

ปัจจัยที่มีผลต่อการงอกและการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ พญาจันทร์ (*Vandopsis gigantea* (Lindl.) Pfitz.) ในหลอดทดลอง

ศิริวารินทร์ ธิบูลย์¹ และ อารักษ์ จันทศิลป์²

Abstract

Thibul, S. and Jantasilp, A

Factors affecting seed germination and protocorm development of
Vandopsis gigantea (Lindl.) Pfitz. *in vitro*

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2006, 28(2) : 277-284

Seeds of *Vandopsis gigantea* (Lindl.) Pfitz. germinated with highest percentage of $60.62 \pm 7.24\%$ on modified VW (Vacin and Went, 1949) medium supplemented with coconut water under light condition. Light not only caused seed germination percentage significantly higher than in darkness ($p < 0.01$), it also induced normal protocorm development to a more advanced stage than those in dark condition. Protocorms after 14-16 weeks of culture in the dark formed abnormal elongated shape and some eventually terminated their growth and finally became brown. The addition of coconut water to basal medium also induced higher percentage of seed germination than that without coconut water ($p < 0.05$). Although, protocorm development in both types of media was comparatively normal, coconut water seemed to promote development slightly more progressive than without coconut water. After 14-16 weeks of culture, most protocorms with coconut water formed 1-2 small expanding leaves while those without coconut water developed only the acute end of shoot initial. Lastly, seed germination in liquid or solid medium was not significantly different, however, protocorms in the latter developed slightly more quickly.

Key words : *Vandopsis gigantea* (Lindl.) Pfitz., seed germination, protocorm development, *in vitro*

Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, 90112 Thailand

¹วท.บ.(ชีววิทยา) ²D. Agr. Sc. (Biotechnology) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: arak.j@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 15 กรกฎาคม 2548 รับลงพิมพ์ 17 สิงหาคม 2548

บทคัดย่อ

ศิริวารินทร์ ธิบูลย์ และ อารักษ์ จันทศิลป์

ปัจจัยที่มีผลต่อการงอกและการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้พญาจักรที่ตัด

(*Vandopsis gigantea* (Lindl.) Pfitz.) ในหลอดทดลอง

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2549 28(2) : 277-284

เมล็ดกล้วยไม้พญาจักรที่ตัด (*Vandopsis gigantea* (Lindl.) Pfitz.) มีการงอกสูงสุดถึง 60.62±7.24% เมื่อเพาะในอาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949) ดัดแปลง เติมน้ำมะพร้าวและเพาะในสภาพที่ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เนื่องจากเมล็ดที่เพาะในสภาพที่ให้แสงนอกจากจะมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่าที่เพาะในที่มืดอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) แล้ว ยังทำให้โปรโตคอร์มมีการเจริญเป็นปกติจนมีใบเกิดขึ้น ขณะที่โปรโตคอร์มในที่มืดมีการเจริญผิดปกติจากโปรโตคอร์มที่เป็นก้อนกลมมีการเจริญยืดยาวขึ้นในสัปดาห์ที่ 14-16 หลังจากเพาะ นอกจากนี้บางส่วนยังหยุดการเจริญและตายในที่สุด ส่วนอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว ทำให้เมล็ดงอกได้ดีกว่าที่ไม่เติมน้ำมะพร้าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่การเจริญของโปรโตคอร์มไม่ต่างกัน โดยมีการเจริญเป็นปกติ เพียงแต่การเจริญในอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเข้าสู่ระยะต่าง ๆ เร็วกว่าอาหารไม่มีน้ำมะพร้าว โปรโตคอร์มเริ่มมีใบขนาดเล็กตั้งแตสัปดาห์ที่ 14-16 ขณะที่ในอาหารที่ไม่มีน้ำมะพร้าว โปรโตคอร์มมีเพียงปลายยอดแหลมเท่านั้น ส่วนการงอกของเมล็ดในอาหารแข็งและอาหารเหลวไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตาม โปรโตคอร์มในอาหารแข็งเจริญเร็วกว่าในอาหารเหลวเล็กน้อย

ประเทศไทยเป็นถิ่นกำเนิดและแหล่งกระจายพันธุ์กล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก มีกล้วยไม้พื้นเมืองมากถึง 167 สกุล 1,140 ชนิด (อบฉันท, 2543) ส่วนใหญ่พบมากทางตอนใต้และตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศไทย (Schuiteman and de Vogel, 2000) นอกจากนี้ยังมีหลายชนิดที่พบเฉพาะภาคใต้ ตัวอย่างเช่น เอื้องปากนกแก้ว (*Dendrobium cruentum* Rchb. F.) เต่าทอง (*Eria ornata* Blume Lindl.) และรองเท้านารีหลายชนิด ซึ่งปัจจุบันพบว่าปริมาณลดลงอย่างมาก จนอาจใกล้สูญพันธุ์ไปแล้ว (อบฉันท, 2543) สาเหตุที่กล้วยไม้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์เกิดจากการลักลอบนำออกจากป่าเป็นจำนวนมากเพื่อการค้า นอกจากนี้ ยังมีการส่งออกไปยังต่างประเทศ โดยเฉพาะชนิดที่มีดอกสวยงามหรือมีคุณสมบัติทางยา อีกสาเหตุที่สำคัญคือการลดลงของพื้นที่ป่าไม้ซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยของกล้วยไม้ป่า (Alphonso, 1986) ด้วยสาเหตุดังกล่าว การอนุรักษ์กล้วยไม้ป่าจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ปัจจุบันนิยมใช้วิธีการอนุรักษ์นอกแหล่งธรรมชาติ (*ex situ* conservation) โดยเก็บรวบรวมต้นพันธุ์ไว้ที่สถานีวิจัย (Thammasiri *et al.*, 1986) หรือเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์หรือโปรโตคอร์ม (protocorm) ในอุณหภูมิต่ำหรือแช่แข็ง (cryopreservation) (ครรชิต, 2547; Kadzimin,

1986; Sagawa, 1990; Seaton, 2000a; Boonyakitjinda and Kwankua, 2548) นอกจากนี้ยังอาจนำโปรโตคอร์มมาเก็บรักษาไว้ในรูปของเมล็ดเทียม (Meesuk, 1998)

การเพาะเมล็ดเป็นการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ทางหนึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนต้นให้มากขึ้น เพื่อแจกจ่ายให้ผู้สนใจทำหัตถการนำกล้วยไม้ออกจากป่า นอกจากนี้ยังอาจนำกลับเข้าไปปลูกในป่า เพื่อเพิ่มจำนวนให้มากขึ้น สาเหตุที่ต้องเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในหลอดทดลอง เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก เอ็มบริโอหยุดเจริญอยู่ในระยะรูปร่างกลมที่มีเพียงไม่กี่เซลล์เท่านั้น (Vellupillai *et al.*, 1997) ไม่มีเอนโดสเปิร์มไว้เลี้ยงต้นอ่อน หรือถ้ามีก็น้อยมาก ในธรรมชาติเมล็ดกล้วยไม้จะงอกได้ต้องอาศัยเชื้อราไมคอร์ไรซาเจริญร่วมกันแบบสมชีพ (symbiosis) นอกจากนี้การงอกของกล้วยไม้แต่ละชนิดยังมีความจำเพาะกับสายพันธุ์ของเชื้อรา Chou และ Chang (2004) ศึกษาการงอกแบบสมชีพของกล้วยไม้ที่ใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรค 2 ชนิดคือ *Anoectochilus formosanus* กับ *Haemaria discolor* โดยเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อไมคอร์ไรซา *Rhizoctonia* spp. 3 สายพันธุ์ (isolate) พบว่าเชื้อราทำให้เมล็ดงอกได้ดี โดยมีเส้นใยแทรกเข้าไปอยู่ในโปรโตคอร์ม ส่วนเมล็ดที่ไม่มีเชื้อราไม่สามารถงอกได้ ตรงกันข้ามเชื้อราไมคอร์ไรซาไม่มี

ผลต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *Platanthera clavellata* ในระยะแรก แต่มีผลต่อการเจริญจนได้เป็นต้น (Zettler and Hofer, 1998)

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้อีกวิธีหนึ่งที่ไม่ต้องอาศัยเชื้อราไมคอร์ไรซา (asymbiotic seed germination) ทำได้โดยเพาะในอาหารสังเคราะห์ในหลอดทดลอง (Seaton, 2000b; 2000c; 2000d) สูตรอาหารที่นิยมใช้คือ Knudson C (Knudson, 1946) และสูตร VW (Vacin and Went, 1949) ดัดแปลงโดยเติมน้ำมะพร้าว (Goh, 1990; Sagawa, 1986, 1991) เนื่องจากเป็นสูตรแบบง่าย ๆ และมีสารอาหารเพียงพอสำหรับการเจริญเป็นโปรโตคอร์ม การศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในเมล็ดของหวายตะมอย (*Dendrobium crumenatum*) ขณะกำลังงอก (Vellupillai et al., 1997) พบว่าในระยะแรกมีการใช้โปรตีนที่เป็นอาหารสะสม (storage body) ในเซลล์ของเอ็มบริโอ แล้วมีการสังเคราะห์โปรตีนใหม่เพิ่มขึ้น เพื่อใช้ในการเจริญในระยะต่อมา การเพิ่มขนาดของเอ็มบริโอเกิดจากการเพิ่มขนาดของเซลล์ที่ด้านโคน (proximal end) เป็นส่วนใหญ่ การเจริญในระยะต่อมาจะเกิดไรซอยด์ (rhizoid) บริเวณส่วนโคน แล้วมีใบขนาดเล็กที่ด้านปลายยอด (distal end) และรากที่โคน (Zettler and Hofer, 1998) มีรายงานความสำเร็จในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ ยี่โถปีนัง (*Arundina graminifolia*) จนเกิดเป็นต้นที่มีรากสมบูรณ์ (บุญยืน, 2525) การเพาะเมล็ดเอื้องลำต้อ (*Pholidota articulata* Lindl) ในอาหาร VW และ Knudson C (มนตรี, 2538) นอกจากนั้นยังมีรายงานความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนต้นจากต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดของกะระระร้อน (*Cymbidium aloifolium*) เอื้องสาย (*Dendrobium aphyllum*) และเอื้องจำปา (*Dendrobium moschatum*) (Nayak et al., 1997b) การชักนำให้เกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของ *Acampe praemorsa* (Nayak et al., 1997a) และ *Cymbidium ensifolium* var. *misericors* (Chang and Chang, 1998) การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและผงถ่านกัมมันต์ต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าหวายเหลืองจันทบูร (*Dendrobium friedericksianum* Rchb.f) (สมพร และนัยนา, 2547) และผลของความเข้มแสงต่อการเติบโตของต้นกล้าเอื้องพร้าว (*Phaius tankervilleae*) และฟ้ามูย (*Vanda coerulea*) พบว่า

ความเข้มแสง $74 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ทำให้มีการเจริญเติบโตดีที่สุด (Soontornchainaksaeng et al., 2001)

พญาจันทร์ (*Vandopsis gigantea*) เป็นกล้วยไม้ที่มีขนาดใหญ่ ดอกมีขนาดใหญ่สวยงามมีการกระจายพันธุ์ตั้งแต่พม่าลงมาทางภาคใต้ของไทย ปัจจุบันพบน้อยลงมาก (อบจันทร์, 2543) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มจำนวนต้นให้มากขึ้นจากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง โดยศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญของโปรโตคอร์ม

อุปกรณ์และวิธีการ

เมล็ดกล้วยไม้พญาจันทร์ได้มาจากการผสมตัวเองโดยช่วยผสมเมื่อดอกบานเต็มที่ (Figure 1) หลังจากติดฝักประมาณ 8 เดือน จึงตัดฝักที่สมบูรณ์มาตัดแต่งและทำความสะอาดด้วยน้ำยาทำความสะอาดเครื่องแก้ว (Teepol™) หลังจากนั้นนำมาฆ่าเชื้อโดยฉีดพ่นฝักด้วยแอลกอฮอล์ 70% แล้วจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% นำไปผ่านเปลวไฟ รอจนไฟดับจึงผ่าฝักเปิดออก แล้วแช่เมล็ดลงในอาหารเหลว

