

การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อและการศึกษาสารพิษเคมีในวุ้นเพชร์หึ่ง

เยาวลักษณ์ ฉัตรสุวรรณ

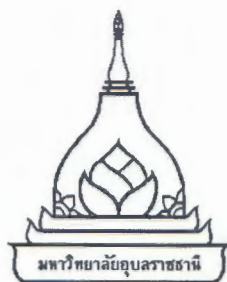
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



MICROPROPAGATION AND PHYTOCHEMICAL STUDY OF
GRAMMATOPHYLLUM SPECIOSUM BLUME

YAOWALAK CHATSUWAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
MAJOR IN AGRICULTURE
FACULTY OF AGRICULTURE
UBON RATCHATHANI UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2018
COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์

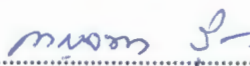
เรื่อง การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อและการศึกษาสารพิษเคมีในวุ้นเพอร์ทิง

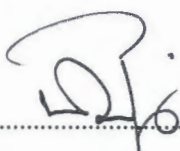
ผู้วิจัย นางสาวเยาวลักษณ์ ฉัตรสุวรรณ

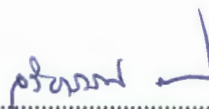
คณะกรรมการสอบ

รองศาสตราจารย์จิตราพรรณ เทียมบโยธร	ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา รุ่งรัชกานนท์	กรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร.บุญส่ง เอกพงษ์	กรรมการ
ดร.ทินน์ พรหมโชติ	กรรมการ
ดร.นิมมานรดี พรหมทอง	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา

 (รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา รุ่งรัชกานนท์)	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
 (รองศาสตราจารย์ ดร.บุญส่ง เอกพงษ์)	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
 (ดร.ทินน์ พรหมโชติ)	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม


.....
(ดร.นรินทร์ บุญพรหมณ์)
คณบดีคณะเกษตรศาสตร์


.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2561

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความรู้ และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ ที่ให้คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ รวมทั้งการเป็นแบบอย่างที่ดีแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด ตลอดจนให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการแก้ไขปัญหาตลอดระยะเวลาการทำวิจัย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ ขอกราบขอบพระคุณรอง ศาสตราจารย์ ดร.บุญส่ง เอกพงษ์ และดร.ทินน์ พรหมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้เสียสละเวลาในการให้คำแนะนำ และข้อเสนอแนะเพิ่มเติมที่เป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาค้นคว้า รวมถึงข้อคิดต่าง ๆ และช่วยตรวจสอบแก้ไข จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.จิตราพรรณ เทียมปโยธร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และดร.นิมมานรดี พรหมทอง ที่เป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ที่ให้คำแนะนำตลอดจนตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบคุณ นางหนูเพียร เพียงตน กลุ่มผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ไทย อำเภอน้ำเย็น จังหวัดอุบลราชธานี ที่อนุเคราะห์ฝักกล้วย เพชรหิิง เพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณ นักวิชาการ เกษตร และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่ช่วยเหลือทางด้าน เครื่องมือและอำนวยความสะดวกในระหว่างการทำวิจัย ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่ช่วยเหลือทางด้าน การทำวิจัย ทั้งให้คำแนะนำและ ให้กำลังใจ ตลอดมา ขอขอบคุณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยจนทำให้ประสบผลสำเร็จ

ท้ายสุดนี้ผู้วิจัย ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้กำลังใจ ส่ ่งเสริมและสนับสนุนให้มีการศึกษาที่ดี คุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากการศึกษาค้นคว้านี้ ขอมอบแด่ผู้ที่อยู่เบื้องหลังในการส่งเสริมความสำเร็จ ทั้งที่ได้กล่าวนามถึงและมิได้กล่าวนามถึงทุกท่าน และขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

เยาวลักษณ์ ฉัตรสุวรรณ

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

เรื่อง : การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อและการศึกษาสารพฤกษเคมีในวุ้นเพชรหึง
 ผู้วิจัย : เยาวลักษณ์ ฉัตรสุวรรณ
 ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
 สาขาวิชา : เกษตรศาสตร์
 อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา รุ่งรักษานนท์
 คำสำคัญ : การเพาะเมล็ด, การพัฒนาของโปรโตคอร์ม, เก็บรักษาเมล็ด, ฤทธิ์การยับยั้ง
 เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส, กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ

วิทยานิพนธ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาการขยายพันธุ์วุ้นเพชรหึงในสภาพปลอดเชื้อ ตั้งแต่การเพาะเมล็ด การพัฒนาของโปรโตคอร์มจนเป็นต้นอ่อน การนำต้นออกปลูก เพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์ด้านฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา- กลูโคซิเดส และการต้านอนุมูลอิสระ ผลการศึกษาพบว่า เมล็ดที่เพาะเลี้ยงบน อาหาร VW ที่เติมผงมันฝรั่ง + น้ำมะพร้าว และระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 0-20 ก./ล. ที่เพาะเลี้ยงในสภาพมืด /แสง เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาที่ดี ส่วนการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม พบว่า โปรโตคอร์มระยะใบ 2 ใบ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมกล้วยหอมบด+น้ำมะพร้าว และอาหารที่เติมกล้วยหอมบด+ผงมันฝรั่ง+น้ำมะพร้าว ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 10 – 30 ก./ล. มีความเหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม การศึกษาการเก็บรักษาเมล็ด พบว่า เมล็ดที่เก็บในอุณหภูมิ 25 °C สามารถเก็บรักษาได้ถึง 270 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 84.75% และมีเปอร์เซ็นต์การงอก 83.19% อีกทั้งมีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะ S5 (โปรโตคอร์มมีใบ 2 ใบ) 38.25% การศึกษากายวิภาคของเมล็ดและโปรโตคอร์มของวุ้นเพชรหึง พบว่า เอ็มบริโอมีการแบ่งเซลล์แล้วพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม โปรโตคอร์มมีการพัฒนาของกลุ่มเนื้อเยื่อเจริญ จากนั้นเนื้อเยื่อเจริญพัฒนาเป็นส่วนยอดและ มีกลุ่มท่อลำเลียง การศึกษาวัสดุปลูกที่มีความเหมาะสมต่อการย้ายออกปลูก พบว่าการใช้วัสดุปลูก คือ กาบมะพร้าวสับหรือสแฟกนัมมอส ทำให้ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตที่ดีในทุกด้าน

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสและการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของต้นที่มีอายุต่างกัน ทั้งตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง พบว่าส่วนเหง้า+ราก ของวุ้นเพชรหึง อายุ 6 ปี มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา- กลูโคซิเดส อยู่ที่ 84.88 และ 85.47% ของตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา -กลูโคซิเดสที่ 50% (IC_{50}) ที่ความเข้มข้น 443.53 ไมโคร กรัมต่อมิลลิกรัม เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Acarbose มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสคิดร้อยละ 94 และมี ค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 390.42 ไมโคร กรัมต่อมิลลิกรัม ส่วนการทดสอบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าตัวอย่างสดของต้นอายุ 6 ปี ส่วนใบและเหง้า+ราก มีการต้านอนุมูลอิสระ อยู่ที่ 77.68 และ 76.95 % ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากสารมาตรฐาน Trolox ที่มีการต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 83.85% และมีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 32.07 17.87 และ 7.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

ABSTRACT

TITLE : MICROPROPAGATION AND PHYTOCHEMICAL STUDY OF
GRAMMATOPHYLLUM SPECIOSUM BLUME
 AUTHOR : YAOWALAK CHATSUWAN
 DEGREE : MASTER OF SCIENCE
 MAJOR : AGRICULTURE
 ADVISOR : ASSOC. PROF. KARNCHANA RUNGRUCHKANONT, Ph.D
 KEYWORDS : SEED CULTURE, PROTOCORM DEVELOPMENT, SEED STORAGE,
 α -GLUCOSIDASE INHIBITION ACTIVITY, ANTIOXIDANT ACTIVITY.

This thesis aimed to study micropropagation of *Grammatophyllum speciosum* Blume. There are many steps of procedure in micropropagation such as seed culture, development of protocorm to plantlet and acclimatization. Finally, the utilization of this orchid was tested on α -Glucosidase inhibition and antioxidant activities. The studies found that seeds cultured on VW medium supplemented with potato powder + coconut water, concentration of sucrose 0-20 g/l and kept in the D/L condition, presented high percentage of seed germination and development. The study of protocorm culture found that protocorms with 2 leaves cultured on VW medium supplemented with banana homogenate + coconut water and VW medium supplemented with banana homogenate + potato powder + coconut water, and concentration of sucrose 10-30 g/l were suitable for protocorm development. In seed storage study, seed stored at 25 °C could last 270 days with 84.75% viability, 83.19 % germination and 38.25% protocorm with 2 leaves. In the histological study of seeds and protocorm, embryo presented cell division and then developed to protocorm. The protocorm consisted of groups of meristematic cells and then developed to shoot apex with vascular bundle. The study of growing media for plantlet acclimatization found that coconut husk chips or sphagnum moss were suitable for plantlet growth in all aspects. The α -Glucosidase inhibition and antioxidant activities in ethanol extracts both fresh and dry samples from different plant parts and different plant aged were determined. The extraction from 6-year old rhizome+root (both fresh and dry samples) showed strong α -Glucosidase inhibition activities (84.88, and 85.47%, respectively), whilst their half inhibition concentrations (IC_{50}) was 443.53 μ g/ml when compared with authentic drug Acarbose, which exhibited 94% inhibition activities and had IC_{50} at the concentration of 390.42 μ g/ml. The antioxidant activity was determined by DPPH radical scavenging. Extractions from

fresh samples of 6-year old leaves and 6-year old rhizome+root yielded high DPPH free radical scavenging activity (77.68 and 76.95%, respectively), which was not significantly different from trolox, the positive control (83.85%). The IC_{50} values were 32.07, 17.87 and 7.43 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	1
1.3 สมมติฐานการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ขอบเขตการศึกษา	2
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของว่านเพชรหึง	4
2.2 สรรพคุณของว่านเพชรหึง	5
2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	6
2.4 การขยายพันธุ์ว่านเพชรหึงในสภาพปลอดเชื้อ	8
2.5 กายวิภาคของโปรโตคอร์มกล้วยไม้	10
2.6 การย้ายออกปลูกนอกหลอดทดลอง	10
2.7 การตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ด	12
2.8 การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 ศึกษาองค์ประกอบอาหารและสภาพแสงต่อการงอกและพัฒนาของเมล็ด	15
3.2 ศึกษาระดับความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสและสภาพแสงต่อการงอกและ การพัฒนาของเมล็ด	16
3.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม	17
3.4 ศึกษาองค์ประกอบในอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม	18
3.5 ศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม	18
3.6 ศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ	19
3.7 ศึกษากายวิภาคของเมล็ดและโปรโตคอร์มของว่านเพชรหึง	21
3.8 ศึกษาวัสดุที่เหมาะสมต่อการย้ายออกปลูก	22

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.9 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสและวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากว่านเพชรหึง	22
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การศึกษาองค์ประกอบอาหารและสภาพแสงต่อการงอกและพัฒนาของเมล็ด	25
4.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาล และสภาพแสงต่อการงอกและพัฒนาของเมล็ด	29
4.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม	33
4.4 การศึกษาองค์ประกอบในอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม	37
4.5 การศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม	41
4.6 การศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ	44
4.7 การศึกษากายวิภาคของเมล็ดและโปรโตคอร์มของว่านเพชรหึง	55
4.8 การศึกษาวัสดุที่เหมาะสมต่อการย้ายออกปลูก	58
4.9 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสและวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากว่านเพชรหึง	60
บทที่ 5 อภิปรายผล	
5.1 ผลของสภาพแสงต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดว่านเพชรหึงในสภาพปลอดเชื้อ	65
5.2 ผลขององค์ประกอบอาหารที่เป็นสารอินทรีย์ต่อการงอก การพัฒนาของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์ม	66
5.3 ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการงอก การพัฒนาของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์ม	67
5.4 ผลของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม	68
5.5 ผลของการเก็บรักษาเมล็ดในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ	70
5.6 ผลของการศึกษากายวิภาคของเมล็ดและโปรโตคอร์มของว่านเพชรหึง	72
5.7 ผลของวัสดุที่เหมาะสมต่อการย้ายออกปลูก	72
5.8 ผลของการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสและวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากว่านเพชรหึง	74
บทที่ 6 สรุป	76
เอกสารอ้างอิง	79
ภาคผนวก	
ก ชนิดและปริมาณสารในสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	88

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ข การเตรียมสารเคมีในการศึกษากายวิภาคของพืช	90
ประวัติผู้วิจัย	92

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
4.1	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดว่านเพชรหึง บนอาหารสูตร VW ดัดแปลง ที่เติมสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาพแสงที่แตกต่างกัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	26
4.2	เปอร์เซ็นต์การพัฒนาของเมล็ดและโปรโตคอร์มว่านเพชรหึงบนอาหารสูตร VW ดัดแปลงที่เติมสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาพแสงที่แตกต่างกัน หลังเพาะ เลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	28
4.3	เปอร์เซ็นต์งอกของการงอกเมล็ดว่านเพชรหึง บนอาหารสูตร VW ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาพแสงที่แตกต่างกัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	30
4.4	เปอร์เซ็นต์การพัฒนาของเมล็ดและโปรโตคอร์มจากการเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร VW ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	31
4.5	ผลของสูตรอาหารและระยะโปรโตคอร์มต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อน หลังเพาะ เลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน	34
4.6	ผลของสูตรอาหารและระยะโปรโตคอร์มต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อน หลังเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 5 เดือน	35
4.7	การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม 2 ระยะ ที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมสารอินทรีย์ แตกต่างกัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน	38
4.8	การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม 2 ระยะ ที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมสารอินทรีย์ แตกต่างกัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	40
4.9	การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน	43
4.10	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดว่านเพชรหึงที่ทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิและ ระยะเวลาต่าง ๆ โดยวิธีการย้อมด้วยสาร TTC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	45
4.11	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดว่านเพชรหึงที่ทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิ และระยะเวลาต่าง ๆ โดยวิธีการย้อมด้วยสาร TTC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปัจจัย A; อุณหภูมิ และปัจจัย B; ระยะเวลา)	46
4.12	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดว่านเพชรหึงที่ทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิ ร่วมกับระยะเวลาต่าง ๆ โดยวิธีการย้อมด้วยสาร TTC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปัจจัยร่วมระหว่าง ปัจจัย A; อุณหภูมิ x ปัจจัย B; ระยะเวลา)	47
4.13	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดว่านเพชรหึง เมื่อนำมาเพาะในอาหารหลังจาก เก็บรักษาในอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ (ปัจจัย A; อุณหภูมิ และปัจจัย B; ระยะเวลา) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	48

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า	
4.14	เปอร์เซ็นต์การงอกและระยะเวลาในการงอกของเมล็ดว่านเพชรหึง เมื่อนำมาเพาะในอาหารหลังจากเก็บรักษาในอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ (ปัจจัยร่วมระหว่างปัจจัย A; อุณหภูมิ x ปัจจัย B; ระยะเวลา) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	49
4.15	เปอร์เซ็นต์การพัฒนาของเมล็ดว่านเพชรหึง หลังทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ (ปัจจัย A; อุณหภูมิ และปัจจัย B; ระยะเวลา) เพาะเป็นเวลาเลี้ยง 5 เดือน	50
4.16	เปอร์เซ็นต์การพัฒนาของเมล็ดว่านเพชรหึง หลังทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ (ปัจจัยร่วมระหว่าง ปัจจัย A; อุณหภูมิ x ปัจจัย B; ระยะเวลา) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	51
4.17	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดว่านเพชรหึงที่ทำการดูความขึ้นเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ โดยวิธีการย้อมด้วยสาร TTC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	54
4.18	การเจริญเติบโตของว่านเพชรหึงที่ปลูกในวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน หลังย้ายออกปลูก 3 เดือน	59
4.19	ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของว่านเพชรหึงที่มีอายุต่างกัน ที่ความเข้มข้นตัวอย่าง 1,000 µg/ml	61
4.20	ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ที่ร้อยละ 50 (IC ₅₀) ของเหง้า+ราก ต้นอายุ 6 ปี และสารมาตรฐาน Acarbose	62
4.21	กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของว่านเพชรหึงเปรียบเทียบกับตัวอย่างสดกับตัวอย่างแห้ง	63
4.22	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ร้อยละ 50 (IC ₅₀) ของส่วนใบเหง้า+ราก ต้นอายุ 6 ปี ส่วนใบของต้นอายุ 1 ปี และสารมาตรฐาน Trolox	64

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
3.1	ระยะโปรโตคอร์มที่พัฒนาจากการเพาะเมล็ดของว่านเพชรหึง หลังจากการเพาะเมล็ดเป็นเวลา 5 เดือน	17
3.2	การบรรจุเมล็ดก่อนทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ	19
3.3	ระดับการติดสีของเอ็มบริโอกล้วยไม้เพื่อประเมินความมีชีวิตด้วยสาร TTC ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	20
4.1	การงอกของเมล็ดว่านเพชรหึงที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมสารอินทรีย์แตกต่างกันและเลี้ยงในสภาพแสงที่แตกต่างกัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	27
4.2	การงอกของเมล็ดว่านเพชรหึงที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเลี้ยงในสภาพแสงที่แตกต่างกัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	32
4.3	เปอร์เซ็นต์การพัฒนาของเมล็ดและโปรโตคอร์มจากการเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร VW ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเพาะเลี้ยงในสภาพแสงที่แตกต่างกัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	33
4.4	การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม 2 ระยะ ที่เลี้ยงบนอาหาร 3 สูตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	36
4.5	การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม 2 ระยะ ที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมสารอินทรีย์แตกต่างกันหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน	39
4.6	การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม 2 ระยะ ที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมสารอินทรีย์แตกต่างกัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	41
4.7	การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม 2 ระยะ ที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมเติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน	44
4.8	การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกหุ้มเมล็ดว่านเพชรหึง หลังทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 15 วัน	45
4.9	การเพาะเลี้ยงเมล็ดว่านเพชรหึงและการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มหลังจากทำการเก็บรักษาเมล็ดในอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	53
4.10	กายวิภาคของเมล็ดว่านเพชรหึง	55
4.11	กายวิภาคของโปรโตคอร์มว่านเพชรหึงที่มีลักษณะบวมสีขาว	56
4.12	กายวิภาคของโปรโตคอร์มว่านเพชรหึงที่มีการพัฒนาเป็นสีเขียว	56
4.13	กายวิภาคของโปรโตคอร์มว่านเพชรหึงที่มีการพัฒนาเป็นยอดแหลม	57
4.14	กายวิภาคของโปรโตคอร์มว่านเพชรหึงที่มีการพัฒนาเป็นใบ 1 คู่	57
4.15	การเจริญเติบโตของว่านเพชรหึงในวัสดุปลูกต่าง ๆ หลังย้ายออกปลูกเป็นเวลา 3 เดือน	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.16	เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสของ (A) เหง้า+ราก ของต้นอายุ 6 ปี และ (B) สารมาตรฐาน Acarbose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	61
4.17	เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของ (A) ใบต้นอายุ 6 ปี (B) เหง้า+รากต้นอายุ 6 ปี (C) ใบต้นอายุ 1 ปี และ (D) สารมาตรฐาน Trolox ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	64
6.1	สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ว่านเพชรหึงในสภาพปลอดเชื้อ	78

คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ

สัญลักษณ์และอักษรย่อ	ความหมาย
ก./ล.	กรัมต่อลิตร
ชม.	ชั่วโมง
ซม.	เซนติเมตร
มม.	มิลลิเมตร
°C	องศาเซลเซียส
µg/ml	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
½ MS	Half Murashige and Skoog
cw	น้ำมะพร้าว
hb	กล้วยหอม
NDM	New Dogashima Medium
pt	ผงมันฝรั่ง
S1	ระยะการพัฒนาที่ 1 เมล็ดไม่งอก
S2	ระยะการพัฒนาที่ 2 โปรโตคอร์มที่มีลักษณะบวมสีขาว
S3	ระยะการพัฒนาที่ 3 โปรโตคอร์มที่มีการพัฒนาเป็นสีเขียว
S4	ระยะการพัฒนาที่ 4 โปรโตคอร์มมียอดแหลม
S5	ระยะการพัฒนาที่ 5 โปรโตคอร์มมีใบ 2 ใบ
VW	Vacin and Went

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ว่านเพชรหึง (*Grammatophyllum speciosum* Blume.) จัดเป็นกล้วยไม้ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก มีลักษณะที่สวยงามและโดดเด่นจึงได้รับสมญานามว่าเป็น ราชนิกกล้วยไม้ (ปฐพีชล วายุอัคคี, 2547) อีกทั้งเพชรหึงยังมีสรรพคุณทางยา เช่น เป็นยาอายุวัฒนะ แก้อาการอัมพฤกษ์จากพิษของแมงป่องต่อย (เดชา ศิริภัทร, 2552)

ว่านเพชรหึง เมื่อได้รับการผสมเกสรแล้วจะมีการติดฝัก เมื่อฝักแก่จนเกิดการแตก เมล็ดที่อยู่ภายในฝักนั้นแบนเมลิ่ จะล่องลอยตามกระแสลมแต่มีเพียงไม่กี่เมล็ดที่จะรอดชีวิตจนพัฒนาเกิดเป็นต้นใหม่ (อบฉันท ไททอง, 2547) ซึ่งอีกวิธีที่นิยมขยายพันธุ์ของ ว่านเพชรหึงคือ วิธีการแยกกอ เพราะว่านเพชรหึงเป็นกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตด้านข้าง แต่ ว่านเพชรหึงมีการเจริญเติบโตที่ช้าและขยายพันธุ์ได้ยาก อีกทั้งว่านเพชรหึงที่พบตามธรรมชาติมีจำนวนลดน้อยลงเนื่องจากมีการลักลอบเก็บต้นมาจำหน่ายซึ่งธรรมชาติของกล้วยไม้ชนิดนี้ ชอบขึ้นบนยอดไม้สูงในป่าดงดิบ ๆ กาฝาก ทำให้มีการเก็บแบบผิดวิธี คือ การโค่นไม้ใหญ่ลงมา เพื่อเก็บว่านเพชรหึงเพียงกอเดียวส่งผลให้มีโอกาสเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์สูงและมีผลกระทบต่อระบบนิเวศธรรมชาติ (ThaiPR.net, 2550) ปัจจุบันจึงได้นำเทคโนโลยีการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์กรรม และยังสอดคล้องกับโครงการ อนุรักษ์พันธุ์กรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ซึ่งการขยายพันธุ์ด้วยวิธี การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ เป็นการขยายพันธุ์ที่ได้จำนวนมากและใช้เวลาอันสั้น รวมทั้งยังเป็นการอนุรักษ์พันธุ์กรรมของพืช

โดยแนวทางการวิจัยโครงการนี้ศึกษาตั้งแต่การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ จนได้ต้นออกปลูก เพื่อนำไปสู่การศึกษาสัพพทุกษเคมีในว่านเพชรหึงที่อายุแตกต่างกัน เป็นประโยชน์ในการนำไปใช้เป็นพืชสมุนไพร จากแนวทางในการพัฒนาการขยายพันธุ์ของ ว่านเพชรหึงและศึกษาสัพพทุกษเคมี สามารถนำข้อมูลนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการสกัดสารสำคัญ ในว่านเพชรหึง เป็นการลดระยะเวลาในการปลูกเลี้ยงเพื่อให้รวดเร็วในการนำไปใช้ประโยชน์และเพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคที่เพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาการขยายพันธุ์ว่านเพชรหึงในสภาพปลอดเชื้อ ตั้งแต่การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ จนได้ต้นออกปลูกเพื่อนำไปสู่การศึกษาสัพพทุกษเคมีในว่านเพชรหึง ในเรื่องต่อไปนี

1.2.1 เพื่อศึกษาองค์ประกอบอาหาร ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และสภาพแสงต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดว่านเพชรหึงในสภาพปลอดเชื้อ

1.2.2 เพื่อศึกษาสูตรอาหาร องค์ประกอบอาหาร และระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ต่อพัฒนาของโปรโตคอร์มว่านเพชรหึงในสภาพปลอดเชื้อ

- 1.2.3 เพื่อศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาเมล็ดว่านเพชรหิ่
- 1.2.4 เพื่อศึกษากายวิภาคของเมล็ดและโปรโตคอร์มของว่านเพชรหิ่
- 1.2.5 เพื่อศึกษาวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการย้ายออกปลูกลงนอกหลอดทดลองของต้นอ่อนว่านเพชรหิ่
- 1.2.6 เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสและวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากว่านเพชรหิ่

1.3 สมมติฐานการวิจัย

- 1.3.1 อิทธิพลขององค์ประกอบอาหาร ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และสภาพแสงมีผลต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดว่านเพชรหิ่ในสภาพปลอดเชื้อ
- 1.3.2 อิทธิพลของสูตรอาหาร องค์ประกอบอาหาร และระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส มีผลต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์มว่านเพชรหิ่ในสภาพปลอดเชื้อ
- 1.3.3 อิทธิพลของอุณหภูมิและระยะเวลามีผลต่อการเก็บรักษาเมล็ดว่านเพชรหิ่
- 1.3.4 ลักษณะทางกายวิภาคของเมล็ดและโปรโตคอร์มของว่านเพชรหิ่มีความแตกต่างกัน
- 1.3.5 อิทธิพลของวัสดุปลูกมีผลต่อการย้ายออกปลูกลงนอกหลอดทดลองของต้นอ่อนว่านเพชรหิ่
- 1.3.6 ว่านเพชรหิ่มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสและมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบองค์ประกอบอาหาร ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และสภาพแสงต่อการงอกที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของเมล็ดว่านเพชรหิ่ในสภาพปลอดเชื้อ
- 1.4.2 ทราบสูตรอาหาร องค์ประกอบอาหาร และระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์มว่านเพชรหิ่ในสภาพปลอดเชื้อ
- 1.4.3 ทราบถึงอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเมล็ดว่านเพชรหิ่
- 1.4.4 ทราบถึงกระบวนการพัฒนาของเมล็ดและโปรโตคอร์มของว่านเพชรหิ่
- 1.4.5 ทราบถึงวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการย้ายออกปลูกลงนอกหลอดทดลองของต้นอ่อนว่านเพชรหิ่
- 1.4.6 ทราบถึงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสและการต้านอนุมูลอิสระจากว่านเพชรหิ่

1.5 ขอบเขตการศึกษา

งานวิจัยนี้ทำเพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการขยายพันธุ์ ว่านเพชรหิ่ ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ตั้งแต่การเพาะเมล็ด การพัฒนาของโปรโตคอร์ม การพัฒนาเป็นต้นอ่อน การอนุบาลต้นอ่อน ในโรงเรือน และศึกษาสารพฤกษเคมี โดยทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

และโรงเรียนกล้วยไม้ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ระหว่างเดือนมีนาคม 2559 ถึง
เดือนมีนาคม 2561

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของว่านเพชรหึง

สกุล *Grammatophyllum* ลักษณะทั่วไปของสกุลนี้ มีการเจริญเติบโตทางด้านข้าง (ระพีสาคริก, 2544) จะพบการกระจายพันธุ์แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (สลิล สิทธิสังจธรรม และเพชรตรีเพ็ชร, 2552) พบทั้งหมด 11 ชนิด คือ

- (1) *Grammatophyllum elegans* พบที่ ฟิจิ
- (2) *Grammatophyllum fenzlianum* พบที่ มาลากู
- (3) *Grammatophyllum kinabaluense* พบที่ บอร์เนียวเหนือ
- (4) *Grammatophyllum martae* ไม่เผยแพร่อย่างแน่ชัด
- (5) *Grammatophyllum measuresianum* พบที่ ฟิลิปปินส์
- (6) *Grammatophyllum multiflorum* พบที่ ฟิลิปปินส์
- (7) *Grammatophyllum rumphianum* พบที่ บอร์เนียว มาลากู
- (8) *Grammatophyllum schmidtianum* พบที่ มาเรียนา
- (9) *Grammatophyllum scriptum* พบที่ มาเลเซียถึงแปซิฟิกตะวันตกเฉียงใต้

(9.1) *Grammatophyllum scriptum* var. *boweri* (Papuasias to Santa Cruz Is.)

Hemicr. or cham. พบที่ ปาปัวนิวกินี และซามัว

(9.2) *Grammatophyllum scriptum* var. *scriptum* พบที่ มาเลเซียถึงแปซิฟิกตะวันตกเฉียงใต้.

(10) *Grammatophyllum speciosum* พบที่ อินโดจีนถึงหมู่เกาะโซโลมอน

(11) *Grammatophyllum stapeliiflorum* พบที่ มาเลเซียถึงนิวกินี (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2552)

ประเทศไทยพบเพียงสกุลเดียว คือ *Grammatophyllum speciosum* Blume หรือเรียกว่า ว่านเพชรหึง พบทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก โดยเฉพาะภาคใต้จะพบมากที่สุด กล้วยไม้เพชรหึง มีชื่อเรียกมากมาย เช่น ว่านหางช้าง ว่านงูเหลือม (สมบุญ ระดม และแสงเดือน อินชนบท, 2555) ชื่อสามัญคือ Tiger orchid (มลิวัลย์ พรหมรักษา, 2539) ซึ่งมาจากสีดอกที่มีลายคล้ายเสือ (นาคยา มนตรี และคณะ, 2552) ในปี ค.ศ. 1825 นักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมัน Carl Ludwig von Blume ได้ตั้งชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Grammatophyllum speciosum* มาจากภาษากรีก แปลว่า มีความสวยงาม หมายถึงดอกที่สวยงาม ส่วนที่มาของชื่อ “เพชรหึง” ในหนังสือตำรากบิลวำน ได้อธิบายว่า เมื่อดอกเพชรหึงแก่ ก้านดอกจะสลายไปคล้ายกับงูเห่า และเมื่อมีพายุใหญ่พัดมา (พายุลมเพชรหึง) คนไทยจึงตั้งชื่อกล้วยไม้ชนิดนี้ว่า “เพชรหึง” นั้นเป็นเพราะว่ามันมีความเกี่ยวข้องกับลมเพชรหึงนั่นเอง ดังที่ได้มีการอธิบายไว้ในหนังสืออักขราภิธานศรับท์ (พ.ศ.2416) ที่อธิบายไว้ว่า “เพ็ชหึง ” คือ ชื่อว่านอย่างหนึ่ง เหมือนลมเพ็ชหึงนั้น (เดชา ศิริภัทร, 2552)

มีแหล่งกำเนิดในเขตร้อนของทวีปเอเชีย (ระพี สาคริก, 2544) พบกระจายพันธุ์ที่ พม่า ไทย ลาว เวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ส่วนในประเทศไทยจะพบที่ อุทัยธานี เลย ชลบุรี ชุมพร สุราษฎร์ธานี ตรัง ในป่าผลัดใบและไม่ผลัดใบ ตามที่โล่งแจ้งแสงแดดจัด มักพบบนต้นไม้ขนาดใหญ่ที่มีความแข็งแรง ลักษณะคือ เป็นกล้วย ไม้อิงอาศัยขนาดใหญ่ที่สุดในโลก ลำต้นขนาดใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร ยาวและแข็งมาก ใบรูปแถบ มีหลายใบ ขนาด $2-2.5 \times 30-40$ เซนติเมตร ปลายแหลม ช่อดอกยาวมาก อาจยาวถึง 2 เมตร ดอกสีเหลืองและจุดสีน้ำตาลแดงจำนวนมาก กลีบเลี้ยงและกลีบดอกรูปรีแกมรูปขอบขนาน ปลาย ยกกลีบมน กลีบปากขนาดเล็ก มีหูปากทรงมนและม้วนเข้าจนปลายจรดกัน แผ่นกลีบมีสัน 3 สัน เรียงขนานกัน (สลิล สิริธิดาธรรม และเพชร ตรีเพ็ชร , 2552) ขนาดดอกบานเต็มที่ กว้างประมาณ 6-8 เซนติเมตร (ศุภลักษณ์ ภูมิคง, 2554) ออกดอกเดือนกรกฎาคม-ตุลาคม (อบฉันท ไททอง, 2551) มีรากแข็งแรงเกาะกันกลม ปลายรากจะขึ้นข้างบนหรือขึ้นข้างล่าง (มลินี อนุพันธุ์สกุล, 2530)

2.2 สรรพคุณของว่านเพชรหึง

2.2.1 ลำลูกกล้วย

2.2.1.1 ใช้ตำผสมเหล้าเอาน้ำมากินหรือนำมาฝน กับเหล้าดื่ม ส่วนกากที่เหลือเอามาใช้พอกปากแผล มีสรรพคุณมีฤทธิ์เป็นยาเย็นช่วยถอนพิษ แก้อาการอักเสบเนื่องจากถูกงูกัด ช่วยแก้พิษงูกัด พิษตะขาบ และพิษแมงป่องต่อย (เดชา ศิริภัทร, 2552)

2.2.1.2 เป็นยาอายุวัฒนะ ด้วยการใช้ลำต้นกับก้านใบนำมาหั่นบาง ๆ ล้างน้ำให้สะอาด แล้วนำมาใส่โหลดองกับเหล้าไว้ดื่ม

2.2.1.3 ใช้ฝนกับน้ำข้าวข้าวใช้ทาพอกรักษาฝี (ใช้สูตรเดียวกับยาอายุวัฒนะ)

2.2.1.4 ใช้เป็นยาบำรุง (ใช้สูตรเดียวกับยาอายุวัฒนะ)

2.2.1.5 ช่วยขับลมในลำไส้ (ใช้สูตรเดียวกับยาอายุวัฒนะ)

2.2.2 ใบ

2.2.2.1 โดยนำเอาใบมา 3 ใบ แล้วปรุงเป็นยาต้ม ใช้เป็นยาระบายอุจจาระและ รักษาโรคพิษของผู้หญิงได้ดี

2.2.3 เหง้า

ตากให้แห้งประมาณ 5-10 กรัม นำไปต้มหรือบดเป็นผงกิน หรือใช้เหง้าสดคั้นเอาแต่น้ำกิน หรือใช้เป็นยาภายนอก โดยบดเป็นผงเป่าคอหรือใช้ทา เหง้าจะมีรสขมและเย็นจัด แต่มีพิษใช้เป็นยารักษาอาการต่าง ๆ ดังนี้คือ

2.2.3.1 รักษาโรคคางทูม โดยใช้เหง้าสดประมาณ 10-15 กรัม นำไปต้มกินหลังอาการวันละ 2 เวลา รักษาอาการท้องมาน โดยใช้เหง้าสด นำมาคั้นเอาแต่น้ำกินบ่อย ๆ

2.2.3.2 รักษาอาการไอ หรืออาการหอบหืด ใช้เหง้าแห้งประมาณ 6 กรัม ม้วอั้งแห้งประมาณ 3 กรัม ชิงแห้งประมาณ 3 กรัม โสยชินแห้งประมาณ 2 กรัม ไคมีจี้แห้งประมาณ 2 กรัม จี้อว้งแห้ง 10 กรัม และลูกพุทราจีนประมาณ 4 ผล นำมาต้มรวมกันเอาแต่น้ำกิน

2.2.3.3 รักษาอาการเจ็บคอ โดยใช้เหง้าสดประมาณ 15 กรัม ผสมกับน้ำส้มสายชู ต้มคั้นเอาน้ำซุบสำลี อมกลืนแต่น้ำซุบ ๆ

2.2.3.4 รักษาฝีที่เต้านมบวมมีหนองในระยะเริ่มแรก ให้ใช้เหง้าแห้ง 1 เหง้า รากดอกไม้จีนแห้งประมาณ 10 กรัม นำมารวมกัน บดให้เป็นผง แล้วผสมน้ำผึ้งกิน

2.2.3.5 รักษาฝีประจำรอย ให้ใช้เหง้าแห้งเหลียงเคี้ยว แห้ไกว่เช่าแห้ง อย่างละเท่า ๆ กัน นำไปบดเป็นผง ผสมทำเป็นยาเม็ด กินครั้งละ 6 กรัม หลังอาหาร

2.2.3.6 รักษาอาการผื่นคันมีน้ำเหลืองที่ขาจากการทำนา ใช้เหง้าแห้ง ใส่น้ำแล้วต้มให้เดือดผสมเกลือแกงเล็กน้อย แล้วทาตามบริเวณที่เป็น ทาวันละ 2 เวลาเช้า-เย็น (นิรนาม, 2555 อ้างอิงจาก; สมบูรณ์ ระดม และแสงเดือน อินชนบท, 2555)

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือการเพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ เช่น เซลล์ โปรโทพลาสต์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหาร น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุมอุณหภูมิและแสงสว่าง (คำณูญ กาญจภูมิ, 2544) ในปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แพร่หลายทั่วโลก และมีการใช้ประโยชน์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างกว้างขวาง ความรู้เทคนิควิธีการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์, 2546)

2.3.1 องค์ประกอบของอาหาร

อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นกับความเหมาะสมต่อชนิดของพืช พันธุ์ และชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเลี้ยง (รังสฤษฎ์ กาวิตะ, 2545) อาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประกอบด้วย สารอนินทรีย์ สารอินทรีย์ คาร์โบไฮเดรต วิตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโต สารที่ทำให้อาหารแข็งตัว รวมไปถึงกรดอะมิโน สารสกัดจากธรรมชาติ (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์, 2546)

2.3.1.1 กลุ่มอนินทรีย์ ธาตุอาหารเป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวนธาตุอาหารทั้งหมดที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช สูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทุกสูตรมีธาตุอาหารเป็นองค์ประกอบพื้นฐาน โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ธาตุอาหารที่พืชต้องการมาก ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) กำมะถัน (S) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และเหล็ก (Fe) และธาตุอาหารที่พืชต้องการน้อย ได้แก่ โบรอน (B) โมลิบดีนัม (Mo) แมงกานีส (Mn) โคบอลต์ (Co) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) คลอรีน (Cl) ไอโอดีน (I) (คำณูญ กาญจภูมิ, 2544)

2.3.1.2 กลุ่มอินทรีย์ คือสารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O)

คาร์บอน โดยปกติพืชเมื่อนำมาเพาะเลี้ยง จะมีการสังเคราะห์แสงลดลง จึงจำเป็นต้องเพิ่มคาร์บอนจากแหล่งภายนอก ซึ่งได้จากน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ นิยมใช้น้ำตาลซูโครส โดยน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาล 2 โมเลกุล ประกอบด้วยฟรุกโทสกับกลูโคส ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่พืชสังเคราะห์ได้เอง โดยทั่วไปพืชจะเจริญเติบโตดีขึ้นเมื่อได้รับปริมาณน้ำตาล ที่เหมาะสม แต่การเพิ่มปริมาณน้ำตาลมากขึ้นจะลดการเจริญเติบโตลง (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง , 2540) และมีหลักฐานชี้ว่าการสร้างสารเมตาโบไลต์ (metabolites) บางชนิดในเนื้อเยื่อที่เลี้ยง เป็นผลมาจากความเข้มข้นของซูโครส (รังสฤษฎ์ กาวีตะ , 2545) ซึ่งน้ำตาลมีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2544)

วิตามิน พืชส่วนมากที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อสามารถสร้างวิตามินได้เอง แต่มีปริมาณไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงเพิ่มวิตามินลงในอาหารสังเคราะห์เพื่อให้พืชเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ เนื่องจากวิตามินทำหน้าที่เป็น coenzyme ในขบวนการต่าง ๆ วิตามินที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ ไทอามีน (thiamine, B₁) (เอกสิทธิ์ นิสยนต์, 2553) ช่วยในการเจริญเติบโตหรือการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน (รังสฤษฎ์ กาวีตะ, 2545)

กรดอะมิโน กรดอะมิโนหลายชนิดไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ยกเว้น ไกลซีน (glycine) เพราะช่วยเพิ่มการเจริญของเซลล์ ส่งเสริมการพัฒนาไปเป็นต้นของพืช (เอกสิทธิ์ นิสยนต์, 2553)

2.3.2 อาหารเสริม

สารประกอบธรรมชาติ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ส่วนใหญ่นิยมใส่สารประกอบธรรมชาติเพื่อช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งสารประกอบทางธรรมชาติที่นิยมใช้ คือ น้ำมะพร้าว มันฝรั่ง และกล้วยหอม ซึ่งในสารประกอบธรรมชาติเหล่านี้จะมีสารชีวเคมีต่าง ๆ มากมาย ทั้งวิตามิน เกลือแร่ ธาตุอาหาร รวมไปถึงที่มีคุณสมบัติของสารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น ในน้ำมะพร้าวมีสารชีวเคมีและสารต่าง ๆ ได้แก่ purine indole, acetic acid และคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด รวมทั้งฮอร์โมนไซโตไคนิน เช่น zeatin และ zeatin riboside (Letham, 1974) โดยในปี ค.ศ.1941 นักวิทยาศาสตร์ชื่อ Van Overbeek ซึ่งได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช *Datura* พบว่าน้ำมะพร้าวมีผลกระทบต่อการสร้างแคลลัสและพัฒนาเอ็มบริโอ (พรพิมล สุริยจันทร์ทอง, 2547) ในกล้วยหอมมีโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามินเอ thiamine, riboflavin, niacin, biotin วิตามินบี1 วิตามินบี2 วิตามินซี และแร่ธาตุจำนวนมาก เช่น แคลเซียม เหล็ก โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โดยเฉพาะธาตุเหล็กอยู่ในสภาพที่พืชนำไปใช้ได้ โดยกล้วยไม้สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและการเกิดรากได้ (Bamell, 1940 อ้างโดยธนาภรณ์ แซ่มเย็น , 2553) ในมันฝรั่งประกอบด้วยแป้งที่มีส่วนประกอบของ amylose และ amylopectin (Schwimmer, 1953 อ้างโดย ธนาภรณ์ แซ่มเย็น ,

2553) น้ำตาล เช่น ซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในการเจริญเติบโตของพืช (Schwimmer et al., 1954 อ้างโดย ธนาภรณ์ แซ่มเย็น , 2553) นอกจากนี้ยังมีสารพวกโพลีเอมีน (polyamine) ที่มีคุณสมบัติในการต้านการชราภาพ และยังมีบทบาทต่อ nucleic acid metabolism โดยเฉพาะมีผลต่อการเพิ่มกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในเนื้อเยื่อพืชมากขึ้นทำให้พืชมีการเจริญดีขึ้น (ธนาภรณ์ แซ่มเย็น , 2553) ดังนั้นจึงมีงานวิจัยเกี่ยวกับสารประกอบธรรมชาติ ดังนี้ ชัยชาญ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ และคณะ (2554) ศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าวปริมาตร 50, 100 และ 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ในอาหารสูตร VW เมื่อเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ ต่อการ เลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้ *Bulbophyllum affine* Lindl. พบว่า อาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 150 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด คือ 2.65 ยอด ส่วนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด คือ 3.21 เซนติเมตร

อัญชลี จาละ (2553) ศึกษาเพาะเมล็ดเพื่อพัฒนาเป็นโปรโต คอรัมของกล้วยไม้นางอ้วกสาริก เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร VW เติมน้ำสกัดมันฝรั่งความเข้มข้น 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ หรือน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่า อาหารที่เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ มีการเกิดโปรโตคอรัมสูงที่สุด

2.3.3 รุ้น

จัดเป็นพวกพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากสาหร่ายทะเล (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2544) มีมวลโมเลกุลใหญ่ หน้าที่ช่วยพยุงเนื้อเยื่อให้ตั้งอยู่ได้บนอาหาร แต่ถ้าใช้รุ้นในปริมาณที่สูง (1.0 %) จะทำให้อาหารแข็งมากจะทำให้พืชดูดอาหารไปใช้ได้ยาก และพืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เต็มที่ (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง , 2540) รุ้นละลายได้ที่อุณหภูมิประมาณ 60 – 100 องศาเซลเซียส และแข็งตัวที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2544)

2.3.4 ผงถ่าน

ผลิตจากไม้ที่ถูกคาร์บอนไนซ์ด้วยอุณหภูมิสูงควบคู่ไปกับไอน้ำ สามารถดูดแก๊สหรือช่วยดูดซับสารพิษของสารประกอบฟีนอลและเมลานิน ทำให้เกิดสภาพที่บดแสงช่วยส่งเสริมให้รากเจริญได้ดี และช่วยคงสภาพเสถียรของ pH (คำณูณ กาญจภูมิ, 2544)

2.4 การขยายพันธุ์ว่านเพชรหึงในสภาพปลอดเชื้อ

ว่านเพชรหึงมีการเจริญเติบโตที่ช้าและขยายพันธุ์ได้ยาก อีกทั้งเมล็ดกล้วยไม้ไม่มีอาหารสะสมจึงทำให้ในธรรมชาติเมล็ดมีการงอกที่น้อยมาก (ครรชิต ธรรมศิริ, 2547) จึงทำให้ไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด จึงได้นำ เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาใช้ในการ ขยายพันธุ์ มีราย งานการเพาะเลี้ยงว่านเพชรหึงในสภาพปลอดเชื้อ คือ

บุญสนอง ช่วยแก้ว และจิรณัฐ ทางมีศรี (2553) ได้ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนว่านหางช้างอายุ 12 เดือน บนอาหารดัดแปลงสูตร VW 12 สูตร คือ สูตร 1-3 ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับกล้วยหอม 100 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมและมันฝรั่งอย่างละ 50 กรัมต่อลิตร และ มันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร สูตรที่ 4-6 เหมือนสูตร 1-3 แต่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และสูตรที่ 7-12 เหมือนสูตรที่ 1-6 แต่เติมผงถ่าน 1.5 กรัมต่อลิตร ทุกสูตรพบว่า อาหารสูตรที่เติมซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับกล้วยหอม มันฝรั่ง อย่างละ 50 กรัมหรือเติมมันฝรั่งอย่างเดียว และเติมผงถ่าน 1.5 กรัมต่อลิตร ทำให้ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตดีที่สุด คือมีจำนวนใบ 9.00 ใบต่อต้น ความยาวใบ 16.44 เซนติเมตร และจำนวนราก 9.10 รากต่อต้น

Sopalun, Thammasiri and Ishikawa (2010) ได้ศึกษาการชักนำ Protocorm-like bodies (PLBs) จากปลายยอดของกล้วยไม้เพชรหึง (*Grammatophyllum speciosum*) บนอาหารเพาะเลี้ยง 3 สูตร คือ VW ½ MS และ MS ทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลว พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน อาหารสูตร ½ MS เหลว สามารถชักนำให้เกิด PLBs ได้มากที่สุด คือ 93 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความแตกต่างทางสถิติ

Pimsen and Kanchnapoom (2011) ได้เลี้ยงโปรโตคอร์มความยาว 2-4 มิลลิเมตรของกล้วยไม้ *Grammatophyllum speciosum* โดยเปรียบเทียบชนิดน้ำตาล 4 ชนิด คือ sucrose, glucose, sorbitol และ mannitol ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS เหลวที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า glucose มีการรอดชีวิตน้อยที่สุดคือ 30 เปอร์เซ็นต์ และ mannitol และ sorbitol มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรโตคอร์มมีสีเขียวและสามารถพัฒนาเป็นต้นได้

Khampa, Wangsomnuk and Wangsomnuk (2010) ศึกษาการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ *Grammatophyllum speciosum* โดยเปรียบเทียบอาหาร 5 สูตร คือ Murashige and Skoog (MS), quarter of MS (¼MS), Gamborg B5 (B5) Vacin and Went (VW) and Knodson C (KC) โดยเติมและไม่เติมผงถ่าน 0.5 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร KC ที่ไม่เติมผงถ่าน มีเมล็ดงอกเป็นโปรโตคอร์มขนาดใหญ่กว่า 1 มิลลิเมตรสูงสุด

Samala et al. (2014) ศึกษาการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ *Grammatophyllum speciosum* โดยเปรียบเทียบอาหาร 3 สูตร คือ half strength Gamborg's B-5 (½B5), New Dogashima (ND), half Murashige and Skoog (½MS) ทุกสูตรเติมถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่า อาหารสูตร ½ B5 สามารถชักนำให้เมล็ดงอกได้ดีที่สุด คือ 96.9 เปอร์เซ็นต์

อาชีเยาะห์ คาเรง และคณะ (2557) นำโปรโตคอร์มของกล้วยไม้เพชรหึง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน พบว่า อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น

1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดสูงสุด คือ 77.78 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดสูงสุดเฉลี่ย 2.67 ยอดต่อโปรโตคอร์ม

ณัชชา วิสุทธิเทพกุล (2548) ศึกษาการเพาะเมล็ดกล้วยไม้เพชราหึง โดยเปรียบเทียบ Vacin and Went (VW), Murashige and Skoog (MS), และ Knudson (Knudson C) พบว่า อาหารสูตร MS ทำให้เมล็ดกล้วยไม้เพชราหึงงอกและเจริญเติบโตได้ดี

2.5 กายวิภาคของโปรโตคอร์มกล้วยไม้

เมื่อเมล็ดกล้วยไม้มีการงอกและขยายขนาดในระยะเริ่มต้น จะมีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม (Protocorm) และโปรโตคอร์มจะมีการพัฒนาต่อไปเป็นยอดและรากของต้นอ่อน การศึกษากายวิภาคของโปรโตคอร์มจึงเป็นสิ่งสำคัญในการศึกษาการพัฒนาระยะต่าง ๆ ของกระบวนการงอกของเมล็ดกล้วยไม้จนพัฒนาเป็นต้นอ่อน Pereira et al. (2015) ได้ศึกษากายวิภาคโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Cyrtopodium glutiniferum* ในระยะการพัฒนาต่าง ๆ จากการเพาะเมล็ดด้วยวิธี Symbiotic โดยใช้ mycorrhizal fungi *Epulorhiza* spp. พบว่า เมื่อเมล็ดงอก ชั้น tegument ถูกทำลาย เอ็มบริโอมีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม โปรโตคอร์มในระยะแรก โครงสร้างประกอบไปด้วยกลุ่ม parenchyma ตามทางยาวของชั้น epidermis ต่อมาได้มีการพัฒนาในส่วน vacuolated และ rhizoids และยังพบว่า ในบริเวณกลางของโปรโตคอร์มมีการแบ่งเซลล์แบบ Mitotic อย่างรวดเร็ว เพื่อสร้างเนื้อเยื่อท่อลำเลียง

Rungruchkanont (1996) ได้ศึกษากายวิภาคของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ 2 สายพันธุ์ คือ *Aerides houlletiana* และ *Acampe rigida* พบว่า โปรโตคอร์มทั้ง 2 สายพันธุ์มีการพัฒนายอดที่แตกต่างกัน *Aerides houlletiana* พบเนื้อเยื่อเจริญมีไซโตพลาสที่หนาแน่นและมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ที่บริเวณปลายยอด แต่ *Acampe rigida* พบเนื้อเยื่อเจริญที่บริเวณปลายยอดมีการกระจายตัวห่าง ๆ

2.6 การย้ายออกปลูกนอกหลอดทดลอง

วัสดุปลูกกล้วยไม้มีความสำคัญสำหรับใช้หล่อหุ้มส่วนของราก เพื่อให้รากกล้วยไม้เกาะหรือทำให้ลำต้นตั้งตรงอยู่ได้ (นฤทธิ เจริญกิจประเสริฐ, 2550) และช่วยรักษาความชื้นและธาตุอาหารให้กับรากกล้วยไม้ (ครรชิต ธรรมศิริ, 2547) คุณสมบัติที่ดีของวัสดุปลูกกล้วยไม้ คือ (1) ใช้ได้ทนทาน (2) รากสามารถเจริญลงในวัสดุปลูกได้ดี (3) สะอาดปราศจากเชื้อโรคและสารพิษที่เป็นอันตรายต่อรากกล้วยไม้ (4) ไม่อุ้มน้ำจนแฉะ ระบายน้ำ และอากาศได้ดี (5) ใช้งานง่าย และ (6) ราคาถูก หาง่าย (กาญจนา รุ่งรักษานนท์, 2555) (7) ไม่เอื้ออำนวยเป็นที่อยู่อาศัยของศัตรูกล้วยไม้ (ระพี สาคริก, 2544)

2.6.1 ถ่าน

เป็นวัสดุที่ได้จากการเผาไม้เนื้อแข็งมีธาตุคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ ไม่มีแร่ธาตุอื่น ๆ (ครรชิต ธรรมศิริ, 2547) ถ่านไม่ย่อยสลายและมีน้ำหนักเบา ข้อดี คือ ระบายน้ำได้ดี ราคาถูก และสะดวกต่อการใช้งาน ข้อเสีย คือเนื่องจากถ่านไม่มีแร่ธาตุอื่น ๆ จำเป็นต้องใส่ปุ๋ยให้เพียงพอต่อความต้องการของต้นกล้วยไม้ (กาญจนา รุ่งรัชกานนท์, 2555)

2.6.2 เปลือกไม้

ได้มาจากการตัดต้นเปลือกไม้หรืออุตสาหกรรมไม้แปรรูป จึงมีราคาไม่แพง น้ำหนักเบา การสลายตัวช้า ไม่เก็บรักษาความชื้น (ชยพร แอคะรัจน์, 2552)

2.6.3 กาบมะพร้าวสับ

นิยมใช้ในการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้รากกิ่งอากาศ ข้อดีหาง่าย ราคาถูก และเก็บความชื้นได้ดี (ครรชิต ธรรมศิริ, 2547) นิยมใช้ในการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ส่วนใหญ่ (ครรชิต ธรรมศิริ, 2547) ข้อเสีย คือ ถ้ารดน้ำมากเกินไป กาบมะพร้าวจะอุ้มน้ำมาก และอาจทำให้รากเน่าได้ง่าย (กาญจนา รุ่งรัชกานนท์, 2555) กาบมะพร้าวย่อยสลายเร็วจึงต้องเปลี่ยนวัสดุปลูกบ่อย ๆ (ครรชิต ธรรมศิริ, 2547) มีอายุใช้งานเพียง 1-2 ปี (นฤทธิ เจริญกิจประเสริฐ, 2550)

2.6.4 สแฟกนัมมอส

สามารถดูดซับน้ำได้มากถึง 20 เท่าของน้ำหนักแห้ง (กาญจนา รุ่งรัชกานนท์, 2555) นิยมใช้กันมากในต่างประเทศโดยเฉพาะในแถบยุโรป โดยใช้สแฟกนัมมอสกับออสมันต้า เป็นเครื่องปลูกกล้วยไม้ทั้งเล็กและใหญ่ (ระพี สาคริก, 2544)

2.6.5 ขุยมะพร้าว

มีลักษณะเป็นผง นุ่ม และเบา ข้อดีคือ ดูดซับน้ำได้ดี ถ่ายเทอากาศดี มีความยืดหยุ่นดี ไม่อัดแน่นทำให้รากพืชเจริญได้ดี (ครรชิต ธรรมศิริ, 2547) นิยมใช้แทนพีทมอส เนื่องจาก พีทมอสมีราคาแพง (Orchidtropical.com, 2010)

นอกจากวัสดุปลูกที่มีความเหมาะสมต่อการย้ายออกปลูกของ วานเพชรหึงแล้ว ยังได้มีการงานการศึกษาสารชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ร่วมกับวัสดุปลูก เพื่อให้ต้นกล้วยไม้มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น เช่น อัญญา จันทรปะทิว และคณะ (2557) ได้ศึกษาการใช้สารโคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยนำต้นกล้วยไม้เพชรหึงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปแช่ในสารละลายโคโตซาน จากนั้นย้ายปลูกลงวัสดุปลูก 3 สูตร คือ (1) กาบมะพร้าว (2) กาบมะพร้าว: ถ่าน (1:1) และ (3) กาบมะพร้าวสับ: ถ่าน: อิฐทุบ (1:1:1) โดยพบว่า การแช่สารโคโตซานความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับวัสดุปลูก กาบมะพร้าวสับ : ถ่าน (1:1) มีความเหมาะสมต่อการส่งเสริมการพัฒนาของต้นกล้วยไม้เพชรหึงมากที่สุด

นาคยา มนตรี และคณะ (2552) ได้ศึกษาผลของสารพาโคลบิวทราโซลต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้เพชรหึงหลังการย้ายปลูก โดยเติมสารพาโคลบิวทราโซลที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10

มิลลิกรัมต่อลิตร ลงอาหารเพาะเลี้ยงสูตร VW + กล้วยหอม 100 กรัมต่อลิตร + มะเขือเทศ 25 กรัมต่อลิตร + มันฝรั่ง 25 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายปลูกลงบนวัสดุปลูกคือ ขุยมะพร้าว : แกลบเผา (4:1) เป็นระยะเวลา 1 เดือน จึงนำต้นย้ายปลูกลงวัสดุปลูกคือ กาบมะพร้าว : อิฐทุบ : ถ่าน (1:1:1) เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่า ต้นกล้วยไม้เพชรหึงที่ได้จากอาหารสูตร VW ที่มีการเติมสารพาโคลบิวทราโซลความเข้มข้น 4 – 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ โดยการให้สารพาโคลบิวทราโซลที่ความเข้มข้นต่ำ ช่วยให้พืชมีการสร้างคลอโรฟิลล์ มีการสะสมอาหารบริเวณโคนต้น และราก อีกทั้งช่วยให้มีการแตกกอที่ดีขึ้น (โกวิท กิตติระกุลญะนันท์ , 2543 อ้างโดย นาทยา มนตรี และคณะ, 2552)

2.7 การตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ด

วิธีการทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดโดยใช้สาร 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) เป็นสารไม่มีสี ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสารสีแดงเมื่อถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ ดีไฮโดรจีเนส ที่ เกิดจากกิจกรรมภายในของเซลล์พืช ถ้าเมล็ดยังมีชีวิตอยู่ สารนี้จะมีผลทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นมีสีแดงทับทิม ถ้าเนื้อเยื่อตายแล้ว เนื้อเยื่อจะไม่เปลี่ยนสี (Chang et al., 1999)

Samala et al. (2014) ศึกษาความมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้ *Grammatophyllum speciosum* ทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดที่ได้จากการผสมตัวเองอายุ 150 วันหลังการผสมเกสร ด้วย 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมล็ดมีความมีชีวิต 99.02 เปอร์เซ็นต์

2.8 การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

เนื่องจากปัจจุบันมีผู้ป่วยโรคเบาหวานมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งโรคเบาหวานเกิดจากเป็นภาวะที่ร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลไปใช้เป็นพลังงานได้ตามปกติ ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น เนื่องจากร่างกายมีการผลิตฮอร์โมนอินซูลินที่สร้างจากตับอ่อนไม่ได้หรือมีการสร้างลดลง

2.8.1 โรคเบาหวานแบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ

2.8.1.1 ชนิดที่ 1 ชนิดพึ่งอินซูลิน (Insulin-dependent diabetes) เซลล์ที่ตับอ่อนซึ่งทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนอินซูลินถูกทำลายไปมาก ร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลเข้าไปในเนื้อเยื่อเพื่อเผาผลาญให้เกิดพลังงานได้

2.8.1.2 ชนิดที่ 2 ชนิดไม่พึ่งอินซูลิน (Non-Insulin-dependent diabetes) ตับอ่อนของผู้ป่วยเบาหวานยังสามารถผลิตอินซูลินได้ตามปกติหรือน้อยกว่าปกติหรือมากกว่าปกติก็ได้ แต่อินซูลินที่มีอยู่ออกฤทธิ์ได้ไม่ดี

อินซูลิน คือฮอร์โมนที่สังเคราะห์และหลั่งจาก เบต้า- เซลล์ ของ Islets of Langerhans จากตับอ่อน ซึ่งเป็นตัวพาน้ำตาลกลูโคสในเลือดไปยังเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ หากขาด

ฮอร์โมนอินซูลินจะทำให้ร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลที่มีอยู่ในกระแสเลือดไปใช้ได้ การยับยั้งการเกิดโรคเบาหวานคือการทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดน้อยลง โดยการยับยั้งการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล จึงมีการยับยั้งเอนไซม์ที่ย่อยแป้งไปเป็นน้ำตาล ได้แก่ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

2.8.2 ยาชนิดเม็ดในการรับประทานในการรักษาโรคเบาหวาน

ในปัจจุบันได้มีการใช้ยาชนิดเม็ดในการรับประทานในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์เป็น 4 ประเภท ได้แก่

2.8.2.1 ยากลุ่มที่ออกฤทธิ์ทำให้น้ำตาลในเลือดต่ำ ได้แก่ ยากลุ่มซัลโฟนิลยูเรีย (Sulfonylureas) เช่น ยาอะซีโตเฮกซาไมด์ (Acetohexamide) โทลาซามิด (Tolazamide) ไกลเมพิไรด์ (Glimepiride) คลอร์โพรพาไมด์ (Chlorpropamide)

2.8.2.2 ยาในกลุ่มอินครีตินฮอร์โมน (Incretin hormones, ฮอร์โมนสร้างจากลำไส้เล็ก เพื่อกระตุ้นการหลั่งอินซูลินเมื่อมีการบริโภคอาหาร) หรือ Incretin mimetics: ได้แก่ ยากลุ่มที่ออกฤทธิ์เลียนแบบการทำงานของฮอร์โมน Glucagon เช่น ยาเอ็กซีนาไทด์ (Exenatide) และยากลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Dipeptidyl peptidase เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของน้ำตาล Glucose เช่น ยาวิลดากลิปติน (Vildagliptin)

2.8.2.3 ยากลุ่มใหม่ซึ่งเป็นยาออกฤทธิ์ควบคุมการดูดซึมกลับของน้ำตาลกลูโคสบริเวณท่อไต: ได้แก่ ยากลุ่ม Sodium - glucose Cotransporter inhibitors (SGLT2 inhibitors): เช่น ยาตาฟากลิโฟลซิน (Dapagliflozin)

2.8.2.4 ยาที่ออกฤทธิ์ด้านการเพิ่มสูงขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือด (Antihyper glycemic drugs): เช่น ยากลุ่มไบกัวไนด์ (Biguanides) เช่นยา เมทฟอร์มิน (Metformin) ยากลุ่มไธอะโซลิดีนไดโอน (Thiazolidinediones) เช่นยา ไพโอกลิตาโซน (Pioglitazone) ยากลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส เอนไซม์ยับยั้งการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในลำไส้ (Alpha - glucosidase inhibitor) เช่น ยาอะคาร์โบส (Acarbose) (พชรภัส บุญสอน, 2556) ซึ่งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส เป็นเอนไซม์ที่อยู่บริเวณผนังลำไส้เล็ก ทำหน้าที่ย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ (Johnston et al., 1994; อ้างโดย วิชิตา กล้าเวช และคณะ, 2556) การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส สามารถชะลอการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือด และชะลอการเพิ่มของระดับน้ำตาลในกระแสเลือด (วิชิตา กล้าเวช และคณะ, 2556; ปนัดดา ทินบุตร และจินดารัตน์ พิมพ์สมาน, 2554)

ในปัจจุบัน คนหันมาใส่ใจดูแลสุขภาพโดยการเลือกบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่เป็นสารประกอบจากธรรมชาติ โดยหันมาใช้ยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพจากสมุนไพรมากขึ้น แทนการพึ่งพาแผนปัจจุบันเพียงอย่างเดียว (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2546) ดังนั้นจึงมีงานวิจัยจากพืชหลากหลายชนิด ที่มีความสามารถในการยับยั้งการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กระแส

เลือด เช่น มะรุม (*Moringa oleifera* Lamk.) สกัดด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์การยับยั้งร้อยละ 50.84 (วิมลพรรณ รุ่งพรหม และคณะ, 2552) สารสกัดจากผลมะเดื่อขี้น้อยแห้ง ใบจิกนาสด ผลเนียงสด ฝักเพกาแห้ง ผลมะเดื่อกรวด และผลมะเดื่อจั่วแห้ง สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา -กลูโคซิเดส ร้อยละ 50.22, 21.12, 13.54, 8.96, 9.88 และ 5.89 ตามลำดับ (วิชุดา กล้าเวช และคณะ, 2556) ใบขนุน (*Artocarpus heterophyllus* Lam) โดยนำมา สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการยับยั้ง IC_{50} คือ 2.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (นริศรา การภักดี และภัทรวดี โตปรากอบสิน, 2557) เป็นต้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาการขยายพันธุ์ วานเพรหิง ในสภาพปลอดเชื้อแบ่งออกเป็น การทดลอง ประกอบด้วย (1) การศึกษาองค์ประกอบอาหารและสภาพแสงต่อการงอกและพัฒนาของเมล็ด (2) การศึกษาระดับความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสและสภาพแสงต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ด (3) การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (4) การศึกษาองค์ประกอบในอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (5) การศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (6) การศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ (7) การศึกษากายวิภาคของเมล็ดและโปรโตคอร์มของ วานเพรหิง (8) การศึกษาวัสดุที่เหมาะสมต่อการย้ายออกปลูก (9) การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสและวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจาก วานเพรหิง โดยมีรายละเอียดขั้นตอนการวิจัย ดังนี้

3.1 ศึกษาองค์ประกอบอาหารและสภาพแสงต่อการงอกและพัฒนาของเมล็ด

นำฝักวานเพรหิงอายุ 8 เดือน มาทำความสะอาด ตัดกลีบดอกแห้งและปลายเส้าเกสรที่ติดอยู่ ออกให้หมด จากนั้นแช่ผิวฝักโดยใช้สารละลายแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ถูรอบ ๆ ฝักให้ทั่ว นำฝักเข้าสู่ปลอดเชื้อใช้ปากคีบ คีบฝักกล้วยไม้จุ่มลงในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นำไปผ่านเปลวไฟให้เปลวไฟลุกท่วมฝักเพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวฝัก นำฝักวางลงบนจานแก้วผ้าฝักตามความยาว ใช้ปากคีบคีบเอาเมล็ดใส่ลงในขวดน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาณเมล็ดกล้วยไม้ให้ได้ 150-200 เมล็ดต่อ 20 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดเมล็ด 20 ไมโครลิตร เพาะลงบนอาหาร Vacin and Went (VW) ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 6 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร และเติมสารอินทรีย์ ได้แก่ กล้วยหอมบด 100 กรัมต่อลิตร ผงมันฝรั่ง 5 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ชนิดเดียวหรือร่วมกัน ทั้งหมด 8 สูตร คือ (1) VW (2) VW + กล้วยหอมบด (3) VW + น้ำมะพร้าว (4) VW + ผงมันฝรั่ง (5) VW + กล้วยหอมบด + น้ำมะพร้าว (6) VW + กล้วยหอมบด + ผงมันฝรั่ง (7) VW + น้ำมะพร้าว + ผงมันฝรั่ง (8) VW + กล้วยหอมบด + น้ำมะพร้าว + ผงมันฝรั่ง ทุกสูตรอาหารผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 25 นาที

แยกเลี้ยงในสภาพ แสง 2 แบบ คือ (1) ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน (แสง) (2) เก็บในที่มืด 10 สัปดาห์แล้วนำมาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน (มืด/แสง) วางแผนการทดลองแบบ 2x8 Factorial in Completely Randomized Design โดยปัจจัย A คือสภาพการให้แสง และปัจจัย B คือ

องค์ประกอบอาหาร มี 16 ทรีทเมนต์ ๆ ละ 10 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) จากนั้นนำไปเลี้ยงในท้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน การเก็บข้อมูลใช้กล้องจุลทรรศน์ Stereo นับจำนวนการงอกของเมล็ดและระยะการพัฒนารูปร่างของเมล็ดว่านเพชรหึง โดยแบ่งเป็น 5 ระยะคือ (ภาพที่ 3.1)

ระยะที่ 1 เมล็ดไม่งอก

ระยะที่ 2 โปรโตคอร์มที่มีลักษณะบวมสีขาว

ระยะที่ 3 โปรโตคอร์มที่มีการพัฒนาเป็นสีเขียว

ระยะที่ 4 โปรโตคอร์มมียอดแหลม

ระยะที่ 5 โปรโตคอร์มมีใบ 2 ใบ

3.2 ศึกษาระดับความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสและสภาพแสงต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ด

นำฝักว่านเพชรหึงอายุ 8 เดือน มาทำความสะอาด ตัดกลีบดอกแห้งและปลายเส้าเกสรที่ติดอยู่ ออกให้หมด แล้วล้างฝักให้สะอาดด้วยสบู่เหลว จากนั้นเช็ดผิวฝักโดยใช้ผ้าสีจุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ถูรอบ ๆ ฝักให้ทั่ว นำฝักเข้าสู่ปลอดเชื้อใช้ปากคีบ คีบฝักกล้วยไม้จุ่มลงในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นำไปผ่านเปลวไฟให้เปลวไฟลูกท่อมฝักเพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวฝัก นำฝักวางลงบนจานแก้วผ้า ฝักตามความยาว ใช้ปากคีบคีบเอาเมล็ดใส่ลงในขวดน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาณเมล็ดกล้วยไม้ให้ได้ 150 - 200 เมล็ดต่อ 20 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดเมล็ด 20 ไมโครลิตร โดยเพาะลงบนอาหาร Vacin and Went (VW) ดัดแปลง ที่เติมกล้วยไม้หอมบด 100 กรัมต่อลิตร ผงมันฝรั่ง 5 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ผงวุ้น 6 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร และเติมน้ำตาลซูโครสโดยแบ่งระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ออกเป็น 5 ทรีทเมนต์ 0, 10, 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 25 นาที

แยกเลี้ยงในสภาพ แสง 2 แบบ คือ (1) ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน (แสง) (2) เก็บในที่มืด 10 สัปดาห์แล้วนำมาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน (มืด/แสง) วางแผนการทดลองแบบ 2×5 Factorial in Completely Randomized Design โดยปัจจัย A คือสภาพการให้แสง และปัจจัย B คือระดับความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส มี 10 ทรีทเมนต์ ๆ ละ 10 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) จากนั้นนำไปเลี้ยงในท้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน การเก็บข้อมูลใช้กล้องจุลทรรศน์ Stereo นับจำนวนการงอกของเมล็ดและระยะการพัฒนารูปร่างของเมล็ดว่านเพชรหึงโดยแบ่งเป็น 5 ระยะคือ (ภาพที่ 3.1)

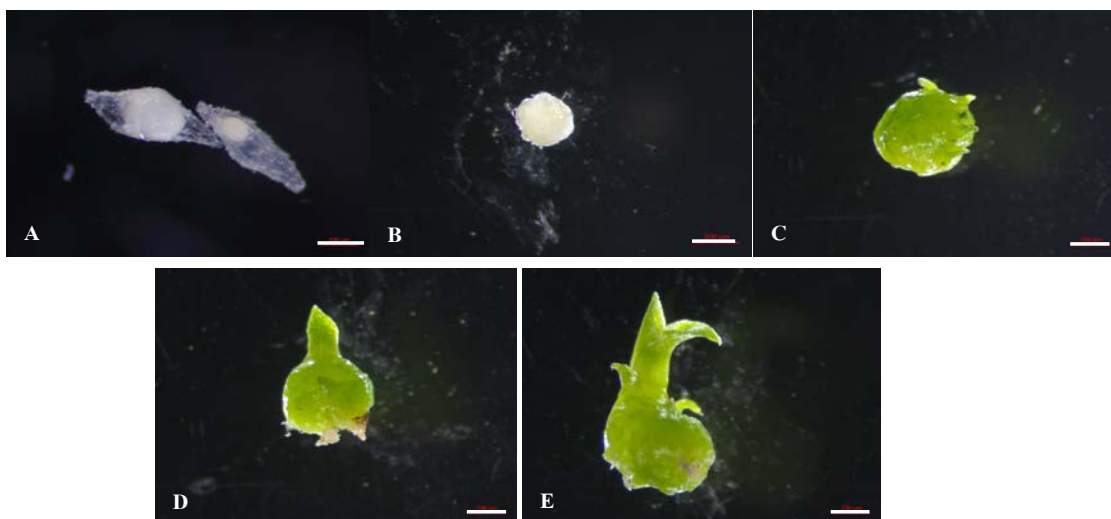
ระยะที่ 1 เมล็ดไม่งอก

ระยะที่ 2 โปรโตคอร์มที่มีลักษณะบวมสีขาว

ระยะที่ 3 โปรโตคอร์มที่มีการพัฒนาเป็นสีเขียว

ระยะที่ 4 โปรโตคอร์มมียอดแหลม

ระยะที่ 5 โปรโตคอร์มมีใบ 2 ใบ



ภาพที่ 3.1 ระยะโปรโตคอร์มที่พัฒนาจากการเพาะเมล็ดของว่านเพชรหึง หลังจากการเพาะเมล็ดเป็นเวลา 5 เดือน

(A) ระยะที่ 1 เมล็ดไม่งอก

(B) ระยะที่ 2 โปรโตคอร์มที่มีลักษณะขาวสีขาว

(C) ระยะที่ 3 โปรโตคอร์มที่มีการพัฒนาเป็นสีเขียว

(D) ระยะที่ 4 โปรโตคอร์มมียอดแหลม

(E) ระยะที่ 5 โปรโตคอร์มมีใบ 2 ใบ

3.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

นำโปรโตคอร์ม 2 ระยะ คือ ระยะยอดแหลม (ภาพที่ 3.1D) และระยะมีใบ 2 ใบ (ภาพที่ 3.1E) มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร 3 สูตร คือ สูตร Half Murashige and Skoog ($\frac{1}{2}$ MS) สูตร Vacin and Went ดัดแปลงที่เติมธาตุอาหารรองและวิตามินของสูตร Murashige and Skoog (VW) และสูตร New Dogashima Medium (NDM) ทั้ง 3 สูตรเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 25 นาที วางแผนการทดลองแบบ 2×3 Factorial in Completely Randomized Design โดยปัจจัย A คือระยะโปรโตคอร์ม และปัจจัย B คือสูตรอาหาร มี 6 ทรีทเมนต์ ทรีทเมนต์ ละ 10 ข้ำ ในแต่ละข้ำมีจำนวน 5 โปรโตคอร์ม เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีการควบคุมอุณหภูมิคือ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 2,000 lux เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกจำนวนราก

ความยาวราก เส้นผ่านศูนย์กลางราก จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ และความสูงต้น หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 และ 5 เดือน

3.4 ศึกษาองค์ประกอบในอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

นำโปรโตคอร์ม 2 ระยะ คือ ระยะยอดแหลม (ภาพที่ 3.1D) และระยะมีใบ 2 ใบ (ภาพที่ 3.1E) เพาะลงบนอาหาร Vacin and Went (VW) ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 6 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร และเติมสารอินทรีย์ ได้แก่ กล้วยหอมบด 100 กรัมต่อลิตร ผงมันฝรั่ง 5 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ชนิดเดียวหรือร่วมกัน ทั้งหมด 8 สูตร คือ (1) VW (2) VW + กล้วยหอมบด (3) VW + น้ำมะพร้าว (4) VW + ผงมันฝรั่ง (5) VW + กล้วยหอมบด + น้ำมะพร้าว (6) VW + กล้วยหอมบด + ผงมันฝรั่ง (7) VW + น้ำมะพร้าว + ผงมันฝรั่ง (8) VW + กล้วยหอมบด + น้ำมะพร้าว + ผงมันฝรั่ง นำเมล็ดที่เพาะในอาหารทั้ง 8 สูตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 25 นาที วางแผนการทดลองแบบ 2x8 Factorial in Completely Randomized Design โดยปัจจัย A คือระยะโปรโตคอร์ม และปัจจัย B คือองค์ประกอบอาหาร มี 16 ทริทเมนต์ ๆ ละ 10 ข้าง ในแต่ละข้างมีจำนวน 5 โปรโตคอร์ม เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีการควบคุมอุณหภูมิคือ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 2,000 lux เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกจำนวนราก ความยาวราก เส้นผ่านศูนย์กลางราก จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ ความสูงต้น และเส้นผ่านศูนย์กลางต้น หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

3.5 ศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

นำโปรโตคอร์ม 2 ระยะ คือ ระยะยอดแหลม (ภาพที่ 3.1D) และระยะมีใบ 2 ใบ (ภาพที่ 3.1E) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ดัดแปลง ที่เติมกล้วยหอมบด 100 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ ผงมันฝรั่ง 5 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร และเติมน้ำตาลซูโครส 5 ระดับ ความเข้มข้น คือ 0, 10, 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 25 นาที วางแผนการทดลองแบบ 2x5 Factorial in Completely Randomized Design โดยปัจจัย A คือระยะโปรโตคอร์ม และปัจจัย B คือระดับความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส มี 10 ทริทเมนต์ ๆ ละ 10 ข้าง ในแต่ละข้างมีจำนวน 5 โปรโตคอร์ม เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีการควบคุมอุณหภูมิคือ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 2,000 lux เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกจำนวนราก ความยาวราก เส้นผ่านศูนย์กลาง

ราก จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ ความสูงต้น และเส้นผ่านศูนย์กลางต้น หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

3.6 ศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

3.6.1 ศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาเมล็ดว่านเพชรหึง

นำเมล็ดว่านเพชรหึง จากฝักอายุ 8 เดือน ในสภาพปลอดเชื้อ มาทำการเก็บรักษาในหลอด เซนต์ปีทิวขนาด 1.5 มล. แล้วทำการพันปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม (ภาพที่ 3.2) แล้วห่อหุ้มด้วยถุง ซิป ล็อค PE (Polyethylene) จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่เก็บรักษา คือ 40, 25, 10, -20 และ -80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 15, 30, 90, 180, 270 และ 360 วัน จากนั้นนำเมล็ดเพชรหึง มาย้อมด้วย 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปเขย่าในเครื่องเขย่า สาร (Shaker) โดยใช้ความเร็วรอบ 5 รอบต่อนาที นาน 30 นาที แล้วบ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และศึกษาการงอกของเมล็ดโดยการ นำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร VW ดัดแปลง ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร กล้วยหอม 100 กรัมต่อลิตร มันฝรั่งผง 5 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 6 กรัมต่อลิตร และผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร บันทึกรูปภาพ โดยการนับเมล็ดที่เอนมีบริโอติสสีแดง (ภาพที่ 3.3) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปอร์เซ็นต์ การงอก และการพัฒนาของเมล็ดเป็นโปรโตคอร์ม โดยแบ่งเป็น 5 ระยะ ดังภาพที่ 3.1

วางแผนการทดลองแบบ 5x7 Factorial in Completely Randomized Design โดยปัจจัย A คือปัจจัยอุณหภูมิ ที่เก็บรักษา และปัจจัย B คือปัจจัยเวลาที่เก็บรักษา โดยการย้อมด้วยสาร TTC แต่ละทริทเมนต์มี 5 ซ้ำ และการเพาะเมล็ด มีทริทเมนต์ละ 5 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 3.2 การบรรจุเมล็ดก่อนทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ



เอ็มบริโอติดสีแดง	เอ็มบริโอติดสีแดง	เอ็มบริโอติดสีแดง	เอ็มบริโอไม่ติดสี;	เอ็มบริโอติดสี
สวย;	ปานกลาง;	เล็กน้อย;	ไม่มีชีวิต	น้ำตาล;
มีชีวิต	มีชีวิต	ไม่มีชีวิต		ไม่มีชีวิต

ภาพที่ 3.3 ระดับการติดสีของเอ็มบริโอกล้วยไม้เพื่อประเมินความมีชีวิตด้วยสาร TTC ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

3.6.2. ศึกษาผลของการดูแลและไม่ดูแลความชื้นก่อนการเก็บรักษาต่อความมีชีวิตของเมล็ดว่านเพชรหึง

นำเมล็ดจากฝักว่านเพชรหึงอายุ 8 เดือน โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ เมล็ดที่ทำการดูแลความชื้นโดยการนำเมล็ดใส่จานแก้วแล้วนำไปใส่โถดูแลความชื้นเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และเมล็ดไม่ดูแลความชื้นโดยการเก็บรักษาเมล็ดทันที จากนั้นทำการเก็บในอุณหภูมิที่ 10 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 30, 60, 90 และ 120 วัน ทำการตรวจสอบความมีชีวิตโดย นำเมล็ดเพชรหึงมาย้อมด้วย TTC 1 เปอร์เซ็นต์ และนำไปเขย่าในเครื่องเขย่าสาร (Shaker) โดยใช้ความเร็วรอบ 5 รอบต่อนาที นาน 30 นาที แล้วบ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผล โดยการนับเมล็ดที่เอ็มบริโอติดสีแดงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่เนื่องจากเมล็ดที่ไม่ดูแลความชื้นมีการเกิดเชื้อราหลังทำการเก็บรักษาเพียง 1 สัปดาห์ ในการเก็บทั้ง 2 อุณหภูมิ จึงเหลือแต่เมล็ดที่ทำการดูแลความชื้นใช้ในการทำการทดลองต่อไป

เมล็ดที่ทำการดูแลความชื้น วางแผนการทดลองแบบ 2x5 Factorial in Completely Randomized Design โดยปัจจัย A คือปัจจัยอุณหภูมิที่เก็บรักษา ปัจจัย B คือปัจจัยเวลาที่เก็บรักษา การย้อมด้วยสาร TTC แต่ละทริทเมนต์มี 5 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.7 ศึกษากายวิภาคของเมลิ็ดและโปรโตคอร์มของวุ้นเพชชิง

3.7.1 เก็บตัวอย่าง โดยแบ่งโปรโตคอร์มเป็นระยะต่าง ๆ 5 ระยะ (ภาพที่ 3.1)

3.7.1.1 เมลิ็ด

3.7.1.2 ระยะโปรโตคอร์มที่มีลักษณะบวมสีขาว

3.7.1.3 ระยะโปรโตคอร์มที่มีการพัฒนาเป็นสีเขียว

3.7.1.4 ระยะโปรโตคอร์มที่มีการพัฒนาเป็นยอดแหลม

3.7.1.5 ระยะโปรโตคอร์มที่มีการพัฒนาใบ 2 ใบ

3.7.2 การดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยแอลกอฮอล์และแทนที่น้ำภายในเซลล์ด้วย paraplax

นำชิ้นส่วนที่ได้ไปแช่ในน้ำยาฆ่าและคงสภาพเซลล์ คือ FAA 50 เปอร์เซนต์ (formalin-acetic, acid-ethyl, alcohol) จากนั้นนำชิ้นส่วนที่แช่อยู่ใน FAA 50 เปอร์เซนต์ ไปเข้าเครื่องดูดอากาศ (suction pump) เพื่อดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อ และช่วยให้น้ำยาซึมเข้าไปได้ทั่วถึง โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 1-2 ชม. หรือจนกว่าฟองอากาศจะออกหมดโดยสังเกตได้ จากที่เนื้อเยื่อจมลงก้นขวดและไม่มีฟองอากาศ ผุดขึ้นมา จากนั้นทิ้งไว้ 18 ชม. นำชิ้นส่วนไปแช่ใน TBA (tertiary butyl alcohol) ที่มีระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 5 ระดับ 50, 70, 85, 95 และ 100 เปอร์เซนต์ตามลำดับ แต่ละระดับใช้เวลา 12 ชม. การแทนที่น้ำด้วยแอลกอฮอล์ แช่ชิ้นส่วนพืชใน pure TBA 3 ครั้ง ๆ ละไม่ต่ำกว่า 12 ชม. แล้วนำไปแช่ในส่วนผสมของ pure TBA กับ paraplax ในอัตรา 1:1 นาน 36 ชม. ที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วเปลี่ยนใช้ paraplax บริสุทธิ์ที่ผ่านการหลอมตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มาแล้วไม่น้อยกว่า 12 ชม. เปลี่ยนประมาณ 3-4 ครั้ง แต่ละครั้งทิ้งไว้ในตู้อบประมาณ 12 ชม.

3.7.3 การฝังเนื้อเยื่อใน paraplax

ใช้ block ขนาดประมาณ 2.5 x 2.5 เซนติเมตร เท paraplax สำหรับฝังชิ้นส่วนพืช (embedding paraffin) ที่หลอมไว้แล้วที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยเครื่องหล่อบล็อกขึ้นเนื้อ รุ่น 1160 ลงไปให้เกือบเต็ม block รอให้ส่วนล่างของ paraplax เย็นตัว ใช้เข็มปลายแหลมที่ลนไฟจนร้อนจัดปาดผิวหน้าของ paraplax ให้เหลวอยู่ตลอดเวลา พร้อมกับใช้เข็มปลายแหลมที่ร้อนจัดเรียงชิ้นส่วนพืชให้อยู่ในแนวที่ต้องการ และเป็นการไล่ฟองอากาศออกจาก paraplax ด้วย แล้วรืบนำ block ไปลอยบนน้ำแข็ง เพื่อป้องกัน paraplax ตกผลึก เมื่อ paraplax แข็งตัวดีแล้วไปไว้ในตู้เย็น การตัดเนื้อเยื่อด้วย rotary microtome นำชิ้นส่วนพืชที่ฝังใน paraplax มาตัดแต่งเป็นสไลด์บางคางหมู แล้วตัดด้วย rotary microtome ความหนาประมาณ 8 - 12 ไมครอน จะได้แถบ paraplax (ribbon) ที่มีชิ้นส่วนพืชติดอยู่ ลอยบนน้ำอุ่นใน water bath อุณหภูมิของน้ำประมาณ 40 องศาเซลเซียส โดยน้ำกลั่น 2 ลิตร ผสมเจลาติน เล็กน้อย เพื่อ ribbon ติดกับแผ่นสไลด์ได้ ดี จากนั้นใช้แผ่นสไลด์ที่ใหม่และสะอาดซ้อน ribbon ขึ้นมาปล่อยให้แห้งแล้วนำไปเก็บไว้ 2-3 วันก่อนย้อมสี

3.7.4 ขั้นตอนการย้อมสี ด้วยสี Toluidine Blue

ผสมสี Toluidine Blue 0.5 กรัม ใน Na_2HPO_4 14.2 กรัม และ Citric acid 9.6 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 10 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แซสไลด์ที่มี ribbon ของเนื้อเยื่อพืชในถ้วยย้อมสีนาน 30 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำเปล่า 10 นาที จากนั้นฝังสไลด์บนกระดาษหนังสือพิมพ์ให้แห้งสนิท ประมาณ 1 คืน ทำการล้าง paraplant ออกด้วย Xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที หยอด permount ลงบนสไลด์แล้วปิดด้วย cover slip วางทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 12 ชม. แล้วนำไปส่องดูโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.8 ศึกษาวัสดุที่เหมาะสมต่อการย้ายออกปลูก

เลี้ยงโปรโตคอร์มวุ้นเพาะหึ่งบนอาหารสูตร Vacin and Went (VW) ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 6 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร และเติมสารอินทรีย์ ได้แก่ กล้วยหอมบด 100 กรัมต่อลิตร ผงมันฝรั่ง 5 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร ต่อลิตร โดยเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 3 เดือน เป็นเวลา 6 เดือน จนโปรโตคอร์มมีการพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่มีความสูงต้น 4.5 - 5 เซนติเมตร จำนวนใบ 5 - 6 ใบ และมีจำนวนราก 8 - 10 ราก นำต้นอ่อนออกจากขวดเพาะเลี้ยง ทำการ ล้างอาหารวุ้นออกจากรากและลำต้นให้สะอาด จากนั้นนำไปปลูกในวัสดุปลูก 5 วัสดุปลูก คือ (1) สแฟกนัมมอส (2) กาบมะพร้าวสับ (3) เปลือกไม้ (4) ถ่าน (5) ขุยมะพร้าว เลี้ยงในโรงเรือนกันฝนพรางแสง 50-70 เปอร์เซ็นต์ บันทึกข้อมูล ความสูงต้น เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ เก็บข้อมูลทุก ๆ เดือน เป็นเวลา 3 เดือน และเดือนที่ 3 เก็บข้อมูลจำนวนราก ความยาวราก และเส้นผ่านศูนย์กลางราก หลังจากเก็บข้อมูลรากแล้วทำการปลูกเลี้ยงต่อในวัสดุปลูกเดิม ทำการเก็บข้อมูลความสูงต้น เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ ในเดือนที่ 4 และ 5 หลังการย้ายออกปลูก ทรีทเมนต์ละ 10 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.9 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสและวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากวุ้นเพาะหึ่ง

การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างสด ใช้ตัวอย่างจากวุ้นเพาะหึ่งที่มีอายุต่างกัน 3 ระยะ คือ ต้นอายุ 6 ปี โดยแบ่งเป็นส่วนใบ เหง้า+ราก และลำลูกกล้วย ส่วนต้นอายุ 1 ปี และต้นในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยแบ่งเป็นส่วนใบ เหง้าและราก นำมาทำความสะอาด ผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำตัวอย่างน้ำหนัก 100 กรัม นำมาสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:5 แล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer ส่วนการเตรียมตัวอย่างแห้ง ใช้ต้นอายุ 6 ปี และต้นอายุ 1 ปี โดยแบ่งเป็นส่วนต่าง ๆ

เช่นเดียวกับตัวอย่างสด โดยนำตัวอย่างที่ทำความสะอาดแล้ว นำไปอบ โดยใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นำบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 50 กรัม นำมาสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:10

ทั้งตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง นำไปบ่มในเครื่องเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นนำตัวอย่างที่กรองเสร็จ ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง หมุนระเหย (Rotary Evaporator) จนตัวทำละลายระเหยออกหมดจนเหลือสารสกัดที่เป็นของเหลวเหนียว

3.9.1 วิธีการทดลองฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

วิธีการของ ปนัดดา ทินบุตร และจินดารัตน์ พิมพ์สมาน (2555)

นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดมา 2 มิลลิกรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (DMSO) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นละลายเอนไซม์แอลฟา- กลูโคซิเดส ความเข้มข้น 1 unit/ml และ p-nitrophenol - α -D-glucopyranoside (PNP-G) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ซึ่งเป็น substrate ใน Phosphate buffer 0.1 โมลาร์ (pH6.8) ส่วนในการทดสอบ ทำการเติม Phosphate buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์แอลฟา- กลูโคซิเดส ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และเติมตัวอย่าง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำมาผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสาร PNP-G ปริมาณ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader (Biochrom รุ่น EZ Read 400) ที่ความยาวคลื่น 405 nm โดยใช้ DMSO เป็น blank และเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Acarbose นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้ง (% inhibition) และการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) โดยใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1,000, 750, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 และ 15.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} ; คำนวณจากโปรแกรม Sigmaplot version 12) ดังสมการ 3.1

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(A \text{ blank} - A \text{ sample})}{A \text{ blank}} \times 100 \quad (3.1)$$

โดย A blank คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DMSO

A sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

3.9.2 วิธีการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity (DPPH)

วิธีการของ พรณี เคนรุ่งเรือง (2550)

นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดมาละลายด้วย absolute ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารละลายอนุมูล DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ที่ความเข้มข้น 6×10^{-5} โมลาร์ ใน absolute ethanol จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างผสมกับสารละลายอนุมูล DPPH ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที ส่วนการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) ใช้ความเข้มข้น 100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.562 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน absolute ethanol (เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานผสมกับสารละลายอนุมูล DPPH ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที เช่นเดียวกันกับตัวอย่าง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (PG Instruments รุ่น T60 UV/VIS) ที่ความยาวคลื่น 515 nm คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) โดยใช้ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.562 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} ; คำนวณจากโปรแกรม Sigmaplot version 12) จากสมการ 3.2

$$\text{DPPH radical - scavenging activity (\%)} = \frac{(A \text{ blank} - A \text{ sample})}{A \text{ blank}} \times 100 \quad (3.2)$$

โดย A blank คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

A sample คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างผสมกับสารละลาย DPPH

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การศึกษาองค์ประกอบอาหารและสภาพแสงต่อการงอกและพัฒนาของเมล็ด

ปัจจัยแสงมีผลต่อการงอกของเมล็ด วานเพชรหึง พบว่าเมล็ด วานเพชรหึง ที่เพาะเลี้ยงในที่มืด 10 สัปดาห์ แล้วให้แสง 10 สัปดาห์ (มืด/แสง) มีเปอร์เซ็นต์การงอกมากกว่าเมล็ดที่เพาะเลี้ยงในที่มืด แสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปัจจัยองค์ประกอบอาหารมีผลทำให้เมล็ดงอกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวเพียงอย่างเดียว อาหารที่เติมกล้วยหอมบด รวมกับผงมันฝรั่ง อาหารที่เติมกล้วยหอมบดร่วมกับน้ำมะพร้าว และอาหารที่เติมผงมันฝรั่งร่วมกับน้ำมะพร้าว มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ดีไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีการงอก 65-69 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1) ปัจจัยร่วมระหว่างสภาพแสงและองค์ประกอบอาหารมีผลต่อการงอกของเมล็ด โดยเมล็ดที่เพาะในอาหารที่เติมกล้วยหอมบดร่วมกับผงมันฝรั่ง อาหารที่เติมกล้วยหอมบดร่วมกับน้ำมะพร้าว และอาหารที่เติมผงมันฝรั่งร่วมกับน้ำมะพร้าว ในสภาพมืด/แสง ส่งเสริมให้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกดีที่สุด โดยมีการงอก 90-94 เปอร์เซ็นต์ ตารางที่ 4.1 และ ภาพที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การออกของเมล็ดว่านเพชรหึง บนอาหารสูตร VW ดัดแปลง ที่เติม สารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาพแสงที่แตกต่างกัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

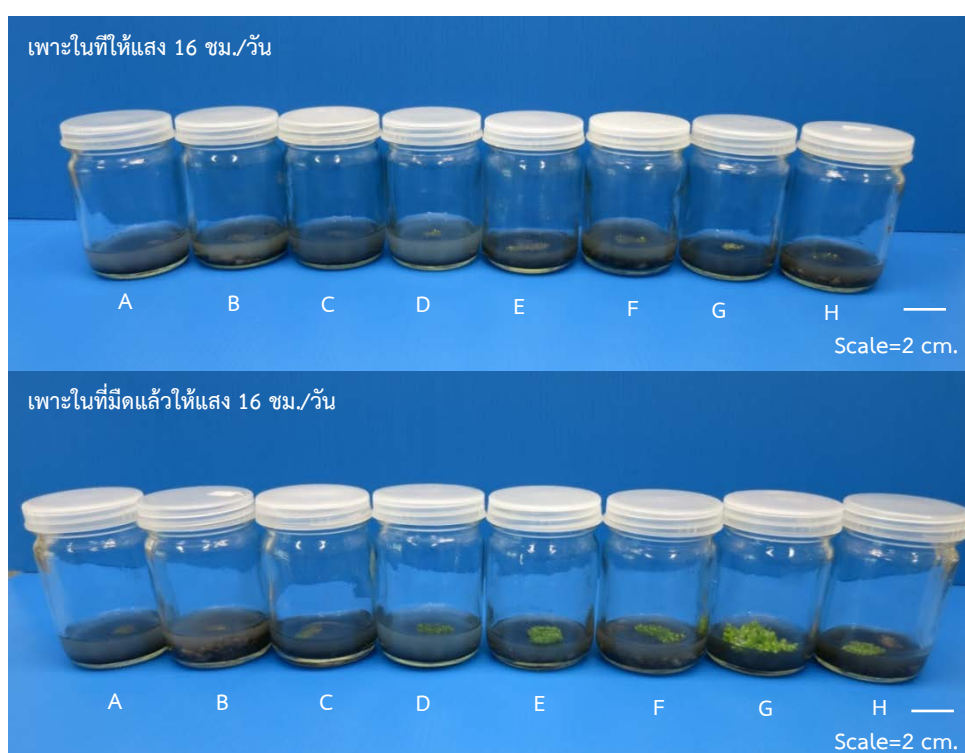
ปัจจัย		เปอร์เซ็นต์การออก
ระดับปัจจัย		
สภาพแสง	มืด/แสง	79.03 ^a
	แสง	32.65 ^b
T-test		**
องค์ประกอบอาหาร	VW	39.96 ^c
	VW+hb	39.28 ^c
	VW+pt	42.64 ^c
	VW+cw	67.05 ^a
	VW+hb+pt	66.56 ^a
	VW+hb+cw	65.02 ^{ab}
	VW+pt+cw	69.24 ^a
	VW+hb+pt+cw	58.99 ^b
F-test		**
สภาพแสง*องค์ประกอบอาหาร	มืด/แสง * VW	54.20 ^d
	มืด/แสง * VW+hb	56.26 ^d
	มืด/แสง * VW+pt	71.42 ^c
	มืด/แสง * VW+cw	86.56 ^b
	มืด/แสง * VW+hb+pt	90.71 ^a
	มืด/แสง * VW+hb+cw	92.88 ^a
	มืด/แสง * VW+pt+cw	94.42 ^a
	มืด/แสง * VW+hb+pt+cw	85.80 ^b
	แสง * VW	21.71 ⁱ
	แสง * VW+hb	22.29 ⁱ
	แสง * VW+pt	13.85 ^j
	แสง * VW+cw	47.54 ^e
	แสง * VW+hb+pt	42.42 ^f
	แสง * VW+hb+cw	37.15 ^g
	แสง * VW+pt+cw	44.07 ^{ef}
	แสง * VW+hb+pt+cw	32.18 ^h
F-test		**
CV.%		11.40

(hb) กล้วยหอมบด (pt) ผงมันฝรั่ง (cw) น้ำมะพร้าว

**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$

ด้านการพัฒนาของเมล็ดและโปรโตคอร์ม พบว่า ปัจจัยสภาพแสงมีผลต่อการพัฒนาโดยเมล็ดที่เพาะในที่มีด 10 สัปดาห์ แล้วให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน (มืด/แสง) มีผลทำให้โปรโตคอร์มพัฒนาอยู่ในระยะเป็นสีเขียว (S3) มียอดแหลม (S4) และมีใบ 2 ใบ (S5) ได้ดีกว่าการเพาะโดยได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน (แสง) (ตารางที่ 2) ปัจจัยด้านองค์ประกอบของอาหารและปัจจัยร่วมระหว่างสภาพแสงและองค์ประกอบอาหารมีผลต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม โดยพบว่า อาหารที่เติมผงมันฝรั่งร่วมกับน้ำมะพร้าว มีการพัฒนาของโปรโตคอร์มจนถึงระยะใบ 2 ใบ (S5) สูงที่สุด 39 เปอร์เซ็นต์ และเมื่ออยู่ในสภาพมืด/แสง จะส่งเสริมให้มีการพัฒนาของโปรโตคอร์มมีใบ 2 ใบ (S5) ได้สูงที่สุด 69 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2)



ภาพที่ 4.1 การงอกของเมล็ดว่านเพชรหึงที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมสารอินทรีย์แตกต่างกันและเลี้ยงในสภาพแสงที่ต่างกกัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

- | | |
|---------------------|---|
| (A) VW | (E) VW + กล้วยหอมบด + น้ำมะพร้าว |
| (B) VW + กล้วยหอมบด | (F) VW + กล้วยหอมบด + ผงมันฝรั่ง |
| (C) VW + น้ำมะพร้าว | (G) VW + น้ำมะพร้าว + ผงมันฝรั่ง |
| (D) VW + ผงมันฝรั่ง | (H) VW + กล้วยหอมบด + น้ำมะพร้าว + ผงมันฝรั่ง |

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การพัฒนของเมล็ดและโปรโตคอร์มว่านเพชรหึงบนอาหารสูตร
VW ดัดแปลงที่เติมสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาพแสงที่แตกต่างกัน หลัง
เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

ปัจจัย ระดับปัจจัย		ระยะการพัฒนา				
		S1	S2	S3	S4	S5
สภาพแสง	มืด/แสง	16.37 ^b	4.60 ^b	50.28 ^a	11.13 ^a	17.62 ^a
	แสง	67.35 ^a	15.09 ^a	14.55 ^b	1.44 ^b	1.57 ^b
T-test		**	**	**	**	**
องค์ประกอบ อาหาร	VW	58.51 ^a	8.30 ^b	32.38 ^b	0.64 ^c	0.17 ^d
	VW+hb	57.10 ^a	8.71 ^b	33.68 ^b	0.43 ^c	0.08 ^d
	VW+pt	54.60 ^a	6.40 ^b	38.44 ^{ab}	0.56 ^c	0.00 ^d
	VW+cw	31.52 ^c	10.26 ^a	44.37 ^a	9.08 ^{ab}	4.77 ^d
	VW+hb+pt	31.20 ^c	11.96 ^a	36.00 ^b	11.35 ^a	9.49 ^c
	VW+hb+cw	33.51 ^{bc}	11.93 ^a	23.43 ^c	10.92 ^{ab}	20.21 ^b
	VW+pt+cw	29.52 ^c	9.15 ^{ab}	13.76 ^d	8.40 ^b	39.17 ^a
	VW+hb+pt+cw	38.92 ^b	12.05 ^a	37.27 ^b	8.91 ^{ab}	2.85 ^d
F-test		**	**	**	**	**
สภาพแสง* องค์ประกอบ อาหาร	มืด/แสง * VW	38.73 ^g	7.07 ^d	53.01 ^{cd}	0.91 ^e	0.28 ^f
	มืด/แสง * VW+hb	36.49 ^g	7.25 ^d	55.35 ^c	0.80 ^e	0.11 ^f
	มืด/แสง * VW+pt	23.05 ^h	5.53 ^{de}	70.45 ^a	0.97 ^e	0.00 ^f
	มืด/แสง * VW+cw	10.57 ⁱ	2.87 ^f	61.07 ^b	16.66 ^b	8.83 ^d
	มืด/แสง * VW+hb+pt	4.82 ^j	4.47 ^{ef}	51.17 ^d	21.39 ^a	18.15 ^c
	มืด/แสง * VW+hb+cw	4.16 ^j	2.95 ^f	32.82 ^e	20.40 ^a	39.67 ^b
	มืด/แสง * VW+pt+cw	3.11 ^j	2.48 ^f	13.90 ^{hi}	11.46 ^c	69.05 ^a
	มืด/แสง * VW+hb+pt+cw	10.01 ^h	4.19 ^{ef}	64.49 ^b	16.48 ^b	4.83 ^e
	แสง * VW	78.29 ^b	9.53 ^c	11.74 ^{hi}	0.37 ^e	0.07 ^f
	แสง * VW+hb	77.71 ^b	10.17 ^c	12.01 ^{hi}	0.05 ^e	0.06 ^f
	แสง * VW+pt	86.15 ^a	7.26 ^d	6.46 ^j	0.13 ^e	0.00 ^f
	แสง * VW+cw	52.46 ^f	17.66 ^b	27.67 ^f	1.50 ^e	0.71 ^f
	แสง * VW+hb+pt	57.58 ^e	19.45 ^{ab}	20.83 ^g	1.32 ^e	0.82 ^f
	แสง * VW+hb+cw	62.85 ^d	20.90 ^a	14.06 ^h	1.45 ^e	0.74 ^f
	แสง * VW+pt+cw	55.93 ^e	15.81 ^b	13.63 ^{hi}	5.3 ^{3d}	9.30 ^d
	แสง * VW+hb+pt+cw	67.83 ^c	19.92 ^a	10.06 ^j	1.34 ^e	0.85 ^f
F-test		**	**	**	**	**
CV.%		12.46	27.44	17.67	27.28	35.47

(hb) กล้วยหอมบด (pt) ผงมันฝรั่ง (cw) น้ำมะพร้าว

**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$

4.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาล และสภาพแสงต่อการงอกและพัฒนาของเมล็ด

ปัจจัยแสงมีผลต่อการงอกของเมล็ด ว่านเพชรหึง พบว่าเมล็ด ว่านเพชรหึง ที่เพาะเลี้ยงในที่มีด 10 สัปดาห์ แล้วย้ายออกแสง มีเปอร์เซ็นต์การงอกมากกว่าเมล็ดที่เพาะเลี้ยงในที่มีแสงซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ปัจจัยระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส มีผลต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยอาหารสูตร VW ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาล 0 กรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การงอกมากกว่าเมล็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 20-40 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับอาหารที่เติมน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร ปัจจัยร่วมระหว่างสภาพแสงและความเข้มข้นของน้ำตาล พบว่า เมล็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาล 0-20 กรัมต่อลิตร ที่เลี้ยงในสภาพมืด/แสง มีเปอร์เซ็นต์การงอกมากที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับระดับปัจจัยอื่น ๆ ดังตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.2

ด้านการพัฒนาของเมล็ดที่เพาะเลี้ยงในสภาพมืด/แสง บนอาหารสูตร VW ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 0-10 กรัมต่อลิตร มีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะ S5 มากที่สุด คือ 33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับทรีตเมนต์อื่น ๆ และเมล็ดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำตาล 20-40 กรัมต่อลิตร ที่เลี้ยงในสภาพมีแสง มีการพัฒนาโปรโตคอร์มถึงแค่ระยะ S4 เท่านั้น ตารางที่ 4.4 และดังภาพที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การงอกของกรงอกเมล็ดว่านเพชรหึง บนอาหารสูตร VW ตัดแปลง
ที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้อาณัติแสงที่แตกต่างกัน
หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

ปัจจัย		เปอร์เซ็นต์การงอก
ระดับปัจจัย		
สภาพแสง	มืด/แสง	87.05 ^a
	แสง	23.38 ^b
T-test		**
ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส (กรัม/ลิตร)	0	68.46 ^a
	10	62.97 ^{ab}
	20	59.34 ^b
	30	52.02 ^c
	40	33.29 ^d
F-test		**
สภาพแสง* ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส (กรัม/ลิตร)	มืด/แสง * VW+0	97.22 ^a
	มืด/แสง * VW+10	95.96 ^a
	มืด/แสง * VW+20	95.31 ^a
	มืด/แสง * VW+30	89.50 ^b
	มืด/แสง * VW+40	57.24 ^c
	แสง * VW+0	39.69 ^d
	แสง * VW+10	29.98 ^e
	แสง * VW+20	23.37 ^f
	แสง * VW+30	14.54 ^g
	แสง * VW+40	9.33 ^h
F-test		**
CV.%		12.61

**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$

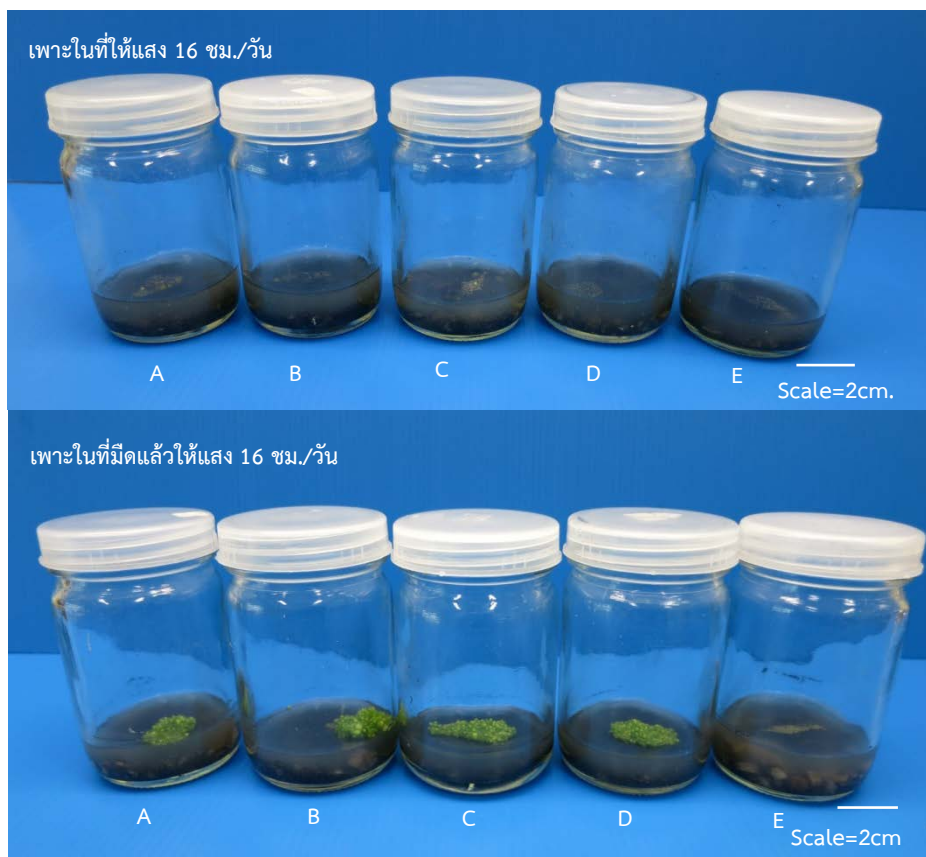
ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การพัฒนของเมล็ดและโปรโตคอร์มจากการเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร VW ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

ปัจจัย ระยะการพัฒนา		S1	S2	S3	S4	S5
สภาพแสง	มืด/แสง	12.95 ^b	5.12 ^b	46.46 ^a	15.80 ^a	19.67 ^a
	แสง	76.62 ^a	13.50 ^a	9.21 ^b	0.40 ^b	0.27 ^b
T-test		**	**	**	**	**
ความเข้มข้น น้ำตาล ซูโครส (กรัม/ลิตร)	0	31.54 ^d	9.20	32.05	10.01 ^{ab}	17.19 ^a
	10	37.03 ^{cd}	9.42	26.90	9.85 ^{ab}	16.81 ^a
	20	40.66 ^c	9.92	26.91	11.81 ^a	10.70 ^{ab}
	30	47.98 ^b	8.90	31.22	6.82 ^b	5.08 ^{bc}
	40	66.71 ^a	9.11	22.10	2.01 ^c	0.07 ^c
F-test		**	ns	ns	**	**
สภาพแสง* ความเข้มข้น น้ำตาล ซูโครส (กรัม/ลิตร)	มืด/แสง * VW+0	2.78 ^h	2.32 ^d	42.00 ^c	19.42 ^b	33.48 ^a
	มืด/แสง * VW+10	4.04 ^h	3.38 ^d	40.42 ^c	19.00 ^b	33.16 ^a
	มืด/แสง * VW+20	4.69 ^h	3.13 ^d	47.62 ^b	23.16 ^a	21.40 ^b
	มืด/แสง * VW+30	10.50 ^g	6.72 ^c	59.09 ^a	13.54 ^c	10.15 ^c
	มืด/แสง * VW+40	42.76 ^f	10.07 ^b	43.17 ^{bc}	3.88 ^d	0.12 ^d
	แสง * VW+0	60.31 ^e	16.08 ^a	22.11 ^d	0.60 ^e	0.90 ^d
	แสง * VW+10	70.02 ^d	15.46 ^a	13.38 ^e	0.69 ^e	0.45 ^d
	แสง * VW+20	76.63 ^c	16.70 ^a	6.20 ^f	0.47 ^e	0.00 ^d
	แสง * VW+30	85.46 ^b	11.09 ^b	3.35 ^f	0.10 ^e	0.00 ^d
	แสง * VW+40	90.67 ^a	8.15 ^c	1.03 ^f	0.15 ^e	0.00 ^d
F-test		**	**	**	**	**
CV.%		15.19	25.92	25.05	35.09	58.93

ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

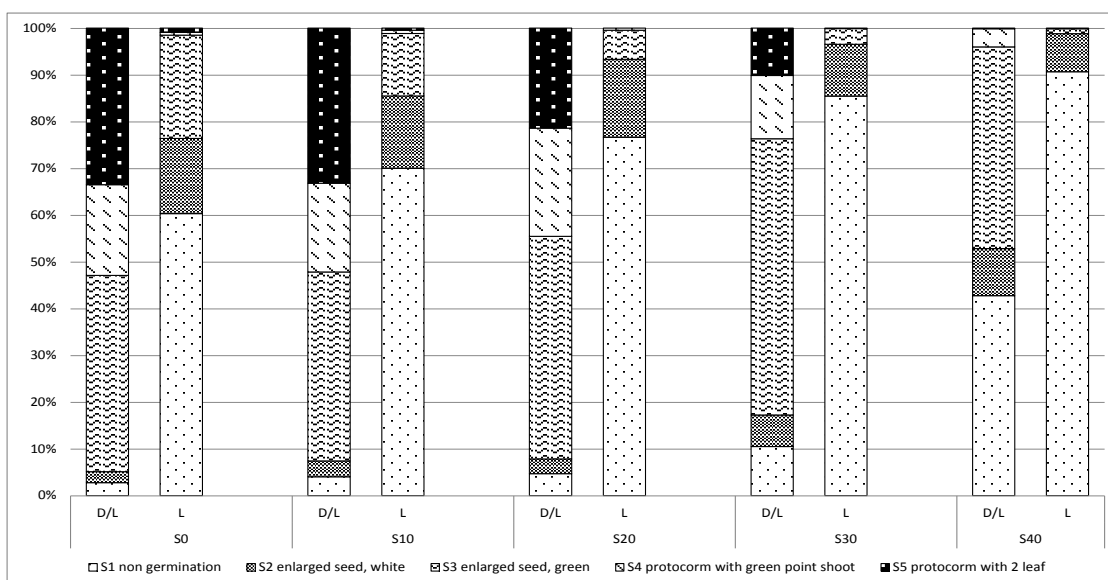
**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$



ภาพที่ 4.2 การงอกของเมล็ดว่านเพชรหึงที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเลี้ยงในสภาพแสงที่แตกต่างกัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

(A) ไม่เติมน้ำตาลซูโครส (B) น้ำตาลซูโครส 10 ก./ล. (C) น้ำตาลซูโครส 20 ก./ล.
(D) น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. (E) น้ำตาลซูโครส 40 ก./ล.



ภาพที่ 4.3 เปอร์เซนต์การพัฒนาของเมล็ดและโปรโตคอร์มจากการเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร VW ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเลี้ยงในสภาพแสงที่แตกต่างกัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

(D/L) เพาะเลี้ยงในที่มืด 10 สัปดาห์ แล้วย้ายออกในสภาพแสง (L) เพาะเลี้ยงในสภาพแสง
 (S0) ไม่เติมน้ำตาลซูโครส (S10) น้ำตาลซูโครส 10 ก./ล. (S20) น้ำตาลซูโครส 20 ก./ล.
 (S30) น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. (S40) น้ำตาลซูโครส 40 ก./ล.

4.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม โดยภาพรวมพบว่าอาหารสูตร VW มีผลต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์มในด้านต่าง ๆ ดีกว่าอาหารสูตร 1/2 MS และ NDM ระยะโปรโตคอร์มที่นำมาเพาะเลี้ยงมีผลต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม โดยพบว่าโปรโตคอร์มระยะมีใบ 2 ใบเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน มีการพัฒนาที่ดีกว่าโปรโตคอร์มระยะยอดแหลม ในด้านจำนวนราก ความยาวราก ความยาวใบ และความสูงต้น ส่วนการพัฒนาด้าน เส้น ผ่านศูนย์กลางราก และจำนวนใบ โปรโตคอร์มยอดแหลมมีค่ามากกว่าโปรโตคอร์มระยะใบ 2 ใบ ความกว้างใบไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนปัจจัยร่วมระหว่างระยะโปรโตคอร์มและสูตรอาหาร พบว่า ระยะโปรโตคอร์มใบ 2 ใบร่วมกับอาหารสูตร NDM มีการเจริญเติบโตในด้านความยาวรากมากที่สุด ซึ่งมีความยาวราก 3.36 เซนติเมตร ระยะโปรโตคอร์มยอดแหลมร่วมกับอาหารสูตร VW มีเส้นผ่านศูนย์กลางรากและจำนวนใบมากที่สุด ส่วนโปรโตคอร์มใบ 2 ใบร่วมกับอาหารสูตร VW มีความยาวใบ 0.95 เซนติเมตร มากกว่าระดับปัจจัยอื่น ๆ (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ผลของสูตรอาหารและระยะโปรโตคอร์มต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

ปัจจัย ระดับปัจจัย		จำนวน ราก (ราก/ ต้น)	ความยาว ราก (ซม.)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง (มม.)	จำนวน ใบ (ใบ/ ต้น)	ความยาว ใบ (ซม.)	ความ กว้างใบ (มม.)	ความสูง ต้น (ซม.)
ระยะโปรโต คอร์ม	ยอดแหลม	1.12 ^b	1.12 ^b	0.59 ^a	2.51 ^a	0.50 ^b	1.70	0.59 ^b
	ใบ2ใบ	1.49 ^a	2.20 ^a	0.35 ^b	2.29 ^b	0.81 ^a	1.80	0.78 ^a
T-test		**	**	**	**	**	ns	**
สูตรอาหาร	½ MS	1.25 ^b	0.68 ^b	0.38 ^b	2.30	0.71 ^a	1.54 ^b	0.71 ^a
	VW	1.52 ^a	2.07 ^a	0.55 ^a	2.45	0.72 ^a	1.91 ^a	0.74 ^a
	NDM	1.14 ^b	2.23 ^a	0.48 ^{ab}	2.44	0.50 ^b	1.80 ^a	0.61 ^b
F-test		**	**	**	ns	**	**	**
ระยะโปรโต คอร์ม*สูตร อาหาร	ยอดแหลม * ½ MS	1.08	0.58 ^d	0.42 ^b	2.14 ^c	0.58 ^c	1.54	0.59
	ยอดแหลม * VW	1.40	1.67 ^c	0.80 ^a	2.86 ^a	0.48 ^{cd}	1.85	0.64
	ยอดแหลม * NDM	0.88	1.10 ^c	0.55 ^b	2.52 ^b	0.38 ^d	1.70	0.55
	ใบ2ใบ * ½ MS	1.42	0.78 ^{cd}	0.35 ^{bc}	2.46 ^b	0.85 ^b	1.53	0.83
	ใบ2ใบ * VW	1.64	2.46 ^b	0.30 ^c	2.04 ^c	0.95 ^a	1.97	0.83
	ใบ2ใบ * NDM	1.40	3.36 ^a	0.41 ^b	2.36 ^b	0.63 ^c	1.91	0.68
F-test		ns	**	**	**	**	ns	ns
CV.%		27.17	26.83	33.62	9.76	18.44	18.11	16.25

ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$

เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน พบว่าสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม โดยพบว่า โปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารสูตร NDM มีจำนวนราก 4.86 ราก และความยาวราก 5.97 เซนติเมตร มากที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตร ½ MS และ VW ที่มีจำนวนราก 4.31 และ 4.30 ราก ตามลำดับ ความยาวรากอาหารสูตร ½ MS และ VW มีความยาวราก 4.29 และ 5.21 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ในด้านความกว้างใบ โปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารสูตร VW ความกว้างใบมากที่สุด โดยมีความกว้างใบ 2.78 มิลลิเมตร ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรอื่น ๆ ส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางราก จำนวนใบ ความยาวใบ ทั้ง 3 สูตรอาหารไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนความสูงต้น โปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS และ VW มีความสูงต้นมากกว่าในอาหารสูตร NDM ปัจจัยระยะโปรโตคอร์มมีผลต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม โดยพบว่าโปรโตคอร์มระยะใบ 2 ใบ มีการพัฒนาที่ดีกว่าโปรโตคอร์มระยะยอดแหลมในด้านความยาวใบ และความสูงต้น ส่วนการ

พัฒนาในด้านอื่น ๆ โปรโตคอร์มทั้ง 2 ระยะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนปัจจัยร่วมระหว่างสูตรอาหารและระยะโปรโตคอร์ม พบว่า อาหารสูตร NDM ร่วมกับโปรโตคอร์มใบ 2 ใบ ให้ผลดีที่สุดในด้านความยาวราก อาหารสูตร ½ MS และ VW ร่วมกับโปรโตคอร์มใบ 2 ใบ ให้ผลที่ดีในด้านความสูงต้น (ตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.4)

ตารางที่ 4.6 ผลของสูตรอาหารและระยะโปรโตคอร์มต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

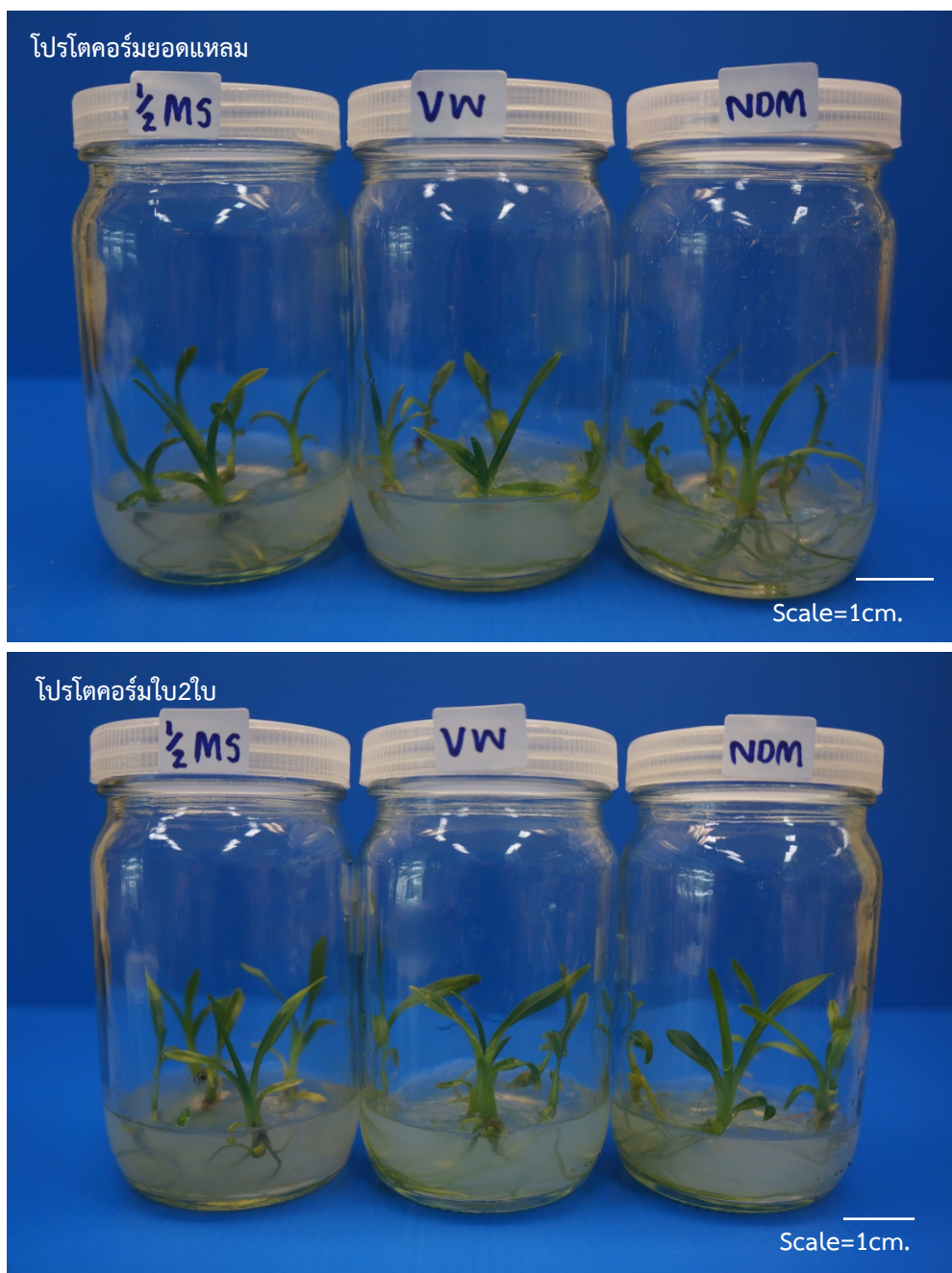
ปัจจัย ระดับปัจจัย		จำนวน ราก (ราก/ ต้น)	ความยาว ราก (ซม.)	เส้นผ่าน ศูนย์กลางราก (มม.)	จำนวน ใบ (ใบ/ต้น)	ความยาว ใบ (ซม.)	ความ กว้าง ใบ (มม.)	ความสูง ต้น (ซม.)
ระยะโปรโต คอร์ม	ยอดแหลม	4.37	5.04	0.77	3.63	1.42 ^b	2.56	2.85 ^b
	ใบ2ใบ	4.61	5.28	0.74	3.57	2.05 ^a	2.67	3.68 ^a
T-test		ns	ns	ns	ns	**	ns	**
สูตรอาหาร	½ MS	4.31 ^b	4.29 ^c	0.71	3.69	1.72	2.55 ^b	3.43 ^a
	VW	4.30 ^b	5.21 ^b	0.80	3.61	1.76	2.78 ^a	3.31 ^a
	NDM	4.86 ^a	5.97 ^a	0.76	3.50	1.74	2.52 ^b	3.06 ^b
F-test		*	**	ns	ns	ns	**	**
ระยะโปรโต คอร์ม*สูตร อาหาร	ยอดแหลม * ½ MS	4.12	4.38 ^d	0.72	3.62 ^{ab}	1.48	2.55	3.02 ^c
	ยอดแหลม * VW	4.02	5.37 ^b	0.83	3.68 ^{ab}	1.41	2.62	2.79 ^d
	ยอดแหลม * NDM	4.96	5.37 ^b	0.75	3.58 ^{ab}	1.38	2.52	2.74 ^d
	ใบ2ใบ * ½ MS	4.50	4.21 ^d	0.69	3.76 ^a	1.95	2.55	3.84 ^a
	ใบ2ใบ * VW	4.58	5.05 ^c	0.76	3.54 ^{ab}	2.11	2.93	3.83 ^a
	ใบ2ใบ * NDM	4.76	6.58 ^a	0.77	3.42 ^b	2.10	2.53	3.38 ^b
F-test		ns	*	ns	**	ns	ns	**
CV.%		14.39	16.83	20.19	7.04	22.13	10.34	10.77

ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

*มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$



ภาพที่ 4.4 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม 2 ระยะ ที่เลี้ยงบนอาหาร 3 สูตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

4.4 การศึกษาองค์ประกอบในอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

ปัจจัยระยะโปรโตคอร์มมีผลต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์มหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า โปรโตคอร์มระยะใบ 2 ใบ มีการพัฒนาที่ดีกว่าโปรโตคอร์มระยะยอดแหลม ใน ทุกด้าน คือ จำนวนราก ความยาวราก เส้นผ่านศูนย์กลางราก จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ ความสูงต้น และเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น ปัจจัยองค์ประกอบสารอินทรีย์ มีผลต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม โดยภาพรวมพบว่าอาหาร VW ที่เติมผงมันฝรั่งเพียงอย่างเดียวทำให้โปรโตคอร์มมีการพัฒนาในด้าน จำนวนราก ความยาวราก จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบที่ดี ส่วนอาหารสูตร VW ที่เติมกล้วยหอมบดร่วมกับน้ำมะพร้าว และอาหารสูตร VW ที่เติมผงมันฝรั่งร่วมกับน้ำมะพร้าว มีเส้นผ่านศูนย์กลางรากมากที่สุดคือ 0.9 มิลลิเมตร ส่วนปัจจัยร่วมระหว่างองค์ประกอบสารอินทรีย์และระยะโปรโตคอร์ม พบว่า อาหารสูตร VW ที่เติมกล้วยหอมบดร่วมกับน้ำมะพร้าวร่วมกับโปรโตคอร์มระยะใบ 2 ใบ มีการพัฒนาที่ดีในทุกด้าน จำนวน ราก ความยาวราก เส้นผ่านศูนย์กลางราก ความยาวใบ ความกว้างใบ ความสูงต้น และเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น ส่วนในด้านจำนวนใบ ทุกระดับปัจจัยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.5)

ตารางที่ 4.7 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม 2 ระยะ ที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมสารอินทรีย์
แตกต่างกัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

ปัจจัย		จำนวน ราก (ราก/ ต้น)	ความ ยาวราก (ซม.)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง ราก (มม.)	จำ นวนใบ (ใบ/ต้น)	ความ ยาวใบ (ซม.)	ความ กว้างใบ (มม.)	ความสูง ต้น(ซม.)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง ลำ ต้น(มม.)
ระดับปัจจัย									
ระยะโปร โตคอร์ม	ยอดแหลม	1.67 ^b	1.62 ^b	0.75 ^b	2.79 ^b	0.60 ^b	1.8 ^b	0.71 ^b	1.78 ^b
	ใบ2ใบ	2.95 ^a	2.38 ^a	0.88 ^a	3.44 ^a	0.94 ^a	2.3 ^a	1.08 ^a	2.38 ^a
T-test		**	**	**	**	**	**	**	**
องค์ประ กอบสาร อินทรีย์	VW	2.33 ^{abc}	1.71 ^c	0.77 ^b	3.37 ^a	0.82 ^{ab}	2.3 ^a	0.97	2.09 ^{ab}
	VW+hb	2.13 ^{bc}	2.32 ^{ab}	0.76 ^b	3.08 ^{bc}	0.79 ^b	2.0 ^b	0.88	1.85 ^b
	VW+pt	2.25 ^{abc}	2.14 ^{abc}	0.76 ^b	3.38 ^a	0.94 ^a	2.3 ^a	0.97	2.07 ^{ab}
	VW+cw	2.62 ^a	0.60 ^d	0.76 ^b	3.32 ^{ab}	0.69 ^{bc}	2.1 ^{ab}	0.88	2.43 ^a
	VW+hb+pt	2.10 ^{bc}	2.22 ^{ab}	0.81 ^b	3.05 ^c	0.77 ^{bc}	1.9 ^b	0.85	1.94 ^b
	VW+hb+cw	2.57 ^a	2.53 ^a	0.93 ^a	2.92 ^{cd}	0.76 ^{bc}	2.0 ^b	0.89	2.17 ^{ab}
	VW+pt+cw	2.45 ^{ab}	2.63 ^a	0.92 ^a	3.09 ^{bc}	0.74 ^{bc}	2.0 ^b	0.88	2.16 ^{ab}
	VW+hb+pt+cw	2.01 ^c	1.85 ^{bc}	0.80 ^b	2.70 ^d	0.63 ^c	1.5 ^c	0.80	1.98 ^b
F-test		**	**	**	**	**	**	ns	*
ระยะโปร โตคอร์ม * องค์ ประ กอบ อาหาร	ยอดแหลม * VW	1.76 ^{fg}	1.51 ^h	0.79 ^{cd}	3.06	0.72 ^{ef}	2.04 ^{fg}	0.86 ^f	1.85 ^{jk}
	ยอดแหลม * VW+hb	1.46 ⁱ	2.18 ^{ef}	0.68 ^f	2.64	0.53 ^{hi}	1.69 ^{ij}	0.61 ^h	1.56 ^l
	ยอดแหลม * VW+pt	1.86 ^{fg}	2.25 ^{de}	0.78 ^{cde}	3.18	0.80 ^d	2.2 ^{cde}	0.82 ^{fg}	1.89 ^j
	ยอดแหลม * VW+cw	2.10 ^e	0.44 ^j	0.71 ^{ef}	2.96	0.61 ^{gh}	2.00 ^{fgh}	0.78 ^{fg}	2.04 ^{hi}
	ยอดแหลม * VW+hb+pt	1.60 ^{hi}	1.76 ^{gh}	0.74 ^{def}	2.88	0.61 ^{gh}	1.74 ⁱ	0.67 ^h	1.73 ^k
	ยอดแหลม * VW+hb+cw	1.66 ^{ghi}	1.94 ^{fg}	0.80 ^c	2.52	0.48 ⁱ	1.57 ^j	0.61 ^h	1.72 ^k
	ยอดแหลม * VW+pt+cw	1.94 ^{ef}	1.99 ^{efg}	0.88 ^b	2.84	0.65 ^{fg}	1.88 ^h	0.76 ^g	1.94 ^j
	ยอดแหลม*VW+hb+pt+cw	1.02 ^j	0.88 ⁱ	0.56 ^g	2.22	0.37 ^j	1.11 ^k	0.54 ⁱ	1.50 ^l
	ใบ2ใบ * VW	2.90 ^c	1.92 ^{fg}	0.76 ^{cde}	3.68	0.92 ^{bc}	2.48 ^a	1.08 ^{bc}	2.32 ^{de}
	ใบ2ใบ * VW+hb	2.86 ^c	2.46 ^{cd}	0.82 ^c	3.52	1.04 ^a	2.35 ^{abc}	1.15 ^a	2.14 ^{gh}
	ใบ2ใบ * VW+pt	2.64 ^d	2.03 ^{efg}	0.74 ^{def}	3.58	1.07 ^a	2.32 ^{bcd}	1.13 ^{ab}	2.24 ^{efg}
	ใบ2ใบ * VW+cw	3.14 ^b	0.76 ⁱ	0.78 ^{cd}	3.68	0.77 ^d	2.28 ^{bc}	0.98 ^e	2.81 ^a
	ใบ2ใบ * VW+hb+pt	2.60 ^d	2.67 ^{bc}	0.88 ^b	3.22	0.93 ^b	2.15 ^{def}	1.02 ^{cde}	2.15 ^{fgh}
	ใบ2ใบ * VW+hb+cw	3.48 ^a	3.11 ^a	1.06 ^a	3.32	1.04 ^a	2.36 ^{ab}	1.17 ^a	2.60 ^b
	ใบ2ใบ * VW+pt+cw	2.96 ^{bc}	3.27 ^a	0.97 ^a	3.34	0.84 ^{cd}	2.13 ^{ef}	0.99 ^{de}	2.38 ^{cd}
	ใบ2ใบ * VW+hb+pt+cw	3.00 ^{bc}	2.83 ^b	1.07 ^a	3.18	0.89 ^{bc}	1.98 ^{gh}	1.07 ^{bcd}	2.46 ^c
F-test		*	**	**	ns	**	**	*	**
CV.%		25.02	36.30	19.82	11.99	28.36	18.07	23.48	16.95

(hb) กล้วยหอมบด, (pt) ผงมันฝรั่ง, (cw) น้ำมะพร้าว

ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

*มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$



ภาพที่ 4.5 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม 2 ระยะ ที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมสารอินทรีย์แตกต่างกันหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

หลังจากเปลี่ยนอาหารและเพาะเลี้ยงต่อรวมเป็นเวลา 5 เดือน พบว่า ปัจจัยระยะโปรโตคอร์มมีผลต่อการเจริญเติบโต โดยโปรโตคอร์มระยะใบ 2 ใบ มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า โปรโตคอร์มระยะยอดแหลม ในด้านจำนวนราก จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ ความสูงต้น และเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น ปัจจัยองค์ประกอบสารอินทรีย์มีผลต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม โดยภาพรวมพบว่า อาหาร VW ที่เติมกล้วยหอมบดร่วมกับน้ำมะพร้าว และอาหาร VW ที่เติมทั้ง 3 สารประกอบอินทรีย์ร่วมกัน ทำให้โปรโตคอร์มมีการพัฒนาที่ดีในทุกด้าน โดยภาพรวม ปัจจัยร่วม ระหว่างระยะโปรโตคอร์มและองค์ประกอบอาหาร พบว่า โปรโตคอร์มระยะใบ 2 ใบ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมกล้วยหอมบดร่วมกับน้ำมะพร้าว และโปรโตคอร์มระยะใบ 2 ใบ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมกล้วยหอมบดร่วมกับผงมันฝรั่งและน้ำมะพร้าว มีการพัฒนาในภาพรวมที่ดี (ดังตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.6)

ตารางที่ 4.8 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม 2 ระยะ ที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมสารอินทรีย์แตกต่างกัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

ปัจจัย		จำนวน ราก (ราก/ ต้น)	ความ ยาวราก (ซม.)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง ราก (มม.)	จำนวน ใบ (ใบ/ต้น)	ความ ยาวใบ (ซม.)	ความ กว้างใบ (มม.)	ความสูง ต้น(ซม.)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง ลำต้น (มม.)
ระดับปัจจัย									
ระยะโปร โตคอร์ม	ยอดแหลม	5.30 ^b	4.01	1.14	5.00 ^b	2.85 ^b	3.88 ^b	2.52 ^b	4.08 ^b
	ใบ2ใบ	6.44 ^a	3.84	1.17	5.24 ^a	3.19 ^a	4.22 ^a	2.78 ^a	4.57 ^a
T-test		**	ns	ns	**	**	**	**	**
สูตร อาหาร	VW	5.51 ^c	1.78 ^f	0.75 ^d	4.91 ^c	2.73 ^d	3.61 ^c	2.01 ^d	3.56 ^d
	VW+hb	5.43 ^c	3.36 ^c	1.11 ^c	5.10 ^{bc}	3.32 ^{ab}	4.06 ^b	2.74 ^{bc}	4.07 ^c
	VW+pt	4.48 ^d	2.45 ^e	0.72 ^d	5.06 ^{bc}	2.88 ^{cd}	3.59 ^c	2.02 ^d	3.43 ^d
	VW+cw	5.43 ^c	2.85 ^d	1.05 ^c	4.81 ^c	2.31 ^e	3.69 ^c	2.45 ^c	4.27 ^c
	VW+hb+pt	6.43 ^b	4.56 ^b	1.40 ^b	5.03 ^c	3.61 ^a	4.41 ^a	3.07 ^{ab}	4.54 ^b
	VW+hb+cw	7.09 ^a	6.14 ^a	1.55 ^a	5.58 ^a	3.05 ^{bc}	4.47 ^a	3.13 ^a	5.15 ^a
	VW+pt+cw	6.15 ^b	4.24 ^b	1.11 ^c	5.11 ^{bc}	2.78 ^{cd}	4.17 ^{ab}	2.64 ^c	4.57 ^b
	VW+hb+pt+cw	6.44 ^b	6.05 ^a	1.55 ^a	5.35 ^{ab}	3.50 ^a	4.40 ^a	3.15 ^a	4.99 ^a
F-test		**	**	**	**	**	**	**	**
ระยะโปร โตคอร์ม * องค์ ประกอบ อาหาร	ยอดแหลม * VW	5.30 ^{hi}	1.63 ^j	0.68 ^j	4.82	2.60	3.53 ^f	1.85	3.45
	ยอดแหลม * VW+hb	4.78 ^{jk}	3.60 ^d	1.10 ^f	5.04	2.93	3.88 ^d	2.39	3.89
	ยอดแหลม * VW+pt	4.36 ^l	2.25 ^s	0.67 ^j	5.02	2.70	3.64 ^f	1.82	3.32
	ยอดแหลม * VW+cw	5.00 ^{ij}	2.73 ^f	1.09 ^f	4.78	2.09	3.55 ^f	2.56	4.10
	ยอดแหลม * VW+hb+pt	5.80 ^{efg}	4.68 ^c	1.43 ^d	4.92	3.43	4.24 ^c	2.27	4.23
	ยอดแหลม * VW+hb+cw	6.08 ^e	6.39 ^a	1.54 ^b	5.42	2.76	4.27 ^c	2.96	4.74
	ยอดแหลม * VW+pt+cw	5.64 ^{fgh}	4.38 ^d	1.09 ^f	4.94	2.81	3.97 ^d	2.60	4.30
	ยอดแหลม*VW+hb+pt+cw	5.44 ^{gh}	6.43 ^a	1.49 ^c	5.02	3.49	3.92 ^d	3.12	4.63
	ใบ2ใบ * VW	5.72 ^{efg}	1.92 ^h	0.82 ^h	5.00	2.86	3.69 ^{ef}	2.16	3.68
	ใบ2ใบ * VW+hb	6.08 ^e	3.12 ^e	1.12 ^f	5.16	3.71	4.23 ^c	3.08	4.26
	ใบ2ใบ * VW+pt	4.60 ^{kl}	2.65 ^f	0.76 ⁱ	5.10	3.06	3.54 ^f	2.21	3.54
	ใบ2ใบ * VW+cw	5.86 ^{ef}	2.96 ^e	1.00 ^s	4.84	2.54	3.82 ^{de}	2.34	4.44
	ใบ2ใบ * VW+hb+pt	7.06 ^c	4.43 ^d	1.38 ^e	5.14	3.79	4.58 ^f	3.27	4.85
	ใบ2ใบ * VW+hb+cw	8.10 ^a	5.88 ^b	1.57 ^{ab}	5.74	3.34	4.68 ^b	3.29	5.57
	ใบ2ใบ * VW+pt+cw	6.66 ^d	4.10 ^d	1.12 ^f	5.28	2.74	4.37 ^c	2.68	4.84
	ใบ2ใบ * VW+hb+pt+cw	7.44 ^b	5.69 ^b	1.60 ^a	5.68	3.51	4.87 ^a	3.18	5.36
F-test		*	*	*	ns	ns	*	ns	ns
CV.%		16.19	15.08	9.67	8.41	15.22	10.95	21.50	8.73

(hb) กล้วยหอมบด (pt) ผงมันฝรั่ง (cw) น้ำมะพร้าว

ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

*มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$



ภาพที่ 4.6 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม 2 ระยะ ที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมสารอินทรีย์แตกต่างกัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน
(hb) กล้วยหอมบด, (pt) ผงมันฝรั่ง, (cw) น้ำมะพร้าว

4.5 การศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

ระยะโปรโตคอร์มใบ 2 ใบ มีพัฒนาการที่ดีกว่า โปรโตคอร์มระยะยอดแหลม ในด้านจำนวนราก ความยาวราก เส้นผ่านศูนย์กลางราก จำนวนใบ ความกว้างใบ ความสูงต้น และเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น ยกเว้นด้านความยาวใบ โปรโตคอร์มระยะยอดแหลมมีความยาวใบ 1.80 เซนติเมตร มีความแตกต่างทางสถิติกับโปรโตคอร์มใบ 2 ใบ ที่มีความยาวใบ 1.34 เซนติเมตร ปัจจัยความเข้มข้นของน้ำตาลมีผลต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อน โดยน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ทำให้มีจำนวนรากมากที่สุด คือ 3.72 รากต่อต้น และมีความยาวรากยาวที่สุดคือ 3.39 เซนติเมตร ระดับน้ำตาล 0-20 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อระดับความเข้มข้นน้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 30 และ 40 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้จำนวนใบลดลง ในด้านการเจริญของต้นและใบ พบว่าระดับน้ำตาล 10-30 กรัมต่อลิตร มีแนวโน้มการเจริญเติบโตที่ดี ส่วนปัจจัยร่วมระหว่างระยะโปรโตคอร์มและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส พบว่ามีปฏิสัมพันธ์กันในทุกด้านโดยระยะโปรโตคอร์มใบ 2 ใบร่วมกับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสทุกระดับความเข้มข้น มีพัฒนาการโดยรวมทั้งในด้านจำนวนราก ความยาวราก เส้นผ่านศูนย์กลางราก จำนวนใบ ความกว้างใบ ความสูงต้น และเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น ดีกว่าโปรโตคอร์มระยะยอดแหลม ยกเว้นความ

ยาวใบ ที่โปรโตคอร์มยอด แหลมร่วมกับระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ 10-30 กรัมต่อลิตร มากกว่าระดับปัจจัยอื่น ๆ ในระยะโปรโตคอร์มยอดแหลม ระดับน้ำตาล 10-30 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ ต้นอ่อนเจริญพัฒนาได้ดีกว่าที่ระดับน้ำตาล 0 และ 40 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.9 และภาพที่ 4.7)

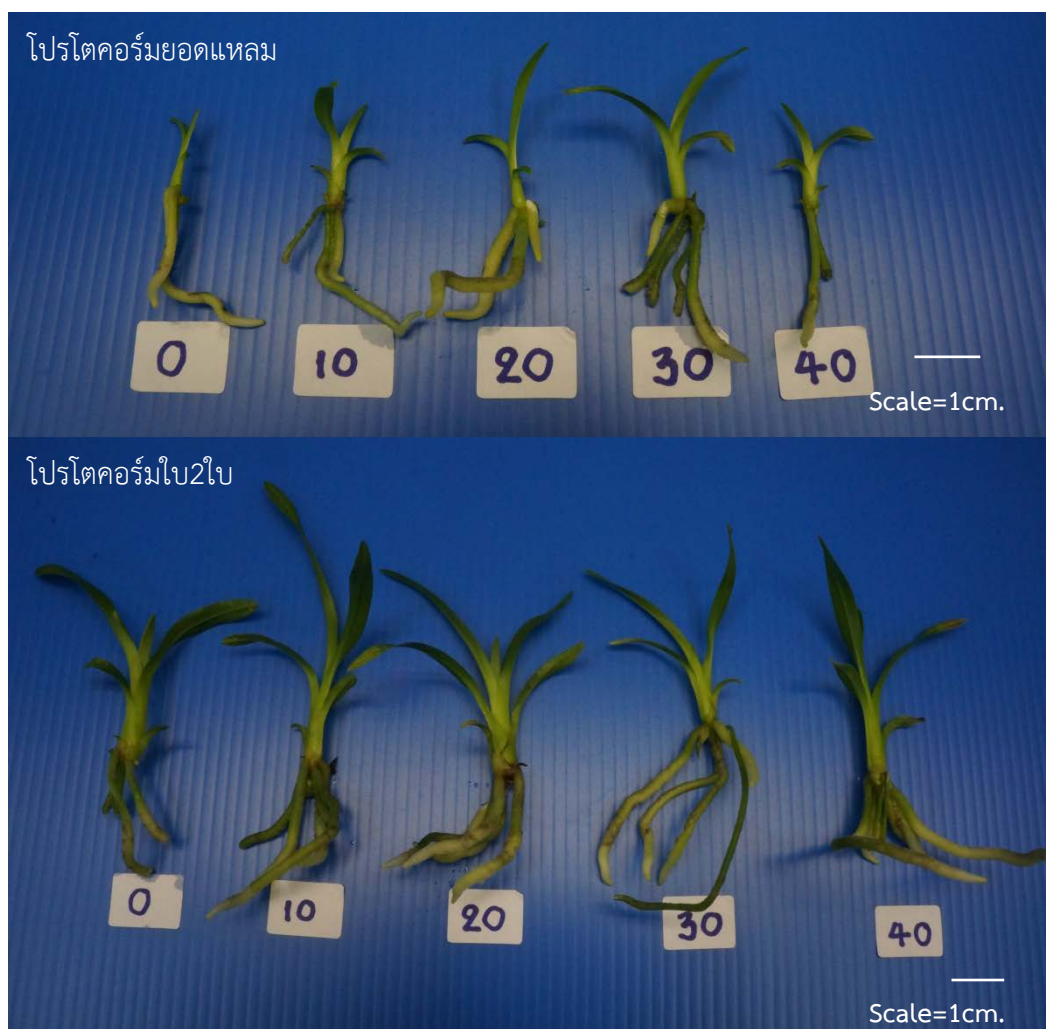
ตารางที่ 4.9 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม
หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

ปัจจัย ระดับปัจจัย		จำนวนราก (ราก/ ต้น)	ความยาว ราก (ซม.)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง ราก (มม.)	จำนวน ใบ (ใบ/ ต้น)	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้าง ใบ (มม.)	ความสูงต้น (ซม.)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง ต้น (มม.)
ระยะโปรโต คอร์ม	ยอดแหลม	2.20 ^b	2.25 ^b	0.29 ^b	2.70 ^b	1.80 ^a	0.18 ^b	0.82 ^b	4.60 ^b
	ใบ2ใบ	3.47 ^a	3.32 ^a	1.08 ^a	4.50 ^a	1.34 ^b	3.39 ^a	1.74 ^a	5.42 ^a
T-test		**	**	**	**	**	**	**	**
ความเข้มข้น น้ำตาลซูโครส (ก./ล.)	0	2.10 ^c	2.35 ^b	1.03 ^a	3.89 ^a	1.32 ^b	1.79 ^b	1.16 ^c	4.81 ^b
	10	2.82 ^b	3.22 ^a	0.66 ^b	4.04 ^a	1.93 ^a	1.75 ^b	1.45 ^a	5.05 ^{ab}
	20	2.89 ^b	2.65 ^b	0.57 ^b	3.88 ^a	1.80 ^a	1.96 ^a	1.31 ^b	5.14 ^a
	30	3.72 ^a	3.39 ^a	0.59 ^b	3.52 ^b	1.75 ^a	1.64 ^b	1.30 ^b	5.16 ^a
	40	2.65 ^b	2.32 ^b	0.60 ^b	2.65 ^c	1.04 ^b	1.78 ^b	1.19 ^{bc}	4.89 ^{ab}
F-test		**	**	**	**	**	**	**	*
ระยะโปรโต คอร์ม * ความเข้มข้น น้ำตาล (ก./ล.)	ยอดแหลม * 0	1.38 ^e	1.91 ^{de}	1.08 ^{ab}	2.80 ^c	1.42 ^b	0.24 ^d	0.68 ^{cd}	4.18 ^d
	ยอดแหลม * 10	2.26 ^d	2.58 ^{cd}	0.09 ^c	3.00 ^c	2.47 ^a	0.21 ^d	0.91 ^c	4.76 ^c
	ยอดแหลม * 20	2.78 ^{cd}	2.62 ^c	0.09 ^c	2.64 ^c	2.17 ^a	0.21 ^d	0.98 ^c	4.76 ^c
	ยอดแหลม * 30	2.98 ^{bcd}	2.60 ^{cd}	0.11 ^c	2.88 ^c	2.23 ^a	0.18 ^d	0.99 ^c	4.91 ^{bc}
	ยอดแหลม * 40	1.62 ^{de}	1.56 ^e	0.09 ^c	2.16 ^d	0.72 ^c	0.07 ^d	0.56 ^d	4.41 ^{cd}
	ใบ2ใบ * 0	2.82 ^{cd}	2.80 ^c	0.97 ^b	4.98 ^a	1.21 ^{bc}	3.34 ^{bc}	1.64 ^b	5.44 ^{ab}
	ใบ2ใบ * 10	3.38 ^{bc}	3.86 ^{ab}	1.23 ^a	5.08 ^a	1.40 ^b	3.28 ^{bc}	1.99 ^a	5.34 ^{ab}
	ใบ2ใบ * 20	3.00 ^{bc}	2.69 ^c	1.04 ^{ab}	5.12 ^a	1.44 ^b	3.72 ^a	1.64 ^b	5.53 ^a
	ใบ2ใบ * 30	4.46 ^a	4.19 ^a	1.08 ^{ab}	4.16 ^b	1.28 ^{bc}	3.09 ^c	1.60 ^b	5.40 ^{ab}
	ใบ2ใบ * 40	3.68 ^b	3.08 ^{bc}	1.10 ^{ab}	3.14 ^c	1.37 ^b	3.49 ^{ab}	1.82 ^{ab}	5.36 ^{ab}
F-test		**	**	**	**	**	**	**	*
CV.%		20.52	23.40	22.28	11.15	31.09	15.43	15.03	8.67

*มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$



ภาพที่ 4.7 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม 2 ระยะ ที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมน้ำตาล ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน
 (0) น้ำตาล 0 ก./ล. (10) น้ำตาล 10 ก./ล.
 (20) น้ำตาล 20 ก./ล. (30) น้ำตาล 30 ก./ล. (40) น้ำตาล 40 ก./ล.

4.6 การศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ

4.6.1 การศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาเมล็ดว่านเพชรหิิง

การศึกษพบว่า เมล็ดที่เก็บในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาความมีชีวิตของเมล็ดได้นานที่สุด โดยสามารถเก็บรักษาได้ถึง 270 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 84.75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดที่เก็บในอุณหภูมิที่ - 20 และ 40 องศาเซลเซียส เก็บรักษาเมล็ดได้น้อยที่สุด คือสามารถเก็บรักษาได้เพียง 15 วัน โดยมีความมีชีวิตเพียง 9.10 และ 2.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมล็ดที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาเมล็ดได้ 30 วัน โดยมีความมีชีวิต 78.96 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาเมล็ดได้

90 วัน โดยมีความมีชีวิต 17.75 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.10 และพบว่าเมล็ดที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 25 และ 40 องศาเซลเซียส หลังจากทำการเก็บรักษา 15 วัน มีการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกหุ้มเมล็ดโดยเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีน้ำตาล โดยเมล็ดมีสีน้ำตาลแบบนี้ตลอดอายุการเก็บรักษา ส่วนเมล็ดที่เก็บที่อุณหภูมิ -80, -20 และ 10 องศาเซลเซียส ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกหุ้มเมล็ดตลอดอายุการเก็บรักษา ดังภาพที่ 4.8

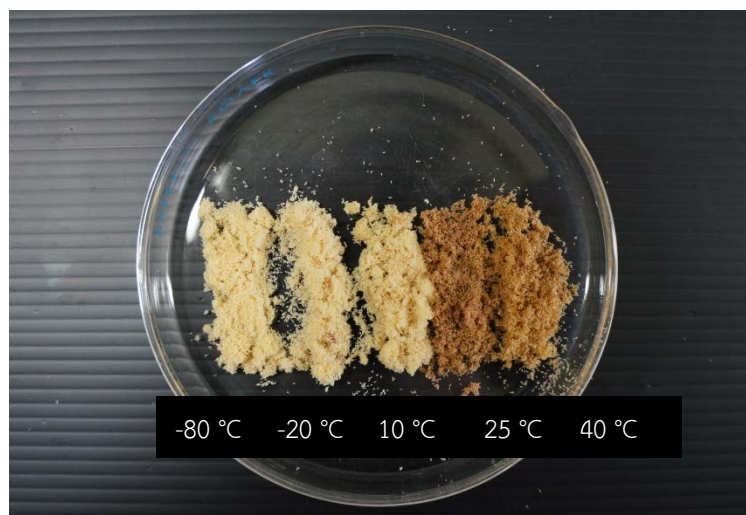
ตารางที่ 4.10 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดว่านเพชรหึงที่ทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิ และระยะเวลาต่าง ๆ โดยวิธีการย้อมด้วยสาร TTC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

อุณหภูมิ เวลา	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต							
	0วัน	1วัน	15วัน	30วัน	90วัน	180วัน	270วัน	360วัน
-80	99.94	43.01±0.09 ^d	35.92±1.37 ^c	26.06±0.29 ^c	17.75±0.94 ^b	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b	0.00
-20		55.67±0.70 ^c	9.10±0.32 ^d	0±0.00 ^d	0±0.00 ^c	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b	0.00
10		96.77±0.04 ^a	91.51±0.09 ^b	78.96±0.30 ^b	0±0.00 ^c	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b	0.00
25		97.27±0.11 ^a	95.67±0.14 ^a	92.21±0.17 ^a	90.05±0.46 ^a	84.49±0.65 ^a	84.75±0.27 ^a	0.00
40		92.99±0.27 ^b	2.23±0.59 ^e	0±0.00 ^d	0±0.00 ^c	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b	0.00
F-Test		**	**	**	**	**	**	ns

ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$



ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกหุ้มเมล็ดว่านเพชรหึง หลังทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 15 วัน

ปัจจัยอุณหภูมิมีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่ทำการทดสอบความมีชีวิตด้วยสาร TTC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมล็ดเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตมากที่สุด คือ 77.78 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับอุณหภูมิอื่น ๆ ส่วนปัจจัยระยะเวลามีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดโดยพบว่า เมล็ดที่เก็บรักษา 1 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุด คือ 96.70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับระยะเวลาอื่น ๆ เมื่อใช้ระยะเวลาเก็บนานขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลง (ตารางที่ 4.11)

ตารางที่ 4.11 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดว่านเพชรหึงที่ทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิ และระยะเวลาต่าง ๆ โดยวิธีการย้อมด้วยสาร TTC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปัจจัย A; อุณหภูมิ และปัจจัย B; ระยะเวลา)

ระดับปัจจัย		เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต
อุณหภูมิ (°C)	-80	16.06±0.43 ^c
	-20	9.25±0.41 ^e
	10	38.18±0.74 ^b
	25	77.78±0.53 ^a
	40	13.60±0.53 ^d
F-test		**
ระยะเวลา (วัน)	1	96.70±0.30 ^a
	15	46.89±0.69 ^b
	30	39.45±0.78 ^c
	90	19.49±0.70 ^d
	180	16.90±0.70 ^e
	270	16.95±0.70 ^e
	360	0.00±0.00 ^f
F-test		**

**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$

ส่วนปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิกับระยะเวลามีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดที่ทำการทดสอบความมีชีวิตด้วยสาร TTC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมล็ดเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ร่วมกับเวลา 1 วัน เมล็ดเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ร่วมกับเวลา 1 วัน และเมล็ดที่เก็บ 25 องศาเซลเซียส ร่วมกับเวลา 15 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุด คือ 96.77 97.27 และ 95.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับปัจจัยร่วมอื่น ๆ (ตารางที่ 4.12)

ตารางที่ 4.12 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดว่านเพชรหึงที่ทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิ
ร่วมกับระยะเวลาต่าง ๆ โดยวิธีการย้อมด้วยสาร TTC ความเข้มข้น 1
เปอร์เซ็นต์ (ปัจจัยร่วมระหว่าง ปัจจัย A; อุณหภูมิ x ปัจจัย B; ระยะเวลา)

ระดับปัจจัย		เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต
อุณหภูมิ (°C) * ระยะเวลา (วัน)	-80 * 1	43.01±0.90 ^f
	-80 * 15	35.92±1.37 ^g
	-80 * 30	26.06±0.29 ^h
	-80 * 90	7.40±0.94 ^j
	-80 * 180	0.00±0.00 ^l
	-80 * 270	0.00±0.00 ^l
	-80 * 360	0.00±0.00 ^l
	-20 * 1	55.67±0.70 ^e
	-20 * 15	9.10±0.32 ⁱ
	-20 * 30	0.00±0.00 ^l
	-20 * 90	0.00±0.00 ^l
	-20 * 180	0.00±0.00 ^l
	-20 * 270	0.00±0.00 ^l
	-20 * 360	0.00±0.00 ^l
	10 * 1	96.77±0.04 ^a
	10 * 15	91.51±0.09 ^b
	10 * 30	78.96±0.30 ^d
	10 * 90	0.00±0.00 ^l
	10 * 180	0.00±0.00 ^l
	10 * 270	0.00±0.00 ^l
	10 * 360	0.00±0.00 ^l
	25 * 1	97.27±0.11 ^a
	25 * 15	95.67±0.14 ^a
	25 * 30	92.21±0.17 ^b
	25 * 90	90.05±0.46 ^b
	25 * 180	84.49±0.65 ^c
	25 * 270	84.75±0.27 ^c
	25 * 360	0.00±0.00 ^l
	40 * 1	92.99±0.27 ^b
	40 * 15	2.23±0.59 ^k
	40 * 30	0.00±0.00 ^l
	40 * 90	0.00±0.00 ^l
	40 * 180	0.00±0.00 ^l
	40 * 270	0.00±0.00 ^l
	40 * 360	0.00±0.00 ^l
F-test		**

**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$

ด้านเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด พบว่า การเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีการงอกสูงที่สุด คือ 77.77 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับเมล็ดที่เก็บในอุณหภูมิต่ำกว่าอื่น ๆ ปัจจัยด้านระยะเวลา พบว่า การเก็บรักษาเมล็ด 1 วัน เมล็ดมีการงอกสูงที่สุด คือ 65.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับระยะเวลาอื่น ๆ และ การเก็บรักษาเมล็ดที่เวลา 360 วัน เมล็ดได้สูญเสียการงอกทั้งหมด เมื่อทำการเก็บรักษาเมล็ดนานขึ้นจะทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกลดลง ดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดวุ้นเพชรหึง เมื่อนำมาเพาะในอาหารหลังจาก เก็บรักษาในอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ (ปัจจัย A; อุณหภูมิ และปัจจัย B; ระยะเวลา) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

ระดับปัจจัย		เปอร์เซ็นต์การงอก
อุณหภูมิ (°C)	-80	7.75±0.22 ^d
	-20	5.23±0.40 ^e
	10	35.88±0.51 ^b
	25	77.77±0.50 ^a
	40	12.61±0.16 ^c
F-test		**
ระยะเวลา (วัน)	1	65.67±1.01 ^a
	15	42.24±0.57 ^b
	30	36.37±0.79 ^b
	90	19.29±0.60 ^c
	180	15.73±0.58 ^d
	270	16.64±0.59 ^{cd}
	360	00.00±0.00 ^e
F-test		**

**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$

ส่วนปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษา มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอก พบว่า เมล็ดที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 90 วัน และ เก็บที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ดี คือมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ 88-98 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.12.2) ส่วนระยะเวลาการงอก พบว่า เมล็ดเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ที่เวลา 30 วัน เมล็ดมีการงอกในสัปดาห์ที่ 7 หลังการเพาะเมล็ด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ เมล็ดเก็บที่อุณหภูมิ 10 และ 25 องศาเซลเซียส ที่เวลา 15 และ 30 วัน เมล็ดมีการงอกในสัปดาห์ที่ 8 สัปดาห์หลังการเพาะเมล็ด และมีความแตกต่างทางสถิติกับระดับปัจจัยอื่น ๆ (ตารางที่ 4.14)

ตารางที่ 4.14 เปอร์เซ็นต์การงอกและระยะเวลาในการงอกของเมล็ดว่านเพชรหึง
เมื่อนำมาเพาะในอาหารหลังจากเก็บรักษาในอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ
(ปัจจัยร่วมระหว่าง ปัจจัย A; อุณหภูมิ x ปัจจัย B; ระยะเวลา) เพาะเลี้ยงเป็น
เวลา 5 เดือน

ระดับปัจจัย		ระยะเวลางอก (สัปดาห์)	เปอร์เซ็นต์การงอก
อุณหภูมิ(°C) * ระยะเวลา (วัน)	-80*1	14 ^a	20.91±0.02 ^{de}
	-80*15	14 ^a	20.70±0.14 ^e
	-80*30	14 ^a	9.25±0.96 ^f
	-80*90	14 ^a	3.42±0.26 ^{gh}
	-80*180	-	00.00±0.00 ^h
	-80*270	-	00.00±0.00 ^h
	-80*360	-	00.00±0.00 ^h
	-20*1	11 ^c	28.60±0.45 ^d
	-20*15	12 ^{bc}	7.35±0.47 ^{fg}
	-20*30	12 ^{bc}	0.68±0.15 ^h
	-20*90	-	00.00±0.00 ^h
	-20*180	-	00.00±0.00 ^h
	-20*270	-	00.00±0.00 ^h
	-20*360	-	00.00±0.00 ^h
	10*1	11 ^c	92.43±0.01 ^{ab}
	10*15	8 ^{de}	80.04±0.20 ^{bc}
	10*30	7 ^e	78.70±0.46 ^c
	10*90	-	00.00±0.00 ^h
	10*180	-	00.00±0.00 ^h
	10*270	-	00.00±0.00 ^h
	10*360	-	00.00±0.00 ^h
	25*1	11 ^c	98.17±0.01 ^a
	25*15	9 ^d	98.13±0.04 ^a
	25*30	8 ^{de}	93.22±0.02 ^{ab}
	25*90	10 ^{cd}	93.04±0.03 ^{ab}
	25*180	11 ^c	78.65±0.87 ^c
	25*270	12 ^{bc}	83.19±0.13 ^{bc}
	25*360	-	00.00±0.00 ^h
	40*1	11 ^c	88.24±0.05 ^{abc}
	40*15	-	00.00±0.00 ^h
	40*30	-	00.00±0.00 ^h
	40*90	-	00.00±0.00 ^h
	40*180	-	00.00±0.00 ^h
	40*270	-	00.00±0.00 ^h
	40*360	-	00.00±0.00 ^h
F-test		**	**

**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$

การศึกษาพบว่า ปัจจัยอุณหภูมิมีผลต่อการพัฒนาของเมล็ด โดยเมล็ดที่เก็บที่ 25 องศาเซลเซียส มีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะ S5 (โปรโตคอร์มมีใบ 2 ใบ) มากที่สุดคือ 24.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับอุณหภูมิอื่น ๆ ด้านปัจจัยระยะเวลา พบว่า การเก็บที่เวลา 30 วัน มีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะ S5 มากที่สุดคือ 31.74 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับระยะเวลาที่เก็บรักษาอื่น ๆ (ตารางที่ 4.15)

ตารางที่ 4.15 เปอร์เซ็นต์การพัฒนาของเมล็ดวุ้นเพชรหึง หลังทำการเก็บรักษาใน

อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ (ปัจจัย A; อุณหภูมิ และปัจจัย B; ระยะเวลา)
เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

ระดับปัจจัย		เปอร์เซ็นต์การพัฒนา				
		S1	S2	S3	S4	S5
อุณหภูมิ (°C)	-80	94.92±0.07 ^a	2.37±0.16 ^b	2.19±0.14 ^c	0.37±0.06 ^d	0.15±0.03 ^d
	-20	91.79±0.39 ^a	1.84±0.17 ^c	3.48±0.27 ^c	1.12±0.18 ^c	1.77±0.17 ^c
	10	76.08±0.38 ^b	1.33±0.11 ^c	10.07±0.34 ^b	2.18±0.14 ^b	10.34±0.35 ^b
	25	28.31±0.42 ^c	2.73±0.12 ^a	34.51±0.43 ^a	10.40±0.21 ^a	24.05±0.41 ^a
	40	98.37±0.12 ^a	0.28±0.06 ^d	0.87±0.12 ^d	0.35±0.07 ^d	0.13±0.04 ^d
F-test		**	**	**	**	**
ระยะเวลา (วัน)	1	43.93±1.14 ^e	6.40±0.31 ^a	19.07±0.70 ^b	13.23±0.48 ^a	17.36±0.074 ^b
	15	62.24±0.51 ^d	4.81±0.19 ^b	24.46±0.50 ^a	2.55±0.17 ^c	5.94±0.31 ^c
	30	61.13±0.67 ^d	0.54±0.08 ^{de}	3.64±0.23 ^c	2.95±0.20 ^c	31.74±0.74 ^a
	90	75.88±0.50 ^c	0.41±0.05 ^{de}	21.68±0.58 ^a	1.50±0.13 ^c	0.53±0.07 ^d
	180	80.34±0.43 ^b	1.23±0.12 ^{cd}	8.00±0.36 ^c	4.08±0.25 ^b	6.35±0.32 ^c
	270	79.20±0.42 ^b	1.58±0.14 ^c	4.40±0.25 ^c	5.26±0.28 ^b	9.56±0.39 ^c
	360	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d
F-test		**	**	**	**	**

**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$

ส่วนปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิกับระยะเวลา พบว่า เมล็ดที่เก็บรักษาที่ 10 องศาเซลเซียส ร่วมกับเวลา 30 วัน และเมล็ดที่เก็บรักษาที่ 25 องศาเซลเซียส ร่วมกับเวลา 30 วัน มีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะ S5 มากที่สุดคือมีเปอร์เซ็นต์พัฒนาที่ 66.63 เปอร์เซ็นต์ (เมล็ดเก็บที่ 10 องศาเซลเซียส) และ 76.35 เปอร์เซ็นต์ (เมล็ดเก็บที่ 25 องศาเซลเซียส) ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับระดับปัจจัยอื่น ๆ (ตารางที่ 4.16 และภาพที่ 4.9)

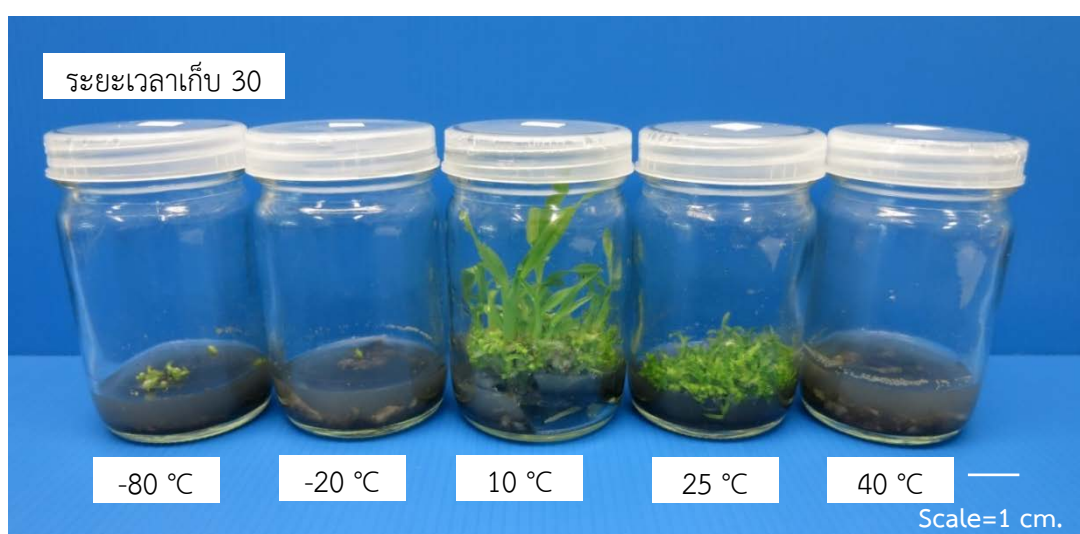
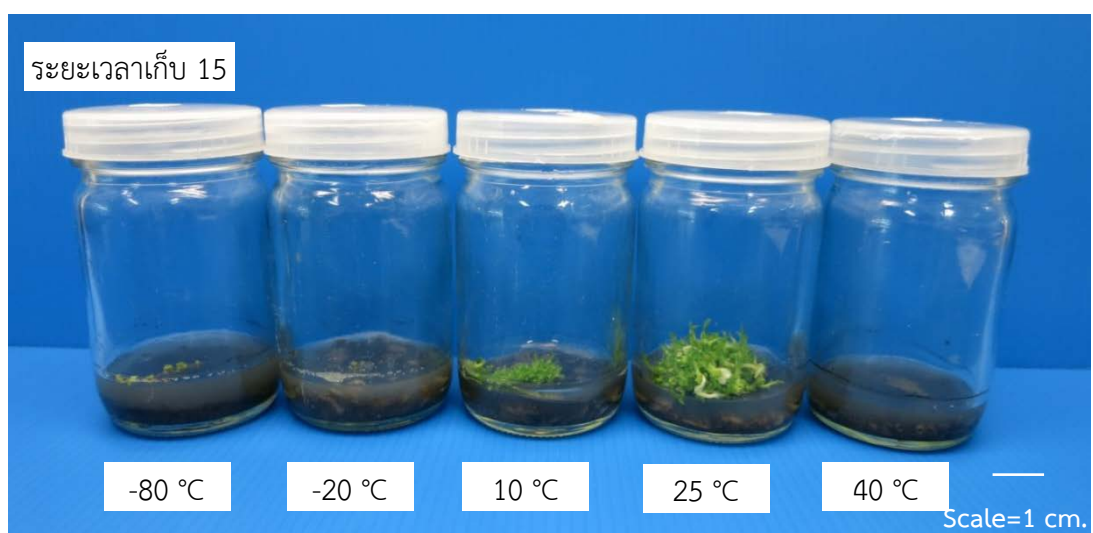
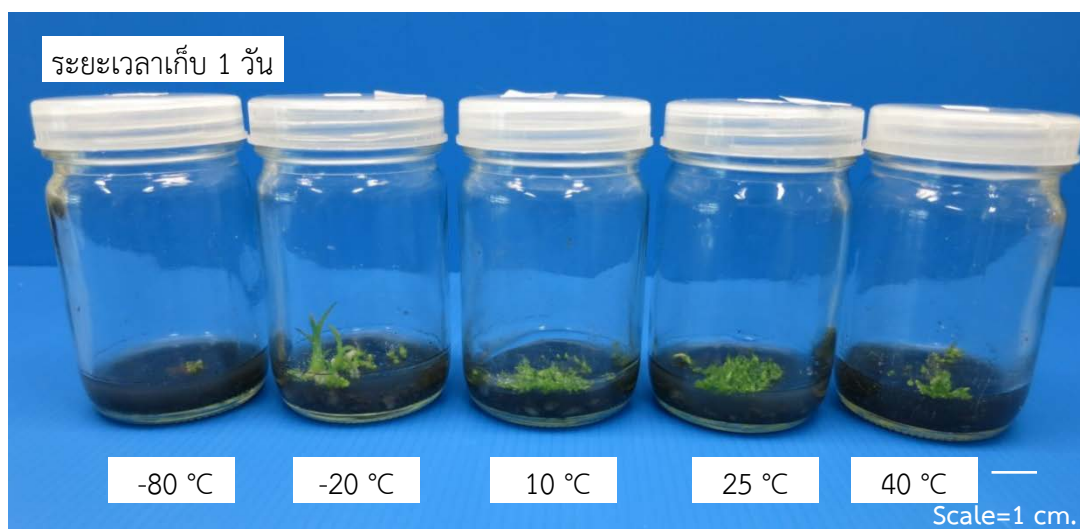
ตารางที่ 4.16 เปอร์เซ็นต์การพัฒนากของเมล็ดว่านเพชรหึง หลังทำการเก็บรักษาใน

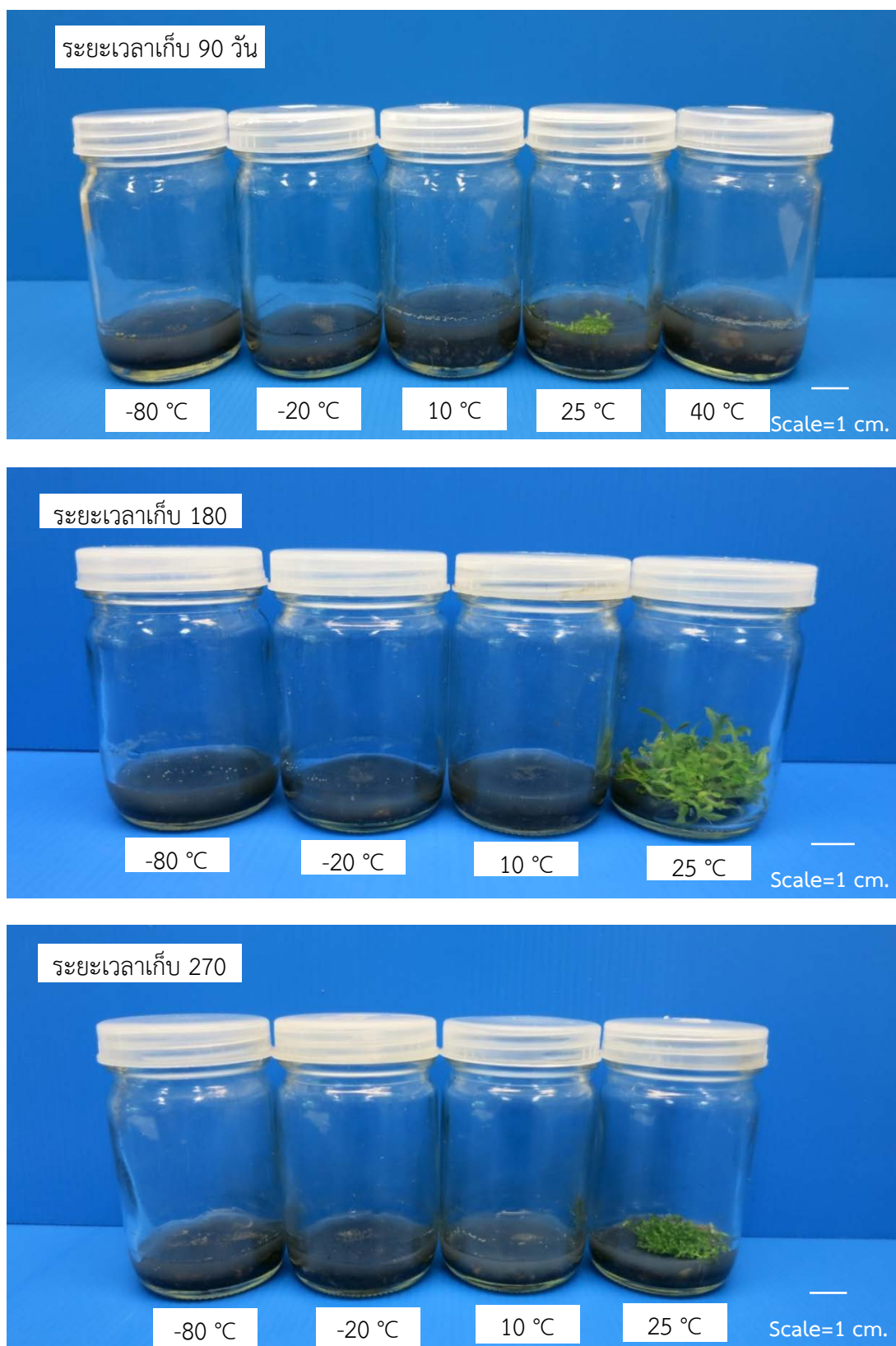
อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ (ปัจจัยร่วมระหว่าง ปัจจัย A; อุณหภูมิ x ปัจจัย B; ระยะเวลา) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

ระดับปัจจัย		เปอร์เซ็นต์การพัฒนา				
		S1	S2	S3	S4	S5
อุณหภูมิ (°C) * ระยะเวลา (วัน)	-80*1	79.09±1.14 ^{ab}	3.53±1.02 ^{de}	10.25±1.94 ^{fg}	6.71±1.51 ^c	0.41±0.23 ^h
	-80*15	79.30±0.07 ^{ab}	14.05±0.30 ^b	6.31±0.46 ^{fg}	0.21±0.07 ^d	0.14±0.05 ^h
	-80*30	90.75±0.26 ^{ab}	0.27±0.15 ^f	7.10±0.77 ^{fg}	0.54±0.25 ^d	1.34±0.47 ^h
	-80*90	96.58±0.05 ^{ab}	0.53±0.10 ^f	2.39±0.24 ^{gh}	0.31±0.09 ^d	0.19±0.07 ^h
	-80*180	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	-80*270	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	-80*360	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	-20*1	71.40±0.27 ^b	5.57±0.33 ^c	5.35±0.26 ^{fg}	7.49±0.49 ^c	10.19±0.32 ^{def}
	-20*15	92.65±0.14 ^{ab}	2.00±0.21 ^{ef}	5.35±0.46 ^{fg}	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	-20*30	99.32±0.02 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.68±0.15 ^h
	-20*90	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	-20*180	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	-20*270	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	-20*360	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	10*1	7.57±0.04 ^d	10.27±0.22 ^b	22.70±0.14 ^{de}	25.95±0.10 ^a	33.51±0.02 ^{bc}
	10*15	19.96±0.39 ^c	6.60±0.21 ^c	57.71±0.37 ^b	5.80±0.37 ^c	9.93±0.79 ^{gh}
	10*30	21.30±0.88 ^c	0.90±0.20 ^{ef}	4.56±0.44 ^{gh}	6.60±0.24 ^c	66.63±0.72 ^a
	10*90	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	10*180	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	10*270	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	10*360	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	25*1	1.84±0.02 ^e	4.15±0.14 ^{cd}	32.67±0.86 ^{cd}	19.19±0.23 ^{ab}	42.15±0.86 ^b
	25*15	1.88±0.21 ^e	0.92±0.17 ^{ef}	63.24±0.77 ^b	8.47±0.34 ^c	25.50±1.30 ^{de}
	25*30	6.78±0.09 ^d	1.48±0.27 ^{ef}	9.00±0.43 ^f	6.39±0.24 ^c	76.35±0.18 ^a
	25*90	6.96±0.10 ^d	1.13±0.14 ^{ef}	84.32±0.06 ^a	5.67±0.20 ^c	1.92±0.18 ^{gh}
	25*180	21.35±0.66 ^c	4.92±0.32 ^{cd}	32.02±0.68 ^{de}	16.31±0.47 ^b	25.41±0.76 ^{cd}
	25*270	16.81±0.29 ^c	6.32±0.24 ^c	17.58±0.23 ^e	21.03±0.22 ^{ab}	38.25±0.33 ^b
	25*360	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	40*1	11.76±0.06 ^{cd}	15.29±0.70 ^a	47.06±0.48 ^{bc}	18.82±0.19 ^{ab}	7.06±0.20 ^{efg}
	40*15	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	40*30	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	40*90	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	40*180	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	40*270	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
	40*360	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^h
F-test		**	**	**	**	**

**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$





ภาพที่ 4.9 การเพาะเลี้ยงเมล็ดวุ้นเพชชิงและการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มหลังจากทำการเก็บรักษาเมล็ดในอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

4.6.2 การศึกษาผลของการดูความชื้นก่อนการเก็บรักษาต่อความมีชีวิตของเมล็ด วาน เพชรหึง

จากการดูความชื้น 2 สัปดาห์ก่อนเก็บรักษา เมล็ดมีความชื้นประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมล็ดที่เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่ 58.03 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า เมล็ดที่เก็บ 10 องศาเซลเซียส ที่มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่ 33.56 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ปัจจัยด้านระยะเวลาที่เก็บรักษา พบว่า วันที่เก็บรักษาเป็นเวลา 15-30 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่ 63.90-58.59 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับ ระยะเวลาอื่น ๆ ส่วนปัจจัยร่วม พบว่า เมล็ดที่เก็บในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ร่วมกับระยะเวลา 15 และ 30 วัน และเมล็ดที่เก็บในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ร่วมกับระยะเวลา 15 30 และ 60 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่สูง คือมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่ 58-67 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเมล็ดวานเพชรหึงที่ทำการดูความชื้นเป็นเวลา

2 สัปดาห์ ก่อนทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ โดยวิธีการย้อมด้วยสาร TTC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

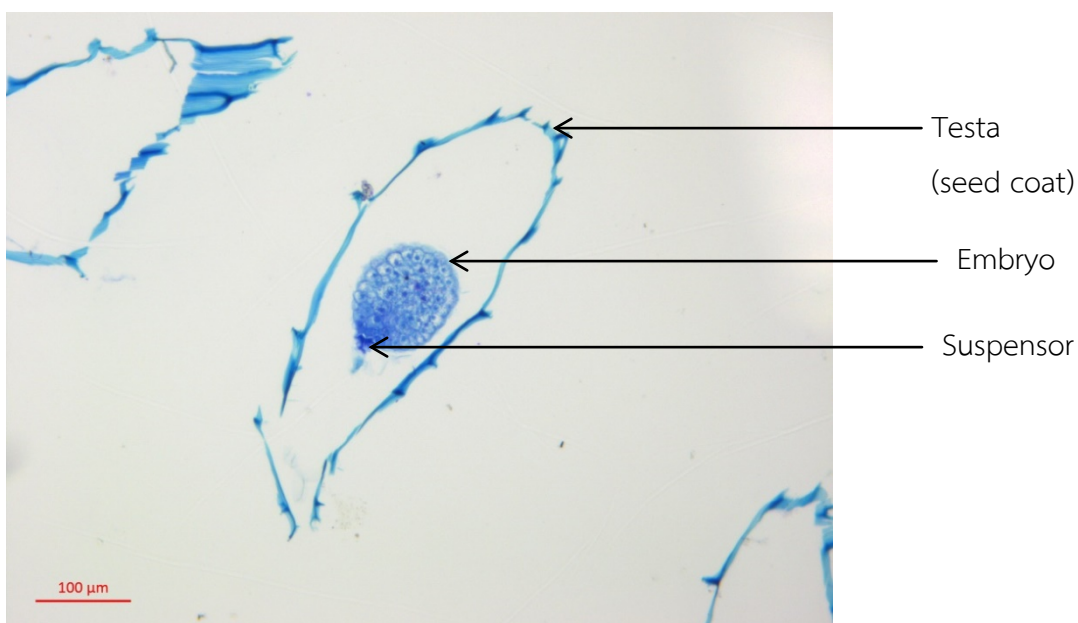
ระดับปัจจัย		เปอร์เซนต์ความมีชีวิต
อุณหภูมิ(°C)	10	33.56±0.34 ^b
	25	58.03±0.13 ^a
T-test		**
เวลา(วัน)	15	63.90±0.13 ^a
	30	58.59±0.17 ^a
	60	46.13±0.34 ^b
	90	35.15±0.52 ^c
	120	32.71±0.58 ^c
F-test		**
อุณหภูมิ (°C) *เวลา (วัน)	10*15	59.81±0.17 ^{ab}
	10*30	56.98±0.18 ^{ab}
	10*60	33.57±0.13 ^c
	10*90	16.86±0.13 ^d
	10*120	15.56±0.23 ^d
	25*15	67.98±0.09 ^a
	25*30	60.19±0.14 ^{ab}
	25*60	58.69±0.31 ^{ab}
	25*90	53.44±0.21 ^b
	25*120	49.85±0.39 ^b
F-test		**

