

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารี เหลืองอุดรในสภาพปลอดเชื้อจากอุทยานแห่งชาติภูสิงห์ จังหวัดนครพนม

ทัศนัย ปัญจันทรสิงห์^{1*} ณัฐยศ ชัยชนะทรัพย์² สุธีรัตน์ แก้วพิลา¹ และ อังคณา มณฑา¹
¹คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ²อุทยานแห่งชาติภูสิงห์ นครพนม
*corresponding author e-mail: cartoon_pine@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาหาสูตรอาหารเหลวและสูตรอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนรองเท้านารีเหลืองอุดร (*Paphiopedilum concolor* (Bateman) Pfitzer) โดยเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ในอาหารเหลว 11 สูตร ได้แก่ อาหารสูตรมาตรฐาน 2 สูตร คือ 1)อาหารสูตร VW Vacin & Went (1949) และอาหารสูตร (MS) Murashige & Skoog (1962) 2) สูตรอาหารดัดแปลง Modified Medium 9 สูตร (MM₁-MM₉) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ α -Naphthalene acetic acid (NAA) ร่วมกับ Peptone ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการวัดขนาดของโปรโตคอร์มที่อายุ 30 วัน และ 90 วัน เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในสูตรอาหารที่ต่างกันนำโปรโตคอร์มในสูตรอาหารที่ถูกคัดเลือกแล้วมาเพาะเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง 2 สูตร ได้แก่ Schenk & Hildebrandt (1972) และ Murashige & Skoog (1962) เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของต้นอ่อนที่อายุ 30 วันและ 90 วัน ($p < 0.01$) ผลการศึกษาพบว่าที่ระยะเวลา 30 วัน โปรโตคอร์มมีขนาดไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ 90 วัน โดยอาหารเหลวดัดแปลงสูตร MM₄ ที่เติม Peptone 1 กรัมต่อลิตร และ Biotin 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ สูตร MM₉ ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรที่เติม Peptone 2 กรัมต่อลิตร และ Biotin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีโปรโตคอร์มขนาดใหญ่อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลวสูตรอื่นๆ นอกจากนั้นยังพบว่า ต้นอ่อนกล้วยไม้บนอาหารแข็งดัดแปลงสูตร Schenk & Hildebrandt ให้ราก ลำต้น และใบที่เจริญได้ดีกว่าอาหารแข็งสูตร Murashige & Skoog

คำสำคัญ : กล้วยไม้ป่า รองเท้านารี *Paphiopedilum concolor* อุทยานแห่งชาติภูสิงห์

Study on medium for *in vitro* seed germination of (*Paphiopedilum concolor* (Bateman) Pfitzer) from Phulungka National Park, Nakhonpanom province

Tasanai Punjansing^{1*}, Natayot Chaichanachap², Sutheerath Kaewpila¹ and
Angkana Monta¹

¹Faculty of Science Udonthani Rajabhat University, Udonthani,

²Phulungka national park, Nakhonpanom

*corresponding author e-mail: cartoon_pine@hotmail.com

Abstract

In this study, liquid and solid media were investigated for the most appropriate recipe on the growth of *Paphiopedilum* (*Paphiopedilum concolor*) orchid protocorms. The protocorms were treated with eleven liquid medium recipes, including two standard media which were Vacin & Went, 1949 (VW) and Murashige & Skoog, 1962 (MS) and nine modified medium (MM₁-MM₉) which were supplemented with growth control NAA (α -Naphthalene acetic acid) and Peptone (0, 1, and 2 mg/ml). Protocorm sizes were measured on the 30th and 90th day to compare growth in different liquid medium recipes. Protocorms from the selected medium were then subcultured to compare the IR growth on two of the modified solid media, which were Schenk & Hildebrandt (1972) and Murashige & Skoog (1962) on the 30th and 90th day. The results showed that there is relatively no difference in the protocorm sizes of every liquid medium recipe on the 30th day. However, protocorm sizes on the 90th day were significantly different, where MM4 medium (supplemented with Peptone 1 g/l and Biotin 1 mg/l) and MM9 medium (supplemented with NAA 2 mg/l Peptone 2 g/l and Biotin 1 mg/l) had significantly larger sizes of protocorms compared to other mediums. Moreover, we found that Schenk & Hildebrandt modified solid medium provided better growth of roots, stems and leaves of the orchid seedlings than Murashige & Skoog solid medium.

