

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. การศึกษาอายุฝักและชนิดของอาหารที่เหมาะสมในการงอกของเมล็ดและเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์

จากการทดลองศึกษาหาอายุฝักและสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเพาะเมล็ดของกล้วยไม้ *Phalaenopsis Silky Moon* พบว่าหลังจากผสมเกสรกล้วยไม้ *Phalaenopsis Silky Moon* ส่วนของก้านดอกที่เป็นรังไข่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวและมีการขยายขนาดเจริญเป็นฝัก เมื่อฝักมีอายุหลังการผสมเกสรมากขึ้น ฝัก และเมล็ด มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงขนาดของฝัก แต่การเพิ่มขนาดของฝักมีไม่มากนัก จึงทำให้ขนาดของฝักไม่ต่างกันระหว่างฝักอายุ 2, 3 และ 4 เดือน ขณะที่เมื่อเมล็ดภายในฝักมีการเจริญเติบโตมากขึ้นจะมีความสมบูรณ์มากขึ้นด้วย เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเมล็ดจะเปลี่ยนจากสีครีมเป็นสีน้ำตาล ทั้งนี้เป็นผลของการเปลี่ยนแปลงของสารพิกคาโรทีนอยด์ (carotenoid) ของพืชนั่นเอง (สัมพันธุ์ 2525) เมื่อทำการศึกษาดังอายุฝักที่เหมาะสมในการเพาะเมล็ด พบว่าฝักที่มีอายุน้อยที่สุดที่ใช้เพาะได้มีอายุ 3 เดือน หลังจากผสมเกสร แต่เมล็ดจากฝักอายุ 2 เดือน ไม่มีการเจริญเติบโตในทุกสูตรอาหาร ทั้งนี้เนื่องจากในฝักที่อ่อนเกินไปเมล็ดยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ เอ็มบริโอยังมีขนาดเล็ก หรืออาจเนื่องมาจากอวุลภายในรังไข่บางส่วนยังไม่ได้รับการผสม เพราะในกล้วยไม้ อวุลไม่ได้รับการผสมพร้อมกันหมดในเวลาเดียวกัน จึงทำให้เป็นเมล็ดลีบ (สกุล 2538) อย่างไรก็ตามเมล็ดจากฝักอ่อนอายุ 3 เดือน เหมาะสมที่สุดในการนำมาเพาะเมล็ด เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด

ในการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเพาะเมล็ดและการเจริญเติบโตของเมล็ด พบเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดในอาหารเหลวสูตรปรับปรุงของ VW (MVW) และ H (MH) ที่เติมน้ำต้มมันฝรั่งที่ต้มจากมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร peptone 2 กรัมต่อลิตร และผงถ่านกัมมันต์ 1 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับรายงานที่ว่า การเติม peptone ลงในอาหารสูตร Thomale GD ช่วยให้เมล็ดงอกมากขึ้น และการเจริญของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* ดีขึ้น (Flame 1978) เนื่องจาก peptone เป็น protein hydrolysate ซึ่งมีส่วนประกอบของกรดอะมิโน (amino acids) อยู่ปริมาณมาก (Arditti 1977) กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีในการเพาะเมล็ดอ่อน โดยเฉพาะ arginine ซึ่งช่วยเพิ่มการเจริญของเมล็ดที่ยังไม่แก่เต็มที่ นอกจากนี้การใส่ผงถ่านกัมมันต์และน้ำต้มมันฝรั่งในสูตรอาหารที่ใช้เพาะเมล็ดกล้วยไม้ *Phalaenopsis* ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มที่ได้จากการเพาะ

เมล็ดดีขึ้น (Tsai 1992) ในมันฝรั่งมีผู้ศึกษาพบว่ามีการโพลีเอมีน (Polyamine) สารนี้มีผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีผลต่อการเพิ่มกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) ในเนื้อเยื่อพืชมากขึ้น ถ่านกัมมันต์เป็นสารอีกชนิดหนึ่งที่สามารถช่วยให้การงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ด เนื่องจากช่วยดูดซับสารยับยั้งการเจริญเติบโตที่เกิดขึ้นจากขบวนการเมแทบอลิซึม นอกจากนี้ยังช่วยรักษาระดับความเป็นกรดและด่างของอาหารไม่ให้เปลี่ยนแปลงมากนัก และยังช่วยเพิ่มออกซิเจนในอาหาร เนื่องจากอนุภาคของถ่านมีลักษณะเป็นรูพรุนคล้ายฟองน้ำ (Arditti และ Ernst 1984)

เมื่อพิจารณาจากชนิดของอาหารที่ใช้ในการเพาะเมล็ด พบว่าเมล็ดมีปริมาณการงอกสูงในสูตรปรับปรุงของ VW และ H ซึ่งอาจเนื่องจากการที่อาหารสูตร VW และ H จะมีความเข้มข้นของสารอาหารในระดับต่ำ ส่วนอาหารสูตร MS มีความเข้มข้นของธาตุอาหารสูงที่สุด Arditti และ Harison (1977) อธิบายว่าการที่อาหารมีความเข้มข้นของสารอาหารต่ำๆ ทำให้การปลดปล่อยธาตุอาหารต่างๆ เกิดได้ดีกว่า จึงทำให้เมล็ดกล้วยไม้สามารถนำธาตุอาหารไปใช้ได้มีประสิทธิภาพ ทำให้เกิดการเจริญเติบโตได้เร็ว

2. การศึกษานิตของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของตาบนก้านช่อดอก

ในการเพาะเลี้ยงตาบนก้านช่อดอกของกล้วยไม้ *Phalaenopsis Silky Moon* นั้นการปนเปื้อนเป็นปัญหาที่สำคัญจึงได้มีการศึกษาหาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของตาบนก้านช่อดอก พบว่าการใช้ $\text{Ca}(\text{OCI})_2$ ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที สามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงที่สุด คล้ายกับการทดลองของ Tanaka และ Sakanishi (1978b) ซึ่งใช้ $\text{Ca}(\text{OCI})_2$ ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ แต่ใช้เวลาเพียง 10 นาที ในการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวตาบนก้านช่อดอกของกล้วยไม้ *Phalaenopsis amabilis* นอกจากนี้ยังพบว่าตำแหน่งตาบนก้านมีผลต่อการปนเปื้อน โดยตำแหน่งที่ 1 ซึ่งอยู่ล่างสุดของช่อดอกติดกับวัสดุปลูกมีการปนเปื้อนสูงที่สุด

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของตาบนก้านช่อ พบว่าตาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Hyponex ที่เติม peptone 2 กรัมต่อลิตร BA 22.2 ไมโครโมลาร์ และน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร มีการเจริญเติบโตดีที่สุด คล้ายกับการเพาะเลี้ยงตาบนก้านช่อดอกของกล้วยไม้ *Phalaenopsis Pink Leopard 'Petra'* (Duan และ Yazawa 1995a) และ BA ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไซโทไคนินที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ และสามารถกระตุ้นให้ตาข้างของพืชเจริญ (ฟิเรคช 2537) มีรายงานเกี่ยวกับอิทธิพลของ BA ต่อการเจริญของตาบนก้านช่อดอกของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* ว่าสามารถกระตุ้นให้ตาที่พักตัวบนก้านช่อดอกเจริญ (Tanaka และ Sakanishi 1978b; Chen และคณะ 2003; อร์ดี 2521)

จากการนำตาบนก้านช่อดอกที่ตำแหน่ง 1-5 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ พบว่า ตำแหน่งบนก้านช่อดอกเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของตาสามารถแบ่งได้ 3 รูปแบบ คือ ตำแหน่งด้านล่าง ส่วนใหญ่จะพักตัวหรือไม่มีการเจริญ ตำแหน่งที่ 2 และ 3 ส่วนใหญ่จะเจริญไปเป็นต้น และตำแหน่งที่ใกล้ดอกคือ 4 และ 5 ส่วนใหญ่จะเจริญเป็นช่อดอก อร์ดี (2521) อธิบายว่าในตำแหน่งที่ใกล้ดอกจะมีระดับ flowering hormone มากกว่าตาที่ตำแหน่งโคนก้านช่อจึงทำให้ตาในตำแหน่งบนมีการเจริญเป็นช่อดอก

3. การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมในการเกิด PLBs จากชิ้นส่วนของใบ

จากการนำชิ้นส่วนใบจากส่วนโคนใบของใบอ่อนกล้วยไม้ *Phalaenopsis* Silky Moon โดยนำต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้ออายุประมาณ 3 เดือน นำมาเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 1 เดือน จนกระทั่งใบมีสีเหลือง ตัดให้มีขนาดกว้างและยาว 0.1×1 เซนติเมตร โดยวิธี transverse thin-section culture (tTCLs) ซึ่งการตัดวิธีนี้สามารถชักนำให้เกิด PLBs ได้ดีในกล้วยไม้หลายชนิด เช่น กล้วยไม้ลูกผสม *Aranda* 'Deborah' (Lakshmanan และคณะ 1995) และกล้วยไม้ *Doritaenopsis* (Park และคณะ 2002) หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งครึ่งสูตรของ MS ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* ในอาหาร 5 สูตร ได้แก่ อาหารครึ่งสูตรของ MS, VW, KC, LM และ Hyponex พบว่าอาหารครึ่งสูตรของ MS เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิด PLBs (Park และคณะ 2002) โดย 2 สัปดาห์แรกเพาะเลี้ยงในที่มืดก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง Hsu และ Chen (2003) อธิบายว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบในที่มืดจะทำให้ใบมีสีเหลืองซึ่งสามารถชักนำให้ใบเกิด PLBs ได้ง่ายกว่าชิ้นส่วนใบที่มีสีเขียว

สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ BA และ NAA เนื่องจาก BA เป็นสารในกลุ่มไซโทไคนินซึ่งมีส่วนในการกระตุ้นวงจรของเซลล์ โดยมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเนื้อเยื่อและชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ (พีรเดช 2537) ขณะที่ NAA ซึ่งเป็นสารในกลุ่มออกซินอาจไปควบคุมในส่วนของการชักนำให้เกิดการจำลอง DNA (ลิลลี่ 2540) สำหรับระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม คือ BA 22.2 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ adenine sulfate 10 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำมะพร้าว 150 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นใบเกิด PLBs มากที่สุด และมีจำนวน PLBs ต่อชิ้นใบสูงที่สุด (12.4 PLBs ต่อชิ้น) คล้ายกับการทดลอง Duan และ Yasawa (1995b) ที่ใช้ BA 22.2 ไมโครโมลาร์ ชักนำให้เกิด PLBs จากชิ้นส่วนโคนใบของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* (*Doriella* Tiny) แต่แตกต่างจากงานทดลองของ Park และคณะ (2002) ที่ใช้ BA 88.8 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 5.4 ไมโครโมลาร์ ในอาหารครึ่งสูตรของ MS สามารถชักนำให้เกิด PLBs ต่อชิ้นใบได้สูงที่สุด (12 PLBs ต่อชิ้น) จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* 'Taisuco

Hatarot' ทั้งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างของสายพันธุ์ จึงทำให้ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตและความเข้มข้นที่เหมาะสมต่างกัน

4. การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมในการเจริญของ PLBs เป็นต้นที่สมบูรณ์

จากการนำ PLBs ที่ได้จากการทดลองที่ 3 มาเพาะเลี้ยงเพื่อให้เจริญเป็นต้นบนอาหารสังเคราะห์ 3 สูตร ได้แก่ สูตร VW, MS และปุ๋ย Hyponex (6.5-6-19) 1 กรัมต่อลิตร ร่วมกับปุ๋ยเคมี Saturnfert (20-20-20) 1 กรัมต่อลิตร ทุกสูตรเพิ่ม peptone 2 กรัมต่อลิตร น้ำต้มมันฝรั่งที่ได้จากมันฝรั่ง 30 กรัมต่อลิตร และผงถ่านกัมมันต์ 0.5 กรัมต่อลิตร พบว่า PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงของ VW จะขยายขนาดและเพิ่มจำนวนได้สูงที่สุดคล้ายกับการทดลองเพาะเลี้ยง PLBs ของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิสทุกผสมในอาหารเหลวสูตร VW เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณ PLBs (Tanaka และ Sakanishi 1978a) แต่ PLBs ที่เกิดนี้จะกลายเป็นสีน้ำตาล ไม่พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ และเมื่อพิจารณาปริมาณธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองของอาหารสูตร VW (Vacin และ Went 1949) พบว่ามี $MnSO_4$ เพียงชนิดเดียว จึงอาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ PLBs ไม่สามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ขณะที่ PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงของปุ๋ย Hyponex ร่วมกับปุ๋ยเคมี Saturnfert มีการเพิ่มจำนวนของ PLBs เพียงเล็กน้อย แต่สามารถชักนำให้ PLBs เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์เกิดยอดและรากได้ โดยมีจำนวนต้นเฉลี่ยต่อกลุ่ม PLBs สูงที่สุด เท่ากับ 7.9 ต้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Park และคณะ (2002) พบว่าการใช้อาหารสูตร Hyponex (6.5-4.5-19 1 กรัมต่อลิตร + 20-20-20 1 กรัมต่อลิตร) เพิ่ม peptone 2 กรัมต่อลิตร น้ำต้มมันฝรั่ง 3 เปอร์เซ็นต์ ผงถ่านกัมมันต์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ PLBs ของ *Phalaenopsis* 4 สายพันธุ์ พัฒนาเป็นต้นได้ภายใน 6 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่า การใช้ปุ๋ย Hyponex เป็นส่วนประกอบในสูตรอาหารน่าจะเหมาะสมสำหรับการชักนำให้ PLBs ของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

5. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดดอกในหลอดทดลองจากต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

การชักนำให้เกิดตาของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* Silky Moon ในหลอดทดลอง โดยนำต้นอายุประมาณ 2 เดือน ที่ได้จากการเพาะเมล็ด เลี้ยงบนอาหารสูตร Vacin and Went (VW) ที่เติมน้ำมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร peptone 2 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 4 ระดับ ในช่วง 20-50 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน จากนั้นย้ายต้นที่ปราศจากรากลงเลี้ยงบนอาหารสูตร VW และอาหารดัดแปลงสูตร VW ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนลดลงจาก 9 มิลลิโมลาร์ เป็น 4.5 มิลลิโมลาร์ เติม BA ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ในช่วง 22.2-66.6 ไมโครโมลาร์

ในส่วนแรกทำการเลี้ยงต้นกล้วยไม้ในอาหารสังเคราะห์สูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส ในช่วง 20-50 กรัมต่อลิตร เพื่อให้ต้นกล้วยไม้ได้สะสมอาหารให้เพียงพอสำหรับการสร้างดอก เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่าสูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร ต้นกล้วยไม้เจริญได้ดีที่สุด แต่เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสเป็น 50 กรัมต่อลิตร ต้นกล้วยไม้กลับเจริญได้น้อยมาก อาจเป็นผลจากน้ำตาลซูโครสในสูตรอาหารมีความเข้มข้นสูงเกินไป ทำให้ต้นเกิดการขาดน้ำ จึงเจริญเติบโตได้น้อยมาก

จากการทดลองในส่วนที่สองเป็นการศึกษาผลของการสะสมน้ำตาลในโตรเจนและ BA ต่อการชักนำให้เกิดดอกในหลอดทดลอง พบว่าสามารถชักนำให้เกิดช่อดอกจากต้นกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร ก่อนย้ายลงอาหารสูตร VW ที่เติม BA ความเข้มข้นสูง 66.6 ไมโครโมลาร์ เท่านั้น ขณะที่อาหารดัดแปลงสูตร VW ที่ปรับลดปริมาณไนโตรเจน สามารถชักนำให้เกิดช่อดอกได้ในทุกความเข้มข้นของ BA แต่มีแนวโน้มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น และจะเกิดช่อดอกสูงที่สุดจากต้นที่เพาะเลี้ยงก่อนในอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร แต่หลังจากเกิดช่อดอกแล้ว ช่อดอกจะค่อยๆ เหี่ยวลงไม่สามารถพัฒนาจนกระทั่งดอกบานได้ ชูติมา (2540) แนะนำว่าเมื่อสังเกตเห็นช่อดอกเริ่มเกิดขึ้นควรรีบย้ายลงเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี BA ช่อดอกอาจมีการพัฒนาและบานต่อไปได้ ดังนั้นการเกิดช่อดอกน่าจะเป็นผลเนื่องจาก BA มากกว่าปัจจัยอื่น โดยจะให้ผลดีขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับการลดปริมาณไนโตรเจนในอาหารและการสะสมน้ำตาลของต้นกล้วยไม้ ผลการทดลองนี้พบว่าสอดคล้องกับหลายการทดลองที่ใช้ BA และการปรับปริมาณไนโตรเจนเพื่อชักนำให้กล้วยไม้ดอก Duan และ Yazawa (1995b) ศึกษาการชักนำให้เกิดในหลอดทดลองของกล้วยไม้ *x Doriella* Tiny (*Doritis pulcherrima* *x Kingiella philippinensis*) พบว่าสามารถชักนำให้ออกดอกได้ในอาหารสูตร VW ที่มี BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และในปีเดียวกันนี้ Duan และ Yazawa ยังได้ศึกษาถึงการเกิดดอกในหลอดทดลองของ *Phalaenopsis* Pink Leopard 'Petra' พบว่ายอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตาบนก้านช่อดอก

สามารถชักนำให้เกิดดอกได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร VW ที่ปรับลดปริมาณไนโตรเจนจาก 9 ไมโครโมลาร์ เป็น 4.5 ไมโครโมลาร์ และเติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร Ziv และ Naor (2006) อธิบายว่าการชักนำให้เกิดดอกในหลอดทดลองขึ้นกับ 2 ปัจจัยหลักคือคาร์โบไฮเดรตและแร่ธาตุในอาหาร ถ้ามีปริมาณไนโตรเจนในอาหารสูงจะยับยั้งการเกิดดอก แต่จะชักนำให้เกิดการเจริญทางลำต้นและใบ ฉะนั้นการลดปริมาณไนโตรเจนในอาหารลงจึงเป็นการชักนำให้เกิดดอก นอกจากปัจจัยทั้งหมดที่ได้ทำการศึกษาขึ้น ยังมีอีกหลายปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดดอก Chen และคณะ (1994) พบว่าการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ *Phalaenopsis* ที่อุณหภูมิสูงส่งผลให้มีอัตราการหายใจของต้นกล้วยไม้เพิ่มขึ้น การรับ CO₂ ต่ำลง และปริมาณคาร์โบไฮเดรตลดลง ทำให้การเจริญเติบโตถูกยับยั้งและเกิดดอกช้าลง

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์