**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

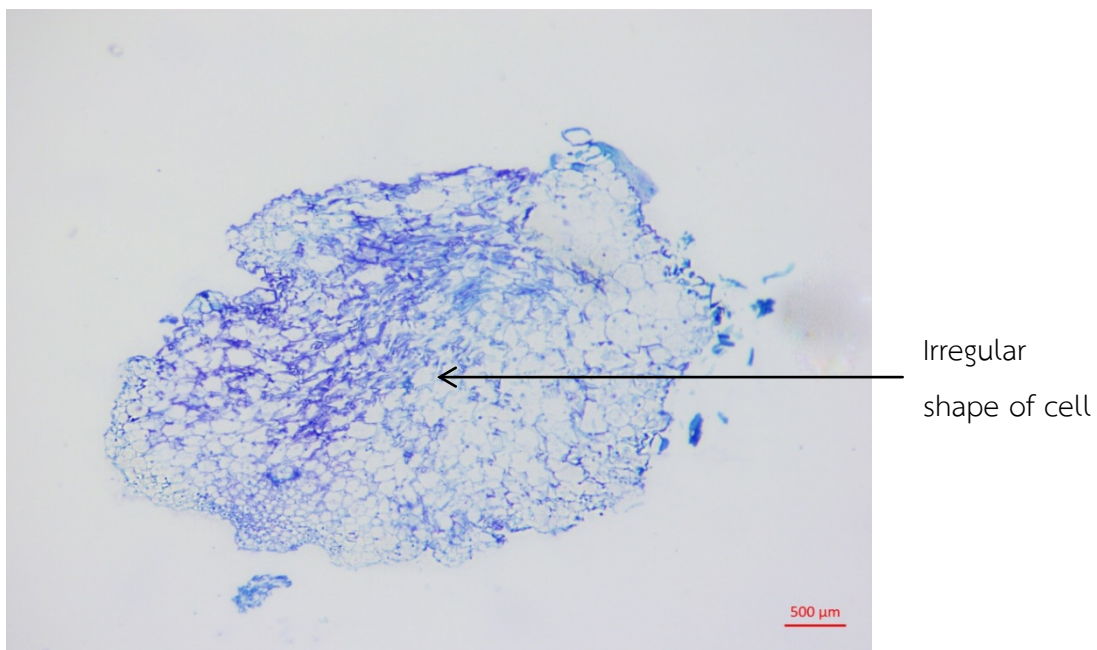
ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$

4.7 การศึกษากายวิภาคของเมล็ดและโปรโตคอร์มของว่านเพชรหิิง

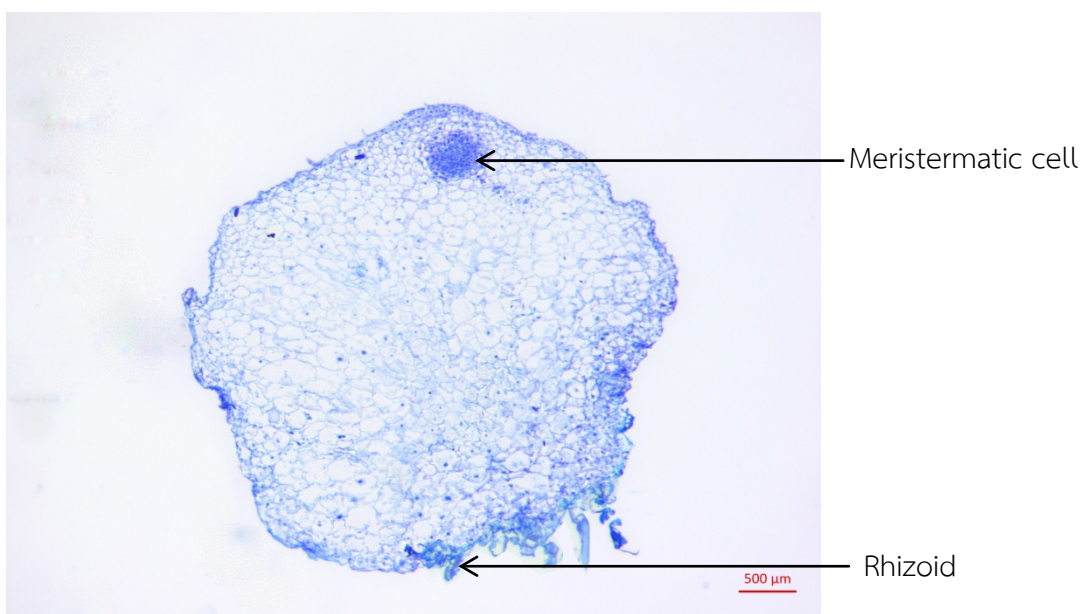
จากการ ศึกษากาย วิภาคของ เมล็ด และการพัฒนาของโปรโตคอร์ม ในระยะต่าง ๆ ของว่านเพชรหิิง พบว่าเมล็ดมีเปลือกหุ้มเมล็ด มีชื่อเรียกเฉพาะว่า testa ล้อมรอบอยู่ด้านนอก มีเอ็มบริโอ (embryo) อยู่กลางเมล็ด ระหว่างเอ็มบริโอและ testa เป็นช่องว่างอากาศ เอ็มบริโอประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีโปรโตพลาสซึมอย่างหนาแน่น (ภาพที่ 4.10) เอ็มบริโอจะมีการขยายขนาดจนทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก เซลล์ในเอ็มบริโอจะมีขนาดใหญ่ขึ้นมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน ซึ่งเป็นระยะโปรโตคอร์ม ที่มีลักษณะบวมสีขาว ยังไม่มีการสังเคราะห์ด้วยแสง (ภาพที่ 4.11) เมื่อมีการให้แสงโปรโตคอร์มจะมีการพัฒนาเป็น นสีเขียว มีการสร้างคลอโรฟิลล์ และบริเวณส่วนด้านบนมีการพัฒนา เนื้อเยื่อเจริญ (meristematic cell) ส่วนบริเวณด้านล่างโปรโตคอร์มมี rhizoid (ภาพที่ 4.12) จากนั้นเนื้อเยื่อเจริญบริเวณส่วนบนของโปรโตคอร์ม เริ่มมีการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด มีการสร้างใบ ทำให้เห็นเป็นยอดแหลม อีกทั้งยังพบกลุ่มเนื้อเยื่อที่จะพัฒนาไปเป็นกลุ่มท่อลำเลียง (provascular) (ภาพที่ 4.13) และต่อมาโปรโตคอร์มมีการเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นยอดและส่วนใบที่เห็นอย่างชัดเจน และเริ่มมีการพัฒนาของกลุ่มท่อลำเลียง (vascular bundle) (ภาพที่ 4.14)



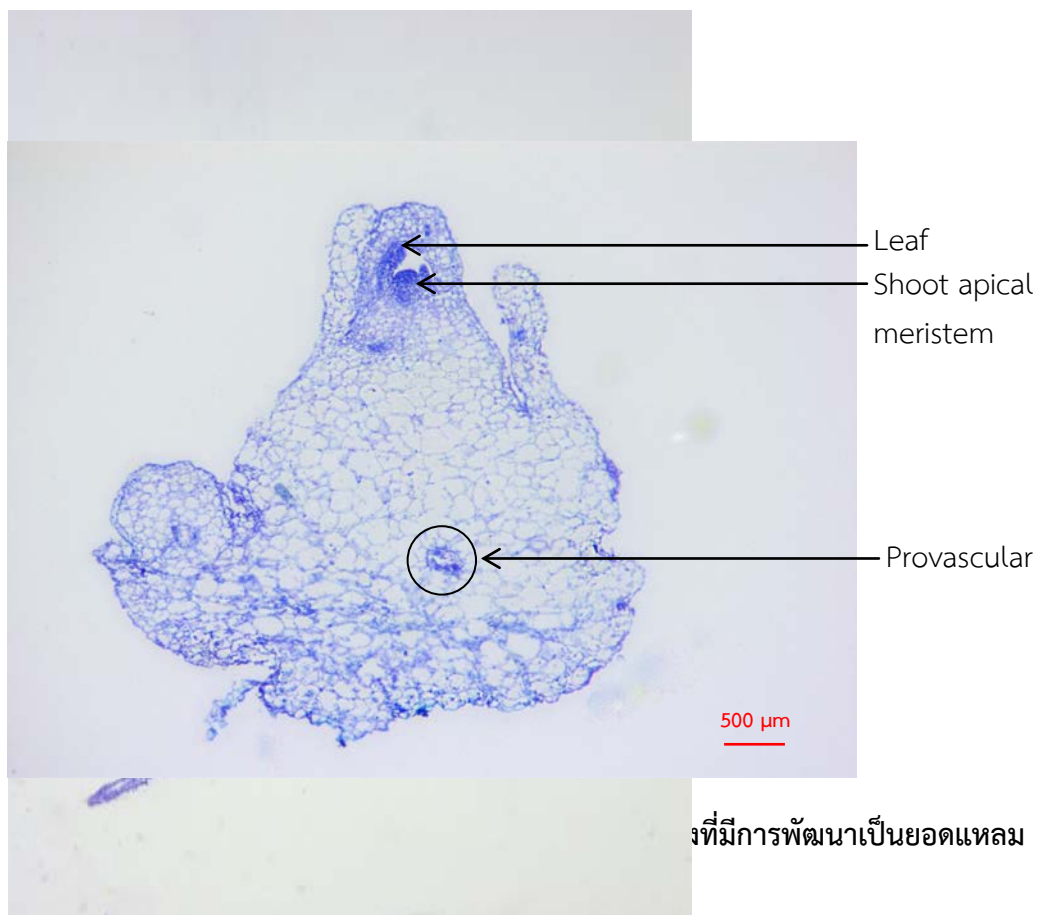
ภาพที่ 4.10 กายวิภาคของเมล็ดว่านเพชรหิิง



ภาพที่ 4.11 กายวิภาคของโปรโตคอร์มว่านเพชรหิงที่มีลักษณะบวมสีขาว



ภาพที่ 4.12 กายวิภาคของโปรโตคอร์มว่านเพชรหิงที่มีการพัฒนาเป็นสีเขียว



← Leaf

← Shoot apical meristem

← Vascular bundle

500μm

ภาพที่ 4.14 กายวิภาคของโปรโตคอร์มว่านเพชรหิ๊งที่มีการพัฒนาเป็นใบ 1 คู่

4.8 การศึกษาวัสดุที่เหมาะสมต่อการย้ายออกปลูก

จากการศึกษาวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการย้ายออกปลูกของว่านเพชรหิ๊ง เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า การเจริญเติบโตทางด้านความสูงต้นของ ว่านเพชรหิ๊ง ที่ปลูกใน สแฟกนัมมอส มีความสูงต้น 5.49 เซนติเมตร มีความแตกต่างทางสถิติกับ ว่านเพชรหิ๊ง ที่ปลูกใน ถ่านและเปลือกไม้ ที่มีความสูงต้น 4.6 และ 4.7 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ ว่านเพชรหิ๊งที่ปลูกใน ขุยมะพร้าว กาบมะพร้าว สับ ที่มีความสูง 4.95 และ 5.15 เซนติเมตร ตามลำดับ เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นของ เพชรหิ๊งที่ปลูกในวัสดุปลูกกาบมะพร้าว สับ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.35 มิลลิเมตร มีความแตกต่างทางสถิติกับ ว่านเพชรหิ๊ง ที่ปลูกใน ถ่านและเปลือกไม้ ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 7.97 และ 8.06 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ ว่านเพชรหิ๊งที่ปลูกในขุยมะพร้าวและสแฟกนัมมอส ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.61 และ 9.19 มิลลิเมตร ตามลำดับ

การเจริญเติบโตทางด้านใบ พบว่า ว่านเพชรหิ๊งที่ปลูกในสแฟกนัมมอส มีจำนวนใบ 6.75 ใบต่อต้น มีความแตกต่างทางสถิติกับว่านเพชรหิ๊งที่ปลูกในถ่าน ที่มีจำนวนใบ 5.58 ใบต่อต้น แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ ว่านเพชรหิ๊ง ที่ปลูกในเปลือกไม้ ขุยมะพร้าว และกาบมะพร้าว สับ ที่มีจำนวนใบ 6.08 5.92 และ 6.42 ใบต่อต้น ตามลำดับ ความยาวใบ พบว่า ว่านเพชรหิ๊งที่ปลูกในกาบมะพร้าวสับมีความยาวใบ 11.35 เซนติเมตร มีความแตกต่างทางสถิติกับว่านเพชรหิ๊งที่ปลูกในถ่าน และขุยมะพร้าว ที่มีความยาวใบ 10 และ 9.83 เซนติเมตร ตามลำดับ ความกว้างใบ พบว่า ว่านเพชรหิ๊งที่ปลูกในกาบมะพร้าวสับ และสแฟกนัมมอส มีความกว้างใบ 7.57 และ 7.38 มิลลิเมตร ตามลำดับ มีความแตกต่างทางสถิติกับว่านเพชรหิ๊ง ที่ปลูกในถ่าน และเปลือกไม้ ที่มีความกว้างใบ 6.48 และ 6.41 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ ว่านเพชรหิ๊งที่ปลูกในขุยมะพร้าว ที่มีความกว้างใบ 6.95 มิลลิเมตร

การเจริญเติบโตทางด้านราก พบว่า ว่านเพชรหิ๊งที่ปลูกในขุยมะพร้าวมีจำนวนราก 6.25 รากต่อต้น มีความแตกต่างทางสถิติกับว่านเพชรหิ๊งที่ปลูกในเปลือกไม้ ที่มีจำนวนราก 4.33 รากต่อต้น แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับว่านเพชรหิ๊งที่ปลูกในถ่าน กาบมะพร้าวสับ และสแฟกนัมมอส ที่มีจำนวนราก 4.75 5.33 และ 5.25 รากต่อต้น ตามลำดับ ความยาวราก พบว่า ว่านเพชรหิ๊งที่ปลูกในเปลือกไม้มีความยาวราก 7.07 เซนติเมตร ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ ว่านเพชรหิ๊ง ที่ปลูกในถ่านและขุยมะพร้าว ที่มีความยาวราก 6.58 และ 5.80 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับว่านเพชรหิ๊ง ที่ปลูกใน กาบมะพร้าว สับ และสแฟกนัมมอส ที่มีความยาวราก 5.28 และ 5.11 เซนติเมตร ตามลำดับ และเส้นผ่านศูนย์กลางรากไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังตารางที่ 4.15 และภาพที่ 4.18

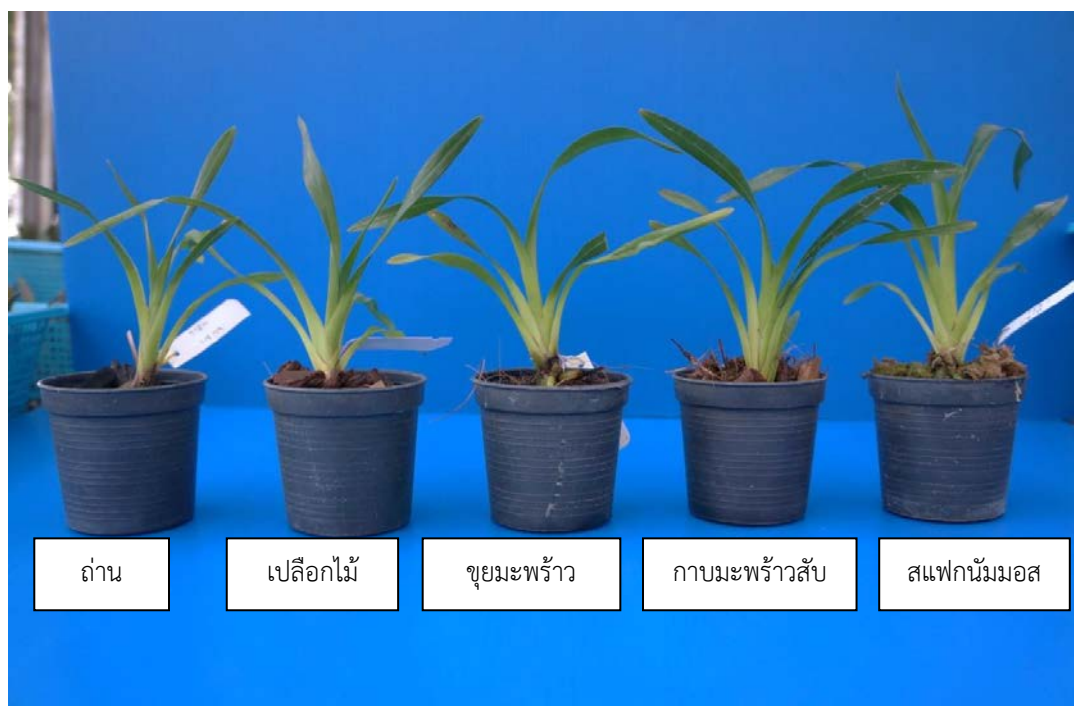
ตารางที่ 4.18 การเจริญเติบโตของว่านเพชรหึงที่ปลูกในวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน หลังย้าย
ออกปลูก 3 เดือน

ชนิดของวัสดุปลูก	ความสูงต้น (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น (มม.)	จำนวนใบ(ใบ/ต้น)	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (มม.)	จำนวนราก (ราก/ต้น)	ความยาวราก (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลางราก (มม.)
ถ่าน	4.6 ^b	7.97 ^c	5.58 ^b	10.00 ^b	6.48 ^b	4.75 ^{ab}	6.58 ^{ab}	2.08
เปลือกไม้	4.7 ^b	8.06 ^{bc}	6.08 ^{ab}	10.49 ^{ab}	6.41 ^b	4.33 ^b	7.07 ^a	1.99
ขุยมะพร้าว	4.95 ^{ab}	8.61 ^{abc}	5.92 ^{ab}	9.83 ^b	6.95 ^{ab}	6.25 ^a	5.8 ^{ab}	2.02
กาบมะพร้าวสับ	5.15 ^{ab}	9.35 ^a	6.42 ^{ab}	11.35 ^a	7.57 ^a	5.33 ^{ab}	5.28 ^b	2.06
สแฟกนัมมอส	5.49 ^a	9.19 ^{ab}	6.75 ^a	10.70 ^{ab}	7.38 ^a	5.25 ^{ab}	5.11 ^b	1.92
F-test	**	**	**	**	**	**	**	ns
CV.%	11.87	11.84	15.80	9.80	10.39	25.51	23.22	11.75

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$



ภาพที่ 4.15 การเจริญเติบโตของว่านเพชรหึงในวัสดุปลูกต่าง ๆ หลังย้ายออกปลูกเป็น

เวลา 3 เดือน

4.9 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา- กลูโคซิเดสและวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระจาก วานเพรทิง

4.9.1 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา- กลูโคซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของวานเพรทิง ที่มีอายุต่างกัน 3 ระยะ คือ ต้นอายุ 6 ปี ต้นอายุ 1 ปี และต้นในเขตเพาะเลี้ยง พบว่าส่วนเหง้า+ราก ของต้นอายุ 6 ปีทั้งในตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้งมีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา- กลูโคซิเดสได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 84.88 และ 85.47 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับส่วนใบและลำลูกกล้วยของต้นอายุ 6 ปี ทั้งในตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 11.46 - 12.78 และมีความแตกต่างทางสถิติกับต้นอายุ 1 ปี ทั้งส่วนใบและเหง้า +ราก ของตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 8.65 - 12.39 และมีความแตกต่างทางสถิติกับต้นในเขตเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งส่วนใบ และเหง้า +รากที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 10.12 และ 13.62 ตามลำดับ แต่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสน้อยกว่าสารมาตรฐาน Acarbose ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 94.50 ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.19 เมื่อเทียบตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้งในชิ้นส่วนและอายุเดียวกัน พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา- กลูโคซิเดสไม่แตกต่างกัน จากนั้นได้นำตัวอย่างสดเหง้า +ราก ของต้นอายุ 6 ปี และสารมาตรฐาน Acarbose โดยใช้ความเข้มข้น 1,000, 750, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 และ 15.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) พบว่า เมื่อความเข้มข้นลดลงทำให้ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา- กลูโคซิเดสลดลงตามลำดับ ดังภาพที่ 4.16 และพบว่าฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่ร้อยละ 50 ของส่วนเหง้า+ราก ต้นอายุ 6 ปี มีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 443.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับสารมาตรฐาน Acarbose มีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 390.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยค่า IC_{50} บ่งบอกความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นส่วนเหง้า+ราก ของต้นอายุ 6 ปี ต้องใช้ปริมาณความเข้มข้นของสารมากกว่าสารมาตรฐาน Acarbose จึงจะสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.19ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของว่านเพชรหึงที่มีอายุต่างกัน ที่ความเข้มข้นตัวอย่าง 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

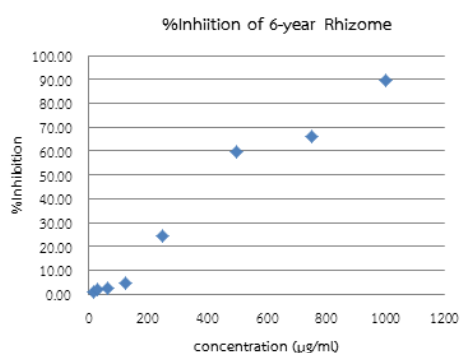
ส่วนของว่านเพชรหึง / อายุของกล้วยไม้	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส	
	ตัวอย่างสด	ตัวอย่างแห้ง
ใบ ของต้น 6 ปี	12.78±0.53 ^c	11.46±0.17 ^{cd}
เหง้า+ราก ของต้น 6 ปี	84.88±1.07 ^b	85.47±0.20 ^b
ลำลูกกล้วย ของต้น 6 ปี	12.06±2.02 ^{cd}	11.77±1.78 ^{cd}
ใบ ของต้น 1 ปี	8.65±1.63 ^f	9.10±0.28 ^{ef}
เหง้า+ราก ของต้น 1 ปี	12.39±0.79 ^{cd}	11.28±0.62 ^{cde}
ใบ ของต้นในเขตเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	10.12±0.28 ^{def}	-
เหง้า+ราก ของต้นในเขตเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	13.62±0.94 ^c	-
Acarbose	94.50±1.42 ^a	
F-test	**	

หมายเหตุ (-) ไม่ได้ทำการทดลอง

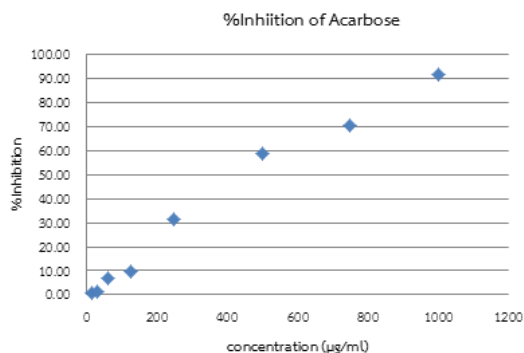
**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันทุกคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$

(A)



(B)



ภาพที่ 4.16 เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสของ (A) เหง้า+ราก ของต้นอายุ 6 ปี และ (B) สารมาตรฐาน Acarbose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 4.20ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ที่ร้อยละ 50 (IC₅₀) ของเหง้า+รากต้นอายุ 6 ปี และสารมาตรฐาน Acarbose

ตัวอย่างสด	IC ₅₀ (µg/ml)
เหง้า+ราก ของต้น 6 ปี	443.53±18.61 ^b
Acarbose	390.42±25.22 ^a
T-test	*

* มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี LSD $P=0.05$

4.9.2 การศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity (DPPH)

การทดสอบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากตัวอย่างของส่วนต่าง ๆ ของว่านเพชรหึงที่มีอายุต่างกัน 3 ระยะ คือ ต้นอายุ 6 ปี ต้นอายุ 1 ปี และต้นในเขตเพาะเลี้ยง พบว่า ใบและเหง้า+ราก ที่เป็นตัวอย่างสดของต้นอายุ 6 ปี มีการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ที่มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ 77.68 และ 76.95 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับใบและเหง้า +รากที่เป็นตัวอย่างแห้งของต้นอายุ 6 ปี ที่มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ 62.85 และ 61.60 ตามลำดับ แต่มีแนวโน้มการต้านอนุมูลอิสระสูงเหมือนกัน ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับส่วนลำลูกกล้วยของต้นอายุ 6 ปี ทั้งในตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้งที่มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ 33.11 และ 35.68 ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติกับส่วนใบและเหง้า +รากของอายุ 1 ปี ทั้งในตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้งที่มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 56.02 47.65 37.52 และ 35.39 ตามลำดับ โดยส่วนใบและเหง้า+รากของต้นในเขตเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด 19.90 และ 24.30 ตามลำดับ ทั้งนี้ ใบและเหง้า +ราก ของต้นอายุ 6 ปี ที่เป็นตัวอย่างสดไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับสารมาตรฐาน Trolox ที่มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 83.85 ดังแสดงในตารางที่ 4.21 จากนั้นได้นำตัวอย่างสด ในส่วนใบและเหง้า +รากของต้นอายุ 6 ปี ส่วนใบของต้นอายุ 1 ปี และสารมาตรฐาน Trolox โดยใช้ความเข้มข้น 100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.562 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC₅₀) พบว่า เมื่อความเข้มข้นลดลงทำให้ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระต่ำลงตามลำดับ ดังภาพที่ 4.17 และพบว่า ส่วนใบและเหง้า+รากของต้นอายุ 6 ปี มีค่า IC₅₀ ที่ความเข้มข้น 32.07 และ 17.87 ในส่วนใบของต้นอายุ 1 ปี มีค่า IC₅₀ ที่ความเข้มข้น 80.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารมาตรฐาน Trolox มีค่า IC₅₀ ที่ความเข้มข้น 7.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.22

ตารางที่ 4.21 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของว่านเพชรหึงเปรียบเทียบ
ตัวอย่างสดกับตัวอย่างแห้ง

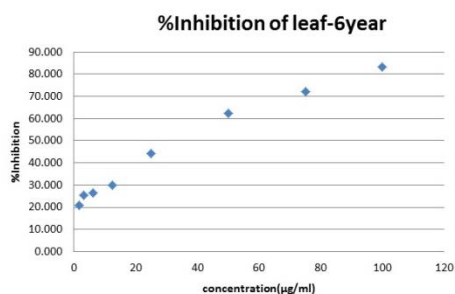
ส่วนของว่านเพชรหึง / อายุของกล้วยไม้	เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ	
	ตัวอย่างสด	ตัวอย่างแห้ง
ใบ ของต้น 6 ปี	77.68±1.33 ^a	62.85±0.34 ^b
เหง้า+ราก ของต้น 6 ปี	76.95±0.13 ^a	61.60±2.00 ^{bc}
ลำลูกกล้วย ของต้น 6 ปี	33.11±4.26 ^e	35.68±2.24 ^e
ใบ ของต้น 1 ปี	56.02±4.79 ^c	47.65±0.67 ^d
เหง้า+ราก ของต้น 1 ปี	37.52±0.83 ^e	35.39±0.71 ^e
ใบ ของต้นในเขตเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	19.90±1.35 ^g	-
เหง้า+ราก ของต้นในเขตเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	24.30±2.17 ^f	-
Trolox	83.85±0.34 ^a	
F-test	**	

หมายเหตุ (-) ไม่ได้ทำการทดลอง

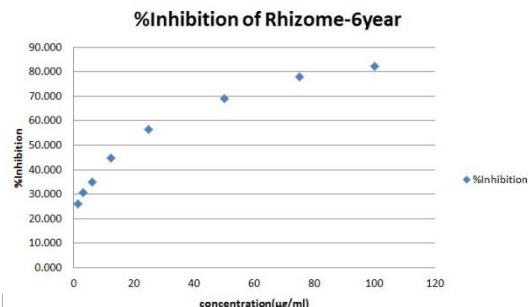
**มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันทุกคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$

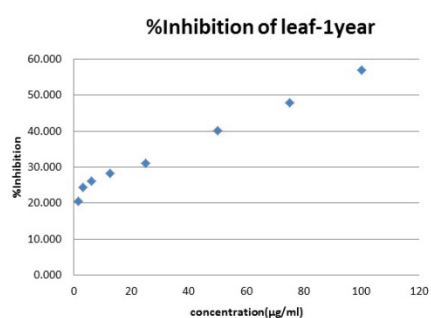
(A)



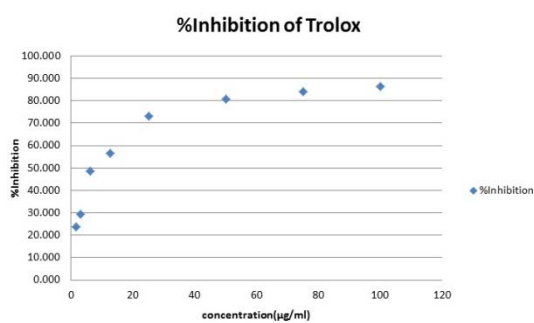
(B)



(C)



(D)



ภาพที่ 4.17 เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของ (A) ใบต้นอายุ 6 ปี (B) เหง้า+รากต้นอายุ 6 ปี (C) ใบต้นอายุ 1 ปี และ (D) สารมาตรฐาน Trolox ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 4.22 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของส่วนใบ เหง้า+ราก ต้นอายุ 6 ปี ส่วนใบของต้นอายุ 1 ปี และสารมาตรฐาน Trolox

ตัวอย่างสด	IC_{50} (µg/ml)
ใบ ต้นอายุ 6 ปี	32.07 ± 2.04^c
เหง้า+ราก ต้นอายุ 6 ปี	17.87 ± 3.38^b
ใบ ต้นอายุ 1 ปี	80.97 ± 3.19^d
Trolox	7.43 ± 1.53^a
F-test	**

** มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT $P=0.05$

บทที่ 5

อภิปรายผล

5.1 ผลของสภาพแสงต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดว่านเพชรหึงในสภาพปลอดเชื้อ

ปัจจัยแสงมีผลต่อการงอกของเมล็ด ว่านเพชรหึง โดยเมล็ดที่เพาะเลี้ยงในที่มืด 10 สัปดาห์ แล้วนำออกมาให้แสง (มืด/แสง) มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่สูงกว่าเมล็ดที่เพาะโดยให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน (แสง) ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นการเพิ่มเติมองค์ความรู้จากการทดลองของ Khampa et al. (2010) ที่รายงานว่า การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ *Grammatophyllum speciosum* Blume มีการงอกไม่แตกต่างกันเมื่อเพาะในที่มืดเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (มืด) หรือเพาะในที่ที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน (แสง) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การงอกของเมล็ด ว่านเพชรหึงมีความต้องการช่วงมืดในระยะหนึ่งหลังจากนั้นเมื่อได้รับแสง จะส่งเสริมให้มีการงอกสูงขึ้นและแสงมีผลต่อการพัฒนาของเมล็ดที่งอก ทำให้เจริญพัฒนาไปสู่ระยะต่าง ๆ ได้เร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Zeng et al. (2012) ที่พบว่า การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ *Paphiopedilum wardii* Sumerh ในที่มืดเป็นเวลา 45 วัน แล้วให้แสง ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง และสอดคล้องกับ Pierik et al. (1988) ที่พบว่าการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. ในที่มืดเป็นเวลา 12 สัปดาห์ แล้วให้แสง เมล็ดมีการงอกและการพัฒนาที่เร็วกว่าการเลี้ยงในที่ที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน แต่ไม่สอดคล้องกับ กาญจนา รุ่งรักษานนท์ และรัตน นาวิ (2560) ที่พบว่าการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสลูกผสมดอกใหญ่สีขาว กล้วยไม้ประเภทอิงอาศัย (Epiphytic) มีการงอกไม่แตกต่างกันเมื่อเพาะในสภาพมืด /แสง หรือได้รับแสง 16 ชั่วโมง/วัน ดังนั้นการงอกของเมล็ดว่านเพชรหึง (กล้วยไม้ประเภทอิงอาศัย) จึงต้องการความมืดกระตุ้นเหมือนกับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี ซึ่งเป็นกล้วยไม้ประเภทขึ้นอยู่บนพื้นดิน (Terrestrial) โดยทั่วไปกล้วยไม้ประเภทอิงอาศัยส่วนใหญ่ต้องการแสงในการงอกและกล้วยไม้ประเภทขึ้นอยู่บนพื้นดิน ต้องการความมืดในการงอก แต่อย่างไรก็ตาม การงอกของเมล็ดกล้วยไม้มีการตอบสนองต่อแสงแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด (Species) ของกล้วยไม้ (Kauth et al., 2008; Chen et al., 2015) ส่วนปัจจัยร่วมระหว่างปัจจัยแสงและองค์ประกอบอาหารมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด โดยพบว่า อาหารที่เติมกล้วยหอมบดร่วมกับผงมันฝรั่ง อาหารที่เติมกล้วยหอมบดร่วมกับน้ำมะพร้าว และอาหารที่เติมผงมันฝรั่งร่วมกับน้ำมะพร้าว ในสภาพมืด/แสง ส่งเสริมให้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกดีที่สุด

ปัจจัยแสงมีผลต่อการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม โดยเมล็ดที่เพาะในที่มืด /แสง มีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มมากกว่าเมล็ดที่เพาะในสภาพ แสง เนื่องจากเมล็ดที่เพาะในสภาพมี มืด/แสง มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่สูงกว่าเมล็ดที่เพาะในสภาพแสง และเมล็ดที่เพาะในสภาพมืด /แสง มีการงอกเร็วกว่า จึงมีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มเร็วกว่า

5.2 ผลขององค์ประกอบอาหารที่เป็นสารอินทรีย์ต่อการงอก การพัฒนาของเมล็ด และการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

ปัจจัยสารอินทรีย์มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด โดยพบว่า อาหารที่มีการเติมสารอินทรีย์มากกว่า 1 ชนิด ทำให้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ดีกว่าการเติมสารอินทรีย์เพียงชนิดเดียว ยกเว้นอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวเพียงอย่างเดียว เนื่องจากน้ำมะพร้าวมีองค์ประกอบของสารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น ไซโตไคนิน ออกซิน จิบเบอเรลลิน และ คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ (Arditti and Ernst, 1993) ซึ่งการเติมสารอินทรีย์ 2 ชนิดร่วมกันจะช่วยส่งเสริมการงอกที่ดีของเมล็ด แต่กลับพบว่าเมื่อเติมสารอินทรีย์ร่วมกันทั้ง 3 ชนิด กลับทำให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับ Tawaro et al. (2008) ที่พบว่าเมล็ดกล้วยไม้ *Cymbidium findlaysonianum* Lindl. ที่เพาะบนอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เพียงอย่างเดียว มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่าอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกล้วยป่น 5 เปอร์เซ็นต์ และผงมันฝรั่ง 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการเติมสารอินทรีย์ 3 ชนิดร่วมกันอาจจะมีการยับยั้งการทำงานซึ่งกันและกัน จึงส่งผลให้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่น้อยลง

ปัจจัยสารอินทรีย์มีผลต่อการพัฒนาของเมล็ดเป็นโปรโตคอร์ม โดยพบว่า เมล็ดที่เพาะในอาหารที่เติมผงมันฝรั่งร่วมกับน้ำมะพร้าว มีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะใบ 2 ใบ (S5) มากที่สุด เนื่องจากมันฝรั่งประกอบด้วยสารอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น น้ำตาล คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และวิตามิน และสารพวก polyamine ช่วยให้มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสทำให้พืชมีการเจริญดีขึ้น (Kaur-Sawhney et al., 1982) ร่วมกับน้ำมะพร้าวที่มีองค์ประกอบของสารควบคุมการเจริญเติบโต ดังที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ไฮยเรศ อาหารที่ส่งเสริมการสร้างโปรโตคอร์ม ดีที่สุดคือ VW ที่เติม มันฝรั่งบด 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ (วันพิรฮาน บินยามะ และคณะ, 2557) ส่วนปัจจัยร่วมระหว่างองค์ประกอบอาหารและปัจจัยแสง พบว่า เมล็ดที่เพาะบนอาหารที่เติมผงมันฝรั่งร่วมกับน้ำมะพร้าว ที่เลี้ยงในสภาพมืด /แสง มีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะใบ 2 ใบ สูงที่สุด คือ 69 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับ ธนากร วงษ์ศา และคณะ (2555) ที่พบว่าอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติมมันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตรและน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้พญาฉันทันต์สูงที่สุดและไม่สอดคล้องกับ Zhang et al. (2013) ที่พบว่าอาหารเติมมันฝรั่งหรือกล้วยเพียงอย่างเดียวก็เพียงพอต่อการเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้ *Cypripedium macranthos* Sw. จากการทดลองในครั้งนี้ ทำให้ทราบว่าอาหารเติมองค์ประกอบอาหารที่เป็นสารอินทรีย์เพียง 2 ชนิด ก็เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของวุ้นเพชรหึงและทำให้ประหยัดต้นทุนในการผลิตได้

ปัจจัยองค์ประกอบสารอินทรีย์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม พบว่า อาหารสูตร VW ที่เติมกล้วยหอมบดร่วมกับน้ำมะพร้าวและอาหารสูตร VW ที่เติมกล้วยหอมบดร่วมกับผงมันฝรั่งและน้ำมะพร้าว ส่งเสริมให้โปรโตคอร์มมีการเจริญเติบโตที่ดี ทั้งในจำนวนราก ความยาวราก เส้นผ่านศูนย์กลางราก จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ ความสูงต้น และเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น สอดคล้องกับ วันพิรฮาน บินยามะ และคณะ (2014) พบว่าอาหารสูตร VW เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ กล้วยหอม 5 เปอร์เซ็นต์ มันฝรั่งบด 5 เปอร์เซ็นต์ และ ผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องไฮยเรศ มีขนาดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ

8.04 มิลลิเมตรต่อชิ้นส่วน เพราะในกล้วยหอมมีโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามินเอ กรดอะมิโน แร่ธาตุชนิดต่าง ๆ วิตามินหลายชนิด และกล้วยหอมยังทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ในอาหารเพาะเลี้ยงทำให้อาหารมีค่าพีเอชที่เหมาะสม (Arditti, 1968) อีกทั้ง กล้วยมีธาตุเหล็กซึ่งอยู่ในรูปที่กล้วยไม่สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและการเกิดรากได้ (Arditti and Ernst, 1993) เมื่อใช้ร่วมกับน้ำมะพร้าวและผงมันฝรั่งสามารถส่งเสริมให้โปรโตคอร์มมีการเจริญเติบโตที่ดีในทุกด้าน ซึ่งไม่สอดคล้องกับ Wu et al. (2012) ที่พบว่า อาหารสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ หรือที่เติมกล้วยบด 100 กรัมต่อลิตร ทำให้โปรโตคอร์มไลต์บอดี้ ที่ได้จากการชักนำจากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Renanthera imschootiana* Rolfe มีการพัฒนาในด้านความสูงยอด จำนวนราก และความยาวรากที่ดี และไม่สอดคล้องกับกุลนาถ ออบสุวรรณ และสุนทรี ทารพันธ์ (2559) ซึ่งพบว่าอาหารสูตร VW ร่วมกับกล้วยหอมทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม้สกุลหวายเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ถึงแม้ว่าอิทธิพลของสารประกอบอินทรีย์จะมีความซับซ้อนแต่ยังคงถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเสมอ (Yih Ng and Saleh, 2011) แทนการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เพราะสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชทำให้เกิด somaclonal ได้

ดังนั้นสารประกอบอินทรีย์จะเป็นองค์ประกอบพื้นฐานที่นิยมนำมาใช้ร่วมกับสูตรอาหารเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและในแต่ละช่วงการเจริญเติบโตของ วานเพรทิง จะมีการตอบสนองต่อสารอินทรีย์ ที่แตกต่างกัน ตั้งแต่การเพาะเลี้ยงเมล็ด วานเพรทิง การเติมผงมันฝรั่งร่วมกับน้ำมะพร้าวจะช่วยส่งเสริมให้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะใบ 2 ใบ (S5) ดีที่สุด และเมื่อโปรโตคอร์มพัฒนาเป็นต้นอ่อน การเติมกล้วยหอมบดร่วมกับน้ำมะพร้าว และการเติมสารอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน จะทำให้โปรโตคอร์มมีการพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่ดีในทุกด้าน จะเห็นได้ว่ากล้วยไม้แต่ละสายพันธุ์และแต่ละช่วงของการพัฒนา จะมีการตอบสนองต่อสารอินทรีย์ ที่แตกต่างกัน

5.3 ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการงอก การพัฒนาของเมล็ด และการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

ปัจจัยความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมีผลต่อการงอกของเมล็ด วานเพรทิง พบว่าการไม่เติมน้ำตาลซูโครส เมล็ดมีการงอกที่ดีไม่แตกต่างจากการเติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 10 - 20 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมน้ำตาลที่ 30-40 กรัมต่อลิตร ทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลดลง สอดคล้องกับ Peirik et al., (1988) รายงานว่าปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้การงอกของเมล็ด กล้วยไม้ *Paphiopedilum ciliolare* ลดลง จากการทดลองนี้ การเพาะเมล็ด วานเพรทิง ในอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลก็สามารถงอกได้ ซึ่งแตกต่างจาก Ernst and Arditti (1990) ที่พบว่ากล้วยไม้ *Phalaenopsis* ไม่สามารถงอกและพัฒนาได้ถ้าขาดน้ำตาล น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญของการพัฒนา เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตน้อยมาก จึงต้องการแหล่งคาร์โบไฮเดรตจากภายนอกเพื่อใช้ในการงอก (Kauth et al., 2008) แต่การทดลองนี้ไม่ได้ใส่น้ำตาลแต่เมล็ดยังสามารถงอกและพัฒนาได้ เนื่องจากการทดลองนี้ได้ใส่สารประกอบอินทรีย์ เช่น กล้วยหอมบดและมันฝรั่งผง ซึ่งถือเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตของเมล็ดกล้วยไม้ เพื่อใช้ในการงอก ส่วนปัจจัยร่วมระหว่างระดับความเข้มข้นของ

น้ำตาลกับสภาพแสง พบว่า ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ 0 - 20 กรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงในสภาพมืด/แสง มีเปอร์เซ็นต์งอกสูงที่สุด

ปัจจัยความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมีผลต่อการพัฒนาของเมล็ดเป็นโปรโตคอร์ม พบว่า เมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ 0-10 กรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงในสภาพมืด /แสง มีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะ S5 มากที่สุด และเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ 40 กรัมต่อลิตร ทั้ง 2 สภาพแสง โปรโตคอร์มมีการพัฒนาถึงแค่ระยะ S4 เท่านั้น เนื่องจากปริมาณน้ำตาลที่สูงเกินไปมีผลยับยั้งต่อการงอกและพัฒนาของโปรโตคอร์มได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Pimsen and Kanchanapoom (2011) ที่ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Grammatophyllum speciosum* Blume พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ โปรโตคอร์มมีการรอดชีวิตน้อยที่สุดเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าน้ำตาลทุกชนิดถ้าใส่ในปริมาณที่สูงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้

ปัจจัยความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมีผลต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม พบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มยอดแหลม และโปรโตคอร์มมีใบ 2 ใบ ในอาหารดัดแปลงสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 10 - 30 กรัมต่อลิตร มีแนวโน้มการพัฒนาเป็นต้นอ่อนดีในทุกด้าน คือ จำนวนราก ความยาวราก ความยาวใบ ความกว้างใบ ความสูงต้น และเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น สอดคล้องกับ บุญสนอง ช่วยแก้ว และจิรัชฐ์ ทางมีศรี (2553) ที่ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อต้นอ่อนว่านหางช้าง พบว่าอาหาร VW ที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับกล้วยหอมผสมมันฝรั่ง อย่างละ 50 กรัมต่อลิตร เติมน้ำมัน 1 กรัมต่อลิตร มีความยาวใบ ความกว้างใบ และจำนวนรากที่ดี น้ำตาลเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากพืชที่อยู่ในหลอดแก้วมีการสังเคราะห์ด้วยแสงน้อยหรือไม่มีการสังเคราะห์ด้วยแสง ดังนั้นน้ำตาลจึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญ และน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลที่นิยมใช้มากที่สุด เพราะหาได้ง่าย ราคาถูก จากการทดลองยังพบว่าอาหารที่เติมน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ทำให้อานเพชรหึงมีแนวโน้มการเจริญเติบโตที่ลดลง เนื่องจากปริมาณน้ำตาลซูโครสที่มากเกินไปมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pimsen and Kanchanapoom (2011) ที่ศึกษาชนิดน้ำตาลคือ sorbitol mannitol sucrose และ glucose ต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของว่านเพชรหึง พบว่าระดับน้ำตาลทุกชนิดที่เพิ่มขึ้นทำให้การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มไล่ระดับดีขึ้น แต่ระดับน้ำตาลที่ 6-8 เปอร์เซ็นต์ กลับทำให้มีการเจริญเติบโตที่น้อยลง และมีการเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดน้อย

5.4 ผลของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม อายุ 2 เดือน พบว่าอาหารสูตร VW และ ½ MS โปรโตคอร์มมีการพัฒนาในส่วนลำต้นและใบดีกว่าในอาหารสูตร NDM เนื่องจากในอาหารสูตร VW และ ½ MS มีปริมาณ Inorganic Nitrogen ที่อยู่ในรูป NH_4^+ มากกว่าในอาหารสูตร NDM ซึ่งในอาหารสูตร VW มี Inorganic Nitrogen ในรูป $\text{NH}_4^+ = 7.57 \text{ mM}$, $\text{NO}_3^- = 5.19 \text{ mM}$ อาหารสูตร ½ MS มี $\text{NH}_4^+ = 10.3 \text{ mM}$, $\text{NO}_3^- = 19.7 \text{ mM}$ และอาหารสูตร NDM มี $\text{NH}_4^+ = 6 \text{ mM}$, $\text{NO}_3^- = 11.9 \text{ mM}$ ซึ่งโปรโตคอร์มระยะเริ่มต้นจะนำ Inorganic Nitrogen ในรูป NH_4^+ ไปใช้ประโยชน์ Raghavan and Torrey (1964) พบว่าตั้งแต่เมล็ดกล้วยไม้เริ่มงอกไปจนถึง

ระยะโปรโตคอร์มเริ่มสร้างใบ 1-2 ใบแรก พืชจะใช้ Inorganic Nitrogen ในรูป NH_4^+ แต่หลังจากพัฒนาเป็นต้นอ่อนถึงสามารถใช้ Inorganic Nitrogen ในรูป NO_3^- ได้ เมื่อพิจารณาว่าอาหารสูตร 1/2 MS มีปริมาณ NH_4^+ มากกว่าในอาหารสูตร VW แต่กลับพบว่าการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มโดยรวมน้อยกว่าอาหารสูตร VW อาจเนื่องมาจากในอาหารสูตร 1/2 MS มีปริมาณ NH_4^+ มากเกินความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม วานเพชชิง แต่ยังไม่ได้ถึงมีความเป็นพิษต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม ในช่วงการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มไปจนถึงอายุ 5 เดือนซึ่งมีการพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์แล้ว การเจริญเติบโตในส่วนใบและความสูงต้น อาหารสูตร VW มีความเหมาะสมมากที่สุด รองลงมาคืออาหารสูตร 1/2 MS และตามด้วยอาหารสูตร NDM ซึ่งสอดคล้องกับ นันทิตา โยทานันท์ (2556) ที่ได้ศึกษาผลของสูตรอาหารสังเคราะห์ที่มีต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นอ่อน วานเพชชิง เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า โปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารสูตร VW และ 1/2 MS มีน้ำหนักสดและพัฒนารากใบที่ดีกว่าสูตรอื่น

การเจริญเติบโตทางราก กลับพบว่าโปรโตคอร์มทั้ง 2 ระยะที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NDM มีจำนวนรากและความยาวรากมากกว่าในอาหารสูตร VW และ 1/2 MS เนื่องจากในอาหารสูตร NDM มีฟอสฟอรัสในรูป KH_2PO_4 ปริมาณ 4.04 mM มากกว่าอาหารสูตร VW ที่มี 1.84 mM และ 1/2 MS ที่มี 0.63 mM เนื่องจากฟอสฟอรัสมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของรากพืช โดยธาตุฟอสฟอรัสจะช่วยให้รากของพืชแข็งแรง และแผ่กระจายได้รวดเร็วขึ้น (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2548) สอดคล้องกับ Rittirat et al. (2012) ได้เพาะเลี้ยง Protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้ *Phalaenopsis cornu-cervi* (Breda) Blume & Rchbf โดยเปรียบเทียบสูตรอาหาร NDM และ MS ที่เติมผงถ่าน 0.2 % ร่วมกับน้ำตาล 0-4 % พบว่าอาหารสูตร NDM ที่เติมน้ำตาล 4 เปอร์เซ็นต์ มีการจำนวนรากมากที่สุดคือ 8.9 รากต่อชิ้นส่วน จากการทดลองพบว่าสูตรอาหาร NDM จะส่งเสริมการเจริญเติบโตด้านรากได้ดี แต่ในด้านลำต้นกลับมีการเจริญเติบโตที่น้อยกว่าในอาหารสูตร VW และ 1/2 MS หากต้องการผลิตเป็นจำนวนมากในเชิงธุรกิจควรเลือกอาหารสูตร VW เนื่องจากมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มเป็นต้นอ่อนได้ดีในทุกด้าน ใช้ปริมาณและชนิดของสารเคมีที่น้อย ทำให้ประหยัดต้นทุนในการผลิตได้

การนำโปรโตคอร์มระยะต่าง ๆ มาใช้ในการเพาะเลี้ยง มีผลต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อน เนื่องจากโปรโตคอร์มทั้ง 2 ระยะ ได้จากการเพาะเมล็ดพร้อมกัน มีการงอกพร้อม ๆ กัน แต่โปรโตคอร์มใบ 2 ใบ มีการเจริญเติบโตเร็วกว่า เนื่องจากโปรโตคอร์มกลุ่มนี้มีพันธุกรรมด้านการเจริญเติบโตที่เด่นกว่า จึงทำให้มีการพัฒนาเร็วกว่าโปรโตคอร์มยอดแหลม นอกจากนั้นโปรโตคอร์มใบ 2 ใบ มีการพัฒนาในส่วนใบ ทำให้มีการสร้างพลังงานจากการสังเคราะห์แสงได้มากขึ้นร่วมกับโปรโตคอร์มสามารถนำ Inorganic Nitrogen ในรูป NO_3^- ไปใช้ประโยชน์ได้ดังที่กล่าวมาแล้ว จึงทำให้โปรโตคอร์มใบ 2 ใบ มีการพัฒนาได้รวดเร็วกว่าโปรโตคอร์มยอดแหลม ดังนั้นการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มควรเลือกโปรโตคอร์มระยะใบ 2 ใบ มาใช้เป็นชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น ทำให้ลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง และประหยัดต้นทุนในการผลิตอีกด้วย

5.5 ผลของการเก็บรักษาเมล็ดในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ

จากการทดลองการเก็บรักษาเมล็ด ว่านเพชรหึง พบว่า การเก็บเมล็ดในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน สามารถชักนำให้เมล็ดมีการงอกในสัปดาห์ที่ 7 หลังเพาะเมล็ด ซึ่งเร็วกว่าการเก็บรักษาเมล็ดในปัจจัยอื่น ๆ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ เมล็ดที่เก็บในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน การเก็บรักษาเมล็ดในอุณหภูมิต่ำในช่วงเวลาสั้น ๆ สามารถกระตุ้นให้เมล็ดมีการงอกที่ดีขึ้น เช่นเดียวกับงานทดลองของ Mweetwa et al. (2007) พบว่า การเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้ *Phalaenopsis* spp. ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วันก่อนนำมาเพาะเลี้ยง ทำให้เมล็ดมีการงอกเร็วขึ้น ซึ่งอุณหภูมิมีผลต่อการควบคุมและอัตราการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมี มีผลต่อการงอกของเมล็ด ในขณะที่จุดเยือกแข็งจะเป็นอันตรายสำหรับการงอกของเมล็ด (จวงจันทร ดวงพัตรา, 2529) และจากการทดลองครั้งนี้ พบว่า เมื่อทำการเก็บรักษาเมล็ดที่อุณหภูมิ 25 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน มีการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกหุ้มเมล็ด โดยเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเปลือกหุ้มเมล็ด (testa) โดยส่วนมากสีเมล็ดจะเข้มขึ้นเมื่อเก็บรักษานานขึ้น สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงคุณภาพเมล็ดได้ (วันชัย จันทรประเสริฐ , 2538) แต่การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกหุ้มเมล็ด ว่านเพชรหึง ในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้บ่งบอกถึงความสัมพันธ์กับการ งอกของเมล็ด เพราะเมล็ดที่เก็บ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีการเปลี่ยนแปลงสีเช่นเดียวกันกับเมล็ดที่เก็บ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่เมล็ดที่เก็บ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร สูตร VW มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ดี ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกหุ้มเมล็ดของว่านเพชรหึงไม่ได้เป็นตัวบ่งชี้เปอร์เซ็นต์การงอกและความแข็งแรงของเมล็ด การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกหุ้มเมล็ดเกิด ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ทำให้เกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (สุปราณี งามประสิทธิ์, 2554) โดย Nozzolillo and Bezada (1984) พบว่า การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกหุ้มเมล็ด เกิดจากความชื้นสูงสัมผัสกับอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส จะมีการเปลี่ยนแปลงสีภายในเวลา 3 สัปดาห์หรือน้อยกว่านี้ ซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ (polymerization) ของสารประกอบแทนนิน (tannins) จึงทำให้เกิดสีน้ำตาลของเปลือกหุ้มเมล็ด ดังนั้นเมล็ดที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ - 80 - 20 และ 10 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิต่ำ ทำให้มีการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลน้อยหรือไม่เกิดจึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีเปลือกหุ้มเมล็ด

จากการทดลองการเก็บรักษาเมล็ดว่านเพชรหึง พบว่า การเก็บเวลาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาเมล็ดให้มีความมีชีวิตได้นาน และมีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาที่ดี การเก็บที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะทำให้เมล็ดสูญเสียความมีชีวิตอย่างรวดเร็ว ซึ่งสูญเสียความมีชีวิตหลังเก็บรักษาที่ 30 วัน เมื่อนำเมล็ดมาย้อมสี TTC จะทำให้ติดสีน้ำตาล (ดังภาพที่ 2) และเมื่อนำไปเพาะ พบว่าไม่มีการงอก สาเหตุที่เมล็ดติดสี น้ำตาล คาดว่า เอ็มบริโอภายในเมล็ดเกิดความบอบช้ำจากอุณหภูมิที่สูงเกินความเหมาะสมต่อการเก็บรักษา เมื่อนำเมล็ดมาย้อมสี เอ็มบริโอจะมีอัตราการดูดสารในปริมาณที่เร็วกว่าเอ็มบริโอปกติจึงทำให้เอ็มบริโอติดสีเข้มกว่าเอ็มบริโอปกติ (วสุ อมฤตสุทธิ และไพลิน ภิญโญ , 2553) ซึ่งสอดคล้องกับ Hay et al. (2010) ที่ได้ทำการเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้ 10 สายพันธุ์ คือ *Caladenia arenicola*, *Caladenia flava*, *Caladenia huegelii*, *Diuris fragrantissima*, *Diuris laxiflora*, *Microtis media* subsp. *media*, *Pterostylis recurva*, *Pterostylis sanguinea*, *Thelymitra crinite* และ *Thelymitra macrophylla* ในสภาวะที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ

มีความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ทุกสายพันธุ์สูญเสียความมีชีวิตอย่างรวดเร็วไม่ถึงเวลา 60 วันหลังการเก็บรักษา เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้ไม่เหมาะสมต่อการเก็บในสภาวะนี้เมื่อเทียบกับการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์อื่น ๆ ที่ไม่ใช้กล้วยไม้ ที่สามารถเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในสภาวะนี้ได้ยาวนานกว่า 120 วัน และจากผลการทดลองพบว่าเมื่อเก็บรักษาเมล็ดที่ - 20 องศาเซลเซียส จะสูญเสียความมีชีวิตรวดเร็วกว่าเมล็ดที่เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับ Vudala and Ribas (2017) ที่ทำการเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้ *Hadrolaelia grandis* ที่อุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 30 และ 36 เดือน พบว่า เมล็ดที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สูญเสียความมีชีวิตรวดเร็วกว่าเมล็ดที่เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สาเหตุยังไม่แน่ชัด อาจเกิดจากความชื้นสัมพัทธ์ของสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส Thornhill and Koopowitz (1992) ได้แนะนำการเก็บรักษาเมล็ดในระยะยาวควรเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า - 70 องศาเซลเซียส และควรมีสาร cryoprotective agent เพื่อป้องกันความเสียหายจากการเกิดน้ำแข็งภายในเอ็มบริโอ ซึ่งการทดลองครั้งนี้ เมล็ดที่เก็บในสภาวะ - 80 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส มีการสูญเสียความมีชีวิตเร็วกว่าเมล็ดที่เก็บในสภาวะที่ 25 องศาเซลเซียส เพราะการเก็บรักษาเมล็ดว่านเพชรหึง ครั้งนี้ ไม่ได้ใส่สาร cryoprotective agent จึงทำให้เมล็ดที่เก็บในสภาวะอุณหภูมิต่ำ ๆ ทำให้เกิด Freeze injury ของเอ็มบริโอภายในเมล็ด

จากการศึกษาการดูดความชื้นก่อนทำการเก็บรักษา พบว่า เมล็ดมีความชื้นก่อนทำการเก็บรักษา สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำการเก็บรักษาเมล็ดโดยไม่ทำการดูดความชื้นเพียงแค่ 1 สัปดาห์ มีเชื้อราเกิดขึ้น ในขณะที่เมล็ดที่ทำการดูดความชื้นก่อนทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในโถดูดความชื้น พบว่าเมล็ดมีความชื้นลดลงเหลือ 13-15 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีเชื้อราเกิดขึ้น หลังจากทำการเก็บรักษา และเมื่อทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิ 10 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เมล็ดที่เก็บในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่าเมล็ดที่เก็บในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เนื่องจากเมล็ดที่เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการเก็บในโถดูดความชื้นที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 10-20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความชื้นสัมพัทธ์บริเวณรอบหลอดบรรจุเมล็ดต่ำกว่าเมล็ดที่เก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ที่ทำการเก็บรักษาภายในตู้เย็นที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 70-80 เปอร์เซ็นต์ โดยความชื้นของเมล็ดมีความสัมพันธ์กับบรรยากาศรอบ ๆ เมล็ด และความชื้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับอายุการเก็บรักษามากกว่าอุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษา (วสุ อมฤตสุทธิ, 2549)

จากการทดลองทั้ง 2 การทดลอง คือเก็บรักษาเมล็ดโดยไม่ดูด (การทดลองที่ 1) กับดูดความชื้นก่อนทำการเก็บรักษา (การทดลองที่ 2) ในครั้งนี้มีแนวโน้มเหมือนกัน คือ พบว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาเมล็ดให้มีชีวิตได้นานที่สุด ซึ่งไม่สอดคล้องกับ อารักษ์ จันทศิลป์ และรัตน หิรัญพันธุ์ (2549) โดยทำการเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้มาว้างด้วยกระดาษอะลูมิเนียมแล้วพับใส่ขวดเลี้ยงเชื้อ โดยภายในขวดใส่ silica gel ไว้ประมาณครึ่งขวด พบว่า การเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้มาว้างที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพียงแค่ 10 วัน ทำให้เมล็ดสูญเสียการงอกหรืองอกน้อยมาก ซึ่งการทดลองครั้งนี้ พบว่า การเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมล็ดมีการงอกที่ดีและสามารถพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะ S5 ได้ แต่เมื่อเก็บรักษาถึง 360 วัน เมล็ดได้สูญเสียความมีชีวิตทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับ Mweetwa et al. (2007) ได้ศึกษาการเก็บเมล็ดกล้วยไม้ *Phalaenopsis spp.* พบว่าเมื่อเก็บรักษาเมล็ดในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 เดือน เมล็ดได้สูญเสียการงอกทั้งหมด

จากการทดลองในครั้งนี้ทำให้ทราบว่า การเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำโดยเก็บในโถดูดความชื้น สามารถเก็บรักษาเมล็ดว่านเพชรหึงได้นานที่สุดคือ 9 เดือน

5.6 ผลของการศึกษากายวิภาคของเมล็ดและโปรโตคอร์มของว่านเพชรหึง

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของเมล็ดกล้วยไม้ จะพบว่าเมล็ดกล้วยไม้จะมีเอ็มบริโอ (Embryo) ขนาดเล็กกว่าเปลือกหุ้มเมล็ด (testa) ค่อนข้างมาก โดยภายในมีช่องว่างขนาดใหญ่ โดยเป็นการปรับตัวของเมล็ด (Gallo et al., 2016) เพื่อให้เมล็ดสามารถลอยไปกับอากาศและทำให้เมล็ดแยกย้ายกันไปได้ไกลเมื่อหลุดออกจากฝัก (Arditti, 1992) โดยเปลือกหุ้มเมล็ดของเมล็ดกล้วยไม้มีเพียง 1 ชั้นเท่านั้น (Gallo et al., 2016) เอ็มบริโอที่อยู่ภายในเมล็ดจะมีการแบ่งเซลล์และเกิดการขยายขนาดจนต้นเปลือกหุ้มเมล็ดแตกออกมา มีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มบวมสีขาว เนื่องจากยังไม่มีสารสังเคราะห์ด้วยแสงทำให้ยังไม่มีโครงสร้างคลอโรฟิลล์ จะพบว่าโปรโตคอร์มในระยะนี้มีเซลล์ที่เป็นรูปร่างที่ไม่แน่นอน (Irregular shape) เมื่อทำการให้แสงกับโปรโตคอร์มไม่นานโปรโตคอร์มจะเริ่มมีการกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงมีการสร้างคลอโรฟิลล์ และเริ่มมีการสร้าง Rhizoid (papillae) (Withner, 1959) โดยพบ Rhizoid บริเวณที่โปรโตคอร์มสัมผัสกับอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อทำหน้าที่ดูดซึมสารอาหาร (Arditti, 1992) และยังเป็น micropylar region เพื่อให้เชื้อ mycorrhiza ผ่านเข้าเนื้อเยื่อพืชบริเวณนี้อีกด้วย (Pereira et al, 2015) อีกทั้งยังพบว่าโปรโตคอร์มเริ่มมีการพัฒนาเนื้อเยื่อเจริญอยู่ภายใน จากนั้นบริเวณเนื้อเยื่อเจริญนี้จะมีการพัฒนาไปเป็นส่วนยอด และใบ ทำให้เห็นเป็นยอดแหลม และได้มีการสร้างกลุ่มเนื้อเยื่อที่จะพัฒนาไปเป็นกลุ่มท่อลำเลียง สอดคล้องกับการทดลองของ Pereira et al. (2015) ที่พบว่าโปรโตคอร์มที่มียอดแหลม บริเวณภายในโปรโตคอร์มจะพบกลุ่มเนื้อเยื่อที่จะพัฒนาไปเป็น xylem และ phloem จากนั้นบริเวณยอดแหลมเริ่มมีการสร้างใบ และกลุ่มท่อลำเลียงจะมีการเชื่อมต่อกับบริเวณยอด เช่นเดียวกับโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Cyrtopodium glutiniferum* ที่ทำการเพาะเมล็ดแบบ Symbiosis เมื่อโปรโตคอร์มอยู่ในระยะมีใบ จะพบกลุ่มท่อลำเลียงเชื่อมต่อกันกับบริเวณยอด (Pereira et al, 2015) จากการศึกษากายวิภาคของเมล็ดและโปรโตคอร์มระยะต่าง ๆ พบว่าการงอกและการพัฒนาเริ่มต้นของโปรโตคอร์มมีโครงสร้างและระยะการพัฒนาลำดับ ๆ กันทั้งการเพาะเมล็ดแบบ Asymbiosis และการเพาะเมล็ดแบบ Symbiosis ซึ่งขั้นตอนการพัฒนา คือ เมื่อเมล็ดงอกและพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม โปรโตคอร์มจะมีการสร้าง Rhizoid จากนั้นโปรโตคอร์มจะสร้างเนื้อเยื่อเจริญเพื่อพัฒนาเป็นส่วนยอดและมีการสร้างใบตามลำดับ สุดท้ายจะมีการเกิดรากจนกลายเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ (Hoang et al., 2016)

5.7 ผลของวัสดุที่เหมาะสมต่อการย้ายออกปลูก

จากการศึกษาวัสดุปลูกที่มีความเหมาะสมต่อการย้ายออกปลูกของ ว่านเพชรหึง 3 เดือน พบว่าว่านเพชรหึงที่ปลูกในกาบมะพร้าวสับ และสแฟกนัมมอส มีการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ที่ดีในทุกด้าน เนื่องจากกาบมะพร้าวสับ และสแฟกนัมมอส มีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำได้ดี ซึ่งมีความชื้นเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของว่านเพชรหึงมากกว่าถ่าน และเปลือกไม้ ที่มีความสามารถเก็บความชื้นได้น้อยกว่า แต่การเจริญเติบโตด้านความยาวรากกลับพบว่า ว่านเพชรหึงที่ปลูกในถ่าน และเปลือกไม้ มีความยาวรากมากกว่า ที่ปลูกในกาบมะพร้าวสับ และสแฟกนัมมอส เนื่องจากถ่าน และเปลือกไม้ อุ้มความชื้นได้

น้อยทำให้รากเกิดการตอบสนองต่อความเครียดในสภาวะขาดน้ำอ่อน ๆ โดยระบบรากจะหยั่งลึกเพื่อหาน้ำเป็นการรักษาความสมดุลของน้ำในต้นพืช นอกจากมีผลต่อระบบรากพืช แล้วการขาดน้ำยังมีผลต่อการเจริญเติบโตของส่วนใบ โดยพืชจะมีการลดขนาดของใบ เพื่อเป็นการลดการใช้พลังงาน และการคายน้ำ โดยอาหารที่พืชสร้างได้ส่วนใหญ่จะถูกส่งไปยังระบบรากซึ่งจะเป็นตัวสนับสนุนการเจริญเติบโตของรากมากกว่าส่วนใบ (นวรรตน์ อุดมประเสริฐ, 2558) จึงทำให้ว่านเพชรหึงที่ปลูกในถ่าน และเปลือกไม้ มีการเจริญเติบโตที่น้อยกว่าวัสดุปลูกอื่น ๆ ถึงแม้ว่าความยาวรากของ ว่านเพชรหึง ที่ปลูกในถ่าน และเปลือกไม้ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับว่านเพชรหึงที่ปลูกในขุยมะพร้าว แต่รากของ ว่านเพชรหึงที่ปลูกในขุยมะพร้าวมีอาการฉ่ำ น้ำและมีการเกิดโรคเน่าขึ้น ซึ่งไม่สอดคล้องกับ สมบูรณ์ ระดม และแสงเดือน อินชนบท (2555) เปรียบเทียบวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ ว่านเพชรหึง 5 วัสดุปลูก ได้แก่ กาบมะพร้าว มอสจีน ถ่าน หินภูเขาไฟ และอิฐมอญ พบว่า จำนวน ราก รากยาว เส้นผ่าศูนย์กลางต้น และความสูงต้น ทุกวัสดุปลูกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เนื่องจากการศึกษาของสมบูรณ์ ระดม และแสงเดือน อินชนบท ใช้ต้นว่านเพชรหึงโดยใช้หน่อที่แยกจากต้นแม่พันธุ์ ซึ่งทำให้ต้นกล้วยไม้ไม่สามารถปรับตัวได้ดีในทุกวัสดุปลูกมากกว่าต้น ว่านเพชรหึง ที่ย้ายออกปลูกจากหลอดทดลองในสภาพปลอดเชื้อ จึงทำให้ทุกวัสดุปลูกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และจากการสังเกตเมื่อย้ายออกปลูกเป็นเวลา 4 - 5 เดือน พบว่า ว่านเพชรหึงที่ปลูกในกาบมะพร้าวสับ และสแฟกนัมมอส ทำให้มีแนวโน้มการเจริญเติบโตที่ดีในด้านความสูงต้น เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น จำนวนใบ ความยาวใบ และความกว้างใบ ดีกว่าวัสดุปลูกอื่น เนื่องจากว่านเพชรหึงที่ปลูกในกาบมะพร้าวสับ และสแฟกนัมมอส มีคุณสมบัติการอุ้มน้ำที่ดีและมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต อีกทั้งว่านเพชรหึงเป็นกล้วยไม้รากกึ่งอากาศจะชอบความชื้นมากกว่ากล้วยไม้รากอากาศ แต่กลับพบว่า การใช้ขุยมะพร้าวเป็นวัสดุปลูกที่มีคุณสมบัติสามารถอุ้มน้ำได้มาก กลับทำให้การเจริญเติบโตน้อยกว่า ว่านเพชรหึงที่ปลูกในกาบมะพร้าวสับ และสแฟกนัมมอส เพราะขุยมะพร้าวมีการอุ้มน้ำที่มากเกินไป (สุเมธ รอดหิรัญ และธรรมศักดิ์ ทองเกตุ, 2557) ทำให้การเกิดโรคเน่าได้ง่ายและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ ซึ่งกาบมะพร้าวสับ และ สแฟกนัมมอส นอกจากมีความสามารถอุ้มน้ำได้ดี แต่ยังมีการระบายอากาศที่ดีซึ่งมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ ว่านเพชรหึง ที่เป็นกล้วยไม้รากกึ่งอากาศ ซึ่งงานวิจัยของ อัญญา จันทรปะทิว และคณะ (2557) พบว่าการย้ายว่านเพชรหึงออกปลูกโดยใช้ กาบมะพร้าวสับ: ถ่าน (1:1) เป็นวัสดุปลูก มีความเหมาะสมต่อการส่งเสริมการพัฒนาของ ว่านเพชรหึง มากที่สุด เนื่องจาก กาบมะพร้าวสับเป็นวัสดุปลูกที่สามารถเก็บความชื้นได้ดี แต่ข้อเสียของกาบ มะพร้าวคือถ้ารดน้ำมากเกินไป กาบมะพร้าวจะอุ้มน้ำไว้มากและอาจทำให้รากเน่าได้ง่าย การผสมถ่านจะทำให้มี การระบายน้ำ และการถ่ายเทอากาศรอบ ๆ ระบบรากได้ดี แต่เนื่องจากงานวิจัยของอัญญา จันทรปะทิว และคณะ ไม่ได้ระบุความถี่ในการรดน้ำ ซึ่งการทดลองในครั้งนี้ได้มีการรดน้ำสัปดาห์ละ 3 ครั้ง ทำให้การใช้วัสดุปลูกคือกาบมะพร้าวสับหรือสแฟกนัมมอสเพียงอย่างเดียวก็มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ ว่านเพชรหึง โดยไม่มีการเกิดโรคเน่า แต่ถ้ามีการรดน้ำทุกวันควรเพิ่มความโปร่งของวัสดุปลูกให้มีการระบายน้ำได้ดีขึ้นด้วยการผสมถ่านหรือเปลือกไม้ เพื่อเป็นการเพิ่มช่องว่างของวัสดุปลูกจะทำให้มีการระบายน้ำและอากาศได้ดี เพราะ ว่านเพชรหึง เป็นกล้วยไม้รากกึ่งอากาศที่ต้องการความชื้นและการระบายอากาศที่ดี

5.8 ผลของการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสและวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากว่านเพชรหึง

เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ชนิดต่าง ๆ เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Shihabudeen, Priscilla and Thirumurugan, 2011) การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสทำให้สามารถชะลอการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือด เพื่อเป็นการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (ปนัดดา ทินบุตร และจินดารัตน์ พิมพ์สมาน , 2554) ดังนั้นการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส มีความสำคัญเพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาโรคเบาหวาน จึงได้ทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสของ ว่านเพชรหึง โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Acarbose ซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวาน พบว่า ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสของส่วนเหง้า + ราก ของต้นอายุ 6 ปี มีค่าร้อยละการยับยั้งในปริมาณที่สูงกว่าส่วนอื่น ๆ เนื่องจากการสะสมสารฟลักซ์เคมีที่มีความสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสในส่วนเหง้า + รากมากกว่าส่วนอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนเหง้า+ราก ในระยะอายุต่าง ๆ พบว่า ต้นอายุ 6 ปี มีความสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้มากกว่าเหง้า+รากของต้นอายุ 1 ปี และต้นในเขตเพาะเลี้ยง เนื่องจากต้นอายุ 1 ปี และต้นในเขตเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อยู่ในระยะ juvenile ซึ่งจะมีการสร้างสารปฐมภูมิ (primary metabolite) เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตมากกว่าการสร้างสารทุติยภูมิ (Secondary Metabolites) โดยที่ต้นอายุ 6 ปี มีการสร้างสารทุติยภูมิมากกว่า จึงทำให้ส่วนเหง้า + รากของต้นที่มีอายุมาก มีการสร้างสารทุติยภูมิที่มีความสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ดีกว่า และเมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) กับสารมาตรฐาน Acarbose พบว่าส่วนเหง้า+รากของต้นอายุ 6 ปี มีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 443 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าสารมาตรฐาน Acarbose ที่มีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 390 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยค่า IC_{50} บ่งบอกความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นส่วนเหง้า + ราก ของต้นอายุ 6 ปี ต้องใช้ปริมาณความเข้มข้นของสารมากกว่าสารมาตรฐาน Acarbose จึงจะสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ว่านเพชรหึงที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสแล้ว ยังมีงานวิจัยที่ได้มีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสในกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ เช่น Haridas et al. (2017) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจาก *Malaxis rheedei* SW. ที่ทำการสกัดทั้งต้น พบว่า มีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 407 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่งานวิจัยนี้ไม่มีสารมาตรฐานเพื่อใช้เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส Inthongkaew et al. (2017) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจาก *Dendrobium formosum* ใช้ทั้งต้นและได้ทำการสกัดสารบริสุทธิ์ โดยพบว่าสารบริสุทธิ์ที่มีชื่อ 5-Methoxy-7-hydroxy-9,10-dihydro-1,4-phenanthrenequinone มีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 126 ไมโครโมลาร์ และสารบริสุทธิ์ที่มีชื่อ confusarin มีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 189 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Acarbose มีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 745 ไมโครโมลาร์ จะเห็นได้ว่าสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 สารที่สกัดได้ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสดีกว่าสารมาตรฐาน Acarbose ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยว่านเพชรหึงครั้งนี้ที่พบว่า ตัวอย่างกล้วยไม้มีฤทธิ์ยับยั้งได้น้อยกว่าสารมาตรฐาน Acarbose เพราะงานวิจัยครั้งนี้ทำการสกัดตัวอย่างจากส่วนต่าง ๆ โดยไม่ได้สกัดแล้ว

แยกให้เป็นสารบริสุทธิ์ จึงทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา- กลูโคซิเดสแตกต่างจากงานวิจัยของ Inthongkaew et al. (2017) ซึ่งทำการแยกสารบริสุทธิ์ จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ได้ดีกว่า อีกทั้งกล้วยไม้แต่ละชนิดจะมีสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยสารอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า ส่วนใบและเหง้า+ราก ของต้นอายุ 6 ปี มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และเมื่อหาค่าความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) พบว่าเหง้า+ราก ของต้นอายุ 6 ปี มีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่าในส่วนใบและส่วนใบของต้นอายุ 1 ปี เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ที่มีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าจากตัวอย่างของ วานเพชรหึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน ได้มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระของ กล้วยไม้ เช่น Nguyen et al. (2018) ได้ทำการศึกษาศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระของ *Phalaenopsis* 3 สายพันธุ์ คือ *Phal.* ‘City More’, *Phal.* ‘Sogo Meili’ และ *Phal.* ‘Queen Beer’ พบว่าส่วนใบของ *Phal.* ‘City More’ มีค่า IC_{50} น้อยที่สุด คือมีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน butylated hydroxytoluene (BHT) มีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 0.51 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ Minh et al. (2016) ได้ทำการศึกษาศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระของ ลูกผสม *Phalaenopsis* 6 สายพันธุ์ คือ *Phal.* ‘Green Field Sweet Valentine “Montclair”’, *Phal.* ‘Sakura Hime SH’, *Phal.* ‘Sogo Yukidian “V3”’, *Phal.* ‘Chian Xen Queen’, *Phal.* ‘Fusheng’s Bridal Dress “Meidarland”’ และ *Phal.* ‘Younghome Golden Leopard “Peachy”’ โดยแบ่งเป็นส่วนใบและราก พบว่า ส่วนรากทุกสายพันธุ์มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ได้ดีกว่าส่วนใบ โดยส่วนรากมีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 0.087-0.100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนใบมีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 0.430-0.645 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน BHT มีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 0.019 ซึ่งส่วนรากมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าสารมาตรฐาน แต่จะเห็นได้ว่ารากมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าส่วนใบเช่นเดียวกับงานวิจัยครั้งนี้ ที่พบว่าส่วนเหง้า+ราก มีค่า IC_{50} ได้ดีกว่าส่วนใบ จะเห็นได้ว่ากล้วยไม้แต่ละชนิดในแต่ละส่วนของต้นจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ไม่เหมือนกัน

ดังนั้นการใช้ส่วนเหง้า + ราก ของต้นอายุ 6 ปี ทั้งในรูปตัวอย่างสดหรือตัวอย่างแห้ง จึงมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสเพื่อเป็นทางเลือกกับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานชนิดไม่ต้องพึ่งพาอินซูลิน และส่วนเหง้า+ราก หรือ ส่วนใบของต้นอายุ 6 ปี นำไปใช้ประโยชน์ในการต้านอนุมูลอิสระต่อไปในอนาคต

บทที่ 6

สรุป

6.1 การศึกษาองค์ประกอบอาหารและสภาพแสงต่อการงอกและพัฒนาของเมล็ด

เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงเมื่อเพาะเมล็ดในสภาพมืด/แสง และเลี้ยงบนอาหารที่เติมกล้วยหอมบดร่วมกับผงมันฝรั่ง หรืออาหารที่เติมกล้วยหอมบดร่วมกับน้ำมะพร้าว หรืออาหารที่เติมผงมันฝรั่งร่วมกับน้ำมะพร้าว โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอก 90-94 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่เติมผงมันฝรั่งร่วมกับน้ำมะพร้าว ส่งเสริมให้โปรโตคอร์มมีการพัฒนา เป็นระยะใบ 2 ใบ (S5) สูงที่สุด โดยมีการพัฒนาที่ 65 เปอร์เซ็นต์

6.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาล และสภาพแสงต่อการงอกและพัฒนาของเมล็ด

เมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม น้ำตาลซูโครสระดับความเข้มข้นที่ 0-20 กรัมต่อลิตร ในสภาพมืด/แสง มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอก 95-97 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ 0-10 กรัมต่อลิตร ในสภาพมืด /แสง ส่งเสริมให้โปรโตคอร์ม มีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะ S5 มากที่สุด โดยมีการพัฒนาที่ 33 เปอร์เซ็นต์

6.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

โปรโตคอร์ม ระยะใบ 2 ใบ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงทำให้มีพัฒนาการเป็นต้นอ่อนดีกว่าและรวดเร็ว กว่าโปรโตคอร์มระยะยอดแหลม โดยมีความยาวใบและความสูงต้น มากกว่า สูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงโปรโตคอร์มว่านเพชรหึง คือ อาหารสูตร VW ส่วนอาหารสูตร NDM มีแนวโน้มส่งเสริมการพัฒนาในส่วนรากที่ดี

6.4 การศึกษาองค์ประกอบในอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

ระยะโปรโตคอร์มใบ 2 ใบ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมกล้วยหอมบดร่วมกับน้ำมะพร้าวและอาหารสูตร VW ที่เติมกล้วยหอมบดร่วมกับผงมันฝรั่งและน้ำมะพร้าว (ภาพที่ 6.1) ส่งเสริมให้โปรโตคอร์มมีการ พัฒนาที่ดี ทั้งในด้านจำนวนราก ความยาวราก เส้นผ่านศูนย์กลางราก จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ ความสูงต้น และเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น

6.5 การศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 10 – 30 กรัมต่อลิตร ในอาหารดัดแปลงสูตร VW (Vacin and Went) ส่งเสริมให้โปรโตคอร์มกล้วยไม้เพชรหึงมีการเจริญเติบโตที่ดีในทุกด้าน

6.6 การศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ

เมล็ดที่เก็บในอุณหภูมิ 25 °C สามารถเก็บรักษาความมีชีวิตของเมล็ดได้นานที่สุด โดยสามารถเก็บรักษาได้ถึง 270 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 84.75 เปอร์เซ็นต์ และปัจจัยการเก็บที่อุณหภูมิ 25 °C มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดคือ 77.77 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งเมล็ดที่เก็บที่ 25 °C มีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะ S5 (โปรโตคอร์มมีใบ 2 ใบ) ค่าเฉลี่ยมากที่สุดคือ 24.05 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการงอกของเมล็ด พบว่า เมล็ดที่เก็บในอุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 15 และ 30 วัน และเมล็ดที่เก็บในอุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 30 วัน เมล็ดมีการงอกในสัปดาห์ที่ 7-8 สัปดาห์หลังการเพาะเมล็ด และเมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 360 วัน เมล็ดที่ทำการเก็บรักษาทุกอุณหภูมิได้สูญเสียความมีชีวิตทั้งหมด

เมล็ดที่ทำการดูความขึ้น 2 สัปดาห์ก่อนเก็บรักษา เมล็ดมีความขึ้นประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ โดยเมล็ดเก็บที่อุณหภูมิ 25 °C มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่ 58.03 เปอร์เซ็นต์ และระยะวันที่ทำการเก็บรักษา 15-30 วัน ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่ 63.90- 58.59 เปอร์เซ็นต์

6.7 การศึกษากายวิภาคของเมล็ดและโปรโตคอร์มของกล้วยไม้เพชรหิิง

การศึกษากายวิภาคโปรโตคอร์มของกล้วยไม้เพชรหิิงหลังจากการเพาะเมล็ด เอ็มบริโอมีการแบ่งเซลล์แล้วพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม ซึ่งมีการพัฒนาของกลุ่มเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic cell) จากนั้นเนื้อเยื่อเจริญพัฒนาเป็นส่วนยอดและมีการพัฒนาของกลุ่มท่อลำเลียง (vascular bundle) จนเกิดเป็นต้นอ่อน

6.8 การศึกษาวัสดุที่เหมาะสมต่อการย้ายออกปลูก

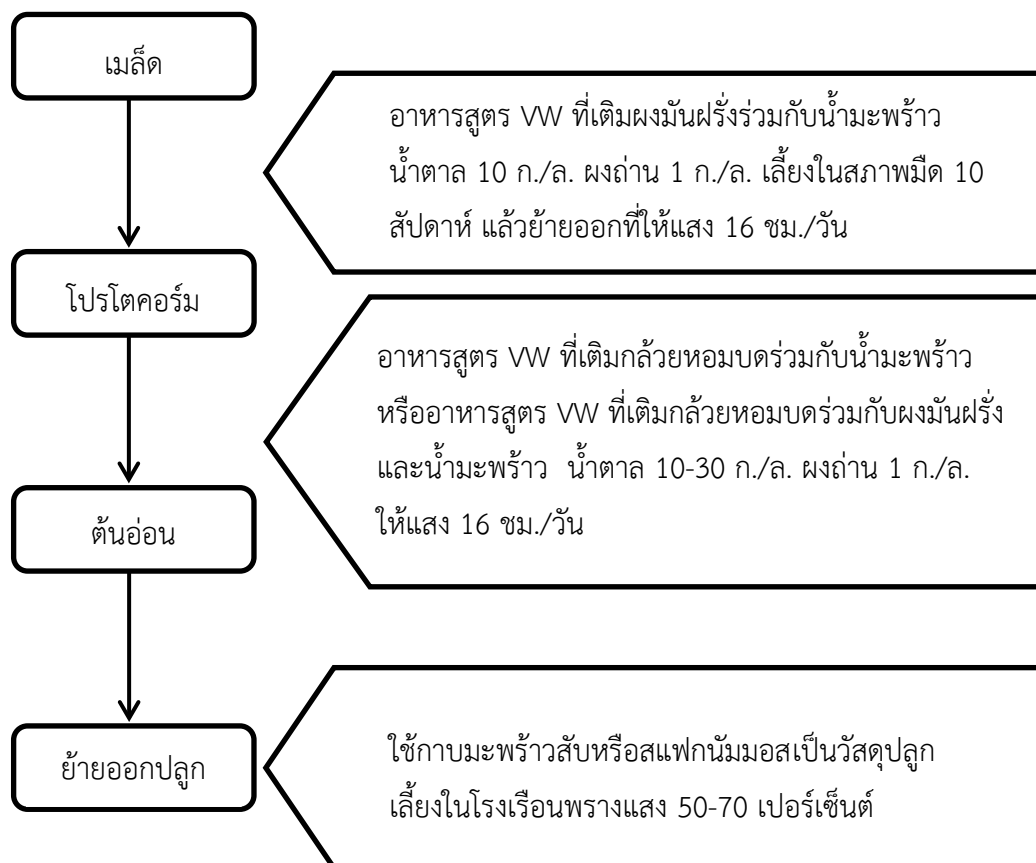
กาบมะพร้าวสับ หรือ สแฟกนัมมอส มีความเหมาะสมต่อการย้ายออกปลูกของต้นอ่อนกล้วยไม้เพชรหิิง โดยมีการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ที่ดีในทุกด้าน และเมื่อใช้ขุยมะพร้าวเป็นวัสดุปลูกทำให้เกิดโรคเน่า

6.9 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา- กลูโคซิเดสและวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากกล้วยไม้เพชรหิิง

ส่วนเหง้า+ราก ของกล้วยไม้เพชรหิิงอายุ 6 ปี มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสคิดเป็นร้อยละ 84-85 ของตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง และมี ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) ที่ความเข้มข้น 443.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Acarbose ซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวาน มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสคิดเป็นร้อยละ 94 และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) ที่ความเข้มข้น 390.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

ส่วนใบและเหง้า +ราก ตัวอย่างสดของต้นอายุ 6 ปี มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH 77.68 และ 76.95 ตามลำดับ ส่วนใบของต้นอายุ 1 ปี ตัวอย่างสด มี เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ 56.02 เมื่อทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) ส่วนใบและเหง้า+ราก ตัวอย่างสดของต้นอายุ 6 ปี มีค่า IC₅₀ ที่ความเข้มข้น 32 และ 17 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ส่วนใบของ

ต้นอายุ 1 ปี มีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ที่มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 83.85 และมีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 7.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 6.1 สรุปสถานะที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ว่านเพชรหึงในสภาพปลอดเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

- กาญจนา รุ่งรัชกานนท์. **กล้วยไม้: เทคโนโลยีและการประยุกต์ใช้งาน**. อุบลราชธานี: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2555.
- กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ และรัตนา นาวิ. “ผลของแสงและองค์ประกอบของอาหารต่อการงอกของเมล็ดและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสลูกผสมดอกใหญ่สีขาวในสภาพปลอดเชื้อ”, **วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์**. 4(3): 29-34; กรกฎาคม-กันยายน, 2560.
- กุลนาถ อบสุวรรณ และสุนทรี ทารพันธ์. “ผลของสูตรอาหารต่อการเติบโตของต้นกล้วยไม้สกุลหวาย *D. Fleischeri* และ *D. Judy Rutz*”, **Veridian E-journal Science and Technology Silpakorn University**. 3(6): 340-348; พฤศจิกายน-ธันวาคม, 2559.
- คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. “การพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรสู่ตลาดสากล”, ใน **การประชุมเชิงปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม 1**. น.1-4. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2546.
- ครรชิต ธรรมศิริ. **เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้**. กรุงเทพฯ: อัมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, 2547.
- คำณูณ กาญจภูมิ. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2544.
- จวงจันทร์ ดวงพัตรา. **เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์**. กรุงเทพฯ: ทังฮั่วชิน, 2529.
- ชยพร แอคะรัตน์. 2552. “การนำเปลือกไม้มาปลูกกล้วยไม้”, **ตำรากกล้วยไม้ ออนไลน์**. www.gotoknow.org/posts/249487. 25 มีนาคม, 2559.
- ชัยชาญ มณีนรุตม์ รุ่งโรจน์ ศรีสังวาล ลายวิเศษกุล และอนุพันธ์ กงบังเกิด. “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สิงโตประหลาด”, **Naresuan University Journal**. 7(2): 45-59; กันยายน, 2554.
- ณัฏชา วิสุทธิเทพกุล. “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหายากและใกล้สูญพันธุ์”, ใน **การประชุมความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้และสัตว์ป่า**. น.368-374. เพชรบุรี: สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช, 2548.
- เดชา ศิริภัทร. “เพชรหึง กล้วยไม้ยักษ์ที่คนไทยเรียกว่าว่าน”, **นิตยสารหมอชาวบ้าน**. 31(364): 16-17; สิงหาคม, 2552.
- ธนากร วงษ์ศา และคณะ. “ผลขององค์ประกอบอาหารต่อการเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้ *Vandopsis gigantea* (Lindl.) Pfitz.) ในสภาพปลอดเชื้อ”, **สัปดาห์วารสารการวิจัย**. 18(2): 11-21; กรกฎาคม, 2555.
- ธนาภรณ์ แซ่มเย็น. **ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2553.
- นฤทธิ เจริญกิจประเสริฐ. **คู่มือปลูกเลี้ยงกล้วยไม้**. กรุงเทพฯ: เกษตรสยามบุ๊คส์, 2550

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- นริศรา การภักดี และภัทรวดี โตปรางกอบสิน. “สารสกัดจากใบขนุนเพื่อศึกษาการยับยั้ง α -Glucosidase”, ใน การประชุมวิชาการปัญญาภิวัฒน์ครั้งที่ 4. น.F41-F46. นนทบุรี: สถาบันการจัดการปัญญาภิวัฒน์, 2557.
- นวรรตน์ อุดมประเสริฐ. **สรีรวิทยาของพืชภายใต้สภาวะเครียด**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2558.
- นาคยา มนตรี, ผัสโสภาคย์ รัตนบันดาล และกนกพร บุญญะอดิชาติ. “ผลของสารพาโคลบิวทราโซลต่อการอนุบาลกล้วยไม้เพชรหึง”, ใน การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณครั้งที่ 19. น.1-8. สงขลา: มหาวิทยาลัยทักษิณ, 2552.
- นันทิดา โยทานันท์. **ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เพชรหึง (*Grammatophyllum speciosum* Blume.) ในสภาพปลอดเชื้อ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2556.
- บุญยืน กิจวิจารณ์. **เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. ขอนแก่น: คลังน่านาวิทยา, 2544.
- บุญสนอง ช่วยแก้ว และจิรณัฐ ทางมีศรี. “การพัฒนาสูตรอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดว่างหางช้างในสภาพปลอดเชื้อ”, ใน การประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 5. น. 1-6. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2553.
- ปฐพีชล วายุอัคคี. **คู่มือกล้วยไม้**. กรุงเทพฯ: เพ็ท-แพล้น พับลิชชิง, 2547.
- ปนัดดา ทินบุตร และจินดารัตน์ พิมพ์สมาน. “ฤทธิ์ยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดสของสารสกัดจากพืชตระกูลเฟินเพื่อใช้บำบัดโรคเบาหวาน”, ใน การประชุมวิชาการนานาชาติวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทยครั้งที่ 21. น. fb003-1-fb003-5. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2554.
- พรพิมล สุริยภัทร. **การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช**. อุบลราชธานี: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2547.
- พรภัส บุญสอน. (2016). “ยาเบาหวาน หรือ ยารักษาโรคเบาหวาน (Antidiabetic agents)”, **หาหมอ.คอม**. <http://haamor.com/th>. 20 มกราคม, 2561.
- พรรณี เตนรุ่งเรือง. **รายงานผลงานวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2550 เรื่องฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเปลือกต้นวงศ์อบเชย (Lauraceae)**. กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้, 2550.
- มาลินี อนุพันธุ์สกุล. **การปลูกกล้วยไม้**. กรุงเทพฯ: เรื่องแสงการพิมพ์, 2530.
- มลิวัลย์ พรหมรักษา. **กล้วยไม้: ไม้ตัดดอกเศรษฐกิจ**. กรุงเทพฯ: ยูนิเวอร์แซลกราฟฟิค, 2539.
- ระพี สาคริก. **กล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มต้น**. กรุงเทพฯ: วศิระ, 2544.
- รังสฤษฎ์ กาวีตะ. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2545.
- วสุ อมฤตสุทธิ. **วิทยาการเมล็ดพันธุ์**. อุบลราชธานี: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2549.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- วสุ อมฤตสุทธิ์ และไพริน ภิญโญ. “การศึกษาการติดสีของต้นอ่อนแตงกวาโดยเทคนิคเตตราโซเลียม”, ใน **การประชุมวิชาการเมล็ดพันธุ์พืชแห่งชาติ ครั้งที่ 7**. น.133-138. พิษณุโลก: โรงเรณที่ออปแลนด์, 2553.
- วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. (2548). “ฟอสฟอรัส”. <https://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%9F%E0%B8%AD%E0%B8%AA%E0%B8%9F%E0%B8%AD%E0%B8%A3%E0%B8%B1%E0%B8%AA>. 25 กรกฎาคม, 2560.
- _____. (2552). “สกุลเพชรหึง”. <https://th.wikipedia.org/wiki/สกุลเพชรหึง>. 7 มกราคม, 2559.
- วิชุดา กล้าเวช และคณะ. “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากสารสกัดฝักพื้นบ้านในจังหวัดพัทลุง”, ใน **การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 5**. น.331-336. กรุงเทพฯ: ศูนย์ประชุมบางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ ปทุมวัน, 2556.
- วิมลพรรณ รุ่งพรหม, ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล และสมฤดี เลี่ยมทอง. “สารยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจากมะรุม”, **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**. 40(3)(พิเศษ): 49-52; กันยายน-ธันวาคม, 2552.
- วันชัย จันทรประเสริฐ. สรีรวิทยาเมล็ดพันธุ์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2538.
- วันพิรฮาน บินยามะ, รอยฮัน หะมะ และสุภาวดี รามสูตร. “ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องไอยเรศ”, **วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์**. 1(4): 20-24; พฤศจิกายน, 2557.
- สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง. การฝึกอบรมหลักสูตรการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเบื้องต้น. ลำปาง: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา, 2540.
- สมบูรณ์ ระดม และแสงเดือน อินชนบท. รายงานผลวิจัยการศึกษาวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สมุนไพรบางชนิด. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้, 2555.
- สลิธิ สติสัจธรรม และเพชร ตรีเพ็ชร. กล้วยไม้ป่าเมืองไทย 2. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน, 2552.
- สุปราณี งามประสิทธิ์. การพัฒนาของเมล็ด และการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) Accession KUBP74. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2554.
- สุเมธ รอดหิรัญ และธรรมศักดิ์ ทองเกตุ. “การพัฒนาขุยมะพร้าวหมักเป็นวัสดุเพาะต้นกล้าแตงกวา”, **วารสารแก่นเกษตร**. 42(3): 835-839; กรกฎาคม, 2557.
- ศุภลักษณ์ ภูมิคง. (2554). “ว่านเพชรหึง”, **ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์**. http://www.qsb.org/Database/Botanic_Book%20full%20option/search_detail.asp?Botanic_ID=1976. 20 มิถุนายน, 2560.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- ศิวพงษ์ จำรัสพันธุ์. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. อุดรธานี: สถาบันราชภัฏอุดรธานี, 2546.
- อบฉันท ไทยทอง. กล้วยไม้เมืองไทย. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน, 2547.
- _____. กล้วยไม้เมืองไทย. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน, 2551.
- อารักษ์ จันทศิลป์ และรัตนา หิรัญพันธุ์. รายงานการวิจัยการเก็บรักษากล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) ในหลอดทดลอง โดยการเก็บรักษาเมล็ดและวิธีชะลอการเจริญเติบโต. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2549.
- อัญญา จันทรปะทิว และคณะ. “ผลของการใช้สารโคโตซานร่วมกับวัสดุปลูกต่อการอนุบาลกล้วยไม้เพชรหึง”, *แก่นเกษตร*. 42(3): 495-500; พฤษภาคม, 2557.
- อัญชลี จาละ. “การขยายพันธุ์กล้วยไม้พื้นเมืองและหายากนางอ้วสาคริกโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ”, *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 18(1): 28-39; มกราคม, 2553.
- อาชีเยาะห์ คาเรง, นูรียานี ยามา และสุภาวดี งามสูตร. “ประสิทธิภาพของ BA และ NAA ต่อการขยายพันธุ์กล้วยไม้หางช้างในสภาพปลอดเชื้อ”, *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์*. 1(2): 19-22; ธันวาคม, 2557.
- เอกสิทธิ์ นิสัยนต์. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้รองเท้านารี (*Paphiopedilum* ‘Delrosi’). วิทยานิพนธ์ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2553.
- Arditti, J. *Micropropagation of Orchids*. New Jersey: Blackwell publishing; 1968.
- _____. *Fundamentals of orchid biology*. New York: John Wiley & Sons, 1992.
- Arditti, J. and Ernst, R. *Micropropagation of Orchid*. New York: John Wiley&Sons Inc.; 1993.
- Chang, W.C., Chen, M.H. and Lee, T.M. “2, 3, 5-Triphenyltetrazolium reduction in the viability assay of *Ulva fasciata* (Chlorophyta) in response to salinity stress”, *Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei*. 40(3): 207-212; July, 1999.
- Chen, Y. and et al. “Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China”, *Global Ecology and Conservation*. 3(1): 367-378; January, 2015.
- Ernst, R. and Arditti, J. “Carbohydrate physiology of orchid seedlings III: Hydrolysis of maltooligosac-charides by *Phalaenopsis* (Orchidaceae) seedlings.”, *American Journal of Botany*. 77(2): 188-195; February, 1990.
- Gallo, F.R. and et al. “Seed structure and *in vitro* seedling development of certain *Laeliinae* species (Orchidaceae)”, *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87(2): 68-73; March, 2016.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Haridas, R., Sumathi, P. and Thekkan, S. “*In-vitro* antidiabetic activity of *Malaxis rheedei* SW. (whole plant): an endangered medicinal orchid”, **International Journal of Pharma and Bio Sciences**. 8(2): 130-133; April, 2017.
- Hay, F.R. and et al. “Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions”, **Botanical Journal of the Linnean Society**. 164(1): 26-41; September, 2010.
- Hoang, N.H. and et al. “Comparative seed germination and seedling development of the ghost orchid, *Dendrophylax lindenii* (Orchidaceae), and molecular identification of its mycorrhizal fungus from South Florida”, **Annals of Botany**. 118(7): 1-15; November, 2016.
- Inthongkaew, P. and et al. “ α -Glucosidase and pancreatic lipase inhibitory activities and glucose uptake stimulatory effect of phenolic compounds from *Dendrobium formosum*”, **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 27(6): 480-487; November, 2017.
- Kaur-Sawhney R., and et al. “Relation of polyamine synthesis and titer to aging and senescence in oat leaves”, **International Journal of Plant Physiology**. 69(2): 405-410; February, 1982.
- Kauth, P.J. and et al. “Techniques and applications of in vitro orchid seed germination”, In **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**. Teixeira da Silva, J.A. p. 376-391. New York: Berghahn Books, 2008.
- Khampa, S., Wangsomnuk, P. and Wangsomnuk, P. “Factors affecting seed germination of *Grammatophyllum speciosum* cultured *in vitro*”, **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**. 18(1): 193-197; January, 2010.
- Letham, D.S. “Regulators of cell division in plant tissue. XX. The Cytokinins of coconut milk”, **Physiologia Plantarum**. 32(1): 66-70; September, 1974.
- Nguyen, H.C. and et al. “Antioxidant activities of the methanol extracts of various parts of *Phalaenopsis* orchids with white, yellow, and purple flowers”, **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**. 46(2): 457-465; 12 February, 2018.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Nozzolillo, C. and Bezada, M.D. “Browning of lentil seed, concomitant loss of viability and The possible role of soluble tannins in both phenomena”, **Canadian Journal of Plant Science**. 64(1): 815-824; January, 1984.
- Minh, T.N. and et al. “Phenolic compounds and antioxidant activity of *Phalaenopsis* orchid hybrids”, **Antioxidants**. 5(31): 1-12; 14 September, 2016.
- Mohamed Sham Shihabudeen, H., Hansi Priscilla, D. and Thirumurugan, K. “Cinnamon extract inhibits α -glucosidase activity and dampens postprandial glucose excursion in diabetic rats”, **Nutrition and metabolism**. 8(46): 2-11; 29 June, 2011.
- Mweetwa, A.M., Welbaum, G.E. and Tay D. “Orchid seed storage for germplasm preservation”, **Acta Horticulturae**. 760(2): 629-635; July, 2007.
- Orchidropical.com. 2010. “เครื่องปลูกกล้วยไม้/วัสดุปลูกกล้วยไม้/ภาชนะปลูกกล้วยไม้”, **ออร์คิดทรอปิคอล.คอม**. <http://www.orchidropical.com/orchids>. 25 มีนาคม, 2559.
- Pereira, M.C. and et al. “Characterization of seed germination and protocorm development of *Cyrtopodium glutiniferum* (Orchidaceae) promoted by mycorrhizal fungi *Epulorhiza spp.*”, **Acta Botanica Brasilica**. 29(4): 567-574; December, 2015.
- Pierik, R.L.M. and et al. “Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. in vitro”, **Scientia Horticulturae**, 34(2): 139-153; February, 1988.
- Pimsen, M. and Kanchanapoom, K. “Effect of basal media and sugar types on *in vitro* regeneration of *Grammatophyllum speciosum* Blume”, **Notulae Scientia Biologicae**. 3(3): 101-104; March, 2011.
- Raghvan, V. and Torrey, J. “Inorganic nitrogen nutrition of the embryos of the orchid *Cattleya*”, **American Journal of Botany**. 51(3): 264-274; March, 1964.
- Rittirat, S., Thammasiri, K. and Te-chato, S. “Effect of media and sucrose concentrations with or without activated charcoal on the plantlet growth of *P. cornu-cervi* (Breda) Blume & Rchb. f.”, **International Journal of Agricultural Technology**. 8(6): 2077-2087; 2012.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Rungruchkanont, K. **Studies on seed germination and plant growth development of Thai wild orchid, *Aerides houlletiana* and *Acampe rigida***. Master Thesis: Mahidol University, 1996.
- Samala, S. and et al. "Protocorm- like body proliferation of *Grammatophyllum speciosum* through asymbiotic seed germination", **Science Asia**. 40(1): 379-383; November, 2014.
- Sopalun, K., Thammasiri, K. and Ishikawa, K. "Micropropagation of the Thai orchid *Grammatophyllum speciosum* Blume", **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 101(2): 143-150; May, 2010.
- Tawaro, S., Suraninpong, P. and Chanprame, S. "Germination and regeneration of *Cymbidium findlaysonianum* Lindl. on a medium supplemented with some organic sources.", **Walailak Journal of Science and Technology**. 5(2): 125-135; June, 2008.
- ThaiPR.net. 2550. "ชาวบ้านบางตึบ ค้นพบวิธีเพาะ "ว่านหางช้าง" กล้วยไม้หายาก ต้นละ 500 บาท", **กล้วยไม้เพชรหึง**. <http://www.ryt9.com/s/prg/279936>. 24 กันยายน, 2550.
- Thornhill, A. and Koopowitz, H. "Viability of *Disa uniflora* Berg (Orchidaceae) seeds under variable storage conditions: Is orchid gene-banking possible?", **Biological Conservation**. 62(1): 21-27; 7 October, 1992.
- Vudala, S.M. and Ribas, L.L.F. "Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae)", **South African Journal of Botany**. 108(1): 1-7; January, 2017.
- Withner, C.L. **The orchids a scientific survey**. New York: The Ronald Press Company, 1959.
- Wu, K. and et al. "Efficient regeneration of *Renanthera* Tom Thumb 'Qilin' from leaf explants", **Scientia Horticulturae**. 135(1): 194-201; February, 2012.
- Yih Ng, C. and Saleh, N.M. "In vitro propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like bodies", **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 105(1): 193-202; April, 2011.
- Zeng, S. and et al. "Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid.", **Scientia Horticulturae**. 138(2): 198-209; May, 2012.
- _____. and et al. "In vitro propagation of *Paphiopedilum hangianum* Perner & Gruss", **Scientia Horticulturae**. 151(1): 147-156; February, 2013.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ชนิดและปริมาณสารในสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ชนิดและปริมาณสารในสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สารเคมี	ปริมาณสาร (mg/L)		
	VW	½ MS	NDM
NH_4NO_3	-	825	480
KNO_3	525	950	200
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	-	470
KCl	-	-	150
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	185	250
KH_2PO_4	250	85	550
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5.7		2.2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	8.6	0.5
H_3BO_4	6.2	6.2	0.5
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025
H_2SO_4	-	-	0.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500	-	-
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27	27.8	-
Na_2EDTA	37	37.3	-
KI	0.83	0.83	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	220	-
Ca_3PO_4	200	-	-
Myo-Inositol	100	100	100
Nicotinic acid	0.5	0.5	1
Pyridoxine-HCl (B6)	0.5	0.5	1
Thiamine-HCl (B1)	0.1	0.1	1
Calcium pantothenate	-	-	1
Adenine	-	-	1
L-Cystein	-	-	1
d-Biotin	-	-	0.1
Fe-EDTA	-	-	21
Glycine	2	2	-
น้ำตาล	10,000	30,000	10,000
วุ้น	6	6-8	-
pH	5.0	5.7	5.4

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมีในการศึกษากายวิภาคของพืช

การเตรียมสารเคมีในการศึกษากายวิภาคของพืช

1. วิธีการเตรียมสาร FAA 50 เปอร์เซ็นต์

1.1 การเตรียม Ethyl alcohol 50 เปอร์เซ็นต์

1.1.1 ตวง Ethyl ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 40 มิลลิลิตร

1.1.2 ตวง Tertiary butyl alcohol ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

1.1.3 ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

1.2 การเตรียม FAA 50 เปอร์เซ็นต์

1.2.1 ตวง Ethyl alcohol 50 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมด้วยวิธี 1.1) ปริมาณ 90 มิลลิลิตร

1.2.2. ตวง Glacial acetic acid ปริมาณ 5 มิลลิลิตร

1.2.3. ตวง Formalin ปริมาณ 5 มิลลิลิตร

1.2.4. ผสมสารทั้ง 3 เข้าด้วยกัน

2. วิธีการเตรียมสาร Tertiary butyl alcohol (TBA) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของTBA (%)	Absolute TBA (ml)	95% ethanol (ml)	น้ำกลั่น (ml)
50	100	400	500
70	200	500	300
85	350	500	150
95	550	450	-
100	666.7	333.3*	-
Absolute	1000	-	-

*ใช้ Absolute ethanol

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวเยาวลักษณ์ ฉัตรสุวรรณ
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2553 - 2557 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2558 ผู้ช่วยงานวิจัยโครงการการขยายพันธุ์กล้วยไม้เพชรหิ๊งเพื่อใช้เป็นพืชสมุนไพร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ผลงานทางวิชาการ	เยาวลักษณ์ ฉัตรสุวรรณ และกาญจนา รุ่งรัชกานนท์. 2557. การขยายพันธุ์และการออกดอกกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ. ใน การประชุมวิชาการ มอบ. วิจัย ครั้งที่ 8. หน้า 33-40. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. เยาวลักษณ์ ฉัตรสุวรรณ และคณะ. 2560. ผลของสูตรอาหารและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เพชรหิ๊ง. ใน การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 44. หน้า 118 – 126. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี เยาวลักษณ์ ฉัตรสุวรรณ และกาญจนา รุ่งรัชกานนท์. 2561. ผลขององค์ประกอบอาหารและสภาพแสงต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้เพชรหิ๊งในสภาพปลอดเชื้อ. ใน การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 19. หน้า 487-494. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.