

การเจริญและพัฒนาของสปอร์เฟิร์นมหาสดำโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Growth and Development of Tree Fern (*Cyathea podophylla* Cople.) Spores in Vitro

ประยงค์ กงนคร¹

Prayong kongnakorn¹

บทคัดย่อ: ทำการศึกษาการเจริญและพัฒนาของสปอร์เฟิร์นมหาสดำโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยมีการฟอกฆ่าเชื้อสปอร์ 2 วิธี คือการจุ่มแอลกอฮอล์ 70 % แล้วฟอกคลอโรกซ์ (sodium hypochlorite 6 %) 10 % นาน 10 นาที และไม่จุ่มแอลกอฮอล์ ฟอกคลอโรกซ์ 10 % นาน 10 นาที นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Miller (1963) ภายใต้ 3 สภาวะคือในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีแสง ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่มีแสง และที่อุณหภูมิห้อง พบว่าวิธีการฟอกและเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสปอร์ซึ่งการฟอกแบบไม่จุ่มแอลกอฮอล์ ก่อนฟอกด้วยคลอโรกซ์ 10 % นาน 10 นาที และเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีที่ดีที่สุด สำหรับการเจริญพัฒนาของสปอร์เฟิร์นมหาสดำบนอาหารแข็งสูตร Miller ที่เพาะเลี้ยงนาน 18 เดือน เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นระยะเวลา 5 เดือนพบว่าเมื่ออายุ 1 เดือนสปอร์มีสีน้ำตาลเริ่มปริเล็กน้อย เดือนที่ 2 สปอร์ เริ่มงอก(germinating spore) เดือนที่ 3 มองเห็นเส้นสายสีเขียว(protonema) มากขึ้น และ อายุ 4 เดือน โปรโตนิมา มีการแบ่งเซลล์ในแนวอนและแนวกว้างเป็นแผ่นรูปหัวใจสีเขียวเรียกว่าโปรธัลลัส (prothallus) ซึ่งเป็นระยะแกมีโทไฟต์ (gametophyte) อายุ 5 เดือนโปรธัลลัสเพิ่มมากขึ้น การเจริญและพัฒนาของเฟิร์นมหาสดำสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าเมื่ออายุ 6-18 เดือน โดยอายุ 6 เดือนเส้นสายโปรโตนิมาเพิ่มมากขึ้น ขนาดโตขึ้น สีเขียวเข้ม มองดูคล้ายกำมะหยี่และมองเห็นโปรธัลลัสเพิ่มมากขึ้น อายุ 7-9 เดือน โปรธัลลัสมีลักษณะหนาและเกิดยอดม้วนบนโปรธัลลัสในเดือนที่ 10 (sporophyte) หลังจากนั้น เฟิร์นมหาสดำมีการเจริญพัฒนากลายเป็นต้นเฟิร์นที่สมบูรณ์ในเดือนที่ 18 และสามารถนำออกปลูกได้

คำสำคัญ: เฟิร์น, เฟิร์นมหาสดำ, การเพาะเลี้ยงสปอร์เฟิร์นมหาสดำโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ABSTRACT: Growth and development of tree fern spores by tissue culture were studied. Two methods of spore sterilization were used; 70% alcohol dipping and 10% chlorox for 10 minutes and only 10% chlorox for 10 minutes. Spores were then cultured in 3 conditions; tissue culture room in light, tissue culture room in dark and room temperature. The results showed that only 10% chlorox for 10 minutes. The best culture for growth and development in Miller medium for 18 months was in culture room. When studied under microscope for 5 months, the results showed that spores became brown and started budding in the 1st month. Spores germinated and showed green protonema. in the 2nd and the 3rd month, respectively. Spores generated prothalli and was gametophyte in the 4th month. Prothalli increased in the 5th month. Its growth and development was visible in 6-18 months. In the 7-9th month, prothalli was thick and rolled up state of the young leaves sporophyte in the 10th month. After that fern plants in vitro can obtain in the 18th month and to grow in mixed soil.

Keywords: fern, tree fern, plant tissue culture

¹ สาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

Plant Science Division, Faculty of Agriculture, Rajamangala University of Technology Srivijaya

* Corresponding author: 819kong@gmail.com

บทนำ

ความหมาย

เฟิร์นมหาสดำ เป็นเฟิร์นต้นขนาดใหญ่ที่สุดเฟิร์นในวงศ์นี้ เป็นสัญลักษณ์ของป่าเขาสูงที่สภาพแวดล้อมยังไม่ถูกทำลาย พบในเขตร้อนตามภูเขาในระดับตั้งแต่ 1000 เมตรขึ้นไป (สะอาดและคณะ, 2525) ประเทศไทยพบเหลือน้อยมาก และไม่ค่อยพบเห็นบริเวณพื้นที่ทำการเกษตร เหลือเฉพาะในป่าสมบูรณ์ ใกล้ลำธารน้ำไหล จังหวัดนครศรีธรรมราช ถือเป็นความโชคดีที่มีภูเขาหลวง และมีชุมชนที่อาศัยธรรมชาติในการประกอบอาชีพแบบพึ่งพาหรือเกษตรยั่งยืนดังเช่น หมู่บ้านคีรีวงค์ ประกอบอาชีพโดยไม่ทำลายธรรมชาติโดยสิ้นเชิง เช่น ทำการเกษตรกรรมภูเขาบนภูเขา เว้นไม้ป่า รักษาความบริสุทธิ์ของน้ำตามธรรมชาติ โดยหลีกเลี่ยงการใช้สารกำจัดวัชพืช ป่าที่รักษาไว้ มีการปลูกแซมไม้ผลหรือพืชผลเกษตร ริมลำธารมีพืชน้ำ และในกลุ่มนี้สิ่งที่โดดเด่นและสง่างามคล้ายกับเป็นเอกลักษณ์ของคีรีวงค์ ของจังหวัดนครศรีธรรมราช คือเฟิร์นต้น หรือ เฟิร์นมหาสดำ ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cyathea podophylla* Copel. อยู่ในวงศ์ Cyatheaceae (Graf, 1986)

บุญยืน (2529) และ รงรอง (2542) รายงานว่าเฟิร์นเล็กๆ วงจรชีวิตสั้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการเจริญและพัฒนาค่อนข้างเร็วใบแรกเกิดภายในเวลา 1 เดือน ซึ่ง วิไลลักษณ์และคณะ (2543) เพาะเลี้ยงสปอร์เฟิร์นชายผ้าสีดา 4 ชนิดในอาหาร 4 สูตร พบว่าสปอร์เฟิร์นงอกได้ดีทั้ง 4 สูตรหลังจาก 1 เดือนเพาะเลี้ยงใน $\frac{1}{2}$ MS เพื่อการเจริญพัฒนา และ ปฐมาภรณ์และคณะ (มปพ.) ที่ได้ทำการทดลองเลี้ยงสปอร์ชายผ้าสีดาพบว่าอาหารที่เหมาะสมคือสูตร MS เดิมชูโครส 15 กรัมต่อลิตร (จารุพันธ์ 2523; วันเพ็ญ 2543; Fliflet 1961 และ Simpson 2010) ได้รายงานว่ามีสปอร์ได้รับสภาพแวดล้อมเหมาะสม จะเริ่มงอกผ่านระยะแกมีโทไฟต์เป็นแผ่นรูปหัวใจสีเขียวเรียกว่า โปรทัลลัส (protallus) ต่อจากนั้นจะสร้างเซลล์ไข่ (egg cell (n)) สเปิร์ม (sperm cell(n)) โดยสเปิร์มจะอาศัยน้ำตามธรรมชาติว่ายเข้าไปผสมพันธุ์กับไข่เป็นไซโกต (zygote) จะ

พัฒนาไปเป็นต้นอ่อน (embryo(2n)) และพัฒนาเป็นกล้าเล็ก (young sporophyte) ต้นเฟิร์นที่โตขึ้น (sporophyte) และต้นโตเต็มวัย (adult plant) นอกจากนี้ ศราวุธและสุเทพ (2545) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก้านใบม้วน แผ่นใบอ่อนแผ่นใบม้วนของเฟิร์นมหาสดำ ปรากฏว่าเนื้อเยื่อปล่อยสารสีน้ำตาลดำลงในอาหาร และเนื้อเยื่อไม่มีการเจริญและพัฒนา ดังนั้นงานวิจัยเรื่องนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสปอร์ของเฟิร์นมหาสดำ ตลอดจนการเจริญและพัฒนาของสปอร์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบกับงานวิจัยเรื่องนี้ยังไม่พบการทำวิจัยมาก่อน ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจ ฉะนั้นการเพาะเลี้ยงสปอร์น่าจะช่วยขยายพันธุ์ได้จำนวนมากขึ้น เพื่อจะได้ใช้ประโยชน์ในเชิงอนุรักษ์หรือเพื่อการค้าต่อไป

วิธีการศึกษา

ทำการฟอกฆ่าเชื้อสปอร์เฟิร์นมหาสดำ โดยการจุ่ม และ ไม่จุ่ม แอลกอฮอล์ 70 % แล้วฟอกด้วยคลอโรกซ์ 10 % เดิมน้ำยาจับใบ (Tween 20) 1-2 หยด ฟอกนาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำสปอร์มาเลี้ยง บนอาหารแข็งสูตร Miller ภายใต้ 3 สภาวะ คือ ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (อุณหภูมิ 25 °C มีแสง 16 ชั่วโมง ต่อวัน) ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสภาวะไม่มีแสง ห้องอุณหภูมิปกติ โดยใช้ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนาน 18 เดือน และศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นระยะเวลานาน 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน ศึกษาการเพาะเลี้ยงสปอร์เฟิร์นมหาสดำ จำนวน 120 หน่วยทดลอง บันทึกข้อมูล การปลอดเชื้อ การเจริญพัฒนาของเฟิร์นมหาสดำทุกเดือน และทดสอบความสัมพันธ์ของวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ที่มีผลต่อ การปลอดเชื้อ โดยใช้การทดสอบไคสแควร์ (Chi-Square Test) ศึกษาการเจริญพัฒนาของเฟิร์นมหาสดำ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์เมื่อทราบผลในตอนต้นแล้วได้มีการนำวิธีที่ดีที่สุดมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป จนพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาความสัมพันธ์ของการฟอกฆ่าเชื้อแล้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใน 3 สภาวะ กับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์นมหาสดำ ต่อการปลอดเชื้อ

การศึกษานี้ ใช้กลุ่มทดลอง (Treatment) 6 กลุ่ม ดังแสดงใน Table 1 กับ ระยะเวลาในการเลี้ยง 5 ระดับ หาความสัมพันธ์ โดยการทดสอบไคสแควร์ พบว่า วิธีการฟอกและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใน 3 สภาวะ กับ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีความสัมพันธ์กัน อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นานขึ้น จะเกิดการปลอดเชื้อลดลง ดังแสดงใน Table 1

2. ศึกษา ผลของการฟอกฆ่าเชื้อแล้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารแข็งสูตร Miller ใน 3 สภาวะ กับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์นมหาสดำ ต่อการเจริญพัฒนาของเฟิร์นมหาสดำ

จากการศึกษา พบว่า กลุ่มทดลองที่ 4. (ฟอกด้วยคลอโรกซ์ 10 % ฟอกนาน 10 นาที เลี้ยงสปอร์ บนสูตรอาหาร Miller ภายใต้ สภาวะห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) มีการเจริญพัฒนาของเฟิร์นมหาสดำดีที่สุด ดังแสดงใน Table 1. คือ มีการเจริญพัฒนาใน ระยะแกมีโทไฟต์ และจากการศึกษาและติดตามการเจริญเติบโต และพัฒนาของสปอร์เฟิร์นมหาสดำ โดยการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นระยะเวลา 5 เดือน พบว่าสปอร์อายุ 1 เดือน มองเห็นเป็นสีน้ำตาลสปอร์เริ่มผลิเล็กน้อย (Figure 1 A) เดือนที่ 2 เริ่มเกิดเส้นใยสีเขียว เรียกว่า โปรโตนีมา (Figure 1B) เดือนที่ 3 มองเห็นเส้นสายโปรโตนีมามากขึ้น (Figure 1 C,D) เดือนที่ 4 เดือน โปรโตนีมามีการแบ่งเซลล์ในแนวนอนและแนวกว้างเป็นแผ่นรูปหัวใจสีเขียวเรียกว่าโปรธัลลัส (Figure 1 E,F) และ เมื่ออายุ 5 เดือน เส้นสายโปรโตนีมา และ โปรธัลลัสมี มากขึ้น ทำให้เห็นสีเขียวเข้มขึ้น เข้ม มองดูคล้ายกำมะหยี่ สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ส่วนกลุ่มทดลองที่ 6. มีการเจริญพัฒนาในทำนองเดียวกับ กลุ่มที่ 4. แต่เมื่ออายุ 5 เดือน เกิดสภาพไม่ปลอดเชื้อ ทั้งนี้เนื่องมาจากสภาวะอุณหภูมิห้อง ไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ อาจมีการถ่ายเทอากาศภายใน กับภายนอกหน่วยทดลอง เชื้อมีโอกาสนับเป็นได้มาก ส่วนกลุ่มทดลองที่ 1,2,3 เนื้อเยื่อไม่มีการเจริญ เนื่องจากถูกทำลายด้วยแอลกอฮอล์ และ กลุ่มทดลองที่ 5. เนื้อเยื่อไม่มีการเจริญ เพราะสปอร์เมื่อเริ่มงอกจะมีสีเขียว แสดงว่าต้องการแสงเพื่อการเจริญพัฒนา สอดคล้องกับ Edwards และ Miller (1972) ที่กล่าวว่า แสงที่เหมาะสมต่อการเจริญของโปรธัลลัส คือ 1615 - 5382 ลักซ์ และในช่วงอายุ 5-9 เดือนนั้น การเจริญอยู่ในระยะแกมีโทไฟต์ที่มีการสร้างสเปิร์ม และไข่ ซึ่งใน 1 โปรธัลลัสนั้นไข่กับสเปิร์มจะสุกไม่พร้อมกัน (วันเพ็ญ, 2543) สเปิร์มอาศัยน้ำว่ายไปผสมกับไข่ (Filifet, 1961) บนโปรธัลลัสอื่น ฉะนั้นระยะนี้หากมีการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว น่าจะส่งเสริมให้สเปิร์มว่ายน้ำไปผสมกับไข่ได้มากและเกิดต้นอ่อนมากขึ้น

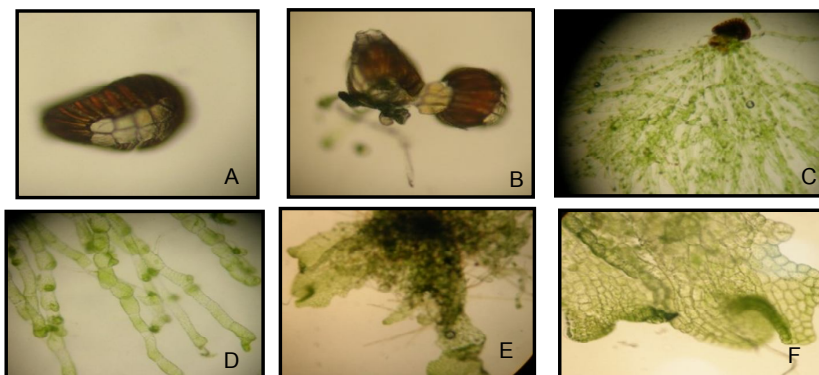


Figure 1 Growth and development of tree- fern spore after cultured on Miller medium for 1 month (100 x)

3. การเจริญและพัฒนาของเฟิร์นมหาสดำ

การศึกษานี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกลุ่มที่เจริญพัฒนาดีที่สุด(กลุ่มทดลองที่ 4.) ต่อ เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Miller พบว่า เนื้อเยื่อ เฟิร์นมหาสดำเมื่ออายุมากขึ้นจะมีการเจริญและพัฒนามากขึ้นตามลำดับ โดย อายุ6เดือน พบเส้นสายโปรโตพลาสติเพิ่มมากขึ้น ขนาดโตขึ้นสีเขียวเข้ม คล้ายกำมะหยี่ เกิดโปร

ทาลัสมากขึ้น อายุ7- 9 เดือน พบโปรทาลัสหนาขึ้น เกิดยอดม้วนบนโปรทาลัส ในเดือนที่ 10 เริ่มเกิดใบในเดือนที่ 11 มองเห็นใบชัดเจนตั้งแต่เดือนที่ 12 เดือนที่ 13-17 เกิดทั้งยอดม้วน ก้านใบ แผ่นใบเพิ่มขึ้น และเกิดต้นและรากที่สมบูรณ์เมื่ออายุ 18 เดือน ดังแสดงใน Figure 2

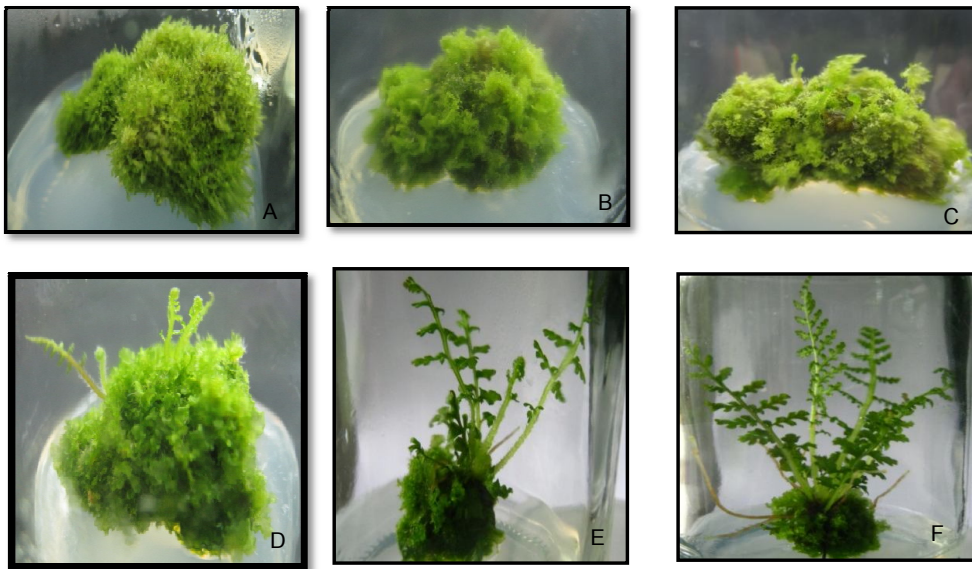


Figure 2 Growth and development of tree-fern after cultured on Miller medium for 6 months (A) , 9 months (B) , 10 months (C) , 11 months (D) , 16 months (E) and 18 months (F)

Table 1 The relation between sterilization method cultured on Miller medium in 3 conditions and culture duration to number of sterile and the growth of tree fern

culture duration(month)	Number of sterile and characters	Treatments (T)					
		1 st Sterilization method			2 nd Sterilization method		
		25 °C(16 h light)(T1)	25 °C(dark) (T2)	Room temp. (T3)	25 °C(16 h light) (T4)	25 °C(dark) (T5)	Room temp. (T6)
1	Number of sterile	20	19	18	15	14	13
	Spore characters	brown	brown	brown	brown	brown	brown
2	Number of sterile	18	18	10	13	13	7
	Spore characters	brown	brown	brown	green brown	brown	light green
3	Number of sterile	18	17	4	12	12	3
	Spore characters	brown	brown	brown	green prothalli	brown	green prothalli
4	Number of sterile	17	17	2	10	12	2
	Spore characters	brown	brown	brown	green prothalli	brown	dark green prothalli
5	Number of sterile	16	16	0	8	12	0
	Spore characters	brown	brown	-	dark green prothalli	brown	-

Remark:1st Sterilization method: 70% alcohol dipping and 10% chlorox for 10 minutes.

2nd Sterilization method: only 10% chlorox for 10 minutes.

χ^2 sterile = 34.4992 df=20 p-value = 0.0229

สรุป

การฟอกฆ่าเชื้อสปอร์เฟิร์นมหาสดำ ใช้คลอโรกซ์ 10% นาน 10 นาที และเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ดีที่สุด สปอร์ที่นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Miller ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนาน 18 เดือน มีการเจริญพัฒนาเป็น ต้นเฟิร์นมหาสดำที่สมบูรณ์ สามารถนำออกปลูกได้

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย และสภากวิจัยแห่งชาติ ที่สนับสนุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2550-2553 เพื่อการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ศราวุธ บุรี และสุเทพ รัตนพันธ์. 2545. การศึกษาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์นมหาสดำ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์นครศรีธรรมราช สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล. 24 น.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2529. การขยายพันธุ์เฟิร์นราชินีในหลอดทดลอง, ในรายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 24 ภาคปัสเตอร์ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, (27-29 มกราคม) กรุงเทพฯ.

รณรงค์ วิเศษสุวรรณ. 2542. การขยายพันธุ์เฟิร์นโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, น.97 ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขั้นพื้นฐาน. ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง, สถาบันวิจัยและพัฒนา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กำแพงแสน, นครปฐม.

จารุพันธ์ ทองแถม และปิยะเกษตร สุขสถาน. 2550. Fern. สำนักพิมพ์สารคดีในนามบริษัทวิริยะธุรกิจ จำกัด. กรุงเทพฯ. 455 น.

วันเพ็ญ โชติวรรณชุลกุล. 2543. การงอกของสปอร์เฟิร์นบางชนิด. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 21 น.

สะอาด บุญเกิด, จเร สุตากร และทิพย์พรรณ สุตากร. 2525. ชื่อพันธุ์ไม้ในเมืองไทย. จีระการพิมพ์. กรุงเทพฯ. 657 น.

Edwards, M.E., and J.H. Miller. (1972) Growth Regulation of Ethylene in Fern Gametophytes. III Inhibition of Spore Germination, American Journal of Botany. 59(5): 458-465.

Fliffet, T. (1961) Growing Ferns from Spores, American Fern Journal. 51(3): 113-127.

Graf, A. B. 1986. Tropical color cyclopedia of exotic plants and trees. 3rd. ROEHRS COMPANY.

Simpson, M.G. 1953. Plant systematic. 2ed. ACADEMIC PRESS California. USA.

ปลาโอ สูตรอาหาร. แหล่งข้อมูล: <http://www.plao.com/%E0%B8%AA%E0%B8%B9%E0%B8%95%E0%B8%A3%E0%B8%AD%E0%B8%B2%E0%B8%AB%E0%B8%B2%E0%B8%A3.html>. ค้นเมื่อ 20 ธันวาคม 2556.