*, 2004) เช่นเดียวกัน พบว่าการใช้ TDZ ร่วมกับ 2,4-D มีความจำเป็นสำหรับการสร้างแคลลัสในกล้วยไม้ *Cymbidium* และ *Oncidium* (Chang and Chang, 1998; Chen and Change, 2000b) โดย TDZ เป็นสารเคมีที่มีการแทนที่กลุ่ม phenyl urea ด้วยการทำงานที่คล้ายกับไซโตไคนิน ใช้ในการชักนำต้นพืชหลาย ๆ ชนิด รวมไปถึงการสร้างอวัยวะ (organogenesis) และการส่งเสริมให้เกิดการสร้างยอดในการเพาะเลี้ยงแบบปลอดเชื้อในกล้วยไม้หลายสปีชีส์ (Huetteman and Preece, 1993)

แต่อย่างไรก็ตามหากมีการศึกษาในพืชต่างพันธุ์จะตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันเมื่อมีการใช้ระยะการเจริญของพืชที่ต่างกันมาเป็นชิ้นส่วนในการเพาะเลี้ยง (Chen *et al.*, 2004) จากผลการศึกษาในกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ พบว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสเองสามารถทำได้ในสูตรอาหารได้หลากหลาย เช่น MS, VW, Kundson's C (KC) (Knudson, 1946), New Dogashima (ND) (Tokuhara and Mii, 1993) ซึ่งแต่ละสูตรอาหารก็มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมมีความสำคัญต่อการเพิ่มปริมาณ และปรับคุณภาพของการเลี้ยงแคลลัสได้ (Jitsopakol, 2008)

โซมาติกเอ็มบริโอ

โซมาติกเอ็มบริโอคือเอ็มบริโอที่พัฒนามาจากเซลล์ร่างกาย ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (รวมทั้งเอ็มบริโอที่เกิดโดยไม่มีการผสมพันธุ์) นั่นคือมีส่วนที่จะกลายเป็นรากและเป็นยอด อันเป็นลักษณะของไซโกติกเอ็มบริโอ ภายในเมล็ดพืชนั่นเอง ซึ่งการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใด ๆ ของพืชเพื่อให้เกิดไซโกติกเอ็มบริโอโดยตรง โดยไม่ต้องผ่านเนื้อเยื่อชนิดอื่นก่อน นอกจากจะสามารถลดขั้นตอนการได้มาซึ่งต้นพืชอันเป็นเป้าหมายสุดท้ายแล้ว ยังลดโอกาสการเกิดการกลายพันธุ์ได้ด้วย ดังนั้นหากวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์ให้ตรงตามพันธุ์แล้ว การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งของการขยายพันธุ์พืชในห้องปฏิบัติการ โซมาติกเอ็มบริโอมักจะพัฒนามาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว โดยสามารถแบ่งตามชนิดของการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ 2 ชนิด คือ การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรง (direct somatic embryogenesis) ที่เป็นการพัฒนาของคัพภะมาจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง และการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอทางอ้อม (indirect somatic embryogenesis) ที่เป็นการพัฒนามาจากแคลลัสก่อนแล้วจึงเกิด nonzygotic embryo อีกทีหนึ่ง (ปิยะดา และอารีย์, 2552)

สำหรับการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้ส่วนของใบเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่เติมไซโตไคนินชนิดต่าง ๆ (2iP, BA, Kinetin, TDZ และ Zeatin) ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าสูตรอาหารที่เติม TDZ 18.16 ไมโครโมลาร์ชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุดเช่นเดียวกัน (Chung *et al.*, 2005) ซึ่ง Chen *et al.* (1999) พบว่าการใช้ TDZ อย่างเดียว (1/2 MS + TDZ 1 หรือ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ผลในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอโดยตรงจากชิ้นส่วนใบได้ดีกว่าการใช้ 2,4-D หรือดีกว่าการใช้ TDZ ร่วมกับ 2, 4-D เนื่องจากผลของไซโตไคนินทั้งสองชนิดอาจเกิดการหักล้างกัน และในการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตอาจส่งผลต่อการกลายพันธุ์ที่เรียกว่าการเกิดความแปรปรวนของส่วนขยายที่มาจากเซลล์โซมาติก (somaclonal variation) ซึ่งเกิดได้ในพืชหลายชนิด และการใช้ TDZ ที่ความเข้มข้นสูง ๆ บางครั้งจะให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาผิดปกติรวมทั้งไปมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของยอดด้วยเช่นเดียวกัน (Hutteman and Preece, 1993)

นอกจากนี้พบว่ามีสารอินทรีย์ในกลุ่มที่ไม่สามารถบ่งชี้องค์ประกอบได้และความแปรปรวน ที่มีการนำมาใช้ในกล้วยไม้และพืชชนิดอื่น ๆ เช่น yeast extract น้ำมะพร้าว กล้วย (Decruse *et al.*, 2003; Ernst, 1994) และมันฝรั่งบด (Chuang *et al.*, 1978; McGregor and McHughen, 1990; Sopory *et al.*, 1978) โดยน้ำมะพร้าวจะมีทั้งส่วนของออกซินและไซโตไคนินและประสบความสำเร็จในการนำมาใช้เพาะเลี้ยงกล้วยไม้ ได้แก่ *Cymbidium* (Huan *et al.*, 2004), *Aerdes crispum* (Sheelavanthmath *et al.*, 2005),

Dendrobium fimbriatum (Roy and Banerjee, 2003) and Aranda Deborah (Lakshmanan *et al.*, 1995)

คำสำคัญ

ภาษาไทย : กล้วยไม้หวาย กล้วยไม้ช้างเผือก โสมatikเอ็มบริโอ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

ภาษาอังกฤษ : *Dendrobium* spp., *Rhynchostylis gigantea* var. *harrisonianum*, somatic embryo, plant growth regulator,

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Symbols and Abbreviations)

ANOVA	Analysis of variance
BA	6 – benzylaminopurine; N6-benzyladenine
CRD	Completely Randomized Design
CW	Coconut water
2,4-D	2,4-dichlorophenoxy acetic acid
DMRT	Duncan's New Multiple Range Test
IAA	Indol acetic acid
IBA	Indole - 3 - butyric acid
MS	Murashige and Skoog medium
NAA	Naphthalene acetic acid
NDM	New Dogashima Medium
TDZ	Thidiazuron
VM	Vacin and Went medium

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

ศึกษาการชักนำแคลสและโซมาติกเอ็มบริโอทั้งในกล้วยไม้สกุลหวายและกล้วยไม้ตระกูลช้างซึ่งทั้งสองสกุลแม้จะมีความแตกต่างและอาจไม่สามารถนำมาเทียบผลของการใช้ฮอร์โมนได้โดยตรงเนื่องจากการมีพันธุกรรมที่ห่างไกลกันแต่ข้อมูลที่ได้จะมีประโยชน์เช่นเดียวกัน โดยสำหรับกล้วยไม้สกุลหวายเป็นตัวแทนกล้วยไม้ที่มีการใช้ประโยชน์มากและมีการศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างกว้างขวาง ขณะที่ผลการศึกษาเกี่ยวกับกล้วยไม้สกุลช้างอาจมีส่วนช่วยในการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลนี้ซึ่งมีการขยายพันธุ์และเจริญเติบโตได้ช้าเมื่อเทียบกับกล้วยไม้ชนิดอื่น ด้วยเหตุนี้ในการศึกษาจึงใช้ต้นอ่อนกล้วยไม้จากบริษัทที่มีความสม่ำเสมอทางพันธุกรรมแต่ทำให้ต้นทุนค่อนข้างสูง ดังนั้นการทดลองจึงประกอบด้วย 2 การทดลอง ได้แก่ การทดลองในกล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุล และการทดลองในกล้วยไม้สกุลช้าง

การทดลองที่ 1

ผลของไซโตไคนินต่อการชักนำแคลสและโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงในกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล

1. พืชที่ใช้ในการศึกษา

- 1.1 โปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุล NO. BIG – 193 (น้ำเงิน – ชมพู) (วางเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่มีฮอร์โมน ประมาณ 2 อาทิตย์ก่อนการศึกษา)
- 1.2 ต้นอ่อนกล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุล NO. BIN – 11 (ชมพูเข้ม) (วางเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่มีฮอร์โมน ประมาณ 2 อาทิตย์ก่อนการศึกษา)

2. สูตรอาหาร

สูตรอาหารในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงจากชิ้นส่วนใบ ได้แก่

สูตรอาหารที่ 1 ½ MS

สูตรอาหารที่ 2 ½ MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 3 ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 4 ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 5 ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 6 ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารชักนำแคลสจากโปรโตคอร์ม ได้แก่

สูตรอาหารที่ 1 ½ MS เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 2 ½ MS เติม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 3 ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 4 ½ MS เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
 สูตรอาหารที่ 5 ½ MS เติม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
 สูตรอาหารที่ 6 ½ MS เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
 สูตรอาหารที่ 7 ½ MS เติม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จัดแบ่งกลุ่มอาหารเพื่อเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นตามตารางภาคผนวกที่ 1 ในระดับความเข้มข้น (stock) ที่เหมาะสมแล้วการเตรียมอาหารมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ดูดสารละลาย stock solutions ต่างๆ มารวมกัน โดยใช้ปริมาตรในแต่ละ stock ตามที่คำนวณไว้
2. เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส
3. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสารเคมีอื่นๆ ตามความต้องการของสูตรอาหาร
4. ปรับปริมาณสารละลายอาหารให้ได้ครบตามที่ต้องการ เติมน้ำในกรณีเตรียมอาหารกึ่งแข็งหรือแข็ง
5. เคี่ยวอาหารเพื่อนำให้ละลายโดยใช้เตาไฟฟ้า
6. ปรับค่าความเป็นกรดและด่างด้วยกรดเกลือ (1 M HCl) และโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (1 M NaOH) ให้ได้ pH = 5.5
7. เทอาหารลงในภาชนะที่จะใช้เลี้ยงโดยในการทดลองนี้ใช้ขวดขนาด 4 ออนซ์ และ จานเพาะเลี้ยง
8. นำภาชนะอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 psi (ปอนด์/ตารางนิ้ว) อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็น

4. สถานที่ทำการวิจัย ทดลอง หรือเก็บข้อมูล

ห้องปฏิบัติการชีววิทยาและเคมี ตึกปฏิบัติการคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร
 มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

5. ระยะเวลาการทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

เริ่มทำการวิจัย เดือน มีนาคม พ.ศ. 2552 ถึง เดือน กันยายน พ.ศ. 2552 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัย

7 เดือน

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาตำแหน่งใบและลักษณะการวางเลี้ยงแผ่นใบต่อการเกิดໄໝຕົກເອີມບຣີໂອ ໃນໄກ່ໄມ້ຫຼ້າຍເອີຍສຸກ

1. การทดลองและสูตรอาหาร

ทำการศึกษาตำแหน่งของใบและลักษณะการวางเลี้ยงที่มีผลต่อการเกิดໄໝຕົກເອີມບຣີໂອ โดยทำการศึกษาและวิเคราะห์แยกใน 2 การทดลอง ได้แก่ การคว่ำแผ่นใบซึ่งเป็นการวางด้านท้องใบ (abaxial side หรือ lower surface) ให้สัมผัสอาหาร และการหงายแผ่นใบซึ่งเป็นการวางด้านหลังใบ (adaxial side หรือ upper surface) ให้สัมผัสอาหาร ตามลำดับ โดยวางชิ้นส่วนที่ได้จากการตัดลงบนอาหารจำนวน 8 ชิ้น ต่อขวด 4 ออนซ์ ในสภาพที่ได้รับแสงและอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นทำการ บันทึกผล เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดໄໝຕົກເອີມບຣີໂອและลักษณะอื่นๆ

การชักนำให้เกิดໄໝຕົກເອີມບຣີໂອจากชิ้นส่วนร่างกายของพืชหรือໄໝຕົກເອີມບຣີໂອโดยตรงจากชิ้นส่วนใบ ศึกษาจากการตัดแบ่งใบของໄກ່ໄມ້ຫຼ້າຍເອີຍສຸກที่มีขนาดความยาวประมาณ 1.0 เซนติเมตร แยกส่วนของ โคน และปลายใบให้มีขนาดอย่างละประมาณ 0.5 เซนติเมตร เพื่อนำไปชักนำให้เกิดໄໝຕົກເອີມບຣີໂອโดยตรงบนอาหาร 6 สูตร ได้แก่

สูตรอาหารที่ 1 ½ MS

สูตรอาหารที่ 2 ½ MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 3 ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 4 ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 5 ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 6 ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การวิเคราะห์ข้อมูล

แต่ละการทดลองทำการศึกษา 1 ปัจจัย คือ สูตรอาหารแบ่งเป็น 6 กลุ่มทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ศึกษาทรีตเมนต์ละ 14 ซ้ำ สำหรับชักนำໄໝຕົກເອີມບຣີໂອ จากชิ้นส่วนใบในการวางแบบลักษณะต่าง ๆ

การทดลองที่ 1.2 การชักนำให้เกิดแคลลัสของໄກ່ໄມ້ຫຼ້າຍເອີຍສຸກ

1. สูตรอาหาร

การชักนำแคลลัสໄກ່ໄມ້จากໂປຣຕີໂຄຣມ โดยนำໂປຣຕີໂຄຣມໄກ່ໄມ້ສຸກໄກ່ໄມ້ຫຼ້າຍເອີຍສຸກไปชักนำให้เกิดแคลลัสลงบนอาหาร 7 สูตร ได้แก่

สูตรอาหารที่ 1 ½ MS เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 2 ½ MS เติม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 3 ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 4 ½ MS เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 5 ½ MS เติม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 6 ½ MS เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 7 ½ MS เติม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยวางโปรโตรคอร์มบนอาหาร 18 ชิ้นต่อ 1 จานเพาะเลี้ยงในสภาพที่ไม่ได้รับแสง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นทำการบันทึกผลเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส น้ำหนักสด สี และขนาดของแคลลัส

2. การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการศึกษา 1 ปัจจัย คือ สูตรอาหารแบ่งเป็น 7 กลุ่มทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ หรือ CRD ศึกษาทรีตเมนต์ละ 12 ซ้ำ สำหรับชักนำแคลลัสจากโปรโตคอร์ม

ข้อมูลของทั้งสามการทดลองนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และการทดลองที่พบความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์ จะมีการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองด้วยวิธีดีตันแคน (Duncan's New Multiple Range Test; DMRT) จากโปรแกรม R

การทดลองที่ 2

ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงในกล้วยไม้ช้างเผือก

1. พืชทดลอง

โปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างเผือก (เลี้ยงในอาหารสูตร VW ที่ไม่มีฮอร์โมน)

ต้นอ่อนกล้วยไม้ช้างเผือก (เลี้ยงในอาหารสูตร VW ที่ไม่มีฮอร์โมน)

2. อาหารสูตรพื้นฐาน ได้แก่ สูตร ½ MS

3. สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA

สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ TDZ

สูตรอาหารที่ 1 ½ MS

สูตรอาหารที่ 2 ½ MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 3 ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 4 ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 5 ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 6 ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. ลักษณะที่ทำการศึกษา

เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนใบ/ปลายใบ/โคนใบ ที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

จำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอบริเวณปลายใบ/โคนใบ

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทุกการทดลองนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และนำลักษณะที่พบความแปรปรวนเนื่องจากปัจจัยที่ศึกษามาเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองโดยวิธีดีเอ็นแคน (DMRT) จากโปรแกรม R

6. สถานที่ทำการวิจัย ทดลอง หรือเก็บข้อมูล

ห้องปฏิบัติการชีววิทยาและเคมี ดิถีปฏิบัติการคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

7. ระยะเวลาการทำวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

เริ่มทำการวิจัย เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2552 ถึง เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2554

การทดลองที่ 3

ผลของน้ำมะพร้าวร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการลดอาการสึ้นน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ช้างเผือก

1. พืชทดลอง

โปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างเผือก (วางเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่มีฮอร์โมน ประมาณ 2 อาทิตย์ก่อนการศึกษา)

ต้นอ่อนกล้วยไม้ช้างเผือก (วางเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่มีฮอร์โมน ประมาณ 2 อาทิตย์ก่อนการศึกษา)

2. อาหารสูตรพื้นฐาน ได้แก่ ½MS

3. สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA

สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ TDZ

สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ น้ำมะพร้าว

4. วางแผนการทดลอง

จากการศึกษาที่พบว่าสูตรอาหาร พันธุกรรม ชนิดของชิ้นส่วนพืชและอายุ มีผลต่อการสร้างสารประกอบฟีนอล (Ozyigit *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2000; Kumria *et al.*, 2003; Lorenzo and Angeles, 2001) อย่างไรก็ตามแม้ว่าการลดการเกิดสึ้นน้ำตาลจะเป็นวัตถุประสงค์หนึ่งของการศึกษาแต่ประสิทธิภาพของการชักนำให้เกิดโคมاتิกเอ็มบริโอก็เป็นวัตถุประสงค์หลักอีกประการหนึ่ง ดังนั้นการศึกษาที่ผ่านมามีการใช้สาร BA และ IBA ที่พบการเกิดสึ้นน้ำตาล ประกอบกับการศึกษาการชักนำโคมاتิกเอ็มบริโอ ของกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้ส่วนของใบที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร ½ MS ที่เติมไซโตไคนินชนิดต่างๆ (2iP, BA, Kinetin, TDZ และ Zeatin) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าสูตรอาหารที่เติม TDZ สามารถชักนำให้เกิดโคมاتิกเอ็มบริโอได้ดีที่สุด (Chen *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2005) นอกจากนี้พบว่ามีสารอินทรีย์ในกลุ่มที่ไม่สามารถบ่งชี้องค์ประกอบได้และความแปรปรวน ที่มีการนำมาใช้ในกล้วยไม้และพืช

