บทความวิจัย

การชักนำให้เกิดต้นใหม่จากชิ้นส่วนลำต้นเทียมของกล้วยไม้สิงโตก้านหลอดในสภาพปลอดเชื้อ

หนึ่งฤทัย จักรศรี[1] อนุพันธ์ กงบังเกิด[2] และ ธนากร วงษศา[1*]

ได้รับบทความ: 15 มีนาคม 2562
ได้รับบทความแก้ไข: 11 มิถุนายน 2562
ยอมรับตีพิมพ์: 14 มิถุนายน 2562

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สิงโตก้านหลอด (*Bulbophyllum capillipes* C.S.P. Parish & Rchb.f.) เป็นกล้วยไม้ที่ปัจจุบันถูกลักลอบนำออกจากป่ามาเพื่อการค้าอย่างต่อเนื่องจนอาจจะส่งผลให้สถานภาพในอนาคตถูกคุกคามและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ได้ ดังนั้นการหาวิธีการช่วยขยายพันธุ์ให้ได้เป็นจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็วโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงเป็นวิธีที่น่าเหมาะสม จากการเลี้ยงส่วนลำต้นเทียมของกล้วยไม้สิงโตก้านหลอดในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตรดัดแปลง Vacin and Went (VW, 1949) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน (Kinetin, BAP, Thidiazuron) หรือออกซิน (IAA, IBA, NAA) ที่แปรผันความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าลำต้นเทียมของสิงโตก้านหลอดที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีการเจริญเกิดต้นใหม่ (1.2 ต้น) ได้ดีไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งการเติม IAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรยังช่วยชักนำให้ลำต้นเทียมเกิดการพัฒนาให้มีรากจำนวนมากและรากมีการยืดยาวออกมาที่สุด และต้นอ่อนสิงโตก้านหลอดมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ หลังการนำออกปลูกในสแฟกนัมมอสหรือกาบมะพร้าวเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ในโรงเรือนเพาะชำ

คำสำคัญ: สารควบคุมการเจริญเติบโต กล้วยไม้สิงโตก้านหลอด การเจริญ การย้ายปลูก

[1]โปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร กำแพงเพชร 62000
[2]หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000
[*]ผู้นิพนธ์ประสานงาน, email: thanakorn_wo@kpru.ac.th

In vitro Plant Regeneration from Pseudobulb Segments of *Bulbophyllum capillipes* C.S.P. Parish & Rchb.f. (Orchidaceae)

Nuengruethai Jacksri[1], Anupan Kongbangkerd[2] and Thanakorn Wongsa[1*]

Received: 15 March 2019
Revised: 11 June 2019
Accepted: 14 June 2019

ABSTRACT

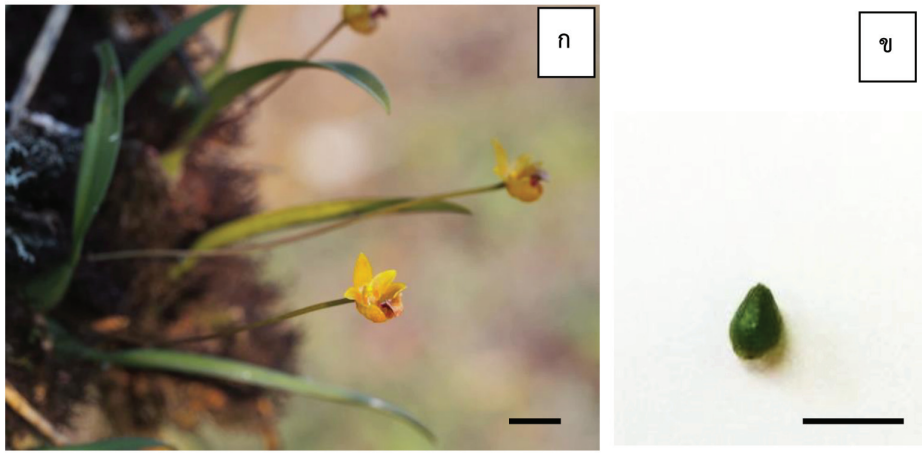
Bulbophyllum capillipes C.S.P. Parish & Rchb.f. is now smuggled out of the forest for illegal commercialization. This orchid may become threatened and risk of extinction in the near future. Therefore, rapid mass propagation of this species via tissue culture technique was performed. Pseudobulb segments of *Bulbophyllum capillipes* C.S.P. Parish & Rchb.f. were *in vitro* cultured on modified semi-solid Vacin and Went (1949) medium supplemented with different cytokinins; Kinetin (Kn), Benzylaminopurine (BAP), Thidiazuron (TDZ) or auxins; Indole-acetic acid (IAA), Indole-butyric acid (IBA), Naphthalene acetic acid (NAA) at 0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 $mg.L^{-1}$ for 12 weeks. The results showed that the highest average shoot numbers (1.2 shoots) were obtained when they were cultured on the medium augmented with 1.0 $mg.L^{-1}$ BAP with no significant difference when compared to the control. Moreover, adding 2.0 $mg.L^{-1}$ of IAA to the medium could induce better root formation number and root elongation from pseudobulb segments than the other. One hundred percent of the plantlets survived during the acclimatization procedure of *B. capillipes* plantlets could be observed after 12 weeks under greenhouse condition when sphagnum moss and chopped coconut husk were used as planting materials.

