การขยายพันธุ์และการเก็บรักษากล้วยไม้สกุลช้างในสภาพปลอดเชื้อ[1]

In Vitro Propagation and Conservation of *Rhynchostylis* spp.

กษิดิศ ดิษฐบรรจง ชยานิจ ดิษฐบรรจง

บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ

กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

Abstract

In vitro propagation of three species of *Rhynchostylis*, namely, *R. gigantea*, *R. coelestris*, and *R. retusa*, has been conducted using pods collected from Ubonratchathani, Kanchanaburi, and Tak provinces. *R. gigantea* showed the highest germination frequency on Vacin and Went (1949) mediun, VW, supplemented with 150 ml/l of coconut water and 100 mg/l of potato extract whereas *R. coelestris* and *R. retusa* displayed the highest germination frequency on VW (1949) medium containing only 150 ml/l of coconut water. The highest proliferation of protocorm like body (plbs) of three species have been obtained from liquid medium of VW (1949) supplemented with 150 ml/l of coconut water and 100 mg/l of potato extract (3.7-5.7 folds increasing in fresh weight within 4 weeks compare to the starting fresh weight). The highest growth rate (determined by the increment of fresh weight) of these three species has been obtained from VW (1949) medium supplemented with 150 ml/l of coconut water and 1 gm/l of orchid fertilizer (21–21–21).

Slow growth preservation or conservation experiments of these species indicated that the appropriate concentration of mannitol are 2 and 4% (w/v). These cultures can be kept in the tissue culture room environment for 12 months without changing the media. For cryopreservation experiment, the use of encapsulation-dehydration technique has been employed to investigate the survival of tissues. The plbs of *R. gigantea* has been precultured on modified VW medium containing 150 ml/l of coconut water, 3% (w/v) of sucrose, 0.3% (w/v) of gelrite, and various concentration of mannitol. After 2 days of

รหัสกิจกรรม 05-02-47-04

รหัสการทดลอง 05-02-47-0403

precultured on mannitol, the plbs have been coated by sodium alginate, over night storage at 10°C, followed by dehydration on silica gel for various times. The alginated beads have been immersed in liquid nitrogen for 1 hour. The survival of the alginate bead have been obtained from the mannitol preculture at 6 and 8% (w/v) with dehydration period 3-4 hours (3.3 – 6.5% survive).

บทคัดย่อ

เก็บรวบรวมฝักกล้วยไม้ป่าสกุลช้าง 3 ชนิด ได้แก่ ช้างกระ เขาแกะ และ ไอยเรศ จากจังหวัดอุบลราชธานี กาญจนบุรี และตาก นำเมล็ดจากฝักที่มีอายุประมาณ 7 - 9 เดือน ซึ่งมีสีครีม จนถึงน้ำตาลอ่อน มาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในอาหารสูตรต่างๆ เมื่อพิจารณาจากคะแนนในการงอก ช้างกระงอกดีที่สุดในอาหารดัดแปลง Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร และน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ ลิตร ที่ระดับ 2.7 คะแนน ส่วนเขาแกะ และไอยเรศ งอกได้ดีที่สุดในอาหารดัดแปลง VW (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร มีระดับคะแนนความงอกที่ 2.5 และ 2.3 คะแนน ตามลำดับ หลังจากที่เมล็ดงอกแล้ว 2 เดือน ทำการเพิ่มปริมาณprotocorm like body (plbs) ของกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด พบว่าช้างกระ เขาแกะ และ ไอยเรศ มีการเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณดีที่สุดในอาหารเหลวดัดแปลง VW (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร ร่วมกับน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ลิตร คิดเป็น 5.7, 4.1 และ 3.7 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อศึกษาอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของต้นอ่อน พบว่าช้างกระ เขาแกะ และไอยเรศ เจริญได้ดีในอาหาร VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร + ปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21–21–21 อัตรา 1 กรัม/ลิตร มีอัตราการเจริญ 1.70, 2.05 และ 1.82 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้นในระยะเวลา 9 เดือน

การเก็บรักษาโดยการชะลอการเติบโตต้น ของกล้วยไม้สกุลช้างทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ช้างกระ เขาแกะ และไอยเรศ การเลี้ยงในอาหารที่เติมสาร mannitol ที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 4% (w/v) โดยไม่เปลี่ยนอาหาร นาน 12 เดือน สามารถชะลอการเติบโตของกล้วยไม้สกุลช้างได้ โดยพิจารณาจากน้ำหนักสดที่ยังคงเพิ่มขึ้นหลังการใส่ mannitol สีใบ ลักษณะความสมบูรณ์แข็งแรง ความมีชีวิต และสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติและเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ ส่วนการเก็บรักษาโปรโตคอมกล้วยไม้ช้างกระ ภายใต้ความเย็นจัดโดยวิธี Encapsulation – Dehydration โปรโตคอม ถูกนำไป preculture ด้วย mannitol บนอาหาร modified Vacin and Went (1949) + น้ำ

มะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร + sucrose 3 % (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) เป็นเวลา 2 วัน แล้วหุ้มด้วย sodium – alginate ทำการ dehydrated โดยใช้ silica gel การศึกษาผลของ mannitol และระยะเวลาในการ dehydrate ก่อนการแช่ liquid nitrogen พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ mannitol สูงขึ้นในแต่ละช่วงเวลาของการ dehydrated เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของ alginate beads จะลดลง ในทำนองเดียวกันระยะเวลาของการ dehydrated ยิ่งนานขึ้นมีผลให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต ของ alginate bead ค่อยๆ ลดลง ในแต่ละความเข้มข้นของ mannitol เช่นเดียวกัน เมื่อนำไปแช่ใน liquid nitrogen นาน 1 ชั่วโมง นำมาเลี้ยงในอาหารเพื่อทดสอบความมีชีวิต โดยพิจารณาจากการเจริญของโปรโตคอมในแต่ละ bead พบว่า มีเปอร์เซนต์ความมีชีวิต 6.5, 4.9 และ 3.3% เมื่อผ่านการ preculture โดยใช้ mannitol ความเข้มข้น 6% (w/v) ที่ระยะเวลา dehydrated 3 และ 4 ชั่วโมง และที่ระดับความเข้มข้น 8% (w/v) ระยะเวลา dehydrated 4 ชั่วโมง ตามลำดับ

คำนำ

ประเทศไทยมีสภาพภูมิประเทศที่เอื้ออำนวยให้มีป่าไม้อันเป็นถิ่นอาศัยของกล้วยไม้ป่าต่างๆ อยู่ในทุกภูมิภาค โดยพบกล้วยไม้ในป่าธรรมชาติมากกว่า 1,000 ชนิด กล้วยไม้ป่าของไทยล้วนแล้วแต่เป็นพืชพรรณที่น่าสนใจและมีคุณค่าทางด้านการศึกษาวิจัยทั้งในแง่วิชาการ ตลอดจนอำนวยประโยชน์ต่อประเทศไทยในอนาคตโดยสามารถนำกล้วยไม้ป่าเหล่านี้มาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อผลิตลูกผสมที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ แต่ในปัจจุบันกล้วยไม้ป่าเป็นพืชที่น่าห่วงว่าจะสูญหายไปเรื่อยๆ เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้ถึงแม้ว่าจะมีจำนวนเมล็ดต่อฝักมาก แต่ต้องการสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติที่เหมาะสมในการงอก และยังต้องอาศัยรา mycorrhiza ที่ช่วยเปลี่ยนแป้งในเอมบริโอให้กลายเป็นน้ำตาลที่เมล็ดสามารถนำไปใช้ในการงอก เมื่อสภาพแวดล้อมเปลี่ยนไป เนื่องจากการทำลายสภาพแวดล้อมทางนิเวศน์วิทยา การตัดไม้ทำลายป่า การเผาป่า การทำไร่เลื่อนลอย ปริมาณกล้วยไม้ป่าที่ขยายพันธุ์ตามธรรมชาติลดลง นอกจากนี้การนำกล้วยไม้ป่าออกมาจำหน่ายทั้งในระดับท้องถิ่น หรือรวบรวมเพื่อการส่งออกไปยังต่างประเทศ ทำให้กล้วยไม้ป่าบางชนิดที่พบในธรรมชาติกลายเป็นของหายาก จะเห็นได้จากมีการลักลอบนำกล้วยไม้ป่าชนิดต่างๆ มาขายที่สวนจตุจักรเป็นปริมาณมากในราคาถูก หากเป็นเช่นนี้ต่อไป กล้วยไม้ป่าอาจสูญพันธุ์ไปจากป่าเมืองไทยได้

วิธีการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ป่าต่างๆ นี้ มีวิธีการที่สามารถทำได้คือการปลูกรักษาไว้ในสภาพป่าซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดโดยธรรมชาติ การนำมาขยายพันธุ์หรือเพิ่มปริมาณให้มากขึ้นและ

