

ผลของสารไคโตซานและพิวเทรสซินต่อการชักนำโปรโตคอร์มของกล้วยไม้หวายลูกผสมสายพันธุ์แอนนา

Effect of chitosan and putrescine on protocorm induction in *Dendrobium* hybrid cv. Anna

ภาวิณี ศิริสม¹, สุदारัตน์ ถนนแก้ว^{2*}

Pawinee Sirisom¹, Sudarat Thanonkeo^{2*}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มของกล้วยไม้หวายลูกผสมสายพันธุ์แอนนา โดยใช้สารไคโตซานและพิวเทรสซิน จากการศึกษาอิทธิพลของสารไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน (0, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่อการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์ม พบว่าการเติมไคโตซานทุกระดับความเข้มข้นในสูตรอาหาร VW ที่มีมันฝรั่งบด สามารถส่งเสริมให้เกิดโปรโตคอร์มที่มีลักษณะสีเขียวและเจริญดี แต่จำนวนโปรโตคอร์มที่ได้มีจำนวนน้อยกว่าสูตรอาหารที่ไม่เติมไคโตซานแต่เติมมันฝรั่งบดเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังได้ศึกษาอิทธิพลของการเติมพิวเทรสซินที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน (0.2, 0.4 และ 0.6 มิลลิโมลาร์) ในอาหารทั้งที่เติมและไม่เติมร่วมกับมันฝรั่งบด ต่อการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์ม พบว่าการเติมพิวเทรสซินที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 0.2 มิลลิโมลาร์ ส่งเสริมการชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มได้น้อย ในขณะที่สูตรอาหารที่เติมสารพิวเทรสซินที่ระดับความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ร่วมกับมันฝรั่งบด ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มและลักษณะโปรโตคอร์มที่ได้มีสีเขียว แต่จำนวนโปรโตคอร์มที่ได้มีน้อยกว่าสูตรอาหารที่ไม่เติมสารพิวเทรสซิน แต่เติมมันฝรั่งบดเพียงอย่างเดียว ดังนั้นวิธีการที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายคือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และมันฝรั่งบดความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งให้จำนวนโปรโตคอร์มสูงสุดโดยเฉลี่ยประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ โปรโตคอร์มที่ได้สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้เมื่อเพาะเลี้ยงต่อในอาหารแข็งสูตรเดิม เป็นเวลา 4 สัปดาห์

คำสำคัญ: ไคโตซาน, พิวเทรสซิน, โปรโตคอร์ม, การชักนำ, กล้วยไม้หวายลูกผสม

Abstract

The purpose of this study was to investigate the cultivation methods that were suitable for protocorm induction of *Dendrobium* hybrid cultivar Anna by using chitosan and putrescine. The effect of chitosan concentrations (0, 10, 15, 20 and 25 mg/l) on the protocorm proliferation was determined. Although the number of protocorm was less than that of medium containing potato homogenate without chitosan supplementation, addition of chitosan at all concentrations could induced the greenish and healthy protocorm. VW medium supplemented with potato homogenate and without chitosan supplementation gave the highest number of protocorm as compared to other media. In addition, the effect of putrescine concentrations (0, 0.2, 0.4 and 0.6 mM) with or without potato homogenate on the protocorm proliferation was also evaluated and it was found that putrescine at concentration higher than 0.2 mM gave less number of protocorm. However, addition of putrescine at 0.2 mM in combination with potato homogenate could induced

¹ นิสิตปริญญาโท, ² อาจารย์, สาขาความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

¹ Graduate student, ² Lecturer, Biodiversity program, Walai Rukhvej Botanical Research Institute, Kantarawichai, Mahasarakam University, Maha Sarakham 44150, Thailand

* Corresponding author : Sudarat Thanonkeo, Walai Rukhvej Botanical Research Institute, Kantarawichai, Mahasarakam University, Maha Sarakham 44150, Thailand. E-mail:sthanonkeo@gmail.com

the greenish and healthy protocorm as compared to another concentration, although the number of protocorm was not comparable to that of medium containing potato homogenate without putrescine supplementation. Therefore, the suitable method for protocorm induction of *Dendrobium* hybrid was VW medium supplemented with 10% w/v potato homogenate, 0.2 mg/l BAP and culturing for 8 weeks. This protocol gave the highest protocorm number with the value of 85%. The resulting protocorms can be generated into plantlets when they were cultured in the same solid medium and cultured for 4 weeks.

Keywords: chitosan, putrescine, protocorm, induction, *Dendrobium* hybrid orchid

บทนำ

กล้วยไม้เป็นพืชในวงศ์ Orchidaceae มีความหลากหลายของชนิดพันธุ์มากอีกวงศ์หนึ่ง โดยพบว่าทั่วโลกมีมากกว่า 25,000 ชนิด ปัจจุบันจัดเป็นไม้ดอกที่คนทั่วโลกชื่นชอบและเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอันดับหนึ่งของประเทศไทย จากข้อมูลทางสถิติ พบว่าการส่งออกกล้วยไม้ของประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ส่วนใหญ่เป็นดอกกล้วยไม้ประมาณ 1,653 ล้านบาท และต้นกล้วยไม้ประมาณ 332.5 ล้านบาท¹ เนื่องจากความสวยงามและความหลากหลายของรูปร่างและสีสันทันของดอกไม้ ทำให้กล้วยไม้เป็นที่นิยมไปทั่วโลก นอกจากนี้ยังมีการปรับปรุงสายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง พบว่ามีการผสมข้ามชนิดข้ามสกุลมากกว่า 30,000 คู่ผสม² ทำให้กล้วยไม้มีความสวยงามและหลากหลายของชนิดมากยิ่งขึ้น สำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย เป็นอีกหนึ่งสกุลที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีรูปทรงดอกและการจัดเรียงภายในช่อดอกที่สวยงาม มีอายุการปักแจกันนาน³ กล้วยไม้สกุลนี้มีจำนวนมากเป็นอันดับสองของวงศ์ Orchidaceae พบประมาณ 1,500 ชนิด จากทั่วโลก และมีราคาสูงในตลาดการค้ากล้วยไม้⁴ ดังนั้นจึงมีการปรับปรุงสายพันธุ์ลูกผสมสกุลหวายมากขึ้น สำหรับในประเทศไทย พบว่ามีการส่งออกของกล้วยไม้สกุลหวายไปยังยุโรปและประเทศเยอรมันมากกว่า 12 ล้านเหรียญยูโร และประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ของกล้วยไม้ทั้งหมดที่ส่งไปยังประเทศสิงคโปร์เป็นกล้วยไม้สกุลหวาย⁵ สำหรับกล้วยไม้หวายลูกผสมสายพันธุ์แอนนา (*Dendrobium* cv. Anna) เป็นอีกหนึ่งสายพันธุ์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมส่งออกกล้วยไม้ในประเทศไทย เนื่องจากมีลักษณะดอกฟอร์มกลมและมีสีชมพู และยังเป็นที่ต้องการของตลาดญี่ปุ่น⁶ อย่างไรก็ตามการขยายพันธุ์กล้วยไม้หวายลูกผสมสายพันธุ์นี้ในธรรมชาติได้ต้นใหม่จำนวนน้อยมากประมาณ 2-4 ต้นต่อปี เท่านั้น ดังนั้นจึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์ แต่เนื่องจากปัญหาของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายบางสายพันธุ์ ชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มและเพิ่มจำนวนได้ยาก และบางสายพันธุ์สามารถชักนำโปรโตคอร์มได้มากแต่ไม่สามารถเจริญ

พัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ ที่ผ่านมามีรายงานการวิจัยที่ศึกษาการพัฒนาหรือปรับปรุงเทคนิคในการชักนำโปรโตคอร์มและต้นใหม่ รวมทั้งการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ลูกผสมด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น การศึกษาผลของสารอินทรีย์เสริมและแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกันต่อการเพิ่มจำนวนของ protocorm like bodies ในกล้วยไม้ *Dendrobium* Alya Pink⁷ การศึกษาผลของคุณภาพแสงต่อการเจริญและการพัฒนา protocorm like bodies ของกล้วยไม้ *Dendrobium officinale* ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ⁸ การศึกษาการเจริญเติบโต และการพัฒนาของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ⁹ การศึกษาการตอบสนองของ Protocorm like bodies ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายชนิดต่าง ๆ บนอาหารสูตร MS ที่เติมไซโตไคนิน และออกซินที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน¹⁰ จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่ามีความหลากหลายแนวทางในการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์ม แต่อีกวิธีที่กำลังได้รับความสนใจคือ การเติมสารกระตุ้น (elicitor) เช่น ไคโตซาน (chitosan) และพิวเทรสซิน (putrescine) มีรายงานพบว่าการเติมไคโตซานสามารถช่วยให้พืชบางชนิดรวมทั้งกล้วยไม้มีการเจริญเติบโตได้ดี และมีความต้านทานโรคได้มากขึ้น¹⁰ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การเติมไคโตซานมีผลต่อการพัฒนาให้เป็นต้นใหม่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หวายลูกผสม *Dendrobium* Earsakul¹¹ และสำหรับการศึกษาคาร์บอนไดออกไซด์เสริมในกล้วยไม้หวายลูกผสมสายพันธุ์แอนนา สามารถเพิ่มอัตราการชักนำให้เกิดหน่อของกล้วยไม้สกุลหวายทางการค้า ได้แก่ สายพันธุ์ Rungnappa Red, Miss Snow White และ Earsakul¹² และเนื่องจากว่ายังไม่มีการรายงานการใช้สารกระตุ้นในการชักนำและเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มของกล้วยไม้หวายลูกผสมสายพันธุ์แอนนา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารกระตุ้น ได้แก่ ไคโตซาน และพิวเทรสซิน ต่อการชักนำและเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์ม เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มจำนวนต้นใหม่ให้เพียงพอต่อการผลิตกล้วยไม้ต่อไป



วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

ตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษาและการเตรียมโปรโตคอร์ม โปรโตคอร์มของกล้วยไม้หวายลูกผสมสายพันธุ์แอนนา อายุ 3 สัปดาห์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทบางกอกกรีน จำกัด ที่มีขนาด 2-5 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง VW¹³ ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับมันฝรั่งบดความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.2 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ภายใต้การควบคุมช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การศึกษาผลของสารกระตุ้นต่อการชักนำและเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์ม

นำส่วนของโปรโตคอร์มขนาดประมาณ 2-5 มิลลิเมตร ที่ได้จากการเตรียมโปรโตคอร์มจากวิธีการข้างต้น มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง VW ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับมันฝรั่งบดความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นชุดควบคุมโดยเปรียบเทียบกับการเติมสารไคโตซาน ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเปรียบเทียบกับ การเติมสารพิวเทรคซิน ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0, 0.2, 0.4 และ 0.6 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ จากนั้นแต่ละชุด การทดลองเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.2 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ภายใต้การควบคุมช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยเปรียบเทียบจำนวนโปรโตคอร์มที่เพิ่มขึ้นต่อชิ้นเนื้อเยื่อ

การพัฒนาโปรโตคอร์มให้เจริญเป็นต้นใหม่

นำส่วนของโปรโตคอร์มที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง VW ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับมันฝรั่งบดความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น

เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และวันผงความเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตร ภายใต้การควบคุมช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ในแต่ละการทดลองเป็นการทดลองแบบ complete randomized design (CRD) นำข้อมูลที่บันทึกได้ไปวิเคราะห์ ความแปรปรวน (ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัยและวิเคราะห์ผล

