

บทความวิจัย (Research Article)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เขาแพะ: กล้วยไม้หายาก

สุมนา เหลืองฐิติกาญจน์^{1*}, กนกอร ศรีม่วง², วาสนา พิทักษ์พล³***In vitro* culture of *Cleisostoma arietinum* for conservation: Rare orchid species**Sumana Leangthitikanjana^{1*}, Kanok-orn Srimuang², Wasna Pitakpol³¹ Department of Biotechnology, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao Province 56000² International Professional Training and Service in Agriculture and Food, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao Province 56000³ Department of Agriculture, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao Province 56000

* Correspondence to: tik_cab@hotmail.com

Naresuan Phayao J. 2019;12(1):13-15.

Received: 23 January 2019, Revised: 20 March 2019, Accepted: 26 March 2019

บทคัดย่อ

การศึกษามุ่งหมายทดลองเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เขาแพะเพื่อการขยายพันธุ์ ด้วยอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) หรือ VW (Vaccine and Went) ที่ไม่เติม/เติม BA (6-benzylaminopurine) ความเข้มข้นต่างๆ ผลการศึกษาพบว่า ชักนำเป็นต้นอ่อนด้วยอาหารสูตร VW เติมน้ำมะพร้าว ร่วมกับ BA หรือ kinetin ความเข้มข้นต่างๆ และชักนำให้เกิดรากด้วยอาหารสูตร VW เติมน้ำมะพร้าว ร่วมกับ NAA (1-naphthyl acetic acid) หรือ IBA [4-(indol-3-yl)butyric acid] ความเข้มข้นต่างๆ ต้นอ่อนย้ายลงปลูกกระถางได้ 4 สัปดาห์ พบอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 57.4

คำสำคัญ: กล้วยไม้เขาแพะ, เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, ในสภาพปลอดเชื้อ

Abstract

The study is aimed to perform tissue culture of the seed of *Cleisostoma arietinum* (Rchb.f.) Garay for propagation on MS (Murashige and Skoog) medium or VW (Vaccine and Went) medium without/with the various concentration of BA (6-benzylaminopurine). The result showed that the shoots were induced by VW medium supplemented with coconut water, and BA or kinetin, while the roots were convinced by the media with coconut water, and NAA (1-naphthyl acetic acid) or IBA [4-(indol-3-yl) butyric acid] at various concentrations. The plantlets were transplanted into the pots, and the survival rate was 57.4% after 4 weeks.

Keywords: *Cleisostoma arietinum*, tissue culture, in vitro

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

² ศูนย์ฝึกอบรมวิชาชีพและบริกรนานาชาติด้านเกษตรและอาหาร คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

³ สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

คำนำ

กล้วยไม้เขาแพะ (*Cleisotoma arietinum* (Rchb.f. Garay) เป็นกล้วยไม้ป่าที่พบอิงอาศัยขึ้นบนพื้นผิวดินไม้เจริญเติบโตได้ดีเมื่อสัมผัสแสงเต็มที่และความสูงระหว่าง 500 ถึง 600 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล ในอุณหภูมิช่วง 18 ถึง 22 องศาเซลเซียส ลำต้นเรียวยาว 8 ถึง 25 เซนติเมตร ห้อยลง 9 ถึง 10 เซนติเมตร ใบอวบน้ำยาวโค้ง ปลายมน ขนาดกว้าง 7 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อขนาด 6 ถึง 10 เซนติเมตร ขนาดดอก 0.6 เซนติเมตร ดอกสีม่วงจาง ขาว ออกดอกระหว่างมกราคมถึงพฤษภาคม [1]

กล้วยไม้พื้นเมืองไทยควรอนุรักษ์เนื่องจากมีปริมาณลดลงและใกล้สูญพันธุ์ การอนุรักษ์ด้วยการรวบรวมให้เจริญเติบโตเป็นพืชต้องใช้แรงงานมาก นอกจากนี้การออกและเจริญในสภาพธรรมชาติมีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำมาก ส่วนการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เป็นการอนุรักษ์ทั้งระยะปานกลางและระยะยาวเหมาะสำหรับเก็บสายพันธุ์มีค่าและหายากอันเกิดจากปัญหาสิ่งแวดล้อม [2-4] เป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับค่าใช้จ่ายต่อการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมระยะยาว ใช้ได้กับสายพันธุ์พืชจำนวนมาก คณะผู้วิจัยมุ่งหมายศึกษาวิธีการขยายพันธุ์กล้วยไม้เขาแพะโดยการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

วัสดุและวิธีการ

เก็บผักเขาแพะ ตัดส่วนของกลีบดอกแห้งและปลายเส้าเกสรออก หลังจากนั้นทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 และฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ร้อยละ 10 นาน 10 นาที ล้างน้ำกลั่น 2 ครั้ง จุ่มผักในแอลกอฮอล์ร้อยละ 90 ผ้าฝักเก็บเมล็ด

เพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS หรือ VW เติมน้ำ BA ความเข้มข้น 0, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในห้องที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 8 สัปดาห์ จำนวน 6 กรรมวิธีๆ ละ 4 ชำๆ ละ 1 ขวด บันทึกน้ำหนักโปรโตคอร์ม

ชักนำให้เกิดต้นอ่อน ใช้โปรโตคอร์มจำนวน 0.1 กรัม เลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติมน้ำมะพร้าว ความเข้มข้นร้อยละ 15 ร่วมกับ BA หรือ kinetin ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับสูตรอาหาร VW ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม:

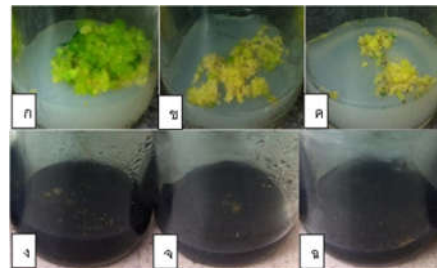
control) นาน 8 สัปดาห์ จำนวน 7 กรรมวิธีๆ 4 ชำๆ ละ 1 ขวด บันทึกจำนวนต้น และความสูงของต้น จากนั้นชักนำให้เกิดราก เลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตร VW เติมน้ำมะพร้าว ความเข้มข้นร้อยละ 15 ร่วมกับ NAA หรือ IBA ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารสูตร VW ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงในสภาวะเช่นเดียวกัน จำนวน 7 ๆ ละ 4 ชำๆ ละ 1 ขวด

หลังจากได้ต้นอ่อนกล้วยไม้เขาแพะที่สมบูรณ์ ย้ายต้นกล้าออกปลูก นามาล้างวัน แห่สารป้องกันเชื้อรา และแบคทีเรีย 3 ถึง 5 นาที นำออกฝังในภาชนะนาน 1 สัปดาห์ ก่อนย้ายลงกระถางบรรจุขุยมะพร้าว ดูแลต้นกล้าในโรงเรือนจนเจริญเต็มที่ และบันทึกการรอดชีวิตของต้นกล้าภายหลังย้ายปลูก 4 สัปดาห์

โดยการศึกษาในแต่ละขั้นตอนทำการวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี analysis of variance และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

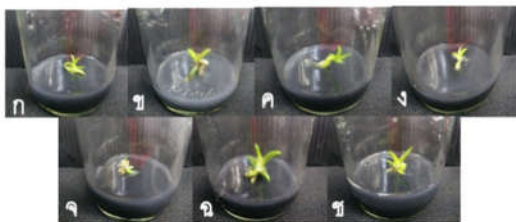
ผลการศึกษา

เมล็ดกล้วยไม้เขาแพะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ไม่เติมน้ำ BA ชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มดีที่สุด มีน้ำหนักเฉลี่ย 3.4 กรัม ส่วนอาหารสูตร MS เติมน้ำ BA ความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้โปรโตคอร์มน้ำหนักเฉลี่ย 0.88 และ 0.94 กรัม ตามลำดับ สำหรับสูตรอาหาร VW ที่เติม/ไม่เติมน้ำ BA ไม่พบการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม **รูป 1**



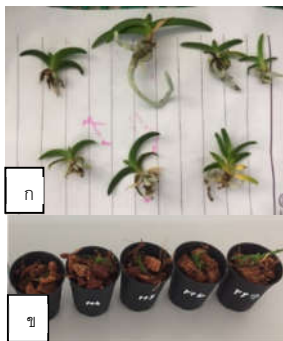
รูป 1 เมล็ดกล้วยไม้เขาแพะเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร (ก) MS ไม่เติมน้ำ BA (ข) MS เติมน้ำ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) MS เติมน้ำ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) VW ที่ไม่เติมน้ำ BA (จ) VW เติมน้ำ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (ฉ) VW เติมน้ำ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

การชักนำให้เกิดต้นออกจากโปรโตคอร์มอาหารสูตร VW เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนต้นเฉลี่ย 4 ต้น ความสูงเฉลี่ย 1.6 เซนติเมตร และการชักนำให้เกิดรากอาหารสูตร VW เติม NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีรากยาวเฉลี่ยมากที่สุด 1.9 เซนติเมตร **รูป 2**



รูป 2 ชักนำต้นอ่อนให้เกิดรากด้วยสูตรอาหาร (ก) VW (ข)

VW เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) เติม NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) VW เติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ) VW เติม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฉ) VW เติม IBA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช) VW เติม IBA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูป 3 (ก) ต้นอ่อนอายุ 2 เดือน (ข) ต้นอ่อนลงกระถางนาน 4 สัปดาห์

ภายหลังการย้ายกล้วยไม้เขาแพะที่มีอายุ 2 เดือน ออกปลูกในกระถางเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 57.4 ต้นอ่อนกล้วยไม้เขาแพะมีการเจริญเติบโตดีทั้งทางลำต้นและราก และมีการแตกของใบใหม่เกิดขึ้น **รูป 3**

วิจารณ์

การทดลองนี้เป็นการศึกษานำร่องการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เขาแพะในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อนำต้นอ่อนปลูกสู่สภาพธรรมชาติพบอัตราการอยู่รอดปานกลาง ขณะที่อัตราการงอกตามธรรมชาติต่ำและการงอกของเมล็ดต้องอาศัยเชื้อรา Mycorrhiza ส่งเสริมการพัฒนาและเจริญเติบโต [5-6] อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อต่อเนื่องมีข้อเสียได้แก่ ความเสี่ยงสูงต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมได้ เพื่อเป็นการลดข้อจำกัดดังกล่าว อาจมีการใช้วิธีการอื่นร่วมด้วยเพื่อช่วยในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช เช่น การเก็บรักษาพันธุ์พืชด้วยวิธี encapsulated-dehydration วิธีนี้สามารถเก็บรักษาพันธุกรรมพืชได้เป็นระยะเวลานานและมีความเสี่ยงต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมต่ำ [4]

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยพะเยา และงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยพะเยา ประจำปี 2559 สัญญาเลขที่ RD 59020 ในการสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. *Cleisotoma arietinum* (Rchb.f.) Garay. Available from: <https://www.orchidcambodia.com/cleisostoma-arietinum.html>
2. Distabanjong K, Distabanjong C, Ruengwiset B. *In vitro* propagation and conservation of *Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl.). Bangkok: Proceedings of 48th Kasetsart University Annual Conference; 2010:571-578.
3. Panis B, Lambardi M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). Proceedings of the Role of Biotechnology. Italy: Villa Gualino; 2005:43-54.
4. Hirano T, Godo T, Mii M, Ishikawa K. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. Plant Cell Rep. 2005;23:534-539.
5. Maneerattanarungroj P, Bunnag S, Monthatong M. *In vitro* conservation of *Cleisostoma areitinum* (Rchb.f.) garay, rare Thai orchid species by an encapsulation-dehydration method. Asian J Plant Sci. 2007;6:1235-1240.

6. Sungkumlong, Deb CR. Effects of different factors on immature embryo culture, PLBs differentiation and rapid mass multiplication of *Coelogyne suaveolens* (Lindl.) Hook. Indian J Exp Biol. 2008;46:243-248.