ผลของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจากสารละลายสำหรับปลูกพืชไม่ใช้ดินต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิด

Effects of Plant Tissue Culture Media from Hydroponics Solution on Germination, and Development of Acampe papillosa (Lindl.) Seed

กนกวรรณ เกิดกูล [1], อาจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์ [2],
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี [3]
[1]นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาการสอนวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
[2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
[3]สาขาพืชสวนประดับ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (Hydroponics) ต่อการงอก และการพัฒนาของเมล็ดเอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดโดยการเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นที่เตรียมจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารสูตร Vacin and Went (VW) ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 ºC เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าทุกสิ่งทดลองสามารถชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ไม่เติมสารละลายปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินซึ่งทำให้เกิดการงอกของเมล็ดเพียง 24.44 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารที่เตรียมจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถชักนำให้ต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดมีการเจริญเติบโตในระยะพัฒนาการที่ 6 มากที่สุดคือ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าสิ่งทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เตรียมจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร มีประสิทธิภาพดี และสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเมล็ดเอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดทดแทนอาหารสูตร VW ได้ เนื่องจากสามารถชักนำให้ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตได้มากกว่า มีต้นทุนการเตรียมน้อยกว่า วิธีการเตรียมง่ายกว่า

คำสำคัญ : การขยายพันธุ์กล้วยไม้ / สารละลายปลูกพืชไม่ใช้ดิน / อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้นทุนต่ำ / การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างง่าย

Abstract

The effects of plant tissue culture media using hydroponics solution on the germination, and development of Acampe papillosa (Lindl.) seed were studied. Seeds of A. papillosa were cultured on solid media lorepared from hydroponic solutions stock A and B into the concentration of 0, 1, 2, 3, 4 and 5 ml/L associated with 30 g/L of sugar Vacin and Went (VW) media. Was used as the control culture media in Seed culture was incubated 25+2 °C with light condition 16 h per day for 16 weeks. The results showed the 100% germination has induced by all media except the concentration of 0 ml/L stock A and B which showed only 24.44% of germination. The 5 ml/L stock A and B culture media showed the significant highest number of development plantlets with 60% induction of 6th development stage of plantlets ($p<0.05$) Therefore, this studied has shown that the modified medium can be used as a replace VW medium due to it had positive effects on A. papillosa seed germination, and development, inexpensive and simple preparation.

Keywords: Orchid propagation / Hydroponics solution / Low cost plant tissue culture medium / Simply plant tissue cultures

บทนำ

เอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิด (Acampe papillosa (Lindl.) เป็นกล้วยไม้ที่ดอกมีกลิ่นหอม ลักษณะดอกมีปลายปากกว้างอ้าออก ยื่นไปข้างหน้า มีเดือยดอกค่อนข้างตรง ซ่อนอยู่ใต้ปลายปาก อยู่ชิดขนานกับปลายปาก ใบยาวประมาณ 20-30 เซนติเมตร กว้าง 2-4 เซนติเมตรเอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดออกดอกประมาณเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม ช่อดอกห้อย ช่อรูปทรงกระบอก กลีบปากมี 3 แฉก เปิดกว้าง ริมแผ่นปากเป็นฝอย มีลายสีม่วงแดงแล้วจางเป็นสีขาว พื้นกลีบดอกเป็นสีขาว มีแต้มสีม่วงอมชมพูที่ปลายกลีบ ขนาดดอกประมาณ 2.5 เซนติเมตร พบขึ้นอยู่ในทุกภาคของประเทศไทยและยังพบในแคว้นอัสสัม ประเทศอินเดีย พม่า ลาว กัมพูชา และ เวียดนาม แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการขยายพันธุ์ของเอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดตามธรรมชาตินั้นต้องการสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม และจำเพาะต่อการงอกและการเจริญเติบโต ประกอบกับการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในปัจจุบัน จึงเป็นเหตุให้กล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดที่กระจายพันธุ์ในธรรมชาติมีอัตราการรอดชีวิตต่ำไปด้วย จึงควรมีการขยายพันธุ์กล้วยไม้ดังกล่าวเพื่อปลูกกลับคืนสู่ธรรมชาติ โดยการขยายพันธุ์กล้วยไม้นั้นทำได้หลายวิธี เช่น ขยายพันธุ์ได้โดยการตัดแยกลำหน้า การตัดชำ การตัดแยกลำหลัง การตัดยอด และการตัดแยกแขนง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อขยายพันธุ์กล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อในอุตสาหกรรมการผลิตกล้วยไม้ตัดดอก และกล้วยไม้กระถาง เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนต้นในปริมาณมาก และได้ต้นที่มีลักษณะเหมือนเดิม