keywords : Wilde orchids *Paphiopedilum concolor*, Phulungka National Park

บทนำ

ประเทศไทยมีกล้วยไม้ป่าจำนวนมากเฉพาะที่นักพฤกษศาสตร์ไทยและเดนมาร์ก ได้นำเสนอ มีถึง 177 สกุล (genera) จำนวน 1,125 ชนิด (species) (วีระชัย และสันติ, 2551) จากรายงานพบว่า กล้วยไม้ไทยมีความหลากหลายทั้งถิ่นอาศัยและพันธุกรรม การสำรวจความหลากหลายของกล้วยไม้ในอุทยานแห่งชาติภูแล้งคา จังหวัดนครพนม พบกล้วยไม้ทั้งหมด 53 ชนิด แบ่งออกเป็น 5 วงศ์ย่อย 35 สกุล สกุลหวาย (*Dendrobium*) พบมากที่สุด กล้วยไม้ที่สำรวจพบส่วนมากเป็นกล้วยไม้ที่ขึ้นตามลานหิน ได้แก่ ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) ยี่โถปิ้ง (*Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr) และ เหลืองพิศมร (*Spathoglottis affinis* Vriese) (ทัศนัย, 2555) พบว่าปัจจุบันกล้วยไม้ป่าในอุทยานแห่งชาติภูแล้งคา ลดจำนวนลงอย่างต่อเนื่อง สาเหตุเพราะพื้นที่ป่าซึ่งเป็นแหล่งอาศัยของกล้วยไม้ ถูกทำลายและมีผู้นิยมเลี้ยงกล้วยไม้ป่ามากขึ้น มีการเก็บกล้วยไม้ป่ามาขายในตลาดจำนวนมาก กล้วยไม้บางชนิดจึงเริ่มมีการสูญพันธุ์ โดยเฉพาะกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดร หรือที่รู้จักกันในชื่อ รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor* (Bateman) Pfitzer) ซึ่งในประเทศไทยพบการกระจายพันธุ์ เกือบทั่วทุกภาค ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบในจังหวัดสกลนคร หนองคาย และอุดรธานี กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดร เป็นกล้วยไม้ดินที่มีการเจริญแบบเป็นกลุ่ม มีเหง้า (sympodial growth) แผ่นใบหนา มีลายใบคล้ายลายหินอ่อน ผิวใบมัน หลังใบมีสีเขียวเข้ม และมีจุดสีม่วงกระจายอยู่อย่างหนาแน่นทั่วทั้งใบ ขอบใบเรียบ ปลายใบเว้ามนม ดอก (flower) เกิดบริเวณปลายยอด ช่อดอก

