วงจรชีวิตและความสามารถในการผสมพันธุ์ของกล้วยไม้เหลืองแม่ปิง

Life Cycle and Crossabilities of *Eulophia flava* (Lindl.) Hook.f.

เอกรัตน์ วสุเพ็ญ ฉันทลักษณ์ ติยายน และ ณัฐา โพธาภรณ์*
Ekarat Vasupen, Chantalak Tiyayon and Nuttha Potapohn*

ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200
Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
**Corresponding author: Email: natorchid@gmail.com*

(Received: 8 August 2020; Accepted: 30 November 2020)

Abstract: *Eulophia flava* (Lindl.) Hook.f. has been found in Wiang Pa Pao district, Chiang Rai province. The inflorescence was 124 ± 32.5 cm tall and consisted of 35 ± 12 florets per inflorescence. Blooming period is mid - May to mid - June. At present, this orchid is rarely found. Thus, selfing and crossabilities of *E. flava* with 4 different species, *E. dufossei*, *E. macrobulbon*, *E. pauciflora* and *E. spectabilis*, and 2 genera, *Cymbidium aloifolium* and *Geodorum citrinum*, were studied. The results showed that *E. flava* is 100 % self - compatible, it can be used as female parent for interspecific and intergeneric cross with some species including *E. dufossei*, *E. macrobulbon*, *E. spectabilis*, *C. aloifolium* and *G. citrinum*. Interspecific hybridization could yield good seed pods with many seeds, whereas intergeneric one could give only few seeds. The chromosome number was 2n = 54. The viability and germination of seed from various capsule age, 90, 120, 150, 180 and 210 days, were investigated. The result showed that seeds viability test with 1 % TTC were 57.8, 91.3, 89.9, 89.8 and 98.5 %, respectively. The germination on MS media were 8.4, 9.3, 14.1, 26.4 and 47.5 %, respectively. Furthermore, younger seeds had longer germination period than older seeds.

Keywords: Life cycle, chromosome number, seed viability

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: เหลืองแม่ปิงเป็นกล้วยไม้ที่พบได้ที่อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย มีช่อดอกสูง 124 ± 32.5 เซนติเมตร มีดอกย่อย 35 ± 12 ดอกต่อช่อ ดอกบานช่วงกลางเดือนพฤษภาคมถึงกลางเดือนมิถุนายน ปัจจุบันพบได้ค่อนข้างน้อย จึงได้ศึกษาความสามารถในการผสมตัวเองและผสมข้ามของ *E. flava* กับกล้วยไม้ 4 ชนิด ได้แก่ *E. dufossei*, *E. macrobulbon*, *E. pauciflora* และ *E. spectabilis* และกล้วยไม้ต่างสกุล 2 สกุล ได้แก่ *Cymbidium aloifolium* และ *Geodorum citrinum* พบว่า *E. flava* สามารถผสมตัวเองได้ 100 % และใช้เป็นแม่พันธุ์ผสมข้ามกับกล้วยไม้บางชนิด ได้แก่ *E. dufossei*, *E. macrobulbon*, *E. spectabilis*, *C. aloifolium* และ *G. citrinum* ซึ่งฝักที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดติดฝักได้ดีมีจำนวนเมล็ดมาก ส่วนฝักที่เกิดจากการผสมข้ามสกุลติดเมล็ดน้อย จำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n = 54 การทดสอบความมีชีวิตและความงอกของเมล็ดจากฝักอายุ 90, 120, 150, 180 และ 210 วัน พบว่าความมีชีวิตของเมล็ดเมื่อทดสอบด้วย 1 % TTC เท่ากับ 57.8, 91.3, 89.9, 89.8 และ 98.5 % ตามลำดับ ส่วนความงอกของเมล็ดบนอาหารวุ้นสูตร MS เท่ากับ 8.4, 9.3, 14.1, 26.4 และ 47.5 % ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เมล็ดอายุน้อยใช้เวลาในการงอกนานกว่าเมล็ดที่อายุมาก

คำสำคัญ: วงจรชีวิต จำนวนโครโมโซม ความมีชีวิตของเมล็ด

คำนำ

กล้วยไม้เป็นหนึ่งในไม้ดอกที่ได้รับความนิยมในหลาย ๆ ประเทศ มูลค่าของดอกกล้วยไม้ในตลาดโลกประมาณ 400 ล้านเหรียญสหรัฐฯ ส่วนหนึ่งเป็นกล้วยไม้เขตร้อน (Department of International Trade Promotion, 2019) เนื่องจากมีความหลากหลายของสีสัน ขนาด และรูปทรงของดอก ทำให้มีการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้มีลักษณะดีตามที่ต้องการ กล้วยไม้หลายชนิดมีความสามารถในการผสมตัวเอง แต่บางชนิดไม่สามารถผสมตัวเองได้ต้องมีการผสมข้ามต้นเท่านั้น นอกจากนี้กล้วยไม้ยังมีคุณสมบัติที่ดีคือสามารถผสมข้ามชนิดและข้ามสกุลได้ เช่น *Phalaenopsis* x *intermedia* ซึ่งเป็นลูกผสมข้ามชนิดที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ และ *Laeliocattleya* Elegans ที่เป็นลูกผสมข้ามสกุล (De *et al*., 2014) การผสมพันธุ์กล้วยไม้เพื่อสร้างลูกผสมใหม่ นอกจากเพื่อใช้ประโยชน์ทางการค้า ยังเป็นการตอบสนองความต้องการที่หลากหลายของผู้บริโภค

กล้วยไม้สกุล *Eulophia* จัดอยู่ใน Tribe *Cymbidieae* และ Subtribe *Eulophiinae* (Dressler, 1993) เป็นกล้วยไม้ดิน (terrestrial orchid) ที่มีหัวสะสมอาหาร พบมากกว่า 200 ชนิดทั่วโลก (van der Cingel, 2001) และหลายชนิดมีรายงานว่า เป็นพืชที่ถูกคุกคามและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ กล้วยไม้สกุล *Eulophia* ที่พบในประเทศไทยมี 14 ชนิด (Chayamarit *et al*., 2014) แต่ละชนิดมีลักษณะของหัว ต้น และดอกแตกต่างกัน

Eulophia flava (Lindl.) Hook.f. หรือเหลืองแม่ปิงเป็นกล้วยไม้สกุล *Eulophia* ชนิดหนึ่งที่พบในประเทศไทย ซึ่งช่อดอกมีความสวยงามและโดดเด่น เป็นกล้วยไม้ที่พบในธรรมชาติเพียงบางพื้นที่ โดย Chayamarit *et al*. (2014) รายงานว่าพบได้ในบริเวณป่าดิบชื้น จังหวัดเพชรบูรณ์ และ Rungruang (2001) รายงานว่าพบในอุทยานแห่งชาติแม่ปิง จังหวัดลำพูน โดยมีลักษณะของลำต้นใต้ดินเป็นหัว สามารถสร้างหัวใหม่ได้ปีละ 1 หัว ช่อดอกตั้งตรงสูง 73 - 170 เซนติเมตร ดอกย่อยสีเหลืองสด 9 - 41 ดอกต่อช่อ ออกดอกในเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อจำนวนประชากรมีหลายปัจจัย ได้แก่ การสืบพันธุ์โดยอาศัยเมล็ดตามธรรมชาติเป็นไปได้ยาก เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็ก การเกิดขึ้นเองในสภาพธรรมชาติจะเกิดขึ้นได้ค่อนข้างน้อย และดอกมักถูกทำลายโดยแมลงศัตรูพืช ทำให้ดอกพัฒนาเป็นฝักและเมล็ดได้น้อย นอกจากนี้การสร้างหัวใหม่ในแต่ละปีเกิดขึ้นได้น้อยเช่นเดียวกัน

เพื่อเป็นการอนุรักษ์และศึกษาการใช้ประโยชน์ จึงได้มีการศึกษาวงจรชีวิต ความสามารถในการผสมตัวเอง ผสมข้ามชนิดและข้ามสกุลของ *E. flava*

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ ผลของอายุฝักต่อความมีชีวิตและการงอกของเมล็ด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการขยายพันธุ์และเป็นข้อมูลในการพัฒนาพืชชนิดนี้ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุพันธุ์พืช

E. flava (Lindl.) Hook.f. และกล้วยไม้ที่นำมาผสมข้ามชนิด ได้แก่ *Eulophia dufossei*, *E. macrobulbon*, *E. pauciflora* และ *E. spectabilis* ส่วนกล้วยไม้ที่นำมาผสมข้ามสกุล ได้แก่ *Cymbidium aloifolium* และ *Geodorum citrinum* (Figure 1)

วงจรชีวิต

ศึกษาวงจรชีวิตในรอบ 1 ปีของ *E. flava* ที่พบในอำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย ความสูงเหนือระดับน้ำทะเลปานกลางประมาณ 630 เมตร และ *Eulophia* spp. อีก 2 ชนิด ที่นำมาผสมข้ามกับ *E. flava* ซึ่งเป็นชนิดที่หายากและยังไม่เคยมีรายงานการศึกษามาก่อน ได้แก่ *E. dufossei* และ *E. pauciflora* ซึ่งปลูกและเจริญเติบโตในจังหวัดเชียงใหม่ ความสูงเหนือระดับน้ำทะเลประมาณ 310 เมตร โดยบันทึกช่วงเวลาออกดอก การเจริญเติบโตทางใบ และการพักตัว

ความสามารถในการผสมพันธุ์

1) การผสมภายในชนิด (intraspecific hybridization) ของ *E. flava* โดยการถ่ายเรณูด้วยมือ

Figure 1. Flower of *Eulophia flava*; (A) inflorescence, (B) leaves, (C) flower, (D) rhizome, (E) *E. dufossei*, (F) *E. macrobulbon*, (G) *E. pauciflora*, (H) *E. spectabilis*, (I) *Cymbidium aloifolium* and (J) *Geodorum citrinum* (scale bar = 1 cm)

(hand - pollination) ในช่วงเวลา 9.00 - 10.00 น. ประกอบด้วย 2 กรรมวิธี คือ ถ่ายเรณูในต้นเดียวกัน และถ่ายเรณูข้ามต้น จำนวน 30 ดอกต่อกรรมวิธี และทดสอบการผสมตัวเองของ *E. dufossei* และ *E. pauciflora* โดยถ่ายเรณูในต้นเดียวกัน จำนวน 3 ดอกต่อชนิด

2) การผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization) นำ *E. flava* ผสมข้ามชนิดกับ *E. dufossei*, *E. macrobulbon*, *E. pauciflora*, *E. spectabilis* และผสมข้ามสลับพ่อแม่ (reciprocal cross) โดยผสมข้ามอย่างน้อย 5 ดอกต่อคู่ผสม ทำการถ่ายเรณูเวลา 8.00 - 10.00 น.

3) การผสมข้ามสกุล (intergeneric hybridization) ของ *E. flava* กับ *C. aloifolium* และ *G. citrinum* พร้อมทั้งผสมสลับพ่อแม่ โดยผสมข้ามอย่างน้อย 5 ดอกต่อคู่ผสม ทำการถ่ายเรณูเวลา 8.00 - 10.00 น.

บันทึกผลการทดลองจากจำนวนฝักที่ผสมติดเทียบกับจำนวนดอกที่ทำการผสมทั้งหมด สำหรับกล้วยไม้ที่มีช่วงดอกบานไม่ตรงกันจะเก็บรักษาเรณูตามวิธีของ Inpar and Potapohn (2009) นำเมล็ดลูกผสมที่ได้มาเพาะในสภาพปลอดเชื้อ และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอกจากเมล็ดที่งอกเทียบกับจำนวนเมล็ดที่เพาะทั้งหมด

เซลล์พันธุศาสตร์

ศึกษาจำนวนโครโมโซมของ *Eulophia* 3 ชนิด ได้แก่ *E. flava*, *E. dufossei* และ *E. pauciflora* เตรียมสไลด์ด้วยวิธี squash technique ดัดแปลงจาก Felix and Guerra (2000) โดยศึกษาช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างราก (5.00 น., 6.00 น., 7.00 น., 8.00 น., 9.00 น., 10.00 น., 11.00 น., 12.00 น. และ 13.00 น.) และระยะเวลา pre - treatment ที่เหมาะสม (4, 12 และ 24 ชั่วโมง) ในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากมีขั้นตอนดังนี้ ตัดปลายรากยาว 5 มิลลิเมตร pretreat ด้วย 0.002 M 8 - hydroxyquinolin ที่อุณหภูมิ 4 °C ตามเวลาที่กำหนด จากนั้นแช่ในสารละลาย acetic - alcohol fixative ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 3 - 12 ชั่วโมง ย่อยผนังเซลล์ด้วย 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 8 นาที และย้อมด้วยสี aceto - orcein เป็นเวลา 30 นาที

ผลของอายุฝักต่อความมีชีวิตและการงอกของเมล็ด

การศึกษาความมีชีวิตของเมล็ด (seed viability) ใช้เมล็ดจากฝักที่ได้จากการผสมตัวเองของ *E. flava* อายุ 90, 120, 150, 180 และ 210 วัน แต่ละช่วงอายุทำ 10 ซ้ำ โดยตักเมล็ดใส่ในจานแก้ว (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร นับเมล็ดก่อนเทสารละลาย 1 % 2,3,5 - triphenyltetrazolium chloride (TTC) ลงไป 5 มิลลิลิตร ปิดฝาจานแก้วแล้วนำไปวางในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมล็ดที่มีชีวิตคือเมล็ดที่ย้อมติดสีแดงบริเวณเอ็มบริโอ บันทึกจำนวนเมล็ดที่ติดสีแดง

ศึกษาการงอกของเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* seed germination) โดยเก็บฝักที่มีอายุ 90, 120, 150, 180 และ 210 วัน มาตัดแต่งและล้างทำความสะอาดก่อนฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย 15 % Clorox นาน 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ในตู้ปลอดเชื้อ ลนไฟและผ่าฝักแล้วเขี่ยเมล็ดทั้งหมดลงในจานแก้ว ใช้ช้อนตักสาร (spatula) ขนาดเล็กตักเมล็ดโรยบนอาหารวุ้นสูตร Murashige and Skoog 1962 (MS) ขวดละ 1 ช้อน จำนวน 10 ขวด ซึ่งในการเพาะเมล็ดแต่ละช่วงอายุได้ทำการนับจำนวนเมล็ดใน 1 ช้อน ทั้งหมด 10 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงวางไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 °C บันทึกจำนวนวันในการงอกและคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอกจากจำนวนเมล็ดที่งอกต่อจำนวนเมล็ดที่เพาะทั้งหมด

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การงอกด้วย ANOVA

ผลการศึกษาและวิจารณ์

วงจรชีวิต

E. flava เริ่มการเจริญเติบโตโดยแทงตายอดโผล่พ้นดินในช่วงปลายเดือนเมษายน ตาดอกมีการพัฒนาเร็วกว่าตาใบ ดอกบานในช่วงกลางเดือนพฤษภาคมถึงกลางเดือนมิถุนายน เมื่อดอกบาน

ได้ระยะหนึ่งตาใบจึงยืดขึ้นและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว หลังจากดอกโรย เมื่อใบเจริญเติบโตได้ระยะหนึ่งจึงสร้างหัวใหม่เพื่อสะสมอาหาร ใบเริ่มแห้งช่วงต้นเดือนพฤศจิกายนและยุบตัวทั้งหมดช่วงปลายเดือนพฤศจิกายน เป็นการเข้าสู่ระยะพักตัว (Table 1) หัวที่โตเต็มที่มีความกว้าง 5.5 - 8.0 เซนติเมตร ยาว 9.5 - 13.5 เซนติเมตร หัวเป็นแบบเหง้า (rhizome) โดยหัวใหม่เกิดต่อจากหัวเก่าไปเรื่อย ๆ หัวเก่าที่อยู่หลังสุดจะค่อย ๆ แห้งไป ต้นที่ออกดอกมีหัวที่สมบูรณ์ต่อกันอย่างน้อย 5 หัว ช่อดอกสูง 124 ± 32.5 เซนติเมตร มีจำนวนดอก 35 ± 12 ดอกต่อช่อ ความกว้างของดอก 8.2 ± 1.7 เซนติเมตร ฝักมีอายุประมาณ 8 เดือน จึงแตกและปล่อยเมล็ดที่มีขนาดเล็กและเบาให้ปลิวไปกับลม ต้นที่โตเต็มที่แล้วมีใบ 3 - 4 ใบ

E. dufossei มีการเจริญเติบโตเหนือดินให้เห็น 2 ช่วง ช่วงแรกเป็นการเจริญเติบโตทางดอก โดยตายอดแทงออกจากปลายหัวใหม่ที่สร้างในฤดูกาลที่ผ่านมา ตาดอกจะยืดขึ้นก่อนและโผล่พ้นดินในเดือนธันวาคม ดอกบานช่วงปลายเดือนธันวาคมถึงเดือนมกราคม จากนั้นจึงพักตัว ช่วงที่สองเป็นการเจริญเติบโตทางใบ โดยตาใบแทงออกมาข้าง ๆ ก้านช่อดอกเก่าซึ่งอยู่ในตาเดียวกัน ใบโผล่ขึ้นมาเหนือดินปลายเดือนมีนาคมและเจริญเติบโตต่อไปจนถึงเดือนตุลาคม ในระยะนี้จะมีการสร้างหัวใหม่เพื่อสะสมอาหาร หลังจากใบยุบตัวไปจะยังไม่มีการเจริญเติบโตเหนือดินให้เห็น จนกระทั่งมีการออกดอกครั้งต่อไป (Table 1)

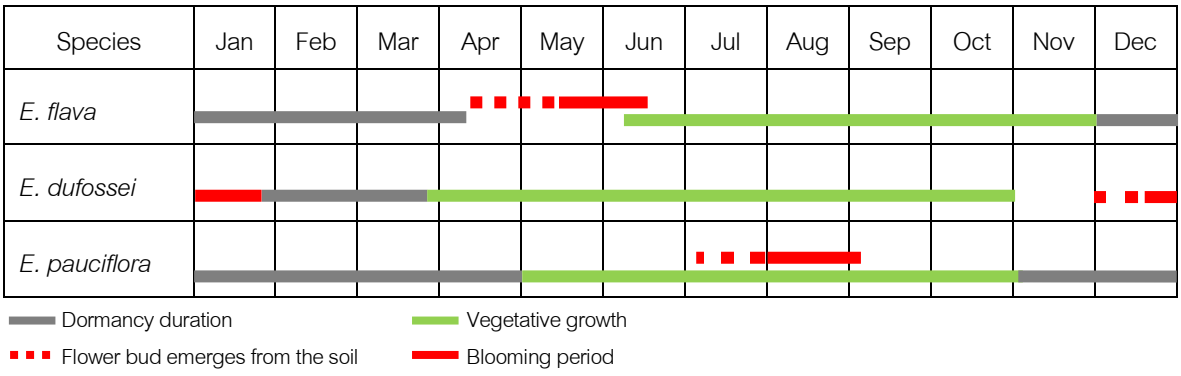
E. pauciflora เริ่มการเจริญเติบโตทางใบก่อน โดยตายอดโผล่ขึ้นเหนือดินในเดือนพฤษภาคมและตาใบเป็นส่วนที่ยืดขึ้นก่อน เมื่อใบเจริญเติบโตได้ระยะหนึ่งจึงเริ่มสร้างหัวใหม่และแทงช่อดอกราวเดือนกรกฎาคม ดอกบานในเดือนสิงหาคมถึงต้นเดือนกันยายน และพักตัวในเดือนพฤศจิกายน (Table 1)

ความสามารถในการผสมพันธุ์

การผสมภายในชนิดของ *E. flava* พบว่าทั้งการผสมภายในต้นและการผสมข้ามต้นติดฝักได้ 100 % แสดงว่า *E. flava* สามารถผสมตัวเองได้ (self-compatible, SC) และจากการสังเกตการติดฝักตามธรรมชาติ พบว่า บางต้นสามารถติดฝักได้มากถึง 7 ฝักต่อต้น แมลงที่ช่วยในการถ่ายเรณู คือ แมลงภู่ (carpenter bee) เช่นเดียวกับกล้วยไม้หลายชนิดที่มีความสามารถในการผสมตัวเองได้ดี เช่น *Cremastra appendiculata* และ *Cymbidium goeringii* ซึ่งการผสมด้วยมือติดฝักได้มากกว่า 95 % บ่งชี้ว่าเป็นพืชผสมตัวเองได้ (Chung and Chung, 2003) เมื่อนำเมล็ดจากฝักอายุ 90 วัน เพาะบนอาหารวุ้นสูตร MS พบว่า เปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 8.4 %

การทดสอบการผสมตัวเองของ *E. dufossei* และ *E. pauciflora* พบว่า *E. pauciflora* สามารถติดฝักได้และเมล็ดจากฝักอายุ 60 วัน สามารถงอกบนอาหารวุ้นสูตร MS มีเปอร์เซ็นต์การงอก 5.7 % ส่วน *E. dufossei* พบว่า รังไข่มีการพัฒนาเป็นฝักแต่ภายในฝักไม่มีเมล็ด ซึ่งฝักสามารถติดอยู่บนก้านช่อดอกได้นาน 2 - 3 เดือน อาจเป็นไปได้ว่า *E. dufossei* เป็นพืชที่ผสมตัวเองไม่ได้

Table 1. Life cycle of *Eulophia* spp.



(self-incompatible, SI) เช่นเดียวกับที่พบในกล้วยไม้หลาย ๆ ชนิดในสกุล *Dendrobium* (Niu *et al*., 2018) โดย SI เป็นกลไกในพืชที่ป้องกันการผสมตัวเอง ทำให้พืชมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในสายพันธุ์ (Zhang *et al*., 2009) ส่วนการที่ฝักมีขนาดใหญ่ขึ้นนั้นคาดว่าเป็นเพราะออกซินที่อยู่ที่ผิวของกลุ่มเรณู ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ช่วยกระตุ้นการสร้างและการเจริญเติบโตของออวุลที่อยู่ในรังไข่ แม้ว่าจะไม่มีการปฏิสนธิฝักก็ยังคงเติบโตได้แต่ไม่มีเมล็ด (Millner *et al*., 2015)

การผสมข้ามชนิดและข้ามสกุล พบว่า เมื่อให้ *E. flava* เป็นแม่พันธุ์ สามารถผสมข้ามกับ *E. dufossei*, *E. macrobulbon*, *E. spectabilis*, *C. aloifolium* และ *G. citrinum* ติดฝักได้ 60.0, 33.3, 100.0, 25.0 และ 40.0 % ตามลำดับ เมื่อนำเมล็ดลูกผสมเพาะบนอาหารวุ้นสูตร MS พบว่า เปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 13.0, 4.6, 6.0, 0.0 และ 6.9 % ตามลำดับ ส่วนการผสมกับ *E. pauciflora* ไม่ติดฝัก เมื่อให้ *E. flava* เป็นพ่อพันธุ์ สามารถผสมข้ามกับ *E. spectabilis* และ *G. citrinum* ติดฝักได้ 100.0 และ 40.0 % ตามลำดับ เมื่อนำเมล็ดลูกผสมเพาะบนอาหารวุ้นสูตร MS พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การงอก 10.1 และ 4.1 % ตามลำดับ ส่วนการผสมข้ามกับกล้วยไม้อีก 4 ชนิด ไม่ประสบความสำเร็จ (Table 2) โดยการผสมข้ามชนิดได้ฝักขนาดใหญ่และติดเมล็ดมาก ส่วนฝักที่ได้จากการผสมข้ามสกุลมีขนาดเล็กและติดเมล็ดน้อย ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการผสมข้ามมีหลายปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิอากาศและความชื้นขณะทำการถ่ายเรณู จำนวนโครโมโซม ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม และความเข้ากันได้ระหว่างเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย (Krasaechai, 1996) นอกจากนี้ความมีชีวิตของเรณูมีผลต่อการผสมเกสรด้วยเช่นกัน ซึ่งการใช้เรณูที่ไม่สมบูรณ์หรือมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่ต่ำเกินไปทำให้การถ่ายเรณูล้มเหลวได้ (Thammatha *et al*., 2016)

Table 2. Fruit set percentage of intraspecific, interspecific and intergeneric hybridization of *Eulophia* spp. and alliances

Female plant		Male plant	Number of hybridized flowers	Number of seed pods	Fruit set (%)	Seed germination (%)
Eulophia flava	x	*Eulophia flava*	60	60	100	8.4
Eulophia dufossei	x	*Eulophia dufossei*	3	0	0	-
Eulophia pauciflora	x	*Eulophia pauciflora*	3	3	100	5.7
Eulophia flava	x	*Eulophia dufossei*	5	3	60.0	13.0
Eulophia dufossei	x	*Eulophia flava*	5	0	0	-
Eulophia flava	x	*Eulophia macrobulbon*	6	2	33.3	4.6
Eulophia macrobulbon	x	*Eulophia flava*	5	0	0	-
Eulophia flava	x	*Eulophia pauciflora*	5	0	0	-
Eulophia pauciflora	x	*Eulophia flava*	5	0	0	-
Eulophia flava	x	*Eulophia spectabilis*	6	6	100	6.0
Eulophia spectabilis	x	*Eulophia flava*	6	6	100	10.1
Eulophia flava	x	*Cymbidium aloifolium*	8	2	25.0	0
Cymbidium aloifolium	x	*Eulophia flava*	8	0	0	-
Eulophia flava	x	*Geodorum citrinum*	5	2	40.0	6.9
Geodorum citrinum	x	*Eulophia flava*	5	2	40.0	4.1

ในการศึกษานี้ *E. pauciflora* และ *C. aloifolium* ไม่สามารถใช้เป็นแม่พันธุ์ผสมข้ามกับ *E. flava* ได้ แม้ว่าจะมีโครโมโซมใกล้เคียงกันและมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมก็ตาม อาจเป็นเพราะเกสรเพศผู้และเพศเมียไม่สามารถเข้ากันได้ เนื่องจาก *E. pauciflora* และ *C. aloifolium* มีดอกขนาดเล็กกว่า *E. flava* มาก ซึ่งอาจจะมีผลต่อการงอกของหลอดเรณูเข้าไปในรังไข่ สอดคล้องกับการศึกษาของ Pintajam *et al*. (2016) ที่พบว่า *E. macrobulbon* และ *E. spectabilis* มีจำนวนโครโมโซมต่างกันแต่สามารถผสมข้ามกันได้ โดยใช้ *E. spectabilis* เป็นแม่พันธุ์ แต่เมื่อใช้ *E. macrobulbon* เป็นแม่พันธุ์จะไม่ติดฝัก เนื่องจาก *E. macrobulbon* มีดอกขนาดเล็กกว่า *E. spectabilis* มาก จึงมีท่อรังไข่เล็กและแคบกว่าท่อของกลุ่มเรณู ในกรณีของคู่ผสมระหว่าง *E. flava* x *E. pauciflora*, *E. dufossei* x *E. flava* และ *E. macrobulbon* x *E. flava* ผสมข้ามไม่สำเร็จ เนื่องจากช่วงเวลาในการออกดอกแตกต่างกัน การเก็บรักษาเรณูของต้นพ่อพันธุ์เป็นเวลา 7 - 9 เดือน ทำให้เรณูสูญเสียความมีชีวิต เมื่อทดสอบความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีประยุกต์ของ Rodjanawijid *et al*. (2016) โดยนำเรณูที่เก็บรักษาไว้มาเพาะบนอาหารวุ้นที่เติม 2 % sucrose วางในที่มืดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ไม่มีเรณูที่งอกได้ แม้ว่าอุณหภูมิ 4 °C สามารถเก็บรักษาเรณูของ *Dendrobium* บางชนิดได้นานถึง 8 เดือน (Inpar and Potapohn, 2009) แต่อาจยังไม่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเรณูของกล้วยไม้ที่ใช้ในการทดลองนี้

เซลล์พันธุศาสตร์

ในขั้นตอนการหาจำนวนโครโมโซมนั้น *Eulophia* แต่ละชนิดมีช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างรากและ pre - treatment แตกต่างกัน โดยเวลาที่เหมาะสมเป็นดังนี้ *E. flava* เก็บรากเวลา 7.00 - 7.30 น. ใช้เวลา pretreat 24 ชั่วโมง ในขณะที่ *E. dufossei* เก็บรากเวลา 7.00 - 7.20 น. pretreat เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ *E. pauciflora* เก็บรากเวลา 10.00 น. pretreat เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากการตรวจสอบจำนวนโครโมโซม พบว่า *E. flava* จากแหล่งธรรมชาติ 3 แหล่ง มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ 2n = 54 ตรงกับรายงานของ Deng *et al*. (2009) ที่พบว่า *E. flava* ในประเทศจีนมีโครโมโซมเท่ากับ 2n = 54 ส่วนจำนวนโครโมโซมของ *E. dufossei* เท่ากับ 2n = 54 และ *E. pauciflora* เท่ากับ 2n = 56 (Figure 2) จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ชนิดอื่นที่

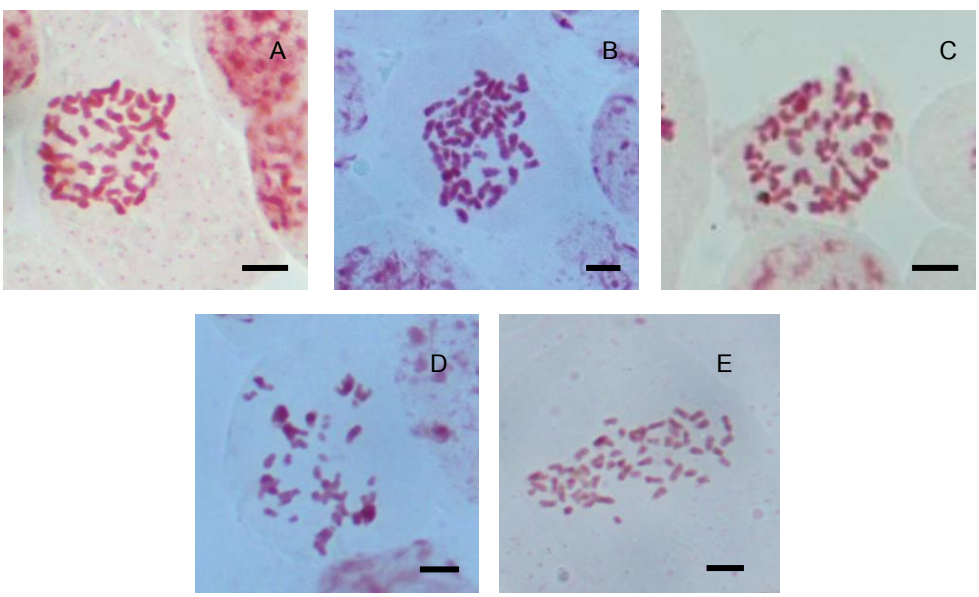


Figure 2. Chromosome numbers of *Eulophia* spp. (scale bar = 5 μm) (A - C) *Eulophia flava* from 3 natural habitats 2n = 54, (D) *Eulophia dufossei* 2n = 54, (E) *Eulophia pauciflora* 2n = 56

นำมาผสมข้ามกับ *E. flava* มีรายงานไว้เป็นดังนี้ *E. macrobulbon* เท่ากับ 2n = 48 (Pintajam *et al*., 2016) *E. spectabilis* เท่ากับ 2n = 54 (Pintajam *et al*., 2018) *G. citrinum* เท่ากับ 2n = 54 (Thongsan, 2008) และ *C. aloifolium* เท่ากับ 2n = 40 (Aoyama, 1989)

ผลของอายุฝักต่อความมีชีวิตและการงอกของเมล็ด

การทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดโดยใช้ TTC ทำให้เอ็มบริโอที่หายใจย้อมติดสีแดง และเอ็มบริโอที่ตายไม่มีชีวิตไม่ติดสี จากการทดลอง พบว่า เมล็ดของ *E. flava* แต่ละช่วงอายุมีการติดสีแตกต่างกัน เมล็ดอายุ 90 วัน มีเมล็ดที่ติดสีเข้ม ติดสีจาง และไม่ติดสี จากการสุ่มตัวอย่างคิดเป็น 12.8, 47.7 และ 39.5 % ตามลำดับ เมล็ดอายุ 120 - 180 วัน ส่วนใหญ่ย้อมติดสีเข้ม ส่วนเมล็ดอายุ 210 วัน เมื่อแช่เมล็ดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไม่สามารถมองเห็นการติดสีที่เอ็มบริโอได้ เมื่อเพิ่มเวลาแช่เมล็ดเป็น 72 ชั่วโมง จึงติดสีจาง (Figure 3) ความมีชีวิตของเมล็ดจากฝักอายุ 90, 120, 150, 180 และ 210 วัน เท่ากับ 57.8, 91.3, 89.9, 89.8 และ 98.5 % ตามลำดับ เมล็ดจากฝักอายุตั้งแต่ 120 - 210 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 3) สอดคล้องกับการศึกษาใน *Cephalanthera falcata* ที่พบว่า เมล็ดจากฝักอายุ 50 - 60 วัน มีเปอร์เซ็นต์การย้อมติดสีต่ำ เมล็ดจากฝักอายุ 70 - 100 วัน ติดสีได้มากขึ้น เมล็ดจากฝักอายุ 110 วัน มองเห็นเอ็มบริโอที่ติดสีไม่ชัดเจน เนื่องจากผนังออวุลชั้นใน (inner integument) ที่อยู่รอบเอ็มบริโอมีสีน้ำตาลเข้ม และเมล็ดจากฝักอายุ 140 วัน ไม่ติดสีย้อม แต่เมื่อลอกเอาเฉพาะเอ็มบริโอมาแช่ใน TTC พบว่า ติดสีแดงเข้ม (Yamazaki and Miyoshi, 2006) เปลือกเมล็ดชั้นนอก (testa) และผนังออวุลชั้นในมีผลต่อการย้อมด้วย TTC ในเมล็ดที่ยังอ่อนสารละลาย TTC สามารถเข้าไปยังเอ็มบริโอโดยผ่านช่องเปิดขนาดเล็ก เช่น รูบริเวณ suspensors เมื่อเมล็ดอายุมากขึ้นจะมีการสะสมของสารทุติยภูมิซึ่งอาจเป็นลิกนิน

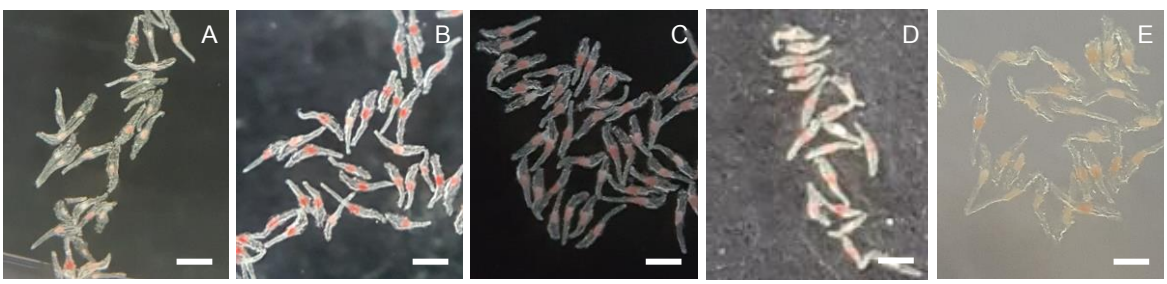


Figure 3. Seed of *Eulophia flava* at different age, (A) 90 - day, (B) 120 - day, (C) 150 - day, (D) 180 - day, and (E) 210 - day. Seeds with red stained in the middle were viable seeds (scale bars = 1 mm)

Table 3. Viability and germination of different seed age of *Eulophia flava*

Seed ages (days)	Seed viability (%)	Seed germination (%)	Days to germination
90	57.8[b]	8.4[c]	61
120	91.3[a]	9.3[c]	52
150	89.9[a]	14.1[c]	40
180	89.8[a]	26.4[b]	36
210	98.5[a]	47.5[a]	30

Means within the same column follow by different letters showed significantly different ($P \leq 0.05$) according to Duncan's multiple range test

หรือคิวติน ส่วนเปลือกเมล็ดชั้นนอกมีการสะสมซูเบอรินและไขมากขึ้น ทำให้น้ำหรือสารละลายไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปยังเอ็มบริโอได้ง่าย (Kauth *et al*., 2008; Yamazaki and Miyoshi, 2006)

การเพาะเมล็ดจากฝักที่มีอายุแตกต่างกันในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ฝักอายุ 210 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด (47.5 %) รองลงมาเป็นฝักอายุ 180 วัน (26.4 %) ส่วนฝักอายุ 90, 120 และ 150 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำ (8.4, 9.3 และ 14.1 % ตามลำดับ) (Table 3) ระยะเวลาในการงอกของเมล็ด พบว่า ฝักอายุ 90 วัน ใช้เวลางอกนานที่สุด คือ 61 วัน ส่วนฝักอายุ 210 วัน ใช้เวลาในการงอก 30 วัน (Table 3) เช่นเดียวกับ *Habenaria rhodocheila* Hance ที่พบว่า เมล็ดจากฝักอายุมากสามารถงอกได้ดีและเร็วกว่าเมล็ดจากฝักอายุน้อย การนำเมล็ดอ่อนไปเพาะต้องใช้เวลาพัฒนาเอ็มบริโอต่อจนถึงจุดที่พร้อมงอกจึงทำให้งอกช้า (Piyatrakul, 2004) ในทางตรงกันข้ามกับกล้วยไม้ดินบางชนิดที่เมล็ดอ่อนซึ่งเอ็มบริโอยังไม่โตเต็มที่สามารถงอกในสภาพปลอดเชื้อได้เร็วกว่าเมล็ดแก่ (Godo *et al*., 2010) เช่น *Calanthe tricarinata* เมล็ดอ่อนมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น แต่เมล็ดแก่เต็มที่กลับงอกได้น้อยลง เนื่องจาก ABA ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นกว่าในเมล็ดอ่อน 5 เท่า (Lee *et al*., 2007) ในกล้วยไม้ *Dactylorhiza maculat*a พบว่า เมล็ดแก่มี ABA มากกว่าเมล็ดอ่อน 14 เท่า (van der Kinderen, 1987) ABA ในเมล็ดทำหน้าที่ควบคุมการแก่ของเอ็มบริโอ การพักตัวและการงอก (Lee *et al*., 2007) แม้ว่าปริมาณ ABA จะมีความสัมพันธ์กับการงอกของเมล็ดในหลอดทดลอง แต่อาจมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อการงอก เช่น การพัฒนาของเปลือกเมล็ด (seed coat) อย่างไรก็ตามเมล็ดกล้วยไม้แต่ละชนิดมีความหนาของเปลือกเมล็ดและคุณสมบัติในการซึมผ่านของน้ำแตกต่างกัน และ ABA ในเมล็ดอาจไม่ได้นำไปสู่การพักตัว ทั้งนี้ต้องพิจารณาถึงการกระจายของฮอร์โมนในเซลล์และความไวของเซลล์ต่อฮอร์โมนร่วมด้วย (van der Kinderen, 1987) ซึ่งในการทดลองนี้เมล็ดของ *E. flava* ที่อายุมากมีเอ็มบริโอที่พัฒนาเต็มที่แล้วทำให้มีความพร้อมที่จะงอกได้เร็วกว่าเมล็ดอ่อน

สรุป

E. flava มีการเจริญเติบโตช่วงปลายเดือนเมษายนโดยออกดอกก่อนใบ ดอกบานกลางเดือนพฤษภาคมถึงกลางเดือนมิถุนายน จากนั้นใบจะยุบตัวในเดือนธันวาคม จำนวนโครโมโซมของ *E. flava* จากทุกแหล่งมีจำนวนเท่ากันคือ 2n = 54 มีความสามารถผสมตัวเองได้ นอกจากนี้ยังใช้เป็นแม่พันธุ์ผสมข้ามชนิดและข้ามสกุลได้ โดยสามารถผสมกับ *E. duofossei*, *E. macrobulbon*, *E. spectabilis*, *C. aloifolium* และ *G. citrinum* ส่วนการผสมกับ *E. pauciflora* ไม่ติดฝัก ส่วนใหญ่คู่ที่ผสมติดฝักได้สังเกตว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากันหรือต้นแม่พันธุ์มีจำนวนโครโมโซมมากกว่า นอกจากนี้ฝักที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดจะติดเมล็ดได้มาก แต่ฝักที่ได้จากการผสมข้ามสกุลจะติดเมล็ดน้อย ความมีชีวิตและความงอกของเมล็ด *E. flava* แปรผันตามอายุเมล็ดที่เพิ่มขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสานที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย และขอขอบคุณ คุณสมัย โคกกรวด และ คุณแจ่มจันทร์ นักสิทธิ์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และต้นพันธุ์ในการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Aoyama, M. 1989. Karyomorphological studies in *Cymbidium* and its allied genera, Orchidaceae. Bulletin of the Hiroshima Botanical Garden 11: 1-121.

Chayamarit, K., R. Pooma and N. Pattharahirantricin. 2014. A Checklist of Plants in Thailand, Volume I. Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning, Bangkok. 238 p. (in Thai)

Chung, M.Y. and M.G. Chung. 2003. The breeding systems of *Cremastra appendiculata* and

Cymbidium goeringii: high levels of annual fruit failure in two self-compatible orchids. Annales Botanici Fennici 40: 81-85.

De, L.C., P. Pathak, A.N. Rao and P.K. Rajeevan. 2014. Commercial Orchids. De Gruyter Open Ltd., Warsaw. 322 p.

Deng, X., R. Mo, Y. Luo and M. Lin. 2009. The karyotype analysis of *Eulophia flava*. Journal of Fujian Forestry Science and Technology 4: 80-83.

Department of International Trade Promotion. 2019. Orchid fact sheet. (Online). Available: https://www.ditp.go.th/contents_attach/539560/539560.pdf (October 27, 2019). (in Thai)

Dressler, R.L. 1993. Phylogeny and Classification of the Orchid Family. Cambridge University Press, Cambridge. 314 p.

Felix, L.P. and M. Guerra. 2000. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid orchids. Genetics and Molecular Biology 23(4): 957-978.

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

Inpar, C. and N. Potapohn. 2009. Effects of temperature and storage period on pollinia viability percentage on *Dendrobium scabrilingue* Lindl., *D. anosmum* Lindl., *D. parishii* Rchb. f. and *D. peguanum* Lindl. Journal of Agriculture 25(2): 101-108. (in Thai)

Kauth, P. J., D. Dutra, T. R. Johnson, S. L. Stewart, M. E. Kane and W. Vendrame. 2008. Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. pp. 375-391. *In*: J. A. T. da Silva (ed.). Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues, Volume V. Global Science Books, Ltd., London.

Krasaechai, A. 1996. Flowering Crops Improvement. Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai. 271 p. (in Thai)

Lee, Y., C. Lu, M. Chung, E.C. Yeung and N. Lee. 2007. Developmental changes in endogenous abscisic acid concentrations and asymbiotic seed germination of a terrestrial orchid, *Calanthe tricarinata* Lindl. Journal of the American Society for Horticultural Science 132(2): 246-252.

Millner, H.J., A.R. McCrea and T.C. Baldwin. 2015. An investigation of self-incompatibility within the genus *Restrepia*. American Journal of Botany 102(3): 487-494.

Niu, S., J. Huang, Q. Xu, P. Li, H. Yang, Y. Zhang, G. Zhang, L. Chen, Y. Niu, Y. Luo and Z. Liu. 2018. Morphological type identification of self-incompatibility in *Dendrobium* and its phylogenetic evolution pattern. International Journal of Molecular Sciences 19(9): 2595, doi: 10.3390/ijms19092595.

Pintajam, P., C. Tiyayon and N. Potapohn. 2016. Interspecific and intergeneric crossabilities of *Eulophia macrobulbon* (Par. & Pchb. f.) Hook. f. and *E. spectabilis* (Dennst.) Suresh. Journal of Agriculture 32(3): 299-308. (in Thai)

Pintajam, P., W. Bundithya and N. Potapohn. 2018. Intraspecific and interspecific crossability of some *Eulophia* species. Maejo International Journal of Science and Technology 12(3): 241-250.

Piyatrakul, P. 2004. Factors influencing germination and seedling development of *Habenaria rhodocheila* Hance. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 171 p. (in Thai)

Rodjanawijid, S., P. Sornchai, D. Sumrittinun, N. Dechsangkranon, B. Kongsamai and S. Chanprame. 2016. The technique for pollinia separation and pollen germination test for certain *Dendrobium* cultivars. Agricultural Science Journal 47(3): 305-316. (in Thai)

Rungruang, C. 2001. Population variation of *Eulophia flava* (Lindl.) Hook.f. in Mae Ping National Park, Lamphun province. M.S. Thesis. Kasetsart University, Bangkok. 78 p. (in Thai)

Thammatha, P., S. Techawongstien and S. Techawongstien. 2016. Appropriate time of pollination on fruit set of pummelo cv. Manee Esan crossed with pummelo cv. Thong Dee. Songklanakarin Journal of Plant Science 3(Suppl. I): M01/31-36. (in Thai)

Thongsan, A. 2008. Characterization and hybridization of *Geodorum* spp. collected from Khun Mae Kwuang National Reserved Forest. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 174 p. (in Thai)

van der Cingel, N. A. 2001. An Atlas of Orchid Pollination: America, Africa, Asia and Australia. A. A. Balkema Publishers, Rotterdam. 296 p.

van der Kinderen, G. 1987. Abscisic acid in terrestrial orchid seeds: a possible impact on their germination. Lindleyana 2(2): 84-87.

Yamazaki, J. and K. Miyoshi. 2006. *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). Annals of Botany 98(6): 1197-1206.

Zhang, Y., Z. Zhao and Y. Xue. 2009. Roles of proteolysis in plant self-incompatibility. Annual Review of Plant Biology 60: 21-42.