



การเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องคำด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้นทุนต่ำ

Growth and Development of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. Plantlet with Low Cost Plant Tissue Cultures Technique

กิตติศักดิ์ โชติกเดชาเดชาณรงค์^{1*} วิมลรัตน์ พจนไตรทิพย์¹ และ วาสนา ประภาเลิศ¹

¹ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพพืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50300

Kittisak Chotikadachanarong^{1*} Wimonrat Phottraithip¹ and Wasana Prapalet¹

¹Center of Excellence in Plant Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University.

Chiang Mai, 50300 Thailand

*Corresponding Author, E-mail: Kittisak_cho@cmru.ac.th

Received: 25 July 2019 | Revised: 21 December 2019 | Accepted: 26 December 2019

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์ต้นอ่อนเอื้องคำด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างง่ายโดยการนำต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Vacin and Went (VW) เป็นชุดควบคุม เปรียบเทียบกับอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างง่ายที่เตรียมจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน สูตรกิตติศักดิ์ (2558) ความเข้มข้น 0KS, 1/5KS, 2/5KS, 3/5KS, 4/5KS และ KS เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 4.9 เติมน้ำวุ้น 7 กรัมต่อลิตร นำไปต้มจนวุ้นละลาย แล้วรอให้อุณหภูมิของอาหารลดลงถึง 60 องศาเซลเซียส จึงเติมน้ำยาฟอกผ้าขาวไฮเตอร์ 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง (29.9 องศาเซลเซียส) เปรียบเทียบกับห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส รวม 14 ชุดการทดลอง ผลการทดลองพบว่าต้นอ่อนเอื้องคำที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร KS ที่อุณหภูมิห้อง ให้ความสูงเฉลี่ยของต้นอ่อน 2.20 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรมาตรฐาน คือ VW อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังมีความยาวใบเฉลี่ย 2.83 เซนติเมตร มากกว่าทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังนั้นอาหารวุ้นสูตร KS จึงสามารถนำมาใช้เพื่อขยายพันธุ์เอื้องคำทดแทนอาหารสูตร VW ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังมีขั้นตอนการเตรียมที่ง่าย อุปกรณ์ และสารเคมีที่สามารถหาซื้อได้ง่ายในท้องตลาด และมีราคาถูก นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดียวที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิแตกต่างกันยังพบว่า การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนที่อุณหภูมิห้องจะมีการเจริญเติบโตมากกว่า และทุกชุดการทดลองยังสามารถชักนำให้ต้นอ่อนเกิดรากได้ 100% ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในห้องที่ไม่ควบคุมอุณหภูมิจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับการประหยัดต้นทุนในการติดตั้งเครื่องปรับอากาศ และลดการใช้พลังงานไฟฟ้าได้มากเป็นแนวทางในการส่งเสริมให้เกษตรกรสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับพืชชนิดอื่น ๆ ได้ในอนาคต

ABSTRACT

Micropropagation of *Dendrobium chrysotoxum* plantlet by simple plant tissue culture technique were investigated. *In vitro* plantlets were cultured on Vacin and Went (VW) agar medium compared with various concentrations of 0, 1/5, 2/5, 3/5, 4/5 and full strength Kittisak (2013) agar media, media from hydroponic solutions, associated with 20 g/L sugar, 7 g/L agar and pH was adjusted to 4.9 which were sterilized with 0.5 mL/L Haiter supplementation. They were incubated in 16 h photoperiod and a light intensity of 2,000 lux at 25±2 °C compared with room temperature for 4 weeks. It was found that shoot high of plantlet cultured on KS medium with room temperature (2.33 cm) higher than VW medium with significantly. Furthermore, leaf length of this treatment (2.83 cm) also higher than all treatments with significantly. Therefore, KS medium can be used as a replacement for VW medium because it had positive effects on plant growth and development, low cost and simple preparation. Furthermore, the result indicated that room temperature promote better growth than in the controlled temperature room. All treatments cultured at room temperature showed 100% root induction. Therefore, room temperature was the cost saving alternative for plant tissue culture.