ผลของไคโตซานต่อการชักนำจำนวนโปรโตคอร์ม การศึกษาการเติมไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร VW ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และมันฝรั่งบด 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเติมไคโตซานทุกความเข้มข้นสามารถส่งเสริมการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มได้ โดยลักษณะโปรโตคอร์มที่ได้จะมีสีเขียว ที่พร้อมจะพัฒนาเป็นต้นใหม่ต่อไป อย่างไรก็ตามพบว่าในสูตรอาหารที่ไม่เติมไคโตซาน ซึ่งเป็นชุดควบคุม แต่เติมมันฝรั่งบดความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์เพียงอย่างเดียว สามารถส่งเสริมการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มได้สูงที่สุด (94.5 ± 4.91 โปรโตคอร์ม) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมไคโตซาน ที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร (72.5±3.55 โปรโตคอร์ม) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (71.2 ± 2.33 โปรโตคอร์ม) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (70.0±4.60 โปรโตคอร์ม) และความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร (65.3±6.40 โปรโตคอร์ม) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมไคโตซานที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันในสูตรอาหารที่เติมมันฝรั่งบดส่งเสริมการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับจำนวนโปรโตคอร์มต่อชิ้นเนื้อเยื่อให้ผลเช่นเดียวกับการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์ม ดังแสดงใน Figure ที่ 1

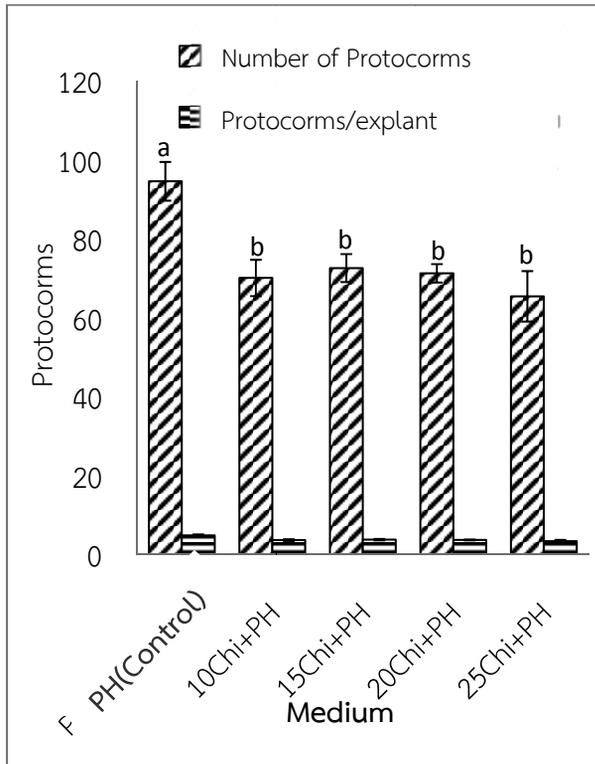


Figure 1. Effect of chitosan concentration on protocorm number per explant during 8 weeks of application of *Dendrobium* cv. Anna. (PH= potato homogenate, 10Chi= 10 mg/l chitosan, 15Chi= 15 mg/l chitosan, 20Chi= 20 mg/l chitosan, 25Chi= 25 mg/l chitosan)

เมื่อนำผลการศึกษาค้นคว้าจำนวนเปอร์เซ็นต์การเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์ม พบว่าสูตรอาหารที่ไม่เติมโคโตซาน แต่เติมเฉพาะมันฝรั่งบด 10 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์การเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์ม สูงที่สุด 78.8 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ สูตรอาหารที่เติมโคโตซานความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร (60.4 เปอร์เซ็นต์) สูตรอาหารที่เติมโคโตซานความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (59.3 เปอร์เซ็นต์) สูตรอาหารที่เติมโคโตซานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (58.3 เปอร์เซ็นต์) และสูตรอาหารที่เติมโคโตซานความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มน้อยที่สุด 54.4 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพประกอบที่ 2

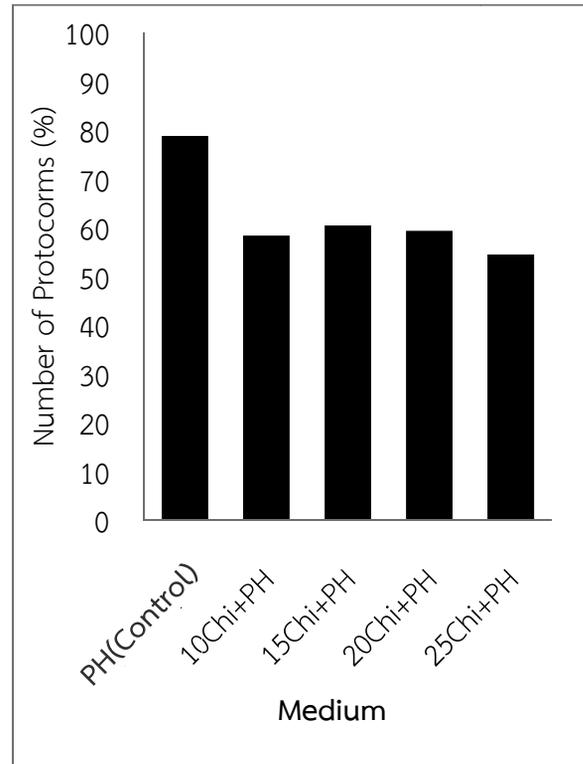


Figure 2. Percentage of protocorm induction of *D. cv. Anna*. in different chitosan concentration (PH= potato homogenate, 10Chi= 10 mg/l chitosan, 15Chi= 15 mg/l chitosan, 20Chi= 20 mg/l chitosan, 25Chi= 25 mg/l chitosan)

ผลของฟิวเทรสซินต่อการชักนำจำนวนโปรโตคอร์ม

การศึกษาการเติมสารกระตุ้นกลุ่มโพลีเอมีน คือฟิวเทรสซินที่มีความเข้มข้นระดับแตกต่างกันได้แก่ 0.2, 0.4 และ 0.6 มิลลิโมลาร์ ในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรรวมกับการเติมและไม่เติมมันฝรั่งบด 10 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองพบว่าสูตรอาหาร VW ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับมันฝรั่งบด 10 เปอร์เซ็นต์ มีการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มมากที่สุดเท่ากับ 83.6 ± 5.46 โปรโตคอร์ม และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่นๆ รองลงมาได้แก่ สูตรอาหารที่เติมมันฝรั่งบดร่วมกับสารฟิวเทรสซินความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (69 ± 6.75 โปรโตคอร์ม) สูตรอาหารที่เติมสารฟิวเทรสซิน



ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (62.5±1.16 โปรโตคอร์ม) สูตรอาหารที่เติมมันฝรั่งบดร่วมกับสารพิวเทอโรซีนความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ (31.8±4.83 โปรโตคอร์ม) สูตรอาหารที่ไม่เติมทั้งพิวเทอโรซีนและมันฝรั่งบด 10 เปอร์เซ็นต์ (23.6±0.75 โปรโตคอร์ม) สูตรที่เติมสารพิวเทอโรซีนความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ (23.4±1.03 โปรโตคอร์ม) สูตรที่เติมสารพิวเทอโรซีนความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ (21.4±0.68 โปรโตคอร์ม) และสูตรที่เติมทั้งมันฝรั่งบดและสารพิวเทอโรซีนความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ (20.8±0.80 โปรโตคอร์ม) สำหรับจำนวนโปรโตคอร์มต่อชิ้นเนื้อเยื่อให้ผลเช่นเดียวกัน ดังแสดงใน Figure 3

