

## บทที่ 2

### การตรวจเอกสาร

#### 1. กล้วยไม้สกุล *Eulophia*

กล้วยไม้สกุล *Eulophia* เป็นพืชในตระกูล Orchidaceae พบว่ามีมากกว่า 300 ชนิด กระจายอยู่ทั่วไปในเขตร้อนของโลกทั้งในทวีปเอเชีย อเมริกา แอฟริกา และในหมู่เกาะมาดากัสการ์ ในทวีปเอเชียพบในประเทศอินเดีย ศรีลังกา จีนและมาเลเซีย ส่วนในตอนใต้ของทวีปแอฟริกา มีรายงานว่ามียากล้วยไม้สกุลนี้มากถึง 42 ชนิด โดยพบว่ามีเจริญเติบโตในบริเวณทุ่งหญ้า ที่ราบลุ่ม ที่ราบสูง และตามพุ่มไม้ (Bose and Bhattacharjee, 1980 ; Rach, 2002) ส่วนใหญ่เป็นพวกที่เจริญเติบโตบนดิน อาจมีหัวอยู่ใต้ดินหรือมีลำลูกกล้วยอยู่เหนือดิน และอาจมีใบหรือไม่มีใบในช่วงออกดอก ใบมีลักษณะบางและเหนียว ช่อดอกตั้งตรง ดอกมีขนาดปานกลางไปจนถึงใหญ่ และมีลักษณะพิเศษ คือ มีสันบนปาก (Kurzweil, 2000)

กล้วยไม้สกุล *Eulophia* ชนิด *Eupha. graminea* Lindl. หรือช้างผสมโขลงนั้นพบว่ามีแหล่งกำเนิดอยู่ในแถบตะวันออกเฉียงใต้ของทวีปเอเชีย (Phua, 2004) โดยมีการกระจายพันธุ์ตั้งแต่ประเทศอินเดีย ไทย ไปจนถึงฟิลิปปินส์ (Yong, 1990) เวียดนาม จีน และไต้หวัน (Seidenfaden, 1983)

Bose and Bhattacharjee (1980) รายงานว่ากล้วยไม้สกุล *Eulophia* ส่วนใหญ่มีลำลูกกล้วยอยู่เหนือดิน ใบยาวและแคบ กล้วยรูปหอก ใบหนาและเหนียว อาจมีใบขณะมีดอกหรือหลังจากมีดอกแล้ว โดยทั่วไปช่อดอกออกจากส่วนโคนของลำลูกกล้วย ช่อดอกอาจแตกแขนงได้ มีจำนวนดอกตั้งแต่น้อยไปจนถึงมาก ทยอยบานจากส่วนโคนไปจนถึงส่วนปลายช่อ ดอกมีสีขาวอมเขียว กลีบเลี้ยงและกลีบดอกแยกออกจากกัน มีขนาดใกล้เคียงกัน กลีบปากติดกับส่วนฐานของโคนเส้าเกสร มีถุงหรือเดือย อาจมีสันจำนวน 3 สันอยู่บริเวณกลางของโคนกลีบปาก เส้าเกสรสั้นหรือยาวก็ได้ กลุ่มเรณูมี 2 กลุ่ม

พรพิมล และ คณะ (2542) สำรวจกล้วยไม้ดินใน จังหวัดอุบลราชธานี รายงานว่าพบกล้วยไม้ดินทั้งหมด 8 ชนิดโดยพบที่อุทยานแห่งชาติภูจองนายอยได้แก่ ท้าวตุล หรือ มังกรคาบแก้ว (*Brachycorythis helferi* (Rchb.f.) Summerh.) นางอ้วนน้อย (*Habenaria dentata* (Sw.) Schltr.) ลิ้นมังกร

(*H. rhodocheila* Hance) ขาวพิศมร (*Spathoglottis eburnea*) เหลืองพิศมร (*S. affinis* de Vriese) และ เอื้องดินว่านจุก (*S. plicata* Bl.) และที่ช่องเม็ก อำเภอสิรินธร พบกล้วยไม้ดินอีก 2 ชนิด คือ เอื้องเหลื่อม (*Calanthe cardioglossa* Schltr.) และ ช้างผสมโขลง (*Eulophia graminea* Lindl.) ตูลยุทธ์ (2546) กล่าวถึงการพบกล้วยไม้ดิน *Eulophia* ชนิด *Eupha. spectabilis* ว่ามีการเจริญเติบโตอยู่ที่ป่าอนุรักษ์บ้านโป่ง หมู่ที่ 6 ตำบลป่าไผ่ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งมีลักษณะทางนิเวศวิทยาเป็นภูเขาหินผุที่มีชั้นหน้าดินตื้น มีซากพืชสะสมอยู่มากพอควร สภาพของป่าเป็นป่าเต็งรัง และป่าดิบแล้ง มีแสงแดดมากแต่ไม่ถึงกับแสงแดดจัด สภาพป่าค่อนข้างโปร่งและมีพืชคลุมดินบางชนิด พื้นที่ดังกล่าวอยู่ในบริเวณที่มีความสูงประมาณ 500 เมตรจากระดับน้ำทะเล

จิตติพร และ คณะ (2545) สำรวจกล้วยไม้ป่าในพื้นที่โคกภูตากา อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น ระหว่างเดือนมกราคมถึงธันวาคม พ.ศ. 2544 พบกล้วยไม้ป่าทั้งประเภทอิงอาศัย และกล้วยไม้ดิน จำนวน 35 ชนิด ใน 22 สกุล โดยพบกล้วยไม้ในสกุล *Habenaria* มากที่สุด คือ 5 ชนิด รองลงมาคือ สกุล *Cleisostoma* 4 ชนิด และ สกุล *Eulophia* 3 ชนิด ในปีต่อมา สมราน (2546) ศึกษาอนุกรมวิธานของพืชวงศ์กล้วยไม้ในบริเวณอุทยานแห่งชาติป่าหินงาม จังหวัดชัยภูมิ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 ถึง พ.ศ. 2546 รายงานว่า จากกล้วยไม้จำนวน 22 สกุล 37 ชนิด ที่สำรวจพบปรากฏว่าเป็นกล้วยไม้อิงอาศัยมากที่สุด รองลงมาเป็นกล้วยไม้ดิน และกล้วยไม้ขึ้นบนหิน สกุลที่เป็นกล้วยไม้อิงอาศัยได้แก่ *Acropsis*, *Aerides*, *Bromheadia*, *Cleisostoma*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Luisia*, *Panisia*, *Pholidota*, *Polystachya*, *Thrixspermum* และ *Trichotosia* สำหรับสกุลที่เป็นกล้วยไม้ดิน ได้แก่ *Eulophia*, *Habenaria*, *Pecteilis*, *Peristylus*, *Spathoglottis* และ *Tainia* และกล้วยไม้ขึ้นบนหินได้แก่ *Doritis*

การรวบรวมพันธุ์ของกล้วยไม้สกุล *Eulophia* ในประเทศไทยมีที่สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ โดยเก็บรวบรวมพันธุ์ไว้ 4 ชนิด คือ *Eupha. andamanensis* Rchb. f., *Eupha. graminea* Lindl., *Eupha. macrobulbon* Hk. f. และ *Eupha. nuda* Lindl. (Nanakorn and Indharamusika, 1999)

## 2. *Eulophia graminea* Lindl.

อบฉันท (2547) กล่าวว่าในประเทศไทยกล้วยไม้สกุล *Eulophia* มี 12 ชนิด สำหรับชนิด *Eulophia graminea* Lindl. ที่มีชื่อสามัญพื้นถิ่นว่าช้างผสมโขลง (Vaddhanaphuti, 1997) หรือว่านพญาเทครัว (นายเกษตร, 2546) หรือหัวข้าวต้ม (สกลิต และ นฤมล, 2545) นั้นมีหัวอยู่เหนือดิน หัวมีลักษณะคล้ายหน่อไม้ (อบฉันท, 2547) ใบเป็นรูปแถบ แผ่นใบบาง ใบร่วงในฤดูแล้ง มีดอกหลังจากทิ้งใบ

ช่อดอกยาวและตรง ช่อโปร่ง ดอกมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5-2.0 เซนติเมตร (ซม) มี 10-25 ดอกต่อช่อ ออกดอกในเดือนกุมภาพันธ์ถึงเมษายน (สลิต และ นฤมล, 2545)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้สกุล *Eulophia graminea* Lindl. นั้น นายเกษตร (2546) สลิต และ นฤมล (2545) Bose and Bhattacharjee (1980) Seidenfaden (1983) Vaddhanaphuti (1997) White and Sharma (2000) และ Yong (1990) กล่าวถึงไว้ดังนี้

**2.1 หัว** เป็นรูปกรวยคล้ายลูกแพร์ หรือรูปน้ำเต้า โคนอวบใหญ่ และ กลม ปลายเรียวแหลม สูงประมาณ 8 ซม มีข้อมีปล้อง

**2.2 ใบ** เป็นใบเดี่ยว คล้ายใบหญ้า สีเขียวอมเทา เรียงตัวแบบสลับ รูปร่างเป็นรูปแถบ ยาวและแคบ ฐานใบเป็นกาบ ปลายใบแหลม มีจำนวนใบต่อดันน้อย ใบยาว 30-40 ซม ใบกว้าง 0.6-2.0 ซม

**2.3 ช่อดอก** เป็นแบบช่อกระจจะ หรือช่อแยกแขนง เป็นช่อที่มีลักษณะตั้งตรงออกมาจาก หัว มีความยาวช่อดอก 35-90 ซม ช่อดอกประกอบด้วยดอกย่อยขนาดเล็กจำนวน 10 – 25 ดอก

**2.4 ดอก** ดอกมีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกสีขาวปนเขียว หรือสีเขียวอมเหลือง บริเวณกลางกลีบดอกมีแถบสีน้ำตาลแดง 3 แถบ กลีบปากเป็นรูปขอบขนานแกมรูปไข่กลับสีขาว แฉกข้างรูปสามเหลี่ยม ปลายกลีบหยัก กลางกลีบมีริยางค์สีชมพูอ่อนจำนวนมาก โคนเส้นเกสรค่อนข้างสั้น มีกลุ่มเรณู 2 ก้อน ฝากรอบกลุ่มเรณูยาวและก้านรองกลุ่มเรณูมีขอบเรียบ ดอกเมื่อบานเต็มที่มีความกว้าง 1.5 ซม และความยาว 1.5 ซม โดยประมาณ

### 3. การเจริญเติบโต

กล้วยไม้สกุล *Eulophia* ส่วนใหญ่เป็นชนิดที่เจริญเติบโตบนพื้นดิน ซึ่งข้างผสมโคลงจัดอยู่ในกลุ่มนี้ส่วนที่เหลือเป็นพวกเจริญเติบโตแบบอิงอาศัย บางชนิดเป็นกล้วยไม้กินซาก เช่น *Eupha. zollingeri* (Hegde, 1981) มีเพียงไม่กี่ชนิดและเป็นชนิดที่หาพบได้ยาก และ บางชนิดเป็นพวกที่เจริญเติบโตบนหิน เช่น *Eupha. quartiniana* (Stewart, 1970)

สมศักดิ์ (2540) กล่าวว่าข้างผสมโคลงเป็นกล้วยไม้ที่มีลักษณะการเจริญเติบโตเป็นแบบฐานร่วม เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้วลำลูกกล้วยจะแตกหน่อใหม่ออกจากบริเวณโคนหรือข้อของลำลูกกล้วย

Bose and Bhattacharjee (1980) รายงานจากการทดสอบการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สกุล *Eulophia* ว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลนี้แตกต่างกันไปตามถิ่นเจริญเติบโต โดยทั่วไปแล้วกล้วยไม้เหล่านี้เจริญเติบโตได้ดีในสภาพอุณหภูมิ 15.5-29.4 °ซ ในฤดูหนาวควรมีอุณหภูมิกลางคืนประมาณ 15.5 °ซ ชอบสภาพชื้นและสภาพพรางแสงโดยที่ Kurzweil (2000) กล่าวว่า

ปริมาณแสงอาทิตย์ที่เหมาะสมคือประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ (%) หากได้รับแสงอาทิตย์โดยตรง หัวอาจไหม้ได้ (Carter, 2004) สำหรับชนิดที่เจริญเติบโตบนพื้นดินพบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนที่มี การระบายน้ำดีและวัสดุปลูกที่เหมาะสม คือ ดินร่วน 1 ส่วน ทรายกับปุ๋ยหมัก 1 ส่วน และ ออสมันดากับเส้นใยไม้สับอย่างละหนึ่งในแปดส่วน (Bose and Bhattacharjee, 1980) ทั้งนี้สอดคล้องกับ รายงานของ Carter (2004) ซึ่งได้ศึกษาการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุล *Eulophia* เช่นกันและพบว่า ดินปลูกที่เหมาะสมควรเป็นดินที่มีการระบายน้ำดี และวัสดุปลูกที่เหมาะสม คือ เวอร์มิคูไลต์ เพอร์ไลต์ พีทมอส พิวมิก และ ไบโอดีค ในอัตราส่วน 1:1:1:3:3 และให้ปุ๋ยสูตร 20-20-20 สลับกับ ปุ๋ยสูตร 3-10-10 ส่วน Kurzweil (2000) แนะนำให้ใช้ Nutrisol, Seagro, Multifeed 10, Osmocote และ Horticote

Singh *et al.* (2003) ศึกษาวัสดุปลูกที่เหมาะสมสำหรับ *Eulophia andamanensis* โดยนำพืช ทดลองปลูกลงในกระถางที่มีวัสดุปลูกที่เป็นส่วนผสมของวัสดุหลายอย่างมาประกอบกัน มี 6 กรรมวิธี ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 คือ ถ่าน อิฐหัก กาบมะพร้าว เปลือกมะพร้าว และปุ๋ยหมัก กรรมวิธีที่ 2 คือ อิฐหัก กาบมะพร้าว เปลือกมะพร้าว และปุ๋ยหมัก กรรมวิธีที่ 3 คือ ถ่าน กาบมะพร้าว เปลือกมะพร้าว และปุ๋ยหมัก กรรมวิธีที่ 4 คือ ถ่าน อิฐหัก เปลือกมะพร้าว และปุ๋ยหมัก กรรมวิธีที่ 5 คือ ถ่าน อิฐหัก กาบมะพร้าว และปุ๋ยหมัก และกรรมวิธีที่ 6 คือ ถ่าน อิฐหัก กาบมะพร้าว และเปลือก มะพร้าว พบว่าวัสดุปลูกในกรรมวิธีที่ 3 มีผลทำให้ได้ต้นที่มีช่อดอกยาวที่สุด คือ 95.75 ซม ดอกมีขนาด ใหญ่คือ 6.65 ซม และช่อดอกมีอายุการบานนานที่สุด คือ 49.67 วัน

#### 4. การขยายพันธุ์ของกล้วยไม้ดิน

การกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้ดินในสภาพธรรมชาติมี 2 ลักษณะ คือ การกระจายพันธุ์ โดยเมล็ดและการกระจายพันธุ์โดยหัว สำหรับการกระจายพันธุ์โดยวิธีหลังนี้กระจายพันธุ์และ เพิ่มปริมาณต้นได้ช้ากว่าวิธีแรก (ระพี, 2530) ฉันทนา และ คณะ (2547) ได้รายงานผลการศึกษาของการกระจายพันธุ์ของช้างผสมโขลงในสภาพธรรมชาติไว้ว่าพืชชนิดนี้กระจายพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างลำลูกกล้วยใหม่จากต้นที่งอกออกมาจากตาใบของลำลูกกล้วยแม่ โดยที่ลำลูกกล้วยแม่แตกตาใบได้ 1-3 ตา และตาเหล่านี้เป็นตาที่มีตำแหน่งอยู่ที่บริเวณฐานของ ลำลูกกล้วยแม่ลำนั้น จากนั้นต้นพืช 1-3 ต้นดังกล่าวนี้ แต่ละต้นก็จะสร้างลำลูกกล้วยของมันเอง ต้นละ 1 ลำ ลำลูกกล้วยเหล่านี้เป็นลำลูกกล้วยแม่ในฤดูการเจริญเติบโตของปีถัดไป ในแต่ ละปีนั้นลำลูกกล้วยแม่ 1 ลำจะสามารถขยายลำลูกกล้วยใหม่ได้เพียง 1-3 ลำ เท่านั้น

สำหรับการกระจายพันธุ์ทางเมล็ดนั้นถึงแม้ว่ากล้วยไม้ดินส่วนใหญ่จะสามารถติดฝักเองได้ในสภาพธรรมชาติและเมื่อฝักแก่แตกออกจะกระจายเมล็ดปลิวไปตามลม หรือตกลงบนพื้นดินในบริเวณใกล้เคียงกับต้นแม่ก็ตาม แต่การอยู่รอดของเมล็ดและต้นกล้าจะขึ้นอยู่กับปัจจัยของสภาพพื้นที่และสภาพแวดล้อมได้แก่ ความชื้นและระดับแสงเป็นหลัก (จันทนา และ คณะ, 2547 ; Nanakorn and Indharamusika, 1999)

การขยายพันธุ์กล้วยไม้ดินในปัจจุบันใช้หลักการขยายพันธุ์โดยอิงแนวทางจากวิธีการกระจายพันธุ์ในสภาพธรรมชาติดังกล่าวแล้วข้างต้น โดยที่ Carter (2004) รายงานว่าสามารถขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุล *Eulophia* บางชนิดโดยการตัดแยกหัวหรือลำลูกกล้วยที่อยู่ชิดติดกันไปปลูกลงกระถางเป็นหัวเดี่ยวหรือลำเดี่ยว โดยปลูกในวัสดุปลูก คือ เวอร์มิคูไลต์ เพอร์ไลต์ พีทมอส ฟิวมิก และ ไบโอดีคในอัตราส่วน 1:1:1:3:3 โดยที่การตัดแบ่งหัวที่ให้ผลดีที่สุด คือ ในระยะที่ต้นมีหัวหรือลำลูกกล้วย 3 หัวติดกัน Thomas (1996) รายงานไว้สอดคล้องกันว่าวิธีการขยายพันธุ์สำหรับ *Eupha. pulchra* ที่ดีที่สุด คือ การแยกหัวหัวเดี่ยวไปปลูก นอกจากนี้ Duncan (2003) ได้รายงานไว้ในกรณีของ *Eupha. horsfallii* นั้น การขยายพันธุ์ที่เหมาะสม คือ การแยกหัวในช่วงก่อนที่หัวจะแตกใบและหัวที่แยกไปใช้เวลา 2 ปี กว่าจะให้ดอก

การขยายพันธุ์กล้วยไม้ดินจากเมล็ดจำเป็นจะต้องขยายพันธุ์จากฝักอ่อนในสภาพปลอดเชื้อเนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมากคล้ายแป้งหรือฝุ่น และภายในเมล็ดแทบจะไม่มีอาหารสะสมสำหรับช่วยในการงอก (Nanakorn and Indharamusika, 1999) ประกอบกับเอ็มบริโอนั้นประกอบด้วยเซลล์พาราคีมาที่มีขนาดเล็กสม่ำเสมอ ไม่มีรากและใบเลี้ยง และอาหารที่สะสมส่วนใหญ่เป็นไขมัน (ครรรชิต, 2547) เมล็ดจึงมีความสามารถในการงอกต่ำ แต่ในทางปฏิบัตินั้นการขยายพันธุ์จากเมล็ดของกล้วยไม้ ทั้งกล้วยไม้อิงอาศัยและกล้วยไม้ดินสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการเพาะเมล็ดจากฝักอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ (จันทนา และ คณะ, 2548)

การศึกษาการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ดินในสภาพปลอดเชื้อกระทำกันในกล้วยไม้ดินหลายชนิด Linden (1980) ศึกษาการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ดินแบบปลอดเชื้อ รายงานว่าเมล็ดอ่อนงอกดีกว่าเมล็ดแก่ และเมล็ดสามารถงอกหลังจากเพาะเมล็ดได้ 2 - 10 สัปดาห์ ช้าหรือเร็วขึ้นอยู่กับชนิดของกล้วยไม้ นอกจากนี้ยังพบอีกด้วยว่าอุณหภูมิที่ไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ด แต่อย่างไรก็ตามการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดของกล้วยไม้ดินใช้เวลานานกว่าจะได้ต้นที่ให้ดอก ในกล้วยไม้ดินบางชนิดอาจใช้เวลานาน 3 - 5 ปี (Jorgensen and Andersen, 1998)

Waes and Debergh (1986) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดิน 23 ชนิด พบว่ากล้วยไม้ดินทุกชนิดที่ศึกษาสามารถงอกได้ดีบนอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีธาตุอาหารหลักและเพาะเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 23 °ซ เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีส่วนผสมของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า เมล็ดงอกได้ดีที่สุดในอาหารที่มีซูโครสเข้มข้น 58 ไมโครโมล การใส่เมนนีทอลอย่างเดี่ยวหรือร่วมกับซูโครสไม่แสดงผลแตกต่างกันนัก สำหรับแหล่งในโตรเจน นั้นพบว่า casein hydrolysate ให้ผลดีที่สุด ส่วนผลของ BA และ GA<sub>3</sub> พบว่า BA ที่ความเข้มข้น 0.88 ไมโครโมล ช่วยเพิ่มความงอกของเมล็ด *Cypripedium calceolus* และ *Epipactis helleborine* แต่ลดเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด *Dactylorhiza maculata* และ *Listera ovata* ส่วน GA<sub>3</sub> มีผลในการลดความงอกของเมล็ด *D. maculata* และ *L. ovata* แต่ไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ด *Cyp. calceolus* และ *Epcts. Helleborine*

Vejsadova and Mala (1996) ศึกษาการงอกของเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อของกล้วยไม้ดินที่ใกล้สูญพันธุ์ 8 ชนิด คือ *Orchis morio*, *Gymnadenia conopsea*, *Liparis loeselii*, *Epipactis palustris*, *Dactylorhiza longibracteata*, *D. bohemica*, *D. incarnata* และ *D. maculata* โดยนำเมล็ดไปฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 10 % หรือแคลเซียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 7 % ร่วมกับเอทานอล 70 % แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงที่แตกต่างกัน 3 สูตร เก็บขวดอาหารไว้ในที่มีดินนาน 4 และ 8 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 18-22 °ซ พบว่า เมล็ดที่เก็บขณะแก่เต็มที่ที่ไม่แสดงความแตกต่างในอาหารทั้ง 3 สูตร การฆ่าเชื้อให้เมล็ดช่วยกระตุ้นความงอกของเมล็ดทั้งเมล็ดอ่อนและเมล็ดแก่และกระตุ้นการปลดปล่อย inhibitor ในเมล็ดแก่ด้วย เมล็ดตอบสนองต่อน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของกล้วยไม้และสูตรของอาหารเลี้ยง นอกจากนี้ยังสรุปไว้ด้วยว่าวิธีการเพาะเลี้ยงแบบนี้สามารถใช้สำหรับการเลี้ยงโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ชนิด *D. longibracteata*, *D. bohemica*, *D. incarnata*, *D. maculata* และ *O. morio* ได้เช่นกัน

Luks and Shevchenko (1977) ศึกษาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดิน คือ *Orchis purpurea* และ *Disa uniflora* โดยการนำเมล็ดมาฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ นาน 1-2 นาที แล้วนำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เมล็ดของกล้วยไม้เหล่านั้นมีอัตราการงอกต่ำ และต้นกล้าเจริญเติบโตช้า เนื่องจากพิษที่เกิดจากเมอร์คิวริกคลอไรด์ แต่เมื่อศึกษาใน *Bletilla striata* ในวิธีที่แตกต่างกันคือ ไม่ให้เมล็ดสัมผัสยาฆ่าเชื้อโดยตรง โดยการนำมาทั้งฝักแล้วฆ่าเชื้อฝักด้วยแอลกอฮอล์ พบว่าเมื่อใช้วิธีการนี้เมล็ดงอก 100 % และต้นกล้าเจริญเติบโตดีหลังจากย้ายลงอาหารสูตรสำหรับการปลูกเลี้ยง

Miyoshi and Mii (1988) ศึกษาการเพิ่มความงอกของเมล็ดแก่ของกล้วยไม้ดิน *Calanthe discolor* ที่เพาะเลี้ยงแบบปลอดเชื้อในอาหารเหลว โดยการให้เมล็ดได้รับอุลตราไวโอเล็ตหลังจากที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 1 % จากผลการทดลอง พบว่า เปลือกหุ้มเมล็ดของเมล็ดเกือบทั้งหมดของกรรมวิธีที่ได้รับอุลตราไวโอเล็ตนาน 4 นาที หลุดออกจากเมล็ด แต่อย่างไรก็ตามกรรมวิธีที่ได้รับอุลตราไวโอเล็ตนานเกิน 8 นาทีนั้น แสดงความเสียหายของเอมบริโอ สำหรับความสามารถในการงอกของเมล็ดนั้น พบว่า กรรมวิธีควบคุมนั้นเมล็ดงอกเพียง 10 % ในขณะที่เมล็ดของกรรมวิธีที่ได้รับ

อุตุตราไซนิกันาน 4-16 นาที งด 60 % ในปีต่อมา Miyoshi and Mii (1998) ได้ศึกษาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดินอีกชนิดหนึ่ง คือ *Cypripedium macranthos* Swartz ในสภาพปลอดเชื้อโดยการพอกเมล็ดในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ หรือแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ แล้วเพาะเมล็ดในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำและเติมไซโตไคนินลงในอาหาร พบว่า การงอกของเมล็ดขึ้นอยู่กับความยาวนานของช่วงเวลาที่เมล็ดสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อ ส่วนการให้เมล็ดได้รับความเย็น 4 °ซ ก่อนที่จะนำไปเพาะแล้วเลี้ยงที่ 20 °ซ ช่วยให้เมล็ดงอกได้ดี การให้ความเย็นเป็นช่วงยาวนานถึง 2 เดือน ช่วยให้เมล็ดงอกดีกว่าการให้ความเย็นเพียง 2 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังพบว่า การให้ไซโตไคนินเข้มข้น 1 ไมโครโมล ช่วยในการงอกของเมล็ด

Barroso *et al.* (1990) ศึกษาการงอกของเมล็ดอ่อนและเมล็ดแก่และการเกิดหัวในอาหารเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อของกล้วยไม้ดิน คือ *Ophrys fusca* Link, *O. lutea* Cav. และ *O. speculum* พบว่า เมล็ดของ *O. fusca* Link และ *O. lutea* Cav สามารถงอกได้และเจริญเป็นโปรโตคอร์ัมหลังจากเพาะเมล็ดได้ 2 เดือน และเมื่อย้ายมาเลี้ยงบนอาหารสูตร 4 (OCM4) พบว่า เกิดเป็นเนื้อเยื่อคล้ายโปรโตคอร์ัมที่มีโปรโตคอร์ัมขนาดเล็กเป็นจำนวนมากเกาะอยู่และเจริญต่อเป็นต้นอ่อนมากมายภายในเวลา 2 เดือน ซึ่งเนื้อเยื่อดังกล่าวนี้สามารถนำไปตัดแบ่งแล้วแยกไปเพาะเลี้ยงในอาหาร OCM4 เพื่อการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนได้ ซึ่งการเลี้ยงครั้งนี้ได้ต้นอ่อนสูง 5 ซม ในเวลา 2 เดือน และต้นอ่อนเหล่านั้นสามารถย้ายปลูกลงดินได้ในเวลาต่อมา ส่วนหัวขนาดเล็กของ *O. lutea* Cav และ *O. speculum* นั้น พบว่าสามารถชักนำให้เกิดได้โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OCM ดัดแปลงและหัวเหล่านั้นมีลักษณะทางสัณฐานและกายวิภาคเหมือนกับหัวที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และยังได้ให้ความเห็นไว้ด้วยว่าวิธีการนี้น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของกล้วยไม้ดินทั้งหลาย

Ochora *et al.* (2001) ศึกษาการงอกแบบสมชีพ (symbiotic) ของเมล็ดกล้วยไม้ดินสกุล *Eulophia* ในประเทศเคนยาบนอาหารเพาะเลี้ยงเมล็ด นำก่อนเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนั้นไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยง 2 สูตร สูตรที่ 1 คือ อาหารที่ใช้สำหรับเพาะเมล็ดที่เติมข้าวโอ๊ต 2 % สูตรที่ 2 คือ อาหารที่มีส่วนผสมของข้าวโอ๊ต ร่วมกับกล้วยบด 10 กรัมต่อลิตร และ ถ่าน 0.2 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหารเลี้ยงสูตรที่ 1 ซึ่งเป็นอาหารที่ให้กลูโคส 2 กรัมต่อลิตร และมี  $\text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.0 มิลลิโมล เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น เมล็ดงอกและเจริญเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุด และในกรรมวิธีนี้เมื่อมีการเลี้ยงเชื้อเอนโดไมคอร์ไรซาร่วมด้วย โดยการเลี้ยงเชื้อในระยะ 7 วันหลังจากเพาะเมล็ด พบว่ามีโปรโตคอร์ัมเกิดขึ้น หลังจากย้ายอาหารเลี้ยงครั้งที่ 2 ได้ 30 วัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมล็ดของกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด สามารถจะนำไปเพาะเลี้ยงแบบสมชีพได้ถ้าเลี้ยงร่วมกับเชื้อราที่เหมาะสม

และการเจริญเป็นต้นอ่อนในอาหารเลี้ยงเกิดขึ้นได้เร็วกว่าในสภาพธรรมชาติ ดังนั้นวิธีการนี้จึงสามารถนำไปใช้ในการอนุรักษ์พันธุ์กรรมกล้วยไม้ 2 ชนิดนี้ โดยวิธีการเก็บรักษานอกพื้นที่ได้

Zettler and Hofer (1998) ศึกษาการขยายพันธุ์ของกล้วยไม้ดิน *Platanther clavellata* ซึ่งเป็นพวกผสมตัวเอง โดยการเพาะเมล็ดแบบสมชีพด้วยการนำเมล็ดมาเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อราไมคอร์ไรซาหลายชนิด (*Epulorhiza* spp.) เพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อแล้วประเมินการงอกและการเจริญเป็นโปรโตคอร์มหลังจากเลี้ยงได้ 1 ปี พบว่า เมล็ดที่นำมาจากรัฐ Tennessee และ South Carolina ของสหรัฐอเมริกา มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงเป็น 76.4 % และ 81.5 % ส่วนเมล็ดที่นำมาจากรัฐ Georgia มีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำเป็น 16.2 % แต่ต้นกล้าของกลุ่มหลังมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าและย้ายปลูกลงดินได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราไมคอร์ไรซาที่เจริญเติบโตที่บริเวณรากของกล้วยไม้ดินชนิดนี้เมื่อนำมาแยกเชื้อเดี่ยวเป็นชนิด *E. inquilina* แล้วสามารถเร่งการเจริญเติบโตของต้นอ่อนได้ ส่วนเชื้อเดี่ยวอีก 3 เชื้อที่แยกได้จากรากของกล้วยไม้ดินต่างชนิดของสกุลเดียวกันนี้ คือ *P. ciliaris*, *P. cristata* และ *P. integrilabia* นั้นไม่มีประสิทธิภาพในการเร่งการเจริญเติบโตของต้นอ่อนของพืชทดลอง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของการอยู่ร่วมกันของชนิดพืชและชนิดของเชื้อรา

Zettler and McInnis (1994) ศึกษาผลของระดับแสงที่มีต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดินชนิดที่กำลังจะสูญพันธุ์ คือ *Platanthera integrilabia* โดยเพาะแบบสมชีพเปรียบเทียบกับเพาะแบบปกติ กรรมวิธีของแสงมี 3 กรรมวิธี ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 ให้ความมืด 7 วันนับจากวันเพาะเมล็ด จากนั้นให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน กรรมวิธีที่ 2 ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นให้อยู่ในที่มืด และกรรมวิธีที่ 3 ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันตลอดการทดลอง และ ให้กรรมวิธีเพิ่มเติมคือ เพาะเลี้ยงในที่มืดตลอดการทดลอง พบว่า กรรมวิธีที่ 1 และ 2 ยับยั้งการงอกของเมล็ด แต่กรรมวิธีที่เพาะเมล็ดแบบสมชีพแล้วได้รับแสงแบบกรรมวิธีที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่าวิธีอื่น ๆ รวมทั้งกรรมวิธีที่อยู่ในที่มืดตลอดเวลา การเจริญของต้นอ่อนในระยะที่สร้างจุกกำเนิดใบนั้นเกิดขึ้นในกรณีที่ให้แสงกระตุ้นใน 7 วันแรก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสภาพธรรมชาติแล้วจะเห็นว่าผลการทดลองนี้ให้ข้อมูลในแง่ที่ว่าแสงกระตุ้นให้เกิดการงอกและการเจริญของต้นอ่อนได้ในสภาพของเขตอบอุ่น

Hollick *et al.* (2002) ศึกษาการตอบสนองต่อพาโคลบิวทราโซลของเชื้อราไมคอร์ไรซาและผลผลิตของหัวของกล้วยไม้ดิน 3 ชนิด คือ *Diuris laxiflora* Lindley, *Microtis media* R. Br. และ *Pterostylis sanguinea* D. Jones & M. Clements โดยการเลี้ยงต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อร่วมกับเชื้อราไมคอร์ไรซา และเชื้อราดังกล่าวนำมาจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีพาโคลบิวทราโซลที่ความเข้มข้นระดับต่างกัน คือ 0, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (มก/ลิตร) พบว่าพาโคลบิวทราโซลทุกความเข้มข้นลดการเจริญเติบโตของเชื้อไมคอร์ไรซาใน *M. media* และ *P. sanguinea* เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมแต่ไม่ลดใน *D. laxiflora* และเมื่อใช้ในความเข้มข้นต่ำกลับกระตุ้นการเจริญเติบโต



ในแง่ของการกระตุ้นการเกิดหัวนั้น พบว่าพาโคลบิวทาโซลมีผลในทางส่งเสริมใน *D. laxiflora* แต่ไม่ได้ผลกับอีก 2 ชนิด

## 5. ลักษณะทางกายวิภาคและการใช้ประโยชน์ในทางอนุกรมวิธาน

กายวิภาคหรือรูปร่างและโครงสร้างภายในของอวัยวะพืชเป็นแหล่งข้อมูลที่ใช้ในทางอนุกรมวิธานมาช้านาน ข้อมูลทางกายวิภาควิทยามีประโยชน์อย่างยิ่งในการไขปัญหาทางด้านความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืช และยังสามารถช่วยในการแปลผลทางวิวัฒนาการได้เป็นอย่างดี การศึกษาข้อมูลทางด้านกายวิภาควิทยามี 2 ประเภท คือ กายวิภาคระดับเซลล์และกายวิภาคระดับต่ำกว่าเซลล์ สำหรับส่วนของพืชที่นำมาศึกษากันมากได้แก่ ลำต้น ก้านใบ แผ่นใบ และ ใบเลี้ยงที่มีโครงสร้างของท่อลำเลียง ทั้งนี้รูปแบบการเรียงของเส้นใบก็สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้เช่นเดียวกัน (กันยา, 2545) ทั้งนี้การใช้ลักษณะทางกายวิภาคในการจำแนกพืชต้องใช้ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะอื่น ๆ ด้วยจึงจะสมบูรณ์ (Samuel and Luchsinger, 1979)

Freudenstein (1994) ศึกษาโครงสร้างของเส้าเกสรและความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ในเผ่าย่อย Corallorhizinae รายงานว่ากล้วยไม้กลุ่มนี้มีลักษณะของก้านกลุ่มเรณูแตกต่างกันหลายแบบ กล่าวคือ สกุล *Govenia* มีก้านกลุ่มเรณูที่เกิดจากเซลล์ผิวชั้นนอก ในขณะที่สกุล *Tipularia* มีลักษณะเฉพาะตัวของก้านกลุ่มเรณูที่มีการยึดตัวและการคอดตัวของจะงอย ส่วนสกุล *Dactylostalix* และ *Ephippianthus* นั้นกลุ่มเรณูไม่มีก้านแต่เกาะอยู่บนฐานที่มีลักษณะเป็นปุ่มหรือเป็น สำหรับสกุล *Aplectrum*, *Corallorhiza*, *Cremastra* และ *Oreorchis* นั้น ก้านกลุ่มเรณูมีเดือย จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยาเขาเสนอข้อสรุปเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ในเผ่าย่อย Corallorhizinae นี้ว่ากล้วยไม้วงศ์นี้สามารถแยกออกเป็นกลุ่มย่อยหลักได้อีก โดยในกลุ่มย่อยหลักกลุ่มหนึ่งประกอบด้วยกล้วยไม้ 4 สกุล คือ *Aplectrum*, *Corallorhiza*, *Cremastra* และ *Oreorchis* และกลุ่มย่อยอื่นที่มีความใกล้ชิดกับกลุ่มย่อยหลักแรกนั้น คือ กลุ่มของสกุล *Calypso*, *Tipularia* และ *Yoania* ส่วนสกุล *Govenia* นั้นเป็นสกุลที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากกับสกุล *Eulophia* ในเผ่าอื่นคือเผ่า Cymbidieae

Stern and Judd (2002) ศึกษากายวิภาคเปรียบเทียบของกล้วยไม้ในเผ่า Cymbidieae รายงานว่ากล้วยไม้กลุ่มนี้มีสกุลที่มีความใกล้เคียงกัน 28 สกุล และได้ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของกล้วยไม้ทั้ง 28 สกุลนั้น พบว่า ลักษณะทางกายวิภาคของกล้วยไม้ที่ศึกษาทั้งหมดมีความคล้ายคลึงกัน ยกเว้นในสกุล *Govenia* ซึ่งพบว่ามีลักษณะที่ไม่พบในสกุลอื่น คือ รากไม่มีวิเลเมน และมัด

ท่อลำเลียงของลำลูกกล้วยไม่มีเซลล์ชนิดสเกลอเรงคิมา ส่วนในสกุล *Grammatophyllum* และ *Porphyroglossis* พบว่า มัดของเซลล์เส้นใยรอบนอกของใบประกอบด้วยกลุ่มของเซลล์เส้นใยที่อยู่ชิดกับเซลล์ผิวและเป็นเซลล์ที่มีลักษณะเรียวยาวมีผนังเซลล์หนา ส่วนกลุ่มของเซลล์เส้นใยที่มีความหนานั้นเป็นกลุ่มที่อยู่ถัดเข้ามาทางด้านชั้นมีโซฟิลล์ ซึ่งลักษณะเช่นนี้พบในกล้วยไม้บางชนิดของสกุล *Maxillaria* จากการวิเคราะห์ DNA ผลที่ได้แสดงความใกล้ชิดกันระหว่างเผ่า *Cymbidieae* และ *Maxillarieae* ส่วนสกุล *Govenia* เป็นสกุลเดียวที่จัดออกไว้นอกกลุ่มเนื่องจากลักษณะทั้งทางกายวิภาคและทางโมเลกุลไม่ใกล้เคียงพอที่จะจัดไว้ในเผ่า *Cymbidieae*

Thorsch (1997) ศึกษาลักษณะของเซลล์เทรคีดเพื่อหาความสัมพันธ์และสภาวะของวิวัฒนาการของกล้วยไม้อิงอาศัยและกล้วยไม้ดิน รายงานว่าจากการศึกษารูปแบบการกระจายของเซลล์เทรคีดและเวสเซลในกล้วยไม้ดินเผ่า *Cranichideae* ในวงศ์ย่อย *Spirantheoideae* และหลายเผ่าของวงศ์ย่อย *Epidendroideae* เปรียบเทียบกับของกล้วยไม้อิงอาศัยในบางเผ่าของวงศ์ย่อย *Epidendroideae* พบว่าลักษณะของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด สามารถใช้พิจารณาและบ่งบอกความใกล้ชิดกันของกล้วยไม้เหล่านั้นได้ ลักษณะดังกล่าวคือลักษณะของรูพรุนของแผ่นตะแกรงของเซลล์เวสเซลและขนาดความกว้าง ยาว และหนาของเซลล์เทรคีดและเซลล์เวสเซล นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์เวสเซลของรากกล้วยไม้อิงอาศัยทั้งหมดมีรูพรุนของแผ่นตะแกรงเป็นแบบคล้ายขี้มันันใด

## 6. เซลล์พันธุศาสตร์และการใช้ประโยชน์ในทางอนุกรมวิธาน

เซลล์พันธุศาสตร์เป็นการศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมระดับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต การศึกษาโครโมโซมพืชให้ข้อมูลที่สามารบ่งบอกความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดกันของต้นพืชในแง่ที่ว่าต้นพืชที่มีความใกล้ชิดกันย่อมมีความคล้ายคลึงกันของจำนวนโครโมโซมและรูปร่างและลักษณะของโครโมโซม (กฤษญา, 2519)

การศึกษาลักษณะและจำนวนโครโมโซมในพืชทำได้โดยการศึกษาจากเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวแบบไมโทซิสหรือไมโอซิสตามความเหมาะสม โดยศึกษาจากเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอยู่ในระยะเมตาเฟส ซึ่งเป็นช่วงที่โครโมโซมหดตัวมากที่สุด ทำให้เห็นโครโมโซมชัดเจนและสามารถนับจำนวนได้ถูกต้องแม่นยำ โดยทั่วไปเนื้อเยื่อของพืชที่นำมาศึกษาโครโมโซมเป็นเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด หรือปลายราก ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเซลล์ที่มีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส (Samuel and Luchsinger, 1979; Withner, 1974) หรือศึกษาจากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในอับละอองเรณูในระยะที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (ภูวดล, 2528; วิสุทธิ์, 2536)

Biswas (1980) รายงานเทคนิคที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากเพื่อศึกษาโครโมโซมในกล้วยไม้ คือ การหยุดวงจรของเซลล์ในสารละลายอิมิตัวของพาราไดคลอโรเบนซีน (PDB) และโคลชิซิน (0.25 %) โดยใช้สารเคมีทั้ง 2 ชนิด ในอัตราส่วนที่ผันแปรไปตามชนิดของกล้วยไม้ และเสนออัตราส่วนที่เหมาะสมไว้สำหรับกล้วยไม้ 18 สกุล

Latha (2002) ศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้ *Habenaria crinifera*, *Nervilia aragoana*, *Renanthera imschootiana*, *Vanda coerulea* และ ลูกผสมของ *Phalaenopsis* สายพันธุ์ Chuck Hagen โดยการพัฒนาเทคนิคการย้อมสีเนื้อเยื่อปลายรากแบบรวดเร็ว รายงานว่าวิธีปฏิบัติที่เหมาะสมคือ การเก็บตัวอย่างปลายรากของพืชทดลองในช่วงเวลา 10.00 น. หยดสี lactopropionic orcein 2 หยดลงบนเนื้อเยื่อ นำกระจกสไลด์ไปลงไฟเหนือตะเกียงเพื่อให้เนื้อเยื่ออ่อนตัว จากนั้นนำ ปลายรากไปวางบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วหยด lactopropionic orcein ลงไป 1 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์แล้วขยี้เนื้อเยื่อ วิธีนี้จะได้โครโมโซมที่ติดสีชัดเจน ทั้งนี้เขาได้รายงานว่า *Habenaria crinifera* มีจำนวนโครโมโซม  $2n = 42$  *Nervilia aragoana* มี  $2n = 68$  *Vanda coerulea* มี  $2n = 38$  และ ลูกผสมของ *Phalaenopsis* สายพันธุ์ Chuck Hagen มี  $2n = 57$

Felix and Guerra (2000) ศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์เพื่อสนับสนุนงานอนุกรมวิธานของกล้วยไม้เผ่า Cymbodiaceae ของประเทศบราซิล โดยศึกษาในตัวอย่าง 44 ชนิด การศึกษาประกอบด้วยการศึกษาโครโมโซมร่างกายจากเนื้อเยื่อปลายรากหรือผนังรังไข่เป็นส่วนใหญ่และใช้เนื้อเยื่อจากตาดอกอ่อนในตัวอย่างของกล้วยไม้บางชนิด เทคนิคในการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาโครโมโซม คือ การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อแล้วหยุดวงจรเซลล์ในสารละลาย 8-hydroxyquinoline เข้มข้น 0.002 M ที่ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วตรึงเนื้อเยื่อในสารละลายคาร์บอน (ethanol : acetic acid = 3 :1) นาน 3-24 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เมื่อจะเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อการขยี้จึงย่อยแยกเซลล์ของเนื้อเยื่อในกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 5 นอร์มอล นาน 20-30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี 2 % giemsa หรือ 1 % hematoxylin เมื่อศึกษาได้กล้องจุลทรรศน์พบว่ากล้วยไม้ในเผ่าย่อย Catasetinae มีจำนวนโครโมโซม  $2n = 54$  และ 108 เผ่าย่อย Cyrtopodiinae มี  $2n = 44, 46$  และ 92 เผ่าย่อย Eulophiinae มี  $2n = 54$  เผ่าย่อย Lycastinae มี  $2n = 40$  และ 80 เผ่าย่อย Maxillariinae มี  $2n = 40$  และ 42 เผ่าย่อย Oncidiinae มี  $2n = 12, 20, 30, 36, 42, 44, 56, 112$  และ 168 เผ่าย่อย Ornithocephalinae มี  $2n = 56$  เผ่าย่อย Stanhopeinae มี  $2n = 40$  และ เผ่าย่อย Zygopetalinae มี  $2n = 52$  และ 96 และ จากผลการศึกษาพบว่าสกุล *Catasetum* และ *Oncidium* เป็นชนิดของกล้วยไม้ดินและกล้วยไม้ที่เจริญเติบโตบนหินที่มีระดับชุดของโครโมโซม (ploidy level) สูงกว่ากล้วยไม้ชนิดอิงอาศัย แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการปรับตัวของกล้วยไม้ทั้ง 2 สกุล ในการเพิ่มชุดของโครโมโซมในสภาพพื้นที่อาศัย

Peakall and James (1989) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ดินของประเทศออสเตรเลียจำนวน 35 ชนิด ใน 17 สกุล พบว่ามี  $2n$  ตั้งแต่ 24 ไปจนถึง 56 และพบว่ามีโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้ดิน 2 ชนิด ทั้งนี้เขาได้ให้ความเห็นจากปรากฏการณ์ที่เกิดการวิวัฒนาการในลักษณะของการเพิ่มชุดของโครโมโซมกล้วยไม้ดินของออสเตรเลียไว้ด้วยว่าความสามารถในการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมนี้มีผลในการทำให้เกิดความผันแปรหรือการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้ดินดังกล่าว

Goldblatt (1981, 1984) และ Felix and Guerra (2000) รายงานการศึกษาจำนวนโครโมโซมของ *Eulophia graminea* Lindl. โดยอ้างอิงงานวิจัยของ Mehra and Sehgel (1975) และ Biswas (1978, 1980) ว่าพืชชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซม  $2n = 54$  และ  $56$

## 7. การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

ปัจจุบันการศึกษาไอโซไซม์ของพืชโดยวิธีทางอิเล็กโทรโฟรีซิสถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการศึกษาสรีรวิทยาพืช โรคพืช การปรับปรุงพันธุ์พืช การจำแนกพันธุ์พืช และการจัดหมวดหมู่พืช เนื่องจากการศึกษาไอโซไซม์นั้นเมื่อเทียบกับการศึกษา DNA marker พบว่ามีข้อได้เปรียบ คือ สิ้นเปลืองเวลา และ ค่าใช้จ่ายน้อยกว่า เป็นเทคนิคที่ไม่ซับซ้อนและสามารถอธิบายผลได้ง่าย (Obara-Okeyo *et al.*, 1998 อ้างโดย กัลยา 2546; Stuber, 1991) อย่างไรก็ตามการนำเอาเทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซิสมาใช้ในแง่ดังกล่าวยังมีข้อจำกัด เนื่องจากไอโซไซม์บางชนิดที่นำมาใช้อาจจะไม่แสดงความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ ดังที่พบจากการศึกษาทดลองในพืชหลายชนิดว่าพันธุ์พืชที่มีแหล่งกำเนิดเดียวกันมีความผันแปรด้านไอโซไซม์น้อย (Brown, 1978 อ้างโดย วรรณภา, 2540)

ประทุมพร (2542) ศึกษาารูปแบบไอโซไซม์ในกล้วยไม้หวายช้างน้ำ ที่รวบรวมมาจาก 5 แหล่ง เมื่อวิเคราะห์เอนไซม์ 9 ชนิด คือ Esterase (EST), Glucose dehydrogenase (GDH), Glutamate dehydrogenase (GLD), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), Leucine amino peptidase (LAP), Malate dehydrogenase (MDH), Malic enzyme (ME), Shikimate dehydrogenase (SKD) และ Superoxide dismutase (SOD) โดยวิธีโพลีอะคริลามิเดเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า เอนไซม์แต่ละชนิดแสดงแถบสีหลายรูปแบบ และค่าเฉลี่ยของความถี่ของรูปแบบเอนไซม์ รวมทั้งค่าสัมประสิทธิ์ของความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมสามารถอธิบายระดับความสัมพันธ์ระหว่างประชากรที่ทดสอบได้ ทำให้สามารถนำไปใช้ในการบ่งชี้และประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชทดลองเหล่านั้น

รัตติกาล (2543) รายงานถึงการแยกกลุ่มกล้วยไม้เอื้องแซะ (*Dendrobium scabrilingue* Lindl.) โดยการวิเคราะห์รูปแบบแถบสีไอโซไซม์ โดยใช้เนื้อเยื่อของเอื้องแซะที่รวบรวมมาจาก 4 แหล่ง ได้แก่ อำเภอแม่สะเรียง และ อำเภอปางมะผ้า จังหวัดแม่ฮ่องสอน อำเภอเชียงดาว จังหวัด

เชียงใหม่ และคอยขุนตาล ในเขตจังหวัดลำปาง ร่วมกับเอ็งเงินแดงและเอ็งแะคอยปุย ด้วยระบบเอนไซม์ 6 ชนิด คือ EST, Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), Glucose-6-phosphate isomerase (GPI), LAP, MDH และ SKD พบว่า EST, GOT, MDH และ SKD แสดงแถบสีหลายรูปแบบ สามารถนำมาแยกความแตกต่างของประชากรเอ็งแะออกจากเอ็งแะคอยปุย และเอ็งเงินแดงได้อย่างเด่นชัด และสามารถแยกกลุ่มตัวอย่างของเอ็งแะออกเป็น 4 กลุ่มตามแหล่งที่มา แต่ไม่สามารถแยกบางตัวอย่างของเอ็งแะภายในกลุ่มตัวอย่างเดียวกันออกจากกันได้ สำหรับ GPI และ LAP ไม่แสดงแถบสีในบางตัวอย่างของเอ็งแะจาก อำเภอเชียงดาว และคอยขุนตาล และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบไอโซไซม์ และ RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) สามารถพิสูจน์ได้ว่ากลุ่มตัวอย่างของเอ็งแะจากอำเภอแม่สะเรียง น่าจะมีแหล่งกำเนิดเดียวกับกลุ่มตัวอย่างของเอ็งแะจากอำเภอปางมะผ้า และ กลุ่มตัวอย่างของเอ็งแะจากอำเภอเชียงดาว น่าจะมีแหล่งกำเนิดเดียวกับกลุ่มตัวอย่างของเอ็งแะจากคอยขุนตาล

Scacchi *et al.* (1991) รายงานผลการศึกษาระบบไอโซเอนไซม์ 7 ระบบ ในการแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ดิน 3 ชนิด ในสกุล *Cephalanthera* ซึ่งมีการแสดงออกและความหลากหลายทางพันธุกรรมแตกต่างกันในแต่ละชนิด โดยที่ *Cephalanthera longifolia* เป็นชนิดที่มีการผสมข้าม *C. rubra* เป็นชนิดที่มีการผสมข้ามเช่นกันแต่กระจายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วย และ *C. damasonium* เป็นชนิดผสมตัวเอง กล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิดนี้ มีการกระจายพันธุ์ในธรรมชาติในแถบป่าและภูเขาในตอนกลางของประเทศอิตาลี เมื่อนำมาปลูกเลี้ยง และปรับปรุงพันธุ์พืชทดลองทั้ง 3 ชนิด ได้ลูกผสมแล้วนำพ่อพันธุ์แม่พันธุ์และลูกผสมมาศึกษาการแสดงออกของแบบแผนไอโซไซม์ พบว่าสามารถแยกกลุ่มออกได้โดยสอดคล้องกับพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของพืชทดลองทั้ง 3 ชนิด โดยที่พืชทดลองในกลุ่มของ *C. longifolia* แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและลักษณะการแสดงออกเป็นพืชที่ผสมข้าม โดยมีการผันแปรทางพันธุกรรมในกลุ่มลูกผสมสูงกว่ากลุ่มอื่น ส่วนในกลุ่ม *C. rubra* แสดงความผันแปรบ้างในบางกลุ่มย่อยของประชากร ในขณะที่บางกลุ่มย่อยไม่มีการผันแปร ส่วนในกลุ่มของ *C. damasonium* นั้นไม่พบว่ามี ความผันแปรทางพันธุกรรม

Obara-Okeyo *et al.* (1997) วิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ของกล้วยไม้ *Cymbidium* 70 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเจลแบ่ง ระบบเอนไซม์ที่ใช้ทดสอบมี 8 ระบบ ได้แก่ Aspartate aminotransferase (AAT), Alcohol dehydrogenase (ADH), GPI, LAP, MDH, Phosphoglucumutase (PGM), SKD และ Triosephosphate isomerase (TPI) ผลการทดลองสรุปได้ว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ 68 กลุ่ม จาก 70 สายพันธุ์ที่ทดสอบแต่มี 2 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ คือ สายพันธุ์ Golden Star 'Kumamoto' และ Golden Star 'Sunrise' และ พบว่าระบบเอนไซม์ TPI เป็นระบบเดียวที่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ชัดเจน

Sharma and Jones (1999) ศึกษาลักษณะของลูกผสมข้ามชนิดตามธรรมชาติของกล้วยไม้ในประเทศออสเตรเลีย ระหว่างชนิด *Pterostylis alveata* และ *P. ophioglossa* โดยใช้เทคนิคการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเจลแข็ง ทดสอบไอโซไซม์ของต้นพืชทดลองด้วยระบบเอนไซม์ 8 ระบบ คือ Diaphorase (DIA), G6PDH, GPI, Isocitrate dehydrogenase (IDH), LAP, ME, PGM และ Uridine diphosphogluconic pyrophosphatase (UDP) โดยใช้สารสกัดจากใบ พบว่า ระบบเอนไซม์ 4 ระบบ คือ GPI, LAP, ME และ UDP แสดงรูปแบบไอโซไซม์ที่บ่งว่าพืชทดลองมีพันธุกรรมของพ่อและแม่ในลักษณะลูกผสมเฮเทอโรไซโกต โดยปรากฏอัลลีลของพ่อและแม่ในพืชทดลอง ซึ่งบ่งบอกจีโนไทป์ของพืชทดลองว่าเป็นจีโนไทป์ลูกผสม

Sharma *et al.* (2001) รายงานความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกล้วยไม้พื้นถิ่น 6 ชนิด ในสกุล *Pterostylis* ชูด *Grandiflorae* ของออสเตรเลียตะวันตก จากการศึกษาอัลโลไซม์โพลีเมอร์ไฟสซิม ที่ตรวจสอบโดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเจลแข็ง พืชทดลองที่ทดสอบมี 35 ประชากร ของกล้วยไม้พื้นถิ่นสกุล *Pterostylis* รวม 6 ชนิด ได้แก่ *Pterostylis aff. alata*, *Ptst. angusta*, *Ptst. aspera*, *Ptst. hamiltonii*, *Ptst. rogersii*, และ *Ptst. scabra* โดยมุ่งศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของการผสมพันธุ์ภายในชนิดและต่างชนิด ตลอดจนความสัมพันธ์ของชนิดเหล่านั้น โดยยึดถือผลการวิเคราะห์ที่ปรากฏจากการใช้ระบบเอนไซม์ 12 ระบบ เมื่อเขียนแผนโคโรแกรมจากผลการทดลองพบว่า สามารถแยกกลุ่มของประชากรออกเป็นกลุ่ม ๆ ได้สอดคล้องกับชนิดของพืชทดลองที่ใช้ และเมื่อพิจารณาจากความคล้ายคลึงกันของกลุ่ม พบว่า กลุ่มต่าง ๆ ที่เป็นตัวแทนของชนิดแต่ละชนิดมีความคล้ายคลึงกันสูง ยกเว้น *Ptst. aff. alata* ซึ่งมีความแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน ทั้งนี้ผลการทดลองที่ได้สนับสนุนการจำแนกโดยวิธีสันฐานวิทยาอย่างสอดคล้องกัน

## 8. การผสมพันธุ์กล้วยไม้

การผสมพันธุ์พืชเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ทำให้เกิดลูกผสมที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมจากต้นพ่อต้นแม่ และเป็นการสร้างพันธุ์ใหม่เพื่อการใช้ประโยชน์ในลักษณะต่าง ๆ ในการผสมพันธุ์กล้วยไม้ สิ่งสำคัญในการการผสมพันธุ์กล้วยไม้ให้ได้ผลดี คือ การเตรียมดอกเพื่อการผสมเกสร และการเก็บรักษาละอองเกสร (Richter, 1972)

การเตรียมดอกกล้วยไม้ที่เป็นแม่พันธุ์จากดอกสมบูรณ์เพศทำได้โดยการกำจัดเกสรเพศผู้หรือการตอนดอก ตัดอับละอองเรณูออกจากดอกที่บ้านเดิมที่อยู่กับต้น นอกจากนี้แล้วแองของเกสรเพศเมียจะต้องสะอาดอีกด้วย ส่วนดอกที่เป็นพ่อพันธุ์จะต้องมีเกสรเพศผู้ที่สะอาดเช่นกัน (ชาลิต, 2542)

การผสมเกสรต้องผสมในขณะที่เกสรเพศเมียพร้อมผสมโดยสังเกตจากปลายยอดเกสรเพศเมียซึ่งในระยะนี้จะมีน้ำเมือกเหนียวคล้ายแป้งเปียกบรรจุอยู่เต็มอ่ง การผสมเกสรทำโดยใช้ไม้ปลายแหลมที่สะอาดเขี่ยเกสรเพศผู้ออกมาแล้วใส่ลงไปที่ยอดเกสรเพศเมีย หลังจากนั้นติดป้ายที่เขียน วัน เดือน และปี ที่ผสมเกสรพร้อมทั้งชื่อพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ (ชวลิต, 2542 ; สมศักดิ์, 2540)

การเก็บรักษาละอองเรณูเพื่อรอการผสมในช่วงเวลาที่เหมาะสมเป็นสิ่งจำเป็นในการปรับปรุงพันธุ์พืช การเก็บรักษาละอองเรณูมีวิธีการที่แตกต่างกันไปตามชนิดของพืช และแต่ละวิธีการมีผลต่อความมีชีวิตของละอองเรณู โดยทั่วไปละอองเรณูของพืชมีชีวิตอยู่ได้ 1-2 ชั่วโมงหรืออย่างมาก 1-2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง การเก็บรักษาละอองเรณูไว้ในที่มีดในภาชนะสุญญากาศ ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 5-10 % จะสามารถเก็บไว้ได้นาน (ลาวัลย์, 2539)

Latha and Jayasree (2002) ศึกษาผลของ ethylene promoter คือ 1-aminocyclopropane carboxylic acid (ACC) และ ethylene inhibitor คือ aminooxy acetic acid (AOA) ที่มีต่อการเจริญเติบโตของหลอดละอองเรณูของกล้วยไม้ชนิด *Spathoglottis plicata* รายงานว่าในการเพาะเลี้ยงหลอดละอองเรณูในสภาพปลอดเชื้อนั้น หลอดละอองเรณูของกล้วยไม้ชนิดชนิดนี้ มีอัตราการยืดตัวเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นอัตราจึงลดลง ซึ่งเขาให้ความเห็นว่าออกซินซึ่งมีอยู่ในหลอดละอองเรณู คือ indole-3-acetic acid (IAA) มีผลในการชักนำให้เกิดการสร้างเอทิลีนซึ่งกระตุ้นการเจริญเติบโตของหลอดละอองเรณู การเพิ่ม ethylene promoter คือ ACC ลงในอาหารเพาะเลี้ยงหลอดละอองเรณูจึงเห็นผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของหลอดละอองเรณูดังกล่าว ในขณะที่การเพิ่ม AOA ซึ่งเป็น ethylene inhibitor ลงในอาหารเพาะเลี้ยงหลอดละอองเรณูมีผลในการชะงักการเจริญเติบโตของหลอดละอองเรณู

Shiau et al. (2002) ศึกษาการอนุรักษ์กล้วยไม้ชนิด *Anoectochilus formosanus* ในประเทศไต้หวัน โดยการผสมเกสรพืชดังกล่าวด้วยมือ แล้วนำฝักอ่อนไปเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ รายงานว่าการศึกษาทดลองผสมเกสรครั้งนี้สำเร็จโดยการผสมเกสรในระยะหลังดอกบาน 2-4 วัน เปอร์เซ็นต์การติดฝักเป็น 86.7 % ฝักอ่อนที่มีอายุเหมาะสมที่จะนำไปเพาะเลี้ยงคือฝักที่มีอายุ 7 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Murashige and Skoog's (MS) ที่มีความเข้มข้นของส่วนผสมครึ่งหนึ่งของสูตรเพิ่มถ่าน 0.2 % และ กล้วยบด 8.0 %

Devi and Deka (1992) ศึกษาความมีชีวิตของหลอดละอองเรณู การพร้อมผสมของยอดเกสรเพศเมีย และความสามารถในการผสมข้ามของกล้วยไม้บางชนิดของประเทศอินเดีย พบว่าความมีชีวิตของกล้วยไม้ชนิด *Spathoglottis plicata* และ *Phaius tankervilleae* ลดลงเรื่อย ๆ หลังจาดอกบาน ในขณะที่ความมีชีวิตของหลอดละอองเรณูของกล้วยไม้อิงอาศัยชนิด *Aerides odoratum* และ *Dendrobium amoenum* ดีขึ้น ในช่วง 3 วันแรกหลังดอกบาน จากนั้นความมีชีวิตค่อย ๆ ลดลง นอก

จากนี้ยังพบว่า การเก็บรักษาละอองเรณูที่อุณหภูมิ 4 °ซ ให้ผลดีกว่าเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ยกเว้นในกล้วยไม้ชนิด *Aer. odoratum* ที่การเก็บรักษาละอองเรณูไม่ได้ผล ส่วนความพร้อมผสมของยอดเกสรเพศเมียนั้น พบว่าใน *Aer. odoratum*, *Den. amoenum*, *Phai. tankervilleae* และ *Spa. plicata* ยอดเกสรเพศเมียพร้อมผสมไปตลอดช่วงเวลา 3, 4, 5 และ 11 วัน หลังดอกบานตามลำดับ สำหรับการทดสอบความสามารถในการผสมข้ามของกล้วยไม้ 4 ชนิดนี้ร่วมกับอีก 6 ชนิดที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การติดฝักเป็น 0 - 100 % ในกลุ่มผสมระหว่างชนิด และ 0 - 75 % ในกลุ่มผสมระหว่างสกุล และ พบว่าการเพาะเลี้ยงเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อทำได้สำเร็จเช่นกัน

Oh *et al.* (2001) ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ของกล้วยไม้ดิน 2 ชนิด คือ *Liparis kumokiri* และ *L. makinoana* พบว่า *L. kumokiri* มีลักษณะของการผสมเกสรเป็นแบบผสมตัวเอง ในขณะที่ *L. makinoana* เป็นแบบผสมข้าม กล้วยไม้ดินทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นประเภทที่ติดฝักได้น้อยในสภาพธรรมชาติ โดยที่ *L. kumokiri* มีเปอร์เซ็นต์ติดฝักเป็น 10.2 - 12.2 % และ *L. makinoana* เป็น 0.1-0.2 % อย่างไรก็ตามการผสมเกสรด้วยมือช่วยให้ดอกติดฝักได้ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าการที่ *L. makinoana* ติดฝักน้อยนั้นนอกจากข้อจำกัดของการที่ผสมตัวเองไม่ติดแล้วนั้น การขาดพาหะในการช่วยผสมเกสรก็อาจจะเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องด้วยอีกปัจจัยหนึ่ง