

การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้า กล้วยไม้ฟาแลนนอพซิสในสภาพปลอดเชื้อ

Development of *In Vitro* Culture Media for Seed Germination and Seedling Growth of *Phalaenopsis* Orchids

คำนำ

กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส (*Phalaenopsis*) ที่สำรวจพบทั่วโลกมีประมาณ 50 ชนิด จากกล้วยไม้ทั้งหมดที่มีประมาณ 19,500 ชนิด (Dressler, 1993) จัดได้ว่าเป็นกล้วยไม้กลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญทางการค้าของโลกอย่างมาก โดยในแต่ละปีตลาดขายต้นกล้วยไม้มีความต้องการฟาแลนนอพซิสในรูปไม้กระถางที่ติดดอก (Flowering pot plant) มากกว่า 1 ล้านต้น (Tanaka, 1992; Bilton, 1998; David, 1999) พันธุ์ที่นิยมปลูกเลี้ยงเป็นการค้าส่วนใหญ่มีดอกขนาดใหญ่ เป็นลูกผสมจาก *Phalaenopsis amabilis*, *P. aphodite*, *P. schillerana* และ *P. stuartiana* (Tanaka, 1992) การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิสโดยการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการผลิตในเชิงการค้า เพราะสามารถผลิตต้นใหม่ได้เป็นจำนวนมาก และสนองต่อความต้องการของตลาดได้ในเวลาอันรวดเร็ว (Tanaka, 1992; Bilton, 1998)

การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิสในสภาพปลอดเชื้อสามารถใช้ชิ้นส่วนต่างๆ มาทำการเพาะเลี้ยงได้หลายชนิด เช่น เมล็ด เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด (meristem) ใบ ปลายราก ตาจากก้านช่อดอก ส่วนตาที่ซอกก้านช่อดอกและส่วนปลายยอดของก้านช่อดอก งานวิจัยส่วนใหญ่จะเน้นศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณ protocorm-like bodies (PLBs) จากชิ้นส่วนต่างๆ แต่หลังจากที่ได้ปริมาณ PLBs ตามที่ต้องการและชักนำให้ PLBs พัฒนาเป็นต้นแล้ว ปัญหาอีกอย่างหนึ่งที่พบเสมอคือหลังจากนำต้นกล้าออกปลูกในสภาพโรงเรือน มักพบว่ามิเปอร์เซ็นต์การตายหลังการย้ายปลูกสูง อาจเนื่องมาจากต้นกล้ามียุคชะงักและไม่มีแข็งแรงพอ จึงไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไปได้ จึงส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น

ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาหาสูตรอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของต้นกล้ากล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิสในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อให้ได้ต้นที่แข็งแรง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการย้ายปลูกที่สูงขึ้นเมื่อนำออกปลูกในสภาพโรงเรือน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกและการพัฒนาของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ฟาแลนนอพิษลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อ
2. เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้ากล้วยไม้ฟาแลนนอพิษลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อ
3. เพื่อหาสภาพการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้ากล้วยไม้ฟาแลนนอพิษลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อ

การตรวจเอกสาร

กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพิษ เป็นกล้วยไม้ที่อยู่ใน Tribe Vandaeae Subtribe Sarcanthinae ตำราพบกล้วยไม้สกุลนี้ประมาณ 50 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นกล้วยไม้อากาศ (epiphyte) และบางชนิดขึ้นอยู่ตามหิน (liphophyte) พบกระจายอยู่ในแถบเอเชียเขตร้อน ทางตอนใต้ของอินเดีย เนปาล ปาร์บิวนิวกินี ทางตอนเหนือของจีน ไต้หวัน และทางตอนใต้ของออสเตรเลีย นอกจากนี้ยังพบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มาเลเซีย ประเทศไทย และฟิลิปปินส์ ซึ่งถือว่ามีกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพิษอยู่มาก (Pridgeon, 1995; Bilton, 1998) เป็นกล้วยไม้ที่มีลักษณะการเจริญเติบโตทางยอด (monopodial growth) มีลำต้นค่อนข้างสั้น ใบหนาและฉ่ำน้ำ มีรากขนาดใหญ่ ยาวและอวบ อ้วน ช่อดอกเกิดจากตาข้างที่บริเวณซอกใบ อาจเกิดประมาณ 2–3 ช่อ หรือมากกว่า (Pridgeon, 1995) ช่อดอกยาวและมีแขนง ดอกมีหลายรูปแบบและหลายสี เช่น ขาว ม่วง ชมพู เหลือง บางชนิดมีกลีบกลายเป็นจุดหรือขีดตามกลีบดอก บางดอกบานพร้อมกันทั้งหมด แต่บางชนิดทยอยกันบาน (อรดี, 2521) นิสัยการเจริญเติบโต มักชอบอยู่ในที่มีความชื้น ซึ่งกล้วยไม้ชนิดนี้สามารถเก็บรักษาความชื้นได้ระหว่างการให้น้ำ ในสภาพธรรมชาติสามารถปรับตัวให้อยู่ได้ในสภาพที่มีแสงน้อย ดังนั้นจึงควรปลูกในที่ที่มีแสงปานกลาง ซึ่งจะช่วยให้การออกดอกและต้านทานโรคได้ (Pridgeon, 1995)

ลักษณะของเมล็ดกล้วยไม้

โดยทั่วไปเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก (exceedingly small) กล้วยผงฝุ่นอยู่ในฝักซึ่งมีลักษณะกลมยาว หรือป่องกลาง ฝักอ่อนมีสีเขียว เมื่อฝักแก่จะมีสีเหลืองและเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำตาล ต่อมาฝักจะแห้งและแตกตามยาวเป็น 3 แนว ทำให้เมล็ดร่วงจากฝัก เมล็ดกล้วยไม้แต่ละชนิดจะมีลักษณะแตกต่างกันตามสี และรูปร่าง เช่น รี กลม แบน หรือรูปกระสวยเป็นต้น ขนาดกว้างประมาณ 0.08-0.27 มิลลิเมตร ความยาวประมาณ 0.4-1.25 มิลลิเมตร น้ำหนักประมาณ 3-14 ไมโครกรัม และมีจำนวนเมล็ดตั้งแต่ 1,300-4,000,000 เมล็ดต่อฝัก เปลือกของเมล็ดมีหลายแบบ เช่น เปลือกบาง (เซลล์ชั้นเดียว) และเป็นร่างแห เช่น เมล็ดกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (จิตรพรพรณ, 2536) ภายในเมล็ดกล้วยไม้จะมีเอ็มบริโอขนาดเล็ก (tiny embryo) เปลือกเมล็ดชั้นนอก (testa) เหนียว หุ้มเอ็มบริโอซึ่งมีขนาดเล็ก มีจำนวนเซลล์ประมาณ 100 เซลล์ เปลือกเมล็ดชั้นนอกมีลักษณะเป็นร่างแห (reticulate) หรือตาข่าย (netlike) ซึ่งมีความจำเพาะในแต่ละชนิด เปลือกเมล็ดชั้นนอกเป็นเนื้อที่ตายแล้ว ซึ่งส่วนใหญ่จะประกอบด้วยช่องอากาศ 98 เปอร์เซ็นต์ อยู่กัน

อย่างหลวม ๆ มองดูคล้าย balloon ลักษณะเช่นนี้ทำให้ความถ่วงจำเพาะของเมล็ดลดลง สามารถลอยได้ในอากาศเป็นเวลานาน และแพร่กระจายไปได้ไกล (Pierik, 1987)

การงอกของเมล็ดกล้วยไม้

Arditti (1967) รายงานว่า การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ต่างจากการงอกของเมล็ดพืชชนิดอื่น โดยการงอกของเมล็ดกล้วยไม้คล้ายกับการพัฒนาของตา (bud) ที่พักตัวอยู่ เมื่อเมล็ดได้รับสภาพที่เหมาะสมจะมีการสะสมอาหาร เอ็มบริโอมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน มีขนาดใหญ่ขึ้น เมล็ดกล้วยไม้ไม่สามารถงอกได้เอง เนื่องจากภายในเมล็ดไม่มีอาหารสะสม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยอาหารจากภายนอกมาช่วยในการพัฒนา การงอกของเมล็ดอาจเกิดได้ทั้งในสภาพธรรมชาติ และในอาหารสังเคราะห์ ดังนี้

1. Symbiotic germination เป็นการงอกของเมล็ดตามธรรมชาติซึ่งต้องอาศัยเชื้อราบางชนิด (mycorrhiza) ที่อยู่บริเวณรากของกล้วยไม้ ที่จะช่วยนำธาตุอาหารจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเข้าไปในเซลล์ของรากโดยเชื้อราเหล่านี้จะงอกเส้นใยแทงเข้าไปในเมล็ดกล้วยไม้ในเส้นใยจะมีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการงอกของเมล็ดและเมล็ดจะย่อยสลายเส้นใยนี้เพื่อนำธาตุอาหารไปใช้ประโยชน์ในการงอก

2. Asymbiotic germination เป็นการงอกของเมล็ดที่ไม่ต้องอาศัยเชื้อราประเภท mycorrhiza เมล็ดสามารถงอกได้ดีเมื่อเพาะบนอาหารสังเคราะห์ที่มีสภาพเหมาะสมต่อการงอกของเมล็ด

Knudson (1922) รายงานว่า เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกได้ในสภาพปลอดเชื้อโดยไม่ต้องอาศัยเชื้อรา mycorrhiza มาช่วยในการงอก เพียงแต่ในสูตรอาหารที่ใช้เพาะต้องมีน้ำตาลและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการงอกและการเจริญของต้นอ่อนจึงทำให้มีการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเพาะเมล็ดกล้วยไม้

Pierik (1987) ให้ข้อคิดว่า สาเหตุและความจำเป็นของการนำเมล็ดกล้วยไม้มาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มีหลายสาเหตุ ดังนี้

1. เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก อาหารสะสมภายในเมล็ดไม่มี หรืออาจมีแต่น้อยมาก ทำให้มีโอกาสรอดชีวิตยาก
2. การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ในสภาพธรรมชาติต้องพึ่งพาอาศัยเชื้อรา mycorrhiza ซึ่งมีความสัมพันธ์แบบ symbiotic germination ส่วนการงอกของเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อนั้นเมล็ดต้องการเพียงแร่ธาตุและน้ำตาลในอาหารสังเคราะห์เท่านั้น
3. หากจำนวนของเมล็ดต่อฝักมีจำนวนจำกัดก็สามารถเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อได้
4. สามารถเพาะเมล็ดที่เอ็มบริโออ่อนได้เพื่อลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์
5. การงอกของเมล็ดและระยะพัฒนาการของเมล็ดเป็นไปอย่างรวดเร็วในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและไม่มีการแข่งขันกับเชื้อราและแบคทีเรีย

กระบวนการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของต้นอ่อน

การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ต่างจากการงอกของเมล็ดพืชชนิดอื่น โดยเมื่อเมล็ดได้รับน้ำตาลและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม จะนำธาตุอาหารเข้าไปใช้ในการงอกและการเจริญเติบโต ซึ่งมีลักษณะการงอกและการพัฒนาของต้นอ่อนแบ่งเป็นระยะต่าง ๆ ได้ดังนี้ 1. เมล็ดสมบูรณ์ แต่ยังไม่งอก 2. เมล็ดขยายขนาดจากเดิม 5 – 10 เท่า โดยเอ็มบริโอมีขนาดใหญ่ขึ้น อาจมีสีขาว (กล้วยไม้ดิน) หรือสีเขียว (กล้วยไม้อากาศ) และจะดันเปลือกเมล็ดแตกออก 3. เอ็มบริโอมีลักษณะเป็นก้อนกลมปลายแหลม และมีรากขนอ่อน หรือ rhizoid เกิดขึ้นโดยรอบ เรียกว่า โปรโตคอร์ม (protocorm) 4. โปรโตคอร์มผลิใบยอดแหลม 1 ใบทางด้านบนพัฒนาเป็นต้นอ่อน 5. ต้นอ่อนมีใบยอด 2 ใบ 6. ต้นอ่อนมีใบยอด 3–4 ใบ และมีรากอย่างน้อย 1 ราก 7. ต้นอ่อนสูงประมาณ 7–10 เซนติเมตร มีระบบรากที่แข็งแรง นำออกปลูกภายนอกได้ (จิตรพรพรรณ, 2545)

องค์ประกอบของสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้

1. เกลือแร่อนินทรีย์

Arditti and Ernst (1993) ได้จำแนกไว้เป็น 2 กลุ่มคือ

1.1 มหธาตุ คือ ธาตุที่จำเป็นต่อพืชในการเจริญเติบโต พืชต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ ไนโตรเจน (N) จะใช้ในรูปแบบของ NH_4^+ หรือ NO_3^- ฟอสฟอรัส (P) ใช้ในรูปแบบ PO_4^{+} โพแทสเซียม (K) ใช้ในรูปแบบเกลือที่มี K^+ แคลเซียม (Ca) ใช้ในรูปแบบของ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ แมกนีเซียม (Mg) ใช้ในรูปแบบ MgCl_2 หรือ MgSO_4

1.2 จุลธาตุ คือ ธาตุที่มีความจำเป็นต่อพืช แต่พืชต้องการในปริมาณน้อยมาก ได้แก่ แมงกานีส (Mn) ใช้ในรูปแบบของ MnCl_2 $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ หรือ MnSO_4 ทองแดง (Cu) ใช้ในรูปแบบ CuSO_4 สังกะสี (Zn) ใช้ในรูปแบบของ ZnCl_2 และ $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ โบรอน (B) ใช้ในรูปแบบ H_3BO_3 คลอรีน (Cl) ใช้ในรูปแบบเกลือคลอไรด์ทั่วไป โมลิบดีนัม (Mo) ใช้ในรูปแบบ Na_2MoO_4 หรือ MoO_3 กำมะถัน (S) ถูกใช้ในรูปแบบของเกลือซัลเฟตทั่วไป เหล็กเป็นจุลธาตุที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ โดยมากจะใช้ในรูปแบบของเกลือ EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid) เช่น NaFeEDTA หรืออาจใช้ในรูปแบบ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ นอกจากนี้ยังมีเกลือแร่อนินทรีย์อื่นที่ใช้ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอีก ได้แก่ อลูมิเนียม (Al) โคบอลต์ (Co) ไอโอดีน (I) และ นิกเกิล (Ni)

2. สารประกอบอินทรีย์

เป็นสารประกอบที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และ ออกซิเจน เป็นหลัก รวมถึงสารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ด้วย เช่น วิตามิน กรดอะมิโนต่าง ๆ น้ำมะพร้าวอ่อน กล้วย มันฝรั่ง ถ่านกัมมันต์ และรวมถึงสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ ด้วย เช่น auxin cytokinin และ gibberellin เป็นต้น (Arditti, 1977; Arditti and Ernst, 1993; Ernst, 1967a,b; Knudson, 1946; จิตราพรรณ, 2536)

2.1 น้ำมะพร้าวอ่อน (coconut water or coconut milk)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้มักมีการใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบในอาหารกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากน้ำมะพร้าวมีสารควบคุมการเจริญเติบโต และมีสารต่าง ๆ ได้แก่ purine indole acetic acid รวมทั้งคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด เช่น erythritol metexitol และ turanose และยังพบ myo-inositol และ sorbitol รวมทั้งมีไซโตไคนิน เช่น zeatin และ zeatin riboside ในปริมาณมาก (Letham, 1974) น้ำมะพร้าวมีผลทำให้คาร์โบไฮเดรตแตกตัว และยังทำให้เกิดการแตกพันธะของสาร ทำให้ได้พลังงานที่นำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการหายใจ และมีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ของเซลล์ผิว (Morel, 1974)

Niimoto and Sagawa (1961) พบว่า การเพิ่มน้ำมะพร้าว 25 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร VW ที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ และวัน 0.8 เปอร์เซ็นต์ เหมาะแก่การเพาะเมล็ดกล้วยไม้สกุลหวาย จากฝักอายุ 45 วัน หรือมากกว่านี้ และอาหารสูตรเดียวกันนี้ยังใช้ได้ดีกับการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของกล้วยไม้สกุลฟาแลน นอปซิสอีกด้วย

Withner (1974) รายงานว่า การเติมน้ำมะพร้าวจะช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้หลายชนิดงอกได้ดีขึ้น และยังส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงปลายยอดของกล้วยไม้หลายชนิด โดยจะส่งเสริมการแบ่งเซลล์ผิว และส่งเสริมการเกิดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มได้ดี นอกจากนี้ดินที่ได้ก็จะพบอาการ necrotic ลดลงด้วย

Intuwong and Sagawa (1973) พบว่า การใส่น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร VW พบว่า ทำให้ยอดของกล้วยไม้ฟาแลน นอปซิสเกิด PLBs และพัฒนาเป็นต้นได้ รวมถึง Ichihashi and Hiraiwa (1996) พบว่า การเติมน้ำมะพร้าวร่วมกับน้ำตาลมีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของ PLBs

2.2 มันทิ้ง

ในมันทิ้งมีสารโพลิเอมีน (polyamine) เช่น putresine spermine และ spermidine กระจายอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อ และในระยะที่ห้วมันทิ้งเกิดการงอก จะพบสารเหล่านี้ได้มากที่บริเวณยอด สารกลุ่มนี้มีผลต่อการเพิ่มกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบ mitosis มากขึ้นในเนื้อเยื่อพืช และยังป้องกันการสลายตัวของคลอโรพลาสต์ และโปรตีน

(Kaur-Sawhney *et al.*, 1982) และการใส่มันฝรั่งในอาหารหลายสูตรมีรายงานว่า ช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ดีขึ้น และต้นอ่อนจะมีความแข็งแรงมากขึ้น (Arditti and Ernst, 1993) Tsai *et al.* (1994) พบว่า การเติมมันฝรั่งในอาหารเพาะเมล็ด *Phalaenopsis* ทำให้ต้นกล้ามีชีวิตรอดมากกว่าในอาหารที่ไม่เติมมันฝรั่ง

2.3 กล้วย

เมื่อปี 1946 Knudson พบว่า เนื้อกล้วยมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ที่ทำให้ pH ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก Arditti and Ernst (1993) รายงานว่า ในปี ค.ศ. 1950 Graeflinger เป็นคนแรกที่ใช้ผงแป้งกล้วยในการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ เพราะในกล้วยมีสารอาหารต่าง ๆ มากมาย โดย Khalifah (1966) พบว่า ในกล้วยมีสารเร่งการเจริญเติบโตพืชบางชนิด เช่น GA_7 , GA_x เป็นต้น และ Barnell (1940) รายงานว่า ธาตุเหล็กที่อยู่ในผลกล้วยจะอยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ได้ และลูกกล้วยไม้สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี Arditti (1965) พบว่า การนำอาหารที่ใส่กล้วยภายใต้ความดันและความร้อนสูงในสภาพเป็นกรด จะทำให้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เป็นประโยชน์ต่อพืชหลายชนิดในกล้วยละลายน้ำได้ดีขึ้น ทำให้ต้นกล้วยไม้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

Anderson (1967) ใส่กล้วยลงในอาหารสูตร Knudson C พบว่า สามารถเร่งการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้สกุล *Cattleya* ได้มากขึ้น และ Ernst (1974) เสนอว่า การใส่กล้วยลงใน อาหารถั่วขาว *Phalaenopsis* จะทำให้ต้นอ่อนเจริญได้ดีขึ้น และควรหลีกเลี่ยงการใส่กล้วยลงในอาหารที่ใช้เพาะ *Paphiopedilum* เพราะจะทำให้ต้นอ่อนที่งอกขึ้นมาหยุดการเจริญเติบโต (Ernst, 1967b, 1974) นอกจากนี้ Arditti (1968) ยังพบว่า การเติมกล้วย 150 กรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร Knudson C สามารถเร่งการงอกของเมล็ด และการเจริญเติบโตของเมล็ดกล้วยไม้ *Cymbidium aurantiaca* ได้ดีขึ้นอีกด้วย

2.4 น้ำตาล

Pierik (1997) รายงานว่า น้ำตาลเป็นส่วนที่สำคัญที่สุดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากเป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เพราะในสภาพปลอดเชื้อภายในขวดเพาะเลี้ยงจะมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์จำกัด และการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้จำเป็นต้องใช้น้ำตาล โดยน้ำตาล sucrose จะมีการเปลี่ยนรูปไปเป็น glucose และ fructose เมื่อนำมาเชื้อ

อัตราการเจริญเติบโตของต้นพืชจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเลยจุดสูงสุดที่เหมาะสมไปการเจริญเติบโตก็จะลดลง นอกจากนี้น้ำตาลยังเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญสำหรับการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ โดยพบว่าเมล็ดของ *Paphiopedilum ciliolare* และลูกผสมชนิดอื่น ๆ ในสกุลนี้จะไม่งอกเลยถ้าไม่มีน้ำตาล เพราะเมล็ดต้องการแหล่งคาร์โบไฮเดรตจากภายนอกเมล็ดเพื่อเป็นแหล่งพลังงานที่ใช้สำหรับการงอก (Lucke, 1971) การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ในปัจจุบันนิยมใช้น้ำตาลทรายหรือซูโครส (table sugar) เพราะหาได้ง่ายและราคาถูก (จิตรพรพรรณ, 2536)

Ichihashi and Hiraiwa (1996) พบว่า การเติมน้ำตาลลงในอาหารมีผลต่อการเติบโตของ PLBs ของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* และ *Doritaenopsis* โดยการเติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นสูงทำให้ PLBs มีสีเหลืองหรือสีเขียวอ่อนและเจริญได้ดี ส่วนอาหารที่เติมน้ำตาล sorbitol หรือ mannitol หรือไม่เติมน้ำตาล มีผลทำให้ PLBs พัฒนาเป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำตาลที่เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตของ PLBs ได้แก่ mannitol sorbitol maltose และ trehalose ส่วน galactose นั้น พบว่า บางครั้งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของ PLBs

Islam and Ichihashi (1999b) ได้ศึกษาผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของ PLBs และการพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* *Doritaenopsis* และ *Neofinetia* พบว่า น้ำตาลซูโครสชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด ส่วนน้ำตาล maltose และ sorbitol สามารถเพิ่มปริมาณ PLBs และชักนำให้ PLBs พัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ดี แต่ในสกุล *Phalaenopsis* และ *Neofinetia* บางชนิดไม่สามารถเพิ่มปริมาณ PLBs และชักนำให้กลายเป็นต้นได้ ยังคงเป็น PLBs เช่นเดิม

2.5 ผงถ่านกัมมันต์

ประกอบด้วยคาร์บอนมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือเป็นธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียม มีลักษณะเป็นผง รูปร่างกลมหรือแบน ภายในอนุภาคของถ่านกัมมันต์จะมีพื้นที่ผิวจำนวนมากและมีความพรุน จึงสามารถดูดซับสารต่าง ๆ ทั้งแก๊ส ของเหลว หรือสารที่ละลายน้ำได้ โดยดูดซับไว้ที่พื้นผิวหน้าของรูพรุนนั้น (Parker, 1992 ; Arditti and Ernst, 1993) Pierik (1987) พบว่า ผงถ่านกัมมันต์สามารถดูดซับสารพิษสีดำ หรือสีน้ำตาล ซึ่งเป็นสารพวก phenol อีกทั้งยังช่วยดูดซับสารบางชนิดในกล้วยบด โดยพบว่า การเติมกล้วยหอมบดเพียงอย่างเดียวโดยไม่เติมผงถ่านกัมมันต์มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ฟาแลนนอพซิสในสภาพปลอดเชื้อ แต่เมื่อเติมผง

ถ่านกัมมันต์ลงไปผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตที่เกิดจากกล้วยหอมบดหมดไปและยังช่วยลดชั้นสารประกอบอินทรีย์ เช่น ออกซิน ไซโตไคนิน เอทิลีน วิตามิน เหล็ก สังกะสี และ abscissic acid นอกจากนี้การเติมผงถ่านยังทำให้อาหารมีสีดํา ซึ่งส่งผลให้รากมีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้นและยังช่วยรักษาระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในอาหารไม่ให้เปลี่ยนแปลงมากนัก นอกจากนี้ Arditti and Ernst (1993) ยังพบว่า ผงถ่านที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังช่วยเพิ่มการระบายอากาศในอาหารให้ดีขึ้นอีกด้วย

Ernst (1974) พบว่า ดันอ่อนของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีและฟาแลนนอพซิสเจริญเติบโตได้ดีขึ้นเมื่อมีการเติมถ่านกัมมันต์ลงในอาหารร่วมกับการใส่กล้วย

Wang and Huang (1976) พบว่า การเติมถ่าน 0.3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร Knudson C มีผลทำให้ดันอ่อนกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิสมีการเจริญเติบโตของรากและยอดเพิ่มขึ้น

Ernst (1984) พบว่า เมื่อนำยอดอ่อนซึ่งไม่มีราก (numerous vegetative shoots) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงก้านดอกของ *Phalaenopsis* Michelle มาเลี้ยงในอาหารสูตร Knudson C ที่เติมกล้วยบด 10 เปอร์เซ็นต์ และถ่านกัมมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกิดการพัฒนารากดีขึ้น

2.6 ผงวุ้น

เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่ได้จากสาหร่ายทะเล การใส่วุ้นในอาหารต้องใส่ในปริมาณที่เหมาะสม ถ้าใส่มากเกินไปจะทำให้อาหารแข็ง พืชจะสัมผัสกับอาหารได้น้อย และการดูดสารอาหารจะถูกจำกัดลง ทำให้พืชไม่เจริญเติบโต (Pierik, 1997) และปริมาณวุ้นที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของอาหารในขวด โดยขวดขนาดเล็กที่มีพื้นที่ผิวของวุ้นอาหารน้อย จะใช้ปริมาณวุ้นน้อยกว่าขวดใหญ่ที่มีพื้นที่ผิวมาก (จิตราพรณ, 2536)

3. องค์ประกอบอื่นๆ

3.1 สารควบคุมการเจริญเติบโต

เป็นสารอินทรีย์ที่ไม่จำกัดว่าพืชจะสร้างขึ้นได้เองหรือมนุษย์สังเคราะห์ขึ้น และถ้าใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถกระตุ้น ยับยั้ง หรือเปลี่ยนแปลงสภาพทางสรีรวิทยาของพืชได้ (พีรเดช, 2537) ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช 2 กลุ่มใหญ่ คือ auxin และ cytokinin แต่จะมีการใช้ GA บ้าง ถึงแม้ว่า GA จะสลายตัวได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (Arditti and Ernst, 1993)

Auxin: Morel (1974) รายงานว่า auxin เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ มีบทบาทในเรื่องของการแบ่งเซลล์ โดยเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงจะไม่มีการเจริญเติบโตถ้าไม่มี auxin ในอาหาร และการใช้ auxin ในการเพาะเลี้ยงพืชต่างชนิดกัน ความเข้มข้นของ auxin ที่ใช้ก็จะต่างกัน (Arditti and Ernst, 1993) Koch (1974) พบว่า IAA, NAA หรือ 2,4-D ช่วยเพิ่มความยาวของก้านช่อดอกกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพิษ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Knudson C แต่จะยับยั้งการพัฒนาในระยะต่อไป

Cytokinin: เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างกว้างขวาง โดยมากเป็น cytokinin ที่ได้จากการสังเคราะห์ การใช้ cytokinin มักใช้ร่วมกับ auxin โดยถ้าจะชักนำให้เกิด callus จะใช้อัตราส่วน auxin ต่ำ cytokinin สูง แต่เมื่อจะชักนำให้เกิดยอดจะใช้อัตราส่วน auxin ต่ำ cytokinin ต่ำ (Pierik, 1997) Koch (1974) เติม BA 1 – 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารสูตร Knudson C พบว่า สามารถชักนำให้กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพิษเกิดยอดจากตาข้างของก้านช่อดอกที่เพาะเลี้ยงได้

3.2 วิตามิน

วิตามิน คือ กลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่ซับซ้อน โดยอาจจะมีการใส่ลงไปในสูตรอาหารเพื่อเหตุผลบางประการ การศึกษาเกี่ยวกับวิตามินและสารที่เกี่ยวข้องกับวิตามิน พบว่าการตอบสนองของกล้วยไม้แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เพราะสรีรวิทยาของการงอกและการเจริญเติบโตของกล้วยไม้แต่ละชนิดไม่เหมือนกัน (Arditti, 1984) Schaffstein (1941) พบว่าการเติม Vandophytin ซึ่งเป็นสารที่เตรียมจาก nicotinic acid ลงในอาหารวุ้นให้ผลดีต่อการงอกของเมล็ด *Dendrobium*

nobile, *Vanda* และ *Phalaenopsis* วิตามินที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้ ได้แก่ thiamine, niacin และกลุ่มวิตามินบี (Withner, 1959) การเติม biotin 0.0001 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารสูตร Thomale GD ช่วยเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ในระยะโปรโตคอร์ม ช่วยส่งเสริมการเกิดรากของต้นกล้วยไม้ และช่วยให้ต้นกล้าแข็งแรงเร็วมากขึ้น (Lucke, 1971)

3.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ความเป็นกรด-ด่าง มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากมีผลโดยตรงต่อสภาพทางฟิสิกส์ของอาหาร และการนำธาตุอาหารไปใช้ของพืช โดย Arditti (1984) รายงานว่า pH ที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ส่วนใหญ่อยู่ที่ 4.8–5.2 และในช่วงระดับ pH 5.5–6.5 จะเป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของพืชในสภาพปลอดเชื้อ (Arditti and Ernst, 1993) แต่ถ้าวัดระดับ pH ต่ำกว่า 4.5 หรือสูงกว่า 7.0 จะไปยับยั้งการเจริญเติบโต โดยที่ IAA และ GA จะไม่คงรูป วัณจะเหลว เกลือโลหะจะตกตะกอน วิตามิน B1 และ pantothenic acid ไม่อยู่ตัว และยับยั้งการดูดซับแอมโมเนียมไอออน (Pierik, 1997)

สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ

แสงและอุณหภูมิ

แสงและอุณหภูมิมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ โดย Arditti (1984) รายงานว่า การงอกของเมล็ดกล้วยไม้จะแตกต่างกันตามความต้องการและการตอบสนองต่อแสง กล้วยไม้บางชนิดสามารถงอกได้ทั้งในสภาพที่มีแสง และในสภาพที่ไม่มีแสง โดยแสงจะเป็นปัจจัยในการพัฒนารากและราก Arditti (1979) พบว่ากล้วยไม้สกุล *Paphiopedilum*, *Cymbidium* และ *Phalaenopsis* สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเพาะบนอาหารและเก็บไว้ในสภาพมืดหรืออาหารที่มีสีดำ โดยเฉพาะ *Paphiopedilum ciliolare* เมล็ดจะงอกเมื่อเก็บขวดเพาะเลี้ยงไว้ในสภาพมืดนาน 3 เดือน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ช่วงแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้คือ สภาพที่มืดไม่มีแสง จนถึงแสงที่มีความสว่าง 2000 แสงเทียน เป็นเวลานาน 12–18 ชั่วโมงต่อวัน และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ส่วนมากอยู่ที่ 20–25 องศาเซลเซียส โดยจะมีกล้วยไม้บางชนิดต้องการอุณหภูมิต่ำมากเพื่อทำลายการพักตัวของเมล็ดก่อนจึงจะมีการงอก ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดและรากของกล้วยไม้ อยู่ที่ 22–26 องศาเซลเซียส (Arditti, 1984; Arditti and Ernst, 1993)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis*

Ernst (1967a) ทดลองเพาะเมล็ด *Phalaenopsis* ลูกผสม *Phalaenopsis* Elisa x *Phal.* Best Girl และ *Phal.* Ruby Lips x *Phal.* New Era จากฝักอายุ 5 เดือน บนอาหารแข็งสูตร Knudson C ที่เติมอินทรียสารชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กล้วย สับปะรด มะละกอ มะเดื่อ มะม่วง มะเขือเทศ raspberries องุ่น กีวีฟรุต เห็ด (*Psalliota campestris*) และน้ำมะพร้าว พบว่า การเติมกล้วย 15 เปอร์เซ็นต์ มีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นกล้วยไม้ฟาแลนนอพซิส โดยมีน้ำหนักสด ความยาวใบ ความกว้างใบ ความยาวรากและจำนวนรากมากกว่าการเติมอินทรียสารชนิดอื่น ๆ

Intuwong and Sagawa (1974) นำเอาส่วนของปลายยอด (shoot tip) ของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิสมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ที่ปลายยอดเกิด PLBs สีเหลือง หลังจากนั้นย้ายลงในอาหารแข็งสูตรเดิมที่ไม่เติมน้ำตาล พบว่า PLBs เปลี่ยนเป็นสีเขียวและพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ภายใน 3-5 เดือน

Tanaka *et al.* (1988) ศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส โดยเลี้ยงบนอาหารสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลงโดยใช้ ferrous sulfate แทน ferric tartrate และเติมน้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ ซูโครส 2.0 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH ให้ได้ 5.3 จากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องที่มีความเข้มแสงต่างกัน 4 ระดับ คือ 2.34 0.95 0.59 และ 0.25 Wm^{-2} พบว่า การเกิดยอดเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มแสงลดลงจาก 2.34 ถึง 0.25 Wm^{-2} นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนใบต่อยอด และความยาวใบก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มแสงลดลงเช่นกัน

Wang (1989) พบว่า ปลายยอด (shoot tip) ส่วนของลำต้น และใบอ่อน ของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส สามารถชักนำให้เกิด PLBs ได้ เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ PLBs สามารถพัฒนาต่อไปเป็นต้นอ่อนได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

Tokuhara and Mii (1993) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* และ *Doritaenopsis* โดยใช้ปลายยอดของก้านช่อดอก พบว่า PLBs เกิดขึ้นมากถึง 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร New Dogashima Medium (NDM) ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP

20 มิลลิลิตรต่อลิตร และ PLBs สามารถพัฒนาต่อไปเป็นต้นได้เมื่อเลี้ยงบนอาหาร NDM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใด ๆ

Chen and Piluek (1995) พบว่า สามารถชักนำให้เกิดการสร้าง adventitious bud จากตาบนก้านช่อดอกของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส บนอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ (VWC) และ TDZ 5 ถึง 40 μM หรือ BAP 40 μM โดย TDZ ที่ระดับ 5 หรือ 10 μM ให้ผลดีที่สุด adventitious bud พัฒนาเป็นต้นหลายต้นบนอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ โดย TDZ ให้ผลมากกว่า BAP ในการกระตุ้นให้เกิด axillary bud ที่พัฒนาเป็นต้นหลายต้นที่สมบูรณ์ และการทำให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ต้องนำมาเลี้ยงในอาหาร VWC ที่เติมซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์

Islam and Ichihashi (1999a) ทดลองใช้ สารสกัดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ taro extract (TE) potato extract (PE) apple extract (APE) และน้ำมะพร้าว เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของแคลลัสของกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* *Doritaenopsis* และ *Neofinetia* พบว่า taro extract ให้ผลดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตของ callus เมื่อใช้ในปริมาณตั้งแต่ 50 – 200 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยน้ำหนักของแคลลัสเพิ่มขึ้นสูงสุด 15-20 เท่าของน้ำหนักแคลลัสเดิม รองลงมาคือ potato extract, apple extract และน้ำมะพร้าวปริมาณ 50 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกัน

Young *et al.* (2000) ศึกษาการใช้อาหารสูตรต่าง ๆ ได้แก่ MS, VW (Vacin, E. and Went, F., 1949), KC (Knudson, 1946), LM (Lindemann *et al.*, 1970) และ Hyponex[®] (6.5-6-19 ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร + 20-20-20 ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร) ในการชักนำให้ PLBs กล้วยไม้ *Phalaenopsis* พัฒนาเป็นต้น พบว่า อาหารสูตร Hyponex[®] สามารถชักนำให้ PLBs พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุด 83 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 8 สัปดาห์ และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากและน้ำหนักสดต้นอ่อนมากที่สุด

Islam *et al.* (2001) ศึกษาเรื่องผลของความเข้มแสงและคุณภาพของแสงต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร New *Phalaenopsis* medium โดยหุ้มขวดทดลองด้วยกระดาษ cellophane สีต่าง ๆ คือ สีแดง เหลือง เขียว น้ำเงิน และขาว จากนั้นนำไปเลี้ยงในที่ที่มีความเข้มแสงต่างกัน 3 ระดับ คือ 25 50 และ 100 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ พบว่า ที่ความเข้มแสง 50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ส่งเสริมให้มีน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความยาวยอด และความยาวความกว้าง และความหนาของใบมีมากขึ้น และแสงสีแดงส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ่อน

มากที่สุด โดยพบว่า น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นอ่อน ความยาวยอด เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น และราก จำนวนรากต่อต้น มีมากกว่าเมื่อเทียบกับแสงสีอื่น

Myint *et al.* (2001) พบว่า อาหารสูตร Tokuhara and Masahiro (ND) medium ที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำต้มมันฝรั่ง 3 เปอร์เซ็นต์ และ น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ PLBs ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนของใบเกิดเป็นต้นได้ดี ส่วนอาหาร สูตร Hyponex® ทำให้ต้นมีการเจริญเติบโตที่ดี เมื่อเติม NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้น เดียวกัน

Tokuhara and Mii (2001) ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของก้านช่อดอกกล้วยไม้สกุล ฟาแลนนอพซิส บนอาหารสูตร NDM ที่เติม NAA 0.5 μM BA 4.4 μM และชูโครส 29.2 μM พบว่า สามารถชักนำให้เกิด embryogenic calluses ได้ 73 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 เดือน จากนั้นย้าย callus ลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NDM ที่เติม NAA 5.4 μM ชูโครส 58.4 μM เพื่อ เพิ่มปริมาณ และเมื่อลดความเข้มข้นของชูโครสลงเหลือ 29.2 μM พบว่าเซลล์สามารถพัฒนา เป็นต้นอ่อนได้ และวิธีนี้ทำให้เกิด somaclonal variation ได้น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์

อรดี (2521) ศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ในการเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์กล้วยไม้ฟาแลนนอพซิสจากก้านช่อดอกในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เมื่อนำก้านช่อดอกเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน ตาจะเจริญไปเป็นต้นที่มีรากที่แข็งแรงและ สามารถย้ายปลูกต่อไปได้ แต่ถ้าตาไม่เจริญให้ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ตาเจริญเป็นต้นได้และถ้าต้องการให้เกิดรากควรเติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

นิภา (2541) เพาะเลี้ยง PLBs ของกล้วยไม้ *Phalaenopsis Adendrot 'Kelvin'* ที่ได้จากการขยายพันธุ์ชิ้นส่วนใบบนอาหารวุ้นสูตรเกียวกะดัดแปลงที่เติม NAA ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร adenine 10 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพได้รับแสงและสภาพมืด พบว่า อัตราการเกิด PLBs สูงสุดของชิ้นส่วนใบบนอาหารวุ้นในสภาพที่ได้รับแสง ร่วมกับการใช้ purify agar 10 กรัมต่อลิตร ที่ pH 5.3 และเพิ่มปริมาณ PLBs ได้ดีในอาหารเหลวสูตร KPS2 โดยสามารถชักนำให้ PLBs พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดบนอาหาร สูตร WS ซึ่งประกอบด้วยมรดจากสูตร VW ร่วมกับจุลธาตุจากสูตร MS และน้ำมะพร้าวอ่อน 15 เปอร์เซ็นต์

ดวงพร (2546) ทดลองเลี้ยงต้นกล้า *Phalaenopsis violaces* Witte อายุ 6 เดือน บนอาหารสูตรที่ใช้สารเคมีจากสูตร VW ปุ๋ยสูตร 21-21-21 ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตรร่วมกับวิตามิน 1 แคปซูลต่อลิตร และปุ๋ย Hyponex[®] ปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเพิ่มหรือไม่เพิ่มกล้วยหอมบดและน้ำต้มมันฝรั่งอย่างละ 50 กรัมต่อลิตร พบว่า อาหารปุ๋ยสูตร 21-21-21 1 กรัมต่อลิตรร่วมกับวิตามิน 1 แคปซูลต่อลิตร ที่มีการเพิ่มกล้วยหอมบดและน้ำต้มมันฝรั่ง และสูตรปุ๋ย Hyponex[®] 3 กรัมต่อลิตร มีผลให้ต้นกล้ามีการเจริญเติบโตดีที่สุดที่สุด โดยมีน้ำหนักสดต่อต้นเฉลี่ยสูงสุด 1.69 และ 1.66 กรัม ตามลำดับ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร
 - 1.1 เครื่องแก้ว เช่น กระบอกตวง แท่งแก้วคนสาร และหลอดหยด เป็นต้น
 - 1.2 ขวดแก้วขนาด 250 และ 750 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด
 - 1.3 หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส
2. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตรคัดแปลง Vacin-Went (Vacin, E. and Went, F., 1949) สารเคมี macroelement จากสูตร Knudson C และ สารเคมี macroelement จากสูตร MS
3. อินทรียสารที่ใช้ร่วมกับการเตรียมอาหาร ได้แก่ น้ำมะพร้าวอ่อน กล้วยหอมบด มันฝรั่ง น้ำตาลทราย และผงถ่านกัมมันต์
4. สารอื่น ๆ
 - 4.1 พงู้น
 - 4.2 ปุ๋ยกล้วยไม้กรีนลีฟส์® สูตร 21-21-21 , ปุ๋ย Grow More® สูตร 20-10-20 และปุ๋ย Hyponex® (6.5 - 6 - 19)
 - 4.3 วิตามินไบโธรา-เอ็ม® และวิตามินรวมชนิดน้ำ นิวโตรเป็กซ์®
 - 4.4 amino acid จากเบนเนอร์โปรตีน®
5. เครื่องมือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
 - 5.1 ตู้ปลอดเชื้อ
 - 5.2 อุปกรณ์ที่ใช้ภายในตู้ปลอดเชื้อ เช่น มีดผ่าตัด ปากคีบ หลอดหยด จานแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์ ไฟแช็ค เป็นต้น
 - 5.3 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ตั้งอุณหภูมิ 26 ± 1 องศาเซลเซียส พร้อมชั้นวางที่ติดหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ให้ความเข้มแสง $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน
6. พืชทดลอง เมล็ดและต้นกล้ากล้วยไม้ฟาแลนนอพิษลูกผสม *Phalaenopsis* Minho Valentine ‘Taisuco’ (ดอกสีชมพู) และ *Phalaenopsis* Happy Girl (ดอกสีขาวปากแดง)

วิธีการ

การทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส

นำฝักกล้วยไม้ *Phalaenopsis* Minho Valentine ‘Taisuco’ อายุ 5 เดือน มาล้างทำความสะอาดด้วยสบู่เหลว เช็ดให้แห้งก่อนสเปรย์ด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ จุ่มฝักในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวฝัก จากนั้นผ่าฝักตามแนวขวางออกเป็น 2 ส่วน นำเมล็ดที่ได้เพาะลงอาหารเหลวสูตร VW (Vacin E. and Went F., 1949) จากนั้นนำขวดที่ใส่เมล็ดแล้ววางไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย 26 ± 1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ เลี้ยงไว้นาน 1 เดือน บันทึกการเปลี่ยนแปลงของเมล็ด โดยนำเมล็ดมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนเมล็ดที่พบในระยะการงอก 4 ระยะ แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความงอก

ระยะที่	ลักษณะการงอกของเมล็ด
1	เมล็ดที่มีเอ็มบริโอแต่ไม่งอก
2	เอ็มบริโอเพิ่มขนาดแต่ยังไม่หลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด
3	เอ็มบริโอขนาดใหญ่หลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด
4	เอ็มบริโอเจริญพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม (protocorm) มีขนาดประมาณ 1–3 มิลลิเมตร

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

ผ้าฝ้ายนำเมล็ด *Phalaenopsis* Minho Valentine ‘Taisuco’ ใส่ลงในน้ำกลั่นในสภาพปลอดเชื้อ แล้วนำไปพ่นบนอาหารแข็งขวดละ 3 มิลลิลิตร ใช้อาหารสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร วุ้น 5 กรัมต่อลิตร (สูตรพื้นฐาน) เปรียบเทียบระหว่างการใช้ 3 ปัจจัย รวม 8 สูตร ดังนี้

- | | |
|-------------|---------------------------------|
| ปัจจัยที่ 1 | น้ำตาลทราย 5 และ 10 กรัมต่อลิตร |
| ปัจจัยที่ 2 | กล้วยหอมบด 0 และ 20 กรัมต่อลิตร |
| ปัจจัยที่ 3 | ผงถ่าน 0 และ 1 กรัมต่อลิตร |

จากนั้นนำขวดที่เพาะเมล็ดแล้วไปวางไว้บนชั้นในหิ้งเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 26 ± 1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง $42 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกจำนวนที่พบในแต่ละระยะการพัฒนา แล้วให้เป็นระดับคะแนน ดังนี้

ลักษณะการเจริญของโปรโตคอร์มและต้นกล้า	ระดับคะแนน	จำนวนที่พบ
<u>ระยะโปรโตคอร์ม</u>		
- เอ็มบริโอขนาด 0.5 - 1 มิลลิเมตร ที่หลุดออกจาก เปลือกหุ้มเมล็ด	1	a
- เอ็มบริโอเจริญพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มมีขนาดประมาณ 1 - 3 มิลลิเมตร	2	b
- โปรโตคอร์มมีขนาด 3 - 4 มิลลิเมตร	3	c
<u>ระยะต้นกล้า</u>		
- ต้นกล้ามีใบยอดที่เห็นชัดเจน 1 ใบ ใบยาวประมาณ 1 เซนติเมตร	4	d
- ต้นกล้ามีใบยอด 1-2 ใบ ใบยาว 1-2 เซนติเมตร และมีรากอย่างน้อย 1 ราก	5	e

นำตัวเลขที่ได้มาคำนวณค่าดัชนีการเจริญเติบโต (Pierik *et al.*, 1988) ดังนี้

$$\text{ดัชนีการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ัม} = \frac{100 \times (a + 2b + 3c)}{a + b + c}$$

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 2 x 2 factorial in CRD มี 7 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด

การทดลองที่ 1.3 ผลของสูตรอาหารต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ัมไปเป็นต้นกล้า

ย้ายโปรโตคอร์ัมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 - 4 มิลลิเมตร อายุ 2 เดือน ที่ได้จากการทดลองที่ 1.2 ลงเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม จำนวน 20 ชิ้นต่อขวด เพื่อให้โปรโตคอร์ัมพัฒนาเป็นต้นกล้า และเลี้ยงต่อไปอีก 2 เดือน (อายุ 4 เดือน หลังเพาะเมล็ด) บันทึกจำนวนต้นที่พบในแต่ละระดับคะแนนเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2 จากนั้นนำตัวเลขที่ได้มาคำนวณค่าดัชนีการเจริญเติบโต ดังนี้

$$\text{ดัชนีการเจริญเติบโตของต้นกล้า} = \frac{100 \times (4d + 5e)}{d + e}$$

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 2 x 2 factorial in CRD มี 7 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด

นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาความแตกต่างของสูตรอาหารต่อการงอกของเมล็ดและการพัฒนาเป็นต้นกล้าด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2 การเลี้ยงต้นกล้วยให้มีขนาดใหญ่ในสภาพปลอดเชื้อ

การทดลองที่ 2.1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงต้นกล้วยไม้ฟาแลนนอพซิส
ลูกผสม

นำต้นกล้วยไม้ *Phalaenopsis* Happy Girl อายุ 4 เดือน มีใบ 2 ใบ มีรากอย่างน้อย 1
ราก มาเลี้ยงในอาหารที่ใช้สารเคมีที่แตกต่างกัน 6 สูตร คือ

1. สารเคมีจากสูตร VW
2. สารเคมี Macroelement ของสูตร MS
3. สารเคมี Macroelement ของสูตร Knudson C
4. สารเคมีจากปุ๋ย Hyponex[®] 3.5 กรัมต่อลิตร
5. สารเคมีจากปุ๋ยกล้วยไม้กรีนลีฟส์[®] สูตร 21-21-21 1 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ วิตามิน
Viterra-M[®] 1 แคปซูลต่อลิตร
6. สารเคมีจากปุ๋ยกล้วยไม้ Grow More[®] สูตร 20-10-20 1 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ วิตามิน
Viterra-M[®] 1 แคปซูลต่อลิตร

โดยทุกสูตรเติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร กล้วย
หอมบด 50 กรัมต่อลิตร น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร ปูน 6 กรัมต่อ
ลิตร จากนั้นนำไปวางไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 5 เดือน

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำ 4 ซ้ำๆ ละ 1 ขวดๆ ละ 10 ต้น

การทดลองที่ 2.2 ผลของกล้วยหอม แบนเนอร์โปรตีน® และวิตามินต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส

นำต้นกล้วยไม้ *Phalaenopsis* Minho Valentine ‘Taisuco’ ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อจากการทดลองที่ 1.3 อายุ 5 เดือน ที่มีใบ 2 ใบ และมีรากอย่างน้อย 1 ราก มาเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง VW เป็นสูตรพื้นฐาน (ไม่เติมน้ำมะพร้าวและ น้ำต้มมันฝรั่ง) เปรียบเทียบระหว่างการใช้ 3 ปัจจัย รวม 24 สูตร ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 กล้วยหอมบด 2 ระดับ คือ 0 และ 50 กรัมต่อลิตร

ปัจจัยที่ 2 แบนเนอร์โปรตีน® 3 ระดับ คือ 0 2 และ 4 มิลลิลิตรต่อลิตร

ปัจจัยที่ 3 วิตามินรวม 4 ระดับ คือ ไม่ใส่วิตามิน ใส่วิตามินไวเทอรา-เอ็ม® 1 แคปซูลต่อลิตร วิตามินนิวโทรเป็กซ์® 10 และ 15 มิลลิลิตรต่อลิตร

จากนั้นนำขวดไปวางไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 7 เดือน วางแผนการทดลองแบบ $2 \times 3 \times 4$ factorial in CRD ทำ 4 ซ้ำๆ ละ 1 ขวดๆ ละ 10 ต้น

การทดลองที่ 2.3 ผลของชนิดแสงต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ฟาแลนนอพซิส

นำต้นกล้วยไม้ *Phalaenopsis* Minho Valentine ‘Taisuco’ จากการทดลองที่ 1.3 อายุ 5 เดือน มีใบ 2 ใบ มีรากอย่างน้อย 1 ราก มาเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง VW ที่เติมน้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร และวุ้น 6 กรัมต่อลิตร ให้ได้รับสภาพแสงที่แตกต่างกัน 2 แบบ

แบบที่ 1 ได้รับแสงเท่ากันตลอดการทดลองจากแหล่งแสง 5 ชนิด

แบบที่ 2 ได้รับสภาพแสงน้อย ความเข้มแสง $1.21 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ นาน 1 เดือน ก่อนได้รับแสงตามปกติเช่นเดียวกับแบบที่ 1

โดยได้รับแสงสว่างจากแหล่งแสง 5 ชนิด คือ

1. แสงจากหลอด Light Emitting Diodes (LEDs) ที่ให้แสงสีแดง 90 เปอร์เซ็นต์ + แสงสีน้ำเงิน 10 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มแสง $5.52 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$
2. แสงจากหลอด LEDs ที่ให้แสงสีแดง 80 เปอร์เซ็นต์ + แสงสีน้ำเงิน 20 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มแสง $3.41 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$
3. แสงจากหลอดโกรลักซ์ (Grolux) ความเข้มแสง $36.4 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$
4. แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent) ชนิด Day Light 36 วัตต์ ความเข้มแสง $32.87 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$
5. แสงธรรมชาติ ความเข้มแสง $6.78 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (วัดความเข้มแสงเวลา 14.00 น. ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่แสงเข้ามามากที่สุด)

จากนั้นนำขวดไปวางไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 4 เดือน วางแผนการทดลองแบบ 2×5 factorial in CRD ทำ 5 ซ้ำๆ ละ 1 ขวด ๆ ละ 10 ต้น

การบันทึกผล

การทดลองที่ 2.1 ถึง 2.3 นำต้นกล้ามาบันทึกลักษณะการเจริญเติบโต ดังนี้

1. นำต้นกล้าออกจากสภาพปลอดเชื้อโดยการทุบขวด
2. นำต้นกล้ามาล้างล้างอาหารออกให้หมดแล้วชั่งน้ำหนักสดของต้นกล้าด้วยเครื่องชั่งละเอียด จำนวน 10 ต้นต่อขวด
3. นับจำนวนใบ วัดความยาวและความกว้างใบ
4. นับจำนวนรากและวัดความยาวของรากที่ยาวที่สุด 5 ราก แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์ผล

การทดลองที่ 2.1 ถึง 2.3 วิเคราะห์ผลโดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์

สถานที่และระยะเวลาในการทำการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร และห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสวนกล้วยไม้ระพี สาคริก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเดือนพฤษภาคม 2547 สิ้นสุดการทดลองเดือนกันยายน 2548

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส

หลังการนำเมล็ดจากฝักกล้วยไม้ *Phalaenopsis* Minho Valentine ‘Taisuco’ ไปเพาะในอาหารเหลวสูตร VW เป็นเวลา 1 เดือน ได้นำเมล็ดมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยบันทึกลักษณะของเมล็ดที่เริ่มงอก ซึ่งพบระยะที่เอ็มบริโอขยายขนาดแต่ยังไม่หลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด ร้อยละ 9.84 ระยะเอ็มบริโอขนาดใหญ่หลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด ร้อยละ 13.11 และระยะเอ็มบริโอเจริญพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม (protocorm) มีขนาดประมาณ 1 – 3 มิลลิเมตร ร้อยละ 60.66 ซึ่งเป็นระยะที่พบมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบเมล็ดอีกร้อยละ 16.39 ที่ไม่แสดงอาการงอกโดยคงลักษณะและขนาดเท่าเดิม คือ เอ็มบริโอมีสีเหลืองอ่อนล้อมรอบด้วยเปลือกบาง ๆ เมื่อนำมาคำนวณอัตราการงอกของเมล็ดภายใน 1 เดือนหลังเพาะ พบว่า เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความงอกร้อยละ 83.61 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวน (ร้อยละ) เมล็ดที่พบในระยะต่าง ๆ ของการงอกหลังเพาะเมล็ดเป็นเวลา 1 เดือน

ลักษณะการงอกของเมล็ด	จำนวนที่พบ (ร้อยละ)	
	เมล็ดไม่งอก	เมล็ดงอก
เมล็ดที่มีเอ็มบริโอแต่ไม่งอก	16.39	-
เอ็มบริโอเพิ่มขนาดแต่ยังไม่หลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด	-	9.84
เอ็มบริโอขนาดใหญ่หลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด	-	13.11
เอ็มบริโอเจริญพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม (protocorm) มีขนาดประมาณ 1 – 3 มิลลิเมตร	-	60.66
รวม	16.39	83.61

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

หลังการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ *Phalaenopsis* Minho Valentine ‘Taisuco’ จากฝักอายุ 5 เดือน บนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง VW โดยทุกสูตรอาหารในปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร น้ำคั้นมันฝรั่ง (จากมันฝรั่ง 100 กรัม) และวุ้น 5 กรัม เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลทราย 5 และ 10 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมบด 0 และ 20 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 0 และ 1 กรัมต่อลิตร นาน 2 เดือน พบการงอกของเมล็ดและการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มเป็น 3 แบบ และได้ให้ระดับคะแนนการพัฒนาเป็น 3 ระดับ คือ

ระดับคะแนน 1 เป็นระยะที่เอ็มบริโอซึ่งมีสีเหลืองอ่อนเปลี่ยนเป็นสีเขียว และขยายขนาดเพิ่มขึ้นจนหลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด พบร้อยละ 0 – 61.68 พบจำนวนมากกว่าครั้งในอาหารที่ใช้น้ำตาล 5 กรัมต่อลิตรและเติมผงถ่าน นอกจากนี้ยังพบการตายในระยะนี้มากเฉลี่ยร้อยละ 37.16 ในอาหารที่เติมผงถ่าน และตายมากที่สุดร้อยละ 61.90 เมื่อใส่ผงถ่านร่วมกับกล้วยหอมบดในอาหารที่ใส่น้ำตาล 5 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2)

ระดับคะแนน 2 เอ็มบริโอพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มขนาดเล็กที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 - 3 มิลลิเมตร ส่วนใหญ่มีการพัฒนาอยู่ในระยะนี้ พบร้อยละ 26.33-75.60 (ตารางที่ 3)

ระดับคะแนน 3 โปรโตคอร์มมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 - 4 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นระยะที่มีการพัฒนามากที่สุด พบร้อยละ 11.99 – 24.40 โดยพบมากที่สุดในการอาหารที่เติมน้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร ที่ไม่ใส่ กล้วยหอมบดและผงถ่าน ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เมล็ดมีการพัฒนาหลังการงอกมากที่สุด (ตารางที่ 3 และภาพที่ 1)

จากการคำนวณหาค่าดัชนีการเจริญเติบโตพบว่าสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลทราย 10 และ 5 กรัมต่อลิตร ที่ไม่ใส่กล้วยหอมบดและผงถ่าน และสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร และกล้วยหอมบด 20 กรัมต่อลิตร ให้ค่าดัชนีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 224.40 208.13 และ 201.82 ตามลำดับ ต่างจากสูตรอาหารอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) เมื่อนำค่าดัชนีการเจริญเติบโตมาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน ปรากฏว่า ไม่มีอิทธิพลร่วมกันระหว่างปริมาณน้ำตาลทราย กล้วยหอมบด และผงถ่าน แต่อิทธิพลร่วมระหว่างปริมาณน้ำตาลทรายและผงถ่านมีผลต่อค่าดัชนีการเจริญเติบโต โดยอาหารที่ไม่ใส่ผงถ่านเมื่อปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ค่าดัชนี

การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจาก 203.39 เป็น 213.11 และอาหารที่ใส่ผงถ่านเมื่อปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้น ค่าดัชนีการเจริญเติบโตจะเพิ่มขึ้นจาก 157.33 เป็น 194.66 นอกจากนี้ยังพบอีกว่าภายใต้อิทธิพลของน้ำตาลทรายและผงถ่าน อาหารที่ไม่ใส่กล้วยหอมบด มีค่าดัชนีการเจริญเติบโตเท่ากับ 198.85 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารที่ใส่กล้วยหอมบดที่มีค่าดัชนีการเจริญเติบโตเพียง 185.40 (ตารางที่ 4) จากผลการทดลองนี้ พบว่า สูตรอาหารที่ใส่น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร ไม่เพิ่มกล้วยและผงถ่าน โปรโตคอร์มมีการพัฒนาดีที่สุด และมีจำนวนตายน้อยที่สุด

ตารางที่ 2 จำนวน (ร้อยละ) ของเอ็มบริโอในระดับคะแนน 1 ที่ตายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน

น้ำตาลทราย (กรัมต่อลิตร)	กล้วยหอมบด (กรัมต่อลิตร)	ผงถ่าน (กรัมต่อลิตร)		เฉลี่ย
		0	1	
5	0	8.89	34.72	21.81
	20	13.51	61.90	37.71
10	0	0	18.07	9.04
	20	15.56	33.96	24.76
เฉลี่ย		9.49	37.16	

ตารางที่ 3 จำนวน (ร้อยละ) โปรโตคอร์มที่พบในระดับคะแนนต่างๆ และค่าดัชนีการเจริญเติบโต หลังการออกของเมล็ดบนอาหาร 8 สูตร นาน 2 เดือน

น้ำตาลทราย (กรัมต่อลิตร)	กล้วยหอมบด (กรัมต่อลิตร)	ผงถ่าน (กรัมต่อลิตร)	คะแนนการพัฒนา			ค่าดัชนีการ เจริญเติบโต
			1	2	3	
5	0	0	8.56	74.20	16.70	208.13ab ^{1/}
		1	51.64	32.35	16.01	164.36 c
	20	0	14.66	72.00	13.33	198.67 b
		1	61.68	26.33	11.99	150.31 c
10	0	0	0.00	75.60	24.40	224.40 a
		1	18.28	64.89	16.82	198.53 b
	20	0	15.66	66.87	17.47	201.82 ab
		1	33.15	42.92	23.93	190.79 b
F-test						*
C.V. (%)						5.20

หมายเหตุ

คะแนนการพัฒนา

- 1 : เอ็มบริโอขนาดใหญ่หลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด
- 2 : เอ็มบริโอเจริญพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มมีขนาด 1 - 3 มิลลิเมตร
- 3 : โปรโตคอร์มมีขนาด 3 - 4 มิลลิเมตร
- * : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์
- 1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย
โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 4 ผลของน้ำตาลทราย กล้วยหอมบด และผงถ่าน ต่อค่าดัชนีการเจริญเติบโตของ
โปรโตคอร์ัม หลังการรอกของเมล็ดที่เลี้ยงบนอาหาร 8 สูตร นาน 2 เดือน

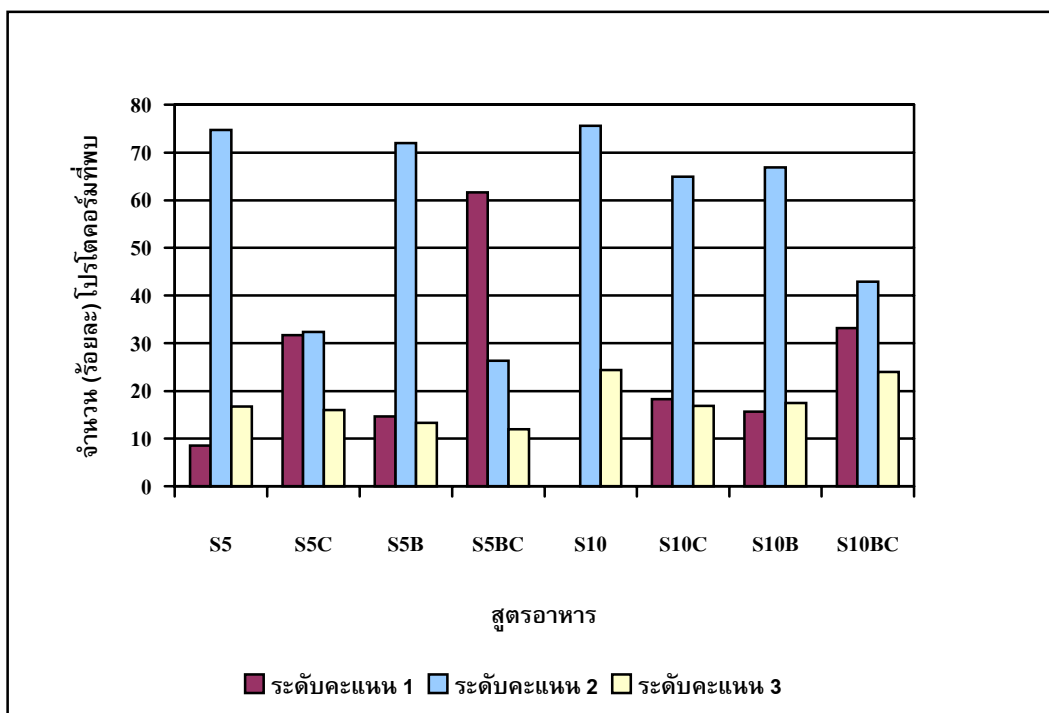
		ปัจจัย	ค่าดัชนีการเจริญเติบโต
น้ำตาลทราย	5	กรัมต่อลิตร	180.37 b ^{1/}
	10	กรัมต่อลิตร	203.89 a
กล้วยหอมบด	0	กรัมต่อลิตร	198.85 a
	20	กรัมต่อลิตร	185.40 b
ผงถ่าน	0	กรัมต่อลิตร	208.25 a
	1	กรัมต่อลิตร	176.00 b
น้ำตาลทราย x ผงถ่าน			
น้ำตาลทราย 5 กรัม x ผงถ่าน 0 กรัม			203.39 ab
น้ำตาลทราย 5 กรัม x ผงถ่าน 1 กรัม			157.33 c
น้ำตาลทราย 10 กรัม x ผงถ่าน 0 กรัม			213.11 a
น้ำตาลทราย 10 กรัม x ผงถ่าน 1 กรัม			194.66 b
F-test			
น้ำตาล			**
กล้วย			*
ผงถ่าน			**
น้ำตาล x กล้วย			ns
น้ำตาล x ผงถ่าน			*
กล้วย x ผงถ่าน			ns
น้ำตาล x กล้วย x ผงถ่าน			ns
C.V. (%)			5.20

ns : ไม่แตกต่างทางสถิติ

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย
โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซนต์



ภาพที่ 1 จำนวน (รียอละ) โปรโตคอร์มที่พบในแต่ละระดับคะแนนหลังการงอกของเมล็ด
เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน

หมายเหตุ S5, S10 คือ สูตรอาหารที่ใส่น้ำตาลทราย 5 และ 10 กรัมต่อลิตร

B คือ สูตรอาหารที่ใส่กล้วยหอมบด 20 กรัมต่อลิตร

C คือ สูตรอาหารที่ใส่ถ่านกัมมันต์ 1 กรัมต่อลิตร

การทดลองที่ 1.3 ผลของสูตรอาหารต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์มไปเป็นต้นกล้า

หลังจากย้ายโปรโตคอร์มที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 - 4 มิลลิเมตร ลงเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม จำนวน 20 ชิ้นต่อขวด เพื่อให้โปรโตคอร์มมีการพัฒนาเป็นต้นกล้า และเลี้ยงต่อไปอีก 2 เดือน (รวมอายุ 4 เดือน หลังเพาะเมล็ด) พบว่า โปรโตคอร์มมีการพัฒนาต่อไปเป็นต้นกล้า จึงได้แบ่งขนาดต้นโดยให้คะแนนการเจริญเติบโตเป็น 2 ระดับคะแนน คือ

ระดับคะแนน 4 ต้นกล้ามีใบยอดเห็นชัดเจน 1 ใบ ใบยาวประมาณ 1 เซนติเมตร พบร้อยละ 21.67 – 61.67 โดยพบมากที่สุดในการที่ให้น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับกล้วยหอมบดและไม่ใส่ผงถ่าน (ตารางที่ 5)

ระดับคะแนน 5 ต้นกล้ามีใบ 1 - 2 ใบ ใบยาวประมาณ 1 - 2 เซนติเมตร และมีรากอย่างน้อย 1 ราก พบร้อยละ 38.33 – 78.33 โดยพบมากที่สุดในการที่ให้น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการใส่กล้วยหอมบดและผงถ่าน (ตารางที่ 5 และภาพที่ 2)

เมื่อนำจำนวนต้นกล้าที่พบในระยะต่าง ๆ มาคำนวณหาค่าดัชนีการเจริญเติบโต พบว่า ต้นกล้าในอาหารสูตรที่ใส่ผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร มีค่าดัชนีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน คือ 473.33 461.67 476.67 และ 478.33 ตามลำดับ (ตารางที่ 5) และมากกว่าโดยแตกต่างทางสถิติกับต้นกล้าในสูตรที่ไม่ใส่ผงถ่าน ยกเว้นต้นกล้าในสูตรที่ใส่น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร และไม่ใส่ผงถ่าน เมื่อนำค่าดัชนีการเจริญเติบโตมาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน ปรากฏว่า ไม่มีอิทธิพลร่วมกันระหว่างปริมาณน้ำตาลทราย กล้วยหอมบด และผงถ่าน แสดงว่า ค่าดัชนีการเจริญเติบโตเป็นอิสระจากปัจจัยรวมทั้ง 3 โดยพบว่า ภายใต้อิทธิพลของกล้วยหอมบดและผงถ่าน ปริมาณน้ำตาลทราย ทั้ง 2 ระดับ (5 และ 10 กรัมต่อลิตร) ให้ค่าดัชนีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ เช่นเดียวกับภายใต้อิทธิพลของปริมาณน้ำตาลทรายและผงถ่าน การใส่และไม่ใส่กล้วยหอมบด ให้ค่าดัชนีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ภายใต้อิทธิพลของน้ำตาลทรายและกล้วยหอมบด การใส่และไม่ใส่ผงถ่าน ให้ค่าดัชนีการเจริญเติบโตแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าอาหารที่ใส่ผงถ่านมีค่าดัชนีการเจริญเติบโตมากกว่าอาหารที่ไม่ใส่ผงถ่าน (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 จำนวน (ร้อยละ) ต้นกล้าที่พบในระดับคะแนนต่าง ๆ และค่าดัชนีการเจริญเติบโต
หลังการรอกของเมล็ดบรณอาหาร 8 สูตร นาน 4 เดือน

น้ำตาลทราย (กรัมต่อลิตร)	กล้วยหอมบด (กรัมต่อลิตร)	ผงถ่าน (กรัมต่อลิตร)	คะแนนการพัฒนา		ค่าดัชนี การเจริญเติบโต
			4	5	
5	0	0	60.00	40.00	440.00 b ^{1/}
		1	26.66	73.33	473.33 a
	20	0	51.66	48.33	448.33 b
		1	38.33	61.67	461.67 ab
10	0	0	41.67	58.33	458.33 ab
		1	23.33	76.67	476.67 a
	20	0	61.67	38.33	438.33 b
		1	21.67	78.33	478.33 a
F-test					**
C.V.(%)					2.93

หมายเหตุ

คะแนนการพัฒนา

- 4 : ต้นกล้ามีใบยอดเห็นชัดเจน 1 ใบ ใบยาวประมาณ 1 เซนติเมตร
- 5 : ต้นกล้ามีใบ 1-2 ใบ ใบยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร และมีรากอย่างน้อย 1 ราก
- ** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์
- 1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย
โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

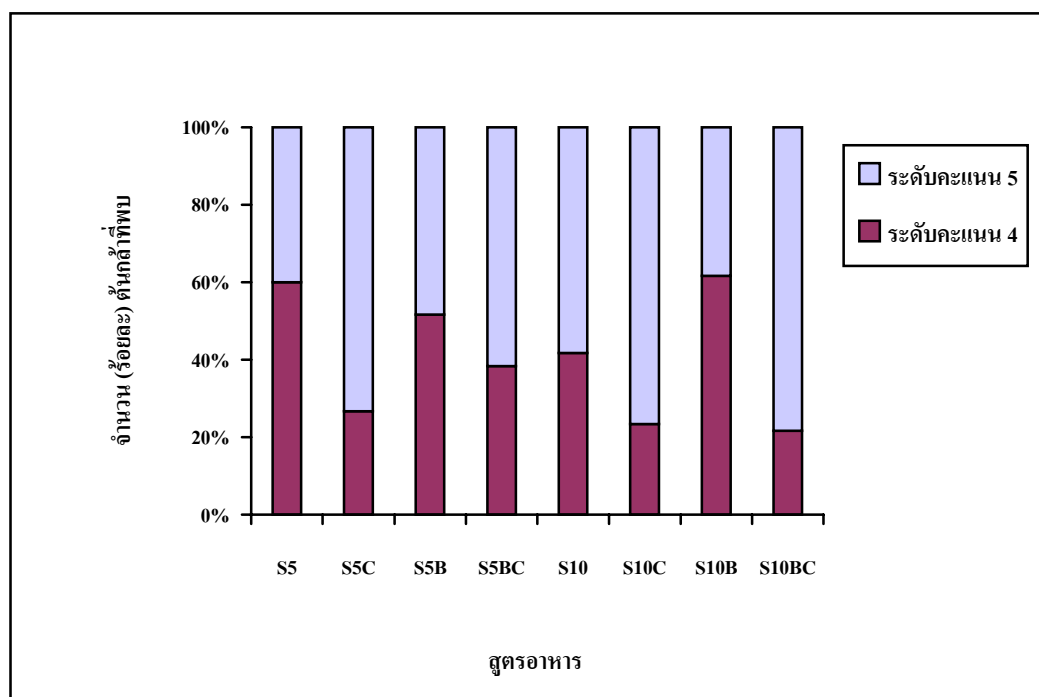
ตารางที่ 6 ผลของน้ำตาลทราย กล้วยหอมบด และผงถ่าน ต่อค่าดัชนีการเจริญเติบโตของ
โปรโตคอร์ม หลังการรอกของเมล็ดที่เลี้ยงบนอาหาร 8 สูตร นาน 4 เดือน

ปัจจัย			ค่าดัชนีการเจริญเติบโต
น้ำตาลทราย	5	กรัมต่อลิตร	455.83
	10	กรัมต่อลิตร	462.92
กล้วยหอมบด	0	กรัมต่อลิตร	462.08
	20	กรัมต่อลิตร	456.67
ผงถ่าน	0	กรัมต่อลิตร	446.25 b ^{1/}
	1	กรัมต่อลิตร	472.50 a
F-test			
น้ำตาล			ns
กล้วย			ns
ผงถ่าน			**
น้ำตาล x กล้วย			ns
น้ำตาล x ผงถ่าน			ns
กล้วย x ผงถ่าน			ns
น้ำตาล x กล้วย x ผงถ่าน			ns
C.V. (%)			2.93

ns : ไม่แตกต่างทางสถิติ

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ย
โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์



ภาพที่ 2 จำนวน (ร้อยละ) ต้นกล้าที่พบในแต่ละระดับคะแนนหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน (อายุ 4 เดือนหลังเพาะเมล็ด)

หมายเหตุ S5, S10 คือ สูตรอาหารที่ใส่น้ำตาลทราย 5 และ 10 กรัมต่อลิตร

B คือ สูตรอาหารที่ใส่กล้วยหอมบด 20 กรัมต่อลิตร

C คือ สูตรอาหารที่ใส่ถ่านกัมมันต์ 1 กรัมต่อลิตร

การทดลองที่ 2 การเลี้ยงต้นกล้วยให้มีขนาดใหญ่ในสภาพปลอดเชื้อ

การทดลองที่ 2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงต้นกล้วยไม้ฟาแลนนอพิษ
ลูกผสม

นำต้นกล้วยไม้ *Phalaenopsis* Happy Girl (สีขาวปากแดง) ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ อายุ 4 เดือน ย้ายลงเลี้ยงในอาหารที่ใช้สารเคมีที่แตกต่างกัน คือ 1) สารเคมีจากสูตร VW 2) สารเคมี Macroelements ของสูตร MS 3) สารเคมี Macroelements ของสูตร Knudson C 4) สารเคมีจากปุ๋ย Hyponex[®] 3.5 กรัมต่อลิตร 5) สารเคมีจากปุ๋ยกล้วยไม้สูตร 20-10-20 1 กรัมต่อลิตรร่วมกับวิตามิน Viterra-M[®] 1 แคปซูลต่อลิตร และ 6) สารเคมีจากปุ๋ยกล้วยไม้ 21-21-21 1 กรัมต่อลิตรร่วมกับวิตามิน Viterra-M[®] 1 แคปซูลต่อลิตร โดยในสูตรพื้นฐานปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วยน้ำตาลทราย 10 กรัม น้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร กล้วยหอมบด 50 กรัม และน้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัม หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน ต้นกล้วยมีการเจริญเติบโตเป็นต้นเดี่ยวขนาดใหญ่ จึงนำออกจากสภาพปลอดเชื้อมาวัดการเจริญเติบโตของต้นพบว่า ทุกสูตรอาหารให้ค่าน้ำหนักสด จำนวนใบ ความกว้าง-ความยาวใบที่ 2 และใบที่ 3 จากยอดจำนวนราก และความสูงทรงต้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้น ความยาวราก มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารสูตรปุ๋ยกล้วยไม้ 20-10-20 1 กรัมต่อลิตร ร่วมกับวิตามิน Viterra-M[®] 1 แคปซูลต่อลิตร และอาหารสูตรปุ๋ยกล้วยไม้ 21-21-21 1 กรัมต่อลิตร ร่วมกับวิตามิน Viterra-M[®] 1 แคปซูลต่อลิตร รากมีความยาวมากที่สุด 4.09 และ 3.80 เซนติเมตร ตามลำดับ มากกว่าต้นในอาหารสูตรอื่น(ตารางที่ 7 และ ภาพที่ 3) แสดงว่าการใช้ปุ๋ยกล้วยไม้ทั้ง 2 สูตร ซึ่งมีราคาถูกแทนการใช้สารเคมีช่วยให้ต้นกล้วยมีการเจริญเติบโตดีเท่ากับการใช้สารเคมีในสูตรอาหารอีก 4 สูตร