บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว อยู่ในวงศ์ Orchidaceae หรือวงศ์กล้วยไม้ ปัจจุบันพบแล้วทั่วโลกมากกว่า 800 สกุล (Genera) จำนวน 25,000 ชนิด และพันธุ์ลูกผสมที่ได้จดทะเบียนไว้แล้วไม่น้อยกว่า 30,000 ชนิด (ครรชิต ธรรมศิริ, 2541) ประเทศไทยเป็นแหล่งกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก มีกล้วยไม้พันธุ์พื้นเมืองที่ถูกค้นพบและตรวจสอบรายชื่อถูกต้องแล้วถึงปี พ.ศ. 2543 อยู่ 177 สกุล จำนวน 1,125 ชนิด (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2543)

ราก

รากของกล้วยไม้ไม่มีระบบรากแก้ว มีเฉพาะรากฝอยจำนวนมากทั้งขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ โดยเจริญจากส่วนที่เป็นข้อของลำต้นหรือเหง้า บางชนิดเจริญจากหัวสะสมอาหารใต้ดิน มีทั้งที่เป็นรากดินและรากอากาศ

สำหรับกล้วยไม้ดินหลายชนิดมักปรากฏรากขนอ่อนที่ส่วนปลายราก ทำหน้าที่ดูดสารอาหารโดยชอนไชไปตามเศษใบไม้ผุ เช่น สกุลว่านนกคุ้ม (*Anoectochilus*) ขาวลออ (*Goodyera*) เอื้องผักปราบ (*Herpysma*) เป็นต้น ดังนั้นจึงพบกล้วยไม้เหล่านี้ในบริเวณที่มีความชื้นสูง รากอีกชนิดหนึ่งคือรากอากาศ เป็นรากที่มีชั้นของเนื้อเยื่อผิว (epidermis) หลายชั้นที่มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ ส่วนที่หุ้มปลายราก เรียกว่า วีลาเมน (velamen) ทำหน้าที่ป้องกันน้ำระเหยออกจากรากและเก็บความชื้นให้กับราก เช่น รากของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) ฟ้ามุ่ย (*Vanda*) (สลิล สิทธิสัจจธรรม, 2550)

ลำต้นหรือลำลูกกล้วย

ลำต้นของกล้วยไม้มีความแตกต่างกันหลายแบบขึ้นกับพันธุ์และสภาพแวดล้อมที่กล้วยไม้ขึ้นอาศัย สามารถจำแนกลำต้นกล้วยไม้ออกเป็น 2 ประเภท คือลำต้นแท้ และลำต้นเทียม ลำต้นแท้คือลำต้นที่มีข้อปล้องเหมือนลำต้นของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทั่วไป ส่วนเหนือข้อจะมีตาที่สามารถเจริญเป็นหน่อใหม่หรือช่อดอกได้ ลำต้นกล้วยไม้ประเภทนี้ เป็นลำต้นของกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตออกไปทางยอดเรื่อยๆ เช่น กล้วยไม้สกุลแวนด้า (*Vanda*) และสกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum*) เป็นต้น ส่วนลำต้นเทียมหรือลำลูกกล้วยหรือหัวเทียม (pseudobulb) เป็นส่วนที่ทำหน้าที่สะสมอาหารไม่ใช่ลำต้นแท้ ตาที่อยู่ตามข้อบนของลำลูกกล้วยสามารถแตกเป็นหน่อหรือช่อดอกได้ ลำต้นแท้จริงของกล้วยไม้ประเภทนี้คือ เหง้า (rhizome) ซึ่งเจริญในแนวนอนไปตามผิวของเปลือกไม้ ลักษณะของเหง้าจะมีข้อและปล้องค่อนข้างถี่ กล้วยไม้ที่มีลำต้นลักษณะนี้ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวาย

(*Dendrobium*) สกุลแคทลียา (*Cattleya*) และสกุลออนซิเดียม (*Oncidium*) (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2543)

ใบ

กล้วยไม้มีใบเดี่ยวทั้งหมด และใช้เป็นเกณฑ์หนึ่งในการจำแนกกล้วยไม้ ทั้งจำนวนใบ การเรียงตัว ขนาด รูปทรง ลวดลาย และอายุของใบ รวมไปถึงการคลี่ออกของใบ

ขนาดใบ กล้วยไม้แต่ละชนิดมีขนาดใบแตกต่างกัน ตั้งแต่ขนาดเล็ก เช่น เบี้ยไม้ใบขน (*Trichotosia dasyphylla*) ไปจนถึงขนาดใหญ่อย่างใบของพลูช้าง (*Vanilla siamensis*) อีกทั้งกล้วยไม้ชนิดเดียวกันยังมีขนาดใบแตกต่างกันตามแต่ละภูมิภาคหรือตามความสมบูรณ์ของแต่ละปี

จำนวนใบ กล้วยไม้ส่วนมากมักมีใบมากกว่า 1 ใบ บางชนิดมีหลายสิบใบ เช่น กล้วยไม้ในสกุลหวาย แต่หลายชนิดมีเพียงใบเดียว ซึ่งมักพบในกล้วยไม้ดินที่มีหัวแบบมันฝรั่ง เช่น สกุลอั้วเชียงดาว (*Amitostigma*) และสิรินธรเนีย (*Sirindhornia*)

รูปทรงของใบ กล้วยไม้แต่ละสกุลมีรูปใบแตกต่างกันอย่างชัดเจน มีทั้งใบรูปกลม รูปรี รูปไข่ รูปใบหอก รูปขอบขนาน รูปแถบ รูปหัวใจ ปลายใบมีทั้งปลายมน ปลายแหลม ปลายเรียวแหลม ปลายติ่งแหลม ปลายตัด ปลายเว้า ปลายเป็นแฉกหนาม เป็นต้น ส่วนลักษณะโคนใบที่พบมี 2 แบบ คือ โคนใบที่เป็นก้านแข็งและโคนใบที่เป็นแผ่นกาบ อย่างไรก็ตามรูปแบบใบของกล้วยไม้แต่ละชนิดในสกุลเดียวกันมักมีลักษณะที่คล้ายกันมาก จึงไม่ควรใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกชนิด โดยเฉพาะในกลุ่มกล้วยไม้สกุลใหญ่บางสกุล เช่น สกุลหวาย (*Dendrobium*) และสกุลสิงโตกลอกตา (*Bulbophyllum*)

ลวดลายบนแผ่นใบ เป็นลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่งซึ่งพบในกล้วยไม้ดินเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น บางชนิดเป็นลายร่างแหสีเข้ม แต่บางชนิดลายร่างแหมีสีสันสวยงาม จนมักเรียกกล้วยไม้กลุ่มนี้ว่า “กล้วยไม้อัญมณี” หรือที่เรียกว่า “Jewel Orchid” เช่น สกุลว่านน้ำทองและสกุลว่านนกคุ้ม

การม้วนของใบ เป็นลักษณะของใบอ่อนมี 3 แบบ คือ การม้วนตามแนวยาว (convolute) คือใบมีการม้วนคล้ายกับใบอ่อนของกล้วย ซึ่งเป็นลักษณะที่พบเป็นส่วนมากในกล้วยไม้ดินเกือบทุกชนิด เช่น สกุลนางอั้ว (*Habenaria*) ลักษณะที่สองคือ การพับตามแนวยาว (duplicate) คือแผ่นใบสองข้างพับประกบเข้าหากันตามแนวเส้นกลางใบ พบในกล้วยไม้อิงอาศัยเกือบทุกชนิด เช่น สกุลหวาย (*Dendrobium*) สิงโตกลอกตา (*Bulbophyllum*) หญ้าจิ้มฟันควาย (*Arundina*) สกุลเอื้องตีนจก (*Acampe*) และสกุลเข็ม (*Ascocentrum*) อีกลักษณะหนึ่งคือ การพับจีบตามยาว (plicate) คือแผ่นใบที่ซ้อนพับกันตามแนวยาวตลอดทั้งใบ เช่น สกุลเอื้องน้ำต้น (*Calanthe*)

ดอก

ดอกกล้วยไม้มีทั้งชนิดที่เป็นดอกเดี่ยวและออกดอกเป็นช่อ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่สุดที่ใช้ในการจัดจำแนกกล้วยไม้ สำหรับลักษณะของดอกมีดังนี้

ดอกเดี่ยว (Solitary) มักออกจากโคนของลำลูกกล้วยหรือที่เหง้าทอดเลื้อย และมีเพียงดอกเดี่ยวอยู่ที่ปลายก้านดอก ก้านดอกสั้นหรือยาว ผอมหรืออ้วน เช่น เอื้องนกกระจิบ (*Trias nasuta*) สิงโตงาม (*Bulbophyllum affine*) เป็นต้น และมีเพียงบางชนิดที่ออกเพียงส่วนปลายลำต้น เช่น กล้วยไม้สกุลเอื้องรงรอง (*Panisea*)

ช่อดอก (inflorescence) แต่ละช่อประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ก้านช่อดอก ทำหน้าที่ผยุงช่อให้ตั้งตรงและยึดช่อให้ติดกับส่วนของลำต้น ส่วนที่สองคือแกนช่อ เป็นส่วนที่ดอกเรียงอยู่บนช่อ มีทั้งแกนเดียวหรือมากกว่า 1 แกน ส่วนที่สามคือดอก อาจเรียงชิดกันแน่น มีจำนวนดอกมากมาย เช่น เอื้องเสือแผ้ว (*Pomatocalpa naevata*) หรือมีจำนวนดอกเพียง 1-2 ดอก เช่น รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor*) สำหรับช่อดอกที่พบในกล้วยไม้มีทั้งช่อสั้นหรือยาว ผอมหรืออวบ และตั้งตรงหรือห้อยย้อยลง

ตำแหน่งของดอกและช่อดอก ดอกและช่อดอกออกที่ปลายลำต้น (terminal inflorescence) มักพบในกล้วยไม้ที่มีการเจริญด้านข้าง มีลำต้นแบบทอดชูยอด และลำต้นเป็นหัวแบบมันฝรั่ง โดยช่อดอกปรากฏที่ปลายยอด เช่น สกุลท้าวคูลู (*Brachycorythis*) ลิ้นมังกร (*Babenaria*) นางตายตัวผู้ (*Peristylus*) และว่านน้ำทอง (*Ludisia*) ดอกและช่อดอกออกด้านข้างลำต้น (lateral inflorescence) พบทั้งในกล้วยไม้ที่มีการเจริญด้านข้างและปลายยอด ทั้งในกล้วยไม้ดินและอิงอาศัย โดยมีช่อดอกออกตามข้อด้านข้างของหัวหรือลำต้น เช่น สกุลหวาย (*Dendrobium*) เอื้องนิ่ม (*Eria*) ช้าง (*Rhynchostylis*) และฟ้ามุ่ย (*Vanda*) ดอกและช่อดอกออกที่โคนลำต้น (basal inflorescence) พบในกล้วยไม้ที่มีการเจริญด้านข้าง โดยเฉพาะสกุลกล้วยไม้ในเผ่าย่อยสิงโต (Subtribe Bulbophyllinae) โดยก้านดอกหรือก้านช่อดอกแทงจากโคนของลำลูกกล้วย เช่น สกุลสิงโตบางชนิด (*Bulbophyllum*) ดอกทับทิมสยาม (*Drymoda*) สิงโตช้อนทอง (*Rhytionanthos*) และเพชรพระอินทร์ (*Trias*)

ส่วนต่างๆ ของดอก

กล้วยไม้มีดอกที่สมมาตรทางด้านข้าง (lateral symmetry) คือลักษณะเหมือนกันทั้งด้านขวาและด้านซ้าย มีรังไข่อยู่ใต้วงกลีบ (inferior ovary) โดยเชื่อมต่อกับส่วนที่เป็นก้าน มีทั้งที่สามารถแยกส่วนได้ชัดเจนและไม่ชัดเจน มักเรียกรวมกันว่าส่วนของก้านดอกและรังไข่ ภายในรังไข่มักมีช่องเพียง 1 ช่อง และมีการเรียงตัวของออวุลตามแนวตะเข็บ (parietal placentation) สำหรับส่วนประกอบอื่นๆ ที่สำคัญได้แก่

กลีบเลี้ยง (sepal) มี 3 กลีบ แยกออกเป็นกลีบเลี้ยงบน (dorsal sepal) 1 กลีบและกลีบเลี้ยง คู่ข้าง (lateral sepal) ที่มีขนาดและรูปทรงเหมือนกันอีก 2 กลีบ ทั้งสามกลีบมักมีขนาดและรูปทรงแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย บางชนิดมีรูปร่างต่างกันมาก เช่น สิงโตพายทอง (*Bulbophyllum wallichii*) ซึ่งมีกลีบเลี้ยงคู่ข้างใหญ่กว่ากลีบเลี้ยงบนหลายเท่า บางชนิดกลีบเลี้ยงบนใหญ่กว่ากลีบเลี้ยงคู่ข้าง แต่พบเพียงไม่กี่ชนิด เช่น สิงโตนางรำ (*Bulbophyllum monanthum*) บางชนิดมีกลีบเลี้ยงคู่ข้างเชื่อมกันทั้งสองด้านจนเป็นหลอด เช่น สิงโตช้อนทอง (*Rhytionanthos spathulatum*) หรือ

เชื่อมติดเป็นแผ่นเดียวกัน (synsepalous) ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี นอกจากนี้กล้วยไม้หลายชนิดมักมีขนปกคลุมบนกลีบเลี้ยงแบบต่างๆ ทั้งขนหยาบแข็งจนถึงขนละเอียดและนุ่ม

กลีบดอก (petal) อยู่ด้านในถัดจากวงกลีบเลี้ยง มี 3 กลีบ ประกอบด้วยกลีบดอกคู่ข้างที่มีขนาดและรูปทรงเหมือนกัน 2 กลีบ และมักมีขนาดเล็กกว่ากลีบเลี้ยง แต่บางชนิดกลีบดอกมีขนาดใหญ่กว่ากลีบเลี้ยง เช่น พัดนางชี (*Oberonia latipetala*) ส่วนกลีบดอกอีก 1 กลีบที่เรียกว่า กลีบปาก (lip หรือ labellum) ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของพืชวงศ์กล้วยไม้ โดยมีวิวัฒนาการแตกต่างจากกลีบอื่นทั้งขนาดและรูปทรง อาจมีขนาดเล็กหรือใหญ่กว่าและมีรูปทรงหลากหลาย บางครั้งเป็นแฉก บางชนิดกลีบปากมีสัน ตุ่มหรือขน หรือมีรูปทรงแปลก เช่น สกุลว่านนกคุ้ม (*Anoectochilus*) บางชนิดขอบกลีบหยักเป็นฟัน บิดเป็นคลื่นหรือหยักเป็นฝอย หรือมีเดือยกลีบดอกที่มีขนาดและรูปทรงแตกต่างกัน

เส้าเกสร (column หรือ gynandrium) เป็นส่วนของก้านเกสรเพศผู้และเพศเมียที่เชื่อมเป็นก้านเดียวกันอยู่ใจกลางของดอก ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของพืชวงศ์กล้วยไม้อีกลักษณะหนึ่ง ทำหน้าที่ชูอับเรณูของเกสรเพศผู้และยอดเกสรเพศเมีย มักเป็นรูปทรงกระบอกอ้วนสั้น หรือเรียวยาว หลายชนิดมีรยางค์เขี้ยวยื่นยาวอยู่ที่ปลายเส้าเกสร ซึ่งเป็นลักษณะเด่นในกลุ่มสิงโตรวงข้าวของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตา (*Bulbophyllum*)

ฝาครอบกลุ่มเรณู (operculum หรือ anther cap) มีรูปทรงคล้ายหมวกรูปกลมหรือรูปหยดน้ำ ภายในฝาครอบแบ่งเป็น 2 ช่อง ผิวของฝาครอบมักเรียบหรือขรุขระ บางสกุลเป็นเดือยรูปทรงกระบอก เช่น สกุลเพชรพระอินทร์ (*Trias*) บางสกุลฝาครอบเป็นเขาสั้นๆ อยู่ที่มุม เช่น สกุลซ่อนแอบ (*Nephelaphyllum*) ขณะที่กล้วยไม้ในวงศ์ย่อย Orchidoideae ไม่มีฝาครอบกลุ่มเรณู

เกสรเพศผู้ (stamen) มีจำนวน 1-3 อัน ละอองเรณูของกล้วยไม้มีลักษณะเป็นกลุ่ม (pollinium) จำนวน 2-8 กลุ่ม หรือกลุ่มเรณูเป็นกลุ่มคล้ายผงแป้ง ประกอบด้วยกลุ่มเรณูย่อยจำนวนมากอัดกันแน่น บางชนิดมีกลุ่มเรณูเป็นก้อนแข็ง พบในกล้วยไม้สกุลแวนดา (Tribe Vandeae) นอกจากนี้กลุ่มเรณูยังประกอบด้วยส่วนอื่นๆ เช่น ก้านกลุ่มเรณู (stipe หรือ caudicle) ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นหรือแถบติดอยู่กับกลุ่มเรณู

เกสรเพศเมีย (pistil) ตำแหน่งของยอดเกสรเพศเมีย (stigma) อยู่ภายในโพรงบริเวณด้านหน้าของเส้าเกสรและด้านล่างของเกสรเพศผู้ ที่มักเรียกว่า “แอ่งเกสรเพศเมีย”