มี 1-3 ดอก ที่โคนก้านช่อดอกและก้านช่อดอกย่อยจะมีใบประดับ และใบประดับย่อยหุ้มอยู่ส่วนที่ติดกับก้าน ดอกย่อยจะเป็นส่วนของรังไข่ (ovary) มีสีม่วงอมเขียว มีขนสีขาวปกคลุมอยู่ทั่วทั้งส่วนของรังไข่ ก้านช่อดอกและดอกมีสีเหลืองมีประจุดสีแดงกระจายอยู่ทั่วทั้งดอก กลีบดอกด้านบน (dorsal sepal) มีลักษณะคล้ายรูปหัวใจคว่ำลง ดอกมีความกว้าง 2.0 - 6.3 เซนติเมตร ยาว 2.7- 3.1 เซนติเมตร ปลายกลีบจะงุ้มลงมาด้านหน้าเล็กน้อย กลีบดอกคู่ข้าง (lateral column) มีลักษณะพุ่งมาทางด้านหน้าของดอก กลีบปาก (lip หรือ labellum) มีลักษณะคล้ายรองเท้าแตะ ติดกับเส้าเกสรซึ่งเป็นลักษณะเด่นของกล้วยไม้รองเท้านารี ส่วนของกลีบปากจะมีสีอ่อนกว่าส่วนของกลีบดอกเล็กน้อย และส่วนของกลีบดอกล่าง (ventral sepal) มีขนาดเล็กกว่ากลีบดอกบน กลุ่มเรณู (pollinium) มีข้างละกลุ่ม รูปร่างกลมติดอยู่บนก้านรองกลุ่มเรณูสั้น ๆ ปลายก้านจะมีติ่งเหนียวติดอยู่ทำหน้าที่คล้ายกาวช่วยยึดกลุ่มเรณูให้สามารถเกาะติดกับพาหะถ่ายเรณู (pollinator) ได้โดยง่าย ฝัก (pod) เป็นส่วนที่เจริญมาจากรังไข่ ฝักอ่อนมีสีเขียว ฝักแก่จะมีสีน้ำตาล เมล็ดจะมีขนาดเล็กมากจนเกือบเป็นผงจำนวนมากเมล็ดเมื่ออ่อนจะมีสีขาวขุ่น เมื่อแก่เมล็ดจะมีสีน้ำตาล จัดเป็นกล้วยไม้อยู่ในสถานภาพพืชหายาก ปัจจุบันจึงได้มีการออกกฎหมายคุ้มครองให้กล้วยไม้สกุลรองเท้านารีเป็นพืชป่าที่มีคุณค่า ซึ่งมีปริมาณน้อยมากและกำลังจะสูญพันธุ์ ตามอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศด้วยชนิดสัตว์ป่าและพืชป่า ที่กำลังจะสูญพันธุ์ (CITES) (สลิ, 2551) กล้วยไม้ชนิดนี้ออกดอกได้ตลอดทั้งปี และดูแลรักษาง่าย จึงนิยมนำมาปลูกเป็นไม้ประดับจำนวนมากการขยายพันธุ์จากเมล็ดในธรรมชาติเกิดได้น้อยเพราะ มีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำและไม่สม่ำเสมอ จึงทำให้เมล็ดไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ ทำให้เจริญเติบโตช้าหรือตายในเวลาต่อมา (วิวัฒน์, 2529) ดังนั้นการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะทำให้ได้กล้าพันธุ์จำนวนมากในเวลาสั้นโดยทั่วไปการขยายพันธุ์กล้วยไม้ด้วยวิธีนี้นิยมใช้สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงในสกุลรองเท้านารี แตกต่างกันตามชนิดของกล้วยไม้ การศึกษาครั้งนี้เป็นการใช้สูตรอาหารดัดแปลง (Modified Medium) เพื่อให้ได้สูตรที่เหมาะสม และปลูกคืนสู่ธรรมชาติเพื่อทดแทนต้นที่ถูกทำลายไปได้อย่างมีประสิทธิภาพผู้วิจัยจึงศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ม กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดร เพื่อเพิ่มปริมาณกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดร เพื่อการขยายพันธุ์และการอนุรักษ์อย่างยั่งยืน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างฝักกล้วยไม้

เก็บตัวอย่างฝักแก่ตามธรรมชาติของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดร จากอุทยานแห่งชาติภูหลวง จังหวัดนครพนม จากพื้นที่เส้นทางการเดินศึกษาธรรมชาติพระธาตุเจดีย์ศรีบุญเนา ซึ่งสามารถพบกล้วยไม้ชนิดนี้ ตามผาทางด้านทิศตะวันตกของอุทยาน การเก็บฝักที่มีการติดฝักตามธรรมชาติ เลือกฝักแก่อายุประมาณ 6 เดือน โดยก่อนการเก็บตัวอย่างฝักแก่นี้ ผู้วิจัยและคณะได้ทำการสำรวจ และจำแนกลักษณะสัณฐานวิทยากล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดรตามหลักอนุกรมวิธานเปรียบเทียบพรรณไม้ อ้างอิงเอกสาร พรรณพฤกษชาติ แห่งประเทศไทย Flora of Thailand volume twelve part one (Santisuk & Larsen, 2011)

2. การฟอกฆ่าเชื้อ

ตัวอย่างผักแก่ที่เก็บได้ จะถูกนำมาทำการฟอกฆ่าเชื้อ โดยการคัดเลือกผักแก่ของกล้วยไม้ที่สมบูรณ์และมีหน่งผักที่ยังไม่แตกมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน และน้ำสะอาด ใช้ปากคืบคืบผักกล้วยไม้จุ่มในแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 แล้วลนไฟ ทำซ้ำ 3 ครั้ง ก่อนนำไปวางบนจานเพาะเชื้อ จากนั้นจึงใช้เทคนิคปลอดเชื้อในทุกขั้นตอนต่อนี้ โดยใช้มีดกรีดผ่าผักออกตามแนวยาว ระหว่างรอยตะเข็บ แล้วจึงใช้ปลายมีดเขี่ยเมล็ดจากผักลงในน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว สุดท้ายจึงใช้ไมโครปิเปต ดูดเอาน้ำที่มีเมล็ดติดมา ด้วยปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร เตรียมไว้ใช้งานทดลองที่ 1

3. การเพาะเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์

3.1 การทดลองที่ 1 ทำการเปรียบเทียบสูตรอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มโดยทำการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนตั้งแต่ระยะแรก (ungerminated seed) โดยย้ายเมล็ดปลอดเชื้อที่เตรียมไว้ลงในอาหารเปรียบเทียบจำนวน 11 สูตรซึ่งดัดแปลงอาหารสูตร VW (Vacin & Went, 1949) สูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) และสูตร MM (Modified Medium) (ตารางที่ 1) วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD (Completely Randomized Design) จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 10 หลอดโดยการทดลองนี้มีปัจจัย คือ สารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด ได้แก่ NAA และ Peptone อย่างละ 3 ระดับ คือ 0,1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นจึงนำขวดตัวอย่างที่ได้ไปวางบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วที่ 120 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมีแสง การทดลองทำในสภาวะปลอดเชื้อ และเก็บข้อมูลโดยการวัดขนาดของโปรโตคอร์ม เพื่อหาค่าเฉลี่ยขนาดของโปรโตคอร์มในอาหารทุกสูตรที่อายุ 30 วัน และ 90 วัน ข้อมูลที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.01

3.2 การทดลองที่ 2 ทำการเปรียบเทียบสูตรอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนโดยย้ายโปรโตคอร์ม อายุ 2 เดือนที่มีขนาดเท่าๆกัน จากสูตรอาหารที่ถูกเลือกจากการทดลองที่ 1 มาลงบนอาหารแข็งสูตรอาหารดัดแปลง 2 สูตร ได้แก่ อาหาร VW และอาหารดัดแปลงที่มีธาตุอาหารหลักของสูตร Schenk & Hildebrandt (1972) ธาตุอาหารรองสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร วน 8 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ไมโครปิเปต ดูดอาหารเหลวออกจากขวดรูปชมพู่ ที่เป็นโปรโตคอร์มแล้วเทลงจานเพาะเชื้อ ใช้ปากคืบ คืบโปรโตคอร์มวางบนอาหารแข็ง ลนปากขวดด้วยไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ให้ร้อน แล้วปิดฝาขวดให้สนิท จากนั้นจึงวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีแสงสว่างตลอดเวลาที่ความเข้มข้นแสง 3,000 ลักซ์ โดยได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการบันทึกผลการเจริญเติบโตของต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่อายุ 30 วันและ 90 วัน โดยการสังเกตและถ่ายภาพบันทึกผลเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและบรรยายลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสูตรอาหารจำนวน 11 สูตร

สูตรอาหาร	NAA(mg/L)	Peptone(g/L)	Biotin(mg/L)	น้ำตาล (g/L)	น้ำมะพร้าว(mL/L)
VW	-	-	-	20	150
MS	-	-	-	30	-
MM ₁	-	-	1	20	100
MM ₂	1	-	1	20	100
MM ₃	2	-	1	20	100
MM ₄	-	1	1	20	100
MM ₅	1	1	1	20	100
MM ₆	2	1	1	20	100
MM ₇	-	2	1	20	100
MM ₈	1	2	1	20	100
MM ₉	2	2	1	20	100

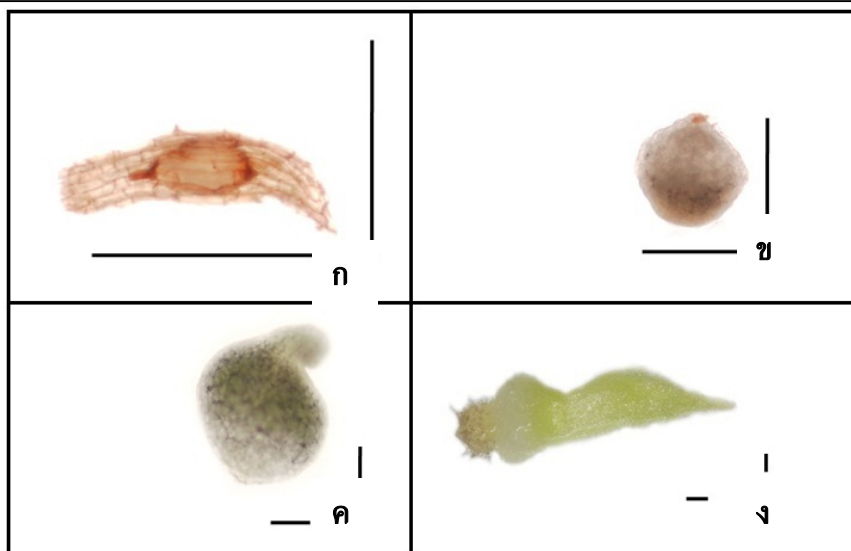
หมายเหตุ VW = Vacin & Went (1949), MS = Murashige & Skoog (1962),

MM = Modified Medium โดยดัดแปลงใช้ธาตุอาหารหลักของ Vacin & Went (1949) และธาตุอาหารรองของ Murashige & Skoog (1962)

ผลการวิจัย

1. ผลศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดร จากระยะ ungerminated seed ถึงระยะ one leaf seedling

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดรพบลักษณะและระยะการเจริญเติบโตทั้ง 4 ระยะดังนี้ ระยะที่ 1 ungerminated seed มีลักษณะเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างคล้ายกระสวยมีเปลือกหุ้มสีน้ำตาลมีขนปกคลุมโดยรอบ และมีเอ็มบริโออยู่ตรงกลางเมล็ด (ภาพที่ 1ก) ระยะที่ 2 swollen seed เอ็มบริโอมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขนาดจากนั้น จะดันเปลือกหุ้มเมล็ดให้ฉีกขาดและหลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด รูปร่างกลม (ภาพที่ 1ข) ระยะที่ 3 โปรโตคอร์ม เอ็มบริโอจะเจริญเป็นลักษณะกลมปลายแหลม และมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ส่วนยอดจะเจริญไปเป็นใบ และส่วนกลมจะเจริญไปเป็นลำต้นและราก ต้นอ่อนเริ่มมีสีเขียว (ภาพที่ 1ค) ระยะที่ 4 One leaf Seedling มีการเจริญเป็นต้นอ่อนที่มีใบเกิดขึ้น 1 ใบ ซึ่งงอกขึ้นทางด้านบนของโปรโตคอร์ม แต่ยังไม่เป็นใบที่แท้จริง ต้นอ่อนระยะนี้มีสีเขียวอ่อนชัดเจน (ภาพที่ 1ง) จากนั้นต้นอ่อนจะมีการเจริญพัฒนาสร้างอวัยวะได้มากขึ้น มีใบที่แท้จริงต่อไป และมีจำนวนใบเพิ่มขึ้นพร้อมที่จะเจริญไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไป



ภาพที่ 1 ลักษณะการเจริญเติบโตของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดรจากระยะ ระยะที่ 1 ungerminated seed (ก) ระยะที่ 2 swollen seed (ข) ระยะที่ 3 protocorm (ค) ระยะที่ 4 one leaf seedling (ง) (สเกลบาร์ = 200 μ m)

2. ผลการศึกษาการเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มที่ 30 วัน และ 90 วัน

จากการเปรียบเทียบสูตรอาหารทั้ง 11 สูตร (VW – MM9) ต่อการเจริญของโปรโตคอร์มที่อายุ 30 วัน พบว่า ขนาดของโปรโตคอร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ($p < 0.01$) แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน พบว่า การเจริญของโปรโตคอร์มเมื่อเปรียบเทียบที่ขนาดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ($p < 0.01$) โดยแบ่งเป็นกลุ่มดังนี้ ขนาดโปรโตคอร์มเฉลี่ยสูงสุด มีสูตรอาหารสองชนิดคือ MM4 และ MM9 โดยมีขนาด 715.9 ± 305.13 และ 748.3 ± 198.33 ไมโครเมตร ตามลำดับ ในขณะที่สูตรอาหาร MM3 MM5 และ MM6 มีขนาดเฉลี่ยของโปรโตคอร์มเล็กกว่ากลุ่มแรก คือ 639.5 ± 250.36 , 559.1 ± 295.05 , และ 605.6 ± 156.94 ไมโครเมตร ตามลำดับ และ กลุ่มที่มีขนาดโปรโตคอร์มเฉลี่ยต่ำสุดคือ สูตรอาหาร VW MS MM1 MM2 และ MM7 มีขนาดเล็กกว่ากลุ่มอื่น คือ 419.6 ± 178.28 , 389.7 ± 108.24 , 398.3 ± 88.70 , 424.6 ± 77.45 และ 643.4 ± 291.32 ไมโครเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

3. ผลการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นอ่อนบนอาหารแข็งสูตร VW (basal medium) และ Schenk & Hildebrandt (Modified Medium)

การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดรบนอาหารแข็งในระยะเวลา 30 วัน พบว่าอาหาร VW (basal medium) ต้นอ่อนมีใบ 1 ใบ ลักษณะสีขาวขุ่น มีรากขนาดเล็ก ใบเริ่มมีการแตกออกเป็นใบอย่างชัดเจน มีสีเขียว รากและลำต้นมีสีขาวขุ่น เริ่มสังเกตเห็นราก

ได้ชัดเจนนั่นอ่อนมีการตั้งตรง (ภาพที่ 2ก) ส่วนอาหาร Schenk & Hildebrandt (Modified Medium) มีต้นอ่อนที่เจริญเติบโตมากกว่าอาหารแข็งชนิดแรก กล่าวคือ นอกจากต้นอ่อนจะมีใบ 1 ใบ ที่มีลักษณะสีเขียวช้ำ และมีรากขนาดเล็กและแตกออกเพิ่มขึ้นแล้ว ใบที่เกิดขึ้นเริ่มมีการแตกออกเป็นสองใบที่มีสีเขียวอย่างชัดเจน และขยายขนาดทั้งกว้างและยาวเพิ่มขึ้น ลำต้นมีขนาดประมาณ 0.2 เซนติเมตร (ภาพที่ 2 ข) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 90 วัน ในอาหาร VW (basal medium) ใบรูปร่างใบเรียวยาว แหลม ปลายใบแหลม มีสีเขียวอ่อน มีขนาดความกว้างและความยาวของใบเพิ่มขึ้นขนาด 1 X 2.5 เซนติเมตร รากเจริญดียาวประมาณ 3-4 เซนติเมตร (ภาพที่ 2 ค) ส่วนในอาหาร สูตร Schenk & Hildebrandt (Modified Medium) พบว่า ลำต้นมีขนาดใหญ่ขึ้น รากมีขนาดใหญ่ขึ้น เป็น 2 เท่าพบ ขนรากสั้นๆ สีนํ้าตาลขาวจำนวนมาก สังเกตเห็นเหง้า (sympodial growth) ชัดเจน ใบ (leaf) ปลายใบโค้งมนมีขนาดใหญ่สีเขียวเข้ม หลังใบลายเหมือนหินอ่อนชัดเจนขนาดใบ 2.5 X 0.5 เซนติเมตร แผ่นใบหนา มีลายคล้ายหินอ่อนผิวใบมัน ใบที่ 1 และใบที่ 2 เจริญเติบโตได้ดีกว่าใบอื่นสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 2 ง)

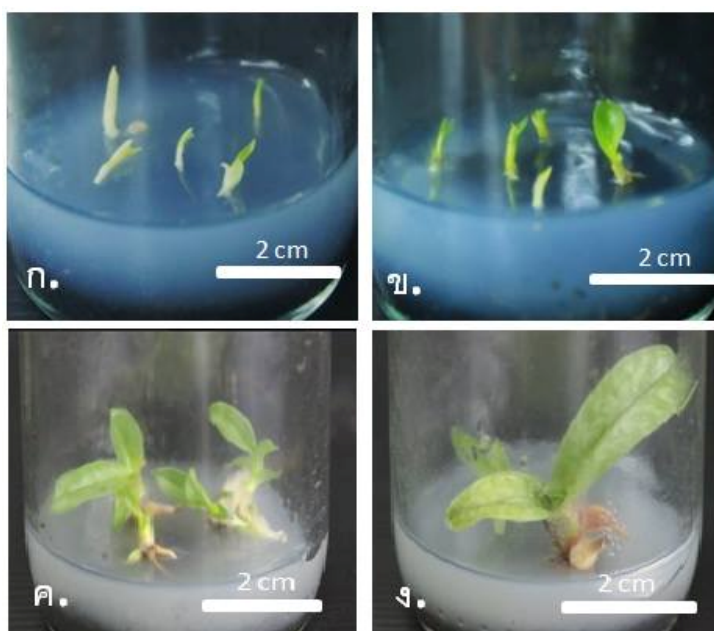
ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบสูตรอาหารเหลว 11 สูตร (VW-MM₉) ของการเจริญโปรโตคอร์มอายุ 30 วัน และ 90 วัน

สูตรอาหาร	ค่าเฉลี่ยขนาดของโปรโตคอร์ม (μm)	
	30 วัน (Mean ± SD)	90 วัน (Mean ± SD)
VW	215.3±38.47	419.6±178.28 ^B
MS	111.4±19.06	389.7±108.24 ^B
MM ₁	179.2±37.79	398.3±88.70 ^B
MM ₂	195.0±37.79	424.6±77.45 ^B
MM ₃	166.0±57.19	639.5±250.36 ^{AB}
MM ₄	190.5±69.29	715.9±305.13 ^A
MM ₅	172.2±64.98	559.1±295.05 ^{AB}
MM ₆	191.1±99.01	605.6±156.94 ^{AB}
MM ₇	199.8±81.99	449.5±93.89 ^B
MM ₈	199.0±101.82	643.4±291.32 ^{AB}
MM ₉	165.2±58.91	748.3±198.33 ^A
F- test	ns	**

หมายเหตุ ns ค่าแสดงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์, $p < 0.01$

** ค่าแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์, $p < 0.01$

A, B, AB ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นอ่อนบนอาหารแข็ง VW (basal medium) และ Schenk and Hildebrandt (Modified Medium) ที่ระยะเวลา 30 วัน (ก และ ข) และ 90 วัน (ค และ ง)

สรุปและการอภิปรายผลการวิจัย

ต้นอ่อนกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดร มีระยะ และลักษณะการเจริญเติบโตเหมือนกับกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดอื่นๆ ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 ระยะ ดังกล่าวแล้วข้างต้น จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดร ในอาหารเหลวสูตร VW (1949) สูตร MS (1962) และสูตรดัดแปลง ที่เติม NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Peptone ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1 และ 2 กรัมต่อลิตร พบว่าเมล็ดเริ่มงอกเมื่อเพาะเลี้ยงได้ระยะเวลา 20 วันขึ้นไป (ไม่ได้แสดงข้อมูลในตาราง) โปรโตคอร์มอายุ 30 วันของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดรมีการเจริญเติบโตในสูตรอาหารทั้ง 11 สูตรไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่พบการเจริญที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 99 เปอร์เซนต์ เมื่อโปรโตคอร์มอายุ 90 วัน ซึ่งพบว่าเมล็ดสามารถงอกได้ดีที่สุดในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง (Modified Medium: MM) สูตรที่ MM₄ และ MM₉ โดย สูตรอาหาร MM₄ คือ สูตรอาหารที่มีองค์ประกอบของ Peptone 1 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ Biotin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง ทำให้มีขนาดเฉลี่ยของโปรโตคอร์มที่ 715.9 ± 305.13 ไมโครเมตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ อีรพล (2535) แต่ถ้าเพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตรที่ MM₉ที่มีการเติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Peptone 2 กรัมต่อลิตร พบว่าขนาดของโปรโตคอร์มมีขนาดใหญ่ที่

748.3 $\pm$ 198.33 ไมโครเมตร แต่ไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับสูตรอาหาร MM₄ ทั้งนี้พบว่าอาหารเหลวที่มีธาตุอาหารหลักสูตร Vacin & Went (1949) ดัดแปลง และเติมธาตุอาหารรองสูตร Murashige & Skoog (1962) ที่มีอินทรีย์สารต่างๆ เช่น น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร Biotin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Peptone 0.5 - 2 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการงอกของเมล็ด และการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Arditti Ernst (1982) ที่กล่าวว่าระดับความเข้มข้นของอาหารเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการงอก สำหรับ Peptone ช่วยให้เอ็มบริโอมีการเจริญเติบโต มีเปอร์เซ็นต์การงอกและพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มที่มีขนาดใหญ่ได้ดีเนื่องจาก Peptone มีส่วนประกอบของสารอาหารต่างๆ มากชนิด เช่น เป็นแหล่งไนโตรเจน กรดอะมิโน วิตามิน และออรอนของธาตุต่างๆ (ธีรพล, 2535) ส่วนการเติม Biotin จะช่วยในกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ในระยะโปรโตคอร์ม และช่วยให้โปรโตคอร์มเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าที่มีขนาดใหญ่และมีระบบรากที่ดี (Lucke, 1971) เนื่องจาก Biotin เป็น Co-enzyme ของปฏิกิริยาต่างๆ และช่วยในการสังเคราะห์กรดไขมัน และ Purine ซึ่งเป็นส่วนประกอบของสารพันธุกรรม (นิธิยาและวิบูลย์, 2537) การเติม NAA ส่ง ผลให้เมล็ดงอกได้ดีและสามารถชักนำรากให้พัฒนาได้ดี (Cho & Valmayor, 1988) เพราะ NAA เป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน ซึ่งมีบทบาทต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดนิวคลีอิก โดยจะไปกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ RNA เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการขยายตัวของเซลล์ (ครรชิต, 2541) ซึ่งเหมาะกับการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดรบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลงที่มีธาตุอาหารหลักของสูตร Schenk & Hildebrandt (1972) ธาตุอาหารรองสูตร Murashige & Skoog (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร วุ้น 8 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการย้ายโปรโตคอร์มและต้นอ่อนที่มีขนาดตั้งต้นเท่าๆกัน มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งทั้งสองสูตรเพื่อทำการเปรียบเทียบด้วยการสังเกตและบันทึกภาพพบว่า สูตรอาหารแข็งที่ใช้เพื่อให้ต้นอ่อนมีการเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ สามารถเจริญได้ดีกว่าในอาหารแข็งสูตร Schenk & Hildebrandt โดยจะสามารถเห็นการเจริญที่มากกว่าได้ชัดเจนที่สุดในระยะ 90 วันข้อสรุปจากงานวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลเพื่อนำสูตรอาหารที่ได้รับการคัดเลือกแล้วไปนำมาใช้เพื่อขยายพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดรอย่างมีประสิทธิภาพ และปลูกกลับคืนสู่อุทยานแห่งชาติต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วรัญญา จีระวิพลวรรณ ที่กรุณาช่วยให้ข้อชี้แนะในการเขียนบทความ ดร.วิบูล เป็นสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์วิเคราะห์ข้อมูลด้านสถิติและตรวจทานให้ข้อเสนอแนะในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณ คุณมีชัย เมืองซ่า เจ้าหน้าที่ อุทยานแห่งชาติภูถ้ำกลั๊ว อำเภอบ้านแพงจังหวัดนครพนม คณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และนักศึกษาสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

เอกสารอ้างอิง

- ครรชิต ธรรมศิริ. (2541). เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. กรุงเทพฯ: อัมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.
- ทัศนัย ปัญจันทร์สิงห์. (2555). รายงานการวิจัยเรื่องความหลากหลายของกล้วยไม้ในอุทยานแห่งชาติภูแล้งคา จังหวัดนครพนม. อุดรธานี: มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
- ธีรพล พรสวัสดิ์ชัย. (2535). ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการงอกและการพัฒนาโปรโตคอร์มของรองเท้านารีเหลืองปราจีน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิธิยา รัตนাপนนท์ และ วิบูลย์ รัตนูปนนท์. (2537). โภชนศาสตร์เบื้องต้น. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- วิวัฒน์ วุฒิชัย. (2529). ผลของอายุฝักการเติมมันฝรั่งน้ำมะพร้าวและถ่านในอาหารสำหรับเพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วีระชัย ณ นคร และ สันติ วัฒนฐานะ. (2551). สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์. กล้วยไม้ไทย 1. (พิมพ์ครั้งที่ 1). เชียงใหม่: วนิตการพิมพ์.
- สกุณา พาแก้ว. (2538). การศึกษาอายุฝักและสูตรอาหารสำหรับเพาะเมล็ดรองเท้านารีเหลืองปราจีน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สกลี สิทธิสัจธรรม. (2551). กล้วยไม้ป่าเมืองไทย. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน.
- Arditti, J., & Ernst, R. (1982). *Physiology of Germinating orchid seeds*. Cornell University.
- Cho, M.S., & Valmayor, H.L. (1988). Effects of culture media on the growth of seedlings derived from embryo culture in *Paphiopedilum philippinense* (Tropical orchid). *Korean Journal of Plant Tissue Culture*, 15, 103-110.
- Lucke, E. (1971). The effect of biotin on sowings of *Paphiopedilum*. *American Orchid Society Bulletin*, 40 (1), 24-26.
- Stimart, D.P., & Ascher, P.D. (1981). *In vitro* germination of *Paphiopedilum* seed on a completely defined medium. *Scientia Horticulturae*, 14, 165-170.
- Santisuk, T., & Larsen, K. (2011). *Flora of Thailand*, volume twelve part one. Bangkok: printed in Thailand at prachachonco.ltd., by niranhetrakul.