Agricultural Sci. J. 49 : 1 (Suppl.) : 225-229 (2018) ว. วิทย. กษ. 49 : 1 (พิเศษ) : 225-229 (2561)

วิธีการที่เหมาะสมในการตรวจสอบความมีชีวิตและความงอกของละอองเกสรหม้อข้าวหม้อแกงลิง

Appropriate Methods for Pollen Viability Pollen and Germination Testing of *Nepenthes* sp.

อมรรัตน์ แก้วคุ้มภัย[1] สรายุทธ อ่อนสนิท[2] เยาวพรรณ สนธิกุล[1] ธีร ศรีสวัสดิ์[1] และ สุรพล ฐิติธนากุล[1]*

Amornrat Kaewkhumpai[1] Sarayut Onsanit [2] Yaowaphan Sontikul[1] Theera Srisawat[1] and Suraphon Thitithanakul[1]*

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตรคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ.สุราษฎร์ธานี 84000

[2]ภาควิชาทรัพยากรประมงและชายฝั่ง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ.สุราษฎร์ธานี 84000

[1]Department of Agriculture and Science Technology, Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, Surat Thani 84000

[2]Department of fishery and Coastal Resources, Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, Surat Thani 84000

*Corresponding author: thiti43@hotmail.com

บทคัดย่อ

หม้อข้าวหม้อแกงลิงมีดอกเพศผู้และเพศเมียแยกอยู่กันคนละต้น ทำให้จำเป็นต้องมีการเก็บละอองเกสรเพศผู้ไว้เพื่อใช้ในการผสมเมื่อมีดอกเพศเมียพร้อมผสม การผสมพันธุ์อาจเกิดความล้มเหลวได้ ดังนั้นการตรวจสอบความมีชีวิตและความงอกของละอองเกสรก่อนการผสมจะช่วยลดความผิดพลาดได้ การทดลองละอองเกสรหม้อข้าวหม้อแกงลิง *Nepenthes mirabilis* var. mirabilis, *N. mirabilis* var. globosa, *N. thorelii* (suratensis) ทดสอบหาสีย้อม Aceto carmine, Aceto orcein, Lactophenol Cotton-blue, Iodine และ 2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride ที่เหมาะสมต่อการทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสร และทดสอบหาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 7 ระดับ คือ 2, 3, 5, 10, 15, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ที่เหมาะสมในอาหารเหลวสูตร Brewbaker and Kwack. (1963) ต่อการงอกของละอองเกสร พบว่า ละอองเกสรของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงทั้ง 3 ชนิด ติดสีย้อม Aceto carmine, Aceto orcein และ Cotton blue ได้ดี มีค่าความมีชีวิตตั้งแต่ 89-100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดสอบการงอกของละอองเกสรในอาหารเหลวระดับน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ พบว่าที่ระดับน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ *N. mirabilis* var. mirabilis และ *N. mirabilis* var. globosa มีอัตราการงอกของละอองเกสรสูงสุด 65.81 และ 54.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ขณะที่ละอองเกสร *N. thorelii* อัตราการงอกของละอองเกสรสูงสุดเพียง 15.12 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าอาหารที่ผสมน้ำตาลซูโครสในการทดลองนี้ยังไม่เหมาะสมสำหรับละอองเกสรของสายพันธุ์ *N. thorelii*

คำสำคัญ: ละอองเกสร, หม้อข้าวหม้อแกงลิง, ความมีชีวิต, การงอก

ABSTRACT

Nepenthes are dioeciously plant. Therefore, pollen storage is essential for pollination and breeding. The determination of pollen germination can facilitate breeding program. Study of pollen viability and germination in *(Nepenthes mirabilis* var. mirabilis), *N. mirabilis* var. globosa and *N. thorelii* (suratensis). Viability test was done by a staining method using Aceto carmine, Aceto orcein, Lactophenol Cotton-blue, Iodine and 2, 3, 5-Triphenyl Tetrazolium Chloride and germination by hanging drop technique in Brewbaker and Kwack (1963) medium added sucrose at concentrations of 2, 3, 5, 10, 15, 20 and 30%. The results showed that the pollen of *Nepenthes mirabilis* var. mirabilis, *N. mirabilis* var. globosa and *N. thorelii* (suratensis) tested by Aceto carmine, Aceto orcein and Lactophenol Cotton-blue could be tight

stained by 89-100%. These germination results were significantly different. In addition, the viability of the pollen and their germination under *in vitro* conditions were determined to assess the pollen fertility potential. The highest percentages of pollen germination in *N. mirabilis* var. mirabilis (65.81%) and *N. mirabilis* var. globosa (54.68%) on a medium supplemented with 10% sucrose. These germination results were significantly different. However, the highest percentages of pollen germination of *N. thorelii* (15.12%) on a medium supplemented with 2% sucrose. It conclude that medium with sucrose added was not suitable foe pollen germination of N. thorelii (suratensis)

Keywords: Pollen, *Nepenthes* sp., Viability, Germination

บทนำ

หม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes* spp.) เป็นพืชที่มีแนวโน้มที่จะสูญพันธุ์จากความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทย ทำให้ถูกจัดเป็นพืชอนุรักษ์ในอนุสัญญาไซเตส และโครงการศึกษาละอองเกสรหม้อข้าวหม้อแกงลิงนี้ได้รับทุนการศึกษาจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) หม้อข้าวหม้อแกงลิงเป็นพืชที่มีดอกแยกเพศอยู่ต่างต้นกัน (Dioeciously) บางครั้งไม่สามารถนำเกสรตัวผู้ไปผสมกับเกสรตัวเมียได้ทันที เนื่องจากต้องรอจนกว่าดอกเพศเมียจะมีความพร้อมในการผสมละอองเกสร ดังนั้นหากได้ตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเกสรก่อนการผสมจะช่วยลดความผิดพลาดเหล่านี้ลงได้ วิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบความมีชีวิตและการงอกของละอองเกสรมีหลายวิธี เช่น การย้อมสี (Staining test) สีที่นิยมใช้คือ Aceto carmine, Aceto orcein, Iodine, 2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) และ Lactophenol cotton blue สีย้อมแต่ล่ะชนิดจะมีความเหมาะสมต่อพืชแตกต่างกัน เช่น การศึกษาในพืชกลุ่ม Medlar ย้อมด้วยสี Iodine มีเปอร์เซ็นต์การย้อมติดสีดีกว่าสี TTC ขณะที่พืชสกุล cherry laurel พบว่า Iodine มีเปอร์เซ็นต์การย้อมติดสีน้อยกว่าสี TTC (Cavusoglu and Sulusoglu., 2014) ส่วนวิธีการทดสอบการงอกของละอองเกสรในห้องปฏิบัติการ (*In vitro* germination) โดยการใช้อาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย บอริก ส่งเสริมการงอกของละอองเกสรด้านการเจริญยืดตัวของท่อละอองเกสร แคลเซียมไนเทรต แมกนีเซียมซัลเฟต และโพแทสเซียมไนเทรต ช่วยให้หลอดละอองเกสรที่งอกยืดตัวได้ดี และน้ำตาลซูโครสทำหน้าที่ควบคุมความสมดุลของน้ำภายในและภายนอกละอองเกสร (Brewbaker and Kwack., 1963) พืชแต่ละชนิดต้องการความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารที่แตกต่างกัน เช่น ละอองเกสรลำไยและกล้วยงอกได้ดีในน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Pham *et al*., 2015; Soares *et al*., 2016) หม้อข้าวหม้อแกงลิงยังไม่มีรายงานวิธีการตรวจสอบความมีชีวิตและการงอกของละอองเกสร ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสีย้อมที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบความมีชีวิต และระดับความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมในอาหารสังเคราะห์เพื่อตรวจการงอกของละอองเกสรหม้อข้าวหม้อแกงลิง คือ *Nepenthes mirabilis* var. mirabilis, *N. mirabilis* var. globosa, *N. thorelii* (suratensis) การศึกษาในครั้งนี้ใช้เป็นแนวทางสำหรับการตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเกสรในงานปรับปรุงสายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิง

อุปกรณ์และวิธีการ

ทดสอบความมีชีวิตและการงอกละอองเกสรของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง

Nepenthes mirabilis var. mirabilis เก็บละอองเกสรในช่วงเดือนกันยายน พื้นที่ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี *N. mirabilis* var. globosa เก็บละอองเกสรในช่วงเดือนสิงหาคม พื้นที่ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตตรัง *N. thorelii* (suratensis) เก็บละอองเกสรในช่วงเดือนกรกฎาคมและตุลาคม พื้นที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี ทดสอบความมีชีวิตโดยย้อมสี Aceto carmine 1%, Aceto orcein 1%, Iodine 1%, Cotton-blue, TTC 1% ตรวจนับจำนวนความมีชีวิตของละอองเกสรที่ติดสี มีรูปร่างปกติ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า การทดลองจำนวน 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำสุ่มนับการติดสี 5 ตำแหน่งต่อสไลด์

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนละอองเกสรที่ติดสี}}{\text{จำนวนละอองเกสรทั้งหมดที่สุ่มนับ}} \times 100$$

ทดสอบการงอกด้วยเทคนิคหยดแขวน (Hanging drop technique) โดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย บอริก 0.01 กรัม แคลเซียมไนเทรต 0.03 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.02 กรัม โพแทสเซียมไนเทรต 0.01 กรัม (Brewbaker and Kwack., 1963) ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 7 ระดับ คือ 2, 3, 5, 10, 15, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ สังเกตลักษณะรูปร่างของละอองเกสรที่งอกด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า การทดลองจำนวน 5 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำทำการสุ่มนับการงอกของละอองเกสรจำนวน 5 ตำแหน่งต่อสไลด์

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความงอก} = \frac{\text{จำนวนละอองเกสรที่งอก}}{\text{จำนวนละอองเกสรทั้งหมดที่สุ่มนับ}} \times 100$$

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการตรวจสอบความมีชีวิตและการงอกของละอองเกสรหม้อข้าวหม้อแกงลิงทั้ง 3 สายพันธุ์ ละอองเกสรที่มีชีวิตจะย้อมติดสี Aceto carmine สีแดงหรือชมพู Aceto orcein สีส้มหรือแดง TTC สีแดง Cotton blue สีน้ำเงินเข้ม และ Iodine ติดสีน้ำตาลแดง ละอองเกสรที่ไม่มีชีวิตจะไม่พบการติดสี (Figure 1) สีย้อมที่เหมาะสมต่อการทดสอบความมีชีวิตละอองเกสรพันธุ์ *N. mirabilis* var. mirabilis พบว่าสีย้อม Aceto orcein สามารถย้อมติดละอองเกสรได้ดี และมีค่าความมีชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาสีย้อม Aceto carmine, Iodine, Cotton Blue และ TTC มีค่าความมีชีวิตเท่ากับ 99.69, 99.59, 99.59, 64.00 เปอร์เซ็นต์ (Figure 3A) สีย้อมที่เหมาะสมต่อการทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสรพันธุ์ *N. mirabilis* var. globosa พบว่าสีย้อม Aceto carmine สามารถย้อมติดละอองเกสรมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 98.40 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ Cotton Blue และ Aceto orcein มีค่าความมีชีวิต 93.64 และ 88.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Iodine และ TTC มีค่าความมีชีวิตของละอองเกสรค่อนข้างต่ำ คือ 47.75 และ 30.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 3B) สีย้อมที่เหมาะสมต่อการทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสรพันธุ์ *N. thorelii* (suratensis) พบว่าสีย้อม Cotton Blue สามารถย้อมติดละอองเกสรมีค่าความมีชีวิต 96.88 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ Aceto orcein, Aceto carmine และ Iodine มีค่าความมีชีวิต 94.49, 94.27, 88.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ TTC มีค่าความมีชีวิตค่อนข้างต่ำ คือ 38.88 เปอร์เซ็นต์ (Figure 3C) ทดสอบการงอกของละอองเกสร ในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ สังเกตเห็นหลอดละอองเกสรที่งอก (pollen tube) แทงทะลุผ่าน germ pore ของละอองเกสรออกมา หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 18-20 ชั่วโมง (ภาพที่ 2) โดยน้ำตาลซูโครสเป็นสารทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานและปรับค่าพลังงานศักย์ของน้ำ (Osmotic potential; OP) ในอาหารสังเคราะห์ให้มีความเหมาะสมต่อการงอกของละอองเกสร (Biagini *et al*., 2014) จากการทดลองพบว่า ที่ระดับน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ มีการงอกดีที่สุด คิดเป็น 65.81, 54.68 ตามลำดับ ของละอองเกสรพันธุ์ *N. mirabilis* var. mirabilis และ *N. mirabilis* var. globosa (Figure 3D, E) ขณะที่ละอองเกสรสายพันธุ์ *N. thorelii* (suratensis) มีการงอกสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ มีการงอกเพียง 15.12 เปอร์เซ็นต์ (Figure 3F) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสีย้อมให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่าเปอร์เซ็นต์การงอกมาก เนื่องจากสีย้อมแต่ละชนิดจะย้อมติดส่วนประกอบของเซลล์ละอองเกสรเพียงบางส่วนเท่านั้น Aceto carmine, Aceto orcein และ Iodine ติดสีบริเวณไซโทพลาสซึม สีจะกระจายทั่วตามตำแหน่งของ chromosome ใน organelle TTC ย้อมติดในส่วนของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ Cotton blue ย้อมติดในส่วนของไคติน และเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ละอองเกสร (Usanee., 2014) ดังนั้นสีย้อมไม่สามารถบ่งบอกถึงความแข็งแรง ความสมบูรณ์ หรือความเป็นหมันของละอองเกสรเพศผู้ได้ แต่ละอองเกสรเหล่านี้ยังมีระดับขององค์ประกอบทางเคมีสูงพอที่จะติดสีย้อมได้ ดังนั้นจึงใช้เป็นเพียงการคาดคะเนความมีชีวิตของละอองเกสร ในเวลาอันรวดเร็วเท่านั้น

สรุป

จากการศึกษาความมีชีวิตและการงอกของละอองเกสรหม้อข้าวหม้อแกงลิง 3 สายพันธุ์ เพื่อทดสอบหาสีย้อมที่เหมาะสมต่อการทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสรและทดสอบหาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมในอาหารสังเคราะห์ต่อการงอกของละอองเกสร พบว่าละอองเกสรของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงทั้ง 3 พันธุ์ ติดสีย้อม Aceto carmine, Aceto orcein และ Cotton blue ได้ดี สำหรับการทดสอบการงอกของละอองเกสร พบว่าที่ระดับน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการงอกละอองเกสรพันธุ์ *N. mirabilis* var. mirabilis และ *N. mirabilis* var. globosa ขณะที่ละอองเกสรพันธุ์ *N. thorelii* ที่ระดับน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณแหล่งทุนวิจัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี และวิทยาเขตหาดใหญ่ที่สนับสนุนทุนในการทำงานวิจัยในระดับบัณฑิตศึกษาจากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม และได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

เอกสารอ้างอิง

Biagini G, Faleri C, Cresti M, Cai G. 2014. Sucrose concentration in the growth medium affects the cell wall composition of tobacco pollen tubes. Plant Reprod 27:129-144

Brewbaker, J.L. and Kwack, B.H. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Amer J Bot. 50: 859-865

Cavusoglu, A and Sulusoglu, M. 2014. In vitro pollen viability and pollen germination in medlar (*Mespilus germanica* L.). Int. Res. J. Biological Sci, vol. 2, no. 5, pp.49–53.

Pham, V.T., Herrero, M., Hormaza, J.I. 2015. Effect of temperature on pollen germination and pollen tube growth in longan (*Dimocarpus longan* Lour.). Sci Hortic. 197, 470–475.

Soares, T.L., Souza, E.H., Costa, M.A.P.C., Silva, S.O., Santos-Serejo, J.A. 2016. Viability of pollen grains of tetraploid banana. Bragantia, Campinas, v. 75, n. 2, p.145-151, 2016

Usanee Wongpatsa. 2014. Effects of temperature on pollen development of male sterility lines on Two-line hybrid rice system. MS. Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

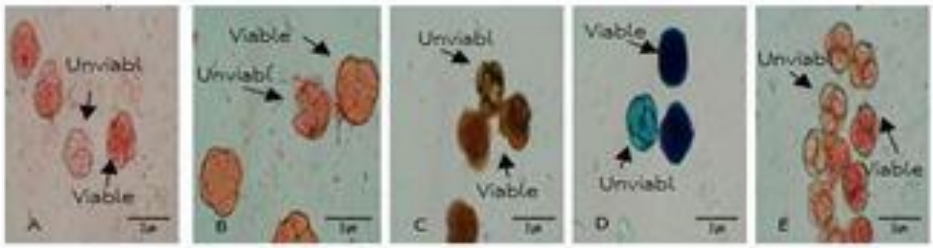

Figure 1 Viability of *N. mirabilis* var. mirabilis was stained with Aceto Carmine (A), Aceto Orcein (B), Iodine (C), Cotton-blue (D), Tetrazolium Chloride (E)

Figure 2 Pollen grains germination from *N. mirabilis* var. mirabilis (A), *N. mirabilis* var. globosa (B), *N. thorelii* (suratensis) (C).

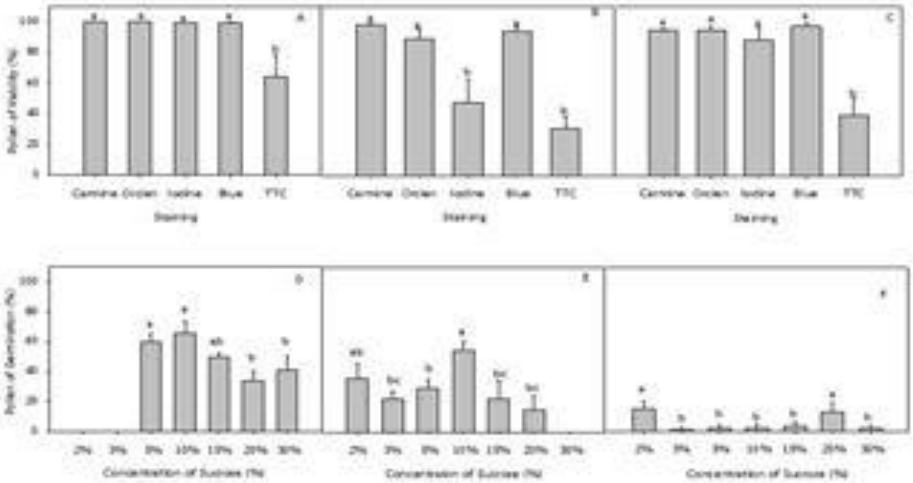

Figure 3 Viability and Germination of pollen grains (%) of *N. mirabilis* var. mirabilis (A, B), *N. mirabilis* var. globosa (C, D), *N. thorelii* (suratensis) (E, F)