P-ISSN 0858-4435
E-ISSN 2651-1231
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : *http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj*
ปีที่ 30 ฉบับที่ 5 (กันยายน-ตุลาคม 2565) หน้า [50-62]

อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและคุณภาพแสงต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สำเภาอินทนนท์ในสภาพปลอดเชื้อ

Effect of Plant Growth Regulators and Light Quality on Protocorm Development of *Cymbidium mastersii* Griff. Ex Lindl. under *in vitro* Culture

บวร คุณากรนุรักษ์*, มนัสนันท์ อ้นคง, อนุพันธ์ กงบังเกิด
หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000
Boworn Kunakhonnuruk*, Manussanun Onkong, Anupan Kongbangkerd
Plant Tissue Culture Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000
Received 19 July 2022; Received in revised 20 August 2022; Accepted 9 September 2022

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สำเภาอินทนนท์ (*Cymbidium mastersii* Griff. ex Lindl.) บนอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติมไซโทไคนิน ได้แก่ BA, Kinetin และ TDZ หรือออกซิน ได้แก่ IBA, IAA, NAA และ 2,4-D ความเข้มข้นที่ 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า การเติม TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดตายอด (11.7 ตายอด) และเกิดยอดใหม่ (8.9 ยอด) สูงที่สุด ขณะที่การเติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มเพิ่มจำนวนมากที่สุด (11.1 และ 9.4 โปรโตคอร์มต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้แสงจากหลอด LED warm white สามารถทำให้เกิดโปรโตคอร์มใหม่ และตายอดเพิ่มจำนวนมากที่สุด (9.5 โปรโตคอร์มต่อชิ้นส่วน และ 1.8 ตายอดต่อชิ้นส่วน) อย่างไรก็ตามแสงขาวจากหลอด Fluorescent ส่งเสริมให้ตายอดพัฒนาไปเป็นยอดใหม่เพิ่มขึ้นมากที่สุด (4.2 ยอดต่อชิ้นส่วน)

คำสำคัญ: สำเภาอินทนนท์; โปรโตคอร์ม; สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช; คุณภาพแสง

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** bowornk@nu.ac.th **doi:**

Abstract

Protocorms of *Cymbidium mastersii* Griff. ex Lindl. were cultured on semi solid Murashige and Skoog (MS) medium added with cytokinins including BA, kinetin, TDZ or auxins including IBA, IAA, NAA, and 2,4-D at 0.5, 1.0, and 2.0 mg/L for 12 weeks of culture. The results found that a culture medium supplemented with 1.0 mg/L TDZ could promote new shoot buds and new shoots higher than other cytokinins (11.7 shoot buds and 8.9 shoots). At the same time, the culture medium added with IBA at 0.5 mg/L or IAA 1.0 mg/L gave higher new protocorms than other auxins (11.1 and 9.4 protocorms/explant respectively). Furthermore, protocorm cultured on MS medium supplemented with 1.0 mg/L TDZ under LED warm white could provide the highest protocorm and shoot bud formation (9.5 protocorm/explant and 1.8 shoot buds/explant). Nevertheless, the highest number of shoots was found under LED warm-white (4.2 shoots per explant).

Keywords: *Cymbidium mastersii*; Protocorms; Plant growth regulators; Light quality

1. บทนำ

สำเภาอินทนนท์ (*Cymbidium mastersii* Griff. Ex Lindl.) จัดอยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Orchidaceae) ที่มีความสวยงาม เจริญเติบโตแบบแตกกอ สูงประมาณ 30 ซม. ลำลูกกล้วยมีกาบใบหุ้ม 16-17 ใบ ออกสลับใบรูปขอบขนาน ปลายหยัก 2 แฉกไม่เท่ากัน ช่อดอกแบบกระจะยาว 25-30 ซม. มีจำนวน 5-15 ดอกต่อช่อ ช่อดอกอายุยาวนาน ดอกมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 ซม. กระจายพันธุ์ในเขตพื้นที่ประเทศอินเดีย บังคลาเทศ เมียนมา จีน และเวียดนาม ในไทยพบบริเวณป่าดิบเขาของภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ความสูง 1,400 – 2,100 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล ดอกออกช่วงเดือนกันยายน - ธันวาคม [1] ในปัจจุบันสภาพภูมิอากาศและสภาพแวดล้อมในธรรมชาติที่เป็นแหล่งอาศัยของกล้วยไม้เปลี่ยนแปลงไปส่งผลกระทบต่อประชากรของกล้วยไม้ป่าหลายชนิด มีแนวโน้มลดจำนวนน้อยลงอย่างมาก [2] รวมไปถึงสำเภาอินทนนท์ที่ประชากรลดลงเช่นเดียวกัน โดยทั่วไปการขยายพันธุ์ของกล้วยไม้จากเมล็ดในธรรมชาติมักอาศัยเชื้อรา (mycorrhiza) เพื่อช่วยในกระบวนการงอกของเมล็ด [3] หรือการแตกกอใหม่จากต้นเดิม ซึ่งสร้างต้นให้เพิ่มจำนวนได้ช้า และใช้ระยะเวลานาน ดังนั้นเพื่อการผลิตและขยายพันธุ์พืชให้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และได้สายพันธุ์ที่เหมือนเดิม ให้เพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ รวมไปถึงการอนุรักษ์ การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ขยายพันธุ์พืชเพื่อการอนุรักษ์ประสบความสำเร็จในพืชกลุ่มกล้วยไม้หลายชนิด [4-7] แต่อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยสำคัญอีกหลายประการที่ช่วยส่งเสริมการขยายพันธุ์กล้วยไม้ในหลอดทดลองให้ประสบความสำเร็จ อาทิ สูตรอาหารเพาะเลี้ยง [8-9] สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน และออกซิน [10-11] รวมไปถึงแสงสว่างที่ปัจจุบันมีการศึกษาทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยจำลองแสงเทียมที่ได้จากหลอด Light Emitting Diode (LED) ที่ให้คุณภาพแสงสว่างแตกต่างกัน และสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพืชตอบสนองได้แตกต่างกันออกไป [9,12] ซึ่งปัจจัยต่างๆ ดังกล่าวยังไม่เคยมีการศึกษาเพื่อการเพิ่มศักยภาพการผลิตและขยายพันธุ์กล้วยไม้สำเภาอินทนนท์ในหลอดทดลองมาก่อน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อมุ่งเน้นศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน และออกซิน รวมไปถึงผลของคุณภาพแสงสว่างที่แตกต่างกันต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตคอร์ม

สำเภาอินทนนท์ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคตได้

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมโปรโตคอร์มกล้วยไม้

นำฝักกล้วยไม้สำเภาอินทนนท์ (*C. mastersii*) ฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยการจุ่มแช่ในสารละลาย NaOCl เข้มข้น 10% นานเป็นเวลา 10 นาที และนำเมล็ดเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) เพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสว่าง LED-warm white ความเข้มแสง 20-30 µmol /m^2s นาน 12 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อเมล็ดงอกและพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มขนาดเล็กจึงนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นสำหรับศึกษาทดลองต่อไป (Figure 1a)

2.2 ผลของสารควบคุมการเจริญและการพัฒนาของโปรโตคอร์มสำเภาอินทนนท์

นำโปรโตคอร์มสำเภาอินทนนท์ (Figure 1a) ย้ายเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมไซโทไคนิน ได้แก่ Benzyladenine (BA), Kinetin (Kin) และ Thidiazuron (TDZ) หรือออกซิน ได้แก่ Indole-3-butyric-acid (IBA), Indole acetic acid (IAA), Naphthalene acetic acid (NAA) และ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้นที่ 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH เป็น 5.7 ทำซ้ำ 3 ซ้ำๆ ละ 20 โปรโตคอร์มต่อชนิดและความเข้มข้น ย้ายเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสว่างจากหลอด LED-warm white ความเข้มแสง 20-30 µmol /m^2s นาน 12 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการเจริญและพัฒนาของโปรโตคอร์ม โดยนับจำนวนโปรโตคอร์มใหม่ จำนวนตายอด จำนวนยอดที่ยาวมากกว่า 0.5 ซม. และจำนวนรากที่เกิดขึ้นทั้งหมดต่อชิ้นส่วน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$)

2.3 ผลของคุณภาพแสงสว่างต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตคอร์มสำเภาอินทนนท์

นำโปรโตคอร์มสำเภาอินทนนท์ (Figure 1a) ย้ายเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH เป็น 5.7 ย้ายเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยกำหนดให้ได้รับคุณภาพแสงสว่างแตกต่างกัน ได้แก่ แสงขาวจากหลอด Fluorescent, แสงสีจากหลอด LED ชนิด Warm white, Red, Blue, Green ความเข้มแสง 20-30 µmol /m^2s นาน 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทำซ้ำ 3 ซ้ำๆ ละ 20 โปรโตคอร์มต่อแสงสว่าง บันทึกผลการเจริญและพัฒนาของโปรโตคอร์ม จำนวนโปรโตคอร์มใหม่ จำนวนตายอด จำนวนยอดที่ยาวมากกว่า 0.5 ซม. และรากที่เกิดขึ้นทั้งหมด วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 ผลของไซโทไคนินต่อการเจริญและพัฒนาการของโปรโตคอร์มสำเภาอินทนนท์

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มสำเภาอินทนนท์บนอาหารสูตรที่เติมไซโทไคนินแตกต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า โปรโตคอร์มเกิดการตอบสนอง และพัฒนาแตกต่างกันออกไป (Figure 1 b-d) ซึ่งชนิดและความเข้มของไซโทไคนินที่เหมาะสมจะส่งผลต่อการชักนำให้เนื้อเยื่อเจริญเกิดพัฒนาเพิ่มจำนวนขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วในหลอดทดลอง โดยเฉพาะพืชในกลุ่มกล้วยไม้ [13-15] จากการศึกษาพบว่าโปรโตคอร์มสำเภาอินทนนท์มีอัตราการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มใหม่มากกว่า 70 % ในอาหารทุกสูตร ขณะที่การเติม Kinetin ความเข้มข้น 1.0 - 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้อัตราการเกิด

โปรโตคอร์มใหม่เฉลี่ยสูงที่สุด (100 %) และให้จำนวนโปรโตคอร์มใหม่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงที่สุด (13-14 โปรโตคอร์มต่อชิ้นส่วน) แตกต่างจากไซโทไคนินชนิดและความเข้มข้นอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ (Table 1 และ Figure 2) ขณะที่อาหารสูตรที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นการพัฒนาของโปรโตคอร์มให้สร้างจำนวนตายอด และยอดใหม่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงที่สุด (11.7 ตายอดต่อชิ้นส่วน และ 8.9 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ) (Table 1 และ Figure 2) และมีเพียงอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชักนำให้ชิ้นส่วนสร้างจำนวนรากใหม่เพิ่มขึ้นสูงสุด (3.6 รากต่อชิ้นส่วน) (Table 1) จากผลการทดลองการเติม TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มสำเภาอินทนนท์พัฒนาสร้างตายอดและยอดใหม่เพิ่มขึ้นมากที่สุด ซึ่ง TDZ จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตสังเคราะห์ในกลุ่มไซโทไคนินที่ออกฤทธิ์รุนแรงและยาวนานกว่าชนิดอื่นๆ ในระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน สามารถกระตุ้นการพัฒนาของเนื้อเยื่อให้สร้างยอดใหม่จากตาข้างเพิ่มมากขึ้น [16] อีกทั้งยังส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาของเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายได้อีกด้วย [17-19] และนอกจากนี้ยังให้ผลที่สอดคล้องกับ *Cymbidium giganteum* [17] และ *Cyrtopodium glutiniferum* [20] อีกด้วย

3.2 ผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของโปรโตคอร์มสำเภาอินทนนท์

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มสำเภาอินทนนท์บนอาหารที่เติมออกซินแตกต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า โปรโตคอร์มสามารถพัฒนาเพิ่มขึ้นได้แตกต่างกัน ซึ่งความเข้มข้นของออกซินในอาหารเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่ออัตราการสร้างโปรโตคอร์มใหม่ที่ลดลง (Table 2) โดยอาหารสูตรที่เติม IBA, IAA หรือ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้อัตราการสร้างโปรโตคอร์มใหม่เพิ่มขึ้นมากกว่า 97 % ขณะที่การเติม 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำให้อัตราการสร้างโปรโตคอร์มใหม่เกิดขึ้นน้อยกว่า 25 % (Table 2) เช่นเดียวกับกล้วยไม้ *Paphiopedilum callosum* มีการพัฒนาของยอดใหม่ลดน้อยลง เมื่อระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น [21] อย่างไรก็ตาม อาหารสูตรที่เติม IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้จำนวนโปรโตคอร์มใหม่เพิ่มขึ้นสูงที่สุด (Table 2 และ Figure 3) ซึ่ง IBA มีส่งผลอย่างมากต่อกลไกทางสรีวิทยาของเซลล์พืชมากกว่าออกซินชนิดอื่นๆ ไม่ว่าจะเป็น NAA หรือ IAA เนื่องจาก IBA จัดเป็นสารตั้งต้นของในการสร้าง IAA และช่วยส่งเสริมการเคลื่อนที่ของสารอาหารจากการสังเคราะห์แสง [22] และยังมีรายงานพบว่าการเติม IBA ในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญให้เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งยังกระตุ้นการเคลื่อนที่ของน้ำตาลและแร่ธาตุภายในท่อลำเลียง [28] รายงานของ Mohanty et al. [15] พบว่าการเติม IBA ความเข้มข้น 10.0 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้กล้วยไม้สำเภาอินทนนท์เกิดตายอดและยอดสูงที่สุด และจากการศึกษาของ Vogel et al. [20] พบว่า IAA ทำให้โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Cyrtopodium glutiniferum* เกิดการพัฒนาสร้างยอดและรากได้ดี เช่นเดียวกันกับการศึกษาทดลอง ที่พบว่าโปรโตคอร์มกล้วยไม้สำเภาอินทนนท์สามารถสร้างรากเพิ่มขึ้นได้มากกว่าออกซินชนิดอื่นๆ ซึ่ง IAA มีอิทธิพลโดยตรงต่อการแบ่งเซลล์และยืดตัวของเซลล์ในราก อีกทั้งมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างท่อลำเลียงและการพัฒนาของโครงสร้างรากอีกด้วย [20]

3.3 ผลของคุณภาพแสงต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตคอร์มสำเภาอินทนนท์

แสงสว่างเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยเฉพาะคุณภาพแสงสว่างที่ต่างกันสามารถชักนำให้กล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเกิดการพัฒนาเพิ่มขึ้นแตกต่างกันออกไป [23-25] จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มสำเภาอินทนนท์ภายใต้แสงสว่างที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า โปรโตคอร์มสำเภาอินทนนท์มีอัตราการเพิ่มจำนวนมากกว่า 95% ในทุกแสงสี ไม่แตก

ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Table 3) อย่างไรก็ตาม โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสว่างจากหลอด LED ชนิด warm-white ส่งผลให้จำนวนโปรโตคอร์มใหม่เพิ่มขึ้นสูงที่สุด (9.5 โปรโตคอร์มต่อชิ้นส่วน) และเกิดการพัฒนาสร้างจำนวนตายอดเพิ่มขึ้นมากที่สุดเช่นกัน (1.8 ตายอดต่อชิ้นส่วน) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่จำนวนยอดใหม่เพิ่มขึ้นมากที่สุด (4.2 ยอดต่อชิ้นส่วน) เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้แสงขาวจากหลอด Fluorescent (Table 3 และ Figure 4) จากงานวิจัยของ Bello-Bello et al. [25] พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน *Vanilla planifolia* ในสภาพปลอดเชื้อภายใต้แสงขาวจากหลอด Fluorescent และหลอด LED สามารถกระตุ้นการสร้างยอดใหม่ของชิ้นส่วนเพิ่มขึ้นมากที่สุดเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาพบว่าแสงสีแดงหรือแสงสีน้ำเงินสามารถชักนำให้โปรโตคอร์มรวมไปถึงยอดใหม่เพิ่มจำนวนมากขึ้นน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้แสงขาว (Table 3 และ Figure 4) การเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีแดงหรือแสงสีน้ำเงินเพียงอย่างเดียยังส่งผลชะลอการเจริญและการพัฒนาในพืชชนิดอื่นๆ เช่นกัน [23, 26, 27] เช่น การเพาะเลี้ยงเอมบริโอสนภายใต้แสงสีน้ำเงินส่งผลให้เนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายยอดถูกยับยั้งการแบ่งเซลล์ [29] ขณะที่การเพาะเลี้ยงภายใต้แสงขาวสามารถชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดของเนื้อเยื่อกล้วยและปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มมากขึ้น [27] นอกจากนี้การเลือกใช้หลอด LED เป็นแหล่งกำเนิดแสงสว่างให้แก่ต้นพืชยังสามารถช่วยประหยัดพลังงานรวมไปถึงมีอายุการใช้งานของหลอดที่ยาวนานกว่าหลอด Fluorescent อีกด้วย

4. สรุป

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สำเภาอินทนนท์ เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมไซโทไคนิน พบว่า TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดตายอดใหม่และเกิดยอดใหม่ได้ดีที่สุด (11.7 ตายอดต่อชิ้นส่วน และ 8.9 ยอดต่อชิ้นส่วน) ขณะที่การเติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มเพิ่มจำนวนมากที่สุด (11.1 และ 9.4 โปรโตคอร์มต่อชิ้นส่วน) และแสงสว่างจากหลอด LED warm white สามารถกระตุ้นการเจริญและพัฒนาให้จำนวนโปรโตคอร์มใหม่เพิ่มสูงที่สุด (9.5 โปรโตคอร์มต่อชิ้นส่วน) รวมไปถึงจำนวนตายอด (1.8 ตายอดต่อชิ้นส่วน) ขณะที่แสงขาวจากหลอด Fluorescent สามารถส่งเสริมให้ตายอดเกิดพัฒนาการเป็นยอดใหม่เพิ่มขึ้นมากที่สุด (4.2 ยอดต่อชิ้นส่วน)

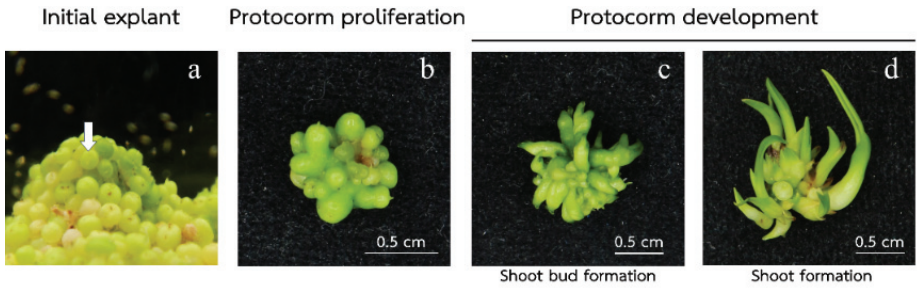

Figure 1 Protocorm of *Cymbidium mastersii* was used as initial explants (a, arrow) and proliferated protocorm-like bodies (b) then developed shoot buds (c) and shoots (d).

Table 1 Effect of cytokinins on protocorm growth and development of *Cymbidium mastersii* after 12 weeks of culture.

Cytokinins	Conc. (mg/L)	Protocorm proliferation (%)	Number / explant			
			Protocorms	Shoot buds	Shoots	Roots
-	0	95.8 ± 1.8 ab	4.6 ± 0.5 c	0.2 ± 0.1 c	0.2 ± 0.0 d	0.3 ± 0.1 b
BA	0.5	83.3 ± 1.8 bc	9.4 ± 0.4 b	4.6 ± 0.0 b	1.4 ± 0.3 cd	0.0 ± 0.0 b
	1.0	77.1 ± 2.4 c	7.5 ± 0.6 bc	8.4 ± 0.3 b	2.6 ± 0.5 bcd	0.0 ± 0.0 b
	2.0	70.8 ± 3.3 c	3.5 ± 0.4 d	6.5 ± 1.4 b	1.3 ± 0.5 cd	3.6 ± 1.6 a
Kinetin	0.5	97.9 ± 0.9 a	7.9 ± 0.3 bc	0.2 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 b
	1.0	100.0 ± 0.0 a	13.5 ± 0.4 a	0.1 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 b
	2.0	100.0 ± 0.0 a	14.9 ± 0.3 a	0.4 ± 0.1 c	0.2 ± 0.0 d	0.1 ± 0.0 b
TDZ	0.5	91.7 ± 2.4 ab	6.4 ± 0.3 bc	11.4 ± 0.6 a	6.9 ± 1.6 ab	0.0 ± 0.0 b
	1.0	97.9 ± 0.9 a	9.9 ± 0.5 b	11.7 ± 0.3 a	8.9 ± 1.2 a	0.0 ± 0.0 b
	2.0	83.3 ± 0.9 bc	5.5 ± 0.4 c	7.5 ± 0.5 b	5.9 ± 0.3 abc	0.0 ± 0.0 b

The same letters within a column are not significantly different at $P \leq 0.05$ according to DMRT. Values are mean ± SE of 3 replications (20 explants per replication).

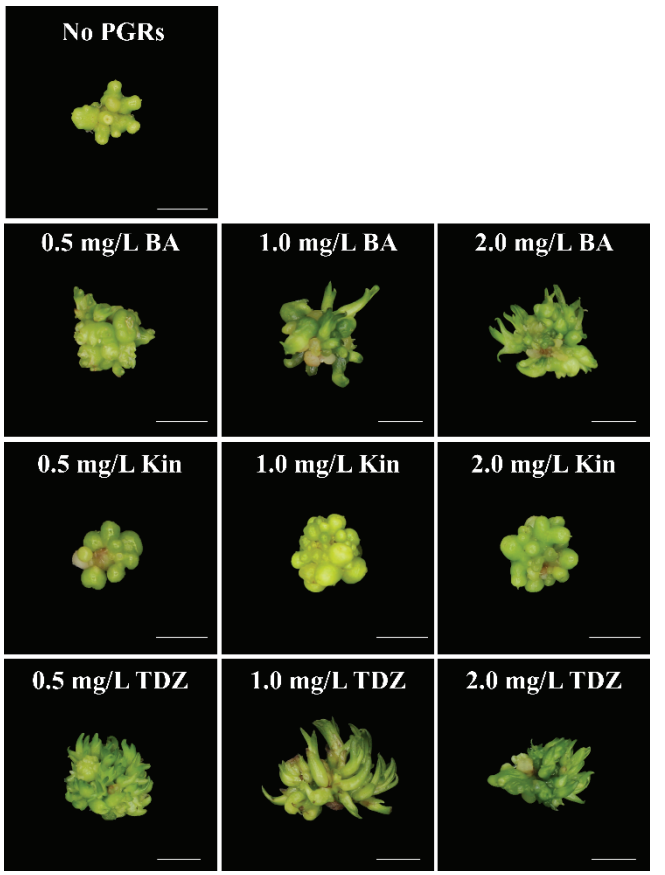

Figure 2 Growth and development of *Cymbidium mastersii* protocorm after 12 weeks of culture in different cytokinins (scale 1.0 cm).

Table 2 Effect of auxins on protocorm growth and development of *Cymbidium mastersii* after 12 weeks of culture.

Auxins	Conc. (mg/L)	Protocorm proliferation (%)	Number / explant			
			Protocorms	Shoot buds	Shoots	Roots
-	0	95.8 ± 1.8 ab	4.6 ± 0.5 bc	0.2 ± 0.1 ab	0.2 ± 0.0 b	0.3 ± 0.1 b
IBA	0.5	100.0 ± 0.0 a	11.1 ± 0.5 a	1.0 ± 0.1 a	1.0 ± 0.1 a	0.7 ± 0.1 a
	1.0	100.0 ± 0.0 a	8.0 ± 0.2 a	0.4 ± 0.1 ab	1.1 ± 0.1 a	0.7 ± 0.1 a
	2.0	89.6 ± 2.4 b	5.0 ± 0.8 bc	0.4 ± 0.0 ab	0.4 ± 0.0 b	0.5 ± 0.0 b
IAA	0.5	100.0 ± 0.0 a	7.7 ± 0.8 ab	0.5 ± 0.1 ab	1.0 ± 0.0 a	1.3 ± 0.1 a
	1.0	95.8 ± 0.9 ab	9.4 ± 0.8 a	0.7 ± 0.0 a	1.1 ± 0.1 a	0.6 ± 0.0 ab
	2.0	95.8 ± 1.8 ab	6.9 ± 0.4 ab	0.3 ± 0.0 ab	0.8 ± 0.0 a	1.1 ± 0.1 a
NAA	0.5	97.9 ± 0.9 a	6.3 ± 0.3 ab	0.5 ± 0.1 ab	0.8 ± 0.1 a	1.0 ± 0.0 a
	1.0	91.7 ± 1.8 ab	5.1 ± 0.4 bc	0.3 ± 0.0 ab	0.6 ± 0.1 ab	0.6 ± 0.0 ab
	2.0	52.1 ± 5.5 b	1.8 ± 0.2 c	0.1 ± 0.0 b	0.1 ± 0.0 b	0.3 ± 0.1 ab
2,4-D	0.5	25.0 ± 3.1 c	0.4 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
	1.0	33.3 ± 3.9 c	0.5 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
	2.0	18.8 ± 1.6 c	0.3 ± 0.1 c	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b

The same letters within a column are not significantly different at $P \leq 0.05$ according to DMRT. Values are mean ± SE of 3 replications (20 explants per replication).

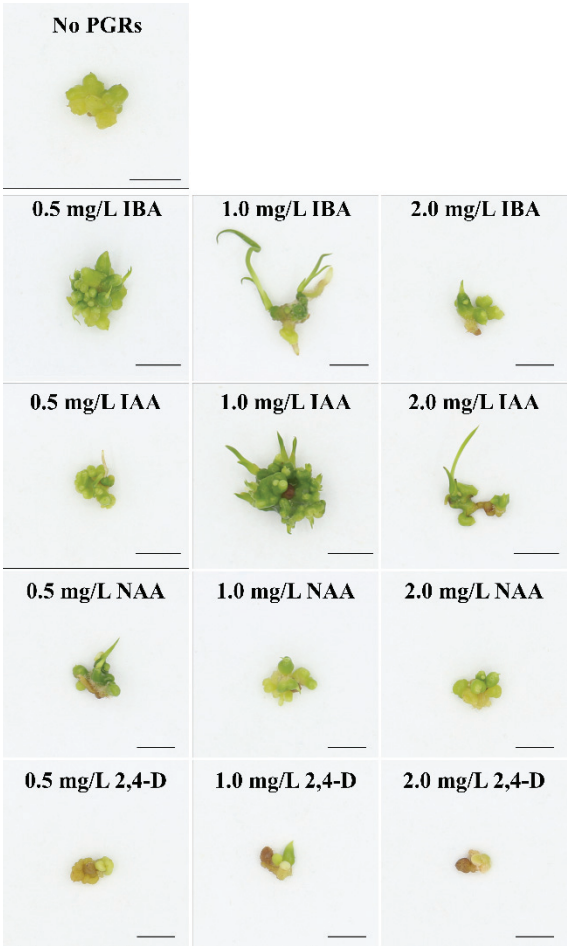

Figure 3 Growth and development of *Cymbidium mastersii* protocorm after 12 weeks of culture in different auxins (scale 1.0 cm).

Table 3 Effect of light quality on protocorm growth and development of *Cymbidium mastersii* after 12 weeks of culture.

Light quality	Protocorm proliferation (%)	Number / explant			
		Protocorms	Shoot buds	Shoots	Roots
Fl-cool white	95.8 ± 0.9 ns	6.2 ± 0.1 b	0.4 ± 0.0 b	4.2 ± 0.4 a	0.0 ± 0.0 ns
LED-warm white	97.9 ± 0.9	9.5 ± 0.5 a	1.8 ± 0.4 a	3.6 ± 0.1 ab	0.0 ± 0.0
LED-red	100.0 ± 0.0	4.9 ± 0.1 b	0.7 ± 0.0 b	3.3 ± 0.3 ab	0.0 ± 0.0
LED-blue	100.0 ± 0.0	5.7 ± 0.3 b	0.1 ± 0.0 b	2.1 ± 0.1 b	0.0 ± 0.0
LED-green	100.0 ± 0.0	5.8 ± 0.2 b	0.4 ± 0.2 b	3.3 ± 0.2 ab	0.0 ± 0.0

The same letters within a column are not significantly different at $P \leq 0.05$ according to DMRT. Values are mean ± SE of 3 replications (20 explants per replication).

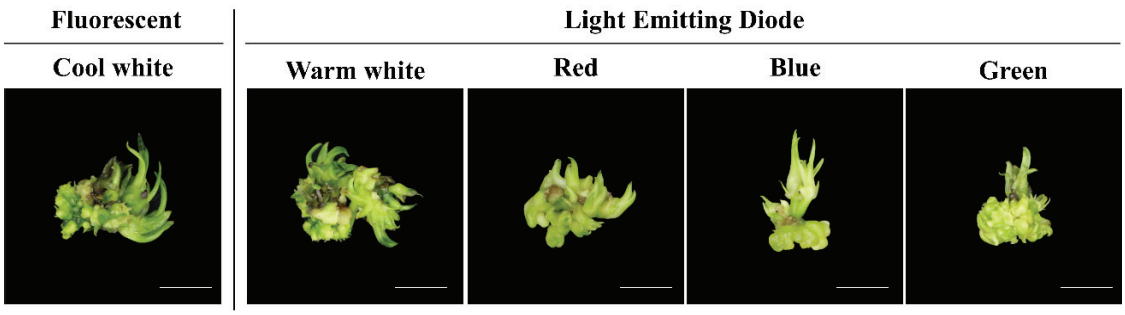

Figure 4 Growth and development of *Cymbidium mastersii* protocorm after 12 weeks of culture in different light qualities (scale 1.0 cm).

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่สนับสนุนทุนวิจัยงบประมาณรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปี พ.ศ. 2564 ขอขอบคุณหน่วยวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัย และขอบคุณนักวิจัยผู้ช่วยทุกท่านที่ช่วยเหลือจนงานวิจัยสำเร็จไปได้ด้วยดี

6. References

[1] The Botanical Garden Organization Ministry of Natural Resources and Environment, 2021, Thailand orchid Paying homage to the Queen Mother, Chiangmai Documentary Design Company Limited, Chiangmai, 320 p.

[2] Kaewthongprakum, P., Tangtragoon, T., Sutigoolabud, P. and Kanpington, A., 2019, Environmental factors affecting the

growth of *Anoectochilus burmanicus* Rolfe, Ban Pong Krai, Pong Yang Sub District, Mae Rim District, Chiang Mai Province, RMUTSV Res. J. 11(1): 181-196. (in Thai)

[3] Suwannarach, N., Kumla, J., Rachanarin, C. and Srimuang, K.O., 2021, *In vitro* symbiotic seed germination of *Epipactis flava* (Orchidaceae) promoted by endophytic fungus, *Tulasnella phuhinrongklaensis*, Chiang Mai J. Sci. 48: 787-792.

[4] Kunakhonnuruk, B., Inthima, P. and Kongbangkerd, A., 2018, *In vitro* propagation of *Epipactis flava* Seidenf., an endangered rheophytic orchid: a first study on factors affecting asymbiotic seed germination, seedling development and greenhouse acclimatization, PCTOC, 135(3): 419-432.

[5] Kunakhonnuruk, B., Inthima, P. and Kongbangkerd, A., 2019, *In vitro* propagation of rheophytic orchid, *Epipactis flava* Seidenf.—A comparison of semi-solid, continuous immersion and temporary immersion systems, Biology 8(4): 72.

[6] Mayo-Mosqueda, A., Maceda-López, L.F., Andrade-Canto, S.B., Noguera-Savelli, E., Caamal-Velázquez, H., Cano-Sosa, J.D.S. and Alatorre-Cobos, F., 2020, Efficient protocol for *in vitro* propagation of *Laelia rubescens* Lindl. from asymbiotic seed germination, S. Afr. J. Bot. 133: 264-272.

[7] Linjikao, J., Kunakhonnuruk, B., Inthima, P. and Kongbangkerd, A., 2021, Effects of media strength and mannitol concentration of growth and development of *Vandopsis lissochiloides* Planlets, Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol. 22(9-10): 34-45.

[8] Calevo, J., Copetta, A., Marchioni, I., Bazzicalupo, M., Pianta, M., Shirmohammadi, N., Cornara, L. and Giovannini, A., 2022, The use of a new culture medium and organic supplement to improve *in vitro* early stage development of five orchid species, Plant Biosystems, 156(1): 143-151.

[9] Vendrame, W.A., Xu, J. and Beleski, D., 2022, Evaluation of the effects of culture media and light sources on *in vitro* growth of *Brassavola nodosa* (L.) Lindl. Hybrid, Horticulturae, 8(5): 450.

[10] Aung, W.T., Bang, K.S., Yoon, S.A., Ko, B. and Bae, J.H., 2022, Effects of different natural extracts and plant growth regulators on plant regeneration and callus induction from pseudobulbs explants through *in vitro* seed germination of endangered orchid *Bulbophyllum auricomum* Lindl., J. Bio-Env. Con. 31(2): 133-141.

[11] Saravia-Castillo, G., Tapia y Figueroa, L. and Borjas-Ventura, R., 2022, Auxins and cytokinins elicit a differentiated response in the formation of shoots and roots in *Cattleya maxima* Lindl. and *Phalaenopsis amabilis* (L) Blume., Sci. Agropecu. 13(1): 63-69.

[12] Schulze, P.S., Pereira, H.G., Santos, T.F., Schueler, L., Guerra, R., Barreira, L.A. ... and Varela, J.C., 2016, Effect of light quality supplied by light emitting diodes

(LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*, Algal Res. 16: 387-398.

[13] Genkov, T. and Ivanova, I., 1995, Effect of cytokinin active phenylurea derivatives on shoot multiplication, peroxidase and superoxide dismutase activities of *in vitro* cultured carnation, Bulg. J. Plant Physiol. 21: 73-83.

[14] Asghar, S., Ahmad, T., Hafiz, I.A. and Yaseen, M., 2011, *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white, Afr. J. Biotechnol. 10(16): 3097-3103.

[15] Mohanty, P., Paul, S., Das, M. C., Kumaria, S. and Tandon, P., 2012, A simple and efficient protocol for the mass propagation of *Cymbidium mastersii*: an ornamental orchid of Northeast India, AoB plants 1-8.

[16] Sherif, N.A., Franklin Benjamin, J.H., Senthil Kumar, T. and Rao, M.V., 2018, Somatic embryogenesis, acclimatization and genetic homogeneity assessment of regenerated plantlets of *Anoectochilus elatus* Lindl., an endangered terrestrial jewel orchid, PCTOC, 132(2): 303-316.

[17] Roy, A.R., Sajeev, S., Pattanayak, A. and Deka, B.C., 2012, TDZ induced micropropagation in *Cymbidium giganteum* Wall. Ex Lindl. and assessment of genetic variation in the regenerated plants, Plant Growth Regul. 68: 435–445.

[18] Kim, Y.K., Kwak, M.H., Hong, J.R., Kim, H.W., Jo, S., Sohn, J.Y., Cheon, S.H. and Kim, K.J., 2017, The complete plastome sequence of the endangered orchid *Habenaria radiata* (Orchidaceae), Mitochondrial DNA B: Resour. 2: 704–706.

[19] Kim, D.H., Kang, K.W., Enkhtaivan, G., Jan, U. and Sivanesan, I., 2019, Impact of activated charcoal, culture medium strength and thidiazuron on non-symbiotic *in vitro* seed germination of *Pecteilis radiata* (Thunb.) Raf., S. Afr. J. Bot. 124: 144-150.

[20] Vogel, I.N. and Macedo, A.F., 2011, Influence of IAA, TDZ, and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation, and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi., a medicinal orchid, PCTOC, 104(2): 147-155.

[21] Wattanawikkit, P., Bunn, E., Chayanarit, K. and Tantiwiwat, S., 2011, Effect of cytokinins (BAP and TDZ) and auxin (2,4-D) on growth and development of *Paphiopedilum callosum*, Agric. Nat. Resour. 45(1): 12-19.

[22] Liu, C., Zhu, J., Liu, Z., Li, L., Pan, R. and Jin, L., 2002, Exogenous auxin effects on growth and phenotype of normal and hairy roots of *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi., Plant Growth Regul. 38: 37-43.

[23] Lin, Y., Li, J., Li, B., He, T. and Chun, Z., 2011, Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* in vitro, PCTOC, 105(3): 329-335.

[24] Sotthikul, C., Kaewpoowat, C. and Saimoon, N., 2015, *In vitro* propagation of *Habenaria* hybrids. Acta Hortic. 1155: 293-300.

[25] Bello-Bello, J.J., Martínez-Estrada, E., Caamal-Velázquez, J.H. and Morales-Ramos, V., 2016, Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of *vanilla* (*Vanilla planifolia* Andrews), Afr. J. Biotechnol. 15(8): 272-277.

[26] Edesi, J., Kotkas, K., Pirttilä, A.M. and Häggman, H., 2014, Does light spectral quality affect survival and regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips after cryopreservation?, PCTOC, 119(3): 599-607.

[27] Waman, A.A., Bohra, P., Sathyanarayana, B.N., Umesha, K., Gowda, B. and Ashok, T.H., 2015, *In vitro* shoot multiplication and root induction in Silk banana variety Nanjana gud Rasabale as influenced by mono-chromatic light spectra, Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B. Biol. Sci. 86: 577-584.

[28] Khandaker, M.M., Saidi, A., Badaluddin, N.A., Yusoff, N., Majrashi, A., Alenazi, M.M., Mohd, K.S., 2022, Effects of Indole-3-Butyric Acid (IBA) and rooting media on rooting and survival of air layered wax apple (*Syzygium samarangense*) CV Jambu Madu. Braz. J. Biol., 82: 1-13.

[29] Latkowska, M.J., Kvaalen, H., Appelgren, M., 2000, Genotype dependent blue and red light inhibition of the proliferation of the embryogenic tissue of Norway spruce. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 36(1): 57-60.