การเกิดต้นจากโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.) ในหลอดทดลอง

Plant Regeneration from Protocorm-Like Bodies of Lady's Slipper Orchid (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.) In Vitro

ปวีณา แก้วอุบล

Paveena Kaewubon

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Botany
Prince of Songkla University
2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเกิดต้นจากโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.) ในหลอดทดลอง

ผู้เขียน นางสาวปวีณา แก้วอุบล

สาขาวิชา พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์)

คณะกรรมการสอบ

....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อารักษ์ จันทศิลป์)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ครรชิต ธรรมศิริ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์

....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเกิดต้นจากโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.) ในหลอดทดลอง
ผู้เขียน	นางสาวปวีณา แก้วอุบล
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2553

บทคัดย่อ

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลอายุประมาณ 6 เดือน บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW (Vacin and Went, 1949) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 3 เดือน พบว่า 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด (2.55 ± 1.21 เปอร์เซ็นต์) และอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มได้ดีที่สุด (45.41 ± 4.59 เปอร์เซ็นต์) หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 4 เดือน บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถสร้างโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (protocorm-like bodies; PLBs) ได้ดีที่สุด (142.86 ± 84.52 มิลลิกรัมต่อแคลลัสเริ่มต้น 8 มิลลิกรัม) และเมื่อนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 6.8 กรัมต่อลิตร และกล้วยหอมบด 20 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ให้เกิดส่วนยอดได้มากที่สุด (89.58 ± 45.47 ยอดต่อโพรโทคอร์มไลค์บอดี้เริ่มต้น 10 มิลลิกรัม) ส่วนการชักนำให้เกิดราก พบว่าอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด (6.00 ± 2.65 รากต่อโพรโทคอร์มไลค์บอดี้เริ่มต้น 10 มิลลิกรัม) อย่างไรก็ตามต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร จะมีลักษณะสมบูรณ์ที่สุดทั้งส่วนยอดและราก นอกจากนี้เมื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่า โพรโทคอร์มไลค์บอดี้เจริญมาจากเซลล์ด้านนอกของก้อนแคลลัส และการเกิดต้นที่เจริญมาจากโพรโทคอร์มไลค์บอดี้จะมีขั้วเจริญปลายยอดและปลายราก นอกจากนี้มีการเชื่อมต่อของกลุ่มเนื้อเยื่อเจริญที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงอาหารและน้ำ (vascular strand) ระหว่างยอดและราก (shoot-root connection) อีกด้วย

Thesis Title Plant Regeneration from Protocorm-Like Bodies of Lady's Slipper Orchid (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.) In Vitro

Author Miss Paveena Kaewubon

Major Program Botany

Academic Year 2010

ABSTRACT

Seeds from 6-month-pods of *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz. were cultured on modified VW (Vacin and Went, 1949) solid medium and supplemented with 20 g/l sucrose, 2 g/l activated charcoal (AC), 2 g/l phytagel as well as various concentrations of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and thidiazuron (TDZ). The results showed that the highest percentage of callus induction (2.55 ± 1.21%) were obtained after three months of culture on a modified VW solid medium, supplemented with the combination of 1 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l TDZ whereas the supplement with 1 mg/l 2,4-D alone provided the highest percentage of protocorms (45.41 ± 4.59%). After culturing for 4 months, the highest formation of callus-derived protocorm-like bodies (PLBs) (142.86 ± 84.52 mg per 8 mg of initial callus) were obtained from a modified VW solid medium containing 2 g/l AC, 2 g/l phytagel and a combination of plant growth regulators; 0.1 mg/l naphthalene acetic acid (NAA) and 0.5 mg/l TDZ and10 g/l sucrose. Then, these PLBs eventually formed the highest number of shoots (89.58 ± 45.47 shoots per 10 mg of initial PLBs) on modified MS (Murashige and Skoog, 1962) solid medium supplemented with 20 g/l sucrose, 2 g/l AC, 6.8 g/l agar and 20 g/l homogenated banana. In addition, the PLBs gave the highest number of roots (6.00 ± 2.65 roots per 10 mg of initial PLBs) on the same medium containing 50 g/l homogenated banana. However, the most effective medium for the plantlet regeneration stage was a modified MS medium supplemented with 50 g/l homogenated banana because plantlets on this medium produced healthy shoots and roots. Histological observation proved that somatic embryos originated from the surface of the embryogenic callus. The PLB-derived plantlet had shoot and root poles. Moreover, these obtained plantlets exhibited the shoot-root connection of vascular strand.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความกรุณาอย่างสูงจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา ข้อชี้แนะและความช่วยเหลือตลอดการศึกษาจนกระทั่งจบหลักสูตร อีกทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของเอกสารประกอบการวิจัย ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบไปด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อารักษ์ จันทศิลป์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ครรชิต ธรรมศิริ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อารักษ์ จันทศิลป์ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์สำหรับการทดลองเกี่ยวกับปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ขอขอบพระคุณ คุณวันชัย มุกดารัศมี ผู้อำนวยการศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร จังหวัดตรัง (พันธุ์พืชเพาะเลี้ยง) และคุณนพรัตน์ ถวิลเวทิน นักวิชาการส่งเสริมการเกษตร สำหรับฝักกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล ซึ่งเป็นประโยชน์ในการทำวิจัยเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณ คุณละม้าย ทองบุญ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการเบิกใช้อุปกรณ์ต่างๆ เกี่ยวกับปฏิบัติการไมโครเทคนิค รวมทั้งความกรุณาที่ช่วยแนะนำความรู้ต่างๆ ทางด้านไมโครเทคนิค

ขอขอบคุณโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ที่สนับสนุนทุนการศึกษา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ นักศึกษาในห้องปฏิบัติการทางเนื้อเยื่อวิทยาของพืชและสัตว์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้กำลังใจและช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เฝ้าเลี้ยงดู อบรมสั่งสอน ตลอดจนเป็นกำลังใจที่ยิ่งใหญ่ ในการสนับสนุนและให้ความรักความเข้าใจเสมอมา รวมทั้งขอขอบพระคุณญาติๆ ทุกคนที่ช่วยเป็นกำลังใจสำคัญ

ปวีณา แก้วอุบล

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการตารางภาคผนวก	(8)
รายการภาพ	(9)
รายการภาพภาคผนวก	(11)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	14
2. วิธีการวิจัย	15
วัสดุอุปกรณ์	15
วิธีการศึกษา	19
3. ผลการทดลอง	24
4. วิจารณ์	51
5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	61
เอกสารอ้างอิง	63
ภาคผนวก	76
ประวัติผู้เขียน	92

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทคอร์มของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากการเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ นาน 3 เดือน 29

2 ผลของน้ำตาลซูโครสและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของแคลลัสกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน 34

3 ผลของมันฝรั่งบดและกล้วยหอมบดต่อการเจริญของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ไปเป็นต้นของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน 42

รายการตารางภาคผนวก

ตารางที่ **หน้า**

ภาคผนวก ก

1 องค์ประกอบของอาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949) 77

2 องค์ประกอบของอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) 78

ภาคผนวก ข

3 สูตรน้ำยาดึงน้ำออกจากเซลล์พืช 12 ขั้นตอน 79

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกกล้วยไม้รองเท้านารี	5
2	ดอกกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.	6
3	ลักษณะฝักกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลอายุประมาณ 6 เดือน	24
4	ลักษณะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลที่มีชีวิต จากฝักอายุประมาณ 6 เดือน เห็นเอ็มบริโอติดสีแดง	25
5	ลักษณะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลที่เริ่มเห็นการพอง หลังจากการเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW นาน 1 เดือน	26
6	ลักษณะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากการเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้น สูตรดัดแปลง VW นาน 2 เดือน	27
7	ลักษณะโพรโทคอร์มของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากเพาะเมล็ด บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล. นาน 3 เดือน	30
8	ลักษณะแคลลัสของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากเพาะเมล็ดบนอาหาร วุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 0.1 มก./ล. นาน 3 เดือน	31
9	ลักษณะโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากเพาะเลี้ยง แคลลัสเป็นเวลา 4 เดือน บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญ เติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ	35
10	ลักษณะแคลลัสที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและไม่สามารถเจริญเป็นโพรโทคอร์ม ไลค์บอดี้ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารวุ้นสูตร ดัดแปลง VW ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต แต่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น ต่างๆ	36
11	ลักษณะโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติม สารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครส 10 ก./ล. นาน 1 เดือน	37
12	ลักษณะโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติม สารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครส 10 ก./ล. นาน 2 เดือน	38

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า

13 ลักษณะโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครส 10 ก./ล. นาน 3 เดือน 39

14 ลักษณะต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS นาน 4 เดือน 43

15 ลักษณะต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. ในระยะเวลาต่างๆกัน 44

16 ลักษณะต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. เป็นเวลา 12 เดือน 45

17 ลักษณะต้นที่แข็งแรงของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. นาน 10 เดือน 46

18 ลักษณะแบบแผนการเจริญจากโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ไปเป็นต้น 47

19 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ทุติยภูมิที่เกิดบนโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ปฐมภูมิ 48

20 ลักษณะต้นกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล 49

21 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของต้นกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. นาน 5 เดือน เมื่อย้อมสีด้วยวิธี safranin and fast green staining 50

22 สมการการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง TTC กับอนุมูลไฮโดรเจน 51

23 แผนภาพสรุปขั้นตอนการเกิดต้นผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล 62

รายการภาพภาคผนวก

ภาพที่ **หน้า**

ภาคผนวก ค

1 ลักษณะทางกายวิภาคการเจริญเติบโตของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อเจริญเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA 0.1 มก./ล. และ TDZ 0.5 มก./ล. ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 10 ก./ล. 84

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2iP	=	2-isopentyladenine
AC	=	Activated charcoal
BA	=	6-benzyladenine
BAP	=	6-benzylamino purine
IAA	=	Indole-3-acetic acid
IBA	=	Indole-3-butyric acid
MS	=	Murashige and Skoog (1962)
mod. MS	=	Modified Murashige and Skoog
mod. VW	=	Modified Vacin and Went
NAA	=	1-naphthaleneacetic acid
PVPP	=	Polyvinylpolypyrrolidone
TDZ	=	Thidia zuron
TPF	=	1,3,5-triphenylformazan
TTC	=	2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride
VW	=	Vacin and Went (1949)

บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กล้วยไม้จัดเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่สำคัญ ซึ่งมีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยพิจารณาได้จากมูลค่าการส่งออกในปี พ.ศ. 2550 ของดอกกล้วยไม้คิดเป็นมูลค่า 2,545 ล้านบาท และมูลค่าการส่งออกต้นกล้วยไม้ในปีเดียวกัน คิดเป็นมูลค่า 400 ล้านบาท (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2550) ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกกล้วยไม้รายใหญ่ที่สุดของโลก นอกจากนี้การส่งออกกล้วยไม้ทั้งต้นและดอกของประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์จากไม้ดอกไม้ประดับอื่นๆ เนื่องจากประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดที่สำคัญของกล้วยไม้หลากหลายชนิด จากการสำรวจพบกล้วยไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยรวมทั้งสิ้น174 สกุล จำแนกเป็นชนิดได้ประมาณ 1,154 ชนิด (สลิลและนฤมล, 2549) โดยสามารถพบกล้วยไม้ได้ตามธรรมชาติเกือบทุกพื้นที่ป่าของประเทศ ทั้งชนิดที่เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย (epiphytic orchid) กล้วยไม้อาศัยบนหิน (lithophytic orchid) และกล้วยไม้ดิน (terrestrial orchid) ซึ่งกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หรือรองเท้านารีดอกขาว (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.) อยู่ในสกุล *Paphiopedilum* เป็นกล้วยไม้ดินที่สำคัญสกุลหนึ่ง มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย และมีเขตการกระจายพันธุ์ไปถึงประเทศมาเลเซีย แหล่งที่พบคือ ภูเขาหินปูน ใกล้ชายฝั่งทะเลทางภาคใต้ของประเทศไทย เช่น จังหวัดสตูล ตรัง สุราษฎร์ธานี กระบี่ ฯลฯ กล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลจัดเป็นกล้วยไม้หายากและใกล้จะสูญพันธุ์ จึงจัดเป็นพืชอนุรักษ์ในบัญชีที่ 1 ของอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ (CITES) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลให้มีจำนวนมากขึ้น โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสำหรับใช้ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของรองเท้านารีขาวสตูล เนื่องจากสามารถผลิตต้นที่ตรงสายพันธุ์ได้ปริมาณมาก (mass propagation) และรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศที่เกิดขึ้นโดยทั่วไปตามธรรมชาติ ซึ่งมีอัตราการงอกและการอยู่รอดต่ำมาก อีกทั้งต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดจะทำให้เกิดลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (Ishii et al., 1998) นอกจากนี้การผลิตในปริมาณมากยังช่วยในการศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายยีน (genetic transformation) เนื่องจากต้นที่ได้ทั้งหมดจะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกัน อย่างไรก็ตามปัญหาที่สำคัญของวิธี

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ เนื้อเยื่อแคลลัสจะเกิดการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (tissue browning) เนื่องจากมีการสะสมของสารประกอบฟีนอล (Hoque and Arima, 2002; Vatanpour-Azghandi et al., 2002) ซึ่งเป็นสารพิษที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชและมีผลต่อการเพิ่มจำนวนพืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Ozyigit et al., 2007) อันเป็นสาเหตุทำให้ความสามารถในการเจริญเติบโตของแคลลัสลดลง จนแคลลัสตายในที่สุด อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW (Vacin and Went, 1949) ที่เติมผงถ่านกัมมันต์ปริมาณ 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถช่วยลดหรือยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสไม่ให้เป็นสีน้ำตาลได้ (ปวีณา, 2550) เนื่องจากผงถ่านกัมมันต์เป็นวัสดุคาร์บอนที่มีเนื้อพรุน ทำให้มีพื้นที่ผิวมากประมาณ 600 - 2,000 ตารางเมตรต่อกรัม ซึ่งผงถ่านกัมมันต์จะดูดซับสารอินทรีย์ที่มีขั้วปานกลาง นั่นคือสารจำพวกอะโรมาติก ได้มากกว่าสารอินทรีย์ที่มีขั้วสูงหรือไม่มีขั้ว ดังนั้นผงถ่านกัมมันต์สามารถดูดซับสารจำพวกอะโรมาติกได้ดี เช่น สารประกอบฟีนอล (Pan and van Staden, 1998) เมื่อสามารถควบคุมให้แคลลัสเจริญต่อไปได้ โดยลดการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของแคลลัส จึงเป็นประเด็นที่จะศึกษาต่อไป เพื่อตรวจสอบแผนการเจริญของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลจากแคลลัส และการเจริญเติบโตจนได้ต้นที่สมบูรณ์ โดยศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ และการเกิดต้น

การตรวจเอกสาร

ข้อมูลทั่วไปของกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Subclass Monocotyledoneae) จัดอยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Family Orchidaceae) ซึ่งเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุดวงศ์หนึ่งของพืชดอก ประกอบด้วยกล้วยไม้ประมาณ 25,000 ชนิดและมากกว่า 800 สกุล (ครรชิต, 2550) รวมทั้งกล้วยไม้รองเท้านารีที่พบทั่วโลกประมาณ 5 สกุลและ 137 ชนิด ในภูมิภาคเอเชียเป็นแหล่งกำเนิดของ “กล้วยไม้รองเท้านารี” หรือ “Lady’s slipper” ไม่น้อยกว่า 55 ชนิด กระจายพันธุ์อยู่ตามธรรมชาติ สำหรับประเทศไทยพบกล้วยไม้รวมทั้งสิ้น 174 สกุล จำแนกเป็นชนิดได้ทั้งหมดประมาณ 1,154 ชนิด โดยพบกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีประมาณ 15 ชนิด (สลิลและนฤมล, 2549)

ข้อมูลทั่วไปของกล้วยไม้รองเท้านารี

กล้วยไม้รองเท้านารี มีชื่อสามัญว่า Lady’s slipper จัดอยู่ในสกุล *Paphiopedilum* และมีชื่อพื้นเมืองอื่นๆ อีกหลายชื่อ เช่น รองเท้านาง รองเท้าแตะนารี หรือ บุหงากะสุต ซึ่งเป็นภาษามาเลเซีย หมายถึง รองเท้าของสตรี เนื่องจากลักษณะดอกที่มีกลีบงุ้มงอเป็นกระเป๋าคล้ายรูปรองเท้าแตะของผู้หญิง ส่วนกระเป๋า (labellum หรือ pouch) ของกล้วยไม้รองเท้านารีมีรูปร่างลักษณะและสีสันแตกต่างกันไปตามชนิด (มาลินี, 2534)

กล้วยไม้สกุล *Paphiopedilum* มีแหล่งกำเนิดอยู่ในเขตร้อนแถบเอเชีย ตั้งแต่อินเดีย บังกลาเทศ พม่า ประเทศไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และทางตะวันออกเฉียงใต้ของจีน (อุไร, 2541) จะพบขึ้นอยู่ในป่าทั่วๆไป บางชนิดเกาะอาศัยอยู่ตามต้นไม้ แต่ส่วนใหญ่จะเป็นพวกที่ขึ้นอยู่ตามพื้นดิน หรือซอกหินที่มีใบไม้ทับถมกันอยู่ เจริญเติบโตในที่โปร่ง ไม่ชอบที่รกทึบ และเป็นพวกที่ไม่ทิ้งใบ ใบมีสีเขียวตลอดปี เมื่อจำแนกตามลักษณะการเจริญเติบโต พบว่ารองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ประเภทแตกกอเช่นเดียวกับกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* สกุล *Cattleya* และสกุล *Cymbidium* (มาลินี, 2534) โดยเจริญเติบโตแบบแตกหน่อใหม่จากตาข้างของต้นเดิม เพื่อสร้างช่อดอก ซึ่งเป็นลักษณะของกล้วยไม้ประเภทฐานร่วม (sympodium) (อุไร, 2541)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้รองเท้านารี

ลำต้น สั้นมาก และไม่มีลำลูกกล้วย (pseudobulb)

ราก ออกจากโคนต้น เป็นกระจุกและมักจะแผ่กระจายในแนวราบมากกว่าหยั่งลึกลงไป

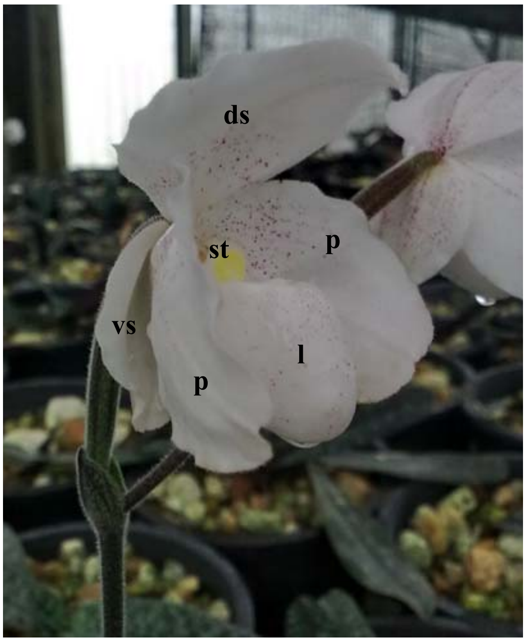
ใบ มีรูปร่างแตกต่างกันไปทั้งรูปรี (elliptic) รูปขอบขนาน (oblong) รูปรีแกมรูปขอบขนาน (oblong-elliptic) หรือรูปแถบ (linear) ออกสลับกันทั้งสองข้าง จำนวน 2 - 7 ใบต่อต้น บางชนิดใบตั้งขึ้น แต่บางชนิดใบอาจแผ่ขนานไปกับพื้นดิน แผ่นใบหนา เส้นกลางใบพับเป็นร่อง ปลายใบมน (obtuse) หรือแหลม (acute) มีทั้งสีเขียวและเป็นมัน เป็นลายตาราง หรือเป็นลายคล้ายหินอ่อน สีเขียวเข้มสลับกับสีเขียวอมเทาทั่วทั้งใบ บริเวณใต้ใบมีสีเขียว บางชนิดมีสีม่วงแดงหรือจุดเล็กๆ สีม่วงแดงกระจายทั่วใบ โคนกาบใบอาจมีสีม่วงเรื่อและมีขนเล็กๆ ปกคลุมตามขอบใบ (อุไร, 2541)

ดอก ออกดอกบริเวณปลายยอด มีทั้งชนิดที่ออกเป็นดอกเดี่ยวและเป็นช่อ (ไพบูลย์, 2521) มีขนาดแตกต่างกัน ก้านดอกอาจยาวหรือสั้น มีสีเขียว สีม่วงแดง หรือสีน้ำตาลแดง และมักมีขนปกคลุม กาบรองดอกมีลักษณะรูปไข่หรือรูปหอกเรียวแหลม มีสีเขียว สีน้ำตาลแดง หรือสีม่วงแดง และมีขนนุ่มปกคลุมเช่นกัน โดยกาบรองดอกจะห่อหุ้มรังไข่ (ovary) กลีบดอกหนาเป็นมัน ด้านนอกมักมีขนปกคลุม ส่วนด้านในมีสีสันสวยงาม (อุไร, 2541) แบ่งเป็น

กลีบนอกหรือกลีบเลี้ยง (sepal) ห่อหุ้มกลีบดอกชั้นใน มีขนนุ่มปกคลุม แบ่งเป็น 3 กลีบ คือ กลีบดอกชั้นนอกกลีบบน (dorsal sepal) 1 กลีบ อยู่ส่วนบนของดอก มักจะใหญ่สะดุดตา มีปลายกลีบแหลม อาจแผ่แบน ตั้งตรงหรืองุ้มมาทางด้านหน้า ส่วนกลีบนอกอีก 2 กลีบจะอยู่ด้านล่างและมักเชื่อมติดกันเป็นชิ้นเดียว เรียกว่า กลีบนอกล่าง (synsepalum) ปลายกลีบนอกล่างมักจะแหลม ชี้ลงและมีลักษณะงุ้มน้อยกว่ากลีบนอกบน (อุไร, 2541)

กลีบในหรือกลีบดอก (petal) กลีบในสองกลีบกางออกไปทั้งสองข้างของดอก มีขนาดและลักษณะเหมือนกัน อาจเป็นแถบ เรียวยาว กลม หรือป้อม แผ่แบน บิดเป็นคลื่น หรืองุ้มงอ กลีบในอีกกลีบหนึ่ง ซึ่งอยู่ด้านล่างของดอกมีลักษณะอิสระและชี้ลงทางด้านล่าง หรือยื่นออกมาสู่ด้านหน้า โดยทั่วไปทั้งลักษณะและสีของกลีบนี้ผิดแปลกไปจากกลีบอื่นๆ นอกจากนี้จะเปลี่ยนรูปเป็นถุงห้อยลงคล้ายหัวรองเท้าของชาวดัตช์ เรียกว่า กระเป๋า หรือ ปาก (lip) (อุไร, 2541)

ดอกของกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นดอกสมบูรณ์เพศ โดยส่วนของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียจะรวมกันอยู่ในส่วนกลางของดอก เรียกว่า เส้าเกสร (column) ซึ่งแตกต่างจากกล้วยไม้อื่นๆ คือ มีเกสรตัวผู้ที่สมบูรณ์ 2 ชุด (มาลินี, 2534) ลักษณะเป็นก้อนเหนียวสีเหลือง เกิดจากเรณู (pollen) รวมตัวกันเป็นก้อน เรียกว่า กลุ่มเรณู (pollinia) โดยติดอยู่ด้านข้างทั้งสองข้างของเส้าเกสร ถัดลงมาบริเวณกึ่งกลางของเส้าเกสรเป็นยอดของเกสรตัวเมีย มีลักษณะคว่ำลง เป็นเนิน 3 เนินติดกัน ปลายเส้าเกสรมีเกสรตัวผู้ที่ไม่สมบูรณ์ เปลี่ยนรูปร่างเป็นแผ่นคล้ายรูปไตหรือรูปพระจันทร์เสี้ยว เรียกว่า โล่ (staminode) (ภาพที่ 1)



ds : dorsal sepal

l : lip

p : petal

st : staminode

vs : ventral sepal (synsepalum)

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกกล้วยไม้รองเท้านารี

ผล เป็นแบบผลแห้งแตก (capsule) ซึ่งเกิดจากการขยายตัวของรังไข่ หลังจากการปฏิสนธิ (fertilization) เมื่อแก่จะมีสีน้ำตาลและแตกตามแนวยาว ภายในมีเมล็ดขนาดเล็กเหมือนฝุ่นผงและมีน้ำหนักน้อย เนื่องจากไม่มีเอนโดสเปิร์ม (endosperm) จึงไม่มีอาหารสะสมทำให้เมล็ดสามารถปลิวไปตามลมได้ง่าย (อุไร, 2541)

ข้อมูลทั่วไปของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz. (ภาพที่ 2)

ชื่อสามัญ Lady’s slipper

ชื่อพื้นเมือง รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีดอกขาว

เขตการกระจายพันธุ์ มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยและกระจายพันธุ์ไปถึงประเทศมาเลเซีย ซึ่งพบบริเวณที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 200 เมตร (อุไร, 2541)

แหล่งที่พบในประเทศไทย ภูเขาหินปูน ใกล้ชายฝั่งทะเลทางภาคใต้ของประเทศ เช่น จังหวัดสตูล ตรัง สุราษฎร์ธานี และกระบี่ (จักรพันธ์และกันย์, 2551)

ฤดูออกดอก มีนาคม - กรกฎาคม

ข้อมูลทางอนุกรมวิธาน

Kingdom : Plantae

Division : Magnoliophyta

Class : Liliopsida

Order : Asparagales

Family : Orchidaceae

Subfamily : Cypripedioideae

Genus *: Paphiopedilum*

Species : *P. niveum*

ภาพที่ 2 แสดงดอกกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล

เป็นกล้วยไม้ดิน พบขึ้นอยู่ตามพื้นดินที่ปกคลุมด้วยอินทรียวัตถุและตามซอกหิน ที่มีใบไม้ผุทับถมกัน

ลำต้น ลำต้นสั้น เจริญเป็นกลุ่ม มีพุ่มใบขนาด 15 - 18 เซนติเมตร

ใบ แผ่นใบรูปรี ความยาว 15 - 17 เซนติเมตร ความกว้าง 2.5 - 3.5 เซนติเมตร มีลายคล้ายหินอ่อน เป็นตารางระหว่างสีเขียวแก่กับสีเขียวอ่อน บริเวณใต้ท้องใบมีสีม่วงเข้มกระจายหนาแน่น (อุไร, 2541)

ดอก เป็นดอกเดี่ยว กว้างประมาณ 4 เซนติเมตร กลีบดอกรูปรีแกมรูปไข่หัวกลับ ปลายเว้าบุ๋ม (สลิลและนฤมล, 2549) กลีบหน้างุ้มมาด้านหน้า ส่วนกลีบนอกด้านบน กลีบดอกและกระเป๋า มีสีขาวและมีจุดสีม่วงน้ำตาลละเอียดมากกระจายอยู่บริเวณใต้โคนกลีบ โล่มีสีขาว ลักษณะรูปร่างคล้ายรูปไต กึ่งกลางเป็นร่องแบะ และมีแต้มสีเหลืองเข้ม ออกดอกจำนวน 1 - 3 ดอกต่อช่อ ก้านดอกยาวและตั้งตรงสีม่วงแดง ความยาว 15 - 17 เซนติเมตร (อุไร, 2541)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1 สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่สำคัญต่อการประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ ซึ่งมีหลายสูตร ทั้งสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบของสารเคมีเพียงไม่กี่ตัว จนกระทั่งสูตรอาหารที่มีหลายองค์ประกอบสลับซับซ้อนมาก เช่น สูตร Knudson C (KC) (Knudson, 1946) สูตร VW สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) สูตร Y3 (Eeuwens, 1976) สูตร B5 (Gamborg, 1970) ฯลฯ โดยสูตรอาหารที่ใช้มีความจำเพาะกับชนิดของพืชที่ใช้เพาะเลี้ยง บางสูตรอาหารเหมาะสำหรับพืชบางกลุ่มหรือบางชนิดเท่านั้น แต่บางสูตรสามารถใช้ได้กับพืชหลายกลุ่มหรือหลายชนิด นอกจากนี้ชนิดของสูตรอาหารยังขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของศึกษา ซึ่งสูตรอาหารที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย คือ สูตร VW และ MS โดยสามารถดัดแปลงให้เหมาะสมกับชนิดของพืชและขั้นตอนในการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามสูตรอาหารแต่ละสูตรจะมี

องค์ประกอบพื้นฐานที่คล้ายคลึงกัน คือ ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง เกลือแร่ และวิตามินต่างๆ โดยเพิ่มเติมสารอาหารอื่นๆ ที่จำเป็น ได้แก่ กรดอะมิโน สารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติ ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มจำนวนและการเจริญเติบโตของเซลล์พืช

1.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตและสารอินทรีย์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

1.2.1 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators)

พืชบางชนิดสามารถสร้างฮอร์โมนพืช (plant hormone) ขึ้นเองได้ อย่างไรก็ตาม การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชลงในอาหารสามารถช่วยให้การเจริญเติบโตดีขึ้น เนื่องจากส่งผลให้สารควบคุมการเจริญเติบโตอยู่ในระดับที่สมดุล และเพื่อให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการทดลอง ซึ่งสารเหล่านี้ทำหน้าที่กระตุ้นและมีส่วนร่วมในกระบวนการต่างๆ ของการเจริญเติบโตของเซลล์ ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์และเนื้อเยื่อพืช โดยเฉพาะสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและกลุ่มไซโทไคนินมีความสำคัญที่สุด ดังนี้

1.2.1.1 ออกซิน (auxin) ได้แก่ IAA (indole-3-acetic acid) IBA (indole-3-butyric acid) NAA (1-naphthaleneacetic acid) และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) ปริมาณการใช้ประมาณ 0.01 - 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยออกซินมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์ การสร้างผนังเซลล์ และการเพิ่มขนาดของเซลล์ (Bonga and von Aderkas, 1992) การใช้ออกซินความเข้มข้นต่ำจะชักนำให้เกิดราก อย่างไรก็ตามถ้าเติมออกซินในปริมาณสูงเกินไปจะยับยั้งการเจริญของราก แต่จะชักนำให้เกิดแคลลัส (Chawla, 2003)

1.2.1.2 ไซโทไคนิน (cytokinin) ได้แก่ BAP (6-benzylaminopurine) BA (6-benzyladenine) TDZ (thidiazuron) kinetin (6-furfurylaminopurine) และ 2iP (2-isopentyladenine) มีหน้าที่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ร่วมกับออกซิน โดยออกซินจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการจำลองตัวเองของดีเอนเอ (DNA duplication) ส่วนไซโทไคนินจะเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการแยกของโครโมโซม (separation of chromosome) (Chawla, 2003) นอกจากนี้เมื่อใช้ไซโทไคนินที่ความเข้มข้นสูงๆ มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนสภาพเซลล์เป็นอวัยวะ (organ differentiation) (รังสฤษดิ์, 2541) และชักนำให้เกิดการสร้างยอดและยับยั้งการสร้างราก (คำนูญ, 2542) โดยไซโทไค-นินสามารถทนความร้อนได้ดีจึงมักเติมในอาหารก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ

นอกจากนี้สมดุลของออกซินและไซโทไคนินมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการกำเนิดอวัยวะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยง ได้แก่ การเกิดแคลลัส ราก และยอด (รังสฤษดิ์, 2541)

1.2.2 น้ำตาล (sugar)

น้ำตาลเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารทุกสูตร เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้พลังงานที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษดิ์, 2541; Pierik, 1997) เพราะเนื้อเยื่อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเหล่านี้สร้างอาหารได้ไม่เพียงพอ เนื่องจากมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์จำกัด ซึ่งไม่เหมาะสำหรับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช ทำให้ไม่มีการสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดขึ้น หรือเกิดขึ้นในอัตราที่ต่ำ น้ำตาลที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ คือ น้ำตาลซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ชนิดเดียวกับที่พืชสังเคราะห์ได้เองและมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิด โดยทั่วไปปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดและสกุลของกล้วยไม้ ซึ่งใช้ประมาณ 10-50 กรัมต่อลิตร (1-5 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตามเมื่อพืชได้รับปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่งที่เหมาะสมกับชนิดของพืชจะส่งผลให้พืชเจริญเติบโตได้ดีขึ้น จากนั้นการเพิ่มปริมาณน้ำตาลมากขึ้นจะลดการเจริญเติบโต เนื่องจากยับยั้งการดูดซึมธาตุอาหารต่างๆ และยับยั้งการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ได้อีกด้วย (Tokuhara and Mill, 2001; Iragi et al., 2005; Vinterhalter et al., 2006; Gonçalves and Romano, 2007 และ Peres et al., 2009)

1.2.3 สารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติ (natural complex)

การเติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว มันฝรั่ง กล้วยหอม สารสกัดจากยีสต์ ฯลฯ ลงในอาหารขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เพาะเลี้ยง นอกจากนี้ชนิดของสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติและปริมาณที่แตกต่างกันส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชที่แตกต่างกันด้วย

1.2.3.1 กล้วยหอม ในกล้วยหอม 100 กรัม ประกอบด้วย ไบโอติน (biotin) วิตามินบี 1 (vitamin B 1) วิตามินบี 2 (vitamin B 2) วิตามินซี (vitamin C) กรดอะมิโน (amino acids) หลายชนิด ได้แก่ ไลซีน (lysine) ซีสเทอีน (cysteine) เมไทโอนิน (methionine) และอาร์จินีน (arginine) เกลือแร่ (minerals) ได้แก่ เหล็ก (Fe) โปแตสเซียม (K) ฟอสฟอรัส (P) และแคลเซียม (Ca) ฮอร์โมนพืช ได้แก่ กลุ่มจิบเบอเรลลิน (gibberellins; GA_7, GA_x) กลุ่มไซโทไคนิน

ชนิดซีเอติน (zeatin) ซีเอตินไรโบไซด์ (zeatin riboside) 2iP และกลุ่มออกซินชนิด IAA โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนเนื้อของกล้วยหอมเป็นแหล่งสะสมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินที่สำคัญ (Arditti and Ernst, 1993 อ้างโดย Chugh et al., 2009) ซึ่งจะยับยั้งการเจริญเติบโตในระยะเริ่มต้น แต่หลังจากนั้นจะส่งผลกระตุ้นกระบวนการเปลี่ยนสภาพ (differentiation) และการเจริญเติบโตของส่วนยอด นอกจากนี้กล้วยที่อยู่ในระยะสุกห่ามจะมีไซโทไคนินที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งเหมาะสำหรับการนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ (Kusumoto and Furukawa, 1977) นอกจากนี้เนื้อกล้วยสามารถช่วยควบคุมระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเพาะเลี้ยงที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยความร้อนจากไอน้ำ (autoclave) ให้คงที่อีกด้วย (Gnasekaran et al., 2010) อย่างไรก็ตามการฆ่าเชื้อโดยความร้อนจากไอน้ำจะส่งผลให้สารบางชนิดสลายตัว เช่น วิตามินซี ฮอร์โมนพืชกลุ่มจิบเบอเรลลิน และกลุ่มออกซินชนิด IAA ฯลฯ (คำนูญ, 2542; สมพร, 2549)

1.2.3.2 มันฝรั่ง ในมันฝรั่งมีสารโพลีอะมีน (polyamine) และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวะสังเคราะห์ (biosynthetic enzyme) กระจายอยู่ในส่วนต่างๆ ของลำต้นใต้ดิน สารเหล่านี้มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยเฉพาะการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิค (nucleic acid) ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) (Kumar and Rajam, 2005) และเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเอ็มบริโอเจนเนซิส (embryogenesis) อีกด้วย (Kong et al., 1999) นอกจากนี้มันฝรั่งยังประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน วิตามินหลายชนิด สารพวกสเตียรอยด์ และสารประกอบฟีนอล (Islam et al., 2003)

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

เมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กเหมือนฝุ่นผงและมีน้ำหนักน้อย เนื่องจากไม่มีเอนโดสเปิร์ม มีเฉพาะเอ็มบริโอ (embryo) จึงจัดเป็นเมล็ดชนิดที่ไม่มีเนื้อเอนโดสเปิร์ม (exalbuminous seed) ดังนั้นการงอกตามธรรมชาติของเมล็ดกล้วยไม้ต้องอาศัยเชื้อราจำพวกไมคอร์ไรซา (mychorrhiza) ในสกุล *Rhizoctonia* ซึ่งอาศัยอยู่ตามรากกล้วยไม้ (ระพี, 2535) ทำให้โอกาสในการเจริญเติบโตค่อนข้างต่ำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เพื่อเพิ่มจำนวนต้นให้ได้ปริมาณมากภายในระยะเวลาสั้น นิยมชักนำให้เกิดต้นผ่านแคลลัส โดยชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนต่างๆ เช่น ปลายราก (Chen and Chang, 2000) โพรโทคอร์ม (protocorm) (Chen et al., 2000; Lin et al., 2000; Lee and Lee, 2003; Zhao et al., 2008) ปลายยอด (Tokuhara and Mill, 2001; Jheng et al., 2006; Roy et al., 2007)

ตาดอก (Meesawat and Kanchanapoom, 2002) โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (protocorm-like bodies; PLBs) (Huan et al., 2004) เมล็ด (Hong et al., 2008) ใบ (Janarthanam and Seshadri, 2008) เป็นต้น จากนั้นชักนำแคลลัสให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้และต้นตามลำดับ ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีรายงานการศึกษาไว้ ดังนี้

2.1 การชักนำแคลลัส

แคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์พาเรงคิมา (parenchyma cell) ที่ยังไม่กำหนดทิศทางการเจริญหรือเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะใด ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้จากชิ้นส่วนต่างๆ เช่น ปลายราก ลำต้น ใบ เมล็ด ฯลฯ โดยขึ้นกับสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารเคมีอื่นๆ ที่เติมลงในอาหาร ซึ่งก่อนเกิดการสร้างแคลลัสจำเป็นต้องเกิดกระบวนการดีดิฟเฟอเรนทิเอชัน (dedifferentiation) ของชิ้นส่วนพืช ทำให้เซลล์ที่โตเต็มที่แล้วสามารถเปลี่ยนจากระยะเต็มวัยไปเป็นระยะอ่อนวัย เรียกว่า การเกิดรีจูเวเนชัน (rejuvenation) หลังจากนั้นตามด้วยการแบ่งเซลล์ขึ้นใหม่มีลักษณะพองฟู

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการชักนำแคลลัส เช่น กล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Oncidium* สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนปลายราก โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด 2,4-D ร่วมกับ TDZ (Chen and Chang, 2000) หรือการทดลองในกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* โดย Chen และคณะ (2000) สามารถชักนำแคลลัสจากโพรโทคอร์ม หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0 - 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0 - 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในกล้วยไม้ *Pleione formosana* Hayata พบว่าสามารถชักนำแคลลัสจากโพรโทคอร์ม เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 - 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0 - 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Lu, 2004) นอกจากนี้ในกล้วยไม้เอื้องคำ (*Dendrobium chrysotoxum* Lindl.) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากปลายยอด โดยเพาะเลี้ยงปลายยอดบนอาหารสูตรดัดแปลง KC ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ หรือ BAP ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ เช่นกัน (Roy et al., 2007) รวมทั้งการทดลองของ Huan และคณะ (2004) พบว่ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Cymbidium* สามารถชักนำแคลลัสจากโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง VW ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมา Janarthanam และ Seshadri (2008) ศึกษาในกล้วยไม้วานิลา (*Vanilla planifolia* Andr.) พบว่าสามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร

สังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์

สำหรับการชักนำแคลลัสของกล้วยไม้รองเท้านารี มีรายงานการศึกษาในกล้วยไม้รองเท้านารีเขตอบอุ่น เช่น กล้วยไม้ชนิด *Cypripedium formosanum* สามารถชักนำแคลลัสจากโพรโทคอร์มบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 4.54 ไมโครโมลาร์ (Lee and Lee, 2003) ส่วนการทดลองในรองเท้านารีเขตร้อน พบว่าการศึกษาส่วนใหญ่จะนิยมใช้กล้วยไม้รองเท้านารีเขตร้อนสายพันธุ์ลูกผสม เช่น รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum callosum* ‘Oakhi’ x *Paphiopedilum lawrenceanum* ‘Tradition’ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากโพรโทคอร์มบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Lin et al., 2000) ต่อมา Hong และคณะ (2008) ทดลองในกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสมเขตร้อน *Paphiopedilum lawrenceanum* var. *alba* x *Paphiopedilum maudiae* พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 22.60 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 4.54 ไมโครโมลาร์ อย่างไรก็ตามอัตราการเกิดแคลลัสค่อนข้างต่ำและการเจริญเติบโตของแคลลัสค่อนข้างช้า และจากการทดลองของ Lin และคณะ (2000) พบว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของลำต้น ปลายราก และใบของกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum callosum* ‘Oakhi’ x *Paphiopedilum lawrenceanum* ‘Tradition’ ซึ่งการชักนำแคลลัสยังเป็นปัญหาสำคัญของการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.2 การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้และต้นใหม่จากแคลลัส

โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ คือ เอ็มบริโอที่เกิดจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อร่างกาย (somatic cell) เรียกอีกอย่างว่า โซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) โดยเกิดจากกระบวนการโซมาติก-เอ็มบริโอเจนเนซิส (somatic embryogenesis) สามารถเกิดได้ 2 แบบ คือ

2.2.1 โซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสแบบทางตรง (direct somatic embryogenesis) โซมาติกเอ็มบริโอสามารถเกิดขึ้นโดยตรงจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง ไม่ผ่านขั้นตอนการเกิดแคลลัส

2.2.2 โซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสแบบทางอ้อม (indirect somatic embryogenesis) โซมาติกเอ็มบริโอที่เกิดจากเซลล์ของแคลลัสที่มีความพร้อมและสามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน

อย่างรวดเร็วเพื่อเจริญไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ โดยกระบวนการเกิดนี้ต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของออกซิน ไซโทไคนิน และน้ำตาล

การชักนำให้เกิดต้นโดยผ่านขั้นตอนการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ประสบความสำเร็จในกล้วยไม้หลายชนิด เช่น กล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Oncidium* สามารถชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นได้ โดยผ่านขั้นตอนของโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิส หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (Chen and Chang, 2000) หรือการทดลองในกล้วยไม้ *Phalaenopsis* Richard Shaffer 'Santa Cruz' แคลลัสสามารถเจริญเติบโตไปเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าวปริมาตร 200 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยไม่เติมน้ำตาลซูโครส (Ishii et al., 1998) และเช่นเดียวกับการทดลองในกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* โดย Chen และคณะ (2000) แคลลัสสามารถเจริญไปเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้และต้นใหม่ตามลำดับ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรืออาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 - 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในกล้วยไม้ *Pleione formosana* Hayata พบว่าแคลลัสสามารถเจริญเติบโตไปเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นย้ายมาเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อชักนำให้เกิดรากและเจริญเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ (Lu, 2004) เช่นเดียวกับกล้วยไม้ *Epidendrum radicans* พบว่าสามารถชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ และเจริญเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ หลังจากการเพาะเลี้ยงนานประมาณ 2 เดือน (Chen et al., 2002) นอกจากนี้มีรายงานการชักนำต้นจากแคลลัสของกล้วยไม้เอื้องดอกมะลิหรือหวายตะมอย (*Dendrobium crumenatum* Sw.) โดยผ่านขั้นตอนของโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสและออร์แกนโนเจเนซิส (organogenesis) บนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ที่เติม NAA ร่วมกับ BA (Meesawat and Kanchanapoom, 2002) และในกล้วยไม้เอื้องคำน้อยหรือแววมยุรา (*D. fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk.f.) สามารถชักนำแคลลัสบนอาหารสูตรดัดแปลง KC ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นแคลลัสเจริญไปเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ และต้นตามลำดับ บนอาหารสูตรดัดแปลง KC ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (Roy and Banerjee, 2003) เช่นเดียวกับกล้วยไม้เอื้องคำ (*D. chrysotoxum* Lindl.) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง KC ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ตามลำดับ และเจริญต่อไปเป็นต้นได้ (Roy et al., 2007) รวมทั้งการทดลองของ Huan และคณะ (2004) พบว่ากล้วยไม้

ลูกผสมสกุล *Cymbidium* สามารถชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสได้ โดยเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรดัดแปลง VW ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อเจริญไปเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้และต้นใหม่ที่สมบูรณ์ตามลำดับ

สำหรับการชักนำให้เกิดต้นโดยผ่านโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ในกล้วยไม้รองเท้านารียังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก จึงมีรายงานการศึกษาน้อยมาก เช่น กล้วยไม้รองเท้านารีเขตอบอุ่นชนิด *Cypripedium formosanum* สามารถชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นต่อไปได้ (Lee and Lee, 2003) ส่วนการทดลองในกล้วยไม้รองเท้านารีเขตร้อน เช่น กล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum callosum* 'Oakhi' x *Paphiopedilum lawrenceanum* 'Tradition' แคลลัสสามารถเจริญไปเป็นโพรโท-คอร์มไลค์บอดี้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ให้เกิดต้นต่อไป (Lin et al., 2000) อย่างไรก็ตามความสามารถในการเจริญไปเป็นต้นใหม่ค่อนข้างต่ำ ต่อมา Hong และคณะ (2008) ประสบความสำเร็จในกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสมเขตร้อน *Paphiopedilum lawrenceanum* var. *alba* x *Paphiopedilum maudiae* พบว่าแคลลัสสามารถเจริญไปเป็นโพรโทคอร์ม-ไลค์บอดี้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 26.85 ไมโครโมลาร์ แล้วเจริญเป็นต้นต่อไป

นอกจากนี้มีรายงานเกี่ยวกับการชักนำการเกิดเป็นยอดรวมในกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum philippinense* x *P.* Susan Booth (Huang et al., 2001) และรองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum philippinense* (Chen et al., 2004) แต่ใช้เวลาค่อนข้างนาน

อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาในรองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.) โดยอิศราภรณ์ (2548) และฮารีซะห์ (2549) พบว่าสามารถชักนำแคลลัสจากเมล็ดบนอาหารสูตรดัดแปลง VW ที่เติม 2,4-D และ TDZ ร่วมกับไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของแคลลัสต่อไปจนได้ต้นใหม่ที่สมบูรณ์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาแผนการเจริญของแคลลัสกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล
2. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมที่มีผลต่อการสร้างโพรโทคอร์มไลค์บอดี้จากแคลลัสกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล
3. ศึกษาแนวโน้มการเกิดเป็นต้นใหม่ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล

บทที่ 2
วิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 พืชที่ใช้ทดลอง

กล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.) โดยใช้เมล็ดจากฝักที่มีอายุฝักประมาณ 6-7 เดือน ซึ่งได้จากการผสมเกสรตัวเอง (self-pollination) ฝักมีสีน้ำตาลอ่อนและมีลักษณะค่อนข้างสมบูรณ์

1.2 สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการศึกษาเบื้องต้น (preliminary studies) พบว่าอาหารที่ใช้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล มี 2 สูตรอาหารหลัก คือ อาหารสูตรดัดแปลง VW (pH 5.3) ซึ่งใช้ในขั้นตอนการชักนำแคลลัสและการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ ส่วนอาหารสูตรดัดแปลง MS (pH 5.8) ใช้ในขั้นตอนการเจริญของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ไปเป็นต้น โดยปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นอร์มัล จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

1.3 สารเคมี

1.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

- เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์
- คลอรอกซ์ และทวีน 20

1.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารสูตรดัดแปลง VW (ตารางที่ 1 ภาคผนวก ก แสดงองค์ประกอบของอาหารสูตร VW)
- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารสูตรดัดแปลง MS (ตารางที่ 2 ภาคผนวก ก แสดงองค์ประกอบของอาหารสูตร MS)
- สารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร คือ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นอร์มัล
- สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน คือ 2,4-D (บริษัท Sigma) และ NAA (บริษัท Fluka) และสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน คือ TDZ (บริษัท Sigma)
- น้ำตาลซูโครส
- ไฟตาเจล (Phytagel; บริษัท Sigma)
- วุ้น (ตรานางเงือก)
- ผงถ่านกัมมันต์ (บริษัท Riedel-de Haën)
- มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.)
- กล้วยหอมทอง (*Musa* (AAA group) "Kluai Hom Thong") อยู่ในระยะที่เปลือกมีสีเขียวอมเหลือง

1.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบความมีชีวิต

- TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride; บริษัท Merck)

1.3.4 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

1.3.4.1 สารเคมีสำหรับวิธีพาราฟิน ประกอบด้วย

- acetic acid
- butyl alcohol
- ethyl alcohol
- formaldehyde
- liquid paraffin
- paraplast plus

1.3.4.2 สารเคมีสำหรับการย้อมสี ประกอบด้วย

- absolute ethyl alcohol
- acidulate water
- ammomium hydroxide
- cloved oil
- Delafield's hematoxylin
- ethyl alcohol
- fast green
- Hi-mo
- lithium carbonate
- picric acid
- safranin O
- xylene

1.3.4.3 สารเคมีสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) ประกอบด้วย

- formalin
- acetic acid
- absolute ethyl alcohol
- triton x-100
- $NaH_2PO_4.2H_2O$
- Na_2HPO_4

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Ohaus รุ่น SPS 601 และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น Drogon 303
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ยี่ห้อ Orion รุ่น SA 520

- เตาอบไมโครเวฟ ยี่ห้อ Best Plus รุ่น MO-140
- หม้อนึ่งความดันไอ ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-320
- เตากวนแม่เหล็กไฟฟ้า ยี่ห้อ Framo-Gerätetechnik รุ่น M 21/1
- กระบอกฉีดยา (syringe)

2.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- ปากคีบ
- มีดผ่าตัด
- จานเพาะเลี้ยงที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
- ตะเกียงแก๊ส
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air-flow cabinet) ยี่ห้อ ISSCO รุ่น ER-7800
- ตู้อบเครื่องแก้ว ยี่ห้อ Termaks รุ่น T 1119 UV
- เครื่องเขย่าเลี้ยงด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที
- เครื่องวัดความเข้มแสง ยี่ห้อ Microvolt Integrator รุ่น MV 2

2.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบความมีชีวิต

- หลอดทดลอง
- กระดาษอะลูมิเนียม
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ยี่ห้อ Zeiss รุ่น Stemi DV 4

2.1.4 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ประกอบด้วย กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ จานเพาะเลี้ยง แท่งแก้วคน บีกเกอร์ ปิเปตขนาดต่างๆ ขวดปรับปริมาตร และขวดแก้วเพาะเลี้ยง

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

- เครื่องไมโครโทม (microtome) ยี่ห้อ AO รุ่น 820 SPENCER
- เครื่องอุ่นสไลด์ ยี่ห้อ Kunz instruments รุ่น HP 3
- อ่างลอยเนื้อเยื่อ (floating bath)
- ตู้อบแห้ง ยี่ห้อ Memmert

- ตู้ดูดไอสารเคมี (flume hood) ยี่ห้อ Flexlab รุ่น SH-150 และยี่ห้อ Astecair รุ่น 3000L
- เครื่องฝังเนื้อเยื่อ (paraffin embedding center) ยี่ห้อ Leica
- ตู้หลอมพาราฟิน ยี่ห้อ Gallenkamp
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ยี่ห้อ Olympus รุ่น CH 30
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ยี่ห้อ Olympus รุ่น BX 51 พร้อมกล้องถ่ายรูป ยี่ห้อ Olympus รุ่น DP 71
- กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800 LV และยี่ห้อ FEI รุ่น Quanta 400
- กล้องถ่ายรูป ยี่ห้อ Panasonic รุ่น DMC-FZ 18
- กล่องเก็บสไลด์
- กล่องพักสไลด์
- บล็อกพลาสติก (embedding ring)
- กระทงโลหะ (mold)
- อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ขวดเก็บตัวอย่าง แผ่นสไลด์ กระจกปิดสไลด์ พู่กัน เข็มเขี่ย มีดไมโครโทม ปากคีบ คอปปลิ้นจาร์ (coplin jar)

