การเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์กล้วยไม้ช้างแดง (*Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน

Enhanced Efficiency for Propagation of Chang Daeng Orchid (*Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) by Cell Suspension Culture Technique

สร้อยสิริ คงรักษ์

Soisiri Kongruk

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Plant Science
Prince of Songkla University
2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์กล้วยไม้ช้างแดง *(Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน
ผู้เขียน	นางสาวสร้อยสิริ คงรักษ์
สาขาวิชา	พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	**คณะกรรมการสอบ**
…………………………………………..	……………………………...ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)	(รองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี)
	……………………….......................กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)
	……………………….......................กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พจมาลย์ สุรนิลพงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

……………………………….………..
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์กล้วยไม้ช้างแดง *(Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน
ผู้เขียน	นางสาวสร้อยสิริ คงรักษ์
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2551

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสูตรอาหาร ผงถ่าน และสภาวะวางเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง พบว่า อาหารสูตร Vacin and Went (VW) เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน ส่งเสริมประสิทธิภาพการเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 0.4 กรัม และให้การรอดชีวิตของชิ้นส่วนที่วางเลี้ยง 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ได้มีลักษณะสีเหลืองครีม สำหรับการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการชักนำและเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดง พบว่า การใช้แคลลัสอายุ 1 เดือน ย้ายเลี้ยงลงอาหารเหลวสูตร New Dogashima Medium (NDM) วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ส่งเสริมการชักนำเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงได้ดี ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 1.11 มล. หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ การศึกษารูปแบบเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงพบว่าเป็นแบบ sigmoid curve ระยะ log phase ของเซลล์อยู่ในช่วงอายุ 12 – 28 วันหลังจากย้ายเลี้ยง ผลของความเข้มข้นน้ำมะพร้าว พบว่า น้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้ดี คือ 2.05 มล. ลักษณะตะกอนเซลล์ที่ได้มีสีเหลืองครีมและขนาดตะกอนเล็ก ส่วนผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาล พบว่า น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถส่งเสริมการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชันได้ดี คือ 2.5 มล. หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และน้ำตาลแลคโตสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ให้การเกิดจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอในซัสเพนชันสูงสุด คือ 31.56 เอ็มบริโอต่อปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มล. นอกจากนี้พบว่า น้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นต่ำสามารถส่งเสริมการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ในซัสเพนชันได้ดีกว่าที่ระดับความเข้มข้นสูง เมื่อนำโซมาติคเอ็มบริโอระยะสุกแก่-สีเขียว อายุ 1- 2 เดือน วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 2 เดือน ส่งเสริมประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ดีที่สุด โดยให้จำนวน Protocorm-like bodies (PLBs) ระยะเริ่มปรากฏยอดและระยะเริ่มปรากฏใบเล็ก 2 ใบ เท่ากับ 91.83 และ 15.67 PLBs ตามลำดับ

Thesis Title Enhanced Efficiency for Propagation of Chang Daeng orchid (*Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) by Cell Suspension Culture Technique.

Author Miss Soisiri Kongruk

Major Program Plant Science

Academic Year 2008

Abstract

Effects of culture media, activated charcoal and light on proliferation of callus of *Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik were studied. Callus cultured on Vacin and Went (VW) solid medium supplemented with 2% sucrose, 15% coconut water and 0.2% activated charcoal in the dark for one month gave the best result in fresh weight at 0.4 g and survival rate at 100%. The color of callus was yellowish cream. Calli at one month of culture gave the highest cell suspension induction after transferring in New Dogashima Medium (NDM) liquid medium supplemented with 2% sucrose and 15% coconut water on rotary shaker at 100 rpm. The highest packed cell volume (PCV) was 1.11 ml after 4 weeks of culture. Cell growth pattern was sigmoid curve and log phase was found at 12-28 days after culture. Coconut water at 15% was optimum for cell suspension culture. The PCV was 2.05 ml after 4 weeks of culture and the characteristic of the cell in suspension was fine and yellowish cream color. The influences of various types of sugar revealed that 1% sucrose containing NDM medium gave the best of increasing PCV after 4 weeks of culture whereas 3% lactose gave the highest number of somatic embryos in suspension (31.56 embryos/1 ml PCV). The better result in increment of cell suspension was obtained at low concentration of sugars. Plantlet regeneration from cell suspension culture was success when green-cell suspension were placed on ½ MS medium supplemented with 3% sucrose, 15% coconut water and 0.2% activated charcoal under 16 h photoperiod for 2 months. The number of protocorm-like bodies (PLBs) which produced of shoot apical and or with 1-2 small expanding leaves was 91.83 and 15.67, respectively.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (3)

Abstract (4)

กิตติกรรมประกาศ (5)

สารบัญ (6)

รายการตาราง (7)

รายการภาพ (8)

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (10)

บทที่

1. บทนำ 1
    - บทนำต้นเรื่อง 1
    - การตรวจเอกสาร 3
    - วัตถุประสงค์ 10
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย 11
    - วัสดุ 11
    - อุปกรณ์ 13
    - วิธีการวิจัย 14
3. ผล 18
4. วิจารณ์ 42
5. สรุป 47

เอกสารอ้างอิง 48

ภาคผนวก 53

ประวัติผู้เขียน 56

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. ผลของสูตรอาหาร ผงถ่าน และสภาวะที่วางเลี้ยงต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน 19
2. ผลของสูตรอาหาร ผงถ่าน และสภาวะที่วางเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสด (กรัม) ของแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน 20
3. ผลของผงถ่านต่อการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสด (กรัม) ของแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน 20
4. ผลของน้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส และแลคโตส ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอในซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงในอาหารเหลวสูตร NDM หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 20 วัน 34
5. ผลของสูตรอาหารและผงถ่านต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดง หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 2 เดือน 37

รายการภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1. ปริมาณการส่งออกดอกกล้วยไม้สดของประเทศไทยระหว่าง ปี พ.ศ. 2546 - 2551 2
2. การชักนำแคลลัสของกล้วยไม้ช้างแดงที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติมน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ 12
3. โซมาติคเอ็มบริโอระยะสุกแก่ สีเขียว อายุประมาณ 1-2 เดือน จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดงในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (บาร์=0.5 เซนติเมตร) 17
4. การพัฒนาของ PLB จากการวางเลี้ยงแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง บนอาหารสูตร NDM วางเลี้ยงในที่มีแสง เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์= 0.2 มิลลิเมตร) 21
5. ผลของสูตรอาหาร ผงถ่าน และสภาวะที่วางเลี้ยงต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์=0.5 เซนติเมตร) 21
6. ปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดง ในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 23
7. ลักษณะตะกอนเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 15 วัน (บาร์=1 เซนติเมตร) 24
8. รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดง ในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 36 วัน 26
9. เซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 15 วัน 27
10. ปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดง ในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าวความเข้มข้นต่าง ๆ หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 29

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

11. ลักษณะตะกอนเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 20 วัน (บาร์=1 เซนติเมตร) 30
12. ปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดงในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ 32
13. ลักษณะตะกอนเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 15 วัน (บาร์=1 เซนติเมตร) 33
14. โซมาติคเอ็มบริโอในซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดง ในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 20 วัน (บาร์=0.6 ไมโครเมตร) 35
15. การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดง หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (บาร์=1 เซนติเมตร) 38
16. PLBs กล้วยไม้ช้างแดง บนอาหารสูตร NDM ปราศจากการเติมผงถ่าน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน (บาร์=1 เซนติเมตร) 39
17. การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดง 40
18. พืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดง อายุประมาณ 1 ปี วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ 41

บทที่ 1

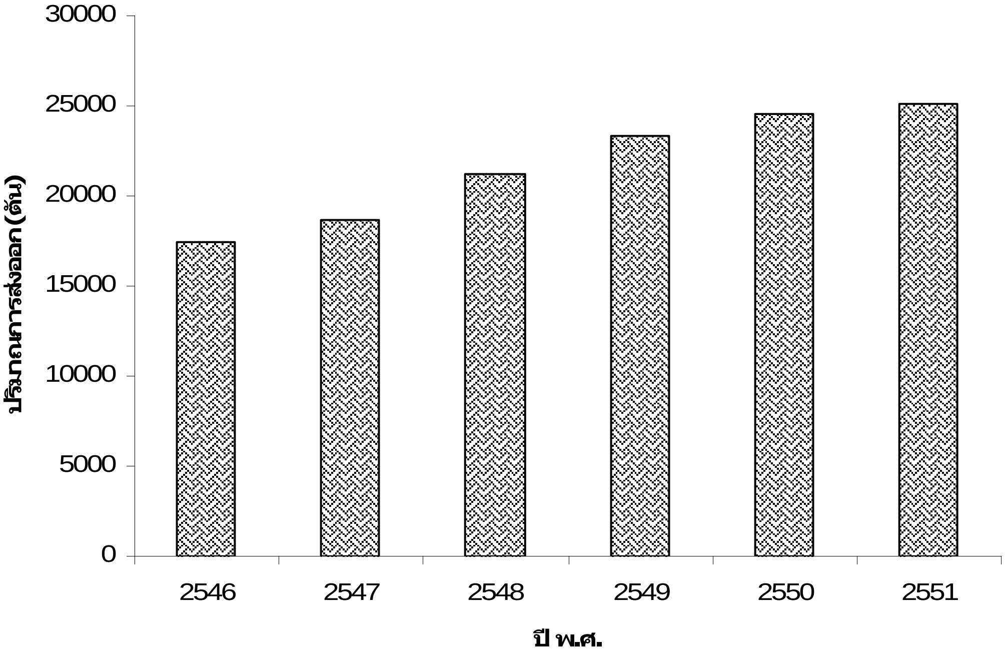
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กล้วยไม้ช้างแดง (*Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) เป็นกล้วยไม้สกุลช้าง ลักษณะโดยทั่วไปของกล้วยไม้สกุลช้างมีขนาดกลางไปจนถึงค่อนข้างใหญ่ ในธรรมชาติพบขึ้นตามป่าดิบแล้งหรือป่าเบญจพรรณ ต้นกลมยาวและแข็ง ทุกชนิดยาวได้ถึง 50 เซนติเมตร ใบยาวเป็นราง หนา อวบน้ำ หรือค่อนข้างหนา แต่เหนียว เรียงสลับซ้ายขวา โคนใบซ้อนถี่คลุมต้น ช่อดอกเกิดตามซอกใบ ยาวพอๆกับใบหรือยาวกว่า อาจจะตั้งตรง เอน หรือห้อยลง แต่ละต้นมักจะมีมากกว่า 1 ช่อ ดอกมีกลีบคงรูปได้นาน กลีบปากมีเดือย และปลายกลีบมักจะพับขึ้น เส้าเกสรสั้น กลุ่มเรณูเกือบกลมและมีร่องเว้า มี 2 กลุ่ม ติดอยู่ที่ปลายแถบ บางที่ยาวและแคบ (อบฉันท์, 2543) ลักษณะเด่นของกล้วยไม้ช้างแดงคือ ดอกมีสีม่วงแดงทั้งดอกหรือเกือบทั้งดอก ช่อดอกเป็นรูปทรงกระบอกโค้งลง ช่อดอกยาวประมาณ 20-40 เซนติเมตร มีดอกแน่นช่อละ 25-60 ดอก ขนาดดอกประมาณ 2.5-3.0 เซนติเมตร ออกดอกปีละครั้ง บ้างต้นอาจมีดอกครั้งละหลาย ๆ ช่อ จัดเป็นกล้วยไม้ที่มีช่อดอกเด่น สวยงามสะดุดตา ดอกมีกลิ่นหอม ทำให้มีผู้สนใจนำมาเพาะปลูกเป็นจำนวนมาก (สุพัตรา และวีณัน, 2548) และมีการซื้อขายในรูปแบบของไม้กระถางกันอย่างแพร่หลาย จากการสำรวจพบว่ากล้วยไม้สกุลช้างที่มีอยู่ในโลก มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ประเทศในแถบอินโดจีน อินเดีย ศรีลังกา ภาคใต้ของหมู่เกาะในทะเลจีน และหมู่เกาะอินเดียตะวันออก สำหรับในประเทศไทยพบว่ากล้วยไม้สกุลช้างมีการกระจายพันธุ์อยู่ทุกภาคของประเทศ บางภาคอาจมีกล้วยไม้สกุลช้างชนิดหนึ่งแต่อาจไม่มีอีกชนิดหนึ่ง (พูนศักดิ์, 2550) นอกจากนี้พบว่ากล้วยไม้สกุลช้าง (*Rhynchostylis*) ที่พบในธรรมชาติเพียง 4 ชนิดเท่านั้น (สมศักดิ์, 2550) คือ ช้าง (*R. gigantea*) ไอยเรศหรือพวงมาลัย (*R. retusa*) เขาแกะ (*R. coelestis*) และช้างฟิลิปปินส์ (*R. violacea*) สำหรับ 3 ชนิดแรกมีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง ส่วนช้างฟิลิปปินส์มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศฟิลิปปินส์ (พูนศักดิ์, 2550)

กล้วยไม้จัดเป็นไม้ดอกไม้ประดับเศรษฐกิจที่มีมูลค่าการส่งออกมากที่สุดของไทยทำรายได้เข้าประเทศในแต่ละปีกว่าพันล้านบาท โดยมีการส่งออกมานานมากกว่า 35 ปี ทั้งในลักษณะของต้น ตัดดอกและไม้กระถาง คิดเป็นร้อยละ 85 ของการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับทั้งหมด ปริมาณและมูลค่าการส่งออกกล้วยไม้ของไทยมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี

(ภาพที่ 1) ในอนาคตคาดว่ากล้วยไม้จะเป็นพืชที่นำรายได้จำนวนมากมาสู่ประเทศไทย (อานนท์ , 2547 อ้างโดย สุพัตรา และวีณัน, 2548) เนื่องจากประเทศไทยตั้งอยู่เหนือเส้นศูนย์สูตร มีภูมิอากาศแบบร้อนชื้นจากอิทธิพลของลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ อุดมสมบูรณ์ด้วยพื้นที่ป่าเขตร้อน ทำให้มีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมสำหรับการปลูกกล้วยไม้เมืองร้อน และเป็นแหล่งกำเนิดของกล้วยไม้ตามธรรมชาติประมาณ 177 สกุล 1,136 ชนิด รวมทั้งกล้วยไม้เฉพาะถิ่นที่พบในประเทศไทยเท่านั้น ซึ่งมีจำนวนถึง 170 ชนิด (อุดม และพัชราวดี, 2549) ทำให้ประเทศไทยได้รับการยกย่องจากประเทศต่าง ๆ ว่าเป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญที่สุดแห่งหนึ่งของโลก กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้กำหนดให้กล้วยไม้เป็นหนึ่งในสี่ของพืช Product Champion ซึ่งเป็นพืชส่งออกที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทย (สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2552)



ภาพที่ 1 ปริมาณการส่งออกดอกกล้วยไม้สดของประเทศไทยระหว่าง ปี พ.ศ. 2546 - 2551

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2552)

ปัจจุบันมีการลักลอบนำกล้วยไม้ช้างแดงออกจากป่าเป็นจำนวนมาก ทำให้กล้วยไม้ช้างแดงในป่ามีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว และหาได้ยากในธรรมชาติ (อบฉันท์, 2543) อาจเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์จากถิ่นกำเนิดเดิมในป่า จึงต้องหาแนวทางสำหรับการเพิ่มปริมาณเพื่อการขยายพันธุ์กล้วยไม้ช้างแดงและเป็นแนวทางในการช่วยอนุรักษ์กล้วยไม้ป่าของไทยให้คงอยู่เป็นมรดกของชาติตลอดไป แต่ในสภาพธรรมชาติไม่สามารถที่จะนำเมล็ดกล้วยไม้มาเพาะได้เหมือนกับไม้ดอกชนิดอื่นๆ เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กและมีอาหารสะสมภายในเมล็ดน้อยมากหรือไม่มีเลย (ณัฐา, 2548) ดังนั้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้จึงต้องการอาหารจากภายนอกเพื่อเข้าไปเลี้ยงต้นอ่อน จนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ จึงมีการพัฒนานำเมล็ดกล้วยไม้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในหลอดทดลอง จากสาเหตุดังกล่าวการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีความสำคัญต่อการขยายพันธุ์กล้วยไม้ป่าหลายชนิดในหลายปีที่ผ่านมา