คำสำคัญ: กล้วยไม้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ต้นทุนต่ำ อาหารอย่างง่าย

Keywords: Orchid, Plant tissue culture, Low cost, Simple media

บทนำ

เอื้องคำ (*Dendrobium chrysotoxum* Lindl.) เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย ลำลูกกล้วยยาวรี ยาว 15-30 เซนติเมตร ผิวเป็นร่องตามยาวตื้น ๆ ใบ มี 2-6 ใบ รูปรีแกมขอบขนาน กว้าง 2-3.5 เซนติเมตร ยาว 8-15 เซนติเมตร ดอก สีเหลืองทอง ออกเป็นช่อใกล้ปลายยอด ยาว 15-20 เซนติเมตร ดอกบานกว้าง 2.5-3 เซนติเมตร มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ กลีบเลี้ยงรูปไข่แกมขอบขนาน กลีบดอกรูปไข่กลับ กลีบปาก แผ่เป็นแผ่นเกือบกลม มีขนนุ่มปกคลุม กลางกลีบสีเหลืองเข้ม ขอบกลีบหยักเป็นฝอยละเอียด และบิดเป็นคลื่นเล็กน้อย ชาวเหนือนิยมนำมาปลูกไว้ในบ้าน เนื่องจากเอื้องคำออกดอกเป็นช่อในช่วงฤดูร้อนเดือน กุมภาพันธ์ ถึงพฤษภาคม จึงเป็นสัญลักษณ์ของเทศกาลปีใหม่เมือง หรือเทศกาลสงกรานต์ ผู้หญิงล้านนามักนำดอกเอื้องคำมาแซมประดับเกล้าถวายผม และถวายพระเพื่อเป็นพุทธบูชา นอกจากนี้ ปัจจุบันยังมีการนำดอกเอื้องคำไปตากแห้งเพื่อนำไปทำชาดอกเอื้องคำซึ่งเป็นที่ต้องการของท้องตลาดสูง เอื้องคำจึงเป็นกล้วยไม้ที่มีความต้องการสูง สำหรับการขยายพันธุ์เอื้องคำสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การแบ่งหน่อซึ่งขยายพันธุ์ได้น้อยและใช้ระยะเวลาานอีกวิธีที่ได้รับความนิยมคือการเพาะเลี้ยงเมล็ด เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้เป็นเอ็มบริโอเปลือยไม่มีอาหารสะสมห่อหุ้ม จึงงอกได้เองยากในสภาพธรรมชาติ แต่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร

สังเคราะห์จะสามารถเจริญเติบโตได้จำนวนมาก และรวดเร็วกว่า เช่น วริศา และสุนทรีพย์ (2548) รายงานการเพาะเลี้ยงเมล็ดเอื้องคำบนอาหารสังเคราะห์สูตร New Dogashima Medium (NDM) ที่เติมน้ำต้มมันฝรั่ง 1% ร่วมกับ benzylaminopurine 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มของเอื้องคำเกิดต้นได้สูงที่สุด เช่นเดียวกับ พรทิพย์ (2557) ที่รายงานว่าสามารถเพาะเลี้ยงเมล็ดเอื้องคำบนอาหารสูตร Vacin and Went (1949) ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีขั้นตอนที่ยุงยาก และจำเป็นต้องใช้งบประมาณสูงประมาณ 3 ถึง 5 แสนบาท เนื่องจากจำเป็นต้องใช้สารเคมี และเครื่องมือราคาแพงหลายอย่าง เช่น สารเคมีในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง หม้อนึ่งความดันไอดูปลอดเชื้อสำหรับตัดเนื้อเยื่อพืช เครื่องกลั่นน้ำ และห้องควบคุมอุณหภูมิ เป็นต้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาวิธีที่จะช่วยลดต้นทุนและลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ เช่น การประยุกต์ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เตรียมจากสารเคมีที่มีราคาถูก และหาซื้อได้ง่าย โดยมีงานวิจัยของ กนกรวรรณและคณะ (2558) ซึ่งใช้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินเพื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดเอื้องกุหลาบกระเปาะเปิดโดยการเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นที่เตรียมจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 0, 1,

2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารสูตร Vacin and Went (VW) ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าทุกชุดการทดลองสามารถชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดได้ 100% ยกเว้นอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ไม่เติมสารละลายปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินซึ่งทำให้เกิดการงอกของเมล็ดเพียง 24.44% เช่นเดียวกับกิตติศักดิ์ (2558) ได้รายงานว่าอาหารวุ้นอย่างง่ายที่เตรียมจากสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ความเข้มข้น stock A และ B อย่างละ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ ม่วงเทพรัตน์ ญ่าหวาน และว่านสีทศ มีการเจริญเติบโตสูงกว่าอาหารสูตร MS นอกจากนี้ยังมีรายงานการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยการเติมน้ำยาฟอกผ้าขาวไฮเตอร์ แทนการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (กิตติศักดิ์, 2559)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องคำบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างง่ายซึ่งเตรียมจากสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินความเข้มข้นต่าง ๆ และเพื่อเปรียบเทียบผลของการเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กับการเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิห้องต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องคำในสภาพปลอดเชื้อ รวมถึงการใช้เทคนิคอย่างง่ายโดยไม่ใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ตู้ปลอดเชื้อสำหรับตัดเนื้อเยื่อพืช และเครื่องกลั่นน้ำ เพื่อเป็นแนวทางในการลดต้นทุนสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเอื้องคำ และการส่งเสริมให้เกษตรกรสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ ได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลอง คือ เอื้องคำ (*Dendrobium chrysotoxum* Lindl.) ซึ่งเก็บฝักจากกลุ่มอนุรักษ์พันธุ์กรรมกล้วยไม้พุ่มยี่ห้อยถิ่นบ้านปางไคร้ ตำบลโป่งแยง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรกิตติศักดิ์ (2558) หรือ KS (2015) ซึ่งเตรียมจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ตรา Hydrowork สูตรสำหรับผักสลัด Stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร

เท่า ๆ กัน เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 4.9 และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารโดยวิธีของ Chotikadachanarong (2013) คือ เติมหัยเตอร์ 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร ลงในอาหาร ทำการเพาะเลี้ยง ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 เดือน

2. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ชุดควบคุมเชิงบวกใช้อาหารวุ้นสูตร Vacin and Went (VW, 1949) VW ที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร (5 ช้อนชา) ปรับ pH เป็น 4.9 เติมน้ำ (ตรานางเงือก) 7 กรัมต่อลิตร (2 ช้อนชา) สำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตรทดลอง คือ อาหารสูตรกิตติศักดิ์ (2558) หรือ KS (2015) ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ OKS 1/5KS 2/5KS 3/5KS 4/5KS และ KS เตรียมโดยเติมน้ำประปา 300 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร จากนั้นเติมสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ตรา Hydrowork สูตรสำหรับผักสลัด Stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละเท่า ๆ กันคือ 0 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำประปาเป็น 1 ลิตร ปรับค่า pH เป็น 4.9 ด้วย 1 M NaOH หรือ 1 M HCl เติมน้ำ (ตรานางเงือก) 7 กรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรนำไปต้มจนวุ้นละลาย รอให้อุณหภูมิของอาหารลดลงถึง 60 องศาเซลเซียส จึงเติมน้ำยาฟอกผ้าขาวไฮเตอร์ 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร (Chotikadachanarong, 2013) เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร เทใส่ถ้วยพลาสติกใส K-RESIN (U60-90) ขนาด 3 ออนซ์ ปิดฝา รอจนวุ้นแข็งตัวแล้วจึงนำไปใช้ในการทดลอง

3. การศึกษาผลของอาหารวุ้นสูตร KS ความเข้มข้นต่าง ๆ และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องคำในสภาพปลอดเชื้อ

เตรียมตู้เนื้อเยื่อซึ่งใช้ในการทดลองนี้ใช้ตู้ปลาขนาด 20×10×12 นิ้ว ใช้แทนตู้ตัดเนื้อเยื่อพืช โดยพ่นด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ภายในตู้ และเช็ดจนทั่วก่อนใช้งาน ถาดสแตนเลสสำหรับรองตัดเนื้อเยื่อให้พ่นด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ให้ชุ่มอยู่ตลอดเวลา และอุปกรณ์สำหรับตัดเนื้อเยื่อ ได้แก่ มีดผ่าตัด และคีมคีบแซในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ก่อนและหลังการใช้งานเสมอเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ขณะใช้งานแทนการเผาด้วยเปลวไฟ จากนั้นคัดเลือกต้นอ่อนเอื้องคำในสภาพปลอดเชื้อที่มี

ความสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร มาทำการย้ายเลี้ยงภายในตู้ปลาที่เตรียมไว้แทนตู้ตัดเนื้อเยื่อพืช โดยนำต้นอ่อนไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร VW และอาหารวุ้นสูตร OKS 1/5KS 2/5KS 3/5KS 4/5KS และ KS จำนวน 1 ต้นต่อ 1 ขวดอาหาร นำไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในห้องที่เปิดหน้าต่างและมีการถ่ายเทอากาศตลอดเวลา โดยมีอุณหภูมิเฉลี่ยในระหว่างการทดลองคือเดือนสิงหาคม ถึงกันยายน พ.ศ. 2561 เท่ากับ 29.9 องศาเซลเซียส รวม 14 ชุด ๆ ละ 15 ข้ำ การทดลองทั้งหมดให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกอัตราการปนเปื้อนความสูงของยอด ความยาวใบ (วัดจากโคนใบถึงปลายใบ) และอัตราการรอดชีวิตภายหลังการย้ายออกปลูก

4. การย้ายต้นอ่อนออกปลูก

เตรียมวัสดุปลูก คือ มอสแห้ง นำมาล้างน้ำ 3 ครั้ง แล้วแช่น้ำเป็นเวลา 1 คืน ก่อนบรรจุในถ้วยพลาสติกใส ขนาด 6 ออนซ์ จากนั้นนำต้นอ่อนเอื้องคำที่ได้จากการทดลองทั้งหมดมาทำการล้างเอาวุ้นออก นำลงปลูกในวัสดุที่เตรียมไว้ ปิดฝา นำไปไว้ในโรงเรือนที่มีการพรางแสง 50% เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงเปิดฝาแล้วรดน้ำวันละ 1 ครั้ง เลี้ยงในโรงเรือนต่อไปอีก 3 สัปดาห์ บันทึกอัตราการรอดชีวิต

5. การวิเคราะห์ผล

การทดลองทั้งหมด 14 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 15 ข้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) โดยอัตราการปนเปื้อน และอัตราการรอดชีวิตภายหลังการย้ายออกปลูกแสดงผลเป็นร้อยละ ความสูงของยอด และจำนวนใบ แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวจากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัย

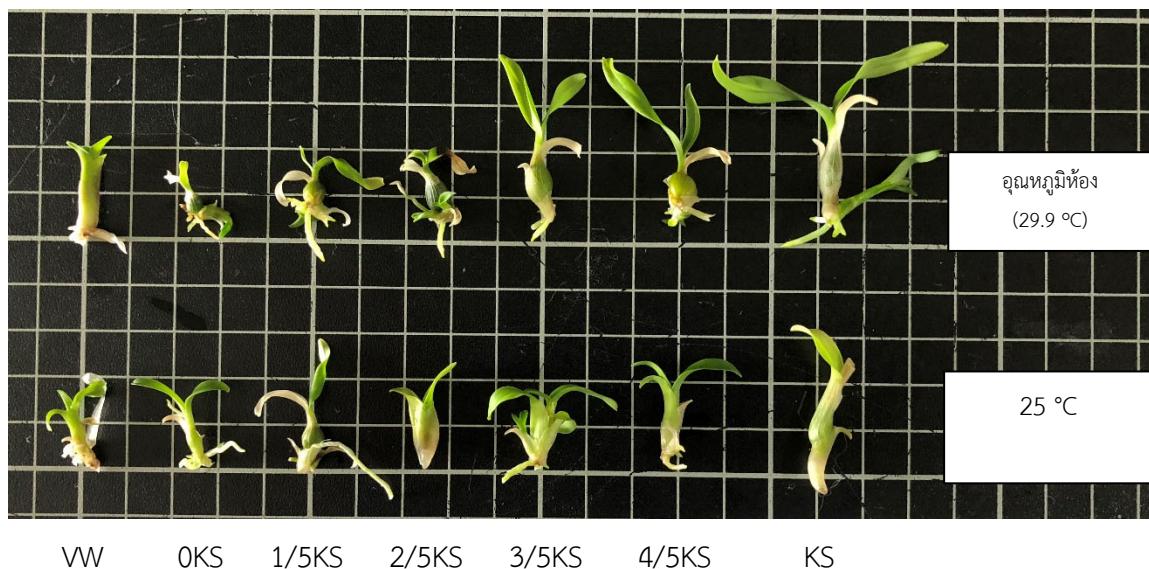
การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องคำในสภาพปลอดเชื้อที่มีความสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร บนอาหารวุ้นสูตร VW และ KS ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้องเฉลี่ย 29.9 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส รวม 14 ชุดการทดลอง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ไม่พบการปนเปื้อนของชิ้นส่วนพืชและอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ผลการทดลองแสดงว่าวิธีการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยไฮเตอร์ และการตัดย้ายเนื้อเยื่อในตู้ปลานั้นสามารถทำให้ปลอดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในส่วนของการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องคำในด้านต่าง ๆ ได้แก่ จำนวนยอด พบว่าทุกชุดการทดลองมีการสร้างยอดเฉลี่ยจำนวน 1 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และมีจำนวนใบเฉลี่ย 2 ใบต่อยอด สำหรับความสูงเฉลี่ยของยอด และความยาวใบเฉลี่ย พบว่าต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร KS ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 29.9 องศาเซลเซียส มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด คือ 2.20 เซนติเมตร ซึ่งมากกว่าชุดควบคุม คือ อาหารวุ้นสูตร VW ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิเดียวกัน และอาหารวุ้นสูตร KS ที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารวุ้นสูตร KS ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิห้องเฉลี่ย 29.9 องศาเซลเซียส สามารถชักนำให้มีความยาวใบเฉลี่ยมากที่สุด 2.83 เซนติเมตร ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ซึ่งต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดังกล่าวมีลักษณะแข็งแรง ลำต้นอวบใหญ่ ใบสีเขียวขนาดใหญ่ ดังรูปที่ 1

เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตรเดียวกันระหว่างอุณหภูมิห้องเฉลี่ย 29.9 องศาเซลเซียส กับ ที่อุณหภูมิต่ำ คือ 25 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิห้องเฉลี่ย 29.9 องศาเซลเซียส ต้นอ่อนจะมีความสูงมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนที่อุณหภูมิห้องเฉลี่ย 29.9 องศาเซลเซียส ทุกชุดการทดลองยังสามารถชักนำให้ต้นอ่อนเกิดรากได้ 100% (รูปที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงความสูงและความยาวใบเฉลี่ยของต้นอ่อนเอื้องคำภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	อุณหภูมิเฉลี่ย (°C)	ความสูงเฉลี่ย (cm±SD)	ความยาวเฉลี่ยใบ (cm±SD)
VW	29.9	1.82±0.23 ^b	0.62±0.62 ^{cde}
OKS	29.9	0.70±0.35 ^{ghi}	1.32±1.09 ^{bcd}
1/5KS	29.9	0.65±0.16 ^{hi}	0.66±0.51 ^{bcde}
2/5KS	29.9	1.00±0.08 ^{def}	0.30±0.27 ^e
3/5KS	29.9	1.27±0.22 ^{cde}	1.57±0.50 ^{bc}
4/5KS	29.9	1.93±0.40 ^{ab}	1.46±0.89 ^{bcd}
KS	29.9	2.20±0.21 ^a	2.83±0.28 ^a
VW	25	1.43±0.11 ^c	0.73±0.25 ^{bcde}
OKS	25	0.60±0.10 ⁱ	0.56±0.57 ^{de}
1/5KS	25	0.93±0.11 ^{fgh}	1.00±0.00 ^{bcde}
2/5KS	25	0.92±0.09 ^{fgh}	0.62±0.47 ^{cde}
3/5KS	25	1.00±0.10 ^{efg}	0.66±0.76 ^{bcde}
4/5KS	25	1.33±0.15 ^{cd}	1.06±0.11 ^{bcde}
KS	25	1.85±0.12 ^b	1.62±0.25 ^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสตรมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT



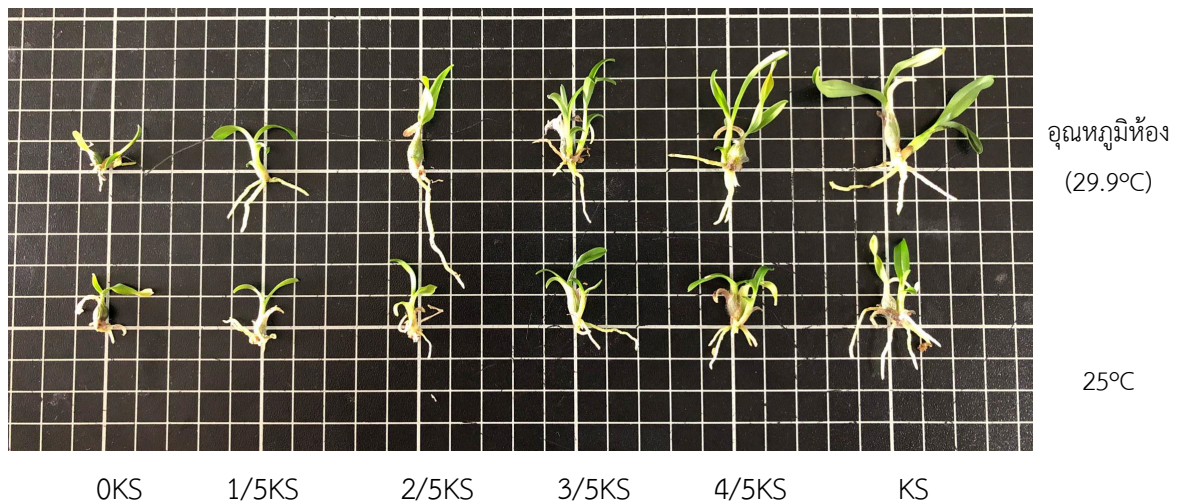
รูปที่ 1 ต้นอ่อนเอื้องคำภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การย้ายต้นอ่อนเอื้องคำที่ได้จากการทดลองทั้งหมด ออกปลูกโดยปรับสภาพในแก้วพลาสติก ดังรูปที่ 2 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงเปิดฝารดน้ำวันละ 1 ครั้ง เลี้ยงในโรงเรือนต่อไป อีก 3 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร VW ทั้งหมดมีอาการฉ่ำน้ำและตาย ในขณะที่ต้นอ่อนที่ได้

จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร KS ทุกความเข้มข้นมีอัตราการรอดชีวิต 100% มีการแตกรากใหม่จำนวนมาก ลักษณะต้นแข็งแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น KS ที่ต้นมีขนาดใหญ่กว่าชุดการทดลองอื่น ๆ (รูปที่ 3)



รูปที่ 2 การปรับสภาพต้นอ่อนเอื้องคำจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก่อนการย้ายออกปลูกในสภาพธรรมชาติ



รูปที่ 3 ต้นอ่อนเอื้องคำภายหลังการย้ายออกปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์

วิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการทดลองแสดงว่าการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารโดยการเติมไฮเตอร์ และการใช้ตู้ปลาเพื่อย้ายเนื้อเยื่อแทนตู้ปลอดเชื้อนั้นไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลานไพลินด้วยเทคนิคเดียวกัน พบว่ามีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากเทคนิคมาตรฐานเช่นกัน (กิตติศักดิ์, 2561)

สำหรับการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องคำนั้นพบว่าจะแปรผันตามความเข้มข้นของอาหารวุ้นสูตร KS ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิเดียว คือ อาหารที่มีความเข้มข้นมากกว่าจะชักนำให้ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตได้มากกว่า และอาหารวุ้นสูตร KS จึงสามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องคำแทนอาหารสูตรมาตรฐานคือ VW ได้เนื่องจากให้ความสูง และความยาวใบมากกว่า สอดคล้องกับรายงานของ กนกวรรณ กิตติศักดิ์ และ

เฉลิมศรี (2558) ที่ศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร KS ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการงอก และการเจริญเติบโตของเมล็ดเอื้องกุหลาบกระเป่าเปิด เปรียบเทียบกับอาหารสูตร Vacin and Went (VW) ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าอาหารวุ้นสูตร KS สามารถชักนำให้ต้นอ่อนที่ออกจากเมล็ดมีการเจริญเติบโตในระยะพัฒนาการที่ 6 คือ ไรโซมมีจำนวนมากขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียว ไรโซมที่ยาวจะมีลักษณะเป็นข้อ ไรโซมพัฒนาเกิดเป็นยอดดอกพันผิวอาหารขึ้นมา จำนวน 60% มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร VW จึงสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเมล็ดเอื้องกุหลาบกระเป่าเปิดทดแทนอาหารสูตร VW ได้ เนื่องจากสามารถชักนำให้ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตได้มากกว่า มีต้นทุนการเตรียมน้อยกว่า วิธีการเตรียมง่ายกว่า และยังมีรายงานการเพาะเลี้ยงเอื้องคำฝักปราบซึ่งเป็นกล้วยไม้ในจีนัส

เดียวกับเอื้องคำโดยเฉพาะเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารวุ้นสูตร VW เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ามีความยาวยอดเฉลี่ย 1.18 เซนติเมตร ซึ่งน้อยกว่าความยาวยอดของต้นอ่อนเอื้องคำในงานวิจัยนี้ (อนุพันธ์ และคณะ, 2555)

นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารวุ้นสูตร KS ยังสามารถใช้ทดแทนอาหารวุ้นสูตร MS ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อม่วงเทพรัตน์ หนุ่ยหวาน (กิตติศักดิ์, 2558) ว่านสีทศ (กิตติศักดิ์, 2559) ลานไพลิน (กิตติศักดิ์, 2561) และ พรมมิ (กิตติศักดิ์, 2562) และยังพบว่าการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องคำบนอาหารวุ้นสูตร MS (Murashiga and Skoog, 1962) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำไปใบความยาวเฉลี่ยได้เพียง 0.4 ± 0.2 เซนติเมตร (Nongdam and Tikendra, 2014)

เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตรเดียวกับระหว่างอุณหภูมิห้องเฉลี่ย 29.9 องศาเซลเซียส กับ ที่อุณหภูมิต่ำ คือ 25 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิห้องเฉลี่ย 29.9 องศาเซลเซียส ต้นอ่อนจะมีความสูงมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากเอื้องคำเป็นกล้วยไม้ที่เจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิสูงตามธรรมชาติอยู่แล้ว ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Kodym et al. (2001) ว่ากล้วย และ มันฝรั่ง ซึ่งเพาะเลี้ยงโดยใช้แสงธรรมชาติในอุณหภูมิช่วง 16-41 องศาเซลเซียส มีการเจริญเติบโตสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายชนิดสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงในช่วงกลางวันได้ถึง 30 องศาเซลเซียส และต่ำสุดในช่วงกลางคืนได้ถึง 10 องศาเซลเซียส โดยไม่ทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง (Ahloowalia and Savangikar, 2002)

การย้ายต้นอ่อนเอื้องคำออกปลูกพบว่าต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร VW ทั้งหมดมีลำต้น และใบมีอาการเหี่ยวแห้ง และตาย สาเหตุน่าจะเป็นเพราะต้นอ่อนในชุดการทดลองดังกล่าวมีรากจำนวนน้อย และสั้นมาก จึงไม่สามารถดูดน้ำและสารอาหารส่งไปยังลำต้นได้ และตายในที่สุด ผลการทดลองดังกล่าวจึงแสดงให้เห็นว่าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างง่ายอย่างง่ายสูตร KS มีประสิทธิภาพดีกว่าเทคนิคมาตรฐานสำหรับการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องคำ นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวยังใช้สารเคมีที่หาซื้อได้ง่าย มีราคาถูก คือ การใช้ธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแทนการใช้สารเคมีตามสูตร VW และ ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพงต่าง ๆ เช่น เครื่องชั่งตวง

4 ตำแหน่ง เครื่องกลั่นน้ำ หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ตู้ปลอดเชื้อสำหรับตัดเนื้อเยื่อ และเครื่องปรับอากาศ จึงทำให้งบประมาณในการลงทุนลดลงเหลือเพียงไม่ถึง 4,000 บาท ซึ่งน้อยกว่าเทคนิคมาตรฐานถึง 100 เท่า และยังลดต้นทุนค่าไฟฟ้าจากหม้อนึ่งความดันไอน้ำ และเครื่องปรับอากาศได้อย่างมาก เหมาะในการส่งเสริมให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้ หรือนำไปประยุกต์ใช้กับพืชชนิดอื่น ๆ ได้

สรุปผลการวิจัย

ต้นอ่อนเอื้องคำในสภาพปลอดเชื้อสามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหารวุ้นสูตร KS ที่เตรียมจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ชื่อทางการค้า Hydrowork สูตรสำหรับผักสลัด Stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละเท่า ๆ กันคือ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH เป็น 4.9 เติมน้ำ 7 กรัมต่อลิตร นำไปต้มจนวุ้นละลาย แล้วรอให้อุณหภูมิของอาหารลดลงถึง 60 องศาเซลเซียส จึงเติมน้ำยาฟอกผ้าขาวไฮเตอร์ 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง วิธีการดังกล่าวจึงเป็นทางเลือกในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างง่ายด้วยอุปกรณ์ และสารเคมีที่สามารถหาซื้อได้ง่ายในท้องตลาด และเป็นแนวทางในการส่งเสริมให้เกษตรกรสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับพืชชนิดอื่น ๆ ได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนการวิจัยจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ งบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 และขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ที่สนับสนุนในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ เกิดกุน, กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์, และเฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี. (2558). ผลของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินต่อการงอก และการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเป่าเปิด. ใน: การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ และนานาชาติ ครั้งที่ 6

- มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา “ก้าวสู่การวิจัยระดับโลก”. นครปฐม. 43-53.
- กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์. (2558). อาหารอย่างง่ายจากสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินเพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อม่วงเพชรต้นและหญ้าหวาน. วารสารมหาวิทยาลัยนครสวรรค์: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23(1): 74-81.
- กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์. (2559). การใช้สารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินทดแทนธาตุอาหารในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านสีทศ. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 44(1): 103-110.
- กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์. (2561). ผลของอาหารจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินและอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยน้ำว้า. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 49(1): 88-95.
- กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์. (2562). เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างง่ายและต้นทุนต่ำเพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมพรมมิ. ใน: เอกสารการประชุมวิชาการชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ครั้งที่ 9 “ทรัพยากรไทย : ชาวบ้านไทยได้ประโยชน์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน ศูนย์หนองระเวียง นครราชสีมา. 355-360.
- พรทิพย์ อติชาติ. (2557). ผลของระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับสารโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิตและลักษณะเซลล์ของโพรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องคำ. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 42(2): 372-379.
- วิศา พิลาโฮม และสุนนทิพย์ บุนนาค. (2548). การขยายพันธุ์กล้วยไม้เข็มขาวและเอื้องคำด้วยการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ วารสารวิจัย มข. (ฉบับบัณฑิตศึกษา) 5(3): 36-45.
- อนุพันธ์ กงบังเกิด, ธนากร วงษ์ศา และ แสงเดือน วรรมชาติ. (2555). ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนเอื้องคำผักปราบ (*Dendrobium ochreatum* Lindl.) ที่เลี้ยงในระบบแช่ชั่วคราว. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย 4 (ฉบับพิเศษ): 159-168.
- Ahloowalia, B. S. and Savangikar, V. A. (2002). Low cost options for tissue culture technology in developing countries. In: Proceeding of a technical meeting organized by the joint FAO/IAEA division of nuclear techniques in food and agriculture and held. Vienna. 41-43.
- Chotikadachanarong, K. (2013). Influence of commercial bleach on sterilization of Persian violet (*Exacum affine* Balf. f. ex Regel) tissue culture media. Rajabhat Journal of Science, Humanities and Social Science 14(2): 34-43.
- Kodym, A., Hollenthoner, S. and Zapata-Arias, F. A. (2001). Cost reduction in the micropropagation of banana by using tubular skylights as source for natural lighting. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 37(2): 237 – 242.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plantarum* 15: 473 – 497.
- Nongdam, P. and Tikendra, L. (2014). Establishment of an Efficient In Vitro Regeneration Protocol for Rapid and Mass Propagation of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. Using Seed Culture. *The Scientific World Journal* 2014.
- Vacin, E. and Went, F. (1949). Some pH changes in nutrient solutions. *In The Orchids Survey*. New York: Ronald Press. pp. 589-599.