วิธีการศึกษา

การศึกษาแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ

ก. ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ข. ขั้นตอนการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

ก. ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. ขั้นตอนการเตรียมเพาะเมล็ด (pre-culture) ก่อนทำการทดลอง

นำฝักของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลอายุประมาณ 6 - 7 เดือน ล้างน้ำประปาให้สะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อ โดยจุ่มฝักกล้วยไม้ลงในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นำไปผ่านไฟจนเปลวไฟดับ จากนั้นแช่คลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่าน

การนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 - 3 ครั้ง หลังจากนั้นใช้มีดตัดหัวท้ายออกและผ่าฝักให้เปิดออก เขี่ยเมล็ดลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วคงที่ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 สัปดาห์ บางส่วนของเมล็ดกล้วยไม้ที่เหลืออยู่ในฝักจะนำไปทดสอบความมีชีวิต โดยวิธี TTC

2. ขั้นตอนการตรวจสอบความมีชีวิตด้วยวิธี TTC

วิธี TTC เป็นการทดสอบเพื่อหาความมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้ โดยใช้สาร TTC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำเมล็ดที่เหลือจากขั้นตอนการเพาะเมล็ดใส่ลงไปผสมกับสารละลายในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร : 1 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากครบกำหนดเวลา ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่น 2 - 3 ครั้งด้วยวิธีการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 5 นาทีต่อครั้ง แล้วนำเมล็ดไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ เพื่อนับการติดสีของเมล็ด ซึ่งเมล็ดที่ติดสีแดง คือ เมล็ดที่มีชีวิต หลังจากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ด ซึ่งเป็นค่าประมาณความสามารถในการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่ใช้ในการทดลอง คำนวณดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่ติดสีแดง}}{\text{จำนวนเมล็ดที่ติดสีแดงและไม่ติดสี}} \times 100$$

3. ขั้นตอนการทดลองจะแบ่งตามระยะการเจริญเติบโต ดังนี้

ระยะที่ 1 การชักนำแคลลัส (callus induction)

ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน คือ 2,4-D ความเข้มข้น 0, 1, 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน คือ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเกิดแคลลัส

นำเมล็ดที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเพาะเมล็ดมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิด 2,4-D ความเข้มข้น 0, 1, 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินชนิด TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปรับ pH ประมาณ 5.3 โดยเพาะเลี้ยงในขวด 2 ออนซ์ และวางเลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน บันทึกผลการทดลองทุกๆ 1 เดือน โดยบันทึกเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทคอร์ม เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำการทดลองชุดการทดลองละ 10 ซ้ำ คำนวณจากสูตรต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่เป็นแคลลัส}}{\text{จำนวนเมล็ดที่มีชีวิตทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงในขวด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทคอร์ม} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่เป็นโพรโทคอร์ม}}{\text{จำนวนเมล็ดที่มีชีวิตทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงในขวด}} \times 100$$

ระยะที่ 2 การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (protocrom-like body formation)

ศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสปริมาณ 0, 10, 20, 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมและไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้

การทดลองที่มีน้ำตาลซูโครสร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้นจะนำแคลลัสที่มีน้ำหนักประมาณ 8 มิลลิกรัมของน้ำหนักสด ย้ายมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข้อมูลจากการทดลองเบื้องต้น) ผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 0, 10, 20, 30 กรัมต่อลิตร โดยปรับ pH ประมาณ 5.3 วางเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสง 23 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุก 1 เดือน เป็นเวลา 4 เดือน บันทึกผลการทดลองดังนี้ น้ำหนักสดรวมของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้กับแคลลัสที่เพิ่มขึ้น (คำนวณตามสูตรข้างล่าง) และเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (คำนวณตามสูตรข้างล่าง) เปรียบเทียบกันในน้ำตาลซูโครสแต่ละความเข้มข้น โดยทำการทดลองชุดการทดลองละ 7 ซ้ำ นอกจากนี้เก็บตัวอย่างไว้สำหรับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

ส่วนการทดลองที่เติมน้ำตาลซูโครส แต่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต จะทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ไม่มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต

น้ำหนักสดรวมของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้กับแคลลัสที่เพิ่มขึ้น

= น้ำหนักโพรโทคอร์มไลค์บอดี้กับแคลลัสที่เกิดขึ้น - น้ำหนักเริ่มต้นของแคลลัส

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้} = \frac{\text{จำนวนขวดที่เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้}}{\text{จำนวนขวดทั้งหมดที่เพาะเลี้ยง}} \times 100$$

ระยะที่ 3 การเจริญของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้เป็นต้น (plantlet regeneration)

ศึกษาผลของสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติคือ มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) ปริมาณ 0, 20, 50 กรัมต่อลิตร และกล้วยหอมทอง (*Musa* (AAA group) "Kluai Hom Thong") ปริมาณ 0, 20, 50 กรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้เป็นต้น โดยนำกล้วยหอมทองและมันฝรั่งต้มสุกมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น

นำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้น้ำหนักเริ่มต้น 20 มิลลิกรัม (ระยะที่มีความยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร) ย้ายมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 6.8 กรัมต่อลิตร ร่วมกับมันฝรั่งบด ปริมาณ 0, 20, 50 กรัมต่อลิตร หรือกล้วยหอมบดปริมาณ 0, 20, 50 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ประมาณ 5.8 วางเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสง 23 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และบันทึกผลการทดลองเป็นจำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อน้ำหนักโพรโทคอร์มไลค์บอดี้เริ่มต้นและนับจำนวนของราก ทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 4 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและปริมาณของสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติ โดยทำการทดลองชุดการทดลองละ 10 ซ้ำ พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างสำหรับศึกษาและติดตามการเจริญทางเนื้อเยื่อวิทยา

ข. ขั้นตอนการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (histological observations)

ศึกษาแบบแผนการเจริญและโครงสร้างการเจริญแต่ละระยะต่างๆ โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 1 เดือน จนได้ต้น โดยเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

1. ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

นำตัวอย่างของแคลลัส โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ และต้นที่ชักนำได้จากสูตรอาหารแต่ละขั้นตอนข้างต้นมาแช่ในน้ำยาคงสภาพสูตร FAA II (formalin-acetic-alcohol) เป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปดึงน้ำออกจากเซลล์ หลังจากนั้นเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีพาราฟิน (paraffin method) (Johansen, 1964; Ruzin, 1999) (ภาคผนวก ข) โดยฝังชิ้นส่วนตัวอย่างในพาราฟิน และตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโทม ที่ความหนา 6 - 8 ไมโครเมตร ซึ่งตัวอย่างจะย้อมด้วยสีต่างๆ ดังนี้

- วิธี Delafield's hematoxylin and safranin staining เพื่อศึกษาโครงสร้างทั่วไปตลอดจนสภาวะการเป็นเนื้อเยื่อเจริญ หรือโครงสร้างการเจริญในระยะต่างๆ (Johansen, 1964; Ruzin,1999) (ภาคผนวก ข)
- วิธี safranin and fast green staining เพื่อศึกษาการเชื่อมต่อของกลุ่มท่อลำเลียง (Ruzin, 1999) (ภาคผนวก ข)

2. ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (Dashek, 2000)

เพื่อศึกษาโครงสร้างภายนอกของเนื้อเยื่อและอวัยวะ (ภาคผนวก ข)

ค. ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลอง

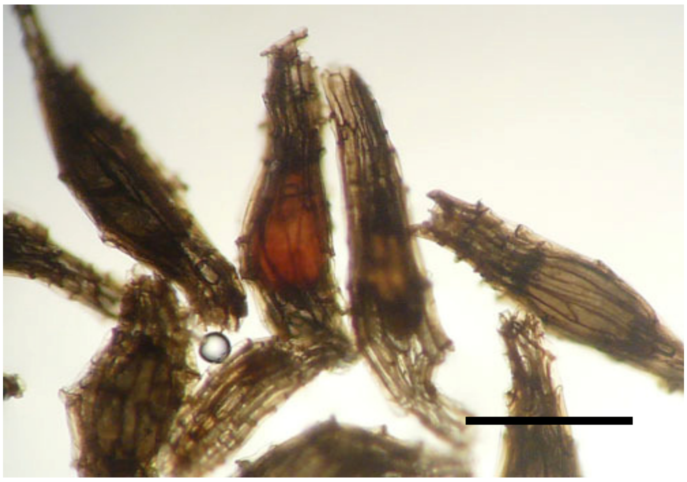
ทำการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และ Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยใช้โปรแกรม SPSS

บทที่ 3
ผลการทดลอง

1. การทดสอบความมีชีวิตของเมล็ด

จากการศึกษาความมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลจากฝักอายุประมาณ 6 เดือนหลังจากการผสมเกสรตัวเอง ฝักมีลักษณะสีน้ำตาลอมเขียว (ภาพที่ 3) ซึ่งการศึกษาความมีชีวิตของเมล็ดทดสอบโดยใช้สาร TTC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมล็ดที่ใช้ในการทดลองมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตประมาณ 27 เปอร์เซ็นต์ ทำให้สามารถคาดคะเนได้ว่าเมล็ดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีความสามารถในการงอกประมาณ 27 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน ซึ่งเมล็ดมีลักษณะเรียวยาว ปลายแหลมและเอ็มบริโอมีรูปร่างยาวรี โดยเมล็ดกล้วยไม้ที่สมบูรณ์ บริเวณตรงกลางของเมล็ดจะป่องและเอ็มบริโอของเมล็ดที่มีชีวิตมีสีแดง (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 3 แสดงลักษณะฝักกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลอายุประมาณ 6 เดือน (Bar = 1.5 เซนติเมตร)



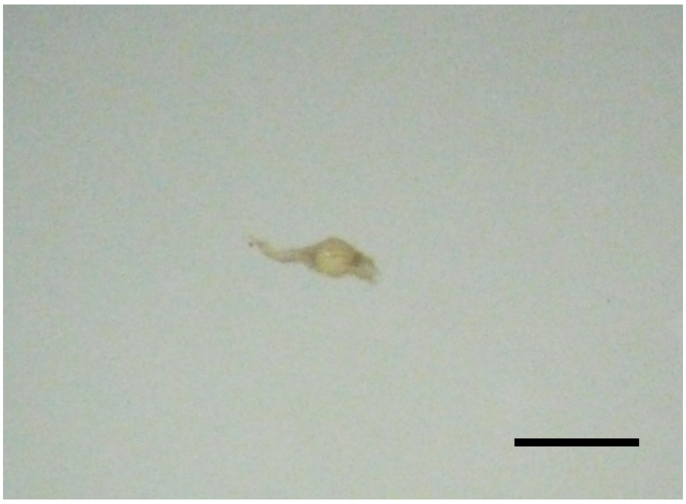
ภาพที่ 4 แสดงลักษณะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลที่มีชีวิต จากฝักอายุประมาณ 6 เดือน เห็นเอ็มบริโอติดสีแดง (Bar = 250 ไมโครเมตร)

2. ขั้นตอนการชักนำแคลลัส

จากการนำเมล็ดที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเพาะเมล็ดในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยวางไว้ในที่มืด บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วคงที่ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ประมาณ 1 สัปดาห์ มาเพาะบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด 2,4-D ความเข้มข้น 0, 1, 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า

หลังการเพาะเมล็ด 1 เดือน

เมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ทุกชุดการทดลองมีลักษณะการเจริญค่อนข้างคล้ายคลึงกันคือ ไม่มีการเจริญของเมล็ดมากนัก เมล็ดยังคงมีลักษณะรูปร่างยาวรี บริเวณตรงกลางเมล็ดจะป่อง และเริ่มมีการพองของเมล็ดบ้างเล็กน้อย (ภาพที่ 5)

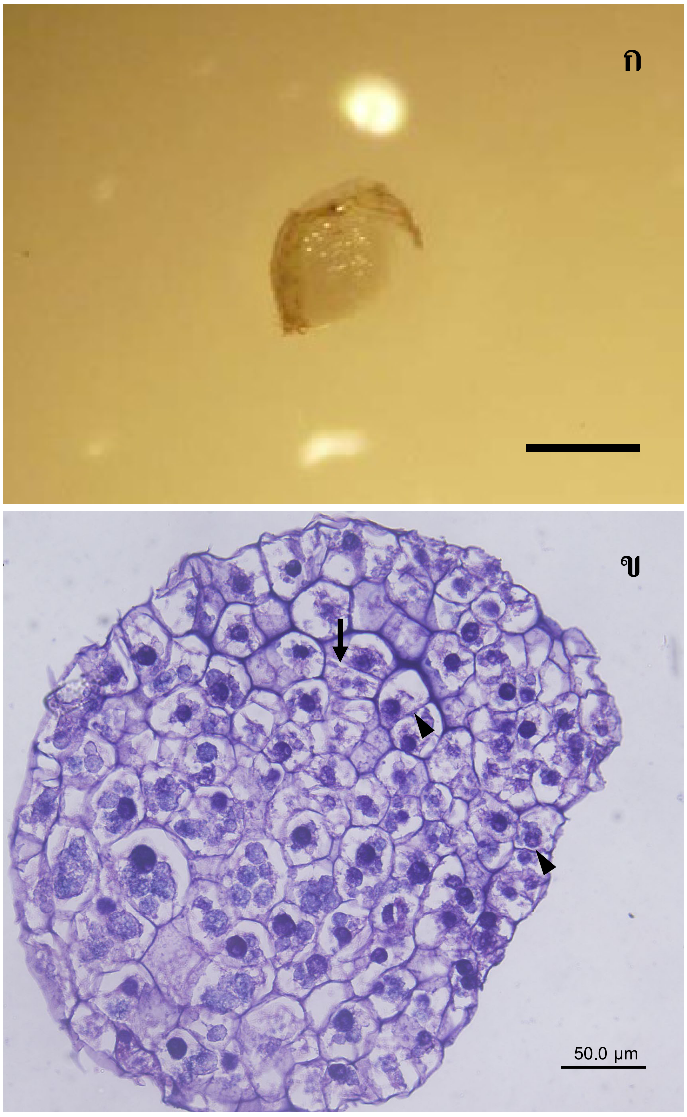


ภาพที่ 5 แสดงลักษณะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลที่เริ่มเห็นการพอง หลังจากการเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW นาน 1 เดือน (Bar = 500 ไมโครเมตร)

หลังการเพาะเมล็ด 2 เดือน

เมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ มีการเจริญของเมล็ดเพิ่มมากขึ้นในทุกชุดการทดลองนั่นคือ เมล็ดมีลักษณะรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป เอ็มบริโอมีการขยายขนาดเพิ่มขึ้น โดยเปลี่ยนแปลงจากลักษณะรูปร่างยาวรีไปเป็นรูปร่างกลม สีเหลืองอ่อนและหลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด (ภาพที่ 6 ก)

นอกจากนี้การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าเอ็มบริโอจากเมล็ดกล้วยไม้ในระยะนี้มีส่วนที่เกิดกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic activity) โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับการขยายตัวและแบ่งตัวของเซลล์ สังเกตจากบริเวณนี้มีเซลล์ที่กำลังแบ่งเซลล์อยู่จำนวนมาก โดยเฉพาะบริเวณส่วนปลาย (apical end) นอกจากนี้เซลล์ชั้นในของเอ็มบริโอมีระนาบการแบ่งเซลล์ทั้งแบบ anticlinal division (ภาพที่ 6 ข; หัวลูกศร) คือ ผนังเซลล์ใหม่จะตั้งฉากกับผิวเซลล์ที่ใกล้ที่สุด และ periclinal division (ภาพที่ 6 ข; ลูกศรชี้) คือ ผนังเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นจะขนานกับผิวเซลล์ที่ใกล้ที่สุด ส่วนเซลล์ผิวชั้นนอกสุดมีระนาบการแบ่งเซลล์แบบตั้งฉากกับผิวเซลล์ (ภาพที่ 6 ข; หัวลูกศร)



ภาพที่ 6 แสดงลักษณะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากการเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW นาน 2 เดือน (ก) เอ็มบริโอขยายขนาดเพิ่มขึ้น (Bar = 300 ไมโครเมตร) (ข) มีการแบ่งเซลล์ทั้งแบบตั้งฉากกับผิวเซลล์ (หัวลูกศร) และแบ่งตัวในแนวขนานกับผิวเซลล์ (ลูกศรชี้) (Bar = 50 ไมโครเมตร)

หลังการเพาะเมล็ด 3 เดือน

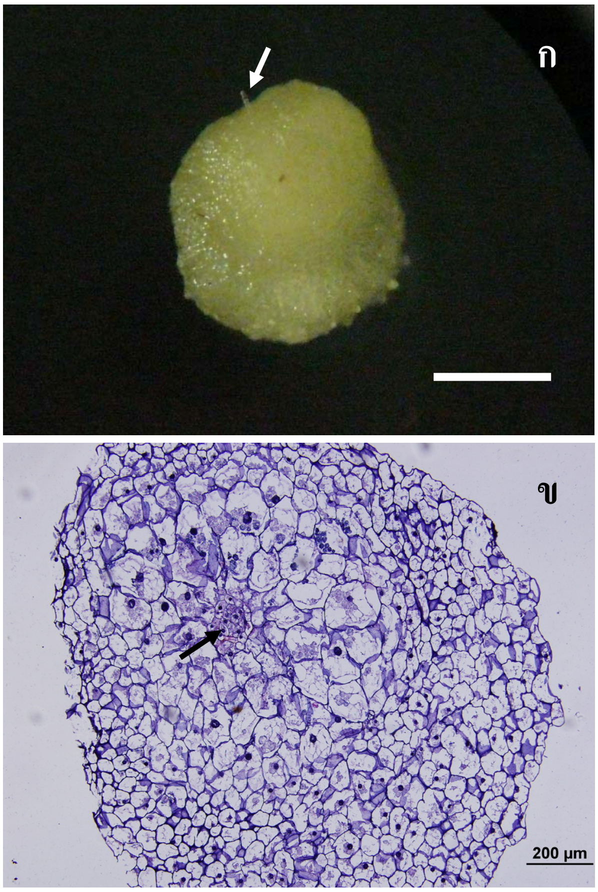
เมล็ดที่เพาะบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมเฉพาะ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 2) สามารถชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มได้ดีที่สุดประมาณ 45.41 ± 4.59 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) โดยโพรโทคอร์มมีลักษณะเป็นก้อนกลมสีขาวและปลายยอดแหลม แต่เมื่อย้ายมาวางเลี้ยงในสภาพมีแสงจะเกิดการเปลี่ยนสีของโพรโทคอร์มจากสีขาวไปเป็นสีเขียว (ภาพที่ 7 ก) ซึ่งบางโพรโทคอร์มเริ่มปรากฏเห็นโครงสร้างคล้ายราก (rhizoid) บริเวณส่วนฐานของโพรโทคอร์ม มีลักษณะเป็นเส้นเล็กๆ (ภาพที่ 7 ก; ลูกศรชี้) นอกจากนี้การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าโพรโทคอร์มมีลักษณะรูปร่างที่จะเจริญไปเป็นส่วนของโครงสร้างรูปโดม (meristematic dome) ซึ่งเซลล์บริเวณโครงสร้างรูปโดมมีลักษณะเป็นเซลล์เจริญ (meristematic cell) คือ เซลล์มีขนาดเล็ก แต่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ (ภาพที่ 7 ข; ลูกศรชี้)

ส่วนชุดการทดลองที่ประกอบด้วยอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 5) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดได้ดีที่สุดประมาณ 2.55 ± 1.21 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรดัดแปลง VW ที่เติม 2,4-D และ TDZ ที่ความเข้มข้นอื่นๆ ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นก้อนสีเหลืองอ่อน เซลล์รวมตัวกันอย่างหลวมๆ หรือเรียกว่า ฟรายเอเบิลแคลลัส (friable callus) (ภาพที่ 8 ก) และจากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าเซลล์ของแคลลัสมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ส่วนแวคคิวโอลมีขนาดเล็กและมีช่องว่างระหว่างเซลล์น้อยมากหรือไม่มีเลย (ภาพที่ 8 ข) นอกจากนี้เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด พบว่าโครงสร้างภายนอกของก้อนแคลลัสมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กอยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน (ภาพที่ 8 ค)

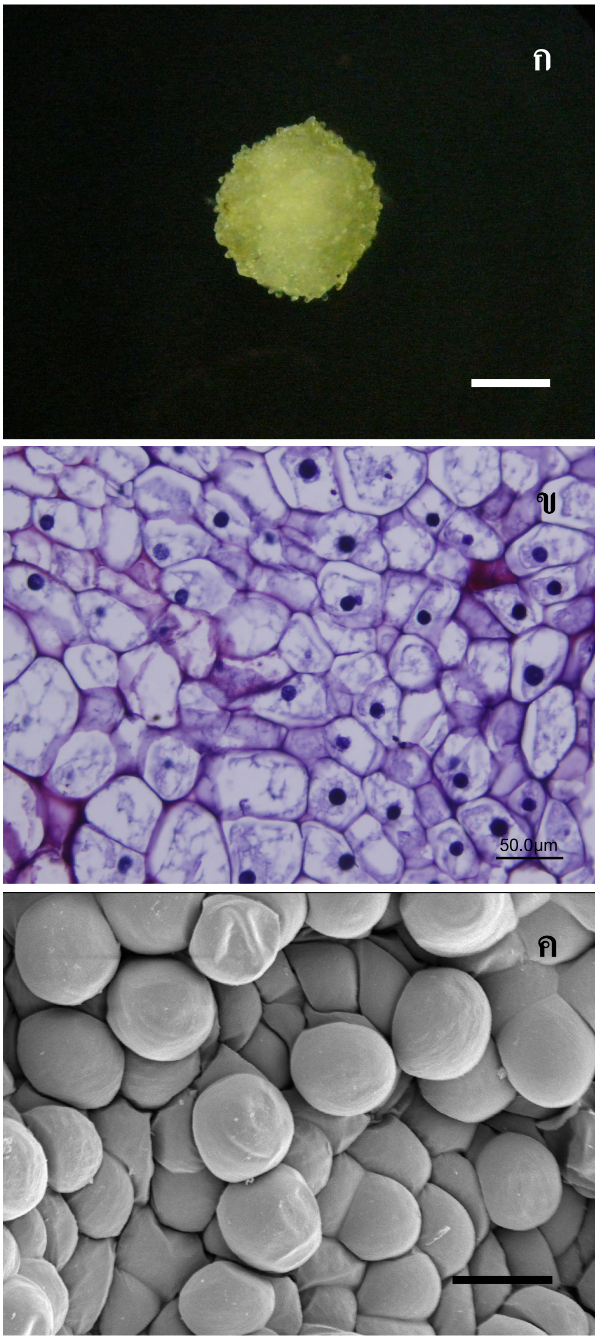
ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทคอร์มของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากการเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ นาน 3 เดือน

ชุดการทดลอง	สารควบคุมการเจริญเติบโต		การเกิดแคลลัส	การเกิดโพรโทคอร์ม
	2,4-D (มก./ล.)	TDZ (มก./ล.)	(เปอร์เซ็นต์ ± S.E.)	(เปอร์เซ็นต์ ± S.E.)
1	0	0	0.00 ± 0.00 c	28.57 ± 5.45 bc
2	1	0	0.00 ± 0.00 c	45.41 ± 4.59 a
3	5	0	0.51 ± 0.51 bc	31.12 ± 5.22 abc
4	0	0.1	0.00 ± 0.00 c	35.71 ± 4.62 abc
5	1	0.1	2.55 ± 1.21 a	22.96 ± 4.69 c
6	5	0.1	2.04 ± 1.17 ab	38.78 ± 4.54 ab
7	0	0.5	0.00 ± 0.00 c	30.10 ± 4.92 bc
8	1	0.5	0.00 ± 0.00 c	28.02 ± 3.66 bc
9	5	0.5	0.00 ± 0.00 c	35.20 ± 5.16 abc

- ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT
- อาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 20 ก./ล., ผงถ่านกัมมันต์ 2 ก./ล., ไฟตาเจล 2 ก./ล.



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะโพรโทคอร์มของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล. นาน 3 เดือน (ก) เริ่มปรากฏโครงสร้างคล้ายรากบริเวณฐานของโพรโทคอร์ม (ลูกศรชี้) (Bar = 1.25 มิลลิเมตร) (ข) เซลล์บริเวณโครงสร้างรูปโดมมีลักษณะเป็นเซลล์เจริญ (ลูกศรชี้) (Bar = 200 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะแคลลัสของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 0.1 มก./ล. นาน 3 เดือน (ก) แคลลัสมีสีเหลืองอ่อน (Bar = 1 มิลลิเมตร) (ข) เซลล์ของแคลลัสมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ และแวคคิวโอลมีขนาดเล็ก (Bar = 50 ไมโครเมตร) (ค) โครงสร้างภายนอกของก้อนแคลลัสมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กอยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน (Bar = 50 ไมโครเมตร)

3. ขั้นตอนการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้

จากการชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ โดยเลี้ยงเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส (น้ำหนักเฉลี่ย 8 มิลลิกรัมของน้ำหนักสดต่อก้อนแคลลัส) บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมและไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 0, 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมเฉพาะสารควบคุมการเจริญเติบโต (ภาพที่ 9 ก) เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและไม่เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ ส่วนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 2) สามารถสร้างโซมาติกเอ็มบริโอหรือโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ได้ดีที่สุด (ภาพที่ 9 ข) คือ 142.86 ± 84.52 มิลลิกรัม (ตารางที่ 2) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ ปริมาณโพรโทคอร์มไลค์บอดี้รองลงมา คือ ในอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร (48.14 ± 31.74 มิลลิกรัม) และ 30 กรัมต่อลิตร (28.00 ± 28.00 มิลลิกรัม) (ตารางที่ 2) โดยโพรโทคอร์มไลค์บอดี้จะมีลักษณะสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 9 ค) และสีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 9 ง) ตามลำดับ ส่วนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 0, 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร แต่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองชนิด พบว่าภายหลังจากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสเป็นระยะเวลาหนึ่ง เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งชิ้นเนื้อเยื่อไม่สามารถเจริญต่อไปและตายในที่สุด (ภาพที่ 10)

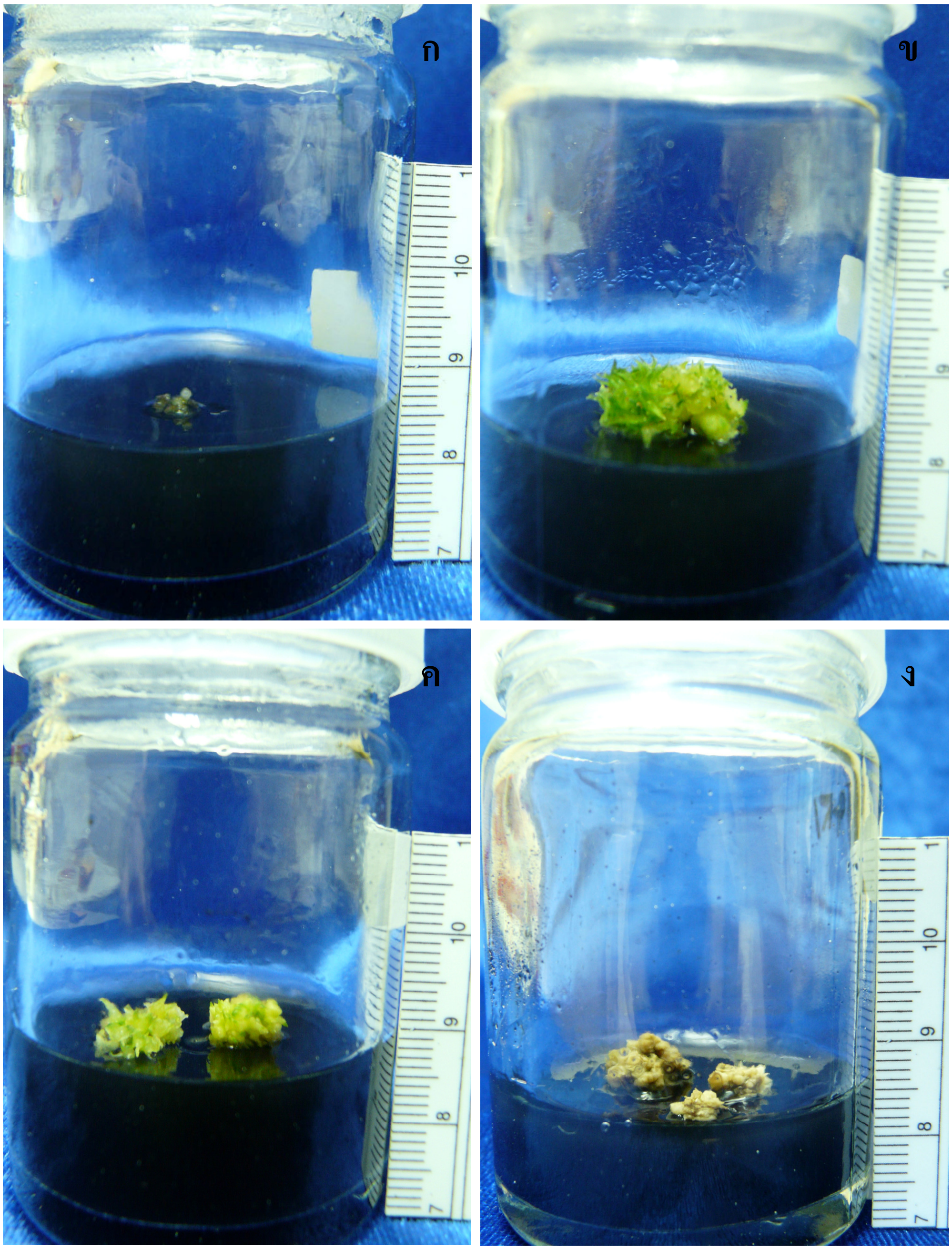
นอกจากนี้การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ พบว่าแคลลัสที่ใช้ชักนำให้เกิดเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์เจริญ ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่จะเจริญไปเป็นกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเอ็มบริโอ (proembryonic mass) หรือโซมาติกเอ็มบริโอระยะก่อนรูปร่างกลม (early globular-shape stage) หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 1 เดือน (ภาพที่ 11 ก; ลูกศรชี้) ซึ่งเจริญมาจากเซลล์ด้านนอกของก้อนแคลลัส (ภาพที่ 11 ข; ลูกศรชี้) เซลล์บริเวณนี้จะมีลักษณะเป็นเซลล์เจริญ โดยเซลล์มีขนาดเล็กและมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของเซลล์ ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ของก้อนแคลลัสเริ่มต้น หลังจากนั้นกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเอ็มบริโอจะแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วเจริญเป็นโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปร่างกลม (globular-shape stage) โดยเซลล์ชั้นเนื้อเยื่อเจริญกำเนิดผิว (protoderm) จะแบ่งตัวในแนวตั้งฉากกับผิว อีกทั้งเซลล์ชั้นนี้จะแสดงแนวขอบเขตของโซมาติกเอ็มบริโออย่างชัดเจน (ภาพที่ 11 ค; แนวหัวลูกศร) ซึ่งเนื้อเยื่อเจริญกำเนิดผิวเป็นเนื้อเยื่อเจริญขั้นแรกที่จะเจริญต่อไปเป็นเซลล์ชั้นนอกสุด (epidermis)

หลังจากนั้นบริเวณส่วนปลายของโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปร่างกลมจะถูกกำหนดขอบเขตแยกออกจากส่วนฐาน โดยการเกิดรอยกด (depression) (ภาพที่ 11 ค; ลูกศรชี้) ซึ่งจะกำหนดขอบเขตของส่วนปลายยอด (shoot apex; SA) (ภาพที่ 11 ค; SA) และจุดกำเนิดใบเลี้ยง (cotyledon primordium; CP) (ภาพที่ 11 ค; CP) หลังจากเกิดรอยกด พบว่าบริเวณปลายยอดและจุดกำเนิดใบเลี้ยงจะเกิดมาจากบริเวณด้านข้างและบริเวณปลายของโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปร่างกลมตามลำดับ ซึ่งเป็นลักษณะการเริ่มเกิดส่วนยอดปลายแหลมเล็ก (protrusion) (ภาพที่ 11 ง) ซึ่งต่อมาจะเจริญเป็นใบเลี้ยง จากนั้นหลังการเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน โซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปร่างกลมจะยืดยาวขึ้นอย่างรวดเร็วเข้าสู่ระยะการสร้างใบเลี้ยง (ภาพที่ 12 ก; ลูกศรชี้) จากการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของโซมาติกเอ็มบริโอระยะนี้ พบว่าใบเลี้ยง (cotyledon; C) จะยืดยาวออก (ภาพที่ 12 ข, 12 ค; C) และเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (shoot apical meristem; SAM) จะนูนขึ้น (ภาพที่ 12 ข, 12 ค; SAM) ขณะเดียวกันจุดกำเนิดใบ (leaf primordium; LP) จะเกิดขึ้นบริเวณด้านข้างของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่นูนขึ้น (ภาพที่ 12 ข, 12 ค; LP) และเจริญอย่างรวดเร็วจนได้เป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่มีอายุประมาณ 3 เดือน (ภาพที่ 13 ก; ลูกศรชี้) ซึ่งจะประกอบด้วยจุดกำเนิดราก (root primordium; RP) (ภาพที่ 13 ข; RP) ใบ (leaf; L) (ภาพที่ 13 ข, 13 ค; L) และเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (ภาพที่ 13 ข, 13 ค; SAM)

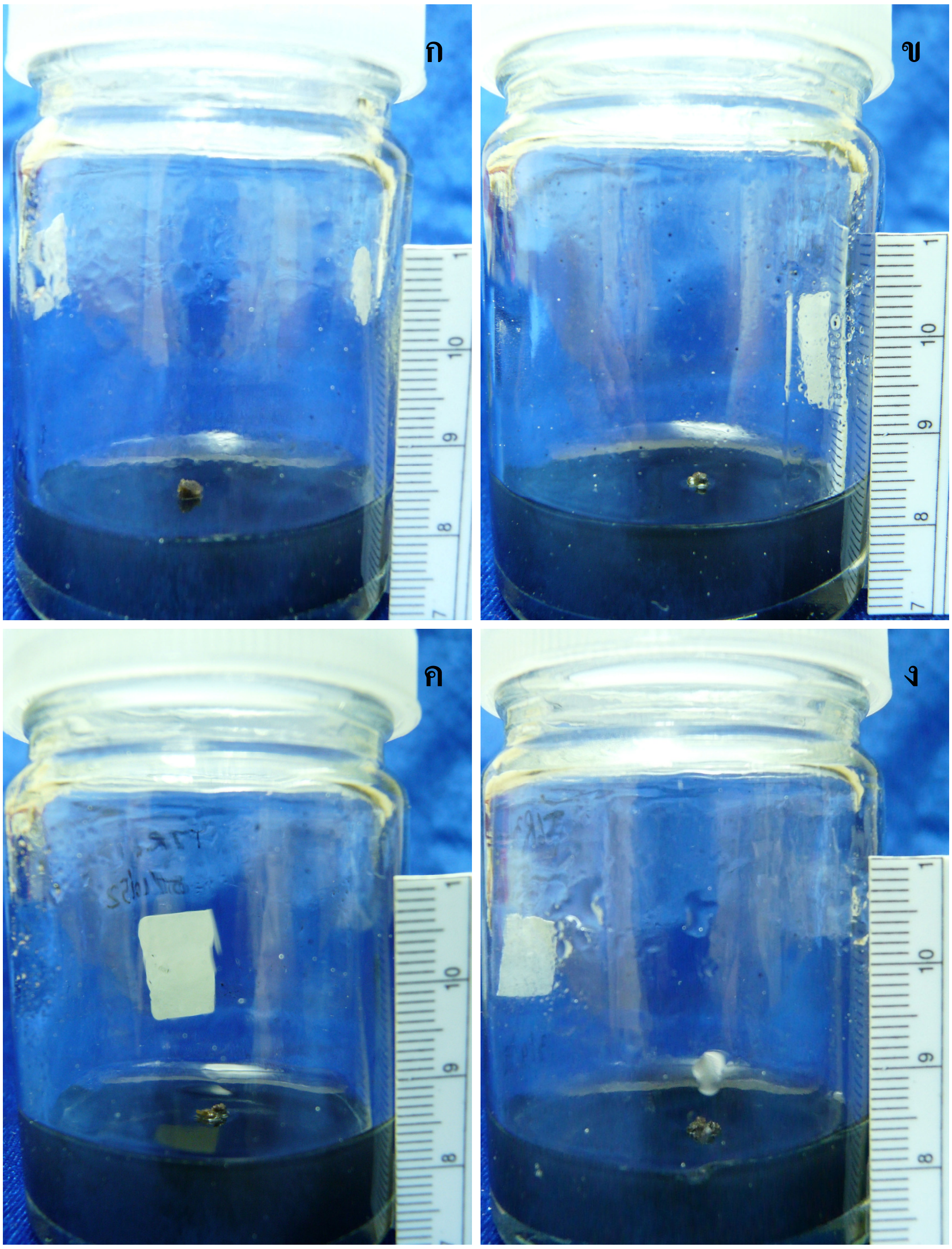
ตารางที่ 2 ผลของน้ำตาลซูโครสและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของแคลลัสกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน

ชุดการทดลอง	สารควบคุมการเจริญเติบโต	น้ำตาลซูโครส (ก./ล.)	น้ำหนักสดของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้* (มิลลิกรัม ± S.E.)	การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (เปอร์เซ็นต์)	หมายเหตุ
1	+	0	0.00 ± 0.00 b	0	สีน้ำตาล**
2	+	10	142.86 ± 84.52 a	57.16	
3	+	20	48.14 ± 31.74 ab	28.58	
4	+	30	28.00 ± 28.00 b	14.29	
5	-	0	0.00 ± 0.00 b	0	สีน้ำตาล**
6	-	10	0.00 ± 0.00 b	0	สีน้ำตาล**
7	-	20	0.00 ± 0.00 b	0	สีน้ำตาล**
8	-	30	0.00 ± 0.00 b	0	สีน้ำตาล**

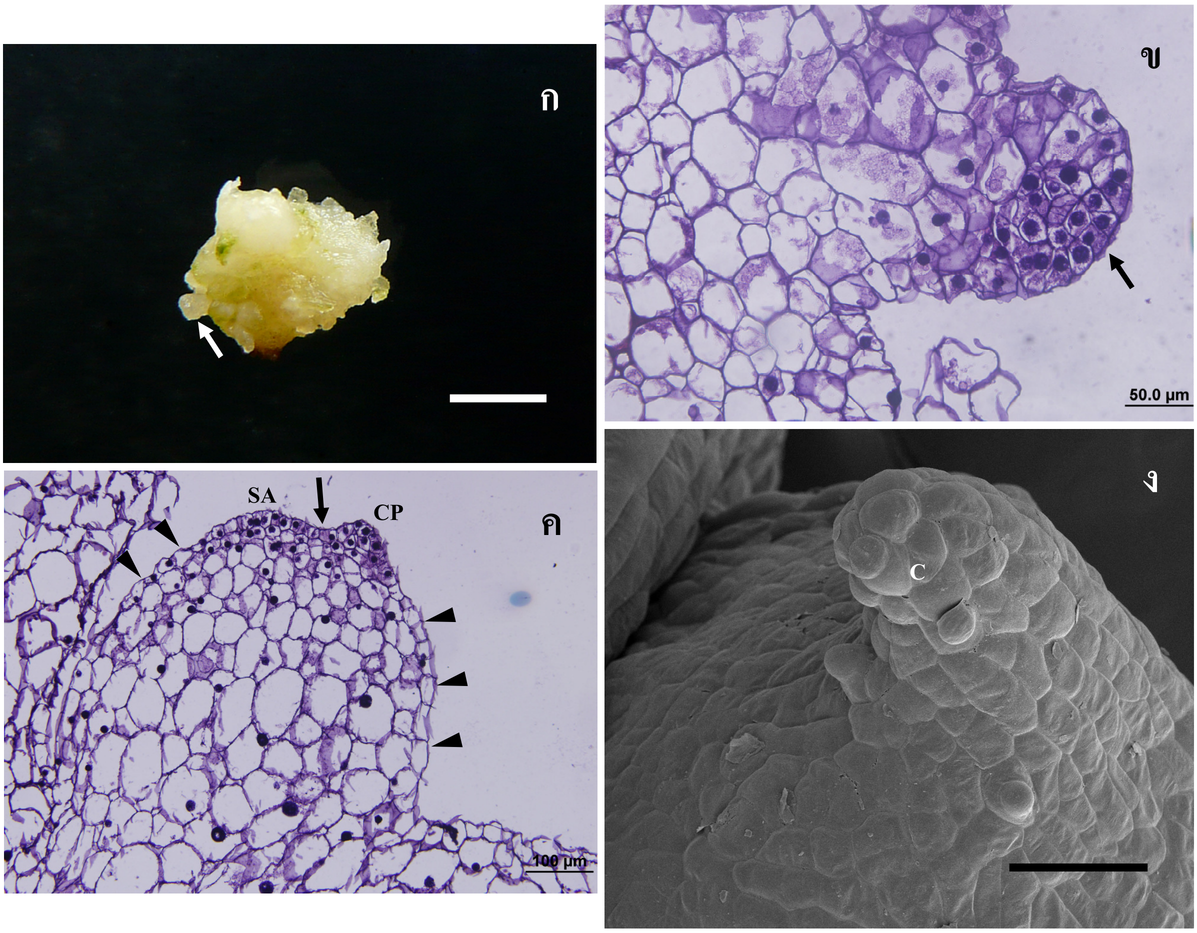
- ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT
- อาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ประกอบด้วย ผงถ่านกัมมันต์ 2 ก./ล., ไฟตาเจล 2 ก./ล.
- สารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 0.5 มก./ล.
- แคลลัสเริ่มต้นน้ำหนักประมาณ 8 มิลลิกรัมของน้ำหนักสด
- * เป็นน้ำหนักสดรวมของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้กับแคลลัสที่เพิ่มขึ้น
- ** แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายในที่สุด



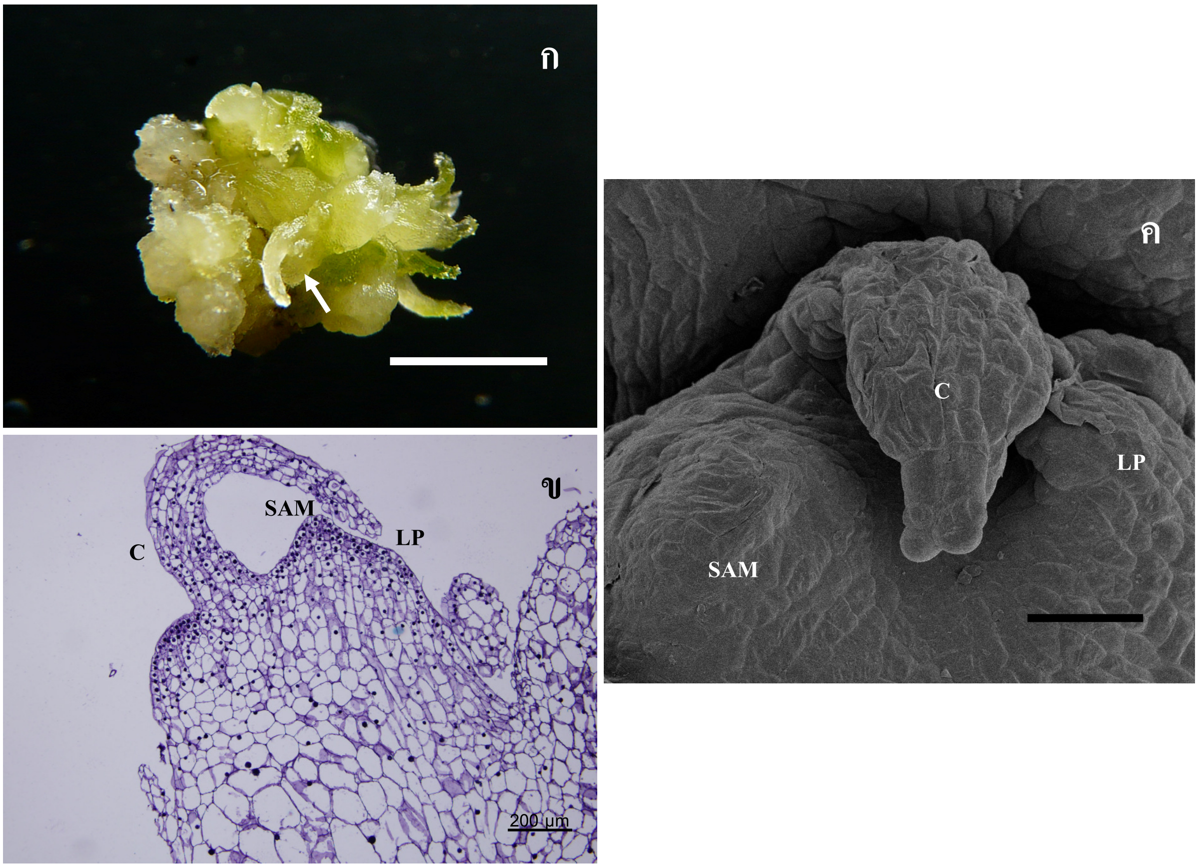
ภาพที่ 9 แสดงลักษณะโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 4 เดือน บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ (ก) น้ำตาลซูโครส 0 ก./ล. ไม่เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้และแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (ข) น้ำตาลซูโครส 10 ก./ล. เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ได้ดีที่สุดและมีสีเขียว (ค) น้ำตาลซูโครส 20 ก./ล. โพรโทคอร์มไลค์บอดี้มีสีเขียวอ่อน (ง) น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. โพรโทคอร์มไลค์บอดี้มีสีเหลืองอ่อน



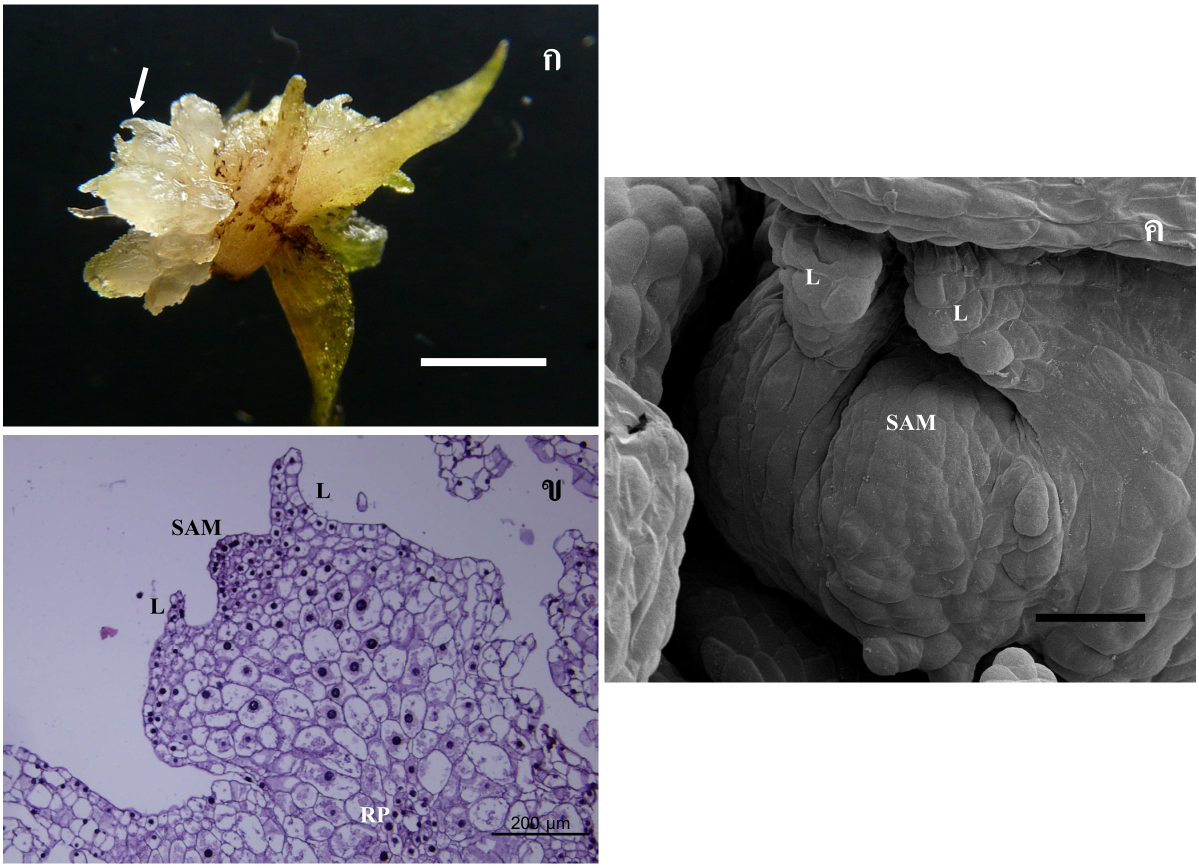
ภาพที่ 10 แสดงลักษณะแคลลัสที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและไม่สามารถเจริญเป็นโพรโทคอร์ม-ไลค์บอดี้ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต แต่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ (ก) น้ำตาลซูโครส 0 ก./ล. (ข) น้ำตาลซูโครส 10 ก./ล. (ค) น้ำตาลซูโครส 20 ก./ล. (ง) น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. เป็นเวลา 4 เดือน



ภาพที่ 11 แสดงลักษณะโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครส 10 ก./ล. นาน 1 เดือน (ก) กลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเอ็มบริโอหรือโซมาติกเอ็มบริโอระยะก่อนรูปร่างกลม (ลูกศรชี้) (Bar = 1.50 มิลลิเมตร) (ข) ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของโซมาติกเอ็มบริโอระยะก่อนรูปร่างกลม (Bar = 50 ไมโครเมตร) (ค) การเกิดรอยกด (ลูกศรชี้) ของโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปร่างกลมและเซลล์ชั้นเนื้อเยื่อเจริญกำเนิดผิวแสดงแนวขอบเขตของโซมาติกเอ็มบริโออย่างชัดเจน (แนวหัวลูกศร) (Bar = 100 ไมโครเมตร) (ง) โครงสร้างภายนอกของส่วนยอดปลายแหลมเล็ก (Bar = 100 ไมโครเมตร) (C: cotyledon, CP: cotyledon primordium, SA: shoot apex)



ภาพที่ 12 แสดงลักษณะโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครส 10 ก./ล. นาน 2 เดือน (ก) โซมาติก-เอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยง (ลูกศรชี้) (Bar = 2.5 มิลลิเมตร) (ข) ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของโซมาติกเอ็มบริโอระยะที่มีใบเลี้ยงยืดยาวออก เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดนูนขึ้นและเกิดจุดกำเนิดใบ (Bar = 200 ไมโครเมตร) (ค) โครงสร้างภายนอกของโซมาติกเอ็มบริโอประกอบด้วยใบเลี้ยง เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดและจุดกำเนิดใบ (Bar = 100ไมโครเมตร) (C: cotyledon, LP: leaf primordium, SAM: shoot apical meristem)



ภาพที่ 13 แสดงลักษณะโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครส 10 ก./ล. นาน 3 เดือน (ก) โพรโทคอร์ม-ไลค์บอดี้ที่สมบูรณ์ (Bar = 2.5 มิลลิเมตร) (ข) ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของโพรโทคอร์ม-ไลค์บอดี้ที่ประกอบด้วย ใบ เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และจุดกำเนิดราก (Bar = 200 ไมโครเมตร) (ค) โครงสร้างภายนอกของใบและเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของโพรโทคอร์ม-ไลค์บอดี้ (Bar = 100 ไมโครเมตร) (L: leaf, RP: root primordium, SAM: shoot apical meristem)

4. ขั้นตอนการเจริญของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ให้เกิดต้น

โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่เจริญมาจากแคลลัส เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมมันฝรั่งบดและกล้วยหอมบดที่ปริมาณต่างๆ (ตารางที่ 3) พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 3) สามารถชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ให้เกิดส่วนยอดได้มากที่สุด คือ 89.58 ± 45.47 ยอดต่อโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ 10 มิลลิกรัม (ตารางที่ 3) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่ไม่เติมทั้งมันฝรั่งบดและกล้วยหอมบด (ชุดการทดลองที่ 1) สำหรับการชักนำให้เกิดราก พบว่าอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 5) สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด คือ 3.00 ± 1.32 รากต่อโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ 10 มิลลิกรัม (ตารางที่ 3) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เติมมันฝรั่งบดปริมาณ 20 และ 50 กรัมต่อลิตร หรือกล้วยหอมบดปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร โดยเริ่มปรากฏส่วนรากขึ้นมาหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน นอกจากนี้พบว่า ความสมบูรณ์ของต้นในแต่ละชุดการทดลองแตกต่างกัน (ตารางที่ 3) โดยต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร มีความสมบูรณ์ของต้นมากที่สุด สังเกตได้จากยอด (ภาพที่ 14 ก; หัวลูกศร) และราก (ภาพที่ 14 ก; ลูกศรชี้) ที่มีขนาดใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ รองลงมาคือ ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 14 ข) และที่ไม่เติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติ (ภาพที่ 14 ค) ตามลำดับ ซึ่งต้นที่ได้จะมียอดขนาดใหญ่แต่รากมีขนาดเล็ก ส่วนต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมมันฝรั่งบดปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 14 ง) และ 50 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 14 จ) จะมีความสมบูรณ์น้อยที่สุด คือ ต้นที่ได้จะมียอดขนาดเล็กและมีรากเกิดขึ้นน้อยมาก อีกทั้งหลังจากการเพาะเลี้ยงต่อไป พบว่ายอดที่เกิดขึ้นไม่สามารถยืดยาวและเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ส่วนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงต่อไป ปลายยอดสามารถเจริญยืดยาว ลำต้นสูงขึ้นและมีการเจริญของส่วนรากยืดยาวเพิ่มขึ้น รากมีลักษณะสีน้ำตาลอ่อนและมีขนรากปกคลุม นอกจากนี้ต้นที่เจริญมาจากโพรโทคอร์มไลค์บอดี้จะเจริญเติบโตเบียดกันในขวด ทำให้ต้น

ไม่สมบูรณ์แข็งแรง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องแยกออกและย้ายมาเลี้ยงในอาหารขวดใหม่เพื่อให้ต้นเจริญเติบโตได้ดีขึ้น หลังจากแยกต้นที่เกิดขึ้นใหม่ย้ายมาเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม (อาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่าต้นที่ได้จะมีลักษณะสมบูรณ์ โดยส่วนยอดจะมีใบสีเขียว ท้องใบมีลายจุดสีม่วง (ภาพที่ 16 ก; ลูกศรชี้) และรากมีขนาดใหญ่ สีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 16 ข; หัวลูกศร) มีขนรากปกคลุมจำนวนมาก (ภาพที่ 16 ข; ลูกศรชี้) ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับต้นที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ นอกจากนี้เมื่อทดลองนำตัวอย่างต้นที่แข็งแรงและมีรากที่สมบูรณ์ออกจากขวดมาปลูกในเรือนเพาะชำที่มีความเข้มแสงประมาณ 30 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยใช้เวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) เป็นวัสดุปลูกซึ่งเป็นวัสดุค้ำจุนที่สามารถเก็บความชื้นได้ดีและมีการระบายน้ำดี พบว่าต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถมีชีวิตรอดได้ (ภาพที่ 17)

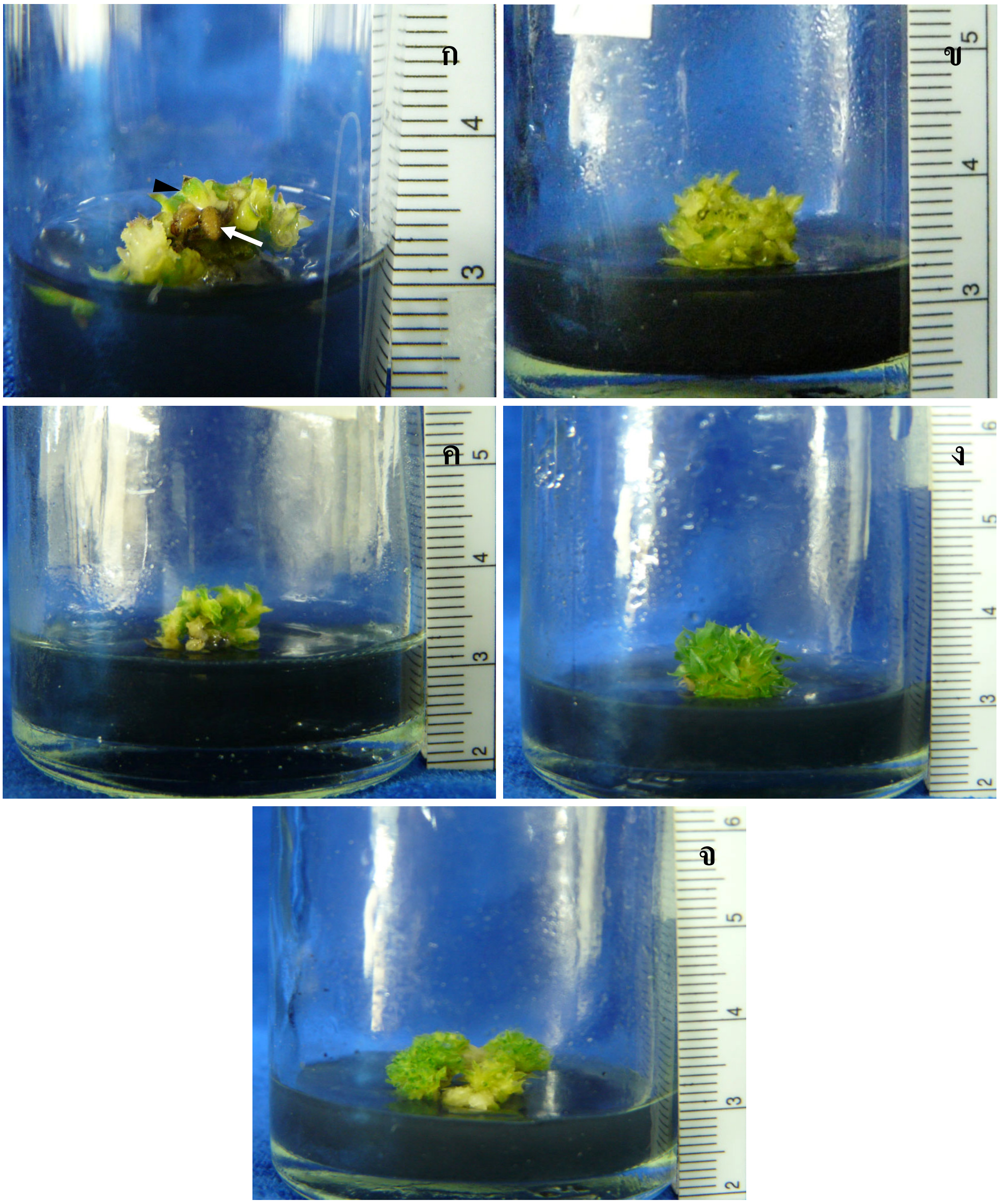
จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าโพรโทคอร์มไลค์บอดี้เริ่มต้นยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร เริ่มมีการเจริญเติบโตของส่วนปลายยอด (ภาพที่ 18 ก) ที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด จุดกำเนิดใบ และปรากฏตำแหน่งรอยคอดบริเวณฐานของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่ยึดเกาะกับก้อนแคลลัส (ภาพที่ 18 ก; ลูกศรชี้) จากนั้นหลังการเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน เริ่มปรากฏเนื้อเยื่อเจริญที่จะเจริญเป็นส่วนราก (ภาพที่ 18 ข; ลูกศรชี้) และการเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ที่มีทั้งส่วนขั้วปลายยอด (ภาพที่ 18 ค; หัวลูกศร) และขั้วปลายราก (ภาพที่ 18 ค; ลูกศรชี้) ซึ่งเป็นต้นที่ได้จากเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน (ภาพที่ 18 ง) นอกจากนี้พบการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ทุติยภูมิ (secondary protocorm-like body) (ภาพที่ 19; ลูกศรชี้) จากบริเวณผิวด้านนอกของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ปฐมภูมิ (primary protocorm-like body) (ภาพที่ 19; หัวลูกศร) และจากการศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอกของต้นกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลอายุ 4 เดือน (ภาพที่ 20 ก) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด พบว่าต้นที่ได้จะมีใบอ่อนเริ่มโผล่ (ภาพที่ 20 ข; ลูกศรชี้) และมีขนรากปกคลุมรากอยู่จำนวนมาก (ภาพที่ 20 ข; หัวลูกศร) สำหรับการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของต้นกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลอายุ 5 เดือนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร โดยการย้อมสีด้วยวิธี safranin and fast green staining แสดงให้เห็นการเชื่อมต่อระหว่างยอดและราก (shoot-root connection) ของต้นที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 21 ก-21 ข) สังเกตได้จาก พบแนวของกลุ่มเนื้อเยื่อเจริญที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงอาหารและน้ำ (vascular strand) เชื่อมต่อระหว่างปลายยอดและส่วนใบ (ภาพที่ 21 ค; ลูกศรชี้) และพบเนื้อเยื่อเจริญกลุ่มนี้บริเวณรากอีกด้วย (ภาพที่ 21 ง) ซึ่งจะพบเซลล์ที่ทำหน้าที่ลำเลียงน้ำ

(tracheary elements; Te) (ภาพที่ 21 ง; Te) บริเวณกลุ่มของเนื้อเยื่อเจริญที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงอาหารและน้ำ

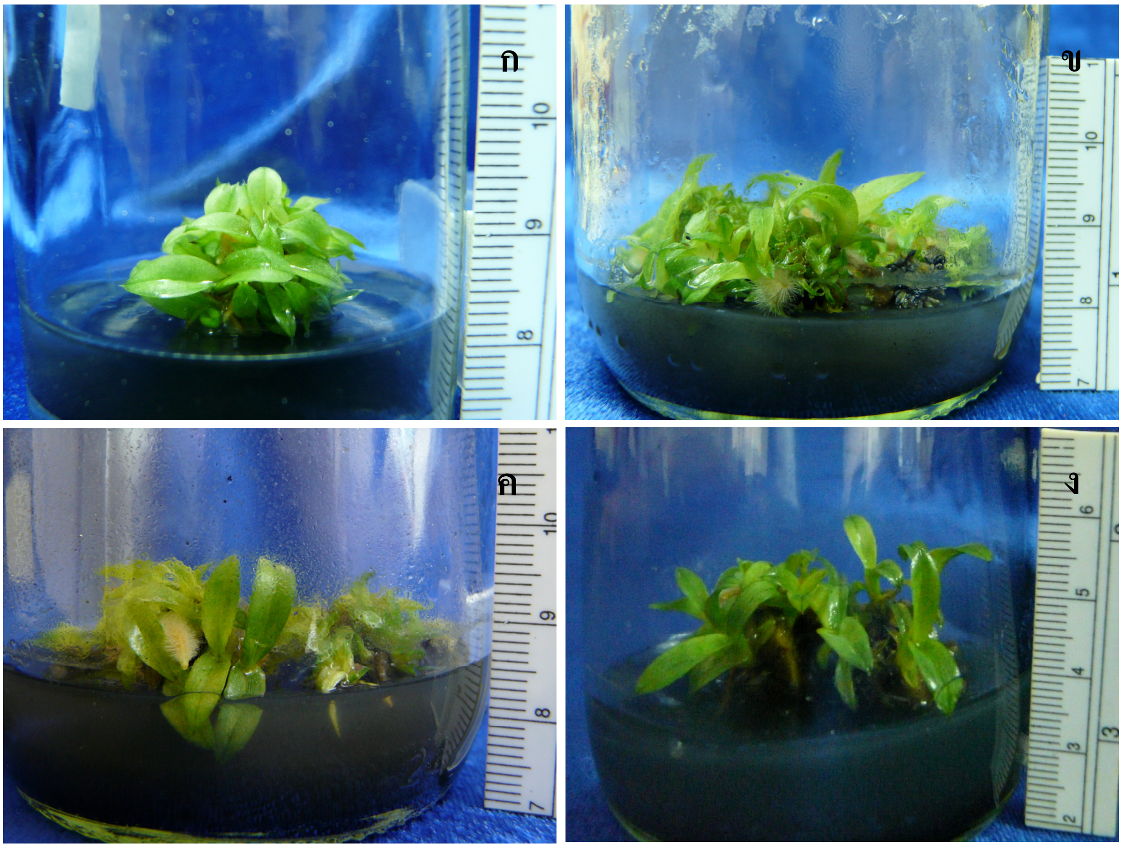
ตารางที่ 3 ผลของมันฝรั่งบดและกล้วยหอมบดต่อการเจริญของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ไปเป็นต้นของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน

ชุดการทดลอง	สารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติ		จำนวนยอดเฉลี่ยต่อโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ 10 มิลลิกรัม ± S.E.	จำนวนรากเฉลี่ยต่อโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ 10 มิลลิกรัม ± S.E.	ความสมบูรณ์ของต้น
	มันฝรั่งบด (ก./ล.)	กล้วยหอมบด (ก./ล.)			
1	0	0	16.65 ± 4.17 b	0.80 ± 0.80 ab	+++
2	20	0	39.70 ± 18.09 ab	0.13 ± 0.13 b	++
3	50	0	58.14 ± 37.62 ab	0.17 ± 0.17 b	++
4	0	20	89.58 ± 45.47 a	1.00 ± 0.76 ab	+++
5	0	50	31.77 ± 17.59 ab	3.00 ± 1.32 a	++++

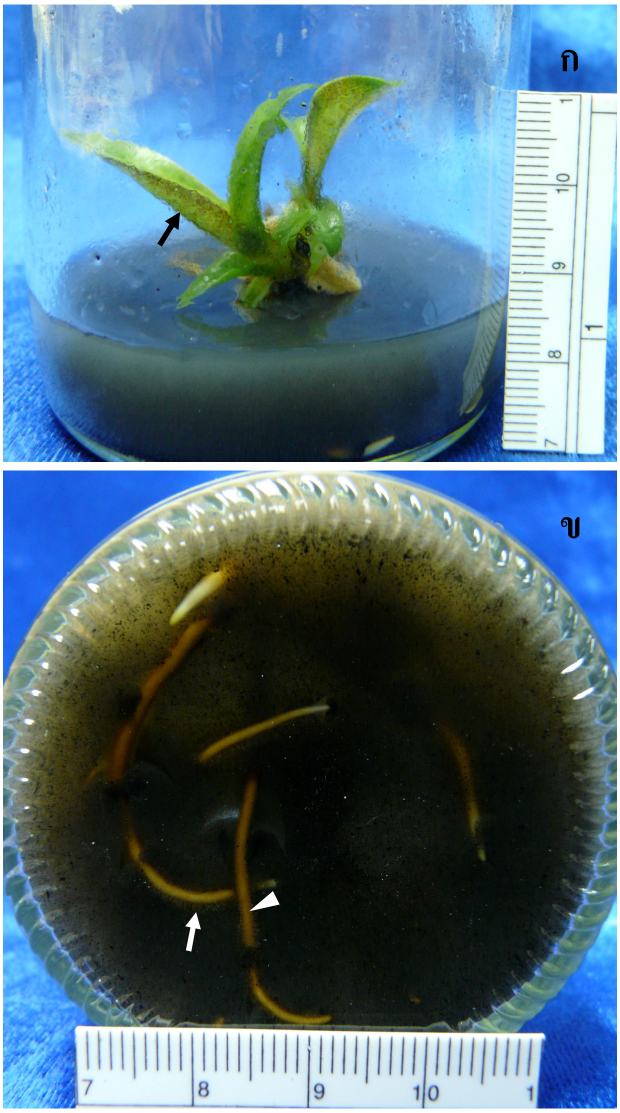
- ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี LSD
- อาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 20 ก./ล., ผงถ่านกัมมันต์ 2 ก./ล., ผงวุ้น 6.8 ก./ล.
- สัญลักษณ์ ++ หมายถึง ยอดมีขนาดเล็กและมีรากเกิดขึ้นน้อยมาก
  +++ หมายถึง ยอดมีขนาดใหญ่แต่รากมีขนาดเล็ก
  ++++ หมายถึง ยอดและรากมีขนาดใหญ่



ภาพที่ 14 แสดงลักษณะต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์ม-ไลค์บอดี้บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS นาน 4 เดือน (ก) ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. เกิดทั้งส่วนยอด (หัวลูกศร) และราก (ลูกศรชี้) ที่มีขนาดใหญ่ (ข) ที่เติมกล้วยหอมบด 20 ก./ล. (ค) ที่ไม่เติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติ (ง) ที่เติมมันฝรั่งบด 20 ก./ล. (จ) ที่เติมมันฝรั่งบด 50 ก./ล.

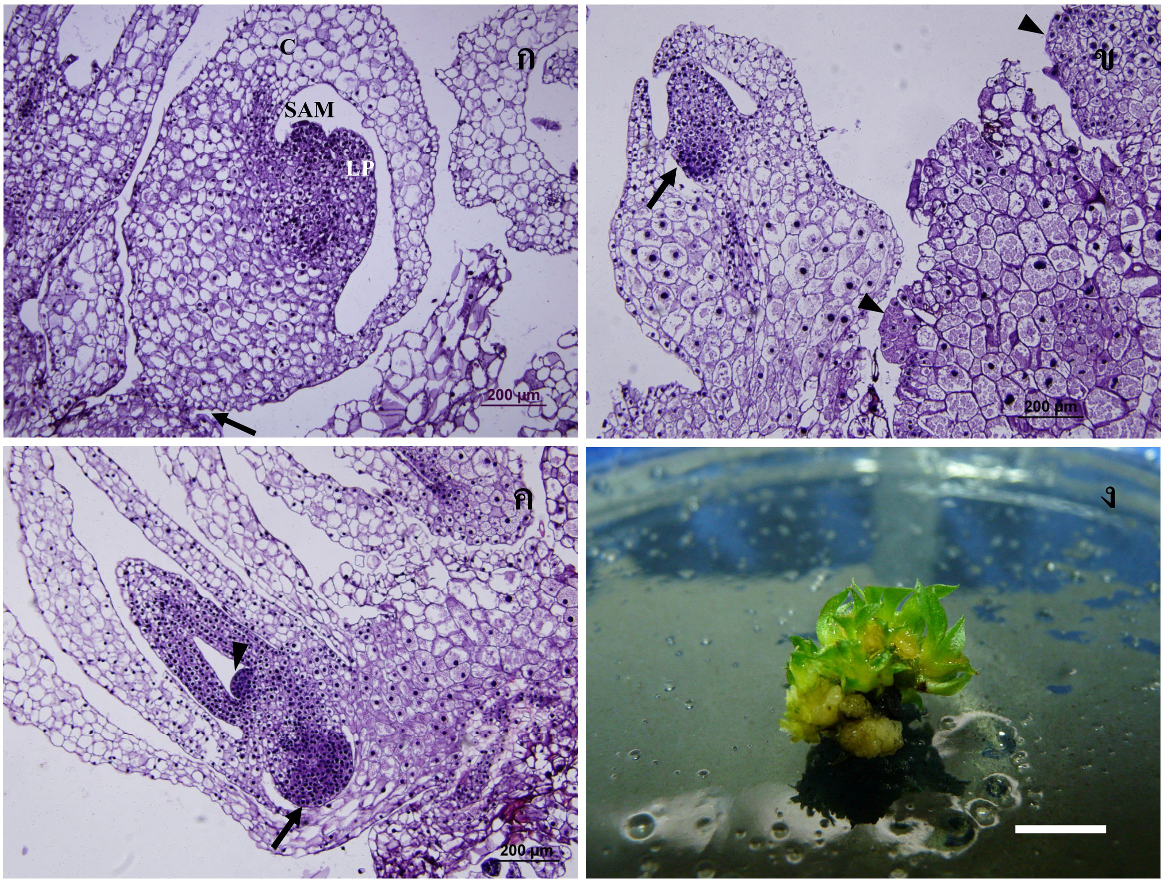


ภาพที่ 15 แสดงลักษณะต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. ในระยะเวลาต่างๆกัน (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ นาน 7 เดือน (ข) นาน 8 เดือน (ค) นาน 9 เดือน (ง) นาน 10 เดือน

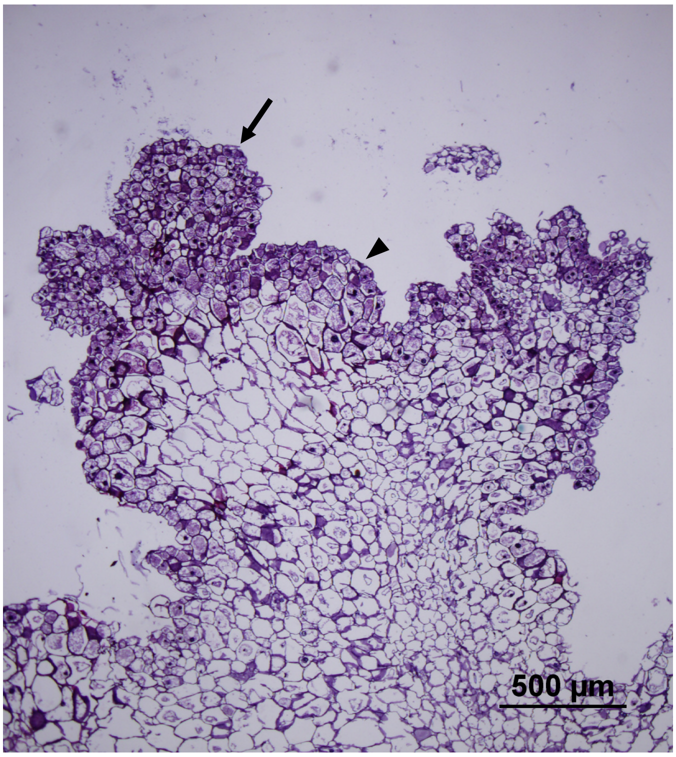


ภาพที่ 16 แสดงลักษณะต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. เป็นเวลา 12 เดือน (ก) ต้นที่สมบูรณ์ มีใบสีเขียวและท้องใบมีลายจุดสีม่วง (ลูกศรชี้) (ข) แสดงรากขนาดใหญ่มีสีน้ำตาลอ่อน (หัวลูกศร) และมีขนรากปกคลุม (ลูกศรชี้)

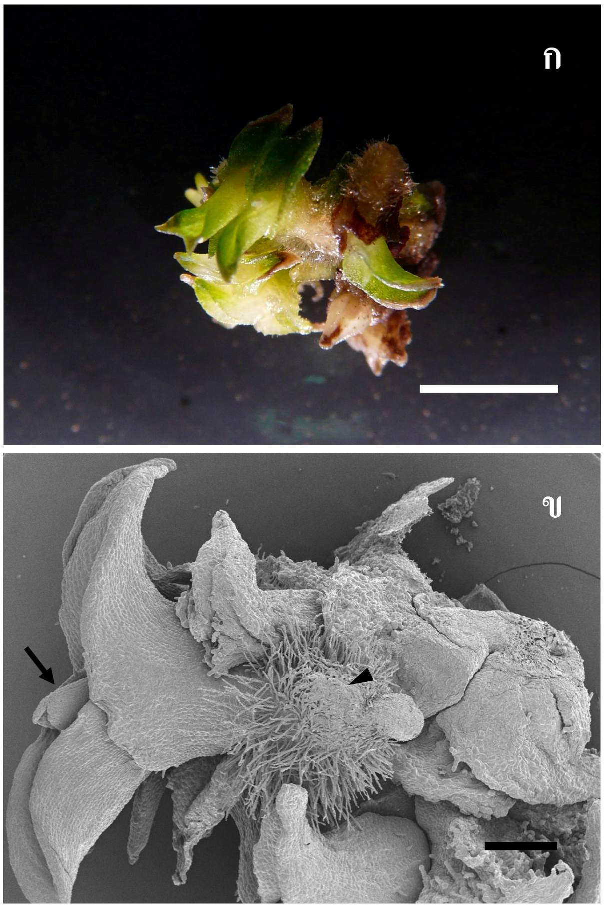
ภาพที่ 17 แสดงลักษณะต้นที่แข็งแรงของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. นาน 10 เดือน สามารถมีชีวิตรอดได้ เมื่อทดลองนำออกจากขวดมาเลี้ยงในเรือนเพาะชำที่มีความเข้มแสงประมาณ 30 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที



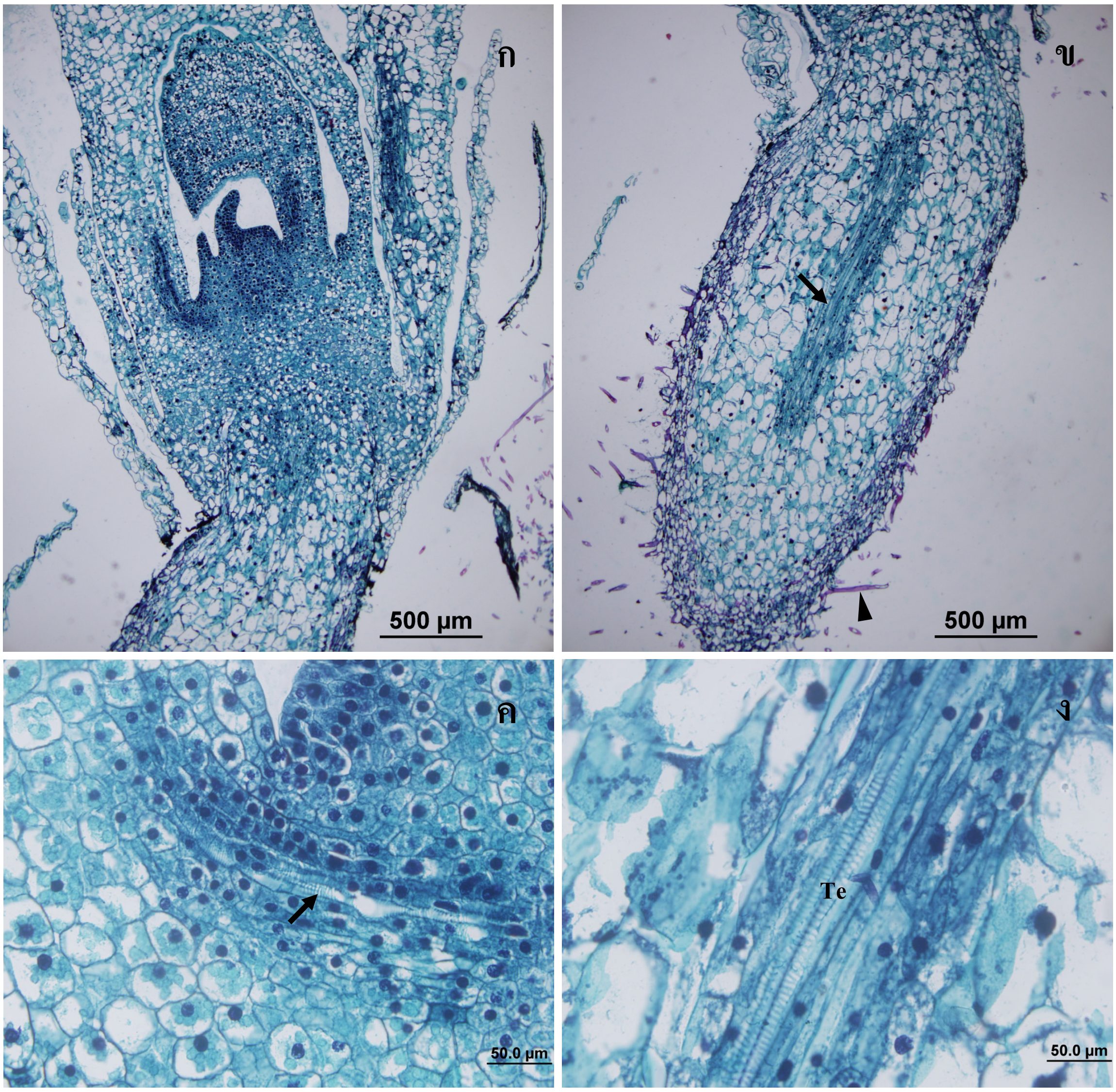
ภาพที่ 18 แสดงลักษณะแบบแผนการเจริญจากโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ไปเป็นต้น (ก) โพรโทคอร์ม-ไลค์บอดี้เริ่มต้น ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด จุดกำเนิดใบ และตำแหน่งรอยคอดบริเวณฐานของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (ลูกศรชี้) (Bar = 200 ไมโครเมตร) (ข) เริ่มปรากฏเนื้อเยื่อเจริญที่จะเจริญเป็นส่วนราก (ลูกศรชี้) และพบกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเอ็มบริโอ (หัวลูกศร) (Bar = 200 ไมโครเมตร) (ค) ต้นที่สมบูรณ์เกาะอยู่บนก้อนแคลลัส มีทั้งส่วนขั้วปลายยอด (หัวลูกศร) และขั้วปลายราก (ลูกศรชี้) (Bar = 200 ไมโครเมตร) (ง) ต้นที่ได้หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. นาน 4 เดือน (Bar = 0.6 เซนติเมตร) (C: cotyledon, LP: leaf primordium, SAM: shoot apical meristem)



ภาพที่ 19 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ทุติยภูมิ (ลูกศรชี้) ที่เกิดบนโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ปฐมภูมิ (หัวลูกศร) (Bar = 500 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 20 แสดงลักษณะต้นกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (ก) หลังจากเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์-บอดี้บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. นาน 4 เดือน (Bar = 0.4 เซนติเมตร) (ข) ลักษณะโครงสร้างภายนอกจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด ต้นที่ได้จะมีใบอ่อนที่เริ่มโผล่ (ลูกศรชี้) และมีขนรากปกคลุมรากอยู่จำนวนมาก (หัวลูกศร) (Bar = 1 มิลลิเมตร)

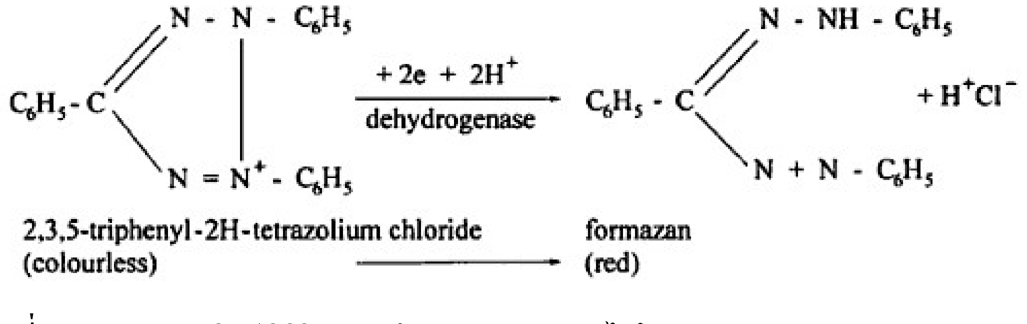


ภาพที่ 21 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของต้นกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. นาน 5 เดือน เมื่อย้อมสีด้วยวิธี safranin and fast green staining (ก) ปลายยอดของต้นที่สมบูรณ์ (Bar = 500 ไมโครเมตร) (ข) รากของต้นที่สมบูรณ์ พบแนวของกลุ่มเนื้อเยื่อเจริญที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงอาหารและน้ำเชื่อมต่อระหว่างปลายยอดและปลายราก (ลูกศรชี้) และมีขนรากปกคลุม (หัวลูกศร) (Bar = 500 ไมโครเมตร) (ค) แนวของกลุ่มเนื้อเยื่อเจริญที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงอาหารและน้ำ เชื่อมต่อระหว่างปลายยอดและส่วนใบ (ลูกศรชี้) (Bar = 50 ไมโครเมตร) (ง) กลุ่มของเนื้อเยื่อเจริญที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงอาหารและน้ำบริเวณราก พบเซลล์ที่ทำหน้าที่ลำเลียงน้ำ (Bar = 50 ไมโครเมตร) (Te: tracheary elements)

บทที่ 4
วิจารณ์

1. การทดสอบความมีชีวิตของเมล็ด

จากการศึกษาความมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลจากฝักกล้วยไม้อายุประมาณ 6 เดือนหลังจากการผสมเกสรตัวเอง เมื่อทดสอบความมีชีวิตโดยใช้สาร TTC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมล็ดที่ใช้ในการทดลองมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตประมาณ 27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมล็ดจะมีลักษณะเรียวยาว ปลายแหลมและเอ็มบริโอมีรูปร่างยาวรี โดยเมล็ดกล้วยไม้ที่สมบูรณ์จะมีลักษณะพองอย่างเด่นชัด บริเวณตรงกลางของเมล็ดจะป่องและเอ็มบริโอของเมล็ดที่มีชีวิตจะมีสีแดง ซึ่งเกิดจากเซลล์ภายในของเมล็ดที่ยังมีชีวิตมีกระบวนการหายใจของเซลล์เกิดขึ้นเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่มีเอนไซม์ dehydrogenase เข้ามาเกี่ยวข้องทำให้มีการปลดปล่อยอนุมูลไฮโดรเจน (H^+) ออกมา โดยอนุมูลไฮโดรเจนที่ปล่อยออกมานี้จะเกิดการทำปฏิกิริยารีดักชั่น (reduction reaction) กับสาร TTC ซึ่งเป็นสารใสไม่มีสี เปลี่ยนเป็นสาร 1,3,5-triphenylformazan (TPF) ที่มีสีแดง (ภาพที่ 22) จึงสามารถแยกเมล็ดที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตออกจากกันได้ โดยพิจารณาดังนี้ ถ้าเมล็ดติดสีแดงทั้งหมดจัดเป็นเมล็ดที่ยังมีชีวิต (viable seed) แต่ถ้าเมล็ดไม่ติดสีเลยจะจัดเป็นเมล็ดที่ไม่มีชีวิต (non-viable seed) (Karrfalt, 2008) หรือหากติดสีไม่เข้มจะนับเป็นเมล็ดไม่มีชีวิตเช่นกัน ทำให้สามารถคาดคะเนความสามารถในการงอกของเมล็ดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้ คือ ประมาณ 27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งวิธีการทดสอบความมีชีวิตของเมล็ด โดยใช้สาร TTC เป็นวิธีการทางชีวเคมีที่สามารถประเมินความมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้ได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว (Vujanovic et al., 2000) นอกจากนี้ยังให้ข้อมูลเกี่ยวกับความแข็งแรงของเมล็ดอีกด้วย



ภาพที่ 22 สมการการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง TTC กับอนุมูลไฮโดรเจน (Miller, 2005)

2. ขั้นตอนการชักนำแคลลัส

จากการนำเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลจากฝักที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเพาะเมล็ดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 1, 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสและโพรโทคอร์ม พบว่าหลังจากการเพาะเมล็ดเป็นเวลา 1 เดือน เมล็ดไม่มีการเจริญเติบโตมากนัก คือ เมล็ดยังคงมีลักษณะเรียวยาว ปลายแหลมและเอ็มบริโอมีรูปร่างยาวรี แต่บางเมล็ดเริ่มมีการพองของเมล็ดบ้างเล็กน้อย เนื่องจากเอ็มบริโอภายในเมล็ดดูดน้ำผ่านชั้นเปลือกหุ้มเมล็ดทำให้เอ็มบริโอขยายขนาดขึ้น (Pierik, 1997) หลังการเพาะเมล็ดนาน 2 เดือน เมล็ดกล้วยไม้จากทุกชุดการทดลองมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น โดยเมล็ดมีลักษณะรูปร่างเปลี่ยนแปลงจากลักษณะรูปร่างยาวรีไปเป็นรูปร่างกลม สีเหลืองอ่อนและหลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด เนื่องจากการดูดน้ำเข้าไปของเอ็มบริโอจะช่วยให้มีการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ดีขึ้น โดยเฉพาะก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังนั้นเมื่อเซลล์ได้รับน้ำและก๊าซออกซิเจนจะกระตุ้นให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมทำงานได้ (วัลลภ, 2540) ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวและขยายขนาดอย่างรวดเร็ว สอดคล้องกับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบบริเวณที่เกิดกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic activity) อยู่จำนวนมาก โดยเฉพาะบริเวณส่วนปลาย นอกจากนี้พบเซลล์บริเวณผิวชั้นนอกสุดของเอ็มบริโอกำลังแบ่งเซลล์แบบตั้งฉากกับผิว ซึ่งมีผลให้มีการขยายพื้นที่ผิว (surface growth) ออกทางด้านข้างและเซลล์ชั้นในของเอ็มบริโอมีการแบ่งเซลล์ทั้งแบบตั้งฉากและขนานกับผิว ทำให้การเจริญเติบโตจะเกิดทั้งการเพิ่มพื้นที่ผิวและขยายขนาด (Evert, 2006)

หลังจากการเพาะเมล็ดเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าทุกชุดการทดลองสามารถชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มจากเมล็ด รวมถึงชุดการทดลองที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตก็สามารถชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มได้เช่นกัน สอดคล้องกับ Pierik (1997) ที่ได้รายงานว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่มีความจำเป็นต่อขั้นตอนการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ เนื่องจากปริมาณของฮอร์โมนภายในเมล็ดอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ด อย่างไรก็ตามการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทคอร์มได้มากขึ้น สอดคล้องกับ Hew และ Clifford (1993) รายงานว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิดลงในอาหารสังเคราะห์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ไซโทไคนิน และจิบเบอเรลลิน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง

ออกซินเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้ เนื่องจากภายในเมล็ดกล้วยไม้มีปริมาณฮอร์โมนในกลุ่มออกซินอยู่น้อย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มเล็กน้อย นอกจากนี้การวางเลี้ยงในสภาพมืดทำให้โพรโทคอร์มมีสีขาว เพราะไม่มีการสร้างคลอโรฟิลล์เกิดขึ้น แต่หลังจากนำมาวางเลี้ยงในสภาพมีแสง พบว่ามีการเปลี่ยนสีของโพรโทคอร์มจากสีขาวไปเป็นสีเขียว เนื่องจากกระบวนการสร้างคลอโรฟิลล์สามารถเกิดขึ้นได้ และการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของโพรโทคอร์มพบการเจริญของเซลล์เพื่อให้เกิดส่วนโครงสร้างรูปโดม โดยเซลล์บริเวณโครงสร้างรูปโดมมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์เจริญ ซึ่งเจริญมาจากกลุ่มเซลล์บริเวณด้านบนของเอ็มบริโอมีการแบ่งเซลล์ทั้งแบบตั้งฉากและขนานกับผิว ซึ่งการแบ่งเซลล์ทั้งสองแบบนี้จะส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตทั้งในด้านความยาวและความกว้าง เพื่อพัฒนาให้เกิดโครงสร้างรูปโดม

ชุดการทดลองที่ประกอบด้วยอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองชนิด หรือเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น พบว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส สอดคล้องกับการทดลองในกล้วยไม้ชนิดวานิลา (*Vanilla planifolia*) ซึ่งไม่สามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (Janarthanam and Seshadri, 2008) และสอดคล้องกับการทดลองของ Chen และ Chang (2000) Lin และคณะ (2000) และ Huan และคณะ (2004) รายงานว่าการเติม TDZ เพียงอย่างเดียวไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส แต่การเติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เช่นเดียวกับผลการทดลองครั้งนี้ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดได้ดีที่สุดบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สอดคล้องกับการทดลองในกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* ของ Chang และChang (1998) สามารถชักนำแคลลัสบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับ Chen และคณะ (2000) พบว่าอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0 - 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0 - 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* ได้ และการทดลองของ Lu (2004) รายงานว่าสามารถชักนำแคลลัสจากโพรโท-คอร์มของกล้วยไม้ *Pleione formosana* บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 - 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0 - 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้สามารถชักนำแคลลัสของกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum callosum* 'Oakhi' x *Paphiopedilum lawrenceanum* 'Tradition' บนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 - 1.0 มิลลิกรัม

ต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1 - 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (Lin et al., 2000) และสามารถชักนำแคลลัสจากเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum* Alma Gavaert บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Hong et al., 2008) สอดคล้องกับการทดลองของ Lin และคณะ (2000) และ Lee และ Lee (2003) พบว่าการรวมกันระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินชนิด TDZ กับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน มีส่วนสำคัญต่อการชักนำแคลลัสของกล้วยไม้รองเท้านารี ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิด 2,4-D ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นออกซินสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ของออกซินค่อนข้างสูงกว่า NAA และ IAA ซึ่ง 2,4-D เป็นออกซินที่จำเป็นต่อการชักนำแคลลัส (Mujib et al., 2005; Janarthanam and Seshadri, 2008) ดังนั้นการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินร่วมกับไซโทไคนินมีความสำคัญต่อขั้นตอนการเกิดเอ็มบริโอเจนนิค-แคลลัสในพืชดอก (Chang and Chang, 1998; Ishii et al., 1998; Ignacimuthu et al., 1999; Roy and Banerjee, 2003) เนื่องจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินสามารถรักษาความสมดุลระหว่างฮอร์โมนภายในเนื้อเยื่อพืช (endogenous hormone) ทั้งออกซินและไซโทไคนิน โดยฮอร์โมนพืชทั้งสองชนิดจะทำหน้าที่ร่วมกันในการควบคุมการแบ่งเซลล์ (Johri and Mitra, 2001) ซึ่งการแบ่งเซลล์เป็นกระบวนการสำคัญที่จำเป็นต่อขั้นตอนการดีดิฟเฟอเรนทิเอชันของชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยง นอกจากนี้การรวมกันระหว่างออกซินและไซโทไคนินมีส่วนสำคัญที่ทำให้เริ่มกระบวนการทางสรีระวิทยาอีกด้วย (Maity et al*.,* 2005) อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดที่เหมาะสมต่อการเกิดโพรโทคอร์มและแคลลัสขึ้นอยู่กับชนิดและชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของแคลลัส พบว่าเซลล์มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ แวคคิวโอลมีขนาดเล็ก และมีช่องว่างระหว่างเซลล์น้อยมากหรือไม่มีเลย ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์เจริญ (Esau, 1964) อีกทั้งเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด พบว่าโครงสร้างภายนอกเซลล์ของแคลลัสมีลักษณะเป็นเซลล์ขนาดเล็กและเซลล์เกาะกันหลวมๆ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะแคลลัสแบบฟรายเอเบิล คือ ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นก้อนสีเหลืองอ่อน เซลล์แต่ละเซลล์ของก้อนแคลลัสรวมตัวกันอย่างหลวมๆ แยกออกจากกันได้ง่าย (คำนูญ, 2542)

3. ขั้นตอนการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้

จากการชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ โดยเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมและไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครส ปริมาณ 0, 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร เพื่อศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสที่ปริมาณต่างๆ ร่วมกับการเติม และไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 4 เดือน เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข้อมูลจากการทดลองเบื้องต้น) ร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นโซมาติกเอ็มบริโอหรือโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ได้ดีที่สุด สอดคล้องกับการทดลองของ Jheng และคณะ (2006) รายงานว่าอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 10 - 20 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดโพร-โทคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้ *Oncidium* ‘Gower Ramsey’ ได้จำนวนมากประมาณ 1,000 โพรโท-คอร์มไลค์บอดี้ต่อแคลลัสเริ่มต้น 0.25 กรัมของน้ำหนักสด เช่นเดียวกับการทดลองในกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum* Alma Gavaert สามารถชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร (Hong et al., 2008) เนื่องจากทั้งปริมาณน้ำตาลซูโครสและการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ สอดคล้องกับการทดลองของ Rai และคณะ (2007) รายงานว่าผลของการทำงานร่วมกันระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโตกับน้ำตาลซูโครสมีบทบาทสำคัญต่อการชักนำให้เกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิส โดยน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงเพราะเนื้อเยื่อเหล่านี้ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้และมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์จำกัด นอกจากนี้น้ำตาลซูโครสยังทำหน้าที่เป็นปัจจัยหนึ่งในการส่งเสริมยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ที่อยู่ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (Koch, 1996; Iragi et al., 2005) และมีรายงานการศึกษาใน *Arabidopsis* พบว่าน้ำตาลซูโครสสามารถชักนำให้เกิดการสะสมของ Cyclin D (Cyc D) โดย Cyc D จะควบคุมการเปลี่ยนจากระยะก่อนการสร้าง DNA (G1 phase) เข้าสู่ระยะสร้าง DNA (S phase) ของวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) (Hopkins and Hüner, 2004) สอดคล้องกับการรายงาน

ของ Takano และคณะ (1990) (อ้างโดย สุภาวดี, 2548) ทำการทดลองในกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* พบว่าน้ำตาลซูโครสส่งเสริมประสิทธิภาพการดูดซึมไนโตรเจนและธาตุอาหารอื่นๆ ให้ดีขึ้น ซึ่งปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้โดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้คือ 20 กรัมต่อลิตร แต่สำหรับการทดลองนี้ น้ำตาลซูโครสปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร เหมาะสมที่สุดต่อการเกิดโพรโทคอร์มไลค์-บอดี้ เช่นเดียวกับการทดลองในกล้วยไม้ชนิด *Vandofinetia* Nara 'Yumika Pink' (Kishi et al., 1997) อย่างไรก็ตามควรใช้น้ำตาลซูโครสที่ปริมาณไม่เกิน 30 กรัมต่อลิตร เนื่องจากการเติมน้ำตาลปริมาณสูงเกินไปจะยับยั้งการดูดซึมธาตุอาหารและยับยั้งการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ ทำให้เกิดการตายของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง นอกจากนี้น้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ เมื่อผ่านการฆ่าเชื้อโดยความร้อนจากไอน้ำจะเกิดกระบวนการแตกสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด คือ น้ำตาลฟรุกโตส (fructose) และน้ำตาลกลูโคส (glucose) (Schenk et al., 1991; Büter et al., 1993) ซึ่งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวทั้งสองชนิด เมื่อผ่านการฆ่าเชื้อโดยความร้อนจากไอน้ำจะสลายตัวเป็น 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอรัลดีไฮด์ (5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde; HMF) และสารประกอบฟีนอล (Büter et al., 1993) ซึ่งจัดเป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์พืช เช่นเดียวกับการทดลองของ Tokuhara และ Mill (2001) Iragi และคณะ (2005) Vinterhalter และคณะ (2006) Gonçalves และ Romano (2007) และ Peres และคณะ (2009) รายงานว่าการเติมน้ำตาลซูโครสปริมาณมากส่งผลให้เกิดสภาวะเครียดน้ำ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของความดันออสโมซิส (osmotic pressure) ซึ่งจะยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช

สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญต่อการชักนำให้เกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิส สอดคล้องกับ Arnold และคณะ (2002) รายงานว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตมีบทบาทสำคัญต่อการชักนำให้แคลลัสและเซลล์ที่เริ่มเกิดขั้วเจริญเติบโตเข้าสู่กระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิส เช่นเดียวกับการทดลองของ Chen และ Chang (2000) รายงานว่าอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA ร่วมกับ TDZ สามารถชักนำให้เกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสจากแคลลัสของกล้วยไม้สกุล *Oncidium* ได้ เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งกลุ่มออกซิน (NAA) และกลุ่มไซโทไคนิน (TDZ) จะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมวัฏจักรของเซลล์และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการแบ่งเซลล์ (cell division) (Francis and Sorrell, 2001; Thomas and Jiménez, 2005)

ส่วนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ไม่เติมน้ำตาล พบว่าแคลลัสจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากขาดแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยง ซึ่งมีรายงานว่าชนิดและปริมาณของคาร์โบไฮเดรต

ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอิทธิพลต่อความสามารถของเซลล์ในการชักนำให้เกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสและการเจริญของโซมาติกเอ็มบริโอ (Blanc et al., 1999; Tokuhara and Mill, 2003)

ส่วนการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต แต่เติมน้ำตาลซูโครสปริมาณ 0, 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ได้ ซึ่งแคลลัสเริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงตาย เนื่องจากขาดสารควบคุมการเจริญเติบโต ตรงข้ามกับการทดลองของ Begum และคณะ (1994) ทำการทดลองในกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร แต่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ได้มากที่สุด

นอกจากนี้การชักนำต้นจากแคลลัส ประสบความสำเร็จเมื่อชักนำผ่านโพรโทคอร์ม-ไลค์บอดี้ ซึ่งขั้นตอนนี้เกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิส (Begum et al., 1994; Meesawat and Kanchanapoom, 2002) อีกทั้งการขยายพันธุ์กล้วยไม้ให้ได้ปริมาณมาก โดยวิธีโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสแบบทางอ้อม มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสแบบทางตรง เพราะการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสแบบทางอ้อม สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ปริมาณมากและโซมาติกเอ็มบริโอสามารถเจริญไปเป็นต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Zhao et al., 2008)

สำหรับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่ากลุ่มเซลล์ที่จะเจริญไปเป็นส่วนของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเอ็มบริโอเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดเล็กและมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของกลุ่มเซลล์เจริญ (Esau, 1964) โดยเจริญมาจากเซลล์ด้านนอกของก้อนแคลลัส สอดคล้องกับการทดลองในกล้วยไม้หลายชนิดที่รายงานว่า โซมาติกเอ็มบริโอมีจุดกำเนิดมาจากเซลล์บริเวณผิวด้านนอกของชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยง เช่น เกิดจากก้อนแคลลัสของกล้วยไม้ *Cymbidium ensifolium* var. *misericors* (Chang and Chang, 1998) เกิดจากใบของกล้วยไม้ *Oncidium* Gower Ramsey (Chen et al., 1999) เกิดจากโพรโทคอร์มและใบของกล้วยไม้ *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa* (Chen and Chang, 2004; Chen and Chang, 2006) นอกจากนี้ในการทดลองของ Teixeira da Silva และ Tanaka (2006) พบว่าสามารถชักนำให้เกิดโพรโทคอร์ม-ไลค์บอดี้จากเซลล์บริเวณส่วนผิว (epidermis) ของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ โดยใช้เทคนิค thin cell layers (TCLs) ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ หรือโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ โดยช่วยลดปัญหาต่างๆ เช่น ความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ปัญหาด้านเวลาและด้านค่าใช้จ่าย

ในการผลิต อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าโซมาติกเอ็มบริโอสามารถเจริญมาจากเซลล์ที่อยู่ภายในของชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงได้เช่นกัน เช่น เกิดจากก้อนแคลลัสของกล้วยไม้ *Cymbidium* Twilight Moon 'Day Light' (Huan et al., 2004) เกิดจากก้อนแคลลัสของกล้วยไม้ *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. (Zhao et al., 2008) ฯลฯ ดังนั้นจุดกำเนิดของโซมาติกเอ็มบริโอขึ้นอยู่กับชนิดของกล้วยไม้ นอกจากนี้รูปแบบการเจริญของโซมาติกเอ็มบริโอสอดคล้องกับรูปแบบการเจริญของเอ็มบริโอของกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Quiroz-Figueroa et al., 2006)

4. การชั กน ำโพรโทคอร์ มไลค์ บอดี้ ให้ เกิ ดเป็ นต้ น

โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่เจริญมาจากแคลลัส เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมมันฝรั่งบดและกล้วยหอมบดที่ปริมาณต่างๆ พบว่า หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ให้เกิดส่วนยอดได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่ไม่เติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติ สอดคล้องกับการทดลองของ Huang และคณะ (2001) รายงานว่าอาหารที่เติมกล้วยผง (banana powder) ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอดของกล้วยไม้รองเท้านารีสายพันธุ์ลูกผสม *P. philippinense* × *P.* Susan Booth ได้มากขึ้น ซึ่งเจริญมาจากโพรโทคอร์มไลค์บอดี้เริ่มต้น 0.01 กรัมของน้ำหนักสด นอกจากนี้มีรายงานการประสบความสำเร็จจากการใช้กล้วยหอมบดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หลายชนิด อย่างไรก็ตามเหตุผลที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นของสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติยังมีรายงานไว้น้อย บางรายงานกล่าวว่าอาหารที่เติมกล้วยหอมบด ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อโดยความร้อนจากไอน้ำที่อุณหภูมิสูง ความดันสูงและสภาพความเป็นกรด ส่งผลให้องค์ประกอบบางอย่างในกล้วยหอมสามารถละลายน้ำได้และเปลี่ยนแปลงอยู่ในรูปที่ช่วยให้พืชเกิดการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น โดยกระตุ้นองค์ประกอบตามธรรมชาติ เช่น ไบโอติน วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 กรดอะมิโนหลายชนิด ได้แก่ ซีสเทอีน ไลซีน เมไทโอนินและอาร์จินีน เกลือแร่ ได้แก่ เหล็ก โปแตสเซียม ฟอสฟอรัสและแคลเซียม (Barnell, 1940; Askar, 1972 อ้างโดย สุภาวดี, 2548) ฮอร์โมนพืชกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ ซีเอติน ซีเอตินไร-โบไซด์ และ2iP (Van Staden and Stewart, 1975 อ้างโดย Vyas et al., 2009) เช่นเดียวกับ Arditti และ Ernst (1993) อ้างโดย Chugh และคณะ (2009) รายงานว่าโดยทั่วไปเนื้อของกล้วยหอมเป็นแหล่งสะสมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินที่สำคัญ ซึ่งจะยับยั้งการเจริญเติบโตใน

ระยะเริ่มต้น แต่ต่อมาจะส่งผลกระตุ้นกระบวนการเปลี่ยนสภาพและการเจริญเติบโตของส่วนยอด โดยเฉพาะกล้วยที่อยู่ในระยะสุกห่ามจะมีไซโทไคนิน จิบเบลเรลลินและออกซินที่มีประสิทธิภาพซึ่งเหมาะสำหรับการนำไปใช้ของกล้วยไม้ (Kusumoto and Furukawa, 1977) อย่างไรก็ตามจิบเบล-เรลลินและออกซินอาจจะสลายได้เมื่อผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อโดยความร้อนจากไอน้ำ

สำหรับการชักนำให้เกิดราก พบว่าอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เติมมันฝรั่งบดหรือกล้วยหอมบดปริมาณต่างๆ โดยเริ่มปรากฏส่วนรากขึ้นมาหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน เช่นเดียวกับการทดลองในกล้วยไม้เอื้องดิน (*Spathoglottis plicata* Blume.) ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร (Sinha et al., 2009) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Lo และคณะ (2004) และ Vyas และคณะ (2009) รายงานว่าสารสกัดจากกล้วย (banana extract) สามารถเพิ่มจำนวนและความสมบูรณ์ของรากกล้วยไม้ชนิด *Dendrobium tosaense* และเอื้องสายม่วง (*Dendrobium lituiflorum* Lindl.) ตามลำดับ โดย Eng-Soon (2005) รายงานว่ากล้วยมีฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเกิดราก และ Arditti และ Ernst (1993) อ้างโดย สุภาวดี (2548) รายงานว่าธาตุเหล็กที่เป็นองค์ประกอบในกล้วยอยู่ในรูปที่สามารถกระตุ้นให้เกิดรากของกล้วยไม้ได้

นอกจากนี้พบว่า ต้นใหม่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร มีความสมบูรณ์ของส่วนปลายยอดและรากมากที่สุดอีกด้วย สอดคล้องกับการทดลองของ Churchill และคณะ (1973) นอกจากนี้มีรายงานว่าอาหารที่เติมกล้วยหอมบดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้หลายชนิด เช่น *Cymbidium* (Kusumoto and Furukawa, 1977) *Doritaenopsis* (Ichihashi and Islam, 1999) *Dendrobium strongylanthum* (Kong et al., 2007) *Aerides houlletiana* (Prasertsongskun and Awaesuemae, 2009) และ *Cattleya* และ *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Vyas et al., 2009) เพราะกล้วยหอมบดมีส่วนส่งเสริมความแข็งแรงของส่วนยอดและรากของกล้วยไม้ (Butcher and Marlow, 1989) เช่นเดียวกับ Gnasekaran และคณะ (2010) รายงานว่าอาหารที่เติมกล้วยหอมบดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของต้นได้มากขึ้น เนื่องจากเนื้อกล้วยที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถช่วยควบคุมระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงให้คงที่ หลังจากผ่านการฆ่าเชื้อโดยความร้อนจากไอน้ำเพราะการฆ่าเชื้อโดยความร้อนจากไอน้ำสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารได้ โดยเกิดจากการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (denaturation of protein) การละลายของเกลือ (dissolution of salt) และปฏิกิริยาการย่อยสลาย

สารพวกคาร์โบไฮเดรต (hydrolysis of carbohydrate) (Owen et al., 1991) ซึ่งนอกจากองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว ระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารยังเป็นปัจจัยสำคัญต่อพืชในการนำสารอาหารที่มีไปใช้อีกด้วย (Thorpe et al., 2008) อีกทั้งกล้วยมีองค์ประกอบบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ ซึ่งจะเพิ่มประสิทธิภาพของการเจริญเติบโตของกล้วยไม้โดยไม่มีผลทำให้เกิดความผิดปกติของการเจริญเติบโต

จากการทดลองเติมมันฝรั่ง พบว่าไม่สามารถทำให้ต้นกล้วยไม้เจริญเติบโตต่อไปได้ เนื่องจากมันฝรั่งประกอบด้วยสารประกอบฟีนอล กรดอะมิโนบางชนิดในระดับต่ำ สารพวกสเตียรอยด์และกรดอินทรีย์ ซึ่งสารเหล่านี้ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (Islam et al., 2003; Rahman et al., 2004) นอกจากนี้การเติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติในปริมาณสูงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากการเติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนในปริมาณสูงส่งผลต่อภาวะสมดุลของสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ของสารอาหารเหล่านั้นลดลง รวมทั้งส่งผลให้ค่าศักย์ของน้ำ (water potential) มีค่าลดลงอีกด้วย (Rahman et al., 2004) ซึ่งผลการทดลองที่ได้ตรงข้ามกับการทดลองในกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสมเขตร้อนสกุล *Paphiopedilum* (Lin et al., 2000) และกล้วยไม้รองเท้านารีเขตอบอุ่นชนิด *Cypripedium formosanum* (Lee and Lee, 2003) พบว่ามันฝรั่งบดสามารถส่งเสริมการรอดชีวิตของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้และสามารถชักนำให้เกิดรากอีกด้วย

นอกจากนี้การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่บริเวณขั้วปลายยอดและเนื้อเยื่อเจริญปลายรากที่บริเวณขั้วปลายราก ทำให้สามารถคาดคะเนแนวโน้มของการเกิดเป็นต้นได้ และการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยการย้อมสีด้วยวิธี safranin and fast green staining แสดงสายของกลุ่มเนื้อเยื่อเจริญที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงอาหารและน้ำ เชื่อมต่อระหว่างยอดและราก โดยลักษณะการเชื่อมต่อเช่นนี้สามารถบ่งบอกถึงลักษณะของต้นที่สมบูรณ์ ซึ่งเป็นลักษณะต้นที่มีจุดกำเนิดมาจากเซลล์ 1 เซลล์ และเกิดต้นผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเน-ซิส (Schumann et al., 1995; Jalil et al., 2008)

อย่างไรก็ตามผลของสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติที่มีต่อกล้วยไม้แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับความต้องการของกล้วยไม้เหล่านั้น ดังนั้นการเติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนที่ปริมาณต่างๆ ไม่มีผลต่อกล้วยไม้ทุกชนิดและผลที่เกิดขึ้นไม่คงที่ สามารถเปลี่ยนแปลงได้ ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับสูตรอาหารและชนิดของกล้วยไม้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

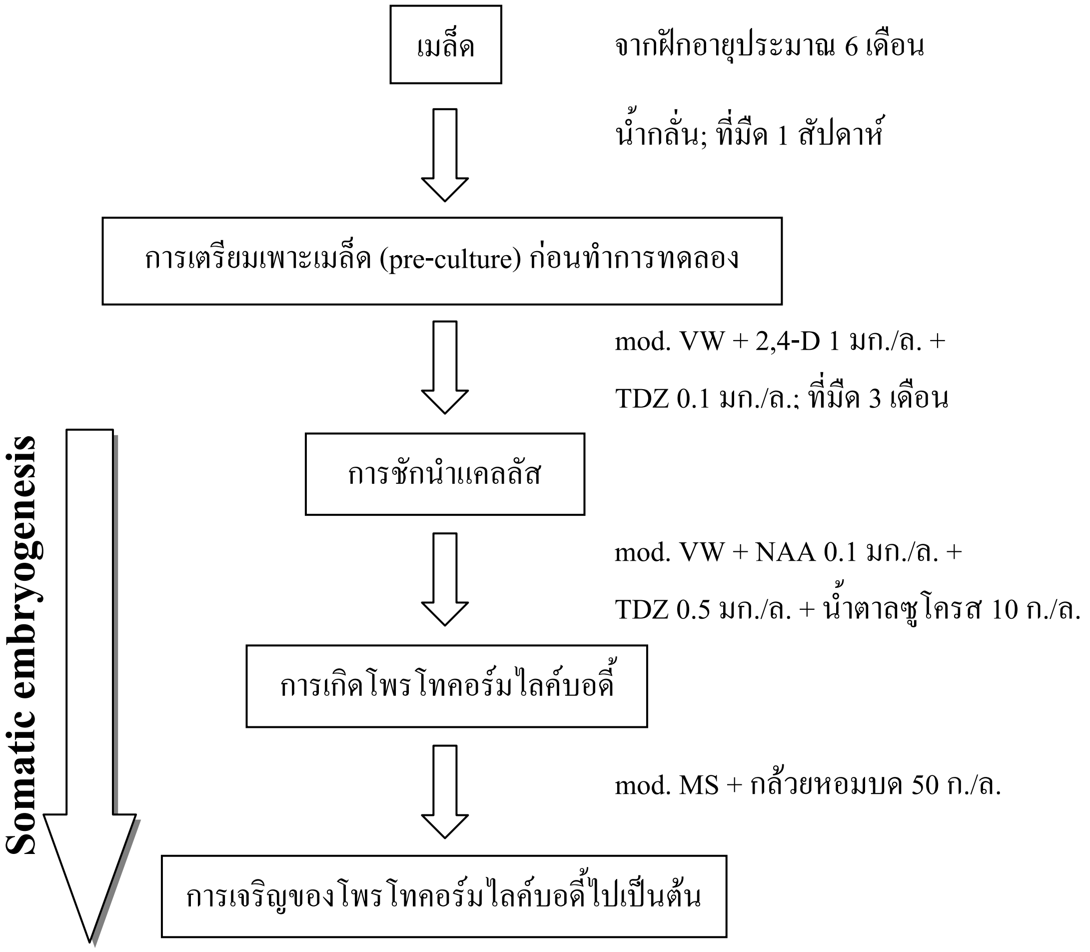
1. เมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลจากฝักอายุประมาณ 6 เดือนหลังจากผสมเกสรตัวเอง มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตประมาณ 27 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบความมีชีวิตด้วยวิธี TTC

2. เมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเมล็ดเป็นเวลา 3 เดือน บนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสูตรอาหารที่สามารถชักนำโพรโทคอร์มได้ดีที่สุด คือ อาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล คือ อาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถสร้างโพรโทคอร์มไลค์บอดี้จากแคลลัส โดยผ่านทางกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิส และพบการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ทุติยภูมิ

4. สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ไปเป็นต้น คือ อาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งต้นที่ได้จะมีลักษณะสมบูรณ์ทั้งส่วนยอดและส่วนราก ใบมีขนาดใหญ่ แข็งแรง และมีลักษณะเหมือนกับต้นที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ และมีการเชื่อมต่อของกลุ่มท่อลำเลียงของส่วนยอดและราก (vascular connection)

การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินและออกซินสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.) อีกทั้งสามารถพัฒนาแคลลัสดังกล่าวให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ โดยผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิส เนื่องจากในขั้นตอนนี้ การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครสเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมให้เกิดการสร้างโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ แล้วสามารถพัฒนาโพรโทคอร์มไลค์บอดี้เหล่านี้ไปเป็นต้นได้ โดยเป็นผลมาจากการเลือกชนิดและปริมาณของสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 แสดงแผนภาพสรุปขั้นตอนการเกิดต้นผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิส ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล

ข้อเสนอแนะ

ในการสร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อพืช น่าจะศึกษาวิจัยเพื่อให้เข้าใจลักษณะการเกิดและกระบวนการสร้างสารสีน้ำตาลที่สอดคล้องกับแผนการเจริญ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการลดหรือยับยั้งไม่ให้เนื้อเยื่อพืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งจะทำให้พืชสามารถเจริญเติบโตไปตามแผนการเจริญได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2550. ข่าวประชาสัมพันธ์. เข้าถึงได้จาก: http://www.moac.go.th/builder/moac02/information/view_index.php?id=5149. (วันที่สืบค้น 9 เมษายน 2553)

คำนูญ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัทด่านสุทธาการพิมพ์: กรุงเทพฯ.

ครรชิต ธรรมศิริ. 2550. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. ปรับปรุงครั้งที่ 2. บริษัทอัมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด: กรุงเทพฯ.

จักรพันธ์ สกุลมีฤทธิ์ และกันย์ จำนงค์ภักดี. 2551. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด: กรุงเทพฯ.

ปวีณา แก้วอุบล. 2550. ผลของสารต้านอนุมูลอิสระต่อการชักนำแคลลัสโดยยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสเป็นสีน้ำตาลของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f) Pfitz.). โครงงานทางชีววิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ไพบูลย์ ไพรีพ่ายฤทธิ์. 2521. ตำรากล้วยไม้ สำหรับผู้เริ่มเล่น. พิมพ์ครั้งที่ 1. อาทรการพิมพ์: กรุงเทพฯ.

มาลินี อนุพันธ์สกุล. 2534. คู่มือการปลูกกล้วยไม้. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

ระพี สาคริก. 2535. กล้วยไม้รองเท้านารี วิธีการปลูกและปัญหาอนุรักษ์ธรรมชาติ. สำนักพิมพ์โอเอส พริ้น ติ้งเฮาส์: กรุงเทพฯ.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

วัลลภ สันติประชา. 2540. เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์. พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่: สงขลา.

สุภาวดี ถาวโร. 2548. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยืนเข้าสู่กล้วยไม้กะเรกะร่อนปากเป็ด (*Cymbidium findlaysonianum* Lindl). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. 2549. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์โฟร์เพซ: กรุงเทพฯ.

สลิล สิทธิสัจจา และนฤมล กฤษณชาญดี. 2549. คู่มือกล้วยไม้. พิมพ์ครั้งที่ 8. สำนักพิมพ์สารคดี: กรุงเทพฯ.

อิศราภรณ์ ไทยฤทธิ์. 2548. การชักนำแคลลัสของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz) I. โครงงานทางชีววิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อุไร จิรมงคลการ. 2541. กล้วยไม้รองเท้านารี. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัทอัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด: กรุงเทพฯ.

ฮารีซะห์ มะเซ็ง. 2549. การชักนำแคลลัสของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz) II. โครงงานทางชีววิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. and Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 69: 233–249.

Begum, A.A., Tamaki, M., Tahara, M. and Kako, S. 1994. Somatic embryogenesis in *Cymbidium* through in vitro culture of inner tissue of protocorm-like bodies. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 63(2): 419-427.

Blanc, G., Michaux-Ferrière, N., Teisson, C., Lardet, L. and Carron, M.P. 1999. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 59: 103–112.

Bonga, J.M. and von Aderkas P. 1992. In Vitro Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht.

Butcher, D. and Marlow, S.A. 1989. Asymbiotic germination of epiphytic and terrestrial orchids. In: Modern Methods in Orchid Conservation: The Role of Physiology, Ecology and Management. Pritchard, H.W., Ed. Cambridge University Press, New York., pp 31-38.

Büter, B., Pescitelli, S.M., Berger, K., Schmid, J.E. and Stamp, P. 1993. Autoclaved and filter sterilized liquid media in maize anther culture: significance of activated charcoal. Plant Cell Reports. 13: 79-82.

Chang, C. and Chang, W.C. 1998. Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. miseriors. Plant Cell Reports. 17: 251-255.

Chawla, H.S. 2003. Plant Biotechnology A Practical Approach. Science Publishers, Inc: New Hampshire.

Chen, J.T. and Chang, W.C. 2000. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). Plant Science. 160(2160): 87-93.

Chen, J.T. and Chang, W.C. 2004. Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa* Shimadzu. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 40: 290-293.

Chen, J.T. and Chang, W.C. 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. Biologia Plantarum. 50(2): 169-173.

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

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

Chen, T.Y., Chen, J.T. and Chang, W.C. 2004. Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 76: 11-15.

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

Chugh, S., Guha, S. and Rao, I.U. 2009. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. Scientia Horticulturae. 122: 507-520.

Churchill, M.E., Ball, E.A. and Arditti, J. 1973. Tissue culture of orchids I. Methods for leaf tips. New Phytologist. 72: 161-166.

Dashek, W.V. 2000. Methods in Plant Electron Microscopy and Cytochemistry. Humana Press: New Jersey.

Eeuwens, C.J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explant excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured in vitro. Physiologia Plantarum. 36: 23-28.

Eng-Soon, T. 2005. Orchid of Asia. 3rd Ed. Saik Wah Press Pte Ltd.: Singapore.

Esau, K. 1964. Plant Anatomy. Toppan company: Tokyo.

Evert, R.F. 2006. Esau's Plant Anatomy: Meristem, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development. 3rd Ed. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey.

Francis, D. and Sorrell, D.A. 2001. The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. Plant Growth Regulation. 33: 1–12.

Gamborg, O. L. 1970. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. Plant Physiology. 45: 372-375.

Gnasekaran, P., Rathinam, X., Sinniah, U.R. and Subramaniam, S. 2010. A study on the use of organic additives on the protocorm-like bodies (PLBs) growth of *Phalaenopsis violacea* orchid. Journal of Phytology. 2(1): 029-033.

Gonçalves, S. and Romano, A. 2007. In vitro minimum growth for conservation of *Drosophyllum lusitanicum*. Biologia Plantarum. 51(4): 795-798.

Hew, C.S. and Clifford, P.E. 1993. Plant growth regulators and the orchid cut-flower industry. Plant Growth Regulation. 13: 231-239.

Hong, P.I., Chen, J.T. and Chang, W.C. 2008. Plant regeneration via protocorm-like body formation and shoot multiplication from seed-derived callus of a maudiae type slipper orchid. Acta Physiologiae Plantarum. 30: 755-759.

Hopkins, W.G. and Hüner, N.P.A. 2004. Introduction to Plant Physiology. 3rd Ed. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey.

Hoque, A. and Arima, S. 2002. Overcoming phenolic accumulation during callus induction and in vitro organogenesis in water chestnut (*Trapa japonica* Flerov). In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 38: 342–346.

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 Science. 166: 1443-1449.

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

Ichihashi, S. and Islam, M.O. 1999. Effects of complex organic additives on callus growth in three orchid genera, *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis* and *Neofinetia*. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 68(2): 269-274.

Ignacimuthu, S., Arockiasamy, S., Antonysamy, M. and Ravichandran, P. 1999. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature leaf explants of *Eryngium foetidum*, a condiment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 56: 131–137.

Iragi, D., Le, V.Q., Lamhamedi, M.S. and Tremblay, F.M. 2005. Sucrose utilization during somatic embryo development in black spruce: involvement of apoplastic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium. Journal of Plant Physiology. 162: 115-124.

Ishii, Y., Takamura, T., Goi, M. and Tanaka, M. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. Plant Cell Reports. 17: 446-450.

Islam, M.O., Rahman, A.R.M.M., Matsui, S. and Prodhan, A.K.M.A. 2003. Effect of complex organic extracts on callus growth and PLB regeneration through embryogenesis in the *Doritaenopsis* orchid. Japan Agricultural Research Quarterly. 37(4): 229-235.

Jalil, M., Chee, W.W., Othman, R.Y. and Khalid, N. 2008. Morphohistological examination on somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). Scientia Horticulturae. 117: 335-340.

Janarthanam, B. and Seshadri, S. 2008. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 44: 84-89.

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

Johansen, D.A. 1964. Plant Microtechnique. McGraw-Hill: New York.

Johri, M.M. and Mitra, D. 2001. Action of plant hormones. Current Science. 80: 199-205.

Karrfalt, R. 2008. Seed Testing. In: The Woody Plant Seed Manual. Bonner, F.T. and Karrfalt, R.P., Eds. The Blackburn Press, New Jersey., pp 1-24.

Kishi, F., Kagami, Y. and Takagi, K. 1997. Suitable conditions for the induction and micropropagation of PLBs in some monopodial orchids. Plant Biotechnology. 14(1): 17-21.

Knudson, L. 1946. A new nutrient for the germination of orchid seeds. American Orchid Society Bulletin. 15: 214-217.

Koch, K.E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 47: 509–540.

Kong, L., Attree, S.M., Evans, D.E., Binarova, P., Yeung, E.C. and Fowke, L.C. 1999. Somatic embryogenesis in white spurce: studies of embryo development and cell biology. In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Jain, S.M., Gupta, P.K., and Newton, R.J., Eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht., Vol. 4, pp 1-28.

Kong, Q., Yuan, S.Y. and Végvári, Gy. 2007. Micropropagation of an orchid *Dendrobium strongylanthum* Rchb.f. International Journal of Horticultural Science. 13(1): 61–64.

Kumar, S.V. and Rajam, M.V. 2005. Polyamines enhance *Agrobacterium tumefaciens vir* gene induction and T-DNA transfer. Plant Science. 168: 475–480.

Kusumoto, M. and Furukawa, J. 1977. Effect of organic matter on the growth of *Cymbidium* protocorm cultured in vitro. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 45(4): 421-426.

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

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

Lo, S.F., Nalawade, S.M., Kuo, C.L., Chen, C.L. and Tsay, H-S. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium*

tosaense Makino-A medicinally important orchid. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 40: 528-535.

Lu, M.C. 2004. High frequency plant regeneration from callus culture of *Pleione form*osana Hayata. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 78: 93-96.

Maity, S., Ray, S. and Banerjee, N. 2005. The role of plant growth regulators on direct and indirect plant regeneration from various organs of *Leucaena leucocephala*. Acta Physiologiae Plantarum. 27: 473-480.

Meesawat, U. and Kanchanapoom, K. 2002. In vitro plant regeneration through embryogenesis and organogenesis from callus culture of Pigeon Orchid (*Dendrobium crumenatum* Sw.). The Thammasat International Journal of Science and Technology. 7: 9-17.

Miller, A. 2005. Tetrazolium Testing for Flower Seeds. In: Flower Seeds: Biology and Technology. McDonald, M.B. and Kwong, F.Y., Eds. Biddles Ltd. King's Lynn., London., pp 299-309.

Mujib, A., Banerjee, S. and Ghosh, P.D. 2005. Origin, Development and structure of somatic embryo in selected bulbous ornamentals: BAP as inducer. In: Plant Cell Monographs: Somatic Embryogenesis. Mujib, A. and Šamaj, J., Eds. Springer, Heidelberg., Vol. 2, pp 15-24.

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

Owen, H.R., Wengerd, D. and Miller, A.R. 1991. Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. Plant Cell Reports. 10: 583-586.

Ozyigit, I.I., Kahraman, M.V. and Ercan, O. 2007. Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). African Journal of Biotechnology. 6: 003-008.

Pan, M.J. and van Staden, J. 1998. The use of charcoal in in vitro culture-A review. Plant Growth Regulation. 26: 155-163.

Peres, L.E.P., Zsögön, A. and Kerbauy, G.B. 2009. Abscisic acid and auxin accumulation in *Catasetum fimbriatum* roots growing in vitro with high sucrose and mannitol content. Biologia Plantarum. 53(3): 560-564.

Pierik, R.L.M. 1997. In Vitro Culture of Higher Plants. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht.

Prasertsongskun, S. and Awaesuemae, R. 2009. Effect of additive substances and planting substrate on growth development of *Aerides houlletiana* Rchb. f. seedling by tissue culture. KKU Science Journal. 37(3): 320-324.

Quiroz-Figueroa, F.R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R.M. and Loyola-Vargas V.M. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 86: 285-301.

Rahman, A.R.M.M., Islam, M.O., Prodhan, A.K.M.A. and Ichihashi, S. 2004. Effects of complex organic extracts on plantlet regeneration from PLBs and plantlet growth in the *Dortiaenopsis* Orchid. Japan Agricultural Research Quarterly. 38(1): 55-59.

Rai, M.K., Akhtar, N. and Jaiswal, V.S. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. Scientia Horticulturae. 113: 129-133.

Roy, J. and Banerjee, N. 2003. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk.f. Scientia Horticulturae. 97: 333-340.

Roy, J., Naha, S., Majumdar, M. and Banerjee, N. 2007. Direct and callus-mediated protocorm-like body induction from shoot-tips of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. (Orchidaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 90: 31-39.

Ruzin, S. 1999. Plant Microtechnique and Microscopy. Oxford University Press: New York.

Schenk, N., Hsiao, K.C. and Bornman, C.H. 1991. Avoidance of precipitation and carbohydrate breakdown in autoclaved plant tissue culture media. Plant Cell Reports. 10: 115-119.

Schumann, G., Ryschka, U., Schulze, J. and Klocke, E. 1995. Anatomy of somatic embryogenesis. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry 30: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Bajaj, Y.P.S., Ed. Springer, Heidelberg., Vol. 30, pp 71-86.

Sinha, P., Hakim, M.L. and Alam, M.F. 2009. In vitro mass clonal propagation of *Spathoglottis plicata* Blume. Plant Tissue Culture and Biotechnology. 19(2): 151-160.

Teixeira da Silva, J.A. and Tanaka, M. 2006. Multiple regeneration pathways via thin cell layers in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). Journal of Plant Growth Regulation. 25: 203-210.

Thomas, C. and Jiménez, V.M. 2005. Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: Molecular aspects. In: Plant Cell Monographs: Somatic Embryogenesis. Mujib, A. and Šamaj, J., Eds. Springer, Heidelberg., Vol. 2, pp 157-175.

Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E.C., de Klerk G-J., Roberts A. and George E.F. 2008. The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects and support system. In: Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Ed. George, E.F., Hall M.A., and de Klerk, G-J., Eds. Springer, Dordrecht., Vol. 1, pp 115-175.

Tokuhara, K. and Mill, M. 2001. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 37: 457-461.

Tokuhara, K. and Mill, M. 2003. Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchid by adjusting carbohydrate sources. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 39: 635-639.

Vacin, E. and Went, F. 1949. Some pH changes in nutrient solution. Botanical Gazette. 110: 605-613.

Vatanpour-Azghandi, A., Villiers, T.A., Ghorbani, A.M. and Tajabadi, A. 2002. The microscopy of tissue decolouration and browning problem in pistachio callus cultures. Acta Horticulturae. 591: 377-388.

Vinterhalter, B., Ninkovic, S., Cingel, A. and Vinterhalter, D. 2006. Shoot and root culture of *Hypericum perforatum* L. transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS. Biologia Plantarum. 50(4): 767-770.

Vujanovic, V., St-Arnaud, M., Barabé, D. and Thibeault, G. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. Annals of Botany. 86: 79-86.

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

Zhao, P., Wu, F., Feng, F.S. and Wang, W.J. 2008. Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall *ex* Lindl. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 44: 178-185.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949)

สารเคมี	ปริมาณ (mg/l)
$(NH_4)_2SO_4$	500
$MgSO_4.7H_2O$	250
KNO_3	525
KH_2PO_4	250
$MnSO_4.4H_2O$	7.5
$Ca_3(PO_4)_2$	200
FeNa-EDTA	37
Thiamine-HCl	0.4
Sucrose	20,000

หมายเหตุ: การศึกษาครั้งนี้ใช้อาหารสูตรดัดแปลง VW ซึ่งอยู่ระหว่างขั้นตอนพิจารณาการจดสิทธิบัตร

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

สารเคมี	ปริมาณ (mg/l)
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	6.9
$ZnSO_4.7H_2O$	6.14
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Na_2-EDTA	37.25
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Sucrose	30,000

หมายเหตุ: การศึกษาครั้งนี้ใช้อาหารสูตรดัดแปลง MS ซึ่งอยู่ระหว่างขั้นตอนพิจารณาการจดสิทธิบัตร

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีพาราฟิน

1. เก็บตัวอย่าง โดยแช่น้ำยาคงสภาพสูตร FAA II เป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดเวลา ล้างชิ้นตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 70 %

2. ดึงน้ำออกจากเซลล์ เพื่อทำให้ชิ้นส่วนตัวอย่างปราศจากน้ำด้วยสารละลาย tertiary butyl alcohol (TBA) จากระดับความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูง (ตารางที่ 3) โดยเริ่มต้นจากน้ำยาเบอร์ที่ 6 เป็นต้นไป แต่ละขั้นตอนแช่ตัวอย่างไว้ 2 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 สูตรน้ำยาดึงน้ำออกจากเซลล์พืช 12 ขั้นตอน

NO.	Total alcohol (%)	Composition (ml)				
		TBA	Ethanol		Water	Other
			95% alcohol	Absolute alcohol		
1	5	-	5	-	95	
2	10	-	10	-	90	
3	20	-	20	-	80	
4	30	-	30	-	70	
5	50	10	40	-	50	
6	70	20	50	-	30	-
7	85	35	50	-	15	-
8	95	55	40	-	5	-
9	100	75	-	25	-	-
10	100	pure	-	-	-	eosin
11	-	pure	-	-	-	-
12	-	50	-	-	-	Paraffin oil (50 ml)

3. เทพาราฟินเหลวลงในขวดชิ้นส่วนตัวอย่างที่แช่อยู่ในน้ำยาเบอร์ที่ 12 (อัตราส่วน 1:1) เก็บในตู้หลอมพาราฟิน ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง

4. เมื่อครบกำหนดเวลา เทส่วนผสมของพาราฟินเหลวและน้ำยาเบอร์ที่ 12 ออกจากขวด แล้วใส่พาราฟินเหลวใหม่ลงไปแทน เก็บในตู้หลอมพาราฟิน ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง เพื่อให้พาราฟินแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ของตัวอย่าง

5. นำชิ้นส่วนตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการต่างๆ ข้างต้นแล้ว ฝังในพาราฟินแข็ง โดยใช้เครื่องฝังเนื้อเยื่อ

6. นำชิ้นส่วนตัวอย่างที่ฝังอยู่ในบล็อกพาราฟิน ตัดให้เป็นชิ้นบางๆ ที่ความหนาประมาณ 6 - 8 ไมโครเมตร ด้วยเครื่องไมโครโทม ซึ่งชิ้นส่วนบางแต่ละชิ้นที่ได้จะติดกันเป็นแถบยาว (ribbon)

7. ใช้มีดโกนตัดแบ่งแถบชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ได้จากการตัดด้วยเครื่องไมโครโทม โดยให้มีความยาวเหมาะสมกับความยาวของแผ่นสไลด์ แล้วนำไปลอยในอ่างลอยเนื้อเยื่อ เพื่อให้แถบชิ้นบางแผ่ออก

8. ใช้แผ่นสไลด์ช้อนแถบชิ้นบางที่แผ่ออกแล้วขึ้นจากอ่างลอยเนื้อเยื่อ

9. วางแผ่นสไลด์ที่ได้บนเครื่องอุ่นสไลด์หรือเก็บในตู้อบ เพื่อให้แห้งสนิท พร้อมสำหรับการย้อมสีต่อไป

ขั้นตอนการละลายพาราฟินออก (deparaffinization) และการเอาน้ำเข้าสู่เซลล์

นำแผ่นสไลด์ที่มี paraffin section ติดอยู่ แช่ในสารละลายตามลำดับ ดังนี้

1.	xylene I	3	นาที
2.	xylene II	3	นาที
3.	absolute alcohol : xylene	3	นาที
4.	absolute alcohol I	2	นาที
5.	absolute alcohol II	2	นาที
6.	95% alcohol I	2	นาที
7.	95% alcohol II	2	นาที
8.	70% alcohol I	2	นาที
9.	70% alcohol II	2	นาที
10.	50% alcohol I	2	นาที

11. 50% alcohol II 2 นาที

เมื่อละลายพาราฟินแล้วจึงนำไปย้อมสีตามวิธีการย้อมแต่ละแบบ

ขั้นตอนการย้อมสี

1. วิธี Delafield's hematoxylin and safranin staining (Johansen, 1964; Ruzin, 1999) มีขั้นตอน ดังนี้

1.1 deparaffinization แล้วนำสไลด์แช่ในน้ำประปา

1.2 ย้อมด้วยสี Delafield's hematoxylin 20 นาที

1.3 ล้างสีด้วยน้ำประปา 2 นาที

1.4 ล้างสีส่วนเกิน (destaining) ใน acidulate water 12 จุ่ม

1.5 จุ่มในน้ำประปาทันที เพื่อหยุดการเอาสีออกมากเกินไป

1.6 จุ่มลงในน้ำประปาที่มีสารละลาย lithium carbonate 2 นาที

1.7 จุ่มลงในน้ำประปา เพื่อล้างสารละลาย lithium carbonate

1.8 ย้อมด้วยสี safranin 3 นาที

1.9 ล้างด้วยน้ำประปา เพื่อเอาสีส่วนเกินออก

1.10 จุ่มอย่างเร็วใน acidulated water 1 - 2 วินาที

1.11 จุ่มทันทีในน้ำประปาที่มีสารละลาย lithium carbonate

1.1.2 ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วย alcohol-xylol series และแช่ใน absolute alcohol : xylene ตามลำดับ

1.13 แช่ xylene I และ xylene II

1.14 mounting ด้วย Hi-mo

2. วิธี safranin and fast green staining (Ruzin, 1999) มีขั้นตอน ดังนี้

<u>Deparaffinization and staining I</u>

2.1 deparaffinization แล้วแช่สี safranin อย่างน้อย 24 ชั่วโมง

2.2 ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

<u>Dehydration</u>

2.3 ดึงน้ำออกจากเซลล์ ตามลำดับ

I จุ่มลงในสารละลาย 0.5% picric acid ใน 95% ethyl alcohol 10 วินาที เพื่อให้เกิด safranin differentiation

II จุ่มลงในสารละลาย ammomium hydroxide ใน 95% ethyl alcohol 10 วินาที - 1 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ picric acid

III จุ่มลงใน absolute alcohol 10 วินาที

IV จุ่มลงใน absolute alcohol 10 วินาที

Staining II

2.4 หยด used cloved oil fast green

หยด fast green 10 - 15 วินาที

หยด used cloved oil fast green

หยด new clove oil

2.5 แช่ใน absolute alcohol : xylene (1:1)

2.6 แช่ใน xylene 2 ครั้ง

2.7 mounting ด้วย Hi-mo

ขั้นตอนการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด

1. เก็บตัวอย่าง โดยแช่ตัวอย่างใน SEM fixative ที่อุณหภูมิ 4°C นานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

2. เมื่อครบกำหนดเวลา ล้างตัวอย่างด้วย 0.1 phosphate buffer (pH 7.2) จำนวน 3 ครั้ง

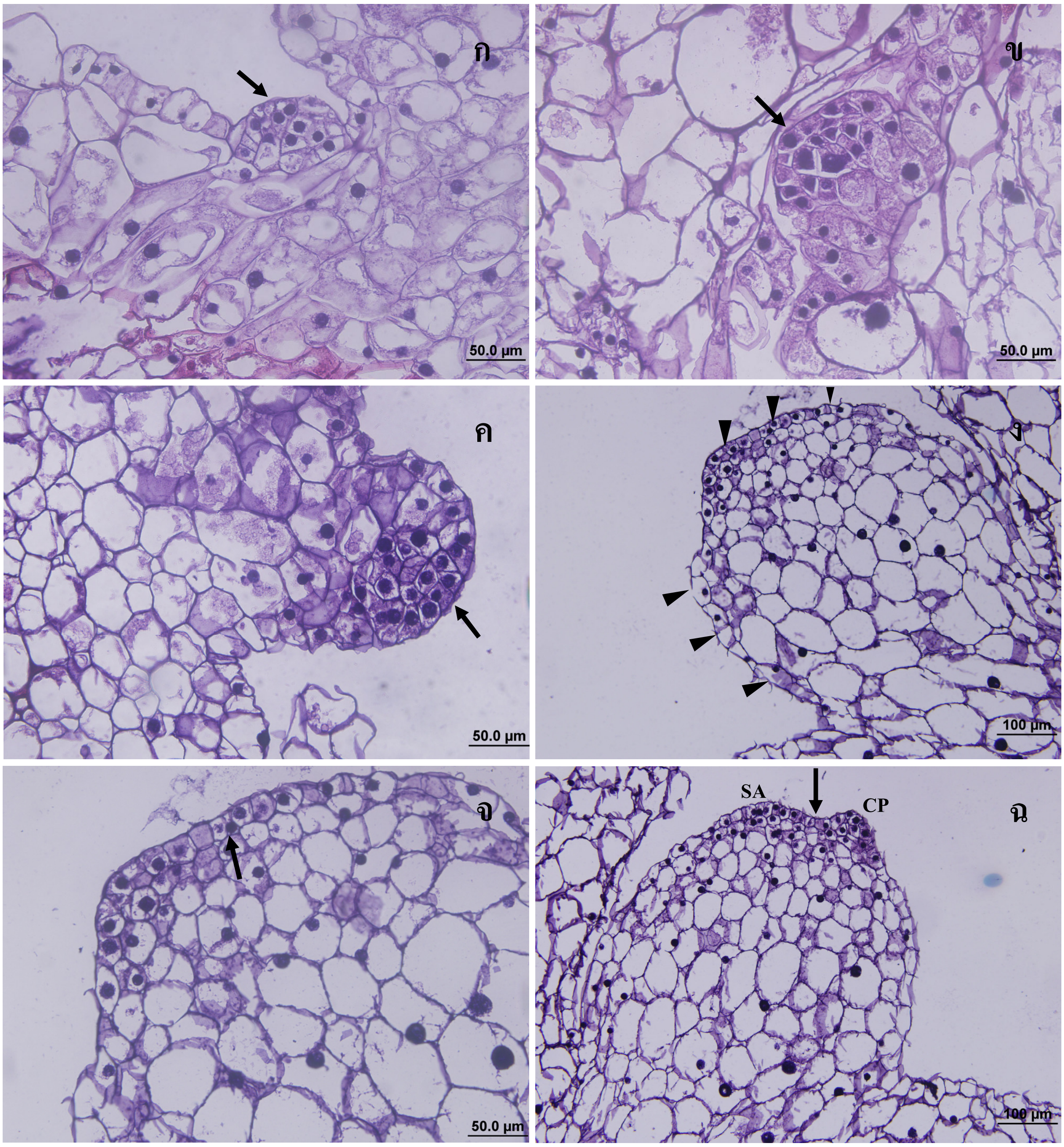
3. กำจัดน้ำออกจากเซลล์ โดยใช้หลักการแทนที่น้ำด้วยสารละลายอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ระเหยง่าย เช่น แอลกอฮอล์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นลำดับ คือ 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% และ 100% ขั้นตอนละ 2 ครั้ง ครั้งละ 10 - 15 นาที

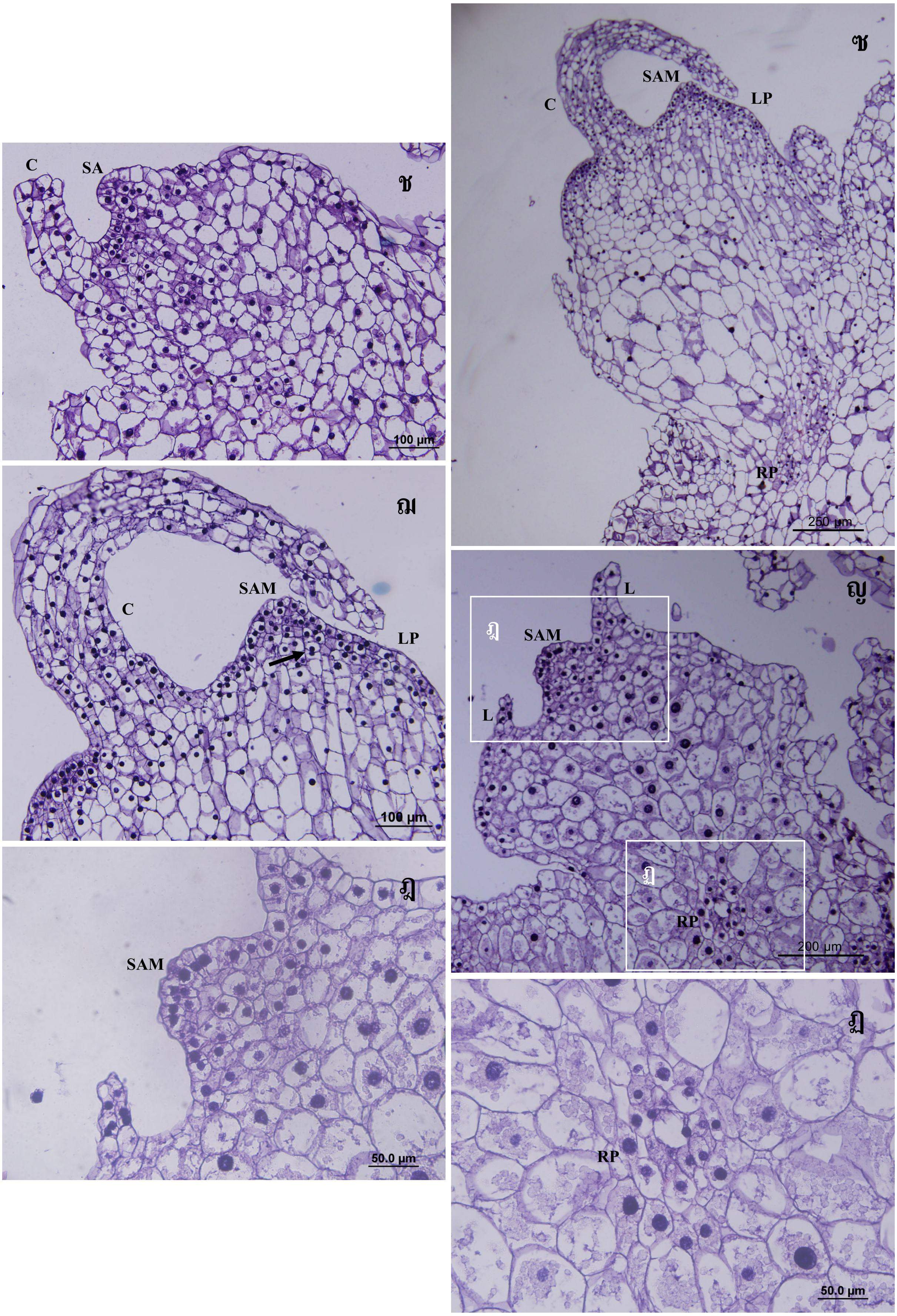
4. นำตัวอย่างมาผ่านขั้นตอนการทำแห้งด้วยเครื่องทำตัวอย่างให้แห้ง ณ อุณหภูมิวิกฤต (critical point dryer; CPD) เพื่อปรับสภาพตัวอย่างให้แห้ง ณ อุณหภูมิวิกฤตของคาร์บอนไดออกไซด์เหลว (liquid CO_2) หลังจากผ่านกระบวนการกำจัดน้ำออก

5. ใช้กรรไกรตัดเทปกาวคาร์บอนเป็นชิ้นๆ แล้วนำไปติดบนแท่นวางตัวอย่าง (stub) ให้แนบสนิท หลังจากนั้นวางตัวอย่างบนแท่นวางตัวอย่าง

6. นำตัวอย่างไปฉาบผิวด้วยทอง (coating) โดยใช้เครื่องฉาบทอง (carbon coater) เพื่อเพิ่มสมบัติการนำไฟฟ้าให้กับตัวอย่าง โดยในขั้นตอนการเคลือบต้องกระทำภายใต้ภาวะสุญญากาศ และให้กระแสไฟฟ้าที่เหมาะสม เพื่อเปลี่ยนสภาพของแท่งโลหะไปเป็นโมเลกุลและตกลงบนผิวตัวอย่างได้เป็นเนื้อเดียวกัน พร้อมสำหรับดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด

ภาคผนวก ค




C
SA
ช
100 µm
ซ
SAM
C
LP
RP
250 µm
ฌ
SAM
C
LP
100 µm
ญ
L
ฎ
SAM
L
ฎ
RP
200 µm
ฎ
SAM
50.0 µm
ฎ
RP
50.0 µm

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะทางกายวิภาคการเจริญเติบโตของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อเจริญเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA 0.1 มก./ล. และ TDZ 0.5 มก./ล. ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 10 ก./ล. (ก-ฉ) หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 1 เดือน (ช-ฌ) หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน (ญ-ฏ) หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 3 เดือน โดยแสดงดังนี้ คือ (ก) กลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเอ็มบริโอระยะ 12 เซลล์ (ลูกศรชี้) (Bar = 50 ไมโครเมตร) (ข) กลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเอ็มบริโอระยะหลายเซลล์ (ลูกศรชี้) (Bar = 50 ไมโครเมตร) (ค) กลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเอ็มบริโอ หรือโซมาติกเอ็มบริโอระยะก่อนรูปร่างกลม (ลูกศรชี้) (Bar = 50 ไมโครเมตร) (ง) โซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปร่างกลม มีเซลล์ชั้นเนื้อเยื่อเจริญกำเนิดผิวแสดงแนวขอบเขตของโซมาติกเอ็มบริโออย่างชัดเจน (แนวหัวลูกศร) (Bar = 100 ไมโครเมตร) (จ) เซลล์ชั้นเนื้อเยื่อเจริญกำเนิดผิวแบ่งตัวในแนวตั้งฉากกับผิวเซลล์ (ลูกศรชี้) (Bar = 50 ไมโครเมตร) (ฉ) การเกิดรอยกด (ลูกศรชี้) ของโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปร่างกลมจะกำหนดขอบเขตของส่วนปลายยอด (shoot apex; SA) และจุดกำเนิดใบเลี้ยง (cotyledon primordium; CP) (Bar = 100 ไมโครเมตร) (ช-ซ) ใบเลี้ยง (cotyledon; C) ยืดยาวออก เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (shoot apical meristem; SAM) นูนขึ้น และเกิดจุดกำเนิดใบ (leaf primordium; LP) (ช. Bar = 100 ไมโครเมตร; ซ. Bar = 200 ไมโครเมตร) (ฌ) เซลล์ชั้นในของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดแบ่งตัวในแนวขนานกับผิวเซลล์ (ลูกศรชี้) เพื่อการเจริญเติบโตทางด้านความสูง (Bar = 100 ไมโครเมตร) (ญ) โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่มีใบ เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และจุดกำเนิดราก (root primordium; RP) (Bar = 200 ไมโครเมตร) (ฎ-ฏ) ภาพขยายของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดและจุดกำเนิดราก ตามลำดับ (ฎ. Bar = 50 ไมโครเมตร; ฏ. Bar = 50 ไมโครเมตร)

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS

วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		M3	LG10_M3
N		125	8
Normal Parameters[a]	Mean	.5714	.9290
	Std. Deviation	2.33051	.13949
Most Extreme Differences	Absolute	.533	.455
	Positive	.533	.455
	Negative	-.403	-.295
Kolmogorov-Smirnov Z		5.957	1.288
Asymp. Sig. (2-tailed)		.000	.072

a. Test distribution is Normal.

Duncan

treat ment	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	14	.0000		
2	14	.0000		
4	14	.0000		
7	14	.0000		
8	13	.0000		
9	14	.0000		
3	14	.5100	.5100	
6	14		2.0407	2.0407
5	14			2.5507
Sig.		.608	.069	.543

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทคอร์ม

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		M3
N		125
Normal Parameters[a]	Mean	32.9138
	Std. Deviation	1.8432E1
Most Extreme Differences	Absolute	.104
	Positive	.104
	Negative	-.071
Kolmogorov-Smirnov Z		1.160
Asymp. Sig. (2-tailed)		.136

a. Test distribution is Normal.

Duncan

treat ment	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
5	14	22.9579		
8	13	28.0215	28.0215	
1	14	28.5714	28.5714	
7	14	30.1014	30.1014	
3	14	31.1207	31.1207	31.1207
9	14	35.2036	35.2036	35.2036
4	14	35.7143	35.7143	35.7143
6	14		38.7757	38.7757
2	14			45.4079
Sig.		.109	.179	.062

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของน้ำหนักสดของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		PLBmg	LG10mg
N		56	7
Normal Parameters[a]	Mean	27.3750	2.2505
	Std. Deviation	9.5144E1	.27697
Most Extreme Differences	Absolute	.488	.291
	Positive	.488	.291
	Negative	-.387	-.119
Kolmogorov-Smirnov Z		3.653	.770
Asymp. Sig. (2-tailed)		.000	.594

a. Test distribution is Normal.

Duncan

treat ment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	7	.0000	
5	7	.0000	
6	7	.0000	
7	7	.0000	
8	7	.0000	
4	7	28.0000	
3	7	48.1429	48.1429
2	7		142.8571
Sig.		.387	.051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ 10 มิลลิกรัม

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		shoot
N		18
Normal Parameters[a]	Mean	43.3617
	Std. Deviation	4.7349E1
Most Extreme Differences	Absolute	.272
	Positive	.272
	Negative	-.202
Kolmogorov-Smirnov Z		1.152
Asymp. Sig. (2-tailed)		.140

a. Test distribution is Normal.

Multiple Comparisons

shoot
LSD

(I) treatment	(J) treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-23.04550	30.58630	.465	-89.1232	43.0322
	3	-41.49133	33.29815	.235	-113.4276	30.4449
	4	-72.92467*	33.29815	.047	-144.8609	-.9884
	5	-15.11467	33.29815	.657	-87.0509	56.8216
2	1	23.04550	30.58630	.465	-43.0322	89.1232
	3	-18.44583	34.82404	.605	-93.6786	56.7869
	4	-49.87917	34.82404	.176	-125.1119	25.3536
	5	7.93083	34.82404	.823	-67.3019	83.1636
3	1	41.49133	33.29815	.235	-30.4449	113.4276
	2	18.44583	34.82404	.605	-56.7869	93.6786
	4	-31.43333	37.22846	.414	-111.8605	48.9939
	5	26.37667	37.22846	.491	-54.0505	106.8039
4	1	72.92467*	33.29815	.047	.9884	144.8609
	2	49.87917	34.82404	.176	-25.3536	125.1119
	3	31.43333	37.22846	.414	-48.9939	111.8605
	5	57.81000	37.22846	.144	-22.6172	138.2372
5	1	15.11467	33.29815	.657	-56.8216	87.0509
	2	-7.93083	34.82404	.823	-83.1636	67.3019
	3	-26.37667	37.22846	.491	-106.8039	54.0505
	4	-57.81000	37.22846	.144	-138.2372	22.6172

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของจำนวนรากเฉลี่ยต่อโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ 10 มิลลิกรัม

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		root	LG10
N		18	8
Normal Parameters[a]	Mean	.9444	.1299
	Std. Deviation	1.61690	.46797
Most Extreme Differences	Absolute	.386	.321
	Positive	.386	.321
	Negative	-.280	-.217
Kolmogorov-Smirnov Z		1.638	.909
Asymp. Sig. (2-tailed)		.009	.380

a. Test distribution is Normal.

Duncan

treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2	4	.1250	
3	3	.1667	
1	5	.8000	.8000
4	3	1.0000	1.0000
5	3		3.0000
Sig.		.475	.079

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวปวีณา แก้วอุบล

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5110220042

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2550

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

โครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย)

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ปวีณา แก้วอุบล และอุปถัมภ์ มีสวัสดิ์. 2552. การชักนำแคลลัสของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.) ให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้และต้นในหลอดทดลอง. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35. เดอะไทด์ รีสอร์ท จังหวัดชลบุรี (บางแสน). 15-17 ตุลาคม 2552. หน้า 82.

Kaewubon, P., Sangdam, S., Thammasiri, K. and Meesawat, U. Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis from Callus-derived PLBs of Tropical Slipper Orchid (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.). *(Accepted for publication in Floriculture and Ornamental Biotechnology)*