การขยายพันธุ์เอื้องช้างน้าวด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

In vitro Propagation of *Dendrobium pulchellum* Roxb. ex Lindl

อารยา อาจเจริญ เทียนหอม[1] ธีรภรณ์ ตุ้มน้อย[2] ปรัชญา เตวิยะ[2] และ วิทยา แก้วศรี[3]

Theanhom, (Arjcharoen) A.[1], Tumnoi, T.[2], Taywiya, P.[2] and Kaesri, W.[3]

Abstract

Dendrobium pulchellum Roxb. ex Lindl was found at Mahidol University, Kanchanaburi campus, however, it has decreased in number. Micropropagation is an excellent method to conserve and increase the number of this species. A completely randomized design (CRD) was used in this experiment to find the appropriate medium for shoot induction of this orchid. There were 5 treatments with 10 replication and data were recorded every 14 day until 42 days. Results showed that Murashige and Skoog (MS) was a suitable medium for shoot induction. Maximum number of leaves generated was 6 and average height of shoots was 2.51 cm. MS medium also induce the highest numbers of shoots. In addition, results showed that ½ MS was the appropriate medium for root induction and resulted in the highest root number of 13 and the highest root length of 1.20 cm.

Keywords: micropropagation, MS, VW, shoot induction

บทคัดย่อ

เอื้องช้างน้าว เดิมเคยพบในพื้นที่มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี แต่ปัจจุบันมีจำนวนลดลง จึงเลือกใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มจำนวนต้นกล้วยไม้สายพันธุ์นี้ให้มากขึ้นโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบรูณ์ (CRD) ทั้งหมด 5 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 10 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองทุกๆ 14 วัน รวมเป็นเวลา 42 วัน และ จากการศึกษาพบว่าสูตรอาหาร MS มีการเจริญเติบโตของยอดดีที่สุดโดยมีจำนวนใบของต้นอ่อนมากสุด(6 ใบ) ขนาดความสูงเฉลี่ยของต้นสูงที่สุด (2.51 เซนติเมตร) อีกทั้งยังทำให้ช้างน้าวแตกหน่อได้มากที่สุด นอกจากนี้ยังศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดราก พบว่าสูตรอาหาร ½ MS มีการเจริญเติบโตของรากดีที่สุด โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 13 ราก และความยาวรากมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 1.20 เซนติเมตร

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาหารสูตร MS อาหารสูตร VW การชักนำยอด

คำนำ

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกที่เป็นที่ชื่นชอบของคนทั่วโลก มีทั้งพันธุ์ที่เกิดขึ้นในสภาพธรรมชาติ และลูกผสมที่เกิดจากการปรับปรุงพันธุ์โดยมนุษย์ (Lauzer และคณะ, 1994) เอื้องช้างน้าวหรือเอื้องคำตาควายเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย (epiphytic orchid) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dendrobium pulchellum* Roxb. ex Lindl สีดอกสวยงามทั้งกลีบเลี้ยงและ กลีบดอกสีครีมขอบกลีบสีชมพู กลีบปากมีแต้มสีแดง แกมเลือดหมูที่โคนด้านในทั้งสองข้าง ดอกบานเต็มที่ กว้าง 7 เซนติเมตร พบในแถบอินเดีย เนปาล เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และไทย ตามป่าผลัดใบ หรือป่าดิบแล้ง ที่ระดับ ความสูง 200-1,500 เมตร (Avila-Daz และคณะ, 2009; Kananont, 2009) จากความสวยงามที่กล่าวมาจึงมีผู้นำกล้วยไม้ชนิดนี้จากป่ามาปลูกเลี้ยงเป็นจำนวนมาก เดิมในพื้นที่มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี มีการกระจายของเอื้องช้างน้าวอยู่ทั่วไป แต่มักมีชาวบ้านลักลอบเข้ามาเก็บของป่าและกล้วยไม้ป่าชนิดต่างๆ ทำให้ปริมาณกล้วยไม้เอื้อช้างน้าวภายในวิทยาเขตลดลงอย่างรวดเร็วและใกล้สูญหายจากพื้นที่ จึงมีการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการเพิ่มปริมาณและช่วยในการอนุรักษ์พันธุ์พืชเหล่านี้ ในการเพิ่มปริมาณกล้วยไม้จำเป็นต้องศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยมีผู้ศึกษาในกล้วยไม้

