



## ระบบการผสมพันธุ์และการติดฝักของกล้วยไม้ดินนางgray (*Habenaria lindleyana* Steud.)

### Breeding Systems and Fruit Set of *Habenaria lindleyana* Steud. (Orchidaceae)

วุฒิชัย ฤทธิ<sup>1</sup> บุญสนอง ชวยแก้ว<sup>1</sup> วิชานู แฟงเมือง<sup>2</sup> กฤติมา โชติมิตร<sup>1</sup> และ สกาวเดือน บุญเหลือ<sup>1</sup>

Wuttichai Ritti<sup>1</sup> Boonsanong Chourykaew<sup>1</sup> Wichan Fangmuang<sup>2</sup> Kittima Chotimitr and Sakaoduan Boonlua<sup>1</sup>

<sup>1</sup>หน่วยวิจัยชีววิทยาพืช สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี 76000

<sup>2</sup>โรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี 76000

<sup>1</sup>Plant biology research unit, Biology Program, Faculty of Science and Technology, Phetchaburi Rajabhat University, Phetchaburi, 76000

<sup>2</sup>Phetchaburi Rajabhat University Demonstration School, Phetchaburi, 76000

\*Corresponding author; E-mail: Wuttichai.rit@mail.pbru.ac.th

Received: 10 July 2020 /Revised: 09 August 2020 /Accepted: 14 August 2020

### บทคัดย่อ

การศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของกล้วยไม้ดินนางgray ในพื้นที่ป่าธรรมชาติมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี วิทยาเขตโป่งสลอด และป่าชุมชนบ้านโป่งสลอด ตำบลหนองกะปี่ อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี เดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2562 โดยทดสอบระบบการผสมพันธุ์ 5 ลักษณะ ได้แก่ การผสมตัวเองตามธรรมชาติ (Spontaneous autogamy) การติดฝักโดยที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (Apomixis) การผสมตัวเอง (Self-pollination) การผสมข้ามต้น (Cross-pollination) และการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ (Natural pollination) พบว่า รูปแบบการผสมข้ามต้นและการผสมตัวเอง สามารถติดฝักได้สูง 100 เปอร์เซ็นต์ทั้งสองรูปแบบ และการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ มีอัตราการติดฝัก 23.52 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่รูปแบบอื่นไม่พบการติดฝัก นอกจากนี้การตรวจสอบการเกิดเอ็มบริโอและความมีชีวิตของเมล็ด พบว่า การผสมข้ามต้น เมล็ดมีการสร้างเอ็มบริโอและเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุด 52.07 เปอร์เซ็นต์และ 32.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

**คำสำคัญ:** นางgray ระบบการผสมพันธุ์ ความมีชีวิตของเมล็ด การติดฝัก



## Abstract

Field studies of the breeding systems of terrestrial orchid, *Habenaria lindleyana* Steud. were established, at Phetchaburi Rajabhat University Pong Salod campus and Pong Salod community forest Nong Kapu Sub District, Ban Lat District, Phetchaburi province, from October 2018 to September 2019. The five different types of breeding systems, including spontaneous autogamy, apomixis, induced self-pollination, induced cross-pollination and natural pollination, were investigated *in situ* at the sites. The results showed that the self-pollination and cross-pollination had the highest percentage of fruit set (100%) in both forms and natural pollination types showed the percentage of fruit set 23.52%. While other types of reproduction had no capsule formation. Moreover, the studies of embryogenesis and seed viability observed from cross-pollination type, the results showed the highest percentage at 52.07% and 32.2%, respectively.

**Keywords:** *Habenaria lindleyana* Steud., breeding system, seed viability, fruit set

## บทนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งศูนย์รวมความหลากหลายทางชีวภาพของพืชอันดับต้น ๆ ของโลก เนื่องจากเป็นรอยต่อของเขตการกระจายพันธุ์พืชถึงสามภูมิภาคเข้าด้วยกัน ได้แก่ ภูมิภาคอินโดจีน (Indo-China) ภูมิภาคอินโดมาเล (Indo-Malayan) และภูมิภาคอินโดเบอร์มีส (Indo-Burma) จึงก่อให้เกิดระบบนิเวศที่หลากหลาย อาทิ ป่าดิบฝน ป่าดิบแล้ง ป่าสนเขา ป่าพรุ ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง ป่าชายเลน รวมถึงหมู่เกาะและแนวปะการังต่าง ๆ จากสภาพภูมิประเทศดังกล่าว ก่อให้เกิดความหลากหลายของทรัพยากรธรรมชาติสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชวงศ์กล้วยไม้ ซึ่งมีรายงานการสำรวจและการตรวจสอบชื่อและชนิดที่ถูกต้องแล้วจากนักพฤกษศาสตร์ ประมาณ 1,157 ชนิด (species) 176 สกุล (genera) [1]

ปัจจุบันกล้วยไม้หลายชนิดมีจำนวนประชากรลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากปัญหาทรัพยากรป่าไม้ถูกทำลายลงทั้งจากกิจกรรมของมนุษย์และภัยธรรมชาติที่มีความรุนแรงมากขึ้น สภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมาก อุณหภูมิสูงขึ้น รวมถึงการแสวงหาผลประโยชน์จากทรัพยากรพืชที่มากเกินไปส่งผลกระทบโดยตรงต่อถิ่นที่อยู่อาศัยของกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ รวมถึงกล้วยไม้ดินนางกราย (*Habenaria lindleyana* Steud.) ซึ่งมีแนวโน้มการลดลงของจำนวนประชากรในธรรมชาติอย่างรวดเร็ว จากปัจจัยทางด้านพื้นที่ธรรมชาติที่เคยอุดมสมบูรณ์ถูกบุกรุกและถูกทำลายเพื่อสร้างที่อยู่อาศัย ประกอบกับปัญหาการลักลอบเก็บกล้วยไม้ออกจากป่าเพื่อการค้าขายยิ่งส่งผลให้กล้วยไม้ นางกราย มีแนวโน้มอาจเกิดการสูญพันธุ์ได้ในอนาคต [2, 3] หากยังไม่ได้รับการศึกษาที่มากเพียงพอเพื่อให้ทราบและเข้าใจถึงโอกาสที่จะ

ประสบความสำเร็จในการเจริญเติบโตเพื่อกระจายพันธุ์ในธรรมชาติ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ โดยเฉพาะระบบการผสมพันธุ์ของกล้วยไม้นางกราย เพื่อให้ทราบข้อมูลอัตราความสำเร็จในการสืบพันธุ์ ซึ่งจะเป็ข้อมูลสำคัญในการหาทางป้องกันปัญหาการสูญพันธุ์ที่อาจจะเกิดขึ้นได้ ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระบบการผสมพันธุ์และอัตราความสำเร็จในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้นางกรายในพื้นที่ป่าธรรมชาติของมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี วิทยาเขตโป่งสลอด และป่าชุมชนบ้านโป่งสลอด ซึ่งพบประชากรของนางกรายกระจายพันธุ์อยู่ และปัจจุบันประชากรเหล่านี้กำลังอยู่ในสภาวะเสี่ยงต่อการถูกรบกวน เพราะฉะนั้นการเข้าใจถึงปัจจัยดังกล่าว จะเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมของกล้วยไม้นางกรายให้คงอยู่ในพื้นที่ต่อไป

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

### 1. ชนิดพืชที่ทำการศึกษา

นางกราย (*Habenaria lindleyana* Steud.) เป็นกล้วยไม้ดินที่มีลำต้นเหนือดินสั้นมาก มีรากสะสมอาหารแบบมันฝรั่ง (Tuberous roots) ใบรูปรีอ้วน จำนวน 3-5 ใบ เรียงตัวแบบเวียน กว้าง 5-10 ซม. ยาว 7-15 ซม. ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม สีเขียว แผ่นติดพื้นดิน ช่อดอกแบบกระจจะ ออกที่ปลายยอด ยาว 15-20 ซม. จำนวนดอก 7-15 ดอก ค่อนข้างโปร่ง ขนาดดอกเมื่อบาน กว้าง 1.5-2 ซม. สีขาว กลีบเลี้ยงคู่ข้างใหญ่กว่ากลีบเลี้ยงบน กลีบปากแยกเป็น 3 แฉก แฉกกลางรูปขอบขนานแกมรูปรี ปลายกลีบปากโค้งมน เดี่ยวดอกรูปทรงระบอขาว มีกระเปาะเก็บน้ำหวานที่ปลายสุดของเดือย เล้าเกสรสั้น กลุ่มเรณูบรรจุในของ

ด้านข้างของเล้าเกสรข้างละ 1 กลุ่ม ปลายกลุ่มเรณูมีแป้นเหนียว ออกดอกเดือนกันยายนถึงตุลาคม พบตามป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง ป่าสนและป่าไผ่ บริเวณเขาหินทราย หินแกรนิต หินดินดาน และเขาหินปูน มีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศลาวและเวียดนาม ในประเทศไทยมีรายงานพบทั่วทุกภาค เช่น จังหวัดเชียงใหม่ น่าน ตาก นครสวรรค์ เลย นครราชสีมา กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สระบุรี ชลบุรี และจันทบุรี เป็นต้น [1, 4, 5, 6]

### 2. พื้นที่ศึกษา

พื้นที่ป่าธรรมชาติมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี วิทยาเขตโป่งสลอด และพื้นที่ป่าชุมชนบ้านโป่งสลอด หมู่ที่ 6 ตำบลหนองกะป๋ อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2562 มีลักษณะเป็นป่าเต็งรัง ป่าเบญจพรรณ ดินส่วนใหญ่เป็นดินหินปนทราย หินกรวด พบกล้วยไม้ดินนางกราย กระจายพันธุ์ตามพื้นที่ที่ค่อนข้างโล่งบริเวณชายป่า หรือบริเวณที่มีการปกคลุมของไม้ชั้นเรือนยอดค่อนข้างโปร่ง (Figure 1)

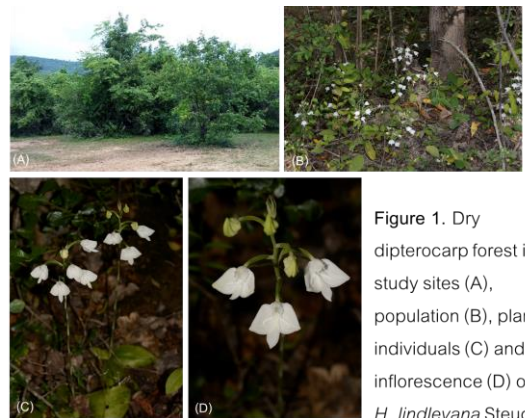


Figure 1. Dry dipterocarp forest in study sites (A), population (B), plant individuals (C) and inflorescence (D) of *H. lindleyana* Steud.

### 3. การศึกษาระบบการผสมพันธุ์ (Breeding systems) ของกล้วยไม้นางทราย

ศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของกล้วยไม้นางทราย โดยทำการครอบช่อดอกกล้วยไม้นางทรายที่ยังตูมอยู่ด้วยตาข่ายไนลอนตาถี่ ขนาด 40 ตาต่อตารางนิ้ว จำนวน 2 ชั้น เพื่อป้องกันแมลงมาผสมเกสรจนกระทั่งดอกที่คลุมไว้บานเต็มที่ จึงเริ่มทำการทดสอบระบบการผสมพันธุ์ โดยแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มทดลอง ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ครอบช่อดอกทั้งไว้จนสิ้นสุดฤดูดอก เพื่อทดสอบการติดฝักและการเกิดเมล็ดจากการผสมตัวเองตามธรรมชาติ (Spontaneous autogamy) โดยไม่ต้องอาศัยพาหะถ่ายละอองเรณู จำนวน 7 ต้น รวมจำนวนดอกทั้งหมด 64 ดอก กลุ่มที่ 2 นำเอากลุ่มเรณูออกแล้วครอบดอกไว้ตามเดิม จากนั้นทิ้งไว้จนสิ้นสุดฤดูการออกดอก เพื่อศึกษาการติดฝักและการเกิดเมล็ดที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (Apomixis) จำนวน 4 ต้น รวมจำนวนดอกทั้งหมด 55 ดอก กลุ่มที่ 3 ชักนำให้เกิดการผสมตัวเอง (Induced self-pollination) โดยการนำเอากลุ่มเรณูในดอกเดียวกันแตะลงบนยอดเกสรเพศเมียเพื่อศึกษาการติดฝักและการเกิดเมล็ดจากการผสมตัวเองแล้วครอบช่อดอกด้วยถุงกันแมลงตามเดิม จำนวน 4 ต้น รวมจำนวนดอกทั้งหมด 36 ดอก กลุ่มที่ 4 ชักนำให้เกิดการผสมข้าม (Induced cross-pollination) โดยการนำเอากลุ่มเรณูในดอกเดิมออกแล้วนำกลุ่มเรณูจากดอกนางทรายต้นอื่นที่อยู่ห่างออกไปไม่ต่ำกว่า 5 ม. มาแตะบนยอดเกสรเพศเมียเพื่อศึกษาการติดฝักและการเกิดเมล็ดจากการผสมข้ามแล้วครอบช่อดอกด้วยถุงกันแมลงตามเดิม จำนวน 6 ต้น รวมจำนวนดอกทั้งหมด 35 ดอก และกลุ่มที่ 5 ปลอ่ยให้เกิดการผสมตามธรรมชาติโดยอาศัยพาหะถ่ายละอองเรณู (Natural pollination) เพื่อเป็นกลุ่ม

ควบคุม จำนวน 100 ต้น รวมจำนวนดอกทั้งหมด 693 ดอก (Figure 2)



Figure 2. The inflorescences of *H. lindleyana* Steud. were covered with nylon mesh bags.

จากนั้นทำการตรวจสอบอัตราการติดฝักในแต่ละวิธีการ นำฝักที่ได้จากการผสมพันธุ์ในกลุ่มต่าง ๆ มาวัดขนาดฝัก น้ำหนักสด และอัตราการเกิดเอ็มบริโอ โดยการนับเมล็ดภายใต้กล้องสเตอริโอ สุ่มนับเมล็ดครั้งละ 100 เมล็ด นับซ้ำจำนวน 5 ครั้ง จากนั้นคำนวณอัตราการเกิดเอ็มบริโอและวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยเปรียบเทียบความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างการทดลองระบบการผสมพันธุ์ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) [7] ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

### 4. การศึกษาความสมบูรณ์และอัตราการมีชีวิตของเมล็ด

ตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ด โดยนำเมล็ดจากฝักที่ได้จากการผสมพันธุ์ในรูปแบบต่าง ๆ มาทดสอบความมีชีวิตด้วยการย้อมสารละลายเตตระโซเลียมคลอไรด์ (2,3,5- triphenyltetrazolium chloride, TTC) ความเข้มข้น 1% (v/v) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บ่มไว้ในที่มืด เมื่อครบกำหนดนำเมล็ดมาล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำการตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดภายใต้กล้องสเตอริโอ

โดยเมล็ดที่มีชีวิตเอ็มบริโอจะยอมติดสีแดง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยเปรียบเทียบความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) [7] ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

## ผลการศึกษา

### 1. ผลการศึกษาระบบการผสมพันธุ์ (Breeding systems) ของกล้วยไม้ดินนางทราย

จากการศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของกล้วยไม้ดินนางทราย พบว่า กลุ่มที่ 1 ดอกที่คลุมด้วยตาข่ายไนลอนกันแมลง (Spontaneous autogamy) และกลุ่มที่ 2 ดอกที่นำเอากลุ่มเรณูออก (Apomixis) แล้วคลุมด้วยตาข่ายไนลอนกันแมลง เมื่อถึงไ้วจันสิ้นสุดการออกดอก พบว่า ไม่มีการติดฝักเกิดขึ้น ขณะที่กลุ่มที่ 3 ดอกที่ได้รับการผสมตัวเอง (Self-pollination) และกลุ่มที่ 4 ดอกที่ได้รับการผสมข้ามต้น (Cross-pollination) มีอัตราการติดฝักสูง 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งสองกลุ่ม โดยดอกนางทรายเมื่อได้รับการผสมด้วยมือ (Hand pollination) แล้ว จะเริ่มมีการเหี่ยวภายใน 3 วันและแห้งทั้งดอกภายใน 11 วัน ขณะที่กลุ่มที่ 5 ฝักที่เกิดจากการผสมตามธรรมชาติโดยอาศัยพาหะถ่ายละอองเรณู (Natural pollination) มีอัตราการติดฝัก 23.52 เปอร์เซ็นต์ (Table 1)

เมื่อทำการศึกษาน้ำหนักของฝัก โดยพิจารณาความกว้าง ความยาว และน้ำหนักสด พบว่า ฝักที่เกิดจากการผสมตามธรรมชาติมีความกว้างเฉลี่ยมากที่สุด 0.43 ซม. และมีความยาวฝักเฉลี่ยมากที่สุด 3.23 ซม. รวมถึงมีน้ำหนักสดสูงที่สุด 0.16 กรัม ซึ่งแตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเทียบกับฝักจากรูปแบบอื่น ๆ (Table 2)

### 2. การศึกษาความสมบูรณ์และอัตราการมีชีวิตของเมล็ด

การศึกษาความสมบูรณ์ของเมล็ด พิจารณาจากการที่เมล็ดมีการสร้างเอ็มบริโอ ซึ่งถือว่าเป็นเมล็ดที่มีความสมบูรณ์ และเมล็ดที่ไม่สร้างเอ็มบริโอ เป็นเมล็ดที่ไม่สมบูรณ์ โดยการสุ่มนับเมล็ดจำนวน 100 เมล็ด นับซ้ำจำนวน 5 ครั้ง ของฝักที่ได้จากการผสมพันธุ์รูปแบบต่าง ๆ จากการศึกษ พบว่า ฝักที่ได้จากการผสมข้ามต้น เมล็ดมีความสมบูรณ์มากที่สุด 52.07 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามพบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับเมล็ดที่ได้จากฝักที่ทำการผสมตัวเอง โดยมีเมล็ดที่มีความสมบูรณ์ 34.40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่า ฝักที่ได้จากการผสมตามธรรมชาติเมล็ดมีความสมบูรณ์น้อยที่สุด 18.75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเทียบกับเมล็ดที่ได้จากฝักที่ทำการผสมตัวเองและผสมข้าม (Table 2)

ในการทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดโดยการย้อมด้วยสารละลายเตตระโซเลียมคลอไรด์ พบว่า เมล็ดจากฝักที่เกิดจากการผสมข้ามต้น มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุด 32.20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเทียบกับเมล็ดที่ได้จากการฝักรูปแบบอื่น ๆ ขณะที่ฝักที่เกิดจากการผสมตัวเอง เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 17.60 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ดที่ได้จากฝักที่ผสมตามธรรมชาติ มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเพียง 2.80 เปอร์เซ็นต์ (Table 2, Figure 3)

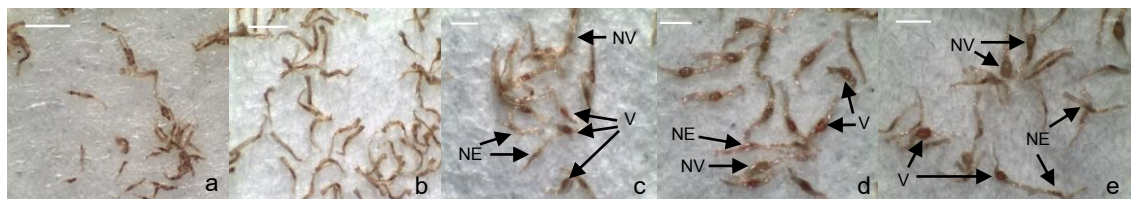
**Table 1.** Types of breeding systems of *Habenaria lindleyana* Steud., number of flower, number of capsule and percentage of capsule

Types of breeding	Number of flower	Number of capsule	Capsule (%)
Spontaneous autogamy	64	0	0
Apomixis	55	0	0
Self-pollination	36	36	100
Cross-pollination	35	35	100
Natural pollination	693	171	23.52

**Table 2.** Average (avg) of width, length and weight of capsule of *H. lindleyana* Steud. derived from different five pollination treatments and percentage of seed with embryo and seed viability of those capsule

Size of capsule	Spontaneous autogamy	Apomixis	Self-pollination	Cross-pollination	Natural pollination
avg of width (cm)	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.39±0.01 <sup>b</sup>	0.35±0.01 <sup>c</sup>	0.43±0.01 <sup>a</sup>
avg of length (cm)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	2.84±0.04 <sup>b</sup>	2.77±0.06 <sup>b</sup>	3.23±0.06 <sup>a</sup>
avg of weight (g)	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.03±0.00 <sup>c</sup>	0.08±0.01 <sup>b</sup>	0.16±0.01 <sup>a</sup>
seed with embryo (%)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	34.4±7.30 <sup>ab</sup>	52.07±6.87 <sup>a</sup>	18.75±4.18 <sup>bc</sup>
seed viability (%)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	17.6±2.80 <sup>b</sup>	32.2±10.24 <sup>a</sup>	2.80±0.73 <sup>c</sup>

Note: The same letters in each row are not significantly different ( $p \leq 0.05$ ).



**Figure 3.** Seed viability experiment (TTC test) among capsules derived from difference pollination types; spontaneous autogamy (a) and apomixis (b) the seeds without embryos, the seeds form self-pollination (c) cross-pollination (d) and natural pollination (e). V=viability; NV=nonviability; NE= no embryo (white scale bar=0.5 mm.)

## อภิปรายผล

จากการศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของกล้วยไม้ดินนางกราย 5 รูปแบบ พบว่า รูปแบบการผสมตัวเอง (Self-pollination) มีอัตราการติดฝักได้สูง 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้ดินนางกรายมีความสามารถในการสืบพันธุ์แบบผสมตัวเอง (Self-compatibility) และจำเป็นต้องอาศัยพาหะถ่ายละอองเรณู (Pollinators) ซึ่งส่วนใหญ่พบรูปแบบการผสมพันธุ์นี้ได้ในพื้นที่ของกล้วยไม้ [8, 9] สอดคล้องกับรายงานการศึกษาระบบการผสมตัวเองของกล้วยไม้สกุล *Habenaria* จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *H. dentata*, *H. erichmichaelii*, *H. lucida*, *H. marginata*, *H. rhodocheila* และ *H. rostellifera* พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การติดฝักสูง 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *H. myriotricha* มีเปอร์เซ็นต์การติดฝัก 50 เปอร์เซ็นต์ [10] อย่างไรก็ตามพบว่าให้ผลการทดลองที่แตกต่างจากรายงานการศึกษาระบบการผสมตัวเองของกล้วยไม้ดินนางกรายพบว่า สามารถติดฝักได้เพียง 50 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น [11] ทั้งนี้อัตราการติดฝักที่แตกต่างกันนั้น อาจขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของต้นพันธุ์ที่ใช้ทำการศึกษารวมถึงสภาพแวดล้อม เป็นต้น

นอกจากนี้จากการศึกษารูปแบบการผสมข้ามต้น (Cross-pollination) ของกล้วยไม้ดินนางกรายพบว่า มีอัตราการติดฝักได้สูง 100 เปอร์เซ็นต์ รวมถึงจำเป็นต้องอาศัยพาหะถ่ายละอองเรณู โดยการผสมข้ามต้นของกล้วยไม้ดินนางกรายสามารถลดอัตราการเกิดเลือดชิดและเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ [9] ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับรายงานการศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของกล้วยไม้ดินนางกราย (*Spathoglottis eburnea* Gagnep.) ไว้ว่า มีอัตราการติดฝักจากการผสมตัวเองและการผสมข้ามต้นได้สูงถึง

82.2 เปอร์เซ็นต์ทั้งสองรูปแบบ [12] ขณะที่ระบบการผสมพันธุ์ที่เกิดเมล็ดโดยไม่มีการปฏิสนธิ (Apomixis) และระบบการผสมพันธุ์ที่สามารถผสมตัวเองได้โดยไม่ใช้พาหะถ่ายละอองเรณู (Spontaneous autogamy) นั้น พบว่าไม่สามารถเกิดขึ้นได้กับกล้วยไม้ดินนางกราย เนื่องจากไม่มีการติดฝักทั้งสองรูปแบบในหลอดตาข่ายในหลอดตาข่าย ซึ่งส่วนใหญ่ระบบการผสมพันธุ์แบบ Apomixis และ Spontaneous autogamy นั้น เกิดขึ้นได้น้อยมาก [9, 13, 14, 15] ซึ่งพบได้เฉพาะในกล้วยไม้ที่เจริญเติบโตอยู่ในพื้นที่ที่มีพาหะถ่ายละอองเรณูน้อยมาก ๆ อาทิ พื้นที่ที่ถูกตัดขาดจากประชากรอื่น พื้นที่ที่มีการสร้างเขื่อนขนาดใหญ่ก่อให้เกิดเป็นหมู่เกาะ หรือเกาะที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ รวมถึงพื้นที่ป่าธรรมชาติที่ถูกบุกรุกเพื่อทำการเกษตร และการสร้างชุมชนเมืองต่าง ๆ [9, 16, 17, 18] ขณะที่พื้นที่ทำการศึกษาค้นคว้านี้เป็นป่าธรรมชาติมีลักษณะเป็นป่าเต็งรัง และป่าเบญจพรรณ ซึ่งเป็นการสนับสนุนว่ากล้วยไม้ดินนางกรายไม่มีระบบการผสมพันธุ์แบบ Apomixis และ Spontaneous autogamy เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาในกล้วยไม้ดินนางกราย (*S. eburnea* Gagnep.) พบว่าไม่มีรูปแบบการผสมพันธุ์แบบ Apomixis และ Spontaneous autogamy [12] และระบบการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติโดยอาศัยพาหะถ่ายละอองเรณู (Natural pollination) พบว่า มีอัตราความสำเร็จในการติดฝัก 23.52 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนดอกทั้งหมดที่ศึกษา 693 ดอกกับจำนวนดอกของรูปแบบผสมตัวเองและผสมข้ามที่มีจำนวนดอก 36 ดอกและ 35 ดอกตามลำดับนั้น มีเปอร์เซ็นต์การติดฝักที่ต่ำมาก อาจขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของพาหะถ่ายละอองเรณูในพื้นที่ดังกล่าวมีไม่มากเพียงพอ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาค้นคว้า

ฝักที่เกิดจากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาตินั้นถูกชดเชยด้วยขนาดและน้ำหนักของฝักที่มีมากกว่า

ขนาดฝักของกล้วยไม้นางกรายที่เกิดจากรูปแบบ Natural pollination พบว่ามีความกว้าง ความยาว และน้ำหนักมากที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเทียบกับฝักจากรูปแบบอื่น สอดคล้องกับฝักกล้วยไม้ *Cyrtopodium punctatum* (L.) Lindl. ที่พบว่าฝักที่เกิดจากการผสมข้ามมีขนาดใหญ่กว่าฝักที่เกิดจากการผสมตัวเอง อย่างไรก็ตามพบได้เฉพาะบางปีเท่านั้น [19] ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์และความแข็งแรงของต้นพันธุ์

เมื่อพิจารณาจำนวนเมล็ดที่มีเอ็มบริโอ พบว่าเมล็ดจากฝักที่ได้จากการผสมข้ามและผสมตัวเองไม่มีความแตกต่างกัน ให้ผลเช่นเดียวกันกับ กล้วยไม้ดินเหลืองพิศมร (*Spathoglottis affinis* de Vriese) และ กล้วยไม้ดินบานตึก (*Spathoglottis eburnea* Gagnep) [4, 12] ขณะที่เมล็ดจากฝักที่ผสมตัวเองตามธรรมชาตินั้นมีเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอในน้อยที่สุด แสดงให้เห็นว่าฝักของกล้วยไม้ดินนางกรายที่เกิดขึ้นในธรรมชาติของประชากรนี้ส่วนใหญ่เป็นฝักที่มาจากการผสมตัวเองโดยมีพาหะถ่ายละอองเรณูช่วยในการผสม นอกจากนี้ยังพบว่าเมล็ดที่เกิดจากการผสมข้ามมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุด สอดคล้องกับกล้วยไม้ดิน *Platanthera leucophaea* (Nutt.) Lindl. ที่พบว่าเมล็ดจากฝักที่ทำการผสมข้ามมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่าเมล็ดจากฝักที่ทำการผสมตัวเอง [20] อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตของขนาดฝักจำนวนเมล็ด รวมถึงอัตราการเกิดเอ็มบริโอและความมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้นั้น ขึ้นอยู่กับจำนวนกลุ่มละอองเรณู (Pollinia) ที่สัมผัสหรือตกลงบนยอดเกสรเพศเมียด้วย [12, 21, 22]

## สรุป

การศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของกล้วยไม้ดินนางกราย พบว่า การผสมข้าม (Cross-pollination) และผสมตัวเอง (Self-pollination) มีอัตราการติดฝักสูงที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การผสมตัวเองตามธรรมชาติ (Natural pollination) ติดฝักเพียง 23.52 เปอร์เซ็นต์ รวมถึงเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดจากฝักที่ทำการผสมข้าม มีเปอร์เซ็นต์สูงที่สุด แสดงให้เห็นว่า กล้วยไม้ดินนางกรายจำเป็นต้องอาศัยพาหะถ่ายละอองเรณูในการผสมพันธุ์ ดังนั้น ควรมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพาหะถ่ายละอองเรณูกับกล้วยไม้ดินนางกราย เพื่อฟื้นฟูพาหะถ่ายละอองเรณูในธรรมชาติ ซึ่งจะช่วยให้กล้วยไม้ชนิดนี้สามารถขยายพันธุ์ได้มากขึ้น รวมถึงควรส่งเสริมให้พื้นที่ดังกล่าวเป็นพื้นที่ปกป้องและอนุรักษ์พันธุกรรมของกล้วยไม้ชนิดนี้ไว้ นอกจากนี้การช่วยผสมเกสรด้วยมือ (Hand pollination) สามารถเพิ่มโอกาสการติดฝักและนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น จะเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นอ่อนให้ได้ปริมาณมาก จากนั้นจึงนำกลับไปปลูกยังพื้นที่ดั้งเดิม ซึ่งเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มจำนวนประชากรกล้วยไม้ดินนางกรายให้มากขึ้นอย่างรวดเร็วและเป็นการช่วยอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้ดินนางกรายให้คงอยู่ในพื้นที่ต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนวิจัยจากโครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน สำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2562 ขอขอบคุณหน่วยวิจัยชีววิทยาพืช สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์





เครื่องมือและอำนวยความสะดวกในการวิจัย  
ขอขอบคุณนางสาวชฎาพร อดทน นางสาวปรางทิพย์  
เถื่อนคนรัก นางสาวดารินทร์ พันธุ์จันทร์ และนางสาวสุ  
กัญญา รุ่งอรุณ ผู้ช่วยวิจัยภาคสนาม

### เอกสารอ้างอิง

- Nanakorn, W. and Watthana, S. 2008. *Queen Sirikit Botanic Garden (Thai Native Orchids2)*. Chiang Mai: Wanida Press.
- อนุพันธ์ กงบังเกิด และแสงเดือน วรรณชาติ. 2550. ผลของแสงต่อการงอกและพัฒนาการของ เมล็ดกล้วยไม้เอื้องคำผักปราบในหลอดทดลอง (*Dendrobium ochreatum* Lindl.). *วารสาร วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*. 3: 231-241.
- วุฒิชัย ฤทธิ บุญสนอง ช่วยแก้ว และอรพรรณ ศรี น้ำคำ. 2561. ผลของไคโทซานต่อการเจริญเติบโต ของต้นอ่อนเอื้องผึ้ง (*D. lindleyi* Steud.) ใน หลอดทดลอง. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. 23(2): 91-103.
- วรชาติ โตแก้ว ประนอม จันทร์โณทัย และ พงษ์ศักดิ์ พลเสนา. 2558. กล้วยไม้ในอุทยาน แห่งชาติน้ำหนาว. ขอนแก่น: ศูนย์วิจัย อนุรักษ์มรดกประยูรศักดิ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- นันทยา วรรณระภูติ. 2555. *ดอกเอื้อง*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- Santisuk, T. and Larsen, K. 2011. *Flora of Thailand (Vol. 12 part 1)*. Bangkok: Prachachon CO. LTD.
- Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics*. 11: 1-42.
- Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. USA: Wiley and son press.
- Dressler, R. L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Australia: Cambridge University Press.
- ชฎาพร ทรายคำ เกวลิน คุณาศักดากุล และณัฐรา โภธาภรณ์. 2563. ความสามารถในการผสมข้าม และการงอกของเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อของ กล้วยไม้ดินบางชนิดในสกุล *Habenaria* และ *Pecteilis*. *วารสารเกษตร*. 36(1): 47-58.
- ชิดชนก ก่อเจดีย์ วิวัฒน์ บัณฑิตย์ จามจุรี ไสถถิกุล และณัฐรา โภธาภรณ์. 2555. ความสามารถในการ ผสมข้ามชนิดและสกุลของกล้วยไม้ดินสกุลฮาเบ นารีเยและสกุลเพคเทิลิสบางชนิด. *วารสารเกษตร*. 28(3): 263-272.
- วิทยา ผาคำ. 2554. *ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของ กล้วยไม้ดินบานติก (Spathoglottis eburnea Gagnep.)*. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- Den Nijs, A.P.M. and van Dijk, G.E. 1993. *Apomixis. In Plant Breeding: Principles and Prospects*. Hayward, M.D., Bosemark, N.O., and Romagosa, I.(eds). Chapman & Hall. London. UK. pp 229-245.
- Tremblay, R. L., Ackerman, J. D., Zimmerman, J. K. and Calvo, R. N. 2004. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society*. 84: 1-54.



15. Claessens, J. and Kleynen, J. 2018. The pollination of European orchids Part 7. Autogamy: *Neotinea maculata* and *Corallorhiza trifida*. *Journal of the Hardy Orchid Society*. 15(2): 50-55.
16. Stipkova, Z., Tsiftsis, S. and Kindlmann, R. 2020. Pollination mechanisms are driving orchid distribution in space. *Scientific Reports*. 1-13.
17. Brys, R., Jacquemyn, H., and Hermy, M. 2008. Pollination efficiency and reproductive patterns in relation to local plant density, population size and floral display in the rewarding *Listera ovata* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 157: 713-721.
18. Brzosko, E. 2002. The dynamics of *Listera ovata* populations on mineral islands in the Biebrza National Park. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 71: 243-251.
19. Dutra, D., Kane, M. E., Adams, C. R. and Richardson, L. 2009. Reproductive biology of *Cyrtopodium punctatum* in situ: implications for conservation of an endangered Florida orchid. *Plant Species Biology*. 24: 92-103.
20. Wallace, L. E. 2003. The cost of inbreeding in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae), *American Journal of Botany*. 90(2): 235-242.
21. Gonzalez-Diaz, N. and Ackerman, J. D. 1988. Pollination, fruit set and seed production in the orchid, *Oeceoclades maculata*. *Lindleyana*. 3(3): 150-155.
22. Vale, A., Rojas, D., Alvarez, J. C. and Navarro, L. 2011. Breeding system and factors limiting fruit production in the nectarless orchid *Broughtonia lindenii*. *Plant Biology*. 13(1): 51-61.