บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

กล้วยไม้เป็นพืชในวงศ์ Orchidaceae ซึ่งเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุดของพรรณพืชในโลก มีการสำรวจพบกล้วยไม้รวมแล้วทั้งสิ้น 174 สกุล จำแนกเป็นชนิดได้ทั้งหมดกว่า 1,154 ชนิด (สลิล และ นฤมล, 2545) กล้วยไม้สกุล *Calanthe* เป็นกล้วยไม้ดินชนิดหนึ่ง เป็นสกุลที่ค่อนข้างใหญ่ มีจำนวน 200 ชนิด (Jay, 2004) ซึ่งพบการกระจายอยู่ทั่วไปในเขตร้อนของโลกทั้งในทวีปอเมริกา แอฟริกา เอเชีย ออสเตรเลีย และหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก ส่วนในทวีปเอเชียพบในประเทศเนปาล อินเดีย พม่า มาเลเซีย ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และไทย (Sheehan and Sheehan, 1979) กล้วยไม้สกุลนี้ส่วนใหญ่เป็นพวกที่มีการเจริญเติบโตบนดิน มีน้อยมากที่เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย (Wood *et al.*,1993)

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

Calanthe cardioglossa Schltr. ที่มีชื่อสามัญพื้นถิ่นว่า เอื้องน้ำต้น หรือเอื้องเหลี่ยม กล้วยไม้ดินชนิดนี้เป็นกล้วยไม้ดินหนึ่งใน 15 ชนิดของสกุล *calanthe* ที่พบในประเทศไทย โดยมีรายงานว่าพบตามป่าดิบเขาในแทบทุกภาคของประเทศไทย กล้วยไม้ชนิดนี้เป็นชนิดที่มีการทิ้งใบก่อนการออกดอก ต้นพืชออกดอกในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ จารุวรรณ (2550) สลิล และ นฤมล (2545) อบฉันท์ (2543) อัครสิทธิ์ (2546) กล่าวถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเอื้องน้ำต้นไว้ดังนี้

ลำลูกกล้วย เป็นรูปน้ำเต้าทรงแคบ ลักษณะคล้ายหัวแบบคอร์ม มีสีเขียวอมเทา ผิวเป็นร่องตื้น ๆ ตามยาว ลำต้นเจริญทางด้านข้าง ลำลูกกล้วยสูง 3-7 ซม และมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0-3.5 ซม

ใบ เป็นใบเดี่ยว ใบรูปรีแกมรูปใบหอก ใบกว้าง 7-10 ซม ยาว 20-30 ซม ปลายแหลมมน โคนสอบเรียวเป็นก้านพับจีบ แผ่นใบบางและอ่อน เส้นใบเรียงตัวแบบขนานตามยาว ใบเรียงตัวแบบสลับ มี 3-4 ใบ ต้นพืชผลัดใบก่อนออกดอก

ช่อดอก ตรงหรือปลายโค้ง ยาว 20-30 ซม ช่อดอกเป็นแบบช่อกระจะ มีดอกย่อย 5-15 ดอกต่อช่อ ดอกย่อยบานจากโคนช่อไปส่วนปลายช่อ ดอกบานพร้อมกันทีละ 2 ดอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดอก เกิดที่ปลายช่อ ดอกมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5-2.0 ซม มีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ รูปไข่ ด้านนอกมีขน ขนาดกว้าง 5-6 มม ยาว 10-15 มม กลีบดอกมี 3 กลีบ รูปรี ผิวเรียบ กลีบปากมีขนาดใหญ่กว่ากลีบอื่น มีลวดลาย มีหลายรูปทรง ขอบกลีบหยักเป็นคลื่น โคนกลีบม้วนเป็นโพรงขนาดกว้าง 8-10 มม ยาว 10-15 มม สีของดอกคือ ขาว เหลือง เหลืองอมส้ม ชมพูอ่อน ชมพูแก่ ชมพูอมม่วง ส้ม แดง และม่วง ดอกที่มีกลีบดอกสีชมพูเมื่อดอกใกล้จะโรยกลีบดอกจะเปลี่ยนเป็นสีส้ม และดอกที่มีกลีบดอกสีขาวนั้นเมื่อใกล้โรยกลีบดอกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เกสรเพศผู้รวมกับเกสรเพศเมียเป็นเส้าเกสร รังไข่อยู่ใต้วงกลีบ มี 3 คาร์เพล เชื่อมติดกันเป็นช่องเดียว ภายในมีไข่อ่อนจำนวนมากติดอยู่ด้านข้างของรกแบบแนวตะเข็บ

ผล เป็นแบบผลแห้งแตก ขนาด 1-2 ซม

2. การศึกษากายวิภาคของพืช

พืชแต่ละชนิดมีลักษณะภายนอกและโครงสร้างภายในที่มีความแตกต่างกัน ลักษณะภายนอกเป็นลักษณะที่มองเห็นได้ด้วยตา แต่ลักษณะภายในซึ่งบอก ได้ถึงข้อมูลที่เป็นโครงสร้างของพืชนั้น จำเป็นจะต้องมีวิธีการพิเศษ ในการศึกษาลักษณะภายในที่จำเป็นสำหรับการสร้างความเข้าใจเกี่ยวกับสรีรวิทยาของต้นพืช คือ ลักษณะทางกายวิภาควิทยา ซึ่งเป็นศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับระบบเนื้อเยื่อของพืช ซึ่งมีความสำคัญสำหรับขบวนการและกลไกของการเจริญเติบโต ความรู้เกี่ยวกับกายวิภาควิทยาของพืช ตลอดจนวิธีการในการนำความรู้ด้านนี้ไปใช้ให้เป็นประโยชน์นั้นมีความสำคัญต่อขบวนการขยายพันธุ์พืช โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากเซลล์พืชแบบต่าง ๆ ซึ่งอยู่ในตำแหน่งจำเพาะเจาะจง สามารถจะเจริญเป็นต้นอ่อนที่มียอด และมีรากได้ในสภาพปลอดเชื้อ

การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของพืชชั้นสูง เป็นการศึกษารูปร่างลักษณะภายในและความสำคัญของเนื้อเยื่อทั้ง 3 ระบบ รวมทั้งการเจริญของส่วนประกอบ การเปลี่ยนสภาพ และวิวัฒนาการของเนื้อเยื่อ (เทียมใจ, 2541) การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยานั้นโดยทั่วไปมี 2 ประเภท คือ กายวิภาคระดับเซลล์และกายวิภาคระดับต่ำกว่าเซลล์ ส่วนของพืชที่นิยมใช้นำมาศึกษาได้แก่ ใบ ลำต้น ก้านใบ แผ่นใบ และใบเลี้ยง รวมถึงรูปแบบการเรียงของเส้นใบ (กันยา, 2545) สำหรับพืชในวงศ์ Orchidaceae ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางกายวิภาคไว้ค่อนข้างกว้างขวาง

Arditti (1992) รายงานการศึกษากายวิภาควิทยาของกล้วยไม้ดินสกุล *Calanthe* ไว้ว่า *C. langei* นั้นมีรากที่มีเซลล์วีเลเมนอยู่ 3-4 ชั้นเซลล์เป็นส่วนใหญ่ ผนังเซลล์มีรูเปิดขนาดเล็ก เนื้อเยื่อวีเลเมนดังกล่าวมีเซลล์ชั้นนอกขนาดใหญ่และผนังเซลล์หนาเล็กน้อย

จารุภัทร (2549) ศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของกล้วยไม้ดินช้างผสมโขลง (*Eulophia graminea* Lindl.) รายงานว่าระบบเนื้อเยื่อของใบคล้ายคลึงกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยทั่วไป แต่มีความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แตกต่างในบางลักษณะ คือ มีปากใบที่ชั้นเนื้อเยื่อผิวทั้งด้านบนใบและด้านใต้ใบ ตำแหน่งของปากใบอยู่ระดับเดียวกับเซลล์ผิว เซลล์คุมมีลักษณะเป็นรูปไต เนื้อเยื่อพื้นเป็นเซลล์มีโซฟิลล์ที่เรียงตัวกันแน่น มีรูปร่างคล้ายคลึงกันไม่แยกเป็นเซลล์แพลิเซดและเซลล์สปอนจี มัดท่อลำเลียงเป็นแบบท่อลำเลียงเคียงข้าง มีเซลล์ไซเล็มอยู่ด้านผิวใบด้านบนใบ และเซลล์โฟลเอ็มอยู่ด้านผิวใบด้านใต้ใบ มัดท่อลำเลียงมีทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็ก มัดท่อลำเลียงขนาดใหญ่แต่ละมัดครอบคลุมพื้นที่ของเนื้อเยื่อพื้นทั้งหมด มีเยื่อหุ้มท่อลำเลียงและมีกลุ่มเซลล์เส้นใยโอบหัวและท้ายของมัดไว้ นอกจากนี้ยังปรากฏกลุ่มเซลล์เส้นใยกระจายตัวอยู่ใต้ชั้นเซลล์ผิวใบอีกด้วย ในเซลล์มีโซฟิลล์ขนาดใหญ่บางเซลล์ปรากฏผลึกรูปเข็ม

ศลิษา (2549) ศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของกล้วยไม้ว่านจูงนางชนิด *Geodorum recurvum* (Roxb.) Alston และ *G. siamense* Rolfe ex Downie รายงานว่า เนื้อเยื่อของลำต้นมีระบบเนื้อเยื่อในลักษณะเดียวกันกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยทั่วไป แต่เนื้อเยื่อพื้นมีลักษณะจำเพาะคือมีคอร์เทกซ์ที่แยกออกเป็น 2 ชั้นตามความแตกต่างของรูปร่างลักษณะของเซลล์ โดยที่เซลล์คอร์เทกซ์ด้านนอกนั้นเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีรูปร่างและขนาดไม่แน่นอน เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ไม่มีช่องว่างระหว่างเซลล์ มีเซลล์ที่จะกลายเป็นเซลล์แอเรงคิมา ส่วนเซลล์ในคอร์เทกซ์ด้านในมีรูปร่างหลายเหลี่ยมที่ไม่แน่นอนเรียงตัว ไม่เป็นระเบียบมีช่องว่างระหว่างเซลล์ และคอร์เทกซ์ 2 ชั้นนี้มีแถบของเซลล์พาเรงคิมาขนาดเล็กจำนวน 2-3 ชั้นเซลล์คั่นไว้

จารุวรรณ (2550) ศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาในส่วนลำต้นของกล้วยไม้ดินเอื้องน้ำต้น (*Calanthe cardioglossa* Schltr.) พบว่าลำต้นมีระบบเนื้อเยื่อในลักษณะเดียวกันกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยทั่วไป คือ เนื้อเยื่อชั้นผิวประกอบด้วยเซลล์ผิว 1 ชั้น และพบปากใบในเนื้อเยื่อชั้นนี้ ส่วนเนื้อเยื่อพื้นมีคอร์เทกซ์ด้านนอกเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีรูปร่างและขนาดไม่แน่นอน ไม่มีท่อลำเลียงปรากฏอยู่ พบผลึกรูปเข็ม ส่วนเซลล์คอร์เทกซ์ด้านในมีรูปร่างกลมหรือหลายเหลี่ยมที่ไม่แน่นอน ปรากฏมัดท่อลำเลียงกระจัดกระจายอยู่เป็นกลุ่ม ๆ มีช่องว่างระหว่างเซลล์

Fukai and Goi (2002) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปลายยอดของ *Lilium longiflorum* cv. Hinomoto รายงานว่า เกิดจุดกำเนิดดอกย่อยที่ตำแหน่งของตาข้างของลำต้นใต้ปลายยอด ในระยะนี้พบว่าปลายยอดสร้างใบน้อยลง และ หยุดการสร้างใบในที่สุด ต่อมาดอกย่อยเหล่านั้นขยายขนาด ลำต้นส่วนปลายเป็นช่อดอกในที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ

การขยายพันธุ์กล้วยไม้ในสภาพธรรมชาติเป็นวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยาก เพราะต้องอาศัยการเพาะเมล็ด ซึ่งเมล็ดมีขนาดเล็กมาก และไม่มีอาหารสะสม จึงมีโอกาสงอกได้น้อยมาก (ครรชิต,

2547; ราตรี, 2547) ทำให้ได้จำนวนต้นน้อย ไม่เพียงพอต่อความต้องการ และอาจมีปัญหาเรื่องการแพร่กระจายเชื้อโรค จึงมีผู้นิยมขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ ซึ่งเป็นการนำส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่าจะเป็นส่วนเนื้อเยื่อหรือ อวัยวะต่าง ๆ ของพืช เช่น ก้านช่อดอก ปลายยอด ปลายใบ ตาข้าง ลำต้น ปลายราก มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มีการเติมแร่ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนั้นยังเติมวิตามิน กรดอะมิโน และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ ตามวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนกล้วยไม้มีการพัฒนาไปเป็น protocorm like bodies (PLBs) แคลลัส หรือเจริญไปเป็นยอด ราก และเป็นต้นที่สมบูรณ์ในที่สุด และยังสามารถสร้างพันธุ์ใหม่ ๆ ได้โดยการเพาะเลี้ยงเอมบริโอและ อับละอองเรณู (สุมนทิพย์, 2541) ซึ่ง ประสาทพร (2541) กล่าวว่าความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับชนิดของกล้วยไม้ สายพันธุ์ อายุของต้น การดูแลรักษา สภาพแวดล้อมในการปลูก อาหาร และสภาพในการเพาะเลี้ยง ซึ่งเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องภายหลังที่มีผู้ประสพความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงส่วนปลายยอดของกล้วยไม้สกุลซิมบิเดียม (*Cymbidium* sp.) ในอาหารสังเคราะห์ และต่อจากนั้นมีการพัฒนา เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลอื่น ๆ อีกมากมาย กว่า 80 ชนิด (Arditi and Ernst, 1993)

3.1 ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

แม้ว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชจำนวนมากในเวลาอันสั้นและใช้ชิ้นส่วน เริ่มต้นน้อยเมื่อเทียบกับการขยายพันธุ์ด้วยวิธีอื่นก็ตาม แต่ความสำเร็จนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะให้ผลแตกต่างกันออกไปตามพันธุกรรม ชิ้นส่วนพืช และสภาพแวดล้อม

3.1.1 ชิ้นส่วนพืช

การเลือกชิ้นส่วนพืชจากต้นพืชเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นับว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อความสำเร็จในการขยายพันธุ์ ชิ้นส่วนพืชอาจเป็นเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) เนื้อเยื่อ (tissue) หรือ อวัยวะ (organ) ซึ่งต้องได้จากต้นที่แข็งแรงสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับอายุของต้นพืช การปลูกดูแลรักษา สภาพแวดล้อมที่ต้นพืชนั้นได้รับและรวมถึงฤดูกาลด้วย ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดี ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญ ตายอด, ตาข้าง, ช่อดอก, ใบ และราก เช่นกล้วยไม้ในสกุล *Doritis, Oncidium, Phalaenopsis* และลูกผสม ใช้ส่วนของก้านช่อดอกที่มีตาที่ข้อ ส่วนของสกุล *Cattleya, Dendrobium, Vanda* และลูกผสมสกุลอื่น ๆ ใช้ส่วนของตาข้างและตายอด (จิตราพรรณ, 2536) และในส่วนของการนำเมล็ดกล้วยไม้มาเพาะในสภาพปลอดเชื้อนั้นสภาพของเมล็ดที่นำมามี 2 ลักษณะคือ เมล็ดอ่อน และ เมล็ดแก่ ซึ่งมีข้อดี และ ข้อเสียต่างกัน เมล็ดของกล้วยไม้หลายชนิดที่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากฝักแก่จะเสียความงอกหรืองอกช้ากว่าปกติ การเพาะเมล็ดอ่อนที่อายุพอเหมาะจะงอกได้เท่ากับการเพาะเมล็ดแก่ที่ฝักยังไม่แตก (จิตราพรรณ, 2536) จากการศึกษาการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ดินของออสเตรเลียหลายชนิดโดย McIntyre *et.al,* (1972) พบว่า การเพาะเมล็ดที่เกือบแก่โดยฝักยังมีสีเขียวและไม่แตกทำให้เมล็ดมีการรอดชีวิตสูงกว่าเพาะเมล็ดแก่

3.1.2 อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

3.1.2.1. สูตรอาหารสังเคราะห์

อาหารสังเคราะห์เป็นแหล่งของแร่ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืช สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้มีหลายสูตร สูตรอาหารแต่ละสูตรมีธาตุอาหาร และความเหมาะสมกับกล้วยไม้แต่ละชนิดแตกต่างกันไป ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับความเหมาะสมกับชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้เพาะเลี้ยง ดังเช่น สูตรอาหาร Murashig and Skoog, 1962 (MS) เป็นสูตรอาหารที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในการเพาะเลี้ยงพืชทั่วไป สูตรอาหาร Vacin and Went, (1949) ดัดแปลง เป็นสูตรอาหารที่นิยมใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเพาะเมล็ดกล้วยไม้หลายชนิด ดังนั้นการดัดแปลงสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อช่วงการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ในสภาพเพาะเลี้ยง และการเติมสารอื่นที่ต้นกล้วยไม้ต้องการในอาหาร สามารถทำให้กล้วยไม้พัฒนาได้เหมาะสมกับช่วงการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น (จิตราพรรณ, 2536) นอกจากนี้ยังมียังรายงานว่า การลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลง ทำให้เมล็ดกล้วยไม้บางชนิดมีการงอกดีขึ้น เมล็ดกล้วยไม้ดินส่วนใหญ่จะงอกได้ดีขึ้นในอาหารที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารลดลง (Rasmussen, 1995)

3.1.2.2 สภาพของอาหาร

โดยทั่วไปอาหารสังเคราะห์ที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอยู่ 2 สภาพ คือ สภาพอาหารแข็ง และสภาพอาหารเหลว (ครรชิต, 2547; รังสฤษดิ์, 2541; ศิวพงศ์, 2541) อาหารแข็งเป็นอาหารที่มีการเติมสารเพื่อทำให้อาหารเปลี่ยนไปอยู่ในสภาพแข็ง เช่น วุ้น และเจลไลต์ (รังสฤษดิ์, 2541) เพื่อให้เนื้อเยื่อกล้วยไม้สามารถสัมผัสกับอาหารและอากาศ ส่วนอาหารเหลวเป็นอาหารสังเคราะห์ที่ไม่มีการเติมสารที่ทำให้อาหารเปลี่ยนสภาพ นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อชักนำเนื้อเยื่อให้เป็นแคลลัส ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชเมื่อเลี้ยงในสภาพอาหารเหลวจะจมอยู่ในอาหารทำให้ขาดออกซิเจน จึงจำเป็นต้องวางขวดเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเพื่อเป็นการเติมออกซิเจนลงในอาหารและชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสามารถสัมผัสกับอาหารได้อย่างทั่วถึง จึงทำให้เนื้อเยื่อพืชมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา (morphology) ได้ดี (รังสฤษดิ์, 2541; Arditti and Ernst, 1993) การเพาะเมล็ดสามารถเพาะได้ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว ถ้าเมล็ดติดกันเป็นก้อนควรเพาะในอาหารเหลวมากกว่า เพื่อเมล็ดสามารถหลุดออกจากกันและสามารถจัดการได้ง่าย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในขั้นตอนต่อไป (McIntyre *et al.*, 1972) การใช้อาหารแข็งเพาะเมล็ด กล้วยไม้กลุ่มอิงอาศัย งอกช้ากว่าการใช้อาหารเหลวแต่ต้นอ่อนจะเจริญเติบโตเร็วกว่า (จิตราพรรณ, 2536)

3.1.2.3 น้ำตาล

น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานของเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อจะสูญเสียความสามารถในการตรึงคาร์บอนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง สาเหตุอาจเกิดจากการที่ภาชนะมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำมาก ประกอบกับในสภาพจำลองที่เลี้ยงในขวดนั้นมีประสิทธิภาพของการสังเคราะห์แสงต่ำกว่าปกติมาก ดังนั้นจึงต้องเพิ่มน้ำตาลให้กับต้นพืชหรือเนื้อเยื่อที่เลี้ยง น้ำตาลที่ใช้อาจเป็นน้ำตาลกลูโคส ซูโครส หรือ ฟรุคโทส (ประสาทพร, 2541) Rasmussen (1995) กล่าวว่า ในสภาพปลอดเชื้อ ต้นอ่อนไม่สามารถเติบโตได้ถ้าปราศจากน้ำตาล มีการทดลองหลายเรื่อง ที่แสดงให้เห็นว่า เมล็ดกล้วยไม้ดินบางชนิดต้องการน้ำตาล สำหรับการงอกในสภาพปลอดเชื้อ เช่น *Cypripedium regina*, *Goodyera repens*, *G. oblongifolia* และ *Listera ovata* มีรายงานว่า *Platanthera bifolia* งอกบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสหรือกลูโคส แต่ไม่พบการงอกบนอาหารที่ไม่มีน้ำตาล แต่ *Dactylorhiza majalis* สามารถงอกได้ในอาหารที่ไม่มีน้ำตาลหรือมีความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำ แต่หากในอาหารมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงจะจำกัดการงอกของเมล็ดได้

3.1.2.4 น้ำมะพร้าวอ่อน

น้ำมะพร้าวมีสารควบคุมการเจริญเติบโต และมีสารต่าง ๆ เช่น Indole-3-acetic acid 1,3-diphenylurea ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายไซโตไคนิน(เกศสุคนธ์, 2538) รวมทั้งคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด เช่น erythritol metezitose และ turanose และยังพบ myo-inositol และ sorbital รวมทั้งไซโตไคนิน เช่น zeatin และ zeatin riboside ในปริมาณมาก น้ำมะพร้าวมีผลทำให้คาร์โบไฮเดรตแตกตัว เกิดการแตกพันธะของสาร ทำให้ได้พลังงานที่นำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการหายใจ และมีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ของเซลล์ผิว ดังนั้นการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้แบบไม่อาศัยเพศ จึงนิยมใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบในอาหาร (Arditti and Ernst, 1993)

3.1.2.5 สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators)

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเป็นสารประกอบที่ไม่ใช่ธาตุอาหาร เมื่อใช้ในปริมาณเล็กน้อยสามารถมีผลต่อการส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญเติบโตหรือพัฒนาการของพืช โดยไปมีผลต่อการปรับเปลี่ยนขบวนการทางสรีรวิทยาของพืช มีทั้งชนิดที่พืชสังเคราะห์ขึ้นและถูกสร้างสังเคราะห์ขึ้นโดยขบวนการทางเคมี (สัมฤทธิ์, 2544) โดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื้อเยื่อจะนิยมใช้สาร 2 กลุ่ม คือ กลุ่มออกซิน (auxin) และกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinin) (Arditti และ Ernst, 1993) สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ มีบทบาทในเรื่องของการแบ่งเซลล์ โดยเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงจะไม่มีการเจริญเติบโตถ้าไม่มีออกซิน ในอาหาร และการใช้ออกซินในการเพาะเลี้ยงพืชต่างชนิดกัน ความเข้มข้นของออกซิน ที่ใช้จะต่างกัน การตอบสนองของพืชต่อออกซินก็ต่างกันด้วย (Arditti and Ernst, 1993) ส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม กลุ่มไซโตไคนิน มีผลทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ กระตุ้นให้เกิดหน่อข้าง โดยไปลดอิทธิพลของการข่มจากตายอดและมีผลในการชักนำให้แตกตาข้าง การเกิดแคลลัส และเกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์ เมื่อใช้ไซโตไคนินร่วมกับออกซินชนิดต่าง ๆ ในสัดส่วนที่แตกต่างกันจะมีผลทำให้เนื้อเยื่อมีการเจริญและพัฒนาในลักษณะที่แตกต่างกัน คือ ถ้าสัดส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินอยู่ในระดับที่สูง แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นต้น ถ้าสัดส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินต่ำแคลลัสจะพัฒนาไปเป็นยอด ถ้าปริมาณไซโตไคนินต่อออกซินปานกลางแคลลัสจะพัฒนาไปเป็นต้น และ ราก และ ถ้าปริมาณไซโตไคนินปานกลาง และออกซินต่ำ แคลลัสจะมีการเพิ่มขนาดมากขึ้นเรื่อย ๆ (สุมนทิพย์, 2541)

3. การเพาะเมล็ดกล้วยไม้

โดยทั่วไปเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก คล้ายผงฝุ่นอยู่ในฝัก ซึ่งมีลักษณะกลมยาว หรือป่องกลาง ฝักอ่อนสีเขียว เมื่อฝักแก่มีสีเหลืองและเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำตาล ต่อมาฝักแห้งและแตกตามยาวเป็นแนว 3 แนว ทำให้เมล็ดร่วงจากฝัก เมล็ดกล้วยไม้แต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกันตามสีและรูปร่างเช่น ยาว รี กลม แบน หรือรูปกระสวยเป็นต้น ขนาดกว้าง 0.08-0.27 มล ความยาว 0.4-1.25 มล น้ำหนัก 3-14 ไมโครกรัม และมีจำนวนเมล็ดตั้งแต่ 1,300-1,400,000 เมล็ดต่อฝัก เปลือกของเมล็ดมีหลายแบบ เช่นเปลือกบาง (เซลล์ชั้นเดียว) และเป็นร่างแห สำหรับเมล็ดกล้วยไม้ดินจะมีขนาดเล็กมาก ความกว้าง 0.07-0.40 มม ความยาว 0.11-1.97 มม ในหนึ่งฝักอาจมีเมล็ดมากถึงพันเมล็ด กล้วยไม้ในเขตร้อนส่วนใหญ่ มีน้ำหนักเมล็ดน้อยกว่า 1 ไมโครกรัม กล้วยไม้ดิน *Goodyera repens* และ *Cephalanthera damasonium* มีน้ำหนักเมล็ดประมาณ 2 ไมโครกรัม นอกจากนั้นเปลือกหุ้มเมล็ดยังถูกปกคลุมด้วยชั้นไขมันที่สามารถป้องกันน้ำได้ ซึ่งด้วยขนาดที่เล็กการศึกษาการงอกในสภาพธรรมชาติจึงทำได้ยาก (Rasmussen, 1995) และ กลไกการงอกยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Miyoshi and Mii, 1995)

การนำเมล็ดกล้วยไม้มาเพาะในสภาพปลอดเชื้อเพื่อช่วยเพิ่มการงอก เมื่อเพาะเมล็ดแล้วการแบ่งตัวของเซลล์จะเพิ่มขึ้นและดันให้หลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ดเรียกโครงสร้างว่าโปรโตคอร์ม (protocorm) ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกนั้นแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของกล้วยไม้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยบางชนิดใช้เวลาเป็นสัปดาห์ เป็นเดือนหรือบางชนิดใช้เวลาเป็นปี ในกล้วยไม้ดินความสัมพันธ์ระหว่างกล้วยไม้กับเชื้อรามีความสำคัญอย่างมากในระยะแรกของการเจริญเติบโตที่เป็นโปรโตคอร์ม ซึ่งเป็นระยะที่ยังไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเมล็ดกันอย่างแพรหลาย เช่น

ธีรพล (2535) ศึกษาอายุฝักที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum Concolor* Lindl.) โดยเพาะเมล็ดจากฝักอายุ 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, และ 28 สัปดาห์หลังการผสมเกสร ในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง พบว่าเมล็ดสามารถงอกได้ในอาหารเหลว เมื่อฝักมีอายุตั้งแต่ 14 ถึง 28 สัปดาห์หลังผสมเกสร โดยเมล็ดจากฝักอายุ 18 สัปดาห์ มีการงอกสูงสุดและให้โปรโตคอร์มที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ส่วนในรองเท้านารีฝาหอย (*P. bellatulum* Rchb. F.) พบว่าอายุฝักที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 18-28 สัปดาห์หลังผสมเกสร โดยเมล็ดมีความสมบูรณ์มากกว่า 60% ความสมบูรณ์ของเมล็ดเพิ่มขึ้นตามอายุฝักที่มากขึ้น เมื่อเพาะในอาหารเหลวสูตร V W (1949) ดัดแปลง เมล็ดเริ่มงอกตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะ และเมื่อเพาะนาน 5-7 สัปดาห์เมล็ดงอกมากกว่า 75% (เกษนันท์, 2538)

นิพาพร (2542) ศึกษาการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ดินลิ้นมังกร และนางอั้วสาคริกในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เมล็ดสามารถงอกได้ดีในอาหารสูตร VW ทุกสูตรที่ และเมื่อต้นอ่อนมีอายุได้ 6 เดือนย้ายต้นอ่อนลงในอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลงโดยเพิ่ม น้ำสกัดจากหัวมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร และกล้วยหอมบด 20 กรัมต่อลิตร จะให้ต้นอ่อนที่พัฒนามากที่สุด และลิ้นมังกรมีการสร้างจำนวนหัวเฉลี่ยได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลงที่มีการเพิ่ม paclobutrazol 0.1 มลต่อลิตร

ปิยะนุช (2547) ศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการงอกและการพัฒนาต้นอ่อนของกล้วยไม้ดินลิ้นมังกร พบว่าเมื่อเพาะเมล็ดในอาหารเหลว VW (CMU1) ไม่พบการงอกจากเมล็ดของฝักอายุ 3 และ 4 สัปดาห์หลังการผสมเกสร ในสัปดาห์ที่ 20 หลังการเพาะเมล็ด พบเอ็มบริโอจากฝักอายุ 7 สัปดาห์ มีขนาดเฉลี่ยสูง และงอกมากที่สุด คือ 2.46% น้ำตาลไม่มีผลต่อการเพิ่มขนาดเฉลี่ยของเอ็มบริโอ เมล็ดสามารถงอกได้ในอาหารที่มีและไม่มีน้ำตาล และอาหารที่มี BA และ/หรือ NAA ช่วยเพิ่มการงอก โดยพบว่า NAA 0.1 มก/ล เมื่อใช้ร่วมกับ BA 1 มก/ล ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด คือ 5.48% และ BA มล/ล เพียงอย่างเดียวให้ขนาดโปรโตคอร์มใหญ่ที่สุด

Mizutani *et al.* (2006) ศึกษาการเพาะเมล็ดเอื้องไผ่ในสภาพปลอดเชื้อ เนื่องจากในสภาพธรรมชาติเมล็ดเอื้องไผ่มีอัตรางอกเพียง 1.6-44.3 % การนำเมล็ดมาเพาะในสภาพปลอดเชื้อสามารถช่วยเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องไผ่มากกว่า 93 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Yamato and Iwas (2008) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ดิน *Cepharanthera falcate* ที่นำมาจากสภาพป่าธรรมชาติ โดยใช้เมล็ดที่มีอายุ 65 วันหลังผสมเกสร พบว่ามีอัตราการงอกเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารวุ้น hyponex agar medium หลังเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 เดือน มีการเจริญของรากประมาณ 10 % หลังจากโปรโตคอร์มเกิดรากและย้ายลงในขวดที่บรรจุอาหาร 100 มล. หลังจากเปลี่ยนอาหารนาน 8 สัปดาห์ การเจริญของยอดเพิ่มขึ้น 30 %

4. การเพาะเลี้ยงอับเรณู

การเพาะเลี้ยงอับเรณู คือ การนำเอาอับเรณู ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ ซึ่งภายในบรรจุด้วยเซลล์เรณูที่อยู่ในระยะ 1 นิวเคลียส (uninucleate) มาเพาะเลี้ยง โดยเริ่มจากการคัดเลือกช่อดอกอ่อนของดอกตัวผู้ที่ยังไม่แทงช่อดอกออกสู่ภายนอก แล้วแยกเอาเฉพาะอับเรณูนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงอับเรณู ได้แก่ การผลิตต้นพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว (haploid plant) เพื่อนำมาใช้ในระบบการปรับปรุงพันธุ์ และการผลิตพืชสายพันธุ์แท้ รวมทั้งเพื่อศึกษาการเจริญและพัฒนาของเรณูสำหรับใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในกระบวนการผสมพันธุ์ (อภิชาต, 2551) ดังมีการศึกษา เช่น ถวัลย์ศักดิ์ และคณะ (2546) ศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันพันธุ์กวางสี พบว่าระยะของดอกย่อยที่เหมาะสมสำหรับการนำอับเรณูมาเพาะเลี้ยง คือ ระยะ R5.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ร่วมกับ kinetin 0.5 มก/ล ในสภาพมืดเป็นเวลา 30 วัน สามารถสร้างแคลลัสได้และเมื่อย้ายแคลลัสเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่เติม 2, 4-D ร่วมกับ BA อย่างละ 0.1 มก /ล ในสภาพที่มีแสง 30 วัน แคลลัสมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น เมื่อย้ายแคลลัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร (1/2×) ที่ไม่เติมวิตามิน แต่เติม 2,4-D 0.02 มก/ล เลี้ยงในสภาพที่มีแสงเป็นเวลา 21 วัน แคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงเป็นเอมบริโอเจนนิคแคลลัส ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ในอัตราต่ำบนอาหารสูตร MS ที่ปกติ นอกจากนี้ เอมบริโอเจนิคแคลลัสยังสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุดบนอาหาร MS ที่เติม glutamine 5 มก/ล ในสภาพที่มีแสง

เบญจพร (2546) เพาะเลี้ยงอับเรณูของซ่อนกลิ่น พบว่า สามารถชักนำให้สร้างแคลลัสได้ในสัปดาห์ที่ 12 ของการเลี้ยง และพัฒนาเป็นเอ็มบริโอได้สำเร็จในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2.5 สตล โดยให้แคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 4.88 และสามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอในช่วง 12-24 สัปดาห์ของการเลี้ยง แต่เอ็มบริโอไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ คงเจริญเฉพาะปลายราก ส่วนปลายยอดไม่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อนและใบได้ และตายหมดในสัปดาห์ที่ 25 ของการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมน้ำมะพร้าว 15% และการใช้ร่วมกันระหว่าง NAA (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 สตล), BAP(0.0, 2.5, 3.0 และ 3.5 สตล) และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

KIN (0.0, 0.5, 1.0, 1.5,2.0, 2.5 และ 3.0 สตล) ไม่มีผลต่อการชักนำให้อับละอองเรณูของซ่อนกลิ่นสร้างแคลลัสได้

Kumar and Murthy (2004) ศึกษาผลของน้ำตาลต่อการเกิดเอ็มบริโอและต้นจากการเลี้ยงอับเรณูของแตงกวา พันธุ์ Calypro และ พันธุ์ Green Long พบว่า ประเภทและความเข้มข้นของน้ำตาล และ กรดอะมิโนมีผลต่อการเกิดเอ็มบริโอ ในสูตรอาหาร B5 ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 0.25 μm และ BA ความเข้มข้น 1.0 μm ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 0.25 μm ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอมากที่สุด คือ 72 และ 80 เอ็มบริโอ ต่อ 60 อับเรณูของแตงกวา 2 พันธุ์ ตามลำดับ

5. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบ (leaf culture)

วิธีการเพาะเลี้ยงใบหรือเนื้อเยื่อจากใบ ใบของพืชแต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกัน ใบที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงและสามารถเจริญเติบโตได้มักเป็นใบที่ยังอ่อนอยู่ ประกอบด้วยเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ เมื่อนำชิ้นส่วนใบมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตเป็นแคลลัสหรือเจริญเติบโตเป็นหน่อขนาดเล็กตามบริเวณรอยตัดหรือบนผิวของใบ สำหรับกล้วยไม้ดินเอื้องน้ำต้นยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบมาก่อน แต่อย่างไรก็ดีพบว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนของใบสามารถประสบความสำเร็จในกล้วยไม้หลายสกุล เช่น Nayak *et al.* (1997) เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ NAA และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *Cymbidium aloifolium* และ *Dendrobium nobile* บนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS ที่เติม BA 1, 2, 2.5, 5 และ 10 มล/ล เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าการเติม BA 1, 2, 2.5 และ 5 มล/ล มีผลทำให้การสร้าง plbs สูงกว่าการไม่เติม BA โดยเฉพาะที่ระดับ 5 มล/ล มีผลทำให้ชิ้นส่วนใบของ *C. aloifolium* มีการสร้าง plbs สูงที่สุดคือ 68.03 และแต่ละชิ้นส่วนมีการสร้าง plbs ได้ 28.1 plbs แต่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ BA ให้สูงขึ้นไปเป็น 10 มล/ล การสร้าง plbs กลับลดลง ส่วนใน *D. nobile* การเติม BA มีผลต่อการสร้าง plbs ในลักษณะเดียวกันกับ *C. aloifolium* แต่ *D. nobile* ต้องการระดับความเข้มข้นของ BA ที่ต่ำกว่า *C. aloifolium* ในการทำให้ชิ้นส่วนมีการสร้าง plbs สูงที่สุด

Chen *et al.* (1999) รายงานว่าใบอ่อนของ *Oncidium* Gower Ramscy สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายคือเซลล์อิพิเดอมอลและมีโซฟิลล์ของปลายใบ และผิวรอยตัดได้โดยตรงได้ภายในเวลา 1 เดือนโดยไม่ผ่านระยะการเกิดแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งร่วมกับ Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้นต่ำ (0.3-1 ppm) การย้ายเนื้อเยื่อลงอาหารสูตรเดิมสามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอให้มากขึ้นและสามารถชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Park *et al.* (2002) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ กล้วยไม้ *Doritaenopsis* บนอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้นต่างกันคือ 1, 2, 3 และ 5 มล/ล เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม TDZ ทุกระดับความเข้มข้นมีการสร้าง plbs ของชิ้นส่วนใบเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระดับความเข้มข้น ของ TDZ จนถึง 2 มล/ล ทำให้เนื้อเยื่อมีการสร้างใบมีการสร้าง plbs สูงที่สุดคือ 72.33 % ในขณะที่ ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ไม่เติม TDZ มีการสร้าง plbs ต่ำสุดเพียง 0.344 % แต่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ TDZ ขึ้นไปอีก 3 และ 5 มล/ล กลับทำให้การสร้าง plbs ลดลง

ราตรี (2547) ศึกษาผลของออกซินและไซโตไคนิน บางชนิดต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบและปลายรากของนางอั้วน้อย บนอาหารแข็งสูตร VS ซึ่งเติม 2,4-D หรือ NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า 2,4-D หรือ NAA ร่วมกับ BA ไม่สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนใบและปลายรากมีการสร้าง plbs ได้

6. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนก้านช่อดอก

การนำส่วนของก้านช่อดอกอ่อนมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ส่วนใหญ่จะประสพความสำเร็จในกล้วยไม้สกุลฟาแลนอฟซิส ดังมีการทดลองดังนี้

อรดี (2522) พบว่า เมื่อเติม BA 5 สตล ลงในอาหารสูตร VW ที่ดัดแปลงโดยการเติมน้ำมะพร้าว 15% ทำให้ตาที่ก้านช่อดอกของ *Phalaenopsis* Arcardia × *Phal.* Cochleris สามารถเจริญเป็นต้นได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับการเติม BA ที่มีความเข้มข้น 1 และ 10 สตล แต่ไม่มีรากเกิดขึ้น

Chen and Chang (2000) เลี้ยงก้านช่อดอกกล้วยไม้ *Oncidium* พันธุ์ Sweet Sugar และ Gower Remsey บนอาหารแข็งสูตร1/2 MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 1 และ 3 มล/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าก้านช่อดอกของกล้วยไม้พันธุ์ Sweet Sugar ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมTDZ มีการสร้างยอดแขนงแตกต่างกัน โดยที่การสร้างยอดแขนงจะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ TDZ จนถึง 1 มล/ล และพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่ 0.1 และ 0.3 มล/ล มีการสร้างเอ็มบริโอ เพียงเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างจากก้านช่อดอกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ไม่เติม TDZ ส่วนในพันธุ์ Gower Remsey พบว่าก้านช่อดอกที่เพาะเลี้ยงทั้งบนอาหารที่เติมและไม่เติม TDZ ไม่มีการสร้างยอดแขนง

Tokuhara and Mii (1993) ศึกษาการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอก *Phalaenopsis* บนอาหารแข็ง 2 สูตร คือ NDM และ 1/2MS ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า ก้านช่อดอกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร NDM ที่เติมNAA ความเข้มข้น 1 มล/ล เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

BAความเข้มข้น 0.1 มล/ล มีการสร้างยอดแขนงสูงถึง 40 และ 47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ BA ให้มากกว่า 0.1 มล/ล และNAA สูงหรือต่ำกว่า 1 มล/ล มีผลทำให้การสร้างยอดแขนงลดลง

7. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

เนื้อเยื่อปลายยอดของพืชเป็นกลุ่มของเนื้อเยื่อเจริญซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (apical meristems) และจุดกำเนิดของใบ กลุ่มเนื้อเยื่อเหล่านี้มีเซลล์ที่อยู่กันแน่น รูปร่างค่อนข้างกลม ไม่มีช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular space) เซลล์สามารถแบ่งตัว ได้ต่อเนื่อง การนำเอาเนื้อเยื่อเจริญไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เรียกว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ หรือถ้านำเอาเฉพาะเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดไปเพาะเลี้ยง เรียกว่า การเพาะเลี้ยงปลายยอด หรือถ้ามีจุดกำเนิดของใบติดมาด้วย เรียกว่า shoot tip culture หรือ shoot apex culture การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อธรรมดาสามารถป้องกันและกำจัดได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราเท่านั้น ส่วนเชื้อไวรัสไม่สามารถกำจัดได้ แต่สามารถเลี้ยงกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสได้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงปลายยอดของพืชจึงเป็นเทคนิคที่ใช้ในการผลิตต้นพืชที่ปราศจากไวรัสได้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดจึงนับว่าเป็นประโยชน์มากในการกำจัดเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคแก่พืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ สตรอเบอร์รี่ กระเทียม เบญจมาศ กล้วยไม้ เป็นต้น นอกจากนั้นยังสามารถขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมากและมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนเดิม เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญที่ปลายยอดเพาะเลี้ยงได้เกือบทุกชนิด วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของพืชแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันไปบ้างดังมีการศึกษา เช่น

Nayak *et al*. (1997) ได้นำเอาชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 6-15 มม ของกล้วยไม้สกุลหวาย 2 สายพันธุ์คือ เอื้องสายไหม *(Dendrobium. aphyllum* Roxb.Fischer) และเอื้องจำปา *(D. moschatum* Buch.-Ham Sw.) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (1962) ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 0.5, 1 และ 2 มล/ล พบว่าอาหารสูตรที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1 มล/ล มีผลทำให้เนื้อเยื่อของกล้วยไม้ เอื้องสายไหม และ เอื้องจำปา มีการพัฒนาของยอดและจำนวนยอดสูงสุดคือ 98.6 และ 95.0 ตามลำดับ มีจำนวนยอดเฉลี่ย 39.5 และ 38.5 ยอดตามลำดับ เช่นเดียวกับอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1 มล/ล ร่วมกับ NAA 1 มล/ล มีผลต่อการสร้างยอดและจำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันเลย การเติม BA ในความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้น มีผลต่อการสร้างยอด และจำนวนยอดเฉลี่ยของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ทั้ง 2 สายพันธุ์เพิ่มสูงขึ้น

Malabadi *et al.* (2004) เพาะเลี้ยงส่วนปลายยอดของกล้วยไม้ฟ้ามุ่ย (*Vanda coerulea*) บนอาหารสังเคราะห์สูตร VW (1949) ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 2.5 และ 3 มล/ล เพื่อเป็นการชักนำให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เกิดเป็น plbs หรือยอด เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติม TDZ 2.5 มล/ล มีการสร้างยอดได้สูง 96±7.42 และมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 8.9±1.26 ยอดต่อชิ้นส่วน แต่เมื่อความเข้มข้นของ TDZ 3 มล/ล มีการสร้างยอดและมีจำนวนยอดเฉลี่ยลดลงคือ 75±4.46 และ 2.5±0.21 ยอดต่อชิ้นส่วนตามลำดับ หลังจากนั้นได้ทำการย้าย plbs หรือส่วนยอดมาเลี้ยงบน 1/2 VW โดยมีการเติม TDZ ความเข้มข้น 2.5 มล/ล เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า plbs หรือยอด มีการพัฒนาสร้างยอดที่สมบูรณ์ได้มากคือ 8.9±1.26 ยอดต่อชิ้นส่วน

สุจรรยา และคณะ (2548) ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดในกล้วยไม้ดิน *Coelogyne tenasserimensis* Scidenf., หวายเอื้องทอง (*Dendrobium ellipsohyllum* Tang & Wang) และแวนด้าเข็มขาว (*Vanda lilacina* Teijsm. &Binnend.) โดยเลี้ยงกล้วยไม้อายุ 1 เดือนในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมไซโตไคนิน 4 ชนิดคือ N6-benzyladenine (BA), kinetin, thidiazuron (TDZ) และ zeatin ความเข้มข้น 0 1 3 และ 5 μM พบว่าหลังจากเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ ต้นกล้ากล้วยไม้ถูกชักนำให้เกิดยอดใหม่จำนวนมากได้ โดยกล้วยไม้หวายเอื้องทองและกล้วยไม้ดิน *Coelogyne* เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี TDZ ความเข้มข้น 5 μM สามารถเกิดยอดใหม่เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 7 และ 3.2 ยอดต่อต้นตามลำดับ ส่วนแวนด้าเข็มขาวเกิดยอดใหม่สูงสุดเท่ากับ 4 ยอดต่อต้น เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 5 μM สำหรับการใช้ kinetin และ zeatin มีผลต่อการชักนำการเกิดยอดน้อยมาก ในขณะที่การใช้ TDZ ไม่สามารถ ชักนำการสร้างรากได้

ราตรี (2547) ศึกษาผลของออกซินและไซโตไคนินบางชนิดต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนางอั้วน้อย (*Habenaria dentate* (Sw.) Schltr.) ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าการเติม BA 3 มล/ล หรือ 1.5 มล/ล ในอาหารเพาะเลี้ยงทำให้เนื้อเยื่อปลายยอดมีการสร้าง plbs สูงที่สุดเท่ากับ 99 plbs ต่อชิ้นส่วน หรือ 77.4 plbs ส่วนการเติม 2, 4-D ความเข้มข้น 1 หรือ 1.5 มล/ล เพียงอย่างเดียว มีการสร้าง plbs สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเติม 2, 4-D ความเข้มข้น 1 หรือ 1.5 มล/ล ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มล/ล กลับมีการสร้าง plbs ลดลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved