ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและคุณภาพของแสง ต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรในหลอดทดลอง

Effects of Plant Growth Regulators and Light Quality on *In Vitro* Seed Germination of *Habenaria rhodocheila* Hance.

พฤกษ์ ล้อมวนวงศ์[1] เซอิจิ ฟูกาอิ[2] วีณัน บัณฑิตย์[1] และ ณัฐา โพธาภรณ์[1*]

Phruek Lomwanawong[1], Seiichi Fukai[2], Weenun Bundithya[1] and Nuttha Potapohn[1*]

[1]ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[1]Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[2]Division of Bioresource Production Science, Graduate School of Agriculture, Kagawa University, Kagawa 761-0795, Japan

**Corresponding author: Email: natorchid@gmail.com*

(Received: 18 November 2020; Accepted: 31 March 2021)

Abstract: *Habenaria rhodocheila* Hance. is one of the orchids which shows low seed germination even though culturing *in vitro*. The aim of this study was to improve seed germination of *H. rhodocheila*. Two sets of experiments were conducted. Firstly, the effect of pre - treatment on seeds with plant growth regulators at different concentrations using α - naphthaleneacetic acid (NAA), 6 - benzylaminopurine (BAP), and ethephon for 24 hours. After pre-treatment, the seeds were cultured on Malmgren modified terrestrial orchid medium (MM). The result showed that 0.1 mg L^{-1} NAA, 1.0 mg L^{-1} BAP, 10.0 mg L^{-1}, and 1000.0 mg L^{-1} ethephon significantly promoted seed germination compared with control (free - plant growth regulator) and other treatments. Secondly, light quality treatments, seeds were sown on Murashige and Skoog medium (MS) and they were kept under six different wavelengths of light including control (under darkness). After two months of culturing, the seeds under darkness, violet (405 nm), green (546 nm), and yellow (595 nm) lights showed significantly high total seed germination than far - red light.

Keywords: *Habenaria rhodocheila* Hance., seed germination, plant growth regulators, light quality

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

บทคัดย่อ: เมล็ดกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรมีอัตราการงอกต่ำ ถึงแม้ว่าจะนำมาเพาะในสภาพปลอดเชื้อ การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกร โดยทำการศึกษา 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองที่ 1 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการงอกของเมล็ด โดยแช่เมล็ดในสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ α-naphthaleneacetic acid (NAA), 6-benzylaminopurine (BAP) และ เอทธิฟอน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะบนอาหารสูตร Malmgren modified terrestrial orchid medium (MM) จากผลการทดลอง พบว่า การแช่เมล็ดในสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ เอทธิฟอน 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมอัตราการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต ชุดการทดลองที่แช่เมล็ดในสารละลาย NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ชุดการทดลองที่แช่เมล็ดในสารละลาย BAP ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร การทดลองที่ 2 ทำการทดสอบประสิทธิภาพของแสงต่อการงอกของเมล็ดโดยเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ภายใต้แสงที่มีความยาวคลื่นแตกต่างกัน 6 แบบ ที่ระดับ ความเข้มแสง 5.0 μmol m^{-2} s^{-1} และชุดควบคุม (สภาพมืด) ตลอดเวลา เมื่อผ่านไป 2 เดือน พบว่า เมล็ดที่เพาะไว้ในที่มืด แสงสีม่วง (405 นาโนเมตร) แสงสีเขียว (546 นาโนเมตร) และแสงสีเหลือง (595 นาโนเมตร) มีอัตราการงอกของเมล็ดที่สูงกว่าเมล็ดที่เพาะภายใต้แสงไกลแดง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ: กล้วยไม้ดินลิ้นมังกร การงอกของเมล็ด สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช คุณภาพของแสง

คำนำ

กล้วยไม้ดินสกุลลิ้นมังกร (*Habenaria*) อยู่ในวงศ์ Orchidaceae มีกระจายพันธุ์อยู่ในป่า เช่น ป่าเบญจพรรณ ป่าสนเขา และป่าไม้ไผ่ (Kurzweil, 2009) ในประเทศไทย เมียนมา กัมพูชา และ ลาว (Royal Botanical Gardens, Kew, 2017) มีกล้วยไม้ดินสกุลลิ้นมังกรชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถพบได้ในประเทศไทยเช่นกัน คือ กล้วยไม้ลิ้นมังกร (*Habenaria rhodocheila* Hance.) มีดอกสีชมพูจนถึงสีชมพูอมส้ม ได้รับความนิยมในบรรดาผู้ที่ชื่นชอบกล้วยไม้ดิน ในสภาพธรรมชาติกล้วยไม้ลิ้นมังกรมีจำนวนลดลงค่อนข้างมาก เนื่องจากเมล็ดงอกได้น้อย ถึงแม้จะมีการนำมาเพาะในสภาพปลอดเชื้อ ก็ยังมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ต่ำ ประมาณ 0.29 ถึง 5.48 % (Piyatrakul, 2004) สาเหตุที่เมล็ดกล้วยไม้งอกได้น้อยอาจจะมาจากเมล็ดมีคัพภะที่มีอาหารสะสมอยู่น้อยมาก ซึ่งในธรรมชาติเมล็ดกล้วยไม้จะสามารถงอกได้โดยการอาศัยเชื้อราไมคอร์ไรซาแบบจำเพาะ (Nigel and Dixon, 2009) ซึ่งพบในกล้วยไม้ชนิดอื่นเช่นกัน เช่น การศึกษาของ Batty *et al.* (2006) รายงานว่าฝักของกล้วยไม้ *Caladenia arenicola* มีจำนวนเมล็ดประมาณ 30,000 ± 2,000 เมล็ดต่อฝัก แต่สามารถงอกได้เพียง 1 % เท่านั้น

ที่ผ่านมามีงานวิจัยที่ทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ ผลการทดลอง พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดส่งเสริมการงอก แต่บางชนิดก็ยับยั้งการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ (Stewart, 2007) Miyoshi and Mii (1995) พบว่า การนำเมล็ดของกล้วยไม้ *Calanthe discolor* ไปแช่ในสารละลาย NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 7 วัน ทำให้เมล็ดงอกเพิ่มขึ้น 50 % ส่วนการแช่เมล็ดในเอทธิฟอน ที่ระดับความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างโปรโตคอร์ม Stewart and Kane (2006) รายงานว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต กลุ่มไซโทไคนิน (ไคเนติน ซีเอติน และ BAP) ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *Habenaria macroceratitis* และ Piyatrakul (2004) รายงานว่าการให้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ควบคู่กับ BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรได้

นอกจากสารควบคุมการเจริญเติบโตแล้ว อีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ คือ แสง ซึ่งผลของแสงต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ขึ้นอยู่กับชนิดของกล้วยไม้ด้วย เช่น เมล็ดของกล้วยไม้ประเภทรากอากาศต้องการแสงในการงอก ส่วนเมล็ดของกล้วยไม้ดินไม่ต้องการแสงในการงอก (Kauth *et al*., 2006) โดยมีรายงานว่าเมล็ดของกล้วยไม้ *Dactylorhiza majalis* (Rasmussen *et al*., 1990) *Calanthe* Satsuma (Fukai *et al.,* 1997) และ *H. macroceratitis* (Stewart, 2007) งอกได้ดีในที่มืด อย่างไรก็ตาม เมล็ดของกล้วยไม้ดินบางชนิดมีรายงานว่าต้องการแสงในการงอก เช่น กล้วยไม้ดินของออสเตรเลีย ต้องการแสงนาน 16 ชั่วโมงต่อวันในการงอก และเมล็ดกล้วยไม้ดินในเขตร้อนก็สามารถงอกได้ เมื่อได้รับแสงในสภาพวันปกติ (Rasmussen, 1995)

งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและผลของคุณภาพของแสงต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกร เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณต้นของกล้วยไม้ชนิดนี้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเตรียมเมล็ด

ใช้ฝักของกล้วยไม้ลิ้นมังกร (*H. rhodocheila*) ที่ได้จากการผสมตัวเองจำนวน 20 ฝัก เมื่อฝักอายุครบ 8 สัปดาห์ เก็บเกี่ยวและผึ่งฝักของกล้วยไม้ไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ประมาณ 2 สัปดาห์ เพื่อกำจัดชั้นเยื่อหุ้มเมล็ด (testa) ซึ่งเป็นเยื่อหุ้มซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้เมล็ดงอกช้า ซึ่งได้ทำการทดลองแล้วว่าการผึ่งฝักทิ้งไว้จนแห้งให้ความงอกที่ดีกว่าการนำฝักไปเพาะทันที หลังจากครบ 2 สัปดาห์แล้ว เปิดฝักนำเมล็ดกล้วยไม้ออกมาแล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียม-ไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ความเข้มข้น 10% นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นสะอาดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ครั้ง ผึ่งให้เมล็ดแห้ง โดยทั้งสองการทดลองใช้เมล็ดคนละชุดกัน

การศึกษาผลของควบคุมการเจริญเติบโตต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกร

นำเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรที่ได้รับการฆ่าเชื้อแล้วแช่ลงในสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ปลอดเชื้อโดยการนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อ ซึ่งมีชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ NAA (0.1,1.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) BAP (0.1,1.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) และเอทธิฟอน (10.0, 100.0 และ 1000.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำเมล็ดประมาณ 100 ถึง 300 เมล็ด ไปเพาะบนอาหารแข็งสูตร Malmgren modified terrestrial orchid medium (MM) (Phyto Technology Labolatory, KS, USA) ที่ใส่น้ำตาลซูโครส 3 % ในจานเพาะเชื้อขนาด 6 มิลลิเมตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในห้องที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซ็นต์ ที่ความเข้มแสง 31.5 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน

ผลของคุณภาพของแสงต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกร

นำเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรมาเพาะบนอาหารวุ้นสูตร Murashige and Skoog medium (MS) (Murashige and Skoog, 1962) ประมาณ 100 ถึง 300 เมล็ด ในจานเพาะเชื้อขนาด 6 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำจานเพาะไปวางไว้ในห้องเพาะเลี้ยง อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ให้แสงสว่างด้วย หลอด monochromatic LED ที่มีความยาวคลื่นแตกต่างกัน ได้แก่ แสงสีม่วง (405 nm) แสงสีคราม (451 nm) แสงสีเขียว (546 nm) แสงสีเหลือง (595 nm) แสงสีแดง (671 nm) แสงสีไกลแดง (774 nm) โดยให้แสงตลอดเวลา และสภาพมืด (ชุดควบคุม)

การวางแผนการทดลองและบันทึกผล

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) แต่ละการทดลองประกอบด้วย 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 จาน

เมื่อเมล็ดงอก คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอก และนำไปแปลงเป็นค่า arcsin และใช้โปรแกรม SPSS version 24.0 statistical software (IBM Corporation; Somers, NY) คำนวณสถิติ โดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$)

การทดลองผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการงอกของกล้วยไม้ลิ้นมังกร บันทึกผลการทดลอง

เมื่อเวลา 3 เดือนหลังเริ่มเพาะเมล็ด ส่วนผลของคุณภาพของแสงต่อการงอกของกล้วยไม้ลิ้นมังกร เก็บผลการทดลองหลังจากเพาะเมล็ด 2 เดือน เมื่อครบกำหนด นำเมล็ดที่เพาะมาตรวจสอบพัฒนาการของเมล็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Olympus, CX12i, Tokyo, Japan) ที่กำลังขยาย 100 เท่า โดยการนับเมล็ดทั้งหมดและเมล็ดที่งอก ซึ่งเมล็ดที่งอกแบ่งออกเป็น 3 ระยะการเจริญเติบโต ดังนี้ 1) ระยะ pre - protocorm คือ เมล็ดที่เริ่มบวม 2) ระยะ protocorm คือ เมล็ดที่พัฒนาไปเป็นโปรโตคอร์ม 3) ระยะ post - protocorm คือ เมล็ดที่พัฒนาไปเป็นต้นอ่อนที่มียอด (Figure 1)

เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด

เมื่อครบกำหนดระยะเวลาของการทดลอง นำเมล็ดมานับเพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์การงอกและศึกษาคุณภาพของการงอกโดยแยกเมล็ดที่งอกออกเป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะ pre - protocorm, ระยะ protocorm และ ระยะ post - protocorm (Figure 1)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกร

เมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรที่แช่ด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 3 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่แตกต่างกัน โดยเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรที่แช่ใน NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ เอทธิฟอน ที่ระดับความเข้มข้น 10.0 และ 1,000.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการงอกดีกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ พบว่า NAA ส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการสร้างโปรโตคอร์มในกล้วยไม้หลาย ๆ ชนิด เช่น Miyoshi and Mii (1995) รายงานว่า เมื่อแช่เมล็ดของกล้วยไม้ *C. discolor* ใน NAA ที่ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้น 1 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้มากกว่า 50 % แต่หากแช่ด้วยความเข้มข้นที่สูงขึ้นทำให้การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ชนิดนี้ลดลง

เมื่อพิจารณาระยะพัฒนาการของโปรโตคอร์ม พบว่า การนำเมล็ดมาแช่ใน NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นการสร้างโปรโตคอร์ม และโปรโตคอร์มสามารถพัฒนาไปเป็นระยะ post - protocorm ได้ดี แต่เมื่อแช่เมล็ดกล้วยไม้ใน NAA ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงกว่านี้กลับยับยั้งการพัฒนาไปเป็นโปรโตคอร์มและต้นอ่อนในระยะ post - protocorm โดยเฉพาะการแช่เมล็ดใน NAA ที่ระดับความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เมล็ดพัฒนาเพียงระยะ pre - protocorm เท่านั้น

สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP พบว่าสามารถส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้ โดยพบว่า BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร. เป็นระดับที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มการงอก มีจำนวนโปรโตคอร์มและต้นอ่อนในระยะ post - protocorm stage มากที่สุดเมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้น 0.1 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Shin *et al*. (2011) ที่รายงานว่า BAP ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการงอกของกล้วยไม้ *Calanthe* ลูกผสม ได้ดีกว่า

Figure 1. Developmental stages of *H. rhodocheila* seeds, A: swollen seed in pre - protocorm stage (arrow), B: protocorm stage (arrow), C: protocorm with shoot in post - protocorm stage, scale bar = 500 µm (A and C) and 2 mm (B)

Table 1. Effects of plant growth regulators on *in vitro* seed germination of *H. rhodocheila* at three months after culturing

Plant growth regulators	Concentration (mg L^{-1})	Pre - protocorm stage (%)[1]	Protocorm stage (%)[1]	Post - protocorm stage (%)[1]	Total (%)[1]
PGR free		0.68 ± 0.45 [b]	0.18 ± 0.18 [bc]	0.00 [d]	0.86 ± 0.45 [c]
NAA	0.1	2.90 ± 1.46 [ab]	6.82 ± 4.42 [a]	6.30 ± 3.78 [bc]	16.00 ± 2.65 [a]
	1.0	1.03 ± 1.03 [ab]	1.65 ± 1.65 [abc]	0.00 [d]	2.67 ± 2.67 [bc]
	10.0	0.41 ± 0.21 [c]	0.00 [c]	0.00 [d]	0.41 ± 0.21 [c]
BAP	0.1	0.98 ± 0.50 [ab]	0.21 ± 0.21 [bc]	0.00 [d]	1.19 ± 0.60 [c]
	1.0	4.69 ± 0.69 [a]	2.29 ± 1.11 [abc]	6.96 ± 1.88 [b]	13.60 ± 1.27 [a]
	10.0	1.05 ± 0.53 [ab]	0.27 ± 0.27 [bc]	2.47 ± 1.47 [bcd]	3.79 ± 2.13 [bc]
Ethephon	10.0	2.37 ± 1.20 [ab]	3.46 ± 1.02 [abc]	17.00 ± 5.23 [a]	22.90 ± 6.52 [a]
	100.0	0.59 ± 0.29 [b]	3.34 ± 1.66 [abc]	0.00 [d]	3.93 ± 1.48 [bc]
	1,000.0	1.28 ± 1.55 [ab]	7.25 ± 2.30 [a]	1.46 ± 0.56 [cd]	9.99 ± 3.10 [ab]
CV (%)		56.96	70.36	60.01	75.72

[1] Means ± SE within the same column follow by different letters showed significantly difference between treatments by Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$

ความเข้มข้นอื่น ๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการให้ระดับความเข้มข้นของ BAP ที่ค่อนข้างต่ำ ช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นสูง

เมื่อพิจารณาผลของเอทธิฟอน พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 10.0 และ 1,000.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรงอกได้ดี ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 10.0, 100.0 และ 1000.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนต้นอ่อนที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาในภาพรวม จะเห็นได้ว่า เอทธิฟอนที่ระดับความเข้มข้น 10.0 และ 1000.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้เมล็ดงอกได้ดี แต่ที่ระดับความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้เมล็ดพัฒนาไปเป็นต้นได้ดีที่สุด มีรายงานว่า เอทธิฟอนที่ระดับ 2 ถึง 8 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นการงอกในกล้วยไม้ *Galeola septentrionalis* (Nakamura *et al*., 1975) และเอทธิฟอนที่ระดับความเข้มข้น 1000.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างโปรโตคอร์มในกล้วยไม้ *C. discolor* (Miyoshi and Mii, 1995)

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การนำเมล็ดกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรไปแช่ในสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ NAA ที่ระดับ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP ที่ระดับ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เอทธิฟอนที่ระดับ 10.0 และ 1000.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้ดี โดยการใช้เอทธิฟอนที่ระดับ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นให้เกิดการพัฒนาไปจนถึงระดับ post - protocorm stage ได้ดีที่สุดอีกด้วย

ผลของคุณภาพของแสงต่อการงอกของกล้วยไม้ลิ้นมังกร

แสงมีผลต่อการงอกของกล้วยไม้ จากผลการศึกษา พบว่า เมล็ดของกล้วยไม้ลิ้นมังกรที่เพาะในสภาพมืด มีการงอกในภาพรวมที่ดีกว่า เมื่อเทียบกับแสงสีคราม (451 nm) และแสงไกลแดง (774 nm) ส่วนการเพาะเมล็ดในแสงสีม่วง (405 nm) สีเขียว (546 nm) สีเหลือง (595 nm) และสีแดง (671 nm) ก็มี

การงอกที่ดีเช่นกัน (Table 2) การเพาะเมล็ดภายใต้สภาพแสงที่มีความยาวคลื่นต่างกัน มีผลต่อพัฒนาการของเมล็ด

เมื่อครบ 2 เดือน เมล็ดที่เพาะเลี้ยงทั้งในสภาพมืด แสงสีม่วง แสงสีเขียว แสงสีเหลือง และแสงสีแดง พัฒนาไปเป็นโปรโตคอร์มได้ดี ทั้งนี้ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนหน้าหลายรายงาน เช่น การศึกษาของ Baque *et al*. (2011) ที่รายงานว่า เมล็ดของกล้วยไม้ *Calanthe* ลูกผสมสามารถงอกได้ทั้งที่มืดและที่มีแสงสว่าง แต่การเลี้ยงในสภาพที่มีแสงมีการงอกที่ดีกว่าการเลี้ยงในสภาพมืด ซึ่งสอดคล้องกับกรณีของเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรที่สามารถงอกได้ดีในที่มืดและแสงบางชนิด และ Dutra *et al*. (2009) ที่รายงานว่า เมล็ดของกล้วยไม้ *Cyrtopodium punctatum* งอกได้ดีในสภาพมืด (0/24 h L/D) เมื่อเทียบกับ การให้แสงที่ 16/8 h L/D Stewart (2007) ที่รายงานว่า กล้วยไม้ *H. macroceratitis* ต้องการความมืดในการงอก เช่นเดียวกันกับกล้วยไม้ *C.* Satsuma (Fukai *et al*., 1997) และ *D. majalis* (Rasmussen *et al*., 1990)

เมล็ดของกล้วยไม้ลิ้นมังกรที่เพาะไว้ในสภาพมืดและภายใต้แสงสีม่วง แสงสีเขียว แสงสีเหลือง และแสงสีแดง สามารถพัฒนาไปเข้าสู่ระยะ protocorm ได้ดีกว่าแสงสีคราม และแสงไกลแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Fukai *et al*. (1997) ที่รายงานว่า การเลี้ยงในสภาพแสงโดยเฉพาะแสงสีแดงช่วยพัฒนาการสร้างโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *C.* Satsuma

ในประเด็นของแสงที่มีผลต่อการงอกนี้ มีรายงานว่า ไฟโตโครมอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการงอก ซึ่งเมล็ดโดยทั่วไป แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ 1) positively photoblastic seed คือ เมล็ดที่ต้องการแสงในการงอก เช่น สลัด ยาสูบ และหญ้าต่าง ๆ 2) negatively photoblastic seed คือ เมล็ดที่ต้องการความมืดในการงอก เช่น มะเขือเทศ และหอมหัวใหญ่ และ 3) non - photoblastic seed คือ เมล็ดที่สามารถงอกได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีแสง (Bradbeer, 1988) ซึ่งไฟโตโครม มี 2 ประเภท ได้แก่ Pr คือไฟโตโครมในรูปที่ไม่ทำงาน และ Pfr คือไฟโตโครมในรูปที่ทำงาน ในพืชกลุ่มผักสลัด การเพาะเมล็ดสลัดภายใต้แสงสีแดงทำให้เมล็ดงอกได้ดีเพราะ ไฟโตโครมในกลุ่ม Pr จะดูดซับแสงสีแดง ที่ความยาวคลื่นประมาณ 600 ถึง 670 nm แล้ว Pr จะแปลงไปเป็นไฟโตโครมในรูป Pfr ทำให้เมล็ดสลัดงอกได้ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเมล็ดสลัดในแสงไกลแดง ที่ความยาวคลื่น 700 ถึง 730 nm ไฟโตโครม Pfr จะเปลี่ยนรูป

Table 2. Effects of light quality on seed germination of *H. rhodocheila* at two months after culturing

Wavelength (nm)	Color	Pre - protocorm stage (%)[ns]	Protocorm stage (%)[1]	Total (%)[1]
Darkness		6.56 ± 0.73	56.5 ± 6.38 [a]	63.1 ± 6.22 [a]
405	Violet	7.23 ± 3.98	40.3 ± 2.86 [ab]	47.5 ± 5.48 [abc]
451	Indigo	7.80 ± 0.53	31.2 ± 6.14 [bc]	39.0 ± 5.98 [cd]
546	Green	8.20 ± 4.44	41.9 ± 2.29 [ab]	50.1 ± 2.23 [abc]
595	Yellow	6.11 ± 2.26	52.6 ± 5.38 [a]	58.7 ± 6.59 [ab]
671	Red	3.65 ± 0.92	41.5 ± 2.51 [ab]	45.1 ± 2.71 [bc]
774	Far - red	2.96 ± 0.39	24.6 ± 5.43 [c]	27.6 ± 5.46 [d]
CV (%)		19.28	20.73	22.27

[1] Means ± SE within the same column follow by different letters showed significantly difference between treatments by Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$

[ns] Not significantly different

ไปเป็น Pr ที่เป็นสถานะที่ไม่ทำงาน ส่งผลให้เมล็ดของสลัดไม่งอก (Contreras *et al*., 2009) สำหรับเมล็ดประเภท negatively photoblastic seed นั้น ถ้าหากให้แสงไกลแดงจะส่งผลทำให้การงอกของเมล็ดลดลง แสดงให้เห็นว่า ไฟโตโครมมีผลต่อการงอกของเมล็ด ในเมล็ดที่แก่ปริมาณของไฟโตโครมในรูป Pfr จะหยุดสร้าง แล้วแปลงไปเป็นรูป Pr เมื่อได้รับแสงไกลแดง ซึ่งส่งผลให้เกิดการชะลอหรือยับยั้งการงอกของเมล็ด (Mohr and Schopfer, 1995) ซึ่งในการศึกษานี้พบว่า การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรภายใต้แสงไกลแดง ทำให้เมล็ดงอกน้อย เมื่อเทียบกับการเพาะเมล็ดภายใต้แสงสีแดง และจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า เมล็ดกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรมีความงอกค่อนข้างที่จะจำเพาะเจาะจงต่อความยาวคลื่นของแสง ในความมืดนั้นไม่มีความยาวคลื่นของแสง ในขณะที่แสงไกลแดงที่ใช้ในการทดลองมีความยาวคลื่นของแสงที่ 774 nm ซึ่งที่ความยาวคลื่นในระดับนี้อาจจะไม่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดินลิ้นมังกร ซึ่งคล้ายกับกรณีของเมล็ดสลัดในรายงานของ Contreras *et al*. (2009) ดังนั้นเมล็ดของกล้วยไม้ลิ้นมังกรจึงจัดเป็นเมล็ดประเภท negatively photoblastic seed

สำหรับแสงสีอื่น ๆ นั้นมีรายงานในกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ เช่น *C.* Satsuma งอกได้ดีในสภาพแสงสีแดง แต่งอกได้น้อยในสภาพแสงสีน้ำเงิน (Fukai *et al*., 1997) ส่วนเมล็ดของกล้วยไม้ *Cattleya walkeriana* งอกได้ดีเมื่อได้รับแสงสีแดง สีเหลือง และแสงสีม่วง แต่งอกได้น้อยเมื่อได้รับแสงสีเขียว (Islam *et al*., 1999) และกล้วยไม้ลิ้นมังกร งอกได้ดีหากได้รับแสงสีม่วง สีเขียวและสีเหลือง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ชนิดของกล้วยไม้ต้องการแสงที่แตกต่างกันในการงอก

อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองนี้ พบว่าเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรงอกได้ดีที่สุดในที่มืด ดังนั้นในการแนะนำการขยายพันธุ์ในเชิงพาณิชย์ การนำเมล็ดที่เพาะแล้วไปวางไว้ในที่มืดจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตลงมากกว่าการให้แสงสว่างจากหลอดไฟ

สรุป

การกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดินลิ้นมังกร สามารถทำได้โดยการนำเมล็ดไปแช่ในสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ระดับ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BAP ที่ระดับ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ เอทธิฟอน ที่ระดับ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนนำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MS ที่ใช้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 31.5 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ช่วยกระตุ้นให้เมล็ดงอกได้ดีขึ้น และการเพาะเมล็ดในที่มืดทำให้เมล็ดมีการงอกดีกว่าที่เพาะภายใต้แสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง

Baque, M.A., Y.K. Shin, T. Elshmari, E.J. Lee and K.Y. Paek. 2011. Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the micropropagation of *Calanthe* hybrids ('Bukduseong' × 'Hyesung' and 'Chunkwang' × 'Hyesung'). Australian Journal of Crop Science 5(10): 1247-1254.

Batty, A.L., M.C. Brundrett, K.W. Dixon and K. Sivasithamparam. 2006. New methods to improve symbiotic propagation of temperate terrestrial orchid seedlings from axenic culture to soil. Australian Journal of Botany 54(4): 367-374.

Bradbeer, J.W. 1988. Seed Dormancy and Germination. Blackie and Son Ltd., Glasgow. 145 p.

Contreras, S., M.A. Bennett, J.D. Metzger, D. Tay and H. Nerson. 2009. Red to far-red ratio during seed development affects lettuce seed germinability and longevity. HortScience 44(1): 130-134.

Dutra, D., M.E. Kane and L. Richardson. 2009. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium*

punctatum: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 96: 235-243.

Fukai, S., K. Fujiwara, K. Okamoto, A. Hasegawa and M. Goi. 1997. Effects of red and blue light on germination and protocorm growth of *Calanthe* Satsuma. Lindleyana 12(4): 169-171.

Islam, M.O., S. Matsui and S. Ichihashi. 1999. Effects of light quality on seed germination and seedling growth of *Cattleya* orchids *in vitro*. Journal of The Japanese Society for Horticultural Science 68(6): 1132-1138.

Kauth, P.J., W.A. Vendrame and M.E. Kane. 2006. *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 85: 91-102.

Kurzweil, H. 2009. The genus *Habenaria* (Orchidaceae) in Thailand. Thai Forest Bulletin (Special issue): 7-105.

Miyoshi, D. and M. Mii. 1995. Phytohormone pre-treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. Scientia Horticulturae 63: 263-267.

Mohr, H. and P. Schopfer. 1995. Plant Physiology. Springer-Verlag, Berlin. 629 p.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Nakamura, S.J., T. Uchida and M. Hamada. 1975. Atmospheric condition controlling the seed germination of an achlorophyllous orchid, *Galeola septentrionalis*. The Botanical Magazine 88: 103-109.

Nigel, D.S. and K.W. Dixon. 2009. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. Annals of Botany 104(3): 543-556.

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

Rasmussen, H.N. 1995. Terrestrial Orchids: From Seed to Mycotrophic Plant. Cambridge University Press, Cambridge. 444 p.

Rasmussen, H.N., T.F. Andersen and B. Johansen. 1990. Light stimulation and darkness requirement for the symbiotic germination of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) *in vitro*. Physiologia Plantarum 79: 226-230.

Royal Botanical Gardens, Kew. 2017. *Habenaria* willd. (Online). Available: http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:638021-1 (January, 28, 2018).

Shin, Y.K., M.A. Baque, S. Elghamedi, E.J. Lee and K.Y. Paek. 2011. Effects of activated charcoal, plant growth regulators and ultrasonic pre-treatments on *in vitro* germination and protocorm formation of *Calanthe* hybrids. Australian Journal of Crop Science 5(5): 582-588.

Stewart, S.L. 2007. Intergrated conservation of florida Orchidaceae in the genera *Habenaria* and *Spiranthes*: Model orchid conservation systems for the Americas. Ph.D. Thesis. University of Florida, Gainesville. 226 p.

Stewart, S.L. and M.E. Kane. 2006. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 86: 147-158.