Keywords: Plant growth regulators, *Bulbophyllum capilipes,* Growth, Transplantation

[1]Biology Program, Faculty of Science and Technology, Kamphaeng Phet Rajabhat University, Kamphaeng Phet 62000
[2]Plant Tissue Culture Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000
[*]Corresponding author, email: thanakorn_wo@kpru.ac.th

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

สิงโตก้านหลอด (*Bulbophyllum capillipes* C.S.P. Parish & Rchb.f.) เป็นกล้วยไม้ในกลุ่มสกุลสิงโตจิ๋ว (Micromonanthe) เป็นสิงโตหนึ่งในแปดชนิดของสิงโตกลุ่มนี้ที่พบได้ในประเทศไทย เป็นพืชอิงอาศัย มีลำต้นเจริญทางด้านข้าง ลำลูกกล้วยรูปไข่ มีใบรูปแถบหนึ่งใบ ดอกเดี่ยวกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร ก้านดอกมีขนาดเล็ก ออกจากโคนลำลูกกล้วย ช่อดอกมีความยาวมาก บางดอกยาวมากกว่า 10 เซนติเมตร ซึ่งเป็นที่มาของชื่อระบุชนิดนั่นเอง ช่วงฤดูกาลออกดอกยาวนานมากตั้งแต่ฤดูหนาวจนถึงฤดูร้อน พบกระจายพันธุ์ในหลายภูมิภาคของประเทศไทย [1] กล้วยไม้ในกลุ่มสกุลสิงโตนั้นมักมีการปรับตัวเจริญในถิ่นอาศัยที่มีความจำเพาะ ทำให้มีโอกาสลดจำนวนประชากรลงได้ง่าย หากพื้นที่ถิ่นอาศัยถูกบุกรุกทำลายด้วยสาเหตุต่างๆ เช่น กิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ แนวทางในการช่วยอนุรักษ์พันธุกรรมของพืชไว้ สามารถทำได้โดยการนำพืชมาทำการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ สภาวะที่เหมาะสมอันช่วยให้สามารถเพิ่มจำนวนพืชได้ในระยะเวลาที่เร็วกว่าการเพิ่มจำนวนในธรรมชาติ จึงได้มีการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้กลุ่มสกุลสิงโต ดังตัวอย่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสิงโตช้อนทอง (*B. spathulatum*) [2] สิงโตฟันจักร (*B. dentiferum*) [3] สิงโตสมอหิน (*B. blepharistes*) [4] สิงโตกลอกตา (*B. carunculatum*) [5] *B. auricomum* [6] *B. fascinator* [7] *B. nipondhii* [8] และ *B. dhaninivatii* [9] จากรายงานต่างๆ ที่ได้กล่าวถึงปัจจัยที่แตกต่างที่เหมาะสมกับกล้วยไม้สิงโตชนิดต่างๆ มีการตอบสนองที่แตกต่างกัน โดยการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาปัจจัยในการทวีจำนวนโดยใช้สารควบคุมการเจริญในกลุ่มไซโทไคนิน ชักนำการออกรากด้วยสารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซิน และศึกษาวัสดุที่เหมาะสมสำหรับใช้ออกปลูกสิงโตก้านหลอดในสภาพแวดล้อมภาพนอกเพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มจำนวนต้นสำหรับการอนุรักษ์พันธุกรรมสิงโตก้านหลอดต่อไปในอนาคต



รูปที่ 1 ลักษณะของลำต้น ใบ และดอกของสิงโตก้านหลอดในสภาพธรรมชาติ (ก) ชิ้นส่วนลำต้นเทียมที่ใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทดลอง (ข) สเกลบาร์ขนาด 1.0 เซนติเมตร

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

นำชิ้นส่วนลำต้นเทียม (Pseudobulb) ของสิงโตก้านหลอดที่ถูกเลี้ยงไว้ในสภาพปลอดเชื้อ อายุประมาณ 6 เดือน ขนาดความสูงของชิ้นส่วนลำต้นเทียมประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยตัดรากและใบออกทั้งหมด เหลือเพียงชิ้นส่วนลำต้นเทียม (รูปที่ 1ข) เพื่อใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทดลองต่อไปนี้ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD)

การทดลองที่ 1 ผลของไซโทไคนินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของลำต้นเทียมของสิงโตก้านหลอด

ชิ้นส่วนลำต้นเทียมที่ถูกเตรียมเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นนำมาวางเลี้ยงบนอาหารดัดแปลง Vacin and Went (VW) [10] ที่มีการเติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำสกัดมันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโคส 30 กรัมต่อลิตร และเติมไซโทไคนินชนิดต่างๆ ได้แก่ Benzylaminopurine (BAP) Kinetin (Kn) และ Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่า pH ของอาหารเป็น 5.2 เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

การทดลองที่ 2 ผลของออกซินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของลำต้นเทียมของสิงโตก้านหลอด

ชิ้นส่วนลำต้นเทียมที่ถูกเตรียมเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นนำมาวางเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยเติมออกซินชนิดต่างๆ ได้แก่ Indole-acetic acid (IAA) Indole-butyric acid (IBA) และ Naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่า pH ของอาหารเป็น 5.2 เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

การทดลองที่ 3 การย้ายต้นอ่อนสิงโตก้านหลอดออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก

เลือกต้นอ่อนสิงโตก้านหลอดที่มีความสมบูรณ์ของใบและรากจากทุกกรรมวิธีมาล้างทำความสะอาดอาหารวุ้นออกให้หมด นำมาแช่ยาฆ่าเชื้อรา Cabendazim® เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาผึ่งต้นให้แห้ง และปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 นิ้ว โดยใช้วัสดุปลูกที่แตกต่างกันคือ สแฟกนัมมอส และกาบมะพร้าว ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วัสดุปลูกละ 20 ต้น จากนั้นวางเลี้ยงในตะกร้าที่ทำการคลุมด้วยถุงพลาสติก โดยทำการปิดถุงพลาสติกในช่วง 2 สัปดาห์แรก และในสัปดาห์ต่อมาจึงทำการเปิดปากถุงพลาสติก และมีการรดน้ำให้ความชื้นหากสังเกตพบว่าวัสดุแห้ง เมื่อครบ 6 สัปดาห์จึงนำถุงพลาสติกออกและเลี้ยงต่อไปเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ในโรงเรือนเพาะชำที่มีการใช้ตาข่ายพรางแสงแดดปริมาณร้อยละ 70

สภาวะที่ใช้เลี้ยง

สภาวะเลี้ยงในหลอดทดลองวางขวดเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเทียมของสิงโตก้านหลอดบนชั้นที่มีการให้แสงสว่าง 30 $\mu mol.m^2.s^1$ เป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน เลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ทำกรรมวิธีละ 25 ขวด ขวดละ 1 ชิ้นส่วน สำหรับสภาวะการย้ายออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกทำการทดลองในโรงเรือนเพาะชำ

การบันทึกผลและการวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการบันทึกข้อมูลการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานต่างๆ ระยะเวลาการเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยนับการเกิดยอดหรือต้นใหม่ จำนวนและวัดความยาว ใบ และรากที่มีการเจริญและพัฒนา นำข้อมูลที่ได้หาค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) สำหรับการออกปลูกในสภาพแวดล้อมปกติทำการบันทึกอัตราการรอดชีวิตทุกสัปดาห์เป็นเวลา 12 สัปดาห์

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ผลของไซโทไคนินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของลำต้นเทียมของสิงโตก้านหลอด

จากการเลี้ยงส่วนลำต้นเทียมสิงโตก้านหลอดเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง VW (1949) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่ากรรมวิธีที่เติม BA ความเข้มข้นในปริมาณน้อย (0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามาถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ รวมถึงยังชักนำให้เกิดการสร้างใบใหม่ และรากใหม่เกิดขึ้นอย่างไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับกรรมวิธีควบคุมอีกด้วย การเพิ่มความเข้มข้นของ BAP ที่มีปริมาณมากขึ้นมีแนวโน้มให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานน้อยลง ไม่ว่าจะเป็นการเกิดยอดใหม่ที่ลดลง ใบสั้น และรากมีจำนวนน้อยมาก แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่นๆ ส่วนการเติม TDZ ลงในอาหารในทุกปริมาณความเข้มข้น มีแนวโน้มให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานที่เหมือนกับการเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเทียมในกรรมวิธีที่เติม BA สำหรับกรรมวิธีที่มีการเติม Kn พบว่าปริมาณความเข้มข้นที่มากที่สุดคือ Kn 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ลำต้นเทียมเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานได้ดี โดยเฉพาะสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ และมีจำนวนใบมากที่สุด แตกต่างอย่างมีนับสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่นๆ ยกเว้นในกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 1)

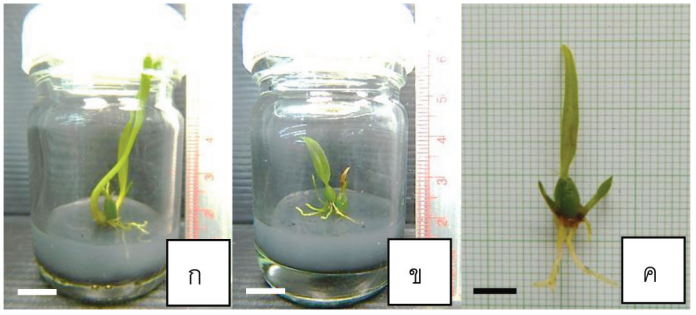
ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของชิ้นลำต้นหัวเทียมของสิงโตก้านหลอดบนอาหาร VW (1949) ที่เติมไซโทไคนินชนิดต่างๆ ความเข้มข้นต่างๆ (0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 12 สัปดาห์

ไซโตไคนิน (มก/ล)	จำนวนต้น Mean±SE	ความยาวต้น Mean±SE	จำนวนใบ Mean±SE	ความยาวใบ Mean±SE	จำนวนราก Mean±SE	ความยาวราก Mean±SE
0.0	1.46±0.18 a*	3.69±0.46 a	1.92±0.24 ab	2.46±0.37 a	6.15±0.94 a	0.91±0.10 a
BAP 0.5	1.18±0.20 a	2.42±0.44 b	1.47±0.29 abc	1.64±0.33 b	4.41±0.97 ab	0.78±0.15 ab
BAP 1.0	1.20±0.22 a	2.27±0.47 b	1.53±0.45 abc	1.50±0.39 b	4.13±1.21 ab	0.72±0.17 ab
BAP 2.0	1.00±0.27 ab	1.57±0.44 bc	1.09±0.28 a-d	1.15±0.36 bc	3.18±1.29 b	0.41±0.15 cd
BAP 4.0	0.45±0.14 c	0.62±0.21 cd	0.60±0.22 cd	0.29±0.11 d	0.85±0.34 c	0.18±0.06 de
Kn 0.5	0.30±0.11 c	0.61±0.28 cd	0.45±0.21 d	0.24±0.12 d	0.40±0.28 c	0.08±0.06 e
Kn 1.0	0.40±0.13 c	0.60±0.21 cd	0.70±0.23 cd	0.32±0.11 d	0.65±0.35 c	0.11±0.05 de
Kn 2.0	0.65±0.20 bc	0.75±0.22 cd	1.00±0.30 bcd	0.38±0.11 d	1.20±0.46 c	0.25±0.09 de
Kn 4.0	1.24±0.20 a	1.46±0.34 bc	2.00±0.41 a	0.72±0.18 cd	3.47±0.88 b	0.58±0.13 bc
TDZ 0.5	0.30±0.13 c	0.23±0.09 d	0.45±0.20 d	0.13±0.05 d	0.35±0.17 c	0.08±0.04 e
TDZ 1.0	0.60±0.15 bc	0.85±0.26 cd	0.80±0.26 cd	0.42±0.14 d	0.85±0.33 c	0.18±0.07 de
TDZ 2.0	1.18±0.26 a	2.06±0.66 b	1.18±0.38 a-d	1.68±0.61 b	4.18±1.43 ab	0.40±0.13 cd
TDZ 4.0	0.15±0.11 c	0.12±0.08 d	0.30±0.25 d	0.08±0.05 d	0.25±0.25 c	0.04±0.04 e

หมายเหตุ *ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี DMRT

การทดลองที่ 2 ผลของออกซินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของลำต้นเทียมของสิงโตก้านหลอด

การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินสามารถกระตุ้นให้ชิ้นส่วนลำตัวเทียมเกิดการสร้างต้นใหม่ที่มีใบและรากได้อย่างสมบูรณ์ในทุกชนิดของออกซิน โดยการเกิดเป็นต้นใหม่จากลำต้นเทียมในทุกกรรมวิธีอย่างไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในกรรมวิธีที่มีการเติม IAA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ที่ระดับ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มของการชักนำให้ต้นอ่อนมีการเจริญของใบ การยืดยาวออกของใบ และการสร้างรากใหม่มีจำนวนมากที่สุด แตกต่างจากกรรมวิธีอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การเพิ่มความเข้มข้นของออกซินมีแนวโน้มของการทำให้การเจริญของต้นใหม่ที่เกิดขึ้นมีการพัฒนาที่ลดลง (ตารางที่ 2)



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของชิ้นลำต้นหัวเทียมของสิงโตก้านหลอดบนอาหาร VW ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ก) ที่เติม BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) และ IAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยสเกลบาร์มีขนาด 1 เซนติเมตร

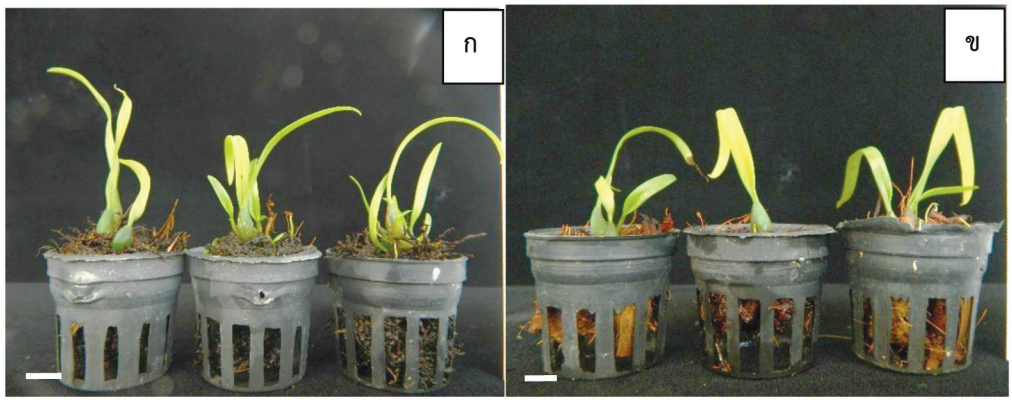
การทดลองที่ 3 การย้ายต้นอ่อนสิงโตก้านหลอดออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก

การย้ายปลูกต้นอ่อนสิงโตก้านหลอดสู่สภาพแวดล้อมภายนอกโดยใช้สแฟกนัมมอส (รูปที่ 3ก) และกาบมะพร้าว (รูปที่ 3ข) เป็นวัสดุปลูก พบว่าต้นอ่อนสิงโตก้านหลอดมีการเจริญเติบโตที่ดี ในช่วงสัปดาห์แรกของการนำต้นออกปลูกนั้น ต้นอ่อนมีการปรับสภาพได้ดี ลำลูกกล้วยมีความสมบูรณ์ แผ่นใบมีการแผ่ยืดยาวออกได้ดี และเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 100

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของชิ้นลำต้นหัวเทียมของสิงโตก้านหลอดบนอาหาร VW (1949) ที่เติมออกซินชนิดต่างๆ ความเข้มข้นต่างๆ (0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 12 สัปดาห์

ออกซิน (มก/ล)	จำนวนต้น Mean ± SE	ความยาวต้น Mean ± SE	จำนวนใบ Mean ± SE	ความยาวใบ Mean ± SE	จำนวนราก Mean ± SE	ความยาวราก Mean ± SE
0.0	1.6 ± 0.13 a*	2.27 ± 0.21 ab	1.5 ± 0.22 abc	1.90 ± 0.20 a	1.0 ± 0.31 abc	0.21 ± 0.06 bc
IAA 0.5	1.6 ± 0.15 a	2.48 ± 0.27 abc	1.7 ± 0.23 ab	1.98 ± 0.24 a	2.6 ± 0.64 ab	0.39 ± 0.09 ab
IAA 1.0	1.4 ± 0.19 a	2.69 ± 0.36 ab	1.5 ± 0.24 abc	2.21 ± 0.32 a	1.7 ± 0.56 abc	0.26 ± 0.08 abc
IAA 2.0	1.6 ± 0.16 a	2.78 ± 0.25 a	1.8 ± 0.28 a	2.16 ± 021 a	2.9 ± 0.86 a	0.49 ± 0.11 a
IAA 4.0	1.3 ± 0.20 a	1.89 ± 0.30 abc	1.3 ± 0.25 abc	1.72 ± 0.31 a	1.9 ± 0.74 abc	0.31 ± 0.09 abc
IBA 0.5	1.4 ± 0.14 a	2.48 ± 0.27 ab	1.1 ± 0.13 abc	2.21 ± 0.22 a	0.8 ± 0.34 bc	0.18 ± 0.08 bc
IBA 1.0	1.6 ± 0.13 a	2.28 ± 0.28 abc	1.4 ± 0.23 abc	1.78 ± 0.29 a	1.6 ± 0.36 abc	0.31 ± 0.07 abc
IBA 2.0	1.4 ± 0.22 a	1.57 ± 0.26 c	1.0 ± 0.19 bc	1.48 ± 0.24 a	1.5 ± 0.60 abc	0.18 ± 0.06 bc
IBA 4.0	1.1 ± 0.10 a	2.15 ± 0.33 abc	0.8 ± 0.14 c	1.83 ± 0.33 a	0.3 ± 0.21 c	0.06 ± 0.04 c
NAA 0.5	1.6 ± 0.18 a	2.56 ± 0.20 ab	1.9 ± 036 a	2.09 ± 0.24 a	1.6 ± 0.52 abc	0.22 ± 0.07 bc
NAA 1.0	1.4 ± 0.17 a	2.34 ± 0.24 abc	1.3 ± 0.18 abc	1.97 ± 0.22 a	1.3 ± 0.55 abc	0.22 ± 0.07 bc
NAA 2.0	1.3 ± 0.16 a	2.03 ± 0.24 abc	1.3 ± 0.21 abc	1.60 ± 0.20 a	1.6 ± 0.58 abc	0.30 ± 0.08 abc
NAA 4.0	1.5 ± 0.15 a	1.82 ± 0.21 abc	1.6 ± 0.22 ab	1.36 ± 0.18 a	1.5 ± 0.42 abc	0.34 ± 0.08 ab

หมายเหตุ* ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี DMRT



รูปที่ 3 ต้นอ่อนสิงโตก้านหลอดที่ออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยใช้สแฟกนัมมอส (ก) และกาบมะพร้าว (ข) เป็นวัสดุปลูก โดยสเกลบาร์มีขนาด 1 เซนติเมตร

อภิปรายผลการทดลอง

จากการเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเทียมของสิงโตก้านหลอดในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตรดัดแปลง Vacin and Went ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน หรือออกซิน ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นเทียมของสิงโตก้านหลอดที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร VW (1949) ที่เติม BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีการเจริญเกิดต้นใหม่ (1.2 ต้น) ได้ดีไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารเพื่อไปกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเกิดการเจริญเติบโต อาจให้ส่งผลให้เกิดการพัฒนาการเจริญน้อยกว่าชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงในกรรมวิธีควบคุม ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงต้นกล้ากล้วยไม้สิงโตกลอกตา (*Bulbophyllum carunculatum*) โดยนำต้นกล้าอายุ 4 เดือน หลังการเพาะเมล็ด วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มีการเติมหรือไม่เติม Hyponex ร่วมกับ BA เข้มข้น 0 0.1 0.5 1.0 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารพาะเลี้ยงที่ไม่เติม Hyponex และ BA และอาหารที่เติม BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีน้ำหนักสดและมีจำนวนใบดีที่สุด แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีอื่นๆ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ [5] อีกทั้งรายงานการเพิ่มจำนวนโพรโทคอร์มของกล้วยไม้สายล่องแล่ง *(Dendrobium aphyllum)* ในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหาร ½ MS ที่ไม่มีการเติมไซโทไคนินเกิดขึ้นได้ดีกว่ากรรมวิธีที่มีการเติม BA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้อาจเนื่องจากโพรโทคอร์มของกล้วยไม้สายล่องแล่งได้รับการกระตุ้นจากฮอร์โมนที่พืชสร้างขึ้นเอง [11] แต่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอ่อนของกล้วยไม้สิงโตกลีบม้วน (*B. khasyanum*) ความสูงประมาณ 1.0-1.5 เซนติเมตร ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าการเติมสารควบคุมการเจริญในกลุ่มไซโตไคนินชนิดต่างๆ (BA, Kinetin และ TDZ) โดยเฉพาะ Kinetin ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้สิงโตกลีบม้วนมีการพัฒนาของจำนวนต้นใหม่ และการเติม BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ต้นอ่อนมีค่าเฉลี่ยของจำนวนโพรโทคอร์มสูงที่สุด ได้ดีกว่ากรรมวิธีในชุดควบคุม เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ [12] อีกทั้งการเติม IAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังช่วยชักนำให้ชิ้นส่วนลำต้นเทียมเกิดการพัฒนาให้มีรากจำนวนมากและรากมีการยืดยาวออกมาที่สุด

ต้นอ่อนสิงโตก้านหลอดมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 100 หลังการนำออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกด้วยสแฟกนัมมอสหรือกาบมพะร้าวเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ เนื่องจากทั้งสแฟกนัมมอสและกาบมะพร้าวเป็นวัสดุปลูกที่สามารถดูดซับน้ำได้ดี สามารถกักเก็บความชื้นไว้ให้มีสภาพที่เหมาะสม ส่งผลให้ช่วยลดการสูญเสียความชื้นของพืชในการนำออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกได้ การใช้สแฟกนัมมอสเป็นวัสดุปลูกทำให้มีอัตราการรอดชีวิตสูง เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นวัสดุปลูกกล้วยไม้อิงอาศัยหลายๆ ชนิด เช่น การย้ายปลูกเอื้องกุหลาบกระเป๋าปิดมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 100 เมื่อใช้สแฟกนัมมอสวัสดุปลูก เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ [13] อีกทั้งการย้ายปลูกกะเรกะร่อนปากเป็ด *(Cymbidium finlaysonianum)* ด้วยสแฟกนัมมอส หรือขุยมะพร้าวส่งผลให้มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 100 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ [14] อีกทั้งยังให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันกับการย้ายออกปลูกกล้วยไม้ในกลุ่มสกุลสิงโตชนิดต่างๆ เช่น การย้ายปลูกสิงโตหัวเข็มหมุด (*B. moniliforme*) โดยใช้สแฟกนัมมอสหรือกาบมะพร้าวเป็นวัสดุปลูกส่งผลให้มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 90-100 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ [15] ต้นอ่อนสิงโตช้อนทอง (*B. spathulatum*) ที่ใช้สแฟกนัมมอสและกาบ

มะพร้าวเป็นวัสดุปลูกนั้นมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดคิดเป็นร้อยละ 88.71 และ 79.03 ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 14 สัปดาห์ [2] จากรายงานวิจัยต่างๆ นั้นแสดงให้เห็นถึงสแฟกนัมมอสหรือกาบมะพร้าวสับเหมาะที่สำหรับใช้เป็นวัสดุปลูกกล้วยไม้สกุลสิงโตชนิดต่างๆ รวมไปถึงสิงโตก้านหลอดด้วย

สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเทียมของสิงโตก้านหลอดในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตรดัดแปลง Vacin and Went ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน หรือออกซิน ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ เลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าลำต้นเทียมของสิงโตก้านหลอดที่มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดี และต้นอ่อนสิงโตก้านหลอดมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 100 หลังการนำออกปลูกบนวัสดุชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ในโรงเรือนเพาะชำ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาวอ่อนรัตน์ อิ่นมะโน หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และโปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างพืชและอุปกรณ์การทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Sittisudjatum, S. (2010). *Bulbophyllum of Thailand.* Bangkok. Baanlaesuan, p. 255.
2. Wongsa, T., Chongphaichitsakul, R., & Cha-umphol, P. (2014). Effects of cytokinins and auxins on growth and development of *Bulbophyllum spathulatum* (Rolfe ex Cooper) Seidenf. seedlings. *Thai Journal of Botany, 6*(Special Issue), 147-156. (in Thai)
3. Samala, S., Pattarakulpisutti, P., & Yenchon, S. (2015). In vitro propagation of *Bulbophyllum dentiferum* Ridl. *Khon Kaen Agricultural Journal, 43*(2): 277-284. (in Thai)
4. Wongsa, T., Butsayapenkae, M., Chongphaichitsakul, R., & Cha-umphol, P. (2016). Effects of organic supplements on *in vitro* shoot multiplication of *Bulbophyllum blepharistes* Rchb.f. In The 10th Botanical Conference of Thailand: BCT10) 16-18 June 2016. Ubon Ratchathani University. p. 260-268. (in Thai)
5. Choopeng, S., & Nukrorchon, C. (2017). Effects of Hyponex and BA on growth and development of (*Bulbophyllum carunculatum*) *in vitro. Khon Kaen Agricultural Journal, 45*(suppl. 1), 1289-1295. (in Thai)
6. Than, M. M. M. (2013). *In vitro* conservation of endangered orchid *Bulbophyllum auricomum* lindl., the royal orchid of Myanmar. *Propagation of ornamental plants, 13*(4), 154-159.
7. Lee, Y. I., & Yeung, E. C. (2010). Embryo development and *in vitro* seed germination of *Bulbophyllum fascinator. Acta Horticulturae, 878,* 243-250.

8. Pakum, W., Wattana, S., Srimuang, K., & Kongbangkerd, A. (2016). Influence of medium component on *in vitro* propagation of Thai's endangered orchid: *Bulbophyllum nipondhii* Seidenf. *Plant Tissue Culture and Biotechnology, 25*(1), 37-46.
9. Kongbangkerd, A., Wattana, S., & Srimuang, K. (2017). Influence of organic supplements on growth and development of *in vitro* shoots of *Bulbophyllum dhaninivatii* Seidenf. *Applied Mechanics and Materials, 855,* 42-46.
10. Vacin, E., & Went, F. W. (1949). Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette, 110,* 605-613.
11. Subthira, T., Suntaranond, S., & Bunnag, S. (2013). Effects of Plant Growth Regulator on *in vitro* culture of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fischer. *KKU Research Journal (Graduate Studies), 13*(1), 1-13. (in Thai)
12. Wongsa,T., Cha-umphol, P., & Kongbangkerd, A. (2014). Effect of cytokinins on *in vitro* shoot multiplication of *Bulbophyllum khasyanum* Griff. In Proceedings the 6th National Science Research Conference. 20-21 March 2014. Burapha University. P. 49-53. (in Thai)
13. Promchan, T., Ramasoot, S., & Bunwest, P. (2016). Effects of activated charcoal and growing media on seedling growth and survival Rate of *Aerides odorata. Wichcha Journal Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, 32*(2): 53-61. (in Thai)
14. Wiriyananont, Y., & Kaisang, K. (2018). Effect of light colors on development of *Cymbidium finlaysoniasnum* Lindl. *in vitro. Songklanakarin Journal of Plant Science, 5*(2), 12-17. (in Thai)
15. Kongbangkerd, A., & Pakum, W. (2018). Effect of media and organic supplements on growth and development from pseudobulb explants of *Bulbophyllum moniliforme* C.S.P.Parish & Rchb.f. *Thai Science and Technology Journal, 26*(7), 1197-1208. (in Thai)