นำกลับสู่ธรรมชาติ ซึ่งมักทำการขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากสามารถขยายพันธุ์ได้เป็นปริมาณมาก และอีกวิธีหนึ่งคือการเก็บรักษาแบบ *in vitro* ไว้ในในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งแบ่งออกเป็นการเก็บรักษาทั้งในระยะปานกลางและระยะยาว การเก็บรักษาในระยะปานกลางสามารถทำได้โดยการปรับสภาพทางเคมี สารอาหาร และสภาพแวดล้อมในหลอดทดลอง โดยการลดอัตราการเจริญเติบโต สามารถเก็บชิ้นส่วนพืชได้ระยะเวลา 1 – 2 ปี หลังจากนั้นต้องนำมาชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตแล้วจึงนำไปเก็บรักษาในรอบต่อไป อีกวิธีหนึ่งคือการเก็บในระยะยาวหรือการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ประมาณ - 196 องศาเซลเซียส ในไนโตรเจนเหลว การอนุรักษ์ในสภาพปลอดเชื้อนี้มีข้อดี คือใช้พื้นที่ในการเก็บรักษาน้อย ไม่มีผลกระทบจากการปลูกและดูแลรักษา สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชจากหลายๆแหล่งไว้ในที่เดียวกัน และเก็บไว้ได้เป็นระยะเวลานาน ซึ่งในขณะนี้สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพได้จัดทำโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้ป่าหลายชนิดในสภาพปลอดเชื้อ การทดลองนี้เป็นการวิจัยเทคโนโลยีการเก็บรักษากล้วยไม้ป่าสกุลช้าง (*Rhynchostylis* spp.) เพื่อสนับสนุนโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช

กล้วยไม้สกุลช้าง (*Rhynchostylis* spp.) เป็นกล้วยไม้อิงอาศัยที่มีขนาดกลางไปจนถึงค่อนข้างใหญ่ พบตามธรรมชาติในป่าดิบแล้งหรือป่าเบญจพรรณ ทางภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันตก มีช่อดอกเด่น กลิ่นหอม สวยงามสะดุดตา ในประเทศไทยพบ 3 ชนิด ได้แก่ เขาแกะ (*Rhynchostylis coelestris* Rchb. f.) ไอยเรศ (*Rhynchostylis retusa* (L.) Blume) และ ช้างกระ (*Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl.) ปัจจุบันจัดเป็นพืชอนุรักษ์บัญชีที่ 2 ซึ่งเป็นชนิดพันธุ์ที่ถึงแม้ว่าจะยังไม่มีข้อมูลว่าจะสูญพันธุ์ แต่ถ้าปล่อยให้มีการค้าโดยไม่ควบคุมอาจทำให้สูญพันธุ์ได้ กล้วยไม้สกุลนี้เป็นที่นิยมแพร่หลาย ทั้งในประเทศและต่างประเทศ สามารถนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อสร้างลูกผสมที่มีลักษณะดี จึงมีการลักลอบจากแหล่งปลูกธรรมชาติมาขายเป็นปริมาณมาก ทำให้ปริมาณในธรรมชาติลดลง จำเป็นต้องดำเนินการขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณ นำกลับเข้าสู่ถิ่นเดิม พร้อมกันนี้ต้องเก็บรักษาพันธุกรรมไว้เพื่อใช้ประโยชน์ต่อการวิจัยและการศึกษาในอนาคตต่อไป การเก็บรักษา ปัจจุบันได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาประยุกต์ใช้เพื่อเก็บรักษาพันธุกรรมไว้ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อสอดคล้องกับอนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ ปี 2535 ที่ได้อธิบายถึงการวิจัยเกี่ยวกับการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมเพื่อเก็บรักษาพันธุ์ที่หายาก และเก็บรวบรวม โดยใช้เทคนิคต่างๆ รวมทั้งการแพร่ขยายสายพันธุ์ตลอดจนเก็บรวบรวมข้อมูล องค์ความรู้ ในชนิดพันธุ์ต่างๆ อันก่อให้เกิดการพัฒนาต่อไปในภายหน้า การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. ศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลช้างโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. ศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษากล้วยไม้สกุลช้างในระยะปานกลางและระยะยาว

อุปกรณ์

1. ฝักกล้วยไม้สกุลช้าง 3 ชนิด ได้แก่ ช้างกระ เขาแกะ และ ไอยเรศ
2. อาหารสูตรต่างๆ และสารเคมีที่จำเป็นในการทดลอง
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่จำเป็นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วิธีการ

การศึกษาการเก็บรักษากล้วยไม้สกุลช้างในสภาพปลอดเชื้อแบ่งเป็น 3 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่1 การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลช้างในสภาพปลอดเชื้อ

ทำการศึกษาการขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนของกล้วยไม้สกุลช้าง 3 ชนิด คือ ช้างกระ เขาแกะ และไอยเรศ มีวิธีดำเนินการ ดังนี้

1.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้

เก็บรวบรวมฝักกล้วยไม้ป่าสกุลช้าง 3 ชนิด ได้แก่ ช้างกระ เขาแกะ และ ไอยเรศ จากจังหวัดอุบลราชธานี กาญจนบุรี และตาก นำฝักที่มีอายุประมาณ 7-9 เดือน (สังเกตจากสีของเมล็ดที่มีสีครีม จนถึงน้ำตาลอ่อน) มาฟอกฆ่าเชื้อภายนอกด้วย Sodium hypoclorite (Haiter®Bleach) 20% นาน 15 นาที นำฝักกล้วยไม้จุ่มแอลกอฮอล์ 95% เผาไฟเพื่อเป็นการฆ่าเชื้ออีกครั้ง หลังจากนั้นนำฝักกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิดชนิดละ 6 - 10 ฝัก มาผ่าเอาเมล็ดภายในซึ่งมีลักษณะเป็นผงละเอียดใส่ลงในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 45 มิลลิลิตร แล้วใช้ไมโครไปเปต ดูดส่วนผสมของเมล็ดและน้ำกลั่นปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดขนาด 4 ออนซ์ที่มีอาหารเพาะเมล็ดสูตรต่างๆ เกลี่ยให้เต็มพื้นที่ผิวของอาหาร เลี้ยงในอาหาร ชนิดละ 20 ขวด ชนิดอาหารที่ใช้ได้แก่

1. อาหารสูตร Vacin and Went (1949) หรือ VW (1949)
2. อาหารดัดแปลงสูตร Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร
3. อาหารดัดแปลงสูตร Vacin and Went (1949) + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ลิตร
4. อาหารดัดแปลงสูตร Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ลิตร

อาหารเพาะเมล็ดทั้ง 4 ชนิด เติม sucrose 3% (w/v), activate charcoal 0.5 gm/l, gelrite 0.3% (w/v) เลี้ยงในห้องที่มีแสงสว่างจากหลอด fluorescent ที่อุณหภูมิห้องเลี้ยง 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส

บันทึกผลการงอกของเมล็ดหลังการเพาะเมล็ดนาน 3 เดือนโดยพิจารณาจากปริมาณการงอกของเมล็ด โดยให้คะแนนจาก 0 - 3 ดังนี้

คะแนน 0 = เมล็ดไม่งอก

คะแนน 1 = เมล็ดงอกมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ สีเหลือง มีปริมาณ 0 – 10% ของพื้นที่

คะแนน 2 = เมล็ดงอกมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ สีเหลือง มีปริมาณ 10 - 50% ของพื้นที่

คะแนน 3 = เมล็ดงอกมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ สีเหลือง ถึงเขียวอ่อน มีปริมาณการงอกมากกว่า 50% ของพื้นที่

1.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณโปรโตคอม หรือ protocorm like body (plbs)

1.2.1 หลังจากเมล็ดงอกแล้วเลี้ยงต่อไปอีก 3 เดือนในอาหารสูตรเดิม พบว่ามีการเจริญเป็น 2 ลักษณะ คือเจริญเป็นต้นอ่อน และโปรโตคอม นำโปรโตคอมที่เกิดขึ้นของกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clump 0.5 - 0.8 เซนติเมตร แต่ละ clump มีน้ำหนักสดประมาณ 30 - 50 มิลลิกรัม แล้วเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตรต่างๆ 4 ชนิด เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์

1.2.2 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 สิ่งทดลอง (treatment) 4 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลองประกอบด้วยโปรโตคอม 40 ชิ้น สิ่งทดลอง ประกอบด้วยสูตรอาหาร 4 ชนิดดังนี้

1. อาหารดัดแปลง Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร
2. อาหารดัดแปลง Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 300 มิลลิลิตร/ลิตร
3. อาหารดัดแปลง Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม /ลิตร
4. อาหารดัดแปลง Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 300 มิลลิลิตร/ลิตร + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ลิตร

อาหารเหลว ทั้ง 4 ชนิด เติม sucrose 3% (w/v) เลี้ยงบน shaker ที่ความเร็วรอบ 140 rpm ในห้องที่มีแสงสว่างจากหลอด fluorescent อุณหภูมิห้องเลี้ยง 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส

1.2.3 บันทึกผล โดยประเมินการเจริญเติบโตจากน้ำหนักสดที่เพิ่มทุก สัปดาห์ที่ 2 และ 4 เปลี่ยนอาหารทุกครั้งที่มีการบันทึกน้ำหนักสด

