การขยายพันธุ์กล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิดในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อการอนุรักษ์อย่างยั่งยืนในจังหวัดร้อยเอ็ด

In Vitro Mass Propagation of Wild Orchid, *Aerides odorata* Lour. for Sustainable Conservation at Roi Et Province

จตุพร หงส์ทองคำ,[1*] สุฑารัตน์ คนขยัน,[1] สุรชัย รัตนสุข[1] และ รชยา พรมวงศ์[1]

Jatuporn Hongthongkham,[1*] Sutarat Khonkayan,[1] Surachai Rattanasuk[1] and Rachaya Promwong[1]

ABSTRACT

Aerides odorata Lour. is a popular wild orchid often taken out from the forest for an ornamental plant. From the situation, the population of this orchid is decreasing continuously and it is at risk of extinction. *In vitro* culture is the suitable method for rapid mass multiplication for sustainable conservation of orchid. Hence, the aims of the present study were to investigate the suitable medium for seed germination and the suitable concentration of plant growth regulators on protocorm regeneration of *A. odorata*. The results indicated that the suitable medium for seed germination was modified NDM medium supplemented with 1% (w/v) sucrose and 1% (w/v) potato extract. The orchid seeds cultured on the modified NDM medium showed seed germination at 100%. The suitable medium and concentration of plant growth regulators on protocorm regeneration was NDM medium supplemented with 1 mg/l NAA and 3 mg/l Kn which showed the highest average number of shoots at 4.73 shoots per protocorm. An average plantlet height at 5.67 mm and number of roots at 3.80 roots per plantlet were obtained from this medium. The complete plants were transferred to the greenhouse and showed 100% survival after 4 weeks of culture.

Keywords: *Aerides odorata* Lour., *In vitro* mass propagation, Conservation

บทคัดย่อ

กล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิด (*Aerides odorata* Lour.) เป็นกล้วยไม้ที่นิยมนำออกมาจากป่าเพื่อปลูกเป็นไม้ประดับตกแต่งอาคารบ้านเรือน ทำให้กล้วยไม้ชนิดนี้ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์จากธรรมชาติ การเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อจึงเป็นวิธีที่สามารถขยายพันธุ์กล้วยไม้ให้ได้ต้นเป็นจำนวนมากเพื่อเป็นการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้อย่างยั่งยืนต่อไป วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้คือศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญเป็นต้นของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิด ผลการศึกษาพบว่า อาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้คืออาหารสูตร NDM ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) โดยเมล็ดกล้วยไม้มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดคือ 100% ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญเป็นต้นของโปรโตคอร์ม พบว่า อาหาร NDM ที่เติม NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ Kn 3 มก./ล. สามารถชักนำให้

[1*]คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด จ.ร้อยเอ็ด 45120

Faculty of Liberal Arts and Science, Roi Et Rajabhat University, Roi Et 45120, Thailand.

*Corresponding author: Tel. 08-9843-3721, E-mail address: jatuporn_h@hotmail.com

โปรโตคอร์มเกิดยอดเฉลี่ยสูงสุดคือ 4.73 ยอดต่อโปรโตคอร์ม ต้นอ่อนมีความสูงเฉลี่ย 5.67 มม. และมีจำนวนรากเฉลี่ย 3.80 รากต่อต้น เมื่อนำต้นกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิดที่เจริญเต็มที่ออกปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่าต้นกล้วยไม้สามารถเจริญได้ตามปกติโดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% ภายหลังจากปลูกเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

คำสำคัญ: กุหลาบกระเป๋าปิด การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ การอนุรักษ์

คำนำ

ประเทศไทยเป็นอีกประเทศหนึ่งในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่ยังคงความอุดมสมบูรณ์ไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติ และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชหลากหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชในวงศ์กล้วยไม้ (Orchidaceae) ซึ่งประเทศไทยนับว่าเป็นแหล่งแพร่กระจายพันธุ์และมีความหลากหลายทางด้านชนิดพันธุ์ (species orchids) ของกล้วยไม้และยังเป็นแหล่งพันธุกรรมของกล้วยไม้ที่สำคัญหลากหลายชนิด ดังจะเห็นได้จากรายงานการค้นพบกล้วยไม้สายพันธุ์พื้นเมืองที่มีแหล่งแพร่กระจายพันธุ์ในประเทศไทยมากถึง 1,125 ชนิด จำนวน 177 สกุล (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2543) นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบกล้วยไม้ชนิดใหม่เพิ่มขึ้นอีกอย่างต่อเนื่อง

ปัจจุบัน ปัญหาการบุกรุกถางป่าเพื่อขยายพื้นที่การเกษตร ในบริเวณที่เป็นพื้นที่ป่าอนุรักษ์ตามเขตป่าสงวนแห่งชาติ และ/หรืออุทยานแห่งชาติต่างๆ ทั่วประเทศไทย รวมถึงการลักลอบนำกล้วยไม้ป่าออกมาจากป่าตามธรรมชาติเพื่อจำหน่าย หรือทำการค้าที่ผิดกฎหมายทั้งภายในประเทศหรือส่งออกไปยังต่างประเทศ ส่งผลให้ประชากรกล้วยไม้ป่าในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็ว (สลิล, 2550) ทำให้กล้วยไม้ป่าที่มีคุณค่าของไทยหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไป และยังมีอีกหลายชนิดที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ สำหรับในพื้นที่ในเขตป่าชุมชน จังหวัดร้อยเอ็ด พบการกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิด (*Aerides odorata*) อยู่เป็นจำนวนน้อย และยังเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในธรรมชาติ เนื่องจากลักษณะของดอกที่มีกลิ่นหอม และมีความสวยงามสะดุดตา จึงทำให้กล้วยไม้ชนิดนี้ถูกนำออกมาจากป่าเพื่อประดับตามบ้านเรือน ทำให้ประชากรกล้วยไม้ในธรรมชาติลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นทางหนึ่งที่จะช่วยอนุรักษ์และคุ้มครองพันธุ์กล้วยไม้ให้คงอยู่ได้ คือการใช้เทคโนโลยีช่วยในการขยายพันธุ์กล้วยไม้เพื่อให้ได้ต้นเป็นจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว และนำกลับไปปลูกคืนสู่ป่าเพื่อเป็นการอนุรักษ์อย่างยั่งยืนต่อไป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) หรือการเพาะเลี้ยงในสภาพหลอดแก้ว (*in vitro* culture) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการอนุรักษ์พันธุ์พืชในสภาพนอกแหล่งกำเนิด (*ex situ* conservation) และยังเป็นการรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ไว้โดยที่ไม่ต้องนำต้นกล้วยไม้ออกมาจากป่าธรรมชาติ นอกจากนี้ยังสามารถขยายพันธุ์กล้วยไม้ได้ปริมาณมากภายในระยะเวลาอันสั้น รวมทั้งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ของการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ที่ตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคได้อีกทางหนึ่งด้วย (ดรรชิต, 2550) สำหรับกล้วยไม้กุหลาบ (*Aerides*) พบว่ามีรายงานถึงความสำเร็จของการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาใช้ในการขยายพันธุ์เพื่อให้ได้ปริมาณมากโดยใช้ส่วนต่างๆ ของพืชมาเพาะเลี้ยง เช่น ใบอ่อน (Murthy and Pyati, 2001) ปลายยอด (Malabadi *et al.*, 2009; Devi *et al.*, 2013) เมล็ดและโปรโตคอร์ม (Parab and Krishnan, 2012: Ramasoot *et al.*, 2015) เป็นต้น มาก และสามารถเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติได้ เพื่อเป็นการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ป่ากุหลาบ

กระเป๋าปิดในพื้นที่ป่าชุมชน จังหวัดร้อยเอ็ดอย่างยั่งยืนต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดและศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญและพัฒนาของกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิด

อุปกรณ์และวิธีการ

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิด

นำฝักกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิด (อายุฝัก 6 เดือน) ที่เก็บได้จากเขตป่าชุมชน จังหวัดร้อยเอ็ด (ฝักมีสีเขียวอมเหลือง) มาทำความสะอาดด้วยน้ำผสมผงซักฟอก ตามด้วยน้ำสะอาด จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของฝัก โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ ความเข้มข้น 1% ที่เติม tween 20 จำนวน 2 หยด เขย่าเป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ผ่าฝักกล้วยไม้ออก และเคาะเมล็ดกล้วยไม้ลงบนอาหารสูตรต่างๆ ได้แก่ Vacin and Went (VW) (1949) ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 2% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) Murashige and Skoog (MS) (1962) ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% (w/v) และน้ำมะพร้าว 15% (v/v) และ New Dogashima Medium (NDM) (Tokuhara and Mii, 1993) ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) แต่ละสูตรทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 10 ขวด เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ Kinetin (Kn) ต่อการเจริญเป็นต้นของกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิด

เพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิด บนอาหารสูตร NDM ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มก./ล. ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มก./ล. เป็นเวลา 90 วัน ภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ แต่ละสูตรทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 15 โปรโตคอร์ม บันทึกผลโดยนับจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นต่อโปรโตคอร์ม ความสูงต้น และนับจำนวนรากต่อต้น วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) และสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์หาความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 22

ศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้ากล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดหลังออกจากขวดเพาะเลี้ยง

นำต้นอ่อนกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติเป็นเวลา 9-10 เดือน ออกจากขวดเพาะเลี้ยง ล้างวุ้นที่ติดอยู่บริเวณส่วนรากออก และปลูกในกระถางพลาสติกที่ใส่กาบมะพร้าวปลูกเลี้ยงในสภาพโรงเรือน ที่มีความเข้มแสง 20% ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 25 ต้น เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้ากล้วยไม้

ผลการทดลอง

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิด

จากการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิดบนอาหารสูตร VW ดัดแปลง MS ดัดแปลง และ NDM ดัดแปลง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้คือ อาหารสูตร NDM ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดคือ 100% เมล็ดที่งอกจะเจริญเป็นโปรโตคอร์มและมีรูปร่างค่อนข้างกลมและมีสีเขียว (Figure 1B) ขณะที่อาหารสูตร MS ดัดแปลง และ VW ดัดแปลง มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 80 และ 20% ตามลำดับ (Figure 1A)

ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ Kinetin (Kn) ต่อการเจริญเป็นต้นของกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิด

เมื่อนำโปรโตคอร์มกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NDM ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0-1 มก./ล. ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0-5 มก./ล. เป็นเวลา 90 วัน พบว่า การเติม NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ Kn 3 มก./ล. สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มเกิดยอดได้สูงสุดเฉลี่ย 4.73 ยอดต่อโปรโตคอร์ม เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.20 ยอดต่อ โปรโตคอร์ม นอกจากนี้ยังพบว่าต้นอ่อนกล้วยไม้มีจำนวนรากต่อต้น และมีความสูงมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มบนอาหารที่เติม NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ Kn 3 มก./ล. โดยต้นอ่อนมีจำนวนรากเฉลี่ย 3.80 รากต่อต้น และมีความสูงเฉลี่ย 5.67 มม. (Table 1 and Figure 2)

ศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้ากล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดหลังออกจากขวดเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิดบนอาหารสูตร NDM ที่เติม NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ Kn 3 มก./ล. โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ สองเดือน เพื่อให้ต้นกล้วยไม้สามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ (Figure 3A) จากนั้นย้ายต้นที่มีใบประมาณ 3-4 ใบ และมีรากแข็งแรง สมบูรณ์ (อายุ 9-10 เดือน) ไปปลูกในกระถางที่มีกาบมะพร้าว พบว่าต้นกล้วยไม้มีอัตราการรอดชีวิต 100% ภายหลังจากนำออกปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (Figure 3B)

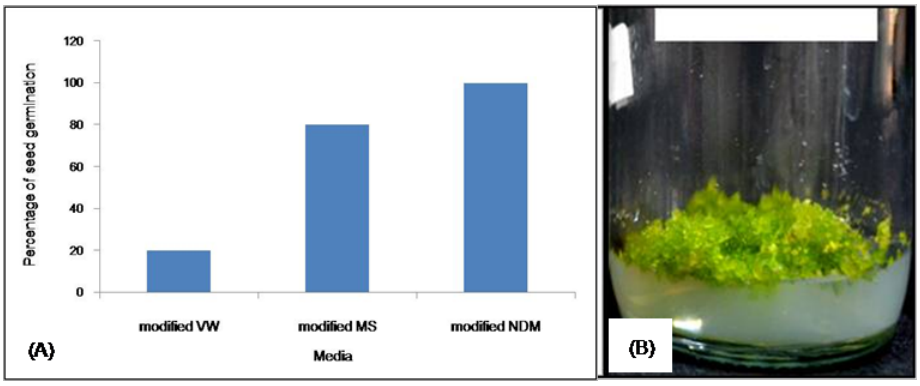

Figure 1 Seed germination and protocorm development of *Aerides odorata* ; (A) Seed germination percentage on different media. (B) Protocorm development on modified NDM medium supplemented with 1% (w/v) sucrose and 1% (w/v) potato extract after 4 weeks of culture.

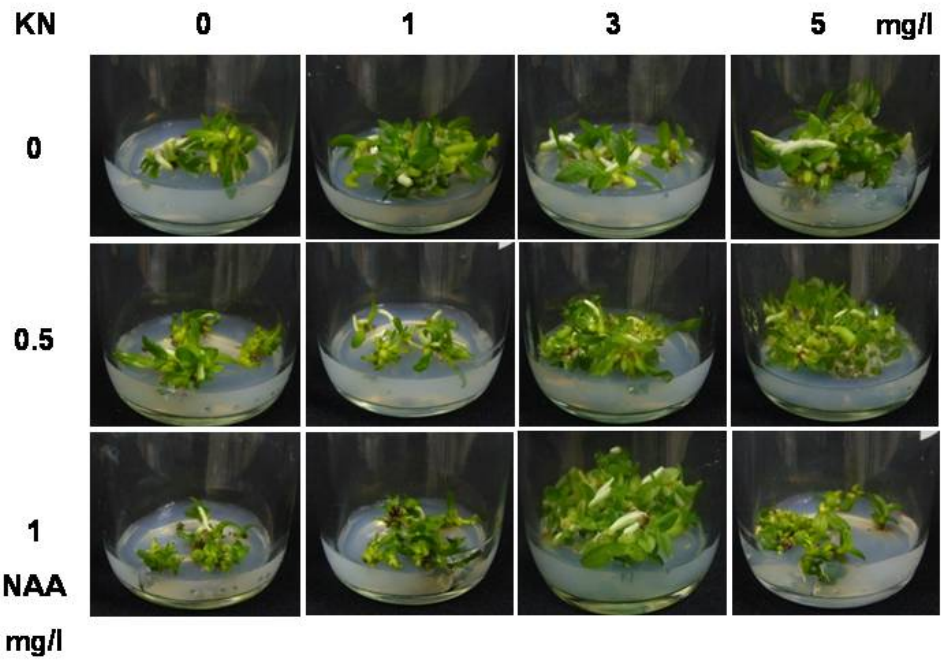

Figure 2 Protocorm regeneration of *Aerides odorata* on NDM medium supplemented with various concentrations of NAA and Kn for 90 days.

Table 1 Effects of growth regulators NAA and Kn on average number of shoots per protocorm, average number of roots per shoot and plantlet height of *Aerides odorata* for 90 days of culture.

Growth Regulators (mg/l)		Average number of shoots per protocorm	Average number of roots per shoot	Plantlet height (mm)
NAA	KN			
0	0	2.20 ± 0.14^{fg}	1.27 ± 0.22^{e}	1.87 ± 0.13^{g}
0	1	3.53 ± 0.13^{cd}	1.80 ± 0.14^{d}	3.93 ± 0.11^{e}
0	3	3.27 ± 0.11^{d}	2.27 ± 0.11^{c}	4.40 ± 0.13^{d}
0	5	4.20 ± 0.20^{b}	2.13 ± 0.09^{cd}	3.40 ± 0.16^{f}
0.5	0	1.87 ± 0.09^{g}	2.40 ± 0.13^{c}	3.47 ± 0.19^{f}
0.5	1	3.53 ± 0.13^{cd}	3.00 ± 0.16^{b}	4.87 ± 0.13^{c}
0.5	3	3.93 ± 0.11^{bc}	3.13 ± 0.16^{b}	5.20 ± 0.22^{abc}
0.5	5	3.80 ± 0.10^{c}	3.27 ± 0.15^{b}	5.40 ± 0.13^{ab}
1	0	2.13 ± 0.09^{fg}	2.93 ± 0.06^{b}	5.13 ± 0.21^{bc}
1	1	2.40 ± 0.13^{ef}	3.13 ± 0.19^{b}	5.33 ± 0.21^{abc}
1	3	4.73 ± 0.18^{a}	3.80 ± 0.10^{a}	5.67 ± 0.12^{a}
1	5	2.73 ± 0.11^{e}	3.33 ± 0.18^{b}	5.07 ± 0.11^{bc}
Significant		*	*	*

Note: Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to Duncan's multiple range tests at 95%.

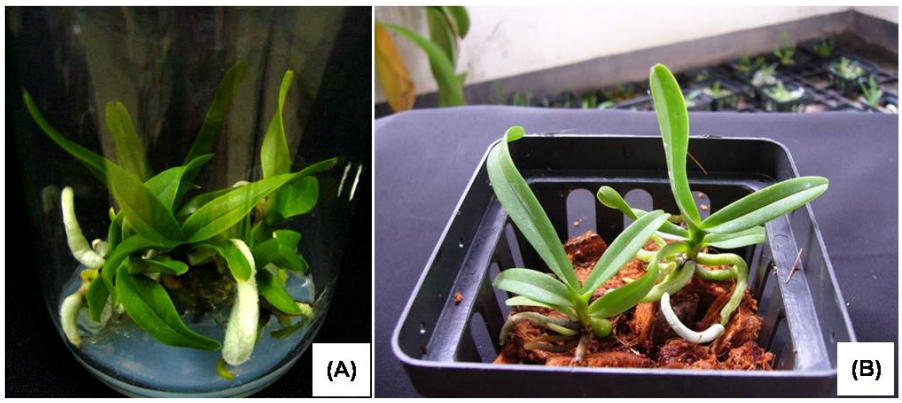

Figure 3 Seedling developments of *Aerides odorata* (A) *A. odorata* cultured on NDM medium supplemented with 1 mg/l NAA and 3 mg/l Kn for 9 months. (B) *A. odorata* transferred to pot in the greenhouse for 4 weeks.

วิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมให้เกิดการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อคือ อายุของฝักกล้วยไม้ที่เหมาะสม หากนำฝักกล้วยไม้ที่อ่อนเกินไปอาจส่งผลให้เมล็ดกล้วยไม้ไม่เกิดการงอกหรือเกิดการงอกช้า ในขณะที่หากนำฝักกล้วยไม้ที่แก่จนเกินไปเมล็ดกล้วยไม้อาจไม่งอก หรืออาจทำให้ฝักกล้วยไม้แตกได้ในขณะที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้นำฝักกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิดที่มีอายุ 6 เดือน สีของฝักมีสีเขียวอมเหลือง เมล็ดภายในฝักจะร่วนสามารถเขี่ยออกจากฝักได้ง่าย ลักษณะเช่นนี้จะทำให้เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกได้ดีและรวดเร็ว สอดคล้องกับการศึกษาของ Zeng *et al.* (2012) ที่รายงานว่าอายุฝักกล้วยไม้ที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ส่งผลต่อความสมบูรณ์และการพัฒนาของเอ็มบริโอได้ นอกจากนี้การใช้อาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพให้เมล็ดกล้วยไม้มีการงอกสูงและสามารถเจริญเป็นโปรโตคอร์มได้รวดเร็วอีกด้วย ถึงแม้ว่าภายในฝักกล้วยไม้จะมีเมล็ดอยู่เป็นจำนวนมาก แต่เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดที่เล็กและไม่มีอาหารสะสม (Dressler, 1993) ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้บนอาหารที่มีปริมาณธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองที่เหมาะสมจะส่งผลต่ออัตราการงอก และการเจริญของเมล็ดกล้วยไม้ได้ นอกจากนี้สารประกอบธรรมชาติจากพืชบางชนิด เช่น น้ำมะพร้าว น้ำต้มมันฝรั่ง น้ำมะเขือเทศ ฯลฯ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของเมล็ดได้ (Islam *et al.*, 2000 : Islam *et al.*, 2011 : Shekarriz *et al.*, 2014) โดยเฉพาะในกล้วยไม้ที่มีอัตราการงอกต่ำ เช่น สกุล *Phalaenopsis* สกุล *Vanda* และสกุล *Aerides* ซึ่งพบว่าการเติมน้ำต้มมันฝรั่งลงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถช่วยกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้ (George, 1996)

ในการชักนำให้โปรโตคอร์มกล้วยไม้ป่ากุหลาบประเป๋าปิดเจริญเป็นต้น พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ Kn 3 มก./ล. สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มเจริญเป็นต้นได้สูงสุด โดยมี

จำนวนยอดเฉลี่ย 4.73 ยอดต่อโปรโตคอร์ม ต้นอ่อนมีความสูงเฉลี่ย 5.67 มม. และมีจำนวนรากเฉลี่ย 3.80 รากต่อต้น ซึ่ง Jainol and Gansau (2016) ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของไซโตไคนิน 2 ชนิด คือ BAP และ kinetin (Kn) ต่อการเพิ่มจำนวนยอดของกล้วยไม้ *Dimorphorchis lowii* พบว่า ปลายยอดกล้วยไม้ที่วางเลี้ยงตามแนวนอนมีการตอบสนองต่อ Kn ความเข้มข้น 2 มก./ล. ได้ดีกว่า BAP ความเข้มข้น 0.5-4.0 มก./ล. ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Kn สามารถเคลื่อนที่ภายในเนื้อเยื่อของกล้วยไม้ *D. lowii* ได้ดีกว่า BAP จึงทำให้ไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างยอดได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Martin *et al.* (2005) พบว่า การใช้ Kn ความเข้มข้น 6.97 µM สามารถเพิ่มจำนวนยอดของกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมได้สูงถึง 5.4 ยอด และในการเพิ่มจำนวนยอดของกล้วยไม้ *Dendrobium nobile* พบว่า ยอดกล้วยไม้มีความยาวสูงที่สุด 4.19 ซม. เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Kn 1.5 มก./ล. (Asghar *et al.*, 2011) ซึ่ง Kinetin เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินมีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ ขยายขนาดของเซลล์ และทำลายผลของการข่มของตายอด (apical dominance) จึงทำให้เกิดการเจริญของตาข้าง นอกจากนี้หากมีการใช้ร่วมกับสารในกลุ่มออกซินในสัดส่วนไซโตไคนินสูงต่อออกซินต่ำจะทำให้เนื้อเยื่อกล้วยไม้มีการเจริญและพัฒนาเป็นต้นได้ สอดคล้องกับ Deepti *et al.* (2013) รายงานว่า โปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Aerides maculosum* สามารถเจริญเป็นต้นได้ภายในเวลา 65-72 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BAP 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล. นอกจากนี้ Goswami *et al.* (2015) รายงานว่า การเติม BAP 0.5-5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5-5 มก./ล. สามารถชักนำให้ PLBs จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Dendrobium* sp. เจริญเป็นต้นได้ อย่างไรก็ตามการเลือกใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตและปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของกล้วยไม้ ชิ้นส่วนพืชและจุดประสงค์ของงานวิจัย ดังนั้นการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเจริญเป็นต้น

การนำต้นกล้วยไม้ออกจากขวดเพื่อปลูกเลี้ยงภายนอกสภาพธรรมชาติ ควรคำนึงถึงถิ่นที่อยู่อาศัยเดิมเดิมของกล้วยไม้เป็นหลัก ดังนั้นในการย้ายต้นกล้วยไม้ออกจากห้องปฏิบัติการจะต้องอนุบาลต้นกล้าภายนอกสภาพธรรมชาติสักระยะหนึ่งเพื่อให้ต้นกล้ามีการเจริญเติบโตเต็มที่ จากนั้นจึงนำปล่อยคืนสู่ป่าธรรมชาติต่อไปได้

สรุปผลการทดลอง

อาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิดคือ อาหารสูตร NDM ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) โดยเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ การงอกสูงสุดคือ 100% และอาหารสูตร NDM ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 3 มก./ล. สามารถชักนำให้ โปรโตคอร์มกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิดเกิดยอดได้สูงสุด 4.73 ยอดต่อโปรโตคอร์ม มีจำนวนรากต่อต้นมากที่สุดคือ 3.80 ราก และต้นอ่อนมีความสูงที่สุดเท่ากับ 5.67 มม.

ผลการทดลองในครั้งนี้สามารถเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิดให้มีจำนวนมากขึ้น ภายหลังจากอนุบาลต้นกล้ากล้วยไม้ภายนอกธรรมชาติเป็นระยะเวลาหนึ่งจะนำปล่อยคืนสู่ป่าธรรมชาติ เพื่อเป็นการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ป่ากุหลาบกระเป๋าปิดไม่ให้สูญพันธุ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

ครรชิต ธรรมศิริ. 2550. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่งจำกัด, กรุงเทพฯ. 283 หน้า.

สลิล สิทธิสัจจธรรม. 2550. กล้วยไม้ป่าเมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ. 495 หน้า.

องค์การสวนพฤกษศาสตร์ สำนักนายกรัฐมนตรี. 2543. สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม 6: กล้วยไม้ไทย. โอเอพริ้นติ้งเฮาส์, เชียงใหม่. 291 หน้า.

Asghar, S., T. Ahmad, I. A. Hafiz, and M. Yaseen. 2011. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. Afr. J. Biotechnol. 10(16): 3097-3103.

Deepti, S., M. C. Gayatri, and S. Sitikantha. 2013. *In vitro* seed germination as an aid to conserve *Aerides maculosum* Lindl., an endemic and endangered orchid of western ghats, India. International J. Pharma. Bio. Sci. 4(2): 478-486.

Devi, H.S., S.I. Devi and T.D. Singh. 2013. High frequency plant regeneration system of *Aerides odorata* Lour. Through foliar and shoot tip culture. Not Bot Horti Agrobo. 41(1): 169-176.

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

George, E. F. 1996. Plant propagation by tissue culture part 2: in practice. 2nd rev. ed. Exegetics Limited, England, pp. 855-859

Goswami, K., S. Yasmin, K. M. Nasiruddin, F. Khatun and J. Akte. 2015. *In vitro* regenaration of *Dendrobium* sp. of orchid using leaf tip as explant. J. Environ. Sci. & Natural Resources. 8(2): 75-78.

Islam, M. O., S. Matsui and S. Ichihashi. 2000. Effect of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in *Cattleya* seedling. Lindleyana 15(2): 81-88.

Islam, M. O., M. Akter and A. K. M. A. Prodhan. 2011. Effect of potato extract on *in vitro* seed germination and seedling growth of local *Vanda roxburgii* orchid. J. Bangladesh Agril. Univ. 9(2): 211-215.

Jainol, J. E. and J. A. Gansau. 2016. Effect of growth regulators and explant orientation on shoot tip culture of borneo endemic orchid, *Dimorphorchis lowii*. Transact. Sci. Technol. 3(2): 306-312.

Malabadi, R.B., J.A. Teixeira da Silva and G. S. Mulgund. 2009. TDZ- induced *in vitro* shoot regeneration of *Aerides maculosum* Lindl. from shoot tip thin cell layers. FOB. 3(1): 35-39.

Martin, K.P., J. Geevarghese, D. Joseph and J. Madassery. 2005. *In vitro* propagation of *Dendrobium* hybrid using flower stalk node explants. Indian J. of Exp. Biol. 43: 280-285.

Murthy, H. N. and A. N. Pyati. 2001. Micropropagation of Aerides maculosum Lindl. (Orchidaceae). In Vito Cell. Dev. Biol-Plant. 37(2): 223-226.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Parab, G. V. and S. Krishnan. 2012. Rapid *in vitro* mass multiplication of orchids *Aerides maculosa* Lindl. and *Rhychostylis*

retusa (L.) Bl. from immature seeds. Indian J Biotechnol. 11: 288-294.

Ramasoot, S., P. Bunwest and W. Nuannut. 2015. Effect of culture media on growth of *Aerides odorata in vitro*. Songklanakarin J. PL. Sci. 2 (4): 11-14.

Shekarriz, P., M. Kafi, S.D. Deilamy and M. Mirmasoumi. 2014. Coconut water and peptone improve seed germination and protocorm like body formation of hybrid *Phalaenopsis.* Agric. sci. dev. 3(10): 317-322.

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

Vacin, E. and F.W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110: 605-613.

Zeng S., K. Wu, S. Teixeira da Silva, J. Zhang, Z. Chen, N. Xia and J. Duan. 2012. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh, an endangered terrestrial orchid. Sci. Hortic. 138:198-209.

Received 31 October 2016

Accepted 31 August 2017