

ผลของสูตรอาหารน้ำตาลซูโครส และไคโตซานต่อการเพิ่มปริมาณต้นอ่อน มัจฉาในหลอดทดลอง

Effects of culture media, sucrose and chitosan concentrations on *Dendrobium palpebrae* Lindl. micropropagation

สุนทรียา กาละวงศ์¹, ภาณุวัฒน์ ยิ้มย่อง¹, สุพัตร์ ฤทธิรัตน์², สกุรัตน์ สุวรรณโณ³ และ อภิรดี เสียงสืงชาติ^{4*}

Soontreeya Kalawong¹, Panuwat Yimyong¹, Suphat Rittirat², Sakulrat Suwanno³ and Apiradee Siangsuepchart^{4*}

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ เพื่อให้ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพขยายพันธุ์ต้นกล้วยไม้เอื้องมัจฉาในหลอดทดลอง และมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น คือศึกษาชนิดของสูตรอาหาร ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล และผลของสารไคโตซาน โดยการนำโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ว่างเลี้ยงบนอาหาร 3 สูตร คือ อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ลดความเข้มข้นลงครึ่งหนึ่ง (1/2 MS) อาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949) และอาหารสูตร ND (New Dogashima medium; Tokuhara and Mii, 1993) เติมน้ำตาลซูโครส 0.2 % นำมะพร้าว 150 มล./ล. และวุ้น 7.5 ก./ล. หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 50 วัน พบว่า สูตรอาหาร VW ให้จำนวนโปรโตคอร์มเฉลี่ย ความสูงต้นเฉลี่ย และจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด คือ 2.11±0.30 มม. 1.51±0.15 ซม. และ 3.52±0.37 ใบต่อต้น ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลให้จำนวนโปรโตคอร์มและการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เพิ่มขึ้น คือ อาหารที่เติมน้ำตาล 7 % ให้จำนวนโปรโตคอร์ม (3.92±0.38 โปรโตคอร์ม) ความสูงต้น (2.85±0.26 มม.) จำนวนใบ (4.91±0.10 ใบ) และจำนวนราก (3.55±0.24 ราก) สูงที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.01$) สำหรับการใส่สารไคโตซาน พบว่าอาหารที่เติมไคโตซาน เข้มข้น 10 มก./ล. ให้ความยาวรากและอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าชุดควบคุม คืออาหารที่ไม่เติมไคโตซาน

คำสำคัญ: กล้วยไม้เอื้องมัจฉา สูตรอาหาร น้ำตาล ไคโตซาน

Abstract: The purpose of this research was to establish method for the effective propagation and plant survival of *Dendrobium palpebrae* Lindl. The evaluated paramters included culture medium,

Received August 1, 2019

Accepted October 9, 2019

¹สาขาวิชาเกษตรและเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา จังหวัดกรุงเทพฯ 10600

¹Department of Agriculture and Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok 10600, Thailand

²สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช จังหวัดนครศรีธรรมราช 80280

²Program in Biology, Faculty of Science and Technology, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Nakhon Si Thammarat 80280, Thailand

³สาขาการปรับปรุงพันธุ์พืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

³Program in Plant Breeding, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

⁴สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ จังหวัดแพร่ 54140

⁴Department of Agro-Industrial Biotechnology, Maejo University Phrae Campus, Phrae 54140, Thailand

* Corresponding author: siangsuepchart.apiradee@gmail.com

sucrose concentrations and chitosan. Protocorms were cultured on half strength MS (Murashige and Skoog, 1962) medium ($\frac{1}{2}$ MS), VW (Vacin and Went, 1949) medium and ND (New Dogashima medium; Tokuhara and Mii, 1993) medium with 0.2 % sucrose and 150 ml coconut water and 7.5 g/L agar. After 50 days of culture, VW medium present the highest protocorm number (2.11 ± 0.30 protocorms), plant height (1.51 ± 0.15 mm.) and leaf number (3.52 ± 0.37 leaves). In addition, sucrose concentrations were improved on protocorm number and plant growth of orchid. These results shown that VW medium with 7 % sucrose gave the highest protocorm number at 3.92 ± 0.38 protocorms, plant height at 2.85 ± 0.26 mm., leaf number at 4.91 ± 0.10 leaves and root number at 3.55 ± 0.24 leaves, significantly difference at the confidence level ($P > 0.01$). For chitosan treatments, medium with low concentrations at 10 percent of chitosan gave the better result in root length and survival rate than medium without chitosan.

Keywords: *Dendrobium palpebrae* Lindl., culture media, sucrose, chitosan

บทนำ

เอื้องมัจฉา (*Dendrobium palpebrae* Lindl.) เป็นกล้วยไม้ป่าที่มีช่อดอกสีส้มสวยงาม กลิ่นหอม (นฤมล, 2557) พบได้ทุกภาคของประเทศไทยส่วนใหญ่พบในป่าดิบแล้งและป่าเบญจพรรณ ลักษณะลำต้นเป็นลำเหลี่ยม แผ่นใบค่อนข้างหนา ช่อดอกเป็นพวงห้อย เกิดตามข้อ กลีบดอกสีขาว กลีบปากสีเหลืองขอบขาว (Figure 1a) (อบจันทร์, 2552) ปัจจุบันได้มีรายงานการศึกษาพฤกษทางเคมีจากการสกัดสารในกล้วยไม้สกุลหวายหลายชนิด พบว่ามีสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต คูมาริน อัลคาลอยด์ ไฟโทสเตอรอยด์ ฟลาโวนอยด์ สารในกลุ่มสเตอรอยด์ ไตรเทอร์พีนอยด์ แทนนิน ฟีนอล ฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก สารแอนโทไซยานิน (Prajapati and Patel, 2013; Johnson and Janakiraman, 2013; Shafazila *et al.*, 2010) และสาร phenolic glycoside dendroside ที่สามารถต้านเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด (Zhou *et al.*, 2017) สำหรับในเอื้องมัจฉา พบว่ามีสารที่ชื่อว่า Dendroflorin ที่สามารถไปลด ROS และปรับปรุงกิจกรรมของเอนไซม์ SOD GPx และ CAT โดยสารเหล่านี้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Figure 1b) (Napat *et al.*, 2018) การนำกล้วยไม้เหล่านี้มาใช้ประโยชน์คือการทำลายต้น ซึ่งพบว่าในธรรมชาติกล้วยไม้ชนิดนี้มีอัตราการติดดอกและการงอกของเมล็ดต่ำเนื่องจากเมล็ดของกล้วยไม้ไม่มีอาหารสะสมภายในเมล็ด การงอกของเมล็ดสามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติแต่จำเป็นต้องอาศัยเชื้อราบางชนิดนำธาตุอาหารภายนอกเข้าไปในเซลล์ราก (ศิริลักษณ์, 2554)

ปัจจุบันการทำลายป่าไม่มีแนวโน้มสูงขึ้นทำให้แหล่งที่อยู่ของกล้วยไม้ลดลง (Tapash and Rahman, 2017) อีกทั้งการพัฒนากล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่มักใช้วิธีผสมเกสรและเพาะเมล็ด จึงจำเป็นต้องอาศัยการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อซึ่งสามารถช่วยในการกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการงอก การเจริญเติบโต หรือการพัฒนาต่าง ๆ ด้วยกรเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช (ไซนีเยะ และคณะ, 2558) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้เป็นจำนวนมาก ในระยะเวลาอันสั้น สำหรับการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตสามารถทำได้โดยการเพิ่มน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งพลังงานให้กับพืช นิยมใช้น้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 1-5 % (ศุภาวีร์ และ จักรพงษ์, 2558) ปัจจุบันทางด้านการเกษตรมีการนำไคโตซานมาใช้เป็นอาหารเสริมให้แก่พืชเพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ป้องกันโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืชอีกหลายชนิด (พรทิพย์ และ ศุภลักษณ์, 2548; อนุรักษ์, 2561) ไคโตซานเป็นสารโพลีเมอร์ธรรมชาติที่มีองค์ประกอบสำคัญในรูปของ D-glucosamine ซึ่งองค์ประกอบในเปลือกนอกของพวกสัตว์ และผนังเซลล์ของเชื้อราบางชนิด เป็นวัสดุชีวภาพที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ มีความปลอดภัยในการนำมาใช้กับมนุษย์ไม่ก่อให้เกิดการแพ้ และปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ไม่ไวไฟ และไม่เป็นพิษต่อพืช (ภาวดี, 2544) การนำไคโตซานมาใช้ในเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทำได้โดยการเติมไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการกระตุ้นให้ต้นกล้วยไม้มีการเกิดราก แตกใบใหม่ และการเจริญเติบโตด้าน

ลำต้น (สมพร, 2555; วุฒิชัย และคณะ, 2559) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ต้องคำนึงถึงสูตรอาหารให้เหมาะสมกับชนิดของกล้วยไม้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาปัจจัยต่างๆ เช่น สูตรอาหาร ผลของน้ำตาลซูโครส และผลของไคโตซาน ต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องมัจฉาในหลอดทดลองสำหรับใช้ประโยชน์ในรูปแบบของเซลล์และต้นที่มีสารสำคัญต่อไป

วิธีการศึกษา

เพื่อศึกษาผลของสูตรอาหาร และน้ำตาลต่อเพิ่มปริมาณของกล้วยไม้เอื้องมัจฉาในหลอดทดลอง และเพื่อผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องมัจฉาในหลอดทดลองและอัตราการรอดชีวิตหลังจากการปลูกในสภาพโรงเรือน

1. การเตรียมเนื้อเยื่อพืช

นำผักกล้วยไม้เอื้องมัจฉา อายุ 10 เดือน (Figure 1c) มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มล./ล. น้ำตาลซูโครส 0.2 % ผงวุ้น 7.5 ก./ล. ปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 5.0 เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 12.5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชม./วัน อุณหภูมิ 26 ± 2 °C เป็นระยะเวลา 8

สัปดาห์ (Figure 1d) จากนั้นนำโปรโตคอร์มที่มีขนาด 1-2 x 3-4 มม. และมีใบ 2 ใบ มาใช้ในการทดลองต่อไป (Figure 1e)

2. การศึกษาสูตรอาหารต่อการพัฒนาโปรโตคอร์มเอื้องมัจฉา

นำโปรโตคอร์มของเอื้องมัจฉา มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร 3 สูตร คือ อาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949) อาหารสูตร ND (New Dogashima) (Tokuhara and Mii, 1993) และอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS (Murashige and Skoog, 1962) โดยอาหารทุกสูตรเติมน้ำมะพร้าว 150 มล./ล. น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 0.2 % เติมผงวุ้นเข้มข้น 7.5 ก./ล. ปรับค่าความเป็นกรดเป็นต่างเป็น 5.0 วางเลี้ยงที่ความเข้มแสง 12.5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชม./วัน อุณหภูมิ 26 ± 2 °C เป็นระยะเวลา 50 วัน บันทึกจำนวนโปรโตคอร์ม จำนวนใบ ความยาวใบ จำนวนราก ความยาวราก และความสูงต้น วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test) ทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด ขวดละ 4 โปรโตคอร์ม

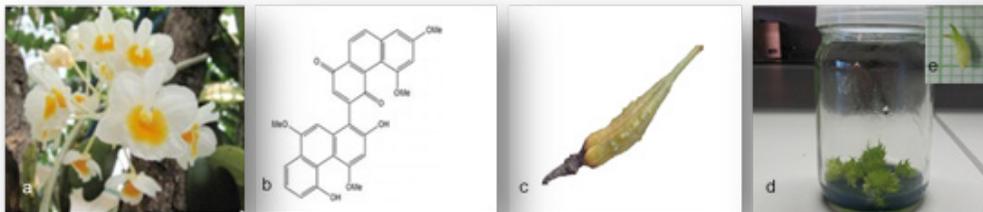


Figure 1 Characteristics of inflorescence (a), Dendroflorin (b), pod (c) and protocorm (d, e) of *D. palpebrae*.

Source: Tapash and Rahman (2010)

3. การศึกษาน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญเติบโตโปรโตคอร์รัมเอื้องมัจฉา

นำโปรโตคอร์รัมของเอื้องมัจฉา มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 เติมน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 8 ระดับ คือ 0 1 2 3 4 5 6 และ 7 % ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น 5.0 วางเลี้ยงที่ความเข้มแสง 12.5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชม./วัน อุณหภูมิ 26 ± 2 °C เป็นระยะเวลา 50 วัน บันทึกจำนวนโปรโตคอร์รัมจำนวนใบ ความยาวใบ จำนวนราก ความยาวราก และความสูงต้น วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด ขวดละ 4 โปรโตคอร์รัม

4. การศึกษาโคโตซานต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตของกล้วยไม้เอื้องมัจฉา

นำต้นเอื้องมัจฉามาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 และ 2 เติมน้ำโคโตซานที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 0 10 20 40 และ 60 มก./ล. ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น 5.0 วางเลี้ยงที่ความเข้มแสง 12.5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชม./วัน อุณหภูมิ 26 ± 2 °C เป็นระยะเวลา 50 วัน บันทึกจำนวนโปรโตคอร์รัม ความสูงต้น จำนวนใบ ความยาวใบ จำนวนราก ความยาวราก และความสูงต้น วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด ขวดละ 4 ต้น

5. การปรับสภาพพืชปลูก

นำกล้วยไม้เอื้องมัจฉามาปรับสภาพปลูก โดยการนำไปไว้ในโรงเรือนก่อนย้ายปลูก 2-3 วัน คลายผ้าขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก่อน 2-3 วัน แล้วล้างวันออกจากรากพืชให้สะอาด นำพืชมาแช่น้ำยาป้องกันเชื้อราก่อนปลูกในภาชนะที่บรรจุวัสดุปลูก คือ ถ่าน จากนั้นนำมาวางเลี้ยงในโรงเรือนที่มีการพรางแสง 50 % อุณหภูมิ 28 ± 2 °C ความชื้น 50 % เพื่อลดความเข้มแสงและอุณหภูมิโรงเรือน หลังย้ายปลูกเป็นเวลา 30 วัน บันทึกอัตราการรอดชีวิต ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. ผลของสูตรอาหารต่ออัตราการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์รัมเอื้องมัจฉา

ผลของสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร คือ VW ND และ $\frac{1}{2}$ MS ซึ่งมีองค์ประกอบและความเข้มข้นของธาตุอาหารที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์รัม พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน อาหารสูตร VW ให้จำนวน โปรโตคอร์รัมเฉลี่ยสูงสุด คือ 2.11 ± 0.30 โปรโตคอร์รัม รองลงมา คือ อาหารสูตร ND ให้ค่าเฉลี่ย 1.76 ± 0.20 โปรโตคอร์รัม และอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ให้ค่าเฉลี่ย 1.48 ± 0.17 โปรโตคอร์รัม ตามลำดับ (Table 1) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งนี้อาหารสูตร VW ให้ค่าเฉลี่ยความสูงต้น และจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด คือ 1.51 ± 0.18 มม. และ 3.52 ± 0.37 ใบต่อต้น ตามลำดับ รองลงมาเป็นอาหารสูตร ND และอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS อาหารสูตร VW ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอื้องมัจฉาได้ดีกว่าอาหารสูตรอื่นๆ คือเกิดการสร้างกลุ่มก้อนโปรโตคอร์รัมเป็นจำนวนมากจนสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนที่มีความแข็งแรงและเกิดการสร้างยอดได้ ส่วนลักษณะพีโนไทป์ของเอื้องมัจฉาในการทดลอง พบว่า ต้นมีใบเรียวยาวขอบใบขนาน ปลายใบแหลมและเกิดรากบริเวณฐานของลำต้น (Figure 2a, b) เนื่องจากสูตรอาหาร VW มีธาตุอาหารหลักที่ประกอบด้วย KNO_3 และ KH_2PO_4 ที่มีปริมาณมากกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ นอกจากนี้ อาหารสูตรนี้ยังมี Ca_2PO_4 ซึ่งธาตุอาหารนี้เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ จัดอยู่ในรูปของแคลเซียมแพคเตดมีหน้าที่ช่วยในการแบ่งเซลล์ สร้างโปรตีนและช่วยในการทำงานของเอนไซม์ตัวอื่น ๆ ด้วย จึงทำให้พืชมีความแข็งแรงและส่งเสริมการเจริญเติบโต โดยอาหารสูตร VW มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์รัมในกล้วยไม้หลายชนิด เช่น เอื้องเงินหลวง (นุชรรัฐ และอัญชลี, 2553; ศิริลักษณ์, 2554) ไม้เอื้องไอยเรศ (วันพิรชาน และคณะ, 2557) กุหลาบกระเป๋าบิด (สุภาวดี และคณะ, 2558) และกะเหรี่ยงร่อนปากเบ็ด (อาทิตยา และวราภรณ์, 2560) ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกใช้สูตรอาหาร VW ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไม้เอื้องมัจฉาในการศึกษาต่อไป

Table 1 Effect of culture media on *D. palpebrae* protocorm Lindl. development after 50 days of culture.

Culture medium	No. protocorm	Plant height (mm)	No. leaf	Leaf length (mm)	No. root	Root length (mm)
½MS	1.48±0.17 ^b	1.27±0.10	3.48±0.15	5.76±0.52 ^a	1.26±0.23	1.86±0.26
VW	2.11±0.30 ^a	1.51±0.15	3.52±0.37	3.87±0.78 ^b	1.11±0.20	0.63±0.07
ND	1.76±0.20 ^{ab}	1.28±0.10	3.30±0.20	3.86±0.60 ^b	1.11±0.19	1.82±1.17
F-test	*	ns	ns	*	ns	ns
C.V. (%)	6.12	8.88	6.97	26.88	3.44	50.17

^{ns} non significant different at $P > 0.05$ * significant different at $P \leq 0.05$ Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to DMRT

2. ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มเอื้องมัจฉา

การเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มของเอื้องมัจฉา ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน บนอาหารสูตร VW เติมน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า อาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 7% ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนต้นสูงที่สุด คือ 3.92 ± 0.38 โปรโตคอร์ม รองลงมา คือสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 6.5 และ 4% ให้จำนวนโปรโตคอร์มเฉลี่ย 3.68 ± 0.66 3.55 ± 0.51 และ 3.38 ± 0.49 โปรโตคอร์ม ตามลำดับ (Table 2) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับอาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 7% โดยจำนวนโปรโตคอร์มจะเพิ่มขึ้นสองเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารสูตร VW เติมน้ำตาลความเข้มข้น 2% ให้จำนวนโปรโตคอร์ม 2.80 ± 0.53 โปรโตคอร์ม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับอาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 7% เมื่อพิจารณาอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส สามารถเกิดโปรโตคอร์มได้เช่นกัน อาจเนื่องมาจากในอาหารมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งในน้ำตาลมีทั้งกรดอะมิโน สารประกอบไนโตรเจน กรดอินทรีย์ ฮูร์โมนพืช (zeatin และ zeatin riboside) และน้ำตาล ซึ่งสารเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งเซลล์และส่งเสริมการขยายของเซลล์ทำให้พืชมีการเจริญและพัฒนาได้ (Letham,

1973; ไชนิยะ และคณะ, 2559) ในการศึกษาครั้งนี้ ยังพบว่า เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำตาลให้สูงขึ้น ส่งผลให้การเจริญเติบโตของกล้วยไม้สูงขึ้นด้วย คือ สูตรอาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 7% ให้ค่าเฉลี่ยความสูงต้น จำนวนใบ จำนวนราก และความยาวรากสูงสุด ส่วนลักษณะทางฟิโนไทป์ของต้นกล้วยไม้เอื้องมัจฉา พบว่า ต้นมีสีเขียวอ่อนอวบ ใบเรียวยาว ปลายใบแหลม มีรากที่ยาวเป็นสีขาว และมีจำนวนรากที่เพิ่มมากขึ้น (Figure 2c) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในการทดลองมีการสังเคราะห์แสงที่ต่ำ เพราะได้รับแสงในปริมาณน้อย และมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณที่จำกัด ดังนั้นการเพิ่มแหล่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่มาจากน้ำตาลซูโครส จึงทำให้ต้นพืชมีการเจริญเติบโตได้ดี แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ คือ น้ำตาล โดยน้ำตาล sucrose จะเปลี่ยนรูปไปเป็น glucose และ fructose เมื่อได้รับความร้อนจากการนึ่งฆ่าเชื้อ อัตราการเจริญเติบโตของต้นพืชจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นแต่เมื่อเลยจุดที่เหมาะสมไปการเจริญเติบโตของต้นพืชจะลดลง (Suphat et al., 2012) ถึงแม้ว่าอัตราการเจริญเติบโตของต้นพืชจะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อน้ำตาลเกินจุดสูงสุดที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นพืชจะส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของต้นพืชลดลง เนื่องจากการเพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำตาลจะ

ทำให้ความออกสโมติกในอาหารเพิ่มขึ้นด้วย ทำให้เซลล์พืชมีการสูญเสียน้ำเกิดการเหี่ยวแห้งของต้นพืช (Krasimira and Georgina, 2014; Yoon et al., 2016) ซึ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ นั้น กล้วยไม้แต่ละชนิดต้องการระดับความเข้มข้นของน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน ดังนั้นอาจทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนการเติมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่สูงขึ้นต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ต่อไป

3. ผลของโคโตซานต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของเอื้องมัจฉา

จากการศึกษาของผลของโคโตซานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ต้นกล้วยไม้เอื้องมัจฉาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติบโตโคโตซานความเข้มข้น 10 มก./ล. ให้ความยาวราก และอัตราการรอดชีวิต หลังจากการออกปลูกในสภาพโรงเรือนด้วยการใช้วัสดุปลูกเป็นถ่านไม้ (Figure 2d) เฉลี่ยสูงที่สุด คือ 2.56 ± 0.11 มม. และ $76.67 \pm 2.89\%$ ตามลำดับสอดคล้องกับการศึกษา วุฒิชัย และคณะ (2559) ได้เพาะเลี้ยงเอื้องรวง (*Panisea uniflora* Lindl.) บนอาหารเติมโคโตซาน พบว่าต้นที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนโคโตซานทุกความเข้มข้นเมื่อออกปลูกในสภาพโรงเรือนให้อัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด 100% เนื่องจากโคโตซานมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้น (elicitor) ให้แก่ต้นพืช โดยจะไปกระตุ้นยีนในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ARnase β -glucanase และ phytoalexins ส่งผลต่อการกระตุ้นระบบป้องกันหรือช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันต่อการเกิดโรคในพืชได้และทำให้ต้นพืชแข็งแรง รวมไปถึงโคโตซานยังช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากหมู่อะมิโนที่เป็นประจุเป็นบวกสามารถที่จะไปจับประจุลบของผนังของแบคทีเรียที่มีผลให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (Boonkerd et al., 1996) แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่าอัตราการรอดชีวิตของต้นที่ออกปลูกกลับลดลงเมื่อความเข้มข้นของโคโตซานเพิ่มขึ้น ซึ่ง Pompienpak-

dee et al. (2006) พบว่าการเลี้ยงโปรโตคอร์มของกล้วยไม้หวาย ‘เอื้องสกุล’ ในอาหารเติมโคโตซานที่ความเข้มข้นที่สูง คือ 80 ppm มีผลการยับยั้งการเติบโตของโปรโตคอร์ม และที่ระดับความเข้มข้น 160 ppm ทำให้เนื้อเยื่อชืดขาวและเซลล์ตาย จึงจำเป็นต้องใช้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในแต่ละพืช นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าในการเพาะเลี้ยงต้นเอื้องมัจฉาบนอาหารเติมโคโตซานในหลอดทดลองที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ส่งผลของค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ทั้งจำนวนโปรโตคอร์ม ความสูง จำนวนใบต่อต้น ความยาวใบ และจำนวนราก อาจเป็นเพราะในการศึกษาได้ใช้ชิ้นส่วนที่เป็นต้นที่มีขนาดเล็กการตอบสนองและความต้องการของธาตุอาหารมีปริมาณไม่มากทำให้การเติมโคโตซานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จึงให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าจะมีรายงานว่าโครงสร้างของโคโตซานมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สามารถปลดปล่อยออกมาเพื่อให้พืชใช้ในการเจริญเติบโตได้ ทั้งนี้ความเข้มข้นของโคโตซานต้องเหมาะสม หากมากหรือน้อยไปส่งผลให้เกิดปริมาณไนโตรเจนที่ไม่พอดีกับพืชที่จะนำไปใช้ได้และมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช (สมพร และหาพิส, 2557) ดังนั้นจากการศึกษาการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารและระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมก็สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นกล้วยไม้ได้ สำหรับโคโตซานสามารถนำมาใช้เติมในอาหารช่วงก่อนการออกปลูกจากในหลอดทดลอง เพื่อให้อัตราการรอดชีวิตในการออกปลูกในโรงเรือนสูงขึ้น (ภาวดี, 2544; สมพร, 2555) หลังจากการออกปลูกแล้วพบว่าลักษณะทางฟีโนไทป์ของต้นเอื้องมัจฉา มีลำต้นอวบหนา ลำต้นไม่สูงมาก ใบหนาสีเขียว มีจำนวนรากน้อย รากเป็นสีเขียวออกขาวเห็นได้ชัด เป็นต้น (Figure 2e) และต้นอ่อนสามารถเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่องในวัสดุปลูกที่เป็นถ่านไม้ได้ดี



Figure 2 Development of *D. palpebrae* Lindl. protocorm on VW medium and plantlet survival. a: VW medium with 150 ml/L coconut water and 2 % sucrose (Bar=0.57 mm); b: Plantlet after culturing for 50 days; c: VW medium with 7% sucrose; d: *In vitro* plantlet cultured in charcoal; e: Plantlet survival after acclimatization in greenhouse for 30 days.

Table 2 Effect of sucrose concentrations on *D. palpebrae* Lindl. protocorm growth after 50 days of culture

Sucrose (%)	No. protocorm	Plant height (mm)	No. leaf	Leaf length (mm)	No. root	Root length (mm)
0	2.29±0.62 ^d	2.16±0.12 ^c	2.77±0.87 ^c	3.01±0.55	1.91±0.12 ^d	2.51±0.98
1	2.42±0.37 ^{cd}	2.23±0.02 ^c	3.33±0.82 ^{bc}	3.64±0.45	2.12±0.12 ^{cd}	2.57±0.45
2	2.80±0.53 ^{bcd}	2.48±0.04 ^b	3.33±0.73 ^{bc}	3.73±0.54	2.53±0.39 ^{bc}	2.75±0.44
3	2.87±0.66 ^{bcd}	2.51±0.05 ^b	3.92±0.20 ^{abc}	3.73±0.31	2.76±0.16 ^b	2.95±0.26
4	3.38±0.49 ^{abc}	2.51±0.02 ^b	3.99±0.76 ^{abc}	3.73±0.27	2.64±0.34 ^b	2.87±0.44
5	3.55±0.51 ^{ab}	2.67±0.05 ^b	4.44±0.64 ^{ab}	4.03±0.31	3.32±0.26 ^a	2.98±0.58
6	3.68±0.66 ^{ab}	2.64±0.11 ^b	4.80±0.11 ^a	3.92±0.24	3.40±0.32 ^a	3.09±0.33
7	3.92±0.38 ^a	2.85±0.26 ^a	4.91±0.10 ^a	3.95±0.38	3.55±0.24 ^a	3.40±0.28
F-test	*	**	**	ns	**	ns
C.V.(%)	17.14	3.18	13.45	10.21	8.63	15.57

^{ns} non significant different at $P > 0.05$ * significant different at $P \leq 0.05$ Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to DMRT

Table 3 Effect of chitosan concentrations on growth and survival rate of *D. palpebrae* Lindl.

Chitosan (mg/L)	No. protocorm ^A	Plant height ^A (mm)	No. leaf ^A	Leaf length ^A (mm)	No. root ^A	Root length ^A (mm)	Survival rate ^B (%)
0	2.31±0.27	2.95±0.27	3.21±0.27	3.51±0.37	2.17±0.27	2.55±0.27 ^a	45.00±8.66 ^{bc}
10	2.33±0.06	2.85±0.14	3.57±1.02	3.47±0.43	2.40±0.14	2.56±0.11 ^a	76.67±2.89 ^a
20	2.19±0.26	2.68±0.18	2.63±0.57	3.08±0.48	2.25±0.05	2.40±0.11 ^{ab}	55.00±5.00 ^b
40	2.27±0.06	2.76±0.10	3.27±0.25	3.31±0.39	2.21±0.15	2.30±0.17 ^{ab}	55.00±10.00 ^b
60	2.12±0.24	2.57±0.28	2.63±0.27	3.05±0.10	2.20±0.14	2.28±0.04 ^b	33.33±5.77 ^c
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	*	**
C.V.(%)	6.52	5.80	15.68	10.06	6.66	6.52	15.81

^{ns} non significant different at $P > 0.05$ * significant different at $P \leq 0.05$ Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to DMRT (A: 50 days afterculturing; B: 30 days after hardening)

สรุป

จากการศึกษา พบว่า อาหารสูตร VW ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 7 % ส่งเสริมการพัฒนและการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องมัจฉาได้ดีที่สุด คือ ให้โปรโตคอร์มเฉลี่ย 3.92±0.38 โปรโตคอร์ม ความสูงต้นเฉลี่ย 2.85±0.26 มม. จำนวนใบเฉลี่ย 4.91±0.10 ใบต่อต้น จำนวนรากเฉลี่ย 3.55±0.24 รากต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ย 3.40±0.28 มม. หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน นอกจากนี้อัตราการรอดชีวิตหลังการออกปลูกเพิ่มสูงขึ้นจากต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเต็มเต็มโคโตซานความเข้มข้น 10 มก./ล. ซึ่งสามารถนำวิธีการนี้ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้ให้ได้จำนวนมาก ในระยะเวลาอันสั้นและสามารถพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเอื้องมัจฉาในหลอดทดลองเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในรูปแบบของเซลล์และต้นที่มีสารสำคัญนี้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ไชนียะ สะมาลา พลวัต ภัทรกุลพิสุทธิ และสุรรัตน์ เย็นช้อน. 2558. การขยายพันธุ์กล้วยไม้สิงโตพันจักภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ. แก่นเกษตร, 43: 277-284.
- ไชนียะ สะมาลา วินิจัย พลเดช ครรชิต ธรรมศิริ ศศิกานต์ ประสงค์สม และ สุกฤต อิมสมบุญ. 2559. ผลของ BA และนำมะพร้าวต่อการเพิ่มปริมาณยอดของกล้วยไม้กะเรกะร่อนด้ามขาว. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์, 3: 52-56.
- นฤมล ธนนันต์. (2557). การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเครื่องหมาย แสตอาร์ดีพี. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 22, 99-108.

- นุชรรัฐ บาลลา และอัญชลี จาละ. 2553. การเพิ่มจำนวนกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงโดยการตัดแบ่งโปรโตคอร์ม. ในการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2553 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พรทิพย์ วงศ์แก้ว และศุภลักษณ์ สิงหนุต. 2548. การศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและสาเหตุโรคสำคัญทางเศรษฐกิจของพืช. ปทุมธานี: ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- ภาวดี เมธะदानนท์. 2544. ความรู้เกี่ยวกับไคติน-ไคโตซาน. ปทุมธานี: ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 10 หน้า.
- วันพีรฮาน บินยามะ รอยฮัน หะมะ และสุภาวดี งามสูตร. 2557. ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องโอยเรศ. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์, 1: 20-24.
- วุฒิชัย ฤทธิ บุญสนอง ช่วยแก้ว ปรียาภรณ์ พรหมบางญวน และศุภลักษณ์ ทักษิน. 2559. ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นอ่อนเอื้องรองรอง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์, 3: 8-13.
- ศุภาวีร์ แสงจันทร์จรเดช และจักรพงศ์ แห่งทอง. 2558. การเพาะเมล็ดเอื้องดอกมะขามในสภาพปลอดเชื้อ. อุบลราชธานี: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี.
- ศิริลักษณ์ เจริญดี. 2554. การอนุรักษและการขยายพันธุ์กล้วยไม้เอื้องเงินหลวงโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมพร ประเสริฐสงกุล. 2555. การใช้ไคโตซานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. วารสารราชภัฏยะลา, 7: 125-134.
- สมพร ประเสริฐสงกุล และหาพิส ปุโรง. 2557. ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงในหลอดทดลอง. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย, 42: 127-134.
- สุภาวดี งามสูตร ปรีดา บุญเวศน์ และวริยา นวลนุช. 2558. ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเป๋ापัดในหลอดทดลอง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์, 2: 11-14.
- อบฉันทน์ ไทยทอง. 2552. กล้วยไม้เมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 16. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน. 214 หน้า.
- อนุรักษ สันป่าเป้า. 2561. ประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการควบคุมโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน. แก่นเกษตร, 46:1087-1091.
- อาทิตยา ชายคีรี และวราภรณ์ ฉวยฉาย. 2560. ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของกระแจะอ่อนปากเปิดในสภาพปลอดเชื้อและผลของปุ๋ยในการอนุบาลหลังออกปลูก. แก่นเกษตร, 45:1197-1202.
- Boonkerd, N., S. Chandkrachang and W.F. Stevens. 1996. Effect of chitin on nodulation and N₂ fixation rhizobia-soybean symbiosis, chitin and chitosan. Proceedings of the 2 nd Asia Pacific Symposium, Bangkok. pp. 183-187.
- Johnson, M. and N. Janakiraman. 2013. Phytochemical and TLC studies on stem and leaves of the orchid *Dendrobium panduratum* subsp. *villosum* Gopalan and A. N. Henry. Indian Journal of Natural Products and Resources, 4: 250-254.
- Krasimira, T. and K. Georgina. 2014. The effect of sucrose concentration on *in vitro* callogenesis of golden root-endangered medicinal plant. Scientific Bulletin Series F. Biotechnologies, 18: 77-82.

- Latham, D. S. 1973. Cytokinin from *Zea mays*. *Phytochemistry*, 12: 2445-2455.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Napat, K., M. Chawanphat, T. Wuttinont, K. Virunh, L. Kittisak, R. Pornchai and S. Boonchoo. 2018. A new phenanthrene dimer from *Dendrobium palpebrae*. *Asian Natural Products Research*, 25: 1-7.
- Prajapati, Ch.N. and N.M. Patel. 2013. Physico-Chemical and Phytochemical Evaluation of *Dendrobium macraei* Roots. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 4:75–80.
- Pompianpakdee, P., R. Pichyangkura, S. Chadchawan and P. Limpanavech. 2006. Chitosan effects on *Dendrobium* 'Eiskul' protocorm-like body production. In: 31st Congress on Science and Technology of Thailand 18-20 October 2006, Suranaree University of Technology, Thailand. pp 1-3.
- Suphat, R., T. Kanchit, and T. Sompong. 2012. Effect of media and sucrose concentrations with or without activated charcoal on the plantlet growth of *P. comu-cervi* (Breda) Blume & Rchb. f. *Journal of Agricultural Technology*, 8: 2077-2087.
- Shafazila, T. S., M. Pat Lee, T.S. Lee Kong Hung, P.Sh. Lee and L. Hung. 2010. Radical Scavenging Activities of Extract and Solvent Partition Fractions from *Dendrobium* Sonia "Red Bom" Flower. *IEEE International Conference on Science and Social Research*, 978: 762–765.
- Tapash, K.B. and Md.M. Rahman. 2017. *In vitro* seed germination and flowering of *Dendrobium palpebrae* Lindl. orchid. *Journal of Global Biosciences*, 6: 4748-4757.
- Tokuhara, K. and M. Mii. 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Report*, 13: 7–11.
- Vacin, E. and F. Went. 1949. Some pH change in nutrient solution. *Botanic Gardens, Conservation News*, 110: 605–613.
- Van, O.J., M.E. Conklin and A.F. Blakeslee. 1941. Factors in coconut milk essential for growth of development of very young *Datura* embryo. *Science*, 94: 350-351.
- Yoon, S.H., J.K. Lee, S.Y. Nam, E.Y. Hong, K.Y. Paek and S.W. Son. 2016. Effects of altering medium strength and sucrose concentration on *in vitro* germination and seedling growth of *Cypripedium macranthos* Sw. *Journal Plant Biotechnology*, 43: 132–137.
- Zhou, X.M., C.J. Zheng, J.T. Wu and G.Y. Chen. 2017. A new phenolic glycoside from the stem of *Dendrobium nobile*. *Journal Natural Product Research*, 1042-1046.