บทความวิจัย

ผลของสูตรอาหารและไซโตไคนินต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำในสภาพปลอดเชื้อ

เจนจิรา พานแก้ว บวร คุณากรนุรักษ์ และ อนุพันธ์ กงบังเกิด

ได้รับบทความ: 12 มีนาคม 2562
ได้รับบทความแก้ไข: 7 มิถุนายน 2562
ยอมรับตีพิมพ์: 13 มิถุนายน 2562

บทคัดย่อ

กล้วยไม้น้ำ จัดเป็นกล้วยไม้ที่มีชีพลักษณ์พิเศษแตกต่างจากกล้วยไม้ชนิดอื่นๆ สามารถอาศัยและแพร่กระจายพันธุ์ในลำธารและรอดชีวิตใต้กระแสน้ำได้เป็นเวลานานหลายเดือน จากการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ถิ่นอาศัยและสภาพแวดล้อมในปัจจุบันทำให้ประชากรกล้วยไม้น้ำมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้น การขยายพันธุ์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการอนุรักษ์จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำบนสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน พบว่า อาหารกึ่งแข็งดัดแปลงสูตร Vacin and Went สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มมีอัตราการรอดชีวิตรวมไปถึงการเจริญเติบโตและมีพัฒนามากที่สุด เมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ นอกจากนี้การใช้ไซโตไคนินร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงสามารถทำให้โปรโตคอร์มมีการตอบสนองที่แตกต่างกันออกไป พบว่า โปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 mg/l สามารถสร้างตายอดใหม่เพิ่มขึ้นมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตามอาการฉ่ำน้ำเกิดขึ้นมากกว่า 60% ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่เติม BA หรือ TDZ และนอกจากนี้ยังพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม Zeatin ความเข้มข้น 2.0 mg/l สามารถกระตุ้นให้ตายอดพัฒนาไปเป็นยอดใหม่ได้มากที่สุด

คำสำคัญ: กล้วยไม้น้ำ สารควบคุมการเจริญเติบโต อาหารเพาะเลี้ยง โปรโตคอร์ม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก 65000
*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, email: anupank@nu.ac.th

Effect of culture media on growth and development of *in vitro Epipactis flava* Seidenf. protocorms

Jenjira Phankaew, Boworn Kunakhonnuruk and Anupan Kongbangkerd*

Received: 12 March 2019
Revised: 7 June 2019
Accepted: 13 June 2019

ABSTRACT

Epipactis flava Seidenf. has a special phenology of orchid different from other species. The distribution of *E. flava* are widespread in specific habitat and it can survive under water stream throughout the rainy season. Currently, *E. flava* has been affected from the change of natural habitat and environment. So, ex situ conservation of *E. flava* via in vitro culture method was necessary. The cultivation of *E. flava* protocorms was carried out on different culture media. The results revealed that modified Vacin and Went was the best culture medium to promote growth and development of *E. flava* protocorm. Furthermore, the addition of cytokinins into medium had differently affected to protocorm response. Although, 0.5 mg/l BA was the most suitable concentration of cytokinin on new shoot bud formation but protocorms shown higher percentage of hyperhydricity than 60% after cultured on the medium added with BA and TDZ. On the other hand, the maximum of new shoot formation was obtained from 2.0 mg/l of Zeatin.

Keywords: Epipactis flava Seidenf., Plant growth regulators, Culture media, Protocorm

Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000
*Corresponding, email: anupank@nu.ac.th

