1รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : แผนบูรณาการวิจัยและพัฒนาเพื่อความยั่งยืนของกล้วยไม้และไมดอกไมประดับ
2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนากล้วยไม้ที่มีศักยภาพอื่น ๆ

   กิจกรรม : การวิจัยและพัฒนากล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตา

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อและขยายพันธุ์สิงโตกลอกตา lobbii complex ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : In vitro micropropagation *Bulbophyllum* Thou. lobbii complex
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	: นายยรรยง พันธ์พฤกษ์	สังกัด	ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร
ผู้ร่วมงาน	: นายอำนวย อรรถลังรอง	สังกัด	สถาบันวิจัยพืชสวน
	: ผศ.ดร.พัฒน ทวีโภค	สังกัด	คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

5. **บทคัดย่อ** :

การฟอกฆ่าเชื้อหน่ออ่อนสิงโตสุมาตรานั่ม (*Bulbophyllum sumatranum* Garay, Hamer & Siegris) และ สิงโตแคลปโตเนนเซ (*Bulbophyllum claptonense* Rolfe.) เพื่อทำการขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า การฟอกหน่ออ่อนที่มีการลอกกาบใบออก และตัดใบยอดอ่อนให้สั้นลง ด้วยการล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปฟอกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ (คลอรอกซ์ : Clorox) 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที สามารถทำให้ได้ชิ้นพืชที่ปลอดเชื้อ 100 % บนอาหารสูตร P723 ในส่วนของการเพิ่มจำนวนต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อสามารถทำได้โดยการนำต้นอ่อนที่ได้ในสภาพปลอดเชื้อ ตัดแบ่งเป็นสองส่วนคือ ส่วยปลายยอด และส่วนฐานไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร P668 พบว่า จะมีการตายของชิ้นส่วนเริ่มต้น หลังจากมีการแตกหน่ออ่อน แล้วหน่ออ่อน จะมีการเพิ่มจำนวนหน่อได้มากบนอาหารสูตร P668 ที่มีการเพิ่มน้ำมะพร้าอ่อน 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ที่ระดับน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์

กรมวิชาการเกษตร

Abstrac

Young shoot of *Bulbophyllum sumatranum* Garay, Hamer & Siegris) and *Bulbophyllum claptonense* Rolfe. disinfection for tissue culture propagation *In vitro*. Remove leaves sheats and cutting young leaf befor soak in 95 % alcohol for 5 minute after that rinse in sterile distrill water and sterile wite 10 % sodium hypochlorite solution for 20 minute can make 100 % sterile explants on P723 medium. Proliferation young plants *in vitro* used sterile young plant cutting in to part as distal and proximal can germinate on P668 medium. Some piece of start explant will turn brown after sprout new shoot and new shoot will be a large increase in the number of shoots on P668 medium that add 150 milliliter coconut water at 1 % sucrose level.

คำสำคัญ (keyword) : ฟอกฆ่าเชื้อ สิงโตกลอกตา หน่ออ่อน เพาะเลี้งเนื่อเยื่อ สภาพปลอดเชื้อ

