ผลของไคโตซานต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของเมล็ดและการเจริญของโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องเทียนสีส้ม (*Coelogyne brunnea* Lindl.)

Asymbiotic seed germination and protocorm development enhancing by chitosan treatment in *Coelogyne brunnea* Lindl. (Orchidaceae)

จุฑารัตน์ กรดสัน[1], ศุทธิณัฏฐ์ สุนทรกลัมพ์[2] และ ปวีณา แก้วอุบล[1*]

Jutharat Krotsan[1], Sutthinut Soonthornkalump[2] and Paveena Kaewubon[1*]

บทคัดย่อ: เอื้องเทียนสีส้ม (*Coelogyne brunnea* Lindl.) เป็นกล้วยไม้อิงอาศัยที่มีดอกสีสันสวยงาม ปัจจุบันประชากรในธรรมชาติมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากการทำลายป่าซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยและการลักลอบเก็บกล้วยไม้ออกจากป่า ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องดำเนินการขยายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของไคโตซานต่อการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโพรโทคอร์มเอื้องเทียนสีส้ม โดยนำฝักเอื้องเทียนสีส้มที่มีอายุ 6 สัปดาห์มาตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดและพบความมีชีวิต 84.43% และนำเมล็ดเอื้องเทียนสีส้มมาผ่านขั้นตอนการเตรียมเมล็ดโดยแช่ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำเมล็ดเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog medium (MS) (Murashige และ Skoog, 1962) ที่เติมไคโตซานความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1% เป็นเวลา 10 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลลักษณะการพัฒนาของโพรโทคอร์มทุกๆ 2 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่เติมไคโตซานทุกระดับความเข้มข้นมีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของเมล็ด ทำให้เกิดการพัฒนาเป็นโพรโทคอร์ม โดยสูตรอาหารที่เติมไคโตซานความเข้มข้น 1% ทำให้เมล็ดมีอัตราการงอกของเมล็ดสูงที่สุด (93.14 ± 7.78%) ซึ่งสามารถจำแนกรูปแบบการงอกของเมล็ดได้ทั้งหมด 5 ระยะ โดยโพรโทคอร์มส่วนใหญ่แสดงลักษณะของเอ็มบริโอที่ขยายขนาดและมีการพัฒนาส่วนยอดชัดเจน รวมทั้งมีไรซอยด์จำนวนมาก ซึ่งเป็นระยะที่ 4 ของการเจริญ ภายในระยะเวลา 6 สัปดาห์หลังจากการเพาะเลี้ยง

คำสำคัญ: สารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน, กล้วยไม้, การเจริญของโพรโทคอร์ม, การขยายพันธุ์, พืชหายาก

ABSTRACT: *Coelogyne brunnea* Lindl. is epiphytic orchid with showy flower. The recent situation of wild *C. brunnea* is serious concern because of the deforestation and over collecting. Moreover, the germination of seed under natural conditions is very low which leading to the decreasing of natural population. Thus, the conservation program of *C. brunnea* is necessary. The recent study focused on the effect of chitosan on seed germination and protocorm development of *C. brunnea*. Seeds of *C. brunnea* from 6-weeks-old capsule were isolated and seed viability showed at 84.34%. After that, seeds were pretreatment with sterilized distilled water for a week. Pretreated seeds were culture on solid Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with various concentrations of chitosan (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1%) for 10 weeks.

Received June 28, 2018
Accepted September 17, 2018

[1] สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง 93210
Program in Biology, Faculty of Science, Thaksin University (Phatthalung campus), Phatthalung 93210
[2] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110
Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110
* Corresponding author: kaewubon.p@gmail.com

The characters of protocorm development were determined every 2 weeks of culture. The result showed the promotion of seed germination and protocorm growth in all chitosan concentration. The supplementation of 1% chitosan showed the highest germination rate (93.14 ± 7.78%). Five developmental stages of protocorms were distinguished. Most of protocorm showed the enlargement of embryo with visibly shoot pole and numerous rhizoids, which determined as stage 4 of development after 6 weeks of culture.

Keywords: complex organic additives, orchid, protocorm development, micropropagation**,** rare plant

บทนำ

กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (*Coelogyne* Lindl.) เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย ปัจจุบันมีการค้นพบแล้วประมาณ 200 ชนิดมีเขตการกระจายพันธุ์แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และหมู่เกาะในทะเลอันดามัน (Clayton, 2002) ในประเทศไทยพบ 36 ชนิด ทั้งบริเวณป่าผลัดใบและป่าไม่ผลัดใบในทุกภาค โดยเฉพาะกล้วยไม้เอื้องเทียนสีส้ม (*Coelogyne brunnea* Lindl.) พบได้บริเวณป่าดิบเขาที่ระดับความสูง 900 - 1,200 เมตรจากระดับน้ำทะเล บริเวณประเทศอินเดีย จีน ลาว พม่า และประเทศไทย (Pedersen et al., 2014) อย่างไรก็ตามปัจจุบันประชากรกล้วยไม้ในธรรมชาติทั่วโลกมีแนวโน้มลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง เนื่องจากปัญหาการลดลงหรือเสื่อมโทรมของถิ่นที่อยู่อาศัย การนำออกจากป่าเพื่อการค้า และสภาวะโลกร้อน (Seaton et al., 2013) อีกทั้งเอื้องเทียนสีส้มเป็นกล้วยไม้ที่มีลักษณะดอกสวยงาม มีสรรพคุณเป็นพืชสมุนไพร และมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นไม้ประดับได้ แต่เนื่องจากในสภาพธรรมชาติ เมล็ดกล้วยไม้มีข้อจำกัดของปัจจัยที่ส่งผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ด เช่น เมล็ดกล้วยไม้ไม่มีเอ็นโดสเปิร์ม (endosperm) ซึ่งเป็นอาหารสะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอ และมีความจำเพาะต่อชนิดของเชื้อราไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) ในการงอก ทำให้อัตราการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ในธรรมชาติค่อนข้างต่ำ ซึ่งจะส่งผลให้ปริมาณกล้วยไม้ลดลงในอนาคต (Aewsakul et al., 2013; Yeung, 2017) ดังนั้นการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบใช้อาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ จึงเป็นวิธีที่สามารถช่วยเพิ่มอัตราการงอกและการรอดชีวิตของต้นอ่อน อีกทั้งการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ด้วยวิธีการดังกล่าว เป็นวิธีการที่เป็นประโยชน์ในการศึกษารูปแบบการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโพรโทคอร์ม (Lee et al., 2005; Gallo et al., 2016) ปัจจุบันมีการใช้สารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะไคโตซาน เป็นสารโพลีเมอร์ธรรมชาติที่ปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม ได้จากปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซีติล (deacetylation) ของน้ำตาล *N*-acetyl-D-glucosamine ที่อยู่บนโครงสร้างของไคติน (Rinaudo, 2006; du Jardin, 2015; Malerba and Cerana, 2018) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเปลือกแข็งของสัตว์ทะเล เช่น กุ้ง ปู และหมึก รวมทั้งผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ (Nge et al., 2006) โดยใช้ไคโตซานเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด รวมทั้งกล้วยไม้ เช่น กล้วยไม้ *Dendrobium* Queen Pink (กุลนาถ และ กรกช, 2553) เอื้องเงินหลวง (*Dendrobium formosum* Roxb.) (สมพร และ หาพิส, 2557) เอื้องรงรอง (*Panisea uniflora*) (วุฒิชัย และคณะ, 2559) *Grammatophyllum speciosum* (Sopalun et al., 2010) *Dendrobium* ‘Eiskul’ (Pornpienpakdee et al., 2010) *Dendrobium* ‘Sureepeach’ (Charoenwattana and Petprapai, 2013) เป็นต้น นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาของ Kananont et al. (2010) และ นรารัตน์ และคณะ (2559) พบว่า ไคโตซานสามารถเพิ่มอัตราการงอกและการรอดชีวิตของต้นอ่อนของกล้วยไม้ *Dendrobium bigibbum* var. *compactum* และ *D. formosum* (Kananont et al., 2010) และ *Paphiopedilum callosum* var. *sublaeve* (นรารัตน์ และคณะ, 2559) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาผลของไคโตซานต่อการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เอื้องเทียนสีส้ม ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการงอกของเมล็ดและการเจริญของโพรโทคอร์ม รวมทั้งผลของไคโตซานต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของเมล็ดและการเจริญของโพรโทคอร์มของกล้วยไม้เอื้องเทียนสีส้ม

วิธีการศึกษา

พืชที่ใช้ในการศึกษา

ฝักกล้วยไม้เอื้องเทียนสีส้ม (*Coelogyne brunnea* Lindl.) อายุ 6 สัปดาห์ หลังจากการผสมเกสรจากกาดคำเที่ยง ตำบลป่าตัน อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ และการวิจัยนี้ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