ชนิดอื่น ๆ เช่น น้ำมะพร้าว (Decruse *et al.*, 2003; Ernst, 1994) ซึ่งมีทั้งส่วนของออกซินและไซโตไคนิน และประสบความสำเร็จในการนำมาใช้เพาะเลี้ยงกล้วยไม้หลายชนิด (Lakshmanan *et al.*, 1995; Roy and Banerjee, 2003; Huan *et al.*, 2004; Sheelavanthmath *et al.*, 2005) ดังนั้นการศึกษานี้จึงประกอบด้วยสูตรอาหารที่มีการเติมและไม่เติมสาร 3 ปัจจัย ได้แก่ น้ำมะพร้าว NAA และ TDZ และเพื่อป้องกันการเกิดสีน้ำตาล ภายหลังการเพาะในอาหารสูตรปกติแล้ว 1 เดือน จะทำการย้ายลงอาหารสูตรเดิมที่เติมผงถ่านเป็นตัวดูดซับอีกครั้งและทำการวัดผลอีกครั้งหนึ่ง

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 2 x 4 Factorial in Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 10 ซ้ำ (จำนวนชิ้นส่วนพืช 20 ชิ้นต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง คือ 1 ซ้ำ) ดังนั้นจึงมีทั้งหมด 16 ทรีตเมนต์ สำหรับ 3 ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของน้ำมะพร้าว (% Coconut Water; CW) ได้แก่

0 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (%)

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของ NAA ได้แก่

0 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปัจจัยที่ 3 ความเข้มข้นของ TDZ ได้แก่

0, 0.1, 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ดังนั้น 16 ทรีตเมนต์ ได้แก่

1. ½MS
2. ½MS เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. ½MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
4. ½MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
5. ½MS เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
6. ½MS เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
7. ½MS เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
8. ½MS เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
9. ½MS เติม 10 % CW
10. ½MS เติม 10 % CW ร่วมกับ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
11. ½MS เติม 10 % CW ร่วมกับ TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
12. ½MS เติม 10 % CW ร่วมกับ TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
13. ½MS เติม 10 % CW ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
14. ½MS เติม 10 % CW ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
15. ½MS เติม 10 % CW ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
16. ½MS เติม 10 % CW ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยนำชิ้นส่วนกล้วยไม้วางเลี้ยงในอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอทั้ง 16 สูตร โดยไม่ได้มีการเติมผงถ่าน วันที่ 7 มิถุนายน 2553 โดยแยกเป็นปลายใบ และโคนใบ โดยการวางแบบคว่ำใบ จากนั้นทำการบันทึกผลการทดลองลักษณะปรากฏต่าง ๆ ของชิ้นส่วนใบ เมื่อวันที่ 10 กรกฎาคม 2553 หรือประมาณ 4 อาทิตย์ หลังการเพาะเลี้ยง

จากนั้นนำชิ้นส่วนปลายใบและโคนใบย้ายลงอาหารทั้ง 16 สูตรอีกครั้งแต่มีการเติม 2 เปอร์เซ็นต์ ผงถ่าน ในวันที่ 13 กรกฎาคม 2553 จากนั้นทำการเก็บข้อมูลการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอในวันที่ 1 สิงหาคม 2553 หรืออีกประมาณ 2 สัปดาห์หลังจากการเติมผงถ่าน

5. ลักษณะที่ทำการศึกษา

เปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำตาลบนชิ้นส่วนพืช

เปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

การเกิดสีเขียวของชิ้นส่วนพืช

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทุกการทดลองนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และนำลักษณะที่พบความแปรปรวนเนื่องจากปัจจัยที่ศึกษามาเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองโดยวิธีดันแคน (DMRT) จากโปรแกรม R

7. สถานที่ทำการวิจัย ทดลอง หรือเก็บข้อมูล

ห้องปฏิบัติการชีววิทยาและเคมี ตึกปฏิบัติการคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

8. ระยะเวลาการทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

เริ่มทำการวิจัย เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2552 ถึง เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2554

ผลการวิจัยและวิจารณ์

การทดลองที่ 1

ผลของไซโตไคนินต่อการชักนำแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงในกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาดำรงใบและลักษณะการวางเลี้ยงแผ่นใบต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอในกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล

การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงจากชิ้นส่วนปลายใบและโคนใบของกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล ในลักษณะการวางคว่ำและหงายชิ้นส่วนใบบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 8 และ 10 สัปดาห์ ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 1-12 และภาพที่ 1-2

การวางในลักษณะคว่ำใบ

ผลการศึกษา พบว่าเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนใบที่รอดชีวิตเมื่อมีการวางในลักษณะคว่ำใบในอาหารชักนำ เพื่อให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ทั้ง 6 สูตร ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่าชิ้นส่วนใบมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (ตารางที่ 1) โดยพบว่าการเติม TDZ ในทุกความเข้มข้นทั้งที่มีหรือไม่มีการเติมร่วมกับ NAA พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของใบสูงกว่าการไม่เติม TDZ แสดงว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของชิ้นส่วนใบสูงกว่าการเติม NAA และการเติมฮอร์โมนทั้งสองชนิดร่วมกันไม่ได้มีผลส่งเสริมกันในการเพิ่มเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเพิ่มขึ้นจากการเติม TDZ เพียงอย่างเดียว

เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนใบที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอภายหลังการชักนำในอาหารทั้ง 6 สูตรพบค่าต่ำ คือ อยู่ระหว่าง 0.89-8.04 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2) เมื่อทำการศึกษาแยกระหว่างปลายใบและโคนใบ พบว่าเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนของปลายใบและโคนใบไม่มีความแตกต่างระหว่างสูตรอาหารทั้ง 6 สูตร เช่นเดียวกันกัน (ตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ) แต่จากผลการศึกษาพบว่า การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอบนชิ้นใบเป็นผลมาจากความสามารถในการเกิดโซมาติกของชิ้นส่วนโคนใบเป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่โดยที่อาหารสูตรที่ 4 คือ $\frac{1}{2}$ MS ที่มีการเติม TDZ 3 มิลลิกรัม มีแนวโน้มการเกิดจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อชิ้นส่วนใบที่รอดชีวิตมีค่าสูงทั้งส่วนบริเวณปลายใบ (0.30 โซมาติกเอ็มบริโอ) และโคนใบ (0.85 โซมาติกเอ็มบริโอ) เมื่อทำการวางเลี้ยงแบบคว่ำใบ (ตารางที่ 5 และ ตารางที่ 6) สำหรับชิ้นส่วนโคนใบ พบว่ามีอาหารชักนำหลายสูตรที่สามารถพบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูง ได้แก่ สูตรที่ 3 และ 6 ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ร่วมกับการพบเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนโคนใบที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงในอาหารสูตรที่ 4 แล้วอาจกล่าวได้ว่าอาหารสูตรที่มีการเติม TDZ มีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาร่วมกันระหว่างจำนวนชิ้นส่วนโคนใบที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอร่วมกับจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่เกิดต่อชิ้นส่วนโคนใบจะเห็นได้ว่าการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอจะเกิดกับชิ้นพืชจำนวนน้อย แต่เมื่อมีความพร้อมในการเกิดในชิ้นส่วนใดแล้วจะสามารถสร้างโซมาติกเอ็มบริโอต่อชิ้นได้จำนวนมาก โดยการสร้าง

โซมาติกเอ็มบริโอได้มากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เช่น ตำแหน่งและระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนใบที่นำมาใช้เริ่มต้น และปริมาณสัดส่วนฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโซมาติกเอ็มบริโอ (คำนูน, 2542; รังสฤษดิ์, 2540) โดยชิ้นส่วนใบที่ใช้ในการศึกษานี้ มีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของใบอ่อนที่มีเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตอยู่มาก และบริเวณโคนของชิ้นส่วนใบที่สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้มากนั้น อาจเนื่องมาจากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ที่นำมาใช้ทำการศึกษานั้น ซึ่งมีความยาววัยอยู่ประกอบกับชิ้นส่วนโคนใบมีการสร้างรอยตัด 2 ทาง ซึ่งพบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอตรงบริเวณรอยตัดดังกล่าว ขณะที่ชิ้นส่วนปลายใบ จะเกิดรอยตัด 1 รอย ด้านในโอกาสในการเกิดโซมาติกเอ็มบริโออาจจะน้อยกว่าโคนใบ

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนใบที่รอดชีวิตเมื่อวางแบบคว่ำใบในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนชิ้นส่วนใบ ทั้งหมด	จำนวนชิ้นส่วนใบ ที่รอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนใบที่รอด ชีวิต ⁺ (ค่าจริงก่อนแปลงข้อมูล)
1. ½ MS	104	80	1.87 ^{ab} ±0.10 (76.92)
2. ½ MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	96	71	1.79 ^b ±0.33 (73.95)
3. ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	112	105	1.97 ^a ±0.03 (93.75)
4. ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	112	105	1.97 ^a ±0.03 (93.75)
5. ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	112	105	1.97 ^a ±0.04 (93.75)
6. ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA	112	90	1.93 ^a ±0.06 (80.35)
F-test			**

หมายเหตุ ** แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ($P < 0.01$)

a, b และ c ตัวอักษรต่างกันในสัณฐานเดียวกันแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ($P < 0.01$)

⁺ ข้อมูลผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการแปลงข้อมูลโดยการ take log

(ผลการทดลองนำข้อมูลที่ได้มาทำการ take log เนื่องจากเมื่อทำการทดสอบความเท่ากัน (homogeneity) ของข้อมูลแล้วพบว่ามีค่าแปรปรวนไม่เท่ากันในทั้ง 6 สูตรอาหาร โดยการแปลงเป็นค่าลอการิทึม ($\log x$) ใช้ในกรณีที่ค่าเฉลี่ยเป็นสัดส่วนกับกำลังสองของค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ เช่น ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตหรือข้อมูลจากการวัดอื่น ๆ)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนใบที่เกิดໂໝາດິກເອັມບຣີໂອເມື່ອວາງແບບຄວ່າໂປໃນອາຫານເພາະເລີຍສູຕຣຕ່າງ ໆ ເປັນເວລາ 8 ສັບດາຫໍ້

ສູຕຣາຫານ	ຈຳນວນຊີ້ນສ່ວນໂປ ທັງໝົດ	ຈຳນວນຊີ້ນສ່ວນໂປທີ່ ເກີດໂໝາດິກ ເອັມບຣີໂອ	ເປີເຊັນຕ໌ຊີ້ນສ່ວນໂປທີ່ເກີດ ໂໝາດິກເອັມບຣີໂອ ⁺ (ຄ່າຈິງກ່ອນແປງຂໍ້ມູນ)
1. ½ MS	104	2	0.16±0.41 (1.92)
2. ½ MS ເຕີມ NAA 0.1 ມິລລິກຣັມຕໍ່ລິຕຣ	96	2	0.18±0.42 (2.08)
3. ½ MS ເຕີມ TDZ 1 ມິລລິກຣັມຕໍ່ລິຕຣ	112	6	0.35±0.59 (5.36)
4. ½ MS ເຕີມ TDZ 3 ມິລລິກຣັມຕໍ່ລິຕຣ	112	5	0.31±0.63 (4.46)
5. ½ MS ເຕີມ TDZ 1 ມິລລິກຣັມຕໍ່ລິຕຣ ຮ່ວມກັບ NAA 0.1 ມິລລິກຣັມຕໍ່ລິຕຣ	112	1	0.07±0.29 (0.89)
6. ½ MS ເຕີມ TDZ 3 ມິລລິກຣັມຕໍ່ລິຕຣ ຮ່ວມກັບ NAA 0.1 ມິລລິກຣັມຕໍ່ລິຕຣ NAA	112	9	0.51±0.64 (8.04)
F-test			ns

ໝາຍເຫດຸ ns ແສດງຄ່າທີ່ໄມ່ແຕກຕ່າງອ່າງມີນັຍສຳຄັຍທາງສຸດທິທີ່ຣະດັບຄວາມເຊື່ອມັ້ນ 95 % (P>0.05)

⁺ ຂໍ້ມູນຜລກາວິເຄຣາະໄດ້ຈາກການແປງຂໍ້ມູນໂດຍການ take log

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนปลายใบที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในเมื่อวางแบบคว่ำในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนชิ้นส่วน ใบทั้งหมด	จำนวนชิ้นส่วน ปลายใบที่เกิด โซมาติก เอ็มบริโอ	เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนปลายใบที่ เกิด โซมาติก เอ็มบริโอ ⁺ (ค่าจริงก่อนแปลงข้อมูล)
1. ½ MS	52	0	0.00±0.00 (0.00)
2. ½ MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	48	0	0.00±0.00 (0.00)
3. ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	56	0	0.00±0.00 (0.00)
4. ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	56	1	0.10±0.37 (1.78)
5. ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	56	0	0.00±0.00 (0.00)
6. ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA	56	0	0.00±0.00 (0.00)
F-test			Ns

หมายเหตุ ns แสดงค่าที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P>0.05$)

⁺ ข้อมูลผลการวิเคราะห์ได้จากการแปลงข้อมูลโดยการ take log

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนโคนใบที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในเมื่อวางแบบคว่ำในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนชิ้นส่วนใบ ทั้งหมด	จำนวนชิ้นส่วนโคนใบที่ เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ	เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนโคนใบที่เกิด โซมาติกเอ็มบริโอ ⁺ (ค่าจริงก่อนแปลงข้อมูล)
1. ½ MS	52	2	0.21±0.52 (3.85)
2. ½ MS เต็ม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	48	2	0.23±0.54 (4.17)
3. ½ MS เต็ม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	56	6	0.44±0.73 (10.71)
4. ½ MS เต็ม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	56	4	0.58±0.60 (7.14)
5. ½ MS เต็ม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	56	1	0.10±0.37 (1.79)
6. ½ MS เต็ม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	56	9	0.64±0.79 (16.07)
F-test			Ns

หมายเหตุ ns แสดงค่าที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P>0.05$)

⁺ ข้อมูลผลการวิเคราะห์ได้จากการแปลงข้อมูลโดยการ take log

ตารางที่ 5 จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่เกิดขึ้นบนชิ้นส่วนปลายใบต่อชิ้นส่วนใบในลักษณะการวางแบบคว่ำใบเมื่อเพาะเลี้ยงใบลงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนชิ้นส่วนใบ ทั้งหมด	จำนวนโซมาติก เอ็มบริโอที่เกิด	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอบริเวณปลายใบต่อ ชิ้นส่วนใบ ⁺ (ค่าจริงก่อนแปลงข้อมูล)
1. ½ MS	52	0	0.00±0.00 (0.00)
2. ½ MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	48	0	0.00±0.00 (0.00)
3. ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	56	6	0.01±0.04 (0.11)
4. ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	56	17	0.04±0.16 (0.30)
5. ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	56	0	0.00±0.00 (0.00)
6. ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	56	0	0.00±0.00 (0.00)
F-test			Ns

หมายเหตุ ns แสดงค่าที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P>0.05$)

⁺ ข้อมูลผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการแปลงข้อมูลโดยการ take log

ตารางที่ 6 จำนวนโชมaticเอ็มบริโอที่เกิดบนชิ้นส่วนโคนใบในลักษณะการวางแบบคว่ำใบเมื่อเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนชิ้นส่วน ใบทั้งหมด	จำนวนโชมatic เอ็มบริโอที่เกิด	จำนวนโชมaticเอ็มบริโอบริเวณโคนใบต่อ ชิ้นส่วนใบ ⁺ (ค่าจริงก่อนแปลงข้อมูล)
1. ½ MS	52	28	0.06 ^a ±0.21 (0.53)
2. ½ MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	48	14	0.03 ^a ±0.30 (0.29)
3. ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	56	28	0.04 ^a ±0.31 (0.50)
4. ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	56	48	0.10 ^a ±0.27 (0.85)
5. ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	56	16	0.04 ^a ±0.16 (0.28)
6. ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	56	11	0.01 ^b ±0.26 (0.20)
F-test			*

หมายเหตุ * แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 % ($P<0.05$)

a, b และ c ตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P<0.05$)

⁺ ข้อมูลผลการวิเคราะห์ได้จากการแปลงข้อมูลโดยการ take log

การวางในลักษณะหยายใบ

การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงจากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้หวายเอี้ยสกุลในลักษณะการวางหยายใบบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบการรอดชีวิตของชิ้นส่วนใบเมื่อวางเลี้ยงในลักษณะหยายใบในอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอทั้ง 6 สูตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) โดยพบว่าอาหารสูตร ½ MS ที่มีการเติม TDZ ความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด (ยกเว้นสูตร ½ MS ที่เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ระหว่าง 82.50-86.25 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7) หรือการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ TDZ และ NAA ร่วมกันไม่ได้มีผลส่งเสริมกันในแง่ของการเพิ่มเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด ซึ่งสอดคล้องกับผลของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนใบที่วางเลี้ยงแบบคว่ำใบบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของกล้วยไม้หวายเอี้ยสกุล (ตารางที่ 1)

ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนใบ ที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ในสูตรอาหารพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (ตารางที่ 8) โดยอาหารที่มีการเติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนชิ้นส่วนใบที่พบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยสูงที่สุด รองลงมาได้แก่สูตรอาหารที่มีการเติม TDZ ร่วมกับ NAA ขณะที่สูตรอาหารที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และที่มีการเติมเฉพาะ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าต่ำที่สุด

เมื่อทำการศึกษาแยกลงไปถึงชิ้นส่วนปลายใบและโคนใบที่สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอพบทั้งชิ้นส่วนปลายใบและโคนใบที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (ตารางที่ 9 และ 10) โดยพบค่าสูงสุดในอาหาร 3 สูตร ได้แก่ ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (17.50 เปอร์เซ็นต์) สูตร ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (12.50 เปอร์เซ็นต์) และสูตร ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (18.75 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 9) โดยผลของส่วนโคนใบที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอให้ผลคล้ายกับส่วนปลายใบที่อาหารทั้ง 3 สูตร สามารถชักนำให้มีเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนโคนใบที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดและใกล้เคียงกับชิ้นส่วนปลายใบ คือ 12.50 15.62 และ 18.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แม้จะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่อาหารสูตร ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนใบที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเช่นกันแต่พบในเปอร์เซ็นต์ต่ำ (5 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 10) ขณะที่การไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือการเติมเฉพาะ NAA อย่างเดียวไม่พบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (ตารางที่ 9 และ 10) ผลการศึกษาให้ผลซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลของ Chen *et al.* (1999) ที่พบว่าการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอในกล้วยไม้ *Oncidium* ในอาหาร MS ที่มีการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 – 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนใบได้เพิ่มขึ้น

อย่างไรก็ตามพบจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่เกิดขึ้นต่อชิ้นส่วนใบที่รอดชีวิตมีค่าต่ำมากในทั้ง 3 สูตร คือเท่ากับ 0.65 1.09 และ 1.59 โซมาติกเอ็มบริโอ สำหรับชิ้นส่วนปลายใบ (ตารางที่ 11) และ 0.58 0.66 และ 0.56 โซมาติกเอ็มบริโอ สำหรับชิ้นส่วนโคนใบ (ตารางที่ 12) สำหรับอาหารสูตร ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตร ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตร ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่สูตร ½ MS เติม TDZ

3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ เท่ากับ 0.15 ต่อชิ้นส่วนโคนใบที่รอดชีวิต (ตารางที่ 12) แต่ไม่พบความแตกต่างเมื่อทดสอบความแปรปรวนของข้อมูลสำหรับลักษณะดังกล่าวนี้ทั้งจากส่วนปลายใบและโคนใบ แสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนของการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล หรืออาจกล่าวได้ว่าอาจมีปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้อาจพบแตกต่างกันแม้ในระยะที่ชิ้นส่วนพืชยังมีความเยาว์วัย

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนใบที่รอดชีวิตเมื่อวางแบบหงายใบในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนชิ้นส่วนใบ ทั้งหมด	จำนวนชิ้นส่วนใบที่รอด ชีวิต	เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนใบที่รอดชีวิต ⁺ (ค่าจริงก่อนแปลงข้อมูล)
1. ½ MS	48	17	1.49 ^c ± 0.25 (35.41)
2. ½ MS เต็ม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	72	36	1.60 ^{bc} ± 0.33 (50.00)
3. ½ MS เต็ม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	80	69	1.92 ^a ± 0.09 (86.25)
4. ½ MS เต็ม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	80	66	1.91 ^a ± 0.09 (82.50)
5. ½ MS เต็ม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	64	54	1.92 ^a ± 0.07 (84.37)
6. ½ MS เต็ม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	64	38	1.75 ^{ab} ± 0.14 (59.37)
F-test			**

หมายเหตุ ** แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ($P < 0.01$)

a, b และ c ตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ($P < 0.01$)

⁺ ข้อมูลผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการแปลงข้อมูลโดยการ take log

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนปลายใบที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อวางแบบหางใบในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนชิ้นส่วนใบ ทั้งหมด	จำนวนชิ้นส่วนปลายใบ ที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ	เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนปลายใบที่เกิด โซมาติกเอ็มบริโอ ⁺ (ค่าจริงก่อนแปลงข้อมูล)
1. ½ MS	24	0	0.00 ^b ± 0.00 (0.00)
2. ½ MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	36	0	0.00 ^b ± 0.00 (0.00)
3. ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	40	7	0.76 ^a ± 0.80 (17.50)
4. ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	40	0	0.00 ^b ± 0.00 (0.00)
5. ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	32	4	0.56 ^{ab} ± 0.78 (12.50)
6. ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	32	6	0.62 ^{ab} ± 0.86 (18.75)
F-test			*

หมายเหตุ * แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P < 0.05$)

a, b และ c ตัวอักษรต่างกันในสัณฐานเดียวกันแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P < 0.05$)

⁺ ข้อมูลผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการแปลงข้อมูลโดยการ take log

ทริตเมนต์ 3 มีเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนปลายใบที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอที่คำนวณจากการนับรวมเท่ากับ 17.50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าค่าในทริตเมนต์ที่ 6 แต่พบการปรากฏชิ้นส่วนใบที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอจำนวนซ้ำที่สูงกว่าทำให้เมื่อศึกษาค่าเฉลี่ยในทุกซ้ำแล้วพบว่ามีความเฉลี่ยเท่ากับ 0.76 ซึ่งสูงสุด (จากการแปลงข้อมูล) และสูงกว่าทริตเมนต์ที่ 6

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนโคนใบที่เกิดโคมاتิกเอ็มบริโอเมื่อวางแบบหงายใบในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนชิ้นส่วนใบทั้งหมด	จำนวนชิ้นส่วนโคนใบที่เกิดโคมاتิกเอ็มบริโอ	เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนโคนใบที่เกิดโคมاتิกเอ็มบริโอ ⁺ (ค่าจริงก่อนแปลงข้อมูล)
1. ½ MS	24	0	0.00±0.00 (0.00)
2. ½ MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	36	0	0.00±0.00 (0.00)
3. ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	40	5	0.70±0.73 (12.50)
4. ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	40	2	0.28±0.59 (5.00)
5. ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	32	5	0.74±0.74 (15.62)
6. ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	32	6	0.64±0.87 (18.75)
F-test			ns

หมายเหตุ ns แสดงค่าที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P>0.05$)

⁺ ข้อมูลผลการวิเคราะห์ได้จากการแปลงข้อมูลโดยการ take log

ทรีตเมนต์ 3 มีเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนโคนใบที่เกิดโคมاتิกเอ็มบริโอที่คำนวณจากการนับรวมเท่ากับ 12.50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าค่าในทรีตเมนต์ที่ 6 แต่พบการปรากฏชิ้นส่วนใบที่เกิดโคมاتิกเอ็มบริโอจำนวนซ้ำที่สูงกว่าทำให้เมื่อศึกษาค่าเฉลี่ยในทุกซ้ำแล้วพบว่ามีความเฉลี่ยเท่ากับ 0.70 ซึ่งสูงสุด (จากการแปลงข้อมูล) และสูงกว่าทรีตเมนต์ที่ 6

ตารางที่ 11 จำนวนโสมatikเอ็มบริโอที่เกิดบนชิ้นส่วนปลายใบในลักษณะการวางแบบหงายใบเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบลงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนชิ้นส่วนใบ ทั้งหมด	จำนวน โสมatikเอ็มบริโอ	จำนวนโสมatikเอ็มบริโอบริเวณปลายใบ ต่อชิ้นส่วนใบที่รอดชีวิต ⁺ (ค่าจริงก่อนแปลงข้อมูล)
1. ½ MS	24	0	0.00±0.00 (0.00)
2. ½ MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	36	0	0.00±0.00 (0.00)
3. ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	40	26	0.08±0.25 (0.65)
4. ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	40	0	0.00±0.00 (0.00)
5. ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	32	35	0.17±0.18 (1.09)
6. ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	32	51	0.22±0.32 (1.59)
F-test			Ns

หมายเหตุ ns แสดงค่าที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P>0.05$)

⁺ ข้อมูลผลการวิเคราะห์ได้จากการแปลงข้อมูลโดยการ take log

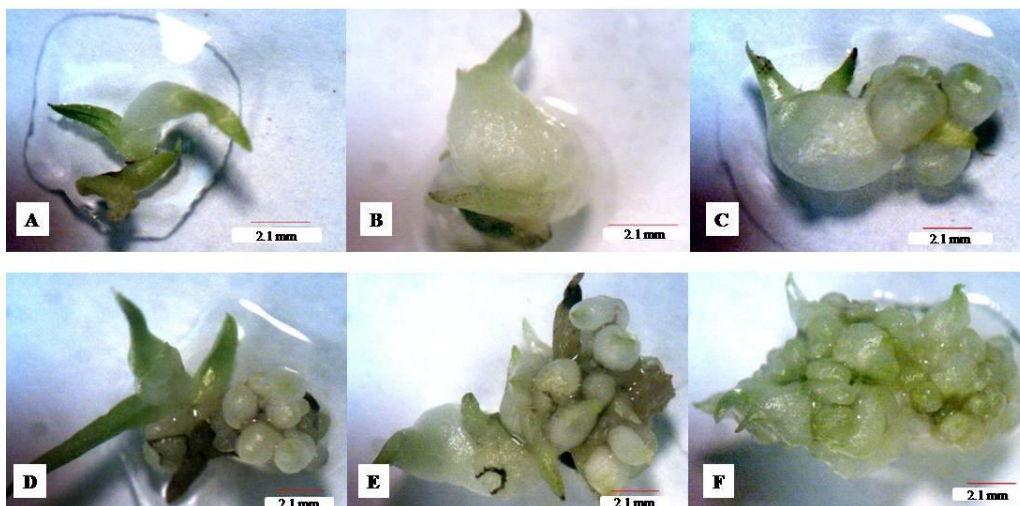
ตารางที่ 12 จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่เกิดบนชิ้นส่วนโคนใบในลักษณะการวางแบบหางยไบเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบลงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนชิ้นส่วน ใบทั้งหมด	จำนวน โซมาติกเอ็มบริโอที่เกิด	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอบริเวณโคนใบต่อ ชิ้นส่วนใบ ⁺ (ค่าจริงก่อนแปลงข้อมูล)
1. ½ MS	24	0	0.00±0.00 (0.00)
2. ½ MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	36	0	0.00±0.00 (0.00)
3. ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	40	23	0.04±0.24 (0.58)
4. ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	40	6	0.01±0.09 (0.15)
5. ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	32	21	0.09±0.37 (0.66)
6. ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	32	18	0.06±0.16 (0.56)
F-test			ns

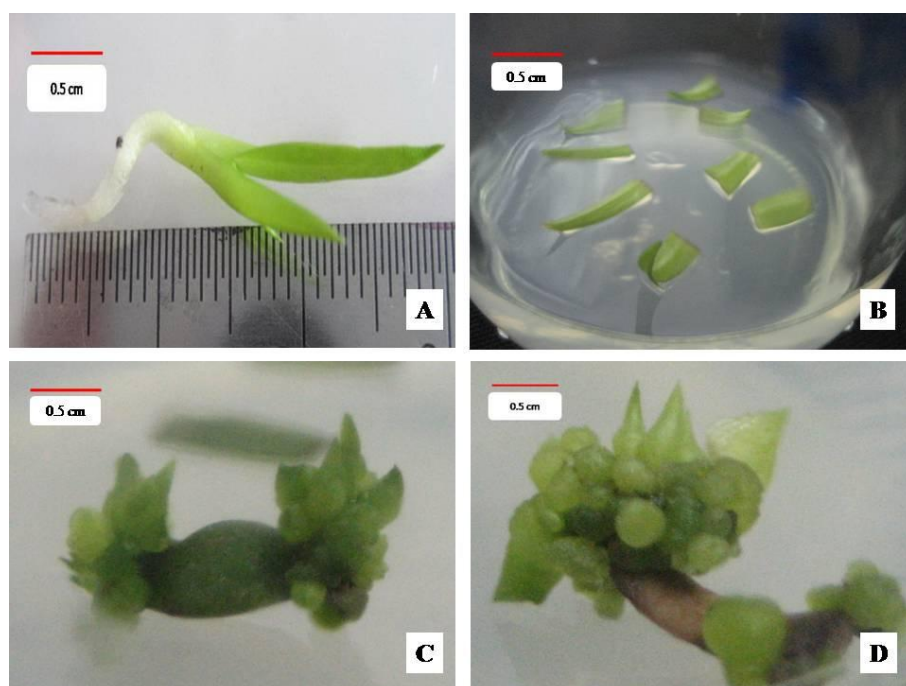
หมายเหตุ ns แสดงค่าที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P>0.05$)

⁺ ข้อมูลผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการแปลงข้อมูลโดยการ take log

ทริตเมนต์ 6 มีจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนโคนใบที่คำนวณจากการนับรวมเท่ากับ 0.56 ซึ่งต่ำกว่าค่าในทริตเมนต์ที่ 3 แต่พบการปรากฏโซมาติกเอ็มบริโอในจำนวนซ้ำที่สูงกว่าทำให้เมื่อศึกษาค่าเฉลี่ยในทุกซ้ำแล้วพบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.06 (จากการแปลงข้อมูล) และสูงกว่าทริตเมนต์ที่ 3



ภาพที่ 1 การชักนำไซมาติกเอ็มบริโอจากโปรโตคอร์มจากกล้วยไม้หวายเอียสกุล (*Dendrobium* 'Earsakul') ที่อายุการชักนำ 8 สัปดาห์ โดยการให้ค่าคะแนนตามการเปลี่ยนแปลงของโปรโตคอร์ม มีค่าคะแนน ดังนี้ 0 = โปรโตคอร์มไม่มีการเปลี่ยนแปลง (A), 1 = มีการตอบสนองของโปรโตคอร์มในอาหารแต่ไม่เกิดไซมาติกเอ็มบริโอ (B), 2 = ปรากฏ 4-6 ไซมาติกเอ็มบริโอ (C), 3 = ปรากฏ 7-9 ไซมาติกเอ็มบริโอ (D), 4 = ปรากฏ 12 ไซมาติกเอ็มบริโอ (E) และ 5 = ปรากฏมากกว่า 12 ไซมาติกเอ็มบริโอ (F)



ภาพที่ 2 การชักนำไซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้หวายเอียสกุล (*Dendrobium* 'Earsakul') (A) กล้วยไม้ขนาดใบอ่อน 1.0-2.0 เซนติเมตร ที่ใช้ในการศึกษาการชักนำไซมาติกเอ็มบริโอ (B) การตัดชิ้นส่วนใบออกเป็นสองส่วนคือส่วนปลายใบ (ช่าย) และส่วนโคนใบ (ขวา) และ (C-D) การเกิดไซมาติกเอ็มบริโอที่ชิ้นส่วนใบ

การทดลองที่ 1.2 การชักนำให้เกิดแคลลัสของกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล

ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้หวายเอื้องสกุลบนอาหารชักนำแคลลัสเป็นเวลา 9 สัปดาห์ แสดงในตารางที่ 13-15 และภาพที่ 3

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มและเปอร์เซ็นต์การตอบสนองของโปรโตคอร์มในอาหารชักนำแคลลัสทั้ง 7 สูตร (การตอบสนองคือการที่โปรโตคอร์มที่รอดชีวิตมีการแสดงลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมรูปแบบต่าง ๆ) ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 13 และ 14 ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์โปรโตคอร์มที่รอดชีวิตในอาหารชักนำสูงในทุกสูตร คือ เกิน 90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13) และโปรโตคอร์มตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเกิน 90 เปอร์เซ็นต์ในทุกสูตร (ตารางที่ 14) แต่ภายในระยะเวลาศึกษา คือ 9 สัปดาห์นั้นพบเปอร์เซ็นต์โปรโตคอร์มที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอมีค่าลดต่ำลงมา คือ อยู่ระหว่าง 38.18-49.00 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 15)

สำหรับการเกิดของแคลลัสจากโปรโตคอร์ม พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ที่ค่อนข้างต่ำมาก โดยอาหารชักนำแคลลัสสูตรที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 7 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดของแคลลัสประมาณ 0 – 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3) แต่อาหารชักนำแคลลัสสูตรที่ 6 คือ $\frac{1}{2}$ MS เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสประมาณสูงสุดอยู่ระหว่าง 5 – 10 เปอร์เซ็นต์ (ไม่ได้นำผลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน) โดยพบว่าลักษณะของแคลลัสที่ได้เป็นกลุ่มเซลล์ที่เกาะกันค่อนข้างแน่น มีสีขาวอมเหลืองและสีเขียวอ่อน การเกิดแคลลัสบนอาหารสูตรดังกล่าวอาจเป็นเพราะเป็นสูตรที่มีทั้งสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน โดยฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินมีบทบาทในการกระตุ้นให้พืชเจริญเติบโต ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ กระตุ้นการเกิดยอด และกระตุ้นให้เกิดแคลลัสเมื่อให้ร่วมกับออกซิน (दनัย, 2547) โดยหากสัดส่วนระหว่างไซโตไคนินมากกว่าออกซินจะกระตุ้นให้เกิดยอด แต่ถ้าสัดส่วนของออกซินมากกว่าไซโตไคนินจะกระตุ้นให้เกิดราก และหากสัดส่วนนี้สมดุลจะพัฒนาไปแคลลัสต่อไป (รังสฤษฎ์, 2540) ส่วนมากการชักนำแคลลัสจะทำการชักนำจากชิ้นส่วนของพืชในอาหารเพาะเลี้ยงโดยใช้ฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินและกลุ่มออกซินที่สมดุลกัน (Chen and Chang, 2006) ขณะที่อาหารสูตรอื่น ๆ ที่มีทั้ง TDZ และ NAA หรือ 2,4-D กลับไม่พบการเกิดแคลลัส ซึ่งอาจเป็นผลมาจากระดับการใช้สารควบคุมการเจริญที่แตกต่างกันและสิ่งที่น่าสนใจ คือ ในการนำโปรโตคอร์มมาชักนำเพื่อให้เกิดแคลลัสนั้น โปรโตคอร์มยังอยู่ในช่วงที่เซลล์กำลังเจริญเติบโตอยู่มากและมีสัดส่วนของออกซินและไซโตไคนินอยู่ระดับหนึ่ง ซึ่งอาจจะมีแตกต่างกับชิ้นส่วนพืชทั่ว ๆ ไปที่มีการนำมาใช้เพื่อชักนำแคลลัส จึงทำให้ระดับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการทดลองนี้ที่เคยใช้ได้ผลและประสบความสำเร็จในการทดลองอื่น ๆ กลับไม่พบการเกิดแคลลัสในการทดลองนี้ จากการศึกษาการพบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงจากโปรโตคอร์มตามการให้คะแนนในภาพที่ 1 ได้แสดงผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 15 แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 7 สูตร ซึ่งมี TDZ เป็นส่วนประกอบทั้งหมด

ตารางที่ 13 เพอร์เซ็นต์โปรโตคอร์มที่รอดชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 9 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนชิ้นส่วนทั้งหมด	จำนวนชิ้นส่วนที่รอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์โปรโตคอร์มที่รอดชีวิต (ค่าก่อนการแปลงข้อมูล)
1. ½ MS เต็ม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	225	209	1.97±0.03 (92.89)
2. ½ MS เต็ม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร	245	226	1.96±0.04 (92.88)
3. ½ MS เต็ม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	265	251	1.97±0.04 (94.72)
4. ½ MS เต็ม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	233	221	1.98±0.03 (94.85)
5. ½ MS เต็ม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	253	245	1.99±0.01 (96.84)
6. ½ MS เต็ม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	251	242	1.98±0.01 (96.41)
7. ½ MS เต็ม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	221	218	1.99±0.01 (98.64)
F-test			ns

หมายเหตุ ns แสดงค่าที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P>0.05$)

+ ข้อมูลผลการวิเคราะห์ได้จากการแปลงข้อมูลโดยการ take log

ตารางที่ 14 เพอร์เซ็นต์โปรโตคอร์มที่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 9 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวน โปรโตคอร์มที่ รอดชีวิต	จำนวนชิ้นโปรโตคอร์ม ที่ตอบสนอง	เปอร์เซ็นต์โปรโตคอร์มที่ตอบสนอง ต่อการเพาะเลี้ยง (ค่าก่อนการแปลงข้อมูล)
1. ½ MS เต็ม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	209	180	1.93±0.04 (86.12)
2. ½ MS เต็ม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร	226	203	1.95±0.03 (89.82)
3. ½ MS เต็ม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	251	214	1.93±0.04 (85.26)
4. ½ MS เต็ม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	221	195	1.94±0.05 (88.24)
5. ½ MS เต็ม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	245	216	1.94±0.15 (88.16)
6. ½ MS เต็ม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	242	216	1.95±0.04 (89.26)
7. ½ MS เต็ม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	218	196	1.95±0.04 (89.91)
F-test			ns

หมายเหตุ ns แสดงค่าที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P>0.05$)

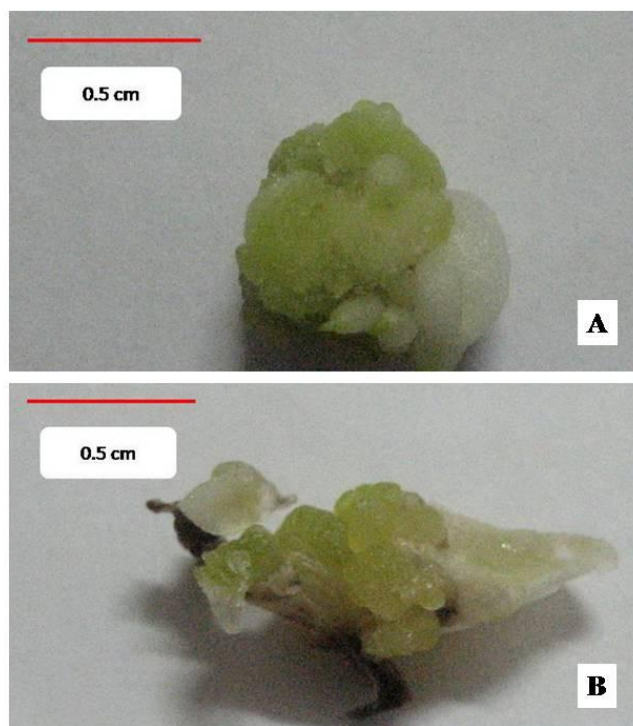
⁺ ข้อมูลผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการแปลงข้อมูลโดยการ take log

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์โปรโตคอร์มที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 9 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวน โปรโตคอร์มที่ รอดชีวิต	จำนวนชิ้นโปรโตคอร์ม ที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ	เปอร์เซ็นต์โปรโตคอร์มที่เกิดโซมาติก เอ็มบริโอ (ค่าก่อนการแปลงข้อมูล)
1. ½ MS เต็ม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	209	97	1.63±0.15 (46.41)
2. ½ MS เต็ม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร	226	103	1.64±0.12 (45.58)
3. ½ MS เต็ม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	251	123	1.68±0.13 (49.00)
4. ½ MS เต็ม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	221	92	1.60±0.15 (41.63)
5. ½ MS เต็ม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	245	96	1.57±0.12 (38.18)
6. ½ MS เต็ม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	242	109	1.64±0.09 (45.04)
7. ½ MS เต็ม TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	218	98	1.62±0.15 (44.95)
F-test			ns

หมายเหตุ ns แสดงค่าที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P>0.05$)

⁺ ข้อมูลผลการวิเคราะห์ได้จากการแปลงข้อมูลโดยการ take log



ภาพที่ 3 (A-B) การชักนำแคลลัสจากโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Dendrobium* 'Earsakul' ที่อายุการเลี้ยง 8 สัปดาห์

การทดลองที่ 2

ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงในกล้วยไม้ช้างเผือก

พบปัญหาการเกิดสีน้ำตาล (browning) บริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนใบในการทดลองที่ 2 ส่งผลให้เกิดการตายของชิ้นส่วนใบ (ภาพที่ 4) ซึ่งอาจเป็นเพราะกล้วยไม้ช้างเผือกยังไม่มีการศึกษาการตัดชิ้นส่วนใบในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอดังนั้นจึงไม่มีรายงานการเกิดสีน้ำตาลดังกล่าว ขณะที่ในกล้วยไม้สกุลหวายไม่เกิดปัญหาดังกล่าว โดยปัญหาการเกิดสีน้ำตาลและก่อให้เกิดการตายพบในพืชหลายชนิดและเป็นปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งผลที่ตามมาของการเกิดสีน้ำตาลคือเกิดการตายของชิ้นส่วนพืชซึ่งเป็นผลมาจากสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) รวมทั้งปริมาณของฟีนอลที่เกิดขึ้น (Ozyigit, 2008) เช่น กล้วยเป็นต้น ซึ่งคำแนะนำสำหรับการแก้ปัญหาการเกิดสีน้ำตาลในพืชต่าง ๆ ได้โดยการใช้ตัวดูดซับ (adsorptive material) หรือสารต่อต้านการเกิดความเป็นพิษ (antioxidant material) เป็นต้น

สารประกอบฟีนอลที่เกิดขึ้นเป็นสารลำดับที่ 2 (secondary metabolites) ที่พบได้ในพืชหลาย ๆ ชนิดซึ่งมีคุณลักษณะที่ประกอบไปด้วยวงแหวนเบนซีน (benzene ring) และกลุ่มของไฮดรอกซิล (hydroxyl group) (Antolovich *et al.*, 2000; Kefeli *et al.*, 2003) แต่ก็อาจพบในรูปแบบอื่น ๆ ได้อีกหลากหลายเช่น ที่พบได้ในพวกพืชสมุนไพรและพืชที่ฟีนอลเป็นหลัก ได้แก่ isoflavone glycosides และอีกหลายๆ กรดฟีนอล เช่น ferulic, caffeic และ chlorogenic acid ที่พบในถั่วเหลือง (Robards *et al.*, 1999) พบว่าองค์ประกอบและการสังเคราะห์ฟีนอลในเนื้อเยื่อพืชขึ้นกับพันธุกรรมและสภาพแวดล้อม เช่น การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่างการปลูก เก็บเกี่ยว หรือการเก็บรักษา (Lux-Endrich *et al.*, 2000) ซึ่งการเกิดสีน้ำตาลในอาหารเป็นความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบทางเคมีของอาหารเพาะเลี้ยงและการปลดปล่อยสารฟีนอล สีของอาหารการไม่มีการเกิดราก และการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนพืชและการตายของพืช ตัวอย่างเช่น ฟีนอลของพืชจะทำให้กระบวนการแคทาบอลิซึมของ Indole Acetic Acid (IAA) ลดน้อยลง สำหรับส่วนของ monophenols เช่น synaptic acid และ ferulic acid ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ จะยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันของเอนไซม์ของ IAA ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการยืดยาวของเซลล์และการแบ่งเซลล์ตามมาด้วยการที่พืชมีการเจริญเติบโตและการพัฒนา (Volpert *et al.*, 1995; Arnaldos *et al.*, 2001) พบว่าการที่สารฟีนอลของพืชจะทำให้ผนังเซลล์พืชแข็ง (Ozyigit, 2008) เป็นที่ทราบกันดีว่าสารประกอบฟีนอลมีการสังเคราะห์ที่ใบและจากนั้นจะมีการส่งผ่านไปยังเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ดังนั้นจึงพบสารประกอบฟีนอลที่ใบมากกว่าส่วนอื่น ๆ (Ozyigit, 2008) แต่ก็มีการศึกษาที่พบมากที่ส่วนรากมากกว่าส่วนอื่น ๆ รวมทั้งส่วนของใบด้วย (Chamandoosti, 2010)

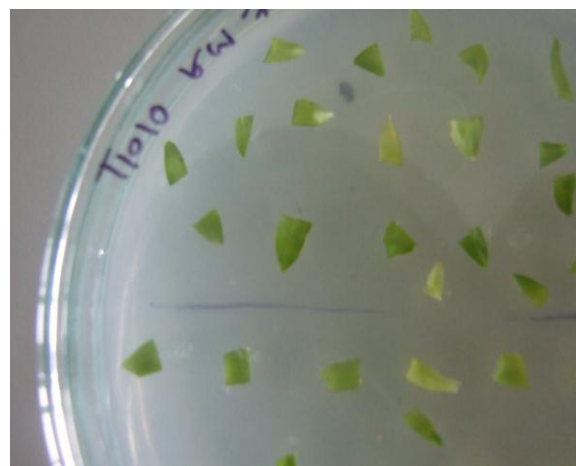
มีการศึกษาที่พบว่าสูตรอาหารและชิ้นส่วนพืชมีผลต่อการสร้างสารประกอบฟีนอล เช่น การศึกษาของ Chamandoosti (2010) ในฝ้าย (cotton) พบว่าชิ้นส่วน hypocotyl ที่เลี้ยงในอาหาร $27.12 \mu\text{M}$ 2,4-D + $8.8 \mu\text{M}$ BA มีการผลิตสารฟีนอลน้อยมาก แต่พบมากขึ้นในอาหารสูตร $0.492 \mu\text{M}$ IBA + $0.929 \mu\text{M}$ KIN แต่สำหรับส่วนของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีการเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีการเติม $0.492 \mu\text{M}$ IBA + $0.929 \mu\text{M}$ KIN เพื่อชักนำให้เกิดต้นพบสารประกอบฟีนอลน้อยมาก (Chamandoosti, 2010) ซึ่งแสดงให้เห็นได้ว่าปัจจัยที่มีส่วนสำคัญในการลดสารประกอบฟีนอลในอาหารเพาะเลี้ยงนั้นขึ้นกับหลายปัจจัย ทั้งส่วน

ของอาหาร ขึ้นส่วนพืช อาจรวมไปถึงอายุของขึ้นส่วนพืช และพันธุกรรม (genotype) (Ozyigit *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2000; Kumria *et al.*, 2003; Lorenzo and Angeles, 2001)

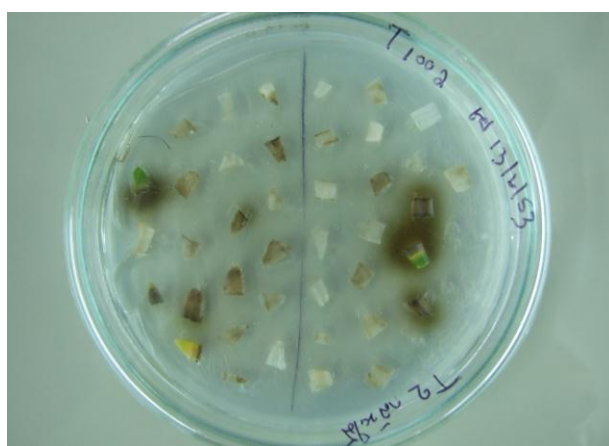
การแก้ปัญหาการหลังสารประกอบฟีนอลในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือการเลือกใช้ขึ้นส่วนพืชรวมทั้งสารควบคุมการเจริญเติบโต เช่นเดียวกันกับการใช้ผงถ่าน (activated charcoal) ในการชักนำให้เกิดแคลลัสและชักนำอวัยวะ (organogenesis) (Wang and Huang, 2009)



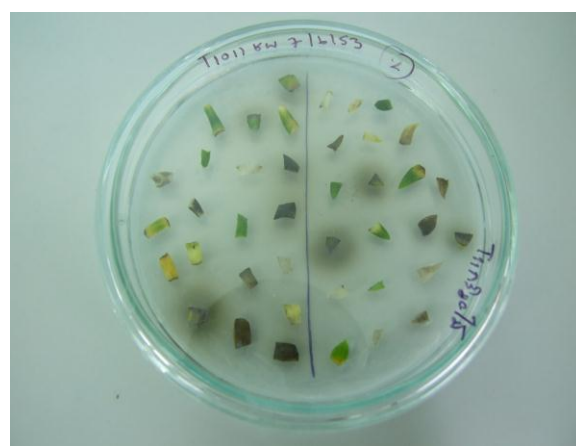
A. ขึ้นส่วนใบของกล้วยไม้ช้างเผือกขณะเริ่มเพาะเลี้ยงในอาหาร



B. ขึ้นส่วนใบของกล้วยไม้ช้างเผือกมีการตัดส่วนโคนใบและปลายใบเพื่อทำการเพาะเลี้ยง



C. ขึ้นส่วนใบของกล้วยไม้ช้างเผือกเริ่มเกิดอาการสีน้ำตาลและเริ่มตาย (1)



D. ขึ้นส่วนใบของกล้วยไม้ช้างเผือกเริ่มเกิดอาการสีน้ำตาลและเริ่มตาย (2)

ภาพที่ 4 การเกิดสีน้ำตาล (browning) ของขึ้นส่วนกล้วยไม้ช้างเผือกที่วางเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยง

การทดลองที่ 3

ผลของน้ำมะพร้าวร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการลดอาการสึ้นน้ำตาลในการเพาะเลี้ยง
ชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ช้างเผือก

จากการศึกษาผลของออกซิน ได้แก่ NAA และไซโตไคนิน ได้แก่ น้ำมะพร้าวและสาร TDZ ต่อการเกิด
นี้้น้ำตาลบนชิ้นส่วนกล้วยไม้ช้างเผือกและความสามารถชักนำโชมอดิกเอ็มบริโอ แสดงในตารางที่ 16-23 และ
ภาพที่ 5

พบอิทธิพลของ NAA และ TDZ ต่อการเกิดสึ้นน้ำตาล เช่นเดียวกันที่พบปฏิกิริยาร่วมระหว่างทั้ง 2
ปัจจัย ได้แก่ ปฏิกิริยาร่วมระหว่างน้ำมะพร้าวร่วมกับ TDZ และปฏิกิริยาร่วมระหว่าง NAA ร่วมกับ TDZ และ
ระหว่างทั้ง 3 ปัจจัย คือ น้ำมะพร้าว NAA และ TDZ (ตารางที่ 16 และ ตารางที่ 17) ดังนี้

การเติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยง ทำให้สึ้นน้ำตาลลดลงอย่างมี
นัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดสึ้นน้ำตาลลดลงจาก 10.85 เป็น 6.55 เปอร์เซ็นต์

ตรงข้ามกับผลของ TDZ ที่พบว่าเติม TDZ ที่ความเข้มข้นสูงพบชิ้นส่วนกล้วยไม้ช้างเผือกเกิดสึ้นน้ำตาล
สูง ขณะที่การลดความเข้มข้นของ TDZ ลงจะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดสึ้นน้ำตาลลดลงไปด้วยเช่นเดียวกัน

อย่างไรก็ตามพบปฏิกิริยาร่วมระหว่างปัจจัย ได้แก่ น้ำมะพร้าว และ TDZ ที่พบว่าการไม่เติมทั้งน้ำ
มะพร้าวและ TDZ จะมีการเกิดสึ้นน้ำตาลน้อยที่สุด ขณะที่การเติม TDZ ไม่ว่าจะมึ้น้ำมะพร้าวหรือไม่ต่างก็
ก่อให้เกิดสึ้นน้ำตาลสูงเช่นเดียวกัน

ปฏิกิริยาร่วมระหว่างปัจจัย ได้แก่ NAA ร่วมกับ TDZ พบว่าการเติม TDZ ทั้งที่มีการเติมและไม่เติม
NAA มีการเกิดสึ้นน้ำตาลค่อนข้างสูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ

สำหรับปฏิกิริยาร่วมระหว่าง 3 ปัจจัย ได้แก่ น้ำมะพร้าว NAA และ TDZ พบว่าการเติม TDZ พบว่ามี
การเกิดสึ้นน้ำตาลสูง แต่เมื่อมีการเติม NAA พบว่าการเกิดสึ้นน้ำตาลมีเปอร์เซ็นต์ลดลง นอกจากนี้การเติมน้ำ
มะพร้าวยังระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ ยังทำให้พบการเกิดสึ้นน้ำตาลลดลงด้วยเช่นเดียวกัน แต่ที่ความเข้มข้นของ
TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับที่พบว่าเกิดการเกิดสึ้นน้ำตาลสูงในทุกทรีตเมนต์ที่มีการเติมอีก 2 ปัจจัยที่เหลือ
ยกเว้นเมื่อมีการเติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติม NAA 0.1 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่าทั้ง NAA และ TDZ มีผลจากการเป็นปัจจัยเดี่ยวแต่ในทิศทางที่
ตรงข้ามกัน คือ การเติม NAA จะทำให้การเกิดสึ้นน้ำตาลลดลง ขณะที่การเติม TDZ กลับพบว่าการเกิดสึ้น
น้ำตาลเพิ่มขึ้น แต่จากการศึกษาของกล้วยไม้หวายเอื้องสกุลที่พบว่าเติม TDZ ซึ่งเป็นสารควบคุมการ
เจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินในอาหารเพาะเลี้ยงจะสามารถชักนำโชมอดิกเอ็มบริโอได้ดีนั้น ในกล้วยไม้ช้างเผือก
พบการเกิดสึ้นน้ำตาล ดังนั้นอาจจำเป็นต้องใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินชนิดอื่นเพื่อศึกษา
การเกิดสึ้นน้ำตาลเพราะชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตก็อาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเกิดสึ้นน้ำตาล
ในชิ้นส่วนกล้วยไม้ช้างเผือก แต่เมื่อมีการใช้ร่วมกับน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้สึ้นน้ำตาลลดลงแต่ทั้งนี้จะ
ลดลงมากเมื่ออาหารสูตรดังกล่าวมีการเติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อทำการศึกษาเปอร์เซ็นต์การเกิดโคมاتิกเอ็มบริโอภายหลังการเลี้ยงในอาหารนาน 4 สัปดาห์ จากสารทั้ง 3 ปัจจัย (ตารางที่ 18 และตารางที่ 19) ไม่พบว่ามีปัจจัยใด หรือปฏิกิริยาร่วมของทั้ง 3 ปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเกิดโคมاتิกเอ็มบริโอ และพบการเกิดโคมاتิกเอ็มบริโอในเปอร์เซ็นต์ต่ำมาก และพบเพียงใน 2 ทริตเมนต์ ได้แก่ ที่อาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS และ $\frac{1}{2}$ MS เต็ม CW 10 เปอร์เซ็นต์ ที่พบการเกิดโคมاتิกเอ็มบริโอเพียง 0.31 และ 0.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งในการศึกษานี้วัดผลเร็วกว่าการทดลองในกล้วยไม้หวายเอียสกุลเนื่องจากพบปัญหาการเกิดสีน้ำตาล

สำหรับที่อายุการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชที่ 4 สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยงและพบปัญหาการเกิดสีน้ำตาล จึงได้เปลี่ยนชิ้นส่วนพืชที่รอดชีวิตทั้งหมดลงในอาหารสูตรเดิมแต่มีการเติมตัวดูดซับได้แก่ผลถ่านอีก 2 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มโอกาสในการรอดชีวิตหรือลดการเกิดสีน้ำตาล (Ozyigit, 2008) หรืออาจมีโอกาสดเกิดโคมاتิกเอ็มบริโอได้อีก ขณะที่ชิ้นส่วนพืชที่แม้จะไม่เกิดสีน้ำตาลแต่เมื่อพบการตายโดยชิ้นส่วนพืชเปลี่ยนเป็นสีสิด ขาว แล้วจะไม่มีโอกาสเกิดโคมاتิกเอ็มบริโอได้อีก

การศึกษาชิ้นส่วนที่ยังมีชีวิตหรือคงลักษณะชิ้นใบมีสีเขียวซึ่งอาจเป็นผลมาจากการได้รับผลกระทบเนื่องจากการเกิดสีน้ำตาลน้อยกว่าชิ้นใบอื่น ๆ โดยวัดผลเป็นเปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 20 และตารางที่ 21) พบว่าปัจจัยน้ำมะพร้าว และปัจจัย TDZ มีผลต่อการที่ชิ้นส่วนยังสามารถคงสีเขียวได้ ขณะที่พบอิทธิพลร่วมหรือปฏิกิริยาร่วมระหว่างทั้งสามปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะดังกล่าวนี้ ดังนี้

การเติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ข้างเผือก จะพบชิ้นส่วนที่เป็นสีเขียวของพืชสูงกว่าการไม่เติม และแม้จะพบว่าที่ความเข้มข้น TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับที่พบการเกิดสีน้ำตาลสูงสุด แต่พบว่าเป็นระดับที่พบว่ามีชิ้นส่วนพืชที่ยังคงสีเขียวสูงที่สุดด้วยเช่นกันภายหลังการเพาะเลี้ยง

แต่อย่างไรก็ตามพบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย ได้แก่ ระหว่างการใช้น้ำมะพร้าวร่วมกับ TDZ ที่พบว่าทุกทริตเมนต์ที่มีน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ มีการเกิดสีเขียวของชิ้นส่วนพืชสูงกว่า โดยในระดับคือยังมีความเข้มข้น TDZ สูงจะสามารถพบการคงสีเขียวของชิ้นส่วนใบกล้วยไม้ข้างเผือกสูงตามไปด้วย ขณะที่แม้จะมีอิทธิพลร่วมระหว่างการเติม NAA และ TDZ แต่อิทธิพลของ TDZ สูงกว่าเนื่องจากพบว่าที่ความเข้มข้น TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งที่เติมและไม่เติม NAA พบสีเขียวของชิ้นส่วนกล้วยไม้ไม่มีเปอร์เซ็นต์สูงกว่าขณะที่ความเข้มข้นของ TDZ ระดับอื่น ๆ ที่ให้ผลไม่แตกต่างกัน

เมื่อทำการแยกศึกษาผลของโคนใบ (base of leaf) และปลายใบ (tip of leaf) ต่อการเกิดโคมاتิกเอ็มบริโอจากการใช้ปัจจัย 3 ปัจจัย ได้แก่ น้ำมะพร้าว NAA และ TDZ ภายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 22 และ ตารางที่ 23) พบว่าปัจจัยตำแหน่งบนชิ้นใบไม่มีผลต่อการเกิดโคมاتิกเอ็มบริโอโดยตรง และไม่มีผลเมื่อศึกษาร่วมกับอีก 2 ปัจจัยที่เหลือ

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโคมاتิกเอ็มบริโอพบทั้งบนชิ้นส่วนโคนและปลายใบ โดยพบการเกิดโคมاتิกเอ็มบริโอที่โคนใบเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS (สูตรที่ 1) เพียงสูตรเดียว แต่พบการเกิดโคมاتิกเอ็มบริโอของชิ้นส่วนปลายใบเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS เต็ม CW 10 เปอร์เซ็นต์ (สูตรที่ 9) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงขึ้นกับตำแหน่งของชิ้นส่วนใบด้วยเช่นกัน

อย่างไรก็ตามภายหลัง การเพาะเลี้ยงเพิ่มอีกจนอายุการเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ พบชิ้นส่วนพืชส่วนใหญ่เกิดสีน้ำตาล และบางส่วนชิตตาย สำหรับกล้วยไม้ที่รอดชีวิตและเกิดโสมatikเอ็มบริโอเฉพาะในอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่

ทริตเมนต์ที่ 9 สูตร ½MS เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์

ทริตเมนต์ที่ 10 สูตร ½MS เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทริตเมนต์ที่ 11 สูตร ½MS เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทริตเมนต์ที่ 12 สูตร ½MS เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทริตเมนต์ที่ 13 สูตร ½MS เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทริตเมนต์ที่ 15 สูตร ½MS เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ซึ่งจากผลที่สังเกตได้นี้อาจกล่าวได้ว่าการเติมน้ำมะพร้าวร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารชักนำโสมatikเอ็มบริโอของกล้วยไม้ช้างเผือกนอกจากจะช่วยในการลดการเกิดสีน้ำตาลแล้ว ยังน่าจะส่งเสริมให้มีการสร้างโสมatikเอ็มบริโอได้

ตารางที่ 16 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนใบในกล้วยไม้ช้างเผือก (*Rhynchosstylis gigantea* var. *harrisonianum*)

CW (%)	NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร) (AxBxC) (**)				Mean (AxB) (ns)	Mean (A) (ns)
		0 มิลลิกรัมต่อลิตร (C1)	0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (C2)	1 มิลลิกรัมต่อลิตร (C3)	3 มิลลิกรัมต่อลิตร (C4)		
0% (A1)	0 มิลลิกรัมต่อลิตร (B1)	1.24 ± 1.32 e	17.36 ± 7.89 a	3.56 ± 5.66 de	16.12 ± 10.98 a	10.00 ± 10.22	8.70
	0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (B2)	0.28 ± 0.83 e	0.50 ± 1.05 e	17.36 ± 9.41 a	12.76 ± 14.15 abc	7.40 ± 11.12	
10% (A2)	0 มิลลิกรัมต่อลิตร (B1)	11.22 ± 11.48 abcd	3.71 ± 4.45 de	13.77 ± 9.09 ab	18.82 ± 5.21 a	11.75 ± 9.48	8.61
	0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (B2)	7.02 ± 4.86 bcde	4.74 ± 5.80 cde	3.56 ± 4.92 de	5.88 ± 5.50 bcde	5.42 ± 5.15	
	Mean (C) (**)	4.73 c	6.65 bc	9.92 ab	13.14 a		

Mean B = **

Mean B1 = 10.85 a

Mean B2 = 6.55 b

Mean (AxC) (**)

Mean A1 C1 = 0.73 ± 1.16 c

Mean A1 C2 = 8.49 ± 10.15 ab

Mean A1 C3 = 10.92 ± 10.43 ab

Mean A1 C4 = 14.25 ± 12.59 a

Mean A2 C1 = 9.26 ± 8.99 ab

Mean A2 C2 = 4.15 ± 4.89 bc

Mean A2 C3 = 8.67 ± 8.78 ab

Mean A2 C4 = 11.97 ± 8.44 a

Mean (BxC) (**)

Mean B1 C1 = 6.23 ± 9.43 bcd

Mean B1 C2 = 10.93 ± 9.44 b

Mean B1 C3 = 8.27 ± 8.86 bcd

Mean B1 C4 = 17.47 ± 8.42 a

Mean B2 C1 = 3.23 ± 4.66 cd

Mean B2 C2 = 2.09 ± 4.04 d

Mean B2 C3 = 11.45 ± 10.35 ab

Mean B2 C4 = 9.50 ± 11.22 bc

ตารางที่ 17 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิดขึ้นส่วนเป็นสีน้ำตาลของกล้วยไม้ช้างเผือก (*Rhynchosyilis igantean* var. *harrisonianum*)

Source	df	Sum of square	Mean square	F Value	Pr>F
A	1	0.257846	0.257846	0.00	0.9465
B	1	586.127401	586.127401	10.29	0.0017
C	3	1452.292394	484.097465	8.50	<0.0001
A*B	1	128.763020	128.763020	2.26	0.1355
A*C	3	809.592324	269.864108	4.74	0.0038
B*C	3	723.461781	241.153927	4.24	0.0071
A*B*C	3	1687.734149	562.578050	9.88	<0.0001

ตารางที่ 18 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโคมاتิกเอ็มบริโอของกล้วยไม้ช้างเผือก (*Rhynchostylis gigantea* var. *harrisonianum*)

CW (%)	NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร) (AxBxC) (ns)				Mean (AxB) (ns)	Mean (A) (ns)
		0 มิลลิกรัมต่อลิตร (C1)	0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (C2)	1 มิลลิกรัมต่อลิตร (C3)	3 มิลลิกรัมต่อลิตร (C4)		
0% (A1)	0 มิลลิกรัมต่อลิตร (B1)	0.31 ± 0.88	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.44	0.04
	0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (B2)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
10% (A2)	0 มิลลิกรัมต่อลิตร (B1)	0.33 ± 0.93	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.48	0.05
	0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (B2)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
	Mean (C) (ns)	0.16	0.00	0.00	0.00		

Mean B = ns

Mean B1 =

0.08

Mean B2 =

0.00

Mean (AxC) (ns)

Mean A1C1 =

0.15 ± 0.61

Mean (BxC) (ns)

Mean B1 C1 =

0.32 ± 0.88

Mean A1 C2 =

0.00 ± 0.00

Mean B1 C2 =

0.00 ± 0.00

Mean A1 C3 =

0.00 ± 0.00

Mean B1 C3 =

0.00 ± 0.00

Mean A1 C4 =

0.00 ± 0.00

Mean B1 C4 =

0.00 ± 0.00

Mean A2 C1 =

0.18 ± 0.68

Mean B2 C1 =

0.00 ± 0.00

Mean A2 C2 =

0.00 ± 0.00

Mean B2 C2 =

0.00 ± 0.00

Mean A2 C3 =

0.00 ± 0.00

Mean B2 C3 =

0.00 ± 0.00

Mean A2 C4 =

0.00 ± 0.00

Mean B2 C4 =

0.00 ± 0.00

ตารางที่ 19 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิดโคมاتิกเอ็มบริโอของกล้วยไม้ช้างเผือก (*Rhynchostylis gigantea* var. *harrisonianum*)

Source	df	Sum of square	Mean square	F Value	Pr>F
A	1	0.00261692	0.00261692	0.03	0.8741
B	1	0.21532418	0.21532418	2.07	0.1526
C	3	0.60522058	0.20174019	1.94	0.1267
A*B	1	0.00052118	0.00052118	0.01	0.9436
A*C	3	0.00464118	0.00154706	0.01	0.9975
B*C	3	0.60992801	0.20330934	1.96	0.1243
A*B*C	3	0.00039076	0.00013025	0.00	0.9999

ตารางที่ 20 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ขึ้นส่วนที่เป็นสีเขียวของกล้วยไม้ช้างเผือก (*Rhynchosyris gigantea* var. *harrisonianum*)

CW (%)	NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร) (AxBxC) (*)				Mean (AxB) (ns)	Mean (A) (**)
		0 มิลลิกรัมต่อลิตร (C1)	0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (C2)	1 มิลลิกรัมต่อลิตร (C3)	3 มิลลิกรัมต่อลิตร (C4)		
0% (A1)	0 มิลลิกรัมต่อลิตร (B1)	1.52 ± 2.54 c	1.78 ± 3.65 c	2.86 ± 1.73 c	1.94 ± 1.85 c	1.99 ± 2.55	2.90 b
	0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (B2)	6.08 ± 3.74 c	1.26 ± 1.78 c	2.19 ± 1.78 c	5.15 ± 4.24 c	3.69 ± 3.75	
10% (A2)	0 มิลลิกรัมต่อลิตร (B1)	6.48 ± 4.84 c	15.20 ± 9.64 b	16.33 ± 3.42 b	21.87 ± 9.90 b	14.88 ± 9.34	16.56 a
	0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (B2)	15.35 ± 10.48 b	14.69 ± 2.98 b	0.76 ± 1.86 c	34.89 ± 19.56 a	18.36 ± 17.47	
	Mean (C) (**)	7.07 b	7.22 b	5.19 b	15.89 a		

Mean B = ns Mean B1 = 8.23

Mean B2 = 10.01

Mean (AxC) (**) Mean A1 C1 = 3.93 ± 3.91 de

Mean A1 C2 = 1.51 ± 2.75 e

Mean A1 C3 = 2.50 ± 2.31 de

Mean A1 C4 = 3.72 ± 3.69 de

Mean A2 C1 = 10.62 ± 8.93 bc

Mean A2 C2 = 14.98 ± 7.32 b

Mean A2 C3 = 8.55 ± 8.55 cd

Mean A2 C4 = 28.76 ± 16.70 a

Mean (BxC) (**) Mean B1 C1 = 4.00 ± 4.53 bc

Mean B1 C2 = 8.09 ± 9.75 bc

Mean B1 C3 = 9.08 ± 7.43 bc

Mean B1 C4 = 11.90 ± 12.38 ab

Mean B2 C1 = 10.14 ± 8.60 bc

Mean B2 C2 = 6.30 ± 7.07 bc

Mean B2 C3 = 1.58 ± 2.48 c

Mean B2 C4 = 19.24 ± 20.29 a

ตารางที่ 21 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์ขึ้นส่วนที่เป็นสีเขียวของกล้วยไม้ช้างเผือก (*Rhynchostylis gigantea* var. *harrisonianum*)

Source	df	Sum of square	Mean square	F Value	Pr>F
A	1	58882.127421	58882.127421	110.85	<0.0001
B	1	200.165972	200.165972	3.77	0.0547
C	3	1990.841508	663.613836	12.51	<0.0001
A*B	1	19.048828	19.048828	0.36	0.5503
A*C	3	1884.477436	628.159145	11.84	<0.0001
B*C	3	1108.003276	369.334425	6.96	0.0002
A*B*C	3	612.198553	204.066184	3.85	0.0116

ตารางที่ 22 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโคมاتิกเอ็มบริโอของกล้วยไม้ช้างเผือกแยกส่วนโคนและปลายใบ (*Rhynchostylis gigantea* var. *harrisonianum*).

CW (%)	NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร)								Mean (A) (ns)
		0 มิลลิกรัมต่อลิตร (C1)		0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (C2)		1 มิลลิกรัมต่อลิตร (C3)		3 มิลลิกรัมต่อลิตร (C4)		
		Tip (D1)	Base (D2)	Tip (D1)	Base (D2)	Tip (D1)	Base (D2)	Tip (D1)	Base (D2)	
0% (A1)	0 มิลลิกรัมต่อลิตร (B1)	0.00 ± 0.0	0.62 ± 1.77	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.04
	0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (B2)	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
10% (A2)	0 มิลลิกรัมต่อลิตร (B1)	0.66 ± 1.86	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.05
	0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (B2)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
Mean C = ns		0.16		0.00		0.00		0.00		

Mean D (ns) Mean D1 = 0.04

Mean D2 = 0.04

Mean B (ns) Mean B1 = 0.08

Mean B2 = 0.00

ตารางที่ 23 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิดโคมاتิกเอ็มบริโอของกล้วยไม้ช้างเผือกแยกส่วนโคนและปลายใบ (*Rhynchosyilis gigantea* var. *harrisonianum*).

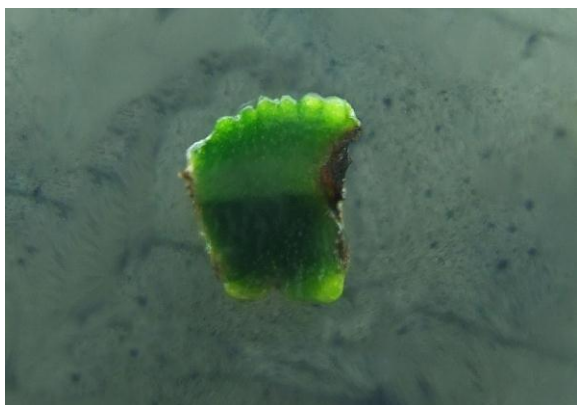
Source	df	Sum of square	Mean square	F Value	Pr>F
A	1	0.00612909	0.00612909	0.03	0.8643
B	1	0.42647861	0.42647861	2.04	0.1550
C	3	1.21307492	0.40435831	1.93	0.1256
D	1	0.00044405	0.00044405	0.00	0.9633
A*B	1	0.00142917	0.00142917	0.01	0.9342
A*C	3	0.00975693	0.00325231	0.02	0.9974
A*D	1	0.43179693	0.43179693	2.06	0.1525
B*C	3	1.20859877	0.40286626	1.92	0.1267
B*D	1	0.00061068	0.00061068	0.00	0.9570
C*D	3	0.00072066	0.00024022	0.00	0.9999
A*B*C	3	0.00067903	0.00022634	0.00	1.0000
A*B*D	1	0.42658599	0.42658599	2.04	0.1550
B*C*D	3	0.00059915	0.00019972	0.00	1.0000
A*B*C*D	6	2.43881746	0.40646958	1.94	0.0755



G. $\frac{1}{2}$ MS เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และ TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ (ทรีตเมนต์ที่ 11) (ขนาดไซมาติกเอ็มบริโอ 2 มิลลิเมตร) (a)



H. $\frac{1}{2}$ MS เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และ TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ทรีตเมนต์ที่ 11) (ขนาดไซมาติกเอ็มบริโอ 2 มิลลิเมตร) (b)



I. $\frac{1}{2}$ MS เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ทรีตเมนต์ที่ 12) (ขนาดไซมาติกเอ็มบริโอ 2 มิลลิเมตร)



J. $\frac{1}{2}$ MS เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ทรีตเมนต์ที่ 13) (ขนาดไซมาติกเอ็มบริโอ 1.5 มิลลิเมตร)



K. $\frac{1}{2}$ MS เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ทรีตเมนต์ที่ 15) (ขนาดไซมาติกเอ็มบริโอ 1 มิลลิเมตร) (a)



L. $\frac{1}{2}$ MS เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ทรีตเมนต์ที่ 15) (ขนาดไซมาติกเอ็มบริโอ 1 มิลลิเมตร) (b)

ภาพที่ 5 การเกิดไซมาติกเอ็มบริโอในกล้วยไม้ช้างเผือก

จากผลการศึกษาในกล้วยไม้ช้างเผือกจะพบว่าอุปสรรคสำคัญอยู่ที่การไม่สามารถรอดชีวิตได้นานในอาหารเพาะเลี้ยงซึ่งมีส่วนมาจากการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนใบที่เกิดจากการตัดชิ้นใบอ่อนของกล้วยไม้ช้างเผือก ซึ่งการเกิดสีน้ำตาลมีรายงานสาเหตุว่าเกิดจากสารประกอบฟีนอลในระดับทางเคมี (Xu *et al.*, 1997; Li and Qiao, 2001) โดยสารสีน้ำตาลนี้สามารถกระตุ้นโพลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase; PPO) ในชิ้นส่วนของพืชและเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์เนื้อเยื่อทำให้เกิดสีน้ำตาลซึ่งมาจากสารประกอบพวก quinine ซึ่งเกิดจากการออกซิเดชัน (Chen, 2004; Chen *et al.*, 2005) โดยสารประกอบฟีนอลมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความต้านทานของพืชต่อเชื้อโรค (Nicholson and Hammerschmidt 1992) หรือกล่าวได้ว่ามีบทบาททั้งต่อต้านการเกิดความเครียดทั้งจากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิตของพืช (Kefeli *et al.*, 2003; Conceicao *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2006) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งสารสีน้ำตาลนี้สามารถเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชได้อย่างช้า ๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารและไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ทำให้เกิดความเป็นพิษทั้งในเนื้อเยื่อและในอาหาร (Feng-jie *et al.*, 2007) การใส่สารยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน (anti-oxidants) จะไปยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลโดยการไปเปลี่ยนแปลงศักยภาพในการเกิดออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลที่อยู่รอบ ๆ ชิ้นส่วนพืช และผลที่ตามมาคือการเกิดสีน้ำตาลจะลดลง การใช้ตัวดูดซับ (absorbents) คือเพื่อการดูดซับ quinines ดังนั้นการใช้สารยับยั้งการเกิดออกซิเดชันและตัวดูดซับ (absorbents) ก่อน (pretreatment) จึงเป็นวิธีการหนึ่งในการลดการเกิดสีน้ำตาล (Feng-jie *et al.*, 2007) ตัวอย่างของตัวยับยั้งการเกิดออกซิเดชันที่เกิดจากฟีนอล ได้แก่ MC, 8-hydroxyquinoline, sulfate, argent, nitras (Zhong *et al.*, 2002), VC, cysteine, globulariacitrin, ovalbumin เป็นต้น (Feng-jie *et al.*, 2007) ขณะที่ตัวดูดซับได้แก่ ผงถ่าน และ polyvinylpyrrolidone (PVP) (Han *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2000; Chen, 2004) แต่ต้องใช้ในระดับที่เหมาะสม (Park *et al.*, 2000; Qin and Sun, 2002; Zhou *et al.*, 2002) ในการศึกษาครั้งนี้ใส่ผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตรในอาหาร ทั้งนี้เพราะผงถ่านมีผลข้างเคียงเนื่องด้วยการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลเกิดโดยการไปดูดซับสารควบคุมการเจริญเติบโตเพราะเป็นตัวที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษของฟีนอลในเวลาเดียวกัน ดังนั้นการจะใช้ผงถ่านต้องมีความระมัดระวัง ซึ่งการใช้ผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ PVP 1.5 กรัมต่อลิตร พบว่าเป็นระดับที่มีความเหมาะสม (Park *et al.*, 2000; Qin and Sun, 2002; Zhou *et al.*, 2002) ขณะเดียวกันการปรับสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตก็มีส่วนสำคัญ เช่น พบว่าการเพิ่มความเข้มข้น BA จะทำส่งผลต่อการเกิดสีน้ำตาลและอัตราการเปลี่ยนแปลงของพืช (differentiating rate) เพิ่มขึ้น ส่งผลให้พืชเป็นสีน้ำตาล แต่การมี BA เข้มข้นต่ำก็พบว่าช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์ฟีนอลเช่นกัน (Yao *et al.*, 1999) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Qiu and Cao, 1989) พบได้ในหลายพืช เช่น walnuts (Zhang *et al.*, 2003) และมันฝรั่ง (Zhang *et al.*, 2004) และกล้วย (Ko *et al.*, 2009)

มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการลดการเกิดสีน้ำตาลของพืชระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทั้งโดยการแช่เนื้อเยื่อในสารต่อต้านการเกิดออกซิเดชันและช่วยในการดูดซับในเวลาเดียวกัน โดยพบว่าใน *Platanus occidentalis* การเติมวิตามินซีความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร สามารถการเกิดสีน้ำตาลได้ หรือการใช้สัดส่วน

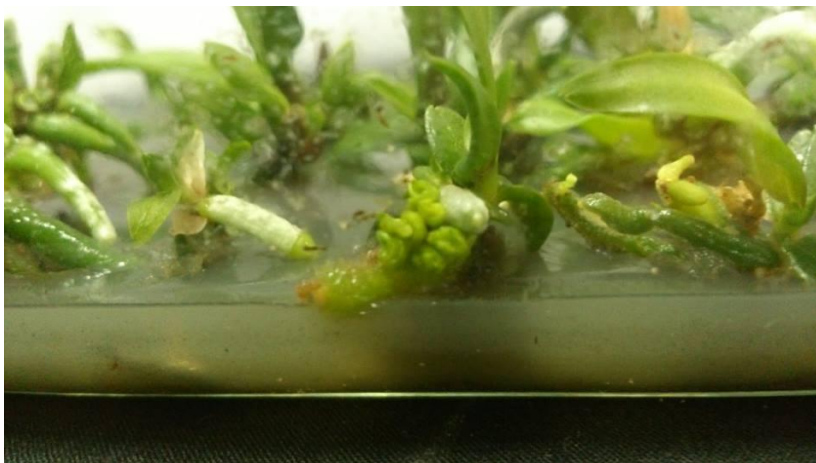
ของสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับการใช้ผงถ่านและ PVP (BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ร่วมกับผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร และ PVP 1.5 กรัมต่อลิตร) ก็สามารถลดการเกิดสีน้ำตาลได้เช่นเดียวกัน (Feng-jie *et al.*, 2007)

อย่างไรก็ตามอาจพบว่าผงถ่านสามารถลดการเกิดสีน้ำตาลในพืชบางชนิดได้แต่อาจไม่สามารถใช้ได้กับทุกพืช เช่น พบว่าผงถ่านและ PVP ไม่สามารถลดการเกิดสีน้ำตาลในกล้วยได้ แต่การเติม ascorbic acid 0.005 เปอร์เซ็นต์ ช่วยลดการเกิดสีน้ำตาลได้ 60 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเพิ่มจำนวนต้นอ่อนได้ (Ko *et al.*, 2009) แม้ว่าการปลดปล่อยสารฟีนอลจะมีพืชต่อเนื้อพืช แต่การสะสมสารดังกล่าวในอาหารอาจไม่ใช่สาเหตุที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลในต้นอ่อนของกล้วยเพราะเมื่อทำการเติมสารดูดซับในอาหารก็ไม่สามารถลดปัญหาดังกล่าวได้ ขณะที่ ascorbic acid จะมีการส่งผ่านไปยังใบและยับยั้งการสร้างสารฟีนอลในใบพืช (Ko *et al.*, 2009) ซึ่ง ascorbic acid เป็นที่รู้จักกันดีว่ามีการใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Elmore *et al.*, 1990) ซึ่งสามารถแก้ปัญหาการเกิดสีน้ำตาลได้ในพืชหลายชนิด (Matin *et al.*, 2007)

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยง faba bean เพื่อป้องกันการเกิดสีน้ำตาลมีการทดสอบเบื้องต้นก่อนด้วย PVA จากนั้นทำการเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างซึ่งประกอบด้วยสารดูดซับ ได้แก่ ผงถ่าน และสารยับยั้งการเกิด antioxidants ได้แก่ ascorbic acid, cysteine และ silver nitrate พบว่าการทดสอบเบื้องต้นโดยการแช่ด้วยสารละลาย PVP (1000 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Murashige and Skoog medium (MS medium) ร่วมกับน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และผงวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และ 6-benzylaminopurine 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ thidiazuron 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หรืออาจมีการเติม ascorbic acid 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือผงถ่าน 10 กรัมต่อลิตร จะช่วยลดการเกิดสีน้ำตาลและช่วยในการสร้างยอดได้ (Abdelwahd *et al.*, 2008)

ด้วยเหตุที่สูตรอาหารเพื่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากการศึกษาในครั้งนี้นี้ยังคงพบการเกิดสีน้ำตาลในชิ้นส่วนกล้วยไม้ข้างเผือกในระดับที่สูงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ และอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้พบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอต่ำด้วยเช่นกัน ดังนั้นการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเติมสาร ได้แก่ PVP หรือการเติม ascorbic acid อาจเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาศึกษาต่อยอดเพื่อลดการเกิดอาการสีน้ำตาลในกล้วยไม้ข้างเผือกได้ต่อไป

ในการศึกษาเกี่ยวกับกล้วยไม้ข้างเผือกมีความยุ่งยากพอสมควรเนื่องจากการเจริญเติบโตช้า ในอาหารสูตรต่าง ๆ ทำให้การขยายพันธุ์เองทำได้ช้า และจากข้อจำกัดดังกล่าวนี้ทำให้เป็นพืชชนิดที่มีราคาสูง อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้พยายามเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลองพบว่าทำได้ช้ามาก (ภาพที่ 6-10) ทำให้ไม่อาจทำการทดลองซ้ำใหม่ในทุกการทดลองได้



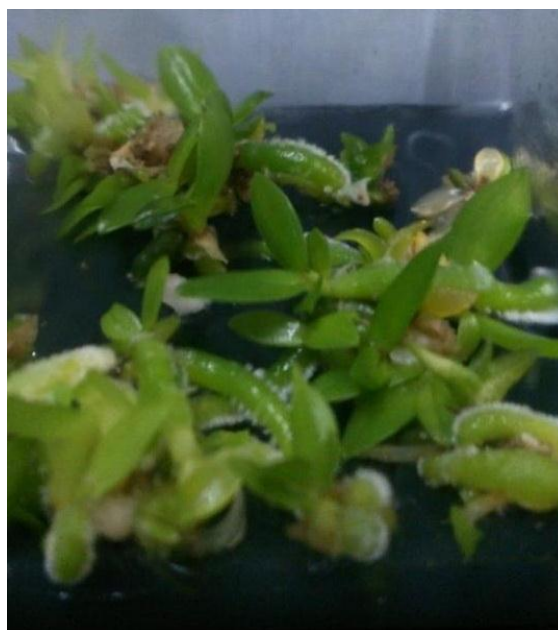
ภาพที่ 6 กล้วยไม้ช้างเผือกที่วางเลี้ยงโปรโตคอร์มเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ร่วมกับ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน แล้วนำมาวางเลี้ยงต่อในอาหารสูตร VW เป็นเวลา 7 เดือน



ภาพที่ 7 แคลลัสที่เกิดจากวางเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ร่วมกับ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 9 เดือน



ภาพที่ 8 กล้วยไม้ช้างเผือกที่วางเลี้ยงโปรโตคอร์มเพื่อเพิ่มปริมาณโดยอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ร่วมกับ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือนแล้วนำมาวางเลี้ยงต่อในอาหารสูตร VW เป็นเวลา 5 เดือน



ภาพที่ 9 กล้วยไม้ช้างเผือกที่วางเลี้ยงโปรโตคอร์มเพื่อเพิ่มปริมาณโดยอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ร่วมกับ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือนแล้วนำมาวางเลี้ยงต่อในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ร่วมกับ peptone 2 กรัมต่อลิตร และผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 เดือน



ภาพที่ 10 ต้นกล้วยไม้ช้างเผือกที่วางเลี้ยงโปรโตคอร์มในอาหารสูตร VW (ขวามือ) และ อาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ร่วมกับ peptone 2 กรัมต่อลิตร และผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 เดือน

สรุปผลการวิจัย

การทดลองที่ 1

ผลของไซโตไคนินต่อการชักนำแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงในกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล

โดยพบว่าผลของการเติม TDZ ในอาหารเพาะเลี้ยงทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนใบสูงขึ้น และมีอิทธิพลสูงกว่าการเติม NAA โดยการเติมฮอร์โมนทั้งสองชนิดร่วมกันไม่ได้มีผลส่งเสริมกันในการเพิ่มเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดทั้งการวางในลักษณะคว่ำและหงายใบ เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนใบที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอภายหลังการชักนำในอาหารทั้ง 6 สูตรพบค่าต่ำทั้งการคว่ำใบและหงายใบ แต่พบว่าการหงายใบมีค่าสูงกว่า คืออยู่ระหว่าง 0.89-8.04 เปอร์เซ็นต์ และ 0-18.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในการคว่ำใบพบว่าความสามารถของตำแหน่งชิ้นส่วนใบต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอต่างกัน โดยความสามารถในการเกิดโซมาติกของชิ้นส่วนโคนใบมากกว่าชิ้นส่วนปลายใบ โดยที่อาหารสูตร ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบการเกิดจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อชิ้นส่วนใบที่รอดชีวิตสูงสุดทั้งส่วนบริเวณปลายใบและโคนใบ ขณะที่เมื่อทำการวางเลี้ยงลักษณะหงายใบแล้วผลของการใช้ส่วนปลายใบและโคนใบไม่ต่างกัน โดยพบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงในอาหาร 3 สูตร ได้แก่ สูตร ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตร ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตร ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการศึกษาในการทดลองนี้อาจสรุปได้ว่าสาร TDZ ส่งผลต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของกล้วยไม้หวายเอื้องสกุลสูงกว่าปัจจัยของ NAA อย่างไรก็ตามการวางเลี้ยงที่ต่างกันส่งผลต่อการชักนำ โดยภาพรวมการวางหงายใบสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงกว่าการคว่ำใบ และลักษณะการวางเลี้ยงส่งผลต่อความสามารถของชิ้นส่วนในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ คือ เมื่อวางเลี้ยงแบบคว่ำใบนั้นส่วนโคนใบพบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงกว่าส่วนของปลายใบ แต่สำหรับการวางเลี้ยงแบบหงายใบนั้นทั้งส่วนโคนใบและปลายใบให้ผลใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ลักษณะการวางเลี้ยงแบบคว่ำและหงายใบยังพบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอต่างกัน คือ 1 สูตรและ 3 สูตรอาหาร ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามทุกสูตรมีการเติม TDZ

สำหรับการเกิดของแคลลัสจากโปรโตคอร์ม พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ที่ค่อนข้างต่ำมาก โดยสูตรอาหารชักนำแคลลัสที่ 6 คือ ½ MS เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสประมาณสูงสุดอยู่ระหว่าง 5 – 10 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2

ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงในกล้วยไม้ช้างเผือก

พบปัญหาการเกิดสีน้ำตาลบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนใบซึ่งมีสาเหตุมาจากการสร้างสารประกอบฟีนอลและเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการตายของชิ้นส่วนใบ

การทดลองที่ 3

ผลของน้ำมะพร้าวร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการลดอาการสั่นน้ำตาลในการเพาะเลี้ยง
ชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ช้างเผือก

จากการพิจารณาในแต่ละปัจจัยที่ศึกษา พบว่าการเติม NAA จะทำให้เกิดสั่นน้ำตาลของชิ้นส่วนใบกล้วยให้ช้างเผือกลดลง ขณะที่การเติม TDZ กลับพบว่ามีอาการสั่นน้ำตาลเพิ่มขึ้น แต่เมื่ออาหารสูตรที่มีการเติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับปัจจัยอื่น ๆ จะทำให้สั่นน้ำตาลลดลง โดยเฉพาะสูตรที่มีการเติมทั้งน้ำมะพร้าวและ NAA อย่างไรก็ตามแม้ว่าที่ความเข้มข้น TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่สูงที่สุดจะพบอาการสั่นน้ำตาลสูงสุด แต่พบว่าเป็นความเข้มข้นที่ชิ้นส่วนพืชที่ยังคงสีเขียวสูงที่สุดด้วยเช่นกัน ในระหว่างการเพาะเลี้ยงทำให้อาจมีโอกาสดังกล่าวในการเกิดโสมติคเอ็มบริโอ

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโสมติคเอ็มบริโอพบทั้งบนชิ้นส่วนโคนและปลายใบ โดยพบการเกิดโสมติคเอ็มบริโอที่โคนใบเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS (สูตรที่ 1) เพียงสูตรเดียว แต่พบการเกิดโสมติคเอ็มบริโอของชิ้นส่วนปลายใบเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS เติมน้ำ CW 10 เปอร์เซ็นต์ (สูตรที่ 9) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงขึ้นกับตำแหน่งของชิ้นส่วนใบด้วยเช่นกัน อาจกล่าวได้ว่าการเติมน้ำมะพร้าวร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารชักนำโสมติคเอ็มบริโอของกล้วยไม้ช้างเผือกนอกจากจะช่วยในการลดอาการสั่นน้ำตาลแล้ว ยังน่าจะส่งเสริมให้มีการสร้างโสมติคเอ็มบริโอได้

บรรณานุกรม (bibliography)

- दनัย บุญยเกียรติ. 2547. สรีรวิทยาของพืช. ฮอรัโมนพืช แหล่งที่มา : http://web.agri.cmu.ac.th/hort/course/359311/PPHY10_hormone.htm, 19 มิถุนายน 2552.
- ธนากร วงษ์ศา อภินันท์ ลิ้มมงคล และ อนุพันธ์ กงบังเกิด. 2551. การเปรียบเทียบวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้าง. NU Science J. 5(2): 165-175.
- นิรนาม. 2552. กล้วยไม้ไทย. แหล่งที่มา : <http://www.geocities.com/n.attanasiri/Page10.html>. 3 พฤษภาคม 2552.
- ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และ อารีย์ วรรณวิวัฒน์. 2552. บทปฏิบัติการ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. บริษัท เอเจนเทค จำกัด กรุงเทพฯ.
- รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. ภาควิชาไร่นา คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 345 น.
- รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- วุฒิชัย ไช้มุกต์ และสมปอง เตชะโต. 2551. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยไม้ช้างแดง. วารสารเกษตร 24(3): 187-198.
- ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี. 187 น.
- Abdelwahd, R., N. Hakam, M. Labhilili and S. M. Udupa. 2008. Use of adsorbant and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in in vitro plantlet regeneration of faba bean. Afr. J. Biotechnol. 7(8): 997-1002.
- Alam, M. K., M. H. Rashid, M. S. Hossain, M. A. Salam and M. A. Rauf. 2002. In vitro seed propagation of *Dendrobium* (*Dendrobium transparens*) orchid as influenced by different media, Biotechnology. 1: 111-115.
- Antolovich, M., P. Prenzler, K. Robards and D. Ryan, 2000. Sample preparation of phenolic compounds in fruits. Analyst. 125: 989-1009.
- Arnaldos, T.L., R. Munoz, M.A. Ferrer and A.A. Calderon, 2001. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananasa*, cv. *Chandler*) callus culture. Physiol. Plantarum., 113: 315-322.

- Chamandoosti, F. 2010. The Relationship between plant growth regulators for organogenesis and phenolic compound in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Asian Journal of Developmental Biology* 2: 16-22.
- Chang, C. and W. C. Chang. 1998. Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. *Plant Cell Rep.* 17:251-255.
- Chen, F., L. Li and W. Gong. 2005. Discussion of browning effects during the tissue cultural of plant. *Northern Hort. J.* 2: 69 (in Chinese with an English abstract).
- Chen, J.-T., C. Chang and W.-C. Chang. 1999. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey' and subsequent plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 19: 143-149.
- Chen, J.-T. and W.-C. Chang. 2000a. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). *Plant Sci.* 160: 87-93.
- Chen, J. and W.-C. Chang. 2000b. Plant regeneration via embryo and shoot bud formation from flower-stalk explants of *Oncidium* Sweet Sugar. *Plant Cell Tiss. Org.* 62: 95-100.
- Chen, J.-T. and W.-C. Chang. 2001. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Plant Growth Regul.* 34: 229-232.
- Chen, K. 2004. Browning mechanism and depress method during the tissue culture. *J. Anhui Agric. Sci.*, 32(5): 1,034–1,036 (in Chinese with an English abstract)
- Chen, T.-Y., J.-T. Chen and W.-C. Chang. 2004. Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Phalaenopsis* orchids. *Plant Cell Tiss. Org.* 76: 11-15.
- Chen, J. and W. Chang 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Plaelenopsis amabilis*. *Biol. planttarum.* 50(2): 169-173
- Chen, Y. and C. Piluck. 1995. Effect of thidiazuron and N6-benzylaminopurine on shoot regeneration of *Phalaenopsis*. *Plant Growth Regul.* 16:99-101.
- Chung, H., J. Cheng and W. Chang. 2005. Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* Pink and Subsequent plant regeneration. *Bio. Plant* 11: 765-769.
- Conceicao, L. F., F. Ferreres, and R. M. Tavares and A. C. Dias. 2006. Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry* 67: 149-55.
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, Ithaca.

- Dai, C., V. N. Lambeth, R. Raben and D. Mertz. 1987. Micropropagation of *Rhododendron prinophyllum* by ovary culture. *HortScience* 22: 491-493.
- Decruse, S. W., A. Gangaprasad, S. Seenii and V. S. Menon. 2003. Micropropagation and eco-restoration of *Vanda spathulata*, an exquisite orchid. *Plant Cell Tiss. Org.* 72: 199-202.
- Dressler, R. L. 1981. The orchids: natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge.
- Dunlap, J. R., S. Kresovich and R. E. McGee. 1986. The effect of salt concentration on auxin stability in culture media. *Plant Physiol.* 81: 934-936.
- Ernst, R. 1994. Effects of thidiazuron on in vitro propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae). *Plant Cell Tiss. Org.* 39: 273-275.
- Fan, L., R. Linker, S. Gepstein, E. Tanimoto, R. Yamamoto and P. M. Neumann. 2006. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stellar accumulation of wall phenolics. *Plant Physiol.* 140: 603-12.
- Feng-jie, T., Z. Zhi-yi, Z. Jun, Y. Na and W. Dong-mei. 2007. Contamination and browning in tissue culture of *Platanus occidentalis* L. *For. Stud. China.* 9(4): 279-282. DOI 10.1007/s11632-007-0044-9.
- Gupta, S.K., P.K. Singh, S.V. Sawant, R. Chaturvedi and R. Tuli, 2000. Effect of light intensity on *in vitro* multiple shoot induction and regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv Khandawa-2). *Indian J. Exp. Biol.*, 38: 399-401.
- Han, S. Y., L. W. Qi, S. G. Zhang. 1995. Study on browning effect of walnut tissue culture. *J. Shanxi Agric. Univ.*, 4: 339-341 (in Chinese with an English abstract).
- Huan, L., T. Takamura and M. Tanaka. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Sci.* 166: 1443-1449.
- Huetteman, C. A and J. E. Preece. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org.* 33:105-119.
- James, D. 1983. Adventitious root formation in vitro in apple rootstocks (*Malus pumila*). I. Factors affecting the length of the auxin-sensitive phase in M.9 and M.26. *Physiol. Plant.* 57: 154-158.
- Jitsopakul, N. 2008. Vitrification-based cryopreservation of *Vanda coerulea* Griff. ex Linal. PH.D thesis. Faculty of graduate studies. Mahidol University.

- Jones, W. E., A. R. Kuehnle and K. Arumuganathan. 1998. Nuclear DNA content of 26 orchids (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. Ann. Bot. 82: 189-184.
- Kefeli, V.I., M.V. Kalevitch and B. Borsari, 2003. Phenolic cycle in plants and environment. J. Cell Mol. Biol., 2: 13-18.
- Khentry, Y., S. Chowpongpan, A. Paradormuwat, S. Tantiwiwat and N. Thaveechai. 2007. Detection of Cymbidium mosaic virus in protocorm-like bodies in *Dendrobium Sonia* using one-step RT-PCR. J. Plant Biochemistry and Biotechnology. 16(2): 123-125.
- Knudson, L. 1946. A nutrient for germination of orchid seeds. Am Orchid Soc. Bull. 15:214-217.
- Ko, W. H., C. C. SU, C. L. Chen and C. P. Chao. 2009. Control of lethal browning of tissue culture plantlets of *Cavendish banana* cv. *Formosana* with ascorbic acid. Plant Cell Tiss Org. (2009) 96:137–141. DOI 10.1007/s11240-008-9469-7
- Kumria, R., V.G. Sunnichan, D.K. Das, S.K. Gupta, V.S. Reddy, R.K. Bhatnagar and S. Leekavathi, 2003. High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) through metabolic stress. Plant Cell Rep. 21: 635-639.
- Lakshmanan, P., C. S. Loh and C. J. Goh. 1995. An in vitro method for rapid regeneration of a monopodial orchid hybrid Aranda Deborah using thin section culture. Plant Cell Rep. 14: 510-514.
- Le, B., N. T. Hang Phuong, L. T. AnhHong and K. Tran Thanh Van. 1999. High frequency shoot regeneration from *Rhynchostylis gigantea* (orchidaceae) using thin cell layers. Plant Growth Regul. 28: 179-185.
- Li, H. X., N. J. Qiao. 2001. Study on decreasing the browning of explants of Cangxi pear. J. Southwest Agric. Univ., 23(6): 524–526 (in Chinese with an English abstract).
- Liu, R. J., A. D. Meng, X. Q. Deng and Y. R. Li. 1988. Seedling rapid propagation of *Dendrobium candidum*. Acta. Pharm. 23: 636-640.
- Lorenzo, J.C. and M.L. Angeles, 2001. Sugarcane microporopagation and phenolic excretion. Plant Cell Tiss. Org. 65: 1-8.
- Lux-Endrich, A., D. Treutter and W. Feucht, 2000. Influence of nutrients and carbohydrate supply on the phenol composition of apple shoot cultures. Plant Cell Tiss. Org. 60: 15-21.

- Martin, K. P, C. L. Zhang, A. Sltater and J. Madassery. 2007. Control of shoot necrosis and plant death during micro-propagation of banana and plantains (*Musa* spp). Plant Cell Tiss. Org. 88:51–59. doi:10.1007/s11240-006-9177-0.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15(3): 473-497.
- Nanakorn, W. and S. Indhamusika. 1999. Ex-situ conservation of native Thai orchids at Queen Sirikit Botanic Garden. Available from :
<http://www.iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/nankron.html>.
- Nasiruddin, K. M., R. Begum, S. Yasmin. 2003. Protocorm-like bodies and plantlet regeneration from *Dendrobium formosum* leaf callus. Asian Journal of Plant Science 2(13):955-957.
- Nayak, N. R., S. Sahoo, S. Patnaik, S. P. Rath. 2002. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). Scientia Horticulturae 94:107-116.
- Nicholson, R. L. and R. Hammerschmidt. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 30:369–389.
Doi:10.1146/annurev.py.30.090192.002101.
- Nissen, S. J. and E. G. Sutter. 1990. Stability of IAA and IBA in nutrient medium to several tissue culture procedures. HortScience 25(7): 800-802.
- Ozyigit, I.I., 2008. Phenolic changes during in vitro organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips. Afr. J. Biotechnol., 7: 1145-1150.
- Ozyigit, I.I., M.V. Kahraman and O. Ercan, 2007. Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Afr. J. Biotechnol., 6: 3-8.
- Park, Y. S., H. N. Murthy and K. Y. Paek. 2000. Mass multiplication of protocorm like bodies using bioreactor system and subsequent plantre generation in *Phalaenopsis*. Plant Cell Tiss. Org. 63: 67–72.
- Qin, H. L. and H. M. Sun. 2002. Review of butterfly orchid. J. Henan Profess. Tech. Teach. Coll., 30(2): 31–35 (in Chinese with an English abstract).
- Qiu, W D, Z. Y. Cao. 1989. Applied Technology of Plant Tissue Culture. Beijing: Higher Education Press, 96–98 (in Chinese).
- Robards, K., P.D. Prenzeler, G. Tucker, P. Swatsitang and W. Glover, 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits. Food Chem., 66: 401-436.

- Roy, J. and N. Benerjee. 2003. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var *oculatum* Hk.f. *Scientia Horticulturae* 97:333-340.
- Sheelavanthmath, S. S., H. N. Murthy, B. P. Hema, E. J. Hahn and K. Y. Pack. 2005. High frequency of protocorm-like bodies (PLBs) induction and plant regeneration from protocorm and leaf section of *Aerides crispum*. *Scientia Horticulturae* 106: 395-401.
- Shiau, Y. J., S. M. Nalawade, C. N. Hsia, V. Mulabagal and H. S. 2005. In vitro propagation of the Chinese medicinal plant, *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl., from axenic nodal segments. 41: 666-670.
- Srivastava, P. S., A. Steinhauer and H. Glock. 1985. Plantlet differentiation in leaf and root cultures of birch (*Betula pendula* Roth.). *Plant Sci.* 42: 209-214.
- Sunitibala, H. and R. Kishor. 2009. Micropropagation of *Dendrobium transparens* L. from axenic pseudobulb segments. *Indian J. of Biotechnology.* 8: 448-452.
- Thaithong, O. 1990. Orchids of Thailand. Office of Environmental Policy and Planning, Thailand.
- Thomas, T. D. and A. Michael. 2007. High-frequency plantlet regeneration and multiple shoot induction from cultured immature seeds of *Rhynchostylis retusa* Blume., an exquisite orchid. *Plant Biotechnol. Rep.* 1: 243-249.
- Tokuhara, K. and M. Mii. 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Rep.* 13: 7-11.
- Tokuhara, K. and M. Mii. 2001. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (ORCHIDACEAE). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 37:457-461.
- Vacin, E. and F. W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette* 110:605-613.
- Vajrabhaya, M. and T. Vajrabhaya. 1970. Culture of *Rhynchostylis gigantea* a monopodial orchid. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 39:907-910.
- Volpert, R., W. Osswald and E.F. Elstner, 1995. Effects of cinnamic acid derivatives on indole acetic acid oxidation by peroxidase. *Phytochemistry*, 38: 19-22.
- Wang, P. and L. Huang, 2009. Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ culture. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 12: 260-262.

- Wu, I.-F., J.-T. Chen and W.-C. Chang. 2004. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 107-109.
- Xu, Z. B., Z. S. Fu and Y. P. Yuan. 1997. The browning phenomenon of the plant tissue. *J. For. Agron.-Crop.*, 1: 55-56 (in Chinese with an English abstract).
- Yao, H. J., X. F. Luo and Y. T. Tian. 1999. Development of explants browning researches. *J. Beijing For. Univ.*, 21(3): 78-84 (in Chinese with an English abstract).
- Zhang, Z. G., L. Wang, H. Liu, Z. G. Cai, X. Z. Han et al. 1993. Studies on protocorm differentiation medium of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl., China *J. Chin. Materia. Med.* 18: 16-19.
- Zhang, S. H., D. Wang and Q. Wang. 2004. The browning elements regarding to *Phytophthora infestan* and the functions of AgNO₃ on the browning effects and cells division. *J. Chin. Phytoph.*, 18(2): 77-81 (in Chinese with an English abstract).
- Zhang, W. F., J. S. Gao, Y. H. Ou and P. W. Yang. 2003. Primary study on browning control in tissue culture of pellicular walnut. *Decid. Fruits*, 3: 4-7 (in Chinese with an English abstract).
- Zhong, M. Q., C. F. Lou and J. Z. Tan. 2002. Function of AgNO₃ during mulberry genetic translation. *J. Trop. Subtrop. Plant*, 10(1): 74-76 (in Chinese with an English abstract).
- Zhou, J. H., C. H. Ye and X. G. Chen. 2002. Study on corm proliferation culture of butterfly orchid. *J. Zhongkai Agric. Tech. Coll.*, 15(3): 13-17 (in Chinese with an English abstract)
- (Received.

ภาคผนวก

ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ-สกุล นางสาวศิรินภรณ์ภา พุ่มแจ้

Miss Sirinnapa Poomjae

วัน เดือน ปีเกิด 8 ธันวาคม 2521 (December 8, 1978)

ตำแหน่ง พนักงานมหาวิทยาลัย (อาจารย์)

สถานที่ทำงาน คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร

ติดต่อ โทรศัพท์/ โทรสาร 032-594038

e-mail address : p_sirin128@yahoo.com

ที่อยู่ปัจจุบัน 2020/37 ถ. ประชาสงเคราะห์ แขวง/ เขต ดินแดง กทม. 10320

โทรศัพท์ 02-6928744

ประวัติการศึกษา

1. วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปี 2544

2540-2544 ศึกษาปริญญาตรี สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

2. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2547

2544-2547 ศึกษาปริญญาโท สาขาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา (ชื่อเรื่อง/ปีที่ทำเนิการ ทั้งระดับปริญญาโทและปริญญาเอก)

- ระดับปริญญาโท

ชื่อเรื่อง : Histopathology of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* liver and kidney after long-term
low level exposure to distilled liquors

ปีที่ทำเนิการ 2544-2547

สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ แขนงวิชาเนื้อเยื่อวิทยา
และพยาธิวิทยา

ประวัติการทำงาน

2549 - ปัจจุบัน เป็นพนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่งอาจารย์

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร

การนำเสนอผลงาน

- Poomjao, S., Wattanasirmit, K., Piyatiratitvarakul, S. and Cherdshewasart, W. 2003. Subchronic effects of Kwao Kruea Dang Butea supaba and Kwao Kruea Dum Mucuna macrocapa on ovary of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. 29th Congress on Science and Technology of Thailand, 20-22 October 2003, Khon Kean University. (Poster Presentation in English).
- Poomjao, S. and Wattanasirmit, K.. 2003. Acute toxicity of distilled liquor on liver of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linn. 8th Biological Science Graduate Congress, 3-5 December 2003, The National University of Singapore. (Poster Presentation in English).
- Na Chiangmai, P. , P. Meetum, A. Puntong and S. Poomjao. 2008. Initiation stage of microgametogenesis of Physic nut (*Jatropha curcas* L.). 2nd Silpakorn University Research Fair, Bangkok, Thailand (poster presentation), 18-19 December 2008.

2. ชื่อ-สกุล ดร. พรณธิภา ณ เชียงใหม่

Dr. Pantipa Na Chiangmai

ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

วัน เดือน ปีเกิด 2 กันยายน 2519 (September, 2 1976)

สถานที่ทำงาน อาจารย์ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตำบลสามพระยา อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี 76120

ติดต่อ โทรศัพท์ 032-594037 โทรสาร 032-594037

e-mail address : pantipa@su.ac.th, m_surin@yahoo.com, mchiangmai@gmail.com

ที่อยู่ 65/2 หมู่ 6 ต. ยุหว่า อ. สันป่าตอง จ. เชียงใหม่ 50120 โทรศัพท์ 053-822695

มือถือ 081-1995360

ประวัติการศึกษา

1. วิทยาศาสตร์ดุสิตบัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตพืช) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Ph. D. (Crop Production Technology) Suranaree University of Technology

2542 – 2547 ศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช

(เทคโนโลยีการผลิตพืช) สำนักเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

-ได้รับทุนการศึกษาจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

ทุน กาญจนภิเษก (รุ่นที่ 2)

2.วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี 2542

M. Sc. (Agriculture) Agronomy Department, Chiangmai University,
Thailand

2540 – 2542 ศีษาระดับปริญญาโท ภาควิชาพืชไร่ (การปรับปรุงพันธุ์พืช)

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

- ได้รับทุนการศึกษาจาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

(ทุน 2 ปี)

3.วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี 2540

B. Sc. (Agriculture) Chiangmai University, Thailand

2536 – 2540 ศีษาระดับปริญญาตรี ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์ และ พรรณธิภา ญ เชียงใหม่. 2539. ระดับปุ๋ยและช่วงเวลาการกำจัดวัชพืชที่มีต่อ
ผลผลิตข้าวไร่. วารสารเกษตร 12 (2):125-133.

พรรณธิภา ญ เชียงใหม่ และ สุทัศน์ จุลศรีไกรวัล. 2542. ประสิทธิภาพของวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสมข้าว
บาร์เลย์. วารสารเทคโนโลยีสุรนารี 7:18-24.

ศรัญญา ชูเจริญ อลงกรณ์ คงเจริญ และ พรรณธิภา ญ เชียงใหม่. 2549. ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่างๆ
ของ *Vigna* spp. และ *Centrosema pascuorum* CV. Calvacade ในแปลงปลูกร่วมกับคุณค่าทาง
โภชนาการเพื่อใช้เป็นพืชอาหารสัตว์. งานสัมมนาบัณฑิตศึกษาเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 4 ประจำปี 2549
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วันที่ 25-26 ธันวาคม 2549 ณ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, หน้า 139-147.

วีรวรรณ ภมร และ พรรณธิภา ญ เชียงใหม่. 2552. ผลของอาหารและชิ้นส่วนพืชในการชักนำให้เกิดแคลลัส
ของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.). วารสารเกษตร 25(2): 125-133.

ชลธิชา ยวงโย จิรัชญา ศรีนาทม จักรชัย กาญจนสมศักดิ์ ยุภา ปู่แดงอ่อน และ พรรณธิภา ญ เชียงใหม่.
2553. ความแปรปรวนลักษณะบางประการของข้าวไร่ที่รวบรวมได้จากเกษตรกรบางรายในเขต
ภาคเหนือของประเทศไทย. วารสารแก่นเกษตร. 38(1):21-28.

จิรัชญา ศรีนาทม ชลธิชา ยวงโย จักรชัย กาญจนสมศักดิ์ ยุภา ปู่แดงอ่อน และ พรรณธิภา ญ เชียงใหม่.
2553. ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในเมล็ดข้าวป่าสามัญ ข้าวพันธุ์ปลูก และข้าวไร่. วารสารแก่น
เกษตร 38(2): 137-144.

วีรพันธ์ กันแก้ว สุทัศน์ จุลศรีไกรวัล สุรัตน์ นักหล่อ พิชัย สุพรไพบูลย์ พรรณธิภา ญ เชียงใหม่ วิมล ปันสุภา
และ สุมินทร์ สมุทคุปต์. 2554. การคัดเลือกถั่วแดงหลวงสายพันธุ์ดี. แก่นเกษตร 39 ฉบับพิเศษ
3:335-341.

- Na Chiangmai, P. 2004. The inheritance of seed size in mungbean. RGJ-Ph.D. Congress V. 23-25 April 2004. Puttaya, Chonburi, Thailand. (Poster Presentation in English).
- Na Chiangmai, P., P. Laosuwan and A. Waranyuwat. 2004. The Inheritance of Seed Size in Mungbean. Thai Journal of Agricultural Science, 37(4): 255-262.
- Na Chiangmai, P., P. Laosuwanand and A. Waranyuwat. 2006. The Effect of Mungbean Seed Size on Germinating Ability, Bean Sprout Production and Agronomic Characters. Silpakorn University International J. 6(1-2): 170-187.
- Chujaroen, S., A. Kongcharoen and P. Na Chiangmai. 2006. Characterization of Yield and Yield Components in *Vigna* spp. Kamphaengsaen Academic Journal, 4: 733-739.
- Kongcharoen, A., S. Chujaroen, P. Nilprapruck, P. Pummarin and P. Na Chiangmai. 2006. Comparison of Nutritional Values in Various Species of *Vigna* spp. Kamphaengsaen Academic Journal, 4: 740-746..
- Phamorn, W. and P. Na Chaingmai. 2007. In vitro callus induction of phytic nut (*Jatropha curcas* L.). 1st Silpakorn University Research Fair, Nakorn-Prathom, Thailand (present poster).
- Na Chiangmai, P. and P. Yodmingkhwan. 2008. Effects of phosphorus element on root development of wild rice species and 4 cultivated rice varieties. 2nd Silpakorn University Research Fair, Bangkok, Thailand (oral and poster presentation), 18-19 December 2008.
- Na Chiangmai, P. , P. Meetum, A. Puntong and S. Poomjae. 2008. Initiation stage of microgametogenesis of Physic nut (*Jatropha curcas* L.). 2nd Silpakorn University Research Fair, Bangkok, Thailand (poster presentation), 18-19 December 2008.
- Na Chiangmai, P., T. Chansem and S. Bootnoi. 2009. Drought manipulation: Effects on nutritive values of legume species; *Vigna* spp., *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade and *Stylosanthes guianensis* cv. Tha pra. Proceedings: Second Interactional Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries (SAADC 2009), 8-11 November 2009, Corus Hotel, Kuala Lumpur. 58-59 p. (Oral presentation)
- Na Chiangmai, P., S. Nanongtoom and S. Arunkeereewat. 2009. The effect of drought manipulation on seed yield and seed yield component characters in *Vigna* spp. and *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade in the field. Proceedings: Second International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries (SAADC 2009), 8-11 November 2009, Corus Hotel, Kuala Lumpur. 202-203 p. (Poster presentation)

- Na Chiangmai, P. and P. Yodmingkhwan. 2010. Common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and some tropical rice (*Oryza sativa* L.) varieties response to inorganic phosphorus application. Silpakorn University Science and Technology Journal (SUSTJ). 4(1): 36-46.
- Na Chiangmai, P., P. Yodmingkhwan, P. Nilprapruck and C. Aekatasanawan. The genetic variances for the phytic acid and inorganic phosphorus contents of elite inbred lines in tropical maize. Third International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries (SAADC 2009), 8-11 November 2011, Suranaree University of Technology. 202-203 p. (Poster presentation)
- Na Chiangmai, P., P. Yodmingkhwan, P. Nilprapruck and C. Aekatasanawan. Variability of phytic acid and inorganic phosphorus contents in seeds of tropical maize (*Zea mays* L.). Third International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries (SAADC 2009), 8-11 November 2011, Suranaree University of Technology. 202-203 p. (Poster presentation)
- Na Chiangmai, P., P. Yodmingkhwan, P. Nilprapruck and C. Aekatasanawan. 2011. The genetic variances for the phytic acid and inorganic phosphorus contents of elite inbred lines in tropical maize. Journal of Agricultural Science and Technology A1: 1326-1328.
- Na Chiangmai, P., P. Yodmingkhwan, P. Nilprapruck and C. Aekatasanawan. 2011. Variability of phytic acid and inorganic phosphorus contents in seeds of tropical maize (*Zea mays* L.). Journal of Agricultural Science and Technology A1: 1322-1325.
- Na Chiangmai, P. and P. Yodmingkhwan. 2011. Competition of root and shoot growth between cultivated rice (*Oryza sativa* L.) and common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) grown under different phosphorus level. SJST. 33(6):685-692.
- Na Chiangmai, P., L. Krittawongwiman and P. Laosuwan. 2012. Potential of Sunflower Varieties Grown under Different Input Levels. In 3rd International Conference on Environmental and Rural Development at Khon Kaen University, Thailand, 21-22 January 2012. (Oral presentation).
- Na Chiangmai, P., P. Yodmingkhwan, P. Nilprapruck, C. Aekatasanawan and M. Kanjanamaneesathian. 2012. Screening of phytic acid and inorganic phosphorus contents in corn inbred lines and F1 hybrids in tropical environment. Maydica 56-1751: 331-339.
- Na Chiangmai, P., Y. Pootaeng-on and T. Khewaram. 2013. Shading tolerance of moth bean (*Vigna aconitifolia*). Silpakorn University Science and Technology Journal (SUSTJ) 7(1): 19-31.

Kaewlek, K., K. Arakit, W. Tamrongchote, Y. Pootaeng-on, W. Kunkaew and P. Na Chiangmai. Response on phosphorus availability levels and water stress in upland rice cultivars in tissue culture. Indigenous and traditional food systems in Asia and the pacific. May 31-June 2, 2012. Khon Kaen, Thailand. p 223-230.

Pootaeng-on, Y., P. Na Chiangmai , N. Kimsi, S. Sooksom, S. Tangchaitam. 2012. Condensed Tannins Values of Hay on Some Legumes to Animal Feeding in Rainy Season. In 3rd International Conference on Environmental and Rural Development at Khon Kaen University, Thailand, 21-22 January 2012. (Oral presentation).

Na Chiangmai, P., L. Krittawongwiman and P. Laosuwan. 2012. Potential of Sunflower Varieties Grown under Different Input Levels. IJERD (in press).

3. ชื่อ-สกุล นางสาวพิมใจ มีตุ้ม

Miss Pimjai Meetum

วัน เดือน ปีเกิด 13 มีนาคม 2523

สถานที่ทำงาน นักวิทยาศาสตร์ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร

ติดต่อ โทรศัพท์ 032-594037-8 , 0818801474 โทรสาร 032-594037 , 0819446521

E-mail address : pimjai_jaja@hotmail .com

ที่อยู่ 19 หมู่ 7 ต.ท่าคอย อ.ท่ายาง จ.เพชรบุรี 76130 โทรศัพท์ 086-7098119

ประวัติการศึกษา

1. วิทยาศาสตร์บัณฑิต(เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2547

2543-2547 ศึกษาระดับปริญญาตรี ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

Na Chiangmai, P. , P. Meetum, A. Puntong and S. Poomjae. 2008. Initiation stage of microgametogenesis of Physic nut (*Jatropha curcas* L.). 2nd Silpakorn University Research Fair, Bangkok, Thailand (poster presentation), 18-19 December 2008.

ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของที่ปรึกษาของแผนงานวิจัย

ชื่อ นายมานะ นามสกุล กาญจนมณีเสถียร

เกิดวันที่ 16 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2506 อายุ 46 ปี

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

สังกัด คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร อ. ชะอำ จ. เพชรบุรี

ภูมิลำเนาเดิม กรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษาระดับอุดมศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
วิทยาศาสตร์บัณฑิต	2528	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์(เกษตรศาสตร์) ประเทศไทย
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	2531	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์(เกษตรศาสตร์) ประเทศไทย
Certificate of Proficiency <u>In English</u>	2534	Victoria University of Wellington, New Zealand
M.Appl.Sc.	2537	Lincoln University , Canterbury, (Microbiology) New Zealand (Second Class Honor, Division 1)

งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

- Petcharat, V and M. Kanjanamaneesathian. 1989. Species of plant pathogenic *Cercospora* spp. in Southern Thailand. Thai Phytopathology. 9 (1): 23-27.
- Kanjanamaneesathian, M., T. Luang-Aram and S. Chantarat. 1995. Testing for *Phytophthora palmivora* inoculation technique, Part 1: Simplified Hydroponic (SH) system for pathogenicity study. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 17(4): 363-371.
- Kanjanamaneesathian, M., T. Srichana and A. Rhodesujit. 1995. Pellets of *Trichoderma harzianum*. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 17 (3): 317-326.
- Kanjanamaneesathian, M., K. Yutchana and I. Suwanchatri. 1996. Effect of soil amendments on sclerotial germination of *Sclerotium rolfsii*. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 18 (2): 145-152.
- Kanjanamaneesathian, M., S. Chantarat and S. Yong. 1996. Germination inhibition of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis* and drenching as possible application method to deliver bacterial antagonists. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 18(2): 135-144.

Kanjanamaneesathian, M., C. Kusonwiriawong, A. Pengnoo and L. Nilratana. 1998.

Screening of potential bacterial antagonists for control of sheath blight in rice and development of suitable bacterial formulations for effective application. *Australasian Plant Pathology*. 27 (3): 198 – 206.

Kanjanamaneesathian, M., W. Leowarin, A. Pengnoo and A. Nooduang. 1999.

Evaluation of agricultural and industrial wastes for the control of damping-off of Chinese kale (*Brassica alboglabra* Bailey) caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Thai Journal of Agricultural Science*. 32 (4) : 547 – 555.

Kanjanamaneesathian, M., S. Te-chato, S. Chantararat, T. Luang-Aram and B. Bunjerdpradit.

1999. Searching for local durians (*Durio zibethinus* Murr.) resistant to *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butler in Southern Thailand. *Thai Journal of Agricultural Science*. 32 (1) : 111 – 125.

Kusonwiriawong, C., A. Pengnoo, L. Nilratana and M. Kanjanamaneesathian. 1999.

Development of effective bacterial formulations for the control of sheath blight of rice. In: R.C. Magarey (ed.), *The Proceedings of the First Australasian Soilborne Disease Symposium*, 9-12 February 1999, Watson Ferguson Company, Brisbane, Australia. pp. 108 – 110.

Kanjanamaneesathian, M., A. Pengnoo, A. Jantharangsri, L. Niratana and C.

Kusonwiriawong. 2000. Scanning electron microscopic examination of a pellet formulation of *Bacillus megaterium* and *B. pumilus*, antagonists of *Rhizoctonia solani*, and survival during storage. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16 (6) : 523 – 527.

Kanjanamaneesathian, M., A. Nooduang and S. Suwaluk. 2000. Screening and

identification of antagonistic fungi *Trichoderma* spp. for inhibition of important plant pathogens. *Thailand Agricultural Research Journal*. 18 (1): 4-16.

Pengnoo, A., C. Kusongwiriawong, L. Nilratana and M. Kanjanamaneesathian. 2000.

Greenhouse and field trials of the bacterial antagonists in pellet formulations to suppress sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *BioControl*. 45 (2) : 245 – 256.

Pengnoo, A., W. Leowarin, N. Koedsub and M. Kanjanamaneesathian. 2002. Nitrogen

mineralization in soil amended with mesocarp fiber of oil palm and other wastes: A greenhouse study. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 24 (1): 1-8.

- Sdodee, R., M. Kanjanamaneesathian and T. Baothong. 2002. Phytophthora in Southern Thailand. In: Workshop on Phytophthora in Southeast Asia, Chiang Mai, Thailand, 8-12 November 2002. Australian Centre for International Agricultural Research. P. 23.
- Bunjerdpradit, B., S. Te-chato, S. Chanaweewaran, S. Lim and M. Kanjanamaneesathian. 2003. Using computer-aided image analysis to assess disease on detached leaves of local durians inoculated with *Phytophthora palmivora*. Thai Journal of Agricultural Science. 36 (1): 81-86.
- Kanjanamaneesathian, M., V. Phetcharat, A. Pengnoo and S. Upawan. 2003. Use of *Trichoderma harzianum* cultured on ground mesocarp fibre of oil-palm as seed treatment to control *Pythium aphanidermatum*, a causal agent of damping-off of Chinese kale seedling. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 19 (8): 825-829.
- Wiwattanapatapee, R, A. Pengnoo, M. Kanjanamaneesathian, K. Sathanasaowapak, L. Nilratana, and A. Jantharangsri. 2003. Bacterial antagonist floating pellets for control sheath blight of rice. The 30th International Symposium on Controlled Release of Bioactive materials, Glasglow, UK, 19-23 July.
- Wiwattanapatapee, R., A. Pengnoo, M. Kanjanamaneesathian, W. Matchavanich, R. Nilratana, and A. Jantharangsri. 2004. Floating pellets containing bacterial antagonist for control sheath blight of rice: Formulations, viability and bacterial release studies. Journal of Controlled Release. 95: 455-462.
- Wiwattanapatapee, R., M. Kanjanamaneesathian, A. Pengnoo, K. Oungbho, W. Rojanarat and A. Chumthong. 2004. Efficacy of bacterial antagonist formulation in suppressing sheath blight of rice. The 31th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Honolulu, Hawaii, USA, 12-16 June.