# บทที่ 2

## การตรวจเอกสาร

กล้วยไม้จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae เป็นพืชมีดอกที่มีจำนวนชนิดมากที่สุดในโลก ประมาณ 25,000 ชนิด (Alberto, 1989) ส่วนใหญ่เป็นกล้วยไม้ที่อาศัยอยู่ในป่า และยังมีหลายชนิดที่ยังไม่มีการศึกษา (Teo, 1985) จากการสำรวจการกระจายพันธุ์ของพืชวงศ์นี้ Dressler (1981) รายงานว่าในทวีปอเมริกามีการพบกล้วยไม้ในโคลัมเบียประมาณ 3,000 ชนิด ในบราซิล 2,500 ชนิด และ เวเนซูเอลา 1,500 ชนิด ในเขตร้อนของแอฟริกามีประมาณ 3,100 ชนิด และเอเชียเขตร้อนมีประมาณ 6,800 ชนิด ในเขตร้อนมีการกระจายตัวของกล้วยไม้สูง เนื่องจากความหลากหลายของสภาพป่าและความแตกต่างในระดับความสูงเหนือระดับน้ำทะเล (Pridgeon, 2000) ในประเทศไทยพบการกระจายตัวอยู่เกือบทุกภาคทั้งในสภาพป่าเขาและสภาพพื้นที่ราบลุ่ม (Kamemoto and Sagarik,1975 ; Vaddahanaphuti, 2005)

กล้วยไม้ชนิดหนึ่งคือ เอื้องใบไผ่อยู่ในสกุล *Arundina* จัดอยู่ในวงศ์ย่อย Epidendroideae เผ่า Arethuseae ซึ่งมี 2 เผ่าย่อย คือ Arundinae และ Bletiinae ซึ่งในเผ่าย่อย Bletiinae มีจำนวน 26 สกุล 380 ชนิด (Arditii,1994) ในขณะที่เผ่าย่อย Arundinae มี 2 สกุล คือ สกุล *Arundina* และ *Dilochia* (Wikimania, 2008)

### กล้วยไม้สกุล *Arundina*

ในประเทศไทยมีเพียงชนิดเดียวเท่านั้นคือ *Arundina graminifolia* มีรายงานว่า เอื้องใบไผ่ชนิด *Arundina graminifolia* (D.Don) Hochr. มีชื่อสามัญว่า bamboo orchid เนื่องจากมีลักษณะการเจริญเติบโตของต้นคล้ายกับต้นไผ่ (Holttum, 1969) เป็นสกุลใกล้เคียงกันกับสกุล *Dilochia*, *Habenaria*, *Phaius* และ *Spathoglottis* เป็นกลุ่มของกล้วยไม้ดินที่มีจำนวนชนิดในสกุลค่อนข้างน้อย (Teo, 1985) กระจายตัวอยู่ทั่วไปในจีนตอนใต้ แหลมมาลายู จนถึงมาเลเซีย อินโดนีเซีย และมหาสมุทรแปซิฟิก (Bose and Bhattacharjee, 1980; Kamemoto and Sagarik, 1975; Siedenfaden and Smitinand, 1959; Teo, 1985) ศรีลังกา ไทย ลาว กัมพูชา เวียดนาม ไต้หวัน และหมู่เกาะชวา (Yongee, 1997) เนปาล (Sheehan and Sheehan, 1979) เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย และหมู่เกาะแปซิฟิก (Wagner *et al.*, 1999) เจริญเติบโตและออกดอกในสภาพป่าที่พื้นดินปกคลุมไปด้วยซาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อินทรียวัตถุเน่าเปื่อยหรือในดินร่วนระบายน้ำดี มีหัวหรือลำต้นแบบคอร์ม (corm) ซึ่งเป็นแหล่งสะสมอาหาร ลำต้นมีข้อและปล้องจำนวนมาก ตาที่ข้อสามารถเจริญไปเป็นหน่ออ่อน กิ่งอ่อนหรือช่อดอก โดยส่วนของข้อมีใบและกาบใบหุ้มไว้ ใบมีสีเขียวอ่อน เส้นใบขนานตามความยาวใบ มีสันใต้ใบ (ปฐพีชล, 2547) มีทั้งชนิดที่เป็นแผ่นใบบิดม้วนงอ แผ่นใบเรียบ และแผ่นใบเรียงซ้อนกัน ช่อดอกเกิดจากด้านข้างของลำต้นใกล้ปลายยอด ช่อดอกมีทั้งชนิดที่เป็นแบบกระจะ (raceme) และชนิดแบบช่อแขนง (panicle) ดอกออกเรียงสลับ (alternate) ดอกมีขนาด เล็ก กลาง จนถึงขนาดใหญ่ (Dressler, 1993) ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นคล้ายกับกล้วยไม้ สกุล *Sobralia* การปลูกเลี้ยงเจริญได้ดีในที่ที่มีอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ชอบแสงแดดจัด ต้องการสภาพ การเจริญเติบโตคล้ายกับกล้วยไม้ในสกุล *Cattleya* ต้องการความชื้นภายในโรงเรือนประมาณ 40 – 60 เปอร์เซ็นต์ วัสดุปลูกระบายน้ำดี มีส่วนผสมของอินทรียวัตถุไม่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และอัตราปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแตสเซียม ที่ให้ในอัตราส่วนที่เท่ากันในทุกๆเดือน (Yongee,1997; Sheehan, and Sheehan, 1979; Holttum, 1953; Wagner *et al.*,1999)

**ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเอื้องใบไผ่**

**ลำต้น** ส่วนที่เป็นลำต้นที่แท้จริง คือ ส่วนที่เรียกว่า หัว ซึ่งมีลักษณะหัวแบบคอร์ม และส่วนที่เห็นเป็นลำต้น คือ ลำต้นเทียม (pseudobulb) มีลักษณะเรียวยาวคล้ายดินสอ ตั้งตรงสูง 1.5 - 2.5 เมตร ลำต้นหรือหัวมีสีเขียวอ่อนจนถึงสีเขียวแก่ ประกอบด้วยข้อและปล้อง บริเวณโคนต้นมีข้อและปล้องถี่ เป็นที่เกิดของรากและหน่อใหม่ หลังจากที่ต้นเจริญเติบโตเต็มที่และออกดอก จึงเริ่มเกิดตายอดใหม่จากข้อใกล้ปลายยอดแทงผ่านกาบใบเก่า และพัฒนาขึ้นจนเกิดเป็นส่วนของต้นที่เรียกว่า ตะเกียง (bulbil) ที่มีใบและรากขนาดเล็ก

**ใบ** เป็นใบเดี่ยว รูปหอก ปลายใบแหลมคม เส้นใบเรียงตัวขนานตามความยาวใบ ผิวใบด้านบนเป็นร่องตามแนวเส้นกลางใบ ใบยาว 12 - 30 เซนติเมตร กว้าง 1.6 - 2.5 เซนติเมตร โคนใบสอบ มีลักษณะเป็นกาบใบหุ้มลำต้น กาบใบมีสีเขียว เมื่อเจริญเต็มที่มีสีน้ำตาลติดกับลำต้น ใบเรียงตัวสลับตามข้อของลำลูกกล้วย

**ช่อดอก** เป็นช่อเดี่ยวแบบกระจะและสามารถแตกเป็นช่อแขนงได้ ดอกย่อยมี 2 - 6 ดอกต่อช่อ ก้านช่อดอกตั้งตรง ยาว 15 - 30 เซนติเมตร มีสีเขียวจนถึงสีแดงม่วง ดอกย่อยบานจากโคนช่อไปยังปลายช่อ ทยอยบานทีละดอก

