

การงอกของเมล็ดและการพัฒนาต้นอ่อนเอื้องเขาแกะในสภาพปลอดเชื้อ

In vitro Seed Germination and Seedling Development of *Rhynchosytilis coelestis*

บัวสอน โบราสี¹ และ อารยา อาจเจริญ เทียนหอม^{1,2*}

Buasorn Borasee¹ and Araya Arjcharoen Theanhom^{1,2*}

บทคัดย่อ: ศึกษาการงอกและการพัฒนาต้นอ่อนเอื้องเขาแกะในสภาพปลอดเชื้อด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำเมล็ดเอื้องเขาแกะจากฝักอายุ 6 เดือนมาเลี้ยงบนสูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962) (MS) และ Vacin and Went (1949) (VW) ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 3 และ 5 มก./ล. พบว่าเมล็ดเอื้องเขาแกะงอกได้ดีบนอาหาร MS ทุกสูตรโดยใช้เวลางอก 25 วัน และเมื่อเลี้ยงโปรโตคอร์มที่เกิดขึ้นอีก 60 วัน พบว่าโปรโตคอร์มสามารถเจริญบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มก./ล. ได้ดีที่สุด ขนาดโปรโตคอร์มเฉลี่ย 1.19 มม. จากนั้นนำโปรโตคอร์มมาชักนำให้เกิดยอดและรากบนอาหาร VW และ VW ดัดแปลงเป็นเวลา 90 วัน พบว่าอาหาร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 100 มล./ล. สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอด จำนวนใบ และจำนวนรากมากที่สุด เป็นจำนวนเฉลี่ย 4.4 ยอด 8.6 ใบ และ 3.5 ราก ตามลำดับ อาหารสูตร VW ที่เติมกล้วยหอมบด 100 ก./ล. สามารถชักนำให้เกิดรากยาวที่สุด เท่ากับ 3.5 ซม. และให้ความสูงต้นอ่อนสูงที่สุดเท่ากับ 1.63 ซม.

คำสำคัญ: เอื้องเขาแกะ, สารควบคุมการเจริญเติบโต, การเพาะเมล็ด, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, โปรโตคอร์ม

ABSTRACT: The study of *in vitro* seed germination and seedling development of *Rhynchosytilis coelestis*. Seeds from six months old pod were sown on Murashige and Skoog(1962) (MS) and Vacin and Went(1949) (VW) medium supplemented with various BA (0, 3 and 5 mg/L). Seed of *R. coelestis* germinated in all MS treatments within 25 days and after 60 days culture, the average size of protocorms (1.19 mm) was highest on MS supplemented with 3 mg/l BA. After that the protocorms were transferred to induce shoot and root on VW and modified VW for 90 days. A highest number of shoots (4.4 shoots), number of leaves(8.6 leaves) and number of roots (3.5 roots) were observed on modified VW supplemented with 100 ml/l coconut water whereas modified VW supplemented with 100 g/l banana showed the highest root length (3.5 cm) and the highest seedling height (1.63 cm)

Keywords: *Rhynchosytilis coelestis*, plant growth regulator, seed germination, tissue culture, protocorm

บทนำ

เอื้องเขาแกะ (*Rhynchosytilis coelestis*) เป็นกล้วยไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบได้ในบริเวณป่าผลัดใบและป่าดิบแล้ง ลำต้นเรียวยาว

สูง 17-25 ซม. ใบ รูปขอบขนาน แผ่นใบมักพับเข้าหากัน กว้าง 3-5 ซม. ยาว 10-15 ซม. ดอกออกเป็นช่อตั้งจากซอกใบยาว 17-23 ซม. ดอกย่อยเรียงแน่นกลีบเลี้ยงและกลีบดอกสีขาวหรือฟ้าอ่อน ขอบกลีบ สีม่วงอ่อนกลีบปากสีม่วงอมน้ำเงิน ดอกบานเต็มที่กว้าง

¹ สาขาวิทยาศาสตร์การเกษตร มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี

Agricultural Science, Mahidol University (Kanchanaburi)

² ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University

* Corresponding author: fagart@ku.ac.th

2 ซม. มีกลิ่นหอม การทำลายสภาพนิเวศวิทยาไม่ว่าจะเป็นการตัดไม้เผาป่าเพื่อทำไร่เลื่อนลอยมีผลกระทบต่อความอยู่รอดของพันธุ์กล้วยไม้ทั้งสิ้น นอกจากนี้การนำกล้วยไม้ป่าออกมาเพื่อจำหน่ายทั้งในระดับท้องถิ่นหรือรวบรวมโดยพ่อค้าเพื่อส่งออกไปยังต่างประเทศถือได้ว่าเป็นการลดปริมาณของกล้วยไม้ในธรรมชาติโดยตรง เอื้องเขาแกะในพื้นที่มหาวิทยาลัยมหิดลวิทยาเขตกาญจนบุรีประสบปัญหานี้เช่นเดียวกันอีกทั้งในสภาพธรรมชาติ เมล็ดกล้วยไม้มีโอกาสในการงอกต่ำเนื่องจากภายในเมล็ดมีอาหารสะสมน้อยและอาจได้รับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จึงได้มีผู้ศึกษาวิจัยการเพาะเมล็ดกล้วยไม้สกุลต่างๆ สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ สูตรแรกเป็นอาหารสูตร Knudson ซึ่งสามารถใช้เพาะเมล็ดกล้วยไม้ได้ดี นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาอาหารสูตรอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและพัฒนาของกล้วยไม้มากมาย แต่ในกล้วยไม้สกุลช้างพบว่าเมล็ดมีการเจริญและพัฒนาค่อนข้างยาก Kumar A. และคณะ (2002) พบว่าเมื่อนำฝัก *R. retusa* (L.) Bl. อายุ 8 เดือนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม BAP 0.0-2.5 μ M และ IAA 0.0-2.5 μ M ร่วมกับ casein 2 ก./ล. พบว่าเมล็ดสามารถงอกบนอาหาร MS ทุกชนิด โดยอาหารที่เติม BAP และ IAA ช่วยให้เมล็ดงอกเร็วขึ้นและเมล็ดมีการพัฒนาเป็นต้นเมื่อเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BAP 2.5 μ M นอกจากนี้ Li. และ Li (2009) รายงานว่าเมื่อเพาะเมล็ดกล้วยไม้ *R. gigantea* พันธุ์กลายดอกสีขาว บนอาหาร 1/2 MS ที่เติม 6-BA 0.05 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.2 มก./ล. เป็นเวลา 70 วัน จะเกิดการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม จากนั้นย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 6-BA 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล. เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส และเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรดังกล่าวเป็นเวลา 2 เดือน แคลลัสจะเกิดการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มได้ชัดแล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วันจะชักนำให้เกิดยอด จากนั้นนำยอดที่เกิดขึ้นมาเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS ที่เติมกล้วยบด 100 ก./ล. พบว่ายอดสามารถเจริญเติบโตได้ดี และสามารถชักนำให้เกิดราก

ได้ แต่รุ่งฤดี (2545) พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดเอื้องเขาแกะอายุ 173 วัน บนอาหารสูตร VW และ VW ดัดแปลง ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.8 เมล็ดไม่สามารถงอกและเจริญพัฒนาได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการงอกและการพัฒนาดันอ่อนเอื้องเขาแกะในสภาพปลอดเชื้อด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณและเป็นการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ชนิดนี้

วิธีการศึกษา

นำฝักเอื้องเขาแกะที่มีอายุ 6 เดือนหลังจากการผสม มาล้างทำความสะอาดทำการตัดแต่งส่วนหัวและส่วนปลายของฝักกล้วยไม้ นำเข้าสู่ปลอดเชื้อ จุ่มฝักกล้วยไม้ในแอลกอฮอล์ (95%) ผ่านไฟให้ลุกท่วมทั้งฝักเพื่อทำการฆ่าเชื้อ 1-2 ครั้ง จากนั้นใช้มีดกรีดตามแนวยาวของฝัก แล้วเขียนเมล็ดกล้วยไม้ลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0, 3 และ 5 มก./ล. ตามลำดับเติมน้ำตาล 30 ก./ล. วุ้น 7 ก./ล. pH 5.6-5.8 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ บันทึกวันแรกที่เมล็ดงอก และขนาดของโปรโตคอร์มที่พัฒนาทุก 30 วัน เป็นเวลา 2 เดือนจากนำโปรโตคอร์มอายุ 60 วันที่ได้มาศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและราก โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร VW และ VW ดัดแปลงที่มีการเติมกล้วยบด 100 ก./ล. (VWB) มันฝรั่งบด 100 ก./ล. (VWP) น้ำมะพร้าว 100 มล./ล. (VWC) กล้วยบด 100 ก./ล. ร่วมกับน้ำมะพร้าว 100 มล./ล. (VWBC) และมันฝรั่งบด 100 ก./ล. ร่วมกับน้ำมะพร้าว 100 มล./ล. (VWPC) เติมน้ำตาล 30 ก./ล. วุ้น 7 ก./ล. pH 5.6-5.8 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ บันทึกการเจริญเติบโต จำนวนยอด ความยาวใบ ความกว้างใบ จำนวนราก ความยาวราก ความสูงต้น ทุก 30 วัน เป็นเวลา 3 เดือนวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม SPSS 16.0 โดยนำ

ข้อมูลพื้นฐานที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

การเพาะเมล็ดเชื้อเขาแกะให้เจริญเป็นโปรโตคอร์ม

จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เมล็ดเชื้อเขาแกะที่เพาะบนอาหาร MS ทุกสูตร สามารถงอกหลังจากการเพาะเมล็ด 25 วัน และอาหาร VW เมล็ดงอกหลังจากเพาะ 30 วัน แต่อาหาร VW ที่เติม BA ทุกความเข้มข้น พบว่าเมล็ดไม่สามารถงอกได้

(Table 1) ไม่สอดคล้องกับการทดลองของ รุ่งฤดี (2545) ที่รายงานว่า เมล็ดเชื้อเขาแกะอายุ 173 วัน ไม่สามารถงอกบนอาหาร VW และ VW ดัดแปลง pH 4.8 ได้ ทั้งนี้คาดว่าเนื่องจากเมล็ดเชื้อเขาแกะมีการสะสมอาหารภายในน้อย อายุเมล็ดที่ต่างกันเพียงเล็กน้อย อาจมีผลต่อความสมบูรณ์และการพัฒนาของ เอ็มบริโอ และ ค่า pH ของอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมส่งผลต่อการกระตุ้นให้เมล็ดงอก เมื่อทำการวัดขนาดโปรโตคอร์มที่เกิดขึ้นหลังเพาะเลี้ยง 60 วัน พบว่าอาหาร MS ที่เติม BA 3 มก./ล. สามารถกระตุ้นให้โปรโตคอร์มมีขนาดใหญ่ที่สุดเท่ากับ 1.19 มม. ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Table 1)

Table1 Days taken for seed germination and protocorm size of *R. coelestis* at 60days after culture on various media.

Type of media	Days taken for seed germination (days)	Protocorm size (mm.)
MS	25	0.87 ^b ± 0.08
MS with BA 3 mg/l	25	1.19 ^a ± 0.33
MS with BA 5 mg/l	25	0.74 ^b ± 0.11
VW	30	0.49 ^c ± 0.07
VW with BA 3 mg/l	-	0.00 ^d ± 0.00
VW with BA 5 mg/l	-	0.00 ^d ± 0.00
F-test	-	*
C.V. (%)	-	10.40

ns and * indicate non-significant and significantly different at P<0.05., respectively.

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดและราก

เมื่อนำโปรโตคอร์มอายุ 60 วัน มาเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลงเพื่อเพิ่มจำนวนยอด พบว่าสูตรอาหาร VWC ให้จำนวนยอดและจำนวนใบสูงที่สุดค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.40 ยอด และ 8.60 ใบตามลำดับสูตรอาหาร VWP ให้ค่าเฉลี่ยความยาวใบและความกว้างใบสูงสุดเท่ากับ 0.67 ใบและ 0.26 ซม.ตามลำดับ (Table 2) ซึ่ง

แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งสอดคล้องกันการทดลองของ Kumar A. และคณะ (2002) ที่รายงานว่า โปรโตคอร์มของ *R. retusa* (L.) Bl. สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BAP 2.5 µM เนื่องจากในน้ำมะพร้าวมีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน เช่นเดียวกับ BAP โดยสารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการแตกตาข้าง จึงเป็นปัจจัยที่

สนับสนุนให้เกิดยอดจำนวนมากจากโปรโตคอร์ม จากนั้นย้ายโปรโตคอร์มที่เกิดยอดลงอาหารสูตรดัดแปลง เพื่อชักนำให้เพิ่มจำนวนราก พบว่าสูตรอาหาร VWC ให้จำนวนรากสูงสุดเท่ากับ 3.50 รากแต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรอื่นๆ ส่วนสูตรอาหาร VWB ให้

ความยาวรากสูงสุด เท่ากับ 1.16 ซม. จากนั้น ทำการวัดส่วนสูง พบว่าสูตรอาหาร VWB ให้ค่าเฉลี่ยความสูงของต้นกล้าสูงสุดเท่ากับ 1.63 ซม. ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Table 2) (Figure 2)

Table 2 *R. coelestis* plantlets which occurred on each medium after cultured for 90 days under light condition.

Type of media	No. of shoot	No. of leaf	Leaf length (cm.)	Leaf width (cm.)	No. of root	Root length (cm.)	Height (cm.)
VW	2.50 ^b ± 1.43	6.50 ^b ± 3.13	0.47 ^{bc} ± 0.06	0.21 ^b ± 0.04	3.20 ± 1.61	0.66 ^{cd} ± 0.13	1.10 ^{bc} ± 0.16
VWB	1.00 ^d ± 0.00	3.10 ^c ± 0.72	0.67 ^a ± 0.22	0.22 ^b ± 0.04	2.90 ± 0.99	1.16 ^a ± 0.22	1.63 ^a ± 0.57
VWC	4.40 ^a ± 1.89	8.60 ^a ± 3.30	0.43 ^c ± 0.10	0.20 ^b ± 0.01	3.50 ± 1.64	0.54 ^d ± 0.27	0.95 ^c ± 0.23
VWP	1.20 ^d ± 0.42	3.00 ^c ± 0.81	0.67 ^a ± 0.13	0.26 ^a ± 0.03	2.30 ± 1.59	0.88 ^b ± 0.16	1.54 ^a ± 0.16
VWBC	1.40 ^{cd} ± 0.96	3.80 ^c ± 2.57	0.59 ^{ab} ± 0.11	0.23 ^{ab} ± 0.05	2.90 ± 1.59	0.82 ^{bc} ± 0.17	1.37 ^{ab} ± 0.22
VWPC	2.40 ^{ab} ± 0.84	5.20 ^{bc} ± 1.47	0.48 ^{bc} ± 0.08	0.23 ^{ab} ± 0.03	3.00 ± 1.24	0.87 ^b ± 0.12	1.35 ^{ab} ± 0.10
F-test	*	*	*	*	ns	*	*
C.V.(%)	43.10	39.85	22.18	16.35	40.88	22.38	19.50

ns and * indicate non-significant and significantly different at $P < 0.05$., respectively.

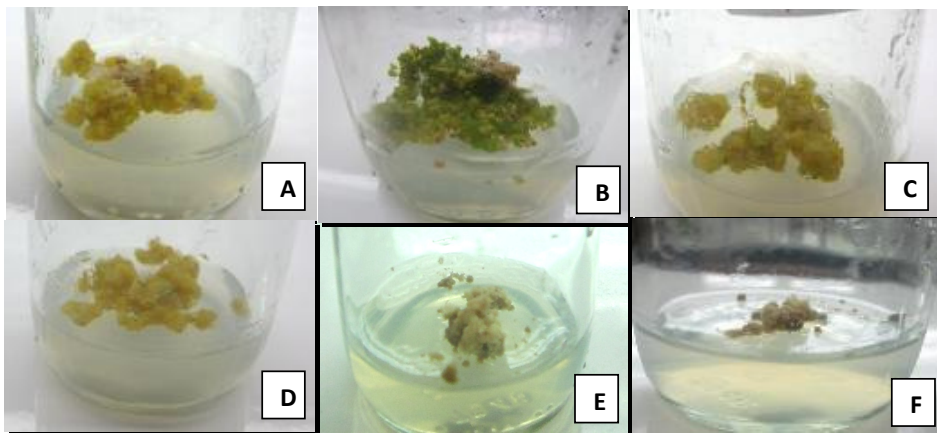


Figure 1 Protocorms of *R. coelestis* at 60 days after culture on various media (A) MS (B) MS with BA 3 mg/l (C) MS with BA 5 mg/l (D) VW (E) VW with BA 3 mg/l and (F) VW with BA 5 mg/l

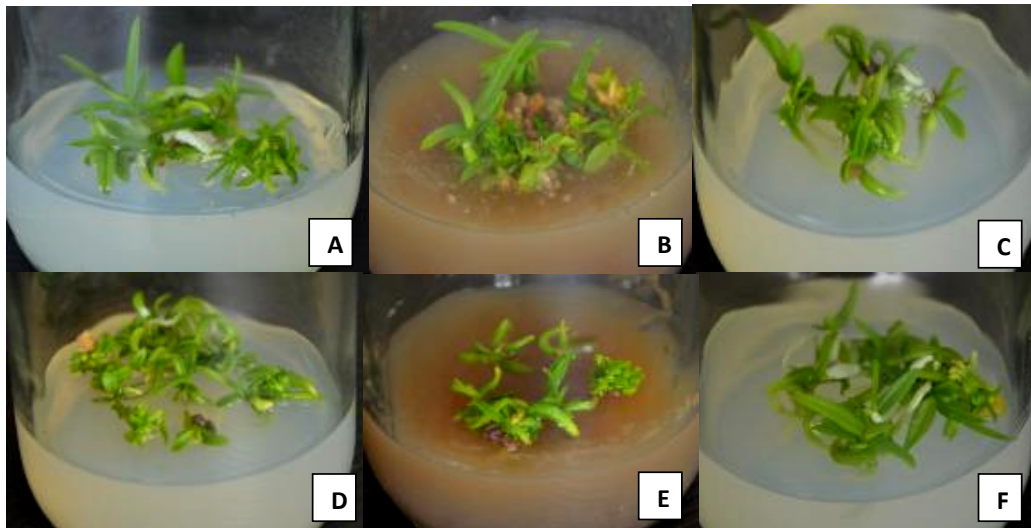


Figure 2. *R. coelestis* plantlets on each medium after cultured for 90 days under light condition.

(A) VW (B) VWB (C) VWC(D) VWP (E) VWBC (F) VWPC

สรุป

เมล็ดเอื้องเขาแกะที่มีอายุ 6 เดือนสามารถงอกได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ทุกสูตรเมล็ดจะเริ่มงอก 25 วันหลังจากการเพาะเมล็ดและโปรโตคอร์มสามารถพัฒนาได้ดีที่สุดบนอาหาร MS ที่เติม BA 3 มก./ล. และเมื่อศึกษาการชักนำโปรโตคอร์มให้เพิ่มจำนวนยอดและราก พบว่า โปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมน้ำมะพร้าวสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด แสดงให้เห็นว่า Cytokinin มีความสำคัญต่อการงอกและการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มที่สมบูรณ์และสามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์เอื้องเขาแกะให้ได้จำนวนมาก

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี และ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ในการสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- รุ่งฤดี คำขาว.2546. การขยายพันธุ์กล้วยไม้พันธุ์เขาแกะ เข้มแดง และเอื้องปากนกแก้วในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สถาบันราชภัฏเพชรบุรี วิทยาลัยการณ ในพระบรมราชูปถัมภ์, กรุงเทพมหานคร.
- Kumar A., S.K. Nandi, N. Bag and L.M.S. Palni. 2002. Tissue culture studies in two important orchid taxa: *Rhynchostylis retusa* (L.) Bl. and *Cymbidium elegans* Lindl.pp.113-124 In: S.K. Nandi, L.M.S. Palni and A. Kumar. Role of plant tissue culture in biodiversity conservation and economic development. Gyandodaya Prakashan, India.
- Li.Z.Y. and X. Li. 2009. In vitro propagation of white-flower mutant of *Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl. through immature seed-derived protocorm-like bodies. Journal of Horticulture and Forestry 6:93-97.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15: 473-497.
- Vacin E.F. and F. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. pp. 589-599 In: C.L.Withner. The Orchids Survey. Ronald Press. N.Y.