ฝักและเมล็ด (pod หรือ seed) มีขนาดและรูปทรงต่างกันมาก หลายชนิดมีฝักยาว เช่น สกุลเอื้องตะขาบ บางชนิดมีรูปร่างกลมโต เช่น สกุลหวาย เมื่อฝักแก่เต็มที่จะแตกตามแนวตะเข็บทั้งสามแนว ในกล้วยไม้กินซากบางชนิดเมื่อฝักแก่ ส่วนของก้านดอกหรือก้านฝักจะเจริญพุ่งขึ้นอย่างรวดเร็วเพื่อให้เมล็ดแพร่กระจายพันธุ์ได้ดีขึ้น เช่น กล้วยส้มสยาม (*Didymoplexiella siamensis*) ส่วนเมล็ดจะมีขนาดเล็กมากคล้ายฝุ่น (dust seed) และมีจำนวนมากมายมหาศาลกว่าล้านเมล็ด

ภายในเมล็ดไม่มีส่วนที่เป็นเอนโดสเปิร์มหรือส่วนที่พัฒนาไปเป็นใบเลี้ยง มีเพียงเปลือกบางๆ 1-2 ชั้น ที่มีเอมบริโออยู่ภายใน (สลิล สิทธิสัจจธรรม, 2550)

การจำแนกกล้วยไม้

เนื่องจากกล้วยไม้มีความหลากหลายของชนิดดังที่ได้กล่าวมาแล้ว จึงสามารถจำแนกกล้วยไม้ตามลักษณะต่างๆ ได้ดังนี้

การจำแนกตามลักษณะการอาศัย

กล้วยไม้อิงอาศัย (epiphytic orchid) เป็นกล้วยไม้ที่อาศัยบนไม้ยืนต้นโดยมีรากช่วยในการยึดเกาะให้ติดแน่นและยังสามารถหาอาหารมาเลี้ยงลำต้นอีกด้วย กล้วยไม้กลุ่มนี้มีจำนวนชนิดมากที่สุดที่พบในประเทศไทย เช่น สกุลฟ้ามุ่ย สกุลเอื้องกุหลาบ สกุลสิงโตกลอกตา สกุลหวาย เป็นต้น

กล้วยไม้ดิน (terrestrial orchid) เป็นกล้วยไม้ที่มีรากหรือส่วนของลำต้นอาศัยที่ผิวหน้าดินหรือใต้ผิวดินที่เรียกว่า “ลำต้นใต้ดิน” หลายชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ทุกฤดูกาล เช่น ว่านน้ำทอง ว่านนกฮูม มักพบกล้วยไม้เหล่านี้ในป่าดงดิบ หลายชนิดมีการพักตัวในฤดูกาลที่ไม่เหมาะสมโดยเหลือเพียงลำต้นใต้ดินเท่านั้น เช่น สกุลลิ้นมังกร สกุลท้าวคูลู สกุลว่านอึ่ง สกุลบัวสันโดษ เป็นต้น กล้วยไม้กลุ่มนี้มีจำนวนชนิดรองลงมาจากกลุ่มกล้วยไม้อิงอาศัย

กล้วยไม้อาศัยบนหิน (lithophytic orchid) เป็นกลุ่มกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตและขยายเผ่าพันธุ์ได้โดยอาศัยอยู่บนหินแทนการยึดเกาะบนดินหรือต้นไม้ มักพบอยู่ใกล้กับมอสและไลเคน กล้วยไม้กลุ่มนี้ เช่น ม้าวิ่ง และเอื้องคำหิน เป็นต้น

การจำแนกตามลักษณะการเจริญเติบโต

การเจริญเติบโตทางปลายยอด (monopodial vegetative) เป็นลักษณะการเจริญเติบโตของส่วนยอดที่ไม่จำกัดคือ มีเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่สามารถเจริญได้อย่างไม่สิ้นสุด ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นก็สามารถเจริญได้อย่างไม่สิ้นสุดเช่นกัน กล้วยไม้ที่มีลักษณะการเจริญเติบโตเช่นนี้ เช่น สกุลฟ้ามุ่ย สกุลช้าง สกุลเข็ม เป็นต้น

การเจริญเติบโตทางด้านข้างของลำต้น (sympodial vegetative) เป็นลักษณะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีอยู่อย่างจำกัด แต่สร้างเนื้อเยื่อเจริญใหม่จากจุดเจริญที่ด้านข้างของลำต้น และจะสร้างยอดใหม่ในช่วงฤดูกาลที่เหมาะสมเท่านั้น ต้นที่สร้างขึ้นมาใหม่อาจเกิดชิดกับลำต้นหรือลำลูกกล้วยเดิม ทำให้มีลักษณะเป็นกอแน่น เช่น กล้วยไม้สกุลกะเรกะร่อน สกุลหวาย เป็นต้น หรืออาจสร้างห่างกันบนเหง้าที่ทอดยาว ทำให้กล้วยไม้มีลักษณะเป็นกอที่คล้ายสายโซ่ (Chain-like) เช่น กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตา สกุลเอื้องเทียน เป็นต้น

การจำแนกตามลักษณะการหาอาหาร

กล้วยไม้ที่สามารถสังเคราะห์อาหารได้ (autophytic orchid) เป็นกล้วยไม้กลุ่มใหญ่ที่พบในโลก เป็นกล้วยไม้ที่มีคลอโรฟิลล์ และสามารถสร้างอาหารเองได้จากการสังเคราะห์แสง

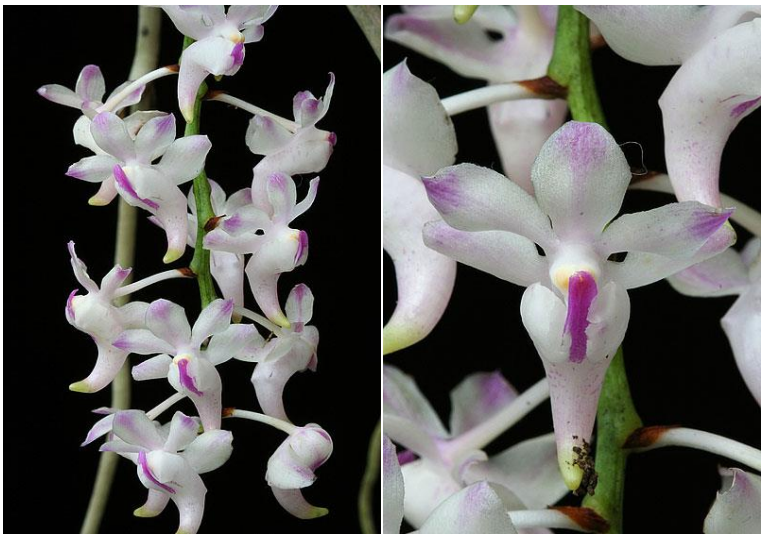
กล้วยไม้กินซาก (saprophytic orchid) เป็นกล้วยไม้กลุ่มเล็กที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้เนื่องจากไม่มีคลอโรฟิลล์ แต่จะอาศัยอาหารจากจุลินทรีย์บางชนิด และสามารถพบได้เฉพาะช่วงที่ออกดอกเท่านั้น กล้วยไม้ในกลุ่มนี้เช่น เอื้องแฝก กล้วยปลวก กล้วยส้มสยาม เป็นต้น (สลิล สิทธิสัจจธรรมและนฤมล กฤษณชาญดี, 2550)

กล้วยไม้ที่ใช้ในการศึกษา

กุหลาบกระเป๋าปิด (*Aerides odorata* Lour.)

กุหลาบกระเป๋าปิดเป็นกล้วยไม้ชนิดเดียวในสกุลกุหลาบที่ส่วนปลายปากแคบกว่าหู และทั้ง 2 ส่วนพับขึ้นมาปิดเส้าเกสรไว้ พบขึ้นอยู่ทุกภาคของประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบในประเทศลาว กัมพูชา เวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ พม่า อินเดีย เนปาล และภูฏาน

กุหลาบกระเป๋าปิดมีลำต้นบิดเป็นเกลียวเล็กน้อย ต้นห้อยย้อยลง มักแตกแขนงเป็นหลายยอด ต้นอาจยาวถึง 1 เมตรครึ่ง ใบยาวประประมาณ 15-25 เซนติเมตร กว้าง 2-3 เซนติเมตร เรียงสลับซ้ายขวา ปลายใบหยักไม่เท่ากัน ใบค่อนข้างบางไม่แข็งทื่อ ขอบใบบิดเล็กน้อย โคนใบหุ้มต้น ออกดอกประมาณเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม ช่อดอกยาวประมาณ 20-30 เซนติเมตรและห้อยลง แต่ละช่อมีประมาณ 30 ดอก แต่ละดอกกว้างประมาณ 3 เซนติเมตร กลีบดอกเป็นสีขาว ปลายกลีบเป็นสีม่วงอมแดงอ่อนๆ ส่วนปลายปากเป็นสีม่วง เดือยดอกโค้งงอนขึ้นคล้ายเขาดอกมีกลิ่นหอมเหมือนกลิ่นดอกกุหลาบและบานนานประมาณ 1-2 สัปดาห์



