การงอกของเมล็ดและการเจริญเป็นต้นของกล้วยไม้เขาแกะ (*Rhynchostylis coelestis* Rchb.f) ในสภาพปลอดเชื้อ

In Vitro Seed Germination and Regeneration of *Rhynchostylis coelestis* Rchb.f

จตุพร หงส์ทองคำ[1*] สุรชัย รัตนสุข[1] และ รชยา พรมวงศ์[1]

Houngtongkam, J.[1*], Ratanasuk, S.[1], & Promwong, R.[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดและผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต Naphthalene Acetic Acid (NAA) และ Benzyladenine (BA) ต่อการเจริญเป็นต้นของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เขาแกะ (*Rhynchostylis coelestis* Rchb.f) โดยนำเมล็ดกล้วยไม้เขาแกะจากฝักอายุ 6 เดือน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ ได้แก่ สูตร Vacin and Went (VW) สูตร Murashige and Skoog (MS) และสูตร New Dogashima Medium (NDM) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เมล็ดกล้วยไม้เขาแกะสามารถงอกและเจริญเป็นโปรโตคอร์มได้ดีบนอาหารสูตร NDM เมื่อนำโปรโตคอร์มเขาแกะมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NDM ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 90 วัน พบว่าอาหารที่เติม NAA 1.0 มก./ล. เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด 100% และมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 4.13 ยอด/โปรโตคอร์ม การชักนำให้เกิดรากทำได้โดยเพาะเลี้ยงยอดอ่อนบนอาหารที่เติม NAA 0-1.5 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน พบว่า การเติม NAA 1.0 มก./ล. สามารถชักนำให้ยอดเกิดรากได้ 100% โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุดและความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 2.13 รากต่อต้น และ 3.73 มม. ตามลำดับ

คำสำคัญ **:** กล้วยไม้เขาแกะ, โปรโตคอร์ม, สารควบคุมการเจริญเติบโต

---

[1]คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด อ.เสลภูมิ จ.ร้อยเอ็ด 45120

[*]Corresponding Author, E-mail: jatuporn_h@hotmail.com

Abstract

The optimum medium for seed germination and the effect of growth regulators, Naphthalene acetic acid (NAA) and Benzyladenine (BA) on protocorms regeneration of *Rhynchostylis coelestis* Rchb.f were studied. Seeds from 6 months old pod were cultured on different media; Vacin and Went (VW), Murashige and Skoog (MS) and New Dogashima Medium (NDM) for seed germination. Results showed that seeds well germinated and developed into protocorms when cultured on NDM medium for 4 weeks of culture. Protocorms were transferred to NDM medium supplemented with various concentrations of NAA and BA for 90 days. It found that the medium containing 1.0 mg/l NAA alone showed the best for shoot induction. The highest percentage (100%) of shoot formation and the highest average number of shoot (4.13 shoot per protocorm) were obtained in this medium. For root induction, shoots were transferred to culture on NDM medium containing with various concentration of NAA (0-1.5 mg/l) for 30 days. The highest percentage of root induction was 100% and the highest number of roots and root length, 2.13 roots per shoot and 3.73 mm respectively, were found in NDM medium containing 1.0 mg/l NAA.

Keywords: *Rhynchostylis coelestis* Rchb.f, Protocorm, Growth Regulator

1. บทนำ

กล้วยไม้เขาแกะ (*Rhynchostylis coelestis* Rchb.f) เป็นกล้วยไม้ป่าที่พบได้มากในป่าดิบแล้งหรือป่าเบญจพรรณ มีลักษณะลำต้นเป็นรูปทรงกระบอก ค่อนข้างเตี้ย ตั้งตรง มีการเจริญเติบโตทางยอด ใบออกเรียงสลับซ้ายขวา โคนใบเป็นแผงชิดกันแน่น ส่วนปลายของใบโค้งลงเล็กน้อยทำให้มองดูคล้ายเขาแกะหรือเขาควาย ช่อดอกเกิดจากข้อใกล้ยอดเป็นช่อตั้งตรง รูปทรงกระบอก มีดอกเบียดกันแน่น ขนาดดอกประมาณ 1.5-2.0 ซม. กลีบดอกทั้ง 5 กลีบมีสีขาว ขอบกลีบมีขลิบเป็นสีม่วงคราม บางต้นอาจมีสีออกไปสีทางแดงหรือสีน้ำเงิน ดอกบานทนนานประมาณ 2 สัปดาห์ และมีกลิ่นหอม (อบฉันท์ ไทยทอง, 2543) ปัจจุบัน กล้วยไม้ชนิดนี้ในป่าธรรมชาติเริ่มลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง สาเหตุสำคัญมาจากการกระทำของมนุษย์ การทำลายป่าซึ่งเป็นการสูญเสียถิ่นที่อยู่