**ดอก** ดอกออกที่ปลายยอด มีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ ลักษณะเรียวรูปหอกขนาด 1.1 × 3.8 เซนติเมตร มีสีขาวอมชมพู กลีบเลี้ยงด้านบนบริเวณปลายกลีบบิดโค้งมาทางด้านหน้าดอก กลีบเลี้ยงด้านล่างแนบติดกับกลีบปาก กลีบดอกมี 3 กลีบ รูปเรียวจนถึงรูปไข่หัวกลับขนาด 2.2 × 3.9 เซนติเมตร มีสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขาวชมพูจนถึงสีม่วงแดงเข้ม กลีบปากมีขนาดใหญ่กว่ากลีบอื่น ยาว 4 - 5 เซนติเมตร ลักษณะของปากมีความแปรปรวนในแต่ละพื้นที่ ปลายกลีบปากหยักเว้าเป็นคลื่น 2 - 3 ร่อง กลีบปากมีขนอ่อนสีขาวโคนกลีบปากประมาณ 1 ใน 3 ส่วน ม้วนเป็นหลอดห่อหุ้มเส้าเกสรไว้แบบหลวมๆ ปลายกลีบปากมีสีเข้มกว่าส่วนอื่น มีปื้นสีเหลืองกลางปาก เส้าเกสรมีขนาดเล็ก โค้งมาทางด้านหน้า เกสรเพศผู้และเพศเมียรวมอยู่ด้วยกันในเส้าเกสร รังไข่อยู่ใต้วงกลีบเลี้ยงและกลีบดอก รังไข่มี 3 คาร์เพล เชื่อมติดกันเป็นช่องเดียว ภายในช่องมีไข่อ่อนจำนวนมากติดอยู่ด้านข้างของรกตามแนวตะเข็บ มีเกสร 4 กลุ่ม 8 ก้อน ดอกออกตลอดปี

**ผล** เป็นรูปกระสวย มีสันบนฝัก 6 สัน ตามแนวตะเข็บ ฝักยาว 3.5 - 5.5 เซนติเมตร มีเมล็ด 30,000-80,000 เมล็ดต่อฝัก มีความสมบูรณ์ของเมล็ดประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ฝักเจริญเต็มที่มีสีเขียว ฝักแก่มีสีน้ำตาล เป็นแบบผลแห้งแล้วแตกออกตามแนวตะเข็บ เมล็ดมีสีเหลืองอ่อน มีลักษณะเป็นฝุ่นผงคล้ายแป้ง กระจายพันธุ์ได้ง่าย (สุทธินันท์, 2548; Beaman *et al*., 2001; Chan *et al.,* 1994, Holttum, 1969; Hooker, 1885; Lindley, 1963)

**ลักษณะการเจริญเติบโตของเอื้องใบไผ่**

เอื้องใบไผ่เป็นกล้วยไม้ดินที่มีส่วนของหัวอยู่ถึ่งผิวดินเหมือนกับพืชหัวทั่วไป มีการเจริญเติบโตเป็นวงจรปี คือ มีระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นตั้งแต่การเกิดหน่อใหม่จนถึงระยะออกดอกและพักตัว มีอวัยวะที่ใช้ในการสะสมอาหารเรียกว่า คอร์ม (corm) (ปฐพีชล, 2547) ลำ ลูกกล้วยเจริญเติบโตแบบไม่ทิ้งใบ มีการเกิดหน่อใหม่จากส่วนของลำลูกกล้วยเก่า พร้อมกับการเกิดรากขนาดเล็กบริเวณโคนต้น บริเวณโคนต้นมีข้อและปล้องถี่สั้น แผ่นใบติดกับส่วนของกาบใบที่ห่อหุ้มส่วนของลำลูกกล้วย เมื่อใบร่วงหล่นยังคงเหลือให้เห็นเพียงส่วนของกาบใบที่มีสีน้ำตาลแห้งติดกับลำลูกกล้วย เมื่อหยุดให้ดอก ไม่มีการตายหรือพักตัว แต่มีการทิ้งใบเพียงบริเวณโคนของลำลูกกล้วย จากนั้นจึงเริ่มเกิดตาข้างบริเวณข้อใกล้ปลายยอดเกิดเป็นตะเกียง แทงออกมาเป็นหน่อใบ ต่อมาเริ่มมีการขยายส่วนของฐานตะเกียงที่ติดกับต้นแม่จนบวมพองและออกรากสีขาวขนาดเล็ก ในขณะที่ลำลูกกล้วยเก่าเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และไม่มีการเจริญเติบโต เมื่อส่วนของตะเกียงตกลงสู่พื้นสามารถเจริญขึ้นเป็นต้นใหม่ (Holttum, 1969) เอื้องใบไผ่สามารถเจริญได้ในพื้นที่ที่มีสภาพอากาศเย็น เจริญเติบโตในที่สูงจนถึงที่ความสูงประมาณ 1,500 เมตร จากระดับน้ำทะเล ขนาดของต้นมีความหลากหลาย โดยทั่วไปมีความสูงประมาณ 2 เมตร และบางแห่งยังสามารถพบต้นที่มีขนาดเล็กในพื้นที่ที่มีความสมบูรณ์ของดินต่ำ แต่ต้นที่เจริญบนพื้นที่ภูเขาสูง ส่วนใหญ่พบว่ากลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีสีขาว แตกต่างจากชนิดที่เจริญบนพื้นที่ราบซึ่งมีดอกขนาดใหญ่กว่า (Byrne, 2001) และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บางครั้งอาจพบบนภูเขาหินปูน ในป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง ที่ระดับความสูง 80 - 1400 เมตร (Beaman *et al*., 2001)

การศึกษาการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ดินสกุลอื่น อาทิ เช่น การศึกษาการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องน้ำต้น (*Calanthe cardioglossa* Schltr.) ที่มาจากแหล่งกระจายพันธุ์ 2 แหล่งมีลักษณะคล้ายคลึงกัน พบว่าต้นพืชเริ่มมีการเจริญหลังจากที่หัวซึ่งมีลักษณะเป็นลำลูกกล้วยเหนือดินผ่านการพักตัวแล้วโดยที่มีการเจริญของตาใบซึ่งอยู่ที่บริเวณของลำลูกกล้วยแม่ หรือลำลูกกล้วยเก่าเจริญออกมาเป็นหน่อใบ ต่อมาหน่อใบนั้นเจริญออกมาเป็นต้นที่มีใบ 4 ใบ ต้นพืชสร้างลำลูกกล้วยใหม่ควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตของใบ เมื่อใบเริ่มแห้งตายจึงมีการเจริญของช่อดอกออกมาจากตาดอกที่โคนของลำลูกกล้วยใหม่ ดอกบานเต็มที่ขณะที่ต้นทิ้งใบหมด จากนั้น ลำลูกกล้วยพักตัวหลังจากดอกโรย ทั้งนี้ความแตกต่างของวงจรการเจริญเติบโตของต้นพืชทั้ง 2 แหล่ง มีลักษณะของช่วงหรือระยะเวลาของการเริ่มเกิดหน่อใบ และช่วงของการแทงช่อดอกแตกต่างกันเท่านั้น (จารุวรรณ, 2550) ส่วนการศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ดิน ช้างผสมโขลง (*Eulophia graminea* Lindl. ซึ่งมีการเจริญเป็นแบบวงจรปี พบว่าในวงจรการเจริญเติบโตหนึ่งวงจรนั้นพืชมีการเจริญเติบโตทางใบและดอกสลับกับการพักตัว ทั้งนี้ต้นพืชเริ่มมีการเจริญเติบโตหลังจากหัวหรือลำลูกกล้วยผ่านการพักตัวแล้ว โดยการแตกตาดอกออกมาก่อนตาใบ หลังจากที่ดอกโรยและเริ่มติดฝัก จึงมีการเจริญเติบโตของหน่อใบออกมาจากตาใบ ซึ่งอยู่ที่บริเวณโคนของลำลูกกล้วยแม่ ต่อมาเริ่มมีการสร้างลำลูกกล้วยควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตของใบ (จารุภัทร, 2549) สำหรับการศึกษาการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ว่านจูงนางชนิด *Geodorum recurvum* (Roxb.) Alston และ *G. siamense* Rolfe ex Downie ในวงจรการเจริญเติบโตหนึ่งวงจรพบว่า ทั้ง 2 ชนิดมีวงจรการเจริญเติบโตเป็นไปในลักษณะเดียวกัน โดยมีการเจริญเติบโตของดอกและใบสลับกับการพักตัวในแต่ละปี โดยต้นพืชเริ่มมีการเจริญเติบโตหลังจากหัวผ่านการพักตัวแล้วและแทงหน่อใบออกมา หลังจากที่หน่อใบนี้เจริญเติบโตได้เล็กน้อยจึงมีตาดอกงอกออกมาจากช่อดอกอ่อน บริเวณซอกของกาบใบที่หุ้มโคนหน่อใบนั้น ช่อดอกดังกล่าวมีการเจริญเติบโตควบคู่ไปกับหน่อใบและเจริญเร็วกว่าหน่อใบ โดยที่ในระยะที่ช่อดอกยืดตัวเต็มที่และดอกบานแล้วนั้น การเจริญเติบโตยังคงอยู่ในระยะที่มีการคลี่ตัวของใบ ดอกสามารถติดฝักได้เองในสภาพธรรมชาติและติดฝักควบคู่ไปกับการเจริญของใบ ในขณะที่ใบขยายตัวมีการสร้างหัวใหม่ขึ้นมาที่บริเวณโคนต้น หัวใหม่หยุดการขยายขนาดเมื่อใบสิ้นสุดการเจริญเติบโต หลังจากนั้นส่วนเหนือดินตายไปคงเหลือเพียงหัวที่พักตัวเป็นระยะเวลา 4 - 5 เดือน หัวใหม่มีหัวเก่าของปีก่อนๆ ซึ่งมีลักษณะแห้งและแข็งจำนวน 5 - 7 หัวเรียงตัวติดกันเป็นแถว ไม่หลุดและไม่สลายไป (ศลิษา, 2549) และการศึกษาการเจริญของกล้วยไม้ดิน 4 ชนิดคือ *Phaius tankervillea* (Banks ex I' Heritier) Blume (เอื้องพร้าว) *Eulophia andamanensis* Rchb. F.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ช้างผสมโขลง) *Habenaria rhodocheila* Hance (ลิ้นมังกร) และ *Habenaria malintana* (Blanco) Merrill (อั้วสุเทพ) พบว่ากล้วยไม้ดินทั้ง 4 ชนิดมีการเจริญเติบโตเหมือนกัน คือ ใน 1 วงจรประกอบด้วยระยะการเจริญทางด้านลำต้น ระยะสืบพันธุ์ และระยะพักตัว ยกเว้นในเอื้องพร้าวมีระยะการพักตัวไม่ชัดเจน การเจริญเติบโตทางด้านความสูงของต้นจนความสูงคงที่ของแต่ละชนิดแตกต่างกัน เอื้องพร้าวและช้างผสมโขลงเริ่มต้นเจริญในเดือนพฤษภาคม และกุมภาพันธ์ ตามลำดับ และมีความสูงคงที่ตั้งแต่เดือนตุลาคมเหมือนกัน ส่วนลิ้นมังกรและอั้วสุเทพมีการเจริญเติบโตเริ่มต้นในปลายเดือนมีนาคม และกลางเดือนเมษายน ความสูงคงที่ตั้งแต่เดือนกันยายน และพฤศจิกายนตามลำดับ (วัชราภรณ์, 2550)

การศึกษาการเจริญเติบโตของเอื้องไผ่ในสภาพปลอดเชื้อ เนื่องจากเมล็ดเอื้องไผ่ในสภาพธรรมชาติมีอัตรางอกที่ต่ำประมาณ 1.6 - 44.3 เปอร์เซ็นต์ จึงได้มีการนำเมล็ดมาเพาะในสภาพปลอดเชื้อ สามารถช่วยเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดเอื้องไผ่ได้มากกว่า 93 เปอร์เซ็นต์ (Mizutani T. *et al.,* 2006) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ดินในสภาพปลอดเชื้อชนิดอื่นด้วย เช่น การขยายพันธุ์กล้วยไม้ดิน *Cepharanthera falcate* ที่นำมาจากสภาพป่าธรรมชาติโดยใช้เมล็ดที่มีอายุ 65 วันหลังผสม มาเพาะลงบน hyponex agar medium หลังเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 เดือนพบว่ามีอัตราการงอกเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญของรากประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อโปรโตคอร์ม (protocorm) เกิดราก จึงย้ายลงในขวดที่บรรจุอาหาร 100 มิลลิลิตร หลังจากเปลี่ยนอาหารนาน 8 สัปดาห์ การเจริญของยอดเพิ่มขึ้น 30 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความสูงต้น 1.5 – 2 เซนติเมตรและย้ายลงปลูกใน vermiculite ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน ทำให้ต้นมีอัตราการรอดสูงขึ้น (Yamato and Iwas, 2007)

**การศึกษาทางกายวิภาควิทยาของกล้วยไม้ดิน**

พืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันในด้านลักษณะการเจริญเติบโต ออกดอก และการกระจายพันธุ์ที่มีความจำเพาะในแต่ละชนิดพืช ตลอดจนมีลักษณะโครงสร้างภายนอกและภายในที่แตกต่างกัน จึงต้องมีการศึกษาเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาขั้นต่อไป การศึกษาลักษณะโดยทั่วไปของพืชประกอบด้วย การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา และ มีข้อมูลพื้นฐานของลักษณะและจำนวนโครโมโซมของพืชแต่ละชนิด เพื่อสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการจำแนกและจัดกลุ่มของพืชในระบบอนุกรมวิธานพืชได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ลักษณะทางกายวิภาควิทยา**

การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของพืชชั้นสูง เป็นการศึกษารูปร่างลักษณะภายในและความสำคัญของเนื้อเยื่อ ที่สอดคล้องกับการเจริญของส่วนประกอบต่างๆ การเปลี่ยนสภาพ และวิวัฒนาการของเนื้อเยื่อ (เทียมใจ, 2542) การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยานั้นโดยทั่วไปมี 2 ประเภท คือ กายวิภาคระดับเซลล์และกายวิภาคระดับต่ำกว่าเซลล์ ส่วนของพืชที่นิยมใช้นำมาศึกษาได้แก่ ใบ ลำต้น ก้านใบ แผ่นใบ และใบเลี้ยง (กันยา, 2545) สำหรับพืชในวงศ์ Orchidaceae ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางกายวิภาควิทยา เพื่อใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มในงานด้านอนุกรมวิธาน