ภาพที่ 1 ลักษณะกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด (*Aerides odorata* Lour.)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อช่วยในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ให้สามารถเพิ่มจำนวนต้นได้ปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีความสามารถในการงอกตามธรรมชาติได้น้อยมาก เนื่องจากได้รับความชื้นไม่เพียงพอหรือได้รับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอื่นๆ เช่น อุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป อาหารสะสมภายในเมล็ดมีน้อยมากไม่เพียงพอต่อการงอกของเมล็ด Knudson (1992) เป็นคนแรกที่ค้นพบและประสบความสำเร็จในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในอาหารปลอดเชื้อซึ่งอยู่ภายในหลอดแก้ว (Arditti and Ernst, 1993) อาหารที่ใช้ประกอบด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเมล็ดกล้วยไม้โดยไม่ต้องอาศัยเชื้อรา และสามารถเพาะเมล็ดกล้วยไม้ให้งอกได้จำนวนมาก ทำให้การผสมพันธุ์กล้วยไม้เจริญก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้หลายชนิดสามารถเพาะได้ในอาหารสังเคราะห์ที่มีส่วนประกอบอาหารที่แตกต่างกันตามความเหมาะสมกับชนิดของกล้วยไม้ จึงต้องมีการวิจัยหาสูตรอาหารที่เหมาะสมกับกล้วยไม้สกุลต่างๆ การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เพื่อการขยายพันธุ์ ชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ส่วนใหญ่เป็นบริเวณที่มีเนื้อเยื่อเจริญของกล้วยไม้ ได้แก่ บริเวณปลายยอด ปลายราก ตาข้าง ใบอ่อน ตาที่ก้านช่อดอกอ่อน เป็นต้น มีรายงานการใช้ชิ้นส่วนพืชของกล้วยไม้แต่ละสกุลมาเพาะเลี้ยงและประสบความสำเร็จ เช่น กล้วยไม้สกุล *Doritaenopsis* และ *Phalaenopsis* ใช้ส่วนของตาดอกที่ก้านช่อดอก (Tokuhara and Mii, 1993) สกุล *Oncidium* จะใช้ส่วนของตาข้างและตายอดจากหน่ออ่อน (Arditti and Ernst, 1993) ใบอ่อน (Chen et al., 1999) และปลายราก (Chen and Chang, 2000) สกุล *Spathoglottis* ใช้ส่วนของปลายใบและตาที่ข้อ (Teng et al., 1997) สกุล *Dendrobium* ใช้ชิ้นส่วนของยอด (Nayak et al., 2002; Roy and Banerjee, 2002) ปลายราก (Huan et al., 2004) และสกุล *Vanda* ใช้ส่วนปลายยอด (Malabadi et al., 2004) เป็นต้น การนำชิ้นส่วนต่างๆ ข้างต้นมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีข้อดีหลายประการ คือสามารถคงลักษณะทางพันธุกรรมไว้ได้ในขณะที่การเพาะเมล็ดจากฝักนั้นส่วนใหญ่ลักษณะทางพันธุกรรมจะไม่คงตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเกิดจากการผสมข้ามต้น (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2541) นอกจากนี้ลักษณะของอาหารก็มีส่วนสำคัญต่อการเจริญของกล้วยไม้ เช่น โปรโทคอร์มกล้วยไม้ สามารถเจริญเติบโตรวดเร็วในอาหารเหลว เนื่องจากอาหารเหลวทำให้เนื้อเยื่อพืชกระจายตัวได้ดี สามารถสัมผัสกับอาหารได้ทุกส่วน จึงทำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชเจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว (Yang et al., 1999) แต่ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของกล้วยไม้บางชนิดก็สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีในอาหารแข็ง (ครรชิต, 2541)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในปัจจุบันมีหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีก็มีหลักการที่ใกล้เคียงกัน คือ การนำชิ้นส่วนใดๆ ของกล้วยไม้มาฟอกฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเพื่อขยายพันธุ์ตามที่ต้องการ แต่อาหารเพาะเลี้ยงบางสูตรก็อาจใช้ได้กว้างขวางครอบคลุมกล้วยไม้หลายชนิด หลายสกุล แต่บาง

สูตรอาจจะใช้ได้ดีเพียงบางสกุลหรือบางชนิดเท่านั้น ซึ่งกล้วยไม้แต่ละชนิดจะมีความต้องการธาตุอาหารและสภาพแวดล้อมที่เจริญและพัฒนาแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนของกล้วยไม้ที่นำมาศึกษาและวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงมีการพัฒนาสูตรอาหารต่างๆ เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของกล้วยไม้แต่ละชนิด ซึ่งสูตรอาหารแต่ละสูตรจะแตกต่างกันไปในส่วนขององค์ประกอบที่เป็นธาตุอาหารและองค์ประกอบของสูตรอาหารที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยประกอบด้วย สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ วิตามิน กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรท สารควบคุมการเจริญเติบโต หรือฮอร์โมนพืช น้ำ และวุ้น (ครรชิต ธรรมศิริ, 2541) สูตรอาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ เช่น สูตร Knudson (1946) สูตร Modified Vacin and Went (1949) สูตร Murashige and Skoog (1962) สูตร Murashige and Tucker medium และสูตร New Dogashima medium (Tokuhara and Mii, 1993) การนำชิ้นส่วนของต้นพืชมาเพาะเลี้ยง จำเป็นต้องใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมด้วย ซึ่งกลุ่มที่นิยมใช้ได้แก่ กลุ่มออกซิน (Auxins) และไซโตไคนิน (Cytokinins) เพื่อกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชเกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน พัฒนาเป็นเอมบริโอ โพรโทคอร์ม และเจริญเป็นต้นในที่สุด สารในกลุ่มออกซินที่นิยมนำมาใช้ในกล้วยไม้ ได้แก่ Naphthalene acetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), Indole-3-acetic acid (IAA) และ Indole-3-butyric acid (IBA) เป็นต้น ส่วนสารในกลุ่มไซโตไคนินได้แก่ Benzylaminopurine (BAP), 1-phenyl-3-(1,2,3-thaiadiazol-5-yl)-urea (TDZ) และ 6-furfurylaminopurine (Kinetin) เป็นต้น ความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินที่ใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชิ้นส่วนพืช และวัตถุประสงค์ของงานวิจัย ซึ่งสารในกลุ่มออกซินหากใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำจะมีผลในการกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชมีการแบ่งเซลล์มากขึ้นช่วยให้มีการสร้างรากหรือยอดใหม่เพิ่มขึ้น (Tokuhara and Mii, 1993) ส่วนสารในกลุ่มไซโตไคนินจะช่วยกระตุ้นให้เนื้อเยื่อขยายขนาดและเพิ่มจำนวนเซลล์ มีรายงานการวิจัยในกล้วยไม้สกุลกุหลาบโดย Sheelavanthmath et al. (2005) ได้นำส่วนของใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่แปรผันปริมาณ BA, TDZ และ Kinetin เพื่อชักนำให้เกิด Protocorm-like bodies (PLBs) พบว่า BA ความเข้มข้น 2 μM สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้เจริญเป็น PLBs ได้ดีกว่า TDZ และ Kinetin ที่ความเข้มข้นเดียวกัน Park et al. (2003) ได้ใช้ชิ้นส่วนรากของกล้วยไม้สกุล *Doritaenopsis* เพื่อชักนำให้เกิด PLBs โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่แปรผันปริมาณ BA, TDZ และ Zeatin จากการศึกษาพบว่า อาหารที่แปรผันปริมาณ TDZ มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ส่วนรากของกล้วยไม้เกิด PLBs ได้ดีกว่าการใช้ BA และ Zeatin

สาเหตุและความจำเป็นในการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้

ในปัจจุบันกล้วยไม้จำนวนมากหลายชนิดได้ถูกนำออกมาจากป่าเพื่อการค้า เพื่อปลูกไว้ดูเล่นและเพื่อการศึกษาวิจัย ซึ่งล้วนเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ประชากรกล้วยไม้ได้ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะกล้วยไม้ที่เป็นที่ต้องการของตลาด

กล้วยไม้หลายชนิดกำลังเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์เป็นผลมาจาก 2 สาเหตุใหญ่ๆ คือ 1. การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในระบบนิเวศวิทยาอันเนื่องมาจากธรรมชาติ การเปลี่ยนแปลงเนื่องมาจากธรรมชาติ เช่น ความผิดปกติของอุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝน น้ำท่วม ฝนแล้ง ฯลฯ ซึ่งเป็นสิ่งที่เราไม่สามารถคาดการณ์ และไม่สามารถควบคุมได้ และ 2. การเปลี่ยนแปลงโดยมนุษย์ มนุษย์จะเปลี่ยนแปลงแหล่งที่อยู่ (Habitat) ของกล้วยไม้หรือทำลายเพื่อนำพื้นที่ไปใช้ประโยชน์ นอกจากนี้มนุษย์ยังเก็บต้นกล้วยไม้ออกจากป่าเพื่อการค้า ทำให้กล้วยไม้ทุกชนิดลดจำนวนลงและอาจสูญพันธุ์ได้ในที่สุด พวกที่มีการกระจายตัวน้อย มีประชากรขนาดเล็ก อยู่เฉพาะพื้นที่มีโอกาสที่จะลดจำนวนและสูญพันธุ์ได้มากกว่า

แนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้

การอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ ชนิดของกล้วยไม้ สภาพแวดล้อม ความสะดวก และความสามารถในการดำเนินการ ซึ่งสามารถแบ่งวิธีการหลักได้ 2 วิธี คือ

1. การอนุรักษ์ในสภาพป่าหรือในแหล่งธรรมชาติ (*In situ* conservation) เป็นการเก็บพันธุ์กล้วยไม้ให้เจริญเติบโตอยู่ในสภาพธรรมชาติ ซึ่งเป็นวิธีอนุรักษ์ที่ดีที่สุดในการรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) แต่กระทำได้ยากในการที่จะรักษาสภาพเดิม ต้องมีการดูแลและวางแผนการจัดการเป็นอย่างดี และต้องร่วมมือกับกลุ่มอนุรักษ์พืชและสัตว์อื่น เพื่อการจัดการระบบนิเวศอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งส่วนใหญ่จะเก็บรักษาไว้ในวนอุทยานแห่งชาติ เขตป่าสงวนต่างๆ วิธีนี้ใช้ทั่วโลกน้อยกว่า 10% เนื่องจากขาดข้อมูลแหล่งนิเวศของกล้วยไม้แต่ละสกุลรวมไปถึงไม่สามารถควบคุมสภาพธรรมชาติในระยะยาวได้

2. การอนุรักษ์ในสภาพนอกแหล่งธรรมชาติ (*Ex situ* conservation) ส่วนใหญ่จะเก็บไว้ในสวนพฤกษศาสตร์ (Botanic gardens) หน่วยงานของกรมป่าไม้ ศูนย์วิจัยทางการเกษตร เรือนกล้วยไม้ของผู้ปลูกเป็นการค้าและผู้ปลูกสมัครเล่น

วิธีการเก็บรักษาในสภาพนอกแหล่งธรรมชาติทำได้ดังนี้

1. เก็บในรูปต้นที่มีชีวิต (Living collection) ปลูกและเลี้ยงในโรงเรือนที่มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ต้องมีการบำรุงดูแลรักษาที่ดี มีบุคลากรที่มีความรู้ความสนใจและอุทิศเวลา รวมทั้งงบประมาณที่พอเพียง จึงจะประสบความสำเร็จในการอนุรักษ์แบบนี้

2. เก็บในรูปเมล็ด (Seed storage, seed banks) การเก็บแบบนี้มีข้อดีหลายอย่างเมื่อเทียบกับการเก็บในรูปต้นที่มีชีวิต คือ ใช้พื้นที่น้อย

3. เก็บในรูปเรณู (Pollen banks) การเก็บเรณูรวมในรูปกลุ่มเรณู ทำได้ง่าย คือแกะเอากลุ่มเรณูออกจากฝาครอบแล้วนำไปใส่ในหลอดแคปซูลยาเปล่า จากนั้นปิดหลอดแคปซูลยาให้แน่นและเก็บไว้ในตู้เย็นในช่องแช่เย็นธรรมดา ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 10°C กลุ่มเรณูจะสามารถเก็บไว้ได้นานถึง 1 ปี โดยไม่เสียคุณสมบัติ

4. เก็บในหลอดแก้ว (*In vitro* conservation) เป็นการเก็บรักษาพันธุ์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้าช่วย สามารถที่จะอนุรักษ์พันธุ์ได้ตั้งแต่ระดับเซลล์เนื้อเยื่อ อวัยวะและต้นอ่อนที่เก็บและเลี้ยงไว้ในหลอดแก้ว วิธีนี้นิยมใช้กันมากเนื่องจากใช้พื้นที่ แรงงานและการดูแลรักษาน้อย ลดการเสี่ยงอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ การทำลายของศัตรูพืช และการดูแลรักษาที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังสะดวกในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์พืชระหว่างประเทศ เนื่องจากมีขนาดเล็ก สะดวกในการขนส่งและปลอดศัตรูพืช การเก็บรักษาในหลอดแก้วทำได้ดังนี้

4.1 ชะลออัตราการเจริญเติบโต โดยเติมสารชะลอหรือชะงักการเจริญเติบโต เช่น mannitol, sorbitol, sucrose และ abscisic acid การลดอุณหภูมิ การลดความเข้มแสง การลดปริมาณธาตุอาหาร จะช่วยทำให้การเปลี่ยนอาหาร (Subculture) ไม่บ่อยนักและจะเก็บรักษาไว้ได้นานประมาณ 1 ปี

4.2 การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่าเยือกแข็ง (Cryopreservation) เช่น เก็บในตู้แช่แข็ง (Freezer) ที่อุณหภูมิ -10°C หรือ -40°C และในไนโตรเจนเหลว (-196°C) จะสามารถเก็บรักษาได้ยาวนานหรือตลอดไป

การเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั่วๆไป จำเป็นต้องมีการเปลี่ยนอาหารบ่อยๆ อาจจะเป็นระยะเวลา 1-6 เดือนต่อครั้ง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดพืช แต่การเก็บรักษาพันธุ์พืชมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการเก็บให้ได้ระยะเวลาที่ยาวนาน ทั้งนี้เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษา ซึ่งการเก็บรักษาพันธุ์พืชนั้นสามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธีด้วยกันคือ

1. การทำให้พืชเจริญเติบโตอย่างช้าๆ (slow growth)

การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้เป็นการเก็บรักษาในระยะเวลาสั้นหรือปานกลาง ซึ่งสามารถช่วยขยายช่วงเวลาการย้ายเลี้ยงออกไป วิธีการลดการเจริญเติบโตสามารถทำได้หลายวิธีเช่น วิธีการลดอุณหภูมิ การลดสภาพแสงในการเพาะเลี้ยง การดัดแปลงสภาพบรรยากาศ การปรับแต่งอาหารเพาะเลี้ยง (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2541) และสารชะลอการเจริญเติบโต ซึ่งสามารถนำมาใช้ได้หลายชนิด

เช่น ดามิโนไซด์ พาโคลบิวทราซอล เมพิแควตคลอไรด์ กรดแอบไซสิก ซอลบิทอล เป็นต้น (ครรชิต ธรรมศิริ, 2547)

Bonnier and Van Tuyl (1997) ทำการเก็บรักษาลิลลี่เป็นเวลา 28 เดือน ที่อุณหภูมิ -2°C และ 25°C เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีปริมาณสารอาหารที่แตกต่างกัน คือ อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 6% หรือ 9% และอาหารสูตร ¼ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 6% หรือ 9% พบว่า อาหารสูตร ¼ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 9% สามารถลดการเจริญเติบโตของ sprout และ bulb ได้มากที่สุด รวมถึงมีความสามารถสูงสุดในการเจริญเติบโตภายหลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 28 เดือน

Lopez et al. (1998) ทำการศึกษาในมันฝรั่ง พบว่าการใช้ mannitol 4% ร่วมกับการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 8°C สามารถขยายเวลาในการเปลี่ยนอาหารไปได้ 8 เดือน หรืออาจมากกว่า 12 เดือน ซึ่งโดยปกตินั้นมันฝรั่งต้องทำการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงทุก 4 ถึง 8 สัปดาห์

ข้อดีของเทคนิคการชะลอการเจริญเติบโต คือ เนื้อเยื่ออยู่ในสภาพพร้อมที่จะขยายพันธุ์และสามารถใช้กับเนื้อเยื่อได้เกือบทุกชนิด ข้อเสีย คือ เก็บรักษาได้เป็นเวลาอันสั้นหรือปานกลาง (2 เดือน ถึง 2 ปี) นอกจากนี้ยังอาจเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมขึ้นได้เอง วิธีการที่ใช้ในพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน การสูญเสียจากปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ตลอดจนการสูญเสียความสามารถในการเกิดอวัยวะ (สมยศ มีสุข, 2541)

2. การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยเทคนิคเมล็ดเทียม (Artificial seeds)