อาศัยของกล้วยไม้ป่า การค้ากล้วยไม้ป่าโดยการเก็บออกจากป่าธรรมชาติเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กล้วยไม้ป่าบางชนิดอยู่ในภาวะวิกฤติ ใกล้สูญพันธุ์ ปัจจุบัน กล้วยไม้เขาแกะถูกจัดสถานภาพให้อยู่ในชนิดพันธุ์พืชในบัญชีแนบท้ายที่ 2 (Appendix II) ของอนุสัญญาไซเตส (CITES) ซึ่งหมายถึงเป็นชนิดพันธุ์ที่เหลืออยู่น้อยหรือกำลังถูกคุกคามแต่ยังไม่ถึงกับสูญพันธุ์ (สุมาลี ทองดอนแอ, มานิตย์ ใจฉกรรจ์, และดวงเดือน ศรีโพทา, 2557) ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้กล้วยไม้เขาแกะตกอยู่ในสภาวะดังกล่าว การเร่งหาวิธีการในการขยายพันธุ์เพื่อให้ได้ต้นกล้วยไม้ปริมาณมากโดยใช้ระยะเวลาไม่นาน จึงเป็นสิ่งที่ควรดำเนินการอย่างเร่งด่วน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือการเพาะเลี้ยงในหลอดแก้ว (*In vitro*) เป็นหนึ่งวิธีที่น่าสนใจ เพราะเป็นวิธีการที่ช่วยในการขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมากและใช้ระยะเวลาสั้น ซึ่งปกติการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ในธรรมชาติมีการงอกต่ำ เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้ไม่มีอาหารสะสม (Endosperm) หรือมีน้อยมากซึ่งไม่เพียงพอต่อการงอก นอกจากนี้การเจริญเติบโตตามธรรมชาติใช้ระยะเวลานาน ต้นใหม่จึงเกิดขึ้นทดแทนต้นเก่าไม่ทันเวลา หากใช้การศึกษาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ในหลอดแก้วโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมจึงสามารถช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ มีรายงานความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้แต่ละชนิดบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ ซึ่งมีส่วนประกอบที่แตกต่างกันจำนวนมาก

นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต (Growth Regulators) ร่วมด้วย เพื่อกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชเกิดการแบ่งเซลล์ ขยายขนาดของเซลล์ และการเจริญของเอมบริโอจนกระทั่งพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ กลุ่มของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้มี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มออกซิน เช่น 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D), Naphthalene Acetic Acid (NAA), Indole-3-Acetic Acid (IAA) และ Indole-3-Butyric Acid (IBA) เป็นต้น และกลุ่มไซโตไคนิน เช่น Benzyladenine (BA) หรือ Benzyl aminopurine (BAP), 6-Furfurlaminopurine (kinetin) และ Thidiazuron (TDZ) เป็นต้น (Roy, Patel, Petel, & Kumar, 2007; Hossain, Sharma, & Pathak, 2009; Godo, Komori, Nakaoki, Yukawa, & Miyoshi, 2010; Nongdam & Chongtham, 2011; Pradhan, Regmi, Ranjit, & Pant, 2016) ซึ่งปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่ชนิดของพืช ชิ้นส่วนพืช และจุดประสงค์ของงานวิจัย

ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ คือ ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่องอกของเมล็ด และศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการชักนำให้เกิดยอดและเกิดรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เขาแกะเพื่อเพิ่มจำนวนต้นและอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ชนิดนี้ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลองศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้เขาแกะ

นำฝักกล้วยไม้เขาแกะที่ได้จากการผสมตัวเอง อายุ 6 เดือน มาทำความสะอาดด้วยน้ำผสมผงซักฟอกและล้างด้วยน้ำประปา ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวรอบนอกของฝักโดยแช่ในสารละลายแคลเซียมไฮเปอร์คลอไรด์ 1% เขย่าเป็นเวลา 20 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ผ่าฝักกล้วยไม้ออกตามแนวยาว และเคาะเมล็ดลงบนอาหารสังเคราะห์ 3 สูตร คือ Vacin & Went (VW, 1949) Murashige and Skoog (MS, 1962) และ New Dogashima Medium (NDM, 1993) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการงอกของเมล็ดกล้วยไม้เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ เมื่อเพาะเลี้ยงผ่านไปเป็นเวลา 3 สัปดาห์

2.1 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการเกิดยอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เขาแกะ

เพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้เขาแกะบนอาหารสูตร NDM ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0-1.5 มก./ล. และ BA ความเข้มข้น 0-5 มก./ล. รวมทั้งหมด 16 สูตร (ตารางที่ 1) เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด และนับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อโปรโตคอร์ม เมื่อเพาะเลี้ยงผ่านไปเป็นเวลา 90 วัน

ตารางที่ 1

สูตรอาหาร NDM ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ รวมทั้งหมด 16 สูตร

สูตรอาหาร NDM ที่	ความเข้มข้น	
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)
1	0	0
2	0	1
3	0	3
4	0	5
5	0.5	0
6	0.5	1
7	0.5	3
8	0.5	5
9	1	0
10	1	1
11	1	3
12	1	5
13	1.5	0
1	1.5	1
15	1.5	3
16	1.5	5

2.2 ศึกษาผลของ NAA ต่อการชักนำให้เกิดรากของกล้วยไม้เขาแกะ

นำยอดอ่อนกล้วยไม้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NDM ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0-1.5 มก./ล. ภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 30 วัน

บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดราก นับจำนวนราก และวัดความยาวราก เพาะเลี้ยงต่อไป 3-4 เดือน เพื่อให้ต้นอ่อนกล้วยไม้เจริญต่อไปก่อนย้ายลงปลูกในกระถางที่มีกาบมะพร้าว และปลูกเลี้ยงในสภาพโรงเรือนที่มีอุณหภูมิ 30-35°C ความเข้มแสง 20%

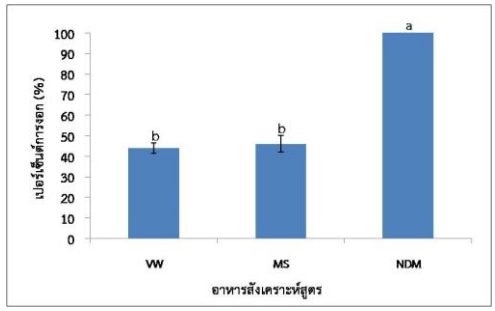
2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม SPSS version 22 ใช้การวิเคราะห์แบบ ANOVA วิเคราะห์ผลความแตกต่างระหว่างสูตรอาหาร และความแตกต่างระหว่างคู่ด้วย LSD (Least Significant Difference)

3. ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้เขาแกะ

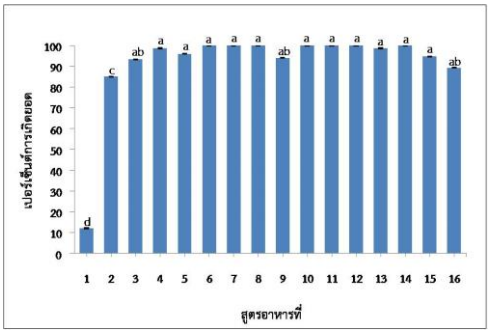
จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เขาแกะบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ ได้แก่ VW MS และ NDM เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกและเจริญเป็นโปรโตคอร์มได้ดีบนอาหารสูตร NDM โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด คือ 100% (ภาพที่ 1) เมล็ดที่งอกจะมีสีเขียว และเริ่มพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มที่มีรูปร่างค่อนข้างกลมภายในเวลา 2 สัปดาห์ของการเพาะเลี้ยง ขณะที่บนอาหารสูตร MS และ VW เมล็ดงอกช้า และมีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 46 และ 44% ตามลำดับ (ภาพที่ 1) นอกจากนี้หากไม่ย้ายเปลี่ยนอาหารเมล็ดที่งอกจะไม่พัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม และเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด



ภาพที่ 1 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เขาแกะเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW MS และ NDM เป็นเวลา 4 สัปดาห์

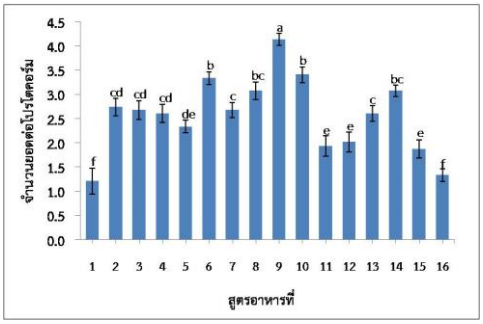
3.2 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการเกิดยอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เขาแกะ

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มบนอาหารที่เติม NAA 0-1.5 มก./ล. และ BA 0-5 มก./ล. เป็นเวลา 90 วัน พบว่า อาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้โปรโตคอร์มเกิดยอดได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดอยู่ระหว่าง 80-100% (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เขาแกะเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 90 วัน

เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าแตกต่างจากอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่เติม NAA 1.0 มก./ล. เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มเกิดยอดได้สูงสุดคือ 4.13 ยอดต่อโปรโตคอร์ม (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อโปรโตคอร์มกล้วยไม้เขาแกะเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 90 วัน

3.3 ศึกษาผลของ NAA ต่อการชักนำให้เกิดรากของกล้วยไม้เขาแกะ

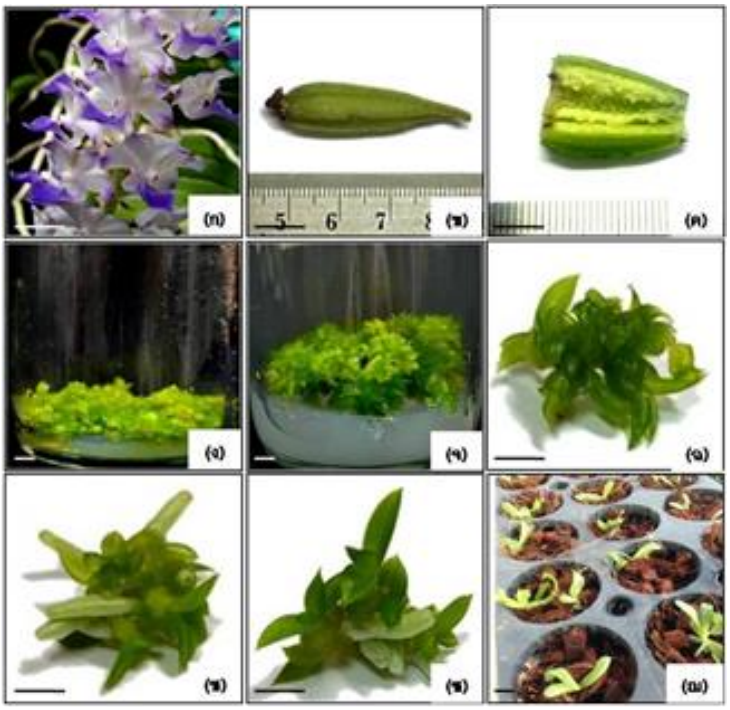
เมื่อเพาะเลี้ยงยอดอ่อนกล้วยไม้บนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0-1.5 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน เพื่อชักนำให้เกิดราก พบว่า อาหารที่เติม NAA 0.5-1 มก./ล. สามารถชักนำให้ยอดกล้วยไม้เกิดรากได้สูงสุดคือ 100% โดยเฉพาะอาหารที่เติม NAA 1.0 มก./ล. ยอดอ่อนกล้วยไม้มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 2.13 รากต่อต้น และมีความยาวรากเฉลี่ยสูงสุดคือ 3.73 มม. (ตารางที่ 2) (ภาพที่ 4) ขณะที่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ NAA เป็น 1.5 มก./ล. พบว่าโปรโตคอร์มเกิดยอดน้อยลง โดยเฉพาะอาหารที่เติม NAA 1.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 5 มก./ล. โปรโตคอร์มมีจำนวนยอดเท่ากับ 1.33 ยอดต่อโปรโตคอร์ม ซึ่งไม่แตกต่างจากโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2

เปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ยของกล้วยไม้เขาแกะเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0-1.5 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ NAA (มก./ล.)	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น	ความยาวราก เฉลี่ย (มม.)
0	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{d}
0.5	100.00±0.00^{a}	2.00±0.17^{a}	2.20±0.14^{b}
1.0	100.00±0.00^{a}	2.13±0.13^{a}	3.73±0.15^{a}
1.5	32.00±4.90^{b}	0.80±0.22^{b}	1.07±0.21^{c}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันทางแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ LSD (Least Significant Difference) ($p<0.05$)



ภาพที่ 4 กล้วยไม้เขาแกะ (*R. coelestis*) ; (ก) ดอกกล้วยไม้เขาแกะ, (ข) ฝักกล้วยไม้เขาแกะ, (ค) เมล็ดกล้วยไม้เขาแกะ, (ง) โปรโตคอร์มกล้วยไม้เขาแกะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NDM เป็นเวลา 30 วัน, (จ) การเกิดยอดของโปรโตคอร์มเขาแกะที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NDM ที่เติม NAA 1 มก./ล. เป็นเวลา 90 วัน, (ช)–(ซ) การเกิดรากของยอดอ่อนเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร NDM ที่เติม NAA 1 มก./ล. เป็นเวลา 30 และ 60 วัน ตามลำดับ และ (ฌ) ต้นอ่อนเขาแกะที่ออกปลูกในสภาพโรงเรือนเป็นเวลา 30 วัน Scale bars; (ก)-(ค) 1 ซม., (ง)-(จ) 0.5 ซม., (ฉ)-(ฌ) 1 ซม.

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้เขาแกะโดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้บนอาหารสังเคราะห์สูตร VW MS และ NDM พบว่า อาหารสูตร NDM สามารถชักนำให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ดีโดยมีอัตราการงอกสูงสุดเท่ากับ 100% ซึ่งเมล็ดที่เริ่มงอกจะมีสีเขียว และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมล็ดที่งอกจะเจริญเป็นโปรโตคอร์มที่มีรูปร่างค่อนข้างกลม ขณะที่การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW และ MS เมล็ดกล้วยไม้มีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำและใช้ระยะเวลาในการงอกนาน นอกจากนี้จากการสังเกตพบว่า หากไม่ย้ายลงอาหารใหม่เมล็ดที่งอกจะไม่เจริญเป็นโปรโตคอร์ม และเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างกันของธาตุอาหารบางชนิดในอาหารแต่ละสูตร (Paul, Kumaria, & Tandon, 2012) ซึ่งในอาหารสังเคราะห์สูตร NDM จะมีปริมาณธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเป็นโปรโตคอร์มของเมล็ดกล้วยไม้โดยเฉพาะอย่างยิ่งไนโตรเจน แคลเซียม และซัลเฟอร์สูง และยังใช้ธาตุเหล็กในรูป Fe.EDTA ซึ่งเมล็ดกล้วยไม้สามารถดูดมาใช้ได้ดีกว่าธาตุเหล็กในรูป $Fe(SO_4)$ ที่เป็นส่วนประกอบในอาหารสูตร MS และ VW นอกจากนี้อาหารสูตร NDM ยังเติมโบรอนและโมลิบดีนัมที่มีผลต่อการแบ่งตัวและการยืดตัวของเซลล์อีกด้วย (Tokuhara, & Mii, 1993)

นอกจากรูปแบบและปริมาณของธาตุอาหารที่แตกต่างกันในอาหารแต่ละสูตรจะส่งผลให้เมล็ดกล้วยไม้จากฝักเดียวกันมีอัตราการงอกที่แตกต่างกันแล้ว ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารยังส่งผลต่อการเจริญของกล้วยไม้อีกด้วย โดย Marschner (1995) รายงานค่า pH ที่แตกต่างกันเป็นสาเหตุให้รากพืชสามารถดูดธาตุที่เป็นประจุลบและประจุบวกได้แตกต่างกัน สำหรับอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงกล้วยไม้พบว่า หากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีค่าความเป็นกรดน้อยเกินไป สารในกลุ่มฟอตเฟสอาจไม่ละลาย ตรงกันข้ามหากอาหารมีความเป็นกรดสูงเกินไปอาจส่งผลให้สารบางชนิดเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติได้ เช่น วุ้นไม่แข็งตัว เป็นต้น นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้เป็นระยะเวลาหนึ่ง ความเป็นกรดของอาหารจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ จึงควรเปลี่ยนอาหารเป็นประจำทุก ๆ 4-6 สัปดาห์ เพื่อให้ต้นกล้วยไม้มีการเจริญอย่างต่อเนื่องและลดความหนาแน่นของต้นพืช

การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ต้องการธาตุอาหารจากภายนอกเนื่องจากเมล็ดและเอมบริโอของกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก อาหารสะสมจึงไม่เพียงพอต่อการงอก ซึ่งในธรรมชาติการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ต้องอาศัยเส้นใยจากเชื้อรา Mycorrhiza เป็นตัวให้น้ำตาลและสารอินทรีย์บางชนิดเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการงอก (Dressler, 1993) ซึ่งการงอกตามธรรมชาติอาจเกิดขึ้นได้น้อยมาก ดังนั้นการเพาะเมล็ดกล้วยไม้บนอาหารสังเคราะห์ที่มีธาตุอาหารและน้ำตาลที่เหมาะสมในสภาพปลอดเชื้อจึงเป็นวิธีที่สามารถ

เพิ่มประสิทธิภาพการงอกของเมล็ดได้ดี และเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้อีกด้วย ดังนั้น ในการศึกษาอัตราการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อจึงต้องศึกษาสูตรอาหารอื่นเพิ่มเติม เพื่อหาสูตรที่เหมาะสมกับกล้วยไม้แต่ละชนิด

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการเกิดยอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เขาแกะ พบว่า อาหารที่เติม NAA 1.0 มก./ล. เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มเขาแกะเกิดยอดได้ 100% และมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ 4.13 ยอดต่อโปรโตคอร์ม ทั้งนี้อาจเพราะโปรโตคอร์มได้รับการกระตุ้นจากฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินที่พืชสร้างขึ้นเองในปริมาณที่เหมาะสมและเพียงพอต่อการกระตุ้นให้พืชเกิดการแบ่งเซลล์ ขยายขนาดของเซลล์และการสร้างยอดได้ ขณะที่การศึกษาของ Santos, Smidt, Padial, & Ribas (2016) รายงานว่า ชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Brasiliorchis picta* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้เกิด PLBs ได้ เนื่องจากอิทธิพลของฮอร์โมนไซโตไคนินที่อยู่ภายในชิ้นส่วนพืชเอง เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ ธวัชชัย ทรัพย์ถิระ, สุภาพ สุนทรนนท์, และสุมนทิพย์ บุนนาค (2556) พบว่า โปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล่งที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มได้ดีกว่าอาหารที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5-2.0 มก./ล. ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มออกซินและไซโตไคนินมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช และมีการนำมาใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้มากที่สุด เพราะมีหน้าที่ในการชักนำให้เนื้อเยื่อมีการแบ่งเซลล์ ขยายขนาดเซลล์ และการเจริญเป็นต้นของกล้วยไม้ นอกจากนี้เมื่อใช้ไซโตไคนินร่วมกับออกซินในสัดส่วนที่แตกต่างกันจะมีผลทำให้เนื้อเยื่อมีการเจริญพัฒนาในลักษณะที่แตกต่างกันด้วย ในการชักนำให้ยอดอ่อนของกล้วยไม้เขาแกะเกิดราก โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (0-1.5 มก./ล.) พบว่า อาหารที่เติม NAA 1.0 มก./ล. สามารถชักนำให้ยอดอ่อนเกิดรากได้สูงสุด 100% มีจำนวนรากและความยาวรากมากที่สุด 2.13 ราก/ต้น และรากยาว 3.73 มม. ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Sheelavantmath, Murthy, Payti, Ashok Kumar, & Ravishankar (2000) พบว่า กล้วยไม้ดินสามารถเกิดรากได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ขณะที่การสร้างรากถูกยับยั้งเมื่อใช้ NAA ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น นอกจากนี้ ยังมีรายงานถึงความสำเร็จของการใช้ออกซินในการชักนำให้เกิดรากของกล้วยไม้หลายชนิด เช่น *Vanda coerulea* (Malabadi, Mulgund, & Nataraja, 2004) *Oncidium taka* (Rahman, Islam, Sen, & Begum, 2005) *Encylia maraie* (Santos Diaz & Alvarez, 2009) และ *Cymbidium aloifolium* (Nongdam, & Chongtham, 2011)

ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถขยายพันธุ์ต้นกล้วยไม้เขาแกะได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งภายหลังจากการนำต้นกล้วยไม้ออกจากขวดและอนุบาลต้นกล้าเป็นระยะเวลาหนึ่งจนกระทั่งได้ต้นกล้วยไม้ที่แข็งแรง การดำเนินการขั้นตอนต่อไปคือการนำต้นกล้วยไม้กลับคืนสู่ป่าธรรมชาติ เพื่อเป็นการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและไม่ให้กล้วยไม้ป่าสูญพันธุ์ไปจากประเทศไทย

5. สรุปผลการทดลอง

เมล็ดกล้วยไม้เขาแกะสามารถงอกและเจริญเป็นโปรโตคอร์มได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร NDM โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดคือ 100% เมล็ดที่งอกจะมีสีเขียวและเริ่มพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มที่มีรูปร่างค่อนข้างกลมภายในเวลา 2 สัปดาห์ ในการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มเขาแกะบนอาหารสูตร NDM ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า อาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดของโปรโตคอร์มคืออาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. โดยโปรโตคอร์มเกิดยอดได้สูงสุด 4.13 ยอด และสามารถชักนำให้ยอดเกิดรากเฉลี่ยสูงสุด 100% โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 2.13 รากต่อต้น และมีความยาวรากเฉลี่ยสูงสุดคือ 3.73 มม.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

ธวัชชัย ทรัพย์ถิระ, สุภาพ สุนทรนนท์, และสุมนทิพย์ บุนนาค. (2556). ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เอื้องสายล่องแล่ง (*Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fischer) ในสภาพปลอดเชื้อ, *วารสารวิจัย มข*, *13*(1), 1-13.

สุมาลี ทองดอนแอ, มานิตย์ ใจฉกรรจ์, และดวงเดือน ศรีโพทา. (2557). ศึกษาการจำแนกชนิดกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* Sw.) เพื่อตรวจสอบติดตามและควบคุมไม่ให้การส่งออกมีผลกระทบเสียหายต่อประชากรของชนิดพันธุ์ในธรรมชาติ ตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518. *วารสารวิชาการเกษตร, 32*(1), 35-44.

อบฉันท์ ไทยทอง. (2543). *กล้วยไม้เมืองไทย*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน.

Dressler, R. L. (1993). *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Australia: Cambridge University Press.

Godo, T., Komori, M., Nakaoki, E., Yukawa, T., & Miyoshi, K. (2010). Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., and endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *46*(3): 323-328.

Hossain, M.M., Sharma, M., & Pathak, P. (2009). Cost effective protocol for *in vitro* mass propagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.-a medicinally important orchid. *Engineering* in *Life Sciences, 9*(6): 444-453.

Malabadi, R.B., Mulgund, G.S., & Nataraja, K. (2004). Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, an endangered orchid using Thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 76*(3): 289-293.

Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants* (2nd Edition). San Diego: Academic Press.

Nongdam, P., & Chongtham, N. (2011). *In vitro* Rapid Propagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.: A Medicinally Important Orchid via Seed Culture. *Journal of Biological Sciences,* 1-7. Retrieved from http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/jbs/0000/30043-30043.pdf

Paul, S., Kumaria S. & Tandon, P. (2012). An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a threatened orchid of northeast India. *AoB PLANTS, 2012:* 1-7.

Pradhan, S., Regmi, T., Ranjit, M., & Pant, B. (2016). Production of virus-free orchid *Cymbidium aloifolium*(L.) Sw. by various tissue culture techniques. *Heliyon*, *2*(10), e00176. http://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00176

Rahman, S.M.M., Islam, S., Sen, P.K. & Begum, F. (2005). In vitro propagation of *Oncidium* taka. *Biotechnology, 4*(3): 225-229.

Roy, A.R., Patel, R.S., Patel, V.V., & Kumar, R. (2007). In vitro propagation of *Thunia marshalliana* Rchb.f. and epiphytic-cum-terrestrial orchid. *The* Journal *of Ornamental Horticulture, 10*(1): 15-19.

Santos Diaz, M.D.S., & Alvarez, C.C. (2009). Plant regeneration through direct shoot formation from leaf cultures and from protocorm-like

bodies derived from callus of *Encyclia mariae* (Orchidaceae), a threatened Mexican orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *45*(2), 162-170.

Santos, S.A., Smidt, E.C., Padial, A.A. & Ribas, L.L.F. (2016). Asymbiotic seed germination and *in vitro* propagation of *Brasiliorchis picta*. *African Journal of Biotechnology, 15*(6), 134-144.

Sheelavantmath, S.S., Murthy, H.N., Pyati, A.N., Ashok Kumar, H.G. & Ravishankar, B.V. (2000). *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. through rhizome section culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60*(2): 151-154.

Tokuhara, K., & Mii, M. (1993). Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Reports, 13*(1): 7-11.