บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กล้วยไม้เป็นพืชวงศ์ใหญ่ที่สุดในบรรดาพืชชั้นสูงทั่วโลก จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae หรือวงศ์กล้วยไม้ ปัจจุบันมีประมาณ 796 สกุล มากกว่า 17,500 ชนิด นับเป็นพืชวงศ์ใหญ่ที่สุดในประเทศไทย โดยสำรวจพบแล้วประมาณ 167 สกุล มากกว่า 1,157 ชนิด (Nanakorn and Watthana, 2008) กล้วยไม้จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยในปัจจุบัน และเป็นสินค้าไม้ดอกไม้ประดับที่สำคัญของไทย เป็นที่นิยมสูงในตลาดโลก มีความสวยงามโดดเด่น มีเสถียรภาพ มีมูลค่าสูง และจัดเป็นสินค้าที่อยู่ในกลุ่มเศรษฐกิจสร้างสรรค์ (Creative Economy) โดยอุตสาหกรรมกล้วยไม้ของไทย สามารถสร้างรายได้นำเงินเข้าสู่ประเทศได้เป็นจำนวนมาก และจากสถิติการส่งออกต้นกล้วยไม้ในเดือนมกราคม ถึงเดือนธันวาคม ปี 2556 ของประเทศไทย คิดเป็นมูลค่า 604,893,779.0 บาท (สำนักงานเลขานุการคณะกรรมการกล้วยไม้แห่งชาติ, 2556) ปัจจุบันกล้วยไม้เป็นไม้ตัดดอกยอดนิยม เนื่องจากมีลักษณะดอกและมีสีสันสวยงาม เป็นไม้ตัดดอกที่มีอายุการใช้งานได้นาน แหล่งกำเนิดกล้วยไม้ป่าที่สำคัญของโลกมี 2 แหล่งใหญ่ๆ ด้วยกัน คือ ลาตินอเมริกาและเอเชียแปซิฟิค สำหรับในลาตินอเมริกาเป็นอาณาบริเวณอเมริกากลางติดต่อกับเขตตอนเหนือของอเมริกาใต้ ส่วนแหล่งกำเนิดกล้วยไม้ป่าในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิค โดยมีประเทศไทยเป็นศูนย์กลาง จากการค้นพบประเทศไทยมีพันธุ์กล้วยไม้ป่าเป็นจำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมเอื้ออำนวยต่อการกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้ในแต่ละพื้นที่ และกล้วยไม้ป่าที่พบในภูมิภาคแถบนี้มีลักษณะเด่นที่เป็นเอกลักษณ์ของตนเอง ซึ่งแตกต่างจากกล้วยไม้ในภูมิภาคลาตินอเมริกา (สลิล สิทธิสัจธรรม และนฤมล กฤษณชาญดี, 2545; อบฉันท์ ไทยทอง, 2543)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เอื้องดินใบไผ่ (*Arundina graminifolia* (D.Don) Hochr.) เป็นกล้วยไม้ดินที่พบได้ทั่วทั้งประเทศ ตามชายป่า ทุ่งโล่ง ที่ระดับความสูงตั้งแต่ 100 – 1,600 เมตร เป็นกล้วยไม้ดินที่มีลักษณะโดดเด่น กล่าวคือ มีความทนทานต่อสภาพภูมิอากาศที่แห้งแล้ง และร้อนได้ดี ลักษณะต้นผอมตรง สูง 50 – 160 เซนติเมตร ใบมีขนาด 12 – 20 เซนติเมตร แผ่นใบมีลักษณะบางและอ่อน โคนใบเป็นกาบหุ้มต้น ช่อดอกสั้นเกิดที่ปลายยอด มีจำนวนดอกในช่อน้อยบานครั้งละ 1 ดอก ดอกมีขนาด 2 – 6 เซนติเมตร มีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ทางแถบประเทศศรีลังกา อินเดีย พม่า จีนตอนใต้

อินโดจีน และภูมิภาคมาเลเซีย (อบฉันท์ ไทยทอง, 2548) และที่สำคัญคือออกดอกได้เกือบตลอดทั้งปี และมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์บางประการที่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาและสร้างกล้วยไม้ดินลูกผสมได้เป็นอย่างดี เช่นดอกมีกลิ่นหอม กลีบปากสีชมพูอ่อน และกลีบปากสีชมพูเข้ม (Nanakorn and Watthana, 2008)

เอื้องดินใบหมาก (*Spathoglottis plicata* Blume) เป็นกล้วยไม้ดินพันธุ์แท้ของประเทศไทยที่พบตามชายป่า หรือทุ่งโล่งที่ชื้นแฉะทางภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย และมีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ทางแถบประเทศศรีลังกา อินเดีย พม่า และภูมิภาคมาเลเซีย ลำต้นเป็นหัวมีลักษณะรูปไข่หรือรูปรีแกมรูปไข่ ขนาด 3 – 5 เซนติเมตร มีแนวข้อปล้องชัดเจน ส่วนบนมีโคนกาบใบหุ้ม ใบเป็นแถบยาวได้ถึง 1 เมตร กว้าง 2 – 6 เซนติเมตร แผ่นใบค่อนข้างบาง แต่แข็ง ปลายใบแหลม โคนใบเรียวเล็กน้อย ช่อดอกตั้งตรงสูงประมาณ 60 – 100 เซนติเมตร ดอกออกที่ปลายช่อ ค่อนข้างแน่นและจะค่อยๆ ทยอยบานเป็นเวลานาน มีใบประดับสีม่วงรองรับ เป็นกล้วยไม้ที่ไม่ทิ้งใบ และสร้างหัวใหม่ขยายออกไปเรื่อยๆ ออกดอกในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม หรือเกือบตลอดทั้งปี (อบฉันท์ ไทยทอง, 2548) และปลูกได้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย ซึ่งปัจจุบันเอื้องดินใบหมากถูกนำมาพัฒนาสายพันธุ์ข้ามชนิด และผลิตเป็นไม้กระถางเชิงการค้าอย่างต่อเนื่อง (Nanakorn and Watthana, 2008)

การผสมพันธุ์กล้วยไม้

การผสมพันธุ์กล้วยไม้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ ให้ได้กล้วยไม้ลูกผสมที่มีลักษณะที่ดี โดยแตกต่างจากต้นพันธุ์ต้นเดิมที่นำมาศึกษา ซึ่งการผสมพันธุ์กล้วยไม้เกิดขึ้นเมื่อมีการถ่ายละอองเกสร (pollination) ตามด้วยการปฏิสนธิ (fertilization) การผสมกล้วยไม้เพื่อปรับปรุงพันธุ์ส่วนใหญ่เกิดจากการผสมตัวเอง (self pollination) และการผสมข้าม (Cross pollination) โดยการผสมข้ามชนิดในรูปแบบ Interspecific hybridization นั้นมีโอกาสประสบความสำเร็จสูงกว่าการผสมข้ามสกุลในรูปแบบ Intergeneric hybridization โดยส่วนมากการผสมข้ามสกุลมีโอกาสประสบความสำเร็จน้อย เนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่น ลักษณะทางพันธุกรรมที่ไม่สามารถเข้ากันได้ ของคู่ผสมที่เลือกใช้ เนื่องมาจากความห่างไกลของสายวิวัฒนาการ หรืออาจเกิดจากการที่เกสรตัวผู้เป็นหมัน เนื่องมาจากจำนวนชุดโครโมโซมที่ผิดปกติ หรือต้นที่คัดเลือกมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ไม่เหมาะสม จึงเกิดการเข้ากันไม่ได้ และอาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมในการผสมเกสรไม่เหมาะสม เช่น ฝนตกชุก อากาศหนาวเย็นเกินไป หรือร้อนจนเกินไป มีโรคหรือแมลงรบกวน ให้ปุ๋ยหรือสารเคมีเข้มข้นมากเกินไป หรือแม้กระทั่งน้ำที่ใช้ในการ

รดมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น ซึ่งจะทำให้โอกาสประสบความสำเร็จในการผสมมีน้อยหรือไม่มีเลย ซึ่งการผสมพันธุ์กล้วยไม้จะได้ผลดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ นอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้น คือ

1. กล้วยไม้ที่ผสมกันได้ต้องเป็นกล้วยไม้ที่มีการเจริญแบบเดียวกัน เช่น กล้วยไม้ประเภทโมโนโพเดียลซึ่งมีการเจริญเติบโตทางยอดต้องผสมกับกล้วยไม้ประเภทโมโนโพเดียลด้วยกัน จึงจะมีโอกาสประสบความสำเร็จมาก ในกรณีที่นำกล้วยไม้ประเภทโมโนโพเดียลมาผสมกับกล้วยไม้ประเภทซิมโพเดียลซึ่งมีการเจริญเติบโตแบบแตกหน่อออกมาด้านข้างซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน จึงเป็นสาเหตุให้เกิดการผสมไม่ติด และมีเปอร์เซ็นต์การติดฝักที่ต่ำ เช่น การศึกษาการผสมข้ามสกุลของกล้วยไม้ *Distichophyllum* x *Formosae* นั้นไม่สามารถติดฝักได้ (มาลินี อินทร์วงศ์ และณัฐา โพธาภรณ์, 2553)

2. กล้วยไม้ที่ผสมกันถ้าอยู่ในสกุลเดียวกันจะสามารถผสมกันได้ง่ายกว่าการผสมข้ามสกุล แต่ก็ยังมีรายงานที่ประสบความสำเร็จในการผสมข้ามสกุล เช่น การผสมข้ามสกุลของกล้วยไม้อิงอาศัยระหว่าง *Aerides vandarum* Reichb.f และ *Vanda stangeana* Reichb.f จนได้ลูกผสมชนิดใหม่เกิดขึ้น ที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นพันธุ์ต้นเดิมที่นำมาศึกษา โดยต้นอ่อนลูกผสมที่เกิดขึ้นสามารถเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมตามปกติได้ดี (Kishor, et al. 2008)

3. การผสมเกสรกล้วยไม้ต้องเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เจริญเติบโตเต็มที่ ถ้าต้นเล็กหรือลำต้นไม่แข็งแรงอาจทำให้อาหารที่มาเลี้ยงฝักไม่เพียงพอ เป็นผลให้ฝักไม่สมบูรณ์เมื่อนำเมล็ดไปเพาะจะส่งผลให้เมล็ดไม่สามารถงอก และพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้

4. ระยะเวลาที่เหมาะสม และความสมบูรณ์ของดอก คือ ดอกกล้วยไม้ที่บานเต็มที่ทั้งดอกแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์ควรมีลักษณะดอกที่บานเท่ากัน และควรเลือกดอกที่ไม่บานมากหรือบานมานานจนจวนจะโรยเพราะจะทำให้มีโอกาสในการผสมติดมีน้อย สำหรับระยะเวลาที่เหมาะสมในการผสมเกสรควรเป็นเวลาเช้า (อบฉันท์ ไทยทอง, 2548)

การปรับปรุงพันธุ์

สำหรับรายงานการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้โดยการสร้างลูกผสมใหม่ ทั้งชนิดที่เป็นลูกผสมข้ามสกุล (Intergeneric hybrids) และลูกผสมข้ามชนิด (Interspecific hybrids) นั้น จะเห็นว่ายังมีการศึกษาน้อย อาทิ (Mao, et al., 2004) ที่ประสบความสำเร็จในการสร้างลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของกล้วยไม้ในสกุล *Spathoglottis* ระหว่าง *S. plicata* กับ *S. kimballiana* โดยเมล็ดที่เกิดขึ้นสามารถงอกและเจริญเติบโตในสภาพหลอดทดลองได้ดี และสามารถย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำได้

สำหรับการศึกษาการสร้างกล้วยไม้ลูกผสมข้ามสกุลนั้นมีรายงานการศึกษาไม่มากนัก อาทิ Kishor, et al. (2006) ทำการสร้างกล้วยไม้อิงอาศัยลูกผสมข้ามสกุลระหว่าง *Vanda coerulea* Griff. กับ *Ascocentrum ampullaceum* (Roxb.) Schltr. var. *auranticum* จนได้ลูกผสมใหม่ที่ชื่อ *Ascocenda* "Kangla" ที่สามารถเจริญเติบโตและให้ดอกได้ และต่อมา Kishor, et al. (2008) ก็ประสบความสำเร็จในการสร้างกล้วยไม้อิงอาศัยลูกผสมข้ามสกุลระหว่าง *Vanda stangeana* กับ *Aerides vandarum* โดยนำเมล็ดมาเพาะขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ และใช้เทคนิคอาร์แอฟแอลพี (RFLP) มาตรวจสอบเสถียรภาพของลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อเมื่อมีการย้ายเลี้ยงหลายๆ ครั้งได้

การงอกของเมล็ดกล้วยไม้

การงอกของเมล็ดกล้วยไม้นั้นจะมีกระบวนการงอกที่แตกต่างจากเมล็ดพืชชนิดอื่นๆ โดยการงอกของเมล็ดกล้วยไม้นั้นจะคล้ายกับการพัฒนาของตา (bud) ที่พักตัว และเมื่อเมล็ดได้รับอาหารที่เหมาะสมหลังจากนั้นจะสะสมอาหารที่คัพภะมีการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน และจะมีขนาดใหญ่ขึ้น (Arditti, 1967) โดยปกติเมล็ดกล้วยไม้ 1 เมล็ดสามารถงอกได้ 1 ต้น แต่พบว่ามีกล้วยไม้บางชนิดที่บางเมล็ดงอกได้ 2 – 3 ต้น Knudson (1922) ได้รายงานไว้ว่า เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกและพัฒนาได้ในสภาพปลอดเชื้อจำเป็นที่จะต้องอาศัยเชื้อรา mycorrhiza ในการส่งเสริมให้เมล็ดเกิดการงอก แต่สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเมล็ดต้องมีน้ำตาลและอาหารที่จำเป็นต่อการงอกและการพัฒนาของต้นอ่อน จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ต่อไป และ Pierik (1987) กล่าวว่าสาเหตุของการนำเมล็ดกล้วยไม้มาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เนื่องมาจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก และไม่มีอาหารสะสมภายในเมล็ด ซึ่งการที่เมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กเมื่อฝักแตกในธรรมชาติ อาจทำให้เมล็ดสูญหายได้ในขณะแพร่กระจายในสภาพธรรมชาติ และมีโอกาสที่จะประสบความสำเร็จในการงอกตามธรรมชาติที่ค่อนข้างน้อยและน้อยมาก ดังนั้นการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อจึงประสบความสำเร็จอย่างมากโดยเมล็ดที่นำมาเพาะในสภาพปลอดเชื้อสามารถงอกได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ในสภาพธรรมชาตินั้นต้องพึ่งพาอาศัยเชื้อรา mycorrhiza ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการงอกแบบ symbiosis และในส่วนการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อนั้น จำเป็นต้องใช้แร่ธาตุและน้ำตาลในอาหารสังเคราะห์เท่านั้น (asymbiotic germination) และในการงอกของเมล็ดกล้วยไม้นั้นสามารถงอกได้ทั้งในสภาพธรรมชาติ ซึ่งการงอกในสภาพธรรมชาตินั้นมีโอกาส

ประสบความสำเร็จที่ค่อนข้างน้อยและการงอกโดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่มีโอกาสประสบความสำเร็จมากกว่า โดยปกติแล้วเมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกได้ 2 วิธี คือ

1. Symbiotic germination เป็นการงอกของเมล็ดในสภาพตามธรรมชาติ ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยเชื้อราที่อาศัยอยู่บริเวณรากกล้วยไม้ (mycorrhiza) มาช่วยส่งเสริมให้เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกได้ โดยเชื้อราจะมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายแป้งหรือเซลลูโลสของกิ่งไม้ และสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตหลายชนิดไปสะสมในเส้นใยของเชื้อรา หลังจากนั้นเมล็ดจะย่อยสลายเชื้อราทำให้เมล็ดได้รับคาร์บอนและธาตุอาหารต่างๆ เมล็ดจึงมีการงอกและพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่มีความสมบูรณ์ต่อไปได้

2. Asymbiotic germination เป็นการงอกของเมล็ดที่ไม่จำเป็นต้องอาศัยเชื้อราประเภท mycorrhiza และสามารถงอกได้ดีในอาหารสังเคราะห์ที่นึ่งฆ่าเชื้อ (sterilized medium) ที่ประกอบด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นหลายชนิดที่เหมาะสมต่อการงอกและการพัฒนาเมล็ดเป็นต้นอ่อนที่มีความสมบูรณ์

ซึ่งกระบวนการงอกของเมล็ดเริ่มจากเมล็ดจะดูดน้ำผ่านเปลือกหุ้มเซลล์ด้านนอก (testa) หลังจากนั้นเมล็ดจะมีลักษณะพองบวม เอมบริโอเริ่มมีการแบ่งเซลล์และค่อยๆ ดันเปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก โดยเอมบริโอจะโผล่พ้นเปลือกหุ้มเมล็ดที่มีรูปร่างคล้ายคอร์ม (corm) หรือที่เรียกว่าโปรโตคอร์ม (protocorm) ซึ่งโปรโตคอร์มจะมีลักษณะเป็นลูกกลมปลายแหลมและมีการพัฒนาเกิดรากงอกขึ้นมาจากส่วนของโปรโตคอร์ม โดยเนื้อเยื่อส่วนบนและส่วนรากมีการเจริญและรอบๆ โปรโตคอร์ม และมีไรซอยด์ (rhizoid) เกิดขึ้น เมื่อโปรโตคอร์มได้รับแสงสีเขียวแล้วจะเริ่มพัฒนาสร้างใบเกิดขึ้น หลังจากนั้นจะพัฒนาและเจริญเป็นต้นอ่อน (seedling) ซึ่งต้นอ่อนในระยะนี้สามารถที่จะสร้างอาหารได้เอง จากนั้นรากที่แท้จริงจะค่อยๆ เกิดขึ้นและจะพัฒนาโดยมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สมบูรณ์ต่อไป (Pierilk, 1972; 1997) ส่วนการศึกษาการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้นั้นได้มีรายงานการศึกษามากมาย เช่น

รายงานการศึกษาของ Park, et al. (2000) ที่ศึกษาการเพาะเมล็ดที่ได้จากการผสมจนสามารถติดฝักของกล้วยไม้ดิน *Calanthe sieboldii* Decne. ex Regel. เมล็ดสามารถพัฒนาเกิดเป็นโปรโตคอร์มและต้นอ่อนได้ดีบนอาหารสูตรที่เติม Adenine sulfate ร่วมกับ Putrescine รวมถึงรายงานการศึกษาของ Kitsaki, et al. (2004) ที่ศึกษากระบวนการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ในสกุล *Ophrys* หลายชนิด และพบว่า อายุฝักมีผลต่อการพัฒนาของส่วนสะสมอาหารใต้ดินขนาดเล็ก (minituber) ได้ดี และการศึกษาของ Martin and Predeep (2003) ที่ได้ศึกษากระบวนการงอกและการเก็บรักษาสายพันธุ์กล้วยไม้ *Ipseama labarica* (Rchb. f.) Hook. f. ใน

สภาพปลอดเชื้อในระยะเวลานาน และการพัฒนาส่วนสะสมอาหารที่เรียกว่า Bulblets เพื่อการเก็บรักษาที่ง่ายขึ้นจากการเลี้ยงชิ้นส่วนตาเหง้า (Rhizome buds) Shimura and Koda (2004) ศึกษาการเพาะเมล็ดของกล้วยไม้ *Cypripedium macranthos* var. *rubenense* ที่สามารถเกิดการงอกและพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มได้จำนวนมาก ซึ่งโปรโตคอร์มจะพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ต่อไป Thakur and Dongarwar (2012) ศึกษาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *Spathoglottis plicata* Blume ในสภาพปลอดเชื้อบนสูตรอาหาร MS (1962) และพบว่า เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด 87.3 เปอร์เซ็นต์

รวมไปถึงงานวิจัยอีกหลายฉบับที่ศึกษากระบวนการงอกของกล้วยไม้ดินในสภาพปลอดเชื้อ อาทิ การศึกษาใน *Anoectochilus formosanus* และ *Haemaria discolor* (Chou and Chang, 2004) *Calopogon tuberosus* และ *Habenaria macroceratitis* (Kauth et al., 2006) *Cymbidium faberi* Rolfe. (Chen et al., 2005) *Cephalanthera falcate* (Thunb.) Blume (Yamazaki and Miyoshi, 2006) *Malaxiskhasiana* Soland ex Swartz (Deb and Temijensagba, 2006) และ *Bletiapurpurea* (Lam.) A. DC. (Dutra, et al. 2008) เป็นต้น และยังมีตัวอย่างรายงานการศึกษาการเพาะเมล็ดกล้วยไม้อิงอาศัยลูกผสมข้ามชนิดบางสกุลอาทิ ลูกผสม *Vanda* (Johnson, et al. 2007) และลูกผสมข้ามสกุลระหว่าง *Vanda stangeana* กับ *Aerides vandarum* (Kishor and Devi, 2009) เป็นต้น

ผลของแสงต่อการงอก และการพัฒนาของเมล็ด

แสงเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดในกล้วยไม้หลายชนิด ซึ่งกล้วยไม้แต่ละชนิดจะมีความต้องการแสงในกระบวนการงอกของเมล็ดและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ที่แตกต่างกัน Stimart and Ascher (1981) รายงานว่า ในสภาพที่ไม่มีแสงเมล็ดสามารถงอกและอยู่รอดได้มากกว่าสภาวะที่ได้รับแสงตลอดเวลา Pierilk (1987) พบว่า การเก็บขวดเพาะเลี้ยงไว้ในสภาวะที่มีแสงจากหลอด fluorescent ในระยะเวลา 12 – 16 ชั่วโมงต่อวัน ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ทั่วไปยกเว้นในกล้วยไม้ดิน ชนิดของแสงสีต่างๆ มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยง เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นยาสูบในสูตรอาหารที่มี IAA พบว่าเมื่อนำเนื้อเยื่อไปเลี้ยงไว้ภายใต้แสงสีแดง และสีเขียวจะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้ดีกว่าแสงสีน้ำเงิน เนื่องจาก IAA จะถูกทำลายด้วยแสงสีน้ำเงิน ส่งผลให้การเจริญเติบโตถูกจำกัด ส่วนแสงสีแดงสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2542) และการศึกษาของ

Urben, Fajerska and Swiderski (2007) โดยศึกษาผลของแสงสีต่างๆ ต่อการงอกและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้ลูกผสมในสกุล *Cattleya* ระหว่าง *C. intermedia* กับ *C. aurantiaca* พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดไว้ในแสงสีแดงสามารถกระตุ้นให้เมล็ดเกิดการงอกได้ดีที่สุด และเมล็ดสามารถพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มหลังจากนั้นโปรโตคอร์มจะพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่มีความสมบูรณ์ได้สูงสุด

นอกจากนี้ความเข้มแสงยังมีผลต่อการสังเคราะห์แสงของพืช เนื่องจากสามารถนำพลังงานแสงมาเก็บสะสมไว้ในรูปของพลังงานเคมี หลังจากนั้นจะเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเป็นน้ำตาลและออกซิเจน เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้ (วงจันทร์ วงศ์แก้ว, 2535) มีตัวอย่างรายงานการศึกษาของ จิตราพรรณ พิลึก (2536) ที่ศึกษาผลของแสงต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ด พบว่า เมล็ดกล้วยไม้ดินสกุล *Paphiopedilum*, *Vanilla* และ *Cymbidium* ที่เพาะเลี้ยงต้องเก็บไว้ในที่มืดจนกว่าเมล็ดจะงอกและเจริญเป็นต้นอ่อนที่มีใบ 2 – 3 ใบ หลังจากนั้นจึงสามารถที่จะย้ายออกไว้ในที่ได้รับแสงสลัวๆ อีก 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำออกมาเพาะเลี้ยงไว้ในสภาวะที่ได้รับแสงตามปกติ จึงจะสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ดี

จากรายงานของอภิวิชญ์ ทิพโชติ (2552) ที่ศึกษาผลของแสงต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดในกล้วยไม้เพชรหึง (*Grammatophyllum speciosum* Blume) ในสภาวะที่ได้รับแสงแตกต่างกัน พบว่าเมล็ดที่ได้รับปัจจัยแสงที่แตกต่างกันนั้นส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่แตกต่างกันด้วย เช่นเดียวกับรายงานของ แสงเดือน วรรณชาติ (2549) ศึกษาการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของต้นอ่อนเอื้องคำผักปราบ (*Dendrobium ochreatum* Lindl.) ที่เลี้ยงไว้ในสภาวะที่ได้รับแสงแตกต่างกัน พบว่าเมล็ดที่ได้รับความมืด 4 สัปดาห์ แล้วตามด้วยแสง 12 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสูงสุด 92.64 เปอร์เซ็นต์ รวมถึงรายงานการศึกษาของวิทยา ผาคำ (2553) ที่ศึกษาผลของแสงต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ดินบานดึก (*Spathoglottis eburmea* Gagnep.) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเมล็ดบนอาหารดัดแปลงสูตร VW (1949) และนำไปเลี้ยงไว้ในสภาวะที่ได้รับแสงแตกต่างกัน พบว่า เมล็ดที่เลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเลี้ยงในที่ได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน สามารถจะกระตุ้นให้เกิดการงอกได้ดีที่สุด

Arditti (1979) ศึกษาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ในสกุล *Paphiopedilum*, *Cymbidium* และ *Phalaenopsis* พบว่า เมื่อนำเมล็ดกล้วยไม้ทั้ง 3 สกุล มาเพาะบนอาหารกึ่งแข็งและเก็บไว้ในที่มืดหรือเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมผงถ่าน จะส่งเสริมให้เมล็ดเกิดการงอกและเจริญเติบโตได้ดี

โดยเฉพาะเมล็ดกล้วยไม้ *Paphiopedilum ciliolare* ซึ่งเมล็ดสามารถงอกได้ดีเมื่อเลี้ยงไว้ในที่มืดนาน 12 สัปดาห์

วุฒิชัย ฤทธิ (2556) ศึกษาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดินว่านอึ่งสยาม (*Eulophia siamensis* Rolfe ex Downie) และเมล็ดของกล้วยไม้ดินเหลืองประไพ (*Eulophia promensis* Lindl.) ที่เพาะบนอาหารกึ่งแข็งดัดแปลงสูตร Vacin and Went (1962) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำต้มมันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตรผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร พบว่าเมล็ดว่านอึ่งสยามและเหลืองประไพที่เลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 12 สัปดาห์ แล้วย้ายออกเลี้ยงที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน จนครบ 24 สัปดาห์ ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสูงที่สุด

การศึกษาของอรรถพ เทียมแก้ว เชิดศักดิ์ ทัพใหญ่ และอนุพันธ์ กงบังเกิด (2555) ที่ได้ศึกษาผลของแสงต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้นางกราย (*Habenaria lindleyana* Steud.) พบว่าเมล็ดที่เพาะในสภาวะที่ได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน มีเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาของเมล็ดสูงที่สุด 39.31 61.85 และ 68.79 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 8 12 และ 16 ตามลำดับ

Kauth, Vendrame and Kane, (2006) ศึกษาการงอกและการพัฒนาของเมล็ดและต้นอ่อน *Calopogon tuberosus* ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เมล็ดที่เลี้ยงไว้ในสภาวะที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สามารถงอกและพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุด

Ali, Murdad and Latip (2011) ที่ได้ทำการศึกษาการงอกของกล้วยไม้ *Dendrobium tetrachromum* และ *D. hamaticalcar* ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS (1962) และนำมาเลี้ยงในสภาวะที่ได้รับแสงแตกต่างกันคือ 16 ชั่วโมงต่อวัน และ 24 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าเมล็ดกล้วยไม้ *D. tetrachromum* ที่เลี้ยงไว้ในสภาวะที่ได้รับแสงตลอด 24 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 70 วัน มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และกล้วยไม้ *D. hamaticalcar* ที่เลี้ยงในสภาวะที่ได้รับแสงตลอด 24 ชั่วโมงต่อวัน จะกระตุ้นให้เมล็ดเกิดการงอกได้สูงสุด 91.51 เปอร์เซ็นต์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์เป็นวิธีที่นิยม และประสบความสำเร็จอย่างมากมาย ความก้าวหน้าของการขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น เริ่มมาจากงานทางด้านการขยายพันธุ์และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ (Morel, 1964) ซึ่งกล้วยไม้จัดเป็นพืชที่ประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในประเทศไทยมีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2517 หลังจากนั้นได้มีการศึกษาและพัฒนา

เทคนิคการเพาะเลี้ยงจนสามารถเพาะเลี้ยงเมล็ดและชิ้นส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้หลายชนิดได้ดี (อารีย์ วรัญญวัฒก์, 2541)

ความสำเร็จในการขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ในสภาวะการเพาะเลี้ยง ตัวอย่างเช่น สัดส่วนของธาตุอาหารหลักกับธาตุอาหารรอง (Churchill, et al., 1972) สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งในกลุ่มของออกซิน (Wu, et al., 2004; Chen and Chang, 2004) ไซโตไคนิน (Malabadi, et al., 2004) และผลร่วมระหว่างออกซินกับไซโตไคนิน (Chang and Chang, 1998; Roy and Banerjee, 2003; Shimura and Koda, 2004) ปริมาณน้ำตาลรวมถึงสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ เช่น น้ำมะพร้าว และน้ำต้มมันฝรั่ง (Tokuhara and Mii, 2003) และปัจจัยสภาพแวดล้อมอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของกล้วยไม้ชนิดพันธุ์ต่างๆ เหล่านั้น พัฒนาเกิดเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ดี (Da Silva, et al., 2005) รวมไปถึงการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้รูปแบบต่างๆ ที่ประสบความสำเร็จทั้งบนอาหารแข็ง (Ishii, et al., 1998) ในอาหารเหลวแบบเขย่าเลี้ยง (Chang and Chang, 2000) ในอาหารเหลวแบบจุ่มแช่ชั่วคราว (Young, et al., 2000) และในอาหารเหลวในถังหมักระดับขยายส่วน (Paek, et al., 2005) เป็นต้น

สำหรับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในกล้วยไม้ดินสกุลต่างๆ นั้นพบว่ามีรายงานการศึกษาทดลองมาบ้าง ตัวอย่างได้แก่งานวิจัยของ Datta, et al. (1999) ที่ศึกษาถึงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ดิน *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. ต่อมา Takahashi, et al. (2000) ศึกษาถึงการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ดิน *Habenaria* (*Pecteilis*) *radiata* รวมไปถึงงานวิจัยของ Soontornchainaksaeng, et al. (2001) ที่ศึกษาถึงผลของแสงต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ดินเอื้องพร้าว (*Phaius tankervilliae* (Banks ex L. Herit.) Bl.) และฟ้ามุ่ย (*Vanda coerulea* Griff.) และยังมีรายงานการวิจัยของ Sheelavantmath, et al. (2000) ที่ประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์กล้วยไม้ดิน *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. จากชิ้นส่วนของเหง้า (Rhizome section) โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินร่วมกับไซโตไคนิน ซึ่งชิ้นส่วนเหง้าสามารถเจริญและพัฒนาต่อไปได้งานวิจัยของ Shimada, et al. (2001) ศึกษาถึงการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์กล้วยไม้ดิน *Habenaria radiate* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน และสามารถชักนำให้ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในสภาพปลอดเชื้อ รวมไปถึงการศึกษาของ Roy and Banerjee (2002) ที่ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดเหง้าและมีการพัฒนาเกิดเป็นต้นอ่อนจากชิ้นส่วนของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ดิน *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. อีกทั้ง Bhadra and Hossain (2003)

ยังได้เริ่มต้นศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการงอกของเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์กล้วยไม้ดิน *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. อีกด้วย สำหรับงานวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการอนุรักษ์กล้วยไม้ดินที่หายากต่างๆ นั้น พบว่ามีตัวอย่างรายงานของ Vassa and Rosenberg (2004) ที่ศึกษาถึงการขยายพันธุ์กล้วยไม้ดินสกุล *Dactylorhiza* จากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อเจริญของโปรโตคอร์มที่เพาะจากเมล็ดของกล้วยไม้ดังกล่าว

การเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากนั้น พบว่ามีรายงานบทความปริทัศน์เรื่องการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์เอื้องดินใบหมาก และ *Epidendrum radicans* โดย Singh (1992) ซึ่งรวบรวมและเรียบเรียงข้อมูลเกี่ยวกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อเอื้องดินใบหมากมาตั้งแต่ ปี 1970 จนถึงปี 1981 นอกจากนี้ ยังมีรายการงานวิจัยเกี่ยวกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อเอื้องดินใบหมากอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน เช่น งานวิจัยของ Teng, et al. (1997) ที่ศึกษาผลของฮอร์โมนต่อพัฒนาการของเอื้องดินใบหมากในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ส่วนของข้อ และใบที่ตัดจากต้นที่ปลูกในเรือนเพาะชำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า ชิ้นส่วนดังกล่าวสามารถพัฒนาเกิดเป็นโปรโตคอร์มและพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้แตกต่างกันออกไป Sinha, et al. (2009) ทำการเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ และตายอดของเอื้องดินใบหมากที่ตัดจากต้นที่ปลูกในเรือนเพาะชำ บนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนิน และไซโตไคนินร่วมกับออกซิน และพบว่า การใช้ฮอร์โมนไซโตไคนินร่วมกับออกซิน มีผลกระตุ้นให้ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงสามารถเจริญและพัฒนาเกิดเป็นต้นอ่อนได้ดีกว่าการใช้ฮอร์โมนกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งเพียงกลุ่มเดียว

สำหรับการศึกษาที่เกี่ยวกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อเอื้องดินใบไผ่ พบว่ามีรายงานการศึกษาทั้งต่างประเทศและในประเทศ เช่น รายงานการศึกษาของบุญยืน กิจวิจารณ์ (2525; บุญยืน กิจวิจารณ์ และไพบูลย์ มงคลถาวรชัย, 2527; Bhadra and Bhowmik, 2005; Chen, et al., 2006) ที่รายงานการศึกษาการนำเมล็ดและส่วนของลำต้น และข้อจากลำต้นกล้วยไม้เอื้องดินใบไผ่มาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และพบว่าเมล็ดมีการงอก และเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนได้ดี และส่วนของข้อจากลำต้นสามารถแตกเป็นต้นใหม่จากตาข้างได้ดีเช่นกัน Martin (2007) ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเอื้องดินใบไผ่ บนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนิน และสามารถกระตุ้นให้ข้อเกิดเป็นโปรโตคอร์มได้เป็นจำนวนมาก และโปรโตคอร์มที่เกิดขึ้นนั้นมีการพัฒนาต่อจนกลายเป็นต้นอ่อนที่เจริญเติบโต และแข็งแรงได้

สารประกอบอินทรีย์ (Organic component)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์ สารประกอบอินทรีย์เป็นสารประกอบที่มีความสำคัญในการกระตุ้นให้ต้นอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการพัฒนาทางสัณฐานวิทยาและการเจริญเติบโตที่ดีในพืชหลายชนิด ซึ่งสารอินทรีย์ที่มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของต้นอ่อน ได้แก่ วิตามิน กรดอะมิโนต่างๆ นอกจากนี้ยังมีสารอินทรีย์เชิงซ้อนที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตและการพัฒนาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยง เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่นิยมนำมาใช้ในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้โดยเฉพาะ (Arditti and Ernst, 1993) โดยน้ำมะพร้าวอ่อนจะประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อน เช่น indole-3-acetic acid (IAA) เป็นต้น (Hadley, 1982) โดยน้ำมะพร้าวอ่อนที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะมีผลทำให้คาร์โบไฮเดรตแตกตัว และทำให้เกิดการแตกพันธะของสาร ทำให้ได้พลังงานจากการแตกตัวของพันธะไปใช้ในกระบวนการหายใจ และยังมีผลกระตุ้นให้เนื่อเยื่อพืชเกิดการแบ่งเซลล์ของเซลล์ผิว (epidermal cell) (Morel, 1974) และน้ำต้มมันฝรั่ง ปัจจุบันมันฝรั่งก็นิยมนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับน้ำมะพร้าวอ่อน (Arditti and Ernst, 1993) เนื่องจากในมันฝรั่งมีสารโพลีเอมีน (polyamine) เช่น putresine spermidine และ spermine และมี biosynthetic enzyme เช่น orginine decarboxylase ornithine decarboxylase และ S-adenosyl-L-methionine decarboxylase ที่อยู่ในหัวมันฝรั่ง (Kaur-Sawhney, et al., 1980) และยังประกอบด้วยแป้งที่มี amylase และ amylopectin (Schwimmer, 1953)

นอกจากนี้ยังมีน้ำตาล (sugar) โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครส เนื่องจากเนื้อเยื่อที่ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนั้นไม่สามารถสังเคราะห์อาหารได้เอง น้ำตาลซูโครชที่เติมลงในอาหารสามารถแตกตัวได้ง่าย เป็นฟรุกโตสและกลูโคส ซึ่งเซลล์พืชสามารถนำเอากลูโคสไปใช้แล้วตามด้วยฟรุกโตส (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2547) ในการแตกตัวของซูโครสจะเกิดได้มากขึ้นเมื่อมีสารประกอบอื่นรวมอยู่ด้วยในขณะที่นึ่งฆ่าเชื้อ การเตรียมอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในปัจจุบันนิยมใช้น้ำตาลทรายซูโครส (table sugar) เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงโดยสามารถส่งเสริมให้เนื้อเยื่อมีการพัฒนาได้ดี (จิตราพรรณ พิลึก, 2536) และน้ำตาลซูโครสที่นำมาใช้เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 2 - 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะกับการเติมลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2547) และธาตุอาหารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของเนื้อเยื่อและต้นอ่อน เช่น โพแทสเซียม (potassium) คลอไรด์ (chloride) และโซเดียม

(sodium) นอกจากนี้ยังมีสารที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงคือ myo-insitol และ sorbitol (Pollard, et al., 1961)

ตัวอย่างรายงานการศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์ต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ชนิดต่างๆ ได้แก่

บุญยืน กิจวิจารณ์ และไพบูลย์ มงคลถาวรชัย (2527) รายงานว่า กล้วยไม้ยี่โถปีนัง (*Arundina graminifolia*) ที่เลี้ยงในอาหารวุ้นดัดแปลงสูตร Vacin and Went (1949) ที่เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมให้เนื้อเยื่อเจริญพัฒนาเป็นยอดใหม่ได้เป็นจำนวนมาก วิชานันต์ เทียมสุวรรณ (2552) ศึกษาผลของน้ำมะพร้าว กล้วยหอม และมันฝรั่งต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มเอื้องสายสามสี (*Dendrobium crystallinum* Rchb.f.) ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรอาหาร MS (1962) พบว่าโปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมกล้วยหอม 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับมันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตร มีการพัฒนาเป็นยอดและรากมากที่สุด ประวีณา มณีรัตนรุ่งโรจน์ (2552) รายงานว่า อาหารสูตร MS (1962) ความเข้มข้น 1/4 เท่าที่ไม่เติมน้ำมะพร้าวเป็นสูตรที่สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มเอื้องนางชี (*Dendrobium virgineum* Rchb.f.) เจริญเป็นโปรโตคอร์มใหม่ได้สูงสุด ในขณะที่สูตรที่เติมน้ำมะพร้าว 15% (v/v) สามารถเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มได้สูงสุดรายงานการศึกษาของอัญชลี จาละ (2553) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้นางอั้วสาคริก (*Pecteilis sagarikii* Seidenf.) พบว่า หลังจากบ่มเมล็ดไว้ในที่มืด 4 เดือน แล้วย้ายลงเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ดัดแปลงสูตร (VW) ที่เติมน้ำมะพร้าวและน้ำต้มมันฝรั่งความเข้มข้นแตกต่างกัน (10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์) รวมทั้งเติมธาตุอาหารรองและวิตามินของอาหารสังเคราะห์สูตร (MS) เป็นระยะเวลา 4 เดือน ส่งผลให้เมล็ดสามารถเจริญเป็นโปรโตคอร์มและพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้เป็นจำนวนมาก วีรชัย ศุกุลพงศ์ (2517) พบว่า อาหารสูตรดัดแปลง VW ที่เติมมันฝรั่งบดในปริมาณ 50 - 100 กรัมต่อลิตร สามารถส่งเสริมให้ต้นอ่อนกล้วยไม้ *Vanda rothschildiana* มีการพัฒนาและเจริญเติบโตได้ดี อาภาภรณ์ วัฒนวิเชียร (2534) ทำการศึกษาทดลองเลี้ยงโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ช้างกระบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 100 150 และ 200 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับน้ำต้มมันฝรั่ง 0 50 และ 100 กรัมต่อลิตร พบว่าโปรโตคอร์มที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับน้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร จะส่งเสริมให้โปรโตคอร์มมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มขึ้น

สารควบคุมการเจริญเติบโต (Growth regulators)

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณที่มากในระยะเวลาอันรวดเร็ว จำเป็นต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) เพื่อกระตุ้นให้เนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงมีการพัฒนาและการเจริญเติบโตที่ดี โดยปกติฮอร์โมนพืชเป็นสารอินทรีย์ที่สร้างขึ้นในพืช และมีปริมาณเพียงเล็กน้อยแต่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพทางสรีรวิทยาโดยการกระตุ้นหรือยับยั้งการเจริญเติบโตในพืชนั้นๆ ซึ่งสารนี้อาจรวมไปถึงวิตามินบางชนิด แต่ไม่รวมถึงธาตุอาหารที่พืชสร้างขึ้น และในปัจจุบันพบว่า มีสารเคมีบางชนิดที่สังเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการ อาจมีโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีเช่นเดียวกับฮอร์โมนที่พืชสร้างขึ้นก็ได้ ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ได้เรียกฮอร์โมนพืชที่ได้จากธรรมชาติ และสารที่ได้จากการสังเคราะห์ดังกล่าวนี้รวมเรียกว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators หรือ PGR) (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2548) โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบ่งออกเป็น 4 ชนิด คือ ออกซิน (Auxin) เป็นฮอร์โมนตัวแรกที่ค้นพบในพืช จากผลซึ่งทำให้เกิดการโค้งงอของส่วนยอดต้นกล้าพืช โดยออกซินเป็นกลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับการขยายขนาดของเซลล์ทำให้ส่วนของพืชมีการเจริญเติบโตและยืดยาวขึ้น ซึ่งสารในกลุ่มออกซินที่นิยมใช้ ได้แก่ naphthalene acetic acid (NAA), indole-3-acetic (IAA) และ 2,4-dichloroacetic acid (2, 4-D) ซึ่งออกซินแต่ละชนิดจะมีหน้าที่ที่แตกต่างกันออกไป แต่ส่วนใหญ่จะช่วยในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส กระตุ้นให้เกิดรากและ somatic embryo ไซโตไคนินเป็นฮอร์โมนที่ค้นพบครั้งแรกจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยวิธีปลอดเชื้อทำการกระตุ้นการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ ซึ่งพืชสร้างขึ้นหรือจากการสังเคราะห์ทางเคมีโดยมากจะเป็นอนุพันธุ์ของแอดีนีน ในพืชจะพบมากบริเวณปลายราก เอ็มบริโอ ผลอ่อนน้ำมะพร้าว สามารถเคลื่อนที่ย้ายไปสู่ส่วนต่างๆ ของพืชโดยผ่านทางท่อน้ำหรือไซเลม สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนินที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ benzyladenine (BA), Kinetin (Kn), 6(gamma, gamma-Dimethylallylamino) purine (2iP) และ (Zeatin) (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2548) จิบเบอเรลลิน (Gibberellin) มีผลกระตุ้นให้ต้นอ่อนเกิดการยืดยาวของลำต้นในต้นอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ และกรดแอบซิสิค (abscisic acid) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินและไซโตไคนินสามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ได้โดยประสิทธิภาพไม่เปลี่ยนแปลง จึงมีการนำมาใช้ร่วมกับสูตรอาหารต่างๆ ในการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในระยะเวลาอันรวดเร็ว (Bonga and Aderkas, 1992) และมีตัวอย่างรายงานการศึกษาการ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินและไซโตไคนินที่ประสบความสำเร็จมากมาย เช่น

Murthy (2005) พบว่า อาหารที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนโปรโตคอร์มและชิ้นส่วนใบ *Aerides crispum* ที่นำมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ สามารถส่งเสริมให้มีการพัฒนาเกิดโปรโตคอร์มต่อชิ้นส่วนในปริมาณสูงสุด

Teng, Nicholson and Teng (1997) ที่ศึกษาการเลี้ยงชิ้นส่วนข้อและใบของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก (*Spathoglottis plicata*) บนอาหาร MS (1962) ที่เติม BA และ NAA พบว่าสูตรอาหารที่เติม NAA 5.37 µM ร่วมกับ BA 0.44 µM สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อและชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มได้สูงสุด Sinha, Hakim and Alam (2009) ที่ได้ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้เอื้องดินใบหมากในสภาพปลอดเชื้อ ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดที่แตกใหม่ได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ วิทยาพร พรชุติ และครรชิต ธรรมศิริ (2552) ทดลองศึกษาเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มเอื้องดินใบหมากเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บนอาหารวุ้นสูตร ½ MS ที่เติม BA และ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า โปรโตคอร์มสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้มากที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 3.2 ยอด ในขณะที่สูตรอาหารที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โปรโตคอร์มสามารถเกิดเป็นโปรโตคอร์มใหม่ได้สูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ Suwannasri, Sectabar and Punjansing (2013) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ดินในสกุล *Spathoglottis* sp. ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA และ NAA พบว่าสูตรอาหารที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ต้นอ่อนมีจำนวนรากที่แตกใหม่สูงสุด และมีความยาวรากสูงสุด Novak and Whitehouse (2013) ศึกษาผลของฮอร์โมนออกซินต่อพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก พบว่า ต้นอ่อนที่ได้รับฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน สามารถพัฒนาเกิดต้นที่แตกใหม่ได้จำนวนมาก มีใบและยอดที่สมบูรณ์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 145 วัน

Bhadra and Bhowmik (2005) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้เอื้องดินใบไผ่ (*Arundina graminifolia* (D. Don.) Hochr.) ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS PM และ MVW และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ IAA BAP และ NAA จากการศึกษาพบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการแตกเป็นไรโซมใหม่ได้สูงสุด และมีอัตราการเกิดรากสูงสุดตามลำดับ และการศึกษาของ Kottackal, Poulose and Martin (2007) ที่ขยายพันธุ์กล้วยไม้ *A. graminifolia* โดยใช้ชิ้นส่วนโปรโตคอร์มและชิ้นส่วนข้อเป็น

ชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทดลอง พบว่า สูตรอาหาร ½ MS ที่เติม BA 44.4 µM สามารถส่งเสริมให้ชิ้นส่วนโปรโตคอร์มที่นำมาเพาะเลี้ยงแตกเป็นโปรโตคอร์มใหม่ได้สูงสุด และเมื่อย้ายเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 44.4 µM สามารถส่งเสริมให้มีการพัฒนาเกิดยอดได้สูงที่สุด

Khatun, et al. (2010) ที่ศึกษาการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมในสกุล *Dendrobium* โดยศึกษาผลของ BAP NAA IAA และ IBA บนอาหารสูตร MS พบว่าสูตรอาหารที่เติม BAP ร่วมกับ IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้ต้นอ่อนพัฒนาเกิดโปรโตคอร์มได้สูงสุด และมีน้ำหนักสดโปรโตคอร์มสูงสุด (5.12 กรัม) และสูตรอาหารที่เติม BAP ร่วมกับ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถส่งเสริมให้ต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมมีจำนวนยอดและจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด Mondal, Aditya and Banerjee (2013) สามารถชักนำให้ *Doritis pulcherrima* Lindl. เกิดยอดได้จำนวนมากเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Knudson C ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่สูตรอาหารที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้โปรโตคอร์มสามารถพัฒนาเกิดเป็นยอดและรากที่สมบูรณ์ได้สูงสุด Devi, Devi and Singh (2013) ศึกษาผลของTDZ และ NAA ต่อการเจริญของกล้วยไม้ *Aerides odorata* Lour. ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ส่งเสริมให้ต้นอ่อนเกิดยอดและรากใหม่ได้ดี และสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีอีกด้วย

สมพร ประเสริฐส่งสกุล และนัยนา ศรีชัย (2547) ได้รายงานว่า กล้วยไม้หวายเหลืองจันทบูรที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW (1949) ที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร Kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 0.3 เปอร์เซ็นต์ สามารถส่งเสริมให้ต้นอ่อนมีการพัฒนาและเจริญเติบโตได้ดี มีจำนวนรากต่อต้นสูงสุด มีความสูงและน้ำหนักต้นเฉลี่ยสูงสุด และเมื่อย้ายออกปลูกในสภาวะภายนอกมีการเจริญเติบโตของลำต้นได้ดี และมีอัตราการรอดสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์

Park, et al. (2002) ที่ศึกษาการเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* hybrid พบว่า ชิ้นส่วนใบสามารถเกิดเป็นโปรโตคอร์มได้จำนวนมาก บนอาหารแข็งที่เติม TDZ ในขณะที่ Chan, et al. (2004) รายงานถึงการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Paphiopedilum philippinense* บนอาหารสูตรที่เติม TDZ และการใช้ TDZ ในความเข้มข้นต่ำจะส่งเสริมให้ต้นอ่อนเกิดเป็นยอดได้มากกว่าการใช้ TDZ ความเข้มข้นสูง ในขณะที่แสงเดือน วรรณชาติ (2549) ศึกษาพบว่าต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องคำผักปราบ (*Dendrobium ochreatum* Lindl.) ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร VW (1949) ที่เติม TDZ ร่วมกับ 2, 4-D สามารถส่งเสริมให้ต้นอ่อนมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาที่ดีและมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

วัสดุปลูกต่ออัตราการรอดชีวิตของกล้วยไม้

การย้ายต้นอ่อนออกปลูกในสภาวะแวดล้อมภายนอกนับว่าเป็นเรื่องที่สำคัญ ซึ่งการย้ายปลูกนั้นต้องคำนึงถึงปัจจัยภายนอกหลายประการเพื่อให้ต้นพืชที่ย้ายออกปลูกสามารถมีชีวิตรอดและมีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งปัจจัยต่างๆ ที่ควรคำนึงถึงในการย้ายปลูก คือ วัสดุปลูกที่เหมาะสม คุณสมบัติของวัสดุปลูกที่เลือก ต้องมีลักษณะที่สามารถเก็บความชื้นได้ดี และสะสมธาตุอาหารที่กล้วยไม้จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และเครื่องปลูกที่ใช้จะต้องระบายน้ำได้ดี ถ่ายเทอากาศได้ดี (ครรชิต ธรรมศิริ, 2535) ดังนั้นการเลือกใช้วัสดุปลูกจึงต้องคำนึงถึงความเหมาะสมของกล้วยไม้ที่นำมาศึกษาและต้องเลือกใช้วัสดุปลูกที่เหมาะสมกับประเภทของกล้วยไม้ที่ปลูก เช่น กล้วยไม้อิงอาศัย (epiphytic orchid) กล้วยไม้ดิน (terrestrial orchid) กล้วยไม้กินซาก (saprophytic orchid) เป็นต้น และวัสดุปลูกที่นำมาใช้ควรมีราคาอยู่ในระดับที่เหมาะสมด้วย (ระพี สาคริก, 2530) ซึ่งวัสดุปลูกที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ

1. กาบมะพร้าว (coconut husk) จะเป็นวัสดุปลูกที่นิยมนำมาใช้ในการปลูกกันอย่างแพร่หลาย โดยกาบมะพร้าวเป็นวัสดุปลูกที่มีอายุการใช้งานที่ค่อนข้างนาน สามารถหาได้ง่าย และมีราคาถูก ซึ่งกาบมะพร้าวที่นำมาใช้ต้องเป็นกาบมะพร้าวแห้งที่มีเปลือกอัดตามยาวลงในเครื่องปลูก ตัดหน้าให้เรียบอาจใช้แปรงลวดปัดหน้าให้เป็นขนเพื่อให้กาบมะพร้าวสามารถดูดซับน้ำได้ดีขึ้น ควรแช่น้ำก่อนนำไปใช้ในการปลูกเพราะกาบมะพร้าวใหม่จะไม่มีแทนนิน (tannin) และเกลือซึ่งเป็นอันตรายต่อรากกล้วยไม้ และแช่สารป้องกันเชื้อราและป้องกันโรคที่อาจจะตามมาหลังจากที่ปลูกเลี้ยง (Withner, 1959)

2. สแฟกนัมมอส (sphagnum moss) จะเป็นวัสดุปลูกที่สามารถเก็บความชื้นได้ดี ซึ่งไม่เหมาะที่จะใช้มอสเป็นวัสดุปลูกกล้วยไม้เพราะจะทำให้รากกล้วยไม้เน่าและจะทำให้เครื่องปลูกแฉะมากโดยจะส่งผลให้กล้วยไม้เน่าเร็วขึ้น และนอกจากนี้สแฟกนัมมอสมีราคาค่อนข้างแพง (ระพี สาคริก, 2530)

3. ดิน เป็นวัสดุปลูกที่นิยมนำมาใช้เป็นส่วนผสมในการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ดิน ซึ่งดินจะมีคุณสมบัติช่วยรักษาความชื้นของรากกล้วยไม้ดิน และทำให้รากสามารถแตกใหม่ได้อย่างรวดเร็ว เพราะในดินมีแร่ธาตุที่จำเป็น และยังเป็นแหล่งอาศัยของเชื้อรา (mycorrhiza) ที่อาศัยอยู่บริเวณรากกล้วยไม้ (ระพี สาคริก, 2530)

4. ทราย เป็นส่วนผสมที่นำมาใช้ในการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ดิน ซึ่งทรายจะมีคุณสมบัติในการระบายน้ำได้ดี และทำให้รากกล้วยไม้แตกใหม่ได้ดี เพราะมีอากาศที่ถ่ายเทได้สะดวกไม่อุ้มน้ำ ลดปัญหาการเน่าของรากและลำต้น (อภิวัฒน์ หาญธนพงศ์ และพิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์, 2548)

5. ออสมันดา (osmunda หรือ osmundine fiber) เป็นวัสดุปลูกที่ได้มาจากเฟิร์น อยู่ในสกุลออสมันดา (*Osmunda* spp.) ซึ่งลักษณะของออสมันดามีลักษณะเป็นเส้นยาวแข็งแรง และมีสีน้ำตาลจนเกือบดำเมื่อจะนำไปปลูกจะต้องล้างน้ำให้สะอาด แล้วตัดตามความยาวที่ต้องการอัดตามยาวลงในกระถาง ซึ่งข้อดีของออสมันดาจะสามารถระบายน้ำได้ดี และถ่ายเทอากาศได้เป็นอย่างดีถึงแม้จะอัดแน่นก็ตาม และธาตุอาหารที่เป็นองค์ประกอบรากกล้วยไม้สามารถดูดไปใช้ประโยชน์ได้ มีน้ำหนักเบา เคลื่อนย้ายง่าย แต่ข้อเสียของออสมันดาคือ มีราคาค่อนข้างแพง หายาก ใช้งานยากเนื่องจากก่อนใช้จะต้องตัดตามความยาวที่ต้องการและจะต้องแช่น้ำก่อนนำไปปลูกซึ่งจะทำให้เสียเวลาพอสมควร โดยออสมันดาจะใช้ได้ดีกับกล้วยไม้รากอากาศ และกึ่งอากาศทุกชนิด (ไพบูลย์ ไพรีพ่ายฤทธิ์, 2521)

6. ถ่าน เป็นวัสดุปลูกที่นิยมนำมาใช้ปลูกในกล้วยไม้รากอากาศและรากกึ่งอากาศ เป็นวัสดุปลูกที่ได้จากการเผาไม้เนื้อแข็ง มีธาตุคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ ไม่มีแร่ธาตุอื่นๆ และถ่านจะมีน้ำหนักที่เบา ไม่ย่อยสลาย มีการระบายน้ำที่ดี แต่เมื่อก่อนนำไปใช้ต้องแช่น้ำ ส่วนข้อดีของถ่านคือมีราคาที่ไม่แพง หาซื้อง่ายและสะดวกในการให้ปุ๋ย ข้อคำนึงถ้ารากกล้วยไม้ที่นำมาปลูกมีขนาดเล็กควรใช้ถ่านที่มีขนาดเล็กด้วย (ครรชิต ธรรมศิริ, 2547)

7. โฟม เป็นวัสดุปลูกที่ถูกนำมาดัดแปลงเพื่อนำมาใช้ในการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ โดยดัดแปลงตัดให้มีขนาดเล็กใส่ลงในกระถาง สามารถใช้เป็นวัสดุปลูกแทนวัสดุปลูกชนิดอื่นๆ ซึ่งทำให้กล้วยไม้มีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกันจากการใช้วัสดุปลูกชนิดอื่นๆ ที่นำมาปลูกเลี้ยง โดยข้อดีของโฟมคือ จะมีน้ำหนักที่ค่อนข้างเบา ไม่อุ้มน้ำแต่ช่องว่างระหว่างโฟมสามารถเก็บความชื้นได้ดี มีความยืดหยุ่นสูง (อรพิน เสละคร, 2548)

8. เวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) เป็นวัสดุปลูกที่มีลักษณะเป็นแผ่นบางๆ คล้ายเกล็ดปลาซ้อนกันหลายๆ ชั้น ซึ่งเวอร์มิคูไลท์เป็นแร่ธาตุในกลุ่ม alumino-silicate ชนิดหนึ่ง ซึ่งการใช้เวอร์มิคูไลท์สิ่งที่ควรคำนึงและต้องปฏิบัติก่อนนำมาใช้เป็นวัสดุปลูกคือ จะต้องนำมาเผาที่อุณหภูมิ 760 องศาเซลเซียส เพื่อให้แผ่น alumino-silicate ที่ซ้อนทับกันขยายออก ซึ่งจะเรียกกระบวนการนี้ว่า exfoliation โดยแร่ที่ผ่านกระบวนการนี้แล้วจะมีความหนาแน่นรวมลดลงเหลือประมาณ 95-145 kg/m^3 ซึ่งจะสามารถอุ้มน้ำได้มากถึง 500 เปอร์เซ็นต์ (w/w) และเวอร์มิคูไลท์จะประกอบด้วยธาตุอาหารมากมาย เช่น โพแทสเซียม แมกนิเซียม และ แคลเซียม ที่พืชสามารถที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรง จึงเหมาะที่จะนำเวอร์มิคูไลท์มาใช้เป็นวัสดุปลูกกล้วยไม้หลายประเภท เช่น กล้วยไม้ดิน กล้วยไม้ที่ขึ้นตามลานหิน เป็นต้น

9. วัสดุปลูกอื่นๆ เช่น อิฐแตกหรือกระถางแตกก็สามารถนำมาใช้เป็นวัสดุในการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ได้เป็นอย่างดี ซึ่งจะมีคุณสมบัติในการเก็บความชื้นได้ดี และมีอายุการใช้งานที่ค่อนข้างยาวนาน หาง่าย ซึ่งจะเหมาะสมกับกล้วยไม้ลงแปลงและปลูกลงกระถางมากกว่าแขวนไว้บนราวเนื่องจากอิฐ และกระถางแตกจะมีน้ำหนักที่ค่อนข้างมาก (ครรชิต ธรรมศิริ, 2541)

ในการศึกษาการออกปลูกของกล้วยไม้สิ่งที่ควรคำนึงถึงมากที่สุดคือวัสดุปลูก ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องเลือกใช้วัสดุปลูกที่เหมาะกับความต้องการของกล้วยไม้ โดยวัสดุปลูกแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันออกไป เช่น สามารถดูดซับน้ำและปุ๋ยได้ดี โดยจะทำให้กล้วยไม้สามารถดูดและนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างเต็มที่ ส่งผลให้กล้วยไม้มีการเจริญเติบโตที่ดี และมีการพัฒนาได้อย่างรวดเร็ว (อรพิน เสละคร, 2548)

อภิวัฒน์ หาญธนพงศ์ และพิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์ (2548) ศึกษาผลของเครื่องปลูกต่อการเติบโตและการออกดอกของเอื้องดินใบหมาก โดยมีวัสดุที่นำมาใช้ในการทดลองทั้งหมด 9 สูตร จากการทดลองพบว่า เครื่องปลูก ทราย + กาบมะพร้าวสับ + ดิน (1:1:1) ทราย + ดิน + ใบไม้ผุ (1:1:1) กาบมะพร้าวสับ + เปลือกถั่ว + ถ่านแกลบ (1:1:1) กาบมะพร้าวสับ + ดิน + เปลือกถั่ว (1:1:1) และกาบมะพร้าวสับ + ดิน + เปลือกถั่ว + ทราย (1:1:1:1) เป็นเครื่องปลูกที่เหมาะสมต่อการปลูกเอื้องดินใบหมากอายุ 2 ปี เนื่องจากมีผลทำให้ต้นของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากมีการเจริญเติบโตที่ดี และสามารถออกดอกได้เร็วที่สุด

ศิวพร แก้วชุ่มชื่น และเฌอมาลย์ วงศ์ชาวจันทร์ (2553) ศึกษาผลของชนิดวัสดุปลูกต่อปริมาณ และคุณภาพรากของกล้วยไม้ดินใบหมากลูกผสม เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ทางเซลล์วิทยา โดยเปรียบเทียบวัสดุปลูก 5 ชนิด ในกล้วยไม้ดินใบหมากลูกผสม 'จุฬาลักษณ์' และลูกผสมสีเหลือง พบว่า ลูกผสมจุฬาลักษณ์ ที่ปลูกในขุยมะพร้าว เกิดรากมากที่สุด 8.40 ราก มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด แต่วัสดุปลูกที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ปลูกกล้วยไม้ดินเพื่อศึกษาทางเซลล์วิทยา ได้แก่ กาบมะพร้าวสับ ขุยมะพร้าว หรือพีทมอส เนื่องจากให้รากที่สะอาด และสมบูรณ์

สมิทธิ์ โพธิสวัสดิ์ (2547) ศึกษาผลของวัสดุปลูกต่ออัตราการรอดชีวิตของกล้วยไม้ดินลูกผสมในสกุล *Spahoglottis* พันธุ์ดอกสีม่วง เหลืองประแดง และพันธุ์ม่วงอ่อนฮอลแลนด์ จากการศึกษาพบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดหลังย้ายปลูกกล้วยไม้ดินลูกผสมพันธุ์ดอกสีม่วงอ่อนฮอลแลนด์ลงในขี้เถ้าแกลบเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดสูงที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อย้ายวัสดุปลูกและปลูกเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์ จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดลดลงเหลือเพียง 9.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ศุภสวัสดิ์ เรืองไพศาล (2548) ได้ศึกษาผลของวัสดุปลูกต่ออัตราการรอดชีวิตของกล้วยไม้ลูกผสมในสกุล *Spathoglottis* 7 สายพันธุ์ พบว่า ลูกผสมพันธุ์เหลืองปนม่วงผสมตัวเองม่วงครามก้านยาวผสมตัวเอง เหลืองพื้นเมืองผสมกับม่วงอ่อน และม่วงครามก้านยาวผสมกับเหลืองปนม่วง โดยใช้ดินผสมกับขี้เถ้าแกลบในอัตราส่วน 1:1 และลดการคายน้ำด้วยการนำไปใส่ถุงพลาสติกใสรัดปากถุงให้แน่น แล้วนำไปแขวนไว้ในโรงเรือนเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน มีอัตราการรอดชีวิตสูงสูด 100 เปอร์เซ็นต์

สราวุธ ชัยบุญเรือง (2547) ศึกษาผลของวัสดุปลูกต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้เอื้องครั่งสายสั้น และเอื้องนางชี โดยศึกษาวัสดุปลูกได้แก่ สแฟกนัมมอส และกาบมะพร้าว จากการศึกษาพบว่า การปลูกเอื้องครั่งสายสั้นด้วยวัสดุปลูกสแฟกนัมมอส จะส่งเสริมให้มีจำนวนลำลูกกล้วย เส้นผ่าศูนย์กลางลำลูกกล้วย ความยาวลำลูกกล้วย จำนวนใบ ความกว้างใบและความยาวใบมากกว่าต้นที่ปลูกด้วยกาบมะพร้าว และนอกจากนี้ต้นที่ปลูกโดยใช้สแฟกนัมมอสยังมีใบที่มีลักษณะสีเขียวเข้มกว่าต้นที่ปลูกด้วยกาบมะพร้าว

ไพสนธิ์ ชุ่มมงคล (2543) ที่ศึกษาวัสดุปลูกต่ออัตราการรอดชีวิตและการเกิดรากใหม่ของต้นอ่อนกล้วยไม้ป่า โดยใช้วัสดุปลูกที่แตกต่างกันคือ ใยมะพร้าว ออสมันดา กาบมะพร้าวสับละเอียด โดยจากการศึกษาพบว่า ต้นอ่อนกล้วยไม้ป่าที่ปลูกด้วยใยมะพร้าวสามารถพัฒนาเกิดรากได้เร็วที่สุด โดยมีจำนวนรากใหม่ จำนวนใบใหม่ และมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด ส่วนออสมันดามีผลทำให้ลำลูกกล้วยยืดยาวมากที่สุด ส่วนใยมะพร้าวและออสมันดามีผลทำให้รากกล้วยไม้ยาวมากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบวัสดุปลูกทั้ง 3 ชนิด จะมีจำนวนยอดที่เกิดใหม่ไม่แตกต่างกัน

ดีเอ็นเอในพืช

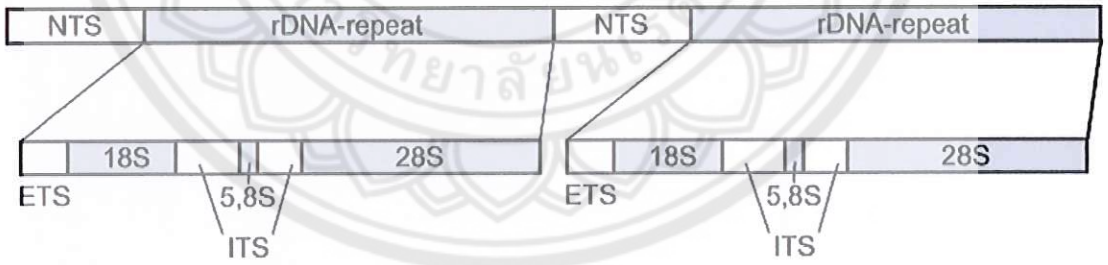
ดีเอ็นเอ (DNA : Deoxyribonucleic acid) เป็นสารพันธุกรรมที่กำหนดรหัสชีวิตของสิ่งมีชีวิต ความแตกต่างของการจัดเรียงตัวของเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ ได้แก่ อะดีนีน (adenine) กวอนีน (guanine) ไซโตซีน (cytosine) และ ไทมีน (thymine) นี่เองที่มีผลทำให้เกิดความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต พืชแต่ละชนิดหรือแต่ละสายพันธุ์จะมีรหัสพันธุกรรมที่เป็นเอกลักษณ์ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดหรือสายพันธุ์ได้ (สุรีพร เกตุงาม, 2546) โดยดีเอ็นเอในพืชสามารถพบได้จาก 3 แหล่ง นั่นคือ นิวเคลียส (nuclear DNA) ซึ่งถูกถ่ายทอดมาจากพ่อและแม่ (paternal Inheritance) ในคลอโรพลาสต์ (chloroplast DNA) และในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial DNA) ซึ่งถูกถ่ายทอดมาจากแม่เพียงฝ่ายเดียว (maternal Inheritance)

ดีเอ็นเอในนิวเคลียส

นิวเคลียส (nucleus) คือออแกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้มพบในเซลล์ยูคาริโอต ภายในบรรจุสารพันธุกรรม (genetic material) ซึ่งจัดเรียงตัวเป็นดีเอ็นเอ (DNA) สายยาวรวมตัวกับโปรตีนหลายชนิด เช่น ฮิสโตน (histone) เป็นโครโมโซม (chromosome) ยีน (gene) ต่างๆ ภายในโครโมโซมเหล่านี้ รวมเรียกว่า นิวเคลียสจีโนม (nuclear genome)

ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA)

สำหรับสิ่งมีชีวิตในกลุ่มโปรคาริโอต และยูคาริโอตนั้นจะมีไรโบโซมอลดีเอ็นเอขนาดไม่เท่ากัน โดยยูคาริโอตจะมีไรโบโซมขนาด 80S ซึ่งประกอบด้วย small subunit และ large subunit ขนาด 40S และ 60S ตามลำดับ สำหรับหน่วยย่อย 40S จะประกอบด้วย 18S rRNA รวมอยู่กับโปรตีน ดีเอ็นเอบริเวณนี้จะเป็นดีเอ็นเอส่วนที่ถูกถอดรหัส (coding region) ไรโบโซมอลดีเอ็นเอจะจัดเรียงตัวเป็นหน่วยซ้ำ (repeat unit) เป็นพันๆ หน่วยซ้ำ หน่วยซ้ำของไรโบโซมอลดีเอ็นเอแยกจากกันโดย intergenic spacer (IGS) แต่ละหน่วยซ้ำประกอบด้วยส่วนที่ถูกถอดรหัสจากดีเอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอ (transcribed region) เริ่มตั้งแต่ส่วน external transcribed spacer (ETS) ถัดมาเป็น small rDNA คือยีน 18S ต่อมาเป็น ITS1 (internal transcribed spacer) ยีน 5.8S ITS2 และสุดท้ายเป็นยีน 26S ซึ่งเป็น large rDNA (ภาพ 1)



ภาพ 1 โครงสร้างของไรโบโซมอลดีเอ็นเอในพืช

ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Ribosomal_DNA

ดีเอ็นเอบริเวณ ITS (internal transcribed spacer)

ดีเอ็นเอบริเวณนี้อยู่ระหว่างไรโบโซมอลดีเอ็นเอขนาด 18S 5.8S และ 26S ดีเอ็นบริเวณ ITS มีความยาวและลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่แน่นอนขึ้นกับชนิดของพืช ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 บริเวณ นั่นคือ

ITS1 และ ITS2 ซึ่งอยู่ระหว่าง 18S และ 5.8S กับ 5.8S และ 26S ตามลำดับ ITS1 และ ITS2 เป็นส่วนหนึ่งของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ถูกถอดรหัสเป็นไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอแต่ไม่ได้อยู่ในโครงสร้างของไรโบโซมที่เป็นส่วนหนึ่งของการสร้างโปรตีน ซึ่ง ITS1 และ ITS2 นั้นมีตำแหน่งอยู่บริเวณ upstream และ downstream ของยีน 5.8S rDNA ตามลำดับ สำหรับ external transcribed spacer ได้แก่ 3'ETS และ 5'ETS ซึ่งจะมีตำแหน่งอยู่ที่บริเวณ 3'end และ 5'end ของ 35S rDNA ตามลำดับ ความหลากหลายที่เกิดขึ้นของบริเวณ spacer เกิดจากในระหว่างการสังเคราะห์ rRNA นั้นจะมีกระบวนการ processing หรือการตกแต่งโมเลกุลของ premature rRNA ตรงบริเวณดังกล่าว เมื่อเปรียบเทียบกันเองระหว่างดีเอ็นเอในนิวเคลียร์จีโนม พบว่าดีเอ็นเอบริเวณ ITS นี้ถูกใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์มากที่สุด เนื่องจากมีบริเวณที่อนุรักษ์ จึงสามารถใช้เป็นตำแหน่งเกาะของ universal primer เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ได้ นอกจากนี้ดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ยังสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ง่าย และมีความยาวพอเหมาะในการนำไปหาลำดับเบส โดยทั่วไปแต่ละส่วนของ ITS1 และ ITS2 จะยาวไม่เกิน 300 คู่เบส และความยาวรวมของ ITS1 และ ITS2 รวมทั้ง 5.8S ประมาณ 600 - 700 คู่เบส (สุชาดา สุขหร่อง, 2553)

การตรวจแยกสายพันธุ์พืชโดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึงดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ที่ตำแหน่งหนึ่งๆ บนโครโมโซมหรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบได้ก็เนื่องจากความแปรผัน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอจึงทำให้เกิดความหลากหลาย (polymorphism) เกิดขึ้นนั่นเอง โดยวิธีตรวจสอบความหลากหลายของดีเอ็นเอดังกล่าวนี้ทำได้หลายวิธี เช่น การหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ การตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมนำมาใช้การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือความมีเสถียรภาพทางพันธุกรรม เช่น เครื่องหมาย Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Kishorand Devi, 2009) และเครื่องหมาย Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (ธนากร วงษศา, 2552) ส่วนการศึกษาของ Kishor, et al. (2009) ที่ได้รายงานผลการตรวจสอบเสถียรภาพทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ดินลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามสกุลระหว่าง *Vanda stangeana* กับ *Aerides vandarum* เมื่อมีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต โดยตรวจสอบจาก

ทั้งดีเอ็นเอในบริเวณนิวเคลียสบริเวณ ITS และดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ที่ยีนบริเวณ *mat*K และ *trn*L-F โดยใช้เทคนิค RAPD และ PCR-RFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิด ได้แก่ *Alu*I *Bgl*II *Dra*I *Eco*RI *Eco*RV *Hae*III *Hind*III *Pst*I และ *Taq*I โดยทั้ง 3 เทคนิคเป็นการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น พบว่า ลูกผสมที่เกิดขึ้นมีรูปแบบของดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวที่เหมือนกันทั้งหมดนั่นหมายความว่าลูกผสมที่เกิดขึ้นมีเสถียรภาพทางพันธุกรรมสูงแม้จะนำไปแยกขยายต่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายรุ่นก็ตามนอกจากเทคนิคดีเอ็นเอที่นำมาตรวจสอบลูกผสมในกล้วยไม้แล้วยังมีพืชชนิดอื่นๆ ที่มีการนำเทคนิคดีเอ็นเอเข้ามาช่วยในการตรวจสอบด้วย เช่น Songpanich and Hongtrakul (2010) ได้ทำการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของ Siam Blue Hardy ซึ่งเป็นลูกผสมบัวประดับระหว่างแม่สกุลย่อย *Nymphaea* และพ่อสกุลย่อย *Brachyceras* โดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ที่บริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Rsa*I *Mse*I และ *Alu*I พบว่าสามารถยืนยันความเป็นลูกผสมได้

Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP) เป็นลายพิมพ์ที่สร้างโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอเฉพาะตัว สามารถใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ โดยความหมายทั่วไปของลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดอาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism) จะหมายถึงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด แล้วผ่านขั้นตอนการไฮบริดไดเซชั่นกับโพรบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีก่อนวิเคราะห์ผลซึ่งลายพิมพ์ชนิดนี้มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ดังนั้นจึงมีการประยุกต์เป็นเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ซึ่งจะใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นในปริมาณน้อย ได้ผลรวดเร็ว ง่าย และปลอดภัยกว่า (สุชาดา สุขหร่อง, 2553)

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีอาศัยหลักความจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ การที่ดีเอ็นเอมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันแม้เพียงตัวเดียวก็เป็นตัวกำหนดได้ว่าเอนไซม์จะสามารถตัดได้หรือไม่ ความยาวของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดเป็นท่อนสามารถวิเคราะห์ความแตกต่างได้โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (สุชาดา สุขหร่อง, 2553)

นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ลูกผสม *Ophrys x Circlarium* ที่ได้จากธรรมชาติซึ่งเกิดจากการผสมข้ามชนิดระหว่าง *O. lutea x O. talentina* โดยวิธี PCR-RFLP โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่ง rDNA ITS (Pellegrino, et al. 2008) และมีรายงานการศึกษาวิเคราะห์สายสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่ กับลูกผสมของกล้วยไม้ *Pterygodium*

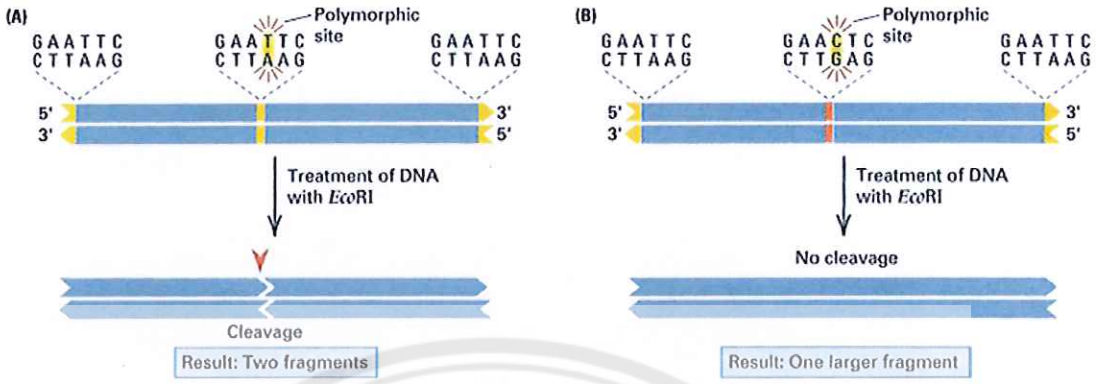
catholicum Sw. กับ *P. acutifolium* Lindl. ที่เกิดจากการผสมข้ามกันตามธรรมชาติ โดยใช้ข้อมูลจากยีน ITS ในนิวเคลียส (Steiner and Cruz, 2009) และจากการศึกษาจำนวนโครโมโซมของเอื้องดินใบหมาก (*Spathoglottis plicata* Blume) พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=40 (Kheawwongjun and Thammasiri, 2008) และเอื้องดินใบไผ่ (*Arundina graminifolia* (D. Don) Hoch.) มีจำนวนโครโมโซม 2n=40 (ทรงชัย แซ่ตั้ง, 2551)

Arpita, et al. (2012) ทำการตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของ *Hypericum perforatum* L. ที่ได้จากสภาพปลอดเชื้อโดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ด้วยเทคนิค RAPD ร่วมกับ PCR-RFLP ในบริเวณ nrITS ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Eco*RV *Cla*I และ *Hpa*II โดยเปรียบเทียบกับต้นแม่ พบว่าได้แถบดีเอ็นเอรูปแบบที่เหมือนกันเช่นกัน ดังนั้นจากผลการศึกษาเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าบริเวณ ITS สามารถเป็นบริเวณที่มีความเสถียรภาพที่สูง จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิคดังกล่าวได้

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)

เอนไซม์ตัดจำเพาะถูกพบครั้งแรกโดย Werner Arber โดยจะตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ภายในโมเลกุลของดีเอ็นเอตรงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะหรือบริเวณใกล้เคียง โดยปกติเอนไซม์ตัดจำเพาะจะพบในระบบย่อย และดัดแปลงดีเอ็นเอแปลกปลอมของแบคทีเรียบางชนิดมีหน้าที่จดจำและทำลายดีเอ็นเอแปลกปลอมโดยการตัดดีเอ็นเอนั้นให้เป็นชิ้นสั้นๆ แต่จะไม่ทำลายดีเอ็นเอของเซลล์ตนเอง ทั้งนี้เพราะเบสบางตัวตรงบริเวณจำเพาะซึ่งเป็นบริเวณจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะจะถูกเปลี่ยนแปลงไปโดยการเติมหมู่เมทิลด้วยเอนไซม์เมทิลเลสเป็นผลให้บริเวณนั้นไม่ใช่บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นๆ อีกต่อไป (จิตติมา เจริญพานิช, 2553)

เอนไซม์ตัดจำเพาะมีคุณสมบัติในการจดจำลำดับเบสของดีเอ็นเอ แล้วจึงตัดดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่จดจำนั้น (ภาพ 2) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนั้นๆ ภายในระยะเวลาที่เหมาะสม ดีเอ็นเอจะถูกย่อยเป็นชิ้น จากนั้นอาจนำชิ้นดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งเอนไซม์นี้มีลำดับเบสจดจำได้ตั้งแต่ 4 - 8 คู่เบส แต่โดยทั่วไปนิยมใช้เอนไซม์ที่มีลำดับเบสจดจำขนาด 4 และ 6 คู่เบส เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีลำดับเบสจดจำขนาด 4 คู่เบส มีโอกาสที่จะตัดดีเอ็นเอได้มากกว่า โดยจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ 4^4 หรือ 256 คู่เบส ในขณะที่เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีลำดับเบสจดจำขนาด 6 คู่เบส มีโอกาสที่จะตัดดีเอ็นเอได้น้อยกว่า โดยตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ 4^6 หรือ 4,096 คู่เบส



ภาพ 2 ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI A คือดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ และ B คือดีเอ็นเอที่ไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์

นอกจากนี้ลำดับของการใส่สารลงในปฏิกิริยาก็มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน ถ้าอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสม โอกาสที่จะเสียสภาพก่อนที่จะทำปฏิกิริยามีสูงมาก (สุชาดา สุขหร่อง, 2553) ดังนั้นจึงควรใส่ น้ำ บัฟเฟอร์ และดีเอ็นเอ จากนั้นจึงผสมให้เข้ากันโดยการใช้นิ้วดีดเบาๆ แล้วจึงเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะสุดท้าย เพราะขณะนั้นในหลอดมีสภาวะที่เหมาะสมแล้ว นอกจากนี้ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างในปฏิกิริยา โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์ตัดจำเพาะหมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ตัดดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมในปริมาตร 50 ไมโครลิตรได้หมดภายในเวลา 1 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ดังนั้นถ้าเพิ่มจำนวนยูนิตของเอนไซม์ ระยะเวลาในการบ่มก็จะลดลงด้วย ในทางปฏิบัติมักใช้เอนไซม์ในปริมาณมากเกินพอในการย่อยดีเอ็นเอเพื่อให้สามารถตัดได้หมด (สุชาดา สุขหร่อง, 2553)

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสอิเล็กโทรโฟริซิส

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสเป็นการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอผ่านเจลอะกาโรสภายใต้สนามไฟฟ้า ใช้ในการตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในช่วง 100 - 10,000 คู่เบส ได้ดี อะกาโรสเจลในความเข้มข้นที่ต่างกันเหมาะในการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน ความเข้มข้นของเจลต่ำเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ เช่น จีโนมิกดีเอ็นเอ ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของเจลเป็น 1.2 - 2 เปอร์เซ็นต์ เหมาะที่ใช้ในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอในงานลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั่วไป เช่น RAPD PCR-RFLP แต่ถ้าเจลมีความเข้มข้นต่ำกว่า 0.6 เปอร์เซ็นต์ จะนิ่มและยากต่อการใช้งาน (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)