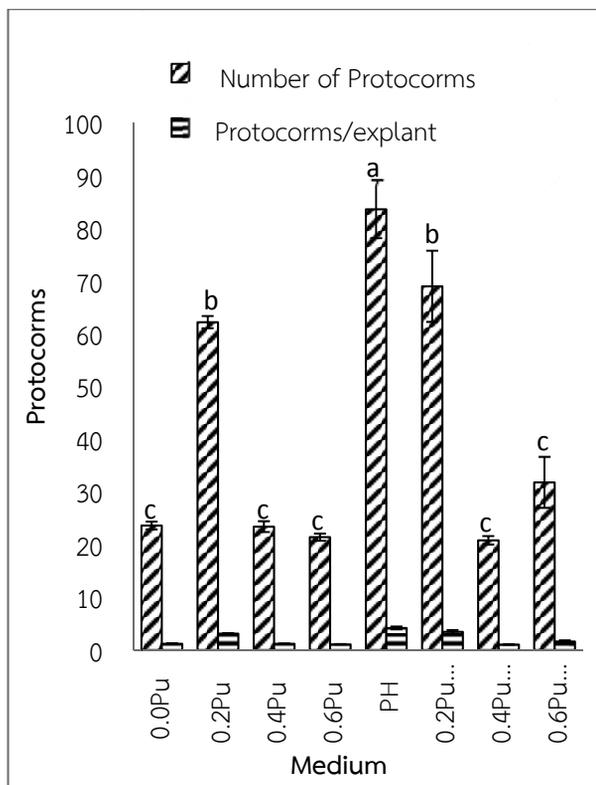


Figure 3. Effect of various putrescine concentration during 8 weeks in VW liquid medium with or without potato homogenate on protocorm induction of *Dendrobium* cv. Anna. (PH=potato homogenate, 0.2Pu=0.2 mM putrescine, 0.4Pu= 0.4 mM putrescine, 0.6Pu=0.6 mM putrescine)

เมื่อนำผลการศึกษาที่ได้คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์ม พบว่าสูตรอาหารที่ไม่เติมสารพิวเทอโรซีนแต่เติมมันฝรั่งบด 10 เปอร์เซ็นต์เพียงอย่างเดียวให้จำนวนโปรโตคอร์มมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ สูตรอาหารที่เติมมันฝรั่งบดร่วมสารพิวเทอโรซีนความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (69 เปอร์เซ็นต์) สูตรอาหารที่เติมสารพิวเทอโรซีนความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์เพียงอย่างเดียว (62 เปอร์เซ็นต์) สูตรอาหารที่เติมมันฝรั่งบดร่วมสารพิวเทอโรซีนความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ (32 เปอร์เซ็นต์) สูตรอาหารที่ไม่เติมทั้งสารพิวเทอโรซีนและมันฝรั่งบด (24 เปอร์เซ็นต์) สูตรอาหารที่เติมสารพิวเทอโรซีนความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ (23 เปอร์เซ็นต์) และสูตรอาหารที่เติมสารพิวเทอโรซีนความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ (21 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีค่าเท่ากับสูตรอาหารที่เติมทั้งมันฝรั่งบดและสารพิวเทอโรซีน ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ (ภาพประกอบที่ 4) โดยลักษณะของโปรโตคอร์มที่ได้จากการศึกษา พบว่า การเติมมันฝรั่งบดเพียงอย่างเดียวโปรโตคอร์มที่ได้มีลักษณะที่ดี มีสีเขียว เหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาเพื่อเพิ่มจำนวนหรือพัฒนาให้เป็นต้นใหม่ต่อไป ในขณะที่การเติมสารพิวเทอโรซีนทุกความเข้มข้นทั้งสูตรที่เติมและไม่เติมมันฝรั่งบด โปรโตคอร์มจะมีสีขาวชัดเจนถึงสีน้ำตาลและไม่สามารถเจริญเติบโตหรือเพิ่มจำนวนต่อไปได้ ดังแสดงใน Figure 5

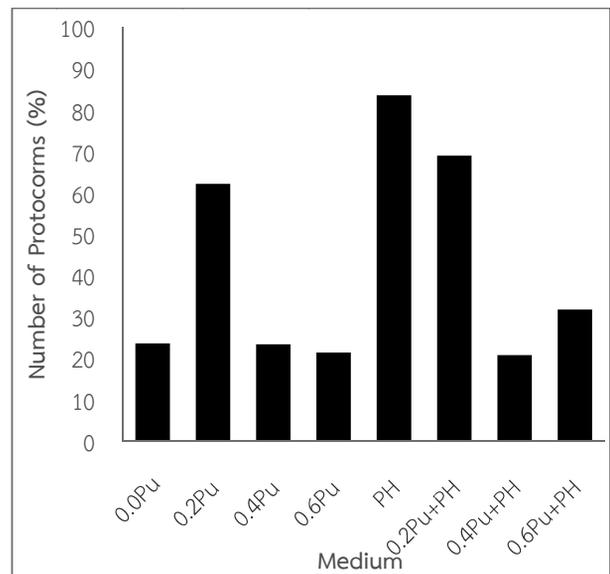


Figure 4. Percentage of protocorm induction of *D.cv.* Anna. in different putrescine concentration



12 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร VW ที่เติมโคโคซานทุกความเข้มข้นสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม และต้นอ่อนของกล้วยไม้เอื้องจำปา เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร VW ที่ไม่ได้เติมโคโคซาน และยังพบว่าอาหารสูตร VW ที่เติมโคโคซาน 0.8 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มและต้นอ่อนของกล้วยไม้เอื้องจำปาได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้โคโคซานในพืชชนิดอื่นด้วย เช่น การใช้โคโคซานที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวหอมมะลิ 105 ในอาหารสูตร MS จากการทดลองพบว่า การเติมโคโคซานความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการแตกกอของข้าวได้ดีที่สุด¹⁷ ซึ่งจากงานวิจัยที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าโคโคซานสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ อย่างไรก็ตามเมื่อจะนำโคโคซานมาประยุกต์ใช้ สิ่งที่ต้องคำนึงคือขนาดโมเลกุลของโคโคซาน และความเข้มข้นที่เหมาะสมกับพืชนั้นๆ รวมทั้งปัจจัยที่เกี่ยวกับพืชเช่น อายุพืช ชิ้นส่วนพืช อาหารที่จะใช้เพาะเลี้ยง และสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วย¹⁸ สำหรับการเติมสารพิวเทรสซินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.2, 0.4 และ 0.6 มิลลิโมลาร์ ทุกความเข้มข้นส่งเสริมการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มได้น้อยมาก อีกทั้งลักษณะโปรโตคอร์มที่ได้ยังมีสีขาวซีด ไม่เหมาะต่อการนำไปพัฒนาเป็นต้นใหม่ ในขณะที่สูตรอาหารที่ไม่เติมสารพิวเทรสซินแต่เติมมันฝรั่งบด 10 เปอร์เซ็นต์เพียงอย่างเดียว ยังคงส่งเสริมการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มได้ดีที่สุด และโปรโตคอร์มที่ได้มีสีเขียวเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่ต่อไป ทั้งนี้อาจเนื่องจากในอาหารสูตรที่เติมมันฝรั่งบด 10 เปอร์เซ็นต์ เพียงอย่างเดียวนั้น อาจมีปริมาณสารอาหารที่เพียงพออีกทั้งในเนื้อมันฝรั่งก็มีสารในกลุ่มโพลีเอมีนที่ช่วยในการแบ่งเซลล์และการพัฒนาของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ได้เช่นเดียวกับสารพิวเทรสซินซึ่งเป็นสารในกลุ่มโพลีเอมีนเช่นเดียวกัน ดังนั้นเมื่อมีการเติมพิวเทรสซินเพิ่มลงไปจึงอาจทำให้ในอาหารเพาะเลี้ยงมีความเข้มข้นของสารโพลีเอมีนมากเกินไปจนอาจไปยับยั้งการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ได้ ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาได้รายงานผลของสารโพลีเอมีนต่อการเพิ่มจำนวนของหน่อกล้วยไม้ พบว่าการเติมสารโพลีเอมีน สเปอร์มีน สเปอร์มีดิน และพิวเทรสซิน จะไปยับยั้งการพัฒนาของเอ็มบริโอของกล้วยไม้ *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume และ *Phalaenopsis nebula* Bl. ที่ชักนำมาจากชิ้นส่วนใบพืช¹⁹

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นใหม่กล้วยไม้ที่ได้จากการชักนำและเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์ม โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากผลิตเป็นจำนวนมาก การใช้มันฝรั่งบดเป็นสารอินทรีย์เสริมเพื่อเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ให้มีประสิทธิภาพ ควรใช้เวลาในการปกปิดก้นมันฝรั่งให้สั้น แล้วหันเนื้อมันฝรั่งลงในน้ำร้อนเพื่อยับยั้งการปล่อยสารประกอบฟีนอลิกก่อนบ่มรวมกัน แล้วนำไปเติมในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ ทูنجัยมมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2554 และ ทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประจำปีงบประมาณ 2557 ที่สนับสนุนให้การศึกษาค้นคว้าวิจัยประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- Petchang R. The effects of colchicine concentration and treatment duration on growth and chromosome number in *Dendrobium draconis* Rchb. f. Journal Science Technology MSU. 2010;29:413-19.
- Kongbangkerd A and Wongsat T. Effect of cytokinins on growth and development of young shoots of *Dendrobium* hybrid (*Dendrobium* green lantern). SWU Sci. J. 2008;23(2):115-25.
- ครุฑชิต ธรรมศิริ. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. ปรับปรุงครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: อัมรินทร์ปริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง; 2547. .
- Maridass M, Mahesh R, Raju G, Benniamin A and Muthuchelian K. *In vitro* propagation of *Dendrobium nanum* through rhizome bud culture. International Journal of Biological Technology 2010;1(2):50-54.
- Khatun H, Khatun MM, Biswas MS, Kabir MR and Al-amin M. *In vitro* growth and development of *dendrobium* hybrid orchid. Bangladesh J. Agril. Res. 2010;35:507-14.
- กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. เอกสารวิชาการกล้วยไม้. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด; 2547. หน้า 352-5.



7. Nambiar N, Tee CS and Maziah M. Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocormlike bodies in *Dendrobium* Alya Pink. *Plant Omics Journal* 2012;5:10-18.
8. Lin Y, Li J, Li B, He T and Chun Z. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2011;105:329–335.
9. Nuraini A, Heriliya WR, Suminar E and Marlina E. Responses of protocorm like bodies hybrid *dendrobium* orchid on various types and concentration of cytokinin and auxin on murashige and skoog (ms) medium. *International Seminar on Horticulture to Support Food Security. Bandar Lampung - Indonesia.* A-131, 2010.
10. Obsuwan K and Sawangsri K. The effect of chitosan on growth of *Dendrobium* Queen Pink in tissue culture. *Agricultural Scien Journal* 2010; 41: 477-480.
11. Pornpienpakdee P, Singhasurasak R, Chaiyasap P, Pichyangkura R, Bunjongrat R, Chadchawan S and Limpanavech P. Improving the micropropagation efficiency of hybrid *Dendrobium* orchids with chitosan. *Scientia Horticulturae* 2010;124:490-499.
12. Kumari IP and George TS. *In vitro* clonal shoot morphogenesis of commercial *Dendrobium* orchid cultivars in polyamines supplemented medium. *Journal of Tropical Agriculture* 2011;49(1-2):118-120.
13. Vacin EF and Went FW. Some pH changes in nutrient solutions. *Bot Gaz.*1949;110:605-13.
14. Prasertsongsun S and Chaipakdee W. Effect of chitosan on growth and development of *Phalaenopsis cornucervi* (Breda) Blume & Rchb.f. *KKU science journal* 2011;39(1):113-119.
15. Pornpienpakdee P, Pichyangkura R, Chadchawan S and Limanavech P. Chitosan effects on *Dendrobium* "Earsakul" protocorm-like body production. 31th Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October 2005, Thailand, Suranaree university of Technology. pp. 1-3.
16. สุภาภรณ์ เอี่ยมแข็ง และ สาวีณี หนูสวัสดิ์. ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องจำปา (*Dendrobium moschatum*) ในสภาพปลอดเชื้อ. ใน: *การประชุมวิชาการแห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9.* 6-7 ธันวาคม 2555, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. หน้า 562-568.
17. สุกฤษณ์ แจ่มจำรัส, สนธิชัย จันทร์เปรม, รรรอง หอมหวล, มณฑา วงศ์มณีโรจน์ และ รัดนา เอกรัมย์. การใช้สารไคโตซานร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวหอมมะลิ 105. ใน: *การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9.* 6-7 ธันวาคม 2555, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. หน้า 545-553.
18. สมพร ประเสริฐสงสกุล. การใช้ไคโตซานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. *วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา* 2555; 7(2):125-134.
19. Gow WP, Chen JT and Chang WC. Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiologica Plantarum* 2008;30(4):507–512.