

**Trimming protocorms for multiplication new protocorm
of *Dendrobium formosum* Roxb.**

**การตัดแบ่งโปรโตคอร์มเพื่อเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มของกล้วยไม้
เอื้องเงินหลวง**

A. Jala and N. Balla

Department of Biotechnology, Faculty of science and technology,

Thammasat University, Rangsit Campus.

Email : anchaleejala@hotmail.com

Abstract

Multiplication *Dendrobium formosum* by using trimmed technique and compared 3 culture medium which were VW (1949) MS (1962) and Jittrapan (1993) medium. Protocorms were trimmed with transverse section (upper and lower section) and longitudinal section. This experiment was done with 9 treatments and used factorial in CRD (Completely randomized design). After cultured sections of protocorms on each medium for 45 days, all sections of protocorms on VW media gave the highest growth and survival rate. Longitudinal section of protocorms gave the highest new protocorms.

Keywords : protocorms , *Dendrobium formosum* , Vacin and Went(VW), Murashige and Skoog(MS) , Jittrapan medium.

บทคัดย่อ

การเพิ่มจำนวนของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงโดยการตัดแบ่งโปรโตคอร์ม และเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มบนอาหารสังเคราะห์ 3 สูตร คือ สูตร VW (1949) MS (1962) และ สูตรจิตราพรณ (2536) ทำการตัดโปรโตคอร์ม 2 แบบคือ ตัดแบ่งตามขวางด้านบน และด้านล่าง และตัดแบ่งตามยาวแบ่งเป็น 2 ชั้น รวมทั้งสิ้น 9 สิ่งทดลอง วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD (Completely randomized design) หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนโปรโตคอร์มที่ได้ทำการตัดแบ่งบนอาหารสูตรต่างๆเป็นเวลา 45 วัน ปรากฏว่าโปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW มีอัตราการรอดชีวิตและเติบโตเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มสูงสุด และเทคนิคการตัดที่ทำให้โปรโตคอร์ม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกลุ่มโปรโตคอร์มที่เกิดใหม่มีขนาดใหญ่ที่สุด คือโปรโตคอร์มที่ทำการตัดแบ่งแบบตามยาว

คำสำคัญ : โปรโตคอร์ม กล้วยไม้เอื้องเงินหลวง อาหารสูตร Vacin and Went (VW) สูตร Murashige and Skoog (MS) สูตรจิตราพรณ

บทนำ

ดอกกล้วยไม้ และต้นกล้วยไม้เป็นพืชหลัก ที่มีการส่งออกมากที่สุดในกลุ่มของไม้ดอกไม้ประดับของประเทศไทย (อุทัย, 2543) ปัจจุบันการปลูกกล้วยไม้ก็ยังคงเป็นที่นิยมของคนทั่วไป ทั้งนี้เนื่องจากเหตุผลหลายประการ คือ ดอกกล้วยไม้สีสันสวยงามมากมาย ลักษณะรูปทรงของดอกงดงามแปลกตา และแตกต่างกันตามลักษณะของสายพันธุ์ ที่สำคัญก็คือ ดอกกล้วยไม้บานอยู่ได้ทนนานกว่าดอกไม้ชนิดอื่นๆ (ชวลิต, 2542)

กล้วยไม้สกุลหวาย (Dendrobium) เป็นสกุลใหญ่ที่สุดในบรรดากล้วยไม้ด้วยกัน มีการแพร่กระจายพันธุ์ ในบริเวณกว้างทั้งในทวีปเอเชียและหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก นักพฤกษศาสตร์ได้ทำการจำแนกออกเป็นหมวดหมู่ไว้ประมาณ 20 หมู่ และมีการรวบรวมกล้วยไม้ชนิดที่ค้นพบแล้วได้ประมาณ 1,000 ชนิดพันธุ์ เอื้องเงินหลวงเป็นกล้วยไม้ป่าที่สวยงาม มีลำลูกกล้วยกลมค่อนข้างอ้วน และตั้งตรง ความยาวประมาณ 30–50 เซนติเมตร ที่กาบใบมีขนสีดำ ลักษณะใบเป็นรูปไข่ยาวรี ยาวประมาณ 10–15 เซนติเมตร ปลายใบแตก