การเจริญเติบโตของโปรโตคอม คำนวณจากน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น คิดเป็นเท่าของน้ำหนักสดเริ่มต้น โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการเพิ่มน้ำหนักสด (เท่าจากน้ำหนักเริ่มต้น)} = \frac{\text{น้ำหนักสดสัปดาห์ที่ 2 /4 - น้ำหนักสดเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}$$

1.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของต้นอ่อน

1.3.1 นำต้นอ่อนของกล้วยไม้ช้างกระ เขาแกะ และไอยเรศ อายุประมาณ 6 เดือน หลังจากเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ มีใบ 2 - 3 ใบ แต่ละต้นมีน้ำหนักสดระหว่าง 20 - 30 มิลลิกรัม นำมาเลี้ยงเปรียบเทียบการเจริญเติบโต ในอาหารสูตรต่างๆ โดยชั่งน้ำหนักสดเริ่มต้นของต้นอ่อนแล้วย้ายต้นอ่อนลงในขวด ขวดละ 2 ต้น นำมาวางไว้บนชั้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิห้อง 25 ± 2 องศาเซลเซียส ได้รับแสงจากหลอด fluorescence วันละ 16 ชั่วโมง

1.3.2 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 สิ่งทดลอง (treatment) 4 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลอง ประกอบด้วยต้นอ่อนกล้วยไม้ชนิดละ 48 ต้น สิ่งทดลองประกอบด้วยสูตรอาหาร 4 ชนิดดังนี้

1. อาหารดัดแปลง Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร
2. อาหาร ดัดแปลง Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร + ปุ๋ยกล้วยไม้สูตร 21 – 21 – 21 อัตรา 1 กรัม/ลิตร
3. อาหาร ดัดแปลง Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม /ลิตร
4. อาหาร ดัดแปลง Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม /ลิตร + ปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21 – 21 - 21 อัตรา 1 กรัม /ลิตร

ปุ๋ยกล้วยไม้ที่ใช้มีชื่อการค้าว่า “ ทวินเฟอร์ตี้ “

อาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิด เติม sucrose 3% (w/v), activate charcoal 0.5 gm/l, gelrite 0.3% (w/v) เปลี่ยนอาหารทุกเดือน

1.3.3 บันทึกผล หลังจากเลี้ยงนาน 3 , 6และ 9 เดือน โดยประเมินจากอัตราการเจริญเติบโต คำนวณจากน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น คิดเป็นเท่าของน้ำหนักสดเริ่มต้น โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการเจริญเติบโต (เท่าจากน้ำหนักเริ่มต้น)} = \frac{\text{น้ำหนักสดเดือนที่ 3/6/9 - น้ำหนักสดเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}$$

การทดลองที่ 2 การเก็บรักษาต้นอ่อนกล้วยไม้สกุลช้างในระยะปานกลางโดยการชะลออัตราการเจริญเติบโต (slow growth storage)

การทดลองนี้เป็นการเก็บรักษาเนื้อเยื่อในสภาพที่มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ ซึ่งตามปกติมีหลายวิธีการ การเปลี่ยนแปลงสภาวะทางกายภาพ เช่น การลดอุณหภูมิ หรือสภาวะในหลอดหรือขวดเนื้อเยื่อ การเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์จากระดับปกติ เช่นลดความเข้มข้นของธาตุ

อาหาร ในการทดลองนี้ใช้วิธีการชะลอการเจริญเติบโต โดยใช้สาร mannitol ซึ่งเป็นสารยับยั้งขบวนการออสโมซิส (osmoticum) การใช้สารชนิดนี้ร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปัจจุบันเป็นที่นิยมมากในการนำมาเก็บรักษาเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนของพืช อย่างไรก็ตามถ้าเติม mannitol ความเข้มข้นที่สูงเกินไป จะมีผลต่อการเจริญของพืชด้วย ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร mannitol ต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อน มีวิธีการดังนี้

2.1 นำต้นอ่อนของกล้วยไม้สกุลช้างทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ช้างกระ เขาแกะ และไอยเรศ ที่มีอายุอย่างน้อย 1 ปี โดยเลือกต้นที่มีการเจริญเติบโตที่สมบูรณ์ มีน้ำหนักสดระหว่าง 0.2-0.5 กรัม มาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ อาหารดัดแปลง VW (1949) ที่เติมปุ๋ยกล้วยไม้สูตร 21-21-21 อัตรา 1 gm/l + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร + sucrose 3% (w/v)+ gelrite 0.3% (w/v) สารชะลอการเจริญเติบโต คือ mannitol ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหาร

2.2 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 4 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลอง มีชิ้นส่วนพืช (ต้นกล้วยไม้น้ำหนักสดระหว่าง 0.2-0.5 กรัม) 48 ต้น สิ่งทดลอง คือ สูตรอาหารที่เติม mannitol และไม่เติม mannitol รวม 6 ชนิดดังนี้

1. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 ml/l + ปุ๋ยกล้วยไม้สูตร 21-21-21 อัตรา 1 gm/l (control)
2. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 ml/l + ปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21-21-21 อัตรา 1 gm/l + mannitol ความเข้มข้น 2% (w/v)
3. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 ml/l + ปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21-21-21 อัตรา 1 gm/l + mannitol ความเข้มข้น 4% (w/v)
4. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 ml/l + ปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21-21-21 อัตรา 1 gm/l + mannitol ความเข้มข้น 6% (w/v)
5. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 ml/l + ปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21-21-21 อัตรา 1 gm/l + mannitol ความเข้มข้น 8% (w/v)
6. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 ml/l + ปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21-21-21 อัตรา 1 gm/l + mannitol ความเข้มข้น 10% (w/v)

2.3 บันทึกลักษณะการเจริญเติบโต โดยแสดงเป็นน้ำหนักสดที่เพิ่ม คิดเป็นเท่าจากน้ำหนักสดเริ่มต้นเช่นเดียวกับข้อ 1.3.3 ที่ระยะการเก็บรักษา 0, 3, 6, 9 และ 12 เดือน เมื่อถึงระยะดังกล่าว นำต้นกล้วยไม้ออกมาชั่งน้ำหนัก แล้วนำกลับเข้าไปเลี้ยงในอาหารเดิม

2.4 ศึกษาการเจริญเติบโตภายหลังการเก็บรักษา นำต้นอ่อนกล้วยไม้ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยใช้ mannitol ที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 4% (w/v) ที่ระยะ 6, 9 และ 12 เดือน มาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต (อาหาร ดัดแปลง Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ ลิตร + ปุ๋ยกล้วยไม้สูตร 21–21–21 อัตรา 1 กรัม/ลิตร) ซึ่งเป็นผลจากการทดลองในข้อ 1.3 เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตภายหลังการเก็บรักษา

การทดลองที่ 3 การเก็บรักษากล้วยไม้ช้างกระ ภายใต้ความเย็นจัดโดยวิธี Encapsulation - Dehydration

การเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชวิธีนี้เป็นการเก็บในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation) ที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส ชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชจะหยุดการเจริญเติบโตโดยสิ้นเชิง เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากที่อุณหภูมินี้มีผลให้เมตาโบลิซึมของเซลล์หยุดชะงัก แต่เซลล์ยังคงมีชีวิต เมื่อต้องการปลูกก็นำมาปลูกในสภาพปกติ มีขั้นตอนของการทดลองดังนี้

3.1 ผลของ mannitol และระยะเวลาในการ dehydrate ต่อความมีชีวิตของโปรโตคอมกล้วยไม้ช้างกระ

ก่อนกระบวนการเก็บรักษาในสภาพเย็นจัดที่ -196 องศาเซลเซียส ในไนโตรเจนเหลว ชิ้นส่วนพืชจะต้องผ่านขบวนการ preculture เพื่อกระตุ้นให้มีการปรับตัวและทนทานต่อสภาพการแข็งตัวขณะการเก็บรักษาและยังต้องเติมสาร cryoprotectants ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อปรับสภาพของเซลล์ ซึ่งทำให้ทนทานต่อการแข็งตัว และการละลายตัวหลังการเก็บรักษาโดยไม่มีผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อ ในการทดลองนี้ใช้สาร mannitol ซึ่งช่วยป้องกันอันตรายให้เซลล์และยังช่วยลดความชื้นของเซลล์ด้วย อย่างไรก็ตามสารชนิดนี้ถ้าใช้ในความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจมีผลต่อเซลล์ได้ จึงต้องทำการศึกษาโดย มีวิธีการทดลองดังนี้

3.1.1 ระยะ preculture

นำโปรโตคอมของกล้วยไม้ช้างกระ (อายุประมาณ 2 เดือน) มาเลี้ยงบนอาหารเพื่อปรับสภาพ ประกอบด้วย modified Vacin and Went (1949) หรือ VW + น้ำมะพร้าว 150มิลลิลิตร/ลิตร + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) ที่เติม mannitol อัตรา 0, 2, 4, 6, และ 8% (w/v) preculture เป็นเวลา 2 วัน ที่ 25$\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในสภาพห้องเลี้ยงมีแสงสว่างจากหลอด fluoresent โดยมีช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

3.1.2 Encapsulation/dehydration

วิธีการ encapsulation/dehydration ดำเนินการตามขั้นตอนของ Sakai (1995) นำโปรโตคอมของกล้วยไม้ช้างกระหลังจาก preculture บน mannitol อัตราต่างๆ ใส่ในอาหารเหลว modified VW (1949) ที่ไม่มีส่วนประกอบของ calcium เติม 3% (w/v) sodium alginate, glycerol 2 M และ 0.4 M sucrose เขี่ยโปรโตคอมให้กระจายเป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนนำไปใส่ลงอาหาร จากนั้นดูดโปรโตคอมของช้างกระ พร้อมอาหารเหลว หยดในอาหารเหลว modified VW (1949) ที่ประกอบด้วย 0.1 M $CaCl_2$ จะทำให้เกิด alginate bead ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 - 5 มิลลิเมตร ภายใน bead มีโปรโตคอมประมาณ 2 - 3 ชิ้นต่อ bead จากนั้นแช่ alginate bead ในอาหารเหลวนี้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ bead แข็งตัวดีขึ้น

หลังจากนั้นทำการ dehydrate โดยนำ bead ที่ผ่านกระบวนการตามข้อ 3.1.2 มาลดความชื้น โดยใส่ในขวดที่บรรจุ silica gel เป็นเวลาต่างๆ ได้แก่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารดัดแปลง VW (1949) ที่เติมปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21-21-21 อัตรา 1 gm/l และ น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร /ลิตร เพื่อประเมินความมีชีวิต

3.1.3 ทำการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ 5 x 6 factorial in Completely Randomized Design (CRD) แต่ละสิ่งทดลองใช้ bead 60 bead (15 bead ต่อซ้ำ) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ปัจจัย ประกอบด้วย

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของ mannitol 5 ระดับ คือ 0, 2, 4, 6 และ 8% (w/v)

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการ dehydration 6 ช่วงคือ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง

3.1.4 บันทึกผลอัตราความมีชีวิตของโปรโตคอมใน alginate bead โดยประเมินจากการเติบโตและเพิ่มปริมาณของโปรโตคอมในแต่ละ bead เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารชักนำให้โปรโตคอมเติบโตและเพิ่มปริมาณ นาน 3 เดือน โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราความมีชีวิต (\%)} = \frac{\text{จำนวน bead ที่โปรโตคอมมีการเติบโต}}{\text{จำนวน bead ทั้งหมด}} \times 100$$

3.2 ผลของการเก็บรักษาใน liquid nitrogen ต่อความมีชีวิตของโปรโตคอม

3.2.1 preculture โปรโตคอมช้างกระ โดยใช้ mannitol ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8% (w/v) เป็นเวลา 2 วัน ที่ 25$\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในสภาพห้องเลี้ยงมีแสงสว่างจากหลอด fluoresent โดยมีช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ตามด้วยการ encapsulation ตามขั้นตอนที่ 3.1.2 และ

ระยะเวลาในการ dehydrate ชิ้น alginate bead ที่ 0, 1, 2 , 3, 4 และ 5 ชั่วโมง แล้วนำ bead เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 6 - 8 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำมาบรรจุใน cryovial แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 ชั่วโมง

3.2.2 หลังจากแช่ cryovial ในไนโตรเจนเหลว 1 ชั่วโมง นำ alginate bead มาทำให้อุ่น โดยแช่ cryovial ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำ bead มาเลี้ยงบนอาหารดัดแปลง VW (1949) ที่เติมปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21-21-21 อัตรา 1 gm/l และน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร /ลิตร เพื่อทดสอบความมีชีวิตโดยสามารถเติบโตเพิ่มปริมาณของโปรโตคอม

3.2.3 ทำการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ 5 x 6 factorial in Completely Randomized design (CRD) แต่ละสิ่งทดลองใช้ 60 bead (15 bead ต่อซ้ำ) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ปัจจัยประกอบด้วย

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของ mannitol 5 ระดับ 0, 2, 4, 6 และ 8% (w/v)

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการ dehydration 6 ช่วง คือ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง

3.2.4 บันทึกผลอัตราความมีชีวิตของโปรโตคอมใน alginate bead โดยประเมินจากการเติบโตและเพิ่มปริมาณของโปรโตคอมในแต่ละ bead เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารดัดแปลง Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ ลิตร และน้ำสกัดมันฝรั่ง100มิลลิกรัม/ลิตร นาน 3 เดือน โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราความมีชีวิต (\%)} = \frac{\text{จำนวน bead ที่โปรโตคอมมีการเติบโต}}{\text{จำนวน bead ทั้งหมด}} \times 100$$

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองที่1 การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลช้างในสภาพปลอดเชื้อ

1.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้สกุลช้างทั้ง 3 ชนิดได้แก่ ช้างกระ เขาแกะ และ ไอยเรศ ในอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ Vacin and Went (1949), อาหารดัดแปลงสูตร Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร, อาหารดัดแปลงสูตร Vacin and Went (1949) เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ลิตร, และอาหารดัดแปลง สูตร Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร และน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 3 เดือน เมล็ดกล้วยไม้ที่งอกมีลักษณะ

เป็นตุ่มขนาดเล็กสีเหลืองจนถึงสีเขียวอ่อนกระจายบนอาหารโดยมีปริมาณความงอกคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ในระดับต่างๆ กัน ช้างกระและเขาแกะสามารถงอกได้ในอาหารทั้ง 4 สูตร แต่ไอยเรศไม่สามารถงอกได้ในอาหาร Vacin and Went (1949) พบว่า ช้างกระมีคะแนนเฉลี่ยความงอกดีที่สุดที่ระดับ 2.7 คะแนน ในอาหารดัดแปลงสูตร Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร และน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ ลิตร และที่ระดับ 2.6 คะแนน ในอาหารดัดแปลงสูตร Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ ลิตร ส่วนเขาแกะ และไอยเรศ งอกได้ดีที่สุดในอาหารดัดแปลง สูตร Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร มีระดับคะแนนความงอกที่ 2.5 และ 2.3 คะแนน ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากการทดลองจะเห็นว่ากล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิดสามารถงอกได้ดีในอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบ ส่วนน้ำสกัดมันฝรั่งไม่มีผลต่อการเพิ่มความงอกของเมล็ด พิจารณาจากคะแนนความงอกของเมล็ดในอาหารที่เติมน้ำสกัดจากมันฝรั่งเพียงอย่างเดียวไม่แตกต่างจากอาหาร Vacin and Went (1949) ที่ไม่เติมทั้งน้ำมะพร้าวและมันฝรั่ง ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมะพร้าวมีส่วนประกอบของสารกลุ่ม cytokinin เช่น zeatin riboside ทำหน้าที่กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (สุรวิช, 2533) ซึ่งช่วยให้เมล็ดมีอัตราความงอกดีขึ้น

ตารางที่ 1 คะแนนความงอกของเมล็ดกล้วยไม้สกุลช้าง

สูตรอาหาร	คะแนนเฉลี่ย		
	ช้างกระ	เขาแกะ	ไอยเรศ
1. Vacin and Went (1949)	0.6	0.4	0
2. Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ ลิตร	2.6	2.5	2.3
3. Vacin and Went (1949) + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ ลิตร	1.1	0.6	0.2
4. Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ ลิตร + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ ลิตร	2.7	2.1	2.0

คะแนน 0 = เมล็ดไม่งอก

คะแนน 1 = เมล็ดงอกมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ สีเหลือง มีปริมาณ 0 – 10% ของพื้นที่

คะแนน 2 = เมล็ดงอกมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ สีเหลือง มีปริมาณ 10 - 50% ของพื้นที่

คะแนน 3 = เมล็ดงอกมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ สีเหลือง ถึงเขียวอ่อน มีปริมาณการงอกมากกว่า 50% ของพื้นที่

1.2 **ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ** protocorm like body (plbs)

หลังจากที่เมล็ดงอกแล้ว เลี้ยงต่อไปอีก 2 เดือน พบว่าเมล็ดที่งอกมีการเจริญเติบโตใน 2 ลักษณะ คือ เจริญเป็นต้นอ่อน และมีการพัฒนาเป็น plbs สีเขียวอ่อน หลังจากที่นำ plbs ของกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด เลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตรต่างๆ กัน พบว่า ในสัปดาห์ที่ 1 การเจริญเติบโตของขนาดยังไม่เห็นความแตกต่างที่เด่นชัด แต่ plbs ที่เลี้ยงในทุกสูตรอาหารจะมีสีเขียวเข้มขึ้นกว่าเดิม ในสัปดาห์ที่ 2 การเจริญเติบโตของ plbs มีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิม มีการเกาะตัวกันและมีสีเขียวเข้มขึ้น และในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 plbs จะมีขนาดใหญ่ จนเห็นได้ชัด บางขวดมีการเพิ่มปริมาณเป็น 2 ชิ้น และมีการเจริญเป็นต้นอ่อน