[1] **ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 50 ถ.งามวงศ์วาน แขวงลาดยาว จตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900**

[1] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

[2] **สาขาวิทยาศาสตร์การเกษตร มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี 199 ต.ลุ่มสุ่ม อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี 71150**

[2] Agricultural Science Program, Mahidol University, Kanchanaburi campus 71150

[3] **สาขาวิทยาศาสตร์การเกษตร มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตอำนาจเจริญ 259 ม.13 ถ.ชยางกูร ต.โนนหนามแท่ง อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ 37000**

[3] Agricultural Science Program, Mahidol University, Amnatcharoen Campus 37000

ชนิดต่างๆ Li และ Li (2009) รายงานว่าเมื่อเพาะเมล็ดกล้วยไม้ *R. gigantea* พันธุ์กลายดอกสีขาว บนอาหาร ½ MS ที่เติม 6-BA 0.05 มก /ล. ร่วมกับ NAA 0.2 มก. /ล. เป็นเวลา 70 วัน จะเกิดการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม และเมื่อนำโปรโตคอร์มที่ได้ มาชักนำยอดบนอาหาร ½ MS ที่เติมกล้วยบด 100 ก. /ล. พบว่ายอดสามารถเจริญเติบโตได้ดี และสามารถชักนำให้เกิดรากได้ Bhadra และคณะ (2003) ได้ชักนำให้ *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. เกิดยอดบนอาหาร MS ที่เติม BAP 2 มก./ล. และกระตุ้นให้เกิดตายอดสูงสุด แต่ในเอื้องช้างน้าวยังไม่มีผู้ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากของเอื้องช้างน้าวในสภาพปลอดเชื้อ ดังนั้นผลที่ได้จากการวิจัยนี้คาดหวังว่าสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการขยายพันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการเตรียมโปรโตคอร์มเอื้องช้างน้าวโดยฝักกล้วยไม้อายุ 6 เดือน นำมาล้างทำความสะอาดทำการตัดแต่งฝักกล้วยไม้ จากนั้นนำไปผ่านไฟให้ลุกท่วมทั้งฝักเพื่อทำการฆ่าเชื้อสองรอบ ใช้มีดผ่าตัดขูดเมล็ดของเอื้องช้างน้าวออก เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige และ Skoog (1962) (MS) เมื่อโปรโตคอร์มกล้วยไม้อายุ 5 เดือน คัดเลือกต้นที่สมบูรณ์นำไปเลี้ยงในอาหารแข็ง 5 สูตร คือ MS MS ร่วมกับ 6-benzyladenine (BA) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร Vacin และ Went 1949 (VW) และ VW ร่วมกับ BA 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ วางแผนการทดลองการสุ่มแบบสมบรูณ์ Completely Randomized Design (CRD) ทั้งหมด 5 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 10 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองทุกๆ 14 วัน รวมทั้งสิ้น 42 วัน จากนั้นนำยอดที่ได้ไปชักนำให้เกิดราก โดยคัดเลือกต้นที่สมบูรณ์เลี้ยงบนอาหารทั้ง 6 สูตร ได้แก่ MS ½ MS MS ร่วมกับ 1-naphthylacetic acid (NAA) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร VW ½ VW และ VW ร่วมกับ 1-naphthylacetic acid (NAA) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองการสุ่มแบบสมบรูณ์ Completely Randomized Design (CRD) ทั้งหมด 6 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 10 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองทุกๆ 7 วัน รวมทั้งสิ้น 21 วัน อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 7 กรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในอาหารสูตร MS และ VW เท่ากับ 5.7 และ 5.1 ตามลำดับ นำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยให้ความเข้มแสง 2500-3000 ลักซ์ เปิดไฟนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพันธ์ 80 – 85 เปอร์เซ็นต์

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เมื่อนำโปรโตคอร์มกล้วยไม้อายุ 5 เดือน ที่ได้จากการเพาะเมล็ดเอื้องช้างน้าวมาทำการทดลอง พบว่าสูตรอาหาร MS สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยได้ดีที่สุด เท่ากับ 4.1 ยอดและมีขนาดต้นสูงที่สุด 3.37 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากสูตรอาหารอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ อาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 ppm สามารถเพิ่มการเจริญของขนาดความกว้างทรงพุ่มได้มากที่สุด เท่ากับ 2.94 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากสูตรอาหารอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่สูตรอาหาร VW ที่เติม BA 3 ppm สามารถเพิ่มจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 6.7 ใบ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากสูตรอาหารอื่นๆ (Table 1) (Figure 1) และเมื่อนำต้นกล้วยไม้มาชักนำให้เกิดราก พบว่าอาหารสูตร ½ MS สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด ซึ่งมีขนาดความยาวราก เท่ากับ 1.20 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากสูตรอาหารอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้พบว่าอาหารสูตร ½ MS สามารถเพิ่มจำนวนรากเฉลี่ยได้มากที่สุด เท่ากับ 13 รากแต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากสูตรอาหารอื่นๆ (Table 2) (Figure 2)

จากผลจากทดลองเมื่อชักนำให้เอื้องช้างน้าวเกิดยอดและราก พบว่าเมื่อเลี้ยงเอื้องช้างน้าวบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีการแตกหน่อได้ดีกว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BA เพียงอย่างเดียว คาดว่าเป็นผลมาจากพืชที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีการเติมสารควบคุมเจริญเติบโต มีปริมาณ auxin และ cytokinin ที่เกิดจากพืชสร้างเองในสัดส่วนที่เหมาะสมมากกว่า อาหารที่มีการเติมสารในกลุ่ม cytokinin เพียงอย่างเดียว ซึ่งสารทั้งสองกลุ่มนี้มีผลส่งเสริมซึ่งกันและกันในเรื่องการแบ่งเซลล์ และการพัฒนาของเนื้อเยื่อ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม auxin ร่วมกับ cytokinin ในการชักนำและการพัฒนาของกล้วยไม้เอื้องช้างน้าว

สรุปผล

จากการศึกษาพบว่าอาหารสูตร MS มีความเหมะสมมากที่สุดในการชักนำให้เกิดยอดในเอื้องช้างน้าวทั้งในด้านจำนวนและความสูงยอด และก่อนนำออกปลูกควรนำยอดที่ได้ไปชักนำให้เกิดรากอาหารสูตร ½ MS จะสามารถชักนำทำให้เกิดจำนวนรากมากที่สุดและมีความยาวของรากมากที่สุด

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในการสนับสนุนงบประมาณในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Avila-Daz, I., Oyama, K., Gomez-Alonso, C. and Salgado-Garciglia, R., 2009, *In vitro* Propagation of the Endangered Orchid Laelia speciosa, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 99: 335–343.

Bhadra, S.K. and Hossain, M.M., 2003, *In vitro* Germination and Micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an Endangered Orchid Species, Plant Tissue Culture, 13(2):165-171

Kananont, N., 2009, Chitosan Specificity for the *in vitro* Seed Germination of Two *Dendrobium* Orchids. Scientia Horticulturae, 124: 239-247

Lauzer, D., St-Arnaud, M. and Barbara, D., 1994, Tetrazolium Staining and *in vitro* Germination of Mature Seeds of Cypripedium acaule (Orchidaceae). Lindleyana, 9: 197–204.

Li, Z.Y. and Li, X., 2009, *In vitro* Propagation of Whiteflower Mutant of *Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl. Through Immature Seed-derived Protocorm-like Bodies, Journal of Horticulture and Forestry, 6: 93-97.

Table 1 *D. pulchellum* shoot induction at 42 days under light condition

media	No. of shoot	No. of leaf	Height (cm.)	Canopy (cm.)
MS	4.1^{a}±1.45	4.9±1.10	3.37^{a}±1.06	2.93^{a}±0.77
MS+BA 3 mg/L	2.5^{b}±1.08	5.7±1.42	2.40^{b}±0.49	2.94^{a}±0.40
VW	1.5^{c}±0.53	5.5±2.07	2.26^{b}±0.39	2.21^{b}±0.27
VW+BA 1 mg/L	2.7^{b}±1.16	6.2±0.92	2.27^{b}±0.22	2.52^{ab}±0.47
VW+BA 3 mg/L	2.2^{bc}±0.79	6.7±1.89	2.29^{b}±0.40	2.69^{a}±0.41
F-test	*	ns	*	*
C.V.(%)	25.48	38.69	23.43	17.57

ns and * indicatenon-significant and significantly different at P<0.05., respectively.

Table 2 *D. pulchellum* root induction at 21 days under light condition

Type of media	No. of root	Root length (cm.)
MS	7.8±2.78	0.85^{d}±0.09
½ MS	13.0±4.37	1.20^{a}±0.15
MS+NAA 1 mg/L	11.1±4.09	0.90^{cd}±0.18
VW	9.1±3.41	1.04^{bc}±0.07
½ VW	11.3±5.27	0.98^{bcd}±0.19
VW+NAA 1 mg/L	10.0±5.89	1.10^{ab}±0.25
F-test	ns	*
C.V.(%)	41.43	15.02

ns and * indicatenon-significant and significantly different at P<0.05., respectively.

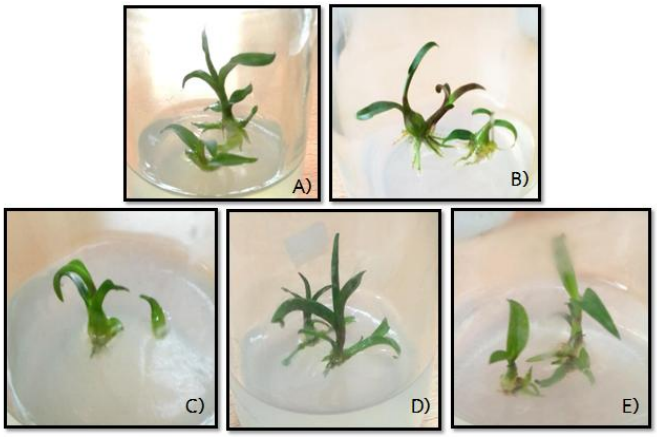

Figure 1 *D. pulchellum* at 42 days after culture on various media A) MS B) MS+BA 3 mg/L C) VW D) VW+BA 1 mg/L E) VW+BA 3 mg/L

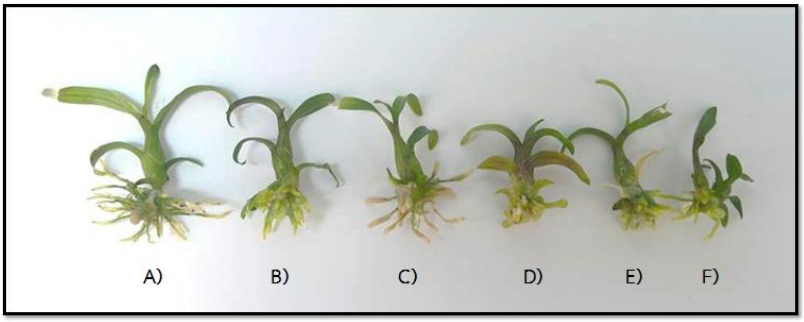

Figure 2 Root induction of *D. pulchellum* on various media A) MS B) ½ MS C) MS+NAA 1 mg/L D) VW E) ½ VW F) VW+NAA 1 mg/L