รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การขยายพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้ว่านเพชรหึงในหลอดทดลอง

Micropropagation and *In Vitro* Conservation of *Grammatophyllum speciosum* Blume.

โดย

สุรีรัตน์ เย็นช้อน

สมปอง เตชะโต

อมรรัตน์ จันทนาอรพินท์

โครงการวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประเภททุนอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ (อพสธ.) ประจำปีงบประมาณ 2560

รหัสโครงการ NAT600105S

ชื่อโครงการวิจัย:

ภาษาไทย: การขยายพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้ว่านเพชรหึงในหลอดทดลอง

ภาษาอังกฤษ: Micropropagation and *In Vitro* Conservation of *Grammatophyllum speciosum* Blume.

ชื่อผู้วิจัย:

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ: ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 60%

ที่อยู่: สาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ถนนกาญจนวณิชย์ ต. คอหงส์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112
โทรศัพท์ 0 7428 6148 โทรสาร 0 7455 8803
E-mail address: sureerat.y@psu.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย 1

ชื่อ: ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 20%

ที่อยู่: สาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ถนนกาญจนวณิชย์ ต. คอหงส์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112
โทรศัพท์ 0 7428 6153 โทรสาร 0 7455 8803
E-mail address: sompong.t@psu.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย 2

ชื่อ: นางอมรรัตน์ จันทนาอรพินท์ สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 20%

ที่อยู่: ฝ่ายวิจัยและบริการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ถนนกาญจนวณิชย์ ต. คอหงส์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112
โทรศัพท์ 0 7428 6012 โทรสาร 0 7455 8801
E-mail address: amonrat.b@psu.ac.th

การขยายพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้ว่านเพชรหึงในหลอดทดลอง

บทคัดย่อ

กล้วยไม้ว่านเพชรหึง (*Grammatophyllum speciosum* Blume.) เป็นกล้วยไม้ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีความโดดเด่นของสีดอกที่มีลักษณะคล้ายลายเสือ อีกทั้งยังมีคุณสมบัติทางยา แต่เนื่องจากในธรรมชาติเมล็ดกล้วยไม้ว่านเพชรหึงมีขนาดเล็กมาก และขยายพันธุ์จำนวนมากได้ช้าและมีราคาค่อนข้างสูง การนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านสมุนไพรจึงมีข้อจำกัด ดังนั้นการศึกษานี้เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองด้วยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารสูตร VW (Vacin and Went) ที่เติมสารประกอบเชิงซ้อนต่าง ๆ พบว่า อาหาร VW เติมมันฝรั่งบด 100 กรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณและให้การเจริญเติบโตของต้นได้ดีที่สุด ต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงที่ชักนำได้เมื่อนำออกอนุบาลปลูกในกาบมะพร้าวสับร่วมกับพีทมอสในอัตราส่วน 1:1 ให้อัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ และให้การเจริญเติบโตได้ดีที่สุดซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยต่อต้นเพิ่มขึ้นสูงสุด 0.84 กรัมต่อต้น สำหรับการอนุรักษ์พันธุกรรมในหลอดทดลองโดยการเพาะเลี้ยงต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงบนอาหารที่เติมสารชะลอการเจริญเติบโต PBZ (Paclobutrazol) สามารถลดการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงได้ ซึ่งต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PBZ ส่งผลให้ความสูงต้น และความยาวใบลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงสามารถเจริญอยู่บนอาหารดังกล่าวได้นาน 2 ปีโดยไม่ต้องย้ายเลี้ยงเปลี่ยนอาหาร เป็นการเก็บรักษาพันธุกรรมในหลอดทดลอง ลดความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ สามารถที่จะนำพันธุกรรมที่อนุรักษ์เอาไว้มาใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนต่อไป

Micropropagation and *In Vitro* Conservation of *Grammatophyllum speciosum* Blume.

Abstract

Grammatophyllum speciosum, also called tiger orchid*,* is considered to be the largest member of the orchid family. In addition, this plant has been found to have potential medicinal benefits. In order to propagate orchids in natural conditions, the seed germination rate is very low. Since the traditional asexual propagation of orchids is extremely slow and the price is quite high, using for herbs is limited. The aim of this study was to enhance the micropropagation efficiency. Shoots were cultured on Vacin and Went (VW) medium supplemented with various organic substances to determine the most suitable media for growth and development of seedling. The results revealed that the suitable medium for proliferation and growth was VW medium supplemented with 100 g/L potato homogenate and 0.1% Activated charcoal (AC). The acclimatization of plantlets with coconut husk and peat moss (1:1) gave the highest survival rate and fresh weight at 100% and 0.84 g/plantlet respectively. The *in vitro* conservation was investigated by suppression of shoot growth on VW medium supplemented with paclobutrazol (PBZ). The results showed that VW medium containing PBZ resulted in minimal growth of plantlets, shoot height and leaf length was significantly decrease. Plantlets can be maintained on this medium without subculturing for 2 years. *In vitro* conservation will allow germplasm collections to be made in sustainable using of *G. speciosum*.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประเภททุนอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ (อพสธ.) ประจำปีงบประมาณ 2560 รหัสโครงการ NAT600105S ซึ่งรายงานวิจัยฉบับนี้ประกอบด้วยเนื้อหาที่เกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณกล้วยไม้ว่านเพชรหึงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การอนุบาลปลูกตลอดจนการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในหลอดทดลอง

ผู้จัดทำขอขอบคุณนางสาวสุนทรีย์ รองเดช นางสาวอิลฮัม วายายี และนางสาวนูรมา มาสากี ในการจัดทำงานวิจัยฉบับนี้ และประสงค์เป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่บุคคลที่มีความสนใจ และบุคคลทั่วไป หากรายงานฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใดผู้จัดทำต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ตรวจเอกสาร	3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	15
ผลการทดลอง	19
วิจารณ์ผล	32
สรุป	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	45

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะลำต้นและใบของกล้วยไม้ว่านเพชรหึง	4
2	ลักษณะดอกกล้วยไม้ว่านเพชรหึงสีปกติ (A) สีแดง (B) และสีเหลือง (เผือก) (C)	4
3	ลักษณะผลของกล้วยไม้ว่านเพชรหึง	5
4	ลักษณะของฝักกล้วยไม้ว่านเพชรหึงที่ใช้เป็นวัสดุพืชเริ่มต้นในการศึกษานี้	15
5	ลักษณะการเกิดโปรโตคอร์มไลด์บอดี้ของชิ้นส่วนยอดกล้วยไม้ว่านเพชรหึงบนอาหารสูตรต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	21
6	ลักษณะการพัฒนาของยอดกล้วยไม้ว่านเพชรหึงบนอาหารสูตรต่างๆ ที่ไม่เติมผงถ่าน (ขวดด้านซ้าย) และเติมผงถ่าน 0.2% (ขวดด้านขวา) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	24
7	ต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 6 เดือน	25
8	ต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากอนุบาลออกปลูกในวัสดุปลูกต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์	27
9	ต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากอนุบาลออกปลูกในวัสดุปลูกต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์	28
10	ต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติม PBZ ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	30
11	ต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติม PBZ ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 เดือน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	31

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองการเพิ่มปริมาณยอดกล้วยไม้ว่านเพชรหึง	17
2	ผลของสารประกอบเชิงซ้อน การเติมผงถ่านและไม่เติมผงถ่านต่ออัตราการรอดชีวิตของกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	19
3	ผลของสารประกอบเชิงซ้อน การเติมผงถ่านและไม่เติมผงถ่านต่อจำนวนโปรโตคอร์มไลด์บอดี้ของกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	20
4	ผลของสารประกอบเชิงซ้อน การเติมผงถ่านและไม่เติมผงถ่านต่อความสูงของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์	22
5	ผลของสารประกอบเชิงซ้อน การเติมผงถ่านและไม่เติมผงถ่านต่อความยาวใบของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์	23
6	ผลของสารประกอบเชิงซ้อน การเติมผงถ่านและไม่เติมผงถ่านต่อจำนวนรากต่อต้นของกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์	23
7	ผลของวัสดุปลูกต่ออัตราการรอดชีวิตและน้ำหนักสดต่อต้นหลังจากการอนุบาลปลูกเป็นเวลา 6 สัปดาห์	26
8	ผลของ PBZ ต่อความสูง ความยาวใบ และจำนวนใบของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 เดือน	29
9	ผลของ PBZ ต่ออัตราการรอดชีวิตของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เป็นเวลา 12 เดือน และ 24 เดือน	30

บทนำ

กล้วยไม้ว่านเพชรหึง (*Grammatophyllum speciosum* Blume.) หรือ ว่านหางช้าง จัดเป็นกล้วยไม้ป่าชนิดหนึ่งที่พบในประเทศไทย เป็นกล้วยไม้ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก ความสวยงามและโดดเด่นของกล้วยไม้ว่านเพชรหึง คือ ลำลูกกล้วยมีลักษณะยาวและมีใบติดอยู่ที่ปลายหลายใบคล้ายหางช้าง อีกทั้งมีกลีบดอกที่หนา ดอกมีสีเหลืองสด และมีจุดเป็นสีแดงเข้มอยู่ทั่วไป คล้ายลวดลายของเสือ และช่อดอกที่มีความยาวตั้งแต่ 30 เซนติเมตรจนถึง 200 เซนติเมตร (อบฉันท์, 2547) ปัจจุบันกล้วยไม้ว่านเพชรหึงเป็นกล้วยไม้ที่กำลังได้รับความนิยมสูงและมีราคาแพง เนื่องจากมีขนาดของลำต้นใหญ่ที่สุดในโลก มีความโดดเด่นของสีดอกที่มีลักษณะคล้ายลายเสือ อีกทั้งยังมีรายงานว่ากล้วยไม้ว่านเพชรหึงมีสรรพคุณทางยาหลายอย่าง เช่น ลำต้นมาฝนกับเหล้าดื่มหรือใช้กากพอกปากแผล ช่วยถอนพิษ หรือฝนน้ำซาวข้าวทาพอกฝี เป็นยาเย็นช่วยแก้พิษตะขาบ แมงป่อง แก้พิษงูกัด รักษาอาการผื่นคันมีน้ำเหลือง ลำต้นกับก้านใบหั่นบางๆ ล้างน้ำให้สะอาดแล้วใส่โหลดองกับเหล้าไว้ดื่มเป็นประจำช่วยขับลมในลำไส้ บำรุงกำลัง เป็นยาอายุวัฒนะ (รวิภา, 2554; Sahakitpichan *et al*., 2013) จึงได้มีการศึกษาหาสารสำคัญจากลำลูกกล้วยของกล้วยไม้ชนิดนี้ และได้รายงานการตรวจพบสารหลายชนิด (Sahakitpichan *et al*., 2013) เพื่อการใช้ประโยชน์ทางด้านสมุนไพร แต่เนื่องจากกล้วยไม้ว่านเพชรหึงมีการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ค่อนข้างช้า และมีราคาค่อนข้างสูง การนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านสมุนไพรจึงมีข้อจำกัด ปัจจุบันได้มีหลายหน่วยงานศึกษาการขยายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเป็นวิธีการที่จะสามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ดังนั้นการศึกษาเพื่อพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้เพชรหึงในหลอดทดลองจึงน่าจะเป็นแนวทางในการผลิตต้นพันธุ์เพื่อส่งเสริมการปลูกเลี้ยงและการนำกล้วยไม้ว่านเพชรหึงมาใช้ประโยชน์ทางด้านสมุนไพร เป็นการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรท้องถิ่นให้เกิดประโยชน์สูงสุด และยังสามารถอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมไว้ในหลอดทดลอง ลดความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ สามารถที่จะนำพันธุกรรมที่อนุรักษ์เอาไว้มาใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการขยายพันธุ์และวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการอนุบาลปลูกกล้วยไม้ว่านเพชรหึง
3. เพื่อศึกษาการอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้ว่านเพชรหึงในหลอดทดลอง

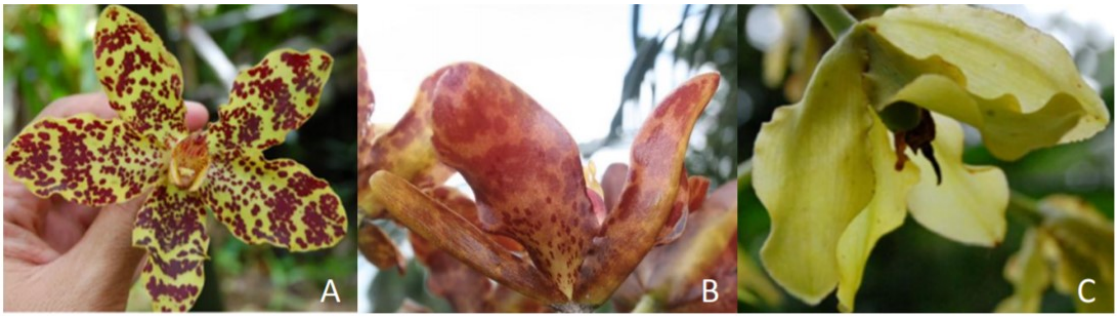
การตรวจเอกสาร

กล้วยไม้ว่านเพชรหึง (*Grammatophyllum speciosum* Blume.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Subclass Monocotyledonae) อยู่ในวงศ์ Orchidaceae มีชื่อสามัญว่า Tiger Orchid, Leopard Flower และชื่อท้องถิ่นเรียกกันหลากหลายในแต่พื้นที่ เช่น กล้วยกา (สุราษฎร์ธานี) ตับตาน (แพร่) มือตับแก (ชุมพร) ว่านงูเหลือม (ใต้) ว่านหางช้าง (กรุงเทพฯ, เลย) เอื้องพร้าว (เชียงใหม่) (อุทยานหลวงราชพฤกษ์, 2560)

1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้ว่านเพชรหึง

กล้วยไม้ว่านเพชรหึงจัดเป็นกล้วยไม้ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก ความสูงของลำอาจสูงได้ถึง 3 เมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-5 เซนติเมตร ลำต้นเมื่อเจริญเต็มที่แล้วจะเปลี่ยนจากสีเขียวแกมเหลืองเป็นสีเหลือง เป็นกล้วยไม้ประเภทแตกกอ ระบบรากอากาศ ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับกันบนลำต้น ใบมีความกว้างประมาณ 3-4 เซนติเมตร และยาวประมาณ 30-60 เซนติเมตร เรียงตัวในระนาบเดียวกัน ใบอ่อนจะโค้งลงด้านล่าง (ภาพที่ 1) ดอกกล้วยไม้ว่านเพชรหึงจะออกเป็นช่อขนาดใหญ่ ดอกย่อยมีกลีบดอก 5 กลีบ กลีบดอกย่อยจะมีขนาดใหญ่และหนา เมื่อบานเต็มจะมีขนาดกว้างประมาณ 6-8 เซนติเมตร โดยกลีบเลี้ยงและกลีบดอกพื้นมีสีเหลืองหม่นหรือเหลืองอมเขียวและมีจุดประสีน้ำตาลแกมม่วงกระจายอยู่ทั่วกลีบคล้ายกับลายเสือที่พบได้โดยทั่วไป (ภาพที่ 2A) บางต้นจุดประสีน้ำตาลขนาดใหญ่ ภาพรวมดอกจึงออกโทนสีแดง (ภาพที่ 2B) และต้นที่มีสีเหลืองล้วน หรือที่นิยมเรียกกันว่า เพชรหึงเผือก (ภาพที่ 2C) ดอกจะออกในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนตุลาคมของทุกปี ดอกเมื่อได้รับการผสมจะพัฒนาเป็นผล รูปร่างยาว มี 3 พู ภายในผลมีเมล็ดขนาดเล็กอยู่เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 3) (อบฉันท์, 2552; อุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ, 2553; อุทยานหลวงราชพฤกษ์, 2560)

ภาพที่ 1 ลักษณะลำต้นและใบของกล้วยไม้ว่านเพชรหึง



ภาพที่ 2 ลักษณะดอกกล้วยไม้ว่านเพชรหึงสีปกติ (A) สีแดง (B) และสีเหลือง (เผือก) (C)
ที่มา: อัคนีย์ และกนก (2562)

ภาพที่ 3 ลักษณะผลของกล้วยไม้ว่านเพชรหึง

โดยทั่วไปแล้วการขยายพันธุ์กล้วยไม้ว่านเพชรหึงด้วยเมล็ดในสภาพธรรมชาตินั้นทำได้ยาก เพราะเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก ภายในเมล็ดมีอาหารสะสมน้อยมากหรือไม่มีเลยจึงไม่เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอ เมล็ดจะงอกได้ต้องอาศัยเชื้อราไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) โดยเชื้อราส่งอาหารให้แก่เอ็มบริโอภายในเมล็ด ทำให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตเป็นโปรโตคอร์ม (protocorm) และเป็นต้นกล้วยไม้ที่สังเคราะห์แสงได้เองในระยะต่อมา (Mckendrick, 2000) กล้วยไม้มีเมล็ดต่อฝักมาก แต่ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวเปอร์เซ็นต์การงอกตามธรรมชาติจึงต่ำมาก ดังนั้น การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดเป็นวิธีการที่ทำได้สำเร็จน้อยมาก ผู้ปลูกเลี้ยงจึงใช้วิธีการขยายพันธุ์โดยการตัดแยกกอ แต่ปัญหาในการขยายพันธุ์โดยวิธีนี้คือ การเพิ่มปริมาณต้นทำได้ช้ามากและในขั้นตอนการตัดแยกลำอาจเกิดการระบาดของโรคทางบาดแผล ดังนั้น ในการเพิ่มจำนวนให้ได้ปริมาณมากนั้นจำเป็นต้องใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2 การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ คือ การนำชิ้นส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้ เช่น หน่ออ่อน ช่อดอกอ่อน ใบ และราก เป็นต้น โดยนำชิ้นส่วนดังกล่าวมาฟอกฆ่าเชื้อ และนำไปชักนำให้เกิดต้นจำนวนมาก

ในอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกล้วยไม้ตัดดอก และกล้วยไม้กระถาง เพื่อเพิ่มจำนวนต้นในปริมาณมากและได้ต้นที่มีลักษณะเหมือนต้นเดิม ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้มีหลายปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยทางด้านพืช หมายถึง ฮอร์โมนที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อมีบทบาทในการเกิด ลักษณะรูปร่าง ฮอร์โมนบางชนิดส่งเสริมการเกิดลักษณะรูปร่างและบางชนิดออกฤทธิ์ยับยั้ง นอกจากนี้ พบว่าชนิดและปริมาณของฮอร์โมนในแต่ละส่วนของเนื้อเยื่อพืชจะแตกต่างกัน เช่น ส่วนปลายยอดจะมี ออกซินปริมาณสูงกว่าส่วนต้น ในรังไข่มีปริมาณออกซิน ค่อนข้างสูง ส่วนในเมล็ดนอกจากจะมีออกซินสูง แล้วปริมาณของจิบเบอเรลลินยังสูงด้วย เป็นต้น ปัจจัยทางด้านกายภาพ ได้แก่ แสง (light) แสงมีความจำเป็นสำหรับการเติบโตของพืชในหลอดทดลอง ซึ่งความเข้มแสงโดยทั่วไปควรอยู่ระหว่าง 1,000-4,000 ลักซ์ ระยะเวลาที่ให้ แสง 8-16 ชั่วโมง อุณหภูมิที่ใช้โดยทั่วไป 24-26 องศาเซลเซียส ปัจจัยอื่น เช่น ขนาดของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่นำมาเพาะเลี้ยง สภาพแวดล้อมของการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture condition) การเปลี่ยนอาหาร (subculture) การย้ายเนื้อเยื่อจากอาหารเก่าไปยังอาหาร ใหม่หลายๆ ครั้งก็มีผลต่อการพัฒนาของชิ้นเนื้อเยื่อเช่นกัน ส่วนปัจจัยทางเคมีได้แก่ สูตรอาหารและองค์ประกอบของอาหาร ซึ่งมีการดัดแปลงองค์ประกอบของธาตุอาหารให้เหมาะสมกับกล้วยไม้แต่ละชนิด Silva และคณะ (2000) รวบรวมรายงานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หวาย พบว่า ส่วนใหญ่นิยมเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (79.3 เปอร์เซ็นต์) รองลงมา คือ สูตร KC และสูตร VW ทำให้ประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์กล้วยไม้ได้หลายชนิด เช่น *Dendrobium nobile* (Malabadi *et al*., 2005) *Grammatophyllum speciosum* (Sopalun *et al*., 2010) กล้วยไม้ *Oncidium* ‘Sugar Sweet’ (Yang *et al*., 2010) *Dendrobium pendulum* และ *Dendrobium primulinum* (Li *et al*., 2013) *Dendrobium aqueum* Lindley (Parthibhan *et al*., 2015) *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm (Utami *et al*., 2017) เป็นต้น

3 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

การดัดแปลงสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อระยะการเจริญเติบโตของกล้วยไม้และการเติมสารอื่น ๆ ที่กล้วยไม้ต้องการลง ในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถทำให้กล้วยไม้เจริญเติบโตได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของธาตุอาหารก็มีผลต่อการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ โดยธาตุอาหารความเข้มข้นต่ำจะทำให้เมล็ดกล้วยไม้บางชนิดงอกได้ดี อาหารวิทยาศาสตร์ที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายสูตรด้วยกันมักเรียกตามชื่อนักวิทยาศาสตร์ที่คิดสูตรนั้นขึ้นมา เช่น สูตร MS ของ Murashige และ Skoog (Murashige and Skoog, 1962) สูตร B5 ของ Gamborg (Gamborg, 1970) สูตร VW ของ Vacin และ Went (Vacin and Went, 1949) สูตร LS ของ Linsmaier และ Skoog (Linsmaier and Skoog, 1965) สูตร SH ของ Schenk และ Hildebrandt (Schenk and Hildebrandt, 1972) สูตร W ของ White

(White, 1963) และสูตร NN ของ Nitsch และ Nitsch (Nitsch and Nitsch, 1956) สูตรอาหารสังเคราะห์ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ ได้แก่ สูตรดัดแปลง VW สูตร Knudson C (KC) (Knudson, 1964) และสูตร MS เป็นต้น สูตรอาหารแต่ละสูตรมีส่วนประกอบ และปริมาณของสารที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกันออกไป กล่าวโดยสรุปองค์ประกอบอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและวัตถุประสงค์ในการใช้ อย่างไรก็ตามสูตรอาหารทุกสูตรมีองค์ประกอบของอาหารส่วนใหญ่ 5 ประเภท ดังนี้คือ

3.1 สารอนินทรีย์ ประกอบด้วยสารที่พืชต้องการในปริมาณมาก คือแคลเซียม แมกนีเซียม โปตัสเซียม ฟอสฟอรัส ไนโตรเจน และกำมะถัน และสารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย สารในกลุ่มนี้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบ่งออกเป็นสองกลุ่มย่อย คือสารเหล็กที่เรียกว่าชีเลท และสารที่พืชต้องการในปริมาณน้อยในรูปอื่น ๆ เช่น คลอรีน แมงกานีส ทองแดง สังกะสี โบรอน และโมลิบดินัม สำหรับสูตรทางเคมีของสารแต่ละตัวที่ใช้แสดงในตารางองค์ประกอบสูตรอาหาร (ตารางภาคผนวกที่ 1) สารอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในแต่ละพืชแตกต่างกัน อย่างเช่นในกล้วยไม้ที่เป็นพืชอิงอาศัยจะมีความต้องการธาตุอาหารที่ค่อนข้างต่ำกว่าพืชที่อยู่ในดิน (อนุพันธ์ และแสงเดือน, 2554) ในองค์ประกอบที่เป็นสารอนินทรีย์ทั้งหมดพบว่าไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนีย และไนเตรทมีผลต่อการแบ่งเซลล์และการพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่โดยกระบวนการออกาโนเจนีซีส หรือเอ็มบริโอเจนีซีส ในขั้นตอนของการแบ่งเซลล์เพิ่มปริมาณนั้นไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมมีความจำเป็น ต่อมาเมื่อต้องการให้มีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต้องลดความเข้มข้นของแอมโมเนียมลง แต่เพิ่มความเข้มข้นของไนเตรทมากขึ้น อย่างไรก็ตามพืชแต่ละชนิดตอบสนองต่อสัดส่วนของแอมโมเนียมและไนเตรทแตกต่างกันออกไป

3.2. น้ำตาล เป็นแหล่งของคาร์บอนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์แสงของเซลล์พืช เซลล์พืชนำคาร์บอนมาสร้างเป็นสารสังเคราะห์ ปรับสัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนให้มีความเหมาะสมเพื่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ รูปของน้ำตาลที่ใช้แตกต่างกันออกไปทั้งที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเชิงเดี่ยว หรือเชิงซ้อน อย่างไรก็ตามน้ำตาลที่ใช้กันมากคือ น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วง 2-10 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เพราะในธรรมชาติพืชเก็บน้ำตาลในรูปของซูโครสเป็นส่วนใหญ่ ส่วนน้ำตาลกลูโคสใช้กันมากกับเนื้อเยื่อพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (สมปอง, 2539)

3.3. สารอินทรีย์ สารอินทรีย์ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นสารที่ส่งเสริมการเจริญ และการแบ่งเซลล์ของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง สารดังกล่าวมีหลายชนิด ความเข้มข้นที่ใช้แตกต่างกันออกไป สารอินทรีย์บางชนิดมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน เช่น อินโนซิตอลที่มีขายในท้องตลาดมีทั้งที่เป็นไมโออินโนซิตอล และมีโสอินโนซิตอล ดังนั้นพืชใดตอบสนองต่อสารนี้ในรูปใดได้ดีก็เลือกใช้รูปนั้น

สารในกลุ่มนี้ส่งเสริมการพัฒนาของนิวเซลลาเซลล์ไปเป็นต้นอ่อน หรือยอด ผลที่สังเกตพบคือการพัฒนายอดรวมจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดที่มีลักษณะเป็นอะโปมิค เช่น เมล็ดอัลมอนด์ เมล็ดมังคุด และเมล็ดลองกอง เป็นต้น (สมปอง, 2539)

3.4 สารประกอบเชิงซ้อน ส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ที่มีคาร์บอน หรือไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เป็นที่น่าเสียดายว่าปริมาณตลอดจนความเข้มข้นของสารดังกล่าวไม่เป็นที่ทราบแน่นอน อาจมีรวม ๆ กันอยู่ในรูปเชิงซ้อนเช่น กรดอะมิโน หรือเคซีนไฮโดรไลเสทซึ่งเป็นกรดอะมิโนเชิงซ้อน นอกจากนี้แล้วอาจมีสารอื่นๆ ดังนี้คือ

3.4.1 น้ำมะพร้าวอ่อน

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้มีการใช้น้ำมะพร้าวอ่อนเป็นส่วนประกอบในอาหารกันอย่างแพร่หลายเนื่องจากน้ำมะพร้าวอ่อนมีสารควบคุมการเจริญเติบโตและมีสารต่างๆได้แก่ purine indole acetic acid รวมทั้งคาร์โบไฮเดรตหลายชนิดเช่น erythritol melezitose และ turanose และยังพบ myo-inositol และ sorbitol รวมทั้งมีไซโตไคนินเช่น zeatin และ zeatin riboside ในปริมาณมาก นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลหลายชนิด ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช ช่วยให้การงอกของเมล็ดกล้วยไม้หลายชนิดดีขึ้น ส่งเสริม การแบ่งเซลล์ผิว (epidermal cell) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดของกล้วยไม้หลายชนิดและส่งเสริมการเกิดและเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม (Arditti, 2008) มีสารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ทำให้เอ็มบริโอมีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น (ภุมรินทร์, 2544)

3.4.2 มันฝรั่ง

ในมันฝรั่งมีสารพวกโพลีเอมีนได้แก่ putrescine spermidine spermine และ biosynthetic enzymes เช่น arginine decarboxylase ornithine decarboxylase กระจายอยู่ในส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อมันฝรั่ง แต่ในช่วงที่หัวมันฝรั่งงอกจะพบสารนี้มากบริเวณยอด ซึ่งสารพวกนี้ทำให้เกิดการเพิ่มของกรดนิวคลีอิกและทำให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบ mitosis มากขึ้น (Flores and Galston, 1982) รวมทั้งป้องกันการสลายของโปรตีนและคลอโรพลาสต์ (Kaur–Sawhney *et al*., 1980) การใส่มันฝรั่งในอาหารยังช่วยเพิ่มการงอกของเมล็ดกล้วยไม้และต้นอ่อนแข็งแรงมากขึ้น (Ernst, 1967) การใช้น้ำสกัดมันฝรั่ง 5 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้จำนวนยอดของ *Dendrobium nobile* เพิ่มขึ้น (Sudeep *et al*., 1997) นอกจากนี้มันฝรั่งยังช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ดีขึ้นและต้นอ่อนจะมีความแข็งแรงมากขึ้น (Arditti, 2008)

3.4.3 กล้วย

เนื่องจากกล้วยหอมอุดมไปด้วยโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามินเอ thiamine riboflavin niacin วิตามินซีและแร่ธาตุจำนวนมาก เช่น แคลเซียม เหล็ก โพแทสเซียม

แมกนีเซียม เป็นต้น อีกทั้งมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ที่ทำให้ pH ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก (Knudson, 1964) โดยเฉพาะธาตุเหล็กอยู่ในรูปที่กล้วยไม้สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้และการเกิดรากได้ (Arditti, 2008) นอกจากนี้ในเนื้อกล้วยหอมยังประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดซึ่งได้แก่ lysine, cysteine, methionine และ arginine (Arditti, 2008) ทั้งสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชบางชนิด เช่น GA_3, GA_7 (Khalifah , 1966) เมื่อผลกล้วยสุกเต็มที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของแป้งเป็นน้ำตาล โดยแป้งลดลงจาก 20-30 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 1-2 เปอร์เซ็นต์ (Stover and Simmonds, 1987) การนึ่งอาหารที่ใส่กล้วยภายใต้ความดันและความร้อนสูงในสภาพเป็นกรดจะทำให้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกล้วยละลายน้ำได้ดีขึ้นทำให้ต้นกล้วยไม้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น (Arditti, 2008) นอกจากนี้พบว่ากล้วยหอมทำให้กล้วยไม้เจริญเติบโตได้ดีกว่ากล้วยชนิดอื่น (จิตราพรรณ, 2536)

3.4.4 ผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal)

ถ่านกัมมันต์ คือคาร์บอนที่ได้จากการเผาไหม้ภายใต้สภาพอุณหภูมิและความดันสูงมีธาตุคาร์บอนมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือเป็นธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียม มีลักษณะเป็นผงมีรูปร่างกลมหรือแบน ภายในอนุภาคของถ่านกัมมันต์มีช่องว่างและพื้นที่ผิวจำนวนมาก สามารถดูด ซับสารต่างๆ ทั้งแก๊สของเหลวหรือสารที่ละลายน้ำได้โดยดูดยึดไว้ที่พื้นผิวหน้าของรูพรุนนั้น (Arditti, 2008) สามารถช่วยดูดซับสารพิษสีน้ำตาลซึ่งเป็นสารประกอบพวก phenol และ melanin รวมทั้ง เอทิลีนซึ่งเป็นพิษกับเซลล์ รวมถึง growth hormone ต่างๆ อาจถูกผงถ่านกัมมันต์ดูดเข้าไปอยู่ในอนุภาคได้มีรายงานว่าการใส่ผงถ่านกัมมันต์ในอาหารจะทำให้เกิดขบวนการ somatic embryogenesis ได้ดีขึ้น (Pierik, 1987) นอกจากนี้ยังช่วยรักษาระดับความเป็นกรด-เบสของอาหารไม่ให้เปลี่ยนแปลงไปมากนักและยังช่วยให้อาหารทึบแสงจึงส่งเสริมการเติบโตแบบมีขั้ว (polar growth) ทำให้รากมีการเจริญเติบโตดีขึ้น ช่วยเพิ่มการระบายอากาศในอาหารได้ดีขึ้นด้วย (Arditti, 2008) นอกจากนี้ผงถ่านกัมมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการเจริญเติบโตและการเกิดรากของต้นกล้วยไม้ *Paphiopedilum* และ *Phalaenopsis* (Ernst, 1974) *Cymbidium lancifolium* (Kim and Lee, 1992) *Dendrobium hybrids* Sonia17 และ 28 (Martin and Madassery, 2006) นอกจากนี้ โปรโตคอร์มของ *Phalaenopsis* Minho Valentine ‘Taisuco’ ที่เลี้ยงในอาหารสูตร VW ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ กล้วยหอม 2 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าดัชนีการเจริญเติบโตมากที่สุดเท่ากับ 478.33 โดยโปรโตคอร์มสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ดีกว่าอาหารที่ไม่มีผงถ่าน (จุฑามาศ, 2549)

3.4.5 สารควบคุมการเจริญเติบโต (Plant growth regulators; PGRs)

สารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นสารซึ่งมีผลทั้งส่งเสริม และยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (เทิดศักดิ์, 2555) หากใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำแต่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้ดี สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้มีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างคล้ายสารในธรรมชาติที่สร้างจากพืช มีผลต่อการเจริญเติบโตในแต่ละระยะพัฒนาการที่แตกต่างกันออกไป ปริมาณและความเข้มข้นของสารขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น พันธุ์พืช อายุและระยะพัฒนาการของพืช สภาพแวดล้อมที่เลี้ยงดูพืช การใช้สารสกัดดังกล่าวจึงต้องคำนึงถึงปัจจัยเหล่านี้ด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชหรือฮอร์โมนที่สร้างขึ้นในต้นพืช (Plant hormones) ทำหน้าที่กระตุ้นและมีส่วนร่วมในกระบวนการต่าง ๆ ที่นำไปสู่การพัฒนาของต้น พืชปกติจะมีการเจริญเติบโตตลอดจนการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์เนื้อเยื่อ และสารชีวเคมี เป็นผลมาจากฮอร์โมนเหล่านี้ทั้งสิ้น ฮอร์โมนพืชสามารถแบ่งตามลักษณะการทำงานได้เป็นกลุ่มใหญ่ ๆ 5 กลุ่ม คือ กลุ่มออกซิน กลุ่มไซโตไคนิน กลุ่มจิบเบอเรลลิน (Gibberellin) กลุ่มเอทธิลีน (Ethylene) และกลุ่มสารยับยั้งการเจริญเติบโต (Inhibitor) (พันทวี, 2532; พีรเดช, 2529, 2555)

4 การอนุบาลต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเตรียมต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะต่างๆ ของพืชภายในหลอดทดลอง เพื่อนำไปปลูกในสภาพของแปลงปลูกนั้นมีชื่อเรียกเป็นภาษาอังกฤษได้หลายชื่อ เช่น hardening, acclimatization เป็นต้น ขั้นตอนดังกล่าวประกอบด้วย

4.1 การเตรียมให้เกิดรากที่สมบูรณ์จากต้นกล้าซึ่งอาจจะทำภายในหลอดทดลอง หรือนำยอดมาชักนำรากภายนอกหลอดทดลอง

4.2 การย้ายต้นกล้าไปสู่สภาพธรรมชาติ แต่ยังคงมีการควบคุมอุณหภูมิ และความชื้นในระยะแรกเพื่อให้ต้นพืชได้ปรับตัวเข้ากับสภาพนอกหลอดทดลอง

เนื่องจากพืชที่ชักนำในหลอดทดลองมีพัฒนาการของชั้นนวลที่ผิวใบน้อย การทำงานของปากใบก็ไม่ดีเท่าที่ควร กล่าวคือไม่สามารถควบคุมการปิดเปิดของปากใบได้ในขณะที่ต้นกล้ามีการคายน้ำ ทำให้สูญเสียน้ำมากได้ แนวทางการป้องกันปัญหาดังกล่าวสามารถที่จะกระทำได้ภายในหลอดทดลอง ก่อนที่จะย้ายต้นกล้าออกไป วิธีการคือการเลี้ยงต้นกล้าที่ต้องการย้ายลงแปลงในสภาพที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง และความเข้มของแสงสูง วิธีการดังกล่าวจะช่วยให้การพัฒนาการของชั้นนวลที่ผิวใบมีมากขึ้น การปิดเปิดของปากใบดีขึ้น อย่างไรก็ตามการชักนำรากของต้นกล้าภายในหลอดทดลองก่อน ช่วยให้อัตราการรอดตายของต้นกล้าในแปลงปลูงเป็นไปได้ดีกว่า ก่อนย้ายต้นกล้าในหลอดลงดินเพื่ออนุบาลสิ่งที่สำคัญต้องทำคือการล้างวุ้นที่ติดกับรากออกจนหมด หากมี

หลงเหลืออยู่จะเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ ทั้งที่เป็นสาเหตุและไม่ใช่สาเหตุโรค มีผลเสียต่อการเจริญเติบโตและการตั้งตัวของต้นกล้าได้ (สมปอง, 2554)

5 วัสดุสำหรับปลูกกล้วยไม้

วัสดุปลูกที่ดีควรมีความทนทาน ไม่ผุเปื่อยหรือสลายตัวง่าย มีอายุการใช้งานไม่น้อยกว่า 2 ปี ความผุของเครื่องปลูกย่อมจะมีสิ่งที่เป็นพิษแก่ต้นกล้วยไม้สลายตัวออกมา เช่น กรดหรือความร้อน ซึ่งจะทำ ให้การเจริญเติบโตหยุดชะงัก รากจะได้รับอันตราย ดูดซับธาตุอาหารไว้ได้ แต่ต้องถูกชะล้างไปได้ง่าย เพื่อไม่ให้เกลือแร่สะสมอยู่จนเป็นอันตรายต่อกล้วยไม้ สะอาดปราศจากสิ่งเป็นพิษจะเป็นอันตรายต่อระบบราก ไม่มีศัตรูรบกวน เช่น มีตะไคร่น้ำหรือราขึ้นเร็วเกินไป หาได้ง่ายและราคาพอสมควร (ระพี, 2516; จิตราพรรณ, 2536; ธันว์, 2546)

วัสดุปลูกที่นิยมใช้ปลูกกล้วยไม้

5.1 ออสมันด้า (osmunda หรือ osmundine fiber) เป็นเครื่องปลูกที่ได้จากรากเฟิร์นซึ่งอยู่ในสกุล *Osmunda* มีลักษณะเป็นเส้นสีดำ มีขนาดเล็ก ค่อนข้างแบน เฟิร์นชนิดนี้มีปรากฏอยู่ตามแหล่งที่มีความชุ่มชื้นสูงและมีระดับพื้นที่สูง อุณหภูมิไม่สูงนัก ข้อดี คือ มีการถ่ายเทอากาศและการระบายน้ำดีมากแม้ว่าจะอัดแน่น เก็บน้ำได้ดีประมาณ 140 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนัก มีธาตุอาหารเป็นองค์ประกอบซึ่งรากกล้วยไม้สามารถดูดไปใช้ได้และมีน้ำหนักเบา จึงสะดวกในการเคลื่อนย้าย ข้อเสีย คือ หายาก ราคาแพงและใช้งานยากเนื่องจากต้องตัดแยกเสียเวลานานออสมันด้าใช้ได้ดีกับกล้วยไม้รากอากาศและกึ่งอากาศทุกชนิด

5.2 กาบมะพร้าว กาบมะพร้าวที่มีความคงทนผุพังช้าต้องเป็นกาบมะพร้าวที่แก่จัดและกาบที่ติดเปลือกแข็งข้างนอกจะดีกว่ากาบชั้นใน ๆ เข้าไป

5.3 โฟม เป็นวัสดุเหลือใช้หาได้ง่ายในท้องถิ่น ซึ่งนิยมใช้ห่อหุ้มสินค้า ข้อดี คือ มีน้ำหนักเบา ไม่อุ้มน้ำแต่ช่องว่างระหว่างก้อนโฟมสามารถเก็บความชื้นได้ดี มีความยืดหยุ่น ทำให้ยึดต้นได้ดี และรากสามารถแทงผ่านโฟมได้ หรือจะรองตะกร้าไม้นิ้วเพื่อป้องกันรากพันตะกร้า และช่วยระบายอากาศในภาชนะปลูกให้โปร่งได้ดี หรือจะตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมแล้วหนีบไม้นิ้ว แต่มีข้อเสียคือ ไม้ที่หนีบกับโฟมจะผอมเพราะความชื้นน้อยเกิน อาจจะแก้ปัญหานี้โดยการใช้สแฟกนั่มมอสหนีบเพิ่มเพื่อช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นได้

5.4 ถ่าน เป็นวัสดุปลูกที่หาง่าย ไม่อุ้มน้ำมาก ใช้ได้นาน เหมาะสำหรับกล้วยไม้ทุกชนิด ก่อนนำมาใช้ควรทำให้มีขนาดใกล้เคียงกัน

5.5 สแฟกนั่มมอส เป็นมอสชนิดหนึ่งซึ่งรักษาความชื้นได้ค่อนข้างดี เพราะสามารถดูดซับความชื้นได้มากและระบายน้ำได้ดี สามารถถ่ายเทอากาศได้ดีเนื่องจากมีน้ำหนักโปร่ง ก่อนนำมาปลูกต้องแช่น้ำแล้วนำมาปลูกได้เลย ข้อเสียคือ ผุไว และราคาค่อนข้างสูง (วิทยา, 2534; ครรชิต, 2550)

5.6 พีทมอส ผลิตจากมอสที่ผ่านขบวนการย่อยสลายมานานหลายปี ปราศจากวัชพืชปะปน นำเข้ามาเพื่อใช้เป็นวัสดุในการเพาะกล้าไม้ต่าง ๆ โครงสร้างของพีทมอสจะมีลักษณะโปร่ง ช่องว่างอากาศสูง สามารถเก็บความชื้นได้ดี จึงมีคุณสมบัติเหมาะสมใช้เป็นวัสดุปลูกและวัสดุเพาะกล้าได้เป็นอย่างดี

การพิจารณาเลือกชนิดของวัสดุปลูกที่ใช้ต้องคำนึงถึงชนิดของกล้วยไม้ วัสดุที่เลือกใช้ควรมีคุณสมบัติในการช่วยระบายน้ำ อากาศได้ดี เก็บความชื้นได้ดี อายุการใช้งานนาน ไม่เป็นแหล่งสะสมโรคและแมลง เป็นวัสดุที่หาได้ง่ายและราคาถูก

6 แนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้

การอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้สามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับ วัตถุประสงค์ ชนิดของกล้วยไม้ สภาพแวดล้อม และความสามารถในการดำเนินการ ซึ่งวิธีการในการเก็บรักษาสามารถทำได้ดังนี้

6.1 การอนุรักษ์ในสภาพป่าหรือในแหล่งธรรมชาติ (in situ conservation) เป็นการเก็บอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ให้เจริญเติบโตอยู่ในสภาพธรรมชาติ และรักษาสภาพบริเวณโดยรอบให้คงเดิมมากที่สุด ซึ่งเป็นวิธีการอนุรักษ์ที่ดีที่สุดในการรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (จรัสศรี, 2548) แต่ทำได้ยาก เนื่องจากไม่สามารถควบคุมสภาพธรรมชาติในระยะยาวได้

6.2 การอนุรักษ์ในสภาพนอกแหล่งธรรมชาติ (ex situ conservation) ส่วนใหญ่จะเก็บในสวนพฤกษศาสตร์ เรือนกล้วยไม้ทั้งของราชการและเอกชน ซึ่งต้องใช้งบประมาณและบุคลากรที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นการทำงานในระยะยาว โดยการเก็บในสภาพนอกแหล่งธรรมชาติ ทำได้หลายวิธี เช่น

6.2.1 เก็บในรูปต้นที่มีชีวิต (living collection) เป็นการปลูกเลี้ยงในโรงเรือนที่มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ต้องมีการบำรุงดูแลรักษาอย่างดี ซึ่งมีข้อเสียในการเก็บรักษา เช่น ปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อม โรคและแมลง

6.2.2 เก็บในรูปแบบเมล็ด (seed bank) เป็นการเก็บรักษาที่สะดวก ใช้พื้นที่น้อย แต่ใช้ได้เฉพาะพืชที่เมล็ดสามารลดความชื้นได้มาก (orthodox seed) เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้อายุสั้น เนื่องจากไม่มีอาหารสะสมในเมล็ด การเก็บด้วยวิธีต้องทำการผสมพันธุ์และเก็บฝักทุกปี

6.2.3 เก็บในรูปแบบเรณู (pollen bank) เป็นการเก็บรักษาที่ทำได้ง่ายโดยการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องซาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 1 ปี โดยไม่เสียคุณสมบัติ

6.2.4 เก็บในสภาพหลอดทดลอง (in vitro conservation) เป็นการเก็บอนุรักษ์โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้าช่วย สามารถเก็บได้ตั้งแต่ระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และต้นอ่อน โดยเก็บเลี้ยงไว้ในหลอดแก้ว วิธีนิยมใช้กันมากเนื่องจากใช้พื้นที่น้อย สามารถลดความเสี่ยงจากความแปรปรวนของสภาพภูมิอากาศ การทำลายของศัตรูพืช และทำได้ง่ายเนื่องจากกล้วยไม้ส่วนใหญ่

ตอบสนองได้ดีและเมื่อนำมาเลี้ยงในหลอดทดลอง นอกจากนี้ยังสะดวกในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์พืชระหว่างประเทศ เนื่องจากมีขนาดเล็ก และสะดวกในการขนส่ง (ครรชิต, 2541)

6.2.5 เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation) เป็นการเก็บอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ได้ยาวนานโดยการเก็บในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ที่อุณหภูมินี้เซลล์จะหยุดการเจริญเติบโต (Bhojwani and Razdan, 1996; Bajaj, 1995) เนื่องจากเมแทบอลิซึมภายในเซลล์หยุดนิ่ง ทำให้สามารถขยายเวลาในการเก็บรักษาไว้ได้ (Kartha, 1985) ซึ่งวิธีการนี้ได้รับความนิยมในปัจจุบันจึงได้มีการศึกษากันในพืชหลายๆชนิด แม้กระทั่งในกล้วยไม้ก็มีรายงานความสำเร็จในการใช้วิธีดังกล่าวในหลายชนิดเช่น กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส (Khoddamzadeh *et al*., 2011) กล้วยไม้สกุลแวนด้า (Thammasiri and Soamkul, 2007) และในกล้วยไม้สกุลหวาย (Bunnag and Khonkayan, 2010; Pouzi *et al*., 2011)

7 การเก็บรักษาพันธุ์พืชในหลอดทดลอง

การเก็บรักษาพันธุ์พืชในหลอดทดลองสามารถที่จะอนุรักษ์ได้ตั้งแต่ระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และต้นอ่อน ในหลอดทดลอง เป็นวิธีการที่นิยมใช้มากเนื่องจากใช้พื้นที่ แรงงาน และการดูแลรักษาน้อย ลดการเสี่ยงอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ การทำลายของศัตรูพืช และการดูแลรักษาที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังสะดวกในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์พืชระหว่างประเทศ เนื่องจากชิ้นส่วนมีขนาดเล็ก สะดวกในการขนส่งและปลอดศัตรูพืช (ครรชิต, 2541) การเก็บรักษาในสภาพหลอดทดลองสามารถทำได้ โดยการเก็บรักษาพันธุ์พืชระยะสั้นด้วยการชะลอการเจริญเติบโต เป็นการลดอัตราการเจริญ เติบโตของพืชโดยการดัดแปลงองค์ประกอบของสูตรอาหารหรือลดอุณหภูมิในการเก็บรักษา ทั้งนี้อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งในการควบคุมขบวนการเมตาโบลิซึม และปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์พืชซึ่งจะส่งผลออกมาในรูปของการเจริญเติบโต

การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อมาใช้ในงานด้านการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชเป็นวิธีที่นิยมเนื่องจากสามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ได้เกือบทุกชิ้นส่วนของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนปลายยอด (shoot tip) และเนื้อเยื่อเจริญ (meristems) ซึ่งเป็นส่วนที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมตรงตามสายพันธุ์สูง การลดการเจริญเติบโตให้ช้าลง (slow growth) โดยการใช้สารชะลอการเจริญเติบโตทำให้เนื้อเยื่อพืชมีการเจริญเติบโตที่ช้าลงช่วยลดงานการย้ายเลี้ยง (subculture) และยังใช้ต้นทุนที่ต่ำกว่าวิธีอื่นในการเก็บรักษาพันธุกรรมพืช (สนธิชัย, 2534; พีรเดช, 2537; ทิพย์สุดา และคณะ, 2543; วรรณดา และคณะ, 2557) สารพาโคลบิวทราโซล (paclobutrazol; PBZ) มีชื่อทางเคมีว่า (2RS, 3RS)-1-(4chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2(1H-1,2,4-triazol-l-yl) pentan-3-ol เป็นสารอีกชนิดที่นิยมใช้ในการชะลอการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชเพื่อวัตถุประสงค์ในการเก็บรักษาพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ โดยมีคุณสมบัติยับยั้งการสังเคราะห์สาร

gibberellin เป็นผลให้เกิดการลดอัตราการเติบโตด้านความสูงของพืช ทำให้พืชมีลักษณะปล้องสั้น ลำต้นเตี้ยและมีทรงพุ่มกะทัดรัด (พีรเดช, 2529; 1983; Stang and Weis, 1984; วรรณดา และคณะ , 2557) การศึกษาผลของการใช้สารชะลอการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเก็บรักษาพันธุกรรมกล้วยไม้ว่านเพชรหึงไว้ในหลอดทดลองสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์ รวบรวมพันธุ์ หรือปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วัสดุ-อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ-อุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

ใช้ฝักกล้วยไม้ว่านเพชรหึง อายุ 5-6 เดือน (ภาพที่ 4) เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 4 ลักษณะของฝักกล้วยไม้ว่านเพชรหึงที่ใช้เป็นวัสดุพืชเริ่มต้นในการศึกษานี้

1.2 วัสดุสารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สูตร VW รายละเอียดองค์ประกอบตุอาหารแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1)
- น้ำตาลซูโครส
- ผงวุ้น
- แอลกอฮอล์เข้มข้น 70 และ95 เปอร์เซ็นต์
- น้ำกลั่น
- น้ำมะพร้าว มันฝรั่ง และกล้วย

- ผงถ่าน

1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมในหลอดทดลอง

- สารพาโคลบิวทราโซล

2. อุปกรณ์การทดลอง

- ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- ไมโครปิเปต
- หม้อนึ่งความดัน
- กล้องบันทึกภาพ
- เครื่องเขย่าเลี้ยง
- เครื่องคนสารละลาย
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องแก้วประกอบด้วย ขวดปรับปริมาตร กระบอกตวง บิกเกอร์ ฟลาสต์ ปิเปต ขวดเพาะเลี้ยง
- ตู้อบไมโครเวฟ
- อุปกรณ์ในการย้ายเลี้ยง ซึ่งประกอบด้วย ปากคีบ ด้ามมีด ใบมีดผ่าตัด กระดาษชำระ
- ชั้นวางเลี้ยง

วิธีการทดลอง

การศึกษาที่ 1 ศึกษาผลของชนิดของสารอินทรีย์ การเติมผงถ่านและไม่เติมผงถ่านต่อการเพิ่มจำนวนยอดของกล้วยไม้ว่านเพชรหึง

นำชิ้นส่วนยอดของกล้วยไม้ว่านเพชรหึง (ความยาวยอด 1 เซนติเมตร) วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง 4 สูตร คือ สูตร VW น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร กล้วยหอมบด 100 กรัมต่อลิตร และมันฝรั่งบด 100 กรัมต่อลิตร (ปัจจัยที่ 1) อาหารแต่ละสูตรเติมและไม่เติมผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ปัจจัยที่ 2) วางเลี้ยงในที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26 ±2 องศาเซลเซียส โดยวางเลี้ยงในขวด 8 ออนซ์ ที่บรรจุอาหาร 25 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 ขวด ขวดละ 4 ยอด วางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต จำนวน PLBs (Protocorm liked bodies) โดยใช้แผนการทดลองแบบ 4×2 factorials ใน CRD (Completely randomized design) (ตารางที่ 1) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's new multiple range test)

ตารางที่ 1 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองการเพิ่มปริมาณยอดกล้วยไม้ว่านเพชรหึง

สูตรอาหาร/สารอินทรีย์เชิงซ้อน	เติมผงถ่าน	ไม่เติมผงถ่าน
VW (ชุดควบคุม)	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2
น้ำมะพร้าว	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
กล้วยหอมบด	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6
มันฝรั่งบด	สูตรที่ 7	สูตรที่ 8

การศึกษาที่ 2 ศึกษาผลของชนิดของสารอินทรีย์ การเติมผงถ่านและไม่เติมผงถ่านต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึง

นำชิ้นส่วนยอดของกล้วยไม้ว่านเพชรหึง (ความยาวยอด 2 เซนติเมตร) วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง 4 สูตร คือ สูตร VW น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร กล้วยหอมบด 100 กรัมต่อลิตร และมันฝรั่งบด 100 กรัมต่อลิตร (ปัจจัยที่ 1) อาหารแต่ละสูตรเติมและไม่เติมผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ปัจจัยที่ 2) วางเลี้ยงในที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26 ±2 องศาเซลเซียส โดยวางเลี้ยงในขวด 8 ออนซ์ ที่บรรจุอาหาร 25 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 ขวด ขวดละ 4 ยอด วางเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์ บันทึกความสูงต้น ความยาวใบ จำนวนราก และความยาวราก โดยใช้แผนการทดลองแบบ 4×2 factorials ใน CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

การศึกษาที่ 3 ศึกษาผลของวัสดุปลูกต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึง

นำต้นกล้ากล้วยไม้ว่านเพชรหึงอายุ 4 เดือน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหาร โดยเลือกต้นกล้าที่แข็งแรง มาล้างวุ้นออกให้สะอาด ก่อนนำปลูกในกระถางที่มีวัสดุปลูกดังนี้

วัสดุปลูกชนิดที่ 1 กาบมะพร้าวสับ

วัสดุปลูกชนิดที่ 2 กาบมะพร้าวสับร่วมกับพีทมอส (1:1)

วัสดุปลูกชนิดที่ 3 กาบมะพร้าวสับร่วมกับสเฟกนั่มมอส (1:1)

วัสดุปลูกชนิดที่ 4 กาบมะพร้าวสับร่วมกับถ่าน (1:1)

ปลูกกระถางละ 1 ต้น แต่ละวัสดุปลูกใช้ 30 ต้น คลุมต้นกล้าด้วยพลาสติกใส เพื่อควบคุมความชื้น เป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกอัตราการรอดชีวิตหลังจากออกปลูก เป็นเวลา 6 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี DMRT

การศึกษาที่ 4 ศึกษาผลของสาร PBZ ต่อการชะลอการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ว่านเพชรหึง

นำชิ้นส่วนยอดของกล้วยไม้ว่านเพชรหึง (ความยาวยอด 2 เซนติเมตร) วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร VW เติม PBZ ความเข้มข้น 0 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26 ±2 องศาเซลเซียส โดยวางเลี้ยงในขวด 8 ออนซ์ ที่บรรจุอาหาร 25 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 ขวด ขวดละ 4 ยอด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 เดือน บันทึก ความสูงต้น ความยาวใบ จำนวนราก และความยาวราก โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ผลการทดลอง

การศึกษาที่ 1 ผลของชนิดของสารอินทรีย์ การเติมผงถ่านและไม่เติมผงถ่านต่อการเพิ่มจำนวนยอดของกล้วยไม้ว่านเพชรหึง

จากการศึกษาผลของอาหารสูตร VW ร่วมกับการเติมสารประกอบเชิงซ้อนลงในอาหารเพาะเลี้ยง ได้แก่ น้ำมะพร้าว, กล้วยหอมบด, มันฝรั่งบด แต่ละสูตรอาหารเปรียบเทียบระหว่างการเติมและไม่เติมผงถ่าน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร VW, เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร, เติมมันฝรั่งบด 100 กรัมต่อลิตร เติมและไม่เติมผงถ่าน ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อาหารสูตร VW เติมกล้วยหอมบด 100 กรัมต่อลิตร เติมและไม่เติมผงถ่านให้อัตราการรอดชีวิตรองลงมา 96.88 เปอร์เซ็นต์ อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละสูตรอาหาร (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของสารประกอบเชิงซ้อน การเติมผงถ่านและไม่เติมผงถ่านต่ออัตราการรอดชีวิตของกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	อัตราการรอดชีวิต (%)		เฉลี่ย$_{\text{สูตรอาหาร}}^{ns}$
	ไม่เติมผงถ่าน	เติมผงถ่าน	
อาหารสูตร VW	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
อาหารสูตร VW เติมน้ำมะพร้าว	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
อาหารสูตร VW เติมกล้วยหอมบด	93.75 ± 3.61	100.00 ± 0.00	96.88 ± 2.13
อาหารสูตร VW เติมมันฝรั่งบด	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
เฉลี่ย$_{\text{ผงถ่าน}}^{ns}$	98.44 ± 1.12	100.00 ± 0.00	

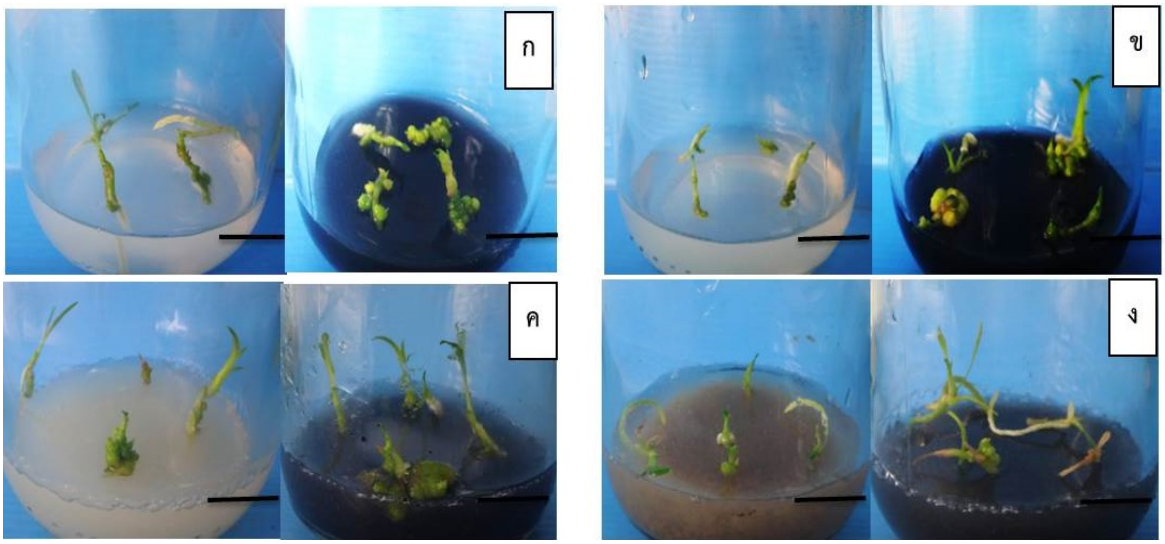
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

สำหรับจำนวน PLBs พบว่า อาหารสูตร VW เติมผงถ่านให้จำนวน PLBs สูงสุด 7.93 โปรโตคอร์มต่อชิ้นส่วน ในทุกชนิดของสารประกอบเชิงซ้อนที่ใช้ พบว่าการเติมหรือไม่เติมผงถ่านให้การเพิ่มปริมาณ PLBs ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3 ภาพที่ 5)

ตารางที่ 3 ผลของสารประกอบเชิงซ้อน การเติมผงถ่านและไม่เติมผงถ่านต่อจำนวนโปรโตคอร์มไลด์บอดี้ของกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนโปรโตคอร์มไลด์บอดี้		เฉลี่ยสูตร$_{อาหาร}^{ns}$
	ไม่เติมผงถ่าน	เติมผงถ่าน	
อาหารสูตร VW	6.47 ± 2.32	7.93 ± 3.56	7.20 ± 1.93
อาหารสูตร VW เติมน้ำมะพร้าว	7.22 ± 2.06	7.07 ± 4.11	7.15 ± 2.05
อาหารสูตร VW เติมกล้วยหอมบด	2.17 ± 1.09	3.00 ± 1.15	2.58 ± 0.74
อาหารสูตร VW เติมมันฝรั่งบด	6.00 ± 1.53	4.56 ± 0.73	5.28 ± 0.82
เฉลี่ย$_{ผงถ่าน}^{ns}$	5.46 ± 0.97	5.64 ± 1.33	

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 5 ลักษณะการเกิดโปรโตคอร์มไลด์บอดี้ของชิ้นส่วนยอดกล้วยไม้ว่านเพชรหึงบนอาหารสูตรต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ก อาหารสูตร VW

ข อาหารสูตร VW เติมน้ำมะพร้าว

ค อาหารสูตร VW เติมมันฝรั่งบด

ง อาหารสูตร VW เติมกล้วยหอมบด

การศึกษาที่ 2 ศึกษาผลของชนิดของสารอินทรีย์ การเติมผงถ่านและไม่เติมผงถ่านต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึง

จากการศึกษาผลสารประกอบเชิงซ้อนลงในอาหารเพาะเลี้ยง หลังจากเพาะเลี้ยงต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงบนอาหารเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่เติมมันฝรั่งบดร่วมกับการเติมผงถ่านให้ความสูงต้น 6.28 เซนติเมตร แตกต่างกันทางสถิติกับทรีตเมนต์อื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารที่เติมหรือไม่เติมผงถ่านลงในอาหารพบว่า ความสูงต้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4) สำหรับความยาวใบ พบว่า อาหารที่เติมมันฝรั่งบด 100 กรัมต่อลิตรให้ความยาวใบสูงสุดแตกต่างกันทางสถิติกับทรีตเมนต์อื่น ๆ และอาหารที่เติม ผงถ่านให้ความยาวใบดีกว่าสูตรที่ไม่เติมผงถ่านแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 5) ส่วนจำนวนรากต่อต้นพบว่า อาหารที่เติมกล้วยบดให้จำนวนรากต่อต้นสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอื่น ๆ และอาหารที่เติมผงถ่านให้จำนวนรากต่อต้นสูงกว่าอาหารที่ไม่เติมผงถ่านแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 4 ผลของสารประกอบเชิงซ้อน การเติมผงถ่านและไม่เติมผงถ่านต่อความสูงของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์

สูตรอาหาร	ความสูงต้น (ซม.)		เฉลี่ยสูตร$_{อาหาร}$*
	ไม่เติมผงถ่าน	เติมผงถ่าน	
อาหารสูตร VW	4.85 ± 0.91abcd	5.48 ± 0.6abc	5.17 ± 0.52A
อาหารสูตร VW เติมน้ำมะพร้าว	3.96 ± 0.06cd	5.54 ± 0.29ab	4.75 ± 0.38AB
อาหารสูตร VW เติมกล้วยหอมบด	4.44 ± 0.21bcd	3.35 ± 0.83d	3.90 ± 0.45B
อาหารสูตร VW เติมมันฝรั่งบด	5.36 ± 0.20abc	6.28 ± 0.28a	5.82 ± 0.26A
เฉลี่ย$_{ผงถ่าน}$^{ns}	4.65 ± 0.26	5.64 ± 1.33	

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรตัวพิมพ์ใหญ่) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างสองปัจจัย (อักษรตัวพิมพ์เล็ก) มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

* แตกต่างทางสถิติที่ระดับ 95% ($p \leq 0.05$)

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 5 ผลของสารประกอบเชิงซ้อน การเติมผงถ่านและไม่เติมผงถ่านต่อความยาวใบของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์

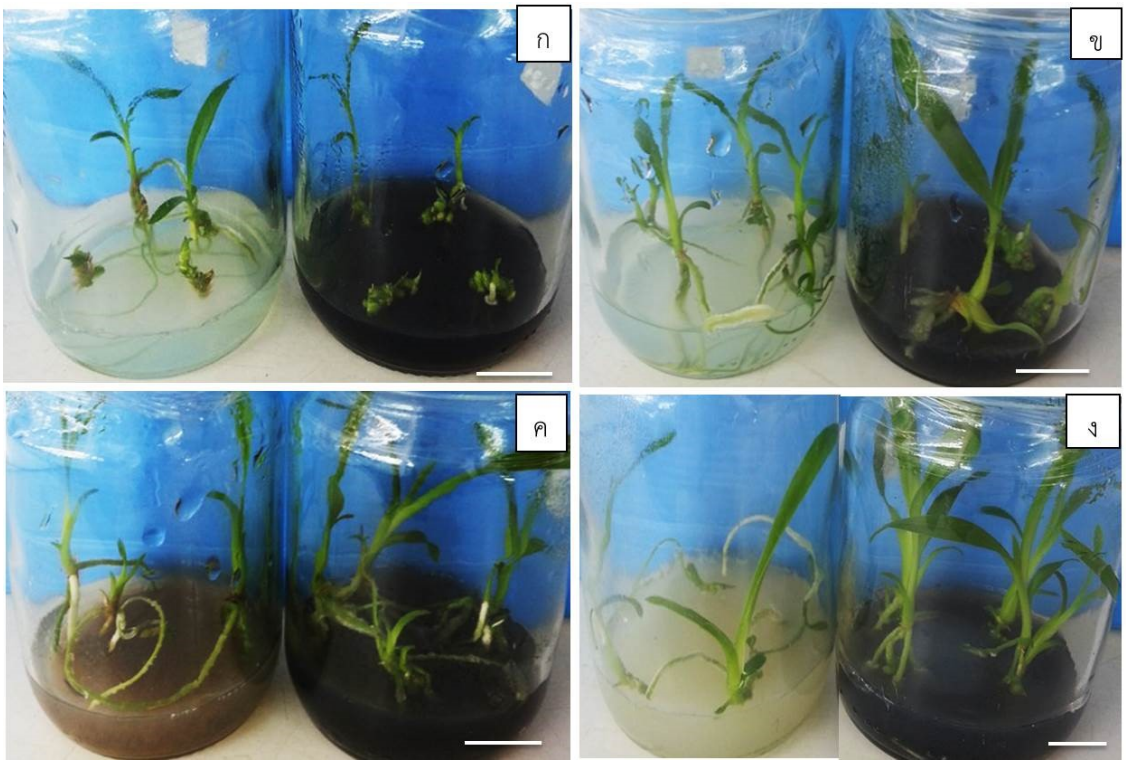
สูตรอาหาร	ความยาวใบ (ซม.)		เฉลี่ยสูตร$_{อาหาร}$*
	ไม่เติมผงถ่าน	เติมผงถ่าน	
อาหารสูตร VW	4.83 ± 1.30bc	8.15 ± 3.62bc	6.49 ± 1.88B
อาหารสูตร VW เติมน้ำมะพร้าว	8.48 ± 1.70bc	9.78 ± 4.44b	9.13 ± 4.26AB
อาหารสูตร VW เติมกล้วยหอมบด	3.02 ± 1.75c	9.64 ± 3.08b	6.33 ± 2.18B
อาหารสูตร VW เติมมันฝรั่งบด	7.58 ± 2.15bc	16.46 ± 2.89a	12.02 ± 2.56A
เฉลี่ย$_{ผงถ่าน}$**	5.98 ± 0.99B	11.05 ± 1.80A	

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรตัวพิมพ์ใหญ่) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างสองปัจจัย (อักษรตัวพิมพ์เล็ก) มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT
* แตกต่างทางสถิติที่ระดับ 95% ($p \leq 0.05$), ** แตกต่างทางสถิติที่ระดับ 99% ($p \leq 0.01$)
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 6 ผลของสารประกอบเชิงซ้อน การเติมผงถ่านและไม่เติมผงถ่านต่อจำนวนรากต่อต้นของกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนราก (รากต่อต้น)		เฉลี่ยสูตร$_{อาหาร}$**
	ไม่เติมผงถ่าน	เติมผงถ่าน	
อาหารสูตร VW	5.03 ± 0.84c	4.87 ± 1.62c	4.95 ± 0.82B
อาหารสูตร VW เติมน้ำมะพร้าว	7.58 ± 1.45ab	6.38 ± 1.06bc	6.98 ± 0.85A
อาหารสูตร VW เติมกล้วยหอมบด	6.00 ± 1.26bc	9.65 ± 0.73a	7.83 ± 1.04A
อาหารสูตร VW เติมมันฝรั่งบด	7.00 ± 1.00bc	8.23 ± 1.30ab	7.62 ± 0.78A
เฉลี่ย$_{ผงถ่าน}$*	6.40 ± 0.58B	7.28 ± 0.75A	

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งและแนวนอน (อักษรตัวพิมพ์ใหญ่) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างสองปัจจัย (อักษรตัวพิมพ์เล็ก) มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT
* แตกต่างทางสถิติที่ระดับ 95% ($p \leq 0.05$), ** แตกต่างทางสถิติที่ระดับ 99% ($p \leq 0.01$)



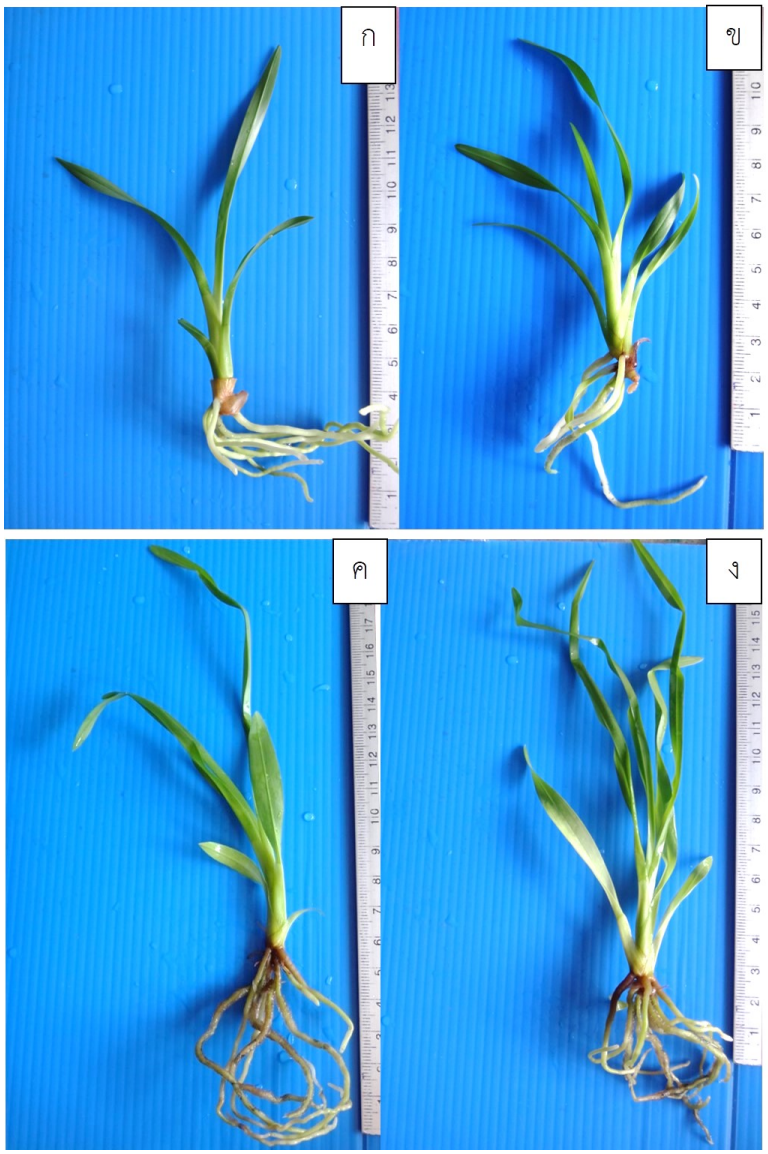
ภาพที่ 6 ลักษณะการพัฒนาของยอดกล้วยไม้ว่านเพชรหึงบนอาหารสูตรต่างๆ ที่ไม่เติมผงถ่าน (ขวดด้านซ้าย) และเติมผงถ่าน 0.2% (ขวดด้านขวา) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ก อาหารสูตร VW

ข อาหารสูตร VW เติมน้ำมะพร้าว

ค อาหารสูตร VW เติมมันฝรั่งบด

ง อาหารสูตร VW เติมกล้วยหอมบด



ภาพที่ 7 ต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 6 เดือน

ก อาหารสูตร VW

ข อาหารสูตร VW เติมมันฝรั่งบด

ค อาหารสูตร VW เติมผงถ่าน

ง อาหารสูตร VW เติมมันฝรั่งบดร่วมกับผงถ่าน

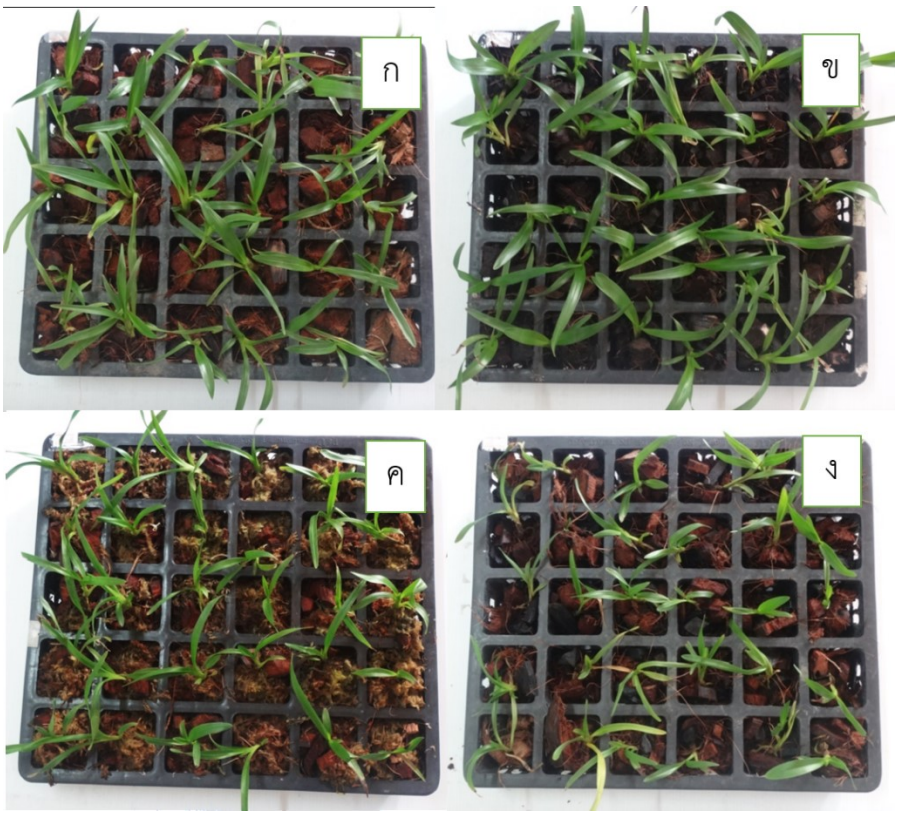
การศึกษาที่ 3 ศึกษาผลของวัสดุปลูกต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึง

หลังจากนำต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ มาอนุบาลปลูกในวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน พบว่า ทุกวัสดุปลูกให้อัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาน้ำหนักสดต่อต้น พบว่า ต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงที่ปลูกในกาบมะพร้าวสับผสมกับพีทมอสในอัตราส่วน 1:1 ให้น้ำหนักสดต่อต้นเพิ่มขึ้น 0.84 กรัมต่อต้น สูงกว่าต้นที่อนุบาลปลูกในวัสดุอื่น ๆ (ตารางที่ 7 ภาพที่ 8-9)

ตารางที่ 7 ผลของวัสดุปลูกต่ออัตราการรอดชีวิตและน้ำหนักสดต่อต้นหลังจากการอนุบาลปลูกเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชนิดของวัสดุปลูก	อัตราการรอดชีวิต (%)	น้ำหนักสดต่อต้น (กรัม)
กาบมะพร้าวสับ	100.00 ± 0.00	0.54 ± 0.07
กาบมะพร้าวสับร่วมกับพีทมอส	100.00 ± 0.00	0.84 ± 0.03
กาบมะพร้าวสับร่วมกับสเฟกนั่มมอส	100.00 ± 0.00	0.56 ± 0.25
กาบมะพร้าวสับร่วมกับถ่าน	100.00 ± 0.00	0.21 ± 0.08
F-test		ns
C.V. (%)		1.86

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



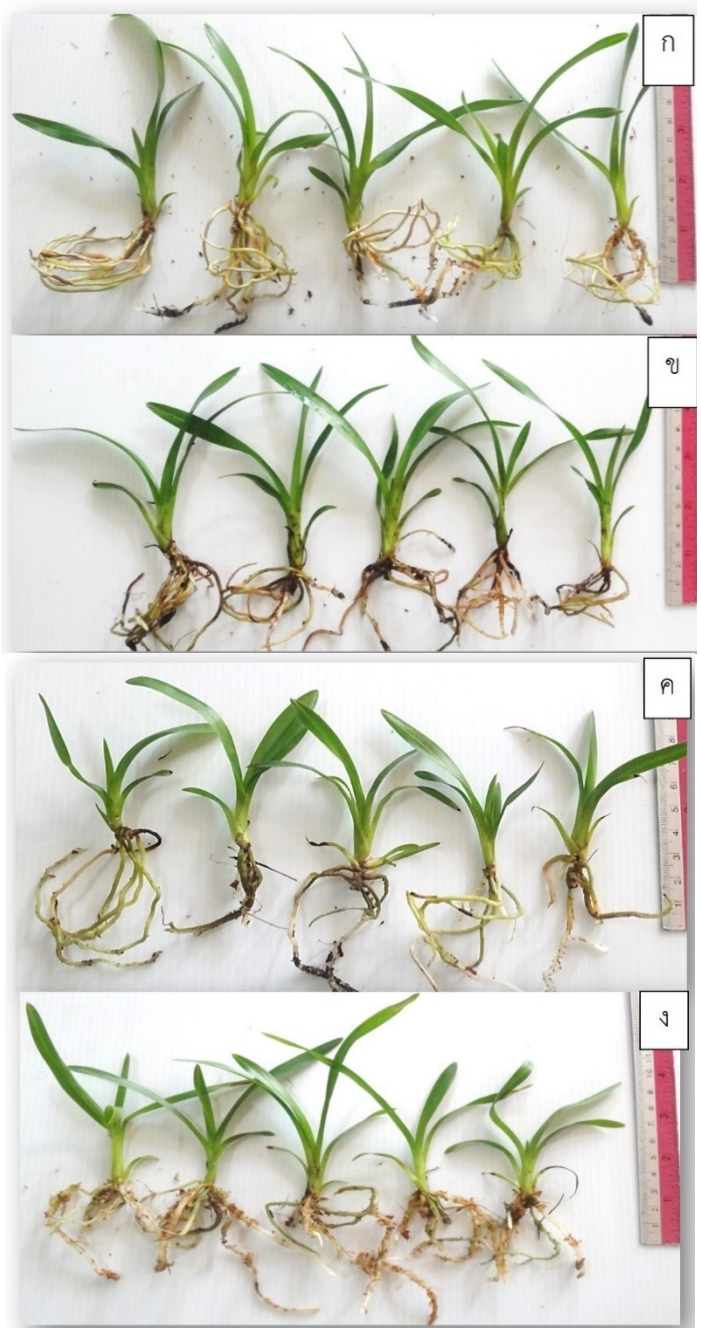
ภาพที่ 8 ต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากอนุบาลออกปลูกในวัสดุปลูกต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ก กาบมะพร้าวสับ

ข กาบมะพร้าวสับร่วมกับพีทมอส

ค กาบมะพร้าวสับร่วมกับสเฟกนั่มมอส

ง กาบมะพร้าวสับร่วมกับถ่าน



ภาพที่ 9 ต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากอนุบาลออกปลูกในวัสดุปลูกต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ก กาบมะพร้าวสับ

ข กาบมะพร้าวสับร่วมกับพีทมอส

ค กาบมะพร้าวสับร่วมกับสเฟกนั่มมอส

ง กาบมะพร้าวสับร่วมกับถ่าน

การศึกษาที่ 4 ศึกษาผลของสาร PBZ ต่อการชะลอการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ว่านเพชรหึง

จากการนำชิ้นส่วนยอดของกล้วยไม้ว่านเพชรหึง (ความยาวยอด 2 เซนติเมตร) วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร VW เติม PBZ ความเข้มข้น 0 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 เดือนบันทึกการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึง พบว่า ความสูงของต้น และความยาวใบลดลงตามความเข้มข้นของ PBZ ที่เพิ่มขึ้น ต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PBZ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความสูงของต้นเฉลี่ย 3.87 เซนติเมตร ความยาวใบ 3.26 เซนติเมตร แตกต่างกันทางสถิติกับอาหารที่ไม่ได้เติม PBZ สำหรับจำนวนใบต่อต้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละสูตรอาหาร (ตารางที่ 8, ภาพที่ 10) หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารเดิมโดยไม่มีการย้ายเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 เดือน พบว่า อัตราการรอดชีวิตของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงชุดควบคุมเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารที่เติม PBZ อยู่ในช่วง 99.17-93.33 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวางเลี้ยงต่อไปเป็นระยะเวลา 24 เดือน พบว่า อัตราการรอดชีวิตลดลง ซึ่งต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม PBZ ให้อัตราการรอดชีวิต 21.66 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่เติม PBZ มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วง 24.17-39.17 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9, ภาพที่ 11) เมื่อนำชิ้นส่วนยอดหลังการเก็บรักษามาย้ายเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด พบว่าชิ้นส่วนยอดสามารถเพิ่มปริมาณและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ที่มีลักษณะปกติได้

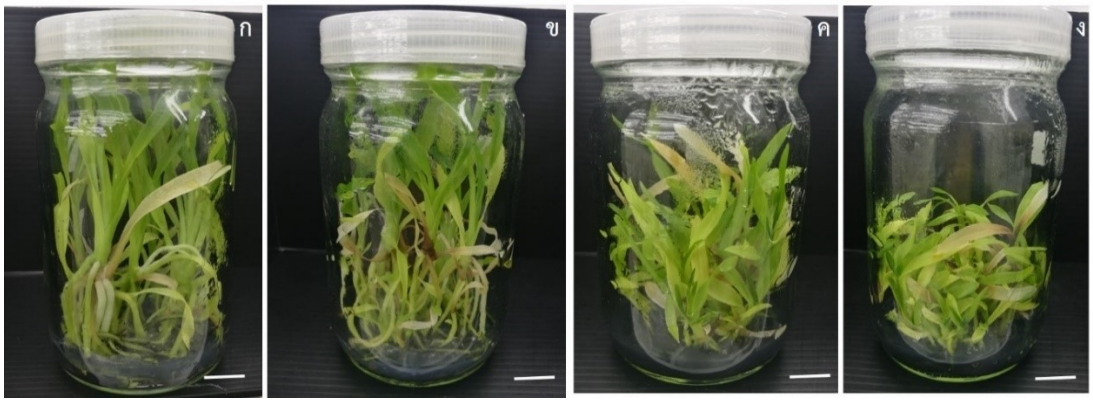
ตารางที่ 8 ผลของ PBZ ต่อความสูง ความยาวใบ และจำนวนใบของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 เดือน

PBZ (mg/L)	ความสูง (ซม.)	ความยาวใบ (ซม.)	จำนวนใบต่อต้น (ใบ)
0	7.53a	9.65a	6.08
0.5	6.79b	7.41b	5.83
1.0	4.63c	3.59c	5.92
2.0	3.87d	3.26d	5.75
F-test	**	**	ns
C.V. (%)	3.89	3.30	6.37

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

** แตกต่างทางสถิติที่ระดับ 99% ($p \leq 0.01$)

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 10 ต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติม PBZ ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 เดือน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ก อาหารสูตร VW

ข อาหารสูตร VW เติม PBZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค อาหารสูตร VW เติม PBZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง อาหารสูตร VW เติม PBZ ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

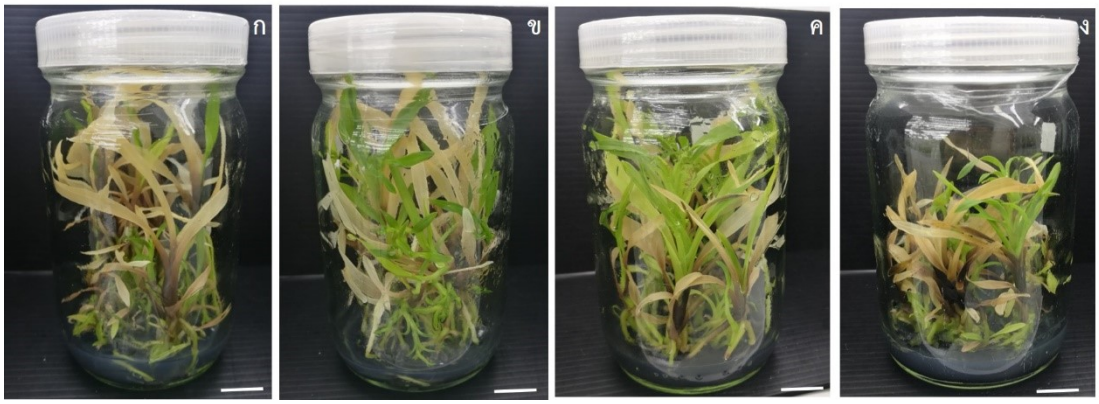
ตารางที่ 9 ผลของ PBZ ต่ออัตราการรอดชีวิตของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เป็นเวลา 12 เดือน และ 24 เดือน

PBZ (mg/L)	อัตราการรอดชีวิต (%)	
	12 เดือน	24 เดือน
0	100a	21.66b
0.5	99.17a	24.17b
1.0	97.5ab	39.17a
2.0	93.33b	38.33a
F-test	*	**
C.V. (%)	3.04	15.13

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

* แตกต่างทางสถิติที่ระดับ 95% ($p \leq 0.05$), ** แตกต่างทางสถิติที่ระดับ 99% ($p \leq 0.01$)

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 11 ต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติม PBZ ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 เดือน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ก อาหารสูตร VW

ข อาหารสูตร VW เติม PBZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค อาหารสูตร VW เติม PBZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง อาหารสูตร VW เติม PBZ ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิจารณ์ผล

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของกล้วยไม้ว่านเพชรหึงบนอาหารสูตร VW เติมสารประกอบเชิงซ้อนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำมะพร้าว กล้วยหอมบด และมันฝรั่งบด พบว่าให้อัตราการรอดชีวิต 96.88-100 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามอาหารที่เติมมันฝรั่งบดร่วมกับการเติมผงถ่านให้การเกิด PLBs และการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงได้ดีที่สุด โดยทั่วไปแล้วองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงนั้นนอกจากธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองแล้วยังมีการเติมสารอินทรีย์ชนิด ต่าง ๆ ซึ่งสารอินทรีย์ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นสารที่ส่งเสริมการเจริญ และการแบ่งเซลล์ของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง สารดังกล่าวมีหลายชนิด สารอินทรีย์บางชนิดมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน รวมถึงสารประกอบเชิงซ้อนที่ใช้การศึกษานี้จัดเป็นสารอินทรีย์ที่มีคาร์บอน หรือไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นพืชใดตอบสนองต่อสารนี้ในรูปใดได้ดีก็เลือกใช้รูปนั้น และต้องมีการศึกษาเพื่อทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชชนิดนั้น ๆ ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้พบว่า น้ำมะพร้าว กล้วยหอม หรือ มันฝรั่ง สามารถนำมาเติมลงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ว่านเพชรหึงได้ แต่สูตรอาหารที่ให้การเจริญของต้นได้ดีที่สุดคือ การเติมมันฝรั่ง เนื่องจากในมันฝรั่งมีสารพวกโพลีเอมีน ได้แก่ putrescine spermidine spermine และ biosynthetic enzymes เช่น arginine decarboxylase ornithine decarboxylase กระจายอยู่ในส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อมันฝรั่ง แต่ในช่วงที่หัวมันฝรั่งงอกจะพบสารนี้มากบริเวณยอด ซึ่งสารพวกนี้ทำให้เกิดการเพิ่มของกรดนิวคลีอิกและทำให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบ mitosis มากขึ้น รวมทั้งป้องกันการสลายของโปรตีนและคลอโรพลาสต์ (Kaur–Sawhney *et al*., 1980) การใส่มันฝรั่งในอาหารจึงช่วยเพิ่มการงอกของเมล็ดกล้วยไม้และต้นอ่อนแข็งแรงมากขึ้น (Ernst, 1967) การใช้น้ำสกัดมันฝรั่ง 5 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้จำนวนยอดของ *Dendrobium nobile* เพิ่มขึ้น (Sudeep *et al*., 1997) นอกจากนี้มันฝรั่งยังช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ดีขึ้น และต้นอ่อนจะมีความแข็งแรงมากขึ้น (Arditti, 2008) พืชแต่ละชนิดตอบสนองต่อสารกลุ่มนี้แตกต่างกัน จึงต้องมีการศึกษาเพื่อทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชชนิดนั้น ๆ เช่น การทดลองของ ปรัชพรรณ และ สมปอง (2550) ได้ศึกษาผลของสารอินทรีย์และสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรในหลอดทดลอง พบว่า การเพาะเลี้ยงต้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเพิ่มความเข้มข้นของสารอินทรีย์เป็น 2.5 เท่า ของสูตร MS ปกติ สามารถชักนำยอดรวมเฉลี่ยสูงสุด 4.78 ยอดต่อชิ้นส่วน ภายในระยะเวลา 30 วัน Maneerattanaryngroj และคณะ (2010) ศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของสิงโตประหลาด (*Bulbophyllum affine* Lindl) โดยนำต้นกล้าจากการเพาะเมล็ดเป็นเวลา 8 เดือน มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ได้แก่ สูตร VW MS ½ MS และ KC (Knudson C) อาหารทุกสูตรเติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร มันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร กล้วย 50 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 2 กรัม

ต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร VW ให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนสูงสุด 3.75 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่อาหารสูตร KC ให้ความยาวยอดสูงสุด 1.48 เซนติเมตร จำนวนราก 12.57 รากต่อต้น และความยาวราก 0.93 เซนติเมตร Utami และคณะ (2017) ศึกษาผลของสารอินทรีย์ในการเจริญเติบโตของเมล็ดกล้วยไม้ *Dendrobium lasianthera* โดยนำชิ้นส่วนที่ได้จากโปรโตคอร์มวางเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เพปโตน 2 กรัมต่อลิตร กล้วยหอม 150 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 23 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหาร VW ที่มีการเติม น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ *Dendrobium lasianthera* ดีที่สุด โดยให้ความยาวต้นเฉลี่ย 3.4 เซนติเมตร จำนวนรากเฉลี่ย 6 รากต่อชิ้นส่วน ความยาวรากเฉลี่ย 1.8 เซนติเมตร จำนวนใบเฉลี่ย 5.2 ใบต่อชิ้นส่วน ความยาวใบเฉลี่ย 1.9 เซนติเมตร อย่างไรก็ตามกล้วยไม้สกุลเดียวกัน แต่ต่างชนิดก็ตอบสนองต่อสารประกอบเชิงซ้อนที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน เช่นการศึกษาของ Parthibhan และคณะ (2015) ศึกษาผลของสารประกอบเชิงซ้อนต่อการชักนำยอดของ *Dendrobium lasianthera J.J.Sm* โดยนำชิ้นส่วนที่ได้โปรโตคอร์มวางเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS เติม กล้วยบด และน้ำมะพร้าวที่ 1 3 5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 23 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 15 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร ½ MS ที่เติมด้วยน้ำมะพร้าว 3 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้เกิดการชักนำยอดดีที่สุดเฉลี่ย 6.2 ยอดต่อชิ้นส่วนโปรโตคอร์มและการเติมกล้วยบด 7 เปอร์เซ็นต์ ให้ต้นที่มีความยาวของยอดมากที่สุด 0.57 เซนติเมตร Li และคณะ (2013) พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำยอด ของกล้วยไม้ *Dendrobium pendulum* และ *Dendrobium primulinum* คือ สูตร ½ MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดของกล้วยไม้ *Dendrobium heterocarpum* คือ สูตร ½ MS เติม BA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร สูตรสำหรับชักนำรากกล้วยไม้ *Dendrobium pendulum* และ *Dendrobium heterocarpum* คือ สูตร ½ MS เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกล้วยบด 100 กรัมต่อลิตร ในขณะที่สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำราก *Dendrobium primulinum* คือ สูตร ½ MS เติม NAA เข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด 100 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่า การเติมกล้วยหอมบดลงในอาหารเพาะเลี้ยง ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ความสูง ความยาวใบ และจำนวนราก น้อยลงกว่าสูตรอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว และมันฝรั่ง การใช้เนื้อกล้วยหอมบด 2-15 เปอร์เซ็นต์เติมลงในอาหารสูตรต่างๆ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้ *Dendrobium nobile* (Sudeep *et al*., 1997) ต้นอ่อนกล้วยไม้สกุล *Cattleya* (Arditti, 1967) ต้นอ่อนของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* (Ernst, 1974) ต้นอ่อน *Habenaria dentata* (Sw.)

Schltr (สัจจพร, 2545) อย่างไรก็ตามพบว่าไม่ควรใส่กล้วยหอมในอาหารที่ใช้เพาะต้นอ่อนของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี *Paphiopedilum* เพราะทำให้ต้นอ่อนที่งอกไม่เจริญเติบโต (Ernst, 1974) สำหรับการเปรียบเทียบระหว่างการเติมหรือไม่เติมผงถ่านลงในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่า การเติมผงถ่านให้การเจริญเติบโตได้ดีกว่าสูตรที่ไม่เติมผงถ่าน เนื่องจาก ผงถ่านมีความสามารถในการดูดซับสารบางตัวออกจากอาหารได้ เช่น การดูดซับฮอร์โมนหรือ สารประกอบฟีนอล ซึ่งเป็นพิษกับเซลล์ เนื่องจากผงถ่านมีช่องว่างที่ ละเอียดมาก มีพื้นที่ผิวในช่องว่างสูง จึงใช้ผงถ่านในการดูดซับสารพิษ เช่น สารประกอบฟีนอล เอทิลีน ทำให้ปริมาณสารดังกล่าวในอาหารลดลง นอกจากนี้อาจใช้ผงถ่านในระยะที่เกิดรากเพื่อลดแสงบริเวณราก และทำให้รากเจริญเติบโตได้ดี ผงถ่านจึงสำคัญต่อการสร้างรากเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ สารที่มีคุณสมบัติคล้ายกันกับผงถ่าน คือ PVP และ กรดแอสคอร์บิค ก็สามารถดูดซับสารฟีนอล หรือยับยั้งการเกิดสารสีน้ำตาลได้ (เพชรรัตน์, 2556) สอดคล้องกับการศึกษาของ วันฟิรฮาน และคณะ (2557) อาหารสูตร VW ร่วมกับการเติมมันฝรั่งบด 5 เปอร์เซ็นต์ ผงถ่าน 2 เปอร์เซ็นต์ ให้การสร้างโปรโตคอร์มของกล้วยไม้เอื้องไอยเรศสูงสุด

สำหรับการศึกษาวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการอนุบาลปลูกกล้วยไม้ว่านเพชรหึงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าวัสดุปลูกที่ใช้ในการศึกษานี้ ส่งผลให้ต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ อัญจนา และคณะ (2557) รายงานการย้ายกล้วยไม้ว่านเพชรหึงปลูกในกระถางพลาสติกที่มีวัสดุปลูกต่าง ๆ ได้แก่ กาบมะพร้าวสับ : ถ่าน อัตราส่วน 1:1 กาบมะพร้าวสับ: ถ่าน: อิฐทุบ อัตราส่วน 1:1:1 และกาบมะพร้าวสับเพียงอย่างเดียว อนุบาลต้นในโรงเรือนพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ต้นกล้าที่ได้จากทุกกรรมวิธีมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาของ นาตยา และคณะ (2557) ศึกษาชนิดของวัสดุปลูกต่อการอนุบาลกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อย้ายปลูกในวัสดุปลูก 3 ชนิด ได้แก่ กาบมะพร้าวสับ กาบมะพร้าวสับและถ่าน (1:1) และ กาบมะพร้าวสับ อิฐทุบ และถ่าน (1:1:1) หลังการอนุบาลเป็นเวลานาน 2 เดือน พบว่า ต้นกล้าที่ย้ายปลูกในวัสดุปลูก กาบมะพร้าวสับและถ่าน (1:1) มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โสภา และ วลิณี (2555) ได้ศึกษาการอนุบาลต้นกล้ากล้วยไม้หวาย Sakura Pink ในกระถาง 2 นิ้ว เติมวัสดุปลูกชนิดต่างๆ คือ กาบมะพร้าวสับ เม็ดดินเผามวลเบา เศษโฟม ฟองน้ำ และทรายหยาบ พบว่า ต้นกล้ากล้วยไม้หวาย Sakura Pink ที่ปลูกในเม็ดดินเผามวลเบา และเศษโฟม มีอัตรารอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากอัตราการรอดชีวิตหลังจากการอนุบาลปลูกแล้ว วัสดุปลูกที่เลือกใช้ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่า การปลูกต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงในกาบมะพร้าวสับผสมกับพีทมอสในอัตราส่วน 1:1 ให้การเจริญเติบโตของต้นได้ดีที่สุด ในขณะที่อุทัย และ จิตราพรรณ (2519) อ้างโดย ธันว์ (2546) ทดลองเปรียบเทียบชนิดของวัสดุปลูกที่เหมาะสมกับกล้วยไม้สกุลหวาย *Dendrobium* Jaquelyn Concert เพื่อศึกษาความแตกต่างด้านการเจริญเติบโตจากเครื่องปลูกต่างชนิดกัน คือ ออสมันด้า กาบมะพร้าว

ถ่าน ถ่านและทรายและหินเล็ก พบว่าต้นกล้วยไม้ที่ปลูกในเครื่องปลูกที่ใช้ออสมันด้าจะมีลำ ลูกกล้วยยาวสุด คือ 13.9 เซนติเมตร รองลงมาคือ กาบมะพร้าว ถ่านและทราย สำหรับเครื่องปลูกที่ใช้ถ่านและหินเล็กจะมีลำ ลูกกล้วยสั้นที่สุด แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้แต่ละชนิดเหมาะสมต่อวัสดุปลูกแตกต่างกัน นอกจากนี้การดูแลในเรื่องของการพรางแสงและการให้น้ำก็มีผลต่อความสำเร็จในการอนุบาลต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในส่วนของการศึกษาการเก็บรักษาพันธุกรรมกล้วยไม้ว่านเพชรหึงในหลอดทดลองโดยการเพาะเลี้ยงต้นพืชที่มีการปรับปริมาณธาตุอาหารและปัจจัยสภาพแวดล้อม เพื่อให้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าลง วิธีการที่นิยมใช้กันมากคือ การลดอุณหภูมิขณะเพาะเลี้ยงร่วมกับการใส่สารบางชนิดที่ไปจำกัดการเจริญเติบโต หรือไปยับยั้งกระบวนการออสโมซิสของเนื้อเยื่อ และในบางกรณีอาจใช้วิธีลด หรือไม่ใส่ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตบางชนิด เช่นเดียวกับการลดปริมาตรก๊าซออกซิเจน (Kartha, 1985) ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ว่านเพชรหึงโดยการใช้สารชะลอการเจริญเติบโต PBZ เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่า ต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PBZ อัตราการเจริญของต้นลดลง ซึ่งความสูงและความยาวใบลดลงแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นระยะเวลา 24 เดือนโดยไม่ต้องมีการย้ายเลี้ยง พบว่า ต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม PBZ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่าต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม PBZ ซึ่งจะเห็นได้ว่า สารชะลอการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงนั้นมีผลโดยตรงต่อการเจริญของพืชทั้งนี้เนื่องมาจากสารพาโคลบิทราโซล มีกลไกในการชะลอการเจริญเติบโตโดยยับยั้งการสร้างกรดจิบเบอเรลลิคในวิถีไอโสพรีนอยด์ด้วยการยับยั้งเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมการสร้างกรดดังกล่าว (Ninnenmann *et al.,* 1964) ส่งผลให้การยืดยาวของปล้องลดลง จึงทำให้ความสูงของต้นลดลง (Hazarika, 2003; Chaney, 2008) เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงหญ้าแฝกในอาหารเติมพาโคลบิวทราโซล ส่งผลให้ลำต้นเตี้ยแคระกว่าต้นในชุดควบคุมอย่างน้อย 10 เท่า ใบไม่ยาวเหมือนพืชตระกูลหญ้าทั่วไป หดสั้นความก้างเพิ่มขึ้นนอกจากนี้ยังหนาเพิ่มขึ้นด้วย (ลดาวัลย์, 2552) Patell และคณะ (2004) พบว่าพาโคลบิวทราโซลความเข้มข้นเพิ่มขึ้นส่งผลให้ใบของ *Epidendrum radicans* มีขนาดเล็กและหนากว่าปกติ 17-37 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามการใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปทำให้ยอด และใบไหม้ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ในการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในระยะปานกลางนอกจากจะใช้พาโคลบิวทรา โซลแล้วยังมีรายงานการใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่นแมนนิทอล หรือซอร์บิทอล เช่นการเก็บรักษาปลายยอดเผือกในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมน้ำตาลแมนนิทอล 1-2 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่อุณหภูมิ 9 องศาเซลเซียส ชิ้นส่วนสามารถเพาะเลี้ยงอยู่บนอาหารดังกล่าวได้นานเป็นเวลา 8 ปี (Bessembinder *et al*., 1993) หรือการเก็บปลายยอดของกล้วยไม้วานิลลาบนอาหาร

ที่เติมน้ำตาลแมนนิทอล 1.5 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ชิ้นส่วนสามารถเพาะเลี้ยงอยู่บนอาหารดังกล่าวได้นานเป็นเวลา 12 เดือน (Divakaran *et al*., 2006) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ทดสอบผลของน้ำตาลแอลกอฮอล์ หรืออุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้ว่านเพชรหึง โดยการใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์ หรืออาจใช้สารชะลอการเจริญเติบโต (พาโคลบิวทราโซล) ร่วมกับน้ำตาลแอลกอฮอล์และอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาเพื่อเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ให้นานขึ้น หรือศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในระยะยาวด้วยวิธีการเก็บในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation)

สรุป

สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณกล้วยไม้ว่านเพชรหึงจากการศึกษานี้ พบว่าอาหารสูตร VW เติมมันฝรั่งบด 100 กรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณและให้การเจริญเติบโตของต้นได้ดีที่สุด

ต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงที่ชักนำได้ในหลอดทดลองเมื่อนำออกอนุบาลปลูกทุกวัสดุปลูกที่ทำการศึกษาให้อัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ แต่การปลูกด้วยกาบมะพร้าวสับร่วมกับพีทมอสในอัตราส่วน 1:1 ให้การเจริญเติบโตได้ดีที่สุดซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยต่อต้นเพิ่มขึ้นสูงสุด 0.84 กรัมต่อต้น สำหรับการอนุรักษ์พันธุกรรมในหลอดทดลองโดยการเพาะเลี้ยงต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงบนอาหารที่เติมสารชะลอการเจริญเติบโต PBZ สามารถลดการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงได้ ซึ่งต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PBZ (1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่งผลให้ความสูงต้น และความยาวใบลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สามารถเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ให้นานขึ้น ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงต้นกล้วยไม้ว่านเพชรหึงในอาหารดังกล่าวได้นาน 2 ปีโดยไม่ต้องมีการย้ายเลี้ยงเปลี่ยนอาหาร

เอกสารอ้างอิง

ครรชิต ธรรมศิริ. 2541. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. กรุงเทพฯ: อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์พับลิชชิ่ง.

ครรชิต ธรรมศิริ. 2550. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. กรุงเทพฯ: อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์พับลิชชิ่ง.

จรัสศรี นวลศรี. 2548. เอกสารคำสอนวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืช (510-432). สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

จิตราพรรณ พิลึก. 2536. การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน.

จินดา ศรศรีวิชัย. 2524. สรีรวิทยาพืชภาคการเจริญเติบโตและการควบคุม. เชียงใหม่: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จุฑามาศ ศรีสำราญ. 2549. การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้ากล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เทิดศักดิ์ โทณลักษณ์. 2555. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสี้ยวดอกขาว. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.

ธันว์ ขำทอง. 2546. การขยายพันธุ์กล้วยไม้สิงโตก้ามปูแดงและสิงโตเครายาวโดยการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรัชพรรณ หนูจีน และสมปอง เตชะโต. 2550. ผลของสารประกอบอินทรีย์และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญและการออกดอกของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรในหลอดทดลอง. วารสารเกษตร 23: 219-226.

พันทวี มาไพโรจน์. 2532. ฮอร์โมนและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช: บทแนะนำความรู้พื้นฐาน. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พีรเดช ทองอำไพ. 2529. ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พีรเดช ทองอำไพ. 2537. ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ : แนวทางในการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: วิชัยการพิมพ์.

พีรเดช ทองอำไพ. 2555. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. เข้าถึงได้จาก: http://www.thaikasetsart.com (สืบค้นเมื่อ 29 กันยายน 2561).

เพชรรัตน์ จันทรทิณ. 2556. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการเกษตร. กรุงเทพฯ: เอกสารประกอบการสอน สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยกรุงเทพธนบุรี

ภุมรินทร์ คงมณี. 2544. การศึกษาการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้าเอื้องแซะหลวงS ในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ระพี สาคริก. 2516. การเพาะปลูกกล้วยไม้ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชวนพิมพ์.

รวิภา เดชาชาญ. 2554. ว่านยารักษาโรค. กรุงเทพฯ: ไทยควอลิตี้บุ๊คส์.

ลัดดาวัลย์ มูสิกาปาละ. 2552. เทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธ์หญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3 (*Vetiveria zizanioides* Nash) ในไนโตรเจนเหลว. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วันฟิรฮาน บินยามะ รอยฮัน หะมะ และ สุภาวดี รามสูตร. 2557. ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของ กล้วยไม้เอื้องไอยเรศ.วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 1: 20-24.

วิทยา สุริยาภณานนท์. 2534. วัสดุปลูกพืชในภาชนะ *ใน* วันต้นไม้ประจำ ปีแห่งชาติ 2534. กรุงเทพฯ: กองสวนสาธารณะ สำนักสวัสดิการสังคม.

วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย กาญจนรี พงษ์ฉวี และรัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์. 2557. การเก็บรักษาพันธุ์หอมน้ำ *Crinum thaianum* Schulze ในสภาพปลอดเชื้อ. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง.

สนธิชัย จันทร์เปรม. 2534. การชะลอการเจริญเติบโตของอ้อยปลูกและอ้อยป่าในสภาพปลอดเชื้อ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมปอง เตชะโต. 2539. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

สมปอง เตชะโต. 2554. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูกเพื่อการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ.

สัจจพร จันทะวงษ์. 2545. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการงอกและพัฒนาของกล้วยไม้ดิน *Geodorum siamense* Rolfe ex Downie และ *Habenaria dentata* (Sw.) Schltr. ในสภาพปลอดเชื้อ. กรุงเทพฯ: ฐานข้อมูลวิทยานิพนธ์ไทย.

โสภา ชูเพ็ง และวลิณี ไชยสุวรรณ. 2555. ผลของ PBZ BA และ TDZ ต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้หวาย Sakura Pink ในสภาพปลอดเชื้อ. แก่นเกษตร 40 (พิเศษ) : 381-387.

อนุพันธ์ กงบังเกิด และแสงเดือน วรรณชาติ. 2554. ผลขององค์ประกอบในอาหารต่อการเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องคำผักปราบ (*Dendrobium ochreatum* Lindl.) ในสภาพ

ปลอดเชื้อ. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร 8: 71-80.

อบฉันท์ ไทยทอง. 2547. กล้วยไม้เมืองไทย. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน.

อบฉันท์ ไทยทอง. 2552. กล้วยไม้เมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 16. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน.

อัคนีย์ ส่องแสง และกนก เลิศพานิช. 2562. การทำนายลักษณะสีดอกของกล้วยไม้ว่านเพชรหึง. เข้าถึงได้จาก: http://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/2556/KC5101037.pdf (เข้าถึงเมื่อ 20 เมษายน 2562).

อัญจนา จันทร์ประทิว สิทธิโชค วีณะคุปต์ สุกัญญา แสนภักดี และนาตยา มนตรี. 2557. ผลของการใช้สารไคโตซานร่วมกับวัสดุปลูกต่อการอนุบาลกล้วยไม้เพชรหึง. วารสารแก่นเกษตร 42: 3.

อุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ. 2553. ข้อมูลสมุนไพร ว่านเพชรหึง. เข้าถึงได้จาก: https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/siri/index.php?page=search_detail&medicinal_id=301. (เข้าถึงเมื่อ 21 มกราคม 2562).

อุทยานหลวงราชพฤกษ์. 2560. ว่านเพชรหึง. เข้าถึงได้จาก: www.royalparkrajapruek.org/Plants/view?id=737 (เข้าถึงเมื่อ 21 มกราคม 2562).

Arditti, J. 2008 Micropropagation of Orchids. 2nd Edition, Oxford: Blackwell Publishing.

Bajaj, Y. P. S. 1995. Cryopreservation of plant cell, tissue and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In Biotechnology in Agriculture and Forestry (ed. Y. P. S. Bajaj) Vol. 32, pp. 3-18. Heidelberg: Springer-Verlag.

Bessembinder, J.J.E., Staritsky, G. and Zandvoort, E.A. 1993. Long-term in vitro storage of *Colocasia esculenta* under minimal growth conditions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33: 121-127.

Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K. 1983. Plant Tissue Culture, Theory and Practice. Netherlands: Elsevier Publishing.

Bunnag. S. and Khonkayan, S. 2010. Long-tem preservation of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl, using encapsulation method. Extreme life, Biospeology and Astrobiology International Journal of the Bioflux Society 2: 45-50.

Chaney, W. R. 2008. Growth Retardants: A Promising Tool for Managing Urban Trees. Purdue Extension. Purdue University. Available Source: http://www.extension.purdue.edu/exmedia/FNR/FNR-252-W.pdf. (accessed on 23 January 2019.

Divakaran, M., Nirmal B. K. and Meter, K. V. 2006. Conservation of vanilla species, *in vitro.* Sciencentia Horticulturae 110: 175-180.

Ernst, R. 1967. Effect of select organic nutrient additives on growth in vitro of *Phalaenopsis* seedlings. American Orchid Society Bulletin 36: 386-394.

Ernst, R. 1974. The use of activated charcoal in asymbiotic seedling culture of *Paphiopedilum*. American Orchid Society Bulletin 43: 35-38.

Flores, H.E. and Galston, A.W. 1982. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. Plant Physiology 69: 701-706.

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

Hazarika, B. N. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plant. Current Science 85: 1704-1712.

Kartha, K.K. 1985. Cryopreservation of Plant Cells and Organ. Boca Raton: CRC Press.

Kaur-Sawhney, R., Flores, H.E. and Galston, A.W. 1980. Polyamine-induced DNA synthesis and mitosis in oat leaf protoplasts. Plant Physiology 65: 368-371.

Khalifah, R.A. 1966. Gibberellin-like substances from the developing banana fruit. Plant Physiology 41: 771-773.

Khoddamzadeh, A. A., Sinniah, U. R., Kadir, M. A., Kadzimin, S. B. Mahmood, M., and Sreeramnan, S. 2011. In vitro induction and proliferation of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf segments of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson. Plant Growth Regulation 65: 381-387.

Kim, J. Y. and Lee, J. S. 1992. Effect of cultural conditions on rhizome growth and organogenesis of *Cymbidium lancifolium* native to Korea in vitro. Journal of Korean Society of Horticultural Science 33: 471-476.

Knudson, L. 1964. A new method for the germination of orchid seeds. American Orchid Society Bulletin 15: 214-217.

Li, Y., Zhu, D.H., Pan, H.T. and Zhang, Q.X. 2013. *In vitro* propagation of three *Dendrobium* species from stems. Journal of Northeast Forest University 41: 77-81.

Linsmaier, E. M. and Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Plant Physiology 18: 100-127.

Maneerattanarungroj, P., Bunnag, S. and Monthatong, M. 2007. *In vitro* conservation of *Cleisostoma areitinum* (Rchb. f.) Garay, rare Thai orchid species by an

encapsulation-dehydration method. Asian Journal of Plant Sciences 6: 1235-1240.

Martin, K.P. and Madassery, J. 2006. Rapid in vitro propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. Sciencentia Horticulturae 108: 95-99.

Ninnemann, H., Zeevaart, J.A.D., Kende, H. and Lang, A. 1964. The plant growth retardant CCC as inhibitor of gibberellin biosynthesis in *Fusarium moniliforme*. Planta. 61: 229-235.

Malabadi, R.B., Mulgund, G.S. and Kallappa, N. 2005. Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot tip sections. Journal of Plant Physiology 162: 473-478.

Mckendrick, S. 2000. *In vitro* germination of orchids: a manual. Ceiba foundation for tropical conservation. Available from: www.Ceiba.org/documents/CFTCproman.pdf (Accessed 8 May 2017).

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

Nitsch, J. P. and Nitsch, C. 1956. Auxin-dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues. American Journal of Botany 43: 838-853.

Pateli, P., Papafotiou, M.P. and Chronopoulos, J.C. 2004. Comparative effects of four plant growth retardants on growth of *Epidendrum radicans*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 79: 303-307.

Parthibhan, S., Rao, M.V. and Kumar, T.S. 2015. In vitro regeneration from protocorms in *Dendrobium aqueum* Lindley – Animpeiled orchid. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 13: 227-233.

Pierik, R.L.M. 1987. *In Vitro* Culture of Higher Plants. Leiden: Martinus Nijhoff Publishers.

Pouzi, N.Z., Rathinam, X., Antony, J.J.J., Poobathy, R. and Subramaniam, S. 2011. Early investigation on cryopreservation of *Dendrobium* sonia-28 using encapsulation-dehydration with modified Evans blue assay. African Journal of Biotechnology 10: 3534-3539.

Schenk, R. U. and Hildebrandt, A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonus and dicotyledonous plant cell culture. Canadian Journal of Botany 50: 199-204.

Sahakitpichan, P., Mahidol, C., Disadee, W., Chimnoi, N., Ruchirawat, S. and Kanchanapoom, T. 2013. Glucopyranosyloxybenzyl derivatives of (R)-2-benzylmalic acid and (R)-eucomic acid, and an aromatic glucoside from the pseudobulbs of *Grammatophyllum speciosum*. Tetrahedron 69: 1031-1037.

Silva, P.A., Jacques, S.C. and Zanettini, M.H. 2000. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. Ciência Rural 30: 105-111.

Sopalun, K., Thammasiri, K. and Ishikawa, K. 2010. Effects of chitosan as the growth stimulator for *Grammatophyllum speciosum* in vitro culture. World Academy of Science, Engineering and Technology 4: 381-383.

Stang, E.J. and Weis, G.G. 1984. Influence of paclobutrazol plant growth regulator on strawberry plant growth, fruiting and runner suppression. Horticultural Science 19: 643-645.

Stover, R.H. and Simmonds, N.W. 1987. Classification of banana cultivars. In: Stover RH and Simmonds NW (ed.) Bananas, 3rd edn. Wiley, New York.

Sudeep, R., Rajeevan, P.K., Valasalakumari, P.K., Geetha, C.K., 1997. Influence of organic supplements on shoot proliferation in *Dendrobium*. Journal of Horticulture 3: 38-44.

Thammasiri, K. and Soamkul, L. 2007. Cryopreservation of *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. seeds by vitrification. ScienceAsia 33: 223–227.

Utami, E.S.W., Hariyanto, S. and Manuhara, Y.S. 2017. In vitro propagation of the endangered medicinal orchid, *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm through mature seed culture. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 7: 406-410.

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

White, P. R. 1963. The Cultivation of Animal and Plant Cells. The Ronald Press, New York, N.Y. USA.

Yang, J.F., Piao, X.C., Sun, D. and Lian, M.L. 2010. Production of protocorm-like bodies with bioreactor and regeneration in vitro of *Oncidium* 'Sugar Sweet'. Scientia Horticulturae 125: 712-717.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Vacin and Went (VW)

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
$Ca_3(PO_4)_2$	200
KNO_3	525
KH_2PO_4	250
$MgSO_4.7H_2O$	250
$(NH_4)_2SO_4$	500
$Fe_2(C_4H_4O_6)_3.2H_2O$	28
$MnSO_4.H_2O$	5.70

ที่มา: Vacin and Went (1949)