เทคนิคเมล็ดเทียมเป็นอีกทางเลือกสำหรับการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืช เพื่อทดแทนระบบการเก็บรักษาในสภาพหลอดแก้วแบบเก่าที่มักเกิดความผันแปรทางพันธุกรรม จากการย้ายเลี้ยงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้สูญเสียความตรงตามพันธุ์ได้ จึงมีการนำเอาเทคนิคเมล็ดเทียมเข้ามาใช้เพื่อหลีก เหลี่ยงปัญหาต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้ (สมยศ มีสุข, 2541) เมล็ดเทียมจะทำหน้าที่เสมือนเปลือกหุ้มเมล็ด เพื่อป้องอันตรายให้แก่เอมบริโอที่อยู่ภายใน โดยการใช้สารที่ทำให้เกิดเจล เช่น อัจจิเนต วุ้น อะกาโรส และเจลลาติน นำมาเคลือบสิ้นส่วนของพืช ก่อนทำการเก็บรักษา (Redenbaugh et al., 1987) เช่นในการเก็บรักษาโปรโทคอร์มของกล้วยไม้ *Dendrobium Sonia* ด้วยการเคลือบสารอัลจิเนตและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C พบว่าสามารถเก็บรักษาได้นานถึง 90 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 56% และในการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 60 วัน ยังคงมีเปอร์เซ็นต์ความงอกได้ 100% (Saiprasad and Polisetty, 2003)

เทคนิคเมล็ดเทียมยังสามารถดัดแปลงสำหรับใช้เก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชแบบแช่แข็งได้ เช่น การรักษาพันธุ์พืชแบบเก็บแช่แข็งโดยวิธีการผลิตเมล็ดเทียม และกำจัดน้ำออก (encapsulation-dehydration method) โดยการนำชิ้นส่วนพืชมาผลิตเมล็ดเทียมโดยการเคลือบด้วยสาร ca-alginate จากนั้นจึงนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง เป็นระยะเวลาหนึ่ง แล้วจึงนำไปกำจัดน้ำออกบางส่วนก่อนที่จะนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวต่อไป (Martinez et al., 1999) หรือการเก็บรักษาพันธุ์พืชแบบแช่แข็ง โดยวิธีการผลิตเมล็ดเทียมและการป้องกันไม่ให้เกิด

ผนึกน้ำแข็ง (encapsulation-vitrification method) ในขณะแช่แข็ง โดยการนำชิ้นส่วนพืชมาผลิตเมล็ดเทียม และปรับสภาพเซลล์โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง จากนั้นจึงเติมสารละลายปกป้องเนื้อเยื่อพืชขณะแช่แข็ง (Plant vitrification solution ; PVS) ก่อนนำไปเก็บแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวต่อไป (Phunchindawan et al., 1997)

ข้อดี คือ ส่วนที่ได้จากการขยายพันธุ์ อยู่ในสภาพที่พร้อมนำไปเก็บรักษา อีกทั้งเนื้อเยื่ออยู่ในสภาพพักตัวและพร้อมที่จะเจริญเติบโตได้ใหม่ จึงเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมได้ต่ำ และยังใช้พื้นที่น้อย ข้อเสีย คือ วิธีการใช้ยังอยู่ในขั้นตอนการพัฒนา รวมถึงการที่ไม่สามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อเจริญได้ทุกชนิด และยังไม่ทราบช่วงเวลาการเก็บรักษาที่แน่นอน (สมยศ มีสุข, 2541)

3. การเก็บรักษาพันธุ์พืชแบบแช่แข็ง (cryopreservation)

วัตถุประสงค์หลักของการเก็บรักษาเนื้อเยื่อในสภาพแช่แข็งก็เพื่อเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมไว้นานๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์ที่ง่ายต่อการดับสูญพันธุ์หรือเสื่อมสภาพเร็วในสภาวะปกติ เนื่องจากการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชต้องใช้พลังงาน และต้องมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารอย่างสม่ำเสมอ ดังนั้นจะลดการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อจนกระทั่งไม่มีเลย (มีค่าเป็นศูนย์) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งให้มีการพักตัวในลักษณะการพักตัวของเมล็ดไม่ให้งอก เป็นสิ่งที่เป็นไปไม่ได้ ทางเดียวที่ทำได้คือ การหน่วงเหนี่ยวระยะเวลาในการเจริญเติบโตให้ยาวนานมากที่สุด โดยการเก็บไว้ในอุณหภูมิที่ต่ำมากๆ การเก็บเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิต่ำระหว่าง -79 ถึง -196°C เรียกว่า Cryopreservation แต่การเก็บในไนโตเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C เป็นวิธีการที่นิยมใช้ ซึ่งการเก็บรักษาพันธุ์พืชแบบแช่แข็งเป็นวิธีที่หยุดกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ของพืช ไม่มีการแบ่งเซลล์และไม่มีกระบวนการทางเมตาบอลิซึมต่างๆ เกิดขึ้นคล้ายกับการพักตัวของเมล็ด ในทางทฤษฎีนั้นเนื้อเยื่อของพืชจะคงสภาพนั้นไปตลอดกาล และเมื่อนำออกสู่สภาวะปกติเซลล์ต่างๆจะยังคงมีชีวิต สามารถแบ่งเซลล์มีการเจริญเติบโตและมีการพัฒนาเป็นต้นพืชได้ตามปกติ (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2541)

การเก็บรักษาแบบแช่แข็งนี้หลีกเลี่ยงไม่ได้ที่จะเกิดอันตรายจากการขยายตัวของผลึกน้ำแข็ง และจะเป็นสาเหตุการตายของเนื้อเยื่อถ้าเกิดขึ้นภายในเซลล์ระหว่างการทำให้เย็นอย่างรวดเร็วในไนโตรเจนเหลว ซึ่งการทำให้เกิดสภาพแก้ว (vitrification) เป็นกระบวนการทางกายภาพที่เป็นของเหลวทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการเกิดผลึกน้ำแข็ง โดยการเปลี่ยนแปลงของสารละลายจากสภาพที่เป็นของเหลวให้เป็นของแข็งที่มีสภาพคล้ายกระจกขุ่นหรือกระจกใส ในช่วงอุณหภูมิประมาณ -110°C รวมถึงมีการดึงน้ำออกจากเซลล์ ซึ่งมีผลให้ความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้น และค่าความเป็นกรดด่างเปลี่ยนแปลงไป เป็นการป้องกันการเสื่อมของเนื้อเยื่อ และเนื่องจากภายในเซลล์มีความหนืดสูง มีผลในการหยุดปฏิกิริยาเคมีที่ต้องการการเคลื่อนย้ายของโมเลกุล ทำให้เกิดสภาพพักตัวและมีเสถียรภาพเป็นเวลานาน (Sakai, 2000)

ข้อดี การเก็บรักษาแบบแช่แข็ง คือ ใช้พื้นที่น้อย รวมทั้งเก็บรักษาได้เป็นเวลานาน (ในทางทฤษฎีเก็บไว้โดยไม่จำกัดเวลา) และเนื้อเยื่ออยู่ในสภาพที่ถูกยับยั้งการเจริญ จึงเกิดการแปรผันทาง

พันธุกรรมได้ต่ำ ข้อเสีย คือ ต้องใช้อุปกรณ์ในการลดอุณหภูมิ เนื้อเยื่อต้องมีการเริ่มเจริญใหม่ ก่อนการขยายพันธุ์ นอกจากนี้ยังใช้กับเนื้อเยื่อที่มีการจัดเรียงโครงสร้างของเซลล์ที่แน่นอนแล้วไม่ค่อยได้ผล และยังต้องมีการพัฒนาวิธีการที่ใช้เฉพาะสำหรับแต่ละพืช (สมยศ มีสุข, 2541)

กระบวนการเก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยทั่วไปสามารถแบ่งออกเป็น 6 ขั้นตอน ดังนี้

1. การปรับสภาพเซลล์ก่อนการให้ความเย็น (pretreatment) เนื้อเยื่อพืชที่จะนำมาเก็บรักษา โดยวิธีนี้จะต้องนำมาผ่านกระบวนการพิเศษบางอย่าง หรือเรียกได้อีกอย่างว่า pretreatment แม้ขั้นตอนนี้ไม่เกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการแช่แข็ง แต่การปรับสภาพของเซลล์หรือเนื้อเยื่อให้เหมาะสมสามารถช่วยเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์ หลังผ่านกระบวนการแช่แข็งแล้วได้ดีขึ้น ขั้นตอนนี้อาจเป็นการเติมสารเคมีบางชนิดให้แก่เซลล์เพื่อให้ทนทานต่อสภาวะเครียดต่างๆ เช่น การเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิที่ต่ำกว่าปกติ หรือการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารเคมีบางชนิด เช่น abscisic acid, proline, sucrose เป็นต้น เพื่อกระตุ้นเนื้อเยื่อให้มีการปรับตัว สามารถทนต่อสภาพการเย็นจนแข็งตัวในขณะการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยเซลล์ที่แข็งแรง สมบูรณ์จะทนต่อความเย็นจัดได้ดี