การฟอกฆ่าเชื้อและการเตรียมเมล็ด

นำฝักกล้วยไม้เอื้องเทียนสีส้มมาล้างทำความสะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อ โดยแช่ฝักในแอลกอฮอล์ 95% นาน 1 - 2 นาที นำไปผ่านไฟจนเปลวไฟดับ จากนั้นแช่สารละลายคลอร็อกซ์ (Clorox) ความเข้มข้น 30% (v/v) ที่เติม Tween 20 จำนวน 2 - 3 หยด เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างฝักด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 2 - 3 ครั้ง ต่อมานำฝักกล้วยไม้ผ่าครึ่งตามแนวความยาวของฝักและนำเมล็ดลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วคงที่ 100 รอบต่อนาที ในสภาพที่ไม่มีแสง ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และส่วนของเมล็ดกล้วยไม้ที่เหลืออยู่ในฝักนำไปทดสอบความมีชีวิตของเมล็ด (เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต = จำนวนเมล็ดที่มีชีวิต/จำนวนเมล็ดทั้งหมด x100) ด้วยสารละลาย TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) ความเข้มข้น 1% (Vujanovic et al., 2000; Al-Turki and Baskin, 2017)

การศึกษารูปแบบการเจริญของเมล็ดและผลของไคโตซานต่อการงอกของเมล็ด

นำเมล็ดกล้วยไม้ที่ผ่านการเตรียมเมล็ดย้ายมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมไคโตซาน (OliZac Technologies Co.,Ltd., Bangkok) ความเข้มข้นแตกต่างกัน (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1%) เติมน้ำตาล 20 ก./ล. และ วุ้น 6.8 ก./ล. โดยปรับ pH ประมาณ 5.7 - 5.8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นอร์มัล จากนั้นเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 23 ไมโครโมล/ตร.ม./วินาที หลังจากการเพาะเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ บันทึกลักษณะการงอก และระยะการเจริญของเมล็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้สเตอริโอ อีกทั้งหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดรวมทุกระยะ (เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดรวมทุกระยะ = จำนวนเมล็ดที่งอก/จำนวนเมล็ดมีชีวิต x 100) และเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดแต่ละระยะ (เปอร์เซ็นต์การงอกระยะ A = จำนวนเมล็ดระยะ A /จำนวนเมล็ดมีชีวิต x 100)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อชุดการทดลอง โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ ANOVA (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ $P \leq 0.05$

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ความมีชีวิตของเมล็ดและระยะการเจริญของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องเทียนสีส้ม

การศึกษาความมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องเทียนสีส้ม (*Coelogyne brunnea* Lindl.) จากฝักอายุประมาณ 6 สัปดาห์ หลังจากการผสมเกสร พบว่าเมล็ดกล้วยไม้เอื้องเทียนสีส้มมีลักษณะยาวรีเอ็มบริโอมีสีขาวอมเหลือง และมีความมีชีวิต 84.34% โดยเมล็ดที่สมบูรณ์ประกอบด้วยเอ็มบริโอที่มีชีวิตซึ่งติดสีแดงหลังจากทดสอบโดยใช้สารละลาย TTC ความเข้มข้น 1% (**Figure 1**) ซึ่งเป็นวิธีการทางชีวเคมีที่สามารถประเมินความมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้ได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว (Vujanovic et al., 2000) เนื่องจากเซลล์ภายในเมล็ดที่มีชีวิตมีกระบวนการหายใจของเซลล์เกิดขึ้น เป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่มีเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) เข้ามาเกี่ยวข้อง ทำให้มีการปลดปล่อยอนุมูลไฮโดรเจน (H^+) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยารีดักชั่น (reduction reaction) กับสารละลาย TTC ที่เป็นสารใสไม่มีสี ทำให้เปลี่ยนเป็น

แก่นเกษตร 47 (1) : 141-150 (2562)./doi: 10.14456/kaj.2019.12

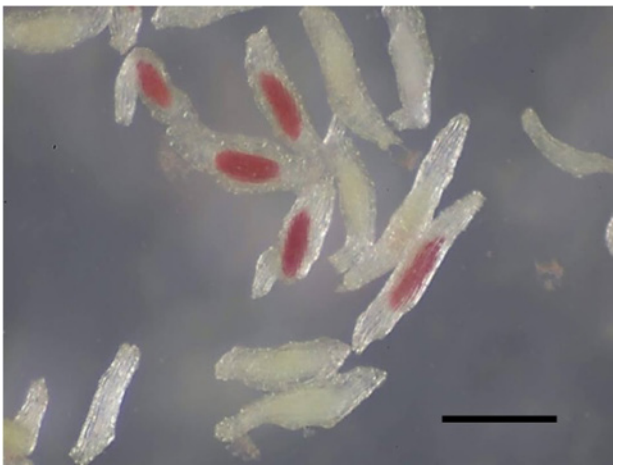

Figure 1 Seeds of *Coelogyne brunnea* Lindl. exhibiting viable embryo (red) and non-viable (colorless) using TTC testing (bar = 500 µm)

สาร 1,3,5-triphenylformazan (TPF) ที่มีสีแดง โดยเมล็ดที่มีเอ็มบริโอติดสีแดงจัดเป็นเมล็ดที่ยังมีชีวิต (viable seed) (Karrfalt, 2008)

เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เอื้องเทียนสีส้มบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS เพื่อศึกษารูปแบบการเจริญของเมล็ด พบว่าเอ็มบริโอภายในเมล็ดเจริญและพัฒนาไปเป็นโพรโทคอร์มที่สมบูรณ์ ภายในระยะเวลา 10 สัปดาห์ หลังจากการเพาะเลี้ยง โดยสามารถจำแนกการเจริญและพัฒนาของเมล็ดออกเป็น 5 ระยะ (**Table 1**) ซึ่งเมล็ดที่สมบูรณ์ มีลักษณะยาวรี ภายในมีเอ็มบริโอสีขาวอมเหลืองที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง จากนั้นหลังการเพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ เอ็มบริโอเริ่มมีการขยายขนาดเล็กน้อย (ระยะที่ 1) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะสามารถสังเกตเห็นการแตกของเปลือกหุ้มเมล็ด เนื่องจากการขยายตัวของเอ็มบริโอที่เพิ่มมากขึ้น (ระยะที่ 2) ต่อมาในระยะที่ 3 พบว่า เอ็มบริโอมีการพัฒนาเป็นโพรโทคอร์มที่มีสีเขียว ที่บริเวณปลายยอดมีลักษณะแหลม

Table 1 Developmental stages of *Coelogyne brunnea* protocorm after culture on hormone-free MS medium

Developmental stage	Week after culture	Characteristic of developmental stage
s0	0	Non-germinate seed
s1	2	Enlarged seed with swollen embryo without rupture of testa
s2	4	Enlarged seed with swollen embryo and rupture of testa
s3	6	Embryo developed into globular protocorm with green point shoot
s4	8	Enlarged protocorm with production of rhizoids and appearance of promeristem
s5	10	Protocorms with first leaf

และหลุดจากเปลือกหุ้มเมล็ด เมื่อครบสัปดาห์ที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นโพรโทคอร์มจะพัฒนาเข้าสู่ระยะที่ 4 ในสัปดาห์ที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง โดยลักษณะของโพรโทคอร์มจะขยายขนาดใหญ่ขึ้น เริ่มพบการเกิดเป็นปุ่มนูนขนาดเล็กที่บริเวณฐานของโพรโทคอร์ม และพบการสร้างไรซอยด์จำนวนมาก ส่วนบริเวณปลายยอดของโพรโทคอร์มมีลักษณะเรียวแหลมอย่างเห็นได้ชัด ต่อมาการเจริญของใบจะเด่นชัดมากขึ้น โดยพบว่าใบแรกมีการขยายขนาดและยืดยาวมากขึ้น เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง (ระยะที่ 5)

ผลของไคโตซานต่อการงอกของเมล็ดเอื้องเทียนสีส้ม

การศึกษาผลของไคโตซานต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องเทียนสีส้มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมไคโตซาน ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1% เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดกล้วยไม้เอื้องเทียนสีส้มสามารถงอกได้บนอาหารทุกชุดการทดลอง (**Table 2**) โดยเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมไคโตซาน ความเข้มข้น 0.4% มีอัตราการงอกต่ำที่สุด (63.24 ± 5.71%) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่เติมไคโตซาน 0.2% (74.10 ± 8.02%) และไม่เติมไคโตซาน (69.24 ± 2.56%) โดยเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารทั้งสามชุดการทดลองมีการเจริญและพัฒนาได้ทุกระยะการเจริญ (ตั้งแต่ระยะที่ 1-5) อย่างไรก็ตามการศึกษาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดแต่ละระยะบนอาหารที่เติมไคโตซานความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ (**Figure 2**) พบว่า การเติมไคโตซานที่ความเข้มข้นต่ำ (0.2 และ 0.4%) และไม่เติมไคโตซาน ไม่มีผลต่อการเจริญแต่ละระยะของเมล็ด สอดคล้องกับ Kananont et al. (2010) รายงานว่าการเพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง (*D. formosum*) บนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW ที่ไม่เติมไคโตซาน สามารถชักนำให้เมล็ดงอกน้อยที่สุด อย่างไรก็ตามจากการทดลองเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซาน ส่งผลให้อัตราการงอกของเมล็ดกล้วยไม้เพิ่มมากขึ้น (**Table 2**) โดยอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมไคโตซาน ความเข้มข้น 0.6, 0.8 และ 1% มีอัตราการงอกของเมล็ดสูง (85.43 ± 4.72, 87.43 ± 6.50 และ 93.14 ± 7.78% ตามลำดับ) โดยเฉพาะอาหารสูตร MS ที่เติมไคโตซาน ความเข้มข้น 1% สามารถชักนำให้เมล็ดมีอัตราการงอกสูงที่สุด (93.14 ± 7.78%) เมล็ดส่วนใหญ่เจริญเป็นโพรโทคอร์มระยะที่ 4 (24.76 ± 6.87%) เป็นระยะที่เอ็มบริโอเจริญเป็นโพรโทคอร์มที่ปลายยอดมีลักษณะเรียวแหลมและบริเวณฐานมีการสร้างไรซอยด์ รองลงมา คือ ระยะที่ 5 (20.86 ± 2.00%) และระยะที่ 3 (20.57 ± 1.48%) ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดระยะที่ 1 (8.76 ± 1.40%) (**Figure 2, 3**) เมื่อ

Table 2 Percentage of seed germination of *Coelogyne brunnea* on MS medium supplemented with different concentrations of chitosan for 10 weeks

Concentration of chitosan (%)	Percentage of seed germination (% ± S.E.)
0	69.24 ± 2.56^{bc}
0.2	74.10 ± 8.02^{abc}
0.4	63.24 ± 5.71^{c}
0.6	85.43 ± 4.72^{ab}
0.8	87.43 ± 6.50^{ab}
1	93.14 ± 7.78^{a}

Values with different letters are significantly different at $P \leq 0.05$ (Duncan's multiple range test)

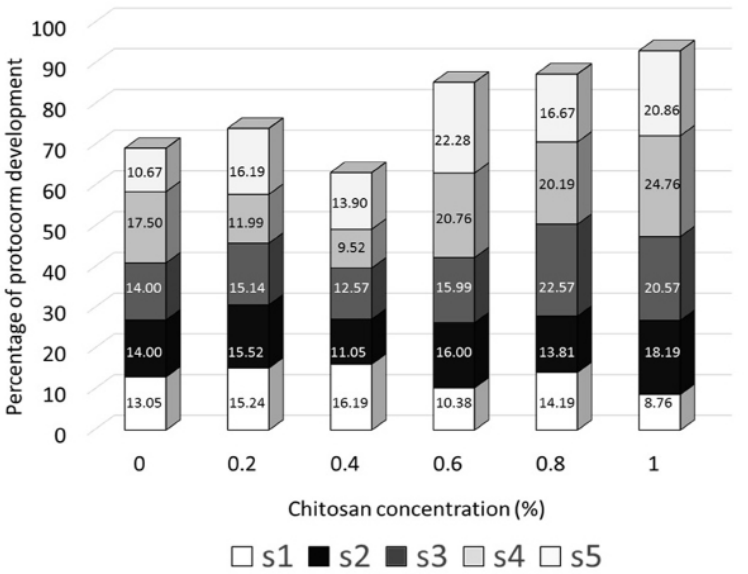

Figure 2 Percentage of protocorm development in a given developmental stage of *Coelogyne brunnea* protocorm supplemented with different concentration of chitosan for 10 weeks

พิจารณาร้อยละของโพรโทคอร์มที่เจริญเข้าสู่ระยะที่ 4 และ 5 จะพบว่าโพรโทคอร์มในระยะที่ 4 และ 5 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีไคโตซาน ความเข้มข้น 1% มีปริมาณสูงที่สุด คือ 45.62% ซึ่งแสดงว่าการเติมไคโตซาน ความเข้มข้น 1% ลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS สามารถกระตุ้นการเจริญของโพรโทคอร์มให้เข้าสู่ระยะที่ 4 และ 5 ได้เพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งโพรโทคอร์มในระยะที่ 4 และ 5 เป็นระยะที่มีการเจริญของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (shoot apical meristem) และเนื้อเยื่อเจริญปลายราก (root apical meristem) โดยเนื้อเยื่อเจริญสามารถแบ่งเซลล์และเจริญเปลี่ยนแปลงสร้างส่วนต่างๆ ของพืช เพื่อพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ (Brukhin and Morozova, 2011) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสุภาภรณ์ และ สาวิณี (2555) รายงานว่า ไคโตซานสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มและต้นอ่อนของกล้วยไม้เอื้องจำปา (*Dendrobium moschatum*) ซึ่งทำให้เพิ่มความสูงและน้ำหนักของต้นอ่อน รวมทั้งการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ช้างกระ (*Rhynchostylis gigantea*) บนอาหารสังเคราะห์ที่เติมไคโตซาน ความเข้มข้น 40 มก./ล. สามารถเพิ่มน้ำหนักของโพรโทคอร์มสูงที่สุด (สุณิษา และ กุลนาถ, 2552) เนื่องจากไคโตซานมีคุณสมบัติในการดูดซับสูง โดยเฉพาะดูดซับโมเลกุลน้ำบริเวณโดยรอบ (Tuzlakoglu et al., 2004) ซึ่งน้ำเป็นปัจจัยสำคัญกระตุ้นกระบวนการงอก ทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนตัว อีกทั้งน้ำเป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ ภายในเมล็ด นำไปสู่การเจริญเติบโตของเอ็มบริโอ (Weitbrecht et al., 2011) และพบว่าไคโตซานมีบทบาทของการเป็นสัญญาณในการสังเคราะห์ฮอร์โมนออกซินโดยผ่านทางวิถีที่เป็นอิสระต่อทริปโตเฟน (tryptophan-independent pathway) (Utairatanakij et al., 2007) ซึ่งในการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ ฮอร์โมนออกซินจะได้รับการสังเคราะห์จากศูนย์กลางการควบคุมออกซิน (auxin organizing center) ที่บริเวณกึ่งกลางของโพรโทคอร์มทำให้ในระยะของการเจริญโพรโทคอร์มมีลักษณะรูปร่างกลม (globular stage) จากนั้นศูนย์กลางการควบคุมออกซินจะเคลื่อนที่ไปบริเวณส่วนบนของโพรโทคอร์ม ทำให้เกิดการเจริญของบริเวณปลายยอดนำไปสู่การเกิดสัณฐานและการเจริญของใบตามลำดับ (Novak et al., 2014) อีกทั้งไคโตซานส่งเสริม

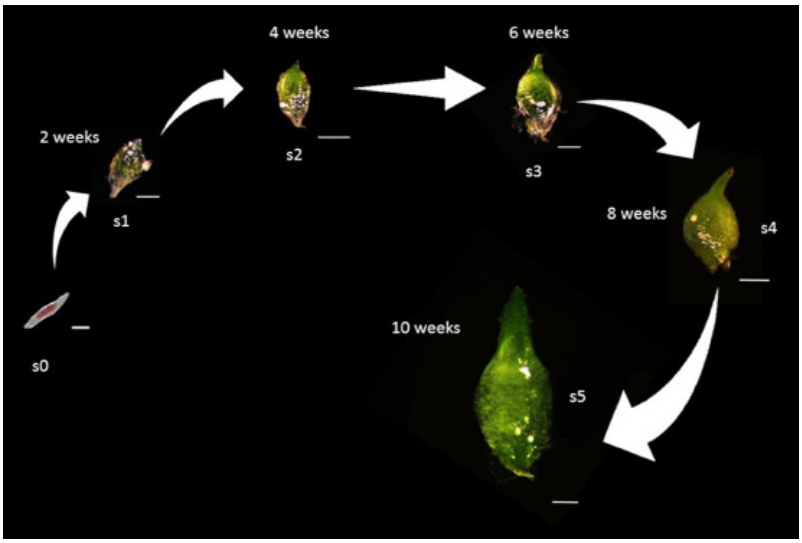

Figure 3 Characteristic of developmental stage of *Coelogyne brunnea* protocorm after culture on MS medium supplemented with 1% chitosan. Seed with viable embryo (s0), The swollen of seed testa cause of embryo enlargement was observed at the 2nd week of culture (s1), At the 4th week, the enlarged embryo emerge from the broken testa was found (s2), The initiation of protomeristem development was detected in the 6th week of culture which indicated by the green pointed shoot-like structure (s3), At week eight, the rhizoids and increase of embryo size is presented (s4), The prominent of first leaf presented in the 10th week of culture (s5) (bar = 250 µm)

การเกิดขนบนโครงสร้างคล้ายไรโซม (hairs on rhizome-like structure) ของโพรโทคอร์ม (Novak and Whitehouse, 2013) ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวเป็นส่วนสำคัญที่บ่งบอกการเจริญระยะที่ 5 ของโพรโทคอร์ม นอกจากนี้มีการใช้ไคโตซานในการอนุบาลต้นกล้าโดยพบว่าไคโตซานส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าได้ เช่น กล้วยไม้เพชรหึง (*Grammatophyllum speciosum* Blume) (อัญจนา และคณะ, 2557) และมะเขือเทศ (อินทร์ธัชว์ และคณะ, 2558) เป็นต้น อีกทั้งไคโตซานมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้น (elicitor) ต่อพืช สามารถกระตุ้นระบบป้องกันหรือช่วยเสริมสร้างระบบภูมิต้านทานในพืช กระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืช (สมพร และ หาพิส, 2557) และทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และสารต้านอนุมูลอิสระได้อีกด้วย (Tuzlakoglu et al., 2004) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของไคโตซานขึ้นอยู่กับชนิดพืชและสูตรอาหาร รวมทั้งความเข้มข้น ค่าระดับการกำจัดหมู่อะเซทิล น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของไคโตซาน (Nge et al., 2006; Pompienpakdee et al., 2010)

สรุป

เมล็ดกล้วยไม้เอื้องเทียนสีส้มจากฝักอายุ 6 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 84.34% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมไคโตซานความเข้มข้น 1% ทำให้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด โดยโพรโทคอร์มส่วนใหญ่เริ่มมีการเจริญเติบโตหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ และโพรโทคอร์มพัฒนาเข้าสู่ระยะที่ 4 ภายในระยะเวลา 6 สัปดาห์หลังจากการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้พบการพัฒนาของใบในโพรโทคอร์มที่อายุ 10 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าไคโตซานมีความสำคัญต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ โดยส่งผลกระตุ้นการงอกของเมล็ด ทำให้เกิด

การเจริญเป็นโพรโทคอร์มและพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ไม่เติมไคโตซาน ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางสำหรับการขยายพันธุ์กล้วยไม้เพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมของกล้วยไม้ป่าที่ใกล้สูญพันธุ์

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ในการสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานวิจัยจากงบประมาณรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2560 หมวดเงินอุดหนุน การบริหารจัดการในรายวิชาโครงงานวิทยาศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

กุลนาถ อบสุวรรณ และกรกช สว่างศรี. 2553. ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ *Dendrobium* Queen Pink. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 41: 477-480.

นรารัตน์ วัฒนาพันธ์, จรัสศรี นวลศรี, และอุปถัมภ์ มีสวัสดิ์. 2559. ผลของสารจากธรรมชาติต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของกล้วยไม้รองเท้านารีม่วงสงขลา (*Paphiopedilum callosum* var. *sublaeve*). วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์. 3: 109-120.

วุฒิชัย ฤทธิ, บุญสนอง ช่วยแก้ว, ปรียาภรณ์ พรหมบางญวน, และศุภลักษณ์ ทักษิณ. 2559. ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของต้นอ่อนเอื้องรงรอง [*Panisea uniflora* (Lindl.) Lindl.] ในหลอดทดลอง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์. 3: 8-13.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล และหาพิส ปุโรง. 2557. ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงในหลอดทดลอง. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 42: 127-134.

สุณิษา อยู่ดี และกุลนาถ อบสุวรรณ. 2552. ผลของไคโตซานต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้สกุลช้างกระในหลอดทดลอง.วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 40: 309-312.

สุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง และสาวิณี หนูสวัสดิ์. 2555. ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องจำปา (*Dendrobium moschatum*) ในสภาพปลอดเชื้อ. น. 2206-2212. ใน: ประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9 วันที่ 6-7 ธันวาคม 2555. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

อัญจนา จันทร์ปะทิว, สิทธิโชค วีณะคุปต์, สุกัญญา แสนภักดี, และนาตยา มนตรี. 2557. ผลของการใช้สารไคโตซานร่วมกับวัสดุปลูกต่อการอนุบาลกล้วยไม้เพชรหึง. แก่นเกษตร. 42(ฉบับพิเศษ 3): 495-500.

อินทร์ธัชว์ ศรีบุตต์, วีรยุทธ สีหานู, และอนันต์สิทธิ์ มีเพียร. 2558. ผลของอัตราไคโตซานที่ผสมกับดินปลูกต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศในถาดหลุมเพาะ. แก่นเกษตร. 42 (ฉบับพิเศษ 1): 906-910.

Aewsakul, N., D. Maneesorn, P. Serivichyaswat, A. Taluengjit, and S. Nontachaiyapoom. 2013. Ex vitro symbiotic seed germination of *Spathoglottis plicata* Blume on common orchid cultivation substrates. Sci. Hort. 160: 238-242.

Al-Turki, T.A., and C.C. Baskin. 2017. Determination of seed viability of eight wild Saudi Arabian species by germination and X-ray tests. Saudi J. Biol. Sci. 24: 822-829.

Brukhin, V. and N. Morozova. 2011. Plant growth and development - basic knowledge and current views. Math. Model. Nat. Phenom. Available: https://www.mmnp-journal.org/articles/mmnp/pdf/2011/02/mmnp201162p1.pdf. Accessed 26 Aug. 2018.

Charoenwattana, P., and U. Petprapai. 2013. Effects of chitosan and lotus extracts as growth promoter in *Dendrobium* Orchid. IJERD. 4: 133-137.

Clayton, D. 2002. The Genus *Coelogyne*: A Synopsis. Natural History Publications, Kota Kinabalu. du Jardin, P. 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. Sci. Hort. 196: 3-14.

Gallo, F.R., L.A. Souza, M.A. Milaneze-Gutierre, and O.J.G. Almeida. 2016. Seed structure and in vitro seedling development of certain Laeliinae species. Rev. Mex. Biodivers. 87: 68-73.

Kananont, N., R. Pichyangkura, S. Chanprame, S. Chadchawan, and P. Limpanavech. 2010. Chitosan specificity for the in vitro seed germination of two *Dendrobium* orchids (Asparagales: Orchidaceae). Sci. Hort. 124: 239-247.

Karrfalt, R. 2008. Seed Testing. P. 1-24. In: F.T. Bonner, and R.P. Karrfalt. The Woody Plant Seed Manual. The Blackburn Press, New Jersey.

Lee, Y.I., N. Lee, E.C. Yeung, and M.C. Chung. 2005. Embryo development of *Cypripedium formosanum* in relation to seed germination in vitro. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130: 747-753.

Malerba, M., and R. Cerana. 2018. Recent advances of chitosan applications in plants. Polymers. Available: http://www.mdpi.com/2073-4360/10/2/118. Accessed 26 Aug. 2018.

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

Nge, K.L., N. Nwe, S. Chandrkrachang, and W.F. Stevens. 2006. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. Plant Sci. 170: 1185-1190.

Novak, S.D., and G.A. Whitehouse. 2013. Auxin regulates first leaf development and promotes the formation of protocorm trichomes and rhizome-like structures in developing seedlings of *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae). AoB PLANTS. Available: https://academic.oup.com/aobpla/article/doi/10.1093/aobpla/pls053/159522. Accessed 26 Aug. 2018.

Novak, S.D., L.J. Luna, and Gamage R.N. 2014. Role of auxin in orchid development. Plant Signal Behav. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4622584/pdf/kpsb-09-10-972277.pdf. Accessed 26 Aug. 2018.

Pedersen, H.Æ., H. Kurzweil, and S. Suddee. 2014. Orchidaceae 2 (Epidendroideae p.p. Neottieae, Tropidieae, Nervilieae, Gastrodieae, Thaieae, Calypsoeae, Arethuseae, Collabieae, Cymbidieae). P. 303–670, Pls XXV–LVI. In: T. Santisuk, and H. Balslev. Flora of Thailand 12(2). The Forest Herbarium, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Bangkok.

Pornpienpakdee, P., R. Singhasurasak, P. Chaiyasap, R. Pichyangkura, R. Bunjongrat, S. Chadchawan, and P. Limpanavech. 2010. Improving the micropropagation efficiency of hybrid *Dendrobium* orchids with chitosan. Sci. Hort. 124: 490-499.

Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. Prog. Polym. Sci. 31: 603-632.

Seaton, P., J.P. Kendon, H. W. Pritchard, D.M. Puspitaningtyas, and T.R. Marks. 2013. Orchid conservation: the next ten years. Lankesteriana. 13: 93-101.

Sopalun, K., K. Thammasiri, and K. Ishikawa. 2010. Effects of chitosan as the growth stimulator for *Grammatophyllum speciosum* in vitro culture. IJSRIT. 4: 828-830.

Tuzlakoglu, K., C.M. Alves, J.F. Mano, and R.L. Reis. 2004. Production and characterization of chitosan fibers and 3-D fiber mesh scaffolds for tissue engineering applications. Macromol. Biosci. 4: 811-819.

Uthairatanakij, A., J.A. Teixeira da Silva, and K. Obsuwan. 2007. Chitosan for improving orchid production and quality. Orchid Science and Biotechnology. 1: 1-5.

Vujanovic, V., M. St-Arnaud, D. Barabé, and G. Thibeault. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. Ann. Bot. 86: 79-86.

Weitbrecht, K., K. Müller, and G. Leubner-Metzger. 2011. First off the mark: early seed germination. J. Exp. Bot. 62: 3289-3309.

Yeung, E.C. 2017. A perspective on orchid seed and protocorm development. Bot. Stud. Available: https://as-botanicalstudies.springeropen.com/track/pdf/10.1186/s40529-017-0188-4. Accessed 16 Aug. 2018.