ในเอื้องใบไผ่ ได้มีการศึกษากายวิภาควิทยาของเนื้อเยื่อใบเท่านั้น โดยมีรายงานว่าเนื้อเยื่อชั้นผิวประกอบด้วยด้านละ 1 ชั้นเซลล์ เซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวเมื่อมองจากการลอกเซลล์ผิวใบ มีรูปร่างตั้งแต่สี่เหลี่ยมจนถึงหกเหลี่ยม เมื่อมองจากการตัดตามขวางมีรูปร่างหลายเหลี่ยมจนถึงมีรูปร่างไม่แน่นอน ผนังเซลล์ด้านขนานกับผิวด้านนอกโค้ง เซลล์ที่เส้นกลางใบแต่แตกต่างจากเซลล์บริเวณแผ่นใบ ผิวใบเคลือบด้วยคิวทิน (cutin) เรียบ ปากใบเป็นชนิดเตตระไซตริก (tetracytric) อยู่ระดับเดียวกับเนื้อเยื่อชั้นผิว มีเฉพาะที่ผิวใบด้านล่าง ยาว 32.5 - 35 และกว้าง 20-27.5 ไมโครเมตร ช่องปากใบยาว 17 - 25 และกว้าง 2.5 - 10 ไมโครเมตร เมื่อมองจากการตัดตามขวางสันด้านนอกของเซลล์คุม (guard cell) มีขนาดใหญ่กว่าสันด้านใน มีขนแบบต่อม (trichome) มี 1 เซลล์ มีเฉพาะที่ผิวใบด้านล่าง ไม่มีเนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว เนื้อเยื่อลำเลียงเป็นมัดท่อลำเลียงเรียงตัวอยู่ในระดับเดียวกัน ทุกมัดเป็นมัดท่อลำเลียงแบบเคียงข้าง มีโฟลเอ็ม (phloem) อยู่ด้านล่างและไซเล็ม (xylem) อยู่ด้านบน มีเยื่อหุ้มท่อลำเลียงเป็นสเกลอเรงคิมา (sclerenchyma) มัดท่อลำเลียงที่เส้นกลางใบมีเยื่อหุ้มท่อลำเลียงเฉพาะบริเวณขั้วโฟลเอ็มและไซเล็ม ที่ขั้วโฟลเอ็มหนา 4-5 ชั้นเซลล์ และที่ขั้วไซเล็มหนา 1-3 ชั้นเซลล์ มีเส้นใบย่อย 2 ขนาด มัดท่อลำเลียงขนาดใหญ่มีเยื่อหุ้มท่อลำเลียง เซลล์ที่ติดอยู่กับ เยื่อหุ้มท่อลำเลียงมีสเตกมาตารูปกรวย มีโซฟิลล์ (mesophyll) ประกอบด้วยเซลล์แพเรงคิมา (parenchyma) ที่มีคลอโรพลาสต์ (chloroplast) มีรูปร่างและการเรียงตัวเหมือนกันไม่แยกเป็นแพลิเซด (palisade) และสปองจี (spongy) หนา 7-8 ชั้นเซลล์ มีเซลล์สะสมผลึก (raphids) รูปเข็ม ไม่มีเซลล์เส้นใย (fibre cell) (อุดมศรี, 2543)

นอกจากนั้นแล้วยังมีการศึกษาลักษณะกายวิภาควิทยาของกล้วยไม้ดินอีกหลายชนิด ได้แก่ การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของกล้วยไม้ดินช้างผสมโขลง *Eulophia graminia* Lindl. พบว่ามีระบบเนื้อเยื่อของใบคล้ายคลึงกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยทั่วไป มีความแตกต่างในบางลักษณะ คือ มีปากใบที่ชั้นเนื้อเยื่อผิวทั้งด้านบนใบและด้านใต้ใบ ตำแหน่งของปากใบอยู่ในระดับเดียวกันกับเซลล์ผิว เซลล์คุมมีลักษณะเป็นรูปไต เนื้อเยื่อพื้นเป็นเซลล์มีโซฟิลล์ที่เรียงตัวกันแน่นมีรูปร่างคล้ายคลึงกัน ไม่แยกเป็นเซลล์แพลิเซดและเซลล์สปอนจี มัดท่อลำเลียงเป็นแบบท่อลำเลียงเคียงข้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มีเซลล์ ไซเล็มอยู่ด้านผิวใบด้านบนใบและเซลล์โฟลเอ็มอยู่ด้านผิวใบด้านใต้ใบ มัดท่อลำเลียง มีทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็ก มัดท่อลำเลียงขนาดใหญ่แต่ละมัดครอบคลุมพื้นที่ของเนื้อเยื่อทั้งหมด มัดท่อลำเลียงมีเยื่อหุ้มท่อลำเลียงและมีกลุ่มเซลล์เส้นใยโอบหัวและท้ายของมัดไว้ นอกจากนี้ยังปรากฏกลุ่มเซลล์เส้นใยกระจายตัวอยู่ใต้ชั้นเซลล์ผิวใบอีกด้วย ในเซลล์มีโซฟิลล์ขนาดใหญ่บางเซลล์ปรากฏผลึกรูปเข็ม (จารุภัทร, 2549) และการศึกษาลักษณะกายวิภาควิทยาของกล้วยไม้ว่านจูงนางชนิด *Geodorum recurvum* (Roxb.) Alston และ *G. siamense* Rolfe ex Downie โดย ศลิษา (2549) พบว่าในเนื้อเยื่อลำต้น มีระบบเนื้อเยื่อในลักษณะเดียวกันกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยทั่วไป แต่เนื้อเยื่อพื้นมีลักษณะจำเพาะ คือ มีคอร์เท็กซ์ (cortex) ที่แยกออกเป็น 2 ชั้นตามความแตกต่างของรูปร่างลักษณะเซลล์ โดยที่เซลล์คอร์เท็กซ์ด้านนอก (outer cortex) นั้นเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีรูปร่างและขนาดไม่แน่นอนเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ไม่มีช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular space) มีเซลล์ที่กลายเป็นเซลล์แอเรงคิมา (aerenchyma) ส่วนเซลล์ในคอร์เท็กซ์ด้านใน (inner cortex) มีรูปร่างหลายเหลี่ยมที่ไม่แน่นอนเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ มีช่องว่างระหว่างเซลล์ และคอร์เท็กซ์ 2 ชั้นนี้มีแถบของเซลล์พาเรงคิมาขนาดเล็กจำนวน 2-3 ชั้นเซลล์คั่นไว้ ส่วนการศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของกล้วยไม้เอื้องน้ำต้น *Calanthe cardioglossa* Schltr. ที่มาจากแหล่งกระจายพันธุ์ 2 แหล่ง พบว่ารากมีระบบเนื้อเยื่อประกอบด้วยเนื้อเยื่อผิว เนื้อเยื่อใต้ชั้นผิวคอร์เท็กซ์ เอนโดเดอร์มิส (endodermis) และสตีล (stele) ที่มีชั้นของเพอริไซเคิล (pericycle) มัดท่อลำเลียงมีการเรียงตัวของเซลล์ไซเล็มสลับกับเซลล์โฟลเอ็มแบบรัศมี ลำต้นประกอบด้วย เนื้อเยื่อผิว (epidermis tissue) เนื้อเยื่อพื้น (ground tissue) และมัดท่อลำเลียงซึ่งเป็นท่อลำเลียงแบบเคียงข้าง เนื้อเยื่อของใบประกอบด้วยชั้นเนื้อเยื่อผิวด้าน บนใบและเนื้อเยื่อผิวด้านใต้ใบ ทั้ง 2 ด้านมีปากใบ (stomata) เนื้อเยื่อพื้นเป็นเซลล์มีโซฟิลล์เรียงตัวแน่นอยู่เต็มพื้นที่ มัดท่อลำเลียงเป็นแบบท่อลำเลียงเคียงข้าง เนื้อเยื่อของกลีบดอก (petal) และกลีบเลี้ยง (sepal) มีระบบเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับใบ ฝักมีผนังผล 3 ชั้น ผนังผลชั้นนอกและชั้นในมีเซลล์เพียงชั้นเดียว ส่วนผนังผลชั้นกลางมีหลายชั้นเซลล์ ผลมี 3 คาร์เพล (carpel) 1 ช่อง ออวุล (ovule) ติดกับผนังรังไข่แบบพลาเซนตา (placenta) ติดตามแนวตะเข็บ ต้นพืชทั้ง 2 แหล่ง ซึ่งเป็นกล้วยไม้ดินที่พบในประเทศไทย มีความแตกต่างกันที่ขนาดของเซลล์ผิวและลักษณะของปากใบ (จารุวรรณ, 2550) การศึกษากายวิภาคของแผ่นใบด้วยวิธีการลอกเซลล์ผิว เมื่อตัดตามขวางโดยกรรมวิธีพาราฟิน พบว่าชนิดของขน ปากใบ การมีหรือไม่มีขน ลวดลายคิวทิน คูติคูลาร์ฮอร์น สเตกมาตา เซลล์แพลิเซด และกลุ่มเส้นใยในมีโซฟิลล์ และรูปร่างของผลึกในสเตกมาตา ในแผ่นใบสามารถระบุชนิดพืชที่ทำการศึกษาได้ ลักษณะกายวิภาคของก้านใบคล้ายกับแผ่นใบ ยกเว้นบางชนิดที่มีโพรงอากาศในมีโซฟิลล์ และลักษณะกายวิภาคของลำต้นแบ่งได้ 3 กลุ่ม ตามรูปแบบการแบ่งชั้นของเนื้อเยื่อพื้น ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เนื้อเยื่อพื้นไม่แบ่งแยกเป็นชั้นที่แตกต่างกันชัดเจน พบใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วงศ์ย่อย Epidendroideae กลุ่มที่ 2 เนื้อเยื่อพื้นแบ่งเป็น 2 ชั้น คือ คอร์เท็กซ์ และสตีล พบในวงศ์ย่อย Neottioideae และกลุ่มที่ 3 เนื้อเยื่อพื้นแบ่งเป็น 3 ชั้น มีเนื้อเยื่อพื้นชั้นกลางประกอบด้วยเซลล์สเกลอเรงคิมาเรียงเป็นวงรอบลำต้นอยู่ระหว่างเนื้อเยื่อพื้นชั้นนอก และชั้นในประกอบด้วยเซลล์แพเรงคิมา พบในวงศ์ย่อย Apostasioiideae และวงศ์ย่อย Orchidoideae (วรชาติ, 2549)