บทนำ

กล้วยไม้น้ำ เป็นกล้วยไม้ป่าชนิดหนึ่งที่มีการเจริญเติบโตและกระจายพันธุ์เฉพาะถิ่นในบริเวณลำธารหรือน้ำตกบริเวณจังหวัดตาก กาญจนบุรี [1] ปัจจุบันกล้วยไม้น้ำถูกจัดให้อยู่ในสถานภาพที่ใกล้สูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติ [2] เนื่องจากพื้นที่อยู่อาศัยที่จำกัด รวมไปถึงสภาพแวดล้อมถิ่นที่อยู่อาศัยถูกบุกรุกจากการเกษตรและอุตสาหกรรม ส่งผลให้ประชากรของกล้วยไม้น้ำในแหล่งพื้นที่ดังกล่าวลดลงอย่างต่อเนื่อง จากการศึกษาของ บวร คุณากรนุรักษ์ [3] ประสบความสำเร็จเป็นเบื้องต้นในการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้น้ำโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเป็นแนวทางในการช่วยอนุรักษ์กล้วยไม้น้ำนอกถิ่นที่อยู่อาศัย ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ สามารถชักนำให้การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงแตกต่างกันออกไปด้วย [4] รวมไปถึงการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชบางชนิดโดยเฉพาะกลุ่มไซโตไคนินที่สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงเกิดการเปลี่ยนแปลงสร้างอวัยวะขึ้นมาใหม่ได้ด้วย [5] แต่อย่างไรก็ตาม จากรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้น้ำดังกล่าวยังไม่พบการศึกษาถึงผลของสูตรอาหารที่แตกต่างกันร่วมไปถึงสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำมาก่อน ดังนั้น งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลขององค์ประกอบของธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองที่แตกต่างกัน รวมไปถึงสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มไซโตไคนินที่ต่างชนิดกันต่อการพัฒนาเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของโปรโตคอร์ม กล้วยไม้น้ำในสภาพปลอดเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ผลของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำ

คัดเลือกโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำจากในสภาพปลอดเชื้อ ที่มีความแข็งแรง มีลักษณะกลม ขนาดประมาณ 0.1 มิลลิเมตร ย้ายลงเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) [6], Modified Vacin and Went (VW) [7] ที่ดัดแปลงเติมน้ำมะพร้าวอ่อน 100 ml/l ร่วมกับน้ำต้มมันฝรั่ง 50 g/l, BM Terrestrial Orchid Medium (BM) [8] และ Malmgren Modified Terrestrial Orchid Medium (MM) [9] โดยแต่ละสูตรปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.7, 5.2, 5.5 และ 5.75 ตามลำดับ เติมผงวุ้น 7.5 g/l และนำไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 ˚C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มจำนวน 4 ชิ้นในขวดขนาด 4 ออนซ์ ที่บรรจุอาหารกึ่งแข็งปริมาตร 20 ml ทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 20 ขวดต่อสูตรอาหารเพาะเลี้ยง

ผลของไซโตไคนินต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำ

คัดเลือกโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำจากในสภาพปลอดเชื้อ ที่มีความแข็งแรง ลักษณะกลม ขนาดประมาณ 0.1 มิลลิเมตร ย้ายเลี้ยงลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลอง ร่วมกับการใช้ไซโตไคนินชนิดและระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ BA, Zeatin และ Kinetin ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/l และ TDZ ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/l ปรับค่าความเป็นกรดด่างตามชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่ดีที่สุด เติมผงวุ้น 7.5 g/l ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 ˚C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มจำนวน 1 โปรโตคอร์ม ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 2 ออนซ์ ที่บรรจุปริมาตรอาหาร 10 ml ทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 20 ขวดต่อสูตรอาหารเพาะเลี้ยง

จากนั้นนำไปเลี้ยงไว้ในห้องควบคุมอุณภูมิ 25 ± 2 °C ที่ได้รับแสงสว่างจากหลอด Warm white ความเข้มแสง 40 μmol/m^2/s เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานต่างๆ ของโปรโตคอร์ม เมื่อระยะเวลาผ่านไป 12 สัปดาห์ วางแผนแบบสุ่มตลอด (CRD) และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลอง

ผลของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำ

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำบนอาหารสูตรที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า โปรโตคอร์มสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาบนอาหารสูตรต่างๆ ได้แตกต่างกันออกไป โดยอาหารกึ่งแข็งดัดแปลงสูตร VW สามารถส่งเสริมให้อัตราการรอดชีวิตเกิดขึ้นสูงที่สุด (68.1%) และพบว่าอาหารสูตรดังกล่าวยังสามารถชักนำให้โปรโตคอร์มสร้างตายอด (1.6 ตายอด) ยอด (2.2 ยอด) ความสูงยอด (0.9 cm) จำนวนรากที่ยาวมากกว่า 0.5 cm (9.9 รากต่อโปรโตคอร์ม) และจำนวนใบเฉลี่ยต่อยอด (3.2 ใบต่อยอด) เพิ่มขึ้นสูงที่สุด ขณะที่อาหารกึ่งแข็งสูตร BM MS และ MM สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มมีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่า 50 % (ตารางที่ 1 และรูปที่ 1)

ตารางที่ 1 การเจริญเติบโตและพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ เมื่ออายุเพาะเลี้ยง ครบ 12 สัปดาห์

อาหารเพาะเลี้ยง	อัตราการรอด (%)	จำนวน/โปรโตคอร์ม		ความสูงยอด	จำนวนราก		จำนวนใบ / ยอด
		ตายอด	ยอด	(cm)	≤ 0.5 cm	> 0.5 cm	
VW	68.1	$1.6 \pm 0.2^{a*}$	2.2 ± 0.2^{a}	0.9 ± 1.5^{a}	1.0 ± 0.2^{b}	9.9 ± 1.2^{a}	3.2 ± 0.1^{a}
BM	44.9	1.2 ± 0.0^{ab}	1.4 ± 0.1^{b}	0.4 ± 0.0^{b}	2.0 ± 0.1^{a}	1.7 ± 0.1^{b}	2.3 ± 0.0^{b}
MS	41.2	1.5 ± 0.1^{ab}	1.4 ± 0.0^{b}	0.4 ± 0.0^{b}	1.9 ± 0.1^{ab}	1.7 ± 0.1^{b}	2.4 ± 0.1^{b}
MM	24.6	0.6 ± 0.0^{b}	1.0 ± 0.0^{b}	0.3 ± 0.0^{b}	1.2 ± 1.0^{ab}	0.6 ± 0.1^{b}	1.9 ± 0.1^{c}

หมายเหตุ:*ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

รูปที่ 1 การเจริญเติบโตและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งดัดแปลงสูตร Vacin and Went (1949) (ก), BM Terrestrial Orchid Medium (ข), Murashige and Skoog (1962) (ค) และ Malmgren Modified Terrestrial Orchid Medium (ง) ที่อายุเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ (Bar = 1 cm)

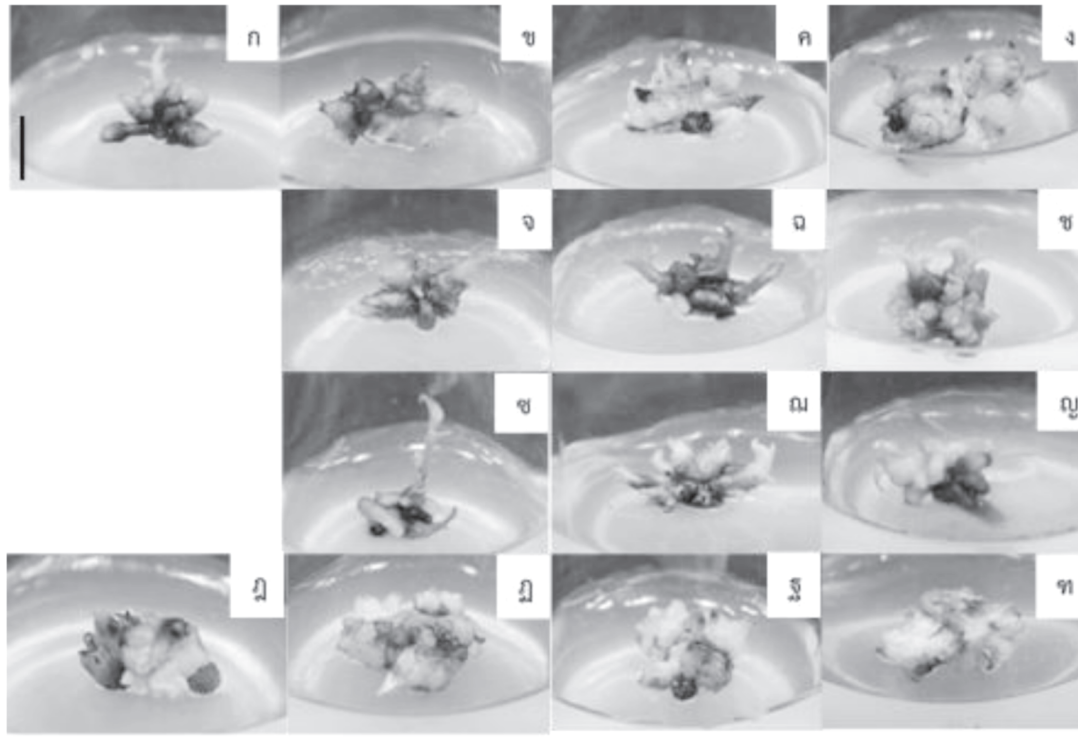
ผลของไซโตไคนินต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำ

จากผลการทดลองก่อนหน้า พบว่า อาหารกึ่งแข็งดัดแปลงสูตร VW สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำ เจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุด ดังนั้น จึงใช้อาหารสูตรดังกล่าวและเติมชนิดและระดับความเข้มข้นของไซโตไคนินแตกต่างกัน ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินสามารถชักนำให้โปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำเกิดการเจริญและเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานแตกต่างกันออกไป โดย อาหารสูตรที่เติม 0.5 mg/l BA สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มสร้างตายอดใหม่เพิ่มขึ้นมากที่สุด (3.9 ตายอด) อย่างไรก็ตาม เมื่อระดับความเข้มข้นของ BA และ TDZ เพิ่มขึ้น อัตราการสร้างตายอดใหม่ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำมีแนวโน้มลดน้อยลง ขณะที่อาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BA หรือ TDZ ไม่สามารถกระตุ้นให้ตายอดพัฒนายืดยาวไปเป็นยอดใหม่ได้ นอกจากนี้จำนวนรากเฉลี่ยของโปรโตคอร์มเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตรที่ไม่เติมไซโตไคนินหรือเติม Zeatin หรือ Kinetin อีกทั้งยังพบว่าอัตราการฉ่ำน้ำของเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นมากกว่า 60 % เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA หรือ TDZ (ตารางที่ 2 และรูปที่ 2)

ตารางที่ 2 การเจริญเติบโตและพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำบนอาหารกึ่งแข็งดัดแปลงสูตร VW ที่เติมไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นแตกต่างกัน ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

ไซโตไคนิน	ความเข้มข้น (mg/l)	จำนวนเฉลี่ย / โปรโตคอร์ม				อัตราการฉ่ำน้ำ (%)
		ตายอด	ยอด	ราก	ใบ	
-	0.0	1.9±0.4^{bc*}	0.7±0.2^{ab}	1.5±0.3^{a}	0.9±0.2^{a}	0.0±0.0^{c}
BA	0.5	3.9±0.2^{a}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{b}	77.7±17.0^{ab}
	1.0	3.0±0.5^{ab}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{b}	86.1±6.0^{ab}
	2.0	2.4±0.4^{bc}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{b}	64.3±18.0^{b}
Zeatin	0.5	2.3±0.7^{bc}	1.2±1.0^{ab}	0.9±0.7^{ab}	0.9±0.6^{a}	0.0±0.0^{c}
	1.0	3.1±0.4^{ab}	1.0±0.5^{ab}	0.6±0.6^{ab}	0.8±0.1^{ab}	0.0±0.0^{c}
	2.0	2.6±0.5^{abc}	1.4±0.6^{a}	0.9±0.9^{ab}	0.6±0.4^{ab}	0.0±0.0^{c}
Kinetin	0.5	1.7±0.3^{bc}	0.5±0.4^{ab}	0.6±0.3^{ab}	0.5±0.3^{ab}	0.0±0.0^{c}
	1.0	1.7±0.3^{bc}	0.5±0.4^{ab}	0.7±0.3^{ab}	0.7±0.2^{ab}	0.0±0.0^{c}
	2.0	2.1±0.4^{bc}	1.0±0.3^{ab}	0.3±0.1^{b}	1.0±0.2^{a}	0.0±0.0^{c}
TDZ	0.1	3.0±0.5^{ab}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{b}	90.2±5.2^{a}
	0.5	2.6±0.8^{abc}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{b}	93.3±3.9^{a}
	1.0	2.6±0.1^{abc}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{b}	73.3±8.3^{ab}
	2.0	1.3±0.2^{c}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{b}	97.0±3.0^{a}

หมายเหตุ: *ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่ไม่เติมไซโตไคนิน (ก) และเติม BA ความเข้มข้น 0.5 (ข), 1.0 (ค) และ 2.0 (ง) mg/l; Zeatin ความเข้มข้น 0.5 (จ), 1.0 (ฉ) และ 2.0 (ช) mg/l; Kinetin ความเข้มข้น 0.5 (ซ), 1.0 (ฌ) และ 2.0 (ญ) mg/l และ TDZ ความเข้มข้น 0.1 (ฎ), 0.5 (ฏ), 1.0 (ฐ) และ 2.0 (ฑ) mg/l ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (Bar = 0.5 cm)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำลงบนอาหารที่ประกอบด้วยธาตุหารแตกต่างกัน พบว่า อาหารกึ่งแข็งดัดแปลงสูตร VW เป็นอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมมากที่สุด สำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำในสภาพปลอดเชื้อ โดยมีอัตราการรอดชีวิต การสร้างตายอด ยอดใหม่ ความสูงยอด จำนวนใบ และจำนวนราก เพิ่มขึ้นสูงที่สุด อาจเนื่องมาจากอาหารสูตรดังกล่าวประกอบด้วยจำนวนธาตุอาหารและความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการดูดซึมมากกว่าอาหารสูตรอื่นๆ จึงส่งผลให้โปรโตคอร์มหรือต้นอ่อนของกล้วยไม้สามารถนำธาตุอาหารดังกล่าวไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากรายงานของอนุพันธ์ กงบังเกิด [10] ได้ศึกษาผลขององค์ประกอบอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องคำผักปราบ *(Dendrobium ochreatum)* พบว่า ต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร VW ทำให้ต้นอ่อนมีการเจริญดีที่สุด รวมไปถึงการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Cymbidium findlaysonianum* ในหลอดทดลอง พบว่า อาหารสูตร VW ที่มีการเติมน้ำมะพร้าว 15% ร่วมกับผงถ่าน 0.2% สร้างชักนำให้อัตราการเกิดต้นใหม่เพิ่มขึ้นมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ [11] โดยองค์ประกอบของอาหารสูตร VW มีสัดส่วน

แอมโมเนียมมากกว่าไนเตรท (2 : 1) ซึ่งโปรโตคอร์มหรือต้นอ่อนของกล้วยไม้สามารถดูดซึมไนโตรเจนในรูปแบบของแอมโมเนียมไอออนได้ดีกว่าไนเตรทที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช [9, 12]

และนอกจากนี้ จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำบนอาหารสูตรที่มีการเติมไซโตไคนินแตกต่างกัน พบว่า การเติม BA หรือ TDZ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถชักนำให้โปรโตคอร์มเกิดการสร้างตายอดใหม่เพิ่มขึ้นได้เร็วกว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมไซโตไคนิน แต่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดใหม่ได้ ขณะที่อัตราการฉ่ำน้ำจะเกิดขึ้นสูงตามไปด้วย แตกต่างจากการเติม Zeatin และ Kinetin ที่ทำให้โปรโตคอร์มสร้างยอดใหม่เพิ่มขึ้นสูงที่สุด จากการศึกษาของ อนุพันธ์ กงบังเกิด และ ธนากร วงษศา [13] พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติม Zeatin สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมให้เกิดยอดใหม่เพิ่มขึ้นมากที่สุดโดยใช้ชิ้นส่วนต้นอ่อน ในขณะที่การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของกล้วยไม้ *Anoectochilus elatus* สามารถเพิ่มจำนวนยอดใหม่สูงที่สุด บนอาหารสูตรที่เติม TDZ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร [14] ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าโปรโตคอร์มกล้วยไม้น้ำที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม BA หรือ TDZ สามารถกระตุ้นให้โปรโตคอร์มเกิดการเจริญไปเป็นตายอด โดยไม่สามารถชักนำให้ตายอดดังกล่าวเกิดการพัฒนาต่อไปเป็นยอดใหม่ขึ้นได้ อย่างไรก็ตาม การเติม Zeatin หรือ Kinetin สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มสร้างยอดใหม่เพิ่มมากขึ้น อาจเป็นเพราะว่าตายอดที่เกิดขึ้นใหม่สามารถตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตดังกล่าวได้ดี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรอำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Sritthichatjatum, S. (2000). Wild orchid of Thailand. Bangkok, Houses and Gardens printing. (in Thai)
2. Santisuk, T., Chayamarit, K., Pooma, R., & Duddee, S. (2006). Thailand red data: plants. Bangkok: Integrated Promotion Technology. p. 256. (in Thai)
3. Kunakhonnuruk, B., Inthima, P., & Kongbangkerd, A. (2018). *In vitro* propagation of *Epipactis flava* Seidenf., an endangered rheophytic orchid: a first study on factors affecting asymbiotic seed germination, seedling development and greenhouse acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 135*(3), 419-432.
4. Lo, S. F., Nalawade, S., Kuo, C. L., & Tasy, 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.

5. Vasudevan, R., & Staden, J. V. (2011). Cytokinin and explant types influence in vitro plant regeneration of Leopard Orchid *(Ansellia africana Lindl.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 107,* 123-129.
6. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum, 15*(3), 473-497.
7. Vacin, E., & Went, F. W. (1949). Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette, 110,* 605-613.
8. Van Waes, J. M., & Debergh, P. C. (1986). In vitro germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum, 67,* 253-261.
9. Malmgren, S. (1992). Large-scale asymbiotic propagation of Cypripedium calceolus - plant physiology from a surgeon's point of view. *Botanical Garden Micropropagation News, 1,* 59-63.
10. Kongbangkerd, A., & Wannachart, S. (2011). Effect of medium components on growth and development of in vitro shoot culture of *Dendrobium ochreatum* Lindl. *Naresuan University Science Journal, 8*(2), 67-76.
11. Tawaro, S., Suraninpong, P., & Chanprame, S. (2008). Germination and regeneration of *Cymbidium findlaysonianum* Lindl. on a medium supplemented with some organic source. *Walailak Journal Science and Technology, 5*(2), 125-135.
12. Stewart, S. K., & Kane, M. E. (2006). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 86,* 147-158.
13. Kongbangkerd, A., & Wongsa, T. (2007). Effect of cytokinins on growth and development of young shoots of *Dendrobium* Hybrid (*Dendrobium* Green Lantern). *Srinakharinwirot Science Journal, 2,* 115-125.
14. Sherif, N. A., Benjamin, J. H. F., Muthukrishnan, S., Kumar, T. S., & Rao, M. V. (2012). Regeneration of plantlets from nodal and shoot tip explants of *Anoectochilus elatus* Lindley, an endangered terrestrial orchid. *African Journal of Biotechnology, 11*(29), 7549-7553.