อาหารเพาะเมล็ดใช้สูตร VW (Vacin and Went, 1949) ดัดแปลง โดยให้ธาตุเหล็กในรูป $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.85 มก./ลิตร ผสมกับ Na_2EDTA 37.25 มก./ลิตร และน้ำตาล 2% อาหารมี 2 แบบคือ แบบเติมน้ำมะพร้าว 15% และแบบไม่เติมน้ำมะพร้าว มีทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลว อาหารแข็งเตรียมโดยใส่ผงขุ่น 0.7% และเทใส่จานเพาะเลี้ยง ส่วนอาหารเหลวเตรียมใส่ฟลาสก์ขนาด 125 มล. ฟลาสก์ละ 25 มล. หลังจากนั้นดูดเมล็ดที่กระจายอยู่ในอาหารเหลวตามที่ต้องการไว้ข้างต้น 1 มล. ใส่ในอาหารที่เตรียมไว้ทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลว อาหารเหลวนำไปวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบ/นาที นำชุดการทดลองทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลวไปเลี้ยงทั้งในที่มืดและที่สว่างโดยให้ความเข้มแสงประมาณ 2,500 ลักซ์ (Lux) ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน ที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$

หลังจากเพาะเมล็ดจนได้โปรโตคอร์มที่เริ่มเกิดเป็นใบ นำมาตรวจนับจำนวนเมล็ดที่งอกในทุกชุดการทดลอง ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ (จานเพาะเลี้ยงหรือฟลาสก์)



Figure 1. *Vandopsis gigantea* (Lindl.) Pfitzer inflorescence with mature flowers ready for hand pollination. Flowers \varnothing approx. 7 cm.

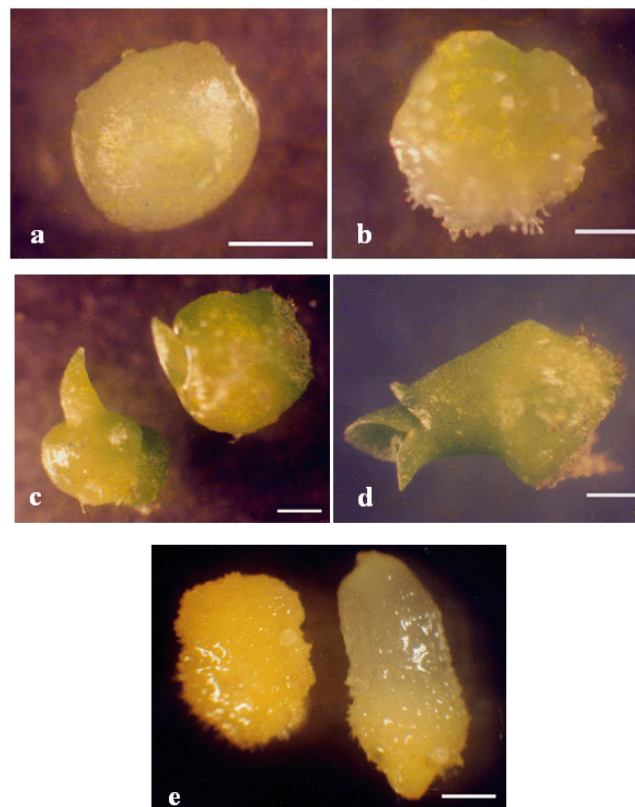


Figure 2. A sequence of protocorm development from seeds germinating on Vacin and Went medium supplemented with coconut water. a - d, under light condition and e, in darkness. a, globular protocorm, 7-8 weeks after sowing. b, protocorm with papillae, 11 weeks. c, protocorms with acute end of shoot initial, 14-16 weeks. d, protocorm with 1-2 small expanding leaves, 18 weeks. e, pale creamy, elongated protocorms with acute shoot end, 14-16 weeks in dark condition. Scale bar = 1 mm.

ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การงอกนำมาแปลงเป็นค่าอาร์คไซน์ก่อนนำไปวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) แบบจำแนก 2 ทาง (อภิญา, 2531) ส่วนการเจริญของเมล็ดได้จากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเมล็ดจนได้เป็นโปรโตคอร์มที่มีใบ

ผลการทดลอง

ปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดพญาจันทร์

หลังจากเพาะ 3-4 สัปดาห์ เอ็มบริโอภายในเมล็ดเริ่มบวมพองขยายขนาดหลุดออกจากเยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) แล้วมีการเจริญมากขึ้นจนมีใบขนาดเล็ก 1-2 ใบในสัปดาห์ที่ 18-20 จากการตรวจสอบการงอกของเมล็ดในสัปดาห์ที่ 20 ปรากฏว่าเมล็ดที่เพาะในอาหารแข็งเติมน้ำมะพร้าวในสภาพที่ให้แสงมีการงอกดีที่สุด มีค่าเฉลี่ย $60.62 \pm 7.24\%$ (Table 1) จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวทำให้เมล็ดงอกได้ดีกว่าอาหารที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว ($p < 0.05$) ส่วนเมล็ดที่เพาะในอาหารแข็งและอาหารเหลวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมล็ดที่เพาะในสภาพที่ให้แสงมีการงอกได้ดีกว่าเมล็ดที่เพาะในที่มืด และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) นอกจากนี้ยังพบว่าผลของปัจจัยทั้งสาม (อาหารแข็ง-อาหารเหลว การใส่น้ำมะพร้าวและการให้แสง) ต่อการงอกของเมล็ดไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน

การเจริญของเอ็มบริโอในสภาวะการเพาะเมล็ดแบบต่าง ๆ

ในช่วงแรกของการเจริญของเอ็มบริโอจากเมล็ดที่เพาะในสภาวะแบบต่างๆ ไม่แตกต่างกัน โดยเอ็มบริโอเริ่มขยายขนาดเป็นก้อนกลมใหญ่ขึ้นจนต้นเยื่อหุ้มเมล็ดออกมาในช่วงสัปดาห์ที่ 3-4 ต่อมาโปรโตคอร์มขยายขนาดเป็นก้อนกลมใหญ่ขึ้นจนสังเกตเห็นได้ในสัปดาห์ที่ 7-8 ข้อแตกต่างของเมล็ดที่เพาะในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงมีเพียงโปรโตคอร์มมีสีเขียวเมื่อได้รับแสง (Figure 2a) ขณะที่เพาะในที่มืด โปรโตคอร์มมีสีขาวครีม หลังจากนั้นมีความช้าเร็วในการเจริญแตกต่างกันเล็กน้อย ในเมล็ดที่เพาะไว้ในที่ให้แสง พบว่าโปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารผสมน้ำมะพร้าวมีการเจริญเร็วกว่าในอาหารที่ไม่ใส่น้ำมะพร้าวเล็กน้อย ต่อมาในสัปดาห์ที่ 11 เกิดปุ่มเล็ก (papillae) ที่ผิวก่อนโปรโตคอร์ม (Figure 2b) โดยเฉพาะโปรโตคอร์มบนอาหารแข็งมีจำนวนปุ่มมากกว่าในอาหารเหลว ในสัปดาห์ที่ 14-16 โปรโตคอร์มมีปลายแหลมยื่นออกมา (Figure 2c) ซึ่งเป็นส่วนที่จะกลายเป็นใบ ต่อมาในสัปดาห์ที่ 18 โปรโตคอร์มมี 1-2 ใบ (Figure 2d) บางโปรโตคอร์มในอาหารแข็งที่เติมน้ำมะพร้าว พบว่ามี 3 ใบ อย่างไรก็ตามจนถึงสัปดาห์ที่ 20 ก็ยังไม่มีรากเกิดขึ้น

ส่วนเมล็ดที่เพาะในที่มืดในช่วงแรกมีการเจริญของเอ็มบริโอเป็นปกติคล้ายกับเมล็ดที่เพาะในที่ที่มีแสง จนถึง

Table 1. Effects of medium solidification, addition of coconut water (CW) and culture illumination on *in vitro* seed germination (% , mean±SE) of *Vandopsis gigantea* (Lindl.) Pfitz.

VW medium (Vacin & Went 1949)		Culture condition	
		Light	Dark
+ CW	Liquid	54.24 ± 3.49	23.44 ± 2.98
	Solid	60.62 ± 7.24	15.71 ± 0.70
- CW	Liquid	39.71 ± 6.21	12.74 ± 1.47
	Solid	38.04 ± 7.43	13.83 ± 1.82

ANOVA of % seed germination:

Culture illumination $p < 0.01$
 CW addition $p < 0.05$
 Medium solidification non-significant
 Interaction non-significant
 3 replications

สัปดาห์ที่ 10 โดยโพโทคอร์รมีลักษณะเป็นก้อนกลมสีเขียวครีม บางส่วนมีปุ่มเล็กครอบก้อนโพโทคอร์รม ต่อมาโพโทคอร์รมส่วนใหญ่หยุดการเจริญและตายไปในที่สุด ส่วนโพโทคอร์รมที่เหลือมีการเจริญที่ผิดปกติในช่วงสัปดาห์ที่ 14-16 โดยมีลักษณะเป็นก้อนยี่ดยาว สีเหลืองใส ปลายด้านหนึ่งมีลักษณะเป็นยอดแหลม (Figure 2e) เมื่อสังเกตต่อมาจนถึงสัปดาห์ที่ 22 พบว่าโพโทคอร์รมไม่มีการเปลี่ยนแปลงและหยุดการเจริญเติบโต

สรุปและวิจารณ์

กล้วยไม้พญาจันทร์พันธุ์มีอายุการถือฝักนานมากเมล็ดที่นำมาเพาะมาจากฝักแก่ที่ยังมีสีเขียว (green pod) อายุประมาณ 8 เดือน หลังจากเพาะเมล็ดในหลอดทดลองพบว่า การเจริญของเอ็มบริโอใช้เวลาเหมือนกัน จากการสังเกตจนถึง 4-5 เดือนหลังจากเพาะ พบโพโทคอร์รมมีการเจริญจนมีใบขนาดเล็กเท่านั้น จะเห็นได้ว่าการเจริญของเอ็มบริโอหลังปฏิสนธิใช้เวลานานมาก แตกต่างจากหวายตะมอย (*D. crumenatum*) ที่เริ่มมีส่วนของใบและรากภายใน 1 เดือน (Vellupillai *et al.*, 1997) ยี่โถปีนัง (*A. graminifolia*) มีการเจริญจนได้ต้นกล้า พร้อมถ่ายออกปลูกภายใน 4 เดือน (บุญยืน, 2525) และเอื้องลำต้อ (*Pholidota articulata*) เจริญเป็นต้นภายใน 2 เดือนครึ่ง (มนตรี, 2538) การเจริญเติบโตของเอ็มบริโอจากเมล็ดจนได้ต้นกล้าช้า อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กล้วยไม้ชนิดนี้ลดปริมาณลงในปัจจุบัน

ในการทดลองครั้งนี้การงอกของเมล็ดค่อนข้างต่ำ (12-61%) เนื่องจากการตรวจนับเมล็ดงอกทำหลังจากเพาะ 20 สัปดาห์ ซึ่งบางชุดการทดลองเอ็มบริโอเจริญจนมีใบจริง 1-2 ใบ และบางชุดการทดลองโดยเฉพะที่เพาะในที่มืด เอ็มบริโอส่วนใหญ่หยุดการเจริญและตายไปแล้ว จากข้อมูลจะเห็นว่าเมล็ดที่เพาะในสภาวะให้แสงมีการงอกดีกว่าที่เพาะในที่มืด แสงจึงจำเป็นต่อการงอกและการเจริญของเมล็ดกล้วยไม้พญาจันทร์ เช่นเดียวกับหวายตะมอย (Vellupillai *et al.*, 1997) ยี่โถปีนัง (บุญยืน, 2525) และเอื้องลำต้อ (มนตรี, 2538) โพโทคอร์รมที่เจริญในที่มืดมีลักษณะกลม สีขาวครีม ต่อมาเกิดเป็นก้อนยาวและหยุดการเจริญเติบโต ซึ่งต่างจากโพโทคอร์รมในที่สว่างที่มีสีเขียว

และเจริญจนมีใบขนาดเล็ก ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะโพโทคอร์รมสีเขียวสามารถสร้างอาหาร ช่วยให้มีการเจริญได้ดีขึ้น ส่วนอาหารเพาะเมล็ดที่เติมน้ำมะพร้าว (CW) ทำให้เมล็ดงอกได้ดีกว่าอาหารที่ไม่มีน้ำมะพร้าว แตกต่างจากเอื้องลำต้อที่น้ำมะพร้าวไม่มีผลต่อการงอก (มนตรี, 2538) นอกจากนั้นโพโทคอร์รมในอาหารที่มีน้ำมะพร้าวยังมีขนาดใหญ่กว่าและสีเขียวเข้มกว่าอาหารที่ไม่มีน้ำมะพร้าว แต่การเจริญต่อมามีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยโพโทคอร์รมที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเจริญเร็วกว่า การที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่าน้ำมะพร้าวมีสารอินทรีย์หลายชนิดรวมทั้งไซโทไคนิน และทำให้ pH ของอาหารเปลี่ยนแปลงน้อย (Goh, 1990 ; Sagawa, 1991) ส่วนการงอกของเมล็ดในอาหารเหลวและอาหารแข็งไม่แตกต่างกันทางสถิติ เพียงแต่โพโทคอร์รมในอาหารแข็งเจริญเร็วกว่าในอาหารเหลว โพโทคอร์รมเริ่มมีใบตั้งแต่สัปดาห์ที่ 14-16 หลังเพาะเมล็ด ขณะที่ยังไม่พบในอาหารเหลว อย่างไรก็ตาม โพโทคอร์รมในอาหารเหลวก็เริ่มเกิดปลายยอดแหลมเช่นกันในสัปดาห์ที่ 18 ซึ่งต่างจากการเจริญของโพโทคอร์รมยี่โถปีนังที่ไม่สามารถเจริญต่อจนเกิดยอดและรากในอาหารเหลว ยกเว้นย้ายมาเลี้ยงในอาหารแข็ง จึงจะเจริญต่อจนได้เป็นต้น (บุญยืน, 2525)

จากการทดลองสรุปได้ว่าเมล็ดกล้วยไม้พญาจันทร์งอกและเจริญได้ดีในอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าวและเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง อาจเพาะเมล็ดในอาหารแข็งได้เลย เนื่องจากอาหารแข็งและอาหารเหลวไม่มีความแตกต่างของการงอกของเมล็ด นอกจากนั้นอาหารแข็งยังทำให้โพโทคอร์รมเจริญได้ดีอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

- ครรรชิต ธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อมรินทร์พรินติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ. 282 หน้า
- บุญยืน กิจวิจารณ์. 2525. การขยายพันธุ์กล้วยไม้พันธุ์ยี่โถปีนังในอาหารปลอดเชื้อ. ว.วิทยาศาสตร์ มข. 10: 131-137.
- มนตรี ไวยครุฑ. 2538. การงอกและการเจริญของกล้วยไม้เอื้องลำต้อ (*Pholidota articulata* Lindl.). โครงการงานทางชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 48 หน้า
- สมพร ประเสริฐสงสกุล และ นัยนา ศรีชัย. 2547. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต และผงถ่านกัมมันต์ ต่อการ

- พัฒนาการขยายพันธุ์กล้วยไม้หวายเหลืองจันทบูร. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 26(5): 757-763.
- อบฉันทน์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ. 461 หน้า
- อภิญา วงศ์กิตติการ. 2531. สถิติสำหรับชีววิทยา. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา. 362 หน้า
- Alphonso, A.G. 1986. The importance of conservation of orchid species in Southeast Asia. Proc. 6th ASEAN Orchid Cong. Chuan Printing Press, Bangkok. Pp. 37-40.
- Boonyakitjinda, V. and Kwankua, W. 2548. Cryopreservation of some wild orchid seeds. Proc. 14th Nat. Gen. Cong., Genetics: From Basics to Molecular Technology, Bangkok, Mar. 11-13, 2005: 432-436.
- Chang, C. and Chang, W.C. 1998. Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. Plant Cell Reports 17: 251-255.
- Chou, L.C. and Chang, D.C.N. 2004. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Anoectochilus formosanus* and *Haemaria discolor* and their F₁ hybrids. Bot. Bull. Acad. Sin. 45: 143-147.
- Goh, C.J. 1990. Orchid, monopodials. In Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R. and Bajaj, Y.P.S. (eds.). Handbook of Plant Cell Culture: Ornamental Species. McGraw-Hill Publishing Company, New York. Pp. 598-637.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. Amer. Orchid Soc. Bull. 14(3): 214-217.
- Kadzimin, S.R. 1986. Cryogenic preservation of orchid germplasm. Proc. 6th ASEAN Orchid Cong. Chuan Printing Press, Bangkok. Pp. 73-78.
- Meesuk, S. 1998. Preservation of Some Thai Native Orchid Species by Synthetic Seed Technique. M.S. Thesis (Agriculture). Available: <http://www.Chiangmai.ac.th/abstract/1998/Abstract/agi/abstract/agi980084.html> (10/4/46).
- Nayak, N.R., Patnaik, S. and Rath, S.P. 1997a. Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. Plant Cell Reports 16: 583-586.
- Nayak, N.R., Rath, S.P., and Patnaik, S. 1997b. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch - Ham) Sw. through thidiazuron induced high frequency shoot proliferation. Sci. Hort. 71: 243-250.
- Sagawa, Y. 1986. Orchid propagation: past, present and future. Proc. 6th ASEAN Orchid Cong. Chuan Printing Press, Bangkok. Pp. 9-12.
- Sagawa, Y. 1990. Orchids, other considerations. In Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R. and Bajaj, Y.P.S. (eds.). Handbook of Plant Cell Culture: Ornamental Species. Mc Graw-Hill Publishing Company. New York. Pp. 638-653
- Sagawa, Y. 1991. Clonal propagation of orchids. In Lindsey, K. (ed.). Plant Tissue Culture Manual C 1: 1-7. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Schuiteman, A. and de Vogel, E. 2000. Orchid Genera of Thailand, Laos, Cambodia, and Vietnam. National Herbarium Nederland, Leiden, the Netherlands.
- Seaton, P. 2000 a. Growing orchids from seed. Part 1: seed storage. The Orchid Review 108 (1231): 55-58 .
- Seaton, P. 2000 b. Growing orchids from seed. Part 2: a guide to sowing. The Orchid Review 108 (1232):107-110.
- Seaton, P. 2000 c. Growing orchids from seed. Part 3: making up the medium. The Orchid Review 108 (1234): 237-240.
- Seaton, P. 2000 d. Growing orchids from seed. Part 4: taking care of your flasks. The Orchid Review 108(1235): 317-319.
- Soontornchainaksaeng, P., Chaicharoen, S., Sirijuntarut, M. and Kruatrachue, M. 2001. *In vitro* studies on the effect of light intensity on plant growth of *Phaius tankervilleae* (Banks ex L' Herit.) Bl. and *Vanda coerulea* Griff. ScienceAsia 27(4): 233-237.
- Thammasiri, S., Lertrusdachakul, B., Jainim, W., and Nukularn, P. 1986. Germplasm collection of Thai orchid species. Proc. 6th ASEAN Orchid Cong. Chuan Printing Press, Bangkok. Pp. 88-90.
- Vacin, E. and Went, F. 1949. pH changes in nutrient

solution. Bot. Gaz. 110. 605-613.

Vellupillai, M., Swarup, S. and Goh, C.J. 1997. Histological and protein changes during early stages of seed germination in the orchid, *Dendrobium*

crumenatum. J. Hort. Sci. 72(6): 941-948.

Zettler, L.W. and Hofer, C.J. 1998. Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. Environmental and Experimental Botany 39: 189-195.