นอกจากนี้ในต่างประเทศได้มีการศึกษาลักษณะกายวิภาควิทยาของใบของกล้วยไม้ เผ่าย่อย Habenariinae พบว่าใบของกล้วยไม้ในเผ่านี้มีลักษณะของมีโซฟิลล์ที่ไม่มีเซลล์แพลิเซด ปากใบแบบไม่มีเซลล์ข้างเซลล์คุมกลุ่มท่อลำเลียงเป็นแบบท่อลำเลียงเคียงข้างที่เรียงตัวเป็นแถวเดี่ยว เยื่อหุ้มท่อลำเลียงประกอบด้วยเซลล์มีชีวิตที่มีผนังเซลล์บาง ไม่มีเซลล์ชนิดสเกลอเรงคิมา และเนื้อเยื่อรองจากผิวชั้นคอร์เทกซ์ของลำลูกกล้วย ประกอบด้วยเซลล์ที่มีชีวิต ผนังเซลล์บาง และมีช่องว่างระหว่างเซลล์ขนาดใหญ่จำนวนมาก รอบนอกของเนื้อเยื่อพื้นเป็นชั้นของเซลล์มีชีวิตที่มีผนังเซลล์หนาล้อมอยู่ 1 ชั้นเซลล์ ยกเว้นในชนิด *Habenaria repens* เนื้อเยื่อพื้นบริเวณกลางลำต้นเป็นเซลล์มีชีวิตที่ส่วนใหญ่มีผนังเซลล์บาง ช่องว่างระหว่างเซลล์มีรูปร่างแตกต่างกันไป ซึ่งใน *H. repens* สามารถเห็นเป็นช่องว่างที่ใหญ่และเห็นเด่นชัดมาก กลุ่มท่อลำเลียงเคียงข้างอยู่กระจัดกระจายทั่วลำต้น ไม่มีเซลล์สเกลอเรงคิมา ส่วนของราก หาอาหารมีชั้นวีลาเมนและมีชั้นเซลล์ผิวที่มีผนังเซลล์บางเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว และมีเซลล์แพสเซจ (passage) ที่มีผนังเซลล์ด้านนอกหนา เนื้อเยื่อลำเลียงของรากที่เกิดจากหัวสะสมอาหารมี 2 รูปแบบ คือ 1) เนื้อเยื่อลำเลียงที่มีท่อลำเลียงรูปทรงกระบอกล้อมรอบด้วยคอร์เทกซ์ และ 2) เนื้อเยื่อลำเลียงที่มีกลุ่มของ เมอริสตีล (meristele) กระจายอยู่ทั่วเนื้อเยื่อพื้น ในรูปแบบแรกนั้นเนื้อเยื่อคอร์เทกซ์ ประกอบด้วยเซลล์ที่มีรูปร่างสม่ำเสมอบางครั้งมีเซลล์เมือก อยู่ด้วย ยกเว้นในสกุล *Stenoglottis* ซึ่งเนื้อเยื่อคอร์เทกซ์มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ ประกอบด้วยเซลล์ที่ทำหน้าที่สะสมและเซลล์ดูดซึมน้ำ โดยไม่มีเซลล์เมือก ส่วนรูปแบบที่สองนั้นเนื้อเยื่อพื้นประกอบด้วยเซลล์เมือกที่มีขนาดใหญ่กว่า และมีเซลล์ดูดซึมที่มีขนาดเล็กกว่า (Stern, 1997) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกของกล้วยไม้อเมริกาเขตร้อน 63 ชนิด ในเผ่า Maxillarieae โดยศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาเผ่าย่อย Oncidiinae พบว่าในเนื้อเยื่อใบและลำต้น ทุกชนิดของเผ่าย่อย Ornithocephalinae มีสเตกมาตา (stegmata) ที่ประกอบด้วย คอนิคอลซิลิกาบอดี้ (conical silica bodies) ส่วนเพอริไซคลิก สเตกมาตา (pericyclic stegmata) สามารถพบได้ในรากของเผ่าย่อย Lycastinae ซึ่งเผ่าย่อย Lycastinae และ Maxillariinae มีต่อมบนใบที่เป็นไฟบรี บันเดิล (fibre bundle) และไทโลโซม (tilosome) และในเผ่าย่อย Zygopetalinae พบเซลล์เอนโดเดอมิสที่มีผนังแบบ U-thickened เป็นส่วนใหญ่ และผนังแบบ O-tickened พบมากในเผ่าย่อย Lycastinae, Ornithocephalinae และ Telipogoninae แต่ในเผ่าย่อยของ Maxillariinae มีความหลากหลายของ ผนังเอนโดเดอมิสมาก อาทิเช่น ชนิด *Cryptarrhena lunata*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นชนิดเดียวที่มีผนังเซลล์บาง เซลล์ที่ทำหน้าที่ในการกักเก็บน้ำมีผนังเซลล์บางและมีความหลากหลายมากในเผ่า Maxillarieae การศึกษา cladistic analyses ดังกล่าวได้ใช้ลักษณะทางกายวิภาควิทยาในเผ่าย่อยเพื่อสนับสนุนข้อมูลด้านอนุกรมวิธานภายในเผ่า (Stern *et al*., 2004)

