บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

กล้วยไม้เป็นพืชในวงศ์ Orchidaceae ซึ่งเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุดของพรรณพืชในโลก (สลิล, 2549) ที่พบอยู่บนโลกนี้มี 15,000-30,000 ชนิด และมากกว่า 800 สกุล (ครรชิต, 2550) กระจายพันธุ์ทั่วโลกพบมากในเขตร้อนตั้งแต่พื้นที่ใกล้ระดับน้ำทะเลจนถึงเทือกเขาสูง 3,000-4,000 เมตร จากระดับน้ำทะเล ในประเทศไทยมีกล้วยไม้ประมาณ 1,140 ชนิด 167 สกุล (อบฉันท์, 2549) พบขึ้นตามป่าชนิดต่างๆตั้งแต่ป่าชายเลนจนถึงป่าดิบในระดับสูง เติบโตบนพื้นดิน บนก้อนหินหรืออิงอาศัยบนต้นไม้ กล้วยไม้พันธุ์ที่เติบโตบนดิน เรียกว่า กล้วยไม้ดิน (terrestrial orchids) ซึ่งบางชนิดอาศัยซากพืชผุเปื่อยเป็นอาหาร พวกที่ขึ้นบนก้อนหินหรืออิงอาศัยบนต้นไม้ เรียกว่า กล้วยไม้อากาศ (aerial orchids) (เต็ม, 2538)

ในประเทศไทยมีกล้วยไม้ดินอยู่ประมาณ 60 สกุล มากกว่า 200 ชนิด (จิตราพรรณ, 2539) โดยทั่วไปการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ดินมีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นในช่วงฤดูฝน และมีการพักตัวในช่วงฤดูหนาว มีกล้วยไม้ดินอยู่จำนวนน้อยชนิดที่มีใบเขียวได้ตลอดทั้งปี เอื้องดินใบหมาก (*Spathoglottis*) เป็นอีกหนึ่งชนิดที่เป็นที่รู้จักกันทั่วไป มีการเจริญเติบโตที่ต่อเนื่องและไม่ทิ้งใบ

กล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis*

การจำแนกทางพฤกษศาสตร์ ได้จัดกล้วยไม้ดินสกุลนี้อยู่ใน

Subfamily : Epidendroideae

Tribe : Arethuseae

Subtribe : Bletiinae

ชื่อสกุล *Spathoglottis* ตั้งขึ้นเมื่อปี ค.ศ. 1825 โดย Carl Ludwig von Blume สำหรับชื่อสกุลมีรากศัพท์มาจากภาษากรีก 2 คำ คือ คำว่า spathe แปลว่า ช้อน และ glotta แปลว่า ลิ้น หรือ ปาก หมายถึง รูปทรงของกลีบปากมีลักษณะคล้ายลิ้น ส่วนชื่อไทยเรียกว่า สกุลกล้วยไม้ดิน (ระพี, 2516; สลิล, 2549) ถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศฟิลิปปินส์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย อินเดีย ศรีลังกา นิวกินี ฮาวาย หมู่เกาะแคโรไลน์ และฟลอริด้าตอนใต้ (ระพี, 2516; อบฉันท์, 2549; Hawkes, 1965) กล้วยไม้สกุลนี้มีประมาณ 45 ชนิด ในประเทศไทยพบ 6 ชนิด (สลิล, 2549) พบขึ้นเกือบทั่วประเทศ ในภาคเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันตก เป็นพวกที่มีดอกสีเหลืองหรือขาวนวล ส่วนชนิดที่พบทางภาคใต้มีดอกสีม่วง พบในจังหวัดตราด ตรัง ชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ปัตตานี และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยะลา (สลิลและนฤมล, 2548) โดยทั่วไปพืชสกุลนี้ชอบขึ้นในที่โล่งแจ้ง หัวมักขึ้นอยู่บนดินและแตกหน่อใหม่ชิดกับหัวเดิม ใบยาวและมีรอยพับจีบตามยาว แต่ละหัวมี 2-4 ใบ ช่อดอกเกิดด้านข้างของหัว ยาวตั้งแต่ 20 เซนติเมตรขึ้นไป บางชนิดยาวเกือบ 1 เมตร ดอกเกิดที่ปลายช่อ กลีบเลี้ยงและกลีบดอกรูปร่างคล้ายกัน และกางออกเกือบอยู่ในระนาบเดียวกัน กลีบปากช่วงกลางมักคอดกิ่ว ช่วงปลายกว้าง และปลายมักหยักเว้า ส่วนโคนมีหูกลีบปากพับตั้งขึ้น เส้าเกสรผอมยาว โค้งเล็กน้อย กลุ่มเรณูมี 2 ชุด ชุดละ 4 กลุ่ม แต่ละกลุ่มรูปคล้ายกระบอง (อบฉันท์, 2549)

กล้วยไม้ดินบางชนิดที่พบในประเทศไทย ได้แก่

1. *Spathoglottis affinis* de Vriese (ชื่อพ้อง: *Spathoglottis lobbii* Rchb. f.) มีชื่อไทย คือ เอื้องหัวข้าวเหนียว หัวมีลักษณะเล็ก ค่อนข้างแบนและทรงแป้น มีรูปร่างไม่แน่นอน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5-3.0 เซนติเมตร ผิวเรียบมีเยื่อบางใสคลุม เป็นกล้วยไม้ชนิดที่ทิ้งใบหมด คงเหลือแต่หัวอยู่กับดินซึ่งพักตัวในฤดูแล้ง ใบกว้างประมาณ 1.5-3.0 เซนติเมตร และยาวประมาณ 20-30 เซนติเมตร ปลายแหลม ก้านช่อดอกยาวประมาณ 20-30 เซนติเมตร และมีขนละเอียด แกนช่อยาวเรียวและตั้ง มีดอกหลายดอกออกโดยรอบและเรียงกันอย่างได้ระเบียบ ดอกมีขนาดค่อนข้างเล็ก ขนาดกลีบเลี้ยงด้านบน กว้าง 0.8 เซนติเมตร และยาว 1.8 เซนติเมตร ดอกมีสีเหลือง ปกติกลีบเลี้ยงด้านบนและกลีบดอกมีขนาดเท่าๆกัน ส่วนกลีบเลี้ยงด้านข้างใกล้ๆกับปากมีขนาดกว้างกว่าเล็กน้อย และมีเส้นสีม่วงอยู่บริเวณส่วนที่กว้างของกลีบ ปลายปากผายกว้างและมีร่อง กลางกลีบปากตรงส่วนโคนที่คอดมีตุ่มเนื้อเยื่อรูปเกือบกลม 2 ตุ่ม กล้วยไม้ชนิดนี้เป็นกล้วยไม้พื้นเมืองพบที่ไทย พม่า อินโดจีน และมาเลเซีย ประเทศไทยพบบริเวณป่าโปร่งหรือชายป่า ตามลาดหินที่มีน้ำซับ เกือบทุกภาคของประเทศ ยกเว้นภาคกลาง ออกดอกตุลาคม - พฤศจิกายน (สลิล, 2549; อบฉันท์, 2549)

2. *Spathoglottis pubescens* Lindl. มีชื่อไทย คือ เอื้องนวลจันทร์ เอื้องดินลาว และบานจ้วน ลำต้นเป็นหัวแบบเผือกอยู่ใต้ดิน หัวมีลักษณะแบน เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.5 เซนติเมตร ใบรูปแถบ มีใบ 2-3 ใบ ใบกว้างประมาณ 1.5-2.0 เซนติเมตร ยาว 15.0-40.0 เซนติเมตร ช่อดอกสูงประมาณ 50.0 เซนติเมตร มีดอก 2-8 ดอก มีสีเหลืองเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3.0-4.0 เซนติเมตร ช่อดอก ก้านดอก และรังไข่มีขนกำมะหยี่ปกคลุม กลีบเลี้ยงรูปรี ด้านนอกเป็นขนกำมะหยี่ กลีบเลี้ยงด้านข้างมักมีแถบสีน้ำตาลแดงขนาดใหญ่ กลีบดอกรูปร่างรีแกมรูปขอบขนาน ทั้ง 5 กลีบมีสีเหลือง ปลายกลีบมน กลีบปากเป็น 3 แฉก กลางกลีบคอดและมีเนื้อเยื่อนูนเป็นครีบ 2 อัน พบในอินเดีย พม่า ไทย ลาว กัมพูชา เวียดนาม และจีน ในประเทศไทยพบที่เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน พิษณุโลก เลย สกลนคร และหนองคาย ออกดอกช่วงเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน ช่วงออกดอกทำการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทิ้งใบ ในช่วงที่ฤดูกาลไม่เหมาะสมมีการพักตัวเหลือเพียงหัวใต้ดิน (เศรษฐพงศ์ และคณะ, 2548; สลิล, 2549)

3. *Spathoglottis eburnea* Gagnep. มีชื่อไทย คือ บานดึก หัวและใบคล้ายเอื้องหัวข้าวเหนียว และเอื้องดินลาว ช่อดอกสูง 20-30 เซนติเมตร จำนวนดอกในช่อน้อย ทยอยบานครั้งละ 1-2 ดอก ก้านดอกย่อยยาวประมาณ 2.0-3.0 เซนติเมตร ขนาดดอกประมาณ 3.0 เซนติเมตร สีนวลอมเหลือง หรือเกือบขาว กลีบปากมีส่วนที่คอดเว้าสั้นมาก มีสันตรงแนวกลางคล้ายเอื้องดินลาว กระจายพันธุ์ในอินโดจีน โดยเฉพาะประเทศไทย และกัมพูชา ประเทศไทยพบเป็นหย่อมกระจายตามทุ่งหญ้าภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงใต้ (เศรษฐพงศ์ และคณะ, 2548; อบฉันท์, 2549)

4. *Spathoglottis plicata* Blume มีชื่อพ้อง ได้แก่ *Bletia angustata* Gaud., *B. angustifolia* Gaud., *Paxtonia rosea* LdI., *Phaius rhumphii* Bl., *S. lilacina* Griff และ *S. spicata* Ldl. (Hawkes, 1978) มีชื่อไทย คือ กล้วยไม้ดิน เอื้องดิน (กรุงเทพฯ) ว่านจุก และกระเทียมป่า (ตราด) (ระพี, 2516; อบฉันท์, 2549) มีลำต้นแบบเหง้าสั้น เป็นหัวแบบเผือก อยู่ใต้ดิน มีรูปร่างเป็นรูปไข่ หรือรีแกมรูปไข่ มีสีเขียวอ่อนหรือเข้ม มีการเจริญเติบโตทางด้านข้าง (sympodium) มีแนวข้อปล้องชัดเจน ลำลูกกล้วยเจริญจากลำต้นใต้ดินโผล่ขึ้นมาเหนือดินเป็นจุดกำเนิดใบ ใบยาวเรียวแหลมคล้ายหอก และมีเส้นใบเป็นรอยจีบพับขนานชิดกันจากโคนใบถึงปลายใบ ใบใหญ่และผอมยาว ฐานใบมีกาบใบรอบๆ ลำต้น ปลายกาบใบเชื่อมติดกัน ใบเมื่อเล็กจะตั้งตรงและมีร่องเมื่อแก่ ช่อดอกเป็นแบบช่อกระจะ (raceme) เกิดบริเวณโคนลำลูกกล้วย เป็นช่อตั้งตรงสูง 60-100 เซนติเมตร ก้านช่อมีลักษณะกลม แข็ง ดอกเกิดที่ปลายช่อค่อนข้างแน่น ดอกเรียงชิดกันบานจากด้านล่างขึ้นด้านบน ทยอยบานเป็นเวลานาน โดยมีจำนวน 10-25 ดอกต่อช่อ ดอกมีกลีบรองดอก (bract) สีม่วงรองรับ ติดแน่นกับดอก กลีบดอกมีขนาดเท่าๆ กัน มีสีแดงอมม่วงหรือม่วงอมชมพู มีขนาดใหญ่มากกว่ากลีบเลี้ยง (sepal) แต่มีปลายมนกว่า มีขนาดประมาณ 1.5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงและกลีบดอกเป็นรูปไข่ เรียวแคบ กลีบปาก (lip or labellum) มี 3 แฉก โคนแคบปลายแบนกว้าง โคนกลีบปากเชื่อมต่อกับฐานเส้าเกสร (column) ที่ยาวและผอมแผ่โค้งออกไป ใกล้ๆยอดกลีบปากยึดกับเกสรเพศผู้ที่มีหมวกปิด (anther cap) ฐานปากมี 3 ส่วน ส่วนที่มีลักษณะแบนแผ่ออกไปด้านข้างและโค้งขึ้น เรียกว่า side lobe ส่วนกลาง เรียกว่า mid lobe ซึ่งมีติ่งกลม 2 ติ่งยื่นออกมา มีสีเหลืองและมีจุดอยู่ด้านบน เรียกว่า calli มีจะงอย (rostellum) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของยอดเกสรเพศเมียอยู่ใต้เกสรเพศผู้ ส่วนยอดมีส่วนเปิดเล็กๆสีเหลือง เป็นที่ตั้งของก้อนเรณู (pollinia) ด้านใต้ของจะงอยด้านหน้าของเส้าเกสรมีลักษณะเป็นแอ่งกว้าง และมีเมือกเหนียวของเกสรเพศเมียไว้รองรับก้อนเรณู กลุ่มเรณูมี 2 ชุด ชุดละ 4 กลุ่ม พืชชนิดนี้พบที่ศรีลังกา อินเดีย ไทย พม่า และภูมิภาคมาเลเซีย ในประเทศไทยมักขึ้นตามที่ดินร่วนและชุ่มชื้นตามป่าโปร่งทางภาคตะวันออกเฉียงใต้และภาคใต้ ออกดอกช่วงเดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พฤษภาคม – ตุลาคม หรือเกือบตลอดปี (ระพี, 2503; ระพี, 2516; อบฉันท์, 2549; Holttum, 1957; Pridgeon, 1992)

