บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาการขยายพันธุ์เอื้องน้ำต้นในสภาพปลอดเชื้อ เป็นการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการขยายพันธุ์พืชชนิดนี้ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อให้ได้ต้นพืชในปริมาณมากในเวลาอันสั้น เพื่อช่วยงานอนุรักษ์พันธุกรรมของเอื้องน้ำต้นให้ยั่งยืนต่อไป โดยการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการขยายพันธุ์จากเมล็ด และจากเนื้อเยื่อกิ่งก้าน นอกจากนี้ยังได้ทดลองเบื้องต้นถึงความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูเพื่อที่จะได้ต้นพืชแฮพพลอยด์ เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ชนิดนี้ต่อไปในอนาคต ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาข้อมูลพื้นฐานอีก 2 ด้าน คือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นพืช เพื่อให้เกิดความเข้าใจในโครงสร้างและการเจริญเติบโตของต้นพืช เพื่อที่จะได้นำความรู้ที่ได้จากการติดตามสรีรวิทยาการเจริญเติบโตบางส่วนไปประกอบการศึกษาด้านการขยายพันธุ์ต้นพืชในสภาพปลอดเชื้อ ทั้งนี้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับโครงสร้างของต้น จะช่วยในการเลือกส่วนของพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงได้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตในช่วงตื่นตัว/พักตัว ส่วนการศึกษากายวิภาควิทยาของต้นพืชนั้นจะให้ประโยชน์ในแง่ของความเข้าใจระบบเนื้อเยื่อของต้นพืช ซึ่งมีส่วนข้องเกี่ยวในการติดตามพัฒนาการของเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ

ผลการศึกษาสามารถสรุป และวิจารณ์ได้ ดังนี้

1. โครงสร้างของเอื้องน้ำต้น

1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของเอื้องน้ำต้น สรุปได้ว่าเอื้องน้ำต้นมีรากเป็นรากดินระบบรากฝอย มีลำต้นแปรรูปไปเป็นลำลูกกล้วยเจริญอยู่บนดิน ลำลูกกล้วยมีสีเขียวเข้ม มีลักษณะคล้ายคนโท มีรอยคอดบริเวณกลางลำลูกกล้วย มีเยื่อของกาบใบแห้งสีเทาเงิน หรือสีน้ำตาลหรือสีทองหุ้มอยู่ด้านนอก ใบเรียงตัวแบบสลับ เส้นใบเห็นชัดเจน เรียงขนานตามความยาวของใบ มีช่อดอก 1 ช่อต่อต้น เกิดจากตาที่อยู่ส่วนฐานของลำลูกกล้วย ช่อดอกเป็นแบบช่อกระจะ ช่อโปร่ง ก้านช่อดอกตั้งตรงหรือโค้งที่ปลาย มีขนอ่อนปกคลุมตลอดทั้งก้านดอกทยอยบานจากโคนช่อไปยังปลายช่อ ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศแบบสมมาตรด้านข้าง มี 6 กลีบ ประกอบด้วยกลีบเลี้ยงด้านบน 1 กลีบ กลีบเลี้ยงด้านข้าง 2 กลีบ ส่วนกลีบดอกมี 3 กลีบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประกอบด้วยกลีบดอกด้านข้าง 2 กลีบ และกลีบปาก 1 กลีบ กลีบปากมีขนาดใหญ่ สีและลักษณะแตกต่างกัน กลางกลีบปากมีสันนูน 3 สัน มีสีแต้มกระจายอยู่ทั่วกลีบปาก เส้าเกสรมีลักษณะอ้วนสั้น ประกอบด้วย เกสรเพศเมียและเกสรเพศผู้ โดยเกสรเพศเมียมีลักษณะเป็นแอ่งอยู่ด้านล่างของเส้าเกสร เกสรเพศผู้อยู่ใต้ฝาครอบ มีกลุ่มเรณู 2 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ก้อน ฝักเป็นแบบแห้งแล้วแตก มีสีเขียวเข้ม ภายในฝักมีเมล็ดขนาดเล็กจำนวนมาก มีลักษณะคล้ายฝุ่นแป้ง มีสีเหลืองอ่อน ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้สอดคล้องกับรายงานของ จารุวรรณ (2550) และ สลิล (2549)

1.2 ลักษณะทางกายวิภาควิทยา

การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของเอื้องน้ำต้น เป็นการศึกษากับอวัยวะหรือส่วนของพืชที่จะนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ก้านช่อดอก ใบ และ ปลายยอด การศึกษาจากเนื้อเยื่อในภาคตัดขวางและภาคตัดยาวของชิ้นส่วนพืชดังกล่าว พบว่า ต้นพืชมีลักษณะทางกายวิภาควิทยา ดังต่อไปนี้

เนื้อเยื่อของลำต้นมีลักษณะคล้ายกับของกล้วยไม้ดินว่านจูงนาง และกล้วยไม้ดินช้างผสมโขลง ตามที่ศลิษา (2550) และ จารุภัทร (2549) ได้รายงานไว้ ซึ่งประกอบด้วยชั้นของเนื้อเยื่อผิวเชิงซ้อน ซึ่งมีเนื้อเยื่อผิว 1 ชั้น และเนื้อเยื่อใต้ชั้นผิวอีกหลายชั้น ในชั้นเซลล์ผิวมีเซลล์ขนรากและมีปากใบปรากฏอยู่ (จารุวรรณ, 2549) ชั้นของคอร์เทกซ์มีเซลล์รอบนอกขนาดเล็ก เซลล์ที่อยู่ลึกเข้าไปด้านใน มีขนาดใหญ่ มัดท่อลำเลียงปรากฏแบบกระจัดกระจายอยู่ทั่วคอร์เทกซ์

เนื้อเยื่อของใบประกอบด้วยระบบเนื้อเยื่อ 3 ระบบ เหมือนกับราก และลำต้น ชั้นของเนื้อเยื่อผิวมี 1 ชั้นอยู่ด้านบนใบและด้านใต้ใบ ด้านละ 1 ชั้น เนื้อเยื่อผิวด้านใต้ใบมีปากใบ มีโซฟิลล์ไม่แบ่งเป็นชั้นของแพลิเซด และสปองจี ซึ่งลักษณะนี้คล้ายคลึงกับที่พบในว่านจูงนางและช้างผสมโขลง (จารุภัทร, 2549; ศลิษา, 2550) มัดท่อลำเลียงของเส้นกลางใบมีขนาดใหญ่ ส่วนมัดท่อลำเลียงของเส้นใบย่อยมี 2 ขนาด โดยมีตำแหน่งของโฟลเอ็มอยู่ด้านเดียวกับด้านท้องใบ และไซเล็มอยู่ด้านเดียวกันกับผิวใบด้านบน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับข้อมูลของจารุวรรณ (2550) ที่ได้ศึกษาไว้

เนื้อเยื่อปลายยอดประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และเนื้อเยื่อเจริญของตาข้าง ซึ่งปรากฏที่ซอกของใบอ่อนและจุดกำเนิดใบ กลุ่มเนื้อเยื่อเจริญเหล่านี้ประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็กรูปร่างค่อนข้างกลมอยู่กันหนาแน่น เซลล์ติดสีเข้ม มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ข้างในเซลล์

ในการศึกษาเนื้อเยื่อของต้นพืชครั้งนี้ได้วิธีการในการเตรียมสไลด์ถาวรของเนื้อเยื่อในส่วนต่าง ๆ ของพืช และได้นำเทคนิคนี้ไปใช้ศึกษากับเนื้อเยื่อที่อยู่ในขวดเพาะเลี้ยงในส่วนของตัวอย่างที่ต้องการจะตรวจสอบลักษณะและพัฒนาการของของเนื้อเยื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อของกล้วยไม้นั้นเป็นวิธีที่ใช้ในการขยายพันธุ์กล้วยไม้เพื่อให้ได้ต้นในปริมาณมาก การใช้กับกล้วยไม้นั้นจำเป็นจะต้องใช้ฝักที่ยังคงเป็นฝักอ่อนมาเพาะเลี้ยง เพื่อที่จะลดปัญหาในการปนเปื้อนของเมล็ดที่อยู่ในฝัก โดยที่การใช้ฝักที่แก่เต็มที่นั้นฝักอาจจะมีรอยแตกและเชื้อโรคจากภายนอกเข้าไปปนเปื้อนภายในฝัก อีกประการหนึ่งการใช้ฝักในระยะที่ฝักยังไม่แก่และฝักยังไม่แตกนั้นเมล็ดจะยังคงอยู่ภายในฝักไม่ปลิวสูญหายไป (ครรชิต, 2547) แต่ในการเพาะเมล็ดจากฝักอ่อนนั้น มีปัจจัยหลายปัจจัยเกี่ยวข้อง ซึ่งปัจจัยที่สำคัญคือ อายุของฝักอ่อน ซึ่งมีผลโดยตรงต่ออายุของเมล็ด และความสมบูรณ์ของเมล็ด เมล็ดที่อายุน้อยเกินไปจะไม่งอก ดังนั้นจึงต้องทดลองว่า ฝักที่มีระยะการเจริญเติบโตระยะใดจึงจะเป็นฝักอ่อน ที่นำมาเพาะเลี้ยงเมล็ดได้ และปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่ง คือ การที่เมล็ดยังไม่สมบูรณ์เต็มที่นั้น สารชีวเคมีภายในเมล็ด โดยเฉพาะฮอร์โมนที่มีผลในการควบคุมการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ดนั้น อาจจะยังพัฒนาได้ไม่เต็มที่ ดังนั้นจึงต้องมีการเพิ่มสารเคมีที่จำเป็นดังกล่าวลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงด้วย ซึ่งชนิดและปริมาณของสารนั้น มักจะเฉพาะเจาะจงในพืชแต่ละชนิด จึงต้องมีการทดลองในด้านนี้ค่อนข้างมาก

ในการทดลองการเพาะเมล็ดของเอื้องน้ำต้นในสภาพปลอดเชื้อนี้เนื่องจากไม่ปรากฏว่ามีการทดสอบกับเอื้องน้ำต้นของประเทศไทยมาก่อน จึงได้วางแผนการศึกษาทดลองในขอบเขตของระดับพื้นฐานเพื่อการศึกษาเบื้องต้น ผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

การศึกษาอายุฝักที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดเป็นการนำฝักกล้วยไม้เอื้องน้ำต้นที่มีอายุ 2, 4, 6, 8 และ 10 สัปดาห์หลังการผสมเกสร มาเพาะในอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลง ก่อนที่จะนำไปเพาะได้ทดสอบลักษณะของเมล็ดที่อยู่ภายในฝักที่มีอายุต่างกันเสียก่อน พบว่าเมล็ดของฝักที่มีอายุ 6-10 สัปดาห์นั้น เมล็ดมีลักษณะที่สมบูรณ์ มีเอ็มบริโอขนาดใหญ่ ส่วนเมล็ดของฝักที่มีอายุ 2 สัปดาห์นั้น เมล็ดมีลักษณะเรียวยาว สังเกตไม่เห็นเอ็มบริโออยู่ภายในเมล็ด จึงลงความเห็นว่าเมล็ดอ่อนเกินไปสำหรับการนำมาเพาะ ส่วนเมล็ดในฝักอายุ 4 สัปดาห์นั้น เมล็ดมีลักษณะการเจริญและพัฒนามากกว่าใน 2 สัปดาห์เล็กน้อย เห็นโครงสร้างคล้ายเอ็มบริโออยู่ภายในเมล็ด

เมื่อนำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงและสังเกตผลพบว่าในภาพรวมแล้วเมล็ดที่อายุน้อยมีความงอกต่ำกว่าเมล็ดที่มีอายุมากกว่าและใช้เวลาในการงอกให้ถึงระดับที่มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดยาวนานกว่าเมล็ดที่แก่กว่า และ เมล็ดที่อ่อนเกินไปไม่สามารถงอก ผลการบันทึกการเปลี่ยนแปลงของขนาดและการพัฒนาของเอ็มบริโอในเมล็ดยังสนับสนุนผลการทดลองในทิศทางเดียวกัน คือ เมล็ดที่มีอายุฝักมากกว่ามีการเพิ่มขนาดของเอ็มบริโอขึ้นมาเรื่อย ๆ ในเวลาที่ผ่านไป และ การเปลี่ยนแปลงของเอ็มบริโอไปเป็นโปรโตคอร์มก็เกิดได้เร็วขึ้นในเมล็ดที่มีอายุฝักมากกว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดลองที่ได้ครั้งนี้ สอดคล้องกับผลการทดลองของธีรพล (2535) ที่พบว่าเอ็มบริโอที่ไม่สมบูรณ์ของรองเท้านารีเหลืองปราจีน ไม่สามารถงอกบนอาหารเพาะเลี้ยงได้และปิยะนุช (2547) ศึกษาพบว่าเมล็ดกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรจากฝักแก่ งอกเร็ว และให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูง Nagasshima (1989) รายงานการศึกษาพัฒนาการของเอ็มบริโอของกล้วยไม้ดิน *Ponerorchis graminifolia* Reichd. f. ในสภาพปลอดเชื้อ ว่าการปฏิสนธิเกิดขึ้นหลังจากการผสมเกสร 12-13 วัน หลังจากนั้นเมล็ดเจริญอย่างรวดเร็วจนมีขนาดโตเต็มที่ใน 40 วันหลังจากการผสมเกสร เมื่อนำเมล็ดมาเพาะพบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด 40% เมื่อใช้เมล็ดอายุ 35-40 วัน

2.2 ผลของ NAA และ BA ต่อการงอกของเมล็ด

การศึกษาผลของ NAA และ BA ที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดนั้นพบว่าสารทั้ง 2 ชนิด มีผลต่อการงอกของเมล็ดคือ ส่งเสริมการงอกของเมล็ด ถ้าใช้ในความเข้มข้นต่ำถึงปานกลาง แต่ถ้าใช้ในความเข้มข้นที่สูงมีผลในด้านชะลอการงอกและให้ผลด้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม และผลที่มีต่อขนาดของเอ็มบริโอในเมล็ดก็เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ทั้งนี้มีรายงานการศึกษาที่สนับสนุนผลการทดลองครั้งนี้คือ NAA สามารถเพิ่มการงอก และ/หรือการเจริญเติบโตของต้นอ่อนได้ โดยมีรายงานว่า เพิ่มการงอกของกล้วยไม้ *Bletilla* sp., *Cattleya aurantiaca, Cymbidium madidum* และ ลูกผสมของ *Paphiopedilum* ส่วนผลของไซโตไคนินมีรายงานว่า ส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ่อนหลายชนิด และ ทำให้ไมโตครอนเดรียมีขนาดใหญ่ เมื่อนำออกซินและไซโตไคนินมาใช้ร่วมกัน พบว่ามีผลทำให้เพิ่มการเจริญโดยผลที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดความเข้มข้นและสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ (Arditti and Ernst, 1993) ในขณะที่ Rasmussen (1995) รายงานว่าออกซินไม่ค่อยมีผลกับการส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดิน โดยในบางกรณีมีการงอกลดลง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเพิ่มการงอกของ *Orchis mascula* เพิ่มได้โดยใช้ไซโตไคนินชนิด BA ความเข้มข้น 0.1-0.2 มก/ล และ kinetin สามารถเพิ่มการงอกของกล้วยไม้ดินที่โดยปกติแล้วงอกยาก เช่น *Cypripedium calceolus*, *C. reginae* และ *Epipactis helleborine* ได้ ส่วน Pauw *et.al* (1995) ทดสอบไซโตไคนิน 3 ชนิด คือ BA, 2-IP และ kinetin กับกล้วยไม้ *Cypripedium candidum* โดยเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร Nortog (1973) ดัดแปลง พบว่า BA และ 2-iP ความเข้มข้น 0.8 มก/ล สามารถเพิ่มการงอกของเมล็ดเป็นต้น

3. ผลของสูตรอาหารต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู

การทดลองเลี้ยงอับเรณูบนอาหารสูตร VW และ MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชนิดคือ NAA, BA และ 2, 4-D นั้น พบว่าไม่สามารถบันทึกผลของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตได้ เนื่องจากอับเรณูไม่ตอบสนองต่อปัจจัยและไม่มีการพัฒนาตลอดการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพาะเลี้ยง ซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อเนื่องอีกมาก เนื่องจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูมีปัจจัยที่มีผลมากมาย และซับซ้อนกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่างกายมาก ทั้งปัจจัยที่เกี่ยวกับอับเรณูเองรวมทั้งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสูตรอาหารตลอดจนสภาพเพาะเลี้ยง (Kurt and Evans, 1998; Peixe *et al.*, 2004)

4. ผลของ 2, 4-D และ TDZ

4.1 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ และก้านช่อดอก

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบและก้านช่อดอกนั้น พบว่ามีปัญหาพื้นฐานเกี่ยวกับการตัดแต่งชิ้นส่วนที่จะนำไปเพาะเลี้ยง เนื่องจากพบว่าในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงนั้นเนื้อเยื่อทั้งสองแบบเกิดสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อ ซึ่งเริ่มเป็นที่บริเวณขอบของเนื้อเยื่อก่อน แล้วลามเข้าไปด้านในและทำให้เนื้อเยื่อตายในที่สุด ซึ่งเป็นลักษณะเดียวกับที่ สุมนทิพย์ (2540) กล่าวถึงและให้เหตุผลว่าเนื้อเยื่อพืช เมื่อเกิดบาดแผลสามารถสร้างสารประกอบฟีนอลขึ้นมาเพื่อให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นตาย และ เนื้อเยื่อบริเวณรอยแผลที่ตายไปแล้วนั้นจะช่วยปิดรอยแผลไม่ให้เนื้อเยื่อสูญเสียน้ำหรือเป็นตัวกันการเข้าทำลายของเชื้อโรค

4.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอด

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของเอื้องน้ำต้นบนอาหารแข็งสูตร VW ซึ่งเติม 2, 4-D และ TDZ ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน นาน 120 วัน พบว่าสามารถชักนำเนื้อเยื่อปลายยอดให้เกิดต้นอ่อนที่แตกหน่อได้ โดยที่ในกรรมวิธีที่ใช้ 2, 4-D และTDZ ที่ความเข้มข้นสูงเท่ากันคือ 2.0 มล/ล นั้น เนื้อเยื่อปลายยอดพัฒนาหน่อข้างและเพิ่มจำนวนยอดต่อต้นได้ถึง 6.2 ยอด ภายในเวลา 120 วัน

ในแง่ของการเจริญเติบโตด้านอื่นคือความสูงของต้นอ่อน จำนวนรากต่อต้น และจำนวนใบต่อต้นนั้น พบว่า 2, 4-D อย่างเดียวเข้มข้น 0.1 มล/ล ให้ค่าของการบันทึกที่ระบุไว้นั้นดีกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ ในขณะที่ TDZ อย่างเดียวทั้ง 3 กรรมวิธีให้ค่าบันทึกที่ต่ำกว่ามาก แต่อย่างไรก็ตามแม้ว่า 2, 4-D และ TDZ จะมีผลในการชักนำให้เกิดยอดและกระตุ้นการเจริญเติบโตแล้วนั้น สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 อย่างมีผลในการทำให้เนื้อเยื่อรากมีรูปร่างผิดปกติ คือ รากอวบใหญ่ สั้น บิดงอติดกันแน่นและขยายใหญ่ตรงปลายราก ทั้งนี้อาจเป็นผลที่เกิดมาจากการแบ่งตัวและการขยายขนาดของเซลล์แบบผิดปกติ ซึ่งเกิดจากผลของ 2, 4-D โดยที่หากใช้ในความเข้มข้นที่มากเกินไปจะมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในบางขั้นตอนได้ ดังกล่าวไว้โดย ราตรี (2547) และ สุมนทิพย์ (2541)

การศึกษาการขยายพันธุ์เอื้องน้ำต้นในสภาพปลอดเชื้อในครั้งนี้ พบว่าได้ข้อมูลพื้นฐานในหลาย ๆ ลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อการนำไปวางแผนการศึกษาเพื่อแก้ปัญหาบางอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่เกิดขึ้นระหว่างการทดลองครั้งนี้ ซึ่งในหลายการทดลองได้เห็นแนวโน้มที่จะพัฒนาเทคนิคเพื่อทำให้การขยายพันธุ์เอื้องน้ำต้นในสภาพปลอดเชื้อเกิดผลสำเร็จในที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved