การศึกษาทดลองในแง่ต่าง ๆ ของแผ่นดินเย็น (*Nervilia aragoana* Gaud.) ซึ่งเป็นกล้วยไม้ป่าที่กระจายพันธุ์ในสภาพธรรมชาติในศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ แบ่งออกเป็นการทดลองย่อย คือ 1) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาควิทยา เซลล์วิทยา และรูปแบบไอโซไซม์ 2) การศึกษาการเจริญเติบโต และ 3) การผสมเกสร การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ และการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากตาใบ การศึกษาดังกล่าวนี้กระทำกับต้นพืชซึ่งมีลักษณะแตกต่างกัน 2 ตัวอย่าง ซึ่งให้ชื่อรหัสเป็น HKRC01 และ HKRC02

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นพืช HKRC01 และ HKRC02 คล้ายคลึงกันคือ รากเกิดออกมาจากหัว จากลำต้นใต้ดิน และจากไหล ลำต้นมีทั้งที่เป็นลำต้นจริงและลำต้นซึ่งแปรรูปอยู่ 2 ลักษณะ ได้แก่ แปรรูปเป็นหัวแบบคอร์ม และแปรรูปเป็นไหล ใบมีเพียง 1 ใบต่อต้น ใบเป็นแบบพับจีบรูปหัวใจ ช่อดอกเป็นแบบช่อกระจะ ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศแบบสมมาตรด้านข้าง มีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ กลีบดอก 3 กลีบ กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีสีเขียวอ่อน กลีบปากมีสีขาว มีขนอ่อนสีขาวและม่วงแดงกระจายอยู่ทั่วกลีบ ฝักเป็นแบบผลแห้งแตก ภายในมีเมล็ดลักษณะเป็นผงบรรจุอยู่มากมาย ต้นพืช 2 รหัสแตกต่างกันตรงที่ HKRC01 มีใบที่ใหญ่กว่า ก้านใบและก้านช่อดอกยาวกว่า HKRC02

ลักษณะทางกายวิภาควิทยาของส่วนประกอบของต้นพืช 2 รหัส มีความคล้ายคลึงกัน โดยมีความแตกต่างในรายละเอียดในบางส่วน ภาคตัดขวางของรากแสดงเนื้อเยื่อผิวที่มีชั้นของเซลล์ผิว มีเนื้อเยื่อคอร์เทกซ์ และ สตีลที่มีลักษณะของเซลล์ ตลอดจนจำนวนชั้นของเซลล์แตกต่างกัน ระบบท่อลำเลียงมีลักษณะเป็นกระบอกท่อลำเลียง มีโฟลเอ็มและไซเล็มเรียงตัวแบบรัศมี มีเนื้อเยื่อแกนกลาง ภาคตัดขวางของก้านใบแสดงรูปแบบของเนื้อเยื่อผิว เนื้อเยื่อพื้นและเนื้อเยื่อท่อลำเลียงในลักษณะเดียวกัน แตกต่างกันที่ขนาดของมัดท่อลำเลียงและปริมาณของเซลล์สเคลอเรงคิมาที่อยู่รอบ ๆ เนื้อเยื่อของใบของพืช 2 รหัส แสดงความแตกต่างที่ขนาดและรูปร่างของเซลล์ผิวและมัดท่อลำเลียงของเส้นใย โดยที่ HKRC01 มีขนาดใหญ่กว่า

การศึกษาเทคนิคการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากเพื่อศึกษาโครโมโซม แสดงให้เห็นว่า พืชทั้ง 2 รหัสสามารถใช้กรรมวิธีการปฏิบัติแบบเดียวกันได้ผลโดยที่มีข้อแตกต่างเพียงช่วงเวลาของกรรมวิธีเก็บตัวอย่างปลายรากเท่านั้น กล่าวคือ HKRC01 เก็บตัวอย่างปลายรากเวลา 11.00 น. ส่วน HKRC02 เวลา 7.00 น. จากนั้นหยุดวงชีพเซลล์ในสารละลาย para-dichlorobenzene เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง และย้อมด้วยสี carbol fuchsin นาน 30 นาที ผลการนับจำนวนโครโมโซม คือ 2n = 144 ใน HKRC01 และ 2n = 72 ใน HKRC02 สำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์จากใบโดยใช้เอนไซม์ 10 ชนิดทดสอบ พบว่า สามารถแยกกลุ่มต้นพืชออกเป็น 2 กลุ่ม สอดคล้องกับความแตกต่างในลักษณะอื่น ๆ ที่ศึกษาไว้แล้ว สอดคล้องกับการแบ่งโดยจำนวนโครโมโซม

การเจริญเติบโตของพืช 2 รหัสเป็นไปในลักษณะเดียวกัน คือ เป็นพืชหลายฤดูที่ผลัดใบ มีการเจริญเติบโตเป็นวงจรปีที่มีการเจริญเติบโตของดอกและใบสลับกับการพักตัวและมีการผลัดใบก่อนพักตัวในฤดูแล้ง ช่วงของการเจริญเติบโตคือ ระหว่างเดือนมีนาคมถึงตุลาคม โดยมีการออกดอกในต้นฤดู ความแตกต่างปรากฏตรงที่ HKRC01 เริ่มวงจรช้ากว่า 1 เดือน และพักตัวช้ากว่า

การศึกษาความเป็นไปได้ของการผสมเกสรให้ดอกโดยวิธีผสมด้วยมือนั้น พบว่า ทำได้สำเร็จ และดอกที่ได้รับการผสม ติดฝัก 100% เมื่อผสมเกสรในช่วง 7.00-11.00 น. ฝักที่ได้รับการผสมและมีอายุ 3, 5, 10 และ15 วันนั้น ได้มีการนำไปทดสอบการเพาะเมล็ดจากฝักอ่อนโดยนำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง VW ดัดแปลง (CMU1) ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ไม่ประสพผลสำเร็จ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาใบของ HKRC02 ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้ชิ้นส่วนจากพืชที่ปลูกเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ พบว่าการเพาะเลี้ยงไม่ประสพผลสำเร็จเช่นกันเนื่องจากเกิดการปนเปื้อน และเมื่อเปลี่ยนมาเป็นการใช้เนื้อเยื่อของปลายไหลมาเพาะเลี้ยงแทนพบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 17 สัปดาห์ เนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D และ TDZ นั้นให้ผลคือ สารทั้ง 2 ชนิด

204133

ให้ผลที่ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุม ทั้งในแง่ของการเกิดไหลจากเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง และคุณภาพของไหล นอกจากนี้ยังพบว่าไม่เกิดผลในการชักนำให้เกิดยอดและรากจากชิ้นส่วนที่เลี้ยงอีกด้วย

ผลของการศึกษาลักษณะของต้นพืช 2 รหัสได้บ่งบอกถึงความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาค เซลล์วิทยา และรูปแบบไอโซไซม์ของต้นพืชทั้ง 2 รหัสได้ อย่างค่อนข้างจะชัดเจน จึงน่าจะเพียงพอที่จะแยกต้นพืชดังกล่าวออกเป็นพันธุ์ได้ 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ HKRC01 และ HKRC02

Abstract

204133

Studies in various aspects concerning *Nervilia aragoana* Gaud., a species of wild orchid naturally grown at Huai Hong Khrai Royal Development Study Centre, was carried out. The studies included 1) characterization of the plants via morphological, anatomical, cytological and isozyme pattern studies, 2) growth and development of the plants and 3) pollination and *in vitro* cultures of immature seeds as well as vegetative tissue.

Morphological studies of 2 *Nervilia* accessions coded as HKRC01 and HKRC02 revealed resemblance of most of the plants' components. Roots originated from three different plant parts, i.e. the corm, the underground stem and the stolon. The stem, in time, could modify to form stolons of which their tips enlarged and became the storage organs of cormous shape. Solitary leaf was of plicate type with heart shape. Perfect flowers of bilateral symmetry were borne on a racemose inflorescence. A flower obtained 3 sepals and 2 petals of green colour. The lip was white covered with white and reddish purple soft hair. The pod of capsule type was also green, bearing enormous amount of dust-liked seeds.

Anatomical studies showed similar tissue systems of the root. A cross section of the root revealed epidermis, cortex and stele with slight differences in respects of the shape and size of the cells and the number of cell layers comprising each tissue system. Vascular cylinder

of radius type of phloem and xylem tissues surrounded the pith. Cross sections of basal petiole represented the stem tissue systems, of which some differences in the bundle size and the coverage areas of sclerenchyma cells of HKRC01 vs HKRC02 could be detected. As for the leaf anatomy, the size of epidermal cells could also tell the differences.

Chromosome investigation via squash technique of root-tip tissue revealed the most suitable protocol for root-tip tissue preparation, i.e. 11.00 a.m. and 7.00 a.m. for root sampling of HKRC01 and HKRC02, respectively. Pretreatment in PDB should take 1 hour while staining needed only 30 minutes in carbol fuchsin. The chromosome number of HKRC01 was 2n = 144 and that of HKRC02 was 72.

Isozyme pattern studies using 10 enzyme systems were successful to express different patterns of the coloured bands. Cluster analysis could allocate tested plants into 2 groups, relavant to their chromosome counts.

Observation on the annual growth cycle of the HKRC01 and HKRC02 plants showed deciduous herbaceous perennial behaviour of the plants. Such cycle started with flowering in March followed by vegetative growth of which lasted until the beginning of dormant period in October. Plants of HKRC02 started the cycle one month earlier.

Hand pollination was tried with the plants of HKRC02. Success was made when the flowers were pollinated during 7.00 to 11.00 a.m. Pods obtained from the trials were used for immature seed culture, aseptically, on modified VW (CMU1) agar medium. All treatments concerning the pod age failed. The seeds were found undeveloped.

Vegetative bud culture were also experimented but the problems of contamination was too serious. Stolon tips were used instead, and they could survive in 2,4-D and TDZ cultures, but no shoot/root induction occurred.

It can be concluded from characterization studies of HKRC01 and HKRC02, especially by the chromosome counts, that the two groups could be justified as two different varieties.