6. คำนำ

David Moore's เป็นนักวิทยาศาสตร์คนแรกที่ทำการศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยวิธีเพาะเมล็ด ระหว่างปี ค.ศ. 1807-1879 ต่อมา Noël Bernard (1874-1911) ได้ทำการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบสมชีพในสภาพปลอดเชื้อสำเร็จ ซึ่งเป็นต้นทางของการขยาพันธุ์ในสภาพปลอเชื้อของพืชอีกหลายชนิดในเวลาต่อมา ในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 1884-1958 Lewis Knudson's ได้พัฒนาการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ และถูกพัฒนาไปสู่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ โดยทำในพืชชนิดอื่นที่ไม่ใช่กล้วยไม้ การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มเป็นที่รู้จักและถูกพัฒนาโดยนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน โดยพัฒนาจากการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อก่อน และเริ่มพัฒนามาสู่การเพาะเลี้ยงยอดอ่อน เริ่มเป็นที่รู้จักจากการหาทางขยายพันธุ์ *Cymbidium* เพื่อให้ปลอดจากไวรัสโดย Georges Morel ในปี 1960 กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตา เป็นกล้วยไม้ที่มีการกระจายตัวทั่วโลก โดยเฉพาะในเขตร้อนชื้นแถบ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จัดเป็นศูนย์กลางการกระจายตัวของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตา (*Bulbophyllum* Thou.) ประเทศไทยมีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วทุกภาค กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาที่พบในประเทศไทย มีการออกดอกหลากหลายแบบ เช่น ช่อดอกแบบร่ม ได้แก่ Section *Cirrhopetalum* และ Section *Cirrhopetaloides* ช่อดอกแบบรวงข้าว ได้แก่ Section *Racemosae* และ Section *Careyana* และพวกที่ออกดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ ได้แก่ Section *Sestochilos* และ Section *Stenochilus* สลิล (2553) พบสิงโตแต่ละชนิดได้ในสภาพพื้นที่ที่แตกต่างกัน การปลูกเลี้ยงสิงโตกลอกตาที่มีสถานที่ในธรรมชาติต่างกัน ย่อมมีการปรับตัวที่แตกต่างกัน การปลูกเลี้ยงให้งอกงามและการขยายพันธุ์ จำเป็นต้องมีความรู้เกี่ยวกับแหล่งกำเนิด สภาพแวดล้อม และบรรยากาศของถิ่นที่อยู่ และพื้นที่การกระจายพันธุ์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาวิธิการจัดการขยายพันธุ์ต่อไป

สูตรอาหารปลอดเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้มีหลากหลายสูตร มีสูตรที่เป็นสูตรมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป และสูตรทางการค้าที่มีการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบบางชนิดเพื่อให้เกิดความเหมาะสมกับกล้วยไม้แต่ละชนิดที่ทำการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันไป สิ่งที่สำคัญต่อการงอกและการเจริญเติบโต เช่นความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง สารประกอบอินทรีย์ (Pitchard, 1989) และ การเลือกสูตรอาหารให้เหมาะสมกับ

กรมวิชาการเกษตร

ช่วงการเจริญเติบโตของกล้วยไม้แต่ละชนิด สามารถทำให้กล้วยไม้มีพัฒนาการที่ดีขึ้น (จิตราพรรณ, 2536) วิตามินเป็นกลุ่มของสารอินทรีย์ที่ซับซ้อน มีผลต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาของกล้วยไม้แต่ละชนิดในช่วงการเจริญเติบโตต่างกันจะแตกต่างกัน (Arditti, 1984)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ เป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เป็นการขยายพันธุ์ที่ใช้กับต้นที่มีลักษณะพิเศษ หรือต้นที่ผ่านการคัดเลือกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ใช้เพื่อรักษาและลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีไว้ไม่ให้สูญหายไป (จิตราพรรณ,2536) การเพาะขยายพันธุ์สิงโตกลอกตาเพื่อให้ได้จำนวนมากในช่วงระยะเวลาอันสั้น มีต้นทุนที่ต่ำ และได้ต้นที่สมบูรณ์ สามารถทำได้ง่าย โดยการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ แต่ต้นที่ได้จะมีพันธุกรรมที่แตกต่างกันซึ่งไม่ใช่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่เป็นการเพิ่มจำนวนต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ ต้นที่ได้จะมีลักษณะแตกต่างกัน ต่างจากการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่จะได้ต้นจำนวนมากในช่วงเวลาอันสั้นเช่นกัน และทุกต้นมีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกัน แต่ต้องใช้กระบวนการที่ต้องใช้ต้นเต็มวัยจากสภาพภายนอก ซึ่งมีต้นทุนสูงกว่า (Yam T.W. และคณะ,2017) ความสามารถในการการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในแต่ละพืช มีความแตกต่างกัน สูตรอาหาร และกระบวนการในการเพิ่มจำนวน มีความแตกต่างกัน หน่ออ่อนของสิงโตกลอกตาชั้น *sestochilos* จะมีลักษณะเป็นแท่งปลายแบนมีกาบใบหุ้มใบอ่อน 4-5 ชั้น ต้องใช้กรรมวิธีในการฟอกฆ่าเชื้อและสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยในปี 2546 ธันว์ ขำทอง ได้ทำการศึกษาการขยายพันธุ์สิงโตก้ามปูแดงและสิงโตเครายาว โดยการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยเมล็ดจะมีการงอกได้ดีบนอาหารสูตร VW ดัดแปลง ที่มีปริมาณน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ และวิตามินรวม 1 แคปซูลต่อลิตร และต้นอ่อนสามารถพัฒนาได้ดีบนอาหารสูตร VW ดัดแปลง สิงโตก้าปูแดงเป็นสิงโตในชั้น *stenochilus* ซึ่งมีการลำดับทางอนุกรมวิธานใกล้กับกับสิงโตในชั้น *sestochilos* (Seigerist, 2001) ในบางเอกสารมีการจัดรวมชั้น *sestochilos* และ *stenochilus* ไว้เป็นชั้นเดียวกัน (Seidenfaden G.,1979) ชัยชาญ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ และ คณะ (2554) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สิงโตประหลาด ซึ่งอยู่ในชั้น *sestochilos* เช่นเดียวกัน พบว่าการเลี้ยงต้นอ่อนสิงโตประหลาดจากการเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร VW ดัดแปลงที่มีการเพิ่มน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัม กล้วยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดใหม่เกิดขึ้นมากที่สุด Yam T.W. และคณะ (2017) ได้อธิบายงานของ Vij และ คณะ ที่ทำการขยายพันธุ์ *Bulbophyllum caryanum* ในสภาพปลอเชื้อในปี ค.ศ.2000 ที่มหาวิทยาลัย Panjab ประเทศอินเดีย โดยใช้ส่วนลำต้นเทียมทั้งหมดตัดแบ่งเป็นส่วนปลายยอด และฐาน เลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่มีการเพิ่มน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลตรต่อลิตร และน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นทำให้ได้ต้นอ่อนที่มีการเจริญเติบโตที่ดีและกลุ่มก้อนของต้นอ่อนเพื่อสามารถนำไปชักนำให้เกิดโปรโตคอร์ม (plbs) และเพิ่มจำนวนต่อไปได้

สารสีน้ำตาลที่เกิดในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อ เป็นสารทุติยภูมิที่ชิ้นพืชที่ได้รับการฟอกฆ่าเชื้อและตัดเพื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อปลดปล่อยออกมา ซึ่งเป็นสิ่งที่สร้างปัญหาในการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (https://patents.google.com/patent/CN103004754A/en, 2012) เพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้เกิดสารสีน้ำตาล การเพิ่มสารบางชนิดเช่น กรดแอสคอร์บิค หรือ บราซซิโนเสตียรอยด์ สามารถช่วยให้ชิ้นพืชลดการปล่อยสารสีน้ำตาลลงได้ และการเพิ่มสารโพลีไวนิลไพโรลิโดน (polyvinylpyrrolidone :PVP) หรือ ผงถ่านกัมมันต์ สามารถช่วยดูดซับสารสีน้ำตาลที่ชิ้นพืชปลดปล่อยออกมาได้ Ko W.H. และคณะ (2009) ใช้กรดแอสคอร์บิค 0.005 เปอร์เซ็นต์ โดยการ

กรองเติมลงบนอาหารปลอดเชื้อที่เย็นแล้ว สามารถช่วยลดการเกิดสารสีน้ำตาลของหน่อกล้วยหอมคาเวนดิชลงได้มากที่สุดที่ 83 เปอร์เซ็นต์

วิธีดำเนินการ :

<u>วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี</u>

1 หน่ออ่อนกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาจากชั้น sestochilos 2 ชนิด คือ *Bulbophyllum sumatranum* Garay, Hamer & Siegris และ *Bulbophyllum claptonense* Rolfe.

2 อาหารปลอดเชื้อ 2 สูตร ได้แก่

- Orchid Seed Sowing Medium (P723 : ร้าน แพลนทมีเดียซอป)
- Maintenance Medium (P668 : ร้าน แพลนทมีเดียซอป)

<u>วิธีการทดลอง</u>

1 วางแผนการทดลองแบบ CRD ปัจจัยที่ศึกษา ระดับความเข้มข้นของ Clorox และ ระยะเวลาในการฟอก

2 เตรียมต้นสำหรับการทดลองโดยเพาะเลี้ยงในสภาพควบคุม และใช้วัสดุเพาะที่ปลอดเชื้อ

3 การฟอกฆ่าเชื้อหน่ออ่อนด้วยมีขั้นตอนดังนี้

3.1 ฟอกฆ่าเชื้อด้วย แอลกอฮอล์ 95 % นาน 5 นาที

3.2 ล้างด้วยการแช่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 นาที

3.3 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ (Clorox) ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆกัน คือ - clorox 5% นาน 10 นาที

- clorox 5% นาน 15 นาที
- clorox 5%นาน 20นาที
- clorox 10% นาน 10 นาที
- clorox 10% นาน 15 นาที
- clorox 10% นาน 20 นาที

แต่ละกรรมวิธีทำจำนวน 4 ซ้ำ

4 ตัดชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Orchid seed sowing medium ที่มีการเพิ่มผงถ่านกัมมันต์ และไม่มีผงถ่าน

5 บันทึกการปนเปื้อนในสภาพปลอดื้อ

6 ย้ายเนื้อเยื่อที่ได้ในสภาพปลอดเชื้อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Maintenance mediumที่มีการเพิ่มน้ำตาลซูโครส 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ที่มีการเพิ่มผงถ่านกัมมันต์ และไม่มีผงถ่าน

7 เก็บขวดที่ทำการเพาะเลี้ยง ไว้ในห้องปลอดเชื้อที่มีอุณหภูมิ 25+2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 45+5 เปอร์เซ็นต์ RH ความเข้มแสง 3,000+200 ลักซ์ (Lux)

8 บันทึกการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนที่ทำการเพาะเลี้ยงทุกสัปดาห์

เวลาและสถานที่

กรมวิชาการเกษตร

ระยะเวลาของผลงาน 3 ปี (ตุลาคม 2560 - กันยายน 2563)

สถานที่ทำการทดลอง 1. ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมวิชาการเกษตร

2. ตลาดการค้าไม้ประดับแบบถาวร และตามงานเทศกาลเฉพาะด้านกล้วยไม้

3. สวนเกษตรกร ในจังหวัดปทุมธานี

4. ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาสิ่งแวดล้อม คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

7. ผลการทดลองและวิจารณ์

ศึกษากรรมวิธีการฟอกที่เหมาะสม สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อหน่ออ่อนสิงโตสุมาตรานั่ม (*Bulbophyllum sumatranum* Garay, Hamer & Siegris) และสิงโตแคลปโตเนนเซ (*Bulbophyllum claptonense* Rolfe.) เพื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อสำหรับการขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อ โดยทำการลอกกาบใบ (leaf sheat) ออกจนเหลือแต่ใบยอด และทำการตัดใบยอดออกให้ไม่มีการหักระหว่างการฟอก พบว่า การฆ่าเชื้อที่ผิวหน่ออ่อนด้วยแอลกอฮอล์ 95% นาน 5 นาที ก่อนนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Clorox) 10 % นาน 20 นาที จะได้ชิ้นพืชที่ปลอดเชื้อ 100% ในขณะที่การฟอกด้วย Clorox 10 % นาน 15 นาที และ การฟอกด้วย Clorox 5 % นาน 20 นาที มีชิ้นพืชปลอดเชื้อ 30 % และ 15 % ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละของชิ้นพืชปลอดเชื้อจากการฟอกฆ่าเชื้อ

ความเข้มข้นสารฟอก Clorox	ระยะเวลา (นาที)	ชิ้นพืชปลอดเชื้อ (%)*
5	10	0
	15	0
	20	15
10	10	0
	15	30
	20	100

*ไม่สามารถวิเคราะห์ทางสถิติได้ เนื่องจากมีการตาย 100 เปอร์เซ็นต์

กรมวิชาการเกษตร

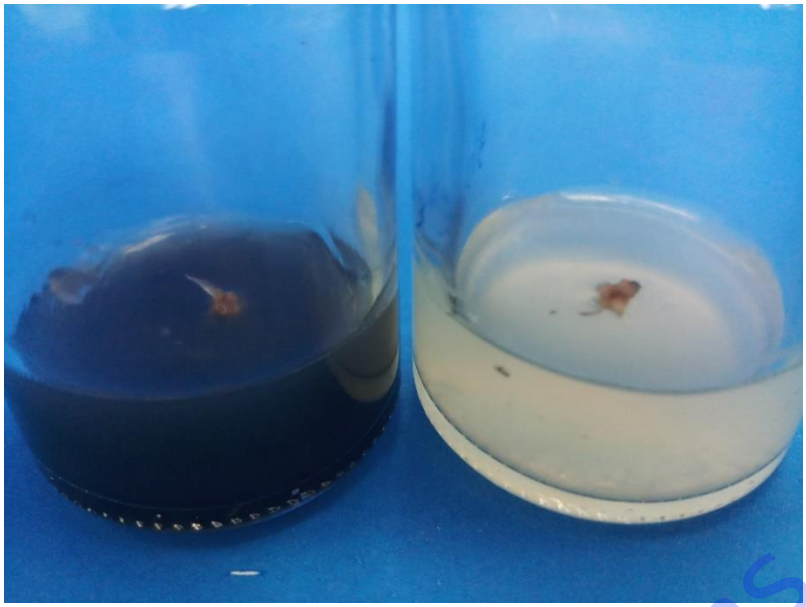
ก่อน หลัง

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของหน่ออ่อน ก่อน และ หลัง ลอกกาบใบออกเพื่อเตรียมฟอกฆ่าเชื้อ

เมื่อได้ชิ้นพืชปลอดเชื้อทำการพักชิ้นพืชบนอาหารสูตร Orchid Seed Sowing Medium (P723) ที่มีการเพิ่มถ่านกัมมันต์ 2 กรัมต่อลิตร และไม่เพิ่มถ่านกัมมันต์ (ภาพที่ 2) โดยที่อาหารสูตร P723 มีธาตุอาหารใกล้เคียงกับ 0.25 เท่าของความเข้มข้นของสารเคมีต่างๆในสูตร MS นอกจากนี้มีการเพิ่มกรดแอสคอบิก (ascorbic acid) เพื่อเป็นการช่วยลดการเกิดการปล่อยสารสีน้ำตาลของชิ้นพืช พบว่าชิ้นพืชเริ่มมีการตายเกิดขึ้น และมีความมีชีวิตคงอยู่ได้นาน 2 เดือน ก่อนตายทั้งหมดดังภาพที่ 3

ภาพที่ 2 ชิ้นพืชที่ฟอกด้วย Clorox 10 % นาน 20 นาที บนอาหารสูตร P723 เมื่อครบ 1 เดือน

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3 ชิ้นพืชอายุ 2 เดือน บนอาหารสูตร P723

ทำการทดสอบขยายพันธุ์จากต้นในสภาพปลอดเชื้อตามแบบ Yam T.W. และคณะ โดยการตัดส่วนลำต้นเทียม (pseudobulb) ออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนโคนต้น (distal) และส่วนยอด (proximal) โดยเลือกใช้สูตรอาหาร P668 ที่มีการเพิ่มน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลตรต่อลิตร ที่ระดับน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาหารสูตร P668 มีธาตุอาหารใกล้เคียงกับ 0.5 เท่าของความเข้มข้นของสารเคมีต่างๆในสูตร MS (ภาพที่ 4) พบว่ามีการตายเกิดขึ้นในบางชิ้นพืช แต่ยังคงมีการแตกหน่อจากชิ้นพืชที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเกิดพัฒนาการเป็นต้นสมบูรณ์ก่อนเกิดการแตกหน่อบริเวณโคนต้นจำนวนมาก (ภาพที่ 4)

1 2 3

ภาพที่ 4 ส่วนของต้นอ่อนฝั่งปลายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร P668

1 -เริ่มต้นทดลอง

2 -มีการแตกหน่อชุดที่ 1 (4 เดือน)

3 -มีการแตกหน่อชุดที่ 2 (10 เดือน)

กรมวิชาการเกษตร

จากการที่กาบใบของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาชั้น sestochilos มีการผลิตสารเป็นลักษณะวุ้นใส (มูซิเลท : mucilage) ซึ่งเป็นสารกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ ที่มีคุณสมบัติคล้ายกาว เมื่อแห้งจะเป็นแผ่นแข็ง โดยมากในพืชจะทำหน้าที่ดักจับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ไม่ให้ทำอันตรายกับต้นพืชได้ (Ann M.P. et al. 2010) ซึ่งการล้างชั้นมูซิเลท สามารถทำได้โดยการใช้แอลกอฮอล์ 1-5 นาที และล้างหรือแช่ด้วยน้ำเปล่าที่สะอาด ทำให้สามารถฟอกฆ่าเชื้อต่อไปได้โดยวิธีทั่วไป ซึ่งสามารถปรับใช้ได้กับสิงโตกลอกตากลุ่มที่มีชั้นมูซิเลท การเพิ่มจำนวนต้นในสภาพปลอดเชื้อโดยการชักนำให้แตกหน่อ สามารถทำให้ได้จำนวนต้นที่มาก โดยไม่เกิดการกลายพันธุ์ จำเป็นในการขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่จำเป็นต้องคงลักษณะของต้นอ่อนที่ได้ให้เหมือนต้นพันธุ์เดิมมากที่สุด (Michael W. Bairu et al. 2011)

จากการทดลองพบว่าต้นอ่อนสิงโตที่เกิดหน่อและพัฒนาจนเข้าสู่ระยะตัดแยกเพื่อย้ายต้นอ่อนเพื่อขยายพันธุ์ต่อได้ดีที่สุด บนอาหารสูตร P723 และ P668 มีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกับ 0.25 และ 0.5 เท่าของสูตร MS (ตารางผนวกที่ 1) ซึ่งมีปริมาณ Thiamine HCl (VitaminB1) มากว่าสูตร MS 100 เท่า มีการเพิ่ม Peptone ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีน และ MES free acid (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic Acid) เป็นสารที่ช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างของอาหารที่เตรียม (buffer) และน้ำมะพร้าวที่มีสารประกอบอินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด มี VitamneB1 ประกอบอยู่จึงทำให้มีการตอบสนองต่อการเจริญเติบโตได้ดี

8. สรุปผลการทดลอง

หน่ออ่อนสิงโตสุมาตรานั่ม และสิงโตแคลปโตเนแซ สามารถฟอกฆ่าเชื้อเพื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อได้โดยการลอกการใบออกและตัดใบอ่อนให้เหลือไม่ยาว แล้วทำการแช่ใน 95 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ 5 นาที แล้วทำการล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 นาที 2 ครั้งก่อนนำไปฟอกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์นาน 20 นาที และการเพิ่มจำนวนต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อทำได้โดยการนำต้นอ่อนมาตัดแบ่งเป็น 2 ส่วน คือส่วนปลายยอดและส่วนฐาน ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร P668 ที่มีการเพิ่มน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ที่ระดับน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการตัดสินใจในการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาชนิดอื่น ๆ
2. นักวิชาการสามารถใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจเพื่อการอนุรักษ์ และขยายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ได้
3. เกษตรกร ใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจในการขยายพันธุ์ปลูกเลี้ยงเพื่อการค้า
4. เจ้าหน้าที่ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการขยายพันธุ์กล้วยไม้จากเมล็ดเพื่อการอนุรักษ์ และใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

9. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -

10. เอกสารอ้างอิง

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

ชัยชาญ มณีรัตน์รุ่งโรจน์, ศรีสังวาล ลายวิเศษกุล และ อนุพันธ์ กงบังเกิด. 2554. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สิงโตประหลาด. NU Science Journal 2011 7(2): 45-59.

ธันว์ ขำทอง. 2546. การขยายพันธุ์กล้วยไม้สิงโตก้ามปูแดงและสิงโตเครายาว โดยการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน , มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , กรุงเทพฯ

สลิล สิทธิสัจจธรรม. 2553. กล้วยไม้สิงโตกลอกตาในประเทศไทย. กรุงเทพฯ บ้านและสวน.

Ann M.Patten, Daniel G.Vassão, Michael P.Wolcott, Laurence B.Davin and Norman G.Lewis. 2010. Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology. Elsevier B.V. 7388 p.

Annonymous. 2012. Composition for preventing browning of plant tissue culture and using method of composition [online]. Retrieved : 8 Jan, 2021. เข้าถึงได้จาก : https://patents.google.com/patent/CN103004754A/en

Arditti, J. 1984. Orchid Biology Reviews and Perspectives. Vol. III. Cornell University Press, London. 432 p.

Ko W.H., C.C. Sa C.L. Chen and C.P. Chao. 2009. Control of lethal browning of tissue culture plantlets of Cavendish banana cv. Formosana with ascorbic acid. Plant Cell Tissue Organ Culture Vol 96:137-143.

Michael W. Bairu, Adeyemi O. Aremu and Johannes Van Staden. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regulation vol 63 : 147–173

Pitchard, H.W. 1989. Modern Methods in Orchid Conservation. Cambridge University Press, NewYork. 169 p.

Seidenfaden, G. 1979. “Orchids Genera in Thailand VIII Bulbophyllum Thou.” Dansk Botanisk Arkiv.33-3

Seigerist, E.S. 2001. Bulbophyllums and Their Allies. Portland,Oregon. Timber Press.

Thoms, B. 2009. Bulbophyllums The incomplete Guide; From A to Why?. Valrico,Florida.

Yam T.W. and J. Arditti. 2017. Micropropagation of Orchids Thrid Edition Vol 1. C.O.S. Printers Pte Ltd. Singapore. 698 p.

กรมวิชาการเกษตร

13. ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 แสดงปริมาณสารเคมีในอาหารเพาะเลี้ยง 3 สูตร (มิลลิกรัมต่อลิตร)

	P668	MS	P723
NH_4NO_3	825.0	1,650.0	412.5
KNO_3	950.0	1,900.0	475.0
H_3BO_3	3.3	6.2	1.65
KH_2PO_4	85	170.0	42.5
$NaMoO_4{:}2H_2O$	0.125	0.213	0.0625
$CoCl_2{:}6H_2O$	0.0125	0.025	0.0063
KI	0.415	0.830	0.2075
$CaCl_2{:}2H_2O$	166.0	332.0	83.0
$CuSO_4{:}5H_2O$	0.0125	0.025	0.0063
$MnSO_4$	8.45	16.9	4.23
$MgSO_4$	90.35	180.69	75.18
$ZnSO_4{:}7\ H_2O$	5.3	8.6	2.65
Na_2EDTA	37.3	37.3	18.65
$FeSO_4{:}7\ H_2O$	27.85	27.85	13.93
Thiamine HCl (VitamineB1)	10.0	0.1	10.0
Nicotinic acid	1.0	0.5	1.0
Pyridoxine HCl	1.0	0.5	1.0
Glycine	-	2.0	
Myoinositol	100.0	100.0	100.0
MES Free acid	500.0	-	500.0
Peptone	2,000.0	-	2,000.0

กรมวิชาการเกษตร