การตรวจเอกสาร

กล้วยไม้ช้างแดง อยู่ในวงศ์ Orchidaceae มีชื่อสามัญว่า Chang Daeng orchid เป็นกล้วยไม้สกุลช้าง จากการสำรวจพบว่ากล้วยไม้สกุลช้างที่มีอยู่ในโลก มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ประเทศในแถบอินโดจีน อินเดีย ศรีลังกา ภาคใต้ของหมู่เกาะในทะเลจีน และหมู่เกาะอินเดียตะวันออก (พูนศักดิ์, 2550) ออกดอกช่วงเดือนธันวาคม – มกราคม (อบฉันท์, 2543) การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยทั่วไปใช้วิธีการเพาะเมล็ด แต่ในสภาพธรรมชาติไม่สามารถที่จะนำเมล็ดมาเพาะได้เหมือนกับไม้ดอกชนิดอื่นๆ เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กและมีอาหารสะสมภายในเมล็ดน้อยมากหรือไม่มีเลย (ณัฐา, 2548) ทำให้โอกาสที่เมล็ดจะงอกและพัฒนาเป็นต้นนั้นน้อยมาก ไม่ถึง 1 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เมล็ดกล้วยไม้ที่แก่แล้วไม่มีทั้งใบเลี้ยงและเอ็นโดสเปิร์ม จึงไม่มีอาหารสะสมไว้เลี้ยงต้นอ่อน ส่วนการที่ต้นอ่อนบางต้นเจริญได้นั้นเพราะบังเอิญอยู่ร่วมกับเชื้อราประเภทไมคอไรซ่าแบบซิมไบโอซิส (สมปอง, 2538) ฉะนั้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้จึงต้องการอาหารจากภายนอกเข้าไปเลี้ยงต้นอ่อน จนกระทั่งต้นอ่อนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ บางครั้งต้นที่ได้อาจเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม เนื่องจากการผสมข้ามกับกล้วยไม้ชนิดอื่นตามธรรมชาติ ปัจจุบันกล้วยไม้ป่าหลายชนิดมีจำนวนลดลง หลายชนิดหายาก หลายชนิดอาจจะสูญพันธุ์ (อุดม และพัชราวดี, 2549) เพื่อเป็นการป้องกันการโดนทำลายจากการทำลายป่า จำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Van Le *et al.*, 1999) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชวิธีหนึ่งและนับเป็นวิธีเดียวที่สามารถขยายพันธุ์กล้วยไม้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น เหมาะที่จะนำมาเป็นเครื่องมือสำหรับการขยายพันธุ์พืชในทางการค้า การส่งออกและการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป การขยายพันธุ์กล้วยไม้ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีบทบาทสำคัญอย่างมากในปัจจุบัน

การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการวางเลี้ยงชิ้นส่วนใด ๆ ของพืช รวมทั้งเซลล์เดี่ยวในอาหารสังเคราะห์ (อาหารเทียมหรืออาหารวิทยาศาสตร์) ในสภาพปลอดเชื้อ (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2551) ปัจจุบันความก้าวหน้าทางเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนานาชนิดได้กลายเป็นเครื่องมือสำคัญของการขยายพันธุ์ และการพัฒนาพันธุ์พืชชนิดใหม่ ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงสามารถพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่ โดยกระบวนการ embryogenesis หรือ organogenesis นอกจากนี้มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน การเพาะเลี้ยงตาข้าง และตายอด การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ การเพาะเลี้ยงอับเรณู การเพาะเลี้ยงคัพภะ เป็นต้น (อารีย์, 2541) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความสำคัญต่อการขยายพันธุ์กล้วยไม้ในหลายปีที่ผ่านมา ทั้งการขยายพันธุ์เพื่อป้องกันการสูญพันธุ์ของกล้วยไม้ป่าหายากและการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณในทางการค้า อย่างไรก็ตามกล้วยไม้แต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อสภาวะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองที่แตกต่างกัน (van Le *et al*., 1999) ได้มีการพัฒนาสูตรอาหารในหลอดทดลองสำหรับกล้วยไม้แต่ละชนิด เช่น การพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ในสกุลแวนดา (สุรวิช, 2537) กล้วยไม้ฟาแลนอปซิส (Tokuhara and Mill, 1993) หรือกล้วยไม้ในสกุลหวาย (Vyas *et al*, 2009) นอกจากนี้มีการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์กล้วยไม้ในหลอดทดลอง ได้แก่ สารควบคุมการเจริญเติบโต สารประกอบเชิงซ้อน อุณหภูมิและแสงภายในห้องวางเลี้ยง อุดม และพัชราวดี (2549) พบว่า การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในสูตรอาหาร Vacin และ Went (VW) สามารถช่วยเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ป่าบางชนิดได้ ปัจจุบันมีการรายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หลายชนิดด้วยกันโดยดัดแปลงการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตให้เหมาะสม Van Le และคณะ (1999) รายงานการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต N6-benzyladenin (BA) เข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ thidiazuron (TDZ) เข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ ในสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS) ว่าสามารถเร่งการพัฒนาตายอด และสาร fochlofen uron เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถส่งเสริมการพัฒนารากกล้วยไม้ช้างแดงได้ในหลอดทดลอง ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายวิธี ในการศึกษาครั้งนี้จะกล่าวถึงเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวภายใต้สภาพการเขย่าเลี้ยงและมีการควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ส่งผลให้เซลล์พืชมีการเจริญเติบโตและมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว สามารถที่จะย้ายเลี้ยงได้เร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแคลลัส (สมปอง, 2550) เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพสำหรับการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณกล้วยไม้ในระยะเวลาอันสั้น

การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน

การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน เป็นการเลี้ยงเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ในอาหารเหลวที่เขย่าตลอดเวลา ทำได้โดยการย้ายแคลลัสที่มีลักษณะก้อนเกาะกันหลวม ๆ (friable callus) ลงในอาหารเหลว หรืออาจเลี้ยงชิ้นส่วนพืช เช่นส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงหรือใบเลี้ยงในอาหารเหลวโดยตรง แรงเขย่าจากเครื่องเขย่าทำให้เซลล์ที่เกิดใหม่แต่ละเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (3-10 เซลล์) หลุดแยกออกจากกันอย่างอิสระกลายเป็นเซลล์ซัสเพนชัน เมื่อเลี้ยงไประยะหนึ่งได้เซลล์เดี่ยวและกลุ่มเซลล์ที่มีหลายขนาดปะปนกัน (คำนูณ, 2542) การเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาพการเขย่าเลี้ยงในอาหารเหลว มีข้อได้เปรียบกว่าการเลี้ยงในสภาพนิ่งบนอาหารแข็งหลายประการด้วยกัน กล่าวคือ การเคลื่อนย้ายของเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ในอาหารเหลวช่วยให้มีการแลกเปลี่ยนก๊าซกับบรรยากาศ ทำให้เซลล์ได้รับธาตุอาหารและอากาศเพียงพอสม่ำเสมอ คุณสมบัติการกำหนดขั้ว (รากยอด) ก็ไม่มีทั้งนี้เพราะแรงโน้มถ่วงช่วยให้การสร้างตารวมเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ช่วยแก้ปัญหาความต่างศักย์ของความเข้มข้นธาตุอาหารที่ชิ้นส่วนพืชสัมผัสอยู่ วิธีการดังกล่าวดัดแปลงมาจากเทคนิคการเลี้ยงแบคทีเรีย ทั้งนี้เพื่อจะใช้ประโยชน์จากเซลล์เดี่ยว ๆ ในการผสมผสานการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยวิธีการที่จำเพาะอื่น ๆ ต่อไป (สมปอง, 2550) สำหรับขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน โดยทั่วไปมี 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การชักนำแคลลัส

แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อพื้นฐานของระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ยังไม่กำหนดทิศทางการเปลี่ยนแปลงหรือพัฒนาไปเป็นส่วนใด เนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิดสามารถนำมาชักนำการสร้างแคลลัสได้ เริ่มต้นจากการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มีธาตุอาหารพืชร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับที่เหมาะสม ความสามารถในการสร้างแคลลัสส่วนใหญ่เป็นผลมาจากสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงไปในอาหารที่เลี้ยง และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต่างกัน จะส่งผลให้แคลลัสมีพัฒนาของโครงสร้างที่แตกต่างกันออกไปด้วย ในบางกรณีแคลลัสสร้างจากชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงได้โดยที่ไม่ต้องอาศัยสารควบคุมการเจริญเติบโต แคลลัสเป็นเครื่องมือที่สำคัญของนักปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพและนักสรีรวิทยา ในกรณีของการเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันเป็นการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ดังนั้นการชักนำก็เริ่มจากแคลลัส แคลลัสที่นำมาใช้นั้นต้องมีลักษณะที่เหมาะสม โดยทั่วไปแล้วแคลลัสเริ่มต้นที่นำมาชักนำต้องเป็น friable callus และสีของแคลลัสโดยทั่วไปเป็นสีเหลืองอ่อนหรือสีครีม ทั้งนี้เพื่อการแยกเป็นเซลล์ที่มีการเกาะตัวกัน

น้อยลง และในสภาพการเขย่าเลี้ยงช่วยส่งเสริมให้เซลล์ที่กำลังมีการแบ่งเซลล์สามารถแยกหลุดออกจากกันได้ง่าย สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำแคลลัส ได้แก่ ชิ้นส่วนพืช อาหารที่ใช้เลี้ยงและสารควบคุมการเจริญเติบโต (สมปอง, 2550) Chen และคณะ (2000) รายงานการศึกษาวิธีการเพิ่มปริมาณแคลลัสของกล้วยไม้ฟาแลนอปซิส ว่าเป็นไปได้ดีเมื่อนำชิ้นส่วนแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 2.26 ไมโครโมลาร์ และ TDZ ความเข้มข้น 2.27 ไมโครโมลาร์ Huan และคณะ (2004) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสของกล้วยไม้ซิมบิเดียมบนอาหารสูตรดัดแปลง VW เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Tryptone ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่งเสริมอัตราการเพิ่มปริมาณของแคลลัสได้ดีที่สุด (9.7 เท่า) นอกจากปัจจัยดังกล่าวข้างต้นแล้ว สภาวะที่วางเลี้ยง (ที่มืดและที่มีแสง) ก็มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสเช่นกัน Chen และ Chang (2000) ได้รายงานความสำเร็จในการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสของกล้วยไม้ออนซิเดียม โดยการวางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 26 ±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน สามารถส่งเสริมการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดี

2. การชักนำและเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน

ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการชักนำเซลล์ซัสเพนชันมีหลายประการ คล้ายกับปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (สมปอง, 2550) ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันได้แก่ สูตรอาหาร น้ำตาล และสารประกอบเชิงซ้อน เป็นต้น

2.1 สูตรอาหาร

อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นกับความเหมาะสมต่อชนิดของพืช สายพันธุ์ ตลอดจนชนิดและสภาพของชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเลี้ยง อย่างไรก็ตามอาหารที่นิยมใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุด คือ อาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้ได้ดีในการเลี้ยงกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนามีช่องว่างในเซลล์จำนวนมาก และเซลล์ยังไม่มีการจัดรูปร่างที่แน่นอน (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2551) Tokuhara และ Mii (2001) รายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ฟาแลนอปซิส ในอาหารเหลวสูตร NDM ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต α-Naphthaleneacetic acid (NAA) เข้มข้น 5.4 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 4.6 เท่าจากน้ำหนักเริ่มต้น และสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสได้ เมื่อนำเซลล์เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NDM ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และ BA เข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ Pradhan และคณะ (1998) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน friable callus ของ

East Indian rosewood ในอาหารเหลวสูตร MS เติม myo-inositol เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์ BA เข้มข้น 2.2 ไมโครโมลาร์ และน้ำมะพร้าวเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถส่งเสริมการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้ดีที่สุด

2.2 น้ำตาล

น้ำตาลเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน เนื่องจากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์แสงของพืช เซลล์พืชนำคาร์บอนมาสร้างเป็นสารสังเคราะห์ (สมปอง, 2539) น้ำตาลที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่วไปมีหลายชนิดด้วยกัน ทั้งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส และกาแลกโตส น้ำตาลโมเลกุลคู่ ได้แก่ ซูโครส มอลโตส และแลกโตส Park และ Facchini (2001) รายงานการศึกษานำตะกอนเซลล์ซัสเพนชันของ *Eschschozia californica* (poppy) ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ว่าให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 0.87 มิลลิลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 40 วัน นอกจากนี้น้ำตาลยังใช้สำหรับการชักนำโซมาติคเอ็มบริโอในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครส น้ำตาลชนิดนี้พบมากในอ้อย หัวบีท และผลไม้ที่มีรสหวานเกือบทุกชนิด เมื่อแตกตัวหรือถูกย่อยจะให้น้ำตาลกลูโคสกับน้ำตาลฟรุกโตสอย่างละ 1 โมเลกุล Vasudevan และ Ganapathi (1999) รายงานว่าการเติมน้ำตาลโมเลกุลคู่อย่างซูโครสและมอลโตส ที่ระดับความเข้มข้น 87.64 มิลลิโมลาร์ ในอาหารสูตร MS ให้ผลการตอบสนองการชักนำการเกิดโซมาติคเอ็มบริโอในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันของถั่วมะแฮะดีที่สุด Vengadesan และคณะ (2002) รายงานว่า น้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 87.64 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ และน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติคเอ็มบริโอในการเพาะเลี้ยงซัสเพนชันของ *Acacia sinuata* สูงที่สุด

2.3 น้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวซึ่งจัดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน สามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะหรือต้นที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เนื่องจากน้ำมะพร้าวประกอบด้วยส่วนประกอบหลายชนิด ได้แก่สารอนินทรีย์หลายชนิด กรดอะมิโน เอนไซม์ วิตามิน น้ำตาล รวมทั้งฮอร์โมนพืช (Arditti and Ernst, 1992 อ้างโดย มัลลิกา และพิมพ์ใจ, 2548) น้ำมะพร้าวจึงเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่นิยมนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้หลายชนิดในหลอดทดลอง ศิริวารินทร์ และอารักษ์ (2549) ทำการศึกษาการเพาะเมล็ดกล้วยไม้พญาฉัททันต์บนอาหารแข็งสูตร VW เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และไม่เติมน้ำมะพร้าว พบว่า อาหารที่เติมน้ำมะพร้าวทำให้เมล็ดงอกได้ดีกว่าอาหารที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว นอกจากนี้โพรโตคอร์มที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมน้ำมะพร้าว มีขนาดใหญ่และสีเขียวเข้มกว่าโพรโตคอร์มที่วางเลี้ยงบนอาหารปราศจากการเติมน้ำมะพร้าว Li และคณะ (2001) รายงานการศึกษาเปรียบเทียบการใช้สารประกอบเชิงซ้อนธรรมชาติ ได้แก่ น้ำมะพร้าว

เคซีนไฮโดรไลเซส มันฝรั่ง และกล้วยบดต่อการเกิดยอดและรากของกล้วยไม้รองเท้านารี พบว่า สูตรอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนการเกิดทั้งยอดและรากดีที่สุด

3. การชักนำการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

การเจริญพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงโซมาติคเอ็มบริโอในซัสเพนชัน โดยทั่วไปนั้นเป็นไปได้ดีเมื่อย้ายโซมาติคเอ็มบริโอไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือสูตรอาหารที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง โซมาติคเอ็มบริโอสามารถเติบโตเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์แข็งแรง ซึ่งพืชแต่ละชนิดต้องการสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญที่แตกต่างกันตามชนิดแต่ละพืช Sung และคณะ (2007) รายงานว่าเซลล์ซัสเพนชันของ *Ranunculus kazusensis* สามารถเจริญพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรพื้นฐานที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง นอกจากสูตรอาหารแล้ว ผงถ่านเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ Oh และคณะ (2008) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชันใน watershield บนอาหารสูตร ½ MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ดีที่สุด 3.2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ปราศจากการเติมผงถ่าน Teng (1997) นำเซลล์ซัสเพนชันของ *Platycerium bifurcatum* มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ และผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยง 54 วัน พบว่า ส่งเสริมการเกิดพืชต้นใหม่สูงสุด นอกจากนี้ พบว่า ผงถ่านส่งเสริมการสร้างราก โดยสร้างสภาวะมืด และทำให้รากเจริญเติบโตได้ดี ผงถ่านจึงสำคัญต่อการชักนำการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2551) Eymar และคณะ (2000) รายงานความสำเร็จในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของ *Lagerstroemia indica* จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS เติมผงถ่านเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารที่ปราศจากการเติมผงถ่าน ชักนำการเกิดรากได้ 85 เปอร์เซ็นต์ สมพร และนัยนา (2547) ศึกษาการเติมผงถ่านกัมมันต์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารแข็งสูตร VW สำหรับเพาะเลี้ยงต้นกล้ากล้วยไม้หวายเหลืองจันทบูร พบว่า อาหารที่เติมผงถ่านกัมมันต์เข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ชักนำการเกิดใบ ราก ความสูงและน้ำหนักสดเฉลี่ยของต้นเพิ่มขึ้น และเมื่อทำการย้ายปลูกหลัง 21 วัน พบว่า อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 85 เปอร์เซ็นต์

วิธีการศึกษานี้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์กล้วยไม้ให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น สำหรับในกล้วยไม้ช้างแดงยังไม่มีรายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน คงมีเพียงการเพาะเมล็ด (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1970) และการเพาะเลี้ยงปลายยอดแบบ thin cell layer (TLC) (Van Le *et al.*, 1999) ซึ่งอัตราการเพิ่มปริมาณเพื่อการขยายพันธุ์

ค่อนข้างต่ำ การใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันสามารถช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวและใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ช้างแดงในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของสูตรอาหาร ผงถ่าน และแสงต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง
2. ศึกษาผลของสูตรอาหาร ระดับความเข้มข้นน้ำมะพร้าว ชนิดและระดับความเข้มข้นน้ำตาลต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดง
3. ศึกษาผลของสูตรอาหาร การเติมและไม่เติมผงถ่านต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดง

บทที่ 2

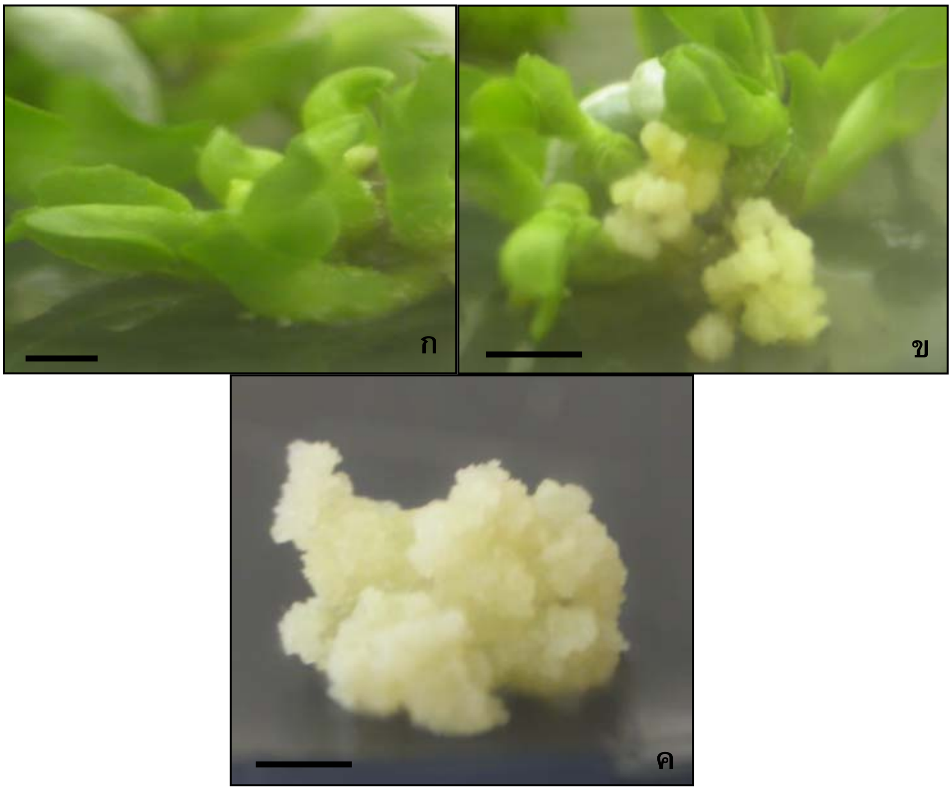
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ชิ้นส่วนแคลลัสของกล้วยไม้ช้างแดง อายุ 1 เดือน จากการนำชิ้นส่วนกลุ่มยอดรวมของกล้วยไม้ช้างแดง (ภาพที่ 2ก) วางเลี้ยงบนอาหารสูตร VW (รายละเอียดขององค์ประกอบแสดงใน ภาคผนวกที่ 2) เติมผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 1 เดือน เริ่มมีการสร้างแคลลัสบริเวณโคนกลุ่มยอดรวม (ภาพที่ 2ข) นำแคลลัสที่ได้วางเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิม แคลลัสดังกล่าวดูแลรักษาโดยการย้ายเลี้ยงในสูตรอาหารข้างต้นทุก ๆ 4 สัปดาห์ วางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส จากนั้นคัดเลือกแคลลัสสีเหลืองครีมซึ่งมีลักษณะเป็น friable callus (ภาพที่ 2ค) มาใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 2 การชักนำแคลลัสของกล้วยไม้ช้างแดงที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติมน้ำมะพร้าว เข้มข้น15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์

ก กลุ่มยอดรวมกล้วยไม้ช้างแดง (บาร์ =0.2 เซนติเมตร)

ข การเกิดแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง บริเวณโคนกลุ่มยอดรวม (บาร์ =0.3 เซนติเมตร)

ค แคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ =0.5 เซนติเมตร)

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร ½ MS MS VW และ NDM (รายละเอียดในภาคผนวกที่ 2)

1.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชคือ น้ำมะพร้าว

1.2.3 ผงถ่าน

1.3 สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัส

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัส ประกอบด้วยอาหาร 3 สูตรคือ สูตรอาหาร MS VW และ NDM อาหารแต่ละสูตรเติมน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เติมและไม่เติมผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้นเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ แบ่งใส่ขวด 8 ออนซ์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สูตรอาหารชักนำเซลล์ซัสเพนชัน

สูตรอาหารชักนำเซลล์ซัสเพนชัน ประกอบด้วยอาหาร 3 สูตรคือ สูตรอาหาร MS VW และ NDM อาหารแต่ละสูตรเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ แบ่งใส่ฟลาสค์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สูตรอาหารชักนำพืชต้นใหม่จากโซมาติคเอ็มบริโอ

สูตรอาหารชักนำการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ประกอบด้วยอาหาร 4 สูตรคือ สูตรอาหาร ½ MS MS VW และ NDM อาหารแต่ละสูตรเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เติมและไม่เติมผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทใส่จานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร บรรจุอาหาร 20 มิลลิลิตร

2. อุปกรณ์การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- เครื่องคนสารละลายพร้อมแท่งแม่เหล็ก
- หม้อนึ่งความดันไอ
- ตู้อบไมโครเวฟ
- เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง เช่น ฟลาสค์ บีกเกอร์ จานเพาะเลี้ยง ขวดปรับปริมาตร
- ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงและวางเลี้ยง

- ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- ชั้นวางเลี้ยง
- เครื่องเขย่าเลี้ยง
- ชุดเครื่องมือ ประกอบด้วย ปากคีบ และมีดผ่าตัด

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดปริมาตรตะกอนเซลล์

- ไปเปตปลายตัด
- หลอดเซนติฟิวก์
- ลูกยางดูด
- ตะแกรงวางหลอด

2.4 เครื่องมือและอุปกรณ์บันทึกภาพ

- กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เต็ด พร้อมชุดถ่ายภาพ
- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ พร้อมชุดถ่ายภาพ

วิธีการวิจัย

1. ศึกษาผลของสูตรอาหาร ผงถ่าน และสภาวะที่วางเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

นำแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง อายุ 1 เดือน น้ำหนักเริ่มต้น 0.1 กรัม วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง 3 สูตร คือ VW MS และ NDM (ปัจจัยที่ 1) เติมและไม่เติมผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ (ปัจจัยที่ 2) วางเลี้ยงทั้งในที่มืดและที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน (ปัจจัยที่ 3) ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส โดยวางเลี้ยงในขวด 8 ออนซ์ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ๆ ละ 3 ชิ้น วางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นและอัตราการรอดชีวิต รวมทั้งลักษณะสีและโครงสร้างของแคลลัส ในแต่ละหน่วยการทดลองเปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ 3x2x2 factorial ใน CRD (Completely randomized design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan’s multiple range test)

2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำและเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน

2.1 ผลของสูตรอาหารต่อการชักนำเซลล์ซัสเพนชัน

นำแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง อายุ 1 เดือน น้ำหนักเริ่มต้น 0.5 กรัม ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลว 3 สูตร คือ VW MS และ NDM เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในฟลาสค์ขนาด 125 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร 25 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100 รอบต่อนาที ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสค์ บันทึกการเพิ่มปริมาณของเซลล์ซัสเพนชันจากปริมาตรตะกอนเซลล์ (packed cell volume: PCV) ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ รวมทั้งบันทึกลักษณะและสีของตะกอนเซลล์ซัสเพนชัน เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหารโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.2 ศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดง

นำตะกอนเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงปริมาตรเริ่มต้น 0.5 มิลลิลิตร ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ดีที่สุด ที่ได้จากการทดลอง 2.1 เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในฟลาสค์ ขนาด 125 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร 25 มิลลิลิตร วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100 รอบต่อนาที ภายใต้การให้

แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสค์ บันทึกการเพิ่มปริมาณของเซลล์ซัสเพนชันจากปริมาตรตะกอนเซลล์ ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ รวมทั้งบันทึกลักษณะและสีของตะกอนเซลล์ซัสเพนชัน เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหารโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.3 ผลของน้ำมะพร้าวต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชัน

นำตะกอนเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงปริมาตรเริ่มต้น 0.5 มิลลิลิตร ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ดีที่สุด ที่ได้จากการทดลอง 2.1 เติมน้ำมะพร้าวที่ระดับความเข้มข้น 0 5 10 15 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในฟลาสค์ ขนาด 125 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร 25 มิลลิลิตร วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100 รอบต่อนาที ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสค์ บันทึกการเพิ่มปริมาณของเซลล์ซัสเพนชันจากปริมาตรตะกอนเซลล์ ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ รวมทั้งบันทึกลักษณะและสีของตะกอนเซลล์ซัสเพนชัน เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหารโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์และโซมาติคเอ็มบริโอในซัสเพนชัน

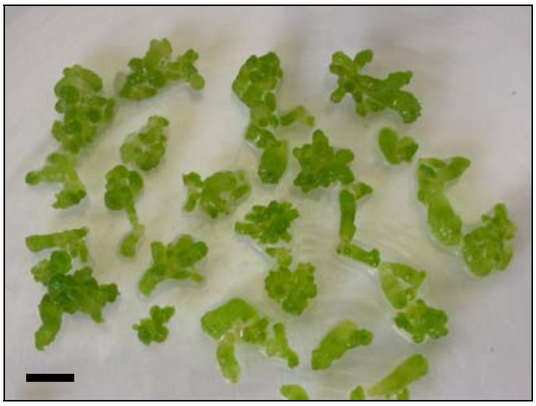
นำตะกอนเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงปริมาตรเริ่มต้น 0.5 มิลลิลิตร ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ดีที่สุด ที่ได้จากการทดลอง 2.1 เติมน้ำมะพร้าวความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลอง 2.3 ร่วมกับการเติมน้ำตาล 4 ชนิด คือ น้ำตาลซูโครส กลูโคส แลคโตส และฟรุคโตส แต่ละชนิดใช้ระดับความเข้มข้น 0 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100 รอบต่อนาที ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสค์ บันทึกการเพิ่มปริมาณของเซลล์ซัสเพนชันจากปริมาตรตะกอนเซลล์ ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ รวมทั้งลักษณะและสีของตะกอนเซลล์ซัสเพนชัน และจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอในซัสเพนชัน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหารโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

วิธีการวัดปริมาตรตะกอนเซลล์

นำหลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 15 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการอบฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว เปิดฝาออก และดูดตะกอนเซลล์ทั้งหมดในฟลาสค์ด้วยไปเปตธรรมดาปลายตัด ซึ่งปลายด้านหนึ่งสวมลูกยางดูด หลังจากดูดตะกอนเซลล์ใส่หลอดจนหมดแล้ว วางทิ้งไว้สักครู่บนตะแกรงวางหลอดให้เซลล์ตกตะกอนลงมาอยู่ที่ก้นหลอด จึงอ่านค่าปริมาตรเซลล์ที่ตกตะกอนลงมาจากมาตราวัดข้างหลอดเซนตริฟิวก์ จดบันทึกไว้ หลังจากอ่านค่าเรียบร้อยแล้ว ใช้ไปเปตดูดตะกอนเซลล์จากหลอดใส่กลับในฟลาสค์เช่นเดิม นำไปวางเลี้ยงในสภาพเดิม

3. ศึกษาการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน

นำโซมาติคเอ็มบริโอระยะสุกแก่-สีเขียวของกล้วยไม้ช้างแดง อายุ 1-2 เดือน (ภาพที่ 3) ปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้น 0.5 มิลลิลิตร วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง 4 สูตร (ปัจจัยที่ 1) คือ VW MS ½ MS และ NDM เติมและไม่เติมผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (ปัจจัยที่ 2) และผงวุ้นเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ โดยวางเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร บรรจุอาหาร 20 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 เพลท (จานเพาะเลี้ยง) ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกจำนวนพืชต้นใหม่ ในแต่ละหน่วยการทดลองเปรียบเทียบกันโดย ใช้แผนการทดลองแบบ 4x2 factorial ใน CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 3 โซมาติคเอ็มบริโอระยะสุกแก่ สีเขียว อายุประมาณ 1-2 เดือน จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดงในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์และน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

บทที่ 3

ผล

1. ศึกษาผลของสูตรอาหาร ผงถ่าน และสภาวะที่วางเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง ได้แก่ สูตรอาหาร (VW MS และ NDM) ผงถ่าน และแสง พบว่า อาหารสูตร VW ทุกสภาพการเพาะเลี้ยงส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) กับหน่วยการทดลองอื่น ๆ (ตารางที่ 1) ส่วนหน่วยการทดลองอื่น ๆ ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นอาหารสูตร MS ปราศจากการเติมผงถ่าน ทั้งวางเลี้ยงในที่มืดและที่มีแสง ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงเท่ากับ 38.89 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานหลังจากวางเลี้ยง พบว่า อาหารสูตร VW และ MS ส่งเสริมการพัฒนาของแคลลัส ส่วนอาหารสูตร NDM ส่งเสริมการพัฒนาจากแคลลัสเป็น PLB (ภาพที่ 4)

นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาน้ำหนักสดแคลลัส พบว่า อาหารสูตร NDM และ VW ร่วมกับการเติมผงถ่าน วางเลี้ยงในที่มืด ให้น้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 0.40 กรัม แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับหน่วยการทดลองอื่น ๆ (ตารางที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบผลของสภาวะที่วางเลี้ยง พบว่า การวางเลี้ยงในที่มืด ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของแคลลัส 0.34 กรัม สูงกว่าการวางเลี้ยงในที่มีแสง ซึ่งให้ปริมาณน้ำหนักสดของแคลลัส 0.30 กรัม แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณาผลของผงถ่าน พบว่า อาหารที่เติมผงถ่าน ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดของแคลลัส 0.33 กรัม สูงกว่าการวางเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากการเติมผงถ่าน ซึ่งให้ปริมาณน้ำหนักสดของแคลลัส 0.30 กรัม แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ศึกษาลักษณะสีของแคลลัส พบว่า แคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมผงถ่าน มีลักษณะสีเหลืองครีม แตกต่างจากแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารปราศจากการเติมผงถ่าน ซึ่งให้แคลลัสมีลักษณะสีน้ำตาล (ภาพที่ 5 ก-ฏ) เมื่อพิจารณาทั้ง 3 ปัจจัยร่วมกัน พบว่า อาหารสูตร VW เติมผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในที่มืด ส่งเสริมการเพาะเลี้ยงแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดงได้ดีที่สุด ให้น้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 0.4 กรัม แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับทรีตเมนต์อื่น ๆ

ตารางที่ 1 ผลของสูตรอาหาร ผงถ่าน และสภาวะที่วางเลี้ยงต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

สภาวะที่วางเลี้ยง	สูตรอาหาร	การเติมผงถ่าน	ลักษณะทางสัณฐาน	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต
ที่มีแสง	VW	เติม	แคลลัส	100a
		ไม่เติม	แคลลัส	100a
	MS	เติม	แคลลัส	58.33bc
		ไม่เติม	แคลลัส	38.89c
	NDM	เติม	PLB	55.56bc
		ไม่เติม	PLB	94.44a
ที่มืด	VW	เติม	แคลลัส	100a
		ไม่เติม	แคลลัส	100a
	MS	เติม	แคลลัส	50bc
		ไม่เติม	แคลลัส	38.89c
	NDM	เติม	PLB	55.56bc
		ไม่เติม	PLB	63.89b
F-test				**
C.V. (%)				16.54

** : มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับ $p \leq 0.01$

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 2 ผลของสูตรอาหาร ผงถ่าน และสภาวะที่วางเลี้ยงต่อปริมาณน้ำหนักสด (กรัม) ของแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	สภาวะที่มีแสง		สภาวะที่มืด		ค่าเฉลี่ย$_{\text{สูตรอาหาร}}$
	เติมผงถ่าน	ไม่เติมผงถ่าน	เติมผงถ่าน	ไม่เติมผงถ่าน	
VW	0.38ab	0.31bcd	0.40a	0.30cd	0.35B
MS	0.18e	0.19e	0.26de	0.27d	0.22C
NDM	0.37abc	0.39ab	0.40a	0.38ab	0.38A
ค่าเฉลี่ย$_{\text{ผงถ่าน}}$	0.31ns	0.3	0.35	0.31	
ค่าเฉลี่ย$_{\text{สภาวะวางเลี้ยง}}$	0.30B		0.34A		C.V. 9.8%

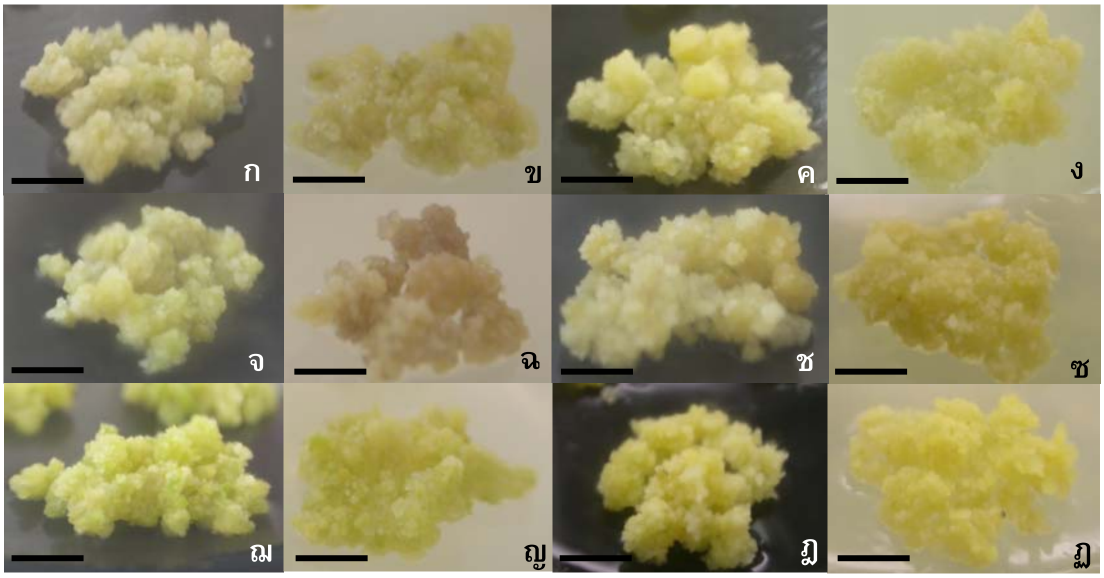
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมภ์แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับ $p \leq 0.05$

ตารางที่ 3 ผลของผงถ่านต่อการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสด (กรัม) ของแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

การเติมผงถ่าน	น้ำหนักสดแคลลัส (กรัม)
เติม	0.33a
ไม่เติม	0.30b
LSD$_{.05}$	0.02
C.V. (%)	9.80

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับ $p \leq 0.05$

ภาพที่ 4 การพัฒนาของ PLB จากการวางเลี้ยงแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง บนอาหารสูตร NDM วางเลี้ยงในที่มีแสง เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์= 0.2 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 5 ผลของสูตรอาหาร ผงถ่าน และสภาวะที่วางเลี้ยงต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

ก และ **ข** อาหารสูตร VW เติมและไม่เติมผงถ่าน วางเลี้ยงในที่มีแสง

ค และ **ง** อาหารสูตร VW เติมและไม่เติมผงถ่าน วางเลี้ยงในที่มืด

จ และ **ฉ** อาหารสูตร MS เติมและไม่เติมผงถ่าน วางเลี้ยงในที่มีแสง

ช และ **ซ** อาหารสูตร MS เติมและไม่เติมผงถ่าน วางเลี้ยงในที่มืด

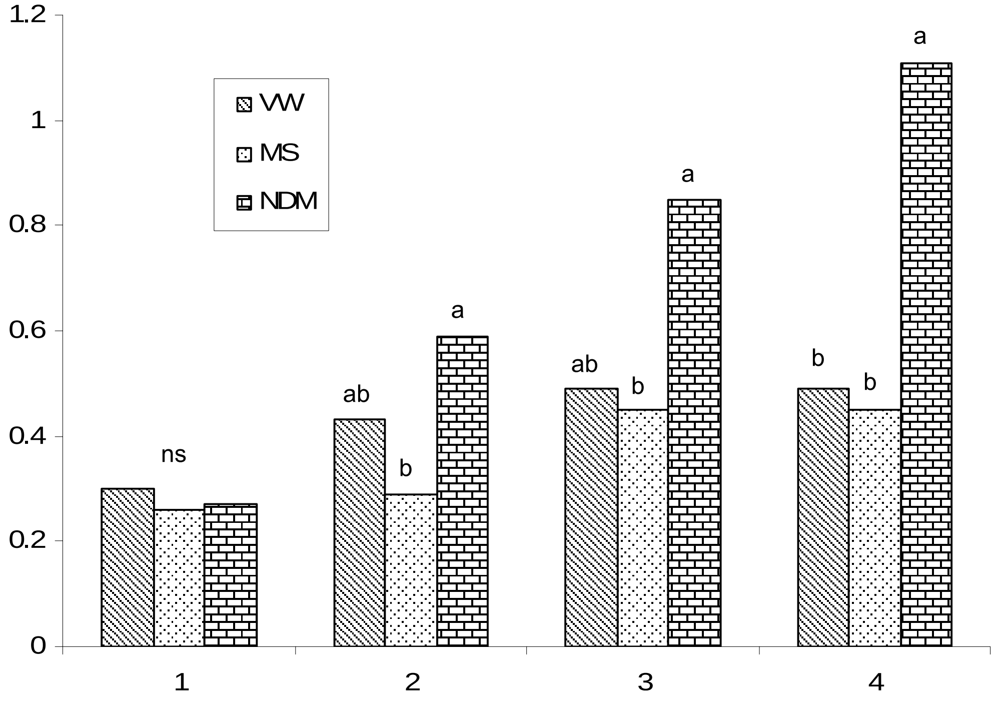
ฌ และ **ญ** อาหารสูตร NDM เติมและไม่เติมผงถ่าน วางเลี้ยงในที่มีแสง

ฎ และ **ฏ** อาหารสูตร NDM เติมและไม่เติมผงถ่าน วางเลี้ยงในที่มืด

2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำและเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน

2.1 ผลของสูตรอาหารต่อการชักนำเซลล์ซัสเพนชัน

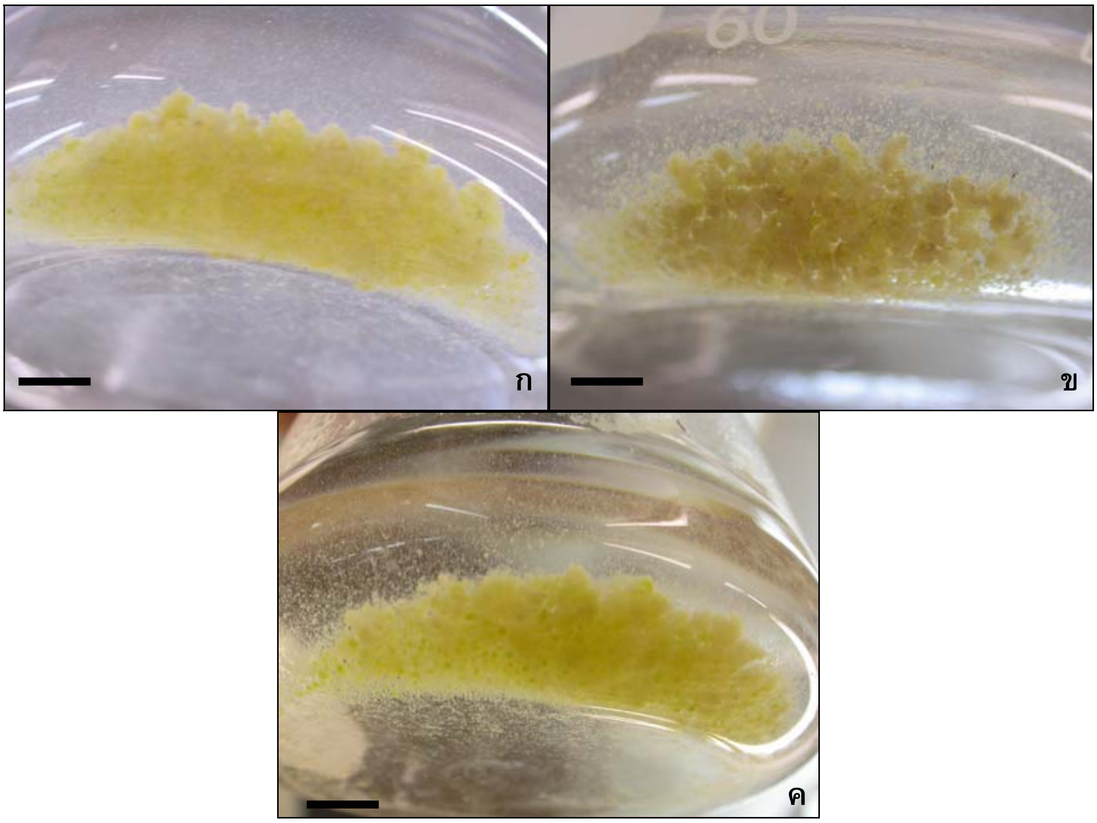
แคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง อายุ 1 เดือน ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลว 3 สูตร คือ VW MS และ NDM เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในที่มีแสงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ทำการวัดปริมาตรตะกอนเซลล์ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารเหลวสูตร NDM ส่งเสริมการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุดและให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เพิ่มขึ้นทุกสัปดาห์ ทั้งสัปดาห์ที่ 2 3 และ 4 (ภาพที่ 6) โดยในสัปดาห์ที่ 4 ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1.11 มิลลิลิตร (PCV) รองลงมาคือ อาหารเหลวสูตร VW และ MS ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เท่ากับ 0.49 และ 0.45 มิลลิลิตร ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ พบว่า อาหารเหลวสูตร VW และ MS ส่งเสริมให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 2 และ 3 หลังจากนั้นปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มคงที่ ไม่มีการเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของตะกอนเซลล์พบว่า ตะกอนเซลล์ในอาหารเหลวสูตร NDM และ VW มีลักษณะสีเหลืองครีม ส่วนอาหารเหลวสูตร MS พบว่าตะกอนเซลล์มีลักษณะสีน้ำตาล (ภาพที่ 7ก, ข และ ค) เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์พบว่าทั้ง 3 สูตรอาหารเป็นแบบ friable และตะกอนเซลล์มีขนาดเล็ก จึงเลือกใช้อาหารเหลวสูตร NDM เพื่อศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงในการทดลองที่ 2.2



ภาพที่ 6 ปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดง ในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละแท่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 7 ลักษณะตะกอนเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 15 วัน (บาร์=1 เซนติเมตร)

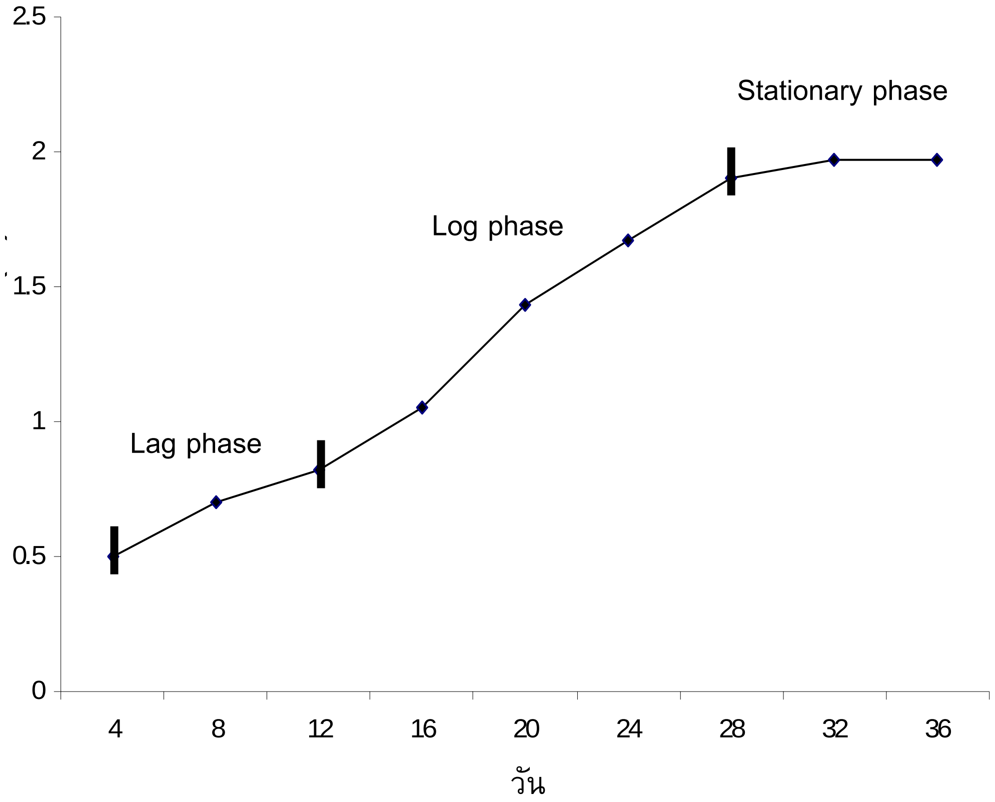
ก ในอาหารเหลวสูตร VW

ข ในอาหารเหลวสูตร MS

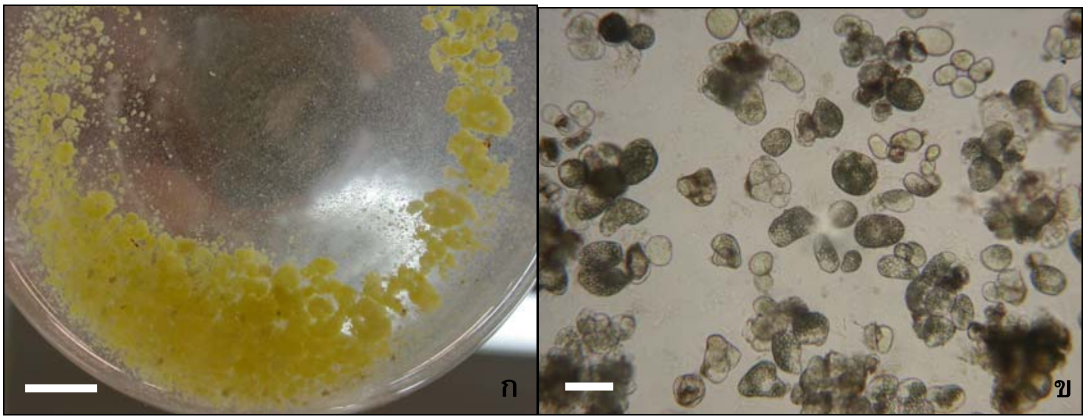
ค ในอาหารเหลวสูตร NDM

2.2 ศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดง

จากการนำปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้น 0.5 มิลลิลิตร ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NDM ร่วมกับน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ทำการวัดปริมาตรตะกอนเซลล์ทุก ๆ 4 วัน พบว่ารูปแบบการเจริญเติบโตเป็นแบบ sigmoid curve ลักษณะกราฟเส้นเป็นรูปตัว S โดยอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงระยะ lag phase อยู่ช่วงอายุ 4-12 วัน ในระยะ log phage อยู่ช่วงอายุ 12- 28 วัน ระยะนี้เป็นระยะที่มีการเพิ่มของเซลล์เป็นแบบเส้นตรง และระยะ stationary phase อยู่ช่วงอายุ 28 วัน ขึ้นไป ซึ่งเป็นระยะที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในด้านการเจริญของเซลล์ การเจริญเติบโตเริ่มคงที่ (ภาพที่ 8) ตะกอนเซลล์ที่ได้มีหลายขนาดปะปนกันและมีลักษณะสีเหลืองสด (ภาพที่ 9ก) ตั้งแต่ระยะ lag phase ถึง stationary phase เมื่อนำตะกอนเซลล์ไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีทั้งเซลล์เดี่ยว ๆ ค่อนข้างกลม กลุ่มเซลล์ขนาดเล็กและกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ปะปนกัน ภายในเซลล์ประกอบด้วยไซโตพลาสซึมเข้มข้น มีลักษณะเป็นเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ จึงอาจเรียกว่า Embryogenic cell suspension (ภาพที่ 9ข)



ภาพที่ 8 รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดง ในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 36 วัน



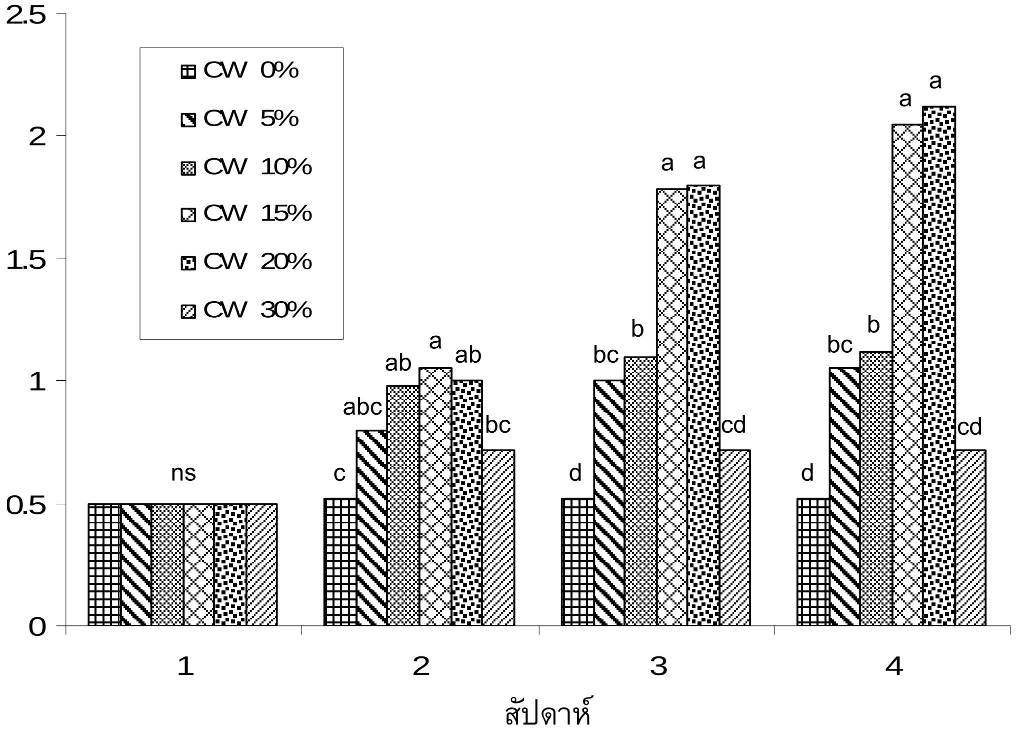
ภาพที่ 9 เซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 15 วัน

ก ตะกอนเซลล์ซัสเพนชัน (บาร์=1 เซนติเมตร)

ข กลุ่มเซลล์ซัสเพนชัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (บาร์=0.6 ไมโครเมตร)

2.3 ผลของน้ำมะพร้าวต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชัน

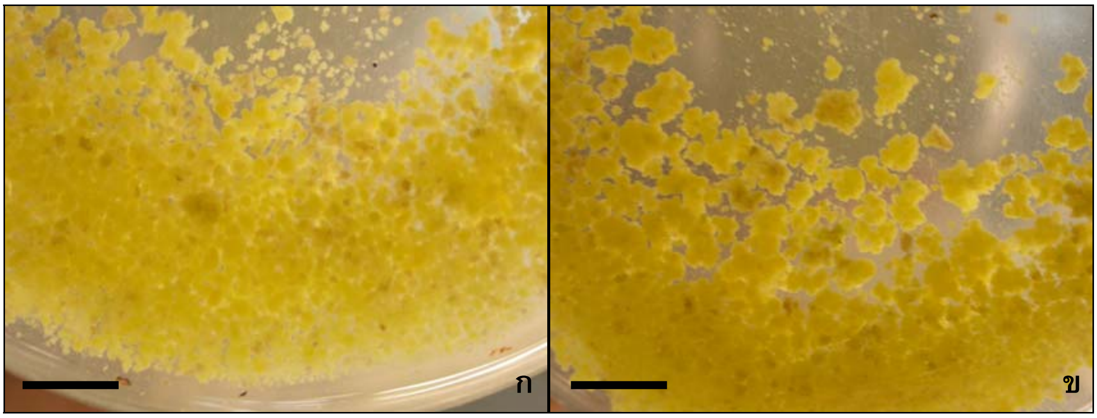
การเติมน้ำมะพร้าวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารเหลวสูตร NDM สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดง วางเลี้ยงในที่มีแสง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ทำการวัดปริมาตรตะกอนเซลล์ ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ระดับความเข้มข้นน้ำมะพร้าวเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เพิ่มขึ้นด้วย และเริ่มลดลงที่ระดับความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงสัปดาห์ที่ 4 น้ำมะพร้าวเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.12 มิลลิลิตร รองลงมาคือ น้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 10 5 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ 2.05 1.12 1.05 และ 0.72 มิลลิลิตร ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 10) ส่วนอาหารเหลวปราศจากการเติมน้ำมะพร้าว ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์คงที่ 0.52 มิลลิลิตร ในสัปดาห์ที่ 2 3 และ 4 เมื่อพิจารณาลักษณะตะกอนเซลล์ระหว่างอาหารเหลวที่เติมน้ำมะพร้าว 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ตะกอนเซลล์ในอาหารเหลวเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะสีเหลืองครีมและมีขนาดเล็ก (ภาพที่ 11ก) ส่วนตะกอนเซลล์ในอาหารเหลวเติมน้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะสีเหลืองเข้ม บางเซลล์มีสีน้ำตาลและตะกอนเซลล์มีขนาดใหญ่กว่า (ภาพที่ 11ข) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบปริมาตรตะกอนเซลล์ของทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นในทุกสัปดาห์ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดง ในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าวความเข้มข้นต่าง ๆ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ns: ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละแท่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 11 ลักษณะตะกอนเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 20 วัน (บาร์=1 เซนติเมตร)

ก เติมน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์

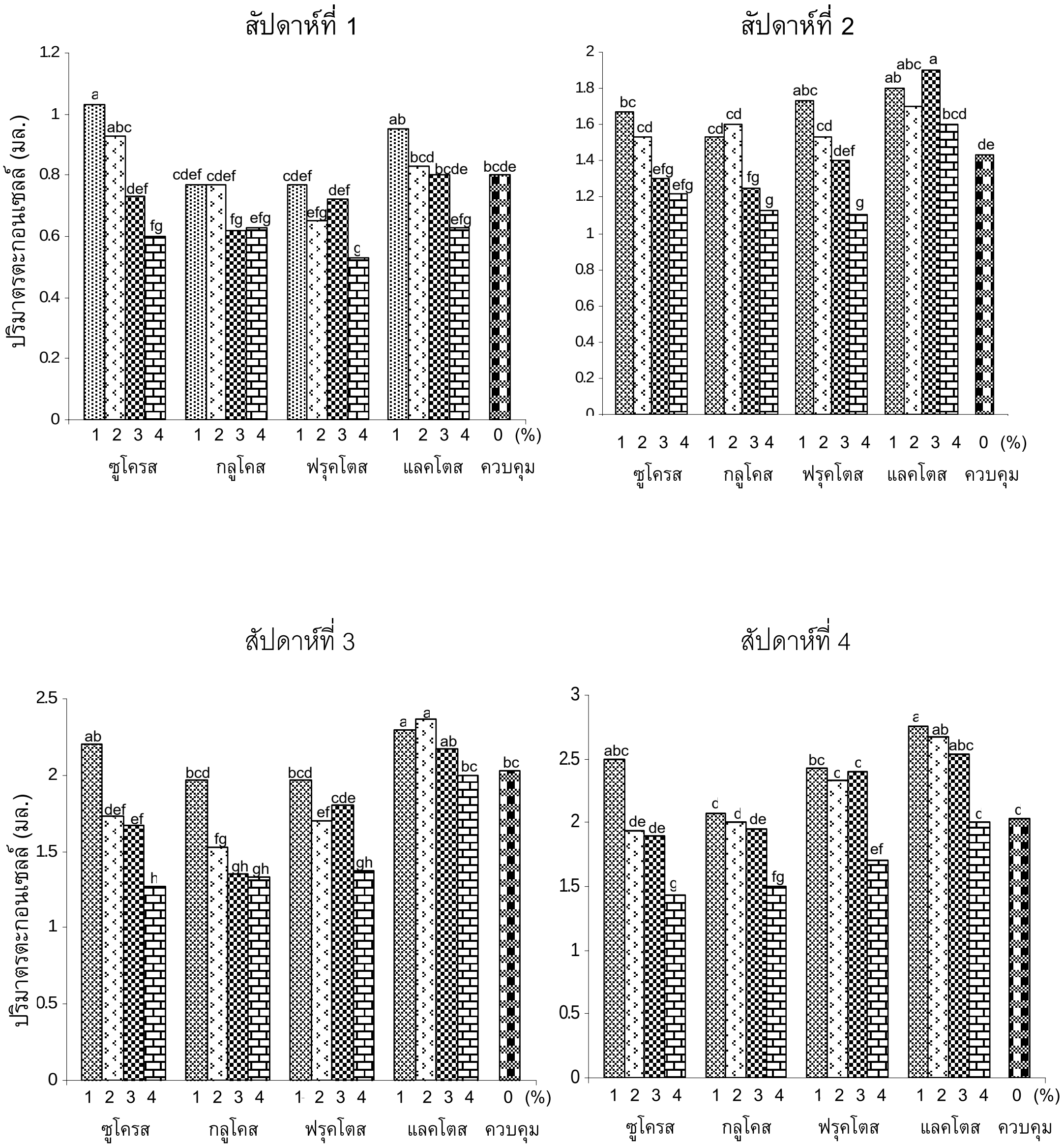
ข เติมน้ำมะพร้าวเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

2.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชันและโซมาติคเอ็มบริโอในซัสเพนชัน

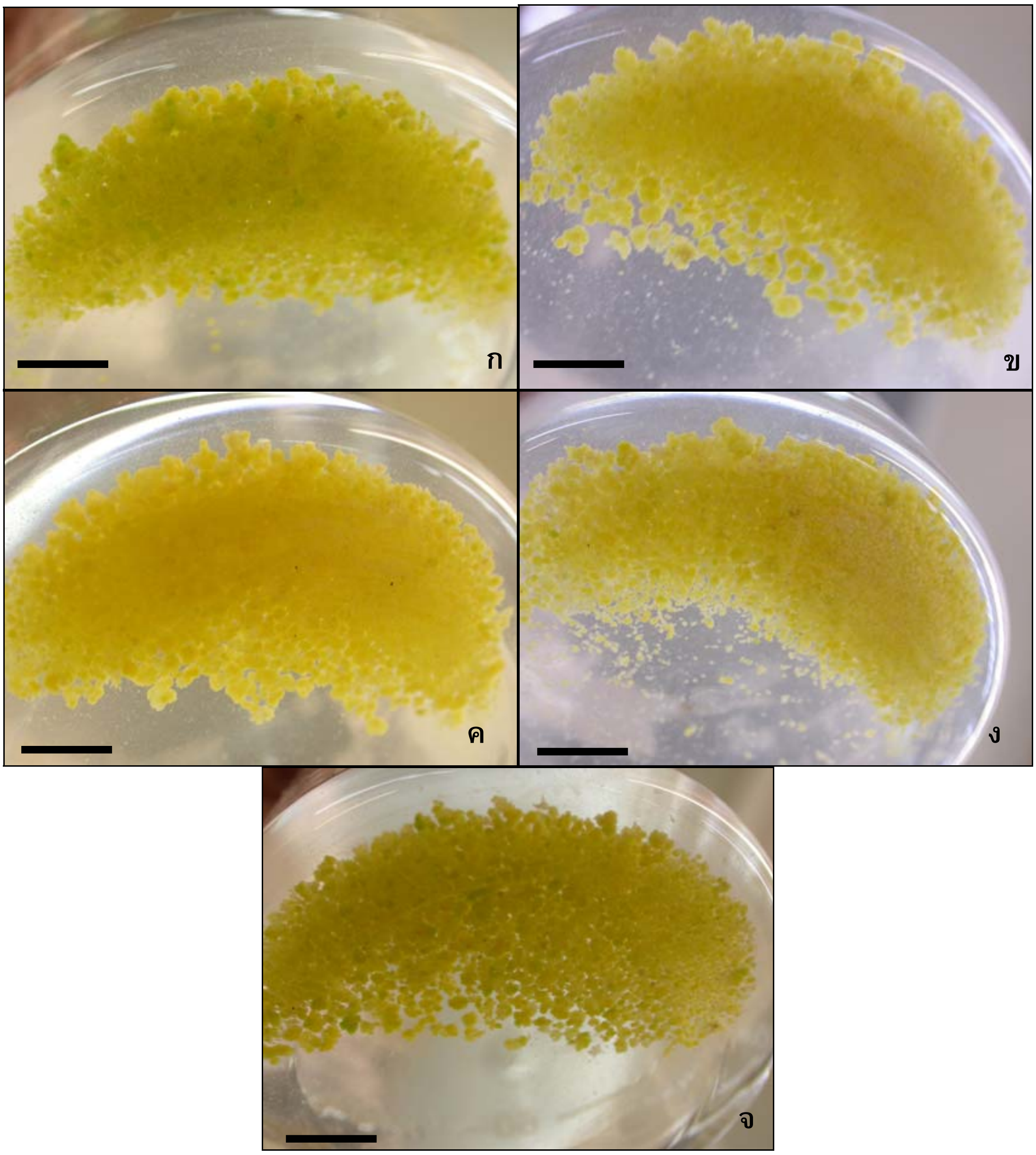
จากการนำปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้น 0.5 มิลลิลิตร ย้ายเลี้ยงลงอาหารเหลวสูตร NDM ร่วมกับการเติมน้ำตาล 4 ชนิดคือ น้ำตาลซูโครส กลูโคส แลคโตส และ ฟรุคโตส ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ทำการวัดปริมาตรตะกอนเซลล์ทุกสัปดาห์ พบว่า สัปดาห์ที่ 1 อาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงที่สุด เท่ากับ 1.03 มิลลิลิตร ส่วนสัปดาห์ที่ 2 3 และ 4 อาหารเหลวเติมน้ำตาลแลคโตส ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด ในสัปดาห์ที่ 4 น้ำตาลแลคโตสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรตะกอนมากที่สุด คือ 2.75 มิลลิลิตร รองลงมาคือน้ำตาลแลคโตสเข้มข้น 2 3 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ คือ 2.67 2.53 และ 2.50 มิลลิลิตร ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ภาพที่ 12) เมื่อพิจารณาลักษณะตะกอนเซลล์ในแต่ละหน่วยการทดลอง พบว่าลักษณะตะกอนเซลล์ในอาหารเหลวเติมน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส มีสีเหลืองครีมและตะกอนเซลล์มีขนาดเล็ก (ภาพที่ 13ก ข และ ค) ซึ่งแตกต่างกับลักษณะตะกอนเซลล์ในอาหารเหลวเติมน้ำตาลแลคโตสมีลักษณะสีเขียวและตะกอนเซลล์ขนาดใหญ่ (ภาพที่ 13ง) เช่นเดียวกับ

ลักษณะตะกอนเซลล์ในชุดควบคุม (ภาพที่ 13จ) เมื่อเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดพบว่า น้ำตาลทุกชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์) ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงกว่าน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นสูง (4 เปอร์เซ็นต์)

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันเป็นเวลา 20 วัน ทำการนับจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอในซัสเพนชันต่อปริมาตรตะกอนเซลล์ 0.5 มิลลิลิตร ในแต่ละหน่วยการทดลอง พบว่า น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอในซัสเพนชันมากที่สุด คือ 15.77 เอ็มบริโอ (ตารางที่ 4) รองลงมาคือน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอในซัสเพนชัน 14.78 และ 14.00 เอ็มบริโอตามลำดับ ส่วนชุดควบคุม (ปราศจากน้ำตาล) ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอในซัสเพนชันน้อยที่สุด คือ 4.67 เอ็มบริโอ โดยโซมาติคเอ็มบริโอมีลักษณะค่อนข้างกลม ขนาดใกล้เคียงกัน และมีสีน้ำตาลดำเข้ม (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 12 ปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดงในอาหารเหลว สูตร NDM เติมน้ำตาลชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละแท่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับ $p \leq 0.05$



ภาพที่ 13 ลักษณะตะกอนเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 15 วัน (บาร์=1 เซนติเมตร)

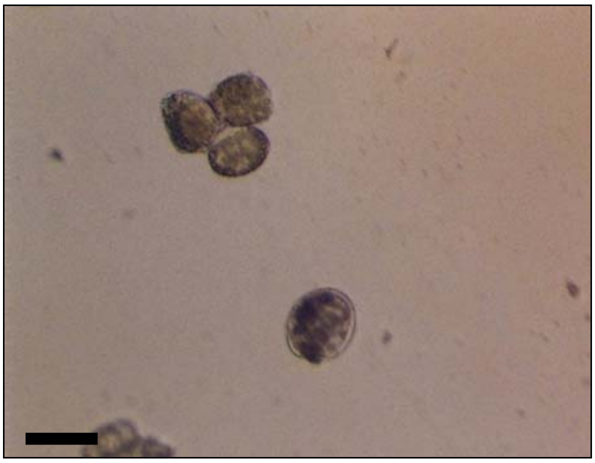
ก ปราศจากการเติมน้ำตาล (ควบคุม)
ข น้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์
ค น้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์
ง น้ำตาลฟรุคโตส 1 เปอร์เซ็นต์
จ น้ำตาลแลคโตส 1 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4 ผลของน้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส และแลคโตส ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอในซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดง ในอาหารเหลวสูตร NDM หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 20 วัน

ชนิดของน้ำตาล	ระดับความเข้มข้น (%)	จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอในเซลล์ซัสเพนชันเอ็มบริโอต่อปริมาตรตะกอนเซลล์ 0.5 มล.
ซูโครส	1	14.00abc
	2	11.89bcd
	3	9.55de
	4	11.56cd
กลูโคส	1	11.33cd
	2	11.89bcd
	3	15.77a
	4	14.78ab
ฟรุคโตส	1	7.56ef
	2	9.56de
	3	7.33ef
	4	10.56de
แลกโตส	1	9.78de
	2	10.56de
	3	8.89de
	4	9.33de
ควบคุม	0	4.67f
F-test		**
C.V. (%)		12.44

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับ $p \leq 0.01$

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 14 โซมาติคเอ็มบริโอในซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดง ในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 20 วัน (บาร์=0.6 ไมโครเมตร)

3. ศึกษาการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน

3.1 ผลของสูตรอาหารและผงถ่านต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากเซลล์ซัสเพนชัน

จากการนำโซมาติคเอ็มบริโอระยะสุก-แก่สีเขียว อายุประมาณ 1-2 เดือน มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็ง 4 สูตรคือ อาหารสูตร VW NDM MS และ ½ MS ร่วมกับการเติมและไม่เติมผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในที่มีแสง เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า อาหารแข็งทุกสูตร ส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น อาหารสูตร MS ปราศจากการเติมผงถ่าน ให้การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ต่ำที่สุด คือ 33 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบจำนวน PLBs ที่มีการพัฒนา พบว่า อาหารสูตร NDM ร่วมกับการเติมผงถ่านส่งเสริม PLBs ให้มีการพัฒนายอดและใบเล็ก 1-2 ใบ มากที่สุด คือ 91.83 และ 15.67 PLBs ตามลำดับ (ตารางที่ 5) รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร ½ MS ไม่เติมผงถ่าน อาหารสูตร NDM เติมและไม่เติมผงถ่าน อาหารสูตร MS เติมผงถ่าน อาหารสูตร VW เติมและไม่เติมผงถ่าน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการเติมและไม่เติมผงถ่าน ในอาหารแต่ละสูตร พบว่า อาหารสูตรเดียวกันเติมผงถ่าน ส่งเสริมการเกิดจำนวน PLBs ที่เริ่มปรากฏยอดและ PLBs ที่ปรากฏใบเล็ก 1-2 ใบ มากกว่าสูตรอาหารไม่เติมผงถ่าน PLBs ที่ได้มีลักษณะสีเขียวเข้มกว่า PLBs ที่เลี้ยงบนอาหารปราศจากการเติมผงถ่าน (ภาพที่ 15ก-ซ) นอกจากนี้ทำการศึกษาจำนวน PLBs ที่ตายพบว่า อาหารสูตร ½ MS เติมผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน PLBs ที่ตายน้อยที่สุด (4.33 PLBs) เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวน PLBs ทั้งหมดที่มีการพัฒนา จึงถือว่ามีจำนวน PLBs ที่ตายน้อยที่สุด รองลงมาคือ อาหารสูตร ½ MS ปราศจากการเติมผงถ่าน NDM เติมผงถ่าน มีจำนวนการตายของ PLBs 4.50 และ 4.83 PLBs ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ส่วนอาหารสูตร MS ไม่เติมผงถ่านให้จำนวน PLBs ที่ตายสูงสุด มากกว่า 100 PLBs กล่าวได้ว่าอาหารเติมผงถ่านให้จำนวน PLBs ที่ตายน้อยกว่าอาหารปราศจากการเติมผงถ่าน นอกจากนี้พบว่า PLBs บนอาหารสูตร NDM ทั้งเติมและไม่เติมผงถ่าน มีลักษณะสีเขียวซีด จนกลายเป็นสีน้ำตาล และมีจำนวนที่ตายเพิ่มมากขึ้น หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 เดือน (ภาพที่16)

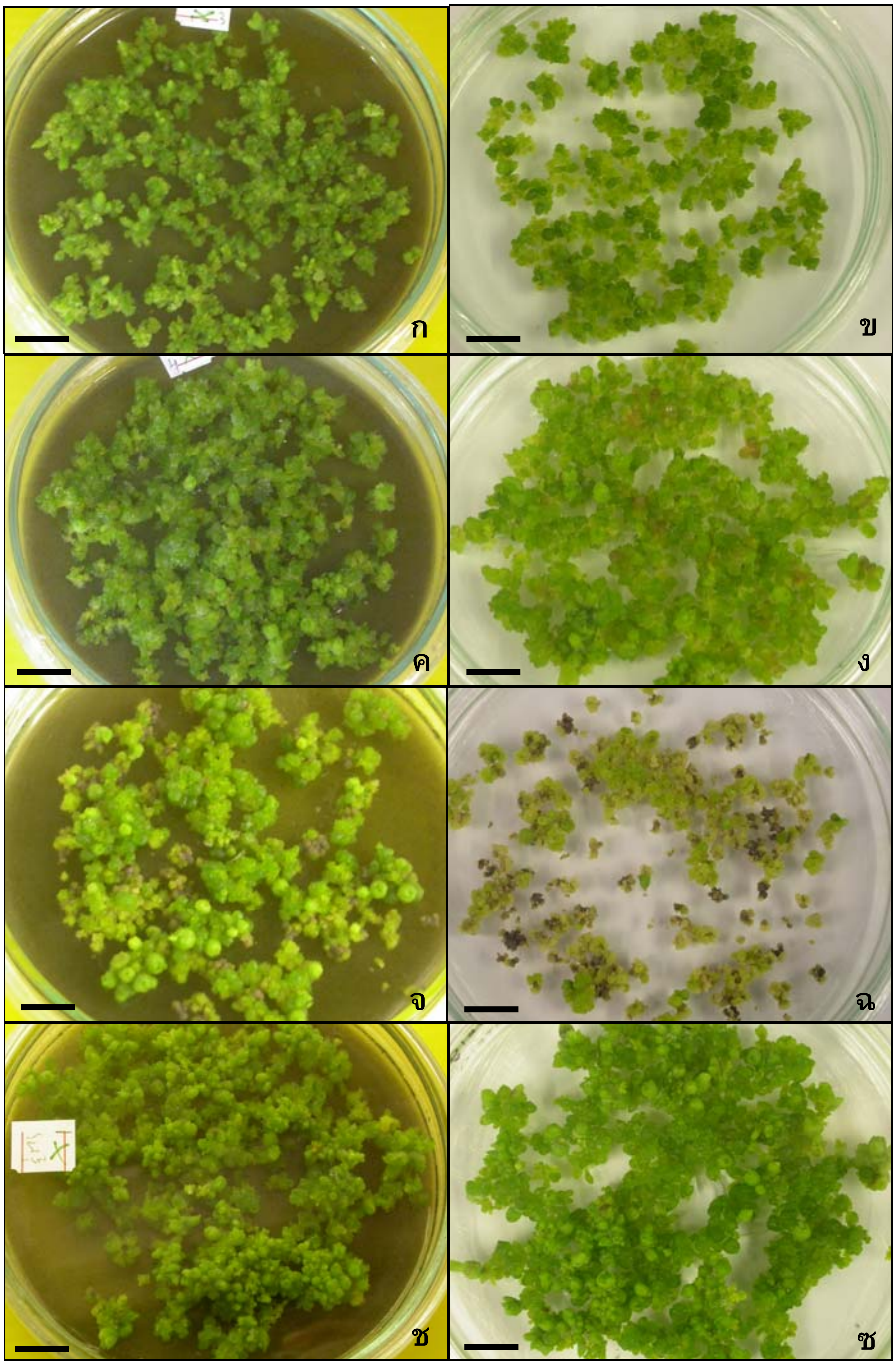
ระยะการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดงเริ่มจาก PLBs ระยะกลมและเริ่มมีการสร้างขนรากหลังจากการวางเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ จากนั้นมีการพัฒนาของ PLBs ระยะเริ่มสร้างยอด (ภาพที่ 17ก) และเข้าสู่การพัฒนาของ PLBs ระยะใบเล็ก 1-2 ใบ ในช่วง 3-4 สัปดาห์ หลังจากการวางเลี้ยง (ภาพที่ 17ข และ ค) และเริ่มมีการสร้างราก หลังอายุประมาณ 3 เดือน (ภาพที่ 17ง)

ตารางที่ 5 ผลของสูตรอาหารและผงถ่านต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดง หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 2 เดือน

สูตรอาหาร	ผงถ่าน	เปอร์เซ็นต์การเกิด PLBs	จำนวน PLBs		จำนวน PLBs ที่ตาย (PLBs)
			เริ่มปรากฏยอด	เริ่มปรากฏใบเล็กๆ 1-2 ใบ	
VW	เติม	100a	25.00bc	0.50c	5.17c
	ไม่เติม	100a	10.83cd	0.33c	3.83c
NDM	เติม	100a	45.50b	15.67a	4.83c
	ไม่เติม	100a	39.33b	11.17ab	9.00c
MS	เติม	100a	28.50bc	6.17bc	27.33b
	ไม่เติม	33.33b	1.33d	0.00c	>100a
½ MS	เติม	100a	91.83a	15.67a	4.33c
	ไม่เติม	100a	79.00a	11.33ab	4.50c
F-test		**	**	**	**
C.V. (%)		11.13	20.83	51.77	24.64

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับ $p \leq 0.01$

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



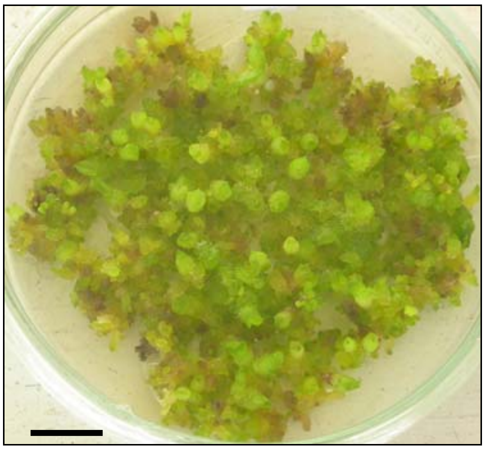
ภาพที่ 15 การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดง หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (บาร์=1 เซนติเมตร)

ก และ **ข** อาหารแข็งสูตร VW เติมและไม่เติมผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์

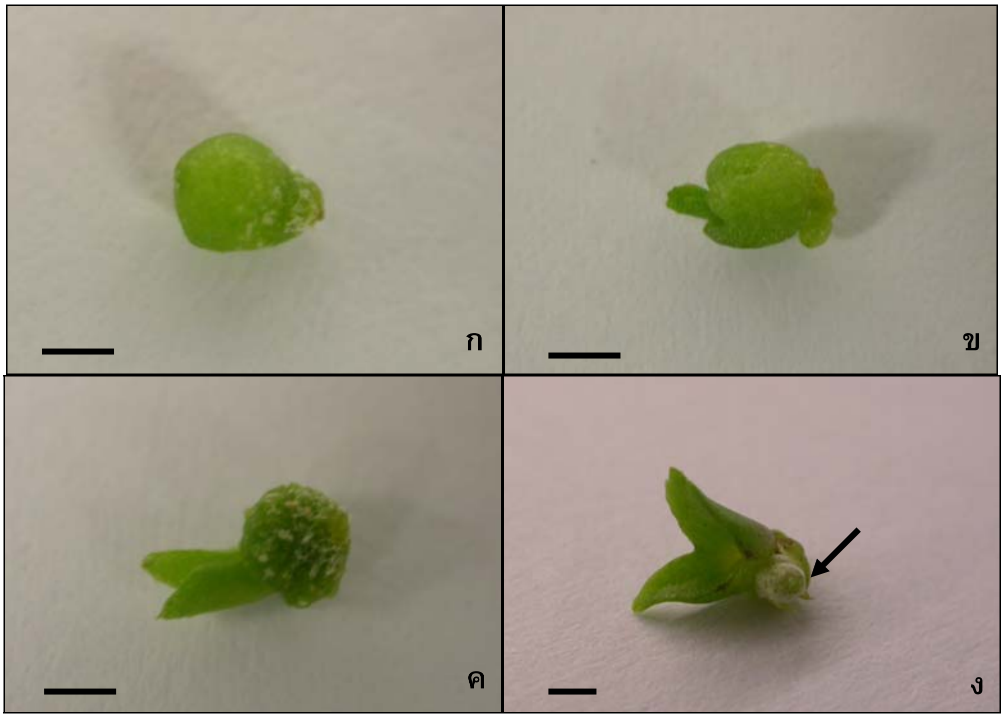
ค และ **ง** อาหารแข็งสูตร NDM เติมและไม่เติมผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์

จ และ **ฉ** อาหารแข็งสูตร MS เติมและไม่เติมผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์

ช และ **ซ** อาหารแข็งสูตร ½ MS เติมและไม่เติมผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 16 PLBs กล้วยไม้ช้างแดง บนอาหารสูตร NDM ปราศจากการเติมผงถ่าน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน (บาร์=1 เซนติเมตร)



ภาพที่ 17 การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดง

ก PLB ระยะกลมและเริ่มสร้างขนราก หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ (บาร์ = 1.5 มิลลิเมตร)

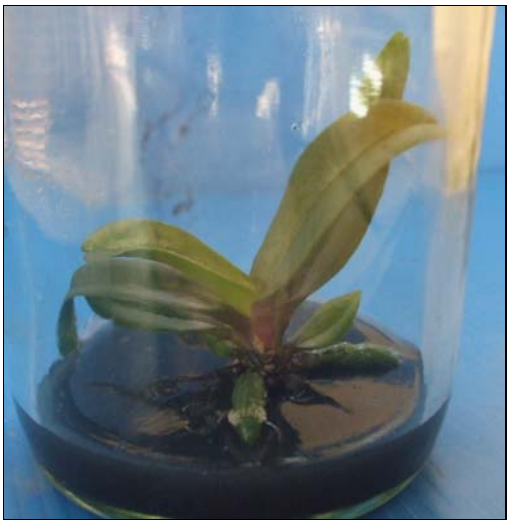
ข PLB ระยะเริ่มสร้างยอด หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ (บาร์ = 2 มิลลิเมตร)

ค PLB ระยะปรากฏใบเล็ก 1-2 ใบ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ (บาร์ = 1 มิลลิเมตร)

ง PLB ระยะเริ่มปรากฏราก เพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 2-3 เดือน (บาร์ = 1 มิลลิเมตร)

3.2 ลักษณะทางสัณฐานของพืชต้นใหม่

ลักษณะทางสัณฐานของพืชต้นใหม่อายุประมาณ 1 ปี ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันในกล้วยไม้ช้างแดง พบว่า พืชต้นใหม่ที่ได้ไม่มีลักษณะที่ผิดปกติใด ๆ ทั้งในส่วนของใบ ลำต้น และราก (ภาพที่ 18) กล่าวได้ว่า ไม่มีความแปรปรวนของลักษณะทางสัณฐาน



ภาพที่ 18 พืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดง อายุประมาณ 1 ปี วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 4

วิจารณ์

แคลลัสเป็นเครื่องมือที่สำคัญของนักปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ในกรณีของการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันนั้นต้องผ่านกระบวนการชักนำแคลลัสที่มีคุณภาพและการเจริญที่ดี (สมปอง, 2550) การวิจัยครั้งนี้ศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง ได้แก่ สูตรอาหาร ผงถ่าน และสภาวะที่วางเลี้ยง พบว่า การเพิ่มปริมาณแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง เป็นไปได้ดีหลังจากวางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร VW ให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็น friable callus ซึ่งเป็นลักษณะของแคลลัสที่มีคุณภาพเหมาะสำหรับนำมาชักนำเซลล์ซัสเพนชัน นอกจากนี้พบว่า อาหารสูตร NDM ส่งเสริมให้ชิ้นส่วนแคลลัสที่วางเลี้ยงมีการพัฒนาเป็น PLB หลังจาการวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ในส่วนที่วางเลี้ยงในที่มืดให้การพัฒนาของยอด ส่วนในที่มีแสงเริ่มมีการพัฒนาของ PLB สีเขียว พร้อมที่จะมีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของอาหารสูตร NDM นั้นจะเห็นว่า มีฟอสเฟตในอาหารปริมาณสูงกว่าในอาหารสูตร VW และ MS นอกเหนือจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช อาหารบางชนิดจะมีผลต่อการเกิดลักษณะรูปร่างของเนื้อเยื่อพืช เช่น หากมีฟอสเฟตในอาหารปริมาณสูงสามารถส่งเสริมการเกิดยอดได้ดีกว่าสูตรอาหารที่มีฟอสเฟตในปริมาณต่ำ (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2551)

สภาวะที่วางเลี้ยงมีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดงเช่นกัน แคลลัสที่วางเลี้ยงในที่มืดส่งเสริมการเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีกว่าแคลลัสที่วางเลี้ยงในที่มีแสง พืชแต่ละชนิดมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสแตกต่างกันออกไป พืชบางชนิดให้การเจริญเติบโตของแคลลัสได้ดีในสภาพที่มืด หากเลี้ยงในที่มีแสงความสามารถในการสร้างแคลลัสลดลง และส่งผลให้แคลลัสมีคุณภาพด้อยลงด้วย ทั้งนี้เพราะชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงมีการปลดปล่อยสารประกอบฟีโนลออกมาจำนวนมาก การเพาะเลี้ยงในที่มีแสงช่วยส่งเสริมกระบวนการสร้างสารดังกล่าวให้เพิ่มมากขึ้น (สมปอง, 2550) สอดคล้องกับ Chen และ Chang (2000) ได้รายงานความสำเร็จในการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสของกล้วยไม้ออนซิเดียม โดยการวางเลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 2 เดือน สามารถส่งเสริมการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดี Ekiz และ Konzak (1997) รายงานการชักนำแคลลัสของ bread wheat จากอับเรณู พบว่าการวางเลี้ยงในที่มืด สามารถชักนำแคลลัสได้ดีกว่าการวางเลี้ยงในที่มีแสง

การเพาะเลี้ยงแคลลัสในกล้วยไม้หลายชนิดมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อชักนำและส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัส อย่างเช่น Lee และ Lee (2003) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสของกล้วยไม้ *Cypripedium formosanum* สามารถชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดี เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D เข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 4.54 ไมโครโมลาร์ หรือแม้แต่ในกล้วยไม้ฟาแลนอปซิส (Chen *et al.*, 2000) และกล้วยไม้ซิมบิเดียม (Huan *et al.*, 2004) ในขณะที่กล้วยไม้ช้างแดงที่ทำการศึกษาครั้งนี้ สามารถทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดี โดยปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหาร เป็นการช่วยลดขั้นตอนในการเตรียมสารและลดต้นทุนในการผลิต

ส่วนการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันของกล้วยไม้ช้างแดง พบว่า สูตรอาหารเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยง อาหารเหลวสูตร NDM เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงดีที่สุด ส่งเสริมการชักนำและเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด คือ 1.11 มิลลิลิตร ในสัปดาห์ที่ 4 ตะกอนเซลล์มีลักษณะสีเหลืองและมีขนาดค่อนข้างเล็ก Tokuhara และ Mill (1993) รายงานว่าอาหารเหลวสูตร NDM เป็นสูตรอาหารที่ประกอบด้วย ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง และสารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ ดัดแปลงมาจากสูตรอาหารอื่น เพื่อให้มีความเหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้โดยทั่ว ๆ ไป และประสบความสำเร็จในการชักนำและเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ฟาแลนอปซิสในอาหารเหลวสูตร NDM (Tokuhara and Mill, 2001)

เมื่อศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดง พบว่า รูปแบบของการเจริญเติบโตมีความคล้ายคลึงกับการเจริญเติบโตของพืชทั่ว ๆ ไป คือมีลักษณะเป็น sigmoid curve ระยะ lag phase อยู่ระหว่าง 4-12 วัน ของการเลี้ยง เป็นระยะเริ่มแรกของการเลี้ยง ระยะนี้เซลล์เพิ่งเข้าสู่ช่วงแรกของวงจรการแบ่งเซลล์ ระยะ log phase อยู่ระหว่าง 12- 28 วัน ของการเลี้ยง เป็นระยะที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นแบบเส้นตรง ระยะนี้มีการสร้างผนังเซลล์และสะสมแป้งจากคาร์โบไฮเดรตที่สร้างก่อนหน้านี้ และเซลล์อยู่ในระยะ stationary phase ที่อายุมากกว่า 28 วันหลังจากย้ายเลี้ยง เป็นระยะที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในด้านการเจริญของเซลล์ มีการปลดปล่อยสารชีวเคมีออกมาจำนวนมากจนอาจทำให้เซลล์ตาย ส่งผลให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ลดลงได้ การเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันมีความคล้ายคลึงกับการเจริญเติบโตของแคลลัส แต่การเจริญเติบโตของแคลลัสช้ากว่า ทั้งนี้เนื่องมาจากวงจรการแบ่งเซลล์ที่ช้ากว่านั่นเอง (สมปอง, 2550) รูปแบบอัตราการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ช้างแดง เป็นการรายงานครั้งแรก ในส่วนของกล้วยไม้ชนิดอื่น ยังไม่มีการรายงาน การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโต สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อประโยชน์สำหรับการศึกษาทางด้านอื่นต่อไป เช่น ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการย้ายเลี้ยง อายุเซลล์ที่เหมาะต่อการแยกโปรโตพลาสเพื่อปรับปรุงพันธุ์ หรือการศึกษาองค์ประกอบภายในเซลล์ในช่วงอายุต่าง ๆ เป็นต้น

นอกจากนี้พบว่า น้ำมะพร้าวซึ่งจัดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ที่นิยมนำมาเติมในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในหลอดทดลอง ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ตั้งแต่ระดับ 0-20 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เพิ่มสูงขึ้นตามลำดับและลดลงที่ระดับความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าวเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.12 มิลลิลิตร รองลงมาคือน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ 2.05 มิลลิลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ อีกทั้งตะกอนเซลล์ในอาหารเติมน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะสีเหลืองครีมและขนาดเล็กกว่าตะกอนเซลล์ในอาหารเติมน้ำมะพร้าวเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกใช้น้ำมะพร้าวความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหารสำหรับการทดลองถัดไป สอดคล้องกับ มัลลิกา และพิมพ์ใจ (2548) ซึ่งรายงานว่า น้ำมะพร้าวสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตถึงเพียงแค่ระดับความเข้มข้นหนึ่ง และหากเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวขึ้นไปอีกการเจริญเติบโตกลับลดลง นอกจากนี้ ศิริวารินทร์ และอารักษ์ (2549) รายงานว่าอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้พญาฉัททันต์ได้ดีและการเจริญเข้าสู่ระยะพัฒนาการต่าง ๆ ของโพรโทคอร์มได้ดี Li และคณะ (2001) รายงานว่าอาหารเติมน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอดและรากของกล้วยไม้รองเท้านารีได้ดีที่สุด ส่วนอาหารที่มีน้ำมะพร้าวสูงกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ต้นมีการเจริญเติบโตลดลง

สำหรับผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่เติมลงในอาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงในอาหารเหลวสูตร NDM ร่วมกับการเติมน้ำตาลแลกโตสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด คือ 2.75 มิลลิลิตร ในสัปดาห์ที่ 4 แต่ตะกอนเซลล์มีสีเขียวและเป็นก้อนขนาดใหญ่ พร้อมที่จะพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (เช่นเดียวกับทรีตเมนต์ควบคุม) ซึ่งไม่เหมาะที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันเพื่อเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ ส่วนน้ำตาลชนิดอื่นพบว่าน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้การเพิ่มปริมาตรตะกอนสูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่น (น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และชุดควบคุม) คือ 2.2 และ 2.5 มิลลิลิตร ในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 ตามลำดับ ทั้งนี้ลักษณะตะกอนเซลล์มีสีเหลืองและขนาดเล็ก ซึ่งเหมาะที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดง เมื่อพิจารณาจำนวนเอ็มบริโอในเซลล์ซัสเพนชัน พบว่า น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนเอ็มบริโอในซัสเพนชันสูงสุดเท่ากับ 15.77 และเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนเอ็มบริโอในซัสเพนชัน 14.00 เอ็มบริโอ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สอดคล้องกับ Vasudevan และ Ganapathi (1999) ศึกษาการชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน ของถั่วมะแฮะ (*Cajanus cajan*) โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ พบว่า ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและ ฟรุคโตสที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้การเกิดโซมาติคเอ็มบริโอเพิ่มขึ้น สำหรับฟรุคโตสนั้น พบว่า เมื่อระดับความเข้มข้นสูงมากขึ้น ส่งผลยับยั้งการเกิด

โซมาติคเอ็มบริโอ ส่วนน้ำตาลโมเลกุลคู่อย่างซูโครสและมอลโตส ให้ผลการตอบสนองดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 87.64 มิลลิโมลาร์ ในกรณีของน้ำตาลมอลโตสสามารถชักนำการเกิดโซมาติคเอ็มบริโอค่อนข้างต่ำ ในขณะที่ Yong และ So (2007) รายงานว่าน้ำตาลซูโครส มีประสิทธิภาพสำหรับการชักนำโซมาติคเอ็มบริโอของ *Magnolia obovata* มากกว่าน้ำตาลกลูโคส ทั้งนี้อาจเนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่แตกต่างกัน จึงควรมีการศึกษาถึงความเหมาะสมของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตในพืชแต่ละชนิดเพื่อสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด จากการศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์สำหรับการเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ต่อไป น้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลที่เลือกใช้ในการศึกษามากที่สุด ทั้งมีความสามารถในการเปลี่ยนรูปได้ง่ายและเนื่องจากน้ำตาลซูโครสไม่มีคุณสมบัติเป็น non-reducing ในธรรมชาติจึงมีความต้านทานต่อการทำลายจากเอ็นไซม์ ส่วนระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดพบว่า น้ำตาลความเข้มข้นต่ำ ๆ ส่งเสริมการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้ดีกว่าความเข้มข้นที่สูง เช่นเดียวกับ มัลลิกา และพิมพ์ใจ (2548) รายงานความสำเร็จในการขยายพันธุ์กล้วยไม้ดินท้าวคูลูดอกเล็ก โดยวางเลี้ยงต้นกล้าในอาหาร VW ดัดแปลงเติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ให้การเจริญเติบโตโดยรวมดีที่สุดและกล่าวว่าอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงทำให้พืชไม่สามารถดูดอาหารไปใช้ได้อย่างเต็มที่ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากแรงดันออสโมติก สกุลรัตน์ และสมปอง (2550) รายงานการเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ เข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับการเติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ว่าส่งเสริมการสร้างโพรโทคอร์มสูงสุด 51.21 เปอร์เซ็นต์

การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากเซลล์ซัสเพนชัน พบว่าการวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS เติมผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ดีที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวน PLBs ระยะเริ่มปรากฏยอดและระยะปรากฏใบเล็ก 1-2 ใบ เท่ากับ 45.50 และ 15.67 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากอาหารสูตร ½ MS เป็นสูตรอาหารที่ลดองค์ประกอบลงครึ่งหนึ่งจากสูตรปกติ (MS) ทำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดสภาวะเครียดจากปริมาณธาตุอาหารที่ลดน้อยลงและกระตุ้นการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ เพื่อที่จะสามารถสร้างอาหารได้เอง สอดคล้องกับ Kishor และคณะ (2006) ได้รายงานการศึกษาการนำต้นกล้าของกล้วยไม้ลูกผสม *Ascocenda* 'Kangla' วางเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ว่าให้การพัฒนาของต้นกล้าดีที่สุด ต้นกล้ามีความสูงของยอด 2.5 ซม. จำนวนใบและรากเท่ากับ 4 และ 3.4 ตามลำดับ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 150 วัน Sung และคณะ (2007) รายงานว่าเซลล์ซัสเพนชันของ *Ranunculus kazusensis* สามารถเจริญพัฒนาเป็นพืชต้นไม้ได้ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรพื้นฐานที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง ในขณะที่ Van Le และคณะ (1999) รายงานความสำเร็จในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของ *Rhynchostylis gigantea* จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดแบบ

thin cell layers บนอาหารสูตร MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นกล้วยไม้สกุลช้าง เช่นเดียวกับกล้วยไม้ช้างแดง แต่มีการตอบสนองต่อสูตรอาหารต่างกัน อาจเกิดจากการใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นในการวางเลี้ยงที่แตกต่างกัน

ผงถ่านเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของกล้วยไม้ ภายในอนุภาคของผงถ่านมีช่องว่างที่ละเอียดมาก มีพื้นที่ผิวในช่องว่างสูง ผงถ่านจึงมีความสามารถในการดูดซับสารบางตัวออกจากอาหารได้และใช้ผงถ่านในการดูดซับสารพิษ เช่น สารประกอบฟีนอล เอทิลีน ทำให้ปริมาณสารดังกล่าวในอาหารลดลง นอกจากนี้ยังมี การดูดซับฮอร์โมนบางส่วน ช่วยปรับสมดุลให้เหมาะสมต่อพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่ ผงถ่านยังส่งเสริมการสร้างราก โดยสร้างสภาวะมืด และทำให้รากเจริญเติบโตได้ดี ผงถ่านจึงสำคัญต่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่ (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2551) นอกจากนี้ผงถ่านกัมมันต์ที่เติมลงไปในอาหารไม่มีผลต่อการแตกตัวของน้ำตาลซูโครสในระหว่างที่มีการนึ่งฆ่าเชื้ออาหาร เพราะหากเกิดการแตกตัวของน้ำตาลซูโครสไปเป็นน้ำตาลฟรุคโตสและกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตสที่เกิดขึ้นอาจจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชบางชนิดได้ (Wann *et al*., 1997 อ้างโดย สมพร และนัยนา, 2547) สอดคล้องกับ Oh และคณะ (2008) ซึ่งประสบความสำเร็จในการกระตุ้นการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนนิคซัสเพนชัน ใน watershield (*Brasenia schreberi*) โดยวางเลี้ยงกลุ่มเซลล์ ในอาหารสูตร ½ MS ร่วมกับการเติมผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่เพิ่มขึ้น 1.9-2.3 เท่า เมื่อเทียบกับสูตรอาหารชุดควบคุมและปราศจากการเติมผงถ่าน นอกจากนี้ยังพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวส่วนใหญ่ เช่น กล้วย (Said and Elbanna, 2003) และกล้วยไม้ (สมพร และนัยนา, 2547) ให้การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ดีเมื่อใช้ผงถ่าน อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นที่ใช้แตกต่างกันออกไป ขึ้นกับชนิดของพืช บางพืชตอบสนองต่อผงถ่านในระดับความเข้มข้นต่ำ เช่น Said และ Elbanna (2003) ประสบความสำเร็จในการกระตุ้นการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของกล้วย (*Musa* spp.) จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน โดยการเติมผงถ่านกัมมันต์เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ร่วมกับการเติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ดีที่สุด 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนบางพืชตอบสนองต่อผงถ่านในระดับความเข้มข้นสูง เช่น สมพร และนัยนา (2547) ได้รายงานการเติมผงถ่านกัมมันต์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร VW ส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ากล้วยไม้หวายเหลืองจันทบูรได้ดีที่สุด ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบจำนวนราก ความสูงและน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเป็น 5.00 ใบต่อต้น 12.83 รากต่อต้น ความสูง 3.29 เซนติเมตรต่อต้น และน้ำหนักสด 0.40 กรัมต่อต้น ตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากพืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นของผงถ่านที่แตกต่างกัน

บทที่ 5

สรุป

การวางเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสกล้วยไม้ช้างแดงบนอาหารแข็งสูตร VW เติมผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณแคลลัสได้สูงสุด ให้น้ำหนักสดแคลลัส 0.40 กรัม

การวางเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เหมาะสมต่อการชักนำเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดงมากที่สุด ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1.11 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันกล้วยไม้ช้างแดง เป็นแบบ sigmoid curve ระยะ lag phase อยู่ช่วงอายุ 4-12 วัน ของการเลี้ยง ระยะ log phase อยู่ช่วงอายุ 12- 28 วัน ของการเลี้ยง และ ระยะ stationary phase อยู่ที่อายุ 28 วันขึ้นไปหลังจากย้ายเลี้ยง

การเติมน้ำมะพร้าวที่ระดับความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวสูตร NDM สามารถส่งเสริมการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้ดี ให้ลักษณะตะกอนเซลล์ที่มีคุณภาพดี และให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ 2.05 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

การเติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวสูตร NDM สามารถส่งเสริมการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้ดี ให้ลักษณะตะกอนเซลล์ที่มีคุณภาพดี และให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ 2.50 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

การวางเลี้ยงชิ้นส่วนโซมาติคเอ็มบริโอระยะสุกแก่-สีเขียว บนอาหารแข็งสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติมผงถ่านเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 เดือน ส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของกล้วยไม้ช้างแดงจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันได้สูงสุด ให้จำนวน PLBs ระยะเริ่มปรากฏยอดและระยะปรากฏใบเล็ก 1-2 ใบ มากที่สุด เท่ากับ 91.83 และ 15.67 ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณัฐา ควรประเสริฐ. 2548. กล้วยไม้วิทยา 1. เชียงใหม่: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พูนศักดิ์ สักกทัตติยกุล. 2550. กล้วยไม้สกุลช้าง. เข้าถึงได้จาก http://www.thaigoodview.com/library/teachershow/poonsak/orchid/sec04p07.html. (เข้าถึงเมื่อ 22 ตุลาคม 2550)

เพ็ญจันทร์ เพชรสุด. 2546. อิทธิพลของวุ้น น้ำตาล และการสร้างแผลต่อการเจริญของยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดมังคุดในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มัลลิกา นวลแก้ว และพิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์. 2548. ผลของซูโครสและน้ำมะพร้าวต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ดินท้าวคูลูดอกเล็ก. ว. เกษตร 21: 91-97.

ศิริวารินทร์ ธิบูลย์ และอารักษ์ จันทศิลป์. 2549. ปัจจัยที่มีผลต่อการงอกและการเจริญของโพรโทคอร์มกล้วยไม้พญาฉัททันต์. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 28: 277-284.

เศรษฐมันตร์ กาลจนกุล. 2550. ร้อยพรรณพฤกษา “กล้วยไม้”. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์เศรษฐศิลป์.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์ และสมปอง เตชะโต. 2550. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาล และผงวุ้นต่อการสร้างโพรโทคอร์มของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 29: 647-654.

สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง. 2551. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล. เข้าถึงได้จาก http://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/Tissue%20Culture/media.html. (เข้าถึงเมื่อ 26 พฤษภาคม 2551)

สมปอง เตชะโต. 2538. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเศรษฐกิจ. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2550. บทปฏิบัติการรายวิชาเทคโนโลยีเซลล์พืช. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล และนัยนา ศรีชัย. 2547. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและผงถ่านกัมมันต์ต่อการพัฒนาการขยายพันธุ์กล้วยไม้หวายเหลืองจันทบูร. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 26:757-763.

สมศักดิ์ มณีพงศ์. 2550. กล้วยไม้ (Orchid). สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์. เข้าถึงได้จาก http://webhost.wu.ac.th/msomsak/Soilless/PowerPoint/Orchid/sld015.htm. (เข้าถึงเมื่อ 22 ตุลาคม 2550)

สุพัตรา เจริญภักดี และวีณัน บัณฑิตย์. 2548. การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับลักษณะดอกของกล้วยไม้สกุลช้าง. วารสารเกษตร 21: 99-105.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2537. การพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ประเภทแวนด้า. นครปฐม: รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2549. พื้นที่เพาะปลูก ผลผลิต และผลผลิตกล้วยไม้. เข้าถึงได้จาก http://www.oae.go.th/statistic/year book1. (เข้าถึงเมื่อ 2 กันยายน 2550)

อุดม นวพานิช และพัชราวดี วัฒนาวิกย์กิจ. 2549. การเก็บรวบรวมและขยายพันธุ์กล้วยไม้ป่า. ว. วิจัย มหาวิทยาลัยรามคำแหง 9: 65-87.

อบฉันท์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. หน่วยปฏิบัติการวิจัยพรรณไม้ประเทศไทย. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Chen, J. T. and Chang, W. C. 2000. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). Plant Sci.160: 87-93.

Chen, Y. C., Chen, C. and Chang, W. C. 2000. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis. In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 36: 420-423.

Ekiz, H. And Konzak, C. F. 1997. Effects of light regimes on anther culture response in bread wheat. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 50: 7-12.

Eymar, E., Alegre, J., Toribio, M. and Lopez Vela, D. 2000. Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 63:57-65.

Hartinie, M. and Azlan J. G. 2007. *In vitro* germination and plantlet establishment of *Labisia pumila* (Bl.) F. Vill. Scientia Hort. 115: 91-97.

Huan, L. V. T., Takamura, T. and Tanaka, M. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in Cymbidium orchid. Plant Sci. 166: 1443-1449.

Kishor, R., Sha Valli Khan, P. S. and Sharma, G. J. 2006. Hybridization and *in vitro* culture of an orchid hybrid Ascocenda ‘Kangla’. Scientia Hort. 108: 66-73.

Lee, Y. I. and Lee, N. 2003. Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 39: 475-479.

Li, C. H., Chi, J. L., Ching, I. K., Bau, L. H. and Murachige, T. 2001. Paphiopedilum cloning *in vitro*. Scientia Hort. 91: 111-121.

Oh, M. J., Na, H. R., Choi, H. K., Liu, J. R. and Kim, S. W. 2008. High frequency plant regeneration from zygotic-embryo-derived embryogenic cell suspension cultures of watershield (*Brasenia schreberi*). Plant Biotechnol. Rep. 2: 87-92.

Park, S. U. and Facchini, P. J. 2001. Somatic embryogenesis from embryogenic cell suspension cultures of California Poppy, *Eschscholzia californica* Cham. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 37: 35-39.

Pradhan, C., Pattnaik, S., Dwari, M., Patnaik, S. N. and Chand, P. K. 1998. Efficient plant regeneration from cell suspension-derived callus of East Indian rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). Plant Cell Rep. 8: 138–142.

Said, M. K. and Elbanna, A. A. M. 2004. Highly efficient somatic embryogenesis and plant regeneration *via* suspension cultures of banana (*Musa* spp.). Arab J. Biotech. 7: 99-110.

Sung, R. M., Jang, R. L. and Suk, W. K. 2007. Plant regeneration from zygotic embryo-derived embryogenic cell suspension cultures of *Ranunculus kazusensis.* Plant Biotechnol. Rep.1: 57-60.

Teng, W. T. 1997. Activated charcoal affects morphogenesis and enhances sporophyte regeneration during leaf cell suspension culture of *Platycerium bifurcatum*. Plant Cell Rep. 17: 77-83.

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

Tokuhara, K. and Mii, M. 2001. Induction of embryogenic and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 37: 457-461.

Tokuhara, K. and Mii, M. 2003. Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of Phalaenopsis orchids by adjusting carbohydrate sources. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 39: 635-639.

Vajrabhaya, M. and Vajrabhaya, T. 1970. Culture of *Rhynchostylis gigantea* a monopodial orchid. Amer. Orchid Soc. Bull. 39: 907-910.

Van Le, B., Hang Phuong, N. T., Anh Hong, L. T. and Tran Thanh, V. K. 1999. High frequency shoot regeneration from *Rhynchostylis gigantea* (orchidaceae) using thin cell layers. Pl. Gr. Reg. 28: 179-185.

Vasudevan, R. A. and Ganapathi, A. 1999. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of pigeonpea (*Cajanus cajan*). Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 56: 179-184.

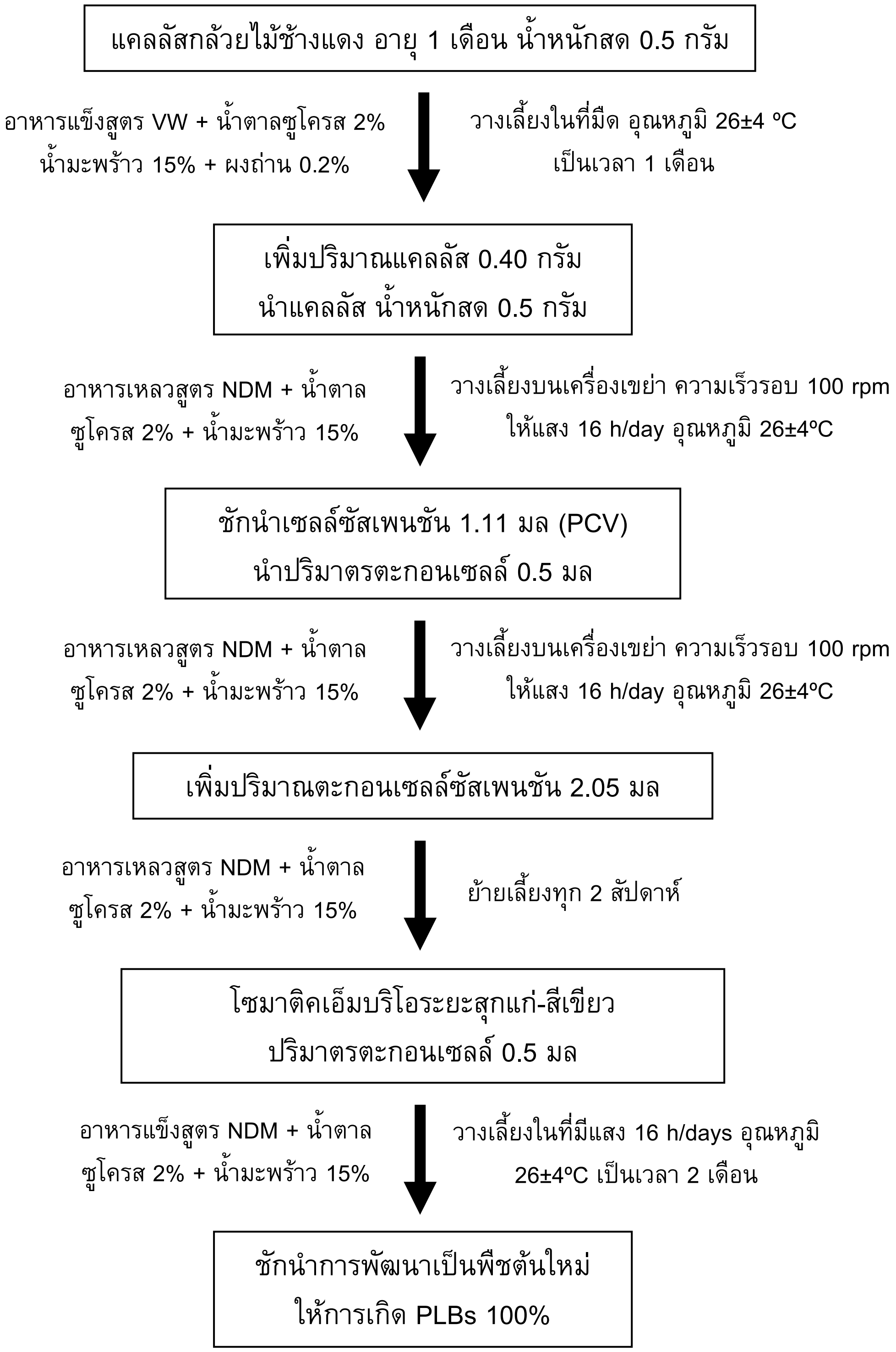
Vengadesan, G., Ganapathi, A., Ramesh, A. V. and Prem, A. R. 2002. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 38: 52-57.

Vyas, S., Guha, S., Bhattacharya, M. and Usha Rao, I. 2009. Rapid regeneration of plants of *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Orchidaceae) by using banana extract. Scientia Hort.. 121: 32-37.

Yasseen, M. Y. 2001. Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberellin and plant morphogenesis *in vitro*. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 37: 204-205.

Yong, W. K. and So, Y. P. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seeds of *Magnolia obovata* Thunberg. Plant Biotechnol. Rep. 1: 237–242.

ภาคผนวกที่ 1


แคลลัสกล้วยไม้ช้างแดง อายุ 1 เดือน น้ำหนักสด 0.5 กรัม
อาหารแข็งสูตร VW + น้ำตาลซูโครส 2%
น้ำมะพร้าว 15% + ผงถ่าน 0.2%
วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 26±4 ºC
เป็นเวลา 1 เดือน
เพิ่มปริมาณแคลลัส 0.40 กรัม
นำแคลลัส น้ำหนักสด 0.5 กรัม
อาหารเหลวสูตร NDM + น้ำตาล
ซูโครส 2% + น้ำมะพร้าว 15%
วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 100 rpm
ให้แสง 16 h/day อุณหภูมิ 26±4ºC
ชักนำเซลล์ซัสเพนชัน 1.11 มล (PCV)
นำปริมาตรตะกอนเซลล์ 0.5 มล
อาหารเหลวสูตร NDM + น้ำตาล
ซูโครส 2% + น้ำมะพร้าว 15%
วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 100 rpm
ให้แสง 16 h/day อุณหภูมิ 26±4ºC
เพิ่มปริมาณตะกอนเซลล์ซัสเพนชัน 2.05 มล
อาหารเหลวสูตร NDM + น้ำตาล
ซูโครส 2% + น้ำมะพร้าว 15%
ย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์
โซมาติคเอ็มบริโอระยะสุกแก่-สีเขียว
ปริมาตรตะกอนเซลล์ 0.5 มล
อาหารแข็งสูตร NDM + น้ำตาล
ซูโครส 2% + น้ำมะพร้าว 15%
วางเลี้ยงในที่มีแสง 16 h/days อุณหภูมิ
26±4ºC เป็นเวลา 2 เดือน
ชักนำการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่
ให้การเกิด PLBs 100%

ขั้นตอนการขยายพันธุ์กล้วยไม้ช้างแดง จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน

ภาคผนวกที่ 2

องค์ประกอบของสูตรอาหาร

องค์ประกอบ	ปริมาณสารที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	MS	NDM	VW
NH_4NO_3	1,650	480	525
KNO_3	1,900	200	425
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	-	470	-
KCl	-	150	-
KI	0.83	-	-
$MgSO_47H_2O$	370	250	250
KH_2PO_4	170	550	250
$MnSO_41H_2O$	16.90	3	7.50
$ZnSO_47H_2O$	10.60	0.5	-
H_3BO_3	6.20	-	-
H_3BO_4	-	0.5	-
$CuSO_45H_2O$	0.025	0.025	-
$Na2MoO_42H_2O$	0.25	0.025	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	500
$CoCl_26H_2O$	0.025	0.025	-
$CaCl_22H_2O$	440	-	-
$FeSO_47H_2O$	27.80	-	27.80
Na_2EDTA	37.30	-	37.30
Myo-inositol	100	100	-
Nicotinic acid	0.50	-	-
Niacin	-	1.0	-
Pyridoxine hydrochloride	0.50	1.0	-
Thiamine hydrochloride	0.10	1.0	-
Calcium pantothenate	-	1.0	-
Glycine	2	-	-
Adenine	-	1.0	-
l-Cystein	-	1.0	-
d-Biotin, cryst.	-	0.1	-

องค์ประกอบของสูตรอาหาร (ต่อ)

องค์ประกอบ	ปริมาณสารที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	MS	NDM	VW
Fe-EDTA	-	21	-
sucrose	3%	2%	2%
pH	5.7	5.2	5
Agar 0.6-0.7% (0.75%), Coconut water 15%			