ชื่อเรื่อง	ชีววิทยาและการขยายพันธุ์กล้วยไม้น้ำ *Epipactis flava* Seidenf.
ผู้วิจัย	บวร คุณากรนุรักษ์
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด
กรรมการที่ปรึกษา	ดร.สันติ วัฒฐานะ
	ดร.กนกอร ศรีม่วง
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ,
	มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2556
คำสำคัญ	กล้วยไม้น้ำ สภาพปลอดเชื้อ การอนุรักษ์

บทคัดย่อ

กล้วยไม้น้ำ (*Epipactis flava* Seidenf.) จัดเป็นพืชถิ่นเดียวในประเทศไทยที่อยู่ในสถานภาพถูกคุกคามและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ การศึกษาชีววิทยาและการขยายพันธุ์กล้วยไม้น้ำในหลอดทดลอง ถูกนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาบางประการสำหรับศึกษาการเจริญเติบโต รวมถึงการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน จากการศึกษาข้อมูลชีพลักษณ์ และลักษณะการเจริญเติบโตของกล้วยไม้น้ำ พบว่ามีวัฏจักรการเจริญเติบโต 2 ช่วงฤดูกาลในรอบปี คือในช่วงฤดูฝน ปริมาณน้ำในลำธารที่เพิ่มสูงขึ้น กล้วยไม้น้ำจะมีการพักตัวชั่วคราวเหลือเพียงแต่เหง้าและรากเกาะติดอยู่กับโขดหิน เมื่อปริมาณน้ำในลำธารลดน้อยลงในช่วงฤดูหนาว กล้วยไม้น้ำจะเริ่มเกิดการเจริญและการพัฒนาทางด้านลำต้น ออกดอกและติดฝักในช่วงฤดูร้อน สภาพนิเวศตามธรรมชาติ พบว่า ความเข้มของแสงแดดเป็นปัจจัยสำคัญ โดยกล้วยไม้น้ำกอเจริญเติบโตในที่ร่ม (108.58 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) จะมีพัฒนาการด้านความสูงของลำต้น และขนาดของพื้นที่แผ่นใบมากกว่ากอกล้วยไม้น้ำที่เจริญเติบโตในที่กลางแจ้ง (414.39 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) อย่างมีนัยสำคัญ ในทางตรงข้าม ร้อยละการสร้างช่อดอกของกอกล้วยไม้น้ำที่เจริญในที่กลางแจ้งมากกว่าในที่ร่ม สำหรับการศึกษารูปแบบการผสมเกสร พบว่า ฝักอายุ 6 สัปดาห์ ที่เกิดจากการผสมเกสรข้ามดอก หรือภายในดอก นั้นจะมีขนาดไม่แตกต่างกัน เมื่อศึกษาโครงสร้างกายวิภาค พบว่า รากปรากฏชั้นเนื้อเยื่อเซลล์ผิวเพียงชั้นเดียว มัดท่อลำเลียงจำนวนห้าแฉก เหง้ามีเนื้อเยื่อชั้นคอร์เทกซ์หนา ซึ่งโครงสร้างทั้งสองส่วนจะสะสมเม็ดแป้งไว้ภายในเซลล์จำนวนมาก แตกต่างจากโครงสร้างของลำต้น แผ่นใบบาง เซลล์ผิวใบบริเวณมัดท่อลำเลียง มีลักษณะเป็นปุ่มยื่นออก (Papillae) บริเวณก้านช่อดอกมีกลุ่มเซลล์ไฟเบอร์ล้อมรอบหนาเป็นพิเศษ

ในการศึกษารูปแบบผสมเกสรและอายุพัฒนาการของฝักต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ฝักที่อายุ 6 สัปดาห์ หลังจากได้รับการผสมเกสรข้ามดอก สามารถชักนำให้เมล็ดเกิดกระบวนการงอกและการพัฒนาได้ดีที่สุด เมื่อระยะเวลาผ่านไป 10 สัปดาห์ จากการศึกษาปัจจัยบางประการที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนยอดใหม่ต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำในหลอดทดลอง พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงสูตร 1/2VW (1949) สามารถกระตุ้นให้ต้นอ่อนสร้างหน่อใหม่เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 1.31 หน่อต่อต้น และการให้แสงสว่างเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน ทำให้ต้นอ่อนสร้างหน่อใหม่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงที่สุด (1.72 หน่อต่อต้น) ในขณะที่ค่าความเป็นกรดด่างภายในอาหารที่ 5.2 สามารถชักนำให้ต้นอ่อนเพิ่มจำนวนหน่อใหม่เฉลี่ยมากขึ้นที่สุด (3.00 หน่อต่อต้น) เมื่อเพาะเลี้ยงผ่านไป 16 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม การเติมน้ำมะพร้าวอ่อน 75 มิลลิลิตร ร่วมกับน้ำต้มมันฝรั่ง 12.5 - 25 กรัมต่อลิตร หรือการเติมน้ำมะพร้าวอ่อน 125 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับน้ำต้นมันฝรั่ง 25.0 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ต้นอ่อนสร้างหน่อเพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงที่สุด (2.53, 2.27 และ 2.00 หน่อต่อต้น ตามลำดับ) นอกจากนี้ ยังพบว่า อาหารเพาะเลี้ยงที่เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ต้นอ่อนสร้างหน่อเพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงที่สุด (3.50 และ 3.56 หน่อต่อต้น ตามลำดับ) ในขณะที่ IBA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้จำนวนรากเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 6.5 รากต่อต้น และยังพบว่า การเลี้ยงต้นอ่อนในระบบอาหารเหลวแบบเขย่า สามารถกระตุ้นให้ต้นอ่อนผลิตหน่อใหม่สูงที่สุดเฉลี่ย 4.30 หน่อต่อต้น เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสถานะกึ่งแข็ง และแบบสองสถานะ เมื่อนำกอกล้วยไม้น้ำขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 เซนติเมตร) ในสภาพปลอดเชื้อที่อายุ 28 เดือน ออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก เป็นเวลา 14 สัปดาห์ พบว่า มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถสร้างหน่อใหม่ได้มากที่สุด (100 เปอร์เซ็นต์) เมื่อปลูกลงในวัสดุผสมระหว่างเม็ดดินเผาและเม็ดหินภูเขาไฟ (1: 1)

Title	BIOLOGY AND EX SITU PROPAGATION OF *EPIPACTIS FLAVA* SEIDENF.
Author	Boworn Kunakhonnuruk
Advisor	Assistant Professor Anupan Kongbangkerd, Dr.rer.nat.
Co - Advisor	Santi Watthana, Ph.D.
	Kanok-orn Srimuang, Ph.D.
Academic Paper	Thesis M.S. in Biotechnology, Naresuan University, 2013
Keywords	*Epipactis flava* Seidenf., *In vitro*, Conservation

ABSTRACT

Epipactis flava Seidenf., an endemic of Thailand, is threatened and endangered species. Biology and *in vitro* propagation of *E. flava*, were studied to obtain information associated with biological growth and micropropagation, for the conservation and sustainable use in the future. The phenology and growth characteristic of *E. flava* were investigated and revealed that the growing season was divided into two phases a year. In the rainy season, the water in the stream increases, *E. flava* was submerged for several months and remaining only its rhizomes and roots adhering to the limestone. The growth for vegetative period recurred again when the water reducing in the mid of winter season and flowering until fruit setting in the summer. The ecological study indicated that, light intensity is a crucial factor and essential for growth, flowering and fruit set of *E. flava*. The results showed that the longer shoot length and size of leave area could observe from shading plants (108.58 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ of light intensity) than the outdoor growing plants (414.39 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ of light intensity). In contrast, the outdoor growing plants showed the higher percentage of flowering than the shading plants. Different pollination patterns (cross-pollination/self-pollination) had no effected on development of 6 weeks-old pod. An anatomical investigation of various parts of *E. flava* i.e. root, rhizome, stem, leaf, inflorescence and pod, was performed. The results showed the epidermal cell was found one single layer and vascular bundles in the central cylinder of roots were radial pentarch. The primary cortex of rhizomes comprised of 19-20

parenchyma cell layers, both accumulate many starch grains which are not found in stem and leaf structure. Leaf surface presenting of papillae above veins. Lots of fiber cells were displayed in inflorescence structure.

Different types of pollination and pod ages were effective for *in vitro* asymbiotic seed germination and development. The results indicated that the highest percentage of seed germination and protocorm development could observe from 6 weeks-old pod of cross pollination after 10 weeks culture. Factors affecting *in vitro* propagation of *E. flava* were also studied. The better shoot induction (1.31 shoots) could obtain when half-strength Vacin and Went (1/2VW) (1949) medium was used. The higher shoot regeneration number (1.72 shoots) could receive when cultured under 12 hrs photoperiod while pH in culture medium at 5.2 was influence on shoot proliferation (3.00 shoots) after 16 weeks culture. However, 1/2VW medium supplemented either with 75 ml/l coconut water or 12.5-25.0 g/l potato extract or adding 125 ml/l coconut water with 25.0 g/l potato extract improved shoot multiplication (2.53, 2.27 and 2.00 shoots per seedling, respectively). Adding plant growth regulators to the medium could increase the number of regenerated shoots. The results showed that the higher shoot induction number (3.50 and 3.56 shoots) could receive when 0.1 mg/l TDZ or 1.0 mg/l 2,4-D were added to the medium, respectively whereas the culture medium added with 2.0 mg/l IBA could stimulate the highest root number (6.5 roots). However, the highest shoot regeneration number (4.30 shoots) was observed when the liquid culture system was performed. Large clumps (diameter 2.0 cm) at 28 months of *in vitro* plantlets were transferred to acclimatize in the greenhouse conditions for 14 weeks. The results indicated that the highest survival rate (100%) could receive in all potting media whereas the highest regeneration rate (100%) could observe when plantlets were cultivated in mix potting media (Hydroton and Pumice 1: 1).