ชื่อวิทยานิพนธ์ การชักนำและการเจริญของดอกกล้วยไม้หวายตะมอย (*Dendrobium crumenatum* Swartz)

ผู้เขียน นางอุปถัมภ์ มีสวัสดิ์

สาขาวิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2548

บทคัดย่อ

ศึกษารูปแบบและสภาวะที่จำเป็นต่อการออกดอกของกล้วยไม้หวายตะมอย *(Dendrobium crumenatum* Sw.) ทั้งในธรรมชาติและจากการชักนำให้ออกดอก พบว่า ช่อดอกในธรรมชาติของกล้วยไม้มีจำนวน 3 ตาดอกที่มีระยะการเจริญ (developmental stage) ที่แตกต่างกัน และมีเพียงตาดอกที่อยู่ในระยะการตอบสนอง (responsive stage) เท่านั้น ที่สามารถเจริญและออกดอกได้ในอีก 9 วันต่อมา (days to anthesis; DTA=9) หลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยปัจจัยทางธรรมชาติที่จำเพาะเจาะจง ปัจจัยดังกล่าวคือการลดลงอย่างรวดเร็วของอุณหภูมิ เป็นผลเนื่องจากเกิดฝนตกหนักหลังเที่ยงวัน โดยมีการลดลงของอุณหภูมิเฉลี่ย 7.66- 9.69 °C ภายใน 1-2 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนการลดของอุณหภูมิประจำวันทั่วไปหลังเที่ยงวันซึ่งมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 1.86-2.69 °C ภายใน 1-2 ชั่วโมงตามลำดับไม่มีผลต่อการกระตุ้นการเจริญของตาดอก ซึ่งในระยะดังกล่าวจะพบดอกขนาดเล็ก (miniature flower) มีองค์ประกอบอวัยวะดอกครบสมบูรณ์ (complete floral structures) แต่การเจริญของละอองเรณูยังอยู่ในระยะก่อนเข้าการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (premeiotic stage) สามารถตรวจพบการเจริญเป็นละอองเรณูที่เติบโตเต็มที่มี 2 นิวเคลียส ในอีก 3 วันก่อนการออกดอก เมื่อศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่กระตุ้นให้มีการเจริญของตาดอก พบว่า กล้วยไม้ที่ได้รับอุณหภูมิต่ำ (8±2 °C) ในที่มืด และกล้วยไม้ที่ได้รับอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนนำมาวางที่อุณหภูมิต่ำในที่มืดเป็นเวลา 1 และ 5 ชั่วโมง สามารถออกดอกได้ในอีก 19 (DTA=19) และ 21 วันต่อมา (DTA=21) เมื่อศึกษาปัจจัยทางชีวภาพพบว่า การให้กรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) และเบนซิลอดีนีน (BA) แยกกัน สามารถกระตุ้นให้กล้วยไม้ออกดอกได้ในเวลาต่อมา แต่การให้ฮอร์โมนทั้งสองชนิดร่วมกันในเวลาเดียวกันไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการออกดอกได้ การให้ GA_3 ที่ความเข้มข้น 10^{-2} M สามารถชักนำให้เกิดการออกดอกได้อีก 10 วันต่อมา (DTA=10) ส่วนการให้ BA ที่ความเข้มข้น $10^{-1} – 10^{-2}$ M สามารถชักนำให้กล้วยไม้ออกดอกได้ในอีก 9 และ 11 วันต่อมาตามลำดับ (DTA=9,11) การให้ BA ความเข้มข้น 10^{-1} M ให้

ค่า DTA=9 เหมือนกับที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ และสามารถกระตุ้นให้ตาดอกของกล้วยไม้แต่ละต้นมีการเจริญต่อไปได้ อย่างไรก็ตาม พืชจะตอบสนองเมื่อตาดอกอยู่ในระยะการตอบสนองเท่านั้น

เพื่อผลิตกล้วยไม้รูปแบบเดียวในปริมาณที่มาก นำไปใช้ในการชักนำดอกในหลอดทดลอง โดยการเพาะเลี้ยงตาข้างเพื่อชักนำแคลลัสบนอาหารดัดแปลงสูตร Vacin and Went (1949) ที่มีน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร ร่วมด้วยกรดแนพธาลีนอซิติก (NAA) 0.5 μM และ BA 4.4 μM ที่ pH 5.3 นำแคลลัสที่ได้มาเพิ่มปริมาณโดยใช้ ฮอร์โมน BA ร่วมกับ NAA และเปปโทน ส่วนการเจริญเป็น protocorm-like bodies (PLBs) ต้องการน้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริม การเกิดเป็นต้นสามารถเกิดได้เอง คุณภาพและปริมาณมากน้อยขึ้นกับอาหารที่ใช้ก่อนหน้านี้ และสามารถใช้เปปโทนเป็นอาหารเสริมได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโต จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่า การเจริญเติบโตเป็นต้นกล้วยไม้ เป็นผลจากกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส (somatic embryogenesis) และออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis) สำหรับการชักนำการออกดอกในหลอดทดลอง จะนำ PLBs เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Knudson (1946) ที่มีน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15% และ BA 5 μM ที่ pH 5.3 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที หลังจากเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์จะเกิดยอดขนาดเล็ก นำยอดที่ได้เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิม แต่เปลี่ยนความเข้มข้นเป็น BA 25 μM เก็บตัวอย่างทุกอาทิตย์เพื่อนำมาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาและโครงสร้างผิว ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบการสร้างใบประดับแรกหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 8 สัปดาห์ การโค้งมนของ floral apex และการแบนตรงส่วนกลางของ floral apex ในสัปดาห์ที่ 15 และ 16 ตามลำดับ พบการสร้างปุ่มกลีบเลี้ยงและกลีบดอกในเวลาต่อมา แต่การสร้างตาดอกจะมีความผิดปกติหากปล่อยให้มีการเจริญในอาหารเหลวต่อไป ในระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวให้ย้ายต้นที่มีส่วนปลายยอดลักษณะยาวและเรียวแหลมไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร Knudson ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15% และ BA 5 μM ปิดทับด้วยอาหารเหลวสูตรเดิมแต่เพิ่มความเข้มข้นเป็น BA 25 μM วางในห้องเพาะเลี้ยงควบคุมอุณหภูมิและแสง เมื่อต้นมีความสูงประมาณ 5-8 เซนติเมตร ย้ายไปปลูกเลี้ยงในเรือนเพาะชำภายใต้สภาวะแวดล้อมธรรมชาติ พบว่า ต้นดังกล่าวสามารถออกดอกได้ในเวลาเดียวกันกับการออกดอกของพืชที่ปลูกเลี้ยงในธรรมชาติเมื่อพืชจากทั้งสองแหล่งได้รับการกระตุ้นด้วยปัจจัยธรรมชาติพร้อมกัน ด้วยวิธีดังกล่าว สามารถทำให้พืชออกดอกได้ในเวลา 8-12 เดือน ภายใต้สภาวะแวดล้อมธรรมชาติ แต่ไม่สามารถชักนำให้ออกดอกในหลอดทดลอง

Thesis Title	Floral Induction and Development of the Pigeon Orchid (*Dendrobium crumenatum* Swartz)
Author	Mrs. Upatham Meesawat
Major Program	Biology
Academic Year	2005

ABSTRACT

Pattern of and requirements for flowering of the pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Sw.) were investigated both under natural and induced conditions. The natural inflorescence comprised of three floral buds, each at different developmental stages. Only one floral bud at the responsive stage could be stimulated to flowering nine days later (days to anthesis, DTA=9) after a specific natural stimulation. This natural stimulus was a sudden drop in temperature as a result from heavy rainfall after noon time. The average decrease in temperature on the induction day can be markedly different at 7.66-9.69°C within 1-2 h However, a slight difference of 1.86-2.69°C within 1-2 h on a general day resulted from the decreasing temperature after noon time could not stimulate further floral development. The plant would flower when its floral bud was at the responsive stage. This stage showed the miniature flower with complete floral parts and the pollen mother cell was still in the pre-meiotic stage. The mature pollen grains showing two nuclei appeared three days before anthesis. The physical stimulus required for flowering was investigated. Both cold treatment (8±2°C, in darkness) for a period of 1 and 5 h and a pre-heat treatment (37°C) before cold treatment for the same periods could induce the flowering 19

(DTA=19) and 21 (DTA=21) days after treating, respectively. The biological stimulus was also investigated. Gibberellic acid (GA_3) and benzyladinine (BA) applied separately could induce flowering but simultaneous application of both failed to induce flowering. Application of 10^{-2} M GA_3 could induce flowering 10 days later (DTA=10) and supply of 10^{-1} – 10^{-2} M BA could induce the flowering 9 and 11 days later (DTA=9, 11). Supply of 10^{-1} M BA gave the same DTA=9 compared to natural DTA and made floral buds of all individual plants developed.

In order to produce uniform plants, *in vitro* clonal propagation was carried out using bud culture. The modified Vacin and Went (1949) medium supplemented with 20 g l^{-1} sucrose, 2 g l^{-1} activated charcoal, and the combination of 0.5 μM Napthaleneacetic acid (NAA), 4.4 μM BA and 2 g l^{-1} peptone at pH 5.3, was used to induce callus. The suitable conditions for callus proliferation, protocorm-like bodies (PLBs) formation and proliferation and regeneration of shoots were examined. It was found that stage of callus induction and proliferation required combination of BA and NAA and 2 g l^{-1} peptone to promote growth. PLBs formation stage needed the additional of 10% coconut water (CW) as an additional nutrient while the quantity of shoot depended on the media used in the previous steps of experiment. Peptone could be added in the media at all three developmental stages as a minor substance. Histological observation suggested that plant regeneration was developed through both embryogenesis and organogenesis. *In vitro* floral organ induction and flowering system was conducted. The PLBs were cultured in liquid Knudson (1946) medium containing 20 gl^{-1} sucrose, 15 % CW and 5 μM BA at pH 5.3 on rotary shaker at 120 rpm. The mini-shoots were obtained four weeks after culture and they were transferred to the same medium supplemented with 25 μM BA to induce the floral

bud and flower. Samples were collected once a week and examined by light and scanning electron microscope. The first bract was initiated eight weeks after culture in liquid medium. The convex floral apex and the flattened floral apex with sepal initiation were shown on the 15^{th} week and the 16^{th} week after culture, respectively. The sepal and petal primordia could be further developed but malformed floral bud could be formed if explants were still cultured in liquid medium for a long time. When the emerging shoot apices were observed in liquid medium, they were then transferred to the same solid medium containing 5 μM BA covered with liquid medium supplemented with 25 μM BA. They were maintained in culture room until these plants attained 5-8 cm height and then transplanted to the natural greenhouse. The plants placed in the greenhouse from both experimental and natural sources could simultaneously bloom after the same natural stimulus. However, plants could flower within 8-12 months using this *in vitro* floral induction system but under natural greenhouse condition only. The *in vitro* flowering system was not successful.