ลักษณะทางกายวิภาควิทยา

การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของพืช เป็นการศึกษาเกี่ยวกับรูปร่างลักษณะภายในของเนื้อเยื่อ การเจริญ วิวัฒนาการ การเปลี่ยนสภาพและความสำคัญของเนื้อเยื่อแต่ละชนิดตลอดจนลักษณะภายในและการเจริญเติบโตของส่วนต่างๆ ของพืช ซึ่งสัมพันธ์กับรูปร่างลักษณะภายนอก (เทียมใจ, 2546) เนื้อเยื่อพืชชั้นสูง จำแนกได้หลายแบบ โดยอาศัยความแตกต่างของรูปร่างโครงสร้าง หน้าที่ ตำแหน่งที่อยู่ ลักษณะของผนังเซลล์และกิจกรรมทางสรีรวิทยาของเนื้อเยื่อ (ลิลลี่, 2546) ข้อมูลทางกายวิภาควิทยามีประโยชน์อย่างยิ่งในการไขปัญหาด้านความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืช และยังสามารถช่วยในการแปลผลทางวิวัฒนาการได้เป็นอย่างดี (กันยา, 2545)

การศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของกล้วยไม้ดินมีอยู่หลายชนิด ได้แก่ ศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของเอื้องน้ำต้น (*Calanthe cardioglossa* Schltr.) ที่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติ 2 แหล่ง รายงานว่า เนื้อเยื่อของใบพืชจากทั้ง 2 แหล่งมีระบบเนื้อเยื่อในลักษณะเดียวกันกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยว โดยทั่วไปมีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยที่เนื้อเยื่อชั้นผิวของต้นที่มาจากแหล่งกระจายพันธุ์ที่ 1 มีรูปร่างค่อนข้างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า แคบและยาว ส่วนเนื้อเยื่อชั้นผิวของต้นที่มาจากแหล่งกระจายพันธุ์ที่ 2 มีลักษณะสี่เหลี่ยมหรือหลายเหลี่ยม หรือค่อนข้างกลม ขนาดไม่เท่ากัน ใบของต้นพืชทั้ง 2 แหล่ง มีเซลล์คุม ลักษณะเป็นรูปไต พบปากใบทั้ง 2 ด้านของผิวใบ ในชั้นมีโซฟิลล์ไม่แบ่งเป็นชั้นพาลิเสดและสปอนจี แต่เป็นเซลล์พาเรงคิมาที่มีรูปร่างกลมหรือกลมรี มีขนาดไม่สม่ำเสมอ เรียงตัวกันแน่น มีช่องว่างระหว่างเซลล์ในบางบริเวณ ในเซลล์มีโซฟิลล์บางเซลล์พบว่ามีผลึกรูปเข็ม มัดท่อลำเลียงเป็นแบบท่อลำเลียงเคียงข้าง มีเซลล์ไซเล็มอยู่ด้านผิวใบด้านบนใบ และเซลล์โฟลเอ็มอยู่ด้านผิวใบด้านใต้ใบ (จารุวรรณ, 2550)

สำหรับลักษณะทางกายวิภาควิทยาของช้างผสมโขลง (*Eulophia graminea* Lindl.) พบว่า เนื้อเยื่อของลำต้นมีระบบเนื้อเยื่อในลักษณะเดียวกันกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยทั่วไป แต่เนื้อเยื่อพืชในชั้นคอร์เทกซ์ที่อยู่ในบริเวณรอบนอกเป็นเซลล์สเคอเรงคิมา และเกิดในแนวรัศมีเห็นเป็นขอบเขตที่ชัดเจน ส่วนเนื้อเยื่อพืชด้านในของคอร์เทกซ์เป็นเซลล์พาเรงคิมาที่มีรูปร่างกลม หรือหลายเหลี่ยม เซลล์ด้านในมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ด้านนอก และปรากฏช่องว่างระหว่างเซลล์ในบางบริเวณ มีมัดท่อลำเลียงซึ่งเป็นแบบท่อลำเลียงเคียงข้าง และที่เนื้อเยื่อผิวพบปากใบด้วย (จารุภัทร, 2549) การศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของว่านจูงนาง 2 ชนิด คือ *Geodorum recurvum* (Roxb.) Alson และ *G. siamense* Rolfe ex Downie พบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ ราก มีระบบเนื้อเยื่อประกอบด้วยชั้นของเนื้อเยื่อผิวหนา 4-9 ชั้น เนื้อเยื่อใต้ผิว 1 ชั้น ชั้นคอร์เทกซ์ เป็นเซลล์พาเรงคิมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มีรูปร่างค่อนข้างกลม หรือหลายเหลี่ยม มีหลายขนาด ผนังเซลล์บาง เซลล์เรียงตัวค่อนข้างแน่น มีช่องว่างระหว่างเซลล์ เซลล์ในชั้นเนื่อเยื่อชั้นในสุดของคอร์เทกซ์มีรูปร่างไม่แน่นอน เป็นเซลล์หลายเหลี่ยมที่มีขนาดต่างกัน และสตีลมีชั้นของเพอริไซเคิล มัดท่อลำเลียงมีการเรียงตัวของเซลล์ไซเล็มสลับกับเซลล์โฟลเอ็มแบบรัศมี (ศลิษา, 2549)

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาคัพภะวิทยาของสกุล *Liparis* พบว่า ผนังอับเรณูขณะที่ยังอ่อนอยู่ ประกอบด้วย ชั้นเซลล์ผิว 1 ชั้น ชั้นเซลล์เอนโดทีเซียม 1 ชั้น ชั้นกลาง 3 ชั้น และชั้นทาพีตัมที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีนิวเคลียส 1 อัน เมื่ออับเรณูโตเต็มที่ เซลล์ของชั้นใต้เซลล์ผิว 2-3 ชั้น เกิดการสร้างและสะสมไขให้หนาขึ้น ผนังอับเรณูมีลักษณะหนา (Sood, 1989) ในกล้วยไม้พืชสกุล *Paphiopedilum* มีลักษณะกายวิภาคศาสตร์ของใบ คือ เซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิวยาวมาก ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในสกุลนี้ ในสกุลย่อย *Brachypetalum* มีเซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิวแตกต่างจากพวกอื่น คือ เซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิวมีลักษณะคล้ายเต้านม ประกอบด้วยส่วนที่เป็นกรวยยื่นออกเป็นเหมือนปุ่มเล็กๆ หรือเป็นคลื่นเล็กๆ พบในกลุ่ม *Barbata* ปากใบพบที่ผิวใบด้านล่าง และมีขนาดใหญ่ (Cribb, 1998) และการศึกษาลักษณะของเซลล์เทรคีด เพื่อหาความสัมพันธ์และสภาวะของวิวัฒนาการของกล้วยไม้อิงอาศัยและกล้วยไม้ดิน รายงานว่า จากการศึกษารูปแบบการกระจายของเซลล์เทรคีดและเวสเซลในกล้วยไม้ดินเผ่า Cranichideae ในวงศ์ย่อย Spiranthoideae พบว่าลักษณะของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด สามารถใช้พิจารณาและบ่งบอกความใกล้ชิดกันของกล้วยไม้เหล่านั้นได้ ลักษณะดังกล่าว คือ ลักษณะของรูพรุนของแผ่นตะแกรงของเซลล์เวสเซลและขนาดความกว้าง ยาว และหนาของเซลล์เทรคีด และเซลล์เวสเซล นอกจากนี้ยังพบว่า เซลล์เวสเซลของรากกล้วยไม้อิงอาศัยทั้งหมดมีรูพรุนของแผ่นตะแกรงเป็นแบบคล้ายขั้นบันได (Thorsch , 1997)

การศึกษากายวิภาควิทยาของกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* พบว่าพืชสกุลนี้ส่วนมาก มีกลุ่มเซลล์เส้นใยใต้ชั้นเนื้อเยื่อชั้นผิวใบทั้ง 2 ด้าน พืชในกลุ่ม *Cymbidium* พบแถวของเซลล์สเคอเรงคิมาเชื่อมต่อเนื่องกันเป็นสาย ยกเว้นเฉพาะบริเวณใต้ปากใบ เนื้อเยื่อผิวเคลือบคิวทินผนังเซลล์ที่ใบของ *C. aloifolium* เซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิวไม่ยื่นออกไปเป็นปุ่ม พืชในกลุ่ม *Maxillarianthe* ในกลุ่มของ *C. goeringii* และ *C. baber* ไม่มีกลุ่มเซลล์ใต้เนื้อเยื่อชั้นผิว กลุ่มของ *C. cyperiflolium* มีกลุ่มเซลล์เส้นใยใต้เนื้อเยื่อชั้นผิวเฉพาะที่ผิวใบด้านบน (Du Puy and Cribb, 1988) และต่อมาได้มีรายงานการศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของกล้วยไม้ในเผ่า Cymbidieae 28 สกุลด้วยกัน เพื่องานอนุกรมวิธานและเปรียบเทียบ โดยศึกษาในส่วนของราก ลำต้น และใบ พบว่า กล้วยไม้ที่ศึกษาทั้งหมดมีลักษณะทางกายวิภาควิทยาที่คล้ายคลึงกัน ยกเว้นในสกุล *Govenia* ซึ่งสกุลนี้ในรากไม่มีชั้นของวีเลเมน และท่อลำเลียงไม่ปรากฏเซลล์สเคลอเรงคิมา ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้แตกต่างจากสกุลอื่นๆในเผ่าเดียวกัน ส่วนในสกุล *Grammatophyllum* และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Porphyroglottis พบว่ามัดของเซลล์เส้นใยรอบนอกของใบ ประกอบด้วยกลุ่มของเซลล์เส้นใยที่อยู่ชิดกับเซลล์ผิว และเป็นเซลล์ที่มีลักษณะเรียว มีผลังเซลล์หนา ส่วนกลุ่มของเซลล์เส้นใยที่มีความหนานั้นเป็นกลุ่มที่อยู่ถัดเข้ามาทางด้านชั้นมีโซฟิลล์ ซึ่งลักษณะเช่นนี้พบในกล้วยไม้บางชนิดของสกุล *Maxillaria* จากการวิเคราะห์ DNA ผลที่ได้แสดงความใกล้ชิดกันระหว่างเผ่า Cymbidieae และ Maxillarieae ส่วนสกุล *Govenia* เป็นสกุลเดียวที่จัดออกไว้นอกกลุ่ม เนื่องจากลักษณะทั้งทางกายวิภาควิทยา และทางโมเลกุลไม่ใกล้เคียงพอที่จะจัดไว้ในเผ่า Cymbidieae (Stern and Judd, 2008)

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในพืช

พืชโพลีพลอยด์เป็นพืชที่มีจำนวนโครโมโซมมากกว่า 2 ชุด ซึ่งเป็นจำนวนที่มากกว่าในพืชปกติที่มีโครโมโซมเพียง 2 ชุด ทั้งนี้ คำว่า “ploidy” หรือ “ploidy level” หมายถึง จำนวนชุดโครโมโซม และใช้สัญลักษณ์แทนเป็น “x” พืชที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด เรียกว่า ดิพลอยด์ (2x) ถ้ามี 3 ชุด เรียกว่า ทริพลอยด์ (3x) มี 4 ชุด เรียกว่า เตตราพลอยด์ (4x) เป็นต้น (Ranney, 2007) นอกจากนี้ยังต้องระบุด้วยว่าจำนวนโครโมโซมนั้นมาจากเซลล์ที่อยู่ในระยะ sporophyte (2n) หรือ gametophyte (n) ในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในพืช สามารถทำได้โดยการใช้สารเคมีหลายชนิด แต่พบว่าโคลชิซินเป็นสารที่มีการใช้มากที่สุด เพราะให้ผลค่าเฉลี่ยในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ที่สม่ำเสมอที่สุด (อดิศร, 2539)

สารโคลชิซินเป็นสารอัลคาลอยด์ มีชื่อ acetyltrimethyl colchicines acid สูตรโมเลกุล $C_{22}H_{25}NO_6$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 399.43 โคลชิซินบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นเกล็ดหรือเป็นผงสีเหลือง ละลายได้ดีในน้ำและแอลกอฮอล์ สลายตัวในที่มีแสง โคลชิซินสกัดได้จากส่วนหัวและเมล็ดของพืช พวก Autumn crocus (*Colchicum autumnale*) (รังสฤษดิ์, 2545; Addink, 2007) และต้นดองดึง (*Gloriosa superba* L.) ซึ่งสามารถพบได้ในประเทศไทย มีการนำเข้าดองดึงจากต่างประเทศเพื่อนำมาสกัดสารโคลชิซินและสารอัลคาลอยด์จากเมล็ดและส่วนหัว

การนำสารโคลชิซินไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์และด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชได้นำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนโครโมโซม โดยโคลชิซินมีผลต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ของพืช คือทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างสปินเดิลไฟเบอร์ (spindle fiber) ในระยะเมตาเฟสของการแบ่งเซลล์ ทำให้สปินเดิลไฟเบอร์เกิดไม่สมบูรณ์หรือขาดหายไป ส่งผลให้โครโมโซมไม่แยกออกจากกันและเคลื่อนที่ไปยังขั้วตรงข้ามในระยะแอนาเฟส ดังนั้นเมื่อเกิดเยื่อหุ้มนิวเคลียสมาล้อมรอบโครโมโซมตรงกลางเซลล์ ทำให้ได้นิวเคลียสที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (ประดิษฐ์, 2541; อัมรา, 2540; Addink, 2007)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การใช้โคลชิซินมักนิยมใช้ในรูปของสารละลายซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของพืชแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป ดังมีตัวอย่างดังต่อไปนี้

ในกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันได้มีการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยนำโปรโตคอร์มมาแช่ในอาหารเหลวสูตร VW ดัดแปลง ที่เติมสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน ตามลำดับ พบว่าเมื่อแช่โปรโตคอร์ม ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 วัน มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำให้เอื้องแปรงสีฟันเกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม และมีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด การแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้น และระยะเวลาในการแช่นานขึ้น ทำให้อัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนลดลง (พรทิพย์, 2550) การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) เอื้องเงิน (*D. draconis* Rchb.f) และหวายมิสสิงคโปร์ (*D.* Miss Singapore) โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่ง ในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร NDM ส่วนโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องเงินและหวายมิสสิงคโปร์เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.01, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 25 ±2 องศาเซลเซียส ในที่มืด ผลการศึกษาพบว่า อัตราการรอดชีวิตและการเกิดยอดของกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิดลดลง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่เติมสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นสูงและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงนานขึ้น สำหรับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งและเอื้องเงิน คือ ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 3 วัน ส่วนอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 2 วัน มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในกล้วยไม้มิสสิงคโปร์ได้ดีที่สุด (จตุพร, 2551)

การศึกษาผลของโคลชิซินที่มีต่อการเจริญเติบโต ลักษณะสัณฐานวิทยา และการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซมในกล้วยไม้ดินหมูกลิ้ง (*Eulophia andamanensis* Rchb.f.) โดยนำต้นอ่อน ขนาดสูง 2-3 เซนติเมตร นำมาแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นสูง 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 2, 4 และ 6 ชั่วโมง พบว่าต้นอ่อนที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 4 และ 6 ชั่วโมง มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซม เป็น 2n = 4x จำนวนทั้งหมด 4 ต้น คิดเป็น 33.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต้นอ่อนเหล่านี้มีลักษณะต้นเตี้ย ลำต้นกว้าง ใบหนา ปากใบใหญ่ เซลล์คุมหนาแน่นกว่าต้นที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซม (สุขไผท, 2551) การศึกษาการเพิ่มโครโมโซมของเอื้องใบไผ่ (Bamboo Orchid) โดยแช่ชิ้นส่วนโปรโตคอร์มในอาหารเหลวสูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

CMU 1 ร่วมกับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 วัน พบว่า เมื่อสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นเพิ่มขึ้นทำให้การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มลดลง ต้นมีการเจริญเติบโตช้า บางต้นมีการแตกกอเป็นกระจุก ใบซ้อนกันแน่น ใบหนา แข็ง มีสีเขียวเข้ม ใบมีทั้งหดสั้นและเรียวยาว ปลายใบมีหยักเว้า แผ่นใบแนบติดกับปลายยอด อีกทั้งมีจำนวนรากลดลงสอดคล้องกับการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพมากที่สุด สามารถชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์ได้ถึง 46 เปอร์เซ็นต์ (ทรงชัย, 2551) การศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่ง ในอาหารเหลวสูตร NDM รวมกับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.01, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มืด ผลการศึกษาพบว่า อัตราการรอดชีวิตและการเกิดยอดของกล้วยไม้ม้าวิ่งลดลง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่เติมสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นสูง และระยะเวลาเพาะเลี้ยงนานขึ้น สำหรับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง คือ ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3 วัน จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซม ของกล้วยไม้ม้าวิ่ง โดยใช้วิธี squash technique พบว่าจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ $2n = 2x = 38$ ส่วนกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ $2n = 4x = 76$ และ $2n = 8x = 152$ (สุมนทิพย์ และ ปิยะดา, 2551)

การชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในกล้วยไม้อะแรนดาโดยการใช้โคลชิซิน ซึ่งใช้ชิ้นส่วนของโปรโตคอร์ม โดย มลวิภา (2521) พบว่า การให้สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 9 วัน สามารถชักนำให้เกิดเตตราพลอยด์ได้ดีที่สุด มีการตายของโปรโตคอร์มประมาณ 1-15 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่เป็นเตตราพลอยด์ ใบหนากว่าต้นดิพลอยด์ ความกว้าง ยาวของเซลล์คุม (guard cell) ของต้นเตตราพลอยด์มากกว่าต้นดิพลอยด์ สำหรับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินและระยะเวลาในการแช่ที่เหมาะสมของ *Dendrobium scabrilingue* Lindl. โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มรวมกับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.025, 0.05, 0.075 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3, 7, 14 และ 21 วัน จากการศึกษาพบว่า ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นเพิ่มขึ้น และระยะเวลาในการแช่ชิ้นส่วนนานขึ้น จะทำให้การเจริญเติบโตของต้นช้าลงเรื่อยๆ ซึ่งที่ความเข้มข้น 0.075 และ 0.100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ต้นสูงน้อยที่สุด คือ สูงเฉลี่ย 2.0 เซนติเมตร ส่วนสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน สามารถทำให้โปรโตคอร์มมีอัตราการอยู่รอดสูงที่สุด 36.8% และเป็นเตตราพลอยด์มากที่สุด โดยต้นที่มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมจะมีต้นขนาดใหญ่ขึ้น และใบหนา แตกต่างจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต้นที่เป็นดิพลอยด์มีลำต้นและใบ ยาวเรียว ต้นมีการเจริญเติบโตเร็ว (สุพัตรา, 2551) ในการศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในกล้วยไม้ลูกผสม *Cymbidium* Silky โดยใช้ protocorm-like bodies (plbs) แช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ แช่เป็นเวลา 1 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมจากดิพลอยด์เป็นเตเตราพลอยด์ได้มากที่สุด คือ 26.7 เปอร์เซ็นต์ (Kim *et al.,* 2003) การศึกษาการใช้สารละลายโคลชิซินชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมใน *Phalaenopsis* โดยเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มในอาหารเหลวสูตร Murashige and Skoog (MS) ร่วมกับสารละลายโคลชิซิน 50 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้โปรโตคอร์มประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ พัฒนาเป็นเตตราพลอยด์และยังพบว่า การฆ่าเชื้อสารละลายโคลชิซินโดยกรองด้วย แผ่นกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มเป็นเตตราพลอยด์ได้ถึง 46 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งดีกว่าวิธีการนึ่งฆ่าเชื้อ (Griesbach, 1981) และการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของ *Cattleya intermedia* L. โดยใช้ plbs แช่ในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went (VW) ร่วมกับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.00, 0.05, 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 และ 8 วัน พบว่าที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเป็นมิกโซพลอยด์และเตตราพลอยด์ โดยต้นที่เป็นเตตราพลอยด์มีจำนวนปากใบน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ (Silva *et al.*, 2000)

นอกจากในกล้วยไม้แล้ว มีการทดลองใช้สารละลายโคลชิซินกับไม้ดอกชนิดอื่นๆ อีกด้วย เช่น

การศึกษาผลของสารละลายโคลชิซินที่มีผลกับ *Ornithogalum* L. ซึ่งเป็นไม้ตัดดอกในวงศ์ *Hyacinthaceae* มีจำนวนโครโมโซม (2n = 12) มีหัวแบบหอม (bulb) โดยให้สารละลายโคลชิซินกับเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ซึ่งมีความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ แช่เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพมากที่สุด สามารถชักนำให้เกิดเตตราพลอยด์ได้ถึง 54-89 เปอร์เซ็นต์ (Blomerus, 2000) การให้สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ปลายยอดของ *Dianthus caryphyllus* L. แช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดเตตราพลอยด์ได้ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ (Mikio *et al.,* 2006) ส่วนการใช้สารละลายโคลชิซินเพื่อชักนำ *Alocasia* 'Green Velvet' ให้เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยใช้ปลายยอดแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.00, 0.01, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าสารละลายความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ แช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์มากที่สุดถึง 10.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปลายยอดที่แช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ชิ้นส่วนตายหมด (Thao *et al.*, 2003) การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในหน้าวัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พันธุ์ ‘Double Spathe’ ใช้สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.00, 0.01, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ แช่เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าทุกระดับความเข้มข้นไม่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของหน้าวัว แต่ที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เวลา 24 ชั่วโมง มียอดเกิดขึ้นได้มากที่สุด คือ 10.42 ยอด (วิชชุตา, 2537) ส่วนการเพิ่มจำนวนโครโมโซมใน *Alocasia* × *amazonica* โดยใช้ปลายยอดแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.00, 0.01, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์มากที่สุด ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่เป็นเตตราพลอยด์มีลักษณะใบกว้าง และหนากว่าต้นดิพลอยด์ (Thao *et al.,* 2004) อีกทั้งมีการชักนำ *Eustoma grandiflorum* ให้เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยใช้ปลายยอดแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 และ 5 วัน พบว่าเมื่อแช่เป็นเวลา 5 วัน เกิดต้นเตตราพลอยด์ได้ดีที่สุดมีการเจริญเติบโตของพืชดีที่สุด อีกทั้งต้นที่เป็นเตตราพลอยด์ยังมีขนาดของลำต้น ความกว้างของใบ และความกว้างของกลีบดอก ดีกว่าต้นที่เป็นดิพลอยด์ (Griesbach, 1990)) และการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในกุหลาบโดยใช้ส่วนยอด แช่ในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเตตราพลอยด์ในกุหลาบได้ 2-3 เปอร์เซ็นต์ (Ma *et al*., 1997) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในลิลี่โดยใช้อับเรณูซึ่งเป็นแฮพพลอยด์มาเพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัส แล้วชักนำให้เป็นดิพลอยด์ โดยใช้สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ แช่เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าเมื่อแช่ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดดิพลอยด์ได้ดีที่สุด คือ 62.3 เปอร์เซ็นต์ (Han *et al*., 1999)

การศึกษาทางด้านเซลล์วิทยา

การศึกษาลักษณะและจำนวนโครโมโซมในพืชทำได้โดยการศึกษาจากเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวแบบไมโตซิส หรือไมโอซิสตามความเหมาะสม โดยศึกษาจากเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอยู่ในระยะเมตาเฟส ซึ่งเป็นช่วงที่โครโมโซมหดตัวมากที่สุด ทำให้เห็นโครโมโซมชัดเจนได้ถูกต้องแม่นยำ โดยทั่วไปเนื้อเยื่อของพืชที่นำมาศึกษาโครโมโซมเป็นเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด หรือปลายราก ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเซลล์มีการแบ่งตัวแบบไมโตซิส (Samuel and Luchsinger, 1979; Withner, 1974) ทั้งนี้พืชแต่ละชนิดมีช่วงเวลาในการแบ่งตัวที่แตกต่างกันออกไปและขั้นตอนในการดำเนินกรรมวิธีศึกษาก็แตกต่างกันไปด้วย จึงต้องมีการศึกษาถึงช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างพืชมาศึกษาและขั้นตอนในการดำเนินการต่างๆ ดังต่อไปนี้

การศึกษาจำนวนโครโมโซมและการเก็บตัวอย่างปลายรากของกล้วยไม้อิงอาศัยซึ่งมีรากอากาศ ได้แก่ การศึกษาของ สุมนทิพย์ และ คณะ (2542) ได้ทำการศึกษาจากบริเวณปลายราก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยใช้วิธี squash ซึ่งมีขั้นแรก คือ การหยุดวงชีพเซลล์ด้วยการกระตุ้นให้เซลล์อยู่ในระยะเมตาเฟส โดยการนำรากของ กล้วยไม้แช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นตรึงเนื้อเยื่อด้วย acetic alcohol เข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ (ซึ่งประกอบด้วย ethyl alcohol : acetic acid 3:1) เก็บตัวอย่างรากไว้ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อต้องการตรวจนับจำนวนโครโมโซม นำชิ้นตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วทำการย่อยแยกเซลล์ ด้วย HCl เข้มข้น 1 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที แล้วล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่นอีก 2-3 ครั้ง แล้วย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย aceto orcein เข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 10-15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ใช้เข็มเขี่ยกดให้ชิ้นตัวอย่างแตก ซับสีส่วนเกินออก ลนไฟเล็กน้อยปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นตรวจนับจำนวนโครโมโซมที่อยู่ในระยะเมตาเฟส จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่า *D. delacourii* และ *D. draconis* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 38 ส่วน *D. pulchellum* และ *D. secundum* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 40 การศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ลูกผสมระหว่าง *Aranthera* Ubol × *Ren. philippinensis* จากเนื้อเยื่อปลายราก เพื่อหาระยะที่เซลล์กำลังแบ่งตัวแบบไมโตซิส พบว่า ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างปลายราก คือ เวลา 7.00 น. และตรึงเนื้อเยื่อใน Carnoy's solution เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แช่ใน acetic acid ไม่เกิน 24 ชั่วโมง ได้เซลล์ในระยะเมตาเฟสมากที่สุด จากผลการนับจำนวนโครโมโซม พบว่ามีโครโมโซม 2n = 57 (สายสุดา, 2523) ส่วนการศึกษารูปร่างลักษณะโครโมโซมจากปลายรากของกล้วยไม้สกุลช้าง (*Rhynchostylis*) โดยตัดปลายรากที่กำลังเจริญเติบโตดี สีเขียว ยาว 2-5 มิลลิเมตร ทำการหยุดวงชีพเซลล์ในสารละลาย 8-hydroxyquinoline เข้มข้น 0.002 โมลาร์ นาน 3-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แล้วจึงตรึงเนื้อเยื่อใน Carnoy's solution นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส แล้วย่อยแยกเซลล์ของเนื้อเยื่อด้วย HCl เข้มข้น 1 นอร์มอล นาน 10-15 นาที ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเก็บรักษาใน acetic acid เข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 7-10 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการย้อมสีเพื่อศึกษารูปร่างลักษณะโครโมโซมให้หยด acetic acid เข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 1 หยด แล้วใช้เข็มเขี่ยปลายแบนเขี่ยส่วนของหมวกราก (root cap) ให้หลุดออกไปให้หมด จากนั้นทำการตรวจนับจำนวนโครโมโซม จากการศึกษาพบว่า *Rhynchostylis gigantea, R. retusa* และ *R. coelestis* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 38 (ไพบูลย์ และนิยะดา, 2540)

วิธีการศึกษาโครโมโซมและช่วงเวลาเก็บปลายรากของกล้วยไม้ดิน ได้แก่ การศึกษาเทคนิคในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้ดินช้างผสมโขลง (*Eulophia graminea* Lindl.) เพื่อศึกษาโครโมโซมโดยทดลองเก็บตัวอย่างปลายรากเวลา 8.00, 9.00, 10.00, 11.00 และ 12.00 น. ความยาวนานในการหยุดวงชีพเซลล์ โดยแช่ปลายรากในสารละลาย para-dichlorobenzene (PDB) นาน 0, 30 นาที 1, 2 และ 3 ชั่วโมง และย้อมสีปลายรากด้วยสารละลาย carbon fuchsin นาน 1, 6,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง จากผลการทดลองสามารถสรุปวิธีปฏิบัติที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของช้างผสมโขลงเพื่อศึกษาโครโมโซม คือ เก็บตัวอย่างปลายรากเวลา 11.00 น. แล้วนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์โดยไม่ต้องผ่านการหยุดวงชีพเซลล์ใน PDB ปลายรากของช้างผสมโขลงมีโครโมโซม 2n = 56 (จารุภัทร, 2549) ส่วนการศึกษาการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) เพื่อศึกษาโครโมโซม โดยการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างปลายราก ทำการเก็บปลายรากช่วงเวลา 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 11.00 และ 12.00 น. หาเวลาที่เหมาะสมที่สุดระหว่างเวลา 9.00-10.00 น. โดยแบ่งเป็น 9.15, 9.30 และ 9.45 น. หาความยาวนานที่เหมาะสมในการหยุดวงชีพเซลล์โดยแช่ปลายรากในสารละลาย 8-hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 โมลาร์ เป็นเวลานาน 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่า ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างปลายราก คือ 9.00-10.00 น. และเวลาที่เหมาะสมที่สุด คือ 9.15 น. ระยะเวลาที่เหมาะสมในการหยุดวงชีพเซลล์ คือ 1 ชั่วโมง จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่า เซลล์ปลายรากมีจำนวนโครโมโซม 2n = 76 (กาญจนา และ คณะ, 2551) การศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้เอื้องฉัตรมรกต (*Liparis siamensis* Rolfe ex Downie) และสิกุนคล (*Malaxis latifolia* J. E. Sm.) จากเนื้อเยื่อปลายราก โดยเก็บตัวอย่างปลายรากของพืชทดลองเวลา 7.00, 8.00, 9.00, 10.00 และ 11.00 น. หยุดวงชีพเซลล์ในสารละลาย PDB เป็นเวลา 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 1 ชั่วโมง 30 นาที, 2, 3 และ 5 ชั่วโมง หยุดการทำงานของเซลล์โดยแช่ใน Carnoy's solution นาน 5 นาที ย่อยแยกเซลล์ด้วย HCl 1 นอร์มอล นาน 5 นาที ย้อมสีเนื้อเยื่อใน carbol fuchsin นาน 30 นาที, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ผลปรากฏว่า เวลาที่เหมาะสมในการเก็บปลายรากของเอื้องฉัตรมรกตและสิกุนคล คือ เวลา 11.00 น. ใช้เวลาในการหยุดวงชีพเซลล์ 1 ชั่วโมง 30 นาที การย้อมสีพืชทั้ง 2 ชนิด ใช้เวลา 30 นาที จากผลการนับจำนวนโครโมโซม พบว่า เอื้องฉัตรมรกตมีจำนวนโครโมโซม 2n = 42 และสิกุนคล 2n = 40 (อมรพรรณ , 2551) สำหรับการศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้ *Habenaria crinifera, Nervilia araqoana, Renanthera imschootiana, Vanda coerulea* และลูกผสม *Phalaenopsis* Chuck Hagen โดยการพัฒนาเทคนิค การย้อมสีเนื้อเยื่อปลายรากอย่างรวดเร็ว รายงานว่าวิธีปฏิบัติที่เหมาะสม คือ การเก็บตัวอย่างปลายรากของพืชทดลองในช่วงเวลา 10.00 น. หยดสี lactopropionic orcein ลงไป 2 หยดลงบนเนื้อเยื่อ นำกระจกสไลด์ไปลนไฟ เหนือตะเกียง เพื่อให้เนื้อเยื่ออ่อนตัว จากนั้นนำปลายรากไปวางบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วหยด lactopropionic orcein ลงไป 1 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วจึงขยี้เนื้อเยื่อ วิธีนี้ได้โครโมโซมที่ติดสีอย่างชัดเจน (Latha, 2002) และการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ เพื่อสนับสนุนงานอนุกรมวิธานของกล้วยไม้เผ่า Cymbiodieae ของประเทศบราซิล โดยศึกษาในตัวอย่าง 44 ชนิด โดยศึกษาโครโมโซมร่างกายจากเนื้อเยื่อปลายราก หรือผนังรังไข่เป็นส่วนใหญ่ และใช้เนื้อเยื่อจากตาดอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อ่อนในตัวอย่างกล้วยไม้บางชนิด เทคนิคในการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาโครโมโซม คือ การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อแล้วหยุดวงชีพเซลล์ในสารละลาย 8-hydroxyquinoline เข้มข้น 0.002 โมลาร์ ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วตรึงเนื้อเยื่อด้วย ethyl alcohol : acetic acid = 3:1 นาน 3-24 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อการขยี้จึงย่อยแยกเซลล์ของเนื้อเยื่อใน HCl เข้มข้น 5 นอร์มอล นาน 20-30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี giemsa เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ หรือ hematoxylin เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ากล้วยไม้ในเผ่าย่อย Catasetinae มีจำนวนโครโมโซม 2n = 54 และ 108 เผ่าย่อย Cyrtopodiinae มี 2n = 44, 46 และ 92 เผ่าย่อย Eulaphiinae 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 และมีเผ่าย่อย Zygopetalinae มี 2n = 52 และ 96 (Felix and Guerra, 2000)

นอกจากนี้ยังมีกรรมวิธีการศึกษาโครโมโซมและช่วงเวลาเก็บปลายรากในพืชชนิดอื่นๆ อาทิ เช่น การศึกษาเทคนิคในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของว่านมหาโชคเพื่อศึกษาโครโมโซม โดยทดลองเก็บปลายรากในช่วงเวลา 7.30-16.30 น. หยุดวงชีพเซลล์โดยแช่ปลายรากในสารละลาย PDB นาน 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หาระยะเวลาในการย้อมสีปลายรากด้วยสารละลาย carbol fuchsin นาน 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากการทดลอง พบว่า วิธีที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากเพื่อศึกษาโครโมโซม คือ เก็บตัวอย่างปลายรากเวลา 9.30 น. หยุดวงชีพเซลล์ใน PDB นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นย้อมปลายรากด้วยสี carbol fuchsin นาน 12 ชั่วโมง แล้วจึงขยี้เนื้อเยื่อ จากการตรวจนับโครโมโซมพบว่า เซลล์ปลายรากของว่านมหาโชคมีจำนวนโครโมโซม 2n = 68 (พวงพรรณ, 2551) และการศึกษาการนับจำนวนโครโมโซมปลายรากบัวโดยใช้วิธี squash ในรากบัวทั้งหมด 3 พันธุ์ คือ บุณฑริก, ปทุม, สัตตบงกช และต้นที่มีลักษณะคล้ายบุณฑริก ที่เรียกว่า แหลมแก้ว และต้นลูกผสม พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมคือ 9.00-10.00 น. ที่สามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนที่สุด หยุดวงชีพเซลล์ด้วย 8-hydroxyquinoline เข้มข้น 0.002 โมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วทำการตรึงเนื้อเยื่อด้วย alcohol เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ : acetic acid (3:1) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำปลายรากแช่ใน HCl เข้มข้น 1 นอร์มอล นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และล้างด้วยน้ำสะอาด เมื่อทำการศึกษาให้ตัดบริเวณปลายรากประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตร มีโครโมโซมอยู่มาก แล้วย้อมสี acetocarmine เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง และจากการนับจำนวนโครโมโซมพบว่า บัวหลวงทั้ง 5 พันธุ์ มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ 2n = 16 (ศิริลักษณ์ , 2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved