การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้รองเท้านารี (*Paphiopedilum* 'Delrosi')

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

โดย

นายเอกสิทธิ์ นิสยันต์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้รองเท้านารี (*Paphiopedilum* 'Delrosi')

โดย
นายเอกสิทธิ์ นิสยันต์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา
ภาควิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

TISSUE CULTURE OF THE LADY'S SLIPPER ORCHID (*PAPHIOPEDILUM* 'DELROSI')

By
Ekasit Nisayan

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree
MASTER OF SCIENCE
Department of Biology
Graduate School
SILPAKORN UNIVERSITY
2010

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง "การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้รองเท้านารี (*Paphiopedilum* 'Delrosi')" เสนอโดย นายเอกสิทธิ์ นิสยันต์ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา
2. รองศาสตราจารย์ ดร.อารีย์ ทองภักดี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.กรกช ชั้นจิรกุล)
...../...../.....

..... กรรมการ
(ดร. ชบา จำปาทอง)
...../...../.....

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา)
...../...../.....

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อารีย์ ทองภักดี)
...../...../.....

50303208 : สาขาวิชาชีววิทยา
คำสำคัญ : รองเท้านารี/การขยายพันธุ์/การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสิทธิ์ นิสยันต์ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้รองเท้านารี (*Paphiopedilum* 'Delrosi'). อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา และ รศ.ดร.อารีย์ ทองภักดี. 94 หน้า.

การขยายพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารี (*Paphiopedilum* 'Delrosi') โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอด ต้นที่ถูกตัดยอดออก และส่วนข้อ และชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากเนื้อเยื่อระหว่างข้อ และชิ้นส่วนใบ บนอาหารที่มีสารควบคุมการเติบโต ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 16 สัปดาห์ การเพาะเลี้ยงส่วนยอดบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex [ปุ๋ย Hyponex (6.5N-4.5P-19K) 3 กรัมต่อลิตร, เปปโตน (peptone) 2 กรัมต่อลิตร, น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร และซูโครส 20 กรัมต่อลิตร] ที่ประกอบด้วย thidiazuron (TDZ), 6-benzyladenine (BA), kinetin (Kn) เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ adenine sulfate (Ads) ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ และ TDZ 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด และจำนวนยอดสูง (100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1.4 ยอดต่อยอดเริ่มต้น และ 90 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1.2-1.3 ยอด ตามลำดับ) การศึกษาผลของน้ำตาลชนิดต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ พบว่าน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนยอดใหม่มากที่สุด (1.8 ต่อยอดเริ่มต้น) และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ 80 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นที่ตัดส่วนยอดออก พบว่าน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kn 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมให้เกิดยอดสูง 1.6 ยอดต่อยอดเริ่มต้น และให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 90 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อ พบว่าน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ที่ปราศจากสารควบคุมการเติบโตมีความเหมาะสมในการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อ ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อระหว่างข้อ และชิ้นส่วนใบ บนสูตรอาหาร 1/2 MS (1/2 strength macro-and full-strength micro elements) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส กลูโคส และมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ (0.45-4.54 ไมโครโมลาร์) เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ 2,4-D (4.52-13.56 ไมโครโมลาร์) พบว่าไม่มีการชักนำให้เกิดแคลลัสและ somatic embryos ทั้งจากชิ้นส่วนระหว่างข้อ หรือชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารทุกสูตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4-5 สัปดาห์ เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาควิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. ..... 2. .....

50303208 : MAJOR : BIOLOGY
KEY WORD : LADY'S SLIPPER ORCHID/PROPAGATION/TISSUE CULTURE

EKASIT NISAYAN : TISSUE CULTURE OF THE LADY'S SLIPPER ORCHID (*PAPHIOPEDILUM* 'DELROSI'). THESIS ADVISORS : ASST.PROF.CHOCKPISIT THEPSITHAR, Ph.D.,AND ASSOC.PROF. AREE THONGPUKDEE,Ph.D. 94 pp.

Micropropagation of Lady's slipper orchid (*Paphiopedilum* 'Delrosi') was established. Multiple shoots were induced from a shoot, a stem without shoot and a node while calli or somatic embryos were induced from an internode and a leaf segment on different types and concentrations of growth regulator in culture media for 16 weeks. An individual shoot was cultured on modified Hyponex media [3 g/l Hyponex (6.5N-4.5P-19K), 2 g/l peptone, 100 g/l boiled potato juice and 20 g/l sucrose] supplemented with thidiazuron (TDZ), 6-benzyladenine (BA), or kinetin (Kn) or combination with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and adenine sulfate (Ads) at various concentrations. It was found that 4.65 µM Kn in combination with 4.52 µM 2,4-D and 0.45 µM TDZ in combination with 4,52 µM 2,4-D provided high percentages of shooting efficiency and number of new shoots (100% with 1.4 new shoots per explant and 90% with 1.2-1.3 new shoots per explant, respectively). Studying on effects of various sugars on multiple shoot induction formed that 20 g/l glucose in combinations with 0.45 µM TDZ and 4.52 µM 2,4-D resulted in the highest new shoot numbers, 1.8 new shoots per explant, with 80% shooting efficiency. For multiple shoot induction from a stem without shoot, 20 g/l sucrose in combinations with 4.65 µM Kn and 4.52 µM 2,4-D promoted high number of shoots, 1.6 new shoots per explant, with 90% shooting efficiency. Furthermore, 20g/l sucrose in medium without plant growth regulator was suitable for shoot induction from a node with 100% shooting efficiency. For *in vitro* culture of an internode and leaf segment cultured for 16 weeks on modified Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with TDZ (0.45-4.54 µM) singly or in combination with 2,4-D (4.52-13.56 µM). It was shown that there was no callus and somatic embryos induced from either an internode or a leaf segments culture on all media. After 4-5 weeks of culturing, explants turned brown and eventually died.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Department of Biology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2010
Student's signature .....
Thesis Advisors' signature 1. ..... 2. .....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา และ รองศาสตราจารย์ ดร.อารีย์ ทองภักดี ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือ ตลอดจนแก้ไขปรับปรุงข้อผิดพลาดในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.กรกช ชั้นจิรกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลนาถ อบสุวรรณ และ ดร.ชบา จำปาทอง ที่ได้กรุณาแนะนำและตรวจแก้ไข พร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะ ทำให้งานวิจัยนี้สมบูรณ์

ขอกราบขอบคุณคณาจารย์ คุณสมโภช สัจจธรรมธวัช คุณสุลักษณ์ นามโชติ และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีววิทยาทุกคนที่ให้ความสะดวกในด้านต่างๆ ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจเป็นอย่างดี

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนการศึกษามาโดยตลอด ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ฏ
สารบัญภาพ	ฑ
บทที่	
1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
ขอบเขตการศึกษา	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
ประวัติและวิวัฒนาการของกล้วยไม้ในประเทศไทย	4
กล้วยไม้รองเท้านารี	4
กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum*	5
การกระจายพันธุ์	5
กล้วยไม้รองเท้านารีในประเทศไทย	5
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	8
การขยายพันธุ์กล้วยไม้	9
การอนุรักษ์กล้วยไม้รองเท้านารี	9
แผนขับเคลื่อนยุทธศาสตร์การแข่งขันกล้วยไม้ไทยในตลาดโลก	10
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	11
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้รองเท้านารีในสภาพปลอดเชื้อ	13
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้จากชิ้นส่วนใบในสภาพปลอดเชื้อ	18
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้จากเนื้อเยื่อระหว่างข้อของก้านช่อดอกในสภาพปลอดเชื้อ	21
การศึกษาผลของน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ	22

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ หน้า
3 อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง 24
อุปกรณ์และสารเคมี 24
พืชทดลอง 24
สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร 24
อุปกรณ์ 25
วิธีการทดลอง 26
ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 26
ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ BA Kn 2,4-D และ Ads ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 26
ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ BA Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 29
ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 31
ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออก 33
ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 36
ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 39
ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 42
4 ผลการทดลอง 45
ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 45

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ หน้า

ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ BA Kn 2,4-D และ Ads ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 45

ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ BA Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 51

ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 55

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออก 60

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 64

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 70

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 72

5 อภิปรายผลการทดลอง 74

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 74

ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 74

ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ BA Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 75

ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 76

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออก 77

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ หน้า
ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 78
ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'. 78
ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 79
6 สรุปผลการทดลอง..... 81
ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 81
ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 81
ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ BA Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 81
ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 82
ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออก..... 82
ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 83
ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 83
ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' 83
ข้อเสนอแนะ 85
บรรณานุกรม 86
ภาคผนวก..... 91
คำอธิบายคำย่อ 92

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ หน้า
ภาคผนวกองค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog..... 93
ประวัติผู้วิจัย..... 94

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'	27
2	สารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'.....	30
3	ชนิดของน้ำตาลและสารควบคุมการเติบโตที่ใช้ในการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'.....	32
4	ชนิดของน้ำตาลและสารควบคุมการเติบโตที่ใช้ในการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดยอดออก	34
5	ชนิดของน้ำตาลและสารควบคุมการเติบโตที่ใช้ในการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'.....	37
6	ชนิดของน้ำตาลและสารควบคุมการเติบโตที่ใช้ในการชักนำการเกิดแคลลัสหรือ somatic embryos จากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum*'Delrosi'.....	40
7	ชนิดของน้ำตาลและสารควบคุมการเติบโตที่ใช้ในการชักนำการเกิดแคลลัสหรือ somatic embryos จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'	43
8	ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับสารควบคุมการเติบโตTDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์	47
9	ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการเจริญเติบโตของส่วนยอดเริ่มต้นของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์	48
10	ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์	52

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ หน้า

11 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn และ 2,4-D ต่อการเจริญเติบโตของยอดเริ่มต้นของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ 53

12 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ 57

13 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการเจริญเติบโตของยอดเริ่มต้นของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ 58

14 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออก หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ 61

15 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ 66

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้รองเท้านารี (*Paphiopedilum*)	7
2	ต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ในขวดปลอดเชื้อ อายุ 14 เดือนหลังจากเพาะเมล็ด	25
3	ลักษณะของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'	28
4	ลักษณะต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากเพาะเลี้ยงในที่มืด.....	35
5	ลักษณะการเพาะเลี้ยงต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออก	35
6	ลักษณะการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'.....	38
7	ลักษณะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'	41
8	ลักษณะการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ..	44
9	ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการเจริญเติบโตและการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์	49
10	ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn และ 2,4-D ต่อการเจริญเติบโตและการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์	54
11	ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการเจริญเติบโตและการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์	59
12	ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออก หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์	62

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ หน้า

13 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'DeIrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ 67

14 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryosจากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'DeIrosi' 71

15 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryosจากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'DeIrosi' 73

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันกล้วยไม้ป่าของไทยลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง โดยเฉพาะในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ต่างๆ ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ซึ่งแต่เดิมเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายของกล้วยไม้เป็นจำนวนมหาศาล ทั้งจำนวนชนิดพันธุ์และจำนวนประชากร (สลิล 2549)

กล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์พื้นเมืองของไทยหลายชนิดได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีทรงพุ่มเตี้ย ดอกสวยงาม และบานทน จึงมีการนำมาปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์เพื่อการค้ากันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศและต่างประเทศ ทำให้มีการเก็บรวบรวมมาจากป่าเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้ปริมาณกล้วยไม้รองเท้านารีลดลงจนใกล้จะสูญพันธุ์ จึงได้มีการกำหนดให้กล้วย ไม้รองเท้านารีเป็นพืชอนุรักษ์ ในบัญชีแนบท้ายหมายเลข 1 ตามอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพันธุ์พืชที่กำลังสูญพันธุ์ หรืออนุสัญญาไซเตส (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora : CITES) โดยควบคุมไม่ให้มีการส่งออกกล้วยไม้รองเท้านารีที่เก็บจากป่า ยกเว้นกรณีที่พืชอนุรักษ์เหล่านี้ได้มาจากการขยายพันธุ์เทียมเท่านั้น ซึ่งหมายรวมถึงต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อและคงจำนวนพ่อแม่พันธุ์ไว้ (ธารทิพย์ 2010)

การใช้ทรัพยากรกล้วยไม้อย่างยั่งยืนเป็นการใช้ทรัพยากรกล้วยไม้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยมีพื้นฐานจากความรู้และความเข้าใจในทรัพยากรกล้วยไม้แต่ละชนิด ทำให้ประชากรในธรรมชาติยังคงอยู่ และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับกล้วยไม้ป่า เช่น การพัฒนาศักยภาพของการขยายพันธุ์กล้วยไม้เพื่อประโยชน์ทางด้านท่องเที่ยวทางธรรมชาติ หรือการท่องเที่ยวเชิงอนุรักษ์ในพื้นที่อนุรักษ์ต่างๆ นอกจากนั้นยังมีการสนับสนุนให้นำกล้วยไม้ป่ามาปรับปรุงสายพันธุ์ เพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีดอกสวยงามยิ่งขึ้น และเพื่อประโยชน์ทางการค้า ซึ่งเป็นรายได้หลักที่สำคัญทางหนึ่งของประเทศ (สลิล 2549)

อีกทั้งกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้มอบหมายให้ กรมส่งเสริมการเกษตรเป็นหน่วยงานหลักในการดำเนินงานโครงการผลักดันการส่งออกกล้วยไม้ปีละ 10,000 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2559 ซึ่งเป็นปีที่สิ้นสุดของแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติให้เกิดขึ้นเป็นรูปธรรมโดยเร็ว

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

โดยการดำเนินงานทั้งหมดอยู่ภายใต้การบริหารและกำกับดูแลของคณะกรรมการกล้วยไม้แห่งชาติ (Orchid Board) ตลอดจนรัฐบาลมีข้อตกลงการเปิดการค้าเสรีกับหลายประเทศ ที่เป็นข้อได้เปรียบสำหรับกรณีของ ดอกไม้ โดยเฉพาะกล้วยไม้ ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะผลักดันให้ประเทศไทยมีการผลิตและส่งออกกล้วยไม้เพิ่มขึ้นได้ตามเป้าหมาย (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2007; 2010)

สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวกับการขยายพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีค่อนข้างน้อย เนื่องจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อไม่สามารถมีชีวิตอยู่บนอาหารสังเคราะห์ได้นาน เป็นผลทำให้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่ค่อยประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ซึ่งในการขยายพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีทางการค้ายังคงทำได้เฉพาะจากการเพาะเมล็ดเท่านั้น (Hong 2008) ดังนั้นการพัฒนาศักยภาพด้านการขยายพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีความสำคัญอย่างมาก ทั้งทางด้านการอนุรักษ์พันธุ์พืชและเพื่อประโยชน์ทางการค้าอีกด้วย

2. ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอด ต้นที่ตัดส่วนยอดออก และข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* ‘Delrosi’

2. เพื่อศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอด ต้นที่ตัดส่วนยอดออก และข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* ‘Delrosi’

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

3. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากเนื้อ เยื่อระหว่างข้อ และชิ้นส่วนใบกล้วยไม้ *Paphiopedilum* ‘Delrosi’

4. เพื่อศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากเนื้อเยื่อระหว่างข้อ และชิ้นส่วนใบกล้วยไม้ *Paphiopedilum* ‘Delrosi’

3. ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอด ต้นที่ตัดส่วนยอดออก และข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* ‘Delrosi’ จากสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

2. ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอด ต้นที่ตัดส่วนยอดออก และข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* ‘Delrosi’ จากสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

3. ศึกษาชนิดของน้ำตาลและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากเนื้อเยื่อระหว่างข้อ และชิ้นส่วนใบกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' จากสูตรอาหาร 1/2 MS (1/2 strength macro-and full-strength micro elements) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงสูตรอาหาร และชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอด ต้นที่ตัดส่วนยอดออก และข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

2. ทราบถึงสูตรอาหาร และชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อ และชิ้นส่วนใบกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กล้วยไม้ (orchid) เป็นไม้ดอกในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledon) จัดอยู่ในวงศ์กล้วยไม้หรือวงศ์ออร์คิเดซิอี (Family Orchidaceae) เป็นพืชวงศ์ใหญ่ที่สุดในบรรดาพรรณพืชทั่วโลก ปัจจุบันมีอยู่ประมาณ 796 สกุล (Genus) และมากกว่า 17,500 ชนิด (Species) และนับเป็นพืชวงศ์ใหญ่ที่สุดในประเทศไทย โดยมีการสำรวจพบแล้วทั้งสิ้น 168 สกุล และมากกว่า 1,170 ชนิด หรือเป็นหนึ่งในสิบห้าของกล้วยไม้ที่พบทั่วโลก นอกจากนี้ กล้วยไม้ไทยยังมีความหลากหลายทั้งถิ่นฐานที่อยู่และพันธุกรรมไม่น้อยไปกว่าประเทศเขตร้อนอื่นๆ (ระพี 2516; สลิล 2549)

1. ประวัติและวิวัฒนาการของกล้วยไม้ในประเทศไทย

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

แต่เดิมในประเทศไทยนั้นยังไม่มีผู้ใดให้ความสำคัญกับกล้วยไม้มากนัก จนมาถึงต้นสมัยรัตนโกสินทร์จึงมีผู้ริเริ่มปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ขึ้น โดยนายเฮนรี่ อาลาบาสเตอร์ (ต้นตระกูล "เศวตศิลา") นำกล้วยไม้หลายชนิดจากต่างประเทศเข้ามาปลูกเลี้ยงเป็นคนแรกในประเทศไทย และมีการศึกษาทดลองปลูกเลี้ยงจนชำนาญ แล้วจึงเผยแพร่ไปสู่เจ้านายในพระราชสำนักและกลุ่มข้าราชบริพาร ต่อมาในสมัยพระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว พระปิยมหาราช ความนิยมกล้วยไม้จึงเพิ่มขึ้น มีการนำกล้วยไม้มาใช้ประดับในงานพระราชพิธีต่างๆ จนทำให้ความนิยมปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ได้แพร่หลายสู่ประชาชนทั่วไป แต่ก็ยังไม่ปรากฏแน่ชัดว่าได้มีการริเริ่มปลูกเลี้ยงกล้วยไม้รองเท้านารีอย่างจริงจังในประเทศไทยเมื่อใด จนกระทั่งในช่วง 30-40 ปีที่ผ่านมานี้ คนไทยให้ความสนใจกล้วยไม้รองเท้านารีกันมากขึ้น ด้วยการนำต้นที่เป็นพันธุ์ป่ามาปลูกเลี้ยง มีการทดลองดัดแปลงสภาพปลูกให้เหมาะสม รวมทั้งวิธีการขยายพันธุ์เริ่มมีการปรับปรุงพันธุ์และผสมพันธุ์กันอย่างจริงจัง จนสามารถผลิตกล้วยไม้รองเท้านารีที่มีคุณภาพดี และสามารถผลิตลูกผสมใหม่ ที่มีคุณภาพไม่แพ้กล้วยไม้จากต่างประเทศ (อุไร 2549)

2. กล้วยไม้รองเท้านารี

กล้วยไม้รองเท้านารี หรือที่ภาษาอังกฤษเรียกว่า Lady's Slipper นั้น มีถิ่นกำเนิดทั้งในเขตร้อนและหนาวของโลก เท่าที่พบแล้วทั่วโลกมี 4 สกุล 125 ชนิด คือ สกุล *Cypripedium* มี 35

ชนิด สกุล *Paphiopedilum* มี 66 ชนิด สกุล *Phragmipedium* มี 20 ชนิด และสกุล *Selennipedium* มี 4 ชนิด (อุไร 2549)

3. กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum*

3.1 การกระจายพันธุ์

กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* จัดเป็นพันธุ์ไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน กระจายพันธุ์อยู่ตามธรรมชาตินับจากแนวเทือกเขาหิมาลัยลงมาสู่ตอนล่าง โดยเฉพาะแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (รวมทั้งไทย) อินเดีย อินโดนีเซีย ภาคตะวันออกเฉียงใต้ของจีน นิวกินี ฟิลิปปินส์ และหมู่เกาะโซโลมอน แต่คนในพื้นที่ไม่นิยมนำมาปลูกเลี้ยงกัน ปล่อยให้อยู่ตามธรรมชาติ และบางชนชาติยังมีความเชื่อว่าชื่อของกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นชื่อที่ไม่เป็นมงคล (ระพี 2535; อุไร 2549)

3.2 กล้วยไม้รองเท้านารีในประเทศไทย

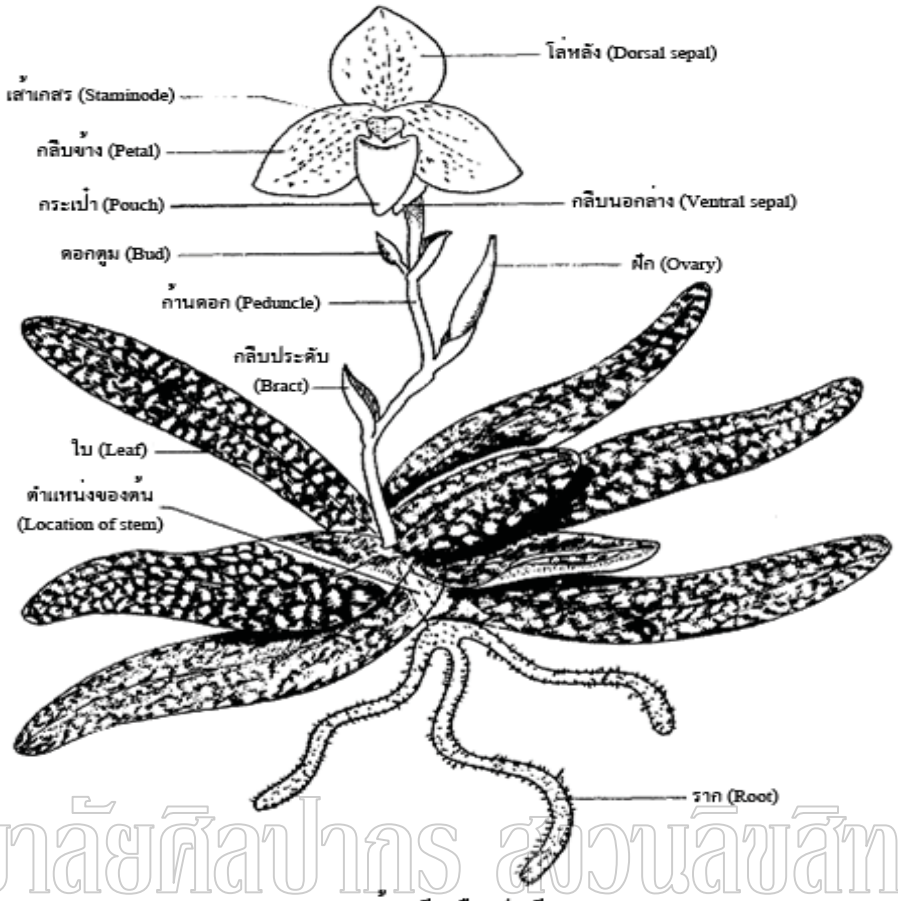
กล้วยไม้รองเท้านารีที่พบว่ามีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศไทยเป็นกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* ปัจจุบันที่ค้นพบแล้วมีทั้งหมด 17 ชนิด คือ (อุไร 2549; ธารทิพย์ 2010)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

1. รองเท้านารีคางกบคอแดง (*Paph. appletonianum* var. *wolterianum*)
2. รองเท้านารีม่วงสงขลา หรือรองเท้านารีคางกบภาคใต้ (*Paph. barbatum*)
3. รองเท้านารีฝาหอย (*Paph. bellatulum*)
4. รองเท้านารีคางกบ หรือรองเท้านารีไทยแลนด์ (*Paph. callosum*)
5. รองเท้านารีดอยตุง (*Paph. charlesworthii*)
6. รองเท้านารีเหลืองปราจีน หรือรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ หรือรองเท้านารีเหลืองอุดร (*Paph. concolor*)
7. รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paph. exul*)
8. รองเท้านารีขาวชุมพร (*Paph. godefroyae*)
9. รองเท้านารีเหลืองตรัง หรือรองเท้านารีเหลืองพังงา (*Paph. godefroyae* var. *leucochilum*)
10. รองเท้านารีเหลืองเลย (*Paph. hirsutissimum* var. *esquirolei*)
11. รองเท้านารีอินซิกเน่ (*Paph. insigne*)
12. รองเท้านารีขาวสตูล (*Paph. niveum*)
13. รองเท้านารีเมืองกาญจน์ หรือรองเท้านารีเชียงดาว (*Paph. parishii*)
14. รองเท้านารีปีกแมลงปอ หรือรองเท้านารีสุขะกูล (*Paph. sukhakulii*)

15. รองเท้านารีอินทนนท์ (*Paph.villosum*)
16. รองเท้านารีช่องอ่างทอง (*Paph.* x Ang Thong)
17. รองเท้านารีเกาะช้าง (*Paph.* x Siamensis)

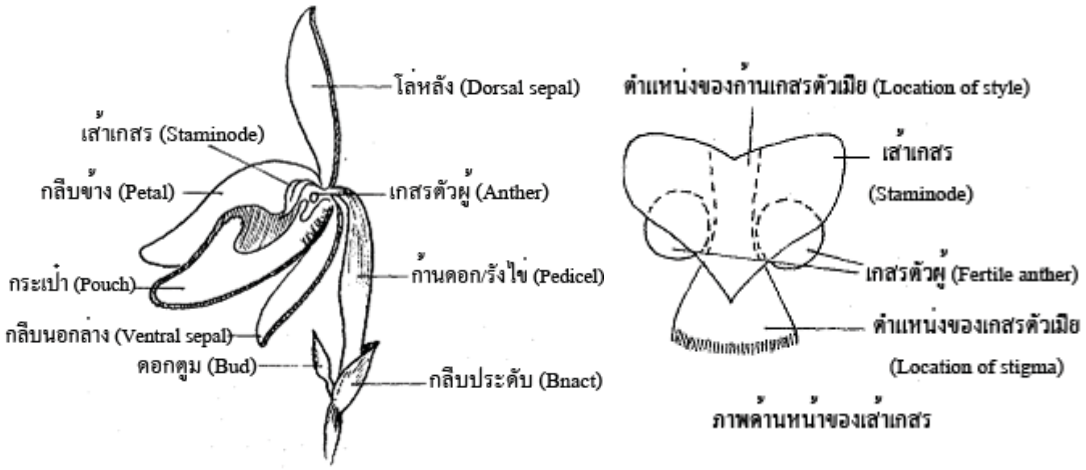
มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์



มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รองเท้านารีเหลืองปราจีน

Paphiopedilum concolor (Batem) Pfitz



ภาพที่ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้รองเท้านารี (*Paphiopedilum*)

ที่มา : ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้รองเท้านารี อ้างถึงใน ระพี สาคริก , <u>กล้วยไม้รองเท้านารี วิธีการปลูกเลี้ยงและปัญหาอนุรักษ์ธรรมชาติ</u> (กรุงเทพมหานคร : โอ.เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์, 2535), 2-3.

3.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ประเภทฐานร่วม (sympodium) คือ เติบโตโดยการแตกหน่อใหม่จากตาข้างของต้นเดิม เพื่อสร้างช่อดอก ลำต้นสั้นมากไม่มีลำลูกกล้วย ในธรรมชาติมักอิงอาศัยกับต้นไม้ใหญ่บนพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลมากๆ หรือขึ้นตามซอกผมหินและพื้นดินที่มีใบไม้ผุทับถมอยู่เป็นเวลานานหลายปี (อุไร 2549)

1. ราก (root)

รากออกจากโคนต้นแผ่กระจายในแนวราบ มีขนาดใหญ่ สีน้ำตาล และมีขนรากปกคลุมอยู่ทั่วไป

2. ใบ (leaf)

ใบมีหลายแบบทั้งรูปขอบขนาน (oblong) รูปรี (elliptic) รูปรีแกมรูปขอบขนาน (oblong-elliptic) หรือรูปแถบ (linear) ออกสลับกันทั้งสองข้าง จำนวน 2-7 ใบต่อต้น แผ่นใบหนา เส้นกลางใบพับเป็นร่อง ปลายใบมน เว้า หรือแหลม มีทั้งสีเขียวเป็นมัน เป็นลายตาราง หรือเป็นลายคล้ายหินอ่อน สีเขียวเข้มสลับกับสีเขียวอมเทาทั่วทั้งใบ โคนกาบอาจมีสีม่วงเรื่อและมีขนเล็กๆ ปกคลุมตามขอบใบ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

3. ดอก (flower)

ดอกออกที่ปลายยอด มีทั้งดอกเดียวและเป็นช่อ ก้านดอกอาจยาวหรือสั้น มักมีขนปกคลุม กาบรองดอกรูปไข่หรือรูปหอกปลายแหลม ห่อหุ้มรังไข่ไว้ และมีขนนุ่มปกคลุมอยู่ทั้งสองส่วน กลีบดอกหนาเป็นมัน ด้านนอกมักมีขนนุ่มปกคลุมเช่นกัน ด้านในมีสีสันสวยงาม แบ่งเป็นกลีบนอกหรือกลีบเลี้ยง (sepal) จะห่อหุ้มกลีบดอกด้านในไว้ มีขนนุ่มปกคลุม แบ่งเป็น 3 กลีบ คือ กลีบนอกบนหรือหลังคา (dorsal sepal) 1 กลีบ อยู่ส่วนบนของดอกและเห็นเด่นชัด อีก 2 กลีบอยู่ด้านล่าง และมักเชื่อมติดกันเป็นชิ้นเดียวเรียกว่า กลีบนอกล่าง (vental sepal หรือ synsepalum) กลีบในหรือกลีบดอก (petal) มีกลีบใน 2 กลีบชี้ออกด้านข้างทั้งสองด้าน อาจเรียกว่า หู มีขนาดและลักษณะเหมือนกัน กลีบในอีกกลีบหนึ่งซึ่งอยู่ด้านล่างของดอกได้เปลี่ยนรูปเป็นถุงห้อยลงคล้ายหัวรองเท้าแตะของชาว ดัตช์ เรียกว่า กระเป๋า (pouch) กล้วยไม้รองเท้านารีเป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสรเพศผู้ที่สมบูรณ์ 2 แห่งลักษณะเป็นก้อนเหนียวสีเหลืองติดอยู่ด้านข้างทั้งสองข้างของเส้าเกสร ถัดลงมาตรงกึ่งกลางของเส้าเกสรเป็นยอดของเกสรเพศเมียซึ่งคว่ำลง ลักษณะเป็นเนิน 3 เนินติดกัน ปลายเส้าเกสรมีเกสรเพศผู้ที่ไม่สมบูรณ์ ซึ่งเปลี่ยนรูปเป็นแผ่นปิดอยู่ เรียกว่า โล่ (staminode)

4. ผล (fruit)

ผลเป็นผลแบบผลแห้งแล้วแตก (capsule) เมื่อแก่มีสีน้ำตาลและแตกออกกตามแนวยาว ภายในมีเมล็ดเล็กๆ คล้ายฝุ่น ปลิวไปตามลมได้ง่าย

4. การขยายพันธุ์กล้วยไม้

การขยายพันธุ์เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการเลี้ยงกล้วยไม้ เพราะเป็นปัจจัยที่สำคัญช่วยให้การเลี้ยงกล้วยไม้เจริญก้าวหน้าไปสู่จุดมุ่งหมายในด้านต่างๆ เพื่อให้พันธุ์กล้วยไม้สามารถสืบทอดมาได้โดยไม่สูญพันธุ์ และยังมีปริมาณเพิ่มขึ้น นอกจากนี้หากใช้หลักวิชาการผสมพันธุ์เข้าช่วย อาจทำให้ได้ผลอีกด้านหนึ่งคือ ได้พันธุ์กล้วยไม้ใหม่ๆ ที่มีลักษณะในแบบแปลกๆ ซึ่งอาจเป็นลักษณะที่พัฒนาไปในทางที่ดีในด้านต่างๆ ได้ เช่นด้านความสวยงาม หรือด้านเศรษฐกิจการค้าดอกกล้วยไม้ (ระพี 2516)

วิธีการขยายพันธุ์กล้วยไม้ การขยายพันธุ์กล้วยไม้สามารถแบ่งตามความมุ่งหมายและผลที่ได้รับ ได้เป็น 2 แบบ คือ

1. การขยายพันธุ์โดยไม่มีการผสมเกสร (vegetative propagation) คือการขยายพันธุ์ด้วยชิ้นส่วนของกล้วยไม้ ซึ่งไม่ใช่ผลของการผสมเกสร ได้แก่ การตัดแยกลำหน้าลำหลัง การตัดลำแก่ไปปักชำในกล้วยไม้ประเภทซิมโพเดียล การตัดยอด ตัดหน่อในกล้วยไม้ประเภทโมโนโพเดียล และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นการขยายพันธุ์แบบนี้เป็นการเพิ่มปริมาณต้นให้มากขึ้น และต้นที่ได้นะมีลักษณะทางพันธุศาสตร์เหมือนเดิม

2. การขยายพันธุ์โดยการผสมเกสรและเพาะเมล็ด (seed propagation) คือการนำเอาเมล็ดซึ่งเป็นส่วนที่เกิดจากการผสมเกสรมาทำการเพาะเพื่อให้งอกขึ้นมาเป็นต้นกล้วยไม้ แม้ว่าเมล็ดกล้วย ไม้เหล่านั้นจะเกิดขึ้นจากการผสมเกสรระหว่างพ่อพันธุ์แม่พันธุ์คู่เดียวกันหรือมาจากฝักเดียวกัน แต่ลักษณะต่างๆ ของต้นและดอกกล้วยไม้อาจมีความแตกต่างกันออกไป ดังนั้นการขยายพันธุ์ลักษณะนี้นอกจากจะเป็นการเพิ่มปริมาณให้มากขึ้นแล้ว ยังมีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาหรือปรับปรุงลักษณะต่างๆ ให้ดีขึ้น หรือแปลกออกไป

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

5. การอนุรักษ์กล้วยไม้รองเท้านารี

ปัจจุบันคนไทยรู้จักและปลูกเลี้ยงกล้วยไม้เป็นไม้ประดับกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งกล้วยไม้ที่ปลูกเลี้ยงส่วนหนึ่งได้มาจากพ่อค้าที่ลักลอบนำออกมาจากป่ามา เพื่อจำหน่ายตามตลาดต้นไม้ โดยมีชาวบ้านในท้องถิ่นเป็นผู้ขุด ดึง แซะกล้วยไม้ป่า และตัดต้นไม้ใหญ่ที่มีกล้วยไม้อิงอาศัยอยู่ อีกทั้งในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารี และกล้วยไม้สกุลอื่นๆ เพื่อคัดเลือกลักษณะทรงต้น ใบ รูปทรงดอก สีสัน อาจทำให้ลักษณะที่ดีบางอย่างของกล้วยไม้ชนิดนั้นหายไปโดยไม่เจตนา เช่น ความต้านทานโรค ความดกของดอกหรือแม้รูปทรงของดอกที่แท้จริงซึ่งช่วยในการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ ดังนั้นการอนุรักษ์ความหลากหลายของกล้วยไม้จึงต้องอยู่บนพื้นฐานของการไม่คัดเลือกลักษณะต่างๆ เพื่อตอบสนองความต้องการของมนุษย์ หลายประเทศรวมทั้งประเทศไทยได้เห็นถึง

ปัญหาการสูญพันธุ์ของพืชป่านี้ จึงร่วมมือกันคุ้มครอง เพื่ออนุรักษ์พืชป่าและสัตว์ป่าที่กำลังสูญพันธุ์ จึงได้มีอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศ (CITES) ขึ้น โดยมีบทบัญญัติว่าประเทศสมาชิกต้องมีกฎหมายข้อบังคับในการคุ้มครองพันธุ์สัตว์ป่า และพืชป่า ซึ่งประเทศไทยได้เข้าเป็นสมาชิกด้วยเมื่อวันที่ 21 มกราคม พ.ศ. 2526 แต่สำหรับประเทศไทยเองนั้นมีการดำเนินการเพื่ออนุรักษ์กล้วยไม้ป่าได้มีมาก่อนอนุสัญญาไซเตสนานแล้ว โดยพระราชบัญญัติป่าไม้ พ.ศ. 2484 ได้กำหนดให้กล้วยไม้ป่าเป็นของหวงห้าม การเก็บหากล้วยไม้ป่าต้องได้รับอนุญาตจากจังหวัดหรือกรมป่าไม้เท่านั้น และกล้วยไม้ป่าที่ถูกเก็บหาตามใบอนุญาตเท่านั้นที่จะถูกนำมาทำการค้าได้ ทั้งนี้ผู้ครอบครองกล้วยไม้ป่าที่เก็บหามาอย่างถูกต้องตามกฎหมาย หรือซื้อจากผู้ขายที่มีใบอนุญาตจำนวนตั้งแต่ 20 ต้นขึ้นไป จะต้องแจ้งขออนุญาตจากกรมป่าไม้เช่นเดียวกัน เพื่อให้มีการควบคุมวิธีการเก็บหากล้วยไม้ไม่ให้เป็นอันตรายต่อการดำรงชนิดพันธุ์ อันจะช่วยป้องกันการสูญพันธุ์ของกล้วยไม้จากการเก็บหา นอกจากนี้ผู้ที่ขยายพันธุ์เทียมพืชอนุรักษ์เป็นการค้าจะต้องขอรับใบอนุญาตจากกรมวิชาการเกษตรด้วย มิฉะนั้นจะมีโทษตามกฎหมาย (อุไร 2549)

6. แผนขับเคลื่อนยุทธศาสตร์การแข่งขันกล้วยไม้ไทยในตลาดโลก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้จัดทำแผนขับเคลื่อนยุทธศาสตร์การแข่งขันกล้วยไม้ไทยในตลาดโลกในปี พ.ศ. 2554 ขึ้น โดยมีคณะอนุกรรมการขับเคลื่อนยุทธศาสตร์การแข่งขันกล้วยไม้ไทยในตลาดโลกปี พ.ศ. 2554-2559 ที่มีหน่วยงานจำนวน 20 หน่วยงาน ประกอบด้วยภาครัฐ 14 หน่วย และภาคเอกชน 6 หน่วย ร่วมดำเนินการในลักษณะบูรณาการดำเนินงานตามแผนงาน โครงการด้านต่างๆ ตามเป้าหมายการผลักดันการส่งออกกล้วยไม้ปีละ 10,000 ล้านในปี พ.ศ. 2559 โดยแผนขับเคลื่อนยุทธศาสตร์ดังกล่าวได้รับการจัดสรรงบประมาณทั้งสิ้น 99.17 ล้านบาท แบ่งเป็น ภาครัฐ 21.54 และภาคเอกชน 88.33 ล้านบาท เพื่อดำเนินการใน 5 ยุทธศาสตร์ คือ

1. การเพิ่มศักยภาพการแข่งขันด้านการตลาดส่งออก ซึ่งจะใช้งบประมาณดำเนินการทั้งสิ้น 82.14 ล้านบาท แบ่งเป็นภาครัฐสนับสนุน 6.44 ล้านบาท และจากภาคเอกชน 75.69 ล้านบาท เพื่อดำเนินการสร้างตลาดเชิงรุก ที่เป็นการขยายช่องทางการตลาดโดยจะเน้นการศึกษาวิเคราะห์เพื่อแก้ไขปัญหาอุปสรรคที่มีต่อการส่งออกในตลาดเดิม การรณรงค์ประชาสัมพันธ์กล้วยไม้ไทยทั้งในประเทศและต่างประเทศ และส่งเสริมการส่งออกกล้วยไม้ที่มีคุณภาพได้มาตรฐานส่งออกและตรวจสอบย้อนกลับได้

2. การส่งเสริมการผลิตกล้วยไม้คุณภาพ ซึ่งประกอบด้วย 2 กิจกรรมหลัก คือ การส่งเสริมการผลิตกล้วยไม้ให้มีความหลากหลาย และการส่งเสริมการผลิตกล้วยไม้ที่มีคุณภาพตามมาตรฐานการส่งออก

3. การพัฒนาและสร้างสรรค์นวัตกรรม โดยการส่งเสริมงานวิจัยเชิงบูรณาการระหว่างเกษตรกร ผู้ประกอบการและนักวิจัย

4. การพัฒนาองค์กร ซึ่งจะเป็นการส่งเสริมการสร้างคลัสเตอร์กล้วยไม้ที่เข้มแข็ง และสร้างศูนย์กลางการให้บริการกล้วยไม้แบบเบ็ดเสร็จ

5. ส่งเสริมการใช้กล้วยไม้ภายในประเทศและต่างประเทศเพิ่มขึ้น อีกทั้งให้มีการสนับสนุนการส่งออกตามภารกิจและศักยภาพด้วย

ยุทธศาสตร์ข้างต้นกระทรวงเกษตรฯ มีเป้าหมายที่จะเพิ่มมูลค่าการส่งออกกล้วยไม้รวมในปี 2554 เพิ่มขึ้นเป็น 3,012.8 ล้านบาท หรือเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 10 เปอร์เซ็นต์ จากมูลค่าการส่งออกกล้วยไม้ในปี พ.ศ. 2552 ซึ่งคณะอนุกรรมการขับเคลื่อนยุทธศาสตร์ฯ จะมีการประชุมขับเคลื่อนและติดตามความก้าวหน้าอย่างต่อเนื่องเพื่อให้การดำเนินงานเป็นไปตามแผนงานและเป้าหมายในที่สุด (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2010)

7. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศวิธีหนึ่ง โดยนำส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่าจะเป็นเซลล์ โพรโทพลาสต์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วยเกลือแร่ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเติบโตของพืช ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหลาย ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุมอุณหภูมิและแสงสว่าง (คำนูญ 2544)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรได้หลายประการทั้งการขยายพันธุ์ ทำให้เกิดต้นตรงตามพันธุ์เดิมในปริมาณมากและในเวลาจำกัด การผลิตพืชปราศจากโรค การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมของพืชโดยเก็บรักษาในรูปแคลลัสหรือต้นที่สมบูรณ์ในหลอดทดลอง และการปรับปรุงพันธุ์พืช เป็นต้น (บุษราภรณ์ 2548)

7.1 องค์ประกอบของอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่วไปนั้นจะประกอบด้วย สารอนินทรีย์ (inorganic component) สารอินทรีย์ (organic component) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) วิตามิน (vitamins) สารควบคุมการเติบโตของพืช (plant growth regulator) สารที่ทำให้อาหารแข็งตัว (gelling agent) นอกจากนี้อาจรวมไปถึงกรดอะมิโน (amino acid) แอนติไบโอติค (antibiotics) หรือสารสกัดจากธรรมชาติ (natural complex) สูตรอาหารต่างๆ มักเรียกตามชื่อผู้คิดค้น อย่างไรก็ดีสูตรอาหารที่ปรากฏในปัจจุบันเมื่อนำมาวิเคราะห์แล้ว พบว่าประกอบด้วย (บุษราภรณ์ 2548)

7.1.1. สารอนินทรีย์ (inorganic component) สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทุกสูตรต้องมีเกลืออนินทรีย์เป็นองค์ประกอบพื้นฐาน เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับพืชที่ปลูกในธรรมชาติ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

7.1.1.1 ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก (macroelements) ได้แก่ C H O N P K S Ca และ Mg ซึ่งมักรวมไปถึง chlorine และ sodium ด้วย สูตรอาหารพื้นฐาน (basal medium) ทั่วไปจะมีการเติม macroelements ลงไปในปริมาณที่มากกว่า 30 ppm (mg/l) โดยธาตุอาหารต่างๆ เหล่านี้เป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และเนื้อเยื่อพืช

7.1.1.2 ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย (microelements) ได้แก่ Fe Cl Mn Cu Zn B และ Mo โดยธาตุอาหารเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็น co-factor และ inducer ในกระบวนการสังเคราะห์ของเอนไซม์ และในอาหารสูตรพื้นฐานทั่วไปจะมีการเติม microelements ลงไปในปริมาณที่น้อยกว่า 30 ppm (mg/l)

7.1.2. สารอินทรีย์ (organic component) คือ สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) ได้แก่

7.1.2.1 คาร์บอน (carbon) โดยปกติแล้วเซลล์พืชสีเขียวเมื่อนำมาเพาะเลี้ยง (culture) มักจะมีการสังเคราะห์แสงลดลง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเพิ่มสารพวกคาร์บอนจากแหล่งภายนอกลงไปในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งมักได้จากน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งได้แก่ น้ำตาลซูโครส (sucrose) กลูโคส (glucose) และฟรุคโตส (fructose) เป็นต้น

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

7.1.2.2 วิตามิน (vitamins) พืชส่วนมากที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อสามารถสร้างวิตามินได้เอง แต่มีปริมาณไม่เพียงพอจึงต้องเพิ่มวิตามินลงในอาหารสังเคราะห์เพื่อให้พืชเจริญเติบโตได้อย่างปกติ เนื่องจากวิตามินมีหน้าที่เป็น coenzyme ในขบวนการต่างๆ ชนิดที่มีการใช้กันมากในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือ ไทอามีน (thiamine, B_1)

7.1.2.3 กรดอะมิโน (amino acid) กรดอะมิโนทั้งหลายไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช ยกเว้นไกลซีน (glycine) ซึ่งมีการใช้ในหลายสูตรอาหาร การเติมกรดอะมิโนลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นเพื่อเพิ่มการเจริญของเซลล์ ส่งเสริมการพัฒนาไปเป็นต้นของพืช

7.1.2.4 สารประกอบธรรมชาติที่ซับซ้อน (natural complexes) สารประกอบที่ซับซ้อนที่มีการนำมาใช้ส่วนใหญ่นั้น ได้จากสารสกัดจากพืช เช่น น้ำมะพร้าว น้ำมะเขือเทศ กล้วยหอม น้ำและเนื้อมันฝรั่ง สารสกัดจากยีสต์ และ protein hydrolysates (เช่น casine hydrolysate, peptone และ tryptone)

น้ำต้มมันฝรั่ง ในมันฝรั่งมีโพลีเอมีน (polyamine) และ biosynthetic enzyme กระจายอยู่ทั่วไปในส่วนต่างๆ ซึ่งสารโพลีเอมีนมีผลต่อการเจริญและพัฒนาของเซลล์ โดยเฉพาะมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของกรดนิวคลีอิค (nucleic acid) ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิส (mitosis) ในเนื้อเยื่อมากขึ้น นอกจากนี้ในมันฝรั่งยังประกอบด้วยแป้ง น้ำตาล โปรตีนและวิตามินอีกด้วย การใส่น้ำต้มมันฝรั่งในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ มีรายงานว่าส่งผลให้เมล็ดงอกได้ดีขึ้นและต้นอ่อนมีความแข็งแรง (Arditti and Ernst 2008)

7.1.2.5 ผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) ผงถ่านผลิตมาจากไม้ที่ถูกคาร์บอไนซ์ด้วยอุณหภูมิสูงควบคู่ไปกับไอน้ำ ภายในเป็นรูที่เป็นตาข่ายละเอียด ซึ่งสามารถดูดแก๊สหรือช่วยดูดซับสารพิษของสารประกอบฟีนอล และเมลานิน (melanin) ทำให้เกิดสภาพดำมืดของอาหารส่งผลให้เกิดรากได้ดี และช่วยคงสภาพเสถียรของพีเอช (pH) (คำนูน 2544)

7.2 สารควบคุมการเติบโตของพืช (plant growth regulator) หรือ ฮอร์โมนพืชเป็นสารที่พืชสร้างขึ้น แม้ว่าจะมีในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพทางสรีรวิทยาของพืช โดยมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นหรือยับยั้งการเจริญเติบโตในพืชนั้นๆ ซึ่งสารควบคุมการเติบโตของพืชที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ออกซิน(auxin) และ ไซโตไคนิน (cytokinin) ส่วนกลุ่มอื่นที่จัดเป็นสารควบคุมการเติบโตของพืช คือ gibberellins abscisic acid และ ethylene นั้นไม่ค่อยนิยมใช้ จะใช้บ้างในพืชบางชนิดเท่านั้น (บุษราภรณ์ 2548)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

7.3 วุ้น (gelling agents) จัดเป็นพวกพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีมวลโมเลกุลสูง ช่วยทำให้อาหารแข็งตัว วุ้นส่วนใหญ่ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้มาจากผลผลิตของสิ่งมีชีวิต คือ สาหร่ายน้ำเค็ม มีหลายชนิดได้แก่ agar agarose และ gelrite (Arditti and Ernst 2008)

8. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้รองเท้านารีในสภาพปลอดเชื้อ

สำหรับการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชผลิตกล้วยไม้รองเท้านารี ได้มีการวิจัยและพัฒนาจากห้องปฏิบัติการในหลายประเทศ เช่น จีน ไต้หวัน และอินเดีย เป็นต้น [Chen *et al*. (2004), Sama *et al*. (2004), Yung and Nean (2001) Huang *et al*. (2001)] เพื่อให้เกิดศักยภาพในการผลิตกล้วยไม้รองเท้านารีในปริมาณมากตามต้องการและสามารถนำออกปลูกได้ในสภาพธรรมชาติ โดยมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับกล้วยไม้รองเท้านารี พอสรุปได้ดังนี้

Lin *et al*. (2000) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Paphiopedilum* hybrid (*Paphiopedilum callosum* 'Oakhi' x *Paph. Lawreneanum* 'Tradition') ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ชักนำจาก Protocorm ซึ่งได้จากการเพาะเมล็ด พบว่า สูตรอาหาร 1/2 Murashige and Skoog, 1962 (MS) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

ความเข้มข้น 1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีการเจริญดีเมื่อย้ายไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารเดิม แต่จะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถพัฒนาเป็น protocorm-like bodies (PLBs) และต้นที่สมบูรณ์ สามารถย้ายลงปลูกในกระถางและมีการเจริญเติบโตที่ดี

Huang *et al*. (2001) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Paphiopedilum* hybrid ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยดัดแปลงส่วนประกอบของอาหารเพื่อชักนำให้เกิดยอดอย่างรวดเร็ว โดยใช้สูตรอาหาร MS ร่วมกับ Murashige & Tucker, 1969 (MT) วิตามิน, ไกลซีน และอินโนซิทอล ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต 6-benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 13 ไมโครโมลาร์ α-Naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 1.6 ไมโครโมลาร์ adenine sulfate (Ads) 0.15 มิลลิโมลาร์ $NaH_2PO_4.H_2O$ 1.23 มิลลิโมลาร์ น้ำตาล 0.18 โมล และน้ำมะพร้าวจากผลมะพร้าวอ่อน 15 เปอร์เซ็นต์ (v/v) หรือ casein hydrolysate 1 กรัมต่อลิตร หรือน้ำต้มมันฝรั่ง (potato homogenate) 10 กรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนยอดแบบทวีคูณและการชักนำให้เกิดราก เพียงขั้นตอนเดียวหรือบนสูตรอาหารเดียวจากยอดที่ปลอดเชื้อของต้นกล้าจากผู้ปรับปรุงพันธุ์เพื่อการค้า พบว่า TDZ ส่งผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของยอดและราก น้ำตาลมอลโตส ลดการเกิดราก ซึ่งวิธีการข้างต้นสามารถเพิ่มจำนวนของ *Paphiopedilum* ได้ทุกๆ 12 สัปดาห์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Yung and Nean (2001) ศึกษาอายุของฝักที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ด สูตรอาหาร 1/2 MS, 1/8 MS และ Thomale GD media, 1954 (TM) ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum primulinum* โดยทดลองใส่ น้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำมันฝรั่งต้ม 20 กรัมต่อลิตร ทริปโตน 2 กรัมต่อลิตร และ น้ำต้มกล้วย 20 กรัมต่อลิตร พบว่า อายุฝักที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดคือ 110 วัน หลังจากการผสมเกสร และพบว่า การใส่น้ำมะพร้าวสามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดได้ดีที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันฝรั่งต้ม และทริปโตน ตามลำดับ ส่วนน้ำต้มกล้วยให้ผลยับยั้งการงอกของเมล็ด นอกจากนี้พบว่า ผงถ่านกัมมันต์มีผลต่อความสามารถในการงอกของเมล็ดน้อย แต่ส่งผลต่อการพัฒนาของ protocorm และการเลี้ยงในอาหารเหลวมีอัตราการงอกของเมล็ดสูงกว่าการเลี้ยงบนอาหารแข็ง

Chen *et al*. (2002) ศึกษาการเกิดยอดทวีคูณจากตาของก้านช่อดอกกล้วยไม้ *Paphiopedilum philippinense* 2 สายพันธุ์ (PH59 และ PH60) โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเติบโต และประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D และ TDZ เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า สูตรอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเติบโตมีชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดยอด 33.3 และ 0 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ 1 และ 0 ชิ้น จากสายพันธุ์ PH59 และ PH60 ตามลำดับ ในสายพันธุ์ PH59

พบว่าสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ มีชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดยอดและจำนวนยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อมากที่สุด 66.7 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในสายพันธุ์ PH60 พบว่า สูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ มีชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดยอดมากที่สุด 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้มีจำนวนยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อมากที่สุด 7.0 ยอด และยอดที่ได้สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเติบโต เป็นเวลา 3 เดือน

Lee and Lee (2003) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Cypripedium formosanum* โดยการชักนำให้เกิดแคลลัสจาก protocorm ที่ได้จากการเพาะเมล็ด มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/4 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ และ TDZ ความเข้มข้น 4.54 ไมโครโมลาร์ พบว่า แคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณดีเมื่อย้ายไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารเดิม และเมื่อย้ายแคลลัสขนาด 4 มิลลิเมตร ไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แคลลัสมีการพัฒนาเป็น PLBs โดยเฉลี่ย 13 PLBs PLBs ที่ได้มีการพัฒนาจนมียอดและรากในสูตรอาหารที่มีผงถ่านกัมมันต์ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร และน้ำมันฝรั่งต้ม ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้น 24 สัปดาห์ ในสูตรอาหารเดิม PLBs พัฒนาเป็นพืชที่สมบูรณ์ พร้อมที่จะย้ายลงปลูกในกระถาง

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Chen *et al*. (2004b) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Paphiopedilum* hybrid 2 สายพันธุ์ (PH59 และ PH60) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการชักนำให้เกิดยอดจากบริเวณบาดแผลของชิ้นส่วนใบ เมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ดัดแปลงธาตุอาหาร (1/2 strength macro-and full-strength micro elements) ซึ่งไม่มีสารควบคุมการเติบโต ในที่มืดเป็นระยะเวลา 1 เดือน ส่วนผสมของสารควบคุมการเติบโต 2,4-D (0, 4.52 และ 45.25 ไมโครโมลาร์) และ TDZ (0, 0.45, 4.54 และ 22.71 ไมโครโมลาร์) ใช้ทดสอบการชักนำให้เกิดยอดของชิ้นส่วนใบ พบว่า ในสายพันธุ์ PH59 สูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 4.54 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนใบที่ใช้ทดลองได้ดีที่สุด ในสายพันธุ์ PH 60 สูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.45 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบที่ใช้ทดลองได้ดีที่สุด นอกจากนี้ สูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ TDZ 4.52 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 4.54 ไมโครโมลาร์ ชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนใบมากกว่าสูตรอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเติบโต พืชที่

สมบูรณ์จะมีจำนวนรากเฉลี่ย 1-3 ราก ที่เกิดจากการย้ายยอดที่ได้ไปเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเติบโตเป็นเวลา 22 เดือน

Sama and Kalita (2004) ศึกษาผลการตอบสนองของเมล็ด *Paphiopedilum insigne* ในสูตรอาหารต่างๆ คือ MS, Gamborg's medium (B_5), Knudson C, 1946 (KC) และ Vacin and Went, 1949 (VW) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโตความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยคิดจากอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของพืช ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเติบโตที่ส่งผลทำให้มีการงอกของเมล็ดมากที่สุด 85 เปอร์เซ็นต์ คือ สารควบคุมการเติบโต NAA และ 3-Indolebutyric acid (IBA) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร Kinetin (Kn) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ casein hydrolysate 100 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตรนี้เป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการพัฒนาและเพิ่มปริมาณของ PLBs ที่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

Shimura and Koda (2004) ศึกษาผลการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* โดยเก็บเมล็ดที่สมบูรณ์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน เพาะเลี้ยงโดยหว่านลงบนสูตรอาหาร Hyponex-peptone ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต NAA และไซโตไคนิน พบว่า เมล็ดสามารถพัฒนาเป็น PLBs แม้ว่าการเจริญเติบโตของ PLBs ค่อนข้างช้า แต่ต้นกล้วยไม้ที่สมบูรณ์สามารถขยายพันธุ์ได้ง่ายจากการเพาะเลี้ยง PLBs บนสูตรอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเติบโต PLBs ถูกย้ายไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารเดิม 8 ครั้ง ในเวลา 2 ปี โดยไม่มีการสูญเสีย และสามารถขยายพันธุ์ได้กล้วยไม้ที่สมบูรณ์จำนวน 10 ต้น จาก PLBs ขนาด 5 มิลลิเมตร จำนวน 1 PLBs ในเวลา 1 ปี

Lin *et al*. (2004) ศึกษาการงอกของเมล็ดจากฝักของ *Paphiopedilum armeniacum* และ *Paphiopedilum micranthum* อายุ 120 วัน และ 180 วัน หลังจากการผสมเกสร เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/4 MS, MS, Rappaport, Konforti and Navon, 1956 (R), KC, VW และ Hyponex 1 โดยเก็บผลหลังจากเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ เป็นเวลา 120 วัน พบว่า ในสูตรอาหารที่มีแร่ธาตุน้อยมีอัตราการงอกของเมล็ด มากกว่าในสูตรอาหารที่มีแร่ธาตุมาก การงอกของเมล็ดมีมากที่สุดในสูตรอาหาร R และน้ำมะพร้าวมีส่วนช่วยกระตุ้นให้เกิดการงอกของเมล็ด การเติมผงถ่าน กัมมันต์ ปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร และกล้วยบด ปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร ทำให้การเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นกล้าดีขึ้น

Yan *et al*. (2006) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Cypripedium flavam* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณจากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร Harvais, 1974 (Harvais) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโตไซโตไคนิน 2 ชนิด (N-Benzyl-9-(2-tetrahydropyranyl) adenine (BAP) หรือ Kn) ร่วมกับน้ำต้มมันฝรั่ง ที่มีความเข้มข้น

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

แตกต่างกัน พบว่า สารควบคุมการเติบโต BAP สามารถชักนำให้เกิดยอดทวีคูณมากกว่าสารควบคุมการเติบโต Kn สูตรอาหาร Harvais ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BAP ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับน้ำต้มมันฝรั่ง ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดทวีคูณมากที่สุด 95 เปอร์เซ็นต์ ของต้นอ่อนที่ใช้ทดลอง และมียอดเกิดมากที่สุด 2.55 ยอดต่อต้นอ่อน 1 ต้น สำหรับการชักนำให้เกิดรากและการรอดชีวิต สูตรอาหาร 1/2 Harvais ที่มีผงถ่านกัมมันต์ปริมาณ 0.6 กรัมต่อลิตร ส่งผลต่อการเกิดรากและมีการรอดชีวิตสูงที่สุด จากการศึกษานี้แสดงว่ากล้วยไม้ *Cypripedium flavam* สามารถขยายพันธุ์โดยการทำให้เกิดยอดทวีคูณจากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ด

Hong *et al*. (2008b) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Alma Gavaert' จาก PLBs โดยตรงและการเกิดยอดทวีคูณจากแคลลัสที่พัฒนาจากเมล็ด โดยชักนำเมล็ดที่ได้จากฝักอายุ 5 เดือน ให้พัฒนาเป็นแคลลัสบนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 22.6 ไมโครโมลาร์ และ TDZ ความเข้มข้น 4.54 ไมโครโมลาร์ ในที่มืด แคลลัสมีการเพิ่มปริมาณอย่างมาก และไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเมื่อย้ายลงบนสูตรอาหารเดิมทุกๆ 2 เดือน เป็นเวลามากกว่า 2 ปี และเมื่อย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต NAA ความเข้มข้น 26.85 ไมโครโมลาร์ แคลลัสพัฒนาเป็น PLBs หรือ ยอด เฉลี่ย 4.7 PLBs ต่อยอด จากแคลลัสแต่ละชิ้นที่ทำการทดลองหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วัน หลังจากนั้น 72 และ 240 วัน ของการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารเดิม ทำให้ได้ตายอดจำนวน 25 ตายอดและพืชที่สมบูรณ์จำนวน 75 ต้น จากการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณจากการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น สารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ มีความเหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและสามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 3 ยอด หลังจากเพาะเลี้ยงยอดอ่อนเป็นเวลา 60 วัน พืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโตเป็นปกติเมื่อย้ายไปปลูกด้วยสแฟกนั่มมอสในเรือนกระจก

Ng and Saleh (2010a) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Paphiopedilum rothschildianum* จาก primary PLBs ให้เกิด secondary PLBs ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเพาะ เลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคาการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 ไมโครโมลาร์ หรือ Kn ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 ไมโครโมลาร์ พบว่า สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิด secondary PLBs ได้ดีที่สุดคือ สูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.0 ไมโครโมลาร์ โดยมีจำนวน secondary PLBs เกิดขึ้นเฉลี่ย 4.1 PLBs ต่อ 1 primary PLBs ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ และเมื่อเพาะเลี้ยง secondary PLBs ที่เกิดขึ้นบน

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

สูตรอาหาร 1/2 MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเติบโต แต่ประกอบด้วยน้ำต้มกล้วยความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิด secondary PLBs ใหม่ เฉลี่ย 9.5-12.1 PLBs.

Ng and Saleh (2010b) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Paphiopedilum rothschildianum* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณจากตาข้างและยอดโดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วย organic nitrogen คือ casein hydrolysate peptone และ trytone-peptone ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร พบว่า สูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วย organic nitrogen สามารถเพิ่มจำนวนยอดทวีคูณได้มากกว่าสูตรอาหารที่ไม่มี organic nitrogen จากทั้งตาข้างและยอด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.9 ยอดต่อตาข้าง และ 2.8 ยอดต่อยอดเดิม หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์ บนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วย peptone ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร และ tryptone-peptone ความเข้มข้น 2.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จะเกิดราก 3-4 ราก และเมื่อย้ายลงปลูกในเรือนกระจกมีอัตราการรอดชีวิต 90 เปอร์เซ็นต์

Long *et al*. (2010) ศึกษาอายุของฝัก ชนิดของอาหาร แหล่งของคาร์บอน และสารอินทรีย์ ที่ส่งผลต่อการงอกของเมล็ด การพัฒนาของโปโตรคอม และการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ *Paphiopedilum villosum* var. *densissimum* พบว่า มีอัตราการขยายพันธุ์เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ฝักที่มีอายุ 200 วันหลังจากเพาะเมล็ด เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร KC ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและน้ำมะพร้าว และศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโตต่อการเกิดยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 4 ชนิด พบว่า สารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มอัตราการเกิดยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum villosum* var. *densissimum* และ *Paphiopedilum insigne* (Lindl.) ตามลำดับ ส่วนสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 5.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มอัตราการเกิดยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum bellatulum* (Rchb. f.) Stein และ *Paphiopedilum armeniacum* S. C. Chen et F. Y. Liu ได้มากที่สุด ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

9. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้จากชิ้นส่วนใบในสภาพปลอดเชื้อ

งานวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้จากชิ้นส่วนใบ เป็นวิธีการหนึ่งที่นักวิจัยเลือกใช้ในการขยายพันธุ์กล้วยไม้ เนื่องจากเป็นชิ้นส่วนพืชที่หาง่าย ขั้นตอนการปฏิบัติไม่ซับซ้อน และสามารถขยายพันธุ์กล้วยไม้ได้เป็นจำนวนมาก พอสรุปได้ดังนี้

Nayak *et al*. (1997) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Acampe praemora* (Roxb.) Blatter and McCann ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบ เพื่อชักนำให้เกิดยอดโดยตรง พบว่า สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอดและจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนของใบมากที่สุด และพบว่า สารควบคุมการเติบโต NAA ความเข้มข้นต่ำ ไม่ส่งผลให้มีการเกิดยอดมากขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต BA Kn และ TDZ อีกทั้งสารควบคุมการเติบโต NAA ความเข้มข้นสูงส่งผลยับยั้งการเกิดยอด ยอดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงสามารถชักนำให้เกิดรากได้จากสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

Chen *et al*. (1999) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Oncidium* Gower Ramsey ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบของใบอ่อน เพื่อชักนำให้เกิด somatic embryos โดยตรงจากเนื้อเยื่อ epidermal และ mesophyll cell ที่บริเวณปลายใบและบริเวณบาดแผล พบว่า สูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.3-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิด somatic embryos ภายในเวลา 1 เดือน

Chen and Chang (2001) ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโตออกซิน และไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิด somatic embryos โดยตรง จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Oncidium* Gower Ramsey ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า สูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโตออกซิน (Indole-3-acetic acid (IAA), IBA, NAA และ 2,4-D) ส่งผลยับยั้งการเกิด somatic embryos เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และพบว่า สูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโตไซโตไคนิน ชนิด TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิด somatic embryos มากที่สุด ที่บริเวณ ปลายใบ adaxial side และบาดแผล คิดเป็น 75, 40 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีจำนวน somatic embryos เฉลี่ย 10.7 somatic embryos ต่อชิ้นส่วนใบที่ทดลอง

Park *et al*. (2002a) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Phalaenopsis* 4 สายพันธุ์ คือ Tinny Sunshine ‘Annie’, ‘Taisuco Hatarot’, Teipei Gold ‘Golden Star’ และ Tinny Galaxy ‘Annie’ ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบ พบว่า สูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 88.8 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 5.4 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิด PLBs มากที่สุด 85 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวน PLBs เฉลี่ย 10-13 PLBs ต่อชิ้นส่วนใบที่ทดลอง หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ และพบว่า PLBs เพิ่มจำนวนอย่างมากเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex (1 กรัมต่อลิตร 6.5N-4.5P-19K + 20N-20P-20K + เปปโตน 2 กรัมต่อลิตร + น้ำต้มมันฝรั่ง 3 เปอร์เซ็นต์ + ผงถ่านกัมมันต์ 0.05 เปอร์เซ็นต์) มีจำนวน PLBs เกิดขึ้นเฉลี่ย 13-18 PLBs ต่อ 1 PLB ที่ทดลอง

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Park *et al*. (2002b) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Doritaenopsis* hybrid ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบ ด้วยวิธี thin-section culture เพื่อชักนำให้เกิด PLBs โดยตรง พบว่า สูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ส่งผลต่อการชักนำให้เกิด PLBs มากกว่าสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BA และ zeatin เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบหนา 1 มิลลิเมตร บนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 9.0 ไมโครโมลาร์ มีจำนวน PLBs เกิดขึ้น 72.3 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวน PLBs เฉลี่ย 18 PLBs ต่อชิ้นส่วนใบที่ทดลอง ซึ่ง PLBs เกิดใกล้กับบริเวณบาดแผลและส่วน epidermal cell

Chen and Chang (2004) ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) ต่อการชักนำให้เกิด somatic embryos โดยตรง จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Oncidium* Gower Ramsey ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า สูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TIBA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิด somatic embryos ที่บริเวณปลายใบ adaxial side, abaxial side และรอยตัด คิดเป็น 55, 47.5, 27.5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีจำนวน somatic embryos เฉลี่ย 134.2 embryos ต่อจานเพาะเลี้ยง ในเวลา 8 สัปดาห์ และพบว่า สารควบคุมการเติบโต IAA, 2,4-D, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7- trihydroxy-4*H*-chromen-4-one (quercetin) และ 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic acid (PICB) ส่งผลยับยั้งการเกิด somatic embryos

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Chen and Chang (2006) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Phalaenopsis amabilis* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบ เพื่อชักนำให้เกิด somatic embryos โดยตรงจาก epidermal cell พบว่า สูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3.0 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิด somatic embryos มากที่สุด เฉลี่ย 19.4 embryos ต่อชิ้นส่วนใบที่ทดลอง

Kuo *et al*. (2005) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Phalaenopsis* Little Steve ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบ เพื่อชักนำให้เกิด somatic embryos โดยตรง พบว่า สูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BA และ TDZ สามารถชักนำให้เกิด somatic embryos ที่บริเวณผิวใบและบาดแผล หลังจากเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 20-30 วัน และพบว่า สูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นสูง ส่งผลยับยั้งการเกิด somatic embryos

Chung *et al*. (2007) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Dendrobium* cv. Chiengmai Pink ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบขนาด 1 เซนติเมตร เพื่อชักนำให้เกิด somatic embryos โดยตรง พบว่า สูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิด somatic embryos มากที่สุด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็น

เวลา 60 วัน somatic embryos ส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่บริเวณผิวใบใกล้กับบริเวณรอยตัดและบริเวณปลายใบเล็กน้อย

Gow *et al*. (2008) ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโตต่อการชักนำให้เกิด embryo โดยตรงจากชิ้นส่วนใบกล้วยไม้ *Phalaenopsis* 2 สายพันธุ์ คือ *Phalaenopsis amabilis* และ *Phalaenopsis* Nebula พบว่า พันธุกรรมมีผลต่อการชักนำให้เกิด embryo สารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 13.3 ไมโครโมลาร์ และ 6-(γ,γ-Dimethylallylamino) purine (2iP) ความเข้มข้น 4.92 ไมโครโมลาร์ มีความเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิด embryo กับสายพันธุ์ *Phalaenopsis amabilis* และ *Phalaenopsis* Nebula ตามลำดับ

10. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้จากเนื้อเยื่อระหว่างข้อของก้านช่อดอกในสภาพปลอดเชื้อ

จากรายงานวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเนื้อเยื่อระหว่างข้อค่อนข้างน้อย พอสรุปได้ดังนี้

Lin (1986) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Phalaenopsis* และ *Doritaenopsis* จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระหว่างข้อของก้านช่อดอก บนสูตรอาหาร VW ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีการเกิด PLBs จากเนื้อเยื่อส่วนเอพิเดอร์มิส และผิวหน้าของรอยตัด และพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน และทราบว่าระยะการพัฒนาของก้านช่อดอกมีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิด PLBs ซึ่งระยะที่เหมาะสมคือก่อนการเกิดดอกแรก และเนื้อเยื่อบริเวณใกล้ปลายยอดของก้านช่อดอกมีความเหมาะสมที่สุดต่อการชักนำการเกิด PLBs

Chen *et al*. (2002) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Epidendrum radicans* จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระหว่างข้อของก้านช่อดอก บนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ พบว่า สามารถชักนำการเกิด PLBs ในเวลา 2 เดือน และสามารถเพิ่มจำนวน PLBs ได้มากที่สุด 23.6 PLBs ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร NH_4NO_3 ความเข้มข้น 825 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KNO_3 ความเข้มข้น 950 มิลลิกรัมต่อลิตร และ PLBs สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์เมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้นเดิม ในเวเลา 1 เดือน

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

11. การศึกษาผลของน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ

จากรายงานวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้มีผู้วิจัยหลายท่านได้ทดลองศึกษาผลของน้ำตาลชนิดต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ เพื่อให้การขยายพันธุ์กล้วยไม้มีประสิทธิภาพมากขึ้น พอสรุปได้ดังนี้

Islam and Ichihashi (1999) ศึกษาน้ำตาล 3 ชนิด (ซูโครส มอลโตส และซอบิทอล) ต่อการพัฒนาของแคลลัสและการเพิ่มจำนวนของกล้วยไม้ *Phalanopsis*, *Doritaenopsis* และ *Neofinetia* พบว่า แคลลัสของกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสมีการพัฒนามากขึ้นเมื่อใส่น้ำมะพร้าวแต่มีสีเหลือง เกาะกันแบบหลวมๆ หลังจากย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่ 3 ครั้ง แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลมอลโตส หรือซอบิทอลส่วนใหญ่ พัฒนาเป็น PLBs และยังพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ ปกติและแข็งแรง มีแคลลัสของกล้วยไม้ *Phalanopsis* และ *Neofinetia* ส่วนน้อยที่พัฒนาเป็นแคลลัสสีเขียวและพัฒนาต่อไป แต่ไม่เกิดเป็น PLBs หรือพืชที่สมบูรณ์

Tokuhara and Mii (2003) ศึกษาน้ำตาล 6 ชนิด (กลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส แลกโตส ซอบิทอล และ ซูโครส ความเข้มข้น 58.4 มิลลิโมลาร์) ต่อการชักนำให้เกิด somatic embryos จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของกล้วยไม้ *Doriataenopsis* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ บนสูตรอาหารแข็ง New Dogashima medium (NDM) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ พบว่า สูตรอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส สามารถชักนำให้เกิด PLBs ได้ดีที่สุด น้ำตาลมอลโตส และซอบิทอลสามารถชักนำให้เกิด PLBs แต่ไม่พบการเพิ่มปริมาณของแคลลัส น้ำตาลซูโครสสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เหมือนกับน้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิด PLBs น้ำตาลฟรุคโตสสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ประมาณครึ่งหนึ่งของน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลกโตสไม่สามารถชักนำให้เกิดทั้ง PLBs และแคลลัส

Faria *et al*. (2004) ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (0, 5, 10, 20, 30 และ 60 กรัมต่อลิตร) ต่อการเจริญเติบโตและการเกิดรากกล้วยไม้ *Dendrobium nobile* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ บนสูตรอาหารดัดแปลง MS พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง MS ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ต้นอ่อนมีความสูงมากที่สุดเฉลี่ย 4.21 ± 0.60 เซนติเมตร และมีการเกิดยอดทวีคูณในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 แต่น้ำตาลซูโครสไม่มีอิทธิผลต่อการเกิดรากของต้นอ่อน

Rahman *et al*. (2005) ศึกษาน้ำตาล 3 ชนิด (ซูโครส มอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และซอบิทอล ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร) ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสและการชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ของกล้วยไม้ *Doritaenopsis* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนสูตรอาหาร New

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Phalaenopsis (NP) พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร NP ที่มีน้ำตาลซูโครส สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้มากกว่าสูตรอาหาร NP ที่มีน้ำตาลมอลโตสและซอร์บิทอล เซลล์มีลักษณะเกาะกันอย่างหลวมๆ มีสีเหลืองใส แสงส่องผ่านได้น้อย ซึ่งเหมือนลักษณะแคลลัสเริ่มต้นและไม่เกิด PLBs แต่แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร NP ที่มีน้ำตาลมอลโตส มีสีเขียวและมีการเกิดเป็น PLBs มากว่าน้ำตาลซอร์บิทอล น้ำตาลซอร์บิทอล ส่งผลให้ PLBs พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ดีกว่าน้ำตาลมอลโตสและซูโครส แต่อย่างไรก็ตาม น้ำตาลมอลโตสทำให้ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดีกว่าน้ำตาลซอร์บิทอลและซูโครส

Jheng *et al*. (2006) ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ *Oncidium* Gower Ramsey พบว่า พืชที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส หรือทรีฮาโลส ส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตมากกว่าพืชที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส อย่างมีนัยสำคัญ PLBs จำนวน 6,000 PLBs โดยประมาณได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสเริ่มต้นที่มีน้ำหนัก 1 กรัม ในระยะเวลา 2 เดือน และมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของ PLBs พัฒนาเป็นพืชที่สมบูรณ์ในระยะเวลา 4 เดือน หลังจากย้ายไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่มีน้ำตาลทรีฮาโลส ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Novotna *et al*. (2007) ศึกษาชนิดของน้ำตาลและสารควบคุมการเติบโตที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ *Dactylorhiza* species พบว่า น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ส่งผลกระตุ้นให้ต้นอ่อนมีการพัฒนาที่ดี อัตราการเจริญเติบโตและความยาวของยอดมีการพัฒนาดีขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนในสูตรอาหารที่มีสารควบคุมการเติบโต BA ร่วมกับ IBA และอัตราการเจริญเติบโตและความยาวของรากมีการพัฒนาดีขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนในสูตรอาหารที่มีสารควบคุมการเติบโต IBA ร่วมกับ NAA

Hong *et al*. (2008a) ศึกษาผลของน้ำตาล 5 ชนิด (เซลโลไบโอส ฟรุคโตส กลูโคส มอลโตส และซูโครส ความเข้มข้น 10, 20, 30 และ 60 กรัมต่อลิตร) ต่อการชักนำให้เกิด somatic embryos จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Oncidium* 2 สายพันธุ์ (*Oncidium* cv. Gower Ramsey และ *Oncidium* cv. Sweet Sugar) พบว่า สูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลเซลโลไบโอส ส่งผลยับยั้งการเกิด somatic embryos และทำให้เกิด browning กับกล้วยไม้ทั้ง 2 สายพันธุ์ ในกล้วยไม้ *Oncidium* cv. Gower Ramsey พบว่า สูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิด somatic embryos มากที่สุด และในกล้วยไม้ *Oncidium* cv. Sweet Sugar พบว่า สูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิด somatic embryos มากที่สุด

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 พืชทดลอง

กล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ในขวดปลอดเชื้อ อายุ 14 เดือนหลังจากเพาะเมล็ด จาก KIT's Orchids 56/3 ซอยกรุงเทพนนท์ 7 ถนนกรุงเทพฯ-นนทบุรี อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

1.2.1 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์

- Hyponex (N:P:K = 6.5-6-19; Hyponex Co., Marysville, Ohio, USA)
- MS (Murashige and Skoog, 1962)
- Phytagel (Sigma, P 8169)
- Peptone (Criterion, C6531)
- ผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal)

1.2.2 แหล่งคาร์โบไฮเดรต

- ซูโครส (sucrose)
- กลูโคส (glucose)
- มอลโตส (maltose)

1.2.3 สารควบคุมการเติบโต

- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
- 6-benzyladenine (BA)
- adenine sulfate (Ads)
- kinetin (Kn)
- thidiazuron (TDZ)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

1.3 อุปกรณ์

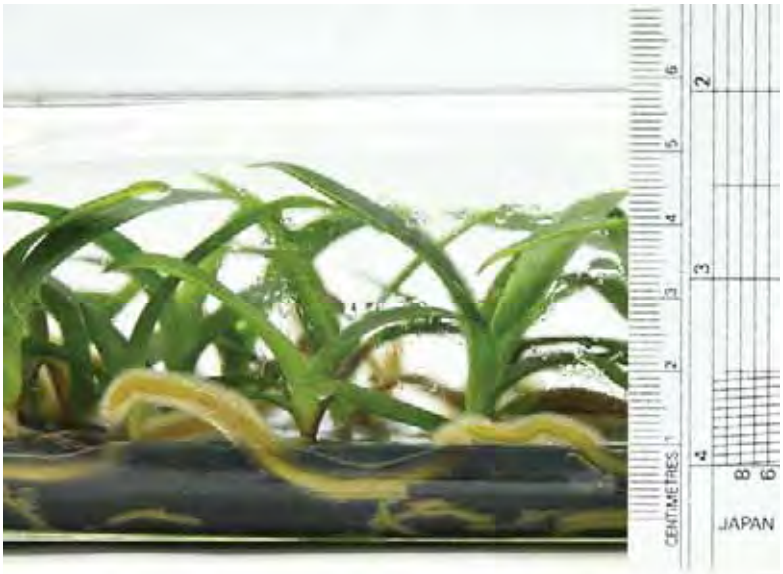
1.3.1 อุปกรณ์และวัสดุสำหรับใช้เตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- เครื่องชั่งแบบละเอียดและหยาบ
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เตาไฟฟ้า (hot plate)
- เตาไมโครเวฟ (microwave)
- ช้อนตักสารเคมี
- เครื่องแก้ว: บีกเกอร์ ขวดใส่อาหาร แท่งแก้ว กระบอกตวง และปิเปตต์

1.3.2 อุปกรณ์และวัสดุสำหรับตัดและถ่ายเนื้อเยื่อ

- ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อพืช (lamina air flow)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- จานแก้ว
- เครื่องมือผ่าตัด: ด้ามมีด ใบมีด และปากคีบ
- ขวดแช่เครื่องมือ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์



ภาพที่ 2 ต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ในขวดปลอดเชื้อ อายุ 14 เดือนหลังจากเพาะเมล็ด

2. วิธีการทดลอง

2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

2.1.1 ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

นำต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' อายุ 14 เดือนหลังจากเพาะเมล็ด มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex [ปุ๋ย Hyponex (6.5N-4.5P-19K) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร + เปปโตน (peptone) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร + น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร] เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (รูปที่ 3A) เพื่อให้ต้นกล้วยไม้ปรับตัวกับสูตรอาหารข้างต้น จากนั้นนำมาตัดแต่งใบให้เหลือจำนวน 3 ใบ และตัดรากที่เกิดขึ้น (รูปที่ 3B) และเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต ดังตารางที่ 1

ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติมวุ้น (Gelrite) 2.4 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และผงถ่านกัมมันต์ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ในขวดเพาะเลี้ยงปริมาตร 240 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร (นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) pH 5.40±0.01 สภาพที่ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 30-35 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

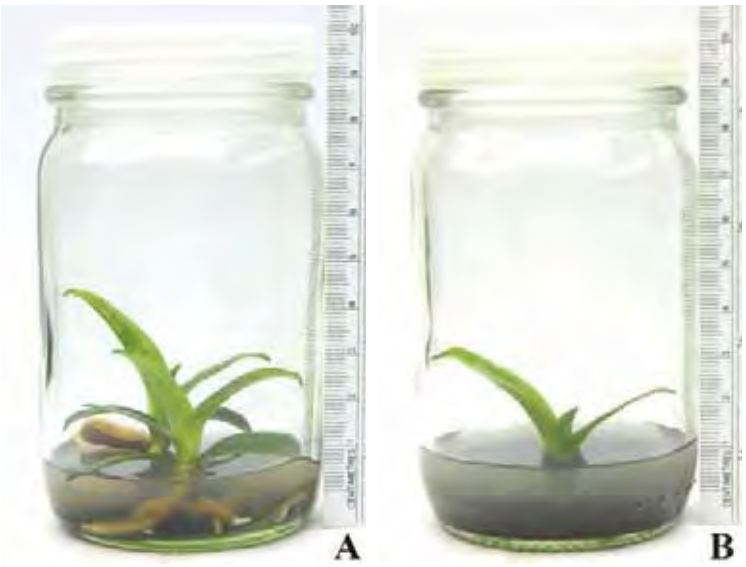
มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บันทึกผลหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ โดยบันทึกน้ำหนักสด จำนวนใบและรากของยอดกล้วยไม้เริ่มต้น และเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด น้ำหนักสด จำนวนใบและรากของยอดกล้วยไม้ที่เกิดใหม่

ตารางที่ 1 สารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

สูตรอาหาร	สารควบคุมการเติบโต				
	TDZ (μM)	BA (μM)	Kn (μM)	2,4 -D (μM)	Ads (μM)
1					
2	0.45				
3	4.54				
4		2.22			
5		4.44			
6			4.65		
7			9.29		
8	0.45			4.52	
9	4.54			4.52	
10		2.22		4.52	
11		4.44		4.52	
12			4.65	4.52	
13	0.45				27.10
14	4.54				27.10
15		2.22			27.10
16		4.44			27.10

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์



ภาพที่ 3 ลักษณะของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'DeIrosi'

(A) ต้นกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex เป็นเวลา 2 สัปดาห์

(B) ต้นกล้วยไม้ที่ตัดแต่งใบให้เหลือจำนวน 3 ใบ และตัดรากออก (ส่วนยอด)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2.1.2 ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

นำต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' อายุ 19 เดือนหลังจากเพาะเมล็ด มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex [ปุ๋ย Hyponex (6.5N-4.5P-19K) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร + เปปโตน (peptone) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร + น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร] เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (รูปที่ 3A) เพื่อให้ต้นกล้วยไม้ปรับตัวกับสูตรอาหารข้างต้น จากนั้นนำมาตัดแต่งใบให้เหลือจำนวน 3 ใบ และตัดรากที่เกิดขึ้น (รูปที่ 3B) เช่นเดียวกับการทดลอง 2.1.1 และเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต ดังตารางที่ 2

ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติมวุ้น (Gelrite) 2.4 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และผงถ่านกัมมันต์ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ในขวดเพาะเลี้ยงปริมาตร 240 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร (นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) pH 5.40±0.01 สภาพที่ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 30-35 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บันทึกผลหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ โดยบันทึกน้ำหนักสด จำนวนใบและรากของยอดกล้วยไม้เริ่มต้น และเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด น้ำหนักสด จำนวนใบและรากของยอดกล้วยไม้ที่เกิดใหม่

ตารางที่ 2 สารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

สูตรอาหาร	สารควบคุมการเติบโต			
	TDZ (μM)	BA (μM)	Kn (μM)	2,4 -D (μM)
1				
2	0.45			
3	2.25			
4		4.44		
5		8.88		
6			2.32	
7			4.65	
8	0.45			4.52
9	0.45			13.56
10	2.25			4.52
11	2.25			13.56
12		4.44		13.56
13		8.88		13.56

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2.2 ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

นำต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' อายุ 14 เดือนหลังจากเพาะเมล็ด มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex [ปุ๋ย Hyponex (6.5N-4.5P-19K) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร + เปปโตน (peptone) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร + น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร] เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (รูปที่ 3A) เพื่อให้ต้นกล้วยไม้ปรับตัวกับสูตรอาหารข้างต้น จากนั้นนำมาตัดแต่งใบให้เหลือจำนวน 3 ใบ และตัดรากที่เกิดขึ้น (รูปที่ 3B) และเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ และสารควบคุมการเติบโต ดังตารางที่ 3

ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติมวุ้น (Gelrite) 2.4 กรัมต่อลิตร น้ำตาลชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และผงถ่านกัมมันต์ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ในขวดเพาะเลี้ยงปริมาตร 240 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร (นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) pH 5.40±0.01 สภาพที่ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 30-35 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บันทึกผลหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ โดยบันทึกน้ำหนักสด จำนวนใบและรากของยอดกล้วยไม้เริ่มต้น และเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด น้ำหนักสด จำนวนใบและรากของยอดกล้วยไม้ที่เกิดใหม่

ตารางที่ 3 ชนิดของน้ำตาลและสารควบคุมการเติบโตที่ใช้ในการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

สูตรอาหาร	น้ำตาล 20 (g/l)	สารควบคุมการเติบโต		
		TDZ (μM)	Kn (μM)	2,4-D (μM)
1	sucrose	0.45		4.52
2	sucrose		4.65	4.52
3	glucose	0.45		4.52
4	glucose		4.65	4.52
5	maltose	0.45		4.52
6	maltose		4.65	4.52

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออก

นำต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 16 สัปดาห์ เพื่อให้ข้อ เนื้อเยื่อระหว่างข้อ และใบที่บริเวณยอดมีความยาวพอที่จะตัดออกได้ จากนั้นนำต้นที่ตัดส่วนยอดออก (รูปที่ 5) เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ดัดแปลงสูตร Hyponex [ปุ๋ย Hyponex (6.5N-4.5P-19K) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร + เปปโตน (peptone) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร + น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร] ที่ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ และสารควบคุมการเติบโต ดังตารางที่ 4

ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติมวุ้น (Gelrite) 2.4 กรัมต่อลิตร น้ำตาลชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และผงถ่านกัมมันต์ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ในขวดเพาะเลี้ยงปริมาตร 240 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร (นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) pH 5.40±0.01 สภาพที่ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 30-35 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

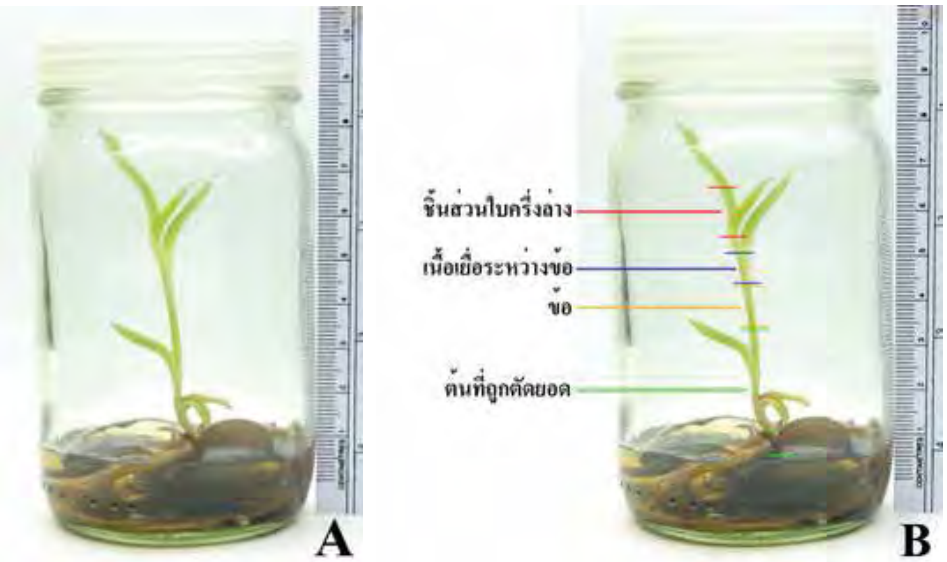
บันทึกผลหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ โดยบันทึกการรอดชีวิตของต้นกล้วยไม้เดิม และเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด น้ำหนักสด จำนวนใบและรากของยอดกล้วยไม้ที่เกิดใหม่

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 4 ชนิดของน้ำตาลและสารควบคุมการเติบโตที่ใช้ในการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออก

สูตรอาหาร	น้ำตาล (20 g/l)	สารควบคุมการเติบโต		
		TDZ (μM)	Kn (μM)	2,4-D (μM)
1	sucrose			
2	sucrose	0.45		
3	sucrose	0.45		4.52
4	sucrose		4.65	4.52
5	glucose			
6	glucose	0.45		
7	glucose	0.45		4.52
8	glucose		4.65	4.52
9	maltose			
10	maltose	0.45		
11	maltose	0.45		4.52
12	maltose		4.65	4.52

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์



ภาพที่ 4 ลักษณะต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากเพาะเลี้ยงในที่มืด

(A) ต้นกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 16 สัปดาห์

(B) ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อต่างๆ ที่นำมาใช้ในการทดลอง

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 5 ลักษณะการเพาะเลี้ยงต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออก

2.4 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

นำส่วนข้อของต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' จากการทดลองที่ 2.3 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ดัดแปลงสูตร Hyponex [ปุ๋ย Hyponex (6.5N-4.5P-19K) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร + เปปโตน (peptone) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร + น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร] (รูปที่ 6) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ และสารควบคุมการเติบโต ดังตารางที่ 5

ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติมวุ้น (Gelrite) 2.4 กรัมต่อลิตร น้ำตาลชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และผงถ่านกัมมันต์ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ในขวดเพาะเลี้ยงปริมาตร 120 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตร (นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) pH 5.40±0.01 สภาพที่ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 30-35 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

บันทึกผลหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ โดยบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด น้ำหนักสด จำนวนใบและรากของยอดกล้วยไม้ที่เกิดใหม่

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 5 ชนิดของน้ำตาลและสารควบคุมการเติบโตที่ใช้ในการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

สูตรอาหาร	น้ำตาล (20 g/l)	สารควบคุมการเติบโต		
		TDZ (μM)	Kn (μM)	2,4-D (μM)
1	sucrose			
2	sucrose	0.45		
3	sucrose	0.45		4.52
4	sucrose		4.65	4.52
5	glucose			
6	glucose	0.45		
7	glucose	0.45		4.52
8	glucose		4.65	4.52
9	maltose			
10	maltose	0.45		
11	maltose	0.45		4.52
12	maltose		4.65	4.52

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 6 ลักษณะการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2.5 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

นำชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' จากการทดลองที่ 2.3 ตัดให้มีความยาว 0.5 เซนติเมตร และนำไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS (1/2 strength macro-and full-strength micro elements) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ และสารควบคุมการเติบโต ดังตารางที่ 6

ทำการทดลอง 10 ซ้ำ เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติมวุ้น (Gelrite) 2.4 กรัมต่อลิตร น้ำตาลชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ในขวดเพาะเลี้ยงปริมาตร 120 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตร (นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) pH 5.40±0.01 สภาพที่ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 30-35 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

บันทึกผลหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ โดยบันทึก สี ลักษณะ และปริมาณแคลลัส หรือ สี ลักษณะ และจำนวน somatic embryos ที่เกิดขึ้น

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 6 ชนิดของน้ำตาลและสารควบคุมการเติบโตที่ใช้ในการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

สูตรอาหาร	น้ำตาล (20 g/l)	สารควบคุมการเติบโต	
		TDZ (μM)	2,4-D (μM)
1	sucrose		
2	sucrose	0.45	
3	sucrose	4.54	
4	sucrose	0.45	4.52
5	sucrose	4.54	4.52
6	sucrose	4.54	13.56
7	glucose		
8	glucose	0.45	
9	glucose	4.54	
10	glucose	0.45	4.52
11	glucose	4.54	4.52
12	glucose	4.54	13.56
13	maltose		
14	maltose	0.45	
15	maltose	4.54	
16	maltose	0.45	4.52
17	maltose	4.54	4.52
18	maltose	4.54	13.56

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 7 ลักษณะการเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2.6 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

นำใบในส่วนยอดของต้นอ่อนกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' จากการทดลองที่ 2.3 ตัดใบอ่อนส่วนครึ่งใบล่างให้มีขนาด 0.3 x 0.4 ตารางเซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS (1/2 strength macro-and full-strength micro elements) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต และน้ำตาลชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 7

ทำการทดลอง 10 ซ้ำ เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติมวุ้น (Gelrite) 2.4 กรัมต่อลิตร น้ำตาลชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ในขวดเพาะเลี้ยงปริมาตร 120 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตร (นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) pH 5.40±0.01 สภาพที่ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 30-35 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

บันทึกผลหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ โดยบันทึก สี ลักษณะ และปริมาณแคลลัส หรือ สี ลักษณะ และจำนวน somatic embryos ที่เกิดขึ้น

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 7 ชนิดของน้ำตาลและสารควบคุมการเติบโตที่ใช้ในการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

สูตรอาหาร	น้ำตาล (20 g/l)	สารควบคุมการเติบโต	
		TDZ (μM)	2,4-D (μM)
1	sucrose		
2	sucrose	0.45	
3	sucrose	4.54	
4	sucrose	0.45	4.52
5	sucrose	4.54	4.52
6	sucrose	4.54	13.56
7	glucose		
8	glucose	0.45	
9	glucose	4.54	
10	glucose	0.45	4.52
11	glucose	4.54	4.52
12	glucose	4.54	13.56
13	maltose		
14	maltose	0.45	
15	maltose	4.54	
16	maltose	0.45	4.52
17	maltose	4.54	4.52
18	maltose	4.54	13.56

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 8 ลักษณะการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* ‘Delrosi’

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

1.1 ผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

นำส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' อายุ 14 เดือนหลังจากเพาะเมล็ด มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex [ปุ๋ย Hyponex (6.5N-4.5P-19K) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร + เปปโตน (peptone) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร + น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร] ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ 1 เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ (สูตร 12) ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากและสม่ำเสมอที่สุด 1.4 ยอด รองลงมาคือสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ (สูตร 2) หรือ BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ (สูตร 11) หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ (สูตร 8) ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เฉลี่ย 90 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 1.6 1.4 และ 1.2 ยอด ตามลำดับ (ตารางที่ 8, รูปที่ 9D, 9A, 9C และ 9B) ในขณะที่สูตรอาหารอื่นๆ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เฉลี่ยระหว่าง 30-70 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยระหว่าง 0.3-1.3 ยอด ส่วนน้ำหนักสด จำนวนใบ และจำนวนรากเฉลี่ยยอดใหม่ของทุกสูตรอาหาร มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สำหรับน้ำหนักสดรวมและน้ำหนักสดยอดเฉลี่ยของยอดเริ่มต้น พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ (สูตร 8) ให้น้ำหนักสดรวมและน้ำหนักสดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 977.1 และ 649.1 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 9, รูปที่ 9B) ส่วนน้ำหนักสดราก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

และจำนวนรากเฉลี่ย พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 4.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ (สูตร 9) ให้น้ำหนักสดราก และจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 402.3 มิลลิกรัม และ 4.9 ราก ตามลำดับ (ตารางที่ 9, รูปที่ 9F) และพบว่า ทุกสูตรอาหารที่ประกอบด้วย Ads ความเข้มข้น 27.1 ไมโครโมลาร์ ทำให้รากมีลักษณะเล็ก สั้น มีขนรากน้อยหรือไม่มีขนราก (รูปที่ 9E) ในขณะที่สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ (สูตร 12) ให้จำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด 6.0 ใบ (ตารางที่ 9, รูปที่ 9D)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 8 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

สูตร	สารควบคุมการเติบโต (μM)					การเจริญเติบโตของยอดใหม่[1/]				
Hyponex	TDZ	BA	Kn	2,4-D	Ads	การเกิดยอด[3/] (%)	จำนวนยอด[3/]	น้ำหนักสดรวม[2/,4/] (mg)	จำนวนใบ[3/]	จำนวนราก[3/]
1						30.00±15.28 c	0.30±0.15 d	25.17±7.80 a	2.0±0.0 a	0.0±0.0 a
2	0.45					90.00±10.00 ab	1.60±0.52 ab	13.06±4.76 a	1.9±0.1 a	0.2±0.0 a
3	4.54					30.00±15.28 c	0.40±0.22 d	27.53±17.30 a	2.2±0.4 a	1.0±0.0 a
4		2.22				50.00±16.67 abc	0.60±0.22 bcd	29.57±6.66 a	2.4±0.2 a	0.8±0.3 a
5		4.44				70.00±15.28 abc	1.30±0.40 abcd	14.20±2.08 a	2.1±0.2 a	0.3±0.0 a
6			4.65			60.00±16.33 abc	0.60±0.16 bcd	25.80±12.07 a	2.2±0.3 a	1.5±0.5 a
7			9.29			40.00±16.33 bc	0.40±0.16 cd	30.85±7.70 a	2.5±0.3 a	1.0±0.0 a
8	0.45			4.52		90.00±10.00 ab	1.20±0.20 abc	43.15±16.41 a	2.5±0.2 a	1.2±0.0 a
9	4.54			4.52		30.00±15.28 c	0.40±0.22 d	28.00±11.32 a	2.2±0.2 a	0.0±0.0 a
10		2.22		4.52		70.00±15.28 abc	0.80±0.20 abcd	47.34±15.32 a	2.6±0.2 a	1.5±0.8 a
11		4.44		4.52		90.00±10.00 ab	1.40±0.27 ab	18.70±4.55 a	2.0±0.2 a	0.8±0.3 a
12			4.65	4.52		100.00±0.00 a	1.40±0.22 a	24.03±9.46 a	2.2±0.3 a	1.1±0.1 a
13	0.45				27.1	30.00±15.28 c	0.30±0.15 d	16.17±10.36 a	2.3±0.3 a	0.0±0.0 a
14	4.54				27.1	40.00±16.33 bc	0.50±0.22 cd	20.98±4.45 a	2.4±0.2 a	0.8±0.3 a
15		2.22			27.1	70.00±15.28 abc	0.90±0.23 abcd	28.76±7.93 a	2.5±0.2 a	1.3±0.6 a
16		4.44			27.1	30.00±15.28 c	0.30±0.15 d	38.27±17.94 a	2.3±0.7 a	1.0±0.0 a

[1/]ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย ± S.E.) ที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P = 0.05) ทำการทดลอง 10 ซ้ำ; [2/]โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT; [3/]โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ Kruskal-Wallis H และ Mann-Whitney U; [4/]น้ำหนักสดรวม = น้ำหนักสดต้นรวมกับน้ำหนักสดราก

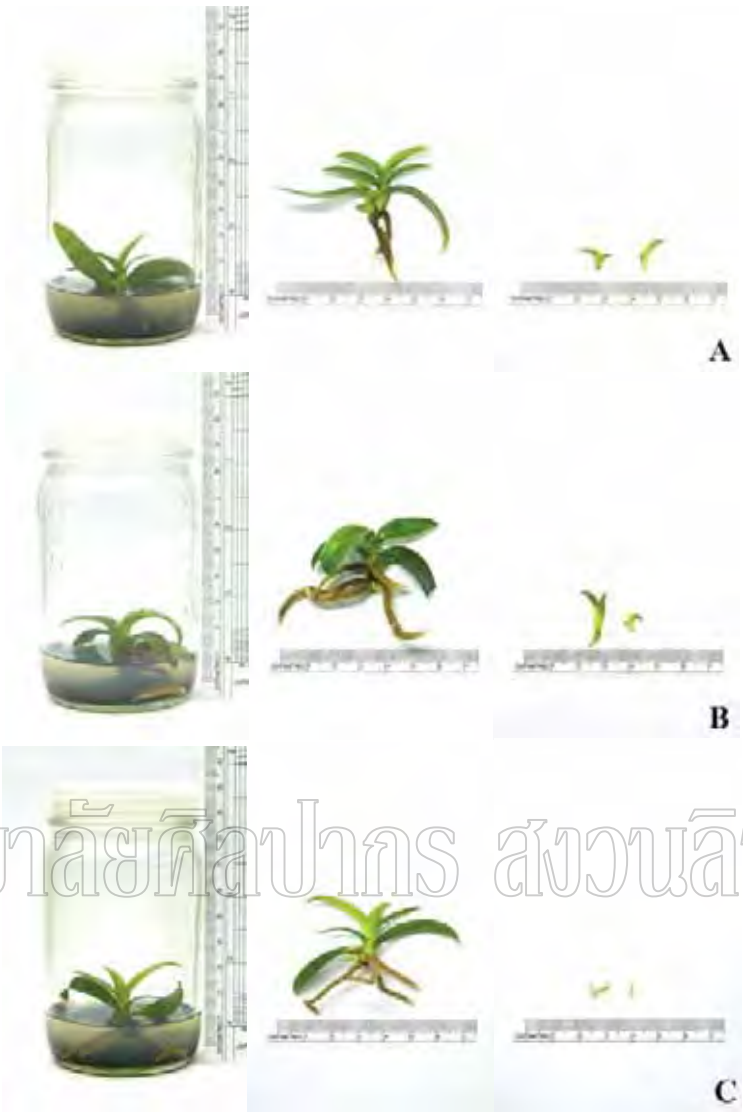
มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 9 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการเจริญเติบโตของส่วนยอดเริ่มต้นของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'DeIrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

สูตร	สารควบคุมการเติบโต (μM)					การเจริญเติบโตของยอดเริ่มต้น[1/]				
Hyponex	TDZ	BA	Kn	2,4-D	Ads	น้ำหนักสดรวม[2/,4/] (mg)	น้ำหนักสดยอด[2/] (mg)	น้ำหนักสดราก[2/] (mg)	จำนวนใบ[3/]	จำนวนราก[2/]
1						819.20±55.81 abc	516.40±29.50 bc	302.80±37.26 bc	5.1±0.2 d	4.4±0.3 ab
2	0.45					891.60±57.99 ab	572.50±35.73 abc	319.10±36.02 abc	5.4±0.2 bcd	4.8±0.2 a
3	4.54					873.20±48.46 ab	521.80±29.99 bc	351.40±22.79 ab	5.2±0.2 cd	4.5±0.2 ab
4		2.22				848.50±47.06 abc	578.10±34.54 abc	270.40±19.85 bc	5.4±0.2 bcd	3.9±0.2 bcd
5		4.44				843.20±73.75 abc	527.40±45.92 bc	315.80±32.86 abc	5.4±0.3 abcd	3.9±0.2 bcd
6			4.65			898.00±44.62 ab	580.50±30.78 abc	317.50±20.78 abc	5.6±0.2 abcd	4.1±0.2 abc
7			9.29			821.13±67.27 abc	592.10±46.03 abc	229.03±28.89 cd	5.6±0.2 abcd	3.8±0.2 bcd
8	0.45			4.52		977.10±42.71 a	649.10±34.04 a	328.00±16.71 ab	5.8±0.1 abc	4.3±0.3 ab
9	4.54			4.52		962.30±55.06 ab	560.00±31.75 abc	402.30±27.86 a	5.5±0.2 abcd	4.9±0.3 a
10		2.22		4.52		786.16±38.78 bcd	515.00±18.98 bc	271.16±26.03 bc	5.9±0.1 ab	4.6±0.3 ab
11		4.44		4.52		833.00±47.32 abc	569.70±30.21 abc	263.30±26.83 bc	5.7±0.2 abcd	4.6±0.3 ab
12			4.65	4.52		898.24±54.68 ab	612.80±29.07 ab	285.44±36.17 bc	6.0±0.1 a	4.3±0.3 ab
13	0.45				27.1	680.14±34.40 cd	524.70±31.09 bc	155.44±12.01 d	5.7±0.2 abc	3.2±0.2 d
14	4.54				27.1	642.24±54.07 d	474.70±43.20 c	167.54±18.89 d	5.4±0.2 bcd	3.3±0.2 cd
15		2.22			27.1	918.90±69.03 ab	622.50±38.15 ab	296.40±37.98 bc	5.9±0.1 ab	4.6±0.3 ab
16		4.44			27.1	934.70±71.44 ab	633.40±53.88 ab	301.30±28.29 bc	5.4±0.2 bcd	4.9±0.3 a

[1/]ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย ± S.E.) ที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P = 0.05) ทำการทดลอง 10 ซ้ำ; [2/]โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT; [3/]โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ Kruskal-Wallis H และ Mann-Whitney U; [4/]น้ำหนักสดรวม = น้ำหนักสดต้นรวมกับน้ำหนักสดราก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์



มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 9 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการเจริญเติบโตและการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

A = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + TDZ 0.45 μM (สูตร 2)

B = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + TDZ 0.45 μM + 2,4-D 4.52 μM (สูตร 8)

C = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + BA 4.44 μM + 2,4-D 4.52 μM (สูตร 11)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 9 (ต่อ) ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการเจริญเติบโตและการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

D = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + Kn 4.65 μM + 2,4-D 4.52 μM (สูตร 12)

E = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + TDZ 0.45 μM + Ads 27.1 μM (สูตร 13)

F = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + TDZ 4.54 μM + 2,4-D 4.52 μM (สูตร 9)

1.2 ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

นำส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' อายุ 19 เดือนหลังจากเพาะเมล็ด มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex [ปุ๋ย Hyponex (6.5N-4.5P-19K) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร + เปปโตน (peptone) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร + น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร] ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn และ 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ 2 เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ (สูตร 8) ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด 90 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากและสม่ำเสมอที่สุด 1.3 ยอด รองลงมาคือสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ (สูตร 2) หรือ BA ความเข้มข้น 8.88 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 13.56 ไมโครโมลาร์ (สูตร 13) ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เฉลี่ย 80 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 1.5 และ 1.1 ยอด ตามลำดับ (ตารางที่ 10, รูปที่ 10B, 10A และ 10D) ในขณะที่สูตรอาหารอื่นๆ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เฉลี่ยระหว่าง 10-60 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยระหว่าง 0.3-1.0 ยอด ในด้านน้ำหนักสดยอดใหม่เฉลี่ย พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 8.88 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 13.56 ไมโครโมลาร์ (สูตร 13) ให้น้ำหนักสดยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด 316.7 มิลลิกรัม (ตารางที่ 10, รูปที่ 10C) ส่วนจำนวนใบ และจำนวนรากยอดใหม่เฉลี่ยของทุกสูตรอาหารมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สำหรับน้ำหนักสดรวม น้ำหนักสดยอด น้ำหนักสดราก จำนวนใบ และจำนวนรากเฉลี่ยของยอดเริ่มต้น พบว่า ส่วนใหญ่มีค่าเฉลี่ยมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ประกอบ ด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ทั้งสองความเข้มข้น คือ 4.52 และ 13.56 ไมโครโมลาร์ (ตารางที่ 11)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 10 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'DeIrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

สูตร	สารควบคุมการเติบโต (μM)				การเจริญเติบโตของยอดใหม่[1/]				
Hyponex	TDZ	BA	Kn	2,4-D	การเกิดยอด[3/] (%)	จำนวนยอด[3/]	น้ำหนักสดรวม[3/,4/] (mg)	จำนวนใบ[3/]	จำนวนราก[3/]
1					30.00±15.28 bc	0.30±0.15 c	52.67±25.17 abc	2.7±0.3 a	0.7±0.3 a
2	0.45				80.00±13.33 ab	1.50±0.45 ab	116.13±70.41 abc	2.7±0.3 a	0.7±0.4 a
3	2.25				50.00±16.67 abc	0.60±0.22 abc	19.80±6.08 c	2.0±0.0 a	0.2±0.2 a
4		4.44			60.00±16.33 abc	0.80±0.25 abc	106.67±49.97 abc	2.6±0.3 a	0.8±0.5 a
5		8.88			40.00±16.33 abc	1.00±0.47 abc	143.00±45.80 ab	2.8±0.4 a	1.0±0.4 a
6			2.32		40.00±16.33 abc	0.70±0.30 abc	121.00±43.03 ab	3.0±0.2 a	1.5±0.2 a
7			4.65		30.00±15.28 bc	0.50±0.27 bc	201.67±104.83 ab	2.7±0.4 a	1.2±0.7 a
8	0.45			4.52	90.00±10.00 a	1.30±0.21 a	187.89±46.32 ab	2.8±0.3 a	1.4±0.3 a
9	0.45			13.56	60.00±16.33 abc	0.90±0.38 abc	90.83±66.01 bc	2.4±0.2 a	0.5±0.4 a
10	2.25			4.52	50.00±16.67 abc	0.60±0.22 abc	190.20±72.73 ab	2.9±0.5 a	1.4±0.5 a
11	2.25			13.56	10.00±10.00 c	0.10±0.10 c	141.00±0.00 ab	3.0±0.0 a	2.0±0.0 a
12		4.44		13.56	30.00±15.28 bc	0.30±0.15 c	0.24±0.11 d	3.3±0.3 a	3.3±0.9 a
13		8.88		13.56	80.00±13.33 ab	1.10±0.23 ab	316.71±85.42 a	3.0±0.3 a	1.6±0.4 a

[1/]ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย ± S.E.) ที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P = 0.05) ทำการทดลอง 10 ซ้ำ; [2/]โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT; [3/]โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ Kruskal-Wallis H และ Mann-Whitney U; [4/]น้ำหนักสดรวม = น้ำหนักสดต้นรวมกับน้ำหนักสดราก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 11 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn และ 2,4-D ต่อการเจริญเติบโตของยอดเริ่มต้นของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

สูตร	สารควบคุมการเติบโต (μM)				การเจริญเติบโตของยอดเริ่มต้น[1/]				
Hyponex	TDZ	BA	Kn	2,4-D	น้ำหนักสดรวม[2/,4/] (mg)	น้ำหนักสดยอด[2/] (mg)	น้ำหนักสดราก[2/] (mg)	จำนวนใบ[3/]	จำนวนราก[2/]
1					1502.20±98.39 e	855.20±43.50 d	647.00±59.29 d	6.0±0.0 c	5.7±0.2 e
2	0.45				1942.50±141.03 cde	936.10±64.20 cd	1006.40±86.81 abc	6.5±0.2 abc	6.8±0.2 bcde
3	2.25				1805.80±83.67 cde	1073.70±37.87 bcd	732.10±76.40 cd	6.5±0.2 abc	6.7±0.3 cde
4		4.44			1852.40±202.22 cde	1034.70±76.73 cd	817.70±144.76 bcd	6.3±0.2 bc	7.0±0.4 bcd
5		8.88			1472.20±89.37 e	910.00±68.78 cd	562.20±34.87 d	6.6±0.2 ab	6.7±0.4 cde
6			2.32		1616.90±122.27 e	964.10±86.48 cd	652.80±67.69 d	6.3±0.2 bc	6.4±0.3 cde
7			4.65		1754.40±160.76 de	1013.00±80.93 cd	741.40±110.94 cd	6.7±0.2 ab	6.2±0.4 de
8	0.45			4.52	2129.30±195.09 bcd	1149.90±101.85 bc	979.40±102.13 abc	7.2±0.2 a	7.3±0.4 abcd
9	0.45			13.56	2571.10±122.80 ab	1572.90±74.63 a	998.20±57.04 abc	6.7±0.2 ab	7.2±0.2 abcd
10	2.25			4.52	2276.40±139.18 abc	1295.90±75.02 b	980.50±76.21 abc	6.9±0.2 ab	7.3±0.3 abcd
11	2.25			13.56	2726.40±154.27 a	1538.50±66.53 a	1187.90±104.79 a	6.5±0.2 abc	7.9±0.3 ab
12		4.44		13.56	2742.90±253.70 a	1647.80±110.69 a	1095.10±149.93 ab	7.0±0.2 ab	7.4±0.5 abc
13		8.88		13.56	2714.70±195.21 a	1553.70±122.25 a	1161.00±94.35 a	6.6±0.2 ab	8.3±0.5 a

[1/]ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย ± S.E.) ที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P = 0.05) ทำการทดลอง 10 ซ้ำ; [2/]โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT; [3/]โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ Kruskal-Wallis H และ Mann-Whitney U; [4/]น้ำหนักสดรวม = น้ำหนักสดต้นรวมกับน้ำหนักสดราก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 10 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn และ 2,4-D ต่อการเจริญเติบโตและการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

A = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + TDZ 0.45 μM (สูตร 2)

B = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + TDZ 0.45 μM + 2,4-D 4.52 μM (สูตร 8)

C = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + BA 8.88 μM + 2,4-D 13.56 μM (สูตร 13)

2. ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

นำส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex [ปุ๋ย Hyponex (6.5N-4.5P-19K) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร + เปปโตน (peptone) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร + น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร] ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ หรือ Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ดังตารางที่ 3 เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า ทุกสูตรอาหารให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (สูตร 3) หรือซูโครส (สูตร 1) ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด 80 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 1.8 และ 1.5 ยอด ตามลำดับ (ตารางที่ 12, รูปที่ 11B และ 11A) ในขณะที่สูตรอาหารอื่นๆ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เฉลี่ยระหว่าง 50-70 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดใหม่เฉลี่ยระหว่าง 0.5-1.6 ยอด สำหรับน้ำหนักสด และจำนวนรากเฉลี่ยของยอดใหม่ พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ (สูตร 2) ให้ยอดใหม่ที่มีน้ำหนักสด และจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 252.43 มิลลิกรัม และ 1.4 ราก ตามลำดับ (ตารางที่ 12, รูปที่ 11C) ส่วนจำนวนใบยอดใหม่เฉลี่ย พบว่า ทุกสูตรอาหารให้จำนวนใบยอดใหม่เฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์

สำหรับน้ำหนักสดรวม น้ำหนักสดยอด น้ำหนักสดราก และจำนวนรากเฉลี่ยของยอดเริ่มต้นส่วนใหญ่ พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส หรือกลูโคส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโตทั้ง 2 แบบ (สูตร 1-4) ให้ค่าเฉลี่ยมากกว่าสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นน้ำหนักสดยอดของยอดเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ (สูตร 6) (ตารางที่ 13) ส่วนจำนวนใบเฉลี่ยของยอดเริ่มต้น พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเติบโต Kn ความ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

เข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ (สูตร 2) ให้จำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 6.7 ใบ (ตารางที่ 13, รูปที่ 11C) ส่วนสูตรอาหารอื่นๆ ให้จำนวนใบเฉลี่ยระหว่าง 5.8-6.5 ใบ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 12 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

สูตร Hyponex	น้ำตาล (20 g/l)	สารควบคุมการเติบโต (μM)			การเจริญเติบโตของยอดใหม่[1/]				
		TDZ	Kn	2,4-D	การเกิดยอด[3/] (%)	จำนวนยอด[2/]	น้ำหนักสดรวม[2/,4/] (mg)	จำนวนใบ[2/]	จำนวนราก[2/]
1	sucrose	0.45		4.52	80.00±13.33 a	1.50±0.48 ab	120.50±37.87 bc	2.7±0.2 a	1.1±0.4 abc
2	sucrose		4.65	4.52	70.00±15.28 a	1.60±0.43 ab	252.43±80.30 a	2.8±0.3 a	1.4±0.3 a
3	glucose	0.45		4.52	80.00±13.33 a	1.80±0.49 a	162.63±61.93 ab	2.4±0.3 a	1.3±0.3 ab
4	glucose		4.65	4.52	70.00±15.28 a	1.40±0.50 ab	111.29±38.76 bc	2.7±0.3 a	1.2±0.3 abc
5	maltose	0.45		4.52	60.00±16.33 a	1.10±0.48 ab	28.86±16.31 c	2.2±0.3 a	0.4±0.2 c
6	maltose		4.65	4.52	50.00±16.67 a	0.50±0.17 b	23.80±8.82 c	2.8±0.6 a	0.4±0.2 bc

[1/]ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย ± S.E.) ที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ (P = 0.1) ทำการทดลอง 10 ซ้ำ; [2/]โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT; [3/]โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ Kruskal-Wallis H และ Mann-Whitney U; [4/]น้ำหนักสดรวม = น้ำหนักสดต้นรวมกับน้ำหนักสดราก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 13 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการเจริญเติบโตของยอดเริ่มต้นของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

สูตร Hyponex	น้ำตาล (20 g/l)	สารควบคุมการเติบโต (μM)			การเจริญเติบโตของยอดเริ่มต้น[1/]				
		TDZ	Kn	2,4-D	น้ำหนักสดรวม[2/,4/] (mg)	น้ำหนักสดยอด[2/] (mg)	น้ำหนักสดราก[2/] (mg)	จำนวนใบ[2/]	จำนวนราก[2/]
1	sucrose	0.45		4.52	1830.00±117.97 a	1139.80±87.96 a	690.20±58.74 a	6.5±0.3 ab	5.9±0.3 a
2	sucrose		4.65	4.52	1974.60±112.84 a	1129.20±86.48 a	845.40±65.31 a	6.7±0.2 a	5.4±0.3 a
3	glucose	0.45		4.52	1812.00±203.98 a	1068.40±123.68 a	743.60±96.17 a	6.5±0.2 ab	5.9±0.4 a
4	glucose		4.65	4.52	1995.20±83.09 a	1163.50±59.27 a	831.70±58.22 a	6.4±0.2 ab	5.6±0.3 a
5	maltose	0.45		4.52	914.60±117.19 b	725.30±96.42 b	189.30±28.79 b	6.2±0.3 ab	3.6±0.5 b
6	maltose		4.65	4.52	1137.10±75.87 b	945.30±55.92 a	191.80±25.19 b	5.8±0.5 b	2.5±0.3 c

[1/]ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย ± S.E.) ที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ (P = 0.1) ทำการทดลอง 10 ซ้ำ; [2/]โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT; [3/]โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ Kruskal-Wallis H และ Mann-Whitney U; [4/]น้ำหนักสดรวม = น้ำหนักสดต้นรวมกับน้ำหนักสดราก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 11 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการเจริญเติบโตและการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

A = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + ซูโครส + TDZ 0.45 μM + 2,4-D 4.52 μM (สูตร 1)

B = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + กลูโคส + TDZ 0.45 μM + 2,4-D 4.52 μM (สูตร 3)

C = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + ซูโครส + Kn 4.65 μM + 2,4-D 4.52 μM (สูตร 2)

3. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออก

นำต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 16 สัปดาห์ เพื่อให้ข้อ เนื้อเยื่อระหว่างข้อ และใบที่บริเวณยอดมีความยาวพอที่จะตัดออกได้ จากนั้น นำต้นที่ตัดส่วนยอดออก ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ดัดแปลงสูตร Hyponex [ปุ๋ย Hyponex (6.5N-4.5P-19K) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร + เปปโตน (peptone) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร + น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร] ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ หรือ Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ดังตารางที่ 4 เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า ทุกสูตรอาหารให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของยอดเริ่มต้น เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ จำนวนยอดใหม่ และจำนวนใบยอดใหม่เฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ไม่มีสารควบคุมการเติบโต (สูตร 9) หรือร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ (สูตร 10) ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 1.5 และ 1.6 ยอด ตามลำดับ (ตารางที่ 14, รูปที่ 12C และ 12D) แต่พบว่าสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบ ด้วยน้ำตาลมอลโตสทุกสูตรอาหารให้ยอดใหม่มีน้ำหนักสดรวม และจำนวนรากเฉลี่ยน้อย และรากมีลักษณะสั้นผิดปกติ มีขนรากน้อยหรือไม่มีขนราก ในขณะที่สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ (สูตร 4) ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เฉลี่ย 90 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 1.6 ยอด เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสและกลูโคส (ตารางที่ 14, รูปที่ 12B) ส่วนน้ำหนักสดรวมเฉลี่ย พบว่าสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ (สูตร 3) ให้น้ำหนักสดของยอดใหม่มีน้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุด 606.86 มิลลิกรัม (ตารางที่ 14, รูปที่ 12A) และทุกสูตรอาหารให้จำนวนใบยอดใหม่เฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์

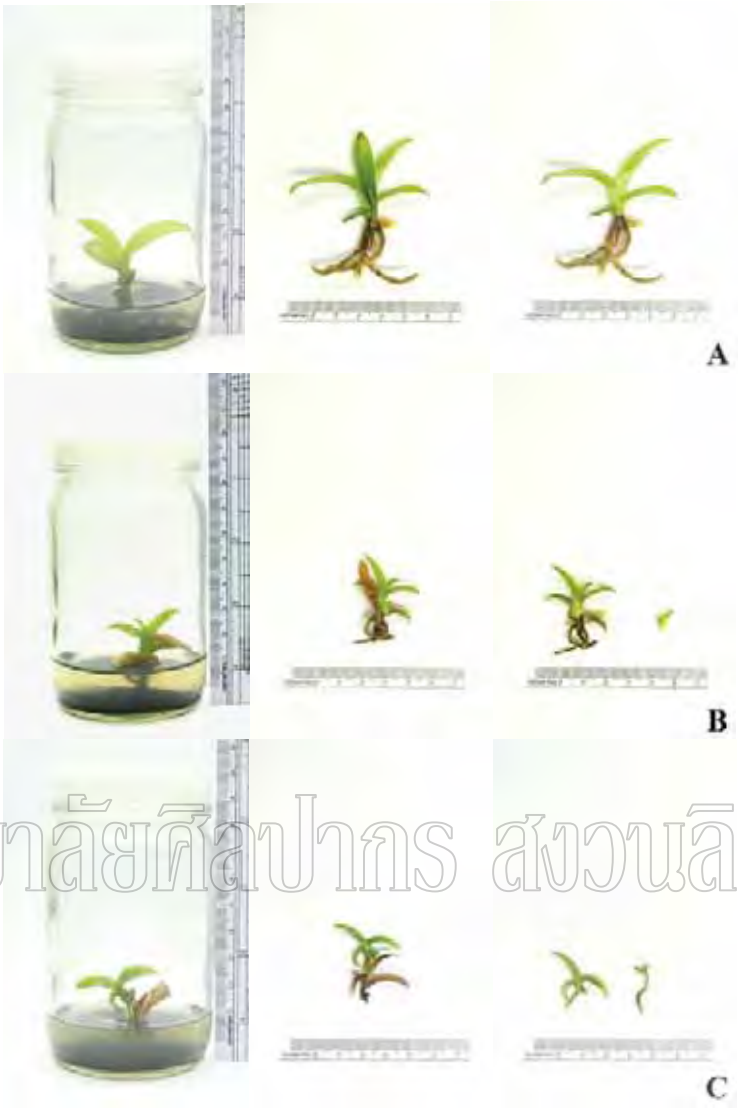
มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 14 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออก หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

สูตร Hyponex	น้ำตาล (20 g/l)	สารควบคุมการเติบโต (μM)			การรอดชีวิตต้นเดิม[2/] (%)	การเจริญเติบโตของยอดใหม่[1/]				
		TDZ	Kn	2,4-D		การเกิดยอด[3/](%)	จำนวนยอด[3/]	น้ำหนักสดรวม[2/,4/](mg)	จำนวนใบ[3/]	จำนวนราก[2/]
1	sucrose				90.00±10.00 a	60.00±16.33 a	1.20±0.42 a	383.78±163.60 bc	3.7±0.3 a	2.8±0.7 abcd
2	sucrose	0.45			90.00±10.00 a	80.00±13.33 a	1.10±0.28 a	392.75±126.60 bc	3.8±0.3 a	3.1±0.7 abc
3	sucrose	0.45		4.52	90.00±10.00 a	70.00±15.28 a	1.60±0.52 a	606.86±132.01 a	4.1±0.3 a	3.3±0.4 ab
4	sucrose		4.65	4.52	90.00±10.00 a	90.00±10.00 a	1.60±0.45 a	347.78±95.41 c	4.0±0.1 a	3.3±0.5 ab
5	glucose				90.00±10.00 a	80.00±13.33 a	0.90±0.18 a	564.25±109.11 ab	4.1±0.1 a	3.9±0.2 a
6	glucose	0.45			100.00±0.00 a	70.00±15.28 a	1.20±0.36 a	288.29±62.51 cd	3.8±0.2 a	3.1±0.2 abc
7	glucose	0.45		4.52	100.00±0.00 a	70.00±15.28 a	1.50±0.58 a	134.00±38.67 d	3.5±0.2 a	2.2±0.4 cde
8	glucose		4.65	4.52	90.00±10.00 a	80.00±13.33 a	1.00±0.21 a	273.75±59.85 cd	3.6±0.2 a	2.8±0.4 bcd
9	maltose				80.00±13.33 a	100.00±0.00 a	1.50±0.22 a	119.70±23.97 d	3.7±0.1 a	1.9±0.2 de
10	maltose	0.45			90.00±10.00 a	100.00±0.00 a	1.60±0.34 a	84.60±14.85 d	3.6±0.3 a	1.6±0.3 e
11	maltose	0.45		4.52	80.00±13.33 a	90.00±10.00 a	0.90±0.10 a	135.11±29.72 d	3.7±0.2 a	2.0±0.3 de
12	maltose		4.65	4.52	90.00±10.00 a	80.00±13.33 a	1.00±0.26 a	89.63±18.63 d	3.7±0.2 a	1.3±0.2 e

[1/]ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย ± S.E.) ที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ (P = 0.1) ทำการทดลอง 10 ซ้ำ; [2/]โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT; [3/]โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ Kruskal-Wallis H และ Mann-Whitney U; [4/]น้ำหนักสดรวม = น้ำหนักสดต้นรวมกับน้ำหนักสดราก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์



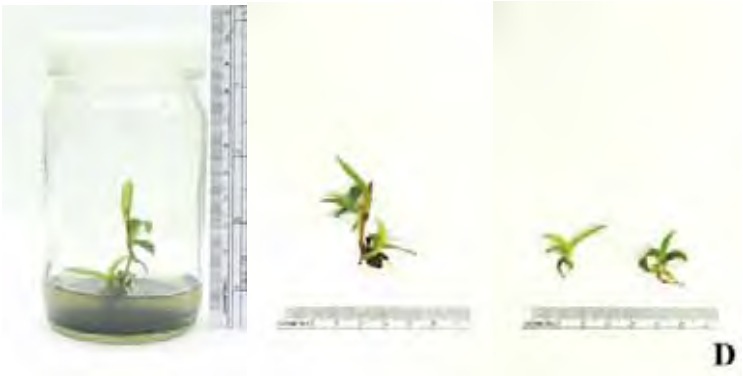
มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 12 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออกหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

A = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + ซูโครส + TDZ 0.45 μM + 2,4-D 4.52 μM (สูตร 3)

B = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + ซูโครส + Kn 4.65 μM + 2,4-D 4.52 μM (สูตร 4)

C = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + มอลโตส (สูตร 9-12)



ภาพที่ 12 (ต่อ) ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออกหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

D = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + มอลโตส + TDZ 0.45 μM (สูตร 10)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

4. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

นำส่วนข้อของต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' จากการทดลองที่ 3 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ดัดแปลงสูตร Hyponex [ปุ๋ย Hyponex (6.5N-4.5P-19K) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร + เปปโตน (peptone) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร + น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร] ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ หรือ Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ดังตารางที่ 5 เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ไม่มีสารควบคุมการเติบโต (สูตร 1) หรือสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ไม่มีสารควบคุมการเติบโต (สูตร 9) หรือร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ (สูตร 10) หรือสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ (สูตร 12) ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 1.0 ยอด (ตารางที่ 15, รูปที่ 13A, 13E, 13F และ 13G) อย่างไรก็ตาม สูตรอาหารข้างต้นให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ และจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ช่วงความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ กับสูตรอาหารส่วนใหญ่ ยกเว้นสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ไม่มีสารควบคุมการเติบโต (สูตร 5) หรือร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ (สูตร 6) ที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเฉลี่ยระหว่าง 40-50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 0.5 ยอด (ตารางที่ 15)

สำหรับน้ำหนักสดยอดใหม่เฉลี่ย พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ (สูตร 4) หรือสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ไม่มีสารควบคุมการเติบโต (สูตร 5) หรือร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ (สูตร 7) มีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดระหว่าง 419.22-451.78 มิลลิกรัม (ตารางที่ 15, รูปที่ 13B, 13C และ 13D) และสูตรอาหารข้างต้นมีน้ำหนักสดยอดใหม่เฉลี่ยแตกต่างกับสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ (สูตร 2) หรือสูตรอาหาร

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโตทุกแบบ (สูตร 9-12) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15)

สำหรับจำนวนใบยอดใหม่เฉลี่ย พบว่า ทุกสูตรอาหารมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนจำนวนรากยอดใหม่เฉลี่ย พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ (สูตร 4) ให้ยอดใหม่มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 3.7 ราก อย่างไรก็ตาม พบว่า สูตรอาหารข้างต้น ส่งผลให้ยอดใหม่มีจำนวนรากเฉลี่ยไม่แตกต่างกับสูตรอาหารส่วนใหญ่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ไม่มีสารควบคุมการเติบโต (สูตร 9) หรือร่วมกับสารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ที่ให้จำนวนรากน้อยที่สุด คือ 2.7 ราก (สูตร 12) (ตารางที่ 15)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 15 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

สูตร Hyponex	น้ำตาล (20 g/l)	สารควบคุมการเติบโต (μM)			การรอดชีวิตของชิ้นส่วนข้อ[2/] (%)	การเจริญเติบโตของยอดใหม่[1/]				
		TDZ	Kn	2,4-D		การเกิดยอด[3/] (%)	จำนวนยอด[3/]	น้ำหนักสดรวม[2/,4/] (mg)	จำนวนใบ[3/]	จำนวนราก[2/]
1	sucrose				90.00±10.00 a	100.00±0.00 a	1.00±0.00 a	374.80±61.61 ab	3.7±0.2 a	3.1±0.3 ab
2	sucrose	0.45			70.00±15.28 b	80.00±13.33 abc	0.80±0.13 ab	245.38±45.38 bcd	3.4±0.2 a	2.9±0.2 ab
3	sucrose	0.45		4.52	80.00±13.33 a	80.00±13.33 abc	0.80±0.13 ab	336.88±41.94 abc	3.3±0.2 a	3.0±0.2 ab
4	sucrose		4.65	4.52	80.00±13.33 a	90.00±10.00 ab	1.00±0.15 a	419.22±65.85 a	3.9±0.4 a	3.7±0.5 a
5	glucose				30.00±15.28 bc	40.00±16.33 c	0.50±0.22 b	450.50±129.11 a	3.5±0.3 a	3.4±0.5 ab
6	glucose	0.45			30.00±15.28 bc	50.00±16.67 bc	0.50±0.17 b	338.20±122.28 abc	3.0±0.3 a	3.0±0.5 ab
7	glucose	0.45		4.52	70.00±15.28 b	90.00±10.00 ab	0.90±0.10 ab	451.78±83.53 a	3.6±0.2 a	3.6±0.3 ab
8	glucose		4.65	4.52	20.00±13.33 c	80.00±13.33 abc	0.80±0.13 ab	378.38±65.28 ab	3.4±0.2 a	3.5±0.4 ab
9	maltose				20.00±13.33 c	100.00±0.00 a	1.00±0.00 a	160.50±17.49 d	3.2±0.1 a	2.7±0.2 b
10	maltose	0.45			10.00±10.00 c	100.00±0.00 a	1.00±0.00 a	187.10±23.35 cd	3.4±0.2 a	3.0±0.2 ab
11	maltose	0.45		4.52	10.00±10.00 c	90.00±10.00 ab	0.90±0.10 ab	190.00±17.10 cd	3.4±0.2 a	3.0±0.2 ab
12	maltose		4.65	4.52	40.00±16.33 bc	100.00±0.00 a	1.00±0.00 a	156.10±22.11 d	3.3±0.2 a	2.7±0.3 b

[1/]ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย ± S.E.) ที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ (P = 0.1) ทำการทดลอง 10 ซ้ำ; [2/]โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT; [3/]โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ Kruskal-Wallis H และ Mann-Whitney U; [4/]น้ำหนักสดรวม = น้ำหนักสดต้นรวมกับน้ำหนักสดราก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 13 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

A = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + ซูโครส (สูตร 1-4)

B = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + ซูโครส + Kn 4.65 μM + 2,4-D 4.52 μM (สูตร 4)

C = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + กลูโคส (สูตร 5-8)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 13 (ต่อ) ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

D = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + กลูโคส + TDZ 0.45 μM + 2,4-D 4.52 μM (สูตร 7)

E = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + มอลโตส (สูตร 9-12)

F = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + มอลโตส + TDZ 0.45 μM (สูตร 10)

ภาพที่ 13 (ต่อ) ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

G = สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex + มอลโตส + TDZ 0.45 μM + 2,4-D 4.52 μM (สูตร 11)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

5. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

นำชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' จากการทดลองที่ 3 มาตัดให้มีความยาว 0.5 เซนติเมตร ไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS (1/2 strength macro-and full-strength micro elements) ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 และ 4.54 ไมโครโมลาร์ เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 และ 13.56 ไมโครโมลาร์ ดังตารางที่ 6 เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อที่เพาะเลี้ยงบนทุกสูตรอาหารข้างต้นไม่มีการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos เลย เนื่องจากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลและตายหลังจากเริ่มเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 4-5 สัปดาห์ (รูปที่ 14A)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 14 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

A = ชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลและตาย

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

6. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'DeIrosi'

นำใบบริเวณยอดจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'DeIrosi' มาตัดใบส่วนครึ่งล่างให้มีขนาด 0.3 x 0.4 ตารางเซนติเมตร ไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS (1/2 strength macro-and full-strength micro elements) ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 และ 4.54 ไมโครโมลาร์ เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 และ 13.56 ไมโครโมลาร์ ดังตารางที่ 7 เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนทุกสูตรอาหารข้างต้นไม่มีการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos เลย เนื่องจากชิ้นส่วนใบมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลและตายหลังจากเริ่มเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ (รูปที่ 15A)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 15 ผลของสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ร่วมกับน้ำตาล 3 ชนิด และสารควบคุมการเติบโต TDZ และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

A = ชิ้นส่วนใบที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลและตาย

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

1.1 ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' โดย TDZ, BA, Kn และ Ads ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins) มีบทบาทสำคัญต่อการชักนำให้เกิดยอด และการพัฒนาไปเป็นต้นของพืช โดยส่งเสริมให้มีการแบ่งและเร่งการขยายตัวของเซลล์ พร้อมกับส่งเสริมการสร้างและการเจริญของตาข้าง ส่วน 2,4-D เป็นสารในกลุ่มออกซิน (auxin) มีหน้าที่ควบคุมการขยายตัวของเซลล์ กระตุ้นการแบ่งเซลล์ ทำให้ส่วนของพืชมีการเจริญเติบโตยืดยาวขึ้น มีผลต่อการเกิดราก และยับยั้งการเจริญของตาข้าง (บุษราภรณ์ 2548) มีหลักฐานแสดงว่าฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดนี้มีส่วนร่วมกันในการควบคุมวงจรของเซลล์ โดยออกซินนั้นอาจไปควบคุมการชักนำให้เกิดการจำลองดีเอนเอ (DNA) ในขณะที่ไซโตไคนินไปควบคุมในส่วนชักนำให้เกิดไมโตซิส ฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดนี้มีความจำเป็นต่อเซลล์ที่ยังอยู่ในวงจรเซลล์ ทั้งนี้ไม่ได้หมายความว่าออกซินมีผลโดยตรงเฉพาะต่อการชักนำการจำลองดีเอนเอ หรือไซโตไคนินมีผลโดยตรงเฉพาะต่อการเกิดไมโตซีสในระยะ G2 เท่านั้น แต่ยังรวมไปถึงการที่เซลล์จะกลับเข้าสู่วงจรเซลล์ได้อีกด้วยเช่นกัน (รังสฤษดิ์ 2541) โดยออกซินมักถูกนำมาใช้ร่วมกับไซโตไคนินเพื่อชักนำให้เนื้อเยื่อพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากได้ หากมีการปรับสมดุลระหว่างออกซินและไซโตไคนินให้ต่ำหรือสูงตามลำดับ ซึ่งแนวคิดนี้ได้จากสมมติฐานของ Skoog and Miller, 1957 (บุษราภรณ์ 2548)

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากและสม่ำเสมอที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ และชักนำให้ยอดใหม่ 1.4 ยอด ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Hong *et al.* (2008b) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Alma Gavaert' จาก PLBs โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 3 ยอด จากสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยงยอดอ่อนเป็นเวลา 60 วัน และจากการทดลองของ Ng and Saleh (2010a) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Paphiopedilum rothschildianum* ซึ่งสามารถชักนำการเกิด secondary PLBs เฉลี่ยมากที่สุด 4.1 PLBs ต่อ 1 primary PLBs จากสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.0 ไมโครโมลาร์ ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ แต่แตกต่างกับการทดลองของ Yan *et al.* (2006) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Cypripedium flavam* จากการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณจากต้นอ่อน โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดทวีคูณมากที่สุด 95 เปอร์เซ็นต์ และมียอดเกิดมากที่สุด 2.55 ยอด จากสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BAP ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับน้ำต้มมันฝรั่ง ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร และการทดลองของ Chen *et al.* (2002) ที่ศึกษาการเกิดยอดทวีคูณจากตาของก้านช่อดอกกล้วยไม้ *Paphiopedilum philippinense* 2 สายพันธุ์ (PH59 และ PH60) ในสายพันธุ์ PH59 มีชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดยอดและจำนวนยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อมากที่สุด 66.7 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโม และสายพันธุ์ PH60 มีชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดยอดมากที่สุด 80 เปอร์เซ็นต์ จากสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

1.2 ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

การทดลองนี้เป็นการปรับความเข้มข้นของสารควบคุมการเติบโต โดยอ้างอิงกับการทดลองที่ 1.1 เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโตต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด จากการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn และ 2,4-D พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากและสม่ำเสมอที่สุด 90 เปอร์เซ็นต์ และยอดใหม่ 1.3 ยอด ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Lin *et al.* (2000) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Paphiopedilum* hybrid (*Paphiopedilum callosum* 'Oakhi' x *Paph. Lawreneanum* 'Tradition') จากการเพาะเลี้ยงแคลลัส บนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสาร

ควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถพัฒนาเป็น PLBs และต้นที่สมบูรณ์

2. ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

จากการศึกษาผลของน้ำตาล 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ หรือ Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติชี้ให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเฉลี่ย จำนวนยอดเฉลี่ยส่วนใหญ่ และจำนวนใบยอดใหม่เฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าสูตรอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตสให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเฉลี่ย จำนวนยอดใหม่เฉลี่ย น้ำหนักสดรวมเฉลี่ย และจำนวนรากยอดใหม่เฉลี่ยน้อยกว่าสูตรอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสและกลูโคส ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า น้ำตาลมอลโตสเกิดการไฮโดรไลซิสช้า จึงทำให้พืชนำคาร์บอนไปใช้ได้ในปริมาณจำกัด (Scott and Aprees 1995) ซึ่งโดยปกติแล้วพืชจะมีการสังเคราะห์แสงลดลง หรือไม่มีการสังเคราะห์แสงเลยเมื่ออยู่ในห้องเพาะเลี้ยง แต่พืชหรือเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยงดังกล่าวยังต้องการสารอาหารจำพวกคาร์บอน เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตในระหว่างการเพาะเลี้ยง จึงมีความจำเป็นที่จะต้องเพิ่มสารจำพวกคาร์บอนจากแหล่งภายนอกลงไปในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งมักได้จากน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ (บุษราภรณ์ 2548) และจากการทดลอง พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด 80 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 1.8 ยอด ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Tokuhara and Mii (2003) ที่ศึกษาน้ำตาล 6 ชนิด (กลูโคส, ฟรุคโตส, มอลโตส, แลกโตส, ซอบิทอล และ ซูโครส ความเข้มข้น 58.4 มิลลิโมลาร์) ต่อการชักนำให้เกิด somatic embryos จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของกล้วยไม้ *Doriataenopsis* โดยสามารถชักนำให้เกิด PLBs ได้ดีที่สุด จากสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสและการทดลองของ Novotna *et al*. (2007) ที่ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ *Dactylorhiza* species พบว่า น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ส่งผลกระตุ้นให้ต้นอ่อนมีการ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

พัฒนาที่ดี แต่ต่างจากการทดลองของ Rahman *et al.* (2005) ที่ศึกษาน้ำตาล 3 ชนิด (ซูโครส, มอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และซอบิทอล ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร) ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสและการชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ของกล้วยไม้ *Doritaenopsis* พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร NP ที่มีน้ำตาลมอลโตส มีสีเขียวและมีการเกิดเป็น PLBs มากว่าน้ำตาลซอร์บิทอล แต่น้ำตาลซอร์บิทอล ส่งผลให้ PLBs พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ดีกว่าน้ำตาลมอลโตสและซูโครส แต่อย่างไรก็ตาม น้ำตาลมอลโตสทำให้ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดีกว่าน้ำตาลซอร์บิทอลและซูโครส

3. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออก

จากการศึกษาผลของน้ำตาล 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ หรือ Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออก จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติชี้ให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด และจำนวนใบยอดใหม่เฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และแม้ว่าสูตรอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตสให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเฉลี่ยสูง แต่พบว่าน้ำหนักสดรวม และจำนวนรากยอดใหม่เฉลี่ยน้อย และรากมีลักษณะสั้นผิดปกติ มีขนรากน้อยหรือไม่มีขนราก ดังนั้นสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เฉลี่ย 90 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 1.6 ยอด จึงเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสม ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Hong *et al.* (2008b) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Alma Gavaert' จาก PLBs โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 3 ยอด จากสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงยอดอ่อนเป็นเวลา 60 วัน และจากการทดลองของ Ng and Saleh (2010a) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Paphiopedilum rothschildianum* ซึ่งสามารถชักนำการเกิด secondary PLBs เฉลี่ยมากที่สุด 4.1 PLBs ต่อ 1 primary PLBs จากสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.0 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

4. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

จากการศึกษาผลของน้ำตาล 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ หรือ Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ต่อการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ไม่มีสารควบคุมการเติบโต ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 1.0 ยอด และน้ำหนักสดรวมเฉลี่ยยอดใหม่มากกว่าสูตรอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตสอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Ng and Saleh (2010b) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Paphiopedilum rothschildianum* โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดทวีคูณจากตาข้าง ซึ่งมีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.9 ยอด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์ จากสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยเปปโตนความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส และไม่มีสารควบคุมการเติบโต แต่ต่างจากการทดลองของ Chen *et al.* (2002) ที่ศึกษาการเกิดยอดทวีคูณจากตาของก้านช่อดอกกล้วยไม้ *Paphiopedilum philippinense* 2 สายพันธุ์ (PH59 และ PH60) ในสายพันธุ์ PH59 มีการเกิดยอดและจำนวนยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อมากที่สุด 66.7 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ และสายพันธุ์ PH60 มีการเกิดยอดมากที่สุด 80 เปอร์เซ็นต์ จากสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

5. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

จากการนำชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 และ 4.54 ไมโครโมลาร์ เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 และ 13.56 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อที่เพาะเลี้ยงบนทุกสูตรอาหารข้างต้นไม่มีการเกิดแคลลัส

หรือ somatic embryos เลย เนื่องจากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลและตายหลังจากเริ่มเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 4-5 สัปดาห์ ซึ่งแตกต่างกับการทดลองของ Lin (1986) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Phalaenopsis* และ *Doritaenopsis* จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระหว่างข้อของก้านช่อดอก โดยสามารถชักนำให้เกิด PLBs จากเนื้อเยื่อส่วนเอพิเดอร์มิส และผิวหน้าของรอยตัด และพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน บนสูตรอาหาร VW ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และการทดลองของ Chen *et al*. (2002) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Epidendrum radicans* จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระหว่างข้อของก้านช่อดอก โดยสามารถชักนำการเกิด PLBs บนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ในเวลา 2 เดือน และสามารถเพิ่มจำนวน PLBs ได้มากที่สุด 23.6 PLBs ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร NH_4NO_3 ความเข้มข้น 825 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KNO_3 ความเข้มข้น 950 มิลลิกรัมต่อลิตร และ PLBs สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์เมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้นเดิม ในเวลา 1 เดือน

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

6. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

จากการนำใบบริเวณยอดจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ครึ่งล่างขนาด 0.3 x 0.4 ตารางเซนติเมตร ไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 และ 4.54 ไมโครโมลาร์ เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 และ 13.56 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนทุกสูตรอาหารข้างต้นไม่มีการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos เลย เนื่องจากชิ้นส่วนใบมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลและตายหลังจากเริ่มเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ ซึ่งแตกต่างกับการทดลองของ Chen *et al*. (2004) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Paphiopedilum* hybrid 2 สายพันธุ์ (PH59 และ PH60) จากการชักนำให้เกิดยอดจากบริเวณบาดแผลของชิ้นส่วนใบ ที่สามารถเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนใบที่ใช้ทดลองได้ดีที่สุด บนสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 4.54 ไมโครโมลาร์ ในสายพันธุ์ PH59 และสามารถชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบที่ใช้ทดลองได้ดีที่สุด บนสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.45 ไมโครโมลาร์ ในสายพันธุ์ PH60 และการทดลองของ Chen and Chang (2006) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Phalaenopsis amabilis* จากชิ้นส่วนใบ ซึ่งสามารถชัก

นำให้เกิด somatic embryos มากที่สุดเฉลี่ย 19.4 จาก epidermal cell โดยตรง บนสูตรสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3.0 ไมโครโมลาร์ และการทดลองของ Park *et al*. (2002b) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Doritaenopsis* hybrid จากชิ้นส่วนใบด้วยวิธี thin-section culture เพื่อชักนำให้เกิด PLBs โดยตรง ซึ่งสามารถชักนำให้เกิด PLBs ได้ 72.3 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวน PLBs เฉลี่ย 18 PLBs บนสูตรอาหาร 1/2 MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 9.0 ไมโครโมลาร์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

1.1 ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

การชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex [ปุ๋ย Hyponex (6.5N-4.5P-19K) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร + เปปโตน (peptone) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร + น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร] ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn, 2,4-D และ Ads ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากและสม่ำเสมอที่สุด 1.4 ยอด

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

1.2 ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต TDZ BA Kn และ 2,4-D ต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

การชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex [ปุ๋ย Hyponex (6.5N-4.5P-19K) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร + เปปโตน (peptone) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร + น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร] ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ, BA, Kn และ 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด 90 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากและสม่ำเสมอที่สุด 1.3 ยอด

2. ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

การชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากส่วนยอดของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex [ปุ๋ย Hyponex (6.5N-4.5P-19K) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร + เปปโตน (peptone) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร + น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร] ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ หรือ Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด 80 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 1.8 ยอด

3. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดส่วนยอดออก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

การชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ที่ตัดยอดออก โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex [ปุ๋ย Hyponex (6.5N-4.5P-19K) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร + เปปโตน (Peptone) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร + น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร] ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ หรือ Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเติบโต Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เฉลี่ยดีที่สุด 90 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 1.6 ยอด

4. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

การชักนำการเกิดยอดจากส่วนข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Hyponex [ปุ๋ย Hyponex (6.5N-4.5P-19K) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร + เปปโตน (Peptone) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร + น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร] ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ หรือ Kn ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Hyponex ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ปราศจากสารควบคุมการเติบโต ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 1.0 ยอด

5. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

การชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS (1/2 strength macro-and full-strength micro elements) ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 และ 4.54 ไมโครโมลาร์ เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 และ 13.56 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อที่เพาะเลี้ยงบนทุกสูตรอาหารข้างต้นไม่มีการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos เลย เนื่องจากชิ้นเนื้อเยื่อระหว่างข้อมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลและตายหลังจากเริ่มเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 4-5 สัปดาห์

6. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi'

การชักนำการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS (1/2 strength macro-and full-strength micro elements) ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และมอลโตส ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.45 และ 4.54 ไมโครโม

ลาร์ เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 และ 13.56 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนทุกสูตรอาหารข้างต้นไม่มีการเกิดแคลลัส หรือ somatic embryos เลย เนื่องจากชิ้นส่วนใบมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลและตายหลังจากเริ่มเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ข้อเสนอแนะ

1. การนำต้นกล้วยไม้ไว้ในที่มืดเพื่อให้เนื้อเยื่อระหว่างข้อ และใบยืดยาวพอที่จะใช้ทำการทดลองควรใช้สารควบคุมการเติบโตในกลุ่มที่ช่วยให้เซลล์ยืดตัวได้ดีร่วมด้วยเพื่อลดระยะเวลาของขั้นตอนการเตรียมพืช

2. การชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ส่วนต่างๆ ควรนำยอดใหม่ไปปลูกและหาอัตราการรอดชีวิตจากยอดที่ได้จากส่วนต่างๆ

3. การชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากกล้วยไม้ *Paphiopedilum* 'Delrosi' ส่วนต่างๆ ควรศึกษาต่อไปว่ายอดใหม่ที่ได้จากส่วนต่างๆ มีลักษณะเหมือนต้นเดิมหรือแตกต่างกันอย่างไร

4. การเพาเลี้ยงส่วนเนื้อเยื่อระหว่างข้อ และชิ้นส่วนใบ ควรใช้ภาชนะเพาะเลี้ยงให้มีขนาดเหมาะสมกับเนื้อเยื่อ เพื่อลดการสูญเสียน้ำของชิ้นเนื้อเยื่อ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ข่าวประชาสัมพันธ์. [Online] Accessed 07 April 2007. Available from http://www.moac.go.th/builder/moac02/information/view_index.php?id=2489.

_____. ข่าวประชาสัมพันธ์. [Online] Accessed 01 February 2010. Available from http://webnew.moac.go.th/ewt_news.php?nid=991&filename=index.

_____. ข่าวประชาสัมพันธ์. [Online] Accessed 16 December 2010. Available from http://webnew.moac.go.th/ewt_news.php?nid=4683&filename=index.

คำนูน กาญจนภูมิ. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2544.

ธารทิพย์ เพชระบูรณิน. ผลิใบ. [Online] Accessed 27 January 2010. Available from http://it.doa.go.th/pibai/pibai/n9/v-2-mar/bonprox.pdf.

บุษราภรณ์ งามปัญญา. เทคโนโลยีเซลล์และเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิคพื้นฐาน. นครปฐม : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2548.

สลิล สิทธิสัจธรรม. กล้วยไม้ป่าเมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์บ้านและสวน สายธุรกิจโรงพิมพ์ บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน), 2549.

ระพี สาคริก. กล้วยไม้รองเท้านารี วิธีปลูกเลี้ยงและปัญหาอนุรักษ์ธรรมชาติ. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 2535.

_____. การเพาะปลูกกล้วยไม้ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย. กรุงเทพฯ : ชวนพิมพ์, 2516

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2541.

อุไร จิรมงคลการ. กล้วยไม้รองเท้านารี. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์บ้านและสวน สายธุรกิจโรงพิมพ์ บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน), 2549.

ภาษาต่างประเทศ

Arditti, J. and Ernst, R. Micropropagation of orchids. Second edition published. Singapore : COS Printers Pte Ltd., 2008

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Chen, J.T., Chang, C. and Chang, W.C. "Direct somatic embryogenesis on leaf of *Oncidium* Gower Ramsey and subsequent plant regeneration." Plant Cell Reports, 19 (1999): 143-149.

Chen, J.T. and Chang, W.C. "Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey'." Plant Growth Regulation, 34 (2001): 229-232.

_____. "TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium*." Biologia Plantarum, 79 (2004): 315-320.

_____. "Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*." Biologia Plantarum, 50(2) (2006): 169-173.

Chen, L.R., Chen, J.T. and Chang, W.C. "Efficient production of protocorm-like bodies and plant regeneration from flower stalk explants of the sympodial orchid *Epidendrum radicans*." *In Vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant, 38 (2002): 441-445.

Chen, T.Y., Chen, J.T. and Chang, W.C. "Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explant of *Paphiopedilum* orchids." *In Vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant, 38 (2002): 595-597.

_____. "Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids." Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 76 (2004): 11-15.

Chung, H.H., Chen, J.T. and Chang, W.C. "Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*." Biologia Plantarum, 50(2) (2007): 346-350.

Faria, R.T., Rodrigues, F.N., Oliveira, L.V.R., Muller, C. "In vitro *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations." Horticultura Brasileira, 22(4) (2004): 780-783.

Gow, W.P., Chen, J.T. and Chang, W.C. "Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids." Acta Physiologiae Plantarum, 30 (2008): 507-512.

Hong, P.I., Chen, J.T. and Chang, W.C. "Promation of direct somatic embryogenesis of *Oncidium* by adjusting carbon sources." Biologia Plantarum. 52(3) (2008a): 597-600.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

_____. "Plant regeneration via protocorm-like body formation and shoot multiplication from seed-derived callus of a maudiae type slipper orchid." Acta Physiologiae Plantarum, 30 (2008b): 755-759.

Huang, L.C., Lin, C.J., Kuo, C.I., Huang, B.L. and Murashige, T. "*Paphiopedilum* cloning in vitro." Scientia Horticulturae, 91 (2001): 111-121.

Islam, M.O. and Ichihashi, S. "Effects of sucrose, maltose and sorbitol on callus growth and plantlet regeneration in *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis* and *Neofinetia*." Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 68(6) (1999): 1124-1131.

Jheng, F.Y., Do, Y.Y., Liauh, Y.W., Chung, J.P. and Huang, P.L. "Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus culture of *Oncidium* 'Gower Ramsey' by adjusting carbohydrate sources." Plant Science, 170 (2006): 1133-1140.

Kuo, H.L., Chen, J.T. and Chang, W.C. "Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* 'Little Steve'." *In Vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant, 41 (2005): 453-456.

Lee, Y.I. and Lee, N. "Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*." *In Vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant, 39 (2003): 475-479.

Lin, C.C. "*In vitro* culture of flower stalk internodes of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*." Lindleyana, American Orchid Society, 1(3) (1986): 158-163.

Lin, Y.H., Chang, C. and Chang, W.C. "Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid." Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 62 (2000): 21-25.

Lin, Y.H., Jun, D., Cheng, L. and Lin, C.Z. "Seed germination in vitro of *Paphiopedilum armeniacum* and *P. micranthum*." Acta Horticulturae Sinica, 31(4) (2004): 540-542.

Long, B., Niemiera, A.X. and Cheng, Z.Y. "In vitro propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae)." Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 101 (2010): 151-162.

Nasiruddin, K.M., Begum, R. and Yasmin, S. "Protocorm like bodies and plantlet regeneration from *Dendrobium formosum* leaf callus." Asian Journal of Plant Science, 2(13) (2003): 955-957.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Nayak, N.R., Patnaik, S. and Rath, S.P. "Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann." Plant Cell Reports, 16 (1997): 583-586.

Ng, C.Y. and Mohd. Saleh, N. "*In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like bodies." Plant Cell, Tissue and Organ Culture, (2010a)

_____. "*In vitro* multiplication of the rare and endangered slipper orchid, *Paphiopedilum rothschildianum* (orchidaceae)." African Journal of Biotechnology, 9(14) (2010b): 2062-2068.

Novotna, K.W., Vehsadova, H. and Kindlmann, P. "Effect of sugar and growth regulators on *in vitro* growth of *Dactylorhiza* species." Biologia Plantarum, 51(1) (2007): 198-200.

Park, S.Y., Murthy, H.N. and Paek, K.Y. "Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves." *In Vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant, 38 (2002a): 168-172.

Park, S.Y., Yeung, E.C., Chakrabarty, D. and Paek, K.Y. "An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture." Plant Cell Reports, 21 (2002b): 46-51.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Rahman, M., Prodhan, A. and Ichihashi, S. "Effect of carbohydrates on callus growth and callus derived plantlet regeneration in *Doritaenopsis* orchid." Biotechnology, 4(2) (2005): 126-131.

Sama, C.M. and Kalita, M. "In vitro propagation of a terrestrial endangered orchid *Paphiopedilum* insigne (Wall. ex. Lindl.) Pfitz." Journal of Phytological Research, 17(1) (2004): 1-5.

Scott, R.L. and Aprees, L.T. "Metabolism of maltose and sucrose by microspores isolated from barlay (*Hordeum vulgare* L.)." Planta, 197 (1995): 435-441.

Shimaru, H. and Koda, Y. "Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* through protocorm-like bodies derived from mature seeds." Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 78 (2004): 273-276.

Su, Y.J., Chen, J.T. and Chang, W.C. "Efficient and repetitive production of leaf-derived somatic embryos of *Oncidium*." Biologia Plantarum, 50(1) (2006): 107-110.

Tokuhara, K. and Mii, M. "Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources." *In Vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant, 39 (2003): 635-639.

Yan, N., Hu, H., Huang, J.L., Xu, K., Wang, H. and Zhou, Z.K. "Micropropagation of *Cypripedium flavum* trough multiple shoots of seedlings derived from mature seed." Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 84 (2006): 113-117.

Yung, L. and Nean, L. "Effect of capsule maturity, medium composition and suspension culture on *in vitro* germination of *Paphiopedilum primulinum* seed." Journal of the Chinese Society for Horticultural Science, 47(2) (2001): 147-156.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

คำอธิบายคำย่อ

คำย่อ		**คำเต็ม**
μM	=	Micromolar
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
Ads	=	Adenine sulfate
BA	=	6-benzyladenine
g/l	=	Gram/litre
Kn	=	Kinetin
mg/l	=	Milligram/litre
MS	=	Murashige and Skoog (1962)
TDZ	=	Thidiazuron
v/v	=	Volume per volume

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางภาคผนวก องค์ประกอบของอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962)

องค์ประกอบ	มิลลิกรัมต่อลิตร
ธาตุอาหารหลัก (macronutrients)	
$MgSO_4.7H_2O$	370
$CaCl_2.2H_2O$	440
KNO_3	1,900
NH_4NO_3	1,650
$KHPO_4$	170
ธาตุอาหารรอง (micronutrients)	
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
KI	0.83
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$ZnSO_4.5H_2O$	8.6
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
H_3BO_3	6.2
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
สารอินทรีย์ (organic constituents)	
Glycine	2
Myo-inositol	100
Thiamine HCl (Vitamin B1)	0.1
Pyridoxine HCl (Vitamin B2)	0.5
Nicotinic acid	0.5
EDTA (disodium salt)	37.3
Sucrose	30,000 (30 g/l)
Agar	6,200 (6.2 g/l)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นายเอกสิทธิ์ นิสยันต์

ที่อยู่ 61/2 หมู่ 1 ตำบล เขาพระ อำเภอ เดิมบางนางบวช จังหวัด สุพรรณบุรี 72120

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2545 สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนกาญจนาภิเษกวิทยาลัย สุพรรณบุรี

พ.ศ. 2549 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สาขาชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยศิลปากร
การศึกษารายบุคคลเรื่อง “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกาบหอยแครง (*Dionaea muscipula*)”

พ.ศ. 2550 ศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
วิทยานิพนธ์เรื่อง “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้รองเท้านารี (*Paphiopedilum* ‘Delrosi’)”

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ประวัติการเข้าร่วมอบรม

พ.ศ. 2551 เข้าร่วมสัมมนาประจำปีของคลัสเตอร์กล้วยไม้ ครั้งที่ 4 ในหัวข้อ "ความก้าวหน้าของคลัสเตอร์กล้วยไม้" ณ ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

พ.ศ. 2552 เข้ารวมการประชุมวิชาการจุลทรรศน์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 26 โดยความร่วมมือระหว่าง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสมาคมจุลทรรศน์แห่งประเทศไทย

พ.ศ. 2553 เสนอผลงานการวิจัยเรื่อง “Multiple shoot induction from seed derived shoots of *Paphiopedilum*.” The First International Orchid Symposium. National Museum of Natural Science Taichung, Taiwan.

ผลงานที่ตีพิมพ์เผยแพร่

Nisayan, E., Thepsithar, C. and Thongpukdee A. “Multiple shoot induction from seed derived shoots of *Paphiopedilum*.” Acta Horticulturae, 878 (2010): 199-204.