**การศึกษาจำนวนโครโมโซม**

การศึกษาถึงส่วนประกอบของเซลล์เป็นข้อมูลที่สามารถบ่งบอกถึงความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตคือโครโมโซม โดยที่พืชแต่ละชนิดมีจำนวนและรูปร่างลักษณะของโครโมโซมที่แน่นอน (กฤษฎา, 2519) การศึกษาจำนวนโครโมโซมเป็นวิธีการหนึ่ง ที่มีความสำคัญต่อการจำแนกความแตกต่างของพืชแต่ละชนิด ได้แก่ การศึกษาลักษณะกายวิภาควิทยาของโครโมโซม การศึกษาพฤติกรรมการเข้าคู่ของโครโมโซมในช่วงเวลาการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสม และระดับความแปรปรวนของประชากรเมื่อเกิดการผสมพันธุ์ขึ้น (Clive, 1989) การหาจำนวนโครโมโซมซึ่งถือว่าเป็นการศึกษาพื้นฐานของพืชแต่ละชนิด สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและผสมพันธุ์ได้ โดยขั้นตอนในการศึกษาจำนวนโครโมโซมในแต่ละช่วงเวลาที่ใช้ มีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดพืช เช่น การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของกล้วยไม้ *Gymnadenia conopsea* s.l. จาก 49 แหล่งของสาธารณรัฐเช็ก โดยเก็บตัวอย่างปลายรากแล้วนำปลายรากของพืช มาหยุดวงชีพเซลล์ด้วยสารละลายพาราไดคลอโรเบนซีน (para-dichlorobenzene; PDB) ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง แล้วแยกเซลล์ โดยใช้กรดไฮโดรคลอริค (HCl) นาน 7 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นบดขยี้เซลล์และย้อมด้วยสีแลคโตโพรพิโอนิคออร์ซีน (lacto propionic orcein) พบว่าจำนวนโครโมโซมปกติของ *G. densiflora* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 40 แต่ในชนิด *G. conopsea* บางต้นเป็นเตตราพลอยด์และเพนตาพลอยด์ที่มี 2n = 40 80 และ100 (Marhold *et al*., 2005) การศึกษาเทคนิควิธีการตรวจนับโครโมโซมจากปลายรากกล้วยไม้ในกลุ่ม Cypripedioideae โดยเก็บปลายรากที่มีการแบ่งเซลล์นำมาหยุดวงชีพเซลล์ด้วย 8-ไฮดรอกซีคิวโนลีน (8 – hydroxyquinoline) เข้มข้น 0.002 โมลต่อลิตร นาน 4 – 5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส รักษาสภาพเซลล์ในสารละลายเอทานอล และกรดอะซิติกในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปแช่ลงในกรดอะซีติกเข้มข้น (glacial acetic) 45 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วแยกเซลล์ด้วยกรดไฮโดรคลอริค เข้มข้น 1 นอร์มอล (N) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และย้อมด้วยสี ฟิวเจน (feulgen solution) ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที บดขยี้เซลล์ในอะซีโต- ออร์ซีน (aceto- orcein) เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ สามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนที่สุด (Antony *et al*., 1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Felix and Guerra (2000) ศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ในกล้วยไม้ในกลุ่ม Cymbidioid บางชนิดของบราซิล โดยเก็บตัวอย่างรากมาแช่ลงใน 8-hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 โมลต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นตรึงเซลล์ (fixed) ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ ที่ประกอบด้วยเอทธานอลและกรดอะซีติก (ethanol/acetic acid) ในอัตราส่วน 3:1 นาน 3 ถึง 24 ชั่วโมงและเก็บไว้ในสภาพอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการเตรียมสไลด์จึงนำปลายรากมาย่อย (hydrolyse) ด้วย กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 5 นอร์มอล ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20-30 นาที และย้อมด้วยสี Giemsa 2 เปอร์เซ็นต์ หรือ hematoxylin 1 เปอร์เซ็นต์ และบันทึกภาพด้วยกล้อง Kodak Imagelink หรือ Agfa complex Pan films พบว่ากล้วยไม้ในกลุ่ม Cymbidioid มีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ 2n = 10 ในชนิด *Psycmorchis pusilla* จนถึง 2n = 168 ใน 2 ชนิดของ *Oncidium* การทดลองครั้งนี้ได้ทำการศึกษาทั้งหมด 44 ชนิดในกลุ่ม Cymbidioid จำนวน 20 สกุล และยังได้ศึกษาวิวัฒนาการของคาริโอไทป์ กล้วยไม้ที่ศึกษาทั้งหมดโดยเฉพาะทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของบราซิลเป็นหลัก โดยพบว่าโครโมโซมมีความหลากหลายคล้ายกับที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าจำนวนโครโมโซม ในเผ่าย่อย Eulophiinae 2n = 44 46 54 และ92 ใน เผ่าย่อย Cyrtopodiinae 2n = 54 ca. 108 ในเผ่าย่อย Catasetinae 2n = 52 ca. 96 ใน เผ่าย่อย Zygopetalinae 2n = 40 และ80 ใน เผ่าย่อย Lycastinae 2n = 40 และ42 ใน Maxillariinae 2n = 40 ใน เผ่าย่อย Stanhopeinae 2n = 56 ใน subtribe Ornithocephalinae 2n = 12 20 30 36 42 44 56 และ112 ca. 168 ใน เผ่าย่อย Oncidiinae การแบ่งเซลล์ในระยะอินเตอเฟส (interphase) มีรูปแบบของการแบ่งเซลล์ตั้งแต่ simple chromocenter จนถึง complex chromocenter พบว่ามีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน x = 7 ซึ่งสามารถจำแนกลักษณะความสัมพันธ์ของ เผ่า เผ่าย่อย และ สกุล จากจำนวนโครโมโซมพื้นฐานได้ และการศึกษาลักษณะของคาริโอไทป์ (karyotype) และเฮเทอโรโครมาทิน (heterochromatin) ส่วนการศึกษาในกล้วยไม้สกุล *Pleione* จำนวน 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มแรกเป็นกลุ่มกล้วยไม้รากอากาศมีจำนวน 2 ชนิด และกลุ่มที่ 2 เป็นกล้วยไม้ดิน ได้มีวิธีการเตรียมตัวอย่างรากโดยเก็บรากมาแช่ลงใน ไฮดรอกซีควิโนลีน ความเข้มข้น 0.002 โมลต่อลิตร และวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 60 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียสนาน 12 ชั่วโมง จากนั้นแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ ที่ประกอบด้วย กรดอะซีติก 100 เปอร์เซ็นต์ และแอบโซลูท เอทธานอล (absolute alcohol) ในอัตราส่วน 1:3 นาน 12 ชั่วโมง สำหรับการศึกษาคาริโอไทป์จำเป็นต้องย่อยด้วยกรดไฮโครคลอริคเข้มข้น 5 นอร์มอล นาน 30 นาที ในสภาพอุณหภูมิห้อง และแยกเซลล์ด้วยวิธีการ Feulgen squash (Stergianou, 1989)

สำหรับกล้วยไม้ดินที่พบในประเทศไทย ได้มีการศึกษาในกล้วยไม้ดินเอื้องน้ำต้น *(Calanthe cardioglossa* Schltr.) จากเนื้อเยื่อปลายรากของแหล่งกระจายพันธุ์ 2 แหล่ง โดยการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากให้ได้เซลล์ที่อยู่ในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิส (mitosis) ในระยะเมตา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เฟส (metaphase) พบว่าการเก็บตัวอย่างปลายรากในเวลา 08.00 น. หยุดวงชีพเซลล์ในสารละลาย PDB เป็นเวลา 36 ชั่วโมง แล้วแช่ปลายรากในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ หลังจากนั้นนำปลายรากไปย้อมด้วยสี คาร์บอลฟุคซิน (carbol fuchsin) นาน 30 นาที โดยที่เทคนิคดังกล่าวสามารถใช้ได้ดีกับเนื้อเยื่อปลายรากทั้ง 2 แหล่งที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ 2n = 44 (จารุวรรณ, 2550) ในขณะที่เนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้ดินช้างผสมโขลง (*Eulophia graminea* Lindl.) พบว่าเทคนิคในการเตรียมเนื้อเยื่อที่เหมาะสมคือเก็บตัวอย่างปลายรากเวลา 11.00 น. จากนั้นนำปลายรากไปรักษาสภาพเซลล์ในสารละลายที่มีส่วนผสมของเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์และกรดอะซิติกเข้มข้นในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 โดยไม่ต้องผ่านการหยุดวงชีพเซลล์ ต่อมานำสไลด์ไปย้อมด้วยสีคาร์บอนฟุคซินนาน 1 ชั่วโมง เมื่อนำเยื้อเยื่อที่ย้อมแล้วไปขยี้แล้วตรวจพบว่าเซลล์ปลายรากมีโครโมโซม 2n = 56 (จารุภัทร, 2549) นอกจากนี้ยังมีรายงานระยะเวลาการเก็บตัวอย่างปลายรากในเวลาเดียวกัน ในว่านจูงนาง 2 ชนิดคือ *Geodorum recurvum* (Roxb.) Alston และ *G. siamense* Rolfe ex Downie จากเนื้อเยื่อปลายรากด้วยวิธีขยี้เซลล์ พบว่าการเตรียมเนื้อเยื่อที่ได้ผล คือการเก็บตัวอย่างปลายรากเวลา 11.00 น. หยุดวงชีพเซลล์ในสารละลาย PDB นาน 3 และ 2 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วนำไปย้อมด้วยสีคาร์บอนฟุคซินนาน 6 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อนำเนื้อเยื่อที่ผ่านกรรมวิธีดังกล่าวไปตรวจนับจำนวนโครโมโซมพบว่า ว่านจูงนาง *G. recurvum* (Roxb.) Alston และ *G. siamense* Rolfe ex Downie มีจำนวนโครโมโซม 2n = 128 และ 54 ตามลำดับ (ศลิษา, 2549)

**เทคนิคการเพิ่มจำนวนโครโมโซม**

การเกิดโพลีพลอยด์ (polyploidy) เป็นกระบวนการที่มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาของพืชและช่วยรักษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกระบวนการเกิดออลโลโพลีพลอยด์ (allopolyploid) (Harlan and deWet, 1975) การปรับตัวและวิวัฒนาการของการแบ่งเซลล์ของพืชโดยไม่มีการลดจำนวนโครโมโซมของเซลล์สืบพันธุ์ลงในช่วงเวลาการแบ่งเซลล์ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของจำนวนโครโมโซมเป็น 2 เท่า การเกิดออโตเตตราพลอยด์ (autotetraploid) มีอัตราการเกิดการกลายพันธุ์เพียง $10^{-5}$ และเกิดขึ้นในช่วงเวลาที่มีการผสมตัวเองและผสมข้ามเพียง 0.2 และ 2.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Ramsey and Douglass, 1998) ซึ่งอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ทางพันธุกรรม เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาของพืชเกิดเป็นพืชชนิดใหม่ เช่น การเปลี่ยนแปลงลักษณะการเจริญเติบโต การเปลี่ยนสีดอก การเพิ่มขนาดดอก ทำให้พืชสามารถปรับตัวได้ในสภาพแวดล้อม ที่เปลี่ยนแปลงไป การกลายพันธุ์สามารถพบได้ในธรรมชาติ การกลายพันธุ์มีผลต่ออัตราการรอดและการดำรงชีพของพืช ตลอดจนการปรับตัวเข้ากับสภาพนิเวศที่จำเพาะเจาะจง โดยมากการกลายพันธุ์เกิดได้ในอัตราที่ต่ำ แต่กล้วยไม้มีจำนวนเมล็ดมาก จึงสามารถเกิดการกลายพันธุ์สูง การกลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พันธุ์สามารถเกิดได้หลายประเภทคือ การกลายพันธุ์ที่เกิดจากพันธุกรรม ได้แก่ การเพิ่ม การสลับ การเคลื่อนย้าย และการขาดหายไปของชิ้นส่วนโครโมโซม ซึ่งกรณีของการเพิ่มจำนวนโครโมโซม สามารถช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ในกรณีให้เกิดความสมบูรณ์ของต้นลูกผสมเพื่อสามารถผสมพันธุ์กับต้นอื่นและสามารถผลิตเมล็ดต่อไปได้ การเกิดโพลีพลอยด์สามารถพบได้ในพืชมากกว่าในสัตว์ ทำให้เกิดพืชชนิดใหม่ขึ้น ซึ่งมีความสำคัญต่อวิวัฒนาการของโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาริโอต (Norberto, 2005) และชิ้นส่วนที่สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ผลดีที่สุดคือส่วนของเมล็ดและเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ การเกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้ส่วนใหญ่เป็นลักษณะที่ดี ช่วยให้เกิดความสมบูรณ์พันธุ์ในลูกผสมที่เป็นหมัน เพิ่มคุณภาพดอก ดอกกว้างขึ้น กลีบเลี้ยงและกลีบดอกเหลื่อมกัน ดอกขนาดใหญ่ สีดอกเข้ม ลำต้น อวบ ข้อและปล้องสั้นลง อายุการบานดอกนานว่าต้นปกติ พืชมีความแข็งแรง ต้านทานต่อโรคและแมลง นอกจากนั้นแล้วยังช่วยเพิ่มความแข็งแรงของต้นพืช และสารประกอบในต้นพืช ที่เป็นประโยชน์ การเพิ่มปริมาณสาร secondary metabolite ที่ใช้ในกรรมวิธีการผลิตยา และสารหอมระเหย อาจทำให้เกิดการทำงานของยีนที่เพิ่มขึ้น มีเอนไซม์ทำงานร่วมกันหลายชนิด การสังเคราะห์แสงสูงขึ้น ออกดอกเร็ว อายุการใช้งานนานทนทานต่อสภาวะเครียดต่างๆได้ดี (Dhawan and Lavama, 1996) ได้มีการศึกษาการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในกล้วยไม้ เช่น การศึกษาผลของ โคลชิซิน (colchicine) ที่มีผลต่อโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Cattleya intermedia* L. ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อร่วมกับระดับความเข้มข้นของโคลชิซิน 0.00, 0.05, 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 4 และ 8 วัน พบว่าระดับความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์สามารถชักนำให้เกิดต้นที่เป็นมิกซ์พลอยด์ (mixoploids) และเตตราพลอยด์ (tetraploids) มีผลทำให้พื้นที่ปากใบและความหนาแน่นของปากใบเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับต้นปกติ การทดลองนี้สามารถใช้ความหนาแน่นของปากใบเป็นตัวจำแนกความแตกต่างระหว่างต้นปกติและต้นเตตราพลอยด์ และการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายโดยการเตรียมอาหารเหลวสูตร Vacin and Went (1949) ที่เติมสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ และนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อ และนำเอาชิ้นส่วนของโปรโตคอร์มย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลวที่วางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ภายใต้สภาพแสงที่ต่อเนื่องเป็นเวลา 5 7 และ 10 วันจากนั้นย้ายชิ้นส่วนของโปรโตคอร์มลงในอาหารใหม่ที่ปราศจากโคลชิซิน พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นเตตราพลอยด์ได้ (Sanguthai, *et al*.; 1973) การศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส 3 ชนิดคือ *Phalaenopsis equestris*, *P. fasciata*, *P.*Betty Hauserman โดยนำฝักกล้วยไม้ที่มีอายุประมาณ 4 – 5 เดือน มาเพาะลงในอาหารสูตร MS จากนั้นเมล็ดเริ่มเกิดลักษณะที่เรียกว่าโปรโตคอร์ม จึงย้ายโปรโตคอร์มจำนวน 50 โปรโต-คอร์มลงในขวดขนาด 125 มิลลิลิตรที่ประกอบด้วยอาหารเหลว 25 มิลลิลิตรร่วมกับสารละลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โคลชิซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการฆ่าเชื้ออาหารโดยการกรองด้วยแผ่นกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 50 รอบต่อนาทีนาน 10 วัน จากนั้นย้ายโปรโตคอร์มลงในอาหารที่ไม่ใส่โคลชิซินและย้ายลงในอาหารใหม่ในเดือนต่อมา เมื่อต้นออกรากแข็งแรงสมบูรณ์จึงย้ายออกปลูกและตรวจนับโครโมโซม โดยเก็บตัวอย่างปลายรากที่มีการเจริญเติบโตมาแช่ลงในสารละลาย PDB จากนั้นแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ในสารละลาย ที่ประกอบด้วยแอบโซลูท เอทธานอล 3 ส่วนต่อ กรดอะซีติกเข้มข้น 1 ส่วน นาน 4 ชั่วโมง และย่อยเซลล์ด้วย HCl เข้มข้น 1 นอร์มอล 1 ส่วนต่อแอบโซลูทเอทธานอล 1 ส่วน ในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 5 – 10 นาที จากนั้นแช่รากในกรดอะซีติก 45 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาทีและย้อมด้วยกรดโพร-ไพออนิค เข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากรรมวิธีที่ให้สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวิธีการกรองสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ประกอบด้วยต้นเตตราพลอยด์และออคตาพลอยด์ (octaploids) 46 และ 2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ต้นที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยสารละลายโคลชิซินมีการปลดปล่อยสารประกอบ ฟีโนลิค (phenolic compound) ในอาหารจึงต้องทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 – 3 สัปดาห์ ต้นมีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นดิพลอยด์ (diploids) พบว่าต้นเตตราพลอยด์ในสภาพธรรมชาติสามารถออกดอกได้หลังเพาะเมล็ดนาน 3 ปี แต่ต้นเตตราพลอยด์ที่ได้จากการชักนำสามารถออกดอกได้หลังเพาะเมล็ดนาน 5 ปี การชักนำให้ออกรากที่ดีต้องมีความเข้มข้นของ NAA มากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป (Griesbach, 1981) และการใช้ส่วนของโปรโตคอร์ม ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดของกล้วยไม้ *Cymbidium* sp. ‘Silky’ ที่เป็นต้นดิพพลอยด์ กับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.01 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาที่ได้รับสาร 3 ระยะ คือ 1 2 และ 3 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมเป็นสองเท่า พบว่าความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ โปรโต-คอร์มตายมากที่สุด ส่วนกรรมวิธีที่ให้ความเข้มข้นของโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โปรโตคอร์มตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ดีที่สุด จำนวนโครโมโซมที่เกิดมีทั้งเป็นเตตราพลอยด์ และทริปพลอยด์ และพบว่าระยะเวลาที่ได้รับสารละลายโคลชิซินไม่มีผลแตกต่างกัน ต่อการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม แต่มีผลต่ออัตราการตายของโปรโตคอร์ม นอกจากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในเซลล์ปลายรากแล้วลักษณะของต้นที่เป็นโพลีพลอยด์ยังมีความแตกต่างจากต้นดิพพลอยด์ในด้านรูปร่างของใบและความยาวใบเมื่อเทียบกับต้นดิพพลอยด์ (Kim *et al*., 1997) การศึกษาการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้สกุลอะแรนดา (*Aranda*) โดยการใช้โคลชิซิน พบว่าวิธีการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยแช่แคลลัสและโปรโต-คอร์มไลค์บอดี้ (protocorm like bodies) ของลูกผสมอะแรนดา 5 ชนิด ในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.5 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 9 วัน และลูกผสมสกุลอะแรคนิส (*Arachnis*) 1 ชนิด โดยใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเข้มข้นของโคลชิซินเหมือนกันแต่ใช้เวลาเพียง 3 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่ออะแรนดาค่อนข้างน้อยประมาณ 1 - 15 เปอร์เซ็นต์ แต่อะแรคนิสตายมากกว่า คือ 90-97 เปอร์เซ็นต์ และผลจากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากต้นพืชทั้งหมด 203 ต้น พบต้นที่เป็นเตตราพลอยด์และเกือบเป็นเตตราพลอยด์ 135 ต้น เป็นมิกซ์พลอยด์ 2 ต้น เป็นดิพพลอยด์ 66 ต้น และผลทางด้านความกว้างและความยาวของเซลล์คุมไม่มีความแตกต่างกัน ลักษณะทั่วไปของต้นดิพลอยด์และเตตราพลอยด์ไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างได้ชัดเจน (มลวิภา, 2521) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาลักษณะดอกและความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ดิพลอยด์ และออลโลเตตราพลอยด์ที่ได้มาจากการใช้สารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มจำนวนโครโมโซมในเนื้อเยื่อแคลลัสที่เป็นดิพลอยด์ พบว่าต้นดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมปกติเท่ากับ 2n = 38 และต้นออลโลเตตราพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 76 จำนวนดอกในช่อดอกขนาดใหญ่มีน้อยกว่าต้นที่เป็นดิพลอยด์ แต่กลีบดอกของต้นเตตราพลอยด์มีขนาดกว้าง ยาว และความหนามากกว่า การบานของดอกบนต้นออลโลเตตราพลอยด์นานกว่าดิพลอยด์เป็นเวลา 8 วัน การแบ่งตัวของไมโครสปอร์โรไซต์ (microsporocyte) ของดิพลอยด์ และออลโลเตตราพลอยด์ส่วนใหญ่แล้วปกติ ยกเว้นบางไมโครสปอร์ (microspore) การงอกของหลอดละอองเกสรของดิพลอยด์ช้ามาก มีเป็นส่วนน้อยที่งอกในเวลา 3 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับ ออลโลเตตราพลอยด์แล้ว หลอดละอองเกสรเพศผู้ มีขนาดยาว และมีจำนวนมาก การศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ในการสืบพันธุ์พบว่าต้นเตตราพลอยด์มีความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์สูงกว่าต้นดิพลอยด์ (สาริณี, 2538)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved