นิพนธ์ต้นฉบับ

ปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดและการเพิ่มจำนวนยอดของหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes mirabilis* (Lour.) Druce) ในหลอดแก้ว

เขมิกา โขมพัตร[1] วัชรินทร์ โตขาว[1] และ อารักษ์ จันทศิลป์[2]

Abstract

Khompat, K., Tokhao, W., and Jantasilp, A.

Factors affecting *in vitro* seed germination and shoot multiplication of a pitcher plant (*Nepenthes mirabilis* (Lour.) Druce)

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2007, 29(2) : 253-260

Mature seeds of a pitcher plant (*Nepenthes mirabilis* (Lour.) Druce) were cultured in liquid and solid MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with BA (6-benzyladenine) at 1, 3 or 5 mg/l or with coconut water (20% v/v). The cultures were incubated under light and dark conditions. Seeds germinated only under light incubation and BA supplemented to both types of media, and solid medium with 3 mg/l BA resulted the highest seed germination (26%) with good development of seedlings. On the contrary, the addition of coconut water to the basal medium produced poor seed germination and seedling growth. Moreover, all cultures in liquid medium terminated their growth after 6 weeks of culture. Young seedlings were subsequently transferred to fresh media of the same treatments after 15 weeks of seed culture. Multiple shoots were proliferated in all levels of BA after 6 weeks of transferring and more shoots were produced as BA level was increased. However, at high BA level of 5 mg/l, rosetting of shoots occurred while lowering BA

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

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

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

รับต้นฉบับ 8 มิถุนายน 2549 รับลงพิมพ์ 20 กันยายน 2549

level to 3 mg/l, fewer shoots were produced but they were vigorous, larger shoots with complete leaves. Root development finally occurred in all BA treatments except the addition of coconut water.

To evaluate the potential of shoot multiplication in different strengths of MS macromutrient, two types of explants, viz. shoot explants and stem explants (both approx. 1.5 cm long) from *in vitro* seedlings, were cultured on full-strength MS macronutrient medium, 1/2 MS, 1/4 MS and 1/8 MS medium. Following 16 weeks of culture, shoot production (number/ explant) increased in both explant types as the macronutrient strength decreased. However, when lowering to 1/8 MS, the fewest shoots were produced and exhibited nutrient deficiency of leaf chlorosis. The optimum strength of MS macronutrient for the maximum production of normal shoots with complete leaves was 1/2 MS medium while 1/4 MS medium produced the highest shoot number from stem explants but shoots were small with abnormal narrow leaf blade. *In vitro* pitcher development occurred spontaneously in all levels of MS macronutrient .

Key words : *Nepenthes mirabilis* (Lour.) Druce, seed germination, shoot multiplication, *in vitro*

บทคัดย่อ

เขมิกา โขมพัตร วัชรินทร์ โตขาว และ อารักษ์ จันทศิลป์

ปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดและการเพิ่มจำนวนยอดของหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes mirabilis* (Lour.) Druce) ในหลอดแก้ว

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2550 29(2) : 253-260

เพาะเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes mirabilis* (Lour.) Druce) ในอาหารเหลวและอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม BA (6- benzyladenine) ความเข้มข้น 1,3 และ 5 มก./ลิตร หรือเติมน้ำมะพร้าว (20%) ทั้งในสภาพที่ให้แสงและในที่มืด พบว่าเมล็ดงอกได้เมื่อให้แสงและเติม BA ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง แต่ต้นอ่อนในอาหารเหลวหยุดการเจริญเติบโต 6 สัปดาห์หลังจากเพาะเมล็ด นอกจากนั้นยังพบว่าอาหารแข็งที่เติม BA เข้มข้น 3 มก./ลิตร มีเมล็ดงอกมากที่สุด (26%) ส่วนอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวเมล็ดงอกน้อยที่สุด (2%) และต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตไม่ดี เนื่องจากการงอกและการเจริญเติบโตช้ามาก จึงย้ายต้นอ่อนลงอาหารใหม่สูตรเดิมในสัปดาห์ที่ 15 หลังจากย้ายเลี้ยง 6 สัปดาห์ ต้นที่เลี้ยงบนอาหารเติม BA ทุกระดับมีการเจริญเติบโตและมีการแตกยอดมากขึ้นตามปริมาณ BA ที่เพิ่มขึ้น แม้ว่า BA 5 มก./ลิตรให้ยอดจำนวนมากที่สุด แต่เป็นยอดขนาดเล็กใบกระจุกแบบกุหลาบซ้อน (rosette) ส่วนที่ BA 3 มก./ลิตร ให้ยอดที่สมบูรณ์มีใบใหญ่กว่า ถึงแม้ว่าจะมีจำนวนยอดน้อยกว่าเล็กน้อย ทุกชุดการทดลองมีการเจริญของราก ยกเว้นในอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว

การศึกษาผลของการลดระดับธาตุอาหารหลักสูตร MS ต่อการเพิ่มจำนวนยอด โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช (explant) 2 แบบคือ ชิ้นส่วนยอด และชิ้นส่วนลำต้น (ทั้ง 2 แบบยาว ~ 1.5 ซม.) บนอาหารแข็งสูตร MS ปกติ และ 1/2 MS, 1/4 MS และ 1/8 MS หลังจากเพาะเลี้ยง 16 สัปดาห์ พบว่าการลดระดับธาตุอาหารหลักลงทำให้มีการเพิ่มจำนวนยอดจากชิ้นส่วนพืชทั้ง 2 แบบ ยกเว้น 1/8 MS ที่นอกจากให้ยอดจำนวนน้อยที่สุดแล้วยังแสดงอาการขาดธาตุอาหาร โดยใบแสดงภาวะพร่องคลอโรฟิลล์ (chlorosis) การลดระดับธาตุอาหารหลักในอาหารเพาะเลี้ยงเป็น 1/2 MS เป็นระดับที่เหมาะสมที่ให้ยอดจำนวนมาก ยอดมีขนาดใหญ่และมีใบที่สมบูรณ์ ส่วนชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/4 MS แม้จะเกิดยอดจำนวนมากที่สุด แต่เป็นยอดขนาดเล็ก แผ่นใบแคบผิดปกติ สำหรับการสร้างกระเปาะดักแมลงในขวดเพาะเลี้ยงเกิดได้เองในทุกระดับธาตุอาหารหลัก

หม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes* spp.) เป็นพืชที่อยู่ในกลุ่มพืชกินสัตว์ (carnivorous plants) โดยปลายใบเจริญเป็นกระเปาะดักจับแมลง (pitcher) ในประเทศไทยมีรายงานการพบพืชชนิดนี้อยู่ 5 ชนิด (ป่าไม้, 2544) คือ *N. ampullaria* Jack, *N. mirabilis* (Lour.) Druce, *N. gracilis* Korth., *N. smilesii* Hemsl. และ *N. thorelii* Lecomte สองชนิดแรกพบทางภาคใต้ของไทย เป็นชนิดที่ขึ้นในที่มีระดับความสูงไม่เกิน 1000 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล หรือ lowland species (Clarke, 1997) ถิ่นที่อยู่อาศัยมักจะเป็นที่เปิด ชื้นแฉะ ดินมีธาตุอาหารต่ำ โดยเฉพาะไนโตรเจนและฟอสฟอรัส เช่น ป่าพรุ ป่าบึง (swamp forest) หรือป่าชายหาด (heath forest) เป็นต้น ปัจจุบันแม้ว่าหม้อข้าวหม้อแกงลิงชนิด *N. mirabilis* (Lour.) Druce จะยังไม่จัดเป็นพืชอนุรักษ์ (Clarke, 1997) แต่ก็มีจำนวนลดลงมาก เนื่องจากถิ่นที่อยู่อาศัยถูกทำลาย เพื่อนำมาพัฒนาเป็นที่อยู่อาศัยและทำการเกษตร นอกจากนั้นยังมีอีกสาเหตุที่ทำให้ลดจำนวนลง เนื่องจากหม้อข้าวหม้อแกงลิงเป็นพืชที่มีดอกแยกเพศอยู่ต่างต้น (dioecious plant) ดังนั้นการผสมพันธุ์จำเป็นต้องมีต้นตัวผู้และต้นตัวเมียอยู่ในบริเวณใกล้กันและต้องมีพาหะถ่ายละอองเรณู (Kato, 1993) เมื่อมีการผสมติดจะเกิดฝักจำนวนมากและภายในฝักมีเมล็ดจำนวนมากเช่นกัน แต่เมล็ดส่วนใหญ่มักจะเป็นหมัน ดังมีรายงานว่า *N. lowii* มีเมล็ดเพียง 4.5% เท่านั้นที่มีเอ็มบริโอ (Kaul, 1982) นอกจากนั้นในเมล็ดยังมีเอนโดสเปิร์มน้อยมาก จึงทำให้เมล็ดมีโอกาสงอกน้อย และมีจำนวนน้อยที่อยู่รอดจนเป็นต้นโตให้ดอกและผล (Clarke, 1997) นอกจากสาเหตุเหล่านี้ยังมีการเก็บหม้อข้าวหม้อแกงลิงบางชนิดที่เหมาะเป็นไม้ประดับออกจากป่าเป็นจำนวนมาก ทำให้บางชนิดลดจำนวนลงอย่างมากจนเป็นพืชอนุรักษ์ที่ห้ามส่งขายระหว่างประเทศ เช่น *N. khasiana* Hook.f. และ *N. rajah* Hook.f. เป็นต้น อย่างไรก็ตามพืชเหล่านี้ถ้านำมาขยายพันธุ์ก็สามารถส่งออกได้ แต่ต้องขออนุญาตก่อน (Clarke, 1997)

การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนพืชได้ในเวลาอันสั้น โดยเฉพาะพืชที่ใกล้สูญพันธุ์ (endangered) ตัวอย่างเช่น หม้อข้าวหม้อแกงลิงชนิด *N. khasiana* Hook. f. ซึ่งเป็นพืชถิ่นเดียว (endemic) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย ปัจจุบันเหลืออยู่ในธรรมชาติน้อยมาก จึงมีความพยายามเพิ่มจำนวนโดยนำเมล็ดมาเพาะในสภาพปลอดเชื้อ แล้วนำส่วนใบ ลำต้น ปลายยอดและรากของต้นกล้ามาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ พบว่ามีเฉพาะส่วนลำต้นที่เกิดยอด 10-12 ยอดในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติม IAA 0.1 มก./ลิตร และ BA 2 มก./ลิตร เมื่อย้ายลงอาหารชักนำราก ยอด 80% เกิดราก (Rathore *et al.*, 1991) ต่อมา Latha และ Seeni (1994) ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นจากต้นกล้าในอาหาร 3 ชนิด พบว่าอาหารสูตร WPM (Woody Plant Medium) ให้ยอดจำนวนมากกว่าสูตร MS และ KC (*Knudson C*) ชิ้นส่วนลำต้น 95% เกิดยอดภายใน 7-8 สัปดาห์ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร WPM ที่เติม BA 2.2 μM (0.5 มก./ลิตร) เมื่อย้ายลงอาหารเดิม ยอดเกิดยืดยาวอย่างรวดเร็วและมีการแตกตาข้างเพิ่มมากถึง 6-12 ยอดจาก 1 ยอด ยอดเกิดรากภายใน 2 สัปดาห์ ในอาหารชักนำราก ขณะชักนำรากปลายใบเกิดกระเปาะจำนวนมาก เมื่อย้ายลงวัสดุปลูก 90-95% อยู่รอด นอกจากนี้ยังมีการนำหม้อข้าวหม้อแกงลิงอีกชนิดคือ *N. madagascariensis* Poir มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร KC ผสมสารอินทรีย์หลายชนิด ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์มากถึง 6-7 เท่า (Cerevcenko and Lavrent-eva, 1992)

นอกจากหม้อข้าวหม้อแกงลิงแล้ว ยังมีรายงานความสำเร็จในการนำพืชกลุ่มใกล้เคียงที่มีกับดักแมลงมาขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออีก 2 ชนิด คือ ต้นกาบหอยแครง (*Dionaea muscipula* Ellis ex L.) (Parliman *et al.*, 1982a, 1982b and Hutchinson, 1984) และหยาดน้ำค้าง (*Drosera rotundifolia*) (Bobak *et al.*, 1995)

การทดลองในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มจำนวนต้นจากการเพาะเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*N. mirabilis* (Lour.) Druce) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดและการเพิ่มจำนวนยอดจากต้นอ่อนและจากชิ้นส่วนลำต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง

ฝักแก่หม้อข้าวหม้อแกงลิงชนิด *N. mirabilis* (Lour.) Druce เก็บจากอำเภอสวี จังหวัดชุมพร นำเมล็ด (Figure 1) มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ (Clorox™) ความ

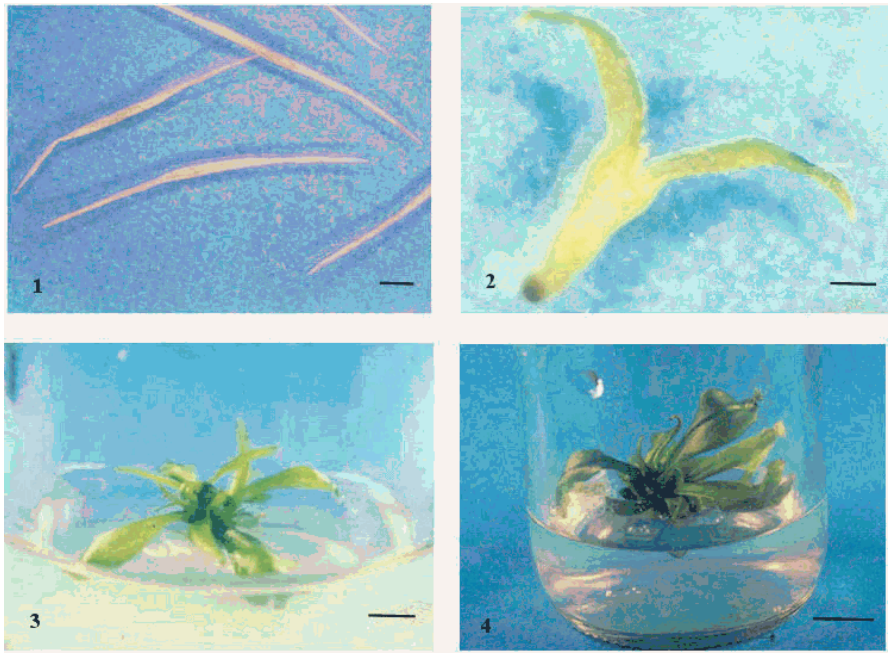

Figure 1. Mature seeds of *Nepenthes mirabilis* (Lour.) Druce prior to surface sterilization. (bar = 1 mm)
Figure 2. Light green embryo with expanding cotyledons germinated on MS solid medium supplemented with 3 mg/l BA under light condition, 6 weeks of culture. (bar = 0.5 mm)
Figure 3. Proliferated multiple shoots with complete leaves from a young seedling cultured on MS solid medium supplemented with 3 mg/l BA under light condition, 6 weeks after transferring (totally 21 weeks after sowing). (bar = 0.5 cm)
Figure 4. Vigorous multiple shoots with complete leaves proliferated on a stem explant cultured on half-strength MS macronutrient medium with 2 mg/l BA supplement for 16 weeks. (bar = 1.0 cm)

[Color figure can be viewed in the electronic version]

เข้มข้น 20% นาน 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง หลังจากนั้นเพาะเมล็ดบนอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MS เติม BA (6-benzyladenine) ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มก./ลิตร หรือเติมน้ำมะพร้าว 20% pH 5.8 อาหารแข็งเติมผงวุ้น 0.7% แต่ละขวดอาหารใส่เมล็ดประมาณ 60 เมล็ด/ขวดขนาด 4 ออนซ์ อาหารแข็งมี 8 ขวดต่อชุดการทดลอง ส่วนอาหารเหลวมี 4 ฟลาสก์/ชุดการทดลอง เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที สภาวะการเพาะเลี้ยงแบ่งเป็น 2 แบบ คือ เลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสงประมาณ 2,000-2,500 ลักซ์ (Lux) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน ที่อุณหภูมิ 25±2°C หลังจากเพาะเมล็ด 15 สัปดาห์ ตรวจนับจำนวนเมล็ดที่งอก เมล็ดที่ไม่งอกและเมล็ดตายที่มีเอมบริโอเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ พร้อมทั้งย้ายต้นอ่อนลงบนอาหารใหม่สูตรเดิมที่ใช้เพาะเมล็ดขวดละ 1 ต้น เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงหลังจากงอก

การเพิ่มจำนวนยอดจากชิ้นส่วนต้น

จากการที่ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงชอบขึ้นในสภาพดินที่มีธาตุอาหารจำกัด จึงศึกษาผลของการลดปริมาณธาตุอาหารหลักต่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนยอดจากชิ้นส่วนลำต้น โดยลดปริมาณธาตุอาหารหลัก (macronutrient) สูตร MS เหลือ 1/2, 1/4 และ 1/8 เท่า (เรียก 1/2 MS, 1/4

MS และ 1/8 MS) เปรียบเทียบกับสูตร MS ปกติ ทุกชุดการทดลองใช้อาหารแข็งและเติม BA 2 มก./ลิตร ชิ้นส่วนพืช (explant) ที่นำมาทดลองมี 2 แบบ คือชิ้นส่วนยอดและชิ้นส่วนลำต้น โดยนำต้นที่เพาะเลี้ยงไว้มาตัดรากและใบออก แล้วตัดแบ่งครึ่งเป็นชิ้นส่วนยอดและชิ้นส่วนลำต้น แต่ละแบบยาวประมาณ 1.5 ซม. นำมาวางเลี้ยงบนอาหารขวดละ 1 ชิ้น และสภาพการเลี้ยงเหมือนกับสภาพการเพาะเมล็ดแบบให้แสง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) แยกเป็น 2 การทดลอง คือการทดลองที่ใช้ชิ้นส่วนยอดและการทดลองที่ใช้ชิ้นส่วนลำต้น แต่ละการทดลองมี 4 ชุดการทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ

ผลการทดลอง

ผลของการเติม BA และน้ำมะพร้าวต่อการงอกของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง

จากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดพบว่ามีการปนเปื้อนมากถึง 60% แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคลอร็อกซ์เป็น 30% ทำให้มีการปนเปื้อนน้อยลง (เหลือประมาณ 10%) แต่เมล็ดไม่งอก จึงเหลือขวดเพาะเมล็ดที่รอดจากการปนเปื้อนจำนวนน้อย อย่างไรก็ตามพบว่าเมล็ดที่เพาะทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็งสามารถงอกได้เมื่อให้แสงเท่านั้น แต่ต้นอ่อนที่งอกในอาหารเหลวจะตายในสัปดาห์ที่ 6 ดังนั้นจึงไม่มีข้อมูลการเพาะเมล็ดในอาหารเหลว

เมล็ดที่เพาะบนอาหารแข็งเฉพาะที่ให้แสงเริ่มงอกในสัปดาห์ที่ 5-6 โดยงอกเป็นต้นอ่อนหลุดออกจากเยื่อหุ้มเมล็ด ส่วนเมล็ดที่เพาะในที่มืดไม่งอกและมีเมล็ดบางส่วนตายไป การเพาะในสภาพให้แสงเมื่อเติม BA ในอาหารทำให้เมล็ดงอกได้ทุกความเข้มข้น (Table 1) โดยเมล็ดที่เพาะบนอาหารแข็งเติม BA 3 มก./ลิตร มีการงอกมากที่สุด (26%) ขณะที่เพาะในอาหารไม่เติม BA ไม่มีการงอกเกิดขึ้น และการเติมน้ำมะพร้าวทำให้เมล็ดงอกน้อยมาก (2%) อย่างไรก็ตาม BA ทำให้มีเมล็ดตายมากกว่าอาหารที่ไม่เติม BA และที่เติมน้ำมะพร้าว (Table 1)

การเจริญเติบโตของต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิงในอาหารที่เติม BA และน้ำมะพร้าว

หลังจากเพาะ 6 สัปดาห์บนอาหารแข็งและให้แสงเมล็ดงอกโดยเอ็มบริโอ (embryo) เจริญหลุดออกจากเยื่อหุ้มเมล็ด ต้นมีสีเขียวอ่อน ใบเลี้ยงแผ่กางออก ส่วนโคนที่เจริญเป็นรากมีสีดำ (Figure 2) ต้นอ่อนเริ่มมีใบจริงในช่วงสัปดาห์ที่ 8-10 การเจริญเติบโตในระยะต่อมาค่อนข้างช้าจึงต้องย้ายต้นอ่อนลงอาหารใหม่สูตรเดิม (BA 1, 3 และ 5 มก./ลิตรหรือน้ำมะพร้าว 20%) ในสัปดาห์ที่ 15 เพื่อให้มีอาหารเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของต้นอ่อนและป้องกันการปนเปื้อนของสารที่ปล่อยออกมาจากเมล็ดที่ตาย หลังจากย้ายเลี้ยง 6 สัปดาห์ (21 สัปดาห์หลังเพาะเมล็ด) ต้นมีการเจริญเติบโตดีในอาหารที่เติม BA และมีการเกิดยอดรวม (multiple shoots) มากขึ้นตามปริมาณ BA ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่เติม BA 5 มก./ลิตร บางต้นให้ยอดมากถึง 20 ยอด แต่เป็นยอดที่มีใบกระจุกแบบกุหลาบซ้อน ส่วนต้นที่เลี้ยงบนอาหารเติม BA 3 มก./ลิตร ถึงแม้ว่าจะมีจำนวนยอดน้อยกว่า แต่มีใบขนาดใหญ่สมบูรณ์กว่า (Figure 3)

Table 1. Effects of BA and coconut water (CW) added to MS solid medium on seed germination (%) and seed death (%) of *Nepenthes mirabilis* (Lour.) Druce seeds cultured under light condition for 15 weeks.

Medium supplements	% Seed germination	% Seed death
0 mg/l BA	0.0	10.0
1 mg/l BA	14.3	43.8
3 mg/l BA	26.3	26.8
5 mg/l BA	10.3	52.5
20 % CW	2.0	12.8

Table 2. Effect of MS macronutrient strengths on shoot proliferation (mean ± SD.) of shoot explants and stem explants cultured under light condition for 16 weeks.

Macronutrient strength of MS medium	Shoot number/explant (mean ± SD.)	
	Shoot explant[x]	Stem explant[x]
Full strength	4.3±0.4[a]	4.0±1.2[b]
1/2	5.0±0.8[a]	5.8±0.5[ab]
1/4	3.8±0.5[ab]	7.5±1.6[a]
1/8	2.4±0.7[b]	4.2±0.5[b]
Significant level	*	*

*** statistically significant at p < 0.05 determined by ANOVA with 3 replications**
[x] mean values followed by the same letter in the same column are not significantly different according to LSD at p 0.05

ขณะที่อาหารเติม BA 1 มก./ลิตร ทำให้ใบมีขนาดใหญ่เช่นกัน แต่มีจำนวนยอดน้อยกว่า (<5 ยอด/ต้น) สำหรับต้นที่เลี้ยงบนอาหารเติมน้ำมะพร้าว (20%) มีการเจริญเติบโตไม่ดี มีเพียงยอดเดียวและใบมีขนาดเล็ก สีออกเหลือง นอกจากนี้บางต้นยังมีใบม้วนงอผิดปกติ การเกิดรากในทุกชุดการทดลองมีน้อยมาก โดยเฉพาะอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวไม่มีการเจริญของราก อย่างไรก็ตามอาหารที่เติม BA 3 มก./ลิตร ทำให้เกิดรากดีที่สุด โดยมีรากยาว 1-3 ซม.

ผลของการลดปริมาณธาตุอาหารหลักสูตร MS ต่อการเพิ่มจำนวนยอด

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนจากลำต้น 2 แบบ คือ ส่วนยอดและส่วนลำต้นบนอาหารแข็งสูตร MS และสูตร MS ที่ลดปริมาณธาตุอาหารหลักระดับต่างกัน (1/2 MS, 1/4 MS และ 1/8 MS) พบว่าทุกชุดการทดลองหลังจากเพาะเลี้ยง 16 สัปดาห์ มีการเพิ่มจำนวนยอดมากขึ้น เมื่อลดปริมาณธาตุอาหารหลักลง (Table 2) แต่เมื่อลดธาตุอาหารหลักเป็น 1/8 เท่า (1/8 MS) ให้ยอดน้อยที่สุด และยอดมีขนาดเล็กใบสีเขียวอมเหลือง การเกิดยอดรวมจากชิ้นส่วนยอดมีจำนวนมากที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS นอกจากนั้นยังมีใบขนาดใหญ่เขียวเข้มปกติ ส่วนชิ้นส่วนลำต้นเกิดยอดจำนวนมากที่สุดในอาหาร 1/4 MS รองลงมาคือชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS แต่ยอดในอาหาร 1/4 MS มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าในอาหาร 1/2 MS และใบมีขนาดเล็ก ขณะที่ยอดในอาหาร 1/2 MS มีใบขนาดใหญ่ สีเขียวเข้ม (Figure 4)

การสร้างกระเปาะดักแมลง พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยง 16 สัปดาห์ มีการสร้างตั้งแต่ 1 ถึง 6 กระเปาะต่อต้น การลดปริมาณธาตุอาหารหลักไม่มีผลต่อการสร้างกระเปาะ แต่จะมีการสร้างกระเปาะมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงนานมากขึ้น

วิจารณ์

เมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*N. mirabilis* (Lour.) Druce) งอกบนอาหารแข็งที่เติม BA ส่วนเมล็ดที่เพาะในอาหารเหลวส่วนใหญ่จะไม่งอก มีส่วนน้อยที่งอกจนใบเลี้ยงแผ่กางออก แต่ตายในสัปดาห์ที่ 6 การงอกในอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวมีจำนวนน้อยมาก ทั้งที่น้ำมะพร้าวก็มีสารในกลุ่มไซโทไคนิน อาจจะเป็นเพราะมีปริมาณต่ำเกินไป ตรงข้ามกับการงอกของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงชนิด *N. khasiana* Hook.f. (Latha and Seeni, 1994) และต้นกาบหอยแครง (*Dionaea muscipula* Ellis ex L.) (Parliman *et al.*, 1982a และ Hutchinson, 1984) ที่ไม่ต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตเพิ่มในอาหารเพาะเมล็ด นอกจากต้องการ BA ในการงอกแล้ว *N. mirabilis* (Lour) Druce ยังต้องการแสงในการงอก เมื่อได้รับแสงในสัปดาห์ที่ 5 ก่อนการงอก 3-5 วัน เอ็มบริโอที่อยู่ภายในเมล็ดเปลี่ยนจากสีครีมเป็นสีเขียว ซึ่งในช่วงนี้อาจมีกลไกกระตุ้นการงอกโดย

เป็นระยะที่มีการสะสมรงควัตถุไฟโทโครม (phytochrome) ชนิดที่ดูดกลืนแสงสีแดงไกล (far red) หรือ Pfr จนถึงระดับที่เหมาะสมที่กระตุ้นให้เกิดการงอกของเมล็ดเมื่อได้รับแสง (Devlin and Witham, 1983) การงอกของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิงชนิดนี้ใช้เวลานานถึง 10 สัปดาห์จึงเป็นต้นอ่อนที่มีใบจริง และมีจำนวนน้อยที่งอก (10-26%) เมล็ดส่วนใหญ่ที่ไม่งอกอาจเป็นเมล็ดที่เป็นหมัน (sterile seed) (Clarke, 1997) ดังมีรายงานว่าเมล็ดของ *N. lowii* มีเพียง 4.5% เท่านั้นที่มีเอ็มบริโอที่สมบูรณ์ (Kaul, 1982)

หลังจากย้ายเลี้ยง 6 สัปดาห์ (21 สัปดาห์หลังเพาะเมล็ด) ต้นอ่อนมีการเกิดยอดมากขึ้น เมื่อเติม BA ในอาหารและมีจำนวนยอดมากขึ้นตามปริมาณ BA ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการเพิ่มจำนวนยอดจากชิ้นส่วนลำต้นของ *N. khasiana* ที่พบว่าการเติม BA 2 มก./ลิตร ร่วมกับ IAA 0.1 มก./ลิตร (Rathore *et al.*, 1991) หรือเติม BA 0.5 มก./ลิตร (2.2 μM) ในอาหารทำให้เกิดยอดรวมได้ดีที่สุดเช่นกัน (Latha and Seeni, 1994) แม้ว่าต้นที่เลี้ยงบนอาหารเติม BA 5 มก./ลิตร จะมียอดและใบจำนวนมาก แต่เป็นยอดขนาดเล็กที่มีใบเล็กๆ จำนวนมากคล้ายกับการเกิดยอดของกาบหอยแครง เมื่อเพิ่มปริมาณ BA ในอาหารจนถึงระดับหนึ่ง (Parliman *et al.*, 1982a) โดยทั่วไปแล้วยอดลักษณะนี้เป็นยอดที่มีคุณภาพต่ำ ไม่สามารถกลับเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้ ส่วน BA 3 มก./ลิตร เป็นระดับที่เหมาะสมทำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์ใบมีขนาดใหญ่ ถึงแม้ว่าจะมีจำนวนยอดน้อยกว่าที่BA 5 มก./ลิตร ส่วนการเติมน้ำมะพร้าวในอาหารนอกจากทำให้เมล็ดงอกน้อยแล้ว ยังทำให้ต้นมีการเจริญเติบโตผิดปกติอีกด้วย ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะน้ำมะพร้าวมีสารในกลุ่มไซโทไคนินไม่เพียงพอหรืออาจจะเป็นชนิดที่ต่างจาก BA ทุกชุดการทดลองมีการเกิดรากยกเว้นในอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว การเจริญของรากในอาหารเติม BA 3 มก./ลิตรดีที่สุด (ยาว 1-3 ซม.)

การเพิ่มจำนวนยอดจากชิ้นส่วนยอดและชิ้นส่วนลำต้นในอาหารสูตร MS ที่ลดปริมาณธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง (1/2 MS) ได้ยอดที่มีใบสมบูรณ์จำนวนมากที่สุด ส่วนชิ้นส่วนลำต้นเลี้ยงบนอาหาร 1/4 MS ให้จำนวนยอดมากที่สุด แต่มีขนาดเล็กใบไม่สมบูรณ์ และอาหาร 1/8 MS ให้ยอดจำนวนน้อยที่สุด นอกจากนั้นยอดยังมีขนาดเล็กหรือแสดงลักษณะขาดธาตุอาหารที่ใบเป็นสีเขียวอมเหลือง แสดงว่าธาตุอาหารหลักในอาหาร 1/8 MS ไม่เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโต ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับการเพิ่มจำนวนต้นของกาบหอยแครงที่ได้ผลไม่ดีในอาหาร ZB (ธาตุอาหารหลักเป็น 1/4 ถึง 1/10 เท่าของสูตร MS) แต่ได้ต้นที่สมบูรณ์จำนวนมากที่สุดในอาหาร 1/2 MS (Parliman *et al.*, 1982a) นอกจากนั้นยังมีรายงานการเพิ่มจำนวนยอดของ *N. khasiana* Hook.f. ได้ดีที่สุด ในอาหารสูตร WPM ซึ่งมีปริมาณธาตุอาหารหลักน้อยกว่าสูตร MS (Latha and Seeni, 1994)

การเกิดกระเปาะดักแมลงเกิดได้ในทุกระดับของธาตุอาหารหลัก (25-60% ของต้น) หลังจากเพาะเลี้ยง 16 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าปริมาณธาตุอาหารหลักไม่มีผลต่อการสร้างกระเปาะดักแมลง แต่การสร้างกระเปาะน่าจะขึ้นกับอายุของต้นมากกว่า สังเกตได้จากการที่มีเฉพาะใบด้านล่างที่แก่แล้วเท่านั้นที่สร้างกระเปาะ ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับการสร้างกระเปาะของ *N. khasiana* Hook.f. ในสภาพปลอดเชื้อ (Latha and Seeni, 1994) นอกจากนั้นยังสังเกตเห็นว่ามีการสร้างกระเปาะมากขึ้น เมื่อปล่อยทิ้งไว้ในอาหารเดิมนานขึ้น การที่ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงสร้างกระเปาะดักแมลงในขวดเพาะเลี้ยง จึงเหมาะที่จะใช้เป็นตัวอย่างพืชที่มีลักษณะพิเศษสำหรับสอนนักเรียน เพื่อดึงดูดความสนใจทางด้านวิทยาศาสตร์

สรุป

เมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*N. mirabilis* (Lour.) Druce) งอกได้ดีที่สุดในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 3 มก./ลิตร และเพาะไว้ในสภาพที่ให้แสง ต้นกล้าที่เพาะในอาหารที่เติม BA มีการแตกยอดมากขึ้น หลังย้ายลงอาหารใหม่ 6 สัปดาห์ โดยที่ BA 3 มก./ลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ให้ยอดขนาดใหญ่ มีใบที่สมบูรณ์จำนวนมาก ต่อมายอดเกิดรากในทุกความเข้มข้นของ BA

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดและชิ้นส่วนลำต้น พบว่าการลดระดับธาตุอาหารหลักสูตร MS ทำให้เกิดยอดรวมมากขึ้น โดย 1/2 MS เป็นระดับที่เหมาะสมทำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์จำนวนมาก

เอกสารอ้างอิง

ป่าไม้, กรม. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. เต็ม สมิติ-นันทน์. ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้ กรุงเทพฯ 810 หน้า

Bobak, M., Blehova, A., Kristin, J., Ovecka, M. and Samaj, J. 1995. Direct plant regeneration from leaf explants of *Drosera rotundifolia* cultured *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 43 : 43-49.

Cerevcenko, T.M. and Lavrent'-eva, A.M. 1992. Biology of *Nepenthes madagascariensis* Poir, grown under cover. Ukrainskii Botanichii Zhurnal. 49 : 85-89. (abstract).

Clarke,C. 1997. Nepenthes of Borneo. Natural History Publications (Borneo) Sdn. Bhd., Sabah. 207 pp.

Devlin, R.M. and Witham, F.H. 1983. Plant Physiology. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California. Pp. 448-465.

Hutchinson, J.F. 1984. *In vitro* propagation of *Dionaea muscipula* Ellis (Venus fly trap). Sci. Hort. 22 : 189-194.

Kato, M. 1993. Floral biology of *Nepenthes gracilis* (Nepenthaceae) in Sumatra. Amer. J. Bot. 80 : 924-927.

Kaul, R.B. 1982. Floral and fruit morphology of *Nepenthes lowii* and *N. villosa*, montane carnivorous of Borneo. Amer. J. Bot. 69 : 793-803.

Latha, P.G. and Seeni, S. 1994. Multiplication of the endangered Indian pitcher plant (*Nepenthes khasiana*) through enhanced axillary branching *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38 : 69-71.

Murashige, T. and Skoog. F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473-497.

Parliman, B.J., Evans, P.T. and Rupert, E.A. 1982a. Tissue culture of single rhizome explants of *Dionaea muscipula* Ellis ex L., the Venus fly-trap, for rapid asexual propagation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107 : 305-310.

Parliman, B.J. Evans, P.T. and Mazur, A.R. 1982b. Adventitious bud differentiation and development in leaf cuttings of *Dionaea muscipula* Ellis ex L., (Venus fly-trap) cultured *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107 : 310-316.

Rathore, T.S., Tandon, P. and Shekhawat, N.S. 1991. *In vitro* regeneration of pitcher plant (*Nepenthes khasiana* Hook.f.) - a rare insectivorous plant of India. J. Plant Physiol. 139 : 246-248. (abstract).