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ คือ การนำชิ้นส่วนต่าง ๆ ของกล้วยไม้ เช่น หน่ออ่อน ช่อดอกอ่อน ใบ ราก และเมล็ด มาทำการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่พื้นผิว แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ โดยทั่วไปนิยมใช้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สูตร Vacin and Went (VW) เช่น การเพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีคางกบบนอาหารสูตร VW เติมน้ำมะพร้าว 300 มิลลิลิตรต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การงอกร้อยละ 100 หลังเลี้ยง 16 สัปดาห์ โปรโตคอร์มมีสีขาวแกมเขียว (ทิวา, 2550) แต่เนื่องจากการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นมีต้นทุนในการเตรียมสูงทั้งในด้านของสารเคมี และเครื่องมือต่าง ๆ อีกทั้งยังมีขั้นตอนการเตรียมที่ซับซ้อน

เนื่องจากอาหารสูตร VW ประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดในปริมาณที่แตกต่างกันจึงจำเป็นต้องชั่งด้วยเครื่องชั่งสารเคมี อีกทั้งต้องฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงโดยการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) เป็นเหตุให้เกษตรกรรายย่อย หรือผู้ที่สนใจการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีงบประมาณจำกัดไม่สามารถดำเนินการได้สำเร็จ

ปัจจุบันมีการผลิตสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินจำหน่ายในรูปแบบของสารละลายเข้มข้นซึ่งหาซื้อได้ทั่วไปในท้องตลาด และมีราคาถูก อีกทั้งยังประกอบด้วยธาตุอาหารจำเป็นสำหรับการปลูกพืช ได้แก่ ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง และธาตุเหล็ก เช่นเดียวกับอาหารสังเคราะห์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดร่วมกับเทคนิคการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารโดยการเติมน้ำยาฟอกผ้าขาวแทนการใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) (กิตติศักดิ์, 2556) เพื่อพัฒนาขั้นตอนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้ง่ายขึ้นด้วยต้นทุนที่ต่ำลง และเป็นแนวทางให้กับเกษตรกรที่มีงบประมาณจำกัดสามารถนำเทคนิคไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เพื่อสร้างอาชีพ สร้างรายได้ รวมถึงเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้ในท้องถิ่นต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อการงอก และการเจริญเติบโตของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิด

ขอบเขตการวิจัย

1. ขอบเขตด้านประชากร

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา คือ ฝักเอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิด จากสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่

2. ขอบเขตด้านตัวแปร

ตัวแปรต้น คือ ความเข้มข้นสารละลายสำหรับปลูกพืชไม่ใช้ดิน

ตัวแปรตาม คือ การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้

ตัวแปรควบคุม คือ ปริมาณผงวุ้นในอาหาร 7 กรัมต่อลิตร ค่า pH ของอาหาร 5.7 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 25±2 องศาเซลเซียส ปริมาณแสงในการเพาะเลี้ยง 16 ชั่วโมงต่อวัน

3. ขอบเขตด้านเวลา

ตั้งแต่เดือน มกราคม 2557 ถึง เดือนธันวาคม 2557

การทบทวนวรรณกรรม

วุฒิชัย และคณะ (2555) ได้ทำการศึกษาผลของแสงต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดินเหลืองประไพในสภาพปลอดเชื้อ จากการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ดินเหลืองประไพ (Eulophia promensis Lindl). บนอาหารสูตร Vacin and Went (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำต้มมันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร เลี้ยงไว้ในที่ได้รับแสงแตกต่างกัน เป็นเวลา 24 สัปดาห์ พบว่า เมล็ดกล้วยไม้ดินเหลืองประไพที่เลี้ยงไว้ในที่มืด 24 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ แล้วย้ายออกเลี้ยงในที่มี

แสง 12 ชั่วโมงต่อวันต่อไปอีก 12 สัปดาห์ จะมีอัตราการงอกในระยะที่ 3.1 ระยะที่ 3.2 และระยะที่ 5 สูงที่สุด คิดเป็น 81.80 ± 3.27a, 51.20 ± 9.37a และ 9.60 ± 1.98a เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่เมล็ดกล้วยไม้ดินเหลืองประไพที่เลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 สัปดาห์แล้วย้ายออกที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวันเลี้ยงจนอายุครบ 24 สัปดาห์ พบว่า จะมีอัตราการงอกในระยะที่ 4 และในระยะที่ 6 สูงที่สุดคิดเป็น 33.20 ± 8.77a และ 3.60 ± 0.83a เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อรรณพ และ คณะ (2555) ได้ศึกษาผลของแสง และอายุฝักต่อพัฒนาการงอกของเมล็ดของกล้วยไม้นางกรายในหลอดทดลอง จากการศึกษาพบว่า เมล็ดที่เพาะในสภาวะที่ได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดดีที่สุด 39.31 , 61.85 และ 68.79 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 8 , 12 และ 16 ตามลำดับ และพบว่าเมล็ดจากฝักของกล้วยไม้นางกราย อายุ 7 สัปดาห์ ที่เพาะในที่ได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดดีที่สุด เมื่อเวลาผ่านไป 8,12 และ 16 สัปดาห์

อนุพันธ์ และคณะ (2550) ศึกษาผลของแสงต่อการงอกและพัฒนาการของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องคำผักปราบ โดยนำเมล็ดจากฝักอายุ 8 เดือน มาเพาะบนอาหารแข็งดัดแปลงสูตร VW ที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตรต่อลิตร มันฝรั่ง 150 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตร โดยให้ระยะเวลาที่ได้รับแสงแตกต่างกันคือได้รับแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน 16 สัปดาห์ ได้รับแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน 16 สัปดาห์ ได้รับความมืด 4 สัปดาห์ แล้วตามด้วยแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน 12 สัปดาห์ ได้รับความมืด 8 สัปดาห์ แล้วตามด้วยแสง 8 ชั่วโมงต่อวันอีก 8 สัปดาห์ และได้รับความมืดตลอด 16 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่มีใบ 3-4 ใบ และรากอย่างน้อย 1 ราก ภายหลังการเพาะเมล็ดเป็นเวลา 12 สัปดาห์ และเมล็ดที่ได้รับความมืด 4 สัปดาห์ แล้วตามด้วยแสง 12 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเป็นต้นอ่อนสูงสุดถึง 92.64 เปอร์เซ็นต์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขนาด 4 ออนซ์ พร้อมฝา มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ และน้ำยาล้างจาน พึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปนึ่งด้วยไอน้ำเดือดโดยลังถึง เป็นเวลานาน 45 นาที ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง เพื่อนำไปบรรจุใส่อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการทดลองทั้งหมด

2. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.1 สิ่งควบคุมคือ อาหารวุ้นสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตรต่อลิตร และใช้น้ำกลั่นในการปรับปริมาตร ปรับ pH เป็น 5.7 เติมผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร นำไปต้มจนวุ้นละลาย เทใส่ขวดปิดฝา แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.2 การเตรียมอาหารวุ้นจากสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน คือ เติมน้ำประปาในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ประมาณ 300 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ชื่อทางการค้า Hydrowork สูตรสำหรับผักสลัด stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำประปา ปรับ pH เป็น 5.7 เติมผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร นำไปต้มจนวุ้นละลาย แล้วฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารโดยวิธีของกิตติศักดิ์ (2556) คือ ตั้งไว้จนอุณหภูมิของอาหารลดลงถึง 60 องศาเซลเซียส แล้วเติมน้ำยาฟอกผ้าขาวไฮเตอร์ 0.1 มิลลิลิตรต่อลิตร คนให้เข้ากัน เทใส่ขวด ปิดฝา

3. การเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้

3.1 นำฝักเอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน ใช้แปรงขัดที่ผิวเบา ๆ จนสะอาด ใช้มีดตัดแต่งเอาส่วนที่เป็นโรค หรือรอยแมลงทำลายออก แล้วใช้แอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 พ่น เช็ดทำความสะอาดฝักกล้วยไม้ให้ทั่วทั้งฝักก่อนนำเข้าตู้ย้ายเนื้อเยื่อ โดยในการทดลองนี้ใช้ตู้ปลาขนาด 20×10×12 นิ้ว เป็นตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

3.2 นำฝักกล้วยไม้จุ่มแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 แล้วนำไปลนไฟ รอจนเปลวไฟดับจึงวางลงบนกระดาษรองตัดเนื้อเยื่อใช้ใบมีดตัดส่วนปลายด้านหัว และท้ายฝักออก จากนั้นกรีดตามรอยสันของฝัก แล้วเคาะเมล็ดลงบนอาหารที่เตรียมไว้ให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร

3.3 นำขวดเนื้อเยื่อไปเลี้ยงในสภาพมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 สัปดาห์ บันทึกการงอก และเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ พร้อมบันทึกภาพถ่าย

4 การเก็บรวบรวมข้อมูล

4.1 การบันทึกลักษณะการงอก

บันทึกลักษณะการงอก การเปลี่ยนแปลงของเมล็ด และเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด โดยการสุ่มนับเมล็ด 30 เมล็ดต่อซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ และนำเมล็ดจากอาหารที่เพาะไว้มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอพร้อมบันทึกภาพ โดยแบ่งกลุ่มเมล็ดเป็นระดับดังนี้

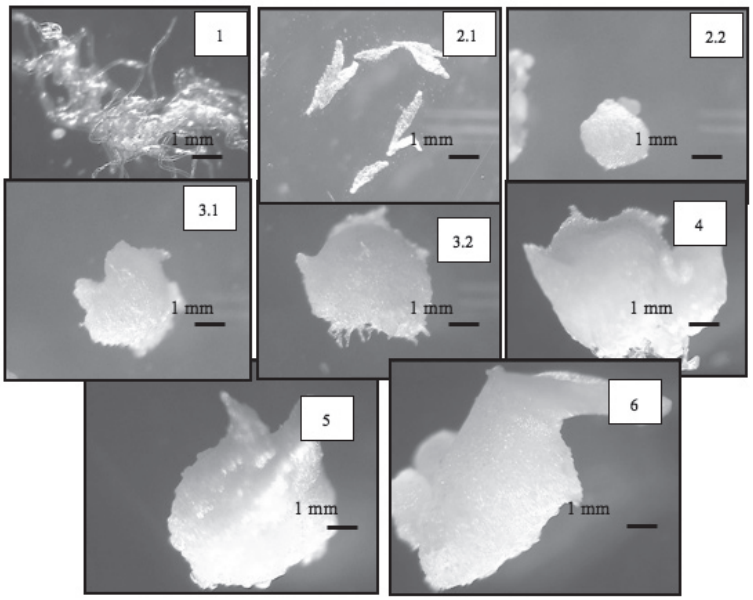
ลักษณะการงอก	ระดับคะแนน	จำนวนที่พบ
เมล็ดที่มีเอ็มบริโอแต่ไม่งอก	0	a
เมล็ดที่มีการขยายตัว พองบวม (งอก) แต่ยังไม่หลุดออกจากเปลือกเมล็ด	1	b
เมล็ดที่มีเอ็มบริโอเกือบหลุดออกจากเปลือกเมล็ด	2	c
เมล็ดที่มีเอ็มบริโอหลุดออกจากเปลือกเมล็ด	3	d

*หมายเหตุ : a ,b,c และ d หมายถึง จำนวนที่พบลักษณะการงอกของแต่ละระยะ นำตัวเลขที่ได้มาคำนวณเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การงอกตามวิธีการของ Pierik และคณะ (1988) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การงอก} = \frac{100 \times (b+c+d)}{a+b+c+d}$$

4.2 การบันทึกระยะพัฒนาการของเมล็ดกล้วยไม้โดยดัดแปลงตามวิธีของ Arditti (1967) (ภาพที่ 1)

ระยะ	ลักษณะของเมล็ดและต้นอ่อน
1	เมล็ดสมบูรณ์ แต่ไม่งอก
2.1	เอ็มบริโอขยายขนาดใหญ่ขึ้นจากเดิม มีสีขาว ไม่มีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ แต่เอ็มบริโอยังไม่แตกออกจากเมล็ด
2.2	เอ็มบริโอขยายขนาดใหญ่ขึ้นจากเดิม มีสีน้ำตาล ไม่มีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ แต่เอ็มบริโอยังไม่แตกออกจากเมล็ด
3.1	เอ็มบริโอขยายขนาดใหญ่ขึ้นจากเดิม 5-10 เท่า หลุดออกจากเปลือก มีสีขาว สีน้ำตาล เริ่มมีขนคล้ายปุยนุ่นเกิดขึ้นปกคลุม (เป็นระยะที่นับว่ามีการงอกของเมล็ดเกิดขึ้น)
3.2	เอ็มบริโอขยายขนาดใหญ่ขึ้นจากเดิม 5-10 เท่า หลุดออกจากเปลือก มีสีเขียวอ่อน เริ่มมีขนคล้ายปุยนุ่นเกิดขึ้นปกคลุม
4	เอ็มบริโอพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม เกิดตุ่มเล็กๆ ประมาณ 1-3 ตุ่ม สีขาว สีเขียวอ่อน มีขนคล้ายปุยนุ่นจำนวนมากปกคลุม
5	เอ็มบริโอพัฒนาเป็นไรโซม ไรโซมมีสีเขียว เขียวถึงเขียวเข้ม ส่วยปลายไรโซมทิ่มลงในอาหาร มีขนคล้ายปุยนุ่นจำนวนมากปกคลุม
6	ไรโซมมีจำนวนมากขนาดใหญ่ขึ้นจากเดิม มีสีเขียว ไรโซมที่ยาวจะมีลักษณะเป็นข้อ ไรโซมพัฒนาเกิดเป็นยอดงอกพ้นผิวอาหารขึ้นมา บริเวณส่วนโค้งที่เกิดยอดจะมีขนาดใหญ่เป็นที่สะสมอาหาร บางไรโซมเกิดราก 1-2 ราก และมีขนคล้ายปุยนุ่นจำนวนมากปกคลุมตลอดทั้งไรโซม



ภาพที่ 1 ลักษณะของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในระยะพัฒนาการต่าง ๆ

5. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองทั้งหมดใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomize design) โดยผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one way ANOVA) จากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เตรียมจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับอาหารวุ้นสูตร VW เป็นเวลา 16 สัปดาห์ ผลการวิจัยพบว่าเมล็ดเอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดสามารถงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารทุกสิ่งทดลอง ยกเว้นอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ไม่เติมสารละลายปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินซึ่งทำให้เกิดการงอกของเมล็ดเพียง 24.44 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 1 นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารวุ้นสูตร VW และอาหารเติมสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถชักนำให้เมล็ดมีการงอกในระยะที่ 3 คือ เอ็มบริโอหลุดออกจากเปลือกเมล็ด มากกว่าสิ่งทดลองที่เติมสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 0, 1 และ 2 มิลลิลิตรต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 1) จากนั้นสุ่มนำเมล็ดบนอาหารทุกสิ่งทดลองที่เพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 16 สัปดาห์ มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอเพื่อศึกษาระยะการพัฒนาของเมล็ดและต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ด พบว่าต้นอ่อนของเอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร มีพัฒนาการของการเจริญเติบโตถึงระยะที่ 6 คือ ไรโซมมีจำนวนมากขนาดใหญ่ขึ้นจากเดิมมีสีเขียว ไรโซมที่ยาวจะมีลักษณะเป็นข้อ ไรโซมพัฒนาเกิดเป็นยอดงอกพ้นผิวอาหารขึ้นมา บริเวณส่วนโค้งที่เกิดยอดจะมีขนาดใหญ่เป็นที่สะสมอาหาร บางไรโซมเกิดราก 1-2 ราก และมีขนคล้ายปุยนุ่นจำนวนมากปกคลุมตลอดทั้งไรโซม จำนวนมากที่สุด (60.00±14.53 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ รองลงมาคือสิ่งทดลองที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร VW (37.77±16.44 เปอร์เซ็นต์) และอาหารที่เติมสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 4 มิลลิลิตรต่อลิตร (40.00±6.67 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 2)

สำหรับลักษณะของต้นอ่อนในระยะพัฒนาการที่ 6 ที่พบในสิ่งทดลองที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร VW และอาหารที่เติมสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร แสดงในภาพที่ 2 จากภาพแสดงให้เห็นว่าต้นอ่อนบนอาหารที่เติมสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร มีลักษณะใบสีเขียวเข้ม และมีขนาดใหญ่กว่าต้นอ่อนที่เกิดบนอาหารวุ้นสูตร VW ในขณะที่เมล็ดที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถชักนำให้เมล็ดมีพัฒนาการได้สูงสุดในระยะ 3.2 คือ เอ็มบริโอขยายขนาดใหญ่ขึ้นจากเดิม 5-10 เท่า หลุดออกจากเปลือก มีสีเขียวอ่อน เริ่มมีขนคล้ายปุยนุ่นจำนวนมากปกคลุม จำนวน 18.89±8.39 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินเลยพบว่าเมล็ดจะมีการเจริญเติบโตได้มากที่สุดเพียงแค่ระยะที่ 2.1 คือ เอ็มบริโอขยายขนาดใหญ่ขึ้นจากเดิม มีสีขาว ไม่มีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ แต่เอ็มบริโอยังไม่แตกออกจากเมล็ด จำนวน 24.33±10.04 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การงอก±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเมล็ดเอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิด และเปอร์เซ็นต์ระยะการงอกภายหลังการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารวุ้นสูตรต่างๆ เวลา 16 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	% การงอก	0*	1*	2*	3*
Vacin and Went (VW)	100±0.00a	0.00±0.00b	0.00±0.00c	0.00±0.00b	100±0.00a
Hydroponics 0 ml.	24.44±10.18b	75.55±10.18a	24.44±10.18a	0.00±0.00b	0.00±0.00c
Hydroponics 1 ml.	100±0.00a	0.00±0.00b	10.00±8.82b	90.00±8.82a	0.00±0.00c
Hydroponics 2 ml.	100±0.00a	0.00±0.00b	0.00±0.00c	8.89±8.39b	91.11±8.39b
Hydroponics 3 ml.	100±0.00a	0.00±0.00b	0.00±0.00c	0.00±0.00b	100±0.00a
Hydroponics 4 ml.	100±0.00a	0.00±0.00b	0.00±0.00c	2.22±3.85b	97.78±3.85a
Hydroponics 5 ml.	100±0.00a	0.00±0.00b	0.00±0.00c	0.00±0.00b	100±0.00a

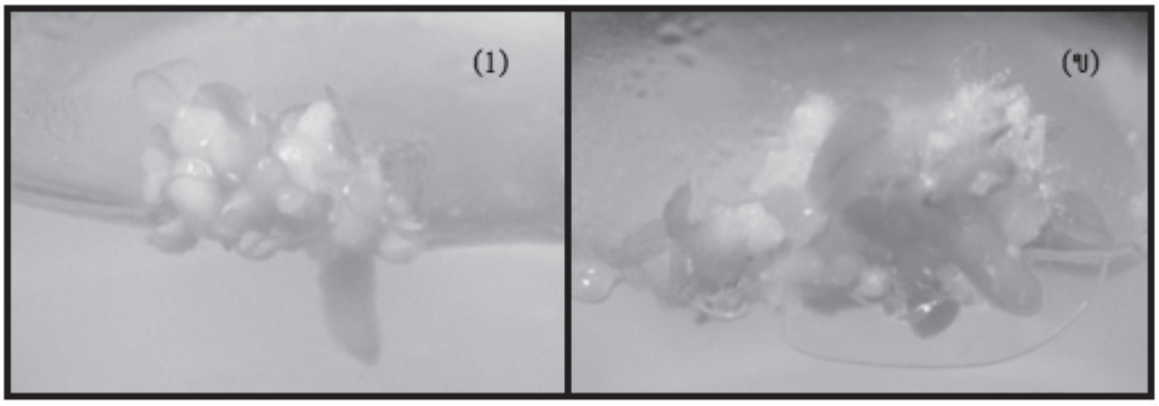
หมายเหตุ : ตัวอักษรเหมือนกันที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

0* - เมล็ดที่มีเอ็มบริโอแต่ไม่งอก
1* - เมล็ดที่มีการขยายตัว พองบวม (งอก) แต่ยังไม่หลุดออกจากเปลือกเมล็ด
2* - เมล็ดที่มีเอ็มบริโอเกือบหลุดออกจากเปลือกเมล็ด
3* - เมล็ดที่มีเอ็มบริโอหลุดออกจากเปลือกเมล็ด

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของระยะพัฒนาการของต้นอ่อนเอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดภายหลังการเพาะเลี้ยงเมล็ดเป็นเวลา 16 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	ระยะพัฒนาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้							
	1*	2.1*	2.2*	3.1*	3.2*	4*	5*	6*
Vacin and Went	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	3.33±5.77b	20.00±10.00c	38.89±15.03a	37.77±16.44b
Hydroponics 0 ml	75.55±10.18a	24.33±10.04a	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00d	0.00±0.00c	0.00±0.00d
Hydroponics 1 ml	0.00±0.00b	0.00±0.00b	10.00±8.81a	71.11±3.85a	18.89±8.39a	0.00±0.00d	0.00±0.00c	0.00±0.00d
Hydroponics 2 ml	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	13.33±3.33a	52.22±6.94a	30.00±3.34ab	4.44±3.85d
Hydroponics 3 ml	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	35.55±7.70b	43.33±10.00a	21.11±5.09c
Hydroponics 4 ml	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	2.22±3.85b	23.33±8.82c	34.44±5.09ab	40.00±6.67b
Hydroponics 5 ml	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	16.66±6.67a	23.33±8.82b	60.00±14.53a

หมายเหตุ : ตัวอักษรเหมือนกันที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 2 ต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดที่อยู่ในระยะพัฒนาการที่ 6 ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์

(1) - ต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดบนอาหารวุ้นสูตร VW

(2) - ต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดบนอาหารวุ้นจากสารละลายปลูกพืชไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับอาหารวุ้นสูตร VW ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอาหารทุกสิ่งทดลองสามารถชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดเอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดได้แม้แต่ในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินซึ่งจะมีเพียงน้ำตาลในอาหารเท่านั้น สอดคล้องกับรายงานของ Pierik et al. (1988) ว่าน้ำตาลเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรตภายนอกที่สำคัญในกระบวนการงอก และเจริญเติบโตของเมล็ด แต่เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพบว่าทุกชุดการทดลองมีเปอร์เซ็นต์การแต่ทั้งนี้ธาตุอาหารต่างๆ ก็น่าจะมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดด้วยเช่นกัน เนื่องจากสิ่งทดลองที่ไม่มีการเติมสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินนั้นจะมีเปอร์เซ็นต์การงอกน้อยที่สุดเพียง 24.44±10.18 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งธาตุอาหารยังมีผลต่อการกระตุ้นระยะการงอกของเมล็ดโดยชุดการทดลองที่มีธาตุอาหารความเข้มข้นมาก เช่น อาหารวุ้นสูตร VW และอาหารที่เติมสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินความเข้มข้นอย่างละ 2-5 มิลลิลิตรต่อลิตร จะกระตุ้นให้เมล็ดมีการงอกถึงระยะที่เอ็มบริโอหลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ดได้ ในขณะอาหารที่ไม่มีการเติมสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินจะชักนำให้เมล็ดมีการงอกได้เพียงระยะที่ 1 คือ เมล็ดมีการขยายตัว พองบวมแต่ยังไม่หลุดออกจากเปลือกเมล็ดเท่านั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ อนุพันธ์ และแสงเดือน (2550) ซึ่งศึกษาลักษณะการงอกของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องคำผักปราบที่ได้รับแสงแตกต่างกันบนอาหารวุ้นสูตร VW เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดที่เอ็มบริโอหลุดออกจากเปลือกเมล็ดมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น โดยมีเมล็ดที่ได้รับความมืด 4 สัปดาห์ แล้วตามด้วยแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน 12 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดถึง 92.64 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการศึกษาระยะพัฒนาการของต้นอ่อนเอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดที่งอกจากเมล็ดภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่เติมสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร มีพัฒนาการของการเจริญเติบโตถึงระยะที่ 6 จำนวนมากที่สุด รองลงมาคือสิ่งทดลองที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้น

อย่างละ 4 มิลลิลิตรต่อลิตร และอาหาร VW เช่นเดียวกับการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ดินเหลืองประไพ (Eulophia promensis Lindl.) บนอาหารสูตร Vacin and Went (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 ml/l น้ำต้มมันฝรั่ง 50 g/l น้ำตาล 20 g/l, ผงวุ้น 7 g/l เลี้ยงไว้ในที่ให้ได้รับแสงแตกต่างกัน เป็นเวลา 24 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดกล้วยไม้ดินเหลืองประไพที่เลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 สัปดาห์แล้วย้ายออกที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวันเลี้ยงจนอายุครบ 24 สัปดาห์ พบว่า จะมีอัตราการงอกในระยะที่ 4 และในระยะที่ 6 สูงที่สุดคิดเป็น 33.20 ± 8.77a และ 3.60 ± 0.83a เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (วุฒิชัย และอนุพันธ์ กงบังเกิด, 2555) ในขณะที่สิ่งทดลองที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมเฉพาะน้ำตาลพบว่ามีการเจริญของต้นอ่อนเพียงแค่ระยะที่ 2.1 เท่านั้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระยะพัฒนาการของต้นอ่อนมีความผันแปรตามความเข้มข้นของสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

ผลการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าอาหารวุ้นจากสารละลายปลูกพืชไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงเมล็ดของเอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดทดแทนอาหารสูตร VW ได้ เนื่องจากอาหารสูตรดังกล่าวสามารถชักนำให้เมล็ดเอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดมีการงอก และการเจริญเติบโตสูงกว่าด้วยต้นทุนต่ำ เนื่องจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินราคาชุดละ 120 บาท สามารถเตรียมอาหารได้ 100 ลิตร จึงมีต้นทุนเฉลี่ยเพียง 1.20 บาทต่อลิตร เท่านั้น และยังมีวิธีการเตรียมที่ง่าย สามารถหาซื้อวัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีได้ตามท้องตลาดด้วยราคาไม่แพง เช่น การใช้ตู้ปลา ราคา 250 บาท แทนตู้ย้ายเนื้อเยื่อ และการใช้น้ำยาฟอกผ้าขาวไฮเตอร์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแทนการนึ่งโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ เป็นต้น

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อเสนอแนะเพื่อการนำผลการวิจัยไปใช้งาน

ควรนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างง่ายที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปเป็นแนวทางในการส่งเสริมการเก็บรักษา อนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ และการขยายพันธุ์กล้วยไม้เพื่อส่งเสริมธุรกิจในระดับชุมชน เช่น กลุ่มเกษตรกร และโรงเรียนต่าง ๆ

2. ข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยต่อไป

ควรศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์. (2556). **ผลของน้ำยาฟอกผ้าขาวต่อการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อม่วงเทพรัตน์.** Rajabhat Journal of Science, Humanities & Social Science. 14(2), 34-43.

ทิวา รักนิ่ม อมรพันธ์ แก้วศรีนวล ปรีชา วิทยพันธุ์ และจีรศักดิ์ แสงศรี. (2550). **อิทธิพลของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อการงอกของเมล็ดรองเท้านารีคางกบใต้ในสภาพปลอดเชื้อ.** วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 38(6), 287-290.

วีระชัย ณ นคร และสุรางค์รัชต์ อินทะมุสิก. (2543). **สวนพฤกษาศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม 6 กล้วยไม้ไทย.** กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮาส์.

วุฒิชัย ฤทธิ และอนุพันธ์ กงบังเกิด. (2555). **ผลของแสงต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดินเหลืองประไพในสภาพปลอดเชื้อ.** พิษณุโลก : หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มหาวิยาลัยนเรศวร.

อนุพันธุ์ กงบังเกิด และแสงเดือน วรรณชาติ. (2550). **ผลของแสงต่อการงอกและพัฒนาการของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องคำผักปราบ.** พิษณุโลก : หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มหาวิยาลัยนเรศวร.

อรรณพ เทียมแก้ว เชิดศักดิ์ ทัพใหญ่ และ อนุพันธ์ กงบังเกิด. (2555). **ผลของแสงและอายุฝักต่อพัฒนาการงอกของเมล็ดของกล้วยไม้นางกรายในหลอดทดลอง.** พิษณุโลก : หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มหาวิทยาลัยนเรศวร.

Arditti, J. (1979). **Aspects of the physiology of orchids.** Advance Botanical Research. 7, 421-655.

Pierik, R. L. M., P. A. Sprenkels, B. Van Der Harst & Q.G. Van Der Meys. (1988). **Seed germination and further development of plantlets of Paphiopedilum ciliolare Pfitz. in vitro".** Scientia Horticulturae. 34, 139-153.

Vacin, E. F. & F. W. Went. (1949). **Some pH changes in nutrient solution.** Botanical Gazette. 110, 605-613.