น้ำหนักสดของ plbs ของช้างกระ เพิ่มขึ้น ระหว่าง 1.6 – 2.4 เท่าในสัปดาห์ที่ 2 ในทุกสูตรอาหาร โดยในอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว 150 - 300 มิลลิลิตร/ลิตร ร่วมกับน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ลิตร มีน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นเป็น 2.4 และ 2.1 เท่า ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2.1) ในสัปดาห์ที่ 4 น้ำหนักสดของ plbs ที่เลี้ยงในอาหารที่เติม น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร ร่วมกับน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ลิตร ยังคงเพิ่มอย่างต่อเนื่อง เป็น 5.7 เท่า และมีความแตกต่างทางสถิติ กับน้ำหนักสดของ plbs ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว 300 มิลลิลิตร/ลิตร ร่วมกับน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยมีการเพิ่มน้ำหนักสดในอัตราที่ลดลง (ตารางที่ 2.1) ส่วนเขาแกะและไอยเรศ plbs ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ มีการเจริญในลักษณะเดียวกับช้างกระ โดยมีการเจริญเพิ่มปริมาณดีที่สุดในอาหารดัดแปลง Vacin and Went (1949) ที่เติม น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร ร่วมกับน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ลิตร คือมีการเจริญเพิ่มเป็น 4.1 และ3.7 เท่าตามลำดับ (ตารางที่ 2.2 และ 2.3)

จากการทดลองจะเห็นว่า pbls ของกล้วยไม้สกุลช้างสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุดในอาหารดัดแปลง Vacin and Went (1949) ที่มีส่วนผสมของน้ำมะพร้าวและน้ำสกัดมันฝรั่ง 150 มิลลิลิตร/ลิตร และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ เนื่องจากน้ำมะพร้าวประกอบด้วยสารที่มีองค์ประกอบของ plant growth regulator กลุ่ม cytokinin ซึ่งช่วยให้การแบ่งเซลล์และเจริญเติบโต น้ำสกัดจากมันฝรั่งยังมีส่วนประกอบของไวตามินบี 1 (thiamine), nicotinic

acid และ niacine ซึ่งช่วยให้เซลล์พืชเพิ่มขบวนการสังเคราะห์ NAD และ NADP ซึ่งเร่งการผลิตและการใช้สารประกอบหลายชนิด ทำให้มีการเจริญเติบโตดีและเร็วขึ้น (จิตราพรรณ , 2536) และนอกจากนี้มันฝรั่งยังมีสาร polyamine ส่งเสริมการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิสอีกด้วย (Kaur-Sawhney *et.al*, 1982)

ตารางที่ 2 การเจริญเติบโตของ plbs ของกล้วยไม้สกุลช้าง (การเจริญเติบโตคิดเป็นเท่าของน้ำหนักสดเริ่มต้น) ในสัปดาห์ที่2 และ 4

ตารางที่ 2.1 การเจริญเติบโตของ plbs ของช้างกระ

สูตรอาหาร	การเจริญเติบโต (เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น)[1]	
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่4
1. Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร	1.8 ab	3.1 c
2. Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 300มิลลิลิตร/ลิตร	1.6 b	2.9 c
3. Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร และน้ำสกัดมันฝรั่ง 100มิลลิกรัม/ ลิตร	2.4 a	5.7 a
4. Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 300 มิลลิลิตร/ลิตร และน้ำสกัดมันฝรั่ง 100มิลลิกรัม/ ลิตร	2.1 a	4.3 b
CV (%)	24	29

[1] ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 2.2 การเจริญเติบโตของ plbs ของเขาแกะ

สูตรอาหาร	การเจริญเติบโต (เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น)[1]	
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่4
1. Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร	1.3 ab	2.0 c
2. Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 300 มิลลิลิตร/ลิตร	1.1 b	1.7 c
3. Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร และน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ ลิตร	2.0 a	4.1 a
4. Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 300 มิลลิลิตร/ลิตร และน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ ลิตร	1.9 a	3.5 b
CV (%)	21	26

[1] ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 2.3 การเจริญเติบโตของ plbs ของไอยเรศ

สูตรอาหาร	การเจริญเติบโต (เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น)[1]	
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่4
1. Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร	1.0 ab	1.5 c
2. Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 300 มิลลิลิตร/ลิตร	0.8 b	1.2 c
3. Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร และน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ลิตร	1.9 a	3.7 a
4. Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 300 มิลลิลิตร/ลิตร และน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ลิตร	1.4 a	2.9 b
CV (%)	25	21

[1] ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT

1.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลช้าง

หลังจากนำต้นกล้ากล้วยไม้ช้างกระ เขาแกะ และไอยเรศ อายุ 6 เดือน เลี้ยงในสูตรอาหาร 4 สูตร ได้ 3 เดือน พบว่า ต้นกล้ามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นในทุกสูตรอาหาร โดยเฉพาะสูตรอาหารดัดแปลง Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร + ปุ๋ยกล้วยไม้สูตร 21–21–21 อัตรา 1 กรัม/ลิตร ต้นมีการเจริญเติบโตมากกว่าสูตรอื่น โดยขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น สีใบเข้มเขียวกว่า

ในระยะ 3 เดือนแรก ช้างกระมีอัตราการเจริญคิดเป็น 0.41 เท่า ในสูตรอาหาร Vacin and Went (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตรและปุ๋ยกล้วยไม้สูตร 21–21–21 อัตรา 1 กรัม/ลิตร และพบว่า การเติมน้ำสกัดมันฝรั่งเข้าไปในสูตรอาหารร่วมกับน้ำมะพร้าวและปุ๋ยกล้วยไม้ ไม่มีความแตกต่างกับการเติมน้ำมะพร้าว และปุ๋ยกล้วยไม้ โดยมีอัตราการเติบโตเป็น 0.42 เท่าในอาหารสูตร Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ลิตร และปุ๋ยกล้วยไม้สูตร 21–21–21 อัตรา 1 กรัม/ลิตร โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในทางตรงกันข้ามเขาแกะและไอยเรศเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำมะพร้าว + ปุ๋ยกล้วยไม้และน้ำสกัดมันฝรั่งทำให้การเจริญเติบโตลดลงเมื่อเทียบกับการเติมน้ำมะพร้าวและปุ๋ยกล้วยไม้ ในเขาแกะและไอยเรศ จะมีการเติบโตเพิ่มขึ้น 0.46 และ 0.49 เท่าตามลำดับและต่างกับอาหารสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3.2 และ 3.3)

ในเดือนที่ 6 และเดือนที่ 9 ช้างกระจะมีการเจริญไม่แตกต่างกันในอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว และปุ๋ย และ อาหารที่เติมน้ำมะพร้าว มันฝรั่งสกัดและปุ๋ย แต่ในเขาแกะ และไอยเรศจะพบความแตกต่างของต้นกล้วยไม้ ในสูตรอาหารต่างๆ ได้เด่นชัดขึ้น ในสูตรอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวและปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21-21-21 (สูตรที่ 2) ต้นกล้วยไม้จะมีสีเขียวเข้มกว่า ลำต้นและรากมีลักษณะอวบแข็งแรงขึ้น ใบมีขนาดใหญ่ กว่าต้นในอาหารสูตรอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด และมีน้ำหนักสดมากกว่าในอาหารสูตรอื่นๆ

การเลี้ยงต้นกล้ากล้วยไม้สกุลช้างในสูตรอาหารที่ใช้ปุ๋ยกล้วยไม้เพิ่มลงไป ในอาหาร Vacin and Went พบว่าการใช้ปุ๋ยอัตรา 1 กรัม/ลิตร ทำให้ต้นกล้ามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ลำต้นและรากอวบใหญ่ ดีกว่าสูตร Vacin - Went ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทั้งนี้เป็นเพราะในสูตรปุ๋ยมีจำนวนธาตุอาหารที่พืชต้องการมากกว่าสูตร Vacin and Went ปกติ เนื่องจากประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก N P K และยังมีธาตุอาหารหลายชนิด ได้แก่ วิตามิน B_1 B_{12} Fe Cu Br Mo Mg Mn และ Zn ซึ่งสารเหล่านี้ Arditfi (1993) รายงานว่ามีส่วนช่วยในการงอก และส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้ากล้วยไม้ นอกจากนี้ยังมีสารอินทรีย์ ซึ่งได้แก่ น้ำมะพร้าวอ่อน เป็นสารช่วยในการเจริญเติบโต และให้ผลดีสำหรับกล้วยไม้ทั่วๆ ไป (จิตราพรรณ, 2536) ส่วนการใช้น้ำสกัดมันฝรั่ง

ผสมในอาหารเลี้ยงเพื่อเร่งการเจริญเติบโตไม่ทำให้น้ำหนักสดของเขาแกะและไอยเรศเพิ่ม เมื่อเทียบกับการใส่ปุ๋ยกล้วยไม้อย่างเดียว จากการสังเกต อาหารสูตรที่มีน้ำสกัดมันฝรั่ง พบว่า เกิดกลุ่มของโปรโตคอมบริเวณฐานของต้นกล้วยไม้ที่ติดกับอาหาร ซึ่งอาจเนื่องจากสารอินทรีย์ในน้ำสกัดมันฝรั่งมีผลต่อการชักนำให้เกิดโปรโตคอมมากกว่าการเจริญเติบโตและพัฒนาของลำต้น จึงทำให้น้ำหนักสดของต้นกล้วยไม้เพิ่มขึ้นในอัตราที่น้อยลง

ตารางที่ 3 การเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้สกุลช้าง (คิดเป็นเท่าจากน้ำหนักสดเริ่มต้น) ระยะ 3, 6 และ 9 เดือน

ตาราง 3.1 การเจริญเติบโตของช้างกระ

สูตรอาหาร	การเจริญเติบโต (เท่าของ นน. เริ่มต้น)[1]		
	เดือนที่ 3	เดือนที่ 6	เดือนที่ 9
1. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ ลิตร	0.24 b	0.59 b	0.94 b
2. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ ลิตร + ปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21–21–21 อัตรา 1 กรัม/ลิตร	0.41 a	0.91 a	1.70 a
3. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ ลิตร + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม /ลิตร	0.29 b	0.60 b	0.90 b
4. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม /ลิตร + ปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21–21-21 อัตรา 1 กรัม/ลิตร	0.42 a	0.95 a	1.62 a
CV (%)	28	33	24

[1] ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT

ตาราง 3.2 การเจริญเติบโตของเขาแกะ

สูตรอาหาร	การเจริญเติบโต (เท่าของ นน. เริ่มต้น)[1]		
	เดือนที่ 3	เดือนที่ 6	เดือนที่ 9
1. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ ลิตร	0.25 b	0.51 b	0.82 b
2. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ ลิตร + ปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21–21–21 อัตรา 1 กรัม/ลิตร	0.46 a	1.21 a	2.05 a
3. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ ลิตร + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม /ลิตร	0.25 b	0.52 b	0.89 b
4. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม /ลิตร + ปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21–21-21 อัตรา 1 กรัม/ลิตร	0.23 b	0.49 b	0.93 b
CV (%)	21	23	29

[1] ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT

ตาราง 3.3 การเจริญเติบโตของไอยเรศ

สูตรอาหาร	การเจริญเติบโต (เท่าของ นน. เริ่มต้น)[1]		
	เดือนที่ 3	เดือนที่ 6	เดือนที่ 9
1. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ ลิตร	0.20 b	0.54 b	0.98 b
2. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ ลิตร + ปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21–21–21 อัตรา 1 กรัม/ลิตร	0.49 a	1.15 a	1.82 a
3. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ ลิตร + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม /ลิตร	0.21 b	0.53 b	0.99 b
4. อาหารดัดแปลง VW (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม /ลิตร + ปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21–21-21 อัตรา 1 กรัม/ลิตร	0.24 b	0.52 b	0.96 b
CV (%)	28	24	21

[1] ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT

การทดลองที่ 2 การเก็บรักษาต้นอ่อนกล้วยไม้สกุลช้างในระยะปานกลางโดยการชะลออัตราการเจริญเติบโต (slow growth storage)

การเก็บรักษาต้นอ่อนของกล้วยไม้สกุลช้างโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ลักษณะของต้นกล้วยไม้จะต้องมีการเจริญเติบโตน้อยลงทั้งทางด้านความสูง การแตกใบ และความยาวของรากแต่ไม่ตายขณะเก็บรักษา นอกจากนี้เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตตามปกติ มีพัฒนาการที่แข็งแรงและไม่เกิดความผันแปรหรือกลายพันธุ์

ภายหลังจากการเลี้ยงช้างกระ เขาแกะ และไอยเรศ ในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ตระกูลช้าง คือ อาหาร VW + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร + ปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21-21-21 อัตรา 1 gm/l (ซึ่งเป็นผลจากการทดลองในข้อ 1.3)ที่ไม่เติม mannitol และเติม mannitol ความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10% (w/v) ในระยะ 3, 6, 9 และ 12

เดือน จากตาราง 4.1, 4.2 และ 4.3 พบว่าในอาหารที่ไม่เติม mannitol กล้วยไม้มีการเจริญเติบโตตามปกติ โดยมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดซึ่งคิดเป็นจำนวนเท่าของน้ำหนักสดเริ่มต้นเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่เมื่อเติมสาร osmoticum ซึ่งช่วยชะลอการเติบโต ซึ่งได้แก่ mannitol ที่ระดับต่างๆ กัน พบว่าการเติม mannitol ในทุกระดับความเข้มข้น อัตราการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่เติม mannitol

ในช้างกระที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่ 3 – 9 เดือน อัตราการเจริญของกล้วยไม้ ในอาหารที่เติม mannitol ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 2 – 4% (w/v) ไม่แตกต่างกัน ยังคงมีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักสดอยู่ แต่ mannitol ที่ระดับความเข้มข้น 4% (w/v) อัตราการเพิ่มน้ำหนักสดจะลดลงในเดือนที่ 12 ส่วนอาหารที่เติม mannitol ความเข้มข้น 6% (w/v) อัตราการเพิ่มน้ำหนักจะลดลง โดยเฉพาะในเดือนที่ 9 และ 12 และใบของกล้วยไม้มีสีซีดเหลือง และที่ 8 และ10% (w/v) จะพบการตายในเดือนที่ 9 และ 12 สำหรับเขาแกะ และ ไอยเรศ มีอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดในทำนองเดียวกัน คือ จะค่อยๆ ลดลง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม mannitol ที่ความเข้มข้น 6, 8 และ 10% (w/v) และพบอาการใบเหลืองซีด และตายเช่นเดียวกัน

ในการทดลองนี้ การเติม mannitol ความเข้มข้นต่ำๆ 2 และ 4% (w/v) ลงในอาหารสามารถลดอัตราการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ได้ดี มีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักสดลดลงแต่ไม่มีอาการของใบเหลืองซีด และตาย แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้น เป็น 6 - 10% (w/v) หลังจากเลี้ยงไปได้ 9 เดือน ใบจะซีดลงเรื่อยและตายในเดือนที่ 12 โดยปกติแล้วธาตุอาหารถูกดูดซึมเข้าเซลล์พืชโดยความแตกต่างของ osmotic pressure ในเซลล์ การเติม mannitol ในอาหารเลี้ยงกล้วยไม้จึงเป็นการเพิ่ม osmotic potential ของอาหาร ทำให้การดูดซึมของธาตุอาหารเข้าสู่เซลล์พืชลดลง (Golnirzaie and Toledo, 1999) ดังนั้นความเข้มข้นของ mannitol ที่ระดับสูงเกินไปจะมีผลต่อขบวนการ osmosis จึงทำให้การเพิ่มของน้ำหนักสดกล้วยไม้สดลดลง นอกจากนี้มีรายงานว่า mannitol สามารถดูดซึมเข้าไปในเซลล์พืชได้ และยังเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย (Thompson *et al*., 1986) ดังนั้นกล้วยไม้ที่เลี้ยงบนอาหารที่มี mannitol ที่ความเข้มข้น 6, 8 และ 10% (w/v) จึงพบการตายของกล้วยไม้และจะพบมากขึ้นเมื่อเลี้ยงไปได้นานกว่า 6 เดือน

เมื่อนำต้นอ่อนกล้วยไม้ที่ผ่านการเก็บรักษา โดยใช้ mannitol ที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 4% (w/v) ที่ระยะ 6, 9 และ 12 เดือน มาเลี้ยงในอาหาร ดัดแปลง Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร + ปุ๋ยกล้วยไม้สูตร 21–21–21 อัตรา 1 กรัม/ลิตร พบว่ามีการเจริญเติบโตเป็นปกติ

ตารางที่ 4 อัตราการเพิ่มน้ำหนักสดของกล้วยไม้สกุลช้าง เลี้ยงบนอาหารชะลอการเจริญเติบโตที่มี mannitol อัตราต่างๆ (คิดเป็นเท่าจากน้ำหนักสดเริ่มต้น) ระยะ 3, 6, 9 และ 12 เดือน

ตาราง 4.1 อัตราการเพิ่มน้ำหนักสดของช้างกระ

สูตรอาหารที่เติม mannitol	น้ำหนักสดที่เพิ่ม(เท่า)[1]			
	3เดือน	6เดือน	9เดือน	12เดือน
0%	0.43 a	0.89 a	1.50 a	1.85 a
2%	0.31 b	0.51 b	0.63 b	0.78 b
4%	0.27 b	0.45 bc	0.51 b	0.64 c
6%	0.19 bc	0.38c	0.31 c	0.27 d
8%	0.16 c	0.22 cd	0.18 d	0.14 e
10%	0.14 c	0.19 d	0.15d	0.10 e
CV (%)	29	32	28	30

[1] ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT

ตาราง 4.2 อัตราการเพิ่มน้ำหนักสดของเขาแกะ

สูตรอาหารที่เติม mannitol	น้ำหนักสดที่เพิ่ม(เท่า)[1]			
	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน
0%	0.48a	1.05 a	1.54 a	1.90 a
2%	0.27 b	0.38 b	0.52 b	0.68 b
4%	0.27 b	0.32 b	0.45 b	0.51 b
6%	0.19 bc	0.19 c	0.16 c	0.14 c
8%	0.15 c	0.15 c	0.12 c	0.09 cd
10%	0.11 c	0.12 c	0.09 d	0.06 d
CV (%)	28	27	33	31

[1] ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT

ตาราง 4.3 อัตราการเพิ่มน้ำหนักสดของไอยเรศ

สูตรอาหารที่เติม mannitol	น้ำหนักสดที่เพิ่ม(เท่า)[1]			
	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน
0%	0.51 a	1.08 a	1.42 a	2.05 a
2%	0.28 b	0.51 b	0.69 b	0.80 b
4%	0.29 b	0.48 b	0.59 b	0.79 b
6%	0.25 bc	0.27c	0.25 c	0.18 c
8%	0.20 cd	0.19 c	0.18 cd	0.12 cd
10%	0.18 cd	0.19 c	0.14 d	0.09 d
CV (%)	32	26	28	29

[1] ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT

การทดลองที่ 3 การเก็บรักษาเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ ภายใต้ความเย็นจัดโดยวิธี Encapsulation - Dehydration

การเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชในระยะยาวโดยการแช่เย็นจัดในไนโตรเจนเหลวที่ –196 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการที่ใช้กันมากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สิ่งสำคัญของวิธีการนี้คือ หลีกเลี่ยงการเกิดการเสียหายของเซลล์ในช่วงที่แช่ในไนโตรเจนเหลว วิธี cryopreservation นี้ เซลล์หรือเนื้อเยื่อต้องผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ ก่อนที่จะแช่ในไนโตรเจนเหลว ดังนั้นขั้นตอนระยะการ dehydration ของalginate bead จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่นำมาพิจารณาในการทดลอง

3.1 ผลของ mannitol และระยะเวลาในการ dehydrate ต่อความมีชีวิตของโปรโตคอมกล้วยไม้ช้างกระ

วิธีการ encapsulation/dehydration ของการทดลองนี้มีกระบวนการของ cryoprotective 2 ขั้นตอน คือ preculture ชิ้นส่วนพืชบน mannitol และการ dehydration alginate bead ในขวดที่บรรจุ silica gel เป็นระยะเวลาต่างๆ วิธีการในขั้นตอนนี้มีความสำคัญต่อการมีชีวิตรอดของโปรโตคอม ถ้าใช้ cryoprotectant ซึ่งก็คือ mannitol ความเข้มข้นที่สูงเกินไป หรือ การ dehydrated ในระยะเวลาที่ไม่เหมาะสม ซึ่งทั้ง 2 ปัจจัยมีผลต่อความมีชีวิตของโปรโตคอม จึงได้ทำการทดลองแบบ factorial in CRD เพื่อศึกษาถึงปัจจัยทั้ง 2 ชนิด โดยใช้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเติบโตเพิ่มปริมาณ

ของโปรโตคอมที่อยู่ภายใน bead ข้อมูลที่ได้นำมาตรวจสอบข้อกำหนด (Assumption) ทางสถิติ พบว่าไม่เป็น normal distribution จึงได้ทำการแปลงข้อมูลโดยใช้ $\sin^{-1}\sqrt{\text{percentage}}$ และจากการวิเคราะห์พบว่าทั้งความเข้มข้นของ mannitol และระยะเวลาในการ dehydrate ล้วนมีผลต่อความมีชีวิตของโปรโตคอมและมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน เมื่อความเข้มข้นของ mannitol สูงขึ้นในแต่ละช่วงเวลาของการ dehydrated เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของ alginate bead จะค่อยๆ ลดลง ในทำนองเดียวกัน ระยะเวลาของการ dehydrated ยิ่งนานขึ้นแปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต ของ alginate bead ก็จะค่อยๆ ลดลง ในแต่ละความเข้มข้นของ mannitol เช่นเดียวกัน

จากตาราง ที่ 5.1 เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ mannitol ที่ใช้ preculture ภายหลังเลี้ยง algenate bead ในอาหารที่ใช้เพิ่มปริมาณโปรโตคอม การใช้ mannitol ระดับ 0, 2, 4, 6 และ 8% (w/v) นาน 2 วันในแต่ละความเข้มข้น algenate bead จะมีอัตราความมีชีวิตลดลง เมื่อนำมา dehydrated เป็นเวลา 4 และ 5 ชั่วโมง และแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับระยะเวลาในการ dehydrate 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ส่วนการ dehydrate ในแต่ละช่วงเวลา เมื่อความเข้มข้นของ mannitol เพิ่มขึ้น อัตราความมีชีวิตจะลดลง โดยที่ความเข้มข้น 8% (w/v) จะมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตน้อยที่สุด คือ 48.24% เมื่อใช้เวลาในการ dehydrated นาน 5 ชั่วโมง (ตาราง 5.2) ทั้งนี้เป็นเพราะระยะเวลาในการ dehydrated และความเข้มข้นของ mannitol ที่สูงเกินไป ทำให้ pH ภายในเซลล์เปลี่ยน เพิ่มความเข้มข้นของ electrolyte และเกิด interaction ระหว่าง macro molecule เป็นผลให้เกิดการเสียน้ำในเซลล์ (Dumet and Benson, 2000) จึงเกิดการตายมากกว่าครึ่ง

3.2 ผลของการเก็บรักษาใน liquid nitrogen ต่อความมีชีวิตของโปรโตคอม

ในการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชใน liquid nitrogen เซลล์หรือชิ้นส่วนของพืชจะต้องผ่านขั้นตอนการ preculture ที่เหมาะสมเพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์ในระดับที่พอเหมาะเพื่อป้องกันเซลล์ถูกทำลายโดยผลึกน้ำแข็งเมื่อนำไปแช่ใน liquid nitrogen จากการทดลองภายหลังจากแช่ liquid nitrogen นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเพิ่มปริมาณโปรโตคอม algenate beads มีเปอร์เซนต์ความมีชีวิตน้อยมาก การ preculture โดยใช้ mannitol ความเข้มข้น 6% (w/v) ที่ระยะเวลา dehydrated 3 และ 4 ชั่วโมง และที่ระดับความเข้มข้น 8% (w/v) ระยะเวลา dehydrated 4 ชั่วโมง จะมีเปอร์เซนต์ความมีชีวิต 6.5, 4.9 และ 3.3% ตามลำดับ ส่วนใน treatment อื่นๆ โปรโตคอมจะตายหมด จึงไม่สามารถวิเคราะห์ผลทางสถิติได้

ในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชโดยวิธี cryopreservation มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง เช่น ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเก็บรักษา การใช้โปรโตคอมของกล้วยไม้ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแบ่งตัวและพัฒนาได้อย่างรวดเร็ว เป็นเซลล์อยู่ในช่วงของการเจริญเติบโต (expotential phase) จะมีความ

ทนทานต่อสภาพเครียดหรือความเย็นจัดได้ดีกว่าเซลล์ในระยะ lag phase หรือ stationary phase เนื่องจากเป็นเซลล์ขนาดเล็ก มีขนาด vacuole ซึ่งเป็นแหล่งเก็บน้ำเล็ก มีปริมาณน้ำน้อย เมื่อผ่านขบวนการ preculture ทำให้มีความทนทานต่อสภาพเย็นจัดได้ นอกจากนี้เซลล์ระยะนี้มีการทนทานต่อการเสียน้ำมากกว่า จึงมีชีวิตรอดหลังจากการเก็บใน liquid nitrogen (Yoshida *et al*.,1993 และ Dereuddre, 1998) และนอกจากนี้การนำ algenate beads ไปแช่ในที่เย็นจัดแต่ไม่แข็ง ก่อนแช่ liquid nitrogen สามารถชักนำให้ความมีชีวิตหลังเก็บรักษาสูงขึ้น (Chen and Katha, 1985) ในการทดลองนี้ได้นำ algenate beads ที่ผ่านการ preculture ไปแช่ในตู้เย็น (5 - 8 องศาเซลเซียส) นาน 24 ชั่วโมงก่อนการนำไปแช่ liquid nitrogen อาจเป็นการช่วยเพิ่มความอยู่รอดได้บ้าง แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีอัตราการรอดชีวิตภายหลังจากเก็บรักษาค่อนข้างน้อย อาจเนื่องมาจากการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์และระหว่างเซลล์พืช ทำให้เซลล์แตก (Crowe *et al*., 1988) หรือเกิดจากการสูญเสียสภาพสมดุลย์ของ lipid bilayer ของ cell membrane ทำให้เซลล์ตาย (Steponkus, 1984)

ตารางที่ 5 ผลของการ preculture ของ alginate bead ต่อ % ความมีชีวิตของ alginate bead ซึ่งมีโปรโตคอมช้างกระ (ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว) แสดงข้อมูลของ Back Transformed Scale

ตารางที่ 5.1 ผลของ mannitol ต่อ % ความมีชีวิตของ alginate bead ที่ระยะเวลาในการ dehydrate ต่างกัน

เวลา dehydration (ชั่วโมง)	% ความมีชีวิต[1]				
	ความเข้มข้นของ mannitol (% w/v)				
	0	2	4	6	8
0	81.32 ab	84.30 a	79.01 a	68.51 a	63.52 a
1	83.32 a	83.05 a	78.51 a	66.77 a	62.26 a
2	79.86 ab	81.01 ab	78.52 a	69.51 a	62.79 a
3	72.51ab	73.53 b	69.51 ab	67.78 a	61.56 a
4	56.51 c	55.76 c	56.51 bc	52.75 b	46.00 b
5	55.50 c	54.51 c	49.00 c	50.24 b	48.24 b

ตารางที่ 5.2 ผลของระยะเวลาในการ dehydrate ต่อ % ความมีชีวิตของ alginate bead ที่ mannitol ความเข้มข้นระดับต่างๆ

ความเข้มข้นของ mannitol (% w/v)	% ความมีชีวิต[1]					
	เวลา dehydration (ชั่วโมง)					
	0	1	2	3	4	5
0	81.32 a	83.32 a	79.86 a	72.51 a	56.51 a	55.50 a
2	84.30 a	83.05 a	81.01 a	73.53 a	55.76 a	54.51 a
4	79.01 ab	78.51 ab	78.52 a	69.51ab	56.51 a	49.00 ab
6	68.51 bc	66.77 bc	69.51 b	67.78 ab	52.75 ab	50.24 ab
8	63.52 c	62.26 c	62.79 b	61.56 b	46.00 b	48.24 b

CV = 31%

[1] ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 6 % ความมีชีวิตของโปรโตคอมช้างกระ หลังแช่ในไนโตรเจนเหลว เมื่อผ่านการ preculture บน mannitol และ dehydrate ที่ระยะต่างๆ

ความเข้มข้นของ mannitol (% w/v)	% ความมีชีวิต					
	เวลา dehydration (ชั่วโมง)					
	0	1	2	3	4	5
0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	6.5	4.9	0
8	0	0	0	3.3	0	0

สรุปผลการทดลอง

การขยายพันธุ์และการเก็บรักษากล้วยไม้สกุลช้างในสภาพปลอดเชื้อ ผลการทดลองสรุปได้ ดังนี้

1. การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลช้างในสภาพปลอดเชื้อทั้ง 3 ชนิด ช้างกระงอกดีที่สุดในอาหารดัดแปลง Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร และน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ระดับ 2.7 คะแนน ส่วนเขาแกะ และไอยเรศ งอกได้ดีที่สุดในอาหารดัดแปลง Vacin and Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร มีระดับคะแนนความงอกที่ 2.5 และ 2.3 คะแนน ตามลำดับ หลังจากเมล็ดงอกจะเจริญเป็นต้นอ่อน และมีการพัฒนาเป็น plbs สีเขียวอ่อน นำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว จะมีการเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณดีที่สุดในอาหารดัดแปลง Vacin and Went (1949) ที่เติม น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร ร่วมกับน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 มิลลิกรัม/ลิตร หลังจากเลี้ยงได้ระยะหนึ่ง plbs จะเพิ่มปริมาณและพัฒนาเป็นต้นอ่อน เมื่อศึกษาอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของต้นอ่อนพบว่า ในเดือนที่ 9 กล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด เจริญได้ดีในอาหาร Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร + ปุ๋ยกล้วยไม้ สูตร 21–21–21 อัตรา 1 กรัม/ลิตร โดยมีอัตราการเจริญของช้างกระ เขาแกะ และไอยเรศ เป็น 1.70, 2.05 และ 1.82 เท่าของน้ำหนักสดเริ่มต้นตามลำดับ

2. การเก็บรักษาต้นอ่อนกล้วยไม้สกุลช้างในระยะปานกลางโดยการชะลออัตราการเจริญเติบโต (slow growth storage) ในการทดลองใช้สาร mannitol ซึ่งเป็น osmoticum ช่วยชะลอการเติบโต พบว่า การเติม mannitol ที่ระดับความเข้มข้น 2 – 4% (w/v) อัตราการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด คิดเป็นเท่าของน้ำหนักเริ่มต้น ยังคงเพิ่มขึ้นจากระยะการเลี้ยง 3 – 12 เดือน แต่ที่ความเข้มข้น 6, 8 และ 10% (w/v) ตั้งแต่เดือนที่6 อัตราการเจริญจะลดลงเรื่อยๆ และมีลักษณะใบขาวซีด และตาย

3. การเก็บรักษาโปรโตคอมกล้วยไม้ช้างกระ ภายใต้ความเย็นจัดโดยวิธี Encapsulation – Dehydration โปรโตคอม ถูกนำไป preculture ด้วย mannitol บนอาหาร modified Vacin and Went (1949) + น้ำมะพร้าว 150มิลลิลิตร/ลิตร + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) และหุ้มด้วย sodium – alginate ทำการ dehydrated โดยใช้ silicagel การศึกษาผลของ mannitol และระยะเวลาในการ dehydrate พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ mannitol สูงขึ้นในแต่ละช่วงเวลาของการ dehydrated เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของ alginate bead จะค่อยๆ ลดลง ในทำนองเดียวกันระยะเวลาของการ dehydrated ยิ่งนานขึ้นเท่าไรเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต ของ alginate bead ก็จะค่อยๆ ลดลง ในแต่ละความเข้มข้นของ mannitol เช่นเดียวกัน และเมื่อนำไปแช่ใน liquid nitrogen นาน 1 ชั่วโมง จึงนำมาเลี้ยงในอาหาร เพื่อทดสอบความมีชีวิตพบว่า มีเปอร์เซนต์ความมีชีวิต 6.5, 4.9 และ 3.3% เมื่อผ่านการ preculture โดยใช้ mannitol ความเข้มข้น 6% (w/v) ที่ระยะเวลา dehydrated 3 และ 4 ชั่วโมง และที่ระดับความเข้มข้น 8% (w/v) ระยะเวลา dehydrated 4 ชั่วโมง ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

จิตราพรรณ พิลึก. 2536. การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้. ภาควิชาพืชสวน. คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , กรุงเทพฯ. 82 น.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2533. องค์ประกอบและการเตรียมอาหารสังเคราะห์. เอกสารประกอบการสอนวิชาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 25 หน้า

Arditti, J. and R. Ernst. 1993. Micropropagation of Orchids. John Wiley & son, inc., New York.

Chen, T.H.H., P.H. Li, and K.K. Katha. 1985. Cryopreservation of wheat suspension cultures and regenarable callus. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 4 : 101-109.

Crowe, J.H., J.F. Carpenter, L.M. Crowe, T.J. Anchordoguy. 1988. Interaction of sugars with membranes. Biochemical Biophysical Acta. 947 : 367-384.

Dereuddre, J. and C. Basaglia. 1998. Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllas* L. var. Kole) apical and axillary shoot tips excised from different aged *in vitro* plantlets. Plant Cell Rep. 7 : 170-173.

Dumet, D. and E.E. Benson. 2000. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In : Engelmann F, Takagi, H. (eds). Cryopreservation of tropical plant germplasm. Italy, IPGRI. Pp. 43-56.

Golmirzaie, A. and J. Toledo. 1999. Noncryogenic, long-term germplasm storage, pp. 95-101. In. R.D. Hall (ed.). Methods in Molecular Biology, vol. 111. Plant Cell Culture Protocols. Humana Press Inc., Totowa.

Kaur- Sawhney, R., L. Shih and A .W.Galston. 1982 . Relation of polyamine biosynthesis to the inhibition sprouting in potato tubers . Plant Physiol . 69 : 411 – 415.

Steponkus, P.L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. Annu. Rev. Plant Physio. 35 : 534-584.

Street, H. E. 1977. Plant Tissue and Cell Culture. London : Black well Scientific Publication.

Thompson, M.R., T.J. Douglas, H. Obata-Sasamoto, and T.A. Thorpe. 1986. Mannitol metabolism in cultured plant cells. Physiol. Plant. 67 : 365-369.

Vacin, E. F. and F. W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110 : 605-613.

Yoshida, S., Y. Hattanda, T. Suyama. 1993. Variation in chilling sensitivity of suspension cultured cells of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) during the growth cycle. Plant Cell Rep. 34 : 673 - 679

ภาคผนวก

1. Modified Vacin and Went (VW, 1949) medium (pH 5.7)

Components	mg/l
$Ca_3(PO_4)2$	200
KNO_3	525
KH_2PO_4	250
$MgSO_4.7H_2O$	250
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
Na_2EDTA	37.25
$MnSO_4.7H_2O$	5.7
Sucrose	3% (w/v)
Gelrite	0.3% (w/v)

2. Na-alginate solution

Components	Concentrate
Na-alginate	3% (w/v)
Sucrose	0.4 M
Glycerol	2 M
Calcium – free VW (1949) medium (pH 5.2)	