เป็น 2 แฉกไม่เท่ากัน ออกดอกที่ยอด ช่อดอกสั้น ช่อหนึ่งๆ มี 3-5 ดอก กลีบดอกมีสีขาว ปากสีเหลืองส้ม โคนปากสอบปลายปากเว้า มีสันนูนสองสันจากโคนออกมาถึงกลางปาก ขนาดดอกโตประมาณ 10 เซนติเมตร มีกลิ่นหอมอ่อน ออกดอกเดือนตุลาคมถึงธันวาคม พบทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ภาคตะวันตก และภาคใต้ แหล่งที่พบในประเทศไทย ป่าผลัดใบเกือบทุกภาค (อบฉันท, 2545)

ในปัจจุบันกล้วยไม้ป่าได้มีการลักลอบนำมาขายเป็นจำนวนมาก ทำให้กล้วยไม้ป่ามีจำนวนลดน้อยลงและอาจสูญพันธุ์ได้ การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อการขยายพันธุ์พบว่า เมล็ดกล้วยไม้ป่าจะงอกได้ดีเมื่อเพาะในอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม (ส่องสกณ, 2545) ซึ่งวัตถุประสงค์ของการทดลองวิจัยนี้เพื่อหาวิธีการขยายพันธุ์กล้วยไม้ป่าให้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ตลอดจนศึกษาวิธีการและตำแหน่งการผ่าโปรโตคอร์ม ให้มีการสร้างโปรโตคอร์มใหม่ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มให้มากขึ้นอีกด้วย และการทดลองครั้งนี้ใช้กล้วยไม้เองเงินหลวงซึ่งเป็นกล้วยไม้ป่าชนิดหนึ่ง

วิธีการทดลองและอุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

ผักอ่อนกล้วยไม้เองเงินหลวง (*D. formosum* Roxb.) ที่มีอายุประมาณ 3 เดือนนำมาเพาะเลี้ยงจนเกิดเป็นโปรโตคอร์มแล้วนำโปรโตคอร์มที่มี อายุ 6 เดือนหลังจากการเพาะเมล็ด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ผ่าตามแนวขวางออกเป็น 2 ส่วน โดยแยกเป็นส่วนด้านบนและส่วนด้านล่าง และผ่าตามยาว แบ่งออกเป็นสองส่วนเท่าๆกัน

2. อาหารที่ใช้เลี้ยงในการทดลอง

เตรียมอาหารแข็งสูตร Vacin and Went (VW) (1949) ดัดแปลงโดยเติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิตรต่อลิตร และผงถ่านกัมมันต์ 0.1 กรัมต่อลิตร อาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) (1962) และอาหารสูตรจิตราพรณ (2536) ดัดแปลงโดยเติมถ่านกัมมันต์ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH อาหารสูตรต่างๆมีค่าเท่ากับ 5.8 ± 0.2 เติมผงวุ้น 0.25% (gelrite) และ หนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดันระดับ 104 kPa อุณหภูมิ 121°C นาน 20 นาที

3. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD (completely randomized design) ประกอบด้วย โปรโตคอร์มที่ได้จากการผ่าตามแนวขวาง แยกเป็นส่วนบนและส่วนล่าง และ โปรโตคอร์มที่ผ่าตามแนวยาว ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน การทดลองนี้ทำ 10 ซ้ำๆ ละ 1 ขวด ขวดละ 3 ชิ้นโปรโตคอร์ม โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการใช้ปัจจัย 2 ปัจจัยคือ

ปัจจัยแรก คือ อาหารที่ใช้เลี้ยงประกอบด้วย 3 สูตร คือ สูตร VW , MS และ จิตราพรรณ

ปัจจัยที่สอง คือ ชิ้นส่วนของโปรโตคอร์มที่ทำการผ่าตามแนวขวางแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยแยกเป็นส่วนด้านบนและส่วนด้านล่าง และผ่าตามยาว แบ่งเป็น 2 ส่วนเช่นกัน (ชายและขวา)

หลังจากนำเนื้อเยื่อโปรโตคอร์มที่ตัดในแนวต่างๆ ลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปราศจากการปนเปื้อนทั้ง 3 สูตร นำขวดเพาะเลี้ยงวางบนชั้นที่มีหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาว ให้แสงสว่าง 1600 ลักซ์นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิห้อง 25 ± 2 องศาเซลเซียส หลังจากเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มนาน 45 วัน บันทึกอัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์ม (ร้อยละ) อัตราโปรโตคอร์มที่ออกขึ้นมาใหม่ (ร้อยละ) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นและแบ่งขนาดของโปรโตคอร์มที่เกิดขึ้นโดยให้เป็นคะแนน แบ่งเป็น 3 ระดับ คือ

ระดับคะแนน	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโปรโตคอร์ม
1 คะแนน	1-3 มิลลิเมตร
2 คะแนน	3.1-5 มิลลิเมตร
3 คะแนน	5.1 มิลลิเมตรขึ้นไป

ผลการทดลอง

อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์ม

นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงอายุ 6 เดือนหลังการเพาะเมล็ด ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ซึ่งผ่าตามแนวขวางและแนวยาวและเลี้ยงบนอาหาร

แข็งทั้ง 3 สูตร (VW , MS และ จิตราพรรณ) ผลปรากฏว่าหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 7 วัน บริเวณผิวหน้าของบาดแผลบนชิ้นส่วนโปรโตคอร์มพบว่าเกิดเนื้อเยื่อเป็นสีขาว และเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 15 วัน ชิ้นส่วนโปรโตคอร์มบางชิ้นเริ่มสร้างโปรโตคอร์มใหม่ขึ้นมา (ภาพ D) แต่โปรโตคอร์มบางชิ้นเริ่มมีสีน้ำตาลเกิดขึ้นบริเวณรอยตัด

เมื่อตรวจนับอัตราการเจริญเติบโตที่เกิดขึ้นที่บริเวณรอยตัด ทั้งแนวยาว และแนวขวาง และสูตรอาหารที่ทำให้โปรโตคอร์ม มีการเจริญเติบโต รวมทั้งอัตราการรอดชีวิตพบว่าสูตรอาหาร VW ให้ผลการทดลอง สูงสุดรองลงมาก็คือ MS และจิตราพรรณ ตามลำดับ

หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนโปรโตคอร์มบนอาหารสูตรต่าง ๆ นาน 45 วัน อัตราการรอดชีวิตและมีการเติบโตเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์ม ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า การผ่าโปรโตคอร์มตามแนวขวาง(ส่วนด้านบน) มีอัตราการรอดชีวิตและเติบโตสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 65.71 (ภาพ A, B) และผ่าตามแนวยาว คิดเป็น ร้อยละ 56 (ภาพ C,D) ส่วนชิ้นส่วนโปรโตคอร์มที่ตัดตามแนวขวางชิ้นส่วนด้านล่างมีอัตราการรอดชีวิตและเติบโตคิดเป็นร้อยละ 48.57 (ภาพ E,F) และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มใหม่ คือสูตร VW MS และจิตราพรรณ ตามลำดับ

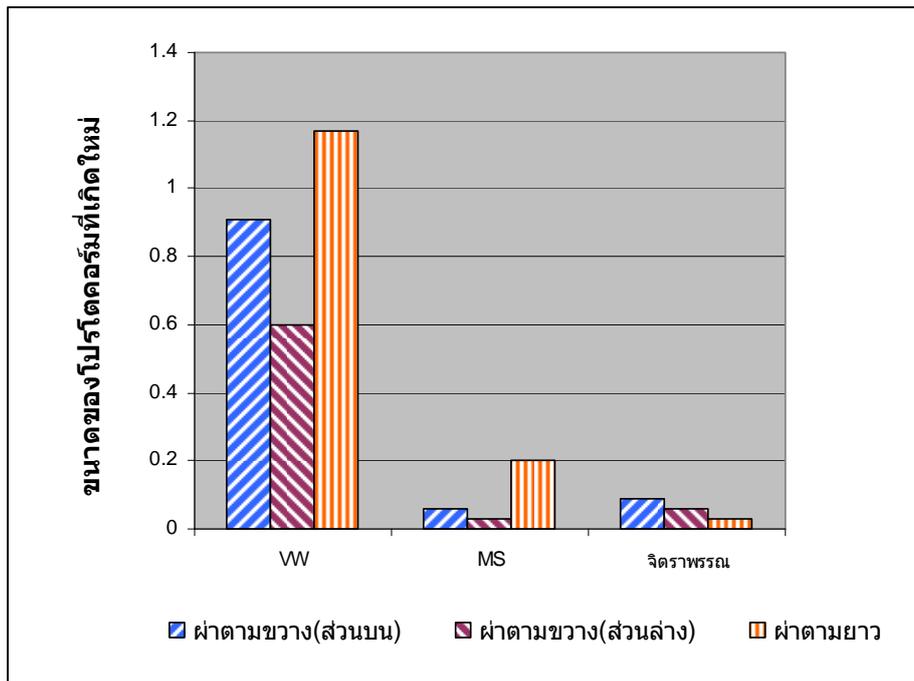
ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยร้อยละของอัตราการรอดชีวิตและมีโปรโตคอร์มใหม่เพิ่มขึ้นจากการผ่าตามแนวขวางและแนวยาวและ บนสูตรอาหารต่าง ๆ และเพาะเลี้ยงนาน 45 วัน

การผ่าโปรโตคอร์ม	VW	MS	จิตราพรรณ
การผ่าโปรโตคอร์มแนวขวาง(ส่วนด้านบน)	65.71	5.71	8.57
การผ่าโปรโตคอร์มแนวขวาง(ส่วนด้านล่าง)	48.57	2.86	5.71
การผ่าโปรโตคอร์มแนวยาว	56	16	2

อัตราการเกิดโปรโตคอร์มใหม่

เมื่อโปรโตคอร์มที่เกิดใหม่เจริญเติบโตขึ้น และให้คะแนนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโปรโตคอร์มที่เกิดใหม่นี้ พบว่า โปรโตคอร์มที่ผ่าตามแนวยาว และเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ให้ค่าเฉลี่ยขนาดของโปรโตคอร์มสูงสุด 1.17 คะแนน รองลงมาก็คือ

โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ใช้เทคนิคการผ่าโปรโตคอร์มตามแนวขวาง (ส่วนด้านบน) มีค่าเฉลี่ย 0.91 คะแนน และเขียนกราฟได้ดังกราฟที่ 1



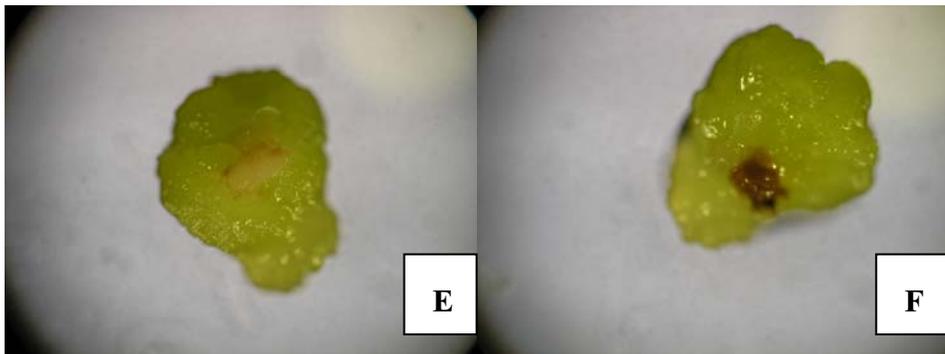
กราฟที่ 1 คะแนนขนาดของโปรโตคอร์มที่เกิดขึ้นใหม่ในสูตรอาหารต่างๆ



ภาพที่ A,B โปรโตคอร์มใหม่ที่เกิดจากการผ่าตามแนวขวาง(ส่วนบน) ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW



ภาพที่ C,D โปรโตคอร์มใหม่ที่เกิดจากการผ่าตามแนวยาว ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW



ภาพที่ E,F โปรโตคอร์มใหม่ที่เกิดจากการผ่าตามขวาง(ส่วนล่าง) ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า อัตราการรอดชีวิตและมีการเติบโตเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มเอื้องเงินหลวงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่มีการผ่าตามแนวขวาง(ด้านบน) และแนวยาวและมีค่าเฉลี่ยสูงสุดที่สุด คือ ร้อยละ 65.71 และร้อยละ 56.0 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Rosmah และคณะ (2006) ที่ได้ทดลองตัดบริเวณส่วนฐานโปรโตคอร์ม *Phalaenopsis gigantean* พบว่าจำนวนโปรโตคอร์มที่เพิ่มขึ้น บนอาหารสูตร XER และเติมน้ำมะพร้าว 15% ร่วมกับ ถ่านกัมมันต์ 2.5 กรัม มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด คือ 4.24 ± 2.89 ส่วนโปรโตคอร์มที่ไม่ได้ทำการตัดแบ่งและเลี้ยงบนอาหารสูตร XER ที่เติมน้ำมะพร้าว 20% และไม่เติมถ่านกัมมันต์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโปรโตคอร์มใหม่มากที่สุดคือ 0.72 ± 0.57 แต่การทดลองนี้ต่างจากการทดลองของ Park และคณะ (2002) ที่ได้ทำการศึกษาการเพิ่มจำนวนของโปรโตคอร์มของ *Doritaenopsis* ลูกผสมโดยการตัดแบ่งชิ้นส่วนของใบ และเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ สูตร MS ที่เติม BA Zeatin และ TDZ และจากการทดลองพบว่า TDZ สามารถกระตุ้นให้เกิดโปรโตคอร์มใหม่ได้ดีกว่า BA และ zeatin

จากการผ่าโปรโตคอร์ม ค่าเฉลี่ยการให้คะแนนแจกแจงขนาดโปรโตคอร์มและมีค่าสูงสุด พบว่า โปรโต-คอร์มที่ทำการผ่าตามแนวยาวและเลี้ยงบนอาหารสูตร VW มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 1.17 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ราฮีมา (2549) ที่ทำการทดลองผ่าโปรโตคอร์มลูกผสมของ *Phalaenopsis* ตามแนวยาวและเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติมน้ำตาลทราย 0, 2 และ 5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5, 1, 2 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยของคะแนนที่ให้กับขนาดโปรโตคอร์มมีค่าเฉลี่ยสูงสุดคือ โปรโตคอร์มที่ผ่าตามแนวยาวและเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำตาลทราย และเติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 1.84

สรุป

การเพิ่มจำนวนของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงโดยใช้เทคนิคการตัดผ่าแบ่งโปรโตคอร์มตามแนวขวางแบ่งเป็นด้านบนและด้านล่างและตามแนวยาว พบว่า การผ่าโปรโตคอร์มทั้งตามแนวขวางด้านบน ตามแนวยาวและเลี้ยงบนอาหารสูตร VW MS และจิตราพรรณ พบว่า

สูตร VW ให้โปรโตคอร์มมีอัตราการรอดชีวิตและเติบโตเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มสูงสุด คิดเป็นร้อยละ 65.71 และร้อยละ 56.0 ตามลำดับ

จากการให้คะแนนการเกิดโปรโตคอร์มใหม่จากชิ้นส่วนของโปรโตคอร์มที่ตัดแบ่งทั้งแนวขวาง (ด้านบนและด้านล่าง) และแนวยาว พบว่าโปรโตคอร์มที่เกิดขึ้นใหม่จากโปรโตคอร์มที่ตัดตามแนวยาวและเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ให้ผลค่าเฉลี่ยการเกิดโปรโตคอร์มใหม่ได้ดีที่สุดคือ ร้อยละ 1.17 รองลงมาคือ โปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ใช้เทคนิคการผ่าโปรโตคอร์มตามแนวขวาง(ส่วนบน) ร้อยละ 0.91

เอกสารอ้างอิง

- [1] จิตราพรรณ พิสิฎ. 2536. การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้. ภาควิชาพืชสวน. คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- [2] ขวลิต ดาบแก้ว. 2542. การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สำหรับผู้เริ่ม. พิมพ์ครั้งที่ 2. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
- [3] ราธิมา วาแมตธิชา. 2549. การชักนำ protocorm-like bodies จากโปรโตคอร์มและต้นกล้ากล้วยไม้ฟาแลนนอพิษลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- [4] ส่องสภณ บุญเกิด. 2545. ผลของปุ๋ยกล้วยไม้และวิตามินรวมต่อการเจริญเติบโตของเอื้องผาเวียงในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- [5] อุทัย จารณศรี. 2543. หลักการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.
- [6] อบฉันท์ ไทยทอง. 2545. กล้วยไม้เมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 3. บ้านและสวน., กรุงเทพฯ
- [7] Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
- [8] Park S.Y., Yeung, D.Chakrabarty and K.Y. Paek. 2002. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells

- of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. *Plant cell report*. 21 : 46-51.
- [9] Rosmah Murdad and et.al. 2006. High frequency multiplication of *Phalaenopsis gigantean* using trimmed bases protocorms technique. *Scientia Horticulturae*. 111: 73-79 .
- [10] Vacin, E. and F.W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.*110: 605 – 613.