2. การใช้สารป้องกันอันตรายจากการเกิดผนึกน้ำแข็ง (cryoprotection) เป็นวิธีการที่ทำให้เนื้อเยื่อมีความต้านทานต่อสภาวะเยือกแข็งมากยิ่งขึ้น โดยใช้สารป้องกันอันตรายจากความเย็นจัดจนเกิดผนึกน้ำแข็ง ก่อนการเก็บรักษาในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำมากๆอย่างน้อย 1 ชั่งโมง จะต้องเติมสารพวก cryoprotectants ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยง เพื่อให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อปรับสภาพ permeability และจุดเยือกแข็ง (freezing point) ซึ่งจะทำให้ทนทานต่อการแข็งตัว (freezing) และการละลายตัว (Thawing) หลังการเก็บรักษาได้โดยไม่มีผลกระทบต่อการพัฒนาของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ (รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ, 2541)

3. การทำให้เนื้อเยื่อแข็งตัวอย่างช้าๆ (Slow freezing) เมื่ออุณหภูมิของการเก็บรักษาลดต่ำลงกว่า 0°C จนถึงประมาณ -100°C จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากเกิดเป็นผลึกน้ำแข็งทั้งภายในและภายนอกเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไซโตพลาสซึมภายในเซลล์จะแข็งตัวและเพิ่มปริมาตรขึ้น ดังนั้น การลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ เป็นการช่วยไม่ให้เซลล์ได้รับอันตรายจากการเกิดผลึกน้ำแข็ง ขณะเดียวกันก็ช่วยดึงน้ำออกจากเซลล์ไปในตัว ในกรณีที่มีการแข็งตัวอย่างรวดเร็วจะทำให้สูญเสียน้ำออกมาได้น้อย เมื่อเกิดผลึกน้ำแข็งและมีปริมาตรเพิ่มขึ้นจะทำให้เซลล์ได้รับความเสียหาย อย่างไรก็ตามถ้าเซลล์สูญเสียน้ำมากเกินไปอาจเกิดความเสียหายได้เช่นกัน ดังนั้นอัตราการอยู่รอดของเซลล์จึงขึ้นกับสมดุลระหว่างอัตราการลดลงของอุณหภูมิอย่างช้าๆ กับอัตราการสูญเสียน้ำออกไปจากเซลล์ด้วย และอัตราการอยู่รอดดังกล่าวนี้ขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อที่เก็บรักษา (รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ, 2541)

4. การเก็บรักษาไว้ในที่เย็นจัด (freeze storage) หลังจากทำให้เซลล์แข็งตัวอย่างช้าๆ แล้วต้องย้ายไปเก็บไว้ที่เย็นจัด (ต่ำกว่า -100°C) เพื่อป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์อีกครั้ง

หนึ่ง ในทางปฏิบัติเพื่อความสะดวกจึงนิยมเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวที่ -196°C หรือในไอของไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapour) ที่ -150°C

5. การทำละลายเนื้อเยื่อ (warming or thawing) เมื่อต้องการนำเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวมาใช้ ต้องนำเนื้อเยื่อที่เก็บแช่แข็งมาละลาย ซึ่งปกติทำโดยการจุ่มภาชนะเก็บ ลงในน้ำสะอาดปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 40-45°C ก่อนที่จะนำเนื้อเยื่อไปเลี้ยงบนอาหารปกติต่อไป สำหรับเนื้อเยื่อที่เก็บแช่แข็งโดยการ encapsulation ก็เพียงนำออกวางในอุณหภูมิห้องธรรมดา เมื่อน้ำแข็งละลายหมด ก็นำเนื้อเยื่อไปเลี้ยงในอาหารปกติและชักนำให้เกิดต้นต่อไป

6. การกลับคืนสภาพปกติ (recovery) เนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนต่างๆ ข้างต้นมาแล้ว อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเซลล์และมักจะอ่อนแออย่างยิ่งต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นตามมา จึงต้องปรับสภาพการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้องการอาหารเพาะเลี้ยงพิเศษที่แตกต่างจากสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงก่อนเก็บรักษา (รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ, 2541)

วิธีการเก็บรักษาพันธุ์พืชแบบแช่แข็ง (cryopreservation)

การรักษาพันธุ์พืชแบบเก็บแช่แข็งโดยวิธี desiccation

การเก็บรักษาด้วยวิธีการนี้เป็นการลดปริมาณน้ำในเซลล์ เพื่อการป้องกันไม่ให้น้ำในเซลล์ของเนื้อเยื่อพืชนั้นเกิดการแข็งตัวในขณะที่ทำการเก็บรักษา สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การผึ่งเซลล์ให้แห้ง การใช้สารดูดความชื้น รวมไปถึงการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง น้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูงจะมีผลต่อแรงดันออสโมซิสของเซลล์โดยการทำให้เซลล์สูญเสียน้ำ แต่เซลล์ไม่ได้รับความเสียหาย ซึ่งในพืชแต่ละชนิดจะใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไป ดังนั้นจึงต้องพิจารณาทั้งชนิดของพืช ขนาดของสิ้นส่วนของพืชก่อนที่จะนำมาทำการทดลอง เช่นในการทดลองนำ immature embryo ของ spring wheat (*Triticum aestivum* L.) เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารยับยั้งการเจริญเติบโต ABA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเก็บไว้ในเครื่อง CRYO – MED ที่สามารถรักษาระดับของอุณหภูมิไว้ที่ – 35°C และที่ 60°C ก่อนที่จะย้ายลงเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำออกมาละลาย ที่อุณหภูมิห้องก่อนย้ายเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเอมบริโอสามารถเจริญและพัฒนาได้ภายใน 3 สัปดาห์หลังจากการเพาะเลี้ยง (Edward et al., 1993)

การรักษาพันธุ์พืชแบบเก็บแช่แข็งโดยวิธี vitrification

เป็นวิธีการเก็บรักษาโดยใช้สารละลายปกป้องเนื้อเยื่อขณะแช่แข็ง (plant vitrification solution; PVS) ซึ่งเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงและมีพิษต่อเซลล์พืช การดึงน้ำออกจากเซลล์ของสารละลายนี้เกิดขึ้นจากการชักนำให้เซลล์เกิดแรงดันออสโมติก โดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ได้รับ

สาร นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันอันตรายจากความเย็นจนเกิดผนึกน้ำแข็ง ซึ่งสารละลายที่ใช้นี้มีทั้งที่สามารถแทรกซึมผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ หรืออาจห่อหุ้มอยู่ภายนอก สารเคมีที่ใช้เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำในเซลล์ตกผนึกแข็งตัวจะมีความเข้มข้นสูง จึงป้องกันไม่ให้เกิดการแข็งตัวของน้ำในเซลล์ เซลล์จึงไม่แตก สารที่ใช้ป้องกันอันตรายจากการเกิดผนึกน้ำแข็งมีหลายชนิด เช่น ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ซูโครส กลูโครส เอทิลีนไกลคอล โพลีเอทิลีนไกลคอล กลีเซอรอล โพรลีน และสารประกอบไฮดรอกไซลิกบางชนิด เป็นต้น ส่วนการใช้สารเคมีนั้นจะแตกต่างกันไปตามแต่ละสูตร เช่น สารละลาย PVS2 จะประกอบไปด้วย กลีเซอรอล 30% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 15% เอทิลีนไกลคอล 15% สารละลาย PVS3 ประกอบด้วย กลีเซอรอล 50% และน้ำตาลซูโครส 50% เป็นต้น

Ishikawa et al. (1997) ทำการเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้ดินพันธุ์ *Bletilla striata* โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ND (Tokuhara and Mii, 1993) เป็นระยะเวลา 10 วัน หลังจากนั้นทำการเตรียมเนื้อเยื่อโดยการเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ที่มีน้ำตาลซูโครส 0.3 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25°C ในที่มืด เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นเติมสารกลีเซอรอล 2 โมลาร์ และซูโครส 0.4 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C และแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 0°C หลังจากนั้นนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นนำเมล็ดมาทำละลายอย่างรวดเร็ว โดยแช่ในอาหารเหลวสูตร ND ร่วมกับซูโครส 0.2 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 20 นาที แล้วจึงนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร ND พบว่าเมล็ดกล้วยไม้มีอัตราการรอดชีวิต 60% และสามารถเจริญเป็นต้นได้ตามปกติ

หรือในการเก็บรักษาเซลล์ของกล้วยไม้พันธุ์ *Doritaenpsis* cv. New Toyohashi โดยทำการเตรียมเซลล์ในอาหารสูตร New Dogashima (ND) ที่มีซูโครส 0.1 โมลาร์ และ abscisic acid (ABA) 1.0 มก./ล. เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25°C หลังจากนั้นเติมสารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอล 2 โมลาร์ และซูโครส 4 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และทำการเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 1-3 ชั่วโมง ในน้ำแข็ง จากนั้นนำลงเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความรอดชีวิต 64% (Tsukazaki et al., 2000)

Keiko and Thammasiri (2005) ทำการเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้ดินเอื้องปากนกแก้วในไนโตรเจนเหลวโดยวิธี vitrification โดยทำให้แห้งในหลอด cryotube ที่เติมสารละลาย plant vitrification solution (PVS2) ที่อุณหภูมิ 25±2°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 วัน จึงนำหลอดออกจากถังไนโตรเจนเหลว ทำให้อุ่นอย่างรวดเร็วในน้ำที่มีอุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 2 นาที แทนที่สารละลาย PVS2 ด้วยอาหารเหลวสูตร modified VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 1.2 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มล. ที่อุณหภูมิ 25±2°C เป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น พบว่าเมล็ดกล้วยไม้เอื้องปากนกแก้วที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธี vitrification สามารถพัฒนาไปเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ ได้ประมาณ 34%

ในขณะที่เมล็ดกล้วยไม้ซึ่งเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวโดยไม่ได้ใช้วิธี vitrification ไม่พบการรอดชีวิต

การรักษาพันธุ์พืชแบบเก็บแช่แข็งโดยวิธี encapsulation-Dehydration

การเก็บโดยวิธีการนี้ทำโดยการนำเมล็ดเทียมที่ได้จากการเคลือบชิ้นส่วนของพืชด้วยสารอัลจิเนต (ca-alginate) จากนั้นนำไปกำจัดน้ำที่อยู่ภายในเมล็ดเทียมออกด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การเป่าลมในตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) การใช้สาร silica gel การใช้น้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูง ก่อนการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (สมยศ มีสุข, 2541) เช่นในการเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดของต้นฮ็อบ หลังจากตัดชิ้นส่วนปลายยอดแล้ว หุ้มด้วยสารอัลจิเนตที่มีน้ำตาลซูโครส 0.5 โมลาร์ ทำการเพาะเลี้ยงก่อนเป็นเวลา 2 วัน บนอาหารแข็งสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 0.75 โมลาร์ จากนั้นกำจัดน้ำออกโดยการเป่าลมในตู้ปลอดเชื้อร่วมกับการใช้ silica gel เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตามด้วยการแช่ลงในไนโตรเจนเหลวอย่างรวดเร็ว และเก็บรักษาเป็นเวลาอย่างน้อยนาน 60 นาที ภายหลังจากการนำตัวอย่างกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ พบว่า ปลายยอดมีเปอร์เซ็นต์ความรอดชีวิตเท่ากับ 80% (Martinez et al., 1999)

Maneerattanarungroj et al. (2007) ทำการเก็บรักษาโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องเมี่ยงแบบแช่แข็งโดยวิธี encapsulation-dehydration โดยใช้โพรโทคอร์มที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในอาหาร ND ที่เติม NAA 0.3 มก./ล. เป็นเวลา 2 เดือน เก็บโพรโทคอร์มที่ผ่านการหุ้มด้วย sodium alginate 3% ในอาหารเหลว ND ที่เติม ABA 1 มก./ล. เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นกำจัดน้ำออกจากโพรโทคอร์มด้วยวิธี air drying โดยผึ่งในตู้ laminar air flow ร่วมกับ silica gel เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง แล้วนำโพรโทคอร์มแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ตรวจสอบความมีชีวิตของเนื้อเยื่อด้วยวิธี TTC assay และวัดอัตราการรอดชีวิตของโพรโทคอร์มหลังจากนำกลับมาเพาะเลี้ยงในอาหาร ND ที่เติม NAA 0.3 มก./ล. เป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่าโพรโทคอร์มที่ผ่านการแช่แข็งมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 40% และผล TTC assay เท่ากับ 50%

การรักษาพันธุ์พืชแบบเก็บแช่แข็งโดยวิธี encapsulation-Vitrification

การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้มีพื้นฐานมาจากการเก็บแช่แข็งโดยการป้องกันไม่ให้เกิดผนึกน้ำแข็ง แต่มีการนำวิธีการเข้ามาเพิ่มคือการเคลือบชิ้นส่วนของพืชด้วยสารอัลจิเนต (ca-alginate) ก่อน ซึ่งการเคลือบชิ้นส่วนพืชด้วยสารอัลจิเนตก่อนทำการเก็บแช่แข็งนั้น จะช่วยลดความเป็นพิษที่ชิ้นส่วนของพืชจะต้องสัมผัสสารเคมีโดยตรงได้ (สมยศ มีสุข, 2541) เช่น ในการเก็บแช่แข็งจุดกำเนิดยอดที่ได้จากการเลี้ยงต้นตอของ horseradish ทำการเคลือบจุดกำเนิดยอดด้วยสารอัลจิเนตที่มีน้ำตาลซูโครส 0.5 โมลาร์ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 0.5 โมลาร์ ในที่มีแสงนาน 1 วัน จากนั้นเติมสารละลายสูตร PVS2 ที่มีน้ำตาลซูโครส 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 0°C หรือ 25°C

เป็นเวลานานต่างๆกัน ก่อนจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว หลังจากทำละลายอย่างรวดเร็วในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40°C แล้วน้ำก้อนอัลจิเนตไปล้างในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 1.2 โมลาร์ เป็นเวลา 40 นาที นำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS นาน 1 คืน แล้วย้ายลงเลี้ยงบนอาหารใหม่อีก 2 ครั้ง พบว่าการใช้สารละลายสูตร PVS2 ที่อุณหภูมิ 0°C นาน 4 ชั่วโมง จุดกำเนิดยอดสามารถมีชีวิตรอด 69% ส่วนการใช้สารละลาย PVS2 ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 2 ชั่วโมง จุดกำเนิดยอดสามารถมีชีวิตรอด 40% (Phunchindawan et al., 1997)

สุรีย์พร พัฒนกิจโกศล (2549) ได้ทำการเก็บรักษาโพรโทคอร์มกล้วยไม้เข็มขาวในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-vitrification พบว่า โพรโทคอร์มที่ผ่านการแช่สาร LS เป็นเวลา 20 นาที ตามด้วยสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 50 นาที และใช้สาร glutathaione 20 ppm ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเกิดสารอนุมูลอิสระ (antioxidant) จากนั้นแช่ลงในไนโตรเจนเหลว ภายหลังจากการนำโพรโตคอร์มกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ โพรโทคอร์มมีความแข็งแรงสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 หลังจากนั้นโพรโทคอร์มมีลักษณะขาวซีดและไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

การตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์และเนื้อเยื่อพืช

1. การตรวจสอบด้วยตาเปล่า

ความมีชีวิตของเนื้อเยื่อหลังการแช่แข็ง เป็นข้อบ่งชี้ถึงความสำเร็จของวิธีการ ดังนั้นการตรวจสอบความมีชีวิต (Viability) ของตัวอย่างพืชด้วยตาเปล่าเป็นวิธีที่ง่ายที่สุด คือสังเกตลักษณะหรือสัญญาณความมีชีวิตของตัวอย่างพืช เช่น ตัวอย่างพืชยังคงมีสีเขียว มีการแบ่งเซลล์หรือมีการเจริญเติบโต เป็นต้น

2. การตรวจสอบด้วยวิธี FDA assay

การย้อมสีด้วย FDA (fluorescein diacetate) เซลล์พืชมีเอนไซม์ esterase จะย่อยโมเลกุลของ FDA แล้วให้สารเรืองแสงสีเขียวเมื่อดูด้วยกล้อง UV

3. การตรวจสอบด้วยวิธี TTC assay

สาร 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) เป็นสารที่ใช้ในการย้อมเพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์พืช โดย International Seed Testing Association (ISTA) ใช้ในการตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ ซึ่งสามารถนำมาใช้ตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์พืชภายหลังจากการแช่แข็งได้ (Verleysen et al., 2004; Vujanovic et al., 2000) ซึ่งหลักการตรวจสอบคือ สารละลาย TTC เป็นสารที่ใสไม่มีสี ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสารสีแดงเมื่อถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ dehydrogenase ที่เกิดจากกิจกรรมภายในของเซลล์พืช การที่สารละลาย TTC ถูกเปลี่ยนเป็นสีแดงแสดงว่าเซลล์พืชนั้นๆยังคงมีชีวิตอยู่ (Chang et al., 1999)

การตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์พืชด้วยวิธีนี้ทำได้เร็วและแม่นยำ นิยมใช้ตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์สิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆได้ด้วย (Vujanovic et al., 2000) วิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถ

มองเห็นสีแดงที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่า หรือหากต้องการดูให้ชัดเจนสามารถส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ (Pellet and Heleba, 1998)

4. การตรวจสอบความคงตัวของสารพันธุกรรม

เซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม เนื่องจากความเย็นที่ได้รับ ซึ่งการตรวจสอบความคงตัวของสารพันธุกรรมในปัจจุบันมีหลายวิธี ขึ้นอยู่กับความสะดวกและความต้องการของผู้ตรวจสอบ เช่น ตรวจสอบ DNA ด้วยวิธี RAPD RFLP และ AFLP เป็นต้น หรือหากต้องการตรวจสอบโปรตีน อาจใช้การตรวจสอบเอนไซม์บางชนิดก็ได้