ผลของสูตรอาหาร น้ำตาลซูโครส และไคโตซานต่อการเพิ่มปริมาณต้นเอื้องมัจฉาในหลอดทดลอง

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

สุนทรียา กาละวงศ์[1], ภาณุวัฒน์ ยิ้มย่อง[1], สุพัตร ฤทธิรัตน์[2], สกุลรัตน์ สุวรรณโณ[3] และ อภิรดี เสียงสืบชาติ[4*]

Soontreeya Kalawong[1], Panuwat Yimyong[1], Suphat Rittirat[2], Sakulrat Suwanno[3] and Apiradee Siangsuepchart[4*]

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ เพื่อให้ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพขยายพันธุ์ต้นกล้วยไม้เอื้องมัจฉาในหลอดทดลอง และมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น คือศึกษาชนิดของสูตรอาหาร ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล และผลของสารไคโตซาน โดยการนำโปรโตคอร์มของกล้วยไม้วางเลี้ยงบนอาหาร 3 สูตร คือ อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่ลดความเข้มข้นลงครึ่งหนึ่ง (½ MS) อาหารสูตร VW (Vacin and Went) และอาหารสูตร ND (New Dogashima medium; Tokuhara and Mii) เติมน้ำตาลซูโครส 0.2 % น้ำมะพร้าว 150 มล./ล. และวุ้น 7.5 ก./ล. หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 50 วัน พบว่า สูตรอาหาร VW ให้จำนวนโปรโตคอร์มเฉลี่ยสูงสุด (2.11±0.30 มม.) ความสูงต้นเฉลี่ยสูงสุด (1.51±0.15 ซม.) และจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด (3.52±0.37 ใบต่อต้น) นอกจากนี้พบว่าน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลให้จำนวนโปรโตคอร์มและการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เพิ่มขึ้น คือ อาหารที่เติมน้ำตาล 7 % ให้จำนวนโปรโตคอร์ม (3.92±0.38 โปรโตคอร์ม) ความสูงต้น (2.85±0.26 มม.) จำนวนใบ (4.91±0.10 ใบ) และจำนวนราก (3.55±0.24 ราก) สูงที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.01$) สำหรับการใช้สารไคโตซาน พบว่าอาหารที่เติมไคโตซาน เข้มข้น 10 มก./ล.ให้ความยาวรากและอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าชุดควบคุม คือ อาหารที่ไม่เติมไคโตซาน

คำสำคัญ: กล้วยไม้เอื้องมัจฉา สูตรอาหาร น้ำตาล ไคโตซาน

Abstract: The purpose of this research was to establish method for the effective propagation and plant survival of *Dendrobium palpebrae* Lindl. The evaluated parameters included kinds of basal

Received August 1, 2019

Accepted October 9, 2019

[1]สาขาวิชาเกษตรและเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา จังหวัดกรุงเทพฯ 10600

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

[2] สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช จังหวัดนครศรีธรรมราช 80280

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

[3] สาขาการปรับปรุงพันธุ์พืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

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

[4] สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ จังหวัดแพร่ 54140

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

* Corresponding author: siangsuepchart.apiradee@gmail.com

media, sucrose concentrations and chitosan. Protocorms were cultured on half strength MS medium (½ MS) (Murashige and Skoog), VW medium (Vacin and Went) and ND medium with 0.2 % sucrose (New Dogashima medium; Tokuhara and Mii) and 150 ml coconut water and 7.5 g/L agar. After 50 days of culture, VW medium gave the highest protocorm number (2.11±0.30 protocorms), plant height (1.51±0.15 mm.) and leaf number (3.52±0.37 leaves). In addition, sucrose concentrations were improved on protocorm number and plant growth of orchid. These results shown that VW medium with 7 % sucrose gave the highest protocorm number at 3.92±0.38 protocorms, plant height at 2.85±0.26 mm., leaf number at 4.91±0.10 leaves and root number at 3.55±0.24 roots, significantly difference at the confidence level ($P \leq 0.01$). For chitosan treatments, medium with low concentrations at 10% of chitosan gave the better result in root length and survival rate than medium without chitosan.
Keywords: *denderobium palapebrae* lindl., culture media, sucrose, chitosan

บทนำ

เอื้องมัจฉา (*Dendrobium palpebrae* Lindl.) เป็นกล้วยไม้ป่าที่มีช่อดอกสีสันสวยงาม กลิ่นหอม (นฤมล, 2557) พบได้ทุกภาคของประเทศไทยส่วนใหญ่พบในป่าดิบแล้งและป่าเบญจพรรณ ลักษณะลำต้นเป็นลำเหลี่ยม แผ่นใบค่อนข้างหนา ช่อดอกเป็นพวงห้อย เกิดตามข้อ กลีบดอกสีขาว กลีบปากสีเหลืองขอบขาว (**Figure 1a**) (อบฉันท์, 2552) ปัจจุบันได้มีรายงานการศึกษาพฤกษทางเคมีจากการสกัดสารในกล้วยไม้สกุลหวายหลายชนิด พบว่ามีสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต คูมาริน อัลคาลอยด์ ไฟโทสเตอรอยด์ ฟลาโวนอยด์ สารในกลุ่มสเตอรอยด์ ไตรเทอร์พีนอยด์ แทนนิน ฟีนอล ฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก สารแอนโทไซยานิน (Prajapati and Patel, 2013; Johnson and Janakiraman, 2013; Shafazila *et al*., 2010) และสาร phenolic glycoside dendroside ที่สามารถต้านเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด (Zhou *et al*., 2017) สำหรับในเอื้องมัจฉา พบว่า มีสารที่ชื่อว่า Dendroflorin ที่สามารถไปลด ROS และปรับปรุงกิจกรรมของเอ็นไซม์ SOD GPx และ CAT โดยสารเหล่านี้มีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระได้ดี (**Figure 1b**) (Napat et al., 2018) การนำกล้วยไม้เหล่านี้มาใช้ประโยชน์ต้องทำลายต้น ซึ่งพบว่าในธรรมชาติกล้วยไม้ชนิดนี้มีอัตราการติดดอกและการงอกของเมล็ดต่ำเนื่องจากเมล็ดของกล้วยไม้ไม่มีอาหารสะสมภายในเมล็ดการงอกของเมล็ดสามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติแต่จำเป็นต้องอาศัยเชื้อราบางชนิดนำธาตุอาหารภายนอกเข้าไปในเซลล์ราก (ศิริลักษณ์, 2554) ปัจจุบันการทำลายป่าไม้มีแนวโน้มสูงขึ้นทำให้แหล่งที่อยู่ของกล้วยไม้ลดลง (Tapash and Rahman, 2017) อีกทั้งการพัฒนากล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่มักใช้วิธีผสมเกสรและเพาะเมล็ด จึงจำเป็นต้องอาศัยการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อซึ่งสามารถช่วยในการกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการงอก การเจริญเติบโต หรือการพัฒนาต่าง ๆ ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช (ไซนีย๊ะ และคณะ, 2558) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้เป็นจำนวนมาก ในระยะเวลาอันสั้น สำหรับการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตสามารถทำได้โดยการเพิ่มน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งพลังงานให้กับพืช นิยมใช้น้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 1-5 % (ศุภาวีร์ และ จักรพงศ์, 2558) ปัจจุบันทางด้านการเกษตรมีการนำไคโตซานมาใช้เป็นอาหารเสริมให้แก่พืชเพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ป้องกันโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืชอีกหลายชนิด (พรทิพย์ และ ศุภลักษณ์, 2548; อนุรักษ์, 2561) ไคโตซานเป็นสารโพลิเมอร์ธรรมชาติที่มีองค์ประกอบสำคัญในรูปของ D-glucosamine ซึ่งองค์ประกอบในเปลือกนอกของพวกสัตว์ และผนังเซลล์ของเชื้อราบางชนิด เป็นวัสดุชีวภาพที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ มีความปลอดภัยในการนำมาใช้กับมนุษย์ไม่ก่อให้เกิดการแพ้ และปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ไม่ไวไฟ และไม่เป็นพิษต่อพืช (ภาวดี, 2544) การนำไคโตซานมาใช้ในเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทำได้โดยการเติมไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการกระตุ้นให้ต้นกล้วยไม้มีการเกิดราก แตกใบใหม่ และการเจริญเติบโตด้าน

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

วิธีการศึกษา

เพื่อศึกษาผลของสูตรอาหาร และน้ำตาลต่อเพิ่มปริมาณของกล้วยไม้เอื้องมัจฉาในหลอดทดลอง และเพื่อผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องมัจฉาในหลอดทดลองและอัตราการรอดชีวิตหลังจากการออกปลูกในสภาพโรงเรือน

1. การเตรียมเนื้อเยื่อพืช

นำฝักกล้วยไม้เอื้องมัจฉา อายุ 10 เดือน (**Figure 1c**) มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มล./ล. น้ำตาลซูโครส 0.2 % ผงวุ้น 7.5 ก./ล. ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.0 เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 12.5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชม./วัน อุณหภูมิ 26±2 ºC เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (**Figure 1d**) จากนั้นนำโปรโตคอร์มที่มีขนาด 1-2 x 3-4 มม. และมีใบ 2 ใบ มาใช้ในการทดลองต่อไป (**Figure 1e**)

2. การศึกษาสูตรอาหารต่อการพัฒนาโปรโตคอร์มเอื้องมัจฉา

นำโปรโตคอร์มของเอื้องมัจฉา มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร 3 สูตร คือ อาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949) อาหารสูตร ND (New Dogashima) (Tokuhara and Mii, 1993) และอาหารสูตร ½ MS (Murashige and Skoog, 1962) โดยอาหารทุกสูตรเติมน้ำมะพร้าว 150 มล./ล. น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 0.2 % เติมผงวุ้นเข้มข้น 7.5 ก./ล. ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น 5.0 วางเลี้ยงที่ความเข้มแสง 12.5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 ชม./วัน อุณหภูมิ 26±2 ºC เป็นระยะเวลา 50 วัน บันทึกจำนวนโปรโตคอร์ม จำนวนใบ ความยาวใบ จำนวนราก ความยาวราก และความสูงต้น วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test) ทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด ขวดละ 4 โปรโตคอร์ม

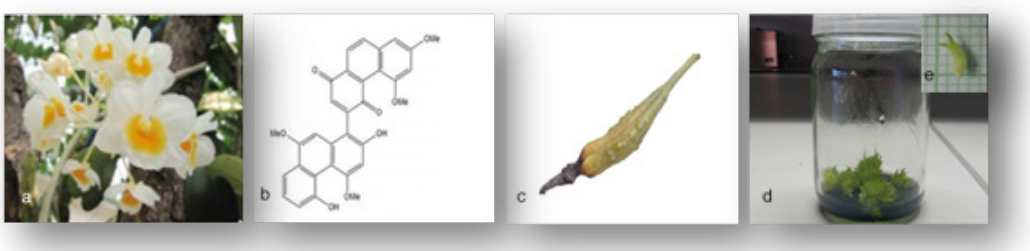

Figure 1 Characteristics of inflorescence (a), Dendroflorin (b), pod (c) and protocorm (d, e) of *D. palpebrae*.

Source: Tapash and Rahman (2010)

3. การศึกษาน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญเติบโตโปรโตคอร์มเอื้องมัจฉา

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

4. การศึกษาไคโตซานต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตของกล้วยไม้เอื้องมัจฉา

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

5. การปรับสภาพพืชปลูก

นำกล้วยไม้เอื้องมัจฉามาปรับสภาพปลูก โดยการนำไปไว้ในโรงเรือนก่อนย้ายปลูก 2-3 วัน คลายฝาขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก่อน 2-3 วัน แล้วล้างวุ้นออกจากรากพืชให้สะอาด นำพืชมาแช่น้ำยาป้องกันเชื้อราก่อนปลูกในภาชนะที่บรรจุวัสดุปลูก คือ ถ่าน จากนั้นนำมาวางเลี้ยงในโรงเรือนที่มีการพรางแสง 50 % อุณหภูมิ 28±2 ºC ความชื้น 50 % เพื่อลดความเข้มแสงและอุณหภูมิโรงเรือน หลังย้ายปลูกเป็นเวลา 30 วัน บันทึกอัตราการรอดชีวิต ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. ผลของสูตรอาหารต่ออัตราการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มเอื้องมัจฉา

ผลของสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร คือ VW ND และ ½ MS ซึ่งมีองค์ประกอบและความเข้มข้นของธาตุอาหารที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน อาหารสูตร VW ให้จำนวน โปรโตคอร์มเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 2.11±0.30 โปรโตคอร์ม รองลงมา คือ อาหารสูตร ND ให้ค่าเฉลี่ย 1.76±0.20 โปรโตคอร์ม และอาหารสูตร ½ MS ให้ค่าเฉลี่ย 1.48±0.17 โปรโตคอร์ม ตามลำดับ (Table 1) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ทั้งนี้อาหารสูตร VW ให้ค่าเฉลี่ยความสูงต้น และจำนวนใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 1.51±0.18 มม. และ 3.52±0.37 ใบต่อต้น ตามลำดับ รองลงมาเป็นอาหารสูตร ND และอาหารสูตร ½ MS อาหารสูตร VW ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอื้องมัจฉาได้ดีกว่าอาหารสูตรอื่นๆ คือเกิดการสร้างกลุ่มก้อนโปรโตคอร์มเป็นจำนวนมากจนสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนที่มีความแข็งแรง และเกิดการสร้างยอดได้ ส่วนลักษณะฟีโนไทป์ของเอื้องมัจฉาในการทดลอง พบว่า ต้นมีใบเรียวยาว ขอบใบขนาน ปลายใบแหลมและเกิดรากบริเวณฐานของลำต้น (Figure 2a, b) เนื่องจากสูตรอาหาร VW มีธาตุอาหารหลักที่ประกอบด้วย KNO_3 และ KH_2PO_4 ที่มีปริมาณมากกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ นอกจากนี้อาหารสูตรนี้ยังมี Ca_2PO_4 ซึ่งธาตุอาหารนี้เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ จัดอยู่ในรูปของแคลเซียมแพคเต็ดมีหน้าที่ช่วยในการแบ่งเซลล์ สร้างโปรตีนและช่วยในการทำงานของเอนไซม์ตัวอื่น ๆ ด้วย จึงทำให้พืชมีความแข็งแรงและส่งเสริมการเจริญเติบโต โดยอาหารสูตร VW มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มในกล้วยไม้หลายชนิด เช่น เอื้องเงินหลวง (นุชรัฐ และอัญชลี, 2553; ศิริลักษณ์, 2554) ไม้เอื้องไอยเรศ (วันฟิรฮาน และคณะ, 2557) กุหลาบกระเป๋าปิด (สุภาวดี และคณะ, 2558) และกะเรกะร่อนปากเป็ด (อาทิตยา และวราภรณ์, 2560) ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกใช้ สูตรอาหาร VW ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไม้เอื้องมัจฉาในการศึกษาต่อไป

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

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

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

2. ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มเอื้องมัจฉา

การเพิ่มปริมาณโปโตคอร์มของเอื้องมัจฉา ภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน บนอาหารสูตร VW เติมน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า อาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 7% ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนต้นสูงที่สุด คือ 3.92±0.38 โปรโตคอร์ม รองลงมา คือสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 6 5 และ 4% ให้จำนวนโปรโตคอร์มเฉลี่ย 3.68±0.66 3.55±0.51 และ 3.38±0.49 โปรโตคอร์ม ตามลำดับ (**Table 2**) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับอาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 7% โดยจำนวนโปรโตคอร์มจะเพิ่มขึ้นสองเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารสูตร VW เติมน้ำตาลความเข้มข้น 2% ให้จำนวนโปรโตคอร์ม 2.80±0.53 โปรโตคอร์ม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับอาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 7% เมื่อพิจารณาอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส สามารถเกิดโปรโตคอร์มได้เช่นกัน อาจเนื่องมาจากในอาหารมีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบ ซึ่งในน้ำมะพร้าวมีทั้งกรดอะมิโน สารประกอบไนโตรเจน กรดอินทรีย์ ฮอร์โมนพืช (zeatin และ zeatin riboside) และน้ำตาล ซึ่งสารเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งเซลล์และส่งเสริมการขยายของเซลล์ทำให้พืชมีการเจริญและพัฒนาได้ (Letham, 1973; ไชนีย๊ะ และคณะ, 2559) ในการศึกษาครั้งนี้ยัง พบว่า เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำตาลให้สูงขึ้น ส่งผลให้การเจริญเติบโตของกล้วยไม้สูงขึ้นด้วย คือ สูตรอาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 7% ให้ค่าเฉลี่ยความสูงต้น จำนวนใบ จำนวนราก และความยาวรากสูงสุด ส่วนลักษณะทางฟีโนไทป์ของต้นกล้วยไม้เอื้องมัจฉา พบว่า ต้นมีสีเขียวอ่อนอวบ ใบเรียวยาว ปลายใบแหลม มีรากที่ยาวเป็นสีขาว และมีจำนวนรากที่เพิ่มมากขึ้น (**Figure 2c**) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในการทดลองมีการสังเคราะห์แสงที่ต่ำ เพราะได้รับแสงในปริมาณน้อย และมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณที่จำกัด ดังนั้นการเพิ่มแหล่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่มาจากน้ำตาลซูโครส จึงทำให้ต้นพืชมีการเจริญเติบโตได้ดี แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ คือ น้ำตาล โดยน้ำตาล sucrose จะเปลี่ยนรูปไปเป็น glucose และ fructose เมื่อได้รับความร้อนจากการนึ่งฆ่าเชื้อ อัตราการเจริญเติบโตของต้นพืชจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นแต่เมื่อเลยจุดที่เหมาะสมไปการเจริญเติบโตของต้นพืชจะลดลง (Suphat et al., 2012) ถึงแม้อัตราการเจริญเติบโตของต้นพืชจะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อน้ำตาลเกินจุดสูงสุดที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นพืชจะส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของต้นพืชลดลง เนื่องจากการเพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำตาลจะ

ทำให้ความออสโมติกในอาหารเพิ่มขึ้นด้วย ทำให้เซลล์พืชมีการสูญเสียน้ำเกิดการแห้งน้ำของต้นพืช (Krasimira and Georgina, 2014; Yoon et al., 2016) ซึ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้นั้น กล้วยไม้แต่ละชนิดต้องการระดับความเข้มข้นของน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างไป ดังนั้นอาจทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนการเติมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่สูงขึ้นต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้นี้ต่อไป

3. ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของเอื้องมัจฉา

จากการศึกษาของผลของไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ต้นกล้วยไม้เอื้องมัจฉาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติมไคโตซานความเข้มข้น 10 มก./ล. ให้ความยาวราก และอัตราการอดชีวิตหลังจากการออกปลูกในสภาพโรงเรือนด้วยการใช้วัสดุปลูกเป็นถ่านไม้ (Figure 2d) เฉลี่ยสูงที่สุด คือ 2.56±0.11 มม. และ 76.67±2.89% ตามลำดับ (Table 3) สอดคล้องกับการศึกษา วุฒิชัย และคณะ (2559) ได้เพาะเลี้ยงเอื้องรงรอง (*Panisea uniflora* Lindl.) บนอาหารเติมไคโตซาน พบว่าต้นที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนไคโตซานทุกความเข้มข้นเมื่อออกปลูกในสภาพโรงเรือนให้อัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด 100% เนื่องจากไคโตซานมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้น (elicitor) ให้แก่ต้นพืช โดยจะไปกระตุ้นยีนในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ARnase β–glucanase และ phytoalexines ส่งผลต่อการกระตุ้นระบบป้องกันหรือช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันต่อการเกิดโรคในพืชได้และทำให้ต้นพืชแข็งแรง รวมไปถึงไคโตซานยังช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากหมู่อะมิโนที่เป็นประจุเป็นบวกสามารถที่จะไปจับประจุลบของผนังของแบคทีเรียมีผลให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (Boonkerd et al.,1996) แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่าอัตราการรอดชีวิตของต้นที่ออกปลูกกลับลดลงเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานเพิ่มขึ้น ซึ่ง Pornpienpakdee et al. (2006) พบว่าการเลี้ยงโปรโตคอร์มของกล้วยไม้หวาย ‘เอียสกุล’ ในอาหารเติมไคโตซานที่ความเข้มข้นที่สูง คือ 80 ppm มีผลการยับยั้งการเติบโตของโปรโตคอร์มและที่ระดับความเข้มข้น 160 ppm ทำให้เนื้อเยื่อชีดขาวและเซลล์ตาย จึงจำเป็นต้องใช้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในแต่ละพืช นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าการเพาะเลี้ยงต้นเอื้องมัจฉาบนอาหารเติมไคโตซานในหลอดลดลองที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ส่งผลของค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ทั้งจำนวนโปรโตคอร์ม ความสูง จำนวนใบต่อต้น ความยาวใบ และจำนวนราก อาจเป็นเพราะในการศึกษาได้ใช้ชิ้นส่วนที่เป็นต้นที่มีขนาดเล็กการตอบสนองและความต้องการของธาตุอาหารมีปริมาณไม่มากทำให้การเติมไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จึงให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าจะมีรายงานว่าโครงสร้างของไคโตซานมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สามารถปลดปล่อยออกมาเพื่อให้พืชใช้ในการเจริญเติบโตได้ ทั้งนี้ความเข้มข้นของไคโตซานต้องเหมาะสม หากมากหรือน้อยไปส่งผลให้เกิดปริมาณไนโตรเจนที่ไม่พอดีกับพืชที่จะนำไปใช้ได้และมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช (สมพร และหาพิส, 2557) ดังนั้นจากการศึกษาการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารและระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมก็สามารถส่งเสริมการเจริญเติบและพัฒนาของต้นกล้วยไม้ได้ สำหรับไคโตซานสามารถนำมาใช้เติมในอาหารช่วงก่อนการออกปลูกจากในหลอดทดลอง เพื่อทำให้อัตราการรอดชีวิตในการออกปลูกในโรงเรือนสูงขึ้น (ภาวดี, 2544; สมพร, 2555) หลังจากการออกปลูก พบว่าลักษณะทางฟีโนไทป์ของต้นเอื้องมัจฉา มีลำต้นอวบหนา ลำต้นไม่สูงมาก ใบหนาสีเขียว มีจำนวนรากน้อย รากเป็นสีเขียวออกขาวเห็นได้ชัดเป็นต้น (Figure 2e) และต้นอ่อนสามารถเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่องในวัสดุปลูกที่เป็นถ่านไม้ได้ดี

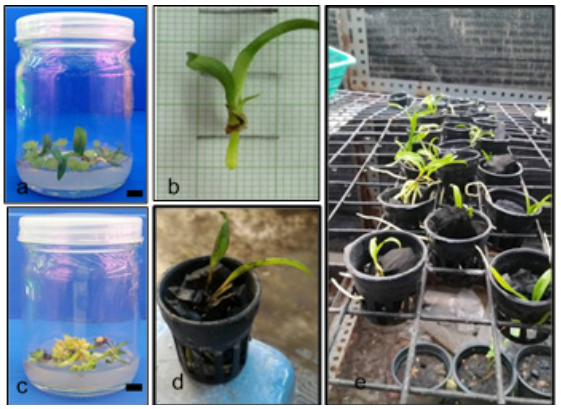

Figure 2 Development of *D. palpebrae* Lindl. protocorm on VW medium and plantlet survival.**a**: VW medium with 150 ml/L coconut water and 2 % sucrose (Bar=0.57 mm); b: Plantlet after culturing for 50 days; **c**: VW medium with 7% sucrose; **d**: *In vitro* plantlet cultured in charcoal; **e**: Plantlet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

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

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

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

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

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

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

สรุป

จากการศึกษา พบว่า อาหารสูตร VW ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 7 % ส่งเสริมการพัฒนาและการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องมัจฉาได้ดีที่สุด คือ ให้โปรโตคอร์มเฉลี่ย 3.92±0.38 โปรโตคอร์มความสูงต้นเฉลี่ย 2.85±0.26 มม. จำนวนใบเฉลี่ย 4.91±0.10 ใบต่อต้น จำนวนรากเฉลี่ย 3.55±0.24 รากต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ย 3.40±0.28 มม. หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน และอัตราการรอดชีวิตหลังการออกปลูกเพิ่มสูงขึ้นจากต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติมเติมไคโตซานความเข้มข้น 10 มก./ล. เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งสามารถนำวิธีการนี้ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้ให้ได้จำนวนมาก ในระยะเวลาอันสั้นและสามารถพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเอื้องมัจฉาในหลอดทดลองเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในรูปของเซลล์และต้นที่มีสารสำคัญนี้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ไซนีย๊ะ สะมาลา, พลวัต ภัทรกุลพิสุทธิ, และสุรีรัตน์ เย็นช้อน. 2558. การขยายพันธุ์กล้วยไม้สิงโตฟันจักภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ. แก่นเกษตร, 43: 277-284.

ไซนีย๊ะ สะมาลา, วินิจชัย พลเดช, ครรชิต ธรรมศิริ, ศศิกานต์ ประสงค์สม, และ ฐกฤต อิ่มสมบรูณ์. 2559. ผลของ BA และน้ำมะพร้าวต่อการเพิ่มปริมาณยอดของกล้วยไม้กะเรกะร่อนด้ามข้าว. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์, 3: 52-56.

นฤมล ธนานันต์. 2557. การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุ์กรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเครื่องหมาย แฮตอาร์ดีพี. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 22: 99-108.

นุชรัฐ บาลลา และอัญชลี จาละ. 2553. การเพิ่มจำนวนกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงโดยการตัดแบ่งโปรโตคอร์ม. *ใน:* การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2553 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว และศุภลักษณ์ สิงหบุตร. 2548. การศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและสาเหตุโรคสำคัญทางเศรษฐกิจของพืช. ปทุมธานี: ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. ปทุมธานี.

ภาวดี เมธะดานนท์. 2544. ความรู้เกี่ยวกับไคติน–ไคโตซาน. ปทุมธานี: ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. ปทุมธานี. 10 หน้า.

วันฟิรฮาน บินยามะ, รอยฮัน หะมะ, และสุภาวดี รามสูตร. 2557. ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องไอยเรศ. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์, 1: 20-24.

วุฒิชัย ฤทธิ, บุญสนอง ช่วยแก้ว, ปรียาภรณ์ พรหมบางญวน, และศุภลักษณ์ ทักษิน. 2559. ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นอ่อนเอื้องรงรอง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์, 3: 8-13.

ศุภาวีร์ แสงจันทร์จิรเดช, และจักรพงศ์ แท่งทอง. 2558. การเพาะเมล็ดเอื้องดอกมะขามในสภาพปลอดเชื้อ. อุบลราชธานี: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี. อุบลราชธานี.

ศิริลักษณ์ เจริญดี. 2554. การอนุรักษ์และการขยายพันธุ์กล้วยไม้เอื้องเงินหลวงโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมพร ประเสริฐส่งกุล. 2555. การใช้ไคโตซานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. วารสารราชภัฏยะลา, 7: 125-134.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล และหาพิส ปุโรง. 2557. ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงในหลอดทดลอง. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 42: 127-134.

สุภาวดี รามสูตร, ปรีดา บุญเวศน์, และวริยา นวลนุช. 2558. ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเป๋าปิดในหลอดทดลอง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์, 2: 11-14.

อบฉันท์ ไทยทอง. 2552. กล้วยไม้เมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 16. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน. กรุงเทพฯ. 214 หน้า.

อนุรักษ์ สันป่าเป้า. 2561. ประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการควบคุมโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน. แก่นเกษตร, 46:1087-1091.

อาทิตยา ชายคีรี และวราภรณ์ ฉุยฉาย. 2560. ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของกะเรกะร่อนปากเป็ดในสภาพปลอดเชื้อและผลของปุ๋ยในการอนุบาลหลังออกปลูก. แก่นเกษตร, 45:1197-1202.

Boonkerd, N., S. Chandrkrachang and W.F. Stevens. 1996. Effect of chitin on nodulation and N2 fixation rhizobia-soybean symbiosis, chitin and chitosan. pp. 183-187. In: Proceeding of the second Asia Pacific Symposium, 21-23 November 1996. Bioprocess Technology Program, Asian Institue of Technology, Bangkok, Thailand.

Johnson, M. and N. Janakiraman. 2013. Phytochemical and TLC studies on stem and leaves of the orchid *Dendrobium panduratum* subsp. villosum Gopalan and A. N. Henry. Indian Journal of Natural Products and Resources, 4: 250–254.

Krasimira, T. and K. Georgina. 2014. The effect of

sucrose concentration on *in vitro* callogenesis of golden root–endangered medicinal plant. Scientific Bulletin Series F. Biotechnologies. 18: 77-82.

Letham, D. S. 1973. Cytokinin from *Zea mays*. Phytochemistry, 12: 2445-2455.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

Napat, K., M. Chawanphat, T. Wuttinont, K. Virunh, L. Kittisak, R. Pornchai and S. Boonchoo. 2018. A new phenanthrene dimer from *Dendrobium palpebrae*. Asian Natural Products Research, 25: 1-7.

Prajapati, Ch.N. and N.M. Patel. 2013. Physico-Chemical and Phytochemical Evaluation of *Dendrobium macraei* Roots. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 4: 75–80.

Pornpienpakdee, P., R. Pichyangkura, S. Chadchawan, and P. Limpanavech. 2006. Chitosan effects on Dendrobium 'Eiskul' protocorm-like body production. pp 1-3. In: Proceeding of the 31st Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October 2005, Suranaree University of Technology, Thailand

Suphat, R., T. Kanchit, and T. Sompong. 2012. Effect of media and sucrose concentrations with or without activated charcoal on the plantlet growth of *P. comu-cervi* (Breda) Blume & Rchb. f. Journal of Agricultural Technology, 8: 2077-2087.

Shafazila, T. S., M. Pat Lee, T.S. Lee Kong Hung, P.Sh. Lee and L. Hung. 2010. Radical Scavenging Activities of Extract and Solvent Partition Fractions from *Dendrobium* Sonia "Red Bom" Flower. IEEE International Conference on Science and Social Research, 978: 762–765.

Tapash, K.B. and Md.M. Rahman. 2017. *In vitro* seed germination and flowering of *Dendrobium palpebrae* Lindl. orchid. Journal of Global Biosciences, 6: 4748-4757.

Tokuhara, K. and M. Mii. 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis*and *Doritaenopsis*by culturing shoot tips of flower stalk buds. Plant Cell Report, 13: 7–11.

Vacin, E. and F. Went. 1949. Some pH change in nutrient solution. Botanic Gardens, Conservation News, 110: 605–613.

Van, O.J., M.E. Conklin and A.F. Blakeslee. 1941. Factors in coconut milk essential for growth of development of very young Datura embryo. Science, 94: 350-351.

Yoon, S.H., J.K. Lee, S.Y. Nam, E.Y. Hong, K.Y. Paek and S.W. Son. 2016. Effects of altering medium strength and sucrose concentration on *in vitro* germination and seedling growth *of Cypripedium macranthos* Sw. Journal Plant Biotechnology, 43: 132–137.

Zhou, X.M., C.J. Zheng, J.T. Wu and G.Y. Chen. 2017. A new phenolic glycoside from the stem of *Dendrobium nobile*. Journal Natural Product Research, 1042-1046.