การขยายพันธุ์กล้วยไม้พื้นเมืองและหายาก "นางอั้วสาคริก" โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

A Tissue Culture Protocol for Propagation of Native and Rare Orchid, *Pecteilis sagarikii* Sedenf.

อัญชลี จาละ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12121

บทคัดย่อ

การทดลองขยายพันธุ์กล้วยไม้นางอั้วสาคริกโดยการเพาะฝักอ่อน และฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับเมล็ด ด้วยสารละลายคลอรอกซ์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เมื่อเปรียบเทียบสารละลายทั้งสองชนิดที่ทำให้ได้เมล็ดกล้วยไม้ปราศจากการปนเปื้อน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริกมีอัตราการงอกใกล้เคียงกัน คือ 73.02 และ72.76 เปอร์เซ็นต์ (ตามลำดับ)

หลังจากบ่มเมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริกไว้ในที่มืดเป็นเวลานาน 4 เดือน ย้ายลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรVacin and Went (VW) ดัดแปลง โดยเติมน้ำมะพร้าวอ่อน หรือน้ำสกัดมันฝรั่งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (10%, 15% และ 20 %) รวมทั้งเติมธาตุอาหารรองและไวตามินของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS) นานอีก 4 เดือน ปรากฏว่าค่าเฉลี่ยของโปรโตคอร์มที่พัฒนาและเจริญมาจากเมล็ดกล้วยไม้นั้น มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) คือบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 10% มีจำนวนโปรโตคอร์มเกิดขึ้นสูงที่สุด

หลังจากนั้นย้ายโปรโตคอร์มลงเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลงสูตร VW เดิม อีก 3 ครั้งโดยทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าจำนวนโปรโตคอร์มที่มีการพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนบนอาหารแต่ละสูตรนั้นมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ต้นอ่อนที่เกิดขึ้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 15%ให้ผลดีที่สุด

คำสำคัญ: นางอั้วสาคริก โปรโตคอร์ม

Abstract

Microprogation *Pecteilis sagarikii* by culturing young pod was investigated. The clorox and hydrogen peroxide solutions were compared for young seed sterilization, and it was not significantly different between treatments. The percentages of *Pecteilis sagarikii* seed germination were 73.02 and 72.76, respectively.

Pecteilis sagarikii seeds were incubated in the dark condition for 4 months, then were cultured on modified Vacin and Went medium supplemented with young coconut water, potato extraction at different concentrations (10% ,15%, and 20%) or with microelement and vitamin of Murashige and Skoog medium for 4 months. The average growth and development of protocorms were significantly different ($p<0.05$) among treatments. Modified VW medium supplemented with 10% young coconut water gave the best result.

The protocorms were transferred 3 times (subcultured every 4 weeks) to the same modified VW medium. The average number of protocorms which developed to be seedlings was significantly different ($p<0.05$) among treatments. Modified VW medium supplemented with 15% young coconut water gave the highest number of seedlings.

Keywords : *Pecteilis sagarikii* Sedenf., Protocorm like bodies

1. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

(1) การเตรียมอาหาร

เตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Vacin and Went สำหรับการเพาะเลี้ยง เมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริก เพื่อชักนำให้เมล็ดมีการเจริญเติบโต การเกิดเป็นโปรโตคอร์มตลอดจนเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อน

1.1 อาหารสำหรับเพาะเมล็ด โดยเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร VW (1949) ดัดแปลงโดยเติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตรต่อลิตร และน้ำตาลทราย 20 กรัม ต่อลิตร

1.2 อาหารสำหรับการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มและเจริญเติบโต โดยเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร VW (1949) ดัดแปลงโดยเติมน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร น้ำสกัดมันฝรั่งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (10%, 15% และ 20%) หรือ น้ำมะพร้าวอ่อนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (10%, 15% และ 20%) และ VW ที่เติมสารอาหาร ธาตุอาหารรอง และไวตามินของสูตร Murashige and Skoog [17] (รวม 8 ทรีตเมนต์)

(2) เตรียมฝักกล้วยไม้นางอั้วสาคริก

โดยช่วยทำการผสมพันธุ์ให้ได้ฝักอ่อนนางอั้วสาคริก และใช้ฝักที่มีอายุ 40 วัน (หลังจากผสมพันธุ์)

การทดลองที่ 1 ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับเมล็ด

เพาะฝักอ่อนนางอั้วสาคริกโดย เปรียบเทียบชนิดของสารละลายที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับเมล็ดระหว่างคลอรอกซ์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และนำเมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริก เพาะลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW และบ่มขวดอาหารที่มีเมล็ดนางอั้วสาคริกนี้ในห้องที่มืด ปรับอุณหภูมิที่ 25 ±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4 เดือน เมื่อครบ

เวลาทำการตรวจสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริก โดยสุ่มตรวจนับเมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริกครั้งละ 50 เมล็ดในแต่ละขวด ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์และบันทึกผล โดยให้เป็นคะแนนแบ่งกลุ่มของเมล็ดออกเป็นระดับและหาเปอร์เซ็นต์การงอกและดัชนีการงอก

การทดลองที่ 2 การเจริญเป็นโปรโตคอร์ม

นำเมล็ดจากการทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ VW ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 10%, 15% และ 20% น้ำสกัดมันฝรั่ง 10%, 15% และ 20% และเติมธาตุอาหารรองและไวตามินตามสูตร MS และ VW (รวม 8 ทรีตเมนต์) เพื่อศึกษาพัฒนาการของเมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริกเจริญเป็นโปรโต-คอร์ม และบันทึกผลการทดลองหลังจากทำการเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน โดยนับจำนวนโปรโตคอร์มที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ 3 การตรวจวัดอัตราการเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนของโปรโตคอร์ม

ศึกษาอิทธิพลของน้ำมะพร้าวอ่อน น้ำสกัดจากมันฝรั่งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (10%, 15% และ 20%) และธาตุอาหารรองและไวตามินของสูตร MS ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้นางอั้วสาคริก โดยนำโปรโตคอร์มนางอั้วสาคริกขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร จำนวน 10 โปรโตคอร์มมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 10% น้ำมะพร้าวอ่อน 15% น้ำมะพร้าวอ่อน 20% น้ำสกัดมันฝรั่ง 10% น้ำสกัดมันฝรั่ง 15% น้ำสกัดมันฝรั่ง 20% และเติม ธาตุอาหารรองและไว-ตามินตามสูตร บันทึกอัตราการเจริญเติบโตและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้นางอั้วสาคริกในแต่ละขวดการทดลอง

(3) วางแผนการทดลอง

แบบ RCBD (Randomized Complete Block Design)

นำขวดอาหารสูตรต่าง ๆ ที่มีโปรโตคอร์มเพาะเลี้ยงที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,600 ลักซ์ ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

(4) สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี

(5) ระยะเวลาทดลอง

ตุลาคม 2550 ถึง ตุลาคม 2551

(6) ผลการทดลอง

จากการนำฝักอ่อนของกล้วยไม้นางอั้ว-สาคริกอายุ 40 วัน มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW และทดสอบสารฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้สารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น10% เป็นเวลานาน 10 นาที และสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แช่นาน 20 นาที พบว่าเมื่อผ่าฝักกล้วยไม้นางอั้วสาคริก ภายในพบเมล็ดเป็นสีน้ำตาลอ่อน เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร VW และบ่มในที่มืดนาน 4 เดือน ปรากฏว่ามีการเปลี่ยนแปลงหลายรูปแบบ บางเมล็ดเกิดการพองบวมขึ้น คัพภะมีขนาดใหญ่ขึ้น บางเมล็ดก็พองดันออกมาพ้นเปลือกหุ้มเมล็ด (testa) บางเมล็ดคัพภะก็ยังคงอยู่ในเมล็ด จึงทำการจัดแบ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเมล็ด และแจกแจงให้คะแนนตามลักษณะการเจริญเติบโตของคัพภะดังตารางที่ 1

จากการตรวจสอบการงอกของเมล็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริกที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่เมล็ดด้วยคลอรอกซ์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้นบางเมล็ดไม่มีการเปลี่ยนแปลง เห็นเป็นเมล็ดเหมือนเดิม อาจกล่าวได้ว่าเมล็ดนั้นอาจไม่งอก แต่มีบางเมล็ดมีการพองบวมคัพภะมีขนาดใหญ่ขึ้นเห็นได้ชัดโดยมีลักษณะของเนื้อเยื่อยื่นออกมา ซึ่งลักษณะที่ปรากฏให้เห็นนี้แสดงว่าเมล็ดมีการงอกเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 1 จากการบันทึกข้อมูลและเมื่อนำมาเปรียบเทียบค่าการงอกของเมล็ดทางสถิติเนื่องจากสารละลายที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดนางอั้วสาคริกทั้ง 2 ชนิด พบว่า เมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริกนี้ มีค่าดัชนีการงอกไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราการงอกและดัชนีการงอกของเมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริก โดยการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หลังจากเลี้ยงบนอาหารด้วยสารละลายสังเคราะห์สูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลงเป็นเวลา นาน 4 เดือน

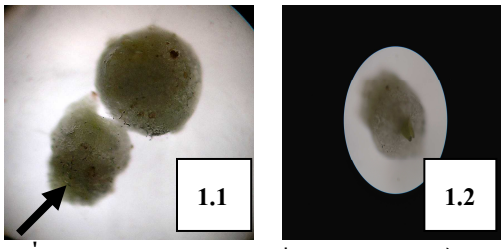
สารฟอกฆ่าเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (คะแนน)*				อัตราการงอก	ดัชนี การงอก (เฉลี่ย)
	0	1	2	3		
คลอรอกซ์	26.98	46.18	8.63	18.21	73.02	0.22
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	27.24	45.02	7.56	20.18	72.76	0.23

* คะแนน 0 – เมล็ดที่มีคัพภะ แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

คะแนน 1 – เมล็ดที่คัพภะมีขนาดใหญ่ขึ้น มียอด เนื้อเยื่อเจริญยื่นออกมา

คะแนน 2 – เมล็ดที่คัพภะมีขนาดใหญ่ขึ้น และเกือบหลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด

คะแนน 3 – เมล็ดที่คัพภะหลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด



รูปที่ 1 การเจริญเติบโตเป็นโปรโตคอร์มของกล้วยไม้นางอั้วสาคริกเป็นก้อนกลม ฐานกว้างและปลายลูกศรเป็นเปลือกของโปรโตคอร์ม (1.1) และ มีใบอ่อนแทงออกมา (1.2)

หลังจากย้ายเมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริกจากการทดลองที่ 1 ลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลงโดยเติมน้ำมะพร้าว น้ำสกัดจากมันฝรั่งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (10%, 15% และ 20%) และสูตร VW ที่เติม ธาตุอาหารรอง และไวตามิน ของสูตร Murashige and Skoog [17] (รวมทั้งหมด 8 ทรีตเมนต์) หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน ผลปรากฏว่ามีการเปลี่ยนแปลงเมล็ด ทยอยกันพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม ซึ่งมีลักษณะเป็นก้อนสีขาว กลม และค่อย ๆ โตขึ้น (ดังรูปที่ 1.1) มีโคนกว้างป้าน และส่วนยอดจะพุ่งเรียวแหลม ด้านบนยอดนี้จะค่อย ๆ ยืดยาวออก

พร้อมทั้งเริ่มมีสีเขียว (ดังรูปที่ 1.2) และเมื่อโปรโตคอร์มนี้เจริญเติบโตขึ้นเป็นก้อนสีเขียวกลม ยอดแหลมก็จะค่อย ๆ คลี่ออกเป็นใบอ่อนใบแรก เป็นสีเขียวอ่อนมีขนาดใหญ่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า แจกแจงผลของการเกิดและงอกเป็นโปรโตคอร์ม บนอาหารสูตรVW ดัดแปลง โดยให้เป็นคะแนนตามความสามารถในการงอกบนอาหารสังเคราะห์สูตรของ VW ที่ดัดแปลงได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 อัตราการเกิดโปรโตคอร์มของกล้วยไม้นางอั้วสาคริกบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ที่ดัดแปลง

สูตรอาหาร VW ที่เติมสารดังนี้	ปริมาณการเกิด โปรโตคอร์ม (คะแนน)					
	1*	**2***	**3***	**4***	**5***	**ค่าเฉลี่ย**
VWไม่เติมสาร (ควบคุม)	**3**	**4**	**4**	**5**	**3**	**3.8 ± 0.374** [c]
เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 10%	**3**	**4**	**5**	**5**	**3**	**4.0 ± 0.447** [b]
เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 15%	**4**	**5**	**3**	**3**	**5**	**4.0 ± 0.447** [b]
เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 20%	**3**	**4**	**5**	**4**	**4**	**4.0 ± 0.316** [b]
เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 10%	**4**	**4**	**5**	**4**	**5**	**4.4 ± 0.244** [a]
เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 15%	**4**	**4**	**3**	**4**	**4**	**3.8 ± 0.200** [c]
เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 20%	**3**	**4**	**4**	**5**	**3**	**3.8 ± 0.374** [c]
เติมธาตุอาหารรอง และไวตามิน ของ MS	**4**	**4**	**3**	**3**	**4**	**3.6 ± 0.244** [c]

*ปริมาณการเกิดโปรโตคอร์ม ในแต่ละขวดที่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

a, b, c เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95%

จากตารางที่ 2 การงอกของโปรโตคอร์มและการเจริญเติบโตบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลงทั้ง 8 สูตร มีปริมาณการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบคะแนนการเกิดโปรโตคอร์มในแต่ละสูตรทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณการเกิดโปรโตคอร์มที่เกิดขึ้นในแต่ละสูตรอาหารVW ด้วย DMRT ($p<0.05$) ปรากฏว่าการพัฒนาของเมล็ดเป็นโปรโตคอร์มในสูตรอาหาร VW ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 10% จะให้ค่าเฉลี่ยของการเกิดเป็นโปรโตคอร์มสูงสุด รองลงมาได้แก่สูตรที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (10%, 15% และ 20%) ส่วนสูตรอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15% และ 20% สูตรที่เติมธาตุอาหารรองและไวตามินของสูตร MS และสูตร VW ที่ไม่เติมสารอื่น ๆ (ตัวควบคุม) มีการพัฒนาและเจริญเป็นโปรโตคอร์มน้อยที่สุด

ย้ายโปรโตคอร์มนางอั้วสาคริกจากการทดลองที่ 2 เพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์ VW ดัดแปลง ที่เติมน้ำมะพร้าว และน้ำสกัดมันฝรั่งความเข้มข้นต่าง ๆ (10%, 15% และ 20 %) และสูตร VW เติมธาตุอาหารรองและไวตามินของสูตรอาหาร MS แต่ละสูตรอาหาร VW ดัดแปลง (ดังตารางที่ 3) เพาะเลี้ยงต่อไปอีก 4 เดือน (เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4

สัปดาห์) พบว่าต้นอ่อนที่เกิดขึ้น เริ่มมีใบคลี่ออกมาให้เห็นตั้งแต่ 2 ใบขึ้นไป (รูปที่ 2.1) ภายใต้อุณหภูมิ 25 ±1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันดังตารางที่ 3

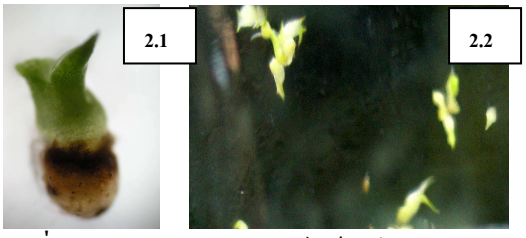
ตารางที่ 3 จำนวนต้นอ่อนที่พัฒนามาจากโปรโตคอร์มบนอาหารสูตร VW ดัดแปลง ที่เติมน้ำมะพร้าว น้ำสกัดมันฝรั่ง และที่เติมธาตุอาหารรอง และไวตามิน ของสูตร MS อายุ 4 เดือน

สูตรอาหารVWดัดแปลงที่เติมสารต่าง ๆ ดังนี้	จำนวนต้นอ่อนที่เกิดขึ้นในแต่ละขวด					ค่าเฉลี่ย *
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	
VWไม่เติมสาร (ตัวควบคุม)	**6**	**8**	**5**	**6**	**4**	**5.8 ± 0.663** [b]
เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 10%	**7**	**6**	**5**	**5**	**6**	**5.8 ± 0.374** [b]
เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 15%	**6**	**7**	**5**	**4**	**5**	**5.4 ± 0.509** [c]
เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 20%	**7**	**6**	**6**	**5**	**6**	**6.0 ± 0.316** [b]
เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 10%	**8**	**7**	**6**	**6**	**5**	**6.4 ± 0.509** [b]
เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 15%	**8**	**6**	**7**	**8**	**7**	**7.2 ± 0.374** [a]
เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 20%	**6**	**7**	**6**	**7**	**7**	**6.6 ± 0.244** [b]
เติมธาตุอาหารรองและไวตามินของสูตร MS	**5**	**4**	**6**	**5**	**6**	**5.2 ± 0.374** [c]

* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

a, b, c เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของโปรโตคอร์มเป็นต้นอ่อนที่เกิดขึ้นในแต่ละสูตรอาหาร VW ดัดแปลงดังตารางที่ 3 พบว่าโปรโตคอร์มมีการพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของต้นอ่อนที่เกิดขึ้นในแต่ละสูตรอาหาร VW ด้วย DMRT ($p<0.05$) ปรากฏว่าสูตรอาหาร VW ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 15% โปรโตคอร์มพัฒนาเป็นต้นอ่อนให้ผลดีที่สุด สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ต้นมีขนาดเล็ก มีใบสีเขียวอ่อน (รูปที่ 2.2) รองลงมาคือสูตรที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 10%, 20% และน้ำสกัดจากมันฝรั่ง 10% และ 20 % และสูตร VW ที่เป็นตัวควบคุม ส่วนสูตรอาหาร VW ที่เติมธาตุอาหารรองและไวตามินของสูตร MS และที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 15% โปรโตคอร์มพัฒนาและเจริญเป็นต้นอ่อนน้อยที่สุด VW ที่เป็นตัวควบคุม ส่วนสูตร อาหาร VW ที่เติมธาตุอาหารรองและไวตามินของสูตร MS และที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 15% โปรโตคอร์มพัฒนาและเจริญเป็นต้นอ่อนน้อยที่สุด



รูปที่ 2 การงอกของโปรโตคอร์มเป็นต้นอ่อนหลังจากเลี้ยงบนอาหาร VW ดัดแปลง (2.1) อายุ 8 สัปดาห์ กำลังขยาย 50 เท่า (2.2) อายุ 12 สัปดาห์สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

2. ผลการทดลอง

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ทั่วไปพบว่าต้องการปัจจัยในการงอกที่ประกอบด้วย ก๊าซออกซิเจน น้ำ และอุณหภูมิที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังมีอีกสาเหตุอื่นๆ อีกเช่น การพักตัวของเมล็ด ซึ่งมีทั้งภายในและภายนอก [13, 18] เมล็ดกล้วยไม้ดินดูดน้ำได้ยาก [1, 22] ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากเปลือกหุ้มเมล็ด (testa) ถูกปกคลุมด้วยชั้นของไขมันที่ทำหน้าที่ป้องกันมิให้น้ำสามารถซึมผ่านเข้าไปได้ นอกจากนี้โครงสร้างของเปลือกหุ้มเมล็ดมีลักษณะเป็นคลื่นที่สามารถกักเก็บฟองอากาศไว้ และยังมีช่องว่างของอากาศแทรกอยู่ระหว่างเปลือกหุ้มเมล็ดกับคัพภะ ทำให้เมล็ดนั้นลอยน้ำ [6, 7, 20, 28, 29] นี่ก็อาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เมล็ดพักตัว ไม่งอกได้ ดังนั้นการแก้ไขทำโดยการแช่เมล็ดลงในสารละลายคลอรอกซ์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเติมสารจับใบ ก็อาจเป็นการทำลายไขมันที่อยู่ที่บริเวณผิวของเปลือกหุ้มเมล็ด หรืออาจทำให้เปลือกของเมล็ดบางลงได้บ้าง ดังรายงานของ Fast ที่ได้รายงานไว้ว่าพบสารยับยั้งการงอกที่เปลือกหุ้มเมล็ดของกล้วยไม้ [9] แต่ Van der Kinderen พบว่าสารยับยั้งการงอกที่มีอยู่ภายในเมล็ดกล้วยไม้นั้น เกี่ยวข้องกับการพักตัวของเมล็ด คือ abscisic acid (ABA) [24] จากการศึกษากล้วยไม้ดินที่งอกยากชนิดหนึ่ง คือ *Epipactis helleborine* พบว่ามีปริมาณ abscisic acid ภายในเมล็ดมากกว่ากล้วยไม้ดินที่งอกง่าย คือ *Dactylorhiza maculaca* ถึง 5 เท่า และ Van Waes ได้รายงานว่าการเติมสาร abscisic acid ให้กับเมล็ดกล้วยไม้ทั้งสองชนิดนี้พบว่า สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดได้ทั้งสองชนิด [25] ดังนั้นการล้างเมล็ดด้วยสารละลายเอทานอล อีเทอร์ หรือตัวทำละลายไขมันอื่น ๆ การใช้สารละลายคลอรอกซ์ (NaOCl หรือ CaOCl) รวมทั้งสารไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ ซึ่งเป็นสาร oxidizing agent มีผลทำให้ชั้นผิวที่เป็นไขมันเสียสมบัติในการป้องกันน้ำบริเวณผิวเสียไป และการเติมสารลดแรงตึงผิวลงไป ก็เป็นการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านน้ำได้ดีขึ้น ทั้งนี้เพราะสารลดแรงตึงผิวจะช่วยให้น้ำสัมผัสกับชั้นที่เป็นไขมันของเปลือกหุ้มเมล็ดได้ดียิ่งขึ้น [17, 18] ดังนั้นการทดลองใช้สารละลายคลอรอกซ์ ร่วมกับน้ำยาซันไลท์ (ทำหน้าที่ลดแรงตึงผิว) ในการฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับเมล็ด อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีค่าดัชนีการงอกสูงกว่าเมล็ดที่ฟอกด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารละลายคลอรอกซ์และน้ำยาซันไลท์ ไปช่วยทำลายชั้นผิวของไขมันที่บริเวณเปลือกหุ้มเมล็ด หรือทำให้ไขมันที่บริเวณเปลือกหุ้มเมล็ดบางลง น้ำจึงสามารถผ่านเข้าไปได้ การทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Harvais และHadley ที่ทดลองฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดกล้วยไม้ *Dactylorhiza purpurella* ด้วยคลอรอกซ์จากเมล็ดที่มีสีเข้มจนได้เมล็ดที่มีสีอ่อน มีผลทำให้อัตราการงอกของเมล็ดสูงขึ้น รวมทั้งการแช่เมล็ดในน้ำเป็นเวลานานก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ช่วยกำจัด หรือทำลายบางส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ด และยังช่วยลดปริมาณสารยับยั้งการงอก (ABA) ได้อีกด้วย [11, 26] ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Van Waes ซึ่งพบว่าหลังทำการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดกล้วยไม้ *Dactylorhiza maculate* นาน 2 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบสาร abscisic acid ปรากฏว่าไม่พบ [25] ดังนั้นจากผลการทดลองใช้สารละลายต่างชนิดกันทั้ง 2 ทรีตเมนต์ เมื่อพิจารณาในด้านการงอก (อัตราการงอกของเมล็ด) แล้ว พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่คุณภาพการงอกของเมล็ด (ดัชนีการงอก) ของเมล็ดที่ฟอกด้วยสารละลายคลอรอกซ์ร่วมกับน้ำยาซันไลท์ให้ค่าเฉลี่ยมากกว่าเล็กน้อย

เปรียบเทียบชนิดของสารละลายที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์สูตร Vacin and Went

จากการเพาะเมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริกบนอาหารสังเคราะห์สูตรVacin and Went ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 15 % และเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลานาน 4 เดือน แล้วย้ายเมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริกนี้ลงเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ที่มีการดัดแปลงโดยเติมน้ำมะพร้าวอ่อน น้ำสกัดจากมันฝรั่ง และที่เติมธาตุอาหารรอง และไวตามินของสูตร Murashige and Skoog [12] ผลปรากฏว่าเมล็ดนางอั้วสาคริกมีค่าเฉลี่ยดัชนีการงอกเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากในช่วงแรกของการงอก ปริมาณธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองไม่มีผลมากนักต่อการพัฒนาของเมล็ดนางอั้วสาคริกในระยะแรก และจากการศึกษาของ Pierik และคณะได้กล่าวว่าการงอกเมล็ดกล้วยไม้จะไม่เกิดขึ้นถ้าไม่มีการเติมน้ำตาลลงในอาหารสังเคราะห์ [19] แต่เนื่องจากการทดลองนี้เติมทั้งน้ำตาลและน้ำมะพร้าว ตลอดจนน้ำสกัดจากมันฝรั่ง ซึ่ง Ratsek, Raghvan และ Woodroof ได้รายงานว่าในน้ำมะพร้าวมีน้ำตาลฟรุคโตส กลูโคส และซูโครส เป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณ 5.25, 7.25 และ 9.18 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ [15, 19, 27] การทดลองนี้มีการเติมน้ำมะพร้าวและน้ำต้มมันฝรั่งลงในอาหารสังเคราะห์ VW ดังนั้นนน้ำมะพร้าวและน้ำต้มมันฝรั่งจึงไม่ใช่ปัจจัยที่มีผลยับยั้งการงอกของเมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริก ซึ่งเหมือนกับการทดลองของ Fast ที่ทำการทดลองกับ *Paphiopedilum aua samen* [8] และ Pierik และคณะ ที่ทำการทดลองเพาะเมล็ด *Paphiopedilum ciliolare* [14] แล้วพบว่าถ้าเพิ่มปริมาณน้ำตาลมากขึ้น จะส่งผลให้การงอกของเมล็ดกล้วยไม้นี้ลดลง แต่ชนิดของน้ำตาลก็มีผลเช่นเดียวกัน คือ น้ำตาลทราย หรือกลูโคส จะไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ด และน้ำตาลทรายเมื่อผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน จะส่งผลให้น้ำตาลบางส่วนถูกไฮโดรไลท์กลายเป็นน้ำตาลฟรุคโตสและกลูโคส [3] นอกจากนี้ น้ำตาลฟรุคโตสและน้ำตาลกูลโคส ยังเป็น isomere ซึ่งกันและกันอีกด้วย

การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มในระยะแรก

จากการย้ายเมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริกลงเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร Vacin and Went [23] ดัดแปลง ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน น้ำสกัดมันฝรั่งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (10%, 15% และ 20%) และที่เติมธาตุอาหารรอง และไวตามินของสูตร Murashige and Skoog รวม 8 สูตร พบว่าเมล็ดเจริญเป็นโปรโตคอร์มนั้น มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเฉพาะสูตรที่เติมน้ำมะพร้าว 10%ให้ผลดีที่สุด ส่วนสูตรอื่น ๆ นั้นให้ผลใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเติมน้ำมะพร้าวและน้ำสกัดมันฝรั่งลงในอาหารสูตร Vacin and Went เป็นการเพิ่มปริมาณธาตุอาหาร และเกลือแร่ต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโต และพัฒนาการของโปรโตคอร์ม และจากการทดลองของ Nayak และคณะ ที่เติมน้ำมะพร้าว 10% ลงในสูตรอาหาร VW พบว่าเมล็ดกล้วยไม้มีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มจำนวนมาก [13]

การนำโปรโตคอร์มของนางอั้วสาคริกที่เกิดขึ้นมาย้ายลงเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร Vacin and Went ดัดแปลง ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน น้ำสกัดมันฝรั่งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (10%, 15% และ 20%) และที่เติมธาตุอาหารรอง และไวตามินของสูตร Murashige and Skoog รวม 8 สูตร ผลปรากฏว่าในสูตรที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 15% ให้ผลสูงที่สุด [12, 23] นั้น สอดคล้องกับการทดลองของวิวัฒน์ และ

Flame ได้พบว่าการเจริญเติบโตของเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน *Paphiopedilum concolor* นั้นมีการเจริญเติบโตดีในอาหารสูตร VW ที่มีการเติมน้ำมะพร้าว 15 % และมันฝรั่ง 10% ร่วมด้วย [2, 10] และจากการวิเคราะห์ของ Dix และ Van Staden ได้รายงานว่าในน้ำมะพร้าวนั้นมีสารประกอบจำพวกออกซินและจิบเบอลิลินที่อาจช่วยในการงอกและเจริญเป็นโปรโตคอร์มก็ได้ [7] เช่นเดียวกันกับการทดลองของ Anderson ได้รายงานว่าเมล็ดกล้วยไม้ (*Spiranthes magnicamporum*) สามารถงอกเป็นโปรโตคอร์มได้ถึง 99% บนอาหารสังเคราะห์สูตร Kundson ที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 5% [4]

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มของกล้วยไม้นางอั้วสาคริกบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลง โดยเติมน้ำมะพร้าว 15% และพบว่ามีการพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนมากที่สุดนั้นสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้สกุลหวายของ Raghavan และ Shantz และSteward ที่เติมน้ำมะพร้าวลงในอาหารสังเคราะห์สูตร VW 10 – 15 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลการเจริญเป็นต้นอ่อนได้มาก [16, 21]

3. สรุปผลการทดลอง

จากการนำฝักอ่อนของกล้วยไม้นางอั้วสาคริกมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Vacin and Went (1949) ทดสอบสารฟอกฆ่าเชื้อสารละลายคลอรอกซ์ และสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ผลปรากฏว่าสารละลายทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หลังจากบ่มในที่มืดนาน 4 เดือน ตรวจสอบเมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริกภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เมล็ดกล้วยไม้มีการเจริญเปลี่ยนแปลงหลายรูปแบบ บางเมล็ดเกิดการพองบวมขึ้น คัพภะมีขนาดใหญ่ขึ้น บางเมล็ดก็พองดันออกมาพ้นเปลือกหุ้มเมล็ด (testa) บางเมล็ดคัพภะก็ยังคงอยู่ในเมล็ด

หลังจากย้ายเมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริกลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW โดยทำการดัดแปลงเติมน้ำมะพร้าว น้ำสกัดจากมันฝรั่ง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (10%, 15% และ 20%) และสูตร VW ที่เติมธาตุอาหารรอง และไวตามินของสูตร Murashige and Skoog (1962) รวมทั้งหมด 8 สูตร ผลปรากฏว่าเมล็ดมีการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม บนสูตรอาหาร VW ดัดแปลงต่าง ๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสูตรที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 10% ทำให้เมล็ดกล้วยไม้นางอั้วสาคริกพัฒนาและเจริญเป็นโปรโตคอร์มได้สูงสุด รองลงมาได้แก่สูตรที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่งเข้มข้น10%, 15% และ20%

เมื่อย้ายโปรโตคอร์มอายุ 4 เดือนลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ VW ที่เติมน้ำมะพร้าวหรือน้ำสกัดมันฝรั่งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (10%, 15% และ 20%) และเติมธาตุอาหารรอง (microelement) และไวตามินของสูตรอาหาร MS ทั้ง 8 สูตร พบว่าโปรโตคอร์มพัฒนาและเจริญเป็นต้นอ่อนบนสูตรอาหาร VW ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 15% ได้จำนวนสูงสุด ส่วนสูตรอาหาร VW ที่เติมน้ำสกัดจากมันฝรั่ง 10% และ20% และที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 10% และ 20% โปรโตคอร์มเกิดเป็นต้นอ่อนน้อยกว่า ส่วนสูตรอาหาร VW ที่เติมธาตุอาหารรองและไวตามินของสูตร MS นั้นเกิดต้นอ่อนน้อยที่สุด

4. เอกสารอ้างอิง

[1] นิพาพร ชันทนุ, การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ดินบางชนิดในสกุลลิ้นมังกรและนางอั้ว, ปัญหาพิเศษ

ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2541.

[2] วิวัฒน์ วุฒิพันธไชย, ผลของอายุฝัก การเติมน้ำมันฝรั่ง น้ำมะพร้าว และถ่านในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเมล็ด กล้วยไม้รองเท้านารีเหลือปราจีน *Paphiopedilumconcolo.* วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2529.

[3] Arditti, J.and R., Ernst, Micropropagation of Orchids, New York, John Wiley & Sons, Inc, 1993.

[4] Anderson, A.B., Symbiotic and Asymbiotic Germination and Growth of *Spiranthes magnicamporum* (Orchidaceae), Lindleyana, Vol 6(4), pp. 183-187, 1991 .

[5] Carlson, M.C., The Germination of the Seed And Development of the Seedling of *Calopogon pulchellu* (SW.) R.Br., Transactions of Illinois State Academy, Vol. 28, pp. 85-86, 1936.

[6] Carlson, M.C., Formation of the Seed of *Cypripedium parviflorum,* Botanical Gazette Vol. 102, pp. 295-301, 1940.

[7] Dix, L. and J. Van Staden., Auxin and Gibberellin-like Substances in Coconut Milk and Malt Xtract, P.33. In H. W. Pritchard, Modern Methods in Orchid Conservation, Cambridge University Press, Cambridge, 1982.

[8] Fast, G., Versuche Zur Anzucht Von *Paphiodilum aua samen*, p.150., In R.L.M, Pierik, P.A., Sprenkels, B. Van der Harst and O.C. der Meys., Seed Germination and Further Development of pPlantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz., *In vitro*. Sci. Hort. Vol. 34, pp. 139 – 153, 1976.

[9] Fast, G., European Terrestrial Orchid (Symbiotic and Asymbiotic Methods), pp. 309 - 326. In J. Arditti (ed). Orchid Biology Reviews and Perspectives ll. Cornell University Press. Ithaca, USA. 1982 .

[10] Flame, M., Influence of Selected Media of Supplements on the Germination and Growth of *Paphiopedilum* Seedling, Amer. Orchid Soc. Bull ., Vol. 47 pp. 419-423, 1978.

[11] Harvais, G. and G. Hadley., The Relation Between Host and Endophyte in Orchid Mycorrhiza, *New Phytol*., Vol. 66, pp. 205-215, 1967.

[12] Murshige T. and F. Skoog., A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture, Plant Physiol., Vol. 15, pp. 473 – 477, 1962.

[13] Nayak, N.R., P.K. Chasd, S.P. Rath, and S.N. Patsaik., Influence of Some Plant Grow Regulators on the Growth and Organogenesis of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. Seed Derived Rhizomes *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant, Vol. 34, pp. 185 – 188, 1998.

[14] Pierik. R. L. M.,P.A. Sprankels.,B. Van der Harst and O.C. der Meys, Seed Germination and Further Development of

Plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz., *In vitro* Sci. Hort. Vol. 34, pp. 139 – 153. 1988.

[15] Raghavan, V., Nutrition Growth and Morphogesis of Plant Embryo, pp.47-48, In Arditti and R. Ernst., Micropropagation of orchids. John Wiley and Sons. Inc., New York, 526 p., 1966.

[16] Raghavan, V., Role of the Generative Cell in Androgenesis in Henbane, *Science*,Vol. 191. (4225) , pp. 388 – 389, 1976.

[17] Rasmussen H.N. and T.F. Anderson Johansen, Temperature Sensitive of *in vitro* Germination and Seedling Development of *Dactylorhizamajalis* (Orchidaceae) with and without a Mycorrhizal Fungus, Plant Cell and Environment, Vol. 13, pp.171 - 177, 1990.

[18] Rasmussen H.N., Terrestrial Orchids-from Seed to Mycotrophic Plant, Cambridge, Cambridge University Press, 444 p., 1995.

[19] Ratsek,J.C., Preliminary Experiments on Nutrients and the pH of Water and Nutrients as they Affect Growth of Orchid Seedlings, Am. Soc. Hort. Sci. Proc., Vol. 29, pp. 558–561, 1932.

[20] Rauh, W., W. Barthlott and N. Ehler, Morphologie und Funktion der Testa Staubformiger Flugsamen, p 10. In H.N. Rasmussen. Terrestrial Orchids from Seed to Mycotrophic Plant, Cambridge University Press., Great Britain, 444 p., 1975.

[21] Shantz,E. M. and F.C. Steward, Coconut Milk Factor: The Growth Promoting Substance in Coconut Milk. P. 615. In J. Aditti and R. Ernst (eds.) Micropropagation of Orchids, John Wiley and Sons, Inc., New York., 1952.

[22] Stoutamire W.P., Wasp-pollinated Species of *Caladenia* in South-western Australia. Australian Jour.of Bot. vol. 31, pp. 383–394, 1983.

[23] Vacin F. and F.W. Went , Some pH Changes in Nutrient Solutions, Bot. Gaz. Vol. 110, pp. 605 – 613, 1949.

[24] Van der Kinderen, *In vitro* Asymbiotic Germination of Immature Seed and Formation of Protocorm by *Cephalanthera-falcata* (Orchidaceae), Ann. of Bot., Vol. 98 (6), pp. 1197 - 1206., 1987.

[25] Van Waes J., Effect of Activated Charcoal on *In vitro* Germination of some Western European Orchids, Physiologia Plantarum. V 6 (2), pp.253 – 261, 1984.

[26] Warcup J.H., Symbiotic Germination of some Australia Terrestrial Orchids. New Phytologist., vol. 72, pp. 387 - 392, 1973.

[27] Woodroof, J.G., Coconuts: Production, Processing-products, The A.V.I. Publ. Co. I.N.C/ West Port, Connecticut , 1979.

[28] Zettler, L.W.,Propagation of the Little Bulb-spur Orchid (*Platanthera clavellata*) by Symbiotic Seed Germination and its Ecolo-

gical Implications, Environ. Exp. Bot., vol. 39, pp.189-195, 1998.

[29] Ziegenspeck,H., Was Beding Die Schwimm-fahigkeit der Samen der Einheimischen Orchideen und der Sporen. p. 10. In H. N. Rasmussen. Terrestrial Orchids from Seed to Mycotrophic Plant, Cambridge University Press, Great Britain, 1935.