ผลของโคลชิซินต่อการชักนำกล้วยไม้ม้าวิ่งให้เกิดพอลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ

Effect of Colchicine Treatment on In Vitro Polyploid Induction of *Doritis pulcherrima* Lindl.

วชิรพัฒน์ จิวานิจ

Wachirapat Jiwanit

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Botany
Prince of Songkla University
2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของโคลชิซินต่อการชักนำกล้วยไม้ม้าวิ่งให้เกิดพอลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ

ผู้เขียน นายวชิรพัฒน์ จิวานิจ

สาขาวิชา พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อารักษ์ จันทศิลป์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(รองศาสตราจารย์ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อารักษ์ จันทศิลป์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ครรชิต ธรรมศิริ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของโคลชิซินต่อการชักนำกล้วยไม้ม้าวิ่งให้เกิดพอลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ

ผู้เขียน นายวชิรพัฒน์ จิวานิจ

สาขาวิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2552

บทคัดย่อ

การชักนำให้เกิดต้นพอลิพลอยด์เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ เพื่อให้ได้ดอกที่มีขนาดใหญ่ กลีบกว้างหนา สีเข้ม รูปทรงดอกดีและแข็งแรง การศึกษาในครั้งนี้นำกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) ซึ่งเป็นกล้วยไม้พันธุ์พื้นเมืองที่มีดอกขนาดเล็กแต่มีหลายดอกในช่อเดียว มาชักนำให้เกิดต้นพอลิพลอยด์ซึ่งอาจทำให้ได้ต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีต้นขนาดเล็กลงแต่ดอกมีขนาดใหญ่ขึ้นเหมาะสำหรับปลูกเป็นกล้วยไม้กระถาง โดยนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ดัดแปลง นาน 25 วัน เอ็มบริโอจะเจริญเป็นโพรโทคอร์มที่มีรูปร่างค่อนข้างกลม จากนั้นนำโพรโทคอร์มที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีโคลชิซินเข้มข้น 0, 0.01, 0.05 และ 0.10 % (w/v) ในที่มืด เป็นระยะเวลา 5 วันและ 10 วัน แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร VW ดัดแปลง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของโพรโทคอร์มทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 14 สัปดาห์ พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับโคลชิซินทำให้เปอร์เซ็นต์การตายของโพรโทคอร์มมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มมีแนวโน้มช้าลง หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 14 สัปดาห์ โพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.10 % (w/v) เป็นเวลา 10 วัน มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงถึง 94.76 ± 0.82 % และมีเพียง 0.88 ± 0.35 % เท่านั้นที่เจริญเติบโตจนถึงระยะที่มีรากเกิดขึ้น การตรวจสอบความเป็นพอลิพลอยด์ด้วยการนับจำนวนโครโมโซม การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอภายในเซลล์ และการวัดขนาดนิวเคลียสของเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบ พบว่าโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.10 % (w/v) เป็นเวลา 5 วันและ 10 วัน สามารถชักนำให้เกิดต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งเตตระพลอยด์ได้สูงสุดคือ 30 % และโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.05 % (w/v) เป็นเวลานาน 10 วัน สามารถชักนำให้เกิดต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งออกตะพลอยด์ได้สูงสุดคือ 15 % ต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งดิพลอยด์และต้นเตตระ-พลอยด์มีลักษณะภายนอกไม่แตกต่างกันคือ มีใบค่อนข้างเรียวยาว แผ่นใบบาง

ส่วนต้นออกตะพลอยด์มีลักษณะใบค่อนข้างสั้น แผ่นใบหนา อวบน้ำ ใบซ้อนกันแน่น การเจริญเติบโตช้ากว่าต้นดิพลอยด์และต้นเตตระพลอยด์ จากการศึกษาความยาวของเซลล์คุม พบว่ามีความยาวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยต้นดิพลอยด์ ต้นเตตระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์ มีเซลล์คุมยาว 33.59 ± 2.55, 41.96 ± 3.68 และ 47.95 ± 5.88 ไมโครเมตร ตามลำดับ และการศึกษาความหนาแน่นของปากใบ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน โดยต้นดิพลอยด์ ต้นเตตระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์ มีความหนาแน่นของปากใบ 37.52 ± 10.17, 28.38 ± 6.91 และ 15.13 ± 2.58 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตรตามลำดับ

Thesis Title	Effect of Colchicine Treatment on In Vitro Polyploid Induction of *Doritis pulcherrima* Lindl.
Author	Mr. Wachirapat Jiwanit
Major Program	Botany
Academic Year	2009

Abstract

Induction of polyploidy is a potential method for breeding orchid mutants with the aim of producing larger flowers with intense colors. In this study, *Doritis pulcherrima* Lindl., a small-flower wild orchid was treated in vitro by colchicine to induce polyploidy and hopefully obtain plants with larger flowers suitable for ornamental potted plants. Seeds of *Doritis pulcherrima* Lindl. were germinated in modified liquid VW medium on a shaker for 25 days. Subsequently, globular protocorms were treated with 0, 0.01, 0.05 and 0.10 % (w/v) colchicine in the liquid medium in dark incubation for 5 and 10 days. The protocorms were then transferred to modified VW agar medium without colchicine to recover. Development of the protocorms was observed at 2 week intervals for 14 weeks. The results indicated that increasing colchicine concentration and duration of treatment tended to increase the percentage of dead protocorms and decreased surviving protocorm developmental processes . After culture on modified VW agar medium for 14 weeks, the highest percentage of protocorm death of 94.76 ± 0.82 % was found in the treatment using 0.10 % (w/v) colchicine for 10 days and only 0.88 ± 0.35 % of the protocorms developed to the final stage of root protrusion. Chromosome number, DNA content and nuclear diameter of abaxial epidermal cells of new leaves were investigated to identify treated plants with different ploidy levels. Treatment with 0.10 % (w/v) colchicine for both 5 and 10 days provided the highest percentage of tetraploid plants of 30 %. Treatment with 0.05 % (w/v) colchicine for 10 days provided the highest percentage of octaploid plants of 15 %. The appearance of both diploid and

tetraploid plants was normal with thin oblong leaves. However, growth of the octaploid plants produced rosette forms and the rate of growth was slower than either diploid or tetraploid plants. All plants of the 3 ploidy levels were significantly different in guard cell length and stomatal density. Guard cell lengths of the diploid, tetraploid and octaploid plants were 33.59 ± 2.55, 41.96 ± 3.68 and 47.95 ± 5.88 μm ,respectively. The densities of the stomata of the diploid, tetraploid and octaploid plants were 37.52 ± 10.17, 28.38 ± 6.91 and 15.13 ± 2.58 stomata / mm^2, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ โดยมีบุคคลที่สำคัญที่สุดคือ ผศ.ดร. อารักษ์ จันทศิลป์ และ รศ. ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาถ่ายทอดวิชาความรู้ เสียสละเวลาให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องแก่ศิษย์เสมอมา

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์ ประธานกรรมการ รศ.ดร. ครรชิต ธรรมศิริ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ให้ความกรุณาในการตรวจสอบวิทยานิพนธ์และได้กรุณาเสนอแนะแก้ไขเพิ่มเติม ทำให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และบุคลากรภาควิชาชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ และข้อแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยตลอดมา รวมถึงภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่อนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนเงินทุนเพื่อการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอขอบพระคุณกำลังใจอันยิ่งใหญ่ของคุณพ่อ คุณแม่ คุณพ่อ – คุณแม่ของภรรยา และภรรยา ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคน ที่มิได้กล่าวนามซึ่งเป็นกำลังใจสำคัญในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมาจนสำเร็จ

วชิรพัฒน์ จิวานิจ

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
รายการกราฟ	(12)
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจสอบเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	12
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	
พืชทดลอง และ สารเคมี	13
วัสดุ	14
อุปกรณ์	15
วิธีการทดลอง	16
3. ผลการวิจัย	22
4. บทวิจารณ์	41
5. บทสรุปและข้อเสนอแนะ	45
รายการเอกสารอ้างอิง	48
ภาคผนวก	57
ประวัติผู้เขียน	66

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์การตายของโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินนาน 5 และ 10 วัน หลังจากการย้ายเลี้ยงบนอาหารวุ้น 14 สัปดาห์	27
2	เปอร์เซ็นต์โพรโทคอร์มที่เจริญอยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้น จากโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับ และ ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ หลังย้ายมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่ไม่มีโคลชิซิน 14 สัปดาห์	28
3	ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียสของเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง	35
4	เปอร์เซ็นต์กล้วยไม้ม้าวิ่งที่เกิดเป็นดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และออกตะพลอยด์ หลังจากโพรโทคอร์มได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วันและ 10 วัน	36
5	ความยาวของเซลล์คุมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นต้นดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และออกตะพลอยด์	38
6	ความหนาแน่นของปากใบของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นต้นดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์	40

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	กล้วยไม้ม้าวิ่ง	3
2	ลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกกล้วยไม้ม้าวิ่ง	4
3	สูตรโครงสร้างของโคลชิซิน	6
4	ลักษณะฝักและเมล็ดของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่นำมาเพาะเลี้ยง	13
5	โพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่ง หลังเพาะเลี้ยง 25 วัน	16
6	การวัดความยาวของเซลล์คุม	20
7	โพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งในระยะการเจริญเติบโต 4 ระยะ	23
8	โพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ตายในระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ	23
9	โพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ปล่อยสารประกอบฟีนอลสีน้ำตาล	24
10	ลักษณะภายนอกของกล้วยไม้ม้าวิ่งอายุ 2 ปี 3 เดือน	30
11	ลักษณะต้นและโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งอายุ 2 ปี 3 เดือน	31
12	ฮีสโตแกรมปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์จากใบกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นต้นดิพลอยด์ ตรวจสอบด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์	32
13	ฮีสโตแกรมปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์จากใบกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นต้นเตตระพลอยด์ ตรวจสอบด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์	33
14	ฮีสโตแกรมปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์จากใบกล้วยไม้ม้าวิ่งที่คาดว่าเป็นต้นออกตะพลอยด์ ตรวจสอบด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์	33
15	นิวเคลียสของเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง	34

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	เซลล์ชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง	35
17	ปากใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง	37
18	ผลึกที่พบในเซลล์ใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง	38
19	ความหนาแน่นของปากใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง	39

รายการกราฟ

กราฟที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์การตายของโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน	26
2	เปอร์เซ็นต์การตายของโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10 วัน	26

บทที่ 1
บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว วงศ์ Orchidaceae ไม่มีเนื้อไม้อายุหลายปี (perennial herb) ปัจจุบันพบว่ามีอยู่ตามธรรมชาติประมาณ 19,000 ชนิด (อบฉันท์, 2543) มีการดำรงชีวิตแตกต่างกัน 2 รูปแบบ คือ พวกที่เจริญอยู่บนพื้นดิน เรียกว่า กล้วยไม้ดิน (terrestrial orchids) และพวกที่เจริญโดยเกาะติดกับต้นไม้อื่น เรียกว่า กล้วยไม้อิงอาศัย (epiphytic orchids) ต้นกล้วยไม้มีหลากหลายขนาดตั้งแต่พวกที่มีลำต้นขนาดตั้งแต่เล็กที่สุดโตกว่าหัวไม้ขีดไฟเล็กน้อยเท่านั้น เช่น พวกสิงโต จนถึงพวกที่มีต้นขนาดใหญ่เกือบเท่าต้นอ้อย เช่น ว่านเพชรหึง กล้วยไม้สามารถกระจายพันธุ์ได้เกือบทุกสภาพอากาศ โดยเฉพาะประเทศไทยจัดได้ว่ามีสภาพอากาศเหมาะสมเอื้อต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ จึงสำรวจพบกล้วยไม้มากถึงประมาณ 1,150 ชนิด แต่ละชนิดมีลักษณะเด่นสวยงาม แตกต่างจากกล้วยไม้ที่เจริญในแถบลาตินอเมริกา (มาลินี, 2534 ; ชนินทร์ และ วิภาส, 2550)

เนื่องจากดอกกล้วยไม้มีลักษณะรูปทรงที่หลากหลายและมีสีสันสวยงาม ให้ดอกที่บานคงทนอยู่ได้เป็นเวลานาน อีกทั้งปลูกเลี้ยงง่าย จึงมีการนำเอากล้วยไม้มาปลูกเพื่อประดับตกแต่งบ้านเรือนและเพื่อการค้า โดยขายในรูปต้นหรือตัดดอก ในปี พ.ศ. 2548 ประเทศไทยส่งออกดอกกล้วยไม้ได้มากถึงประมาณ 2,540 ล้านบาท และเมื่อย้อนไปนับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 เรื่อยมาจนถึงปี พ.ศ. 2547 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกดอกกล้วยไม้ไปสู่ตลาดโลกได้ขยายตัวมากขึ้นเรื่อยๆ อย่างเห็นได้ชัดเจน (ดรุณวรรณ, 2549) เป็นการยืนยันถึงความก้าวหน้าของอุตสาหกรรมกล้วยไม้ไทย กล้วยไม้ที่ได้รับความนิยมมีทั้งกล้วยไม้ที่ปลูกและพัฒนาพันธุ์โดยนักปรับปรุงพันธุ์และกล้วยไม้ป่าในธรรมชาติ ทำให้กล้วยไม้ป่าบางส่วนถูกนำออกมาจากป่าเพื่อประโยชน์ทางการค้าหรือปลูกไว้ดูเล่น จำนวนประชากรกล้วยไม้ป่าจึงลดลงอย่างรวดเร็ว จนกล้วยไม้บางชนิดเกือบสูญพันธุ์ (ครรชิต, 2541) แนวทางหนึ่งที่อาจช่วยลดปัญหานี้ นั่นคือการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ป่าให้มีลักษณะดีกว่าเดิมและเพิ่มจำนวนให้ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งจะส่งผลให้กล้วยไม้ป่าที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ได้รับความสนใจมากกว่ากล้วยไม้ป่าเดิม ความต้องการกล้วยไม้ป่าจึงอาจลดลง

การปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การผลิตลูกผสมจากต้นพ่อแม่พันธุ์ดี (ครรชิต, 2541) การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสี (Irfaq and Nawab, 2001) และชักนำให้เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมที่เรียกว่าการชักนำพืชให้เกิดพอลิพลอยด์

(polyploid) (กนิษฐา, 2542 ; สุมนา, 2549) วิธีการเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์กับการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ได้เช่นกัน

กล้วยไม้ที่เป็นต้นพอลิพลอยด์มักให้ดอกที่มีขนาดใหญ่ กลีบกว้าง หนา สีเข้ม รูปทรงดอกดีและแข็งแรงกว่าดอกกล้วยไม้ที่เป็นต้นดิพลอยด์ (diploid) (Norberto, 2005) ซึ่งเป็นลักษณะของต้นพันธุ์ดีตรงกับความต้องการของตลาด (กาญจนา, 2548) การศึกษาในครั้งนี้ใช้กล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) ซึ่งเป็นกล้วยไม้พันธุ์พื้นเมืองที่มีดอกขนาดเล็กแต่มีหลายดอกในหนึ่งช่อดอก นักปรับปรุงพันธุ์นิยมนำมาผสมข้ามกับกล้วยไม้ในสกุล *Phalaenopsis* ได้ลูกผสมที่มีชื่อสกุลใหม่ว่า *Doritaenopsis* ซึ่งมีลักษณะเหมาะทั้งปลูกเป็นไม้ตัดดอกและไม้กระถาง (Park et al., 2003) การชักนำกล้วยไม้ม้าวิ่งให้เกิดต้นพอลิพลอยด์อาจทำให้ได้ต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีต้นขนาดเล็กลง แต่ดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น เหมาะสำหรับปลูกเป็นกล้วยไม้กระถางและอาจเป็นที่ต้องการของตลาด สร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจได้

1.2 การตรวจสอบเอกสาร

1.2.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์และจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง

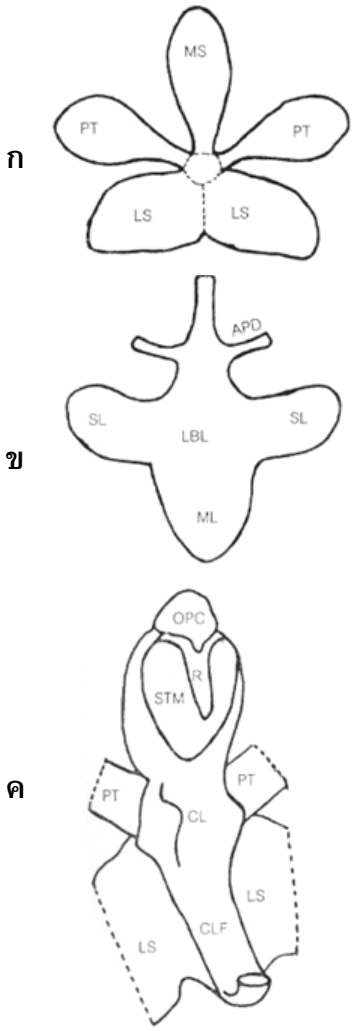
กล้วยไม้ม้าวิ่งกระจายพันธุ์อยู่ในอินเดีย พม่า อินโดจีน มาเลเซีย และพบทุกภาคของประเทศไทย (อบฉันท์,2543) มีชื่อวิทยาศาสตร์หลายชื่อ แต่ชื่อที่ใช้กันมากคือ *Doritis pulcherrima* Lindl. และ *Phalaenopsis pulcherrima* (Lindl.) J.J.Sm. (สุรางค์รัชต์, 2551) จากรายงานชื่อพันธุ์ไม้ใน A Checklist of the Vascular Plants of Lao PDR ซึ่ง Newman และคณะ (2007) เป็นผู้ศึกษา ได้รายงานกล้วยไม้ม้าวิ่งในชื่อ *Doritis pulcherrima* Lindl. ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ของกล้วยไม้ม้าวิ่งตามรายงานเล่มนี้

สุรางค์รัชต์ (2551) ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ม้าวิ่ง และกล่าวถึงลักษณะของกล้วยไม้ม้าวิ่ง ดังนี้ **ต้น** (ภาพที่ 1ก) สูง 2 – 30 เซนติเมตร มีระบบรากที่โผล่ขึ้นมาเหนือพื้นดิน คล้ายรากอากาศของกล้วยไม้อิงอาศัย แต่ละรากมีลักษณะค่อนข้างกลมเรียวยาวและไม่แตกแขนง ปลายรากมีสีเขียวใสจนถึงแดงคล้ำ **ใบ** แผ่นใบหนาและค่อนข้างแข็ง เรียงสลับซ้ายขวา ซ้อนกันแน่น ปลายใบสอบกว้าง หรือปลายใบมน กว้าง 1.5 – 4 เซนติเมตร ยาว 5 – 12 เซนติเมตร จำนวน 2 – 10 ใบ ท้องใบสีเขียวและหลังใบมีประสีม่วงแดง บางต้นมีสีเขียวทั้งใบ ระยะระหว่างใบ 0.5 – 1.5 เซนติเมตร **ดอก** (ภาพที่ 1ข) มีสีหลากหลายตั้งแต่สีเกือบขาว ขาวอมชมพู ชมพูอ่อน ไปจนถึงสีแดงม่วงออกเป็นช่อตรงยาว 15 - 60 เซนติเมตร เกิดที่โคนต้นหรือซอกใบใกล้โคนต้น ดอกย่อยจำนวน 2 -20 ดอก เมื่อบานเต็มที่กว้าง 1.5 – 2 เซนติเมตร ดอกทะยอยบานจากโคนช่อสู่ปลายช่อ ลักษณะของดอกเป็นดังนี้ <u>กลีบเลี้ยง</u> แบ่งเป็น กลีบเลี้ยง

กลีบกลางและกลีบเลี้ยงคู่ข้าง โดยกลีบเลี้ยงกลีบกลางเป็นรูปรีแกมขอบขนาน กว้าง 0.45 - 0.65 เซนติเมตร ยาว 0.9 - 1.8 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงคู่ข้างเป็นรูปขอบขนาน ปลายกลีบสอบขนาด 0.9 - 1.3 x 0.7 - 0.85 เซนติเมตร กลีบดอก แบ่งเป็นกลีบดอกบนและกลีบปาก โดยกลีบดอกบน มี 2 กลีบ ลักษณะเช่นเดียวกับกลีบเลี้ยงกลีบกลาง กลีบปากหนากว่ากลีบดอกบนขนาด 0.9 - 1.1 x 0.9 - 1.1 เซนติเมตร ช่วงกลางกลีบโค้ง ปลายกลีบพับลง ขอบด้านข้างกลีบปากตั้งขึ้น ใกล้โคนกลีบปากมีติ่งยาวยื่นออกมาจากขอบคล้ายเงี่ยงตั้งขึ้นข้างละ 1 อัน กลางกลีบปากมีสันนูนตามยาว 2 แนว เส้าเกสร สูง 0.5 เซนติเมตร ฝาครอบกลุ่มละอองเรณูลักษณะคล้ายหัวนกมีปากยาว โคนเส้าเกสรยืดยาวและเชื่อมติดกับโคนกลีบเลี้ยงคู่ข้าง กลุ่มละอองเรณูสีเหลือง รูปร่างค่อนข้างกลม มี 2 คู่ จำนวน 4 ก้อน ขนาดไม่เท่ากัน เมื่อดอกบานเต็มที่ กลีบเลี้ยงและกลีบดอกคู่บนจะบานแผ่และลู่ไปด้านหลังทำให้เห็นเส้าเกสรเด่นชัด ลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกกล้วยไม้ม้าวิ่งแสดงดังภาพที่ 2

กล้วยไม้ม้าวิ่งดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 38 (สุมนทิพย์และปิยะ-ดา, 2550 ; Kamemoto et al., 1964 ; Soonthornchainaksaeng, 2005) ขณะที่ต่างสายพันธุ์ คือ กล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) ซึ่งมีดอกขนาดใหญ่และสีเข้มกว่า มีจำนวนโครโมโซม 2n = 76 (กาญจนาและคณะ, 2551) เชื่อกันว่ากล้วยไม้ชนิดนี้เป็นต้นเตตระพลอยด์ของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ มีการกระจายพันธุ์อยู่ในบริเวณจังหวัดอุบลราชธานี อุดรธานี และหนองคาย (พิมลพรรณและสุจิตร, 2542)

ภาพที่ 1 กล้วยไม้ม้าวิ่ง ก : ต้น ข : ดอก



MS = กลีบเลี้ยงกลีบกลาง
LS = กลีบเลี้ยงกลีบข้าง
PT = กลีบดอก
CL = เส้าเกสร
LBL = กลีบปาก
APD = แผ่นเงี่ยง
SL = หูกลีบปาก
ML = สันกลาง
OPC = ฝาครอบกลุ่มเรณู
R = จะงอยเล็ก
STM = แอ่งเกสรเพศเมีย
CLF = คางเส้าเกสร

ภาพที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกกล้วยไม้ม้าวิ่ง (สุรางค์รัชต์, 2551)
ก : กลีบดอกและกลีบเลี้ยง ข : กลีบปาก ค : เส้าเกสร

1.2.2 การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ

การเพิ่มจำนวนประชากรของกล้วยไม้ทั่วไปในธรรมชาติมักมีข้อจำกัดคือ ติดฝักน้อย เมล็ดมีขนาดเล็กมากอาจเรียกว่า “dust seed” ภายในเมล็ดมีอาหารสะสมน้อยมากไม่เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอ เมล็ดจะงอกได้ต้องอาศัยเชื้อราไมคอร์ไรซา (*Mycorrhiza*) โดยเชื้อราส่งอาหารให้แก่เอ็มบริโอภายในเมล็ด ทำให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตเป็นโพรโทคอร์ม (protocorm) และเป็นต้นกล้วยไม้ที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้เองในระยะต่อมา (McKendrick, 2000) กล้วยไม้มีจำนวนเมล็ดต่อฝักมาก แต่ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวเปอร์เซ็นต์การงอกตามธรรมชาติจึงต่ำมาก ดังนั้นนักวิจัยจึงได้ทดลองนำเมล็ดกล้วยไม้มาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกให้มากขึ้น ในระยะแรกมีการทดลองเตรียมอาหารโดยใช้

เชื้อราไมคอร์ไรซาเลี้ยงร่วมอยู่ในอาหารด้วย ทำให้สามารถเพาะเมล็ดกล้วยไม้ให้เจริญเติบโตขึ้นได้ ต่อมามีการพัฒนาสูตรอาหารที่ไม่ต้องใช้เชื้อราได้สำเร็จ สูตรอาหารที่เหมาะสำหรับใช้เพาะเมล็ดกล้วยไม้ คือ Vacin and Went (VW) และ Knudson (ไพบูลย์, 2521)

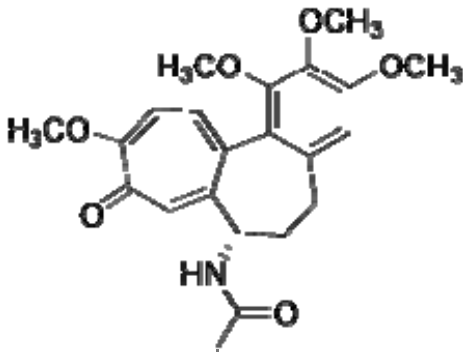
ขั้นตอนแรกของการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อคือ การทำให้เมล็ดปราศจากเชื้อ โดยนำฝักแก่ที่ยังไม่แตกมาฉีดพ่นด้วยเอธานอล 96 % ผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว หากเป็นฝักแก่แห้งและแตกแล้วฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ 10% เป็นเวลา 15 - 20 นาที ไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ (H_2O_2) นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ตามลำดับ (Buyun et al., 2004) หรืออาจใช้ไซยานอลเมทิลเมอร์คิวรีกวานิดีน (cyanol methylmercuri guanidine) ความเข้มข้นช่วง 0.5-1.5 ppm. (Farrar, 1963) จากนั้นนำเมล็ดมาเลี้ยงในอาหารเหลวหรืออาหารวุ้นสูตรที่เหมาะสม วางไว้ในห้องเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน

สำหรับการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ม้าวิ่งในสภาพปลอดเชื้อทำได้โดยล้างฝักด้วยน้ำยาล้างจาน แล้วแช่ในเอธานอล 70 % เป็นเวลา 30 วินาที และล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง จากนั้นแช่ฝักในเมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) 1 % เป็นเวลา 15 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง จากนั้นเปิดฝักออก นำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยการเติมเบนซิลอะมิโนเพียวรีน (6-benzyl-amino purine: BA) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแนฟทาลีน-อะซีติก (2-naphthalene acetic acid: NAA) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน (activated charcoal : AC) 1 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (Luan et al., 2006) อย่างไรก็ตามการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตอาจมีผลทำให้จำนวนโครโมโซมของพืชเปลี่ยนแปลงได้ ดังเช่นการศึกษาในต้น *Asclepias curassavica* L. (Pramanik and Datta, 1986) และ *Dendrobium crumenatum* Sw. (Meesawat et al., 2008) ดังนั้นในการศึกษาผลของโคลชิซินต่อการชักนำพืชให้เกิดพอลิพลอยด์ จึงไม่ควรเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยง

1.2.3 การชักนำพืชให้เกิดพอลิพลอยด์

การชักนำพืชให้เกิดพอลิพลอยด์เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชที่ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมมากขึ้น มักมีผลต่อพืชทำให้ปริมาณสารในเซลล์เพิ่มขึ้น ขนาดเซลล์ขยายเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ดอกใหญ่ขึ้น ลักษณะเหล่านี้แตกต่างจากลักษณะที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยการผสมเกสร (Griesbach, 1985) พืชพอลิพลอยด์เกิดขึ้นตามธรรมชาติได้แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดน้อยมาก แบ่งการเกิดเป็น 2 ลักษณะคือ เกิดจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่าของเซลล์ร่างกาย ที่ได้มาจากการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสผิดปกติ (mitotic doubling of chromosome number) หรือการรวมกันของเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่ลดจำนวนโครโมโซม (unreduced gametes) (Vainstein, 2002) สำหรับการชักนำพืชให้เป็นพอลิพลอยด์ทำได้โดยใช้

สารที่มีสมบัติยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ช่วยในการแยกตัวของโครโมโซมในระยะแอนาเฟส เช่น โคลชิซิน (colchicine) ออริซาลิน (oryzalin) ไตรฟลูราลิน (trifluralin) อะมิโพรฟอสเมธิล (amiprophos-methyl) และ ไนตรัสออกไซด์ (nitrous oxide) (Ranney, 2007) โดยสารที่นิยมใช้กันทั่วไปคือ โคลชิซินซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างของโคลชิซิน

โคลชิซินเป็นสารประเภทอัลคาลอยด์ที่ละลายน้ำได้ (Lodish et al., 1995) มีสมบัติจับกับโปรตีนทูบูลินซึ่งเป็นหน่วยย่อยของไมโครทูบูลได้ หากทูบูลินที่มีโคลชิซินจับอยู่ถูกนำไปใช้สร้างไมโครทูบูล จะส่งผลต่อโครงสร้างของไมโครทูบูลซึ่งไม่สามารถสร้างเป็นเส้นใยที่ยาวขึ้นได้ จึงทำให้ไม่มีการสร้างเส้นใยสปินเดิลขณะที่มีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นโครมาทิดจึงไม่ถูกดึงไปที่ขั้วเซลล์ในระยะแอนาเฟส มีผลทำให้จำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าเป็นเตตระพลอยด์(tetraploid) (Starr and Taggart, 1995) ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำโคลชิซินมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งได้แก่การสร้างพืชสายพันธุ์แท้ (homozygous plant) และการชักนำพืชให้เกิดเป็นพืชพอลิพลอยด์

การสร้างพืชสายพันธุ์แท้เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ มีรายงานในข้าวโพด (Mohammadi et al., 2007) และยาสูบ (Bürün and Emìroglu, 2008) ซึ่งโดยทั่วไปการสร้างพืชสายพันธุ์แท้เป็นการชักนำเซลล์แฮพลอยด์ (haploid) ให้เป็นเซลล์ไดแฮพลอยด์ (dihaploid) มักชักนำโดยใช้ร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงละอองเรณู (Eeckhuat et al., 2004)

การปรับปรุงพันธุ์พืชหลายชนิดใช้วิธีการชักนำให้เกิดเป็นพอลิพลอยด์ เช่น Thao และคณะ (2003) นำยอดของต้น Green Velvet ซึ่งเป็นพืชสกุล *Alocasia* แช่ในโคลชิซิน ซึ่งเป็นวิธีการเดียวกับที่ใช้ใน *Buddleia globosa* (Rose et al., 2000) Shao และคณะ (2003) เติมโคลชิซินในอาหารเพาะเลี้ยงส่วนข้อของต้นทับทิม (*Punica granatum*)

วิธีการชักนำพืชให้เกิดพอลิพลอยด์มีหลายวิธี จำเป็นต้องเลือกใช้วิธีการให้เหมาะสมกับชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อพืชที่นำมาชักนำ อีกทั้งต้องคำนึงถึงความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินและระยะเวลาที่ให้แก่ชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อพืชด้วย (Blakeslee and Avery,

1937) โดยชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อพืชที่มีลักษณะแข็งหรือมีอายุมากมักต้องใช้โคลชิซินความเข้มข้นสูง จากการทดลองชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในพืชบางชนิด ช่วงความเข้มข้นของโคลชิซินที่เลือกใช้สัมพันธ์กับชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อ โดยเรียงลำดับตามชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อที่ต้องใช้โคลชิซินจากความเข้มข้นสูงไปต่ำได้ดังนี้ คือ ตาข้าง เมล็ด ยอดอ่อน และต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามลำดับ ตัวอย่างการใช้โคลชิซินช่วงความเข้มข้นต่างๆ กับชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อพืช ดังเช่น ตาข้างของพืชที่ปลูกตามสภาพในธรรมชาติ มักใช้วิธีการหยดสารละลายโคลชิซินบนตาข้างโดยตรง ตาข้างของหม่อน ใช้โคลชิซินเข้มข้น 0.4 % (ประชาชาติและสำเริง, 2540) ตาข้างของถั่วเขียวพันธุ์อู่ทอง ใช้โคลชิซินเข้มข้นช่วง 0.1 - 0.5 % (มยุรีและคณะ, 2547) สำหรับเมล็ดมักใช้วิธีการแช่ในสารละลายโคลชิซิน โดยเมล็ดข้าวโพดและเมล็ดพืชจำพวกผักล้มลุกใช้สารละลายโคลชิซินเข้มข้นช่วง 0.1 - 0.5 % (จักรกฤษณ์และคณะ, 2545) เมล็ดถั่ว chickpeas (*Cicer arietinum*) ซึ่งเป็นพืชอาหารสัตว์ใช้สารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.25 % (Sohoo et al., 1970) ยอดอ่อนของหม่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ มักแช่ชิ้นส่วนของยอดอ่อนในสารละลายโคลชิซินเช่นเดียวกับเมล็ด ความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วง 0.02 - 0.10 % (นิตย์ศรีและอำไพ, 2541) และเอ็มบริโอของข้าวซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่ยังอ่อนอยู่ ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโคลชิซินผสมอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.01 - 0.05 % (ประดิษฐ์และคณะ, 2537)

นอกจากความเข้มข้นของโคลชิซินแล้ว ระยะเวลาที่ชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับโคลชิซิน เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดพืชพอลิพลอยด์ โดยทั่วไปแล้วการให้โคลชิซินความเข้มข้นต่ำมักให้เป็นระยะเวลานานกว่าความเข้มข้นสูง แต่อย่างไรก็ตามพืชแต่ละชนิดมีความทนต่อพิษของโคลชิซินได้แตกต่างกัน หากชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อพืชได้รับโคลชิซินความเข้มข้นสูงเกินไปหรือนานเกินไปจะทำให้มีการตายสูง ดังผลที่ปรากฏในการศึกษาการชักนำผักกาดขาวให้เกิดเป็นพอลิพลอยด์ ซึ่งใช้วิธีการแช่เมล็ดในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.25 % และ 0.5 % นาน 24 ชั่วโมง พบว่าต้นอ่อนในเมล็ดตายหมด แต่สำหรับเมล็ดผักคะน้าที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.5 % นาน 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน กลับพบว่าสามารถชักนำให้เกิดเป็นคะน้าพอลิพลอยด์ได้ (จักรกฤษณ์และคณะ, 2545) ดังนั้น ในการชักนำพืชให้เกิดพอลิพลอยด์จำเป็นต้องทดลองเพื่อหาระดับความเข้มข้นของโคลชิซินและระยะเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้พืชรอดตายมาก มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นพอลิพลอยด์สูง

จากรายงานข้างต้นจะพบว่าวิธีการให้โคลชิซินแก่พืชทดลองมีหลากหลายวิธี ได้แก่ แช่เมล็ด หยดบนตายอดหรือตาข้าง และผสมโคลชิซินในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยตรง อย่างไรก็ตามทุกวิธีการควรระวังป้องกันไม่ให้โคลชิซินได้รับแสง เนื่องจากโคลชิซินสลายตัวได้เมื่อถูกแสงและความร้อนสูง (Griesbach, 1981) สามารถแก้ปัญหานี้ได้คือ ในกรณีที่หยดโคลชิซินบนยอดหรือตาข้าง ให้ห่อหุ้มชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อพืชด้วยกระดาษอลูมิเนียม และในกรณีที่แช่เมล็ดในภาชนะหรือเพาะเลี้ยงในขวด ให้ห่อหุ้มภาชนะที่มีเมล็ดแช่อยู่หรือขวดเพาะเลี้ยงด้วยกระดาษอลูมิเนียมหรืออาจคลุมไว้ด้วยผ้าดำ (นิตย์ศรีและอำไพ, 2541)

1.2.4 การชักนำกล้วยไม้ให้เกิดพอลิพลอยด์

การชักนำให้เกิดต้นพอลิพลอยด์ในกล้วยไม้ มีการนำชิ้นส่วนหลายชนิดมาในการทดลอง เช่น ลำต้น (Menninger, 1963) โครงสร้างคล้ายโพรโทคอร์ม (protocorm – like bodies : PLBs) (Silva et al., 2000) โพรโทคอร์ม (Griesbach, 1981; 1985) แคลลัส (callus) (มลวิภา, 2521) และต้นสมบูรณ์ (Vichiato et al., 2007) โดยทั่วไปความเข้มข้นของโคลชิซินที่ใช้ในการทดลองชักนำกล้วยไม้ให้เกิดพอลิพลอยด์อยู่ในช่วง 0.01 - 0.20 % (w/v) มีเฉพาะการทดลองของ Menninger (1963) เท่านั้นที่ใช้โคลชิซินระดับความเข้มข้นสูงถึง 1 % (w/v) สำหรับระยะเวลาที่ให้มีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของกล้วยไม้และชิ้นส่วนที่นำมาชักนำ โดยระยะเวลาที่ใช้นานที่สุด คือ 10 วัน (Griesbach, 1981 ; 1985) การชักนำให้กล้วยไม้เกิดเป็นต้นพอลิพลอยด์มี 3 วิธีการหลัก คือ

1.2.4.1 ใช้เข็มแทงบริเวณตาซึ่งปรากฏอยู่บนลำลูกกล้วย (pseudobulb) หลายๆ ครั้ง แล้วนำไปแช่ในสารละลายโคลชิซิน วิธีการนี้ Menninger (1963) ใช้ทดลองกับกล้วยไม้พันธุ์ Brockhurs ซึ่งเป็นกล้วยไม้ในสกุล *Cymbidium* และใช้สารละลายโคลชิซินเข้มข้น 1% (w/v) พบว่าส่วนยอดที่เกิดจากตาเป็นเตตระพลอยด์ 2 ตา จากทั้งหมด 3 ตา

1.2.4.2 ชักนำโดยใช้ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใส่โคลชิซินในอาหารเพาะเลี้ยงโดยตรง วิธีนี้มักใช้กับชิ้นส่วนของกล้วยไม้ที่เป็น PLBs (Silva et al., 2000) โพรโทคอร์ม (Griesbach, 1981; 1985) และแคลลัส (มลวิภา, 2521) สำหรับเทคนิคนี้ต้องเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ในขั้นตอนการเตรียมอาหารต้องผสมสารโคลชิซินลงไปด้วย การผสมสารโคลชิซินในอาหารเพาะเลี้ยงแล้วนำอาหารเพาะเลี้ยงไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อโดยนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอจะทำให้โคลชิซินบางส่วนสลายไป ทำให้ระดับความเข้มข้นของโคลชิซินในอาหารเปลี่ยนแปลงไปจากระดับที่ต้องการ Silva และคณะ (2000) แก้ปัญหานี้โดยนำอาหารเพาะเลี้ยงไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อโดยนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอก่อน จากนั้นกรองสารละลายโคลชิซินผ่านกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงนำมาเติมลงในอาหารให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ หากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในสภาพปลอดเชื้อ ต้องวางภาชนะเพาะเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่า ในที่มืดตลอดเวลา เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดต้องย้ายชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อของกล้วยไม้ไปเลี้ยงต่อในอาหารที่ไม่เติมโคลชิซิน การทดลองของนักวิจัยที่ใช้วิธีการนี้ในการชักนำกล้วยไม้ให้เกิดพอลิพลอยด์ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถชักนำให้กล้วยไม้เกิดเป็นต้นพอลิพลอยด์ได้ในเปอร์เซ็นต์สูงสุด คือ 0.05 % (w/v) ส่วนระยะเวลาขึ้นกับชนิดของกล้วยไม้ กล่าวคือ PLBs ของกล้วยไม้ *Cattleya intermedia* Lindl. ใช้ระยะเวลา 8 วัน (Silva et al., 2000) PLBs ของกล้วยไม้พันธุ์ Silky ซึ่งเป็นกล้วยไม้ลูกผสมในสกุล *Cymbidium* ใช้ระยะเวลา 1 สัปดาห์ (Kim et al., 2003) และโพรโทคอร์มของกล้วยไม้ในสกุล *Phalaenopsis* ใช้ระยะเวลา 10 วัน (Griesbach ,1985) ฯลฯ

1.2.4.3 ใช้ต้นกล้วยไม้ขนาดเล็กแช่ในสารละลายโคลชิซิน วิธีการนี้ Vichiato และคณะ (2007) ทดลองในกล้วยไม้ *Dendrobium nobile* Lindl. ให้เกิดเป็นต้นเตตระพลอยด์ พบว่า วิธีการนี้มีข้อดีคือ ต้นกล้วยไม้ทั้งต้นมีความทนต่อสารโคลชิซินมากกว่าชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อที่ถูกแยกออกมาจากต้น โพรโทคอร์มและแคลลัส ทำให้ไม่มีการตายเกิดขึ้น แม้จะใช้ความเข้มข้นของโคลชิซินสูงถึง 0.1% (w/v) ซึ่งความเข้มข้นนี้สามารถชักนำให้เกิดกล้วยไม้เตตระพลอยด์ได้ดีที่สุดเมื่อให้โคลชิซินนาน 96 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามวิธีการนี้อาจทำให้มีโอกาสเกิดไคเมอราได้สูง

1.2.5 การตรวจสอบความเป็นพืชพอลิพลอยด์

1.2.5.1 การศึกษาจำนวนโครโมโซม

พืชที่เป็นพอลิพลอยด์คือ พืชที่มีชุดโครโมโซมมากกว่า 2 ชุด (Campbell et al., 1999) ดังนั้น วิธีการใช้ตรวจสอบพืชพอลิพลอยด์ที่ถูกต้องและชัดเจนที่สุด คือการศึกษาจำนวนโครโมโซม (สาริณี, 2538 ; Saradhuldhat and Silayai, 2001) อย่างไรก็ตาม การศึกษาจำนวนโครโมโซม ซึ่งส่วนใหญ่ใช้เซลล์จากปลายราก เป็นวิธีการศึกษาที่ค่อนข้างทำได้ยาก เนื่องจากต้องเก็บรากที่มีเซลล์กำลังแบ่งตัวอยู่ และต้องหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บราก เพื่อให้ได้เซลล์ที่แบ่งตัวอยู่ในระยะเมทาเฟส นอกจากนี้พืชที่มีจำนวนโครโมโซมมาก หรือมีโครโมโซมขนาดเล็กจะทำให้มีโอกาสนับจำนวนได้ผิดพลาดมากขึ้น

1.2.5.2 การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอ

ปัจจุบันการเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งวัดด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ (flow cytometer) เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการบอกความแตกต่างระหว่างพืชที่เป็นดิพลอยด์และพอลิพลอยด์ได้อย่างรวดเร็ว (Suda, 2004) นักวิจัยหลายท่านใช้เทคนิคนี้ตรวจสอบระดับพลอย-ดีของพืช ดังเช่น Hanson และคณะ (2001) Tuna และคณะ (2001) Blakesley และคณะ (2002) Bonos และคณะ (2002) Emshwiller (2002) Kadota และNiimi (2002) และEeckhuat และคณะ (2004) ฯลฯ โดยการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอมีวิธีการดังนี้ (Bennett and Leitch, 1995)

การหั่นเนื้อเยื่อพืช : ในการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ มักใช้ใบเป็นเนื้อเยื่อในการตรวจวัด โดยต้องแยกนิวเคลียสจากเซลล์พืช ทำโดยหั่นเนื้อเยื่อพืชให้ละเอียดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยสารที่มีสมบัติทำให้นิวเคลียสแยกจากไซโทพลาซึมง่ายขึ้นและได้ปริมาณมากเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังช่วยคงสภาพนิวเคลียสไม่

ให้แตก ป้องกันไม่ให้ดีเอ็นเอถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส (endonuclease) และช่วยให้การติดสีของดีเอ็นเอดีขึ้น (Loureiro et al, 2006) บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มีหลายสูตร ได้แก่ Galbraith's buffer, LB01, Arumuganathan and Earle, Marie's nuclear isolation buffer, Otto buffer และ Tris-$MgCl_2$ (Doležel and Bartoš, 2005) อย่างไรก็ตาม พืชแต่ละชนิดและชนิดของเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน เหมาะสมกับบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องทดลองหาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับพืชที่ต้องการแยกนิวเคลียส เนื่องจากไม่มีบัฟเฟอร์ชนิดใดที่ดีที่สุดกับพืชทุกชนิด (Loureiro et al., 2006)

การกรองนิวเคลียส : กรองนิวเคลียสที่แยกได้ผ่านตะแกรงไนลอน (nylon mesh) เพื่อแยกเศษเนื้อเยื่อและเศษเซลล์ออก อย่างไรก็ตามใบแก่ของพืชจำพวกกล้วยไม้ภายในเซลล์จะมีผลึกแคลเซียมออกซาเลตอยู่ปริมาณมาก ผลึกนี้สามารถผ่านตะแกรงไนลอนไปรบกวนการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ และอาจไปอุดตันระบบการไหลของของเหลวในเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ได้ ป้องกันปัญหานี้ได้โดยกรองนิวเคลียสผ่านสำลีที่อุดอยู่ในปลายปิเปตขนาด 5 มิลลิลิตร ซึ่งเรียกว่า cotton column วิธีการนี้มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณผลึกแคลเซียมออกซาเลตได้มากกว่าการกรองผ่านตะแกรงไนลอนอย่างมีนัยสำคัญ (Lee et al., 2005)

การย้อมสีดีเอ็นเอ : นิวเคลียสที่ผ่านการกรองแล้วจะนำมาย้อมด้วยสีย้อมดีเอ็นเอ สีที่นิยมใช้มี 2 ชนิด คือ ไดอะมิดิโนฟีนิลอินโดล (4′,6-diamidino-2-phenylindole; DAPI) และโพรพิเดียมไอโอไดด์ (propidium iodide ; PI) ในปัจจุบันนิยมใช้ PI ในการวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอมากกว่า DAPI เนื่องจากมีความไว (sensitivity) ต่อการจับกับดีเอ็นเอ โดยไม่ขึ้นกับชนิดของเบสในสายของดีเอ็นเอ (Bennett and Leitch, 1995) หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ที่ย่อยอาร์เอ็นเอคือ อาร์เอ็นเอส (RNase) เป็นการป้องกันการรบกวนของอาร์เอ็นเอในขั้นวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอ การเติมเอนไซม์อาร์เอ็นเอส อาจเติมขณะหั่นเนื้อเยื่อพืชหรือพร้อมกับการเติมสีย้อมก็ได้

การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ : นำนิวเคลียสที่ผ่านการย้อมสีดีเอ็นเอแล้วไปวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ ซึ่งจำเป็นต้องมีการปรับเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ด้วยนิวเคลียสของพืชมาตรฐานที่ทราบปริมาณดีเอ็นเอที่แน่นอน ขั้นตอนนี้มีความสำคัญต่อการเทียบหาปริมาณดีเอ็นเอของพืชตัวอย่างให้ถูกต้องแม่นยำขึ้น พืชมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ *Oryza sativa* IR36, *Vigna radiata* cv. "Berken", *Lactuca sativa* cv. "Grand Rapids", *Zea mays* AV35, *Pisum sativum* cv. "Minerva Maple", *Nicotiana tabacum* cv. "Xanthi", *Secale cereale* cv. "Petkus Spring", *Secale cereale* "inbred line JIC3030010", *Sorghum bicolor* "Pioneer 8595", *Triticum durum* cv. "Langdon", *Vicia faba* cv. "GS011", *Triticum aestivum* cv. "Chinese Spring" (Bennett), *Triticum aestivum* cv. "Chinese Spring" (Tuleen) และ *Allium cepa* cv. "Ailsa Craig" (Johnston et al., 1999) นอกจากนี้อาจใช้ดีเอ็นเอ

จากนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่ (Arumuganathan and Earle, 1991) และปลาเทราซ์ (Atichat and Bunnag, 2007) ก็ได้เช่นกัน ในกรณีที่ศึกษาปริมาณดีเอ็นเอของพืชตัวอย่างโดยวิธีการหั่นเนื้อเยื่อใบพืชตัวอย่างและพืชมาตรฐานรวมกัน ต้องเลือกใช้พืชมาตรฐานที่มีปริมาณ ดีเอ็นเอต่างจากของพืชตัวอย่าง เพื่อไม่ให้ฮีสโตแกรมของพืชทั้งสองชนิดเกิดการซ้อนทับกัน ฮีสโตแกรมของนิวเคลียสที่ปรากฏทางขวาจะมีปริมาณดีเอ็นมากกว่าฮีสโตแกรมที่ปรากฏทางซ้าย

สำหรับการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้ม้าวิ่ง เมื่อใช้ *Pisum sativum* เป็นพืชมาตรฐาน พบว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งมีปริมาณดีเอ็นเอ 2C เท่ากับ 13.49 pg (Lin et al., 2001) แต่เมื่อใช้นิวเคลียสจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่เป็นมาตรฐาน กลับพบว่า กล้วยไม้ม้าวิ่งมีปริมาณดีเอ็นเอ 2C เท่ากับ 9.25 pg (Jones et al., 1998) ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเกิดขึ้นได้เมื่อใช้เครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ต่างเครื่องกัน ดังนั้นหากต้องการเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอของพืชต่างระดับพลอยดีหรือพืชต่างชนิดกัน ต้องวิเคราะห์ในครั้งเดียวกันและใช้เครื่องโฟลไซโท-มิเตอร์เครื่องเดียวกัน (Doležel et al., 1998)

1.2.5.3 การศึกษาขนาดของนิวเคลียส

เมื่อจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น ขนาดนิวเคลียสจะใหญ่ขึ้นและส่งผลให้เซลล์ขยายขนาด เพื่อรักษาอัตราส่วนระหว่างปริมาตรของไซโทพลาซึมกับปริมาตรของนิวเคลียสให้คงที่ (Fan et al., 2003) การศึกษาเปรียบเทียบขนาดนิวเคลียสระหว่างพืชที่เป็นดิพลอยด์กับพืชที่เป็นพอลิพลอยด์ยังไม่มีรายงาน มีเพียงการศึกษาใน Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*) ที่เป็นแฮพลอยด์ (n = x = 29 - 30) ดิพลอยด์ (2n = 2x = 56 - 58) ทริพลอยด์ (2n = 3x = 87) และเตตระพลอยด์ (2n = 4x = 116) พบว่าปริมาตรของนิวเคลียสเซลล์เม็ดเลือดแดงมีค่าเท่ากับ 4.1, 8.7, 13.7 และ 19.5 ลูกบาศก์ไมโครเมตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าปริมาตรของนิวเคลียสเพิ่มขึ้นตามจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น (Pandian and Koteeswaran, 1999)

1.2.5.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เมื่อเกิดการเพิ่มของจำนวนโครโมโซมจะทำให้มีจำนวนอัลลีลของยีนเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีนมากขึ้นด้วย (Fan et al., 2003) โดยทั่วไปพืชพอลิพลอยด์มักจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไปจากต้นดิพลอยด์ปกติ จึงสามารถนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางลักษณะมาใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกพืชพอลิพอยด์ออกจากพืชดิพลอยด์

1.2.5.4.1 ขนาดปากใบ : พืชที่เป็นพอลิพลอยด์มีขนาดปากใบซึ่งวัดได้จากขนาดของเซลล์คุมใหญ่กว่าปากใบของพืชที่เป็นดิพลอยด์หรือต้นปกติ (Sohoo et al., 1970; Przywara et al., 1988; Silva et al., 2000; Saradhuldhat and Silayai, 2001; Kadota and Niimi, 2002; Fan et al., 2003; Beck et al., 2003)

1.5.5.4.2 ความหนาแน่นของปากใบ : พืชที่เป็นพอลิพลอยด์มีความหนาแน่นของปากใบน้อยกว่าความหนาแน่นของปากใบของพืชที่เป็นดิพลอยด์ (นิตย์ศรีและอำไพ, 2541; Silva et al., 2000; Saradhuldhat and Silayai, 2001; Beck et al., 2003)

1.5.5.4.3 จำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุม : การศึกษาในต้นหม่อนเตตระ-พลอยด์ พบว่ามีจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุมเพิ่มขึ้นจากต้นดิพลอยด์ (นิตย์ศรีและอำไพ, 2541) ซึ่งผลเป็นเช่นเดียวกับการศึกษาในบัวบก (Chulalaksananukul and Chimnoi, 1999) นอกจากนี้ Ranney (2007) สนับสนุนว่าสามารถนำจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุมมาใช้ตรวจสอบการเป็นพืชพอลิพลอยด์ได้เช่นกัน

1.5.5.4.4 ขนาดของละอองเรณู : จากการศึกษาขนาดของละอองเรณูของต้นถั่ว chickpeas พบว่าละอองเรณูของต้นที่เป็นพอลิพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่าละอองเรณูของต้นดิพลอยด์อย่างชัดเจน (Sohoo et al., 1970)

1.5.5.4.5 การงอกของละอองเรณู : จากการศึกษาในกล้วยไม้ *Dendrobium superbiens* พบว่าละอองเรณูของต้นที่เป็นออลโลเตตระพลอยด์มีเปอร์เซนต์การงอกมากกว่าละอองเรณูของต้นที่เป็นดิพลอยด์ (สาริณี, 2538)

1.3 วัตถุประสงค์

1.3.1 เพื่อศึกษาผลของโคลชิซินต่อการตายและการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่ง

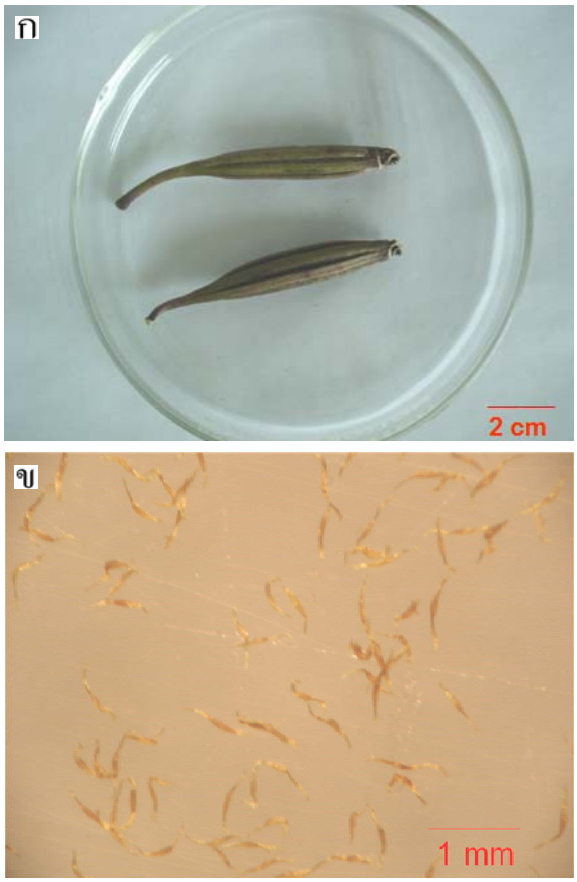
1.3.2 เพื่อศึกษาผลของสารโคลชิซินต่อการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในกล้วยไม้ม้าวิ่ง

1.3.3 เพื่อศึกษาความแตกต่างของจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก ปริมาณดีเอ็นเอ ขนาดนิวเคลียสของเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบ ความยาวของเซลล์คุมและความหนาแน่นของปากใบ ระหว่างกล้วยไม้ม้าวิ่งต้นดิพลอยด์กับต้นพอลิพลอยด์

บทที่ 2
วิธีการทดลอง

พืชทดลอง

ฝักกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ได้จากสำรวจและเก็บจากชั้น 5 ของน้ำตกโตนงาช้าง จังหวัดสงขลา โดยเลือกฝักแก่พอประมาณ สีน้ำตาลอมเขียว เมล็ดมีสีน้ำตาลอ่อน ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ลักษณะฝักและเมล็ดของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่นำมาเพาะเลี้ยง
ก : ฝัก ข : เมล็ด

สารเคมี

1. สารเคมีทั่วไป

1.1 น้ำยาล้างจาน
1.2 เอธานอล 70 % และ 95 %
1.3 น้ำยาเช็ดเลนส์
1.4 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 1 N

2. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเมล็ด

2.1 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร VW (1949) ดัดแปลง ดังปรากฏในภาคผนวก

2.2 ผงวุ้นตรานางเงือก™

2.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 N

3. สารที่ใช้ชักนำพืชให้เกิดพอลิพลอยด์

3.1 โคลชิซิน EC No. 2005985 ผลิตโดยบริษัท Fluka BioChemika

4. สารที่ใช้ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

4.1 แอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน (α - bromonaphthalene)

4.2 กรดกลาเชียลอะซิติก (glacial acetic acid)

4.3 สีย้อมโครโมโซม carbol fuchsin

4.4 หยดน้ำมัน (oil immersion)

5. สารที่ใช้ศึกษาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์

5.1 สารละลายที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์และสีย้อมดีเอ็นเอ Cystain UV Ploidy ของบริษัท Partec GmbH

วัสดุ

1. กระดาษกรอง 110 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Whatman® No. 1093 110
2. กระดาษอลูมิเนียม
3. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น กระบอกตวง แท่งแก้วคน ขวดเพาะเลี้ยง ปิเปต บีกเกอร์ จานเลี้ยงเชื้อ
4. เครื่องนับเซลล์
5. ช้อนตักสาร
6. ชุดกรองสาร พร้อมกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Domnick Hunter Asypor
7. ชุดกรอง Partect 30 μm CellTrics
8. เทอร์โมมิเตอร์
9. ไมโครมิเตอร์สำหรับเลนส์ใกล้ตา (ocular micrometer)
10. ไมโครมิเตอร์สำหรับแท่นวางวัตถุ (stage micrometer)
11. วัสดุที่ใช้ในการย้ายเลี้ยง เช่น มีดผ่าตัด ปากคีบ จานเลี้ยงเชื้อ ฯลฯ

12. วัสดุที่ใช้ในการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก ได้แก่ ใบมีด แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์ เข็มเขี่ย ดินสอปลายเรียบ ปากคีบ ขวดแก้วขนาดเล็ก (vial) ฯลฯ

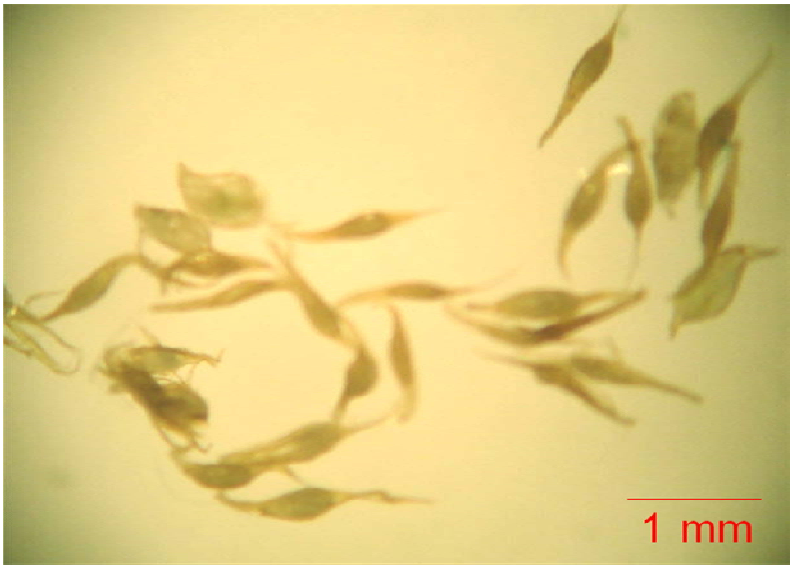
อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น CH-BI45 - 2
2. กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ ยี่ห้อ ZEISS รุ่น Stemi DV4
3. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ ยี่ห้อ Nikon รุ่น UFX – DX II
4. กล้องถ่ายรูปดิจิตอล ยี่ห้อ Sony รุ่น DSC - W5
5. เครื่องชั่งสารละเอียด 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ OHAUS รุ่น Scout™ Pro
6. เครื่องชั่งสารละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น AL204
7. เครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ ยี่ห้อ Partec รุ่น PA II
8. เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง ยี่ห้อ ORION รุ่น SA 520
9. เครื่องวัดความเข้มแสง ยี่ห้อ Microvolt Integrator รุ่น MV2
10. เครื่องเขย่า (shaker)
11. ชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยงและหลอดไฟฟลูออเรสเซ็นต์ ยี่ห้อ PHILIPS ขนาด 18 และ 36 วัตต์
12. ตู้อบเครื่องแก้ว ยี่ห้อ termaks รุ่น T 1119 UV
13. ตู้ย้ายเนื้อเยื่อปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)
14. เตาอบไมโครเวฟ ยี่ห้อ Bestplus รุ่น MO-140
15. เตากวนแม่เหล็กไฟฟ้า ยี่ห้อ Framo® – Gerätetechnik รุ่น M21/1
16. หม้อนึ่งอัดไอ ผลิตโดยบริษัท Tomy Seiko Co., LTD. รุ่น SS-320

วิธีการทดลอง

การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

1. ตัดแต่งฝักกล้วยไม้ม้าวิ่ง โดยตัดส่วนของก้านและส่วนปลายฝักออกเล็กน้อย ล้างด้วยน้ำยาล้างจานและน้ำประปา 2 - 3 ครั้ง
2. นำฝักมาผ่านกระบวนการทำให้ปลอดเชื้อโดยจุ่มในเอธานอล 95 % ผ่านเปลวไฟ แล้ววางฝักในจานเลี้ยงเชื้อให้เอธานอลเผาไหม้ไปจนหมด ทำซ้ำ 2 ครั้ง
3. ตัดส่วนปลายและโคนฝักออกอีกเล็กน้อย จากนั้นผ่าเปิดฝักตามยาวแล้วเปิดฝักออกด้วยปากคีบ
4. นำเมล็ดมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเหลวสูตร VW ดัดแปลงปริมาตร 50 มิลลิลิตร
5. วางขวดเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในห้องที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 17.72 µmol $m^{-2}s^{-1}$ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ประมาณ 25 วัน เมล็ดจะเจริญเป็นโพรโทคอร์มซึ่งเป็นระยะที่เอ็มบริโอแบ่งตัว มองเห็นมีลักษณะเป็นก้อนกลมอยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ด (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 โพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่ง หลังเพาะเลี้ยง 25 วัน

การชักนำกล้วยไม้ม้าวิ่งให้เกิดต้นพอลิพลอยด์

เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ม้าวิ่งในอาหารเหลวเป็นเวลา 25 วัน เอ็มบริโอในเมล็ดจะเจริญเป็นโพรโทคอร์มขนาดเล็กประมาณ 0.5 มิลลิเมตร จากนั้นนำโพรโทคอร์มที่ได้มาชักนำให้เกิดเป็นต้นพอลิพลอยด์ตามวิธีการ ดังนี้

1. เตรียมอาหารเหลวสูตร VW ดัดแปลง แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 45, 47.5, 49.5 และ 50 มิลลิลิตร อย่างละ 2 ขวด
2. ทำให้อาหารเหลวปลอดเชื้อโดยการนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที
3. เตรียมสารละลายโคลชิซินให้มีความเข้มข้น 1% (w/v) ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
4. เติมสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 1 % (w/v) ปริมาตร 0, 0.5, 2.5 และ 5 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว 50, 49.5, 47.5 และ 45 มิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งจะทำให้ได้อาหารเหลวที่มีสารโคลชิซินเข้มข้น 0, 0.01 , 0.05 และ 0.10 % (w/v) ตามลำดับ
5. กรองโพรโทคอร์มด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
6. นำโพรโทคอร์มที่กรองได้ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอาหารเหลวที่มีสารโคลชิซินเข้มข้น 0, 0.01 , 0.05 และ 0.10 % (w/v) หุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียมเพื่อป้องกันการสลายของสารโคลชิซินเมื่อได้รับแสง วางบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 และ 10 วัน
7. เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ใช้หลอดหยดปลอดเชื้อดูดอาหารเหลวที่มีโพรโทคอร์มประมาณ 1 มิลลิลิตร จากแต่ละชุดการทดลอง ใส่บนอาหารวุ้นสูตรเดิมที่ไม่มีโคลชิซินในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 เซนติเมตร ชุดการทดลองละ 6 จาน
8. วางจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดบนชั้นเลี้ยง ให้แสงที่มีความเข้มประมาณ 17.72 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องที่มีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส

การศึกษาผลของโคลชิซินต่อการตายและการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์ม

1. สังเกตการเปลี่ยนแปลงของโพรโทคอร์ม หลังจากย้ายเลี้ยงลงในอาหารวุ้นที่ปราศจากสารโคลชิซินเป็นเวลา 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 สัปดาห์ โดยบันทึกจำนวนโพรโทคอร์มที่ตาย และจำนวนโพรโทคอร์มที่เจริญเข้าสู่ระยะการเจริญต่างๆ
2. วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตายของโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลาเท่ากัน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น 14 สัปดาห์ โดยใช้ One - Way ANOVA และ DMRT ตามลำดับ และเปรียบเทียบ

เปอร์เซ็นต์การตายของโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นเท่ากัน นาน 5 วัน และ 10 วัน โดยใช้ t - test วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS

3. วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของโพรโทคอร์มที่อยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้น จากโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลาเท่ากัน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น 14 สัปดาห์ โดยใช้ One – Way ANOVA และ DMRT ตามลำดับ และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของโพรโทคอร์มที่มีรากเกิดขึ้น จากโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นเท่ากัน นาน 5 วันและ 10 วัน โดยใช้ t - test วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS
4. หลังเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 14 สัปดาห์ ย้ายต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งมาเลี้ยงบนอาหารวุ้น ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 8 ออนซ์ เพื่อให้เจริญเติบโตเป็นต้น

การตรวจสอบความเป็นพอลิพลอยด์

1. การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

สุ่มต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งจากทั้ง 8 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 20 ต้น เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก ด้วยวิธี Feulgen squash (Sharma and Sharma, 1980) ตามขั้นตอนดังนี้

1.1 **การเตรียมราก (pretreatment) :** เลือกรากที่ปลายรากมีสีเขียวใส ตัดรากช่วงเวลา 9.00 – 11.00 น. ยาวประมาณ 1 - 2 เซนติเมตร แช่ในสารละลายอิ่มตัวแอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน เก็บที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 **การตรึงราก (fixation) :** เทสารละลายอิ่มตัวแอลฟาโบรโมแนฟทาลีนทิ้ง แล้วใส่น้ำยาตรึงราก (fixative) ซึ่งมีส่วนผสมของเอธานอล 95 % และกรดกลาเชียลอะซีติก อัตราส่วน 3 : 1 เก็บที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3 **การเก็บรักษาราก (storage) :** เทน้ำยาตรึงรากทิ้ง ล้างด้วยเอธานอล 95 % 2 – 3 ครั้ง แล้วเก็บรากไว้ในเอธานอล 70 % ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการจะศึกษาจำนวนโครโมโซม ให้ทำตามขั้นตอนต่อไป

1.4 **การไฮโดรไลซิส (hydrolysis) :** นำรากที่เก็บไว้ในเอธานอล 70 % ออกมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 – 3 ครั้ง แล้วนำไปไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N ที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10 นาที

1.5 **การย้อมสีราก (staining) :** หลังจากไฮโดรไลซ์รากแล้ว นำรากมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 – 3 ครั้ง ซับด้วยกระดาษซับ แล้วแช่ในสีย้อม carbol fuchsin เป็นเวลา 3 – 4 ชั่วโมง ล้างรากด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำไปเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม หากไม่สามารถศึกษาได้ทันทีหลังย้อมสีราก ให้เก็บรากไว้ในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 16 องศา-เซลเซียส

1.6 **การเตรียมสไลด์ (slide preparation) :** นำรากที่ผ่านการย้อมสีแล้วมาวางบนแผ่นสไลด์ ใช้ใบมีดโกนตัดให้เหลือเฉพาะส่วนปลายรากยาวประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร หยดสี carbol fuchsin 1 - 2 หยด ปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ แล้วเคาะด้วยดินสอปลายเรียบเพื่อให้โครโมโซมกระจายตัว นำสไลด์ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสที่โครโมโซมกระจายดีจำนวน 10 เซลล์ นับจำนวนโครโมโซม บันทึกภาพโครโมโซมจากเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายตัวดีที่สุด โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

2. การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์

ศึกษาปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ม้าวิ่ง โดยใช้เครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ ยี่ห้อ Partec รุ่น PA II ของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาเทราท์เป็นมาตรฐาน วิธีการศึกษามีดังนี้ (Atichart and Bunnag, 2007)

2.1 ตัดใบกล้วยไม้ม้าวิ่งที่อ่อนที่สุด จากกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นต้นดิพลอยด์ ต้นเตระพลอยด์ และต้นที่อาจเป็นออกตะพลอยด์ ต้นละประมาณ 50 มิลลิกรัม วางบนจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร

2.2 เติมสารละลาย Cystain UV Ploidy 0.5 มิลลิลิตร แล้วใช้ใบมีดโกนหั่นเนื้อเยื่อใบกล้วยไม้ม้าวิ่งให้เป็นชิ้นเล็กๆ บางประมาณ 0.5 มิลลิเมตร เพื่อให้นิวเคลียสหลุดออกมา

2.3 เติมสารละลาย Cystain UV Ploidy เพิ่มอีก 1.5 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที

2.4 กรองนิวเคลียสที่แยกออกมาได้ ผ่านชุดกรอง Partect 30 μm CellTrics

2.5 วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของนิวเคลียสที่กรองได้ด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์

2.6 เปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอของต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดีต่างกัน

3. การศึกษาขนาดนิวเคลียสของเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง

ศึกษาขนาดของนิวเคลียสของเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง ตามวิธีการดังนี้

3.1 ตัดใบที่ 3 นับจากยอด (นับใบยอดเป็นใบแรกเมื่อมีความยาวมากกว่า 0.5 เซนติเมตร จากกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นต้นดิพลอยด์ ต้นเตตระพลอยด์ และต้นที่อาจเป็นออกตะพลอยด์

3.2 ใช้มีดโกนตัดด้านหลังใบตามแนวยาวของใบให้บางที่สุด เพื่อให้ได้ชั้นอีพิเดอร์มิส

3.3 นำแผ่นใบที่ตัดได้วางบนแผ่นสไลด์ ย้อมด้วยสี carbol fuchsin 1 – 2 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์

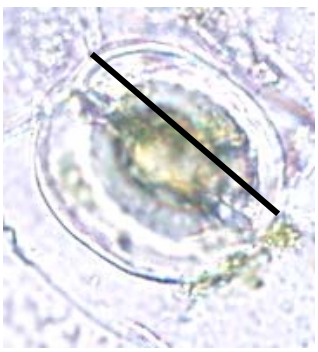
3.4 นำสไลด์ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า วัดความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียสของเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิส จำนวน 30 นิวเคลียสต่อหนึ่งใบ ใช้ต้นละ 1 ใบ จากกล้วยไม้ม้าวิ่งต้นดิพลอยด์และต้นเตตระพลอยด์อย่างละ 10 ต้น ส่วนต้นที่คาดว่าเป็นออกตะพลอยด์ใช้ 5 ต้น เนื่องจากมีต้นจำนวนจำกัดและบางต้นมีแผ่นใบขนาดเล็กเกินไปไม่สามารถนำมาศึกษาได้

3.5 หาค่าเฉลี่ยความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียส วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียสระหว่างกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดีต่างกัน โดยใช้ One – Way ANOVA และ DMRT ตามลำดับ

การศึกษาความแตกต่างของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดีต่างกัน

1. การศึกษาความยาวของเซลล์คุมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง

การวัดความยาวของเซลล์คุม แสดงในภาพที่ 6



แทนความยาว

ภาพที่ 6 การวัดความยาวของเซลล์คุม

ศึกษาความยาวของเซลล์คุมตามวิธีการดังนี้ (Przywara et al., 1988)

1.1 ตัดใบที่ 3 นับจากยอด (นับใบยอดเป็นใบแรกเมื่อมีความยาวมากกว่า 0.5 มิลลิเมตร) จากกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นต้นดิพลอยด์ ต้นเตตระพลอยด์ และต้นที่อาจเป็นออกตะพลอยด์

1.2 ตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาดประมาณ 0.4 เซนติเมตร x 0.7 เซนติเมตร

1.3 ใช้มีดโกนตัดด้านหลังใบตามแนวยาวของใบให้บางที่สุด เพื่อให้ได้ชั้นอีพิเดอร์มิส

1.4 นำแผ่นใบที่ตัดได้วางบนแผ่นสไลด์ หยดด้วยสีซาฟรานิน ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า

1.5 วัดความยาวของเซลล์คุม (ภาพที่ 6) จำนวน 20 เซลล์ต่อหนึ่งใบ ใช้ต้นละ 1 ใบ จากกล้วยไม้ม้าวิ่งต้นดิพลอยด์และต้นเตตระพลอยด์ อย่างละ 10 ต้น ต้นที่อาจเป็นออกตะพลอยด์ 5 ต้น

1.6 หาค่าเฉลี่ยของความยาวเซลล์คุม วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความยาวของเซลล์คุมระหว่างต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดีต่างกัน โดยใช้ One - Way ANOVA และ DMRT ตามลำดับ

2. การศึกษาความหนาแน่นของปากใบ

ศึกษาความหนาแน่นของปากใบโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Cramer (1999) ดังนี้

2.1 เตรียมสไลด์เช่นเดียวกับการศึกษาความยาวของเซลล์คุม นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า

2.2 นับปากใบต่อหนึ่งสนามภาพซึ่งเป็นพื้นที่ทั้งหมดที่มองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1 สนามภาพมีพื้นที่เท่ากับ 2,189,286.5 ตารางไมโครเมตร) นับ 6 ตำแหน่งต่อหนึ่งแผ่นใบ หาค่าเฉลี่ยของจำนวนปากใบต่อหนึ่งสนามภาพ

2.3 คำนวณหาความหนาแน่นของปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร โดยใช้สูตร

$$\text{จำนวนปากใบต่อหนึ่งตารางมิลลิเมตร} = \frac{\text{จำนวนปากใบต่อหนึ่งสนามภาพ} \times 10^6}{2{,}189{,}286.5}$$

2.4 ศึกษาความหนาแน่นของปากใบ โดยใช้ต้นละ 1 ใบ จากกล้วยไม้ม้าวิ่งต้นดิพลอยด์และต้นเตตระพลอยด์ อย่างละ 10 ต้น ต้นที่อาจเป็นออกตะพลอยด์ 5 ต้น

2.5 หาค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นของปากใบ วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความหนาแน่นของปากใบระหว่างต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดีต่างกัน โดยใช้ One – Way ANOVA และ DMRT ตามลำดับ

บทที่ 3
ผลการวิจัย

เมื่อนำเมล็ดกล้วยไม้ม้าวิ่งมาเพาะในอาหารเหลวสูตร VW ดัดแปลง พบว่าเอ็มบริโอจะมีการแบ่งเซลล์ทำให้มีลักษณะบวมออกเกิดเป็นโพรโทคอร์มรูปร่างค่อนข้างกลมอยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ด จากนั้นนำโพรโทคอร์มที่ได้มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากผลของโคลชิซิน ซึ่งการศึกษาผลของโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่ง จำเป็นต้องทราบลำดับของการเจริญเติบโต และลักษณะรูปร่างของโพรโทคอร์มที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละระยะ

การเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่ง

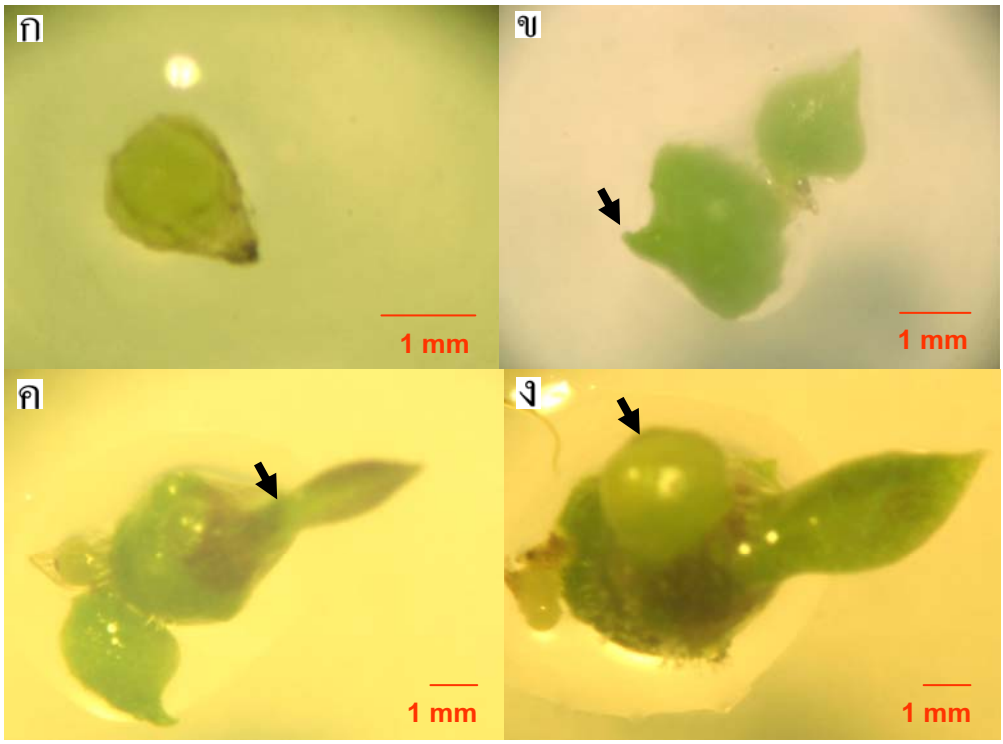
หลังจากย้ายโพรโทคอร์มทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับโคลชิซินจากอาหารเหลวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นในจานเลี้ยงเชื้อ พบว่าโพรโทคอร์มจะมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ สังเกตการเจริญเติบโตได้จากขนาดของโพรโทคอร์มที่โตขึ้น และมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างที่มีรูปแบบแน่นอน จำแนกระยะการเจริญเติบโตได้ 4 ระยะ ตามลำดับ ดังนี้

ระยะการเจริญเติบโตที่ 1 เป็นระยะที่เอ็มบริโอในเมล็ดเริ่มแบ่งเซลล์จนกระทั่งเป็นก้อน ส่วนใหญ่มีลักษณะค่อนข้างกลม (ภาพที่ 7ก) เมื่อโพรโทคอร์มมีขนาดใหญ่ขึ้น เปลือกหุ้มเมล็ดที่เป็นเส้นใยจะขาดออกจากกัน บางโพรโทคอร์มประกอบด้วยเซลล์ที่จับกันอย่างหลวมๆ ทำให้มีลักษณะคล้ายแคลลัสซึ่งเป็นก้อนฟู รูปร่างไม่แน่นอน นอกจากนี้ยัง พบว่าโพรโทคอร์มของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นก้อนฟูบางส่วนเปลี่ยนแปลงลักษณะจนคล้ายกับมี 2 - 4 โพรโทคอร์มเชื่อมติดกัน แต่ละส่วนของโพรโทคอร์มสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่สมบูรณ์ และสามารถหลุดออกจากกันได้

ระยะการเจริญเติบโตที่ 2 โพรโทคอร์มในระยะการเจริญเติบโตที่ 1 ซึ่งเซลล์ที่จับกันหลวมๆ จับตัวกันแน่นมากขึ้น ทำให้มีลักษณะค่อนข้างกลมมากขึ้น และเริ่มมียอดแหลมปรากฏในด้านที่จะเจริญเป็นส่วนต้น (ภาพที่ 7ข) จนกระทั่งยอดแหลมเจริญจนกลายเป็นใบที่สังเกตเห็นแผ่นใบได้ชัดเจน

ระยะการเจริญเติบโตที่ 3 เริ่มสังเกตเห็นใบที่ 2 หลังจากนั้นจะเจริญเติบโตต่อจนอาจมีใบที่ 3 เกิดขึ้น แต่ยังไม่ปรากฏราก (ภาพที่ 7ค)

ระยะการเจริญเติบโตที่ 4 เริ่มมีตุ่มรากปรากฏ จนกระทั่งรากยื่นยาวออกมาเห็นได้ชัดเจน รากมักเกิดบริเวณด้านข้างของโพรโทคอร์ม ไม่ได้เกิดบริเวณด้านปลายตรงข้ามกับส่วนยอด (ภาพที่ 7ง)



ภาพที่ 7 โพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งในระยะการเจริญเติบโต 4 ระยะ

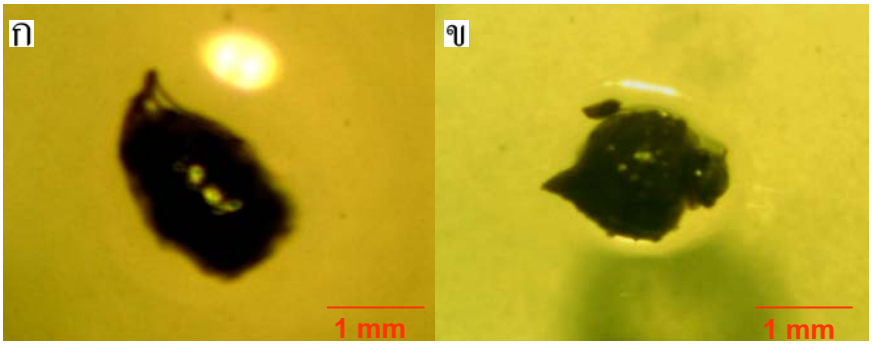
ก : ระยะการเจริญเติบโตที่ 1 อายุ 4 สัปดาห์ รูปร่างค่อนข้างกลม

ข : ระยะการเจริญเติบโตที่ 2 อายุ 8 สัปดาห์ มียอดแหลมเกิดขึ้น (ลูกศรชี้)

ค : ระยะการเจริญเติบโตที่ 3 อายุ 10 สัปดาห์ มีใบที่ 2 เกิดขึ้น (ลูกศรชี้)

ง : ระยะการเจริญเติบโตที่ 4 อายุ 14 สัปดาห์ มีตุ่มรากเกิดขึ้น (ลูกศรชี้)

ระหว่างการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น โพรโทคอร์มบางส่วนจะตายไป โดยมีสีซีดลง และค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีดำ การตายสามารถเกิดได้ทุกระยะของการเจริญเติบเติบโต ส่วนใหญ่มักตายในระยะการเจริญเติบโตที่ 1 (ภาพที่ 8ก) และระยะการเจริญเติบโตที่ 2 (ภาพที่ 8ข)



ภาพที่ 8 โพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ตายในระยะการเจริญเติบโตต่างๆ

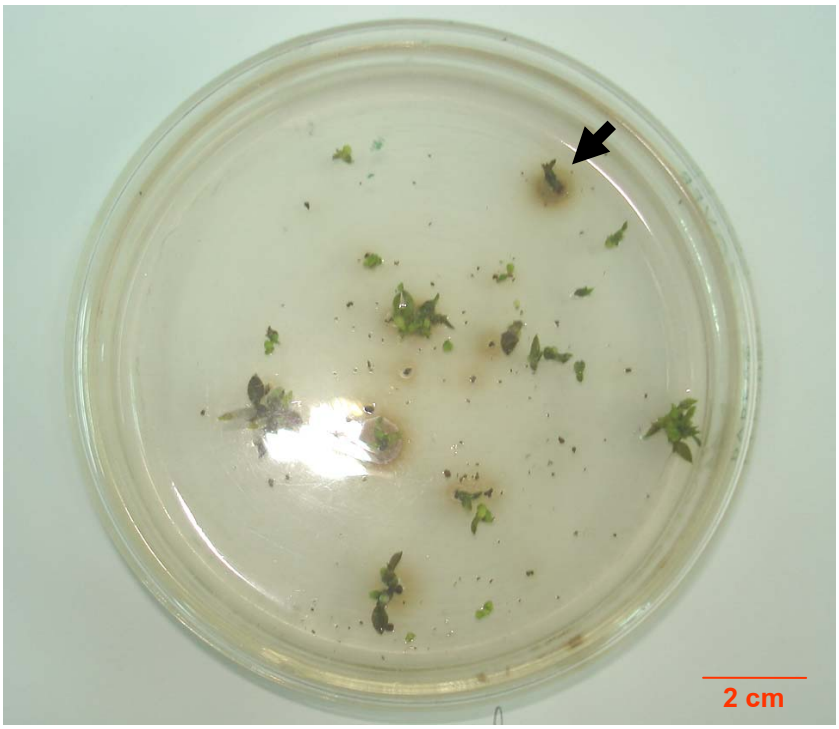
ก : ระยะที่ 1 ข : ระยะที่ 2

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ม้าวิ่งในอาหารเหลวสูตร VW ดัดแปลง เป็นเวลา 25 วัน แล้วย้ายมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรเดิมในจานเลี้ยงเชื้อ พบว่าโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งเจริญเติบโตค่อนข้างช้า โดยใช้เวลาประมาณ 14 สัปดาห์ จึงจะมีรากเกิดขึ้นเป็นต้นที่สมบูรณ์

ผลของโคลชิซินต่อการตายและการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่ง

ผลของโคลชิซินต่อการตายของโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่ง

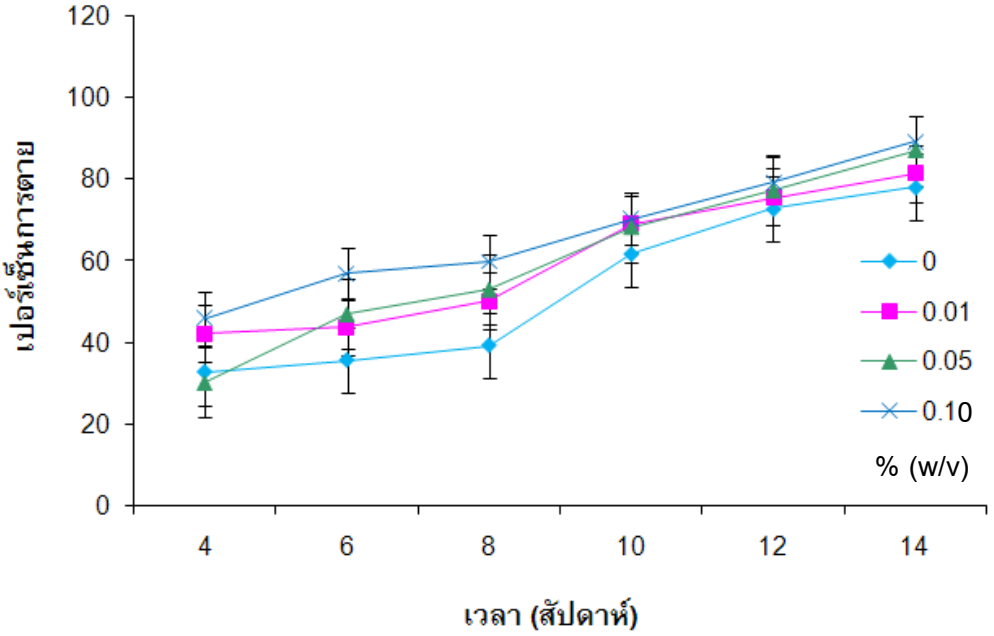
หลังจากย้ายโพรโทคอร์มที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่ไม่เติมและเติมโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่ไม่มีโคลชิซิน พบว่าทั้งโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ ส่วนใหญ่มีการปล่อยสารสีน้ำตาลออกมา (ภาพที่ 9) ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวกฟีนอล (phenolic compound)



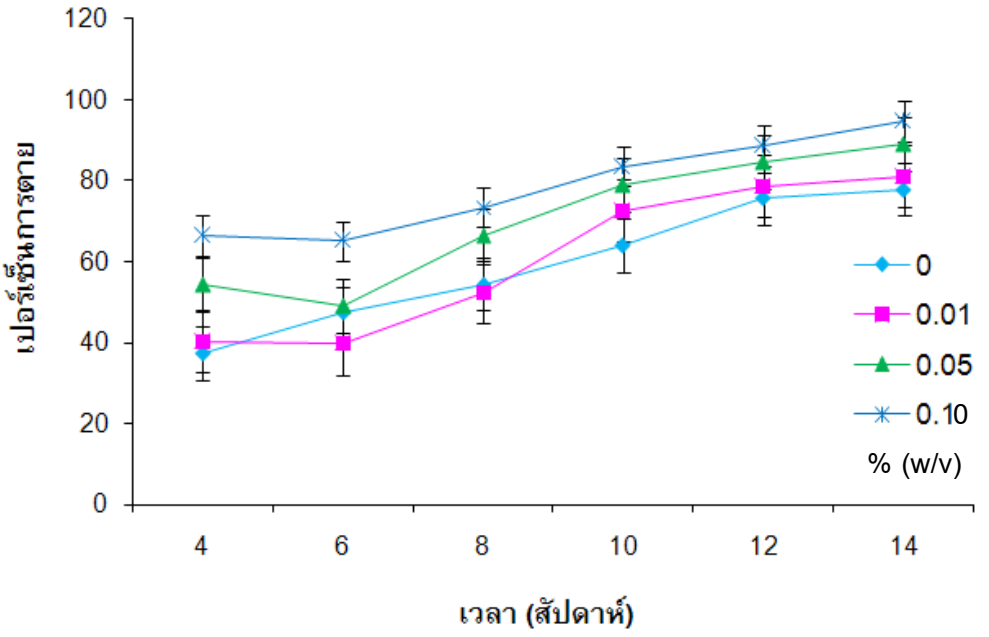
ภาพที่ 9 โพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ปล่อยสารประกอบฟีนอลสีน้ำตาล (ศรชี้)

เมื่อเลี้ยงโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งบนอาหารวุ้นนาน 4 สัปดาห์ จากนั้นสังเกตการตายและการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่ง 14 สัปดาห์ พบว่าการตายของโพรโทคอร์มทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับโคลชิซินมีแนวโน้มเหมือนกัน โดยเมื่อเพาะเลี้ยงนานขึ้น โพรโทคอร์มจะตายเพิ่มขึ้น และโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0.10 % (w/v) ตายมากที่สุด และเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 10 ถึง 14 สัปดาห์ พบว่าโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินทุกความเข้มข้นมีการตายใกล้เคียงกัน โดยโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับโคลชิซินมีเปอร์เซ็นต์การตายน้อยที่สุด อย่างไรก็ตามทั้งโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินทุกความเข้มข้นมีการตายสูงกว่า 75 %

จากการสังเกตการตายของโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นนาน 4 สัปดาห์ พบว่าการตายของโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินทุกความเข้มข้น ต่ำกว่า 50 % โดยโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.05 % (w/v) ตายใกล้เคียงกับโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับโคลชิซิน ต่ำกว่าการตายของโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซิน 0.01 % (w/v) และ 0.10 % (w/v) ซึ่งมีการตายใกล้เคียงกัน หลังจากเพาะเลี้ยงนานขึ้น โพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินทุกความเข้มข้นตายเพิ่มมากขึ้น โดยมีแนวโน้มว่าโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นสูงตายมากกว่าโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่ำ จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 14 โพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินทุกความเข้มข้นตายใกล้เคียงกันมาก แต่อย่างไรก็ตามโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นสูงตายมากกว่าโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่ำ (กราฟที่ 1) การตายของโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเป็นเวลา 10 วัน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นนาน 4 สัปดาห์ (กราฟที่ 2) พบว่าโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.01 % (w/v) มีการตายต่ำกว่า 50 % โพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.05 % (w/v) ตายประมาณ 55 % ส่วนโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.10 % (w/v) มีการตายสูงมากเกือบ 70 % จนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 14 โพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ มีแนวโน้มการตายเช่นเดียวกับโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเป็นระยะเวลานาน 5 วัน



กราฟที่ 1 เปอร์เซ็นต์การตายของโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 5 วัน (⊺ หมายถึง SD)



กราฟที่ 2 เปอร์เซ็นต์การตายของโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 10 วัน (⊺ หมายถึง SD)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การตายของโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซิน นาน 5 และ 10 วัน หลังจากการย้ายเลี้ยงบนอาหารวุ้น 14 สัปดาห์

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (% w/v)	เปอร์เซ็นต์การตายของโพรโทคอร์ม (Mean ± SE)	
	ได้รับนาน 5 วัน	ได้รับนาน 10 วัน
0	78.13 ± 1.97[a]	77.83 ± 1.36[a]
0.01	81.58 ± 0.90[a]	81.10 ± 3.00[a]
0.05	87.07 ± 1.98[b]	89.03 ± 0.75[b]
0.10	89.25 ± 0.79[b]	94.76 ± 0.82[c*]

หมายเหตุ

ตัวอักษรในคอลัมน์เดียวกันที่ต่างกัน แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) ทดสอบโดย DMRT

* ค่าเปอร์เซ็นต์การตายในแถวเดียวกัน แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ทดสอบโดย t - test

หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารวุ้น 14 สัปดาห์ พบว่าโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้นข้นต่างๆ นาน 5 วัน ตายใกล้เคียงกัน โดยโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับโคลชิซินตายต่ำสุด คือ 78.13 ± 1.97 % ไม่แตกต่างจากการตายของโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้นข้น 0.01 % (w/v) ซึ่งมีการตาย 81.58 ± 0.90 % เมื่อความเข้มข้นของโคลชิซินสูงขึ้นเป็น 0.05 % (w/v) และ 0.10 % (w/v) การตายของโพรโทคอร์มสูงขึ้นแตกต่างจากโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.01 % (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) โดยโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.05 % (w/v) มีการตาย 87.07 ± 1.98 % ไม่แตกต่างจากการตายของโพรโท-คอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.10 % (w/v) ที่มีการตาย 89.25 ± 0.79 %

สำหรับโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้นข้นต่างๆ นาน 10 วัน พบว่าโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับโคลชิซินมีการตายต่ำสุดคือ 77.83 ± 1.36 % ไม่แตกต่างจากการตายของโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้นข้น 0.01% (w/v) ซึ่งตาย 81.10 ± 3.00 % เมื่อความเข้มข้นของโคลชิซินสูงขึ้นเป็น 0.05 % (w/v) และ 0.10 % (w/v) การตายของโพรโทคอร์มสูงขึ้นแตกต่างจากโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.01 % (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) โดยโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.05 % (w/v) มีการตาย 89.03 ± 0.75 % แตกต่างจากการตายของโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.10 % (w/v) ซึ่งตาย 94.76 ± 0.82 % อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตายของโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นเท่ากัน เป็นเวลา 5 วันและ 10 วัน พบว่าการให้โคลชิซิน 5 วันและ 10 วัน ทำให้มีการตายของโพรโทคอร์มไม่แตกต่างกัน ยกเว้นความเข้มข้น 0.10 % (w/v) เมื่อได้รับนาน 10 วัน ทำให้มีการตายสูงกว่าที่ได้รับนาน 5 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1)

ผลของโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่ง

หลังเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มบนอาหารวุ้นเป็นเวลา 14 สัปดาห์ พบว่าโพรโท-คอร์มที่รอดตายมีการเจริญเติบโตอยู่ในทุกระยะ แต่ส่วนใหญ่อยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้น เปอร์เซ็นต์ของโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ นาน 5 วันและ 10 วัน ที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้น แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์โพรโทคอร์มที่เจริญอยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้น จากโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ หลังย้ายมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่ไม่มีโคลชิซิน 14 สัปดาห์

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (% w/v)	เปอร์เซ็นต์ของโพรโทคอร์มในระยะที่มีรากเกิดขึ้น (Mean ± SE)	
	ได้รับนาน 5 วัน	ได้รับนาน 10 วัน
0	7.67 ± 1.51[a]	4.75 ± 0.60[a]
0.01	5.60 ± 1.15[ab]	3.08 ± 0.17[ab]
0.05	3.71 ± 1.22[b]	1.88 ± 0.78[bc]
0.10	2.69 ± 0.51[b]	0.88 ± 0.35[c*]

หมายเหตุ

ตัวอักษรในคอลัมน์เดียวกันที่ต่างกัน แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) ทดสอบโดย DMRT

* ค่าเปอร์เซ็นต์การตายในแถวเดียวกัน แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ทดสอบโดย t - test

โพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ นาน 5 วัน หลังจากเลี้ยงบนอาหารวุ้นเป็นเวลา 14 สัปดาห์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของโคลชิซินสูงขึ้น ทำให้การเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มลดลง โดยโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับโคลชิซินมีการเจริญอยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้นสูงสุดคือ 7.67 ± 1.5 % ไม่แตกต่างจากโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.01 % (w/v) ซึ่งมีโพรโทคอร์มที่เจริญอยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้น 5.60 ± 1.15 % ส่วนโพรโทคอร์มที่ได้

รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 % (w/v) และ 0.10 % (w/v) มีการเจริญของโพรโทคอร์มไม่แตกต่างจากโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซิน 0.01 % (w/v) โดยมีโพรโทคอร์มที่เจริญอยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้นเป็น 3.71 ± 1.22 % และ 2.69 ± 0.51 % ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

โพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ นาน 10 วัน หลังจากเลี้ยงบนอาหารวุ้นเป็นเวลา 14 สัปดาห์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของโคลชิซินสูงขึ้น ทำให้การเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มลดลงเช่นกัน โดยโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับโคลชิซินเจริญอยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้นสูงสุดคือ 4.75 ± 0.60 % แตกต่างจากโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินทุกความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ โพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.01 % (w/v) มีโพรโทคอร์มที่เจริญอยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้น 3.08 ± 0.17 % ไม่แตกต่างจากโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 % (w/v) ซึ่งมีโพรโทคอร์มที่เจริญอยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้น 1.88 ± 0.78 % ส่วนโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซิน 0.10 % (w/v) มีโพรโทคอร์มที่เจริญอยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้นเป็น 0.88 ± 0.35 % ไม่แตกต่างจากโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซิน 0.05 % (w/v) แต่แตกต่างจากโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซิน 0.01 % (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของโพรโทคอร์มที่เจริญอยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้นจากโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเป็นเวลา 5 วันและ 10 วัน พบว่าเมื่อให้โคลชิซิน นาน 5 วัน และ 10 วัน ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ของโพรโทคอร์มที่อยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้นไม่แตกต่างกัน ยกเว้นความเข้มข้น 0.10 % (w/v) ที่ได้รับนาน 10 วัน ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ของโพรโทคอร์มที่เจริญอยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้น น้อยกว่าที่ได้รับนาน 5 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2)

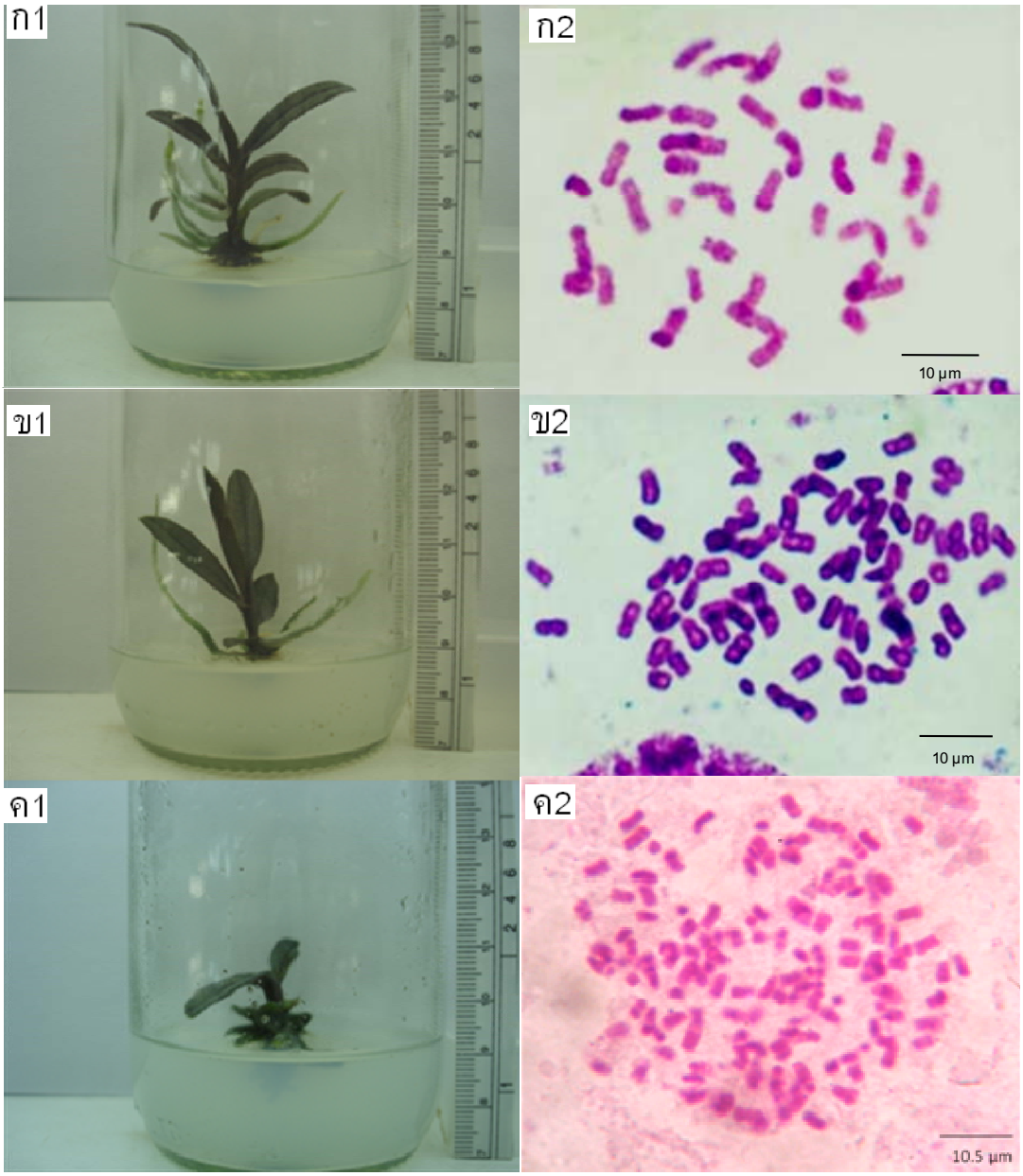
การตรวจสอบความเป็นพอลิพลอยด์

1. การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

เมื่อสังเกตลักษณะภายนอกของต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากโพรโทคอร์มทั้งที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ พบว่า มี 2 แบบ คือ ต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีลักษณะปกติ โดยมีใบค่อนข้างเรียวยาว แผ่นใบบาง (ภาพที่ 10ก) และ ต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีลักษณะผิดปกติ คือมีใบค่อนข้างสั้น แผ่นใบหนา อวบน้ำ ใบซ้อนกันแน่น (ภาพที่ 10ข) เจริญเติบโตช้ากว่าต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีลักษณะปกติ

ภาพที่ 10 ลักษณะภายนอกของกล้วยไม้ม้าวิ่ง อายุ 2 ปี 3 เดือน
ก : ต้นที่มีลักษณะปกติ ข : ต้นที่มีลักษณะผิดปกติ

จากการสุ่มตัวอย่างกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน และ 10 วัน มาศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก ชุดการทดลองละ 20 ต้น พบว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีลักษณะปกติมีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน โดยต้นที่มีลักษณะปกติบางต้น (ภาพที่ 11 ก1) มีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 38 (ภาพที่ 11 ก2) เป็นต้นดิพลอยด์ และต้นที่มีลักษณะปกติบางต้น (ภาพที่ 11 ข1) มีจำนวนโครโมโซม 2n = 4x = 76 (ภาพที่ 11 ข2) เป็นต้นเตตระพลอยด์ ส่วนกล้วยไม้ม้าวิ่งต้นที่มีลักษณะผิดปกติ (ภาพที่ 11 ค1) มีจำนวนโครโมโซมประมาณ 147 - 152 แท่ง (ภาพที่ 11 ค2) คาดว่าอาจเป็นต้นออกตะพลอยด์ (2n = 8x = 152) ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากได้แน่นอน เนื่องจากมีโครโมโซมจำนวนมาก และมีการซ้อนทับกันมาก นอกจากนี้รากที่นำมาใช้ในการศึกษามีจำนวนน้อย เนื่องจากเกิดรากช้ามาก และรากที่งอกออกมามักมีลักษณะแข็ง หนา พบเซลล์ที่อยู่ระหว่างการแบ่งเซลล์จำนวนน้อย



ภาพที่ 11 ลักษณะต้นและโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งอายุ 2 ปี 3 เดือน

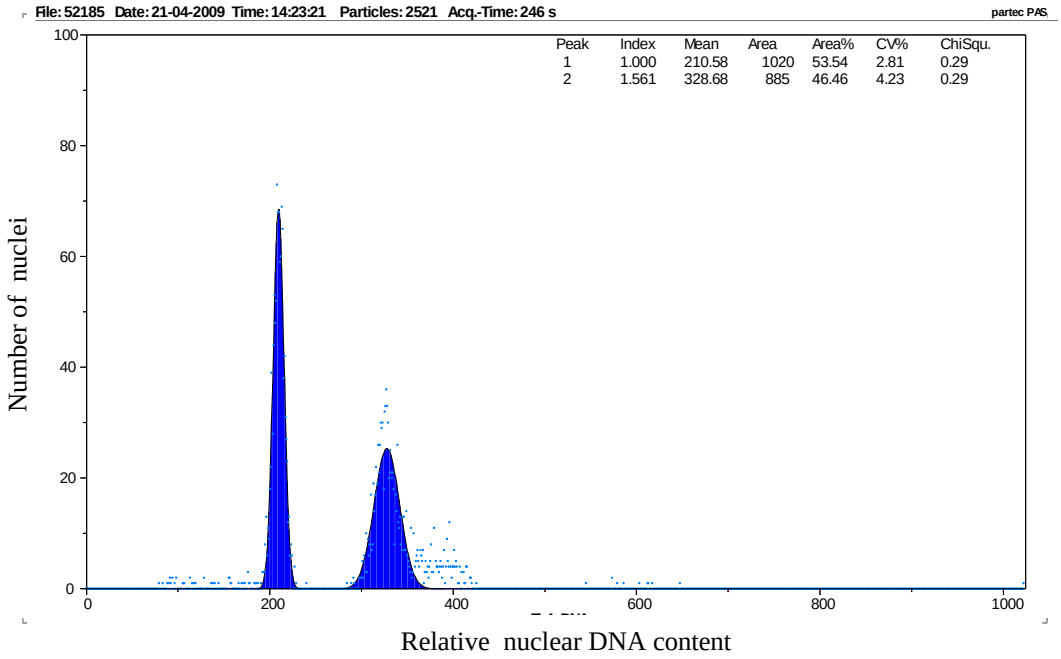
ก1 : ต้นดิพลอยด์ ก2 : โครโมโซม 2n = 38

ข1 : ต้นเตตระพลอยด์ ข2 : โครโมโซม 2n = 76

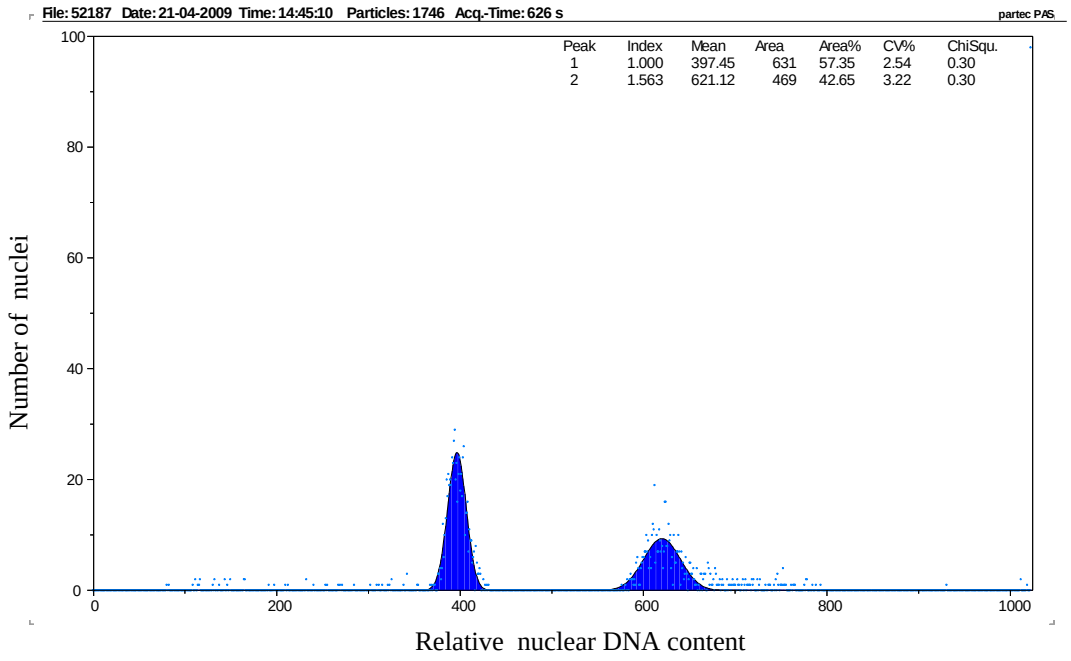
ค1 : ต้นที่อาจเป็นออกตะพลอยด์ ค2 : โครโมโซม 2n ≈ 150

2. การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์

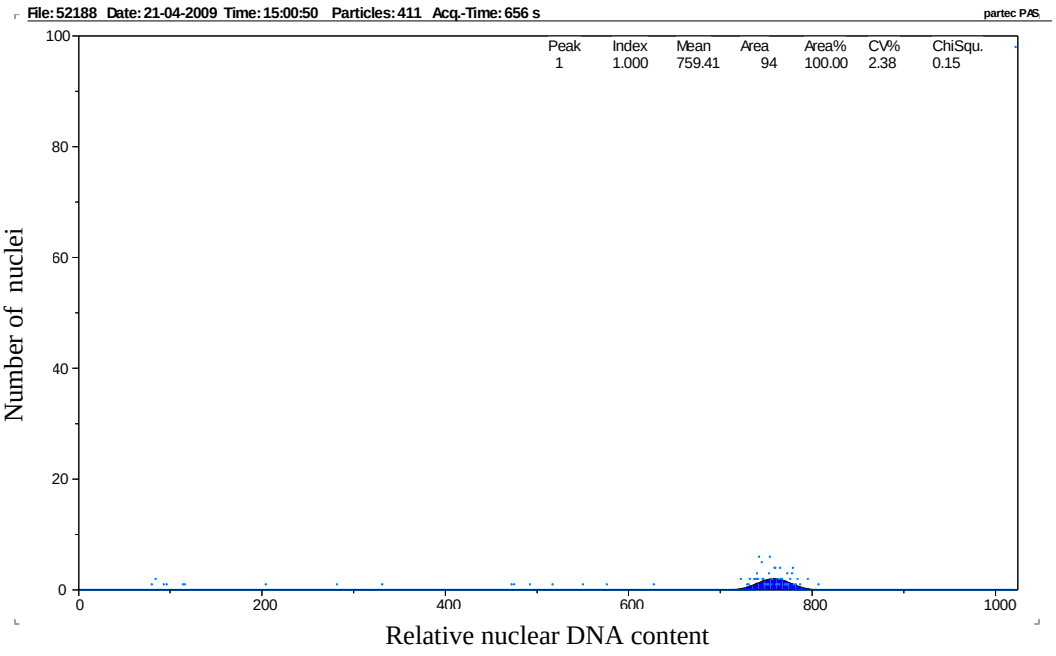
จากการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ม้าวิ่งด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ Partec รุ่น PA II โดยใช้ดีเอ็นเอในนิวเคลียสเม็ดเลือดแดงของปลาเทราท์เป็นมาตรฐาน พบว่านิวเคลียสจากเซลล์ของใบกล้วยไม้ม้าวิ่งดิพลอยด์ซึ่งมีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 38 มีฮีสโตแกรมขึ้นตรงตำแหน่งช่อง 200 และมีเซลล์ที่อยู่ในระหว่างการแบ่งเซลล์ทำให้มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น ปรากฏเป็นฮีสโตแกรมอยู่ทางขวาของฮีสโตแกรมแรก (ภาพที่ 12) นิวเคลียสจากเซลล์ของใบกล้วยไม้ม้าวิ่งเตตระพลอยด์ซึ่งมีจำนวนโครโมโซม 2n = 4x = 76 มีฮีสโตแกรมขึ้นตรงตำแหน่งซึ่งเป็น 2 เท่าของนิวเคลียสที่เป็นดิพลอยด์ คือ ช่อง 400 และมีเซลล์ที่อยู่ในระยะการแบ่งเซลล์ทำให้มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น ปรากฏเป็นฮีสโตแกรมอยู่ทางขวาของฮีสโตแกรมแรกเช่นกัน (ภาพที่ 13) และนิวเคลียสจากเซลล์ของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีลักษณะผิดปกติคาดว่าอาจเป็นต้นออกตะพลอยด์ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบจำนวนโครโมโซมที่แน่นอนได้ มีฮีสโตแกรมขึ้นตรงตำแหน่งใกล้ช่อง 800 ซึ่งนิวเคลียสเหล่านี้มีปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 4 เท่าของนิวเคลียสที่เป็นดิพลอยด์ (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 12 ฮีสโตแกรมปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์จากใบกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นต้นดิพลอยด์ตรวจสอบด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์



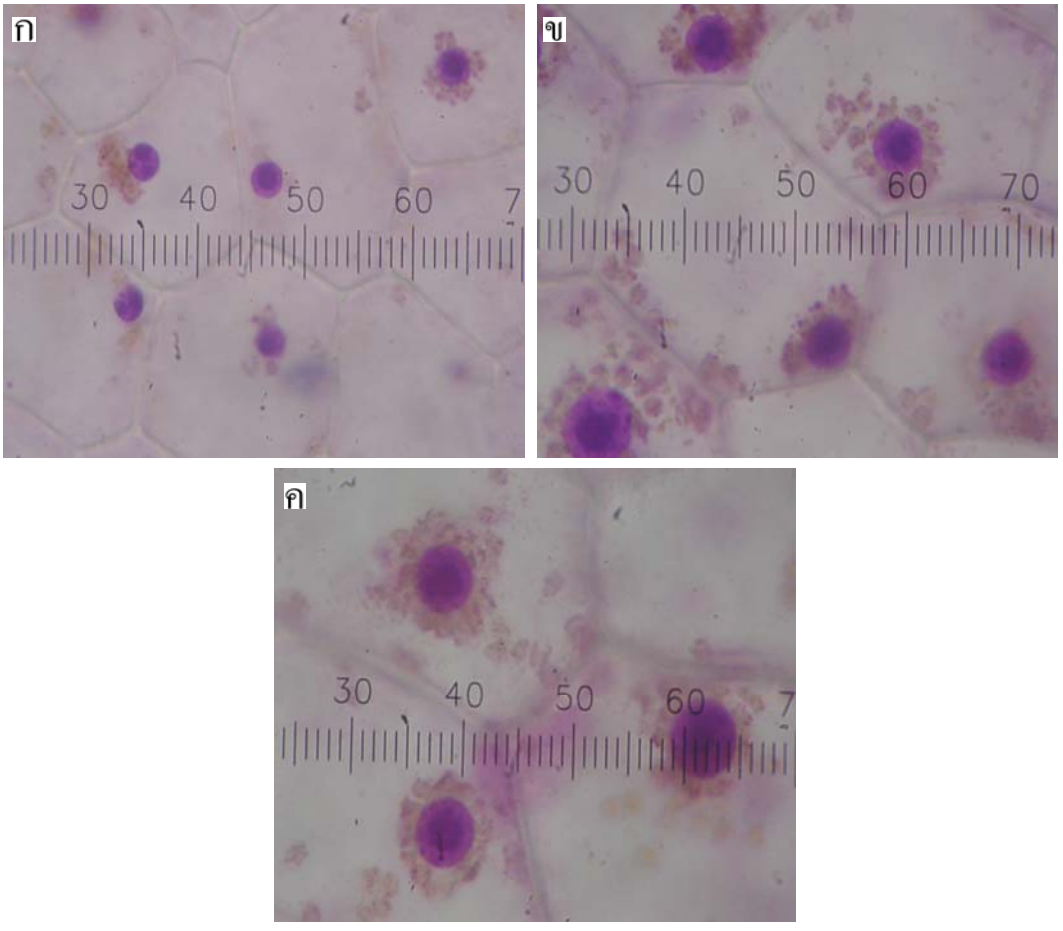
ภาพที่ 13 ฮีสโตแกรมปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์จากใบกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นต้นเตตระพลอยด์ ตรวจสอบด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์



ภาพที่ 14 ฮีสโตแกรมปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์จากใบกล้วยไม้ม้าวิ่งที่คาดว่าเป็นต้นออกตะพลอยด์ ตรวจสอบด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์

3. ศึกษาขนาดนิวเคลียสของเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง

เมื่อนำเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบของกล้วยไม้ม้าวิ่งดิพลอยด์ เตตระ-พลอยด์ และต้นที่คาดว่าเป็นออกตะพลอยด์ มาย้อมด้วยสี carbol fuchsin ทำให้สามารถเห็นนิวเคลียสติดสีม่วงเข้มได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 15) ซึ่งวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 7.63 ± 0.88, 10.82 ± 1.59 และ 14.23 ± 1.71 ไมโครเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่านิวเคลียสของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นต้นดิพลอยด์ ต้นเตตระพลอยด์และต้นที่อาจเป็นออกตะพลอยด์ มีขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 15 นิวเคลียสของเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง
ก : ต้นดิพลอยด์ ข : ต้นเตตระพลอยด์ ค : ต้นที่อาจเป็นออกตะพลอยด์

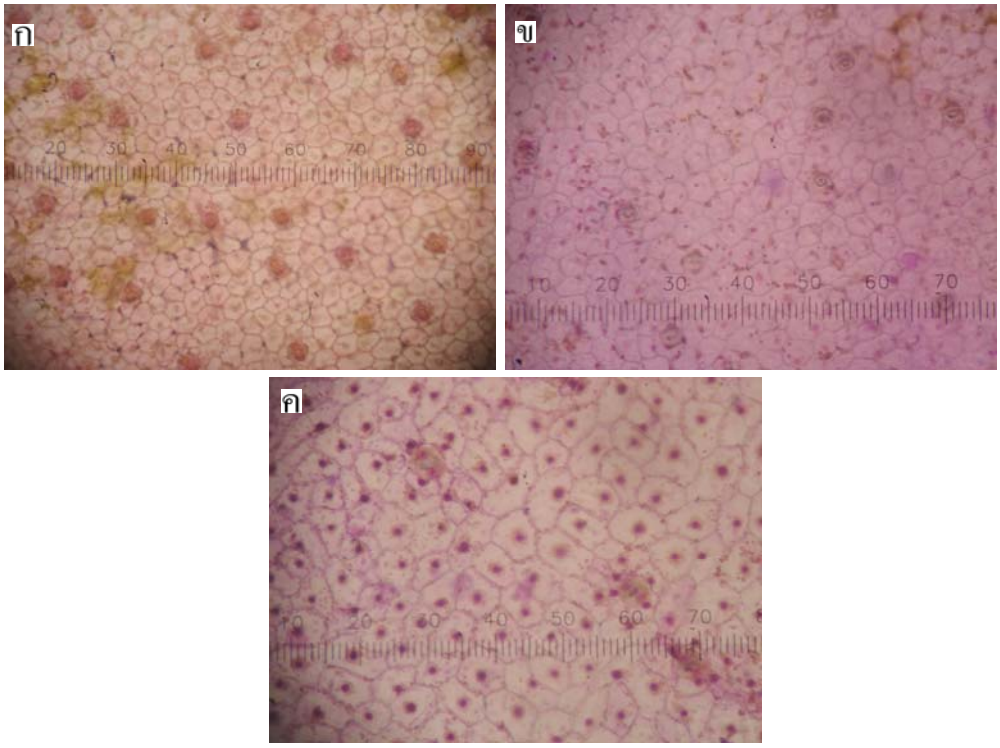
ตารางที่ 3 ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียสของเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง

กล้วยไม้ม้าวิ่ง	ความยาวเป็นไมโครเมตรของเส้นผ่านศูนย์กลางนิวเคลียส (Mean ± SD)
ต้นดิพลอยด์	7.63 ± 0.88[a]
ต้นเตตระพลอยด์	10.82 ± 1.59[b]
ต้นที่คาดว่าเป็นออกตะพลอยด์	14.23 ± 1.71[c]

หมายเหตุ

ตัวอักษรในคอลัมน์เดียวกันที่ต่างกัน แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) ทดสอบโดย DMRT

จากการสังเกตขนาดของเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบ พบว่าเซลล์ของกล้วยไม้ม้าวิ่งต้นที่คาดว่าเป็นออกตะพลอยด์มีขนาดใหญ่ที่สุด รองลงมาคือต้นเตตระพลอยด์ และต้นดิพลอยด์มีขนาดเซลล์เล็กที่สุด (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 เซลล์ชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง
ก : ต้นดิพลอยด์ ข : ต้นเตตระพลอยด์ ค : ต้นที่คาดว่าเป็นออกตะพลอยด์

จากผลการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก ปริมาณดีเอ็นเอ และขนาดนิวเคลียสของเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบ ช่วยสนับสนุนว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งต้นที่มีลักษณะผิดปกติอาจจะเป็นต้นออกตะพลอยด์

ผลของโคลชิซินต่อการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในกล้วยไม้ม้าวิ่ง

โคลชิซินทุกความเข้มข้นที่ให้แก่โพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งเป็นเวลา 5 วัน และ 10 วัน สามารถชักนำให้กล้วยไม้ม้าวิ่งเกิดเป็นต้นพอลิพลอยด์ได้ แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดแตกต่างกัน โดยโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.10 % (w/v) นานทั้ง 5 วันและ 10 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นเตตระพลอยด์สูงสุดคือ 30 % ส่วนโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.05 % (w/v) นาน 10 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นออกตะพลอยด์สูงสุดคือ 15 % อย่างไรก็ตามโพรโทคอร์มที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่ไม่เติมโคลชิซินนาน 10 วัน ก็พบต้นเตตระพลอยด์เช่นกันประมาณ 5 % (ตารางที่ 4)

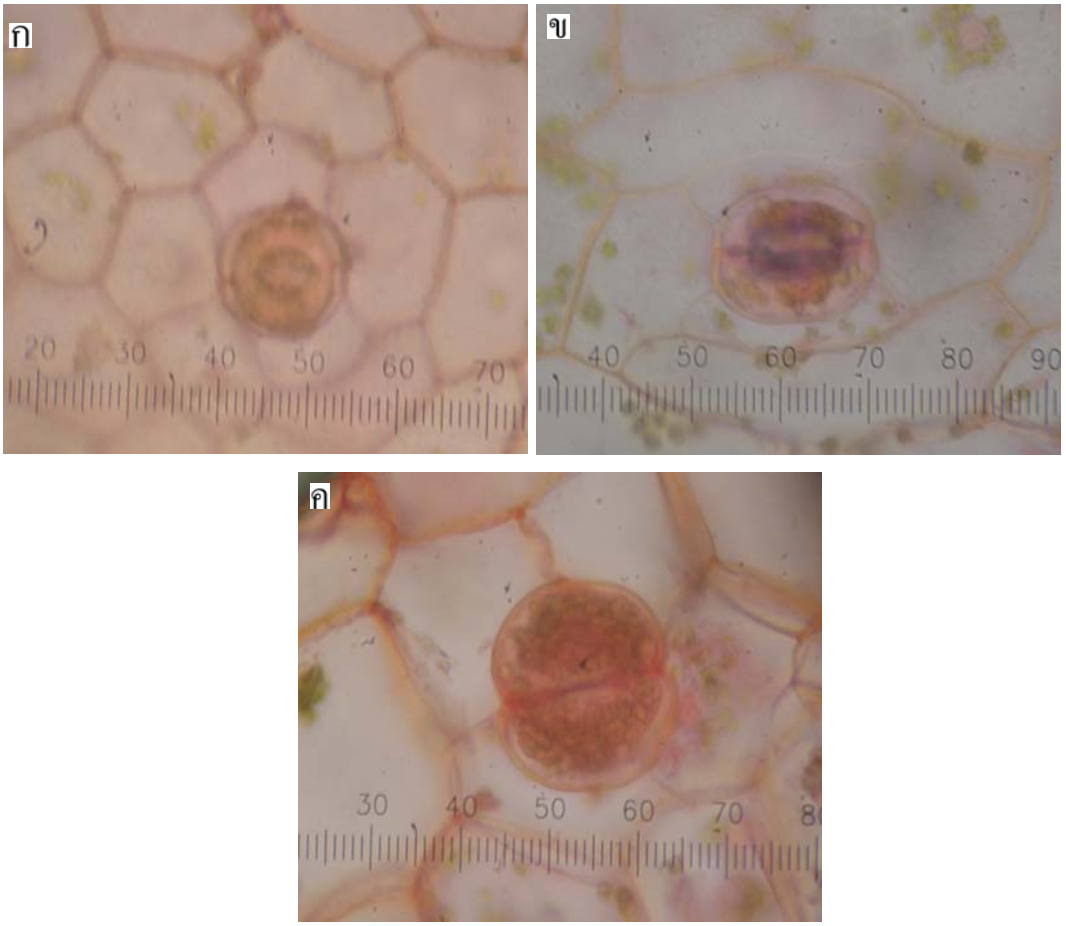
ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์กล้วยไม้ม้าวิ่งที่เกิดเป็นดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และออกตะพลอยด์ หลังจากโพรโทคอร์มได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วันและ 10 วัน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน % (w/v)	เปอร์เซ็นต์กล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดีต่างๆ หลังได้รับโคลชิซิน					
	นาน 5 วัน			นาน 10 วัน		
	ดิพลอยด์	เตตระพลอยด์	ออกตะพลอยด์	ดิพลอยด์	เตตระพลอยด์	ออกตะพลอยด์
0	100	0	0	95	5	0
0.01	75	25	0	90	10	0
0.05	70	20	10	65	20	15
0.10	70	30	0	60	30	10

การศึกษาปากใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง

1. การศึกษาความยาวของเซลล์คุมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง

ปากใบของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นต้นดิพลอยด์ ต้นเตตระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์มีขนาดแตกต่างกัน (ภาพที่ 17) เมื่อวัดความยาวของเซลล์คุม พบว่ามีความยาวเป็น 33.59 ± 2.55, 41.96 ± 3.68 และ 47.95 ± 5.88 ไมโครเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 5) จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเซลล์คุมของกล้วยไม้ม้าวิ่งต้นดิพลอยด์ ต้นเตตระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์ มีความยาวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 17 ปากใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง
ก : ต้นดิพลอยด์ ข : ต้นเตตระพลอยด์ ค : ต้นออกตะพลอยด์

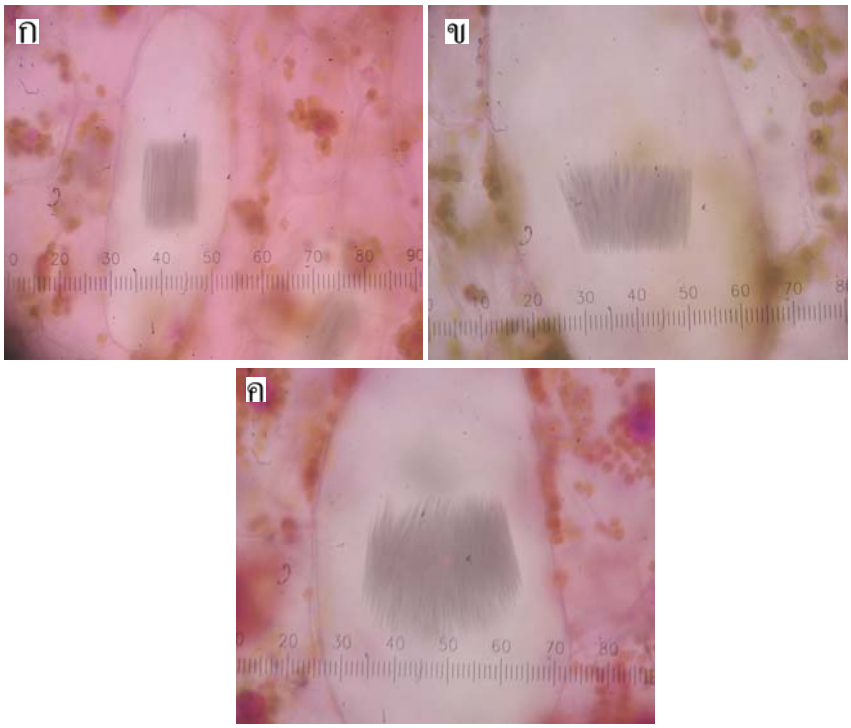
ตารางที่ 5 ความยาวของเซลล์คุมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นต้นดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์

กล้วยไม้ม้าวิ่ง	ค่าเฉลี่ยความยาวของเซลล์คุม (µm) (Mean ± SD)
ต้นดิพลอยด์	33.59 ± 2.55[a]
ต้นเตตระพลอยด์	41.96 ± 3.68[b]
ต้นออกตะพลอยด์	47.95 ± 5.88[c]

หมายเหตุ

ตัวอักษรในคอลัมน์เดียวกันที่ต่างกัน แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) ทดสอบโดย DMRT

ในเนื้อเยื่อของใบกล้วยไม้ม้าวิ่ง สังเกตพบว่ามีเซลล์พิเศษที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ทั่วไปกระจายอยู่ทั่วทั้งแผ่นใบ ภายในเซลล์พิเศษเหล่านี้มีการเก็บสะสมผลึกซึ่งมีลักษณะใส ปลายแหลมทั้งสองข้าง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณผลึกโดยภาพรวม พบว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งต้นดิพลอยด์มีปริมาณผลึกต่อเซลล์น้อยกว่าต้นเตตระพลอยด์และต้นออกตะพลอยด์อย่างชัดเจน ส่วนต้นเตตระพลอยด์และต้นออกตะพลอยด์มีปริมาณผลึกใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 18)

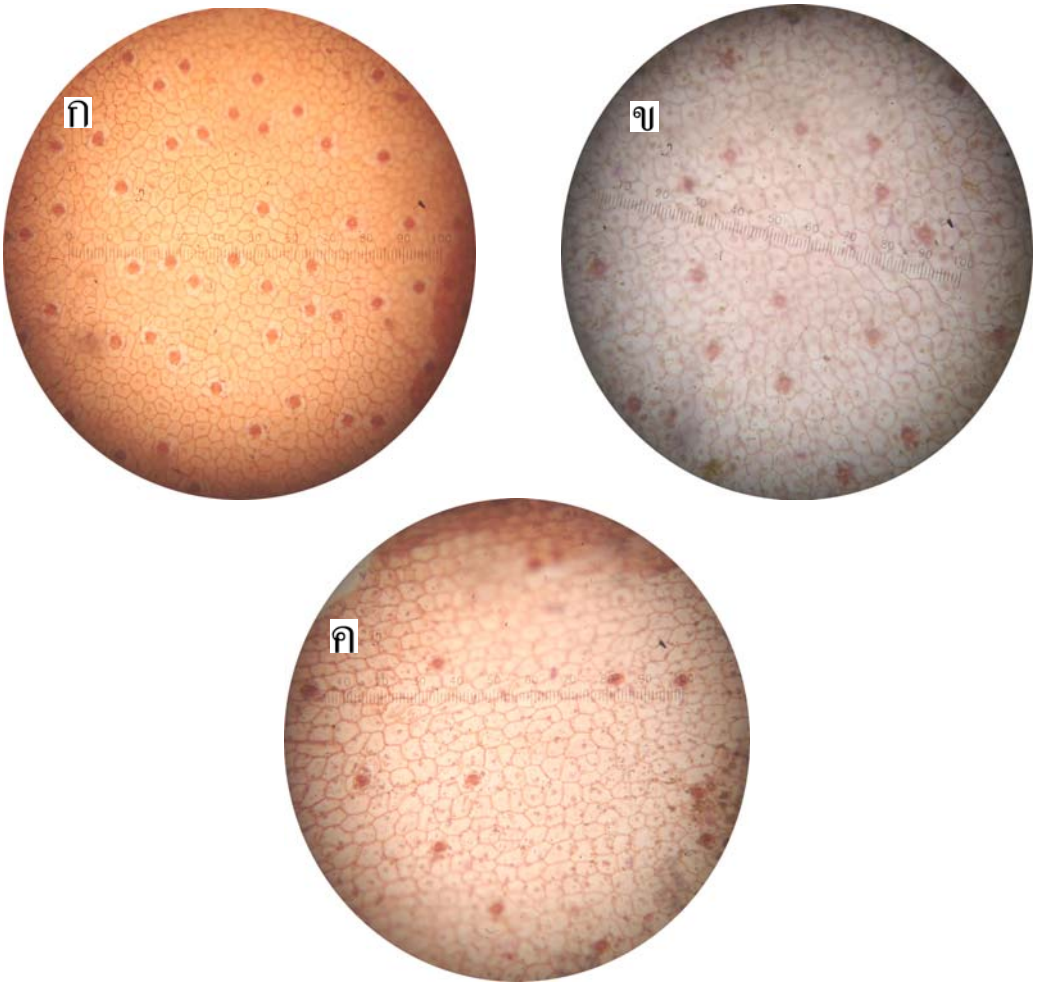


ภาพที่ 18 ผลึกที่พบในเซลล์ใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง

ก : ต้นดิพลอยด์ ข : ต้นเตตระพลอยด์ ค : ต้นออกตะพลอยด์

1. การศึกษาความหนาแน่นของปากใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง

จากการศึกษาความหนาแน่นของปากใบของต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งต้นดิพลอยด์ ต้นเตตระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์ พบว่ามีปากใบหนาแน่นแตกต่างกัน (ภาพที่ 19) เมื่อหาค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นของปากใบ พบว่ามีค่าเป็น 37.52 ± 10.17, 28.38 ± 6.91 และ 15.13 ± 2.58 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 6) จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าปากใบของกล้วยไม้ม้าวิ่งต้นดิพลอยด์ ต้นเตตระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์ มีความหนาแน่นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 19 ความหนาแน่นของปากใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง
ก : ต้นดิพลอยด์ ข : ต้นเตตระพลอยด์ ค : ต้นออกตะพลอยด์

ตารางที่ 6 ความหนาแน่นของปากใบของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นต้นดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์

กล้วยไม้ม้าวิ่ง	ค่าเฉลี่ยจำนวนปากใบต่อตาราง มิลลิเมตร (Mean ± SD)
ต้นดิพลอยด์	37.52 ± 10.17^{a}
ต้นเตตระพลอยด์	28.38 ± 6.91^{b}
ต้นออกตะพลอยด์	15.13 ± 2.58^{c}

หมายเหตุ

ตัวอักษรในคอลัมน์เดียวกันที่ต่างกัน แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) ทดสอบโดย DMRT

บทที่ 4
บทวิจารณ์

หลังเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ม้าวิ่งในอาหารเหลวสูตร VW ดัดแปลง เอ็มบริโอในเมล็ดจะแบ่งเซลล์เจริญเป็นโพรโทคอร์มรูปร่างค่อนข้างกลมขนาดเล็ก จากนั้นนำโพรโทคอร์มอายุ 25 วัน ซึ่งมีขนาดประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่ไม่เติมและเติมโคลชิซินเข้มข้น 0.01 , 0.05 และ 0.10 % (w/v) นาน 5 และ 10 วัน แล้วย้ายโพรโทคอร์มมาเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นที่ไม่เติมโคลชิซินในจานเลี้ยงเชื้อ จนครบ 14 สัปดาห์ สังเกตการตาย พบว่าทั้งโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินมีเปอร์เซ็นต์การตายสูง แม้โพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับโคลชิซินก็มีการตายสูงกว่า 75 % โพรโทคอร์มที่ตายส่วนใหญ่มีขนาดเล็ก ยังไม่แยกออกจากเยื่อหุ้มเมล็ด ผลการทดลองนี้แตกต่างจากที่สุลาวัลย์และสุมนทิพย์ (2551) เพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ม้าวิ่งในอาหารสูตร NDM จนเจริญเป็นโพรโทคอร์มที่มีขนาดประมาณ 2 - 3 มิลลิเมตร ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 เดือน แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ พบว่ามีการตายน้อย จึงเป็นไปได้ว่าขนาดของโพรโทคอร์มที่นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นมีผลต่อการเจริญเติบโตและการตาย โดยโพรโทคอร์มขนาดใหญ่กว่าจะรอดชีวิตได้มากกว่าขนาดเล็ก อาจเนื่องจากโพรโทคอร์มขนาดใหญ่ มีพัฒนาการทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยามากกว่าเมื่อเปลี่ยนสภาพการเลี้ยงจากอาหารเหลวเป็นอาหารวุ้นจึงสามารถปรับตัวและอยู่รอดได้มากกว่าโพรโทคอร์มขนาดเล็ก อย่างไรก็ตามการนำโพรโทคอร์มขนาดเล็กเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีโคลชิซินเพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นพอลิพลอยด์ ทุกเซลล์ของโพรโทคอร์มจะได้รับโคลชิซินอย่างทั่วถึงจึงทำให้ได้ต้นพอลิพลอยด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนโครโมโซมเหมือนกันทั้งต้น ในขณะที่การใช้โพรโทคอร์มขนาดใหญ่จะทำให้มีโอกาสเกิดต้นที่เป็นไคเมอรา (chimera) สูง สำหรับอาหารสูตรที่ใช้ในการทดลองควรเป็นสูตรอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เนื่องจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตอาจจะทำให้จำนวนโครโมโซมเปลี่ยนแปลงได้ (Pramanik and Datta, 1986; Meesawat et al., 2008)

จากการสังเกตการตายของโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งทั้งที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ นาน 5 วันและ 10 วัน ในช่วงเวลา 2 - 14 สัปดาห์หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงนานขึ้น โพรโทคอร์มจะตายมากขึ้น โดยโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับโคลชิซินตายน้อยที่สุด ส่วนโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินมีแนวโน้มการตายสูงขึ้นตามความเข้มข้นของโคลชิซินที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตายของโพรโทคอร์มหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นเป็นเวลา 14 สัปดาห์ พบว่าโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ นานทั้ง 5 วันและ 10 วัน มีการตายสูงขึ้นตามความเข้มข้นของโคลชิซิน สอดคล้องกับการทดลองในกล้วยไม้ *Cattleya intermedia* Lindl. (Silva et al., 2000) และกล้วยไม้ลูกผสมใน

สกุล *Cymbidium* (Kim et al., 2003) เมื่อพิจารณาระยะเวลาที่ได้รับโคลชิซิน พบว่าการตายของโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.01 และ 0.05 % (w/v) นาน 5 วันและ 10 วัน มีเปอร์เซ็นต์การตายไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามระยะเวลา 10 วัน มีแนวโน้มการตายสูงกว่า 5 วัน ส่วนการให้โคลชิซินเข้นข้น 0.10 % (w/v) นาน 10 วัน มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงกว่า 5 วันอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับผลการศึกษาใน *Astragalus membranaceus* ที่มีเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับโคลชิซิน (Chen and Gao, 2007) การจะเลือกใช้ระยะเวลานาน 5 วันหรือ 10 วัน จึงต้องพิจารณาเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยด์ด้วย

การเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งมีแนวโน้มลดลง เมื่อได้รับโคลชิซินความเข้นข้นเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับในกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* (Griesbach, 1981) พบว่ากล้วยไม้ต้นที่ได้รับโคลชิซินจะมีการเจริญเติบโตช้าลงและชักนำให้เกิดรากยาก และการศึกษาในต้นบัวบกเตตระพลอย์ที่เป็นผลมาจากการได้รับโคลชิซิน พบว่าต้นบัวบกเตตระพลอยด์มีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นบัวบกดิพลอยด์ (Chulalaksananukul and Chimnoi, 1999)

หลังจากเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งบนอาหารวุ้นในจานเลี้ยงเชื้อ นาน 14 สัปดาห์ ย้ายโพรโทคอร์มที่อยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้นมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 8 ออนซ์ จนกระทั่งเจริญเป็นต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่สมบูรณ์ สังเกตลักษณะภายนอกของกล้วยไม้ม้าวิ่ง พบว่ามีต้นกล้วยไม้ม้าวิ่ง 2 ลักษณะ คือ ต้นที่มีลักษณะปกติและต้นที่มีลักษณะผิดปกติ และเมื่อตรวจสอบจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก พบว่าจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ไม่ได้รับโคลชิซินมีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 38 สอดคล้องกับ Kamemoto และคณะ (1964) และสุมนทิพย์และปิยะดา (2550) ในการศึกษาครั้งนี้ พบกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เจริญมาจากโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับโคลชิซินซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวนาน 10 วัน ก่อนย้ายมาเลี้ยงบนอาหารวุ้น มีจำนวนโครโมโซมเปลี่ยนแปลงเป็น 2n = 4x = 76 แต่พบเพียงต้นเดียวเท่านั้นซึ่งถือว่าเกิดในเปอร์เซ็นต์ต่ำ แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งในธรรมชาติสามารถเกิดต้นเตตระพลอยด์ได้เอง เช่นเดียวกับกล้วยไม้ *Cattleya intermedia* Lindl. (Silva et al., 2000) การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ นาน 5 วันและ 10 วัน พบว่าต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีลักษณะปกติบางต้นเป็นต้นดิพลอยด์ (2n = 2x = 38) และบางต้นเป็นต้นเตตระพลอยด์ (2n = 4x = 76) ส่วนต้นที่ลักษณะผิดปกติ นับจำนวนโครโมโซมได้ประมาณ 150 แท่ง ซึ่งอาจเป็นต้นออกตะพลอยด์ (2n = 8x = 152) เมื่อนำกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นต้นดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และออกตะพลอยด์ไปตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอ พบว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งแต่ละต้นน่าจะมีระดับพลอยดีตามที่ระบุจริง กล่าวคือต้นเตตระพลอยด์มีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 เท่าของต้นดิพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์มีปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 4 เท่าของต้นดิพลอยด์

การเปรียบเทียบขนาดนิวเคลียสของเซลล์ชั้นอีพิเดอร์มิสจากด้านหลังใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง พบว่าขนาดนิวเคลียสของกล้วยไม้ม้าวิ่งเรียงจากขนาดใหญ่ไปเล็กได้ดังนี้คือ นิวเคลียสของเซลล์จากต้นออกตะพลอยด์ ต้นเตตระพลอยด์ และต้นดิพลอยด์ตามลำดับ เมื่อสังเกตขนาดของเซลล์ชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบโดยภาพรวม พบว่าเซลล์มีขนาดแตกต่างกันเรียงลำดับได้เช่นเดียวกับขนาดของนิวเคลียส สอดคล้องกับ Fan และคณะ (2003) ที่กล่าวว่า เมื่อจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น ขนาดนิวเคลียสจะใหญ่ขึ้นและส่งผลให้เซลล์ขยายขนาด เพื่อรักษาอัตราส่วนระหว่างปริมาตรของไซโทพลาซึมกับปริมาตรของนิวเคลียสให้คงที่ และสอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่า ปริมาตรของนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลา Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*) เพิ่มขึ้นตามจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น (Pandian and Koteeswaran, 1999)

จากผลการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก ปริมาณดีเอ็นเอ และขนาดนิวเคลียสของเซลล์ชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบ ยืนยันได้ว่าต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีระดับพลอยดี 3 ระดับ คือ ดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และออกตะพลอยด์ โดยพบว่า โพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ได้รับโคลชิซินทุกความเข้มข้น นานทั้ง 5 วันและ 10 วัน สามารถชักนำให้เกิดเป็นกล้วยไม้ม้าวิ่งเตตระพลอยด์ได้ แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดแตกต่างกัน โคลชิซินเข้มข้น 0.10 % (w/v) ที่ให้แก่โพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งนานทั้ง 5 วันและ 10 วัน มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดต้นเตตระพลอยด์ได้สูงสุด คือ 30 % เท่ากัน ถึงแม้ว่าระยะเวลา 10 วัน จะสามารถชักนำให้เกิดต้นออกตะพลอยด์ได้มากถึง 10 % แต่ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงมาก ดังนั้นโคลชิซินเข้มข้น 0.10 % (w/v) ที่ให้แก่โพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งนาน 5 วัน จึงเหมาะที่สุดสำหรับใช้ในการชักนำกล้วยไม้ม้าวิ่งให้เกิดเป็นต้นเตตระพลอยด์ ผลการทดลองในครั้งนี้ แตกต่างจากการศึกษาในกล้วยไม้หลายชนิดที่รายงานไว้ว่า โคลชิซินเข้มข้น 0.05 % (w/v) มีผลในการชักนำให้เกิดต้นกล้วยไม้เตตระพลอยด์ได้ดีที่สุด (Kim et al., 2003; Silva et al., 2000; Griesbach, 1981) อย่างไรก็ตามโคลชิซินเข้มข้น 0.05 % (w/v) ที่ให้แก่โพรโท-คอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่ง นาน 10 วัน สามารถชักนำให้เกิดกล้วยไม้ม้าวิ่งออกตะพลอยด์ได้ดีที่สุดถึง 15 % ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นมิกโซพลอยด์ เป็นไปได้ว่าการใช้โคลชิซินกับโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งในระยะที่มีขนาดเล็ก โคลชิซินสามารถแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ของโพรโทคอร์มได้อย่างทั่วถึง ส่งผลให้มีจำนวนโครโมโซมเหมือนกันทุกเซลล์ (Griesbach, 1981)

เมื่อเปรียบเทียบความยาวเซลล์คุมของปากใบกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดีต่างกัน พบว่า เซลล์คุมมีความยาวแตกต่างกัน โดยกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นต้นออกตะพลอยด์มีเซลล์คุมยาวที่สุด รองลงมาคือต้นเตตระพลอยด์ ส่วนต้นดิพลอยด์มีความยาวของเซลล์คุมสั้นที่สุด สอดคล้องกับศึกษาในพืชหลายชนิดที่ พบว่าเซลล์คุมจะยาวขึ้นตามระดับพลอยดีที่สูงขึ้น เช่น กล้วยไม้ *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl. (Atichart and Bunnag, 2007) กล้วยไม้ลูกผสม *Ionocidium* Popcorn (Fan et al., 2003) กล้วยไม้ *Cattleya intermedia* Lindl.

(Silva et al., 2000) กล้วยไข่ (Saradhuldhat and Silayai, 2001) *Actinidia deliciosa* (Przywara et al., 1988) *Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui (Kadota and Niimi, 2002) *Astragalus membranaceus* (Chen and Gao, 2007) และ *Acacia mearnsii* (de Wild) (Beck et al., 2003) แต่อย่างไรก็ตามในกล้วยไม้ลูกผสม *Cymbidium* กลับพบว่าเซลล์คุมของต้นที่เป็นดิพลอยด์ ทริพลอยด์ และเตตระพลอยด์ มีความยาวไม่แตกต่างกัน (Kim et al., 2003) และ นักวิจัยคณะนี้ยังอ้างถึง Motonobu และคณะ (1997) ที่รายงานไว้ว่าขนาดของปากใบของพืชที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า มีขนาดเท่ากับปากใบของต้นที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ

สำหรับความหนาแน่นของปากใบ พบว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งต้นดิพลอยด์ ต้นเตตระ-พลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์ มีปากใบหนาแน่นลดลงตามลำดับ เป็นผลมาจากปากใบและเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสขยายขนาดมากขึ้น ตามจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น กล้วยไม้ *Cattleya intermedia* Lindl. (Silva et al., 2000) กล้วยไข่ (Saradhuldhat and Silayai, 2001) และหม่อน (นิตย์ศรีและอำไพ, 2541) แต่ในกล้วยไม้ลูกผสม *Cymbidium* กลับพบว่าความหนาแน่นของปากใบในกล้วยไม้ชนิดนี้เพิ่มขึ้นตามระดับพลอยดีที่เพิ่มขึ้น (Kim et al., 2003)

บทที่ 5
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ผลของโคลชิซินต่อการตายและการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่ง

โคลชิซินมีผลต่อการตายของกล้วยไม้ม้าวิ่ง โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซินและระยะเวลาที่ให้แก่โพรโทรคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่ง พบว่าโพรโทคอร์มมีเปอร์เซ็นต์การตายสูงขึ้น อย่างไรก็ตามโพรโทคอร์มที่ไม่ได้รับโคลชิซินก็มีเปอร์เซ็นต์การตายที่สูงเช่นเดียวกัน ซึ่งส่วนใหญ่ตายตั้งแต่ระยะที่สังเกตเห็นโพรโทคอร์มบวมออกเล็กน้อย เป็นไปได้ว่าเมล็ดส่วนใหญ่มีเอ็มบริโอยังไม่เจริญเต็มที่ ดังนั้นก่อนนำมาเพาะเลี้ยง ควรตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสาร TTC นอกจากนี้เพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ควรเพาะเมล็ดในอาหารเหลวก่อนให้โคลชิซินเป็นเวลานานกว่านี้ เพื่อให้ได้โพรโทคอร์มขนาดใหญ่ ซึ่งจะมีผลทำให้สามารถทนต่อพิษของโคลชิซินได้ดีกว่าโพรโทคอร์มขนาดเล็ก แต่อย่างไรก็ตามต้องคำนึงด้วยว่า หากโพรโทคอร์มมีขนาดใหญ่ การได้รับโคลชิซินอาจไม่ทั่วถึง โดยเฉพาะเซลล์ที่อยู่ภายในซึ่งห่างจากเซลล์บริเวณผิว หากเป็นเช่นนี้จะทำให้ได้โพรโทคอร์มที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันเกิดเป็นไคเมอราขึ้นได้ (Griesbach, 1981)

เมื่อสังเกตการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์ม พบว่า การเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งช้าลง เมื่อได้รับโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้นและนานขึ้น

การตรวจสอบความเป็นพอลิพลอยด์

1. ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

ต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีลักษณะแตกต่างกัน 2 แบบ คือ ต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีลักษณะปกติ โดยมีใบค่อนข้างเรียวยาว แผ่นใบบาง และต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีลักษณะผิดปกติ โดยใบค่อนข้างสั้น แผ่นใบหนา อวบน้ำ ใบซ้อนทับกันแน่น การเจริญเติบโตช้ากว่าต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีลักษณะปกติ จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของกล้วยไม้ม้าวิ่งทั้งสองแบบ พบว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีลักษณะปกติมีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกัน 2 ระดับ คือ ดิพลอยด์ (2n = 2x = 38) และ เตตระพลอยด์ (2n = 4x = 76) ส่วนต้นที่มีลักษณะผิดปกติอาจเป็นออกตะพลอยด์ซึ่งนับจำนวนโครโมโซมได้ประมาณ 150 แท่ง เนื่องจากมีโครโมโซมจำนวนมาก และซ้อนทับกันหลายแท่งจึงทำให้ไม่สามารถนับจำนวนได้แน่นอน ปัญหาของการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากคือ รากมีน้อยและส่วนใหญ่เป็นรากที่

ไม่มีการแบ่งเซลล์แม้ปลายรากมีลักษณะใสก็ตาม เพื่อให้เกิดรากเร็วขึ้นอาจทำโดยตัดรากแก่ทิ้งแล้วย้ายต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งไปเลี้ยงในอาหารใหม่ และควรตัดรากมาศึกษาตั้งแต่มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร

2. การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์

ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ม้าวิ่งต้นที่เป็นเตตระพลอยด์มีปริมาณเป็น 2 เท่าของต้นที่เป็นดิพลอยด์ ส่วนต้นที่เป็นคาดว่าออกตะพลอยด์มีปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 4 เท่าของต้นที่เป็นดิพลอยด์ และประมาณ 2 เท่าของต้นที่เป็นเตตระพลอยด์

3. การศึกษาขนาดนิวเคลียสของเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง

นิวเคลียสของเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดีต่างกัน มีขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระดับพลอยดีที่สูงขึ้นจะส่งผลให้ขนาดนิวเคลียสใหญ่ขึ้น

ความเข้มข้นของโคลชิซินและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้กล้วยไม้ม้าวิ่งเกิดเป็นต้นพอลิพลอยด์

โคลชิซินทุกความเข้มข้นที่ให้แก่โพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งนาน 5 วันและ 10 วัน สามารถชักนำให้เกิดเป็นกล้วยไม้ม้าวิ่งเตตระพลอยด์ได้ แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดแตกต่างกัน โคลชิซินเข้มข้น 0.10 % (w/v) ที่ให้แก่โพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งนานทั้ง 5 วันและ 10 วัน สามารถชักนำให้เกิดต้นเตตระพลอยด์ได้สูงสุดคือ 30 % เท่ากัน แต่เมื่อให้นาน 10 วัน มีการตายสูงกว่า ดังนั้นโคลชิซินเข้มข้น 0.10 % (w/v) ที่ให้แก่โพรโทคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งนาน 5 วัน จึงเหมาะที่สุดสำหรับใช้ในการชักนำกล้วยไม้ม้าวิ่งให้เกิดเป็นต้นเตตระพลอยด์

การศึกษาความแตกต่างของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดีต่างกัน

กล้วยไม้ม้าวิ่งที่ระดับพลอยดีต่างกัน มีความยาวของเซลล์คุมและความหนาแน่นของปากใบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยเมื่อระดับพลอยดีสูงขึ้น เซลล์คุมมีความยาวเพิ่มขึ้น ในขณะที่ความหนาแน่นของปากใบลดลง

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบประเด็นที่น่าสนใจที่แตกต่างจากงานวิจัยอื่น 2 ประเด็น ดังนี้

1. ลักษณะภายนอกของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดีเป็นดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ไม่แตกต่างกัน ซึ่งในงานวิจัยส่วนใหญ่ พบว่าพืชที่ระดับพลอยดีต่างกันจะแสดงลักษณะออกมาแตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรนำกล้วยไม้ม้าวิ่งดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ออกปลูกในเรือนเพาะชำ เพื่อศึกษาว่าลักษณะต่างๆ ที่เคยศึกษาแล้วขณะอยู่ในขวดเพาะเลี้ยง รวมถึงลักษณะดอก ว่ายังคงเหมือนกันหรือไม่ พร้อมกันนี้ต้องศึกษาลักษณะของต้นออกตะพลอยด์ด้วย เพื่อให้ได้ข้อมูลในการตัดสินใจว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งเตตระพลอยด์หรือกล้วยไม้ม้าวิ่งออกตะพลอยด์เหมาะสมสำหรับการปลูกเป็นไม้กระถางที่น่าจะมีคุณค่าทางเศรษฐกิจมากกว่ากัน

2. การใช้ขนาดนิวเคลียสของเซลล์ชั้นอีพิเดอร์มิสจากด้านหลังใบเป็นเกณฑ์ในการตรวจสอบความเป็นพอลิพลอยด์ของกล้วยไม้ม้าวิ่ง พบว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดีต่างกัน มีนิวเคลียสขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการใช้ขนาดนิวเคลียสของเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสจากด้านหลังใบจึงน่าจะเป็นเกณฑ์หนึ่งที่สามารถตรวจสอบความเป็นพืชพอลิพลอยด์ได้อย่างรวดเร็ว

รายการเอกสารอ้างอิง

กนิษฐา คุ้มวณิชย์. 2542. ผลของสารสกัดเมล็ดดองดึง *Gloriosa superba* Linn. ที่มีต่อการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ของแตงโม *Citrullus lanatus* Mats & Nakai ในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

กาญจนา ขวัญทองเย็น. 2548. ระบบธุรกิจกล้วยไม้ของไทย. รายงานวิชาสัมมนา (878 - 596) สาขาการจัดการธุรกิจเกษตร คณะเศรษฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ ศรีประไพ ธรรมแสง และแสงเดือน พลเยี่ยม. 2551. บทคัดย่อการศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง. เข้าถึงได้จาก http://conf.agi.nu.ac.th/nhc7/upload/abstract/Ab_NHC7_กาญจนา%20รุ่งรัชกานนท์_01.doc (วันที่สืบค้น 22 สิงหาคม 2551)

ครรชิต ธรรมศิริ. 2541. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน): กรุงเทพฯ.

จักรกฤษณ์ ภารการ. สุปาณี บุดดีคง, ยุพิน ไชยโต, วาสนา ไวจำปาและชูเกียรติ ผาโสม. 2545. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์พืชด้วยสารโคลชิซีน ในข้าวโพดหวาน ผักกาดขาวปลี คะน้า และหอมแดง. เข้าถึงได้จาก http://www.msu.ac.th/bio-dept/Plant-Breeding/Colchicine.html (วันที่สืบค้น 2 กุมภาพันธ์ 2550)

ชนินทร์ โถรัตน์ และวิภาส วิเชียรสินทุ์. 2550.กล้วยไม้ไทยความหลากหลายที่ยังรอการค้นพบ. เข้าถึงได้จาก http://www.sarakadee.com/feature/1999/04/orchid1.htm (วันที่สืบค้น 6 กันยายน 2551)

ดรุณวรรณ บุญสนอง. 2549. การวิเคราะห์ศักยภาพการส่งออกกล้วยไม้ของประเทศไทย. สาร-นิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ธุรกิจเกษตร) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิตย์ศรี แสงเดือน และอำไพ สินพัฒนานนท์. 2541. การชักนำให้เกิดหม่อนเตตระพลอยด์ โดยใช้โคลชิซินร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสตร์). 32(4): 424 - 430.

ประชาชาติ นพพวง และสำเริง วิชานา . 2540.การสร้างหม่อน Tetraploid จากหม่อนที่มีความต้านทานโรครากเน่า. วารสารวิชาการเกษตร. 15(3): 179 - 184.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, เผดิม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา,กาญจนา กล้าแข็ง, นิตย์ศรี แสงเดือน, ชัยฤกษ์ มณีพงษ์ และสงกรานต์ จิตรากร. 2537. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนร่วมกับการชักนำด้วยโคลชิซิน. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสตร์). 28(2): 193 - 199.

พิมลพรรณ มุธุสิทธ์ และสุจิตร อุตรมาตย์. 2542. พรรณไม้จากจังหวัดอุบลราชธานี. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

ไพบูลย์ ไพรีพ่ายฤทธิ์. 2521. ตำรากล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มเล่น. ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคล อาทรการพิมพ์: กรุงเทพฯ.

มลวิภา โสมานันท์. 2521.การชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในกล้วยไม้อะแรนดาโดยการใช้โคลชิซิน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มยุรี แก้วภู่, อรุณรัศมิ์ วณิชชานนท์ และประดิษฐ์ ตั้งสกุล. 2547. การชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในถั่วเขียวผิวมันพันธุ์อู่ทอง 1 โดยใช้สารโคลชิซีน. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 7(1): 10 - 20.

มาลินี อนุพันธ์สกุล. 2534. คู่มือการปลูกกล้วยไม้. พิมพ์ครั้งที่ 2. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์: กรุงเทพฯ.

สาริณี ไชยเจริญ. 2538. การศึกษาจำนวนโครโมโซม ลักษณะดอกและความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ดิพลอยด์ และออลโลเตตระ-พลอยด์. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสตร์). 29(2): 150 - 157.

สุมนทิพย์ บุนนาค และ ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์. 2550. เซลล์พันธุศาสตร์ของกล้วยไม้บางชนิดในเขตอนุรักษ์พันธุกรรมพืช พื้นที่โคกภูตากา อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น. วารสารวิจัย มข. 12(4): 393 – 401.

สุมนา จำปา. 2549. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเยอบีราโดยใช้สารโคลชิซิน และสารเอท-ทิลมีเทนซัลโฟเนต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุรางค์รัชต์ อินทะมุสิก. 2551 . การแปรผันทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl. sensu lato) ในเขตพฤกษชาติภาคใต้ของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุลาวัลย์ มหาหิงค์ และสุมนทิพย์ บุนนาค. 2551. การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima Lindl*.) ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. เข้าถึงได้จากhttp://www.irpus.or.th/project_file/2550_2008-06-30_H063_R50C03006_Complete.pdf (วันที่สืบค้น 10 พฤษภาคม 2552)

อบฉันท์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์บ้านและสวน: กรุงเทพฯ.

Arumuganathan,K. and Earle, E.D. 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. Plant Molecular Biology Reporter. 9(3): 229 - 233.

Atichart, P. and Bunnag, S. 2007. Polyploid induction in *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl. by in vitro techniques. Thai Journal of Agricultural Science. 40(1 - 2): 91 - 95.

Beck, S. L., Dunlop, R.W. and Fossey, A. 2003. Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). Botanical Journal of the Linnean Society. 141: 177 - 181.

Bennett, M.D. and Leitch, I.J. 1995. Nuclear DNA amounts in angiosperms. Annals of Botany. 76: 113 - 176.

Blakeslee, A.F. and Avery, A.G. 1937. Method of inducing doubling of chromosomes in plants. Journal of Heredity. 28: 393 - 411.

Blakesley, D., Allen, A.,Pellny, T.K. and Roberts, A.V. 2002. Natural and induced polyploidy in *Acacia dealbata* Link. and *Acacia mangium* Willd. Annals of Botany. 90: 391 - 398.

Bonos,S.A., Plumley,K.A. and Meyer, W.A. 2002. Ploidy determination in *Agrostis* using flow cytometry and morphological traits. Crop Science. 42: 192 - 196.

Bürün, B. and Emìroglu, Ü. 2008. A comparative study on colchicine application methods in obtaining doubled haploids of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Turkish Journal of Biology. 32: 105 - 111.

Buyun, L., Lavrentyeva, A., Kovalska, L. 2004. In vitro germination of seeds of some rare tropical orchids. Acta Universitatis Latviensis, Biology. 676: 159 - 162.

Campbell, N.A., Reece, J.B. and Mitchell, L.G.1999. Biology. 5th Ed. Addison Wesley Longman, Inc. New York.

Chen, L.L. and Gao, S.L. 2007. In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploid in *Astragalus membranaceus*. Scientia Horticulturae. 112: 339 – 344.

Chulalaksananukul,W. and Chimnoi, W.1999. Polyploid induction in *Centella asiatica* (L.) Urban by colchicine treatment. Journal of Scientific Research Chulalongkorn University. 24(2): 55 - 65.

Cramer, C.S.1999. Laboratory techniques for determining ploidy in plant. Hortechnology. 9(4): 594 – 596.

Doležel, J. and Bartoš, J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. Annals of Botany. 95: 99 - 110.

Doležel, J., Greilhuber, J.,Lucretti, S.,Meister, A., Lysak, M.A., Nardi, L. and Obermayer, R. 1998. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter - laboratory comparison. Annals of Botany. 82 : 17-26.

Eeckhuat, T.G.R., Werbrouck, S.P.O., Leus, L.W.H., Bockstaele, E.J.V. and Debergh, P.C. 2004. Chemically induced polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regel through somatic embryogenesis. Plant cell, Tissue and Organ Culture. 78: 241 - 246.

Emshwiller, E. 2002. Ploidy levels among species in the *Oxalis tuberosa* alliance as inferred by flow cytometry. Annals of Botany. 89: 741 - 753.

Fan,L.Y., Thame,A. and Wing, Y.T. 2003. Influence of increase of ploidy level (from 2n to 4n) on the physical attributes of *Ionocidium* Popcorn. http://staff.science.nus. edu.sg/~scilooe/srp_2003/sci_paper/botanic/research_paper/lim_yifan.pdf. (accessed 5/3/07)

Farrar, M.D. 1963. Growing ochid seedlings. American Orchid Society Bulletin. 32: 888 - 891.

Griesbach, R.J. 1981. Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1: 103 - 107.

Griesbach, R.J. 1985. Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement. The Journal of Heredity. 76: 74 - 75.

Hanson, L.,McMahon, K.A., Johnson, M.A.T. and Bennett, M.D. 2001. First nuclear DNA C – values for 25 angiosperm families. Annals of Botany. 87: 251 - 258.

Irfaq, M. and Nawab, K. 2001. Effect of gamma irradiation on some morphological of three wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Journal of Biological Sciences. 1(10): 935 – 937.

Johnston, J.S., Bennett, M.D., Rayburn, A.L., Galbraith, D.W. and Price, H.J. 1999. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. American Journal of Botany. 86(5): 609 - 613.

Jones, W.E., Kueknle, A.R. and Arumuganathan, K. 1998. Nuclear DNA of 26 ochid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. Annals of Botany. 82: 189 - 194.

Kadota, K. and Niimi, Y. 2002. In vitro induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyriforia* N. cv. Hosui). Plant Cell Reports. 21: 282 - 286.

Kamemoto, H., Sagarik, R. and Kasemsap, S. 1964. Chromosome numbers of *Sarcanthine* orchid species of Thailand. Natural History Bulletin of the Siam Society. 20: 235 - 241.

Kim, M.S, Kim, J.Y. and Eun, J.S. 2003. Chromosome doubling of a *Cymbidium* hybrid With colchicine treatment in meristem culture. www.biolo.aichiedu.ac.jp/ NIOC2003poster/10KoreaCym.pdf. (accessed 16/1/07)

Lee, H-C. and Lin, T-Y. 2005. Isolation of plant nuclei suitable for flow cytometry from recalcitrant tissue by use of a filtration column. Plant Molecular Biology Reporter. 23: 53 - 58.

Lin, S., Lee, H.C., Chen, W. H.,Chen, C.C., Kao, Y.Y. , Fu, Y.M., Chen, Y.H. and Lin, T. Y. 2001. Nuclear DNA contents of *Phalaenopsis* sp. and *Doritis pulcherrima*. Journal of the American Society for Horticultural Science. 126: 195 - 199.

Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursley, S.L., Matsudaira, P. and Darnell, J. 1995. Molecular Cell Biology. 3rd Ed., W.H. Freeman and company, New York.

Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J. and Santos, C. 2006. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. Annals of Botany. 98: 679 - 689.

Luan,V.Q.,Thien,N.Q., Khiem,D.V. and Nhut,D.T. 2006. In vitro germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. Proceeding of International Workshop on Biotechnology in Agriculture. Nong Lam University, Ho Chi Minh City. October 20 - 21. Pp 175 – 177.

McKendrick, S. 2000. In Vitro Germination of Orchids : a Manual. Ceiba foundation for tropical conservation. www.Ceiba.org/documents/CFTCproman.pdf (accessed 6/1/07)

Menninger, E.D. 1963. Diary of a colchicine - induced tetraploid *Cymbidium*. American Orchid Society Bulletin. 32: 885 - 887.

Meesawat, U., Srisawat, T., Eksomtramage, L. and Kanchanapoom, K. 2008. Nuclear DNA content of the pigeon orchid (*Denbrobium crumenatum* Sw.) with the analysis of flow cytometry. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 30(3): 277 – 280.

Mohammadi, P.P., Moieni, A. and Jalali - Jalaran, M. 2007. Colchicine induced embryo-genesis and doubled haploid production in maize (*Zea mays* L.) anther culture. Iranian Journal of Biotechnology. 5(3): 140 – 146.

Newman, M., Ketphanh, S., Svengsuksa, B., Thomas, P., Sengdala, K., Lamxay, V. and Armstrong, K. 2007. A Checklist of the Vascular Plants of Lao PDR. Royal Botanic Garden Edinburgh, Scotland.

Norberto, R.B., 2005. Polyploidy breeding in orchids. Phillippine Orchid Society Online. www.Philorchidsociety.org/index.php (accessed 4/1/07)

Pandian, T.J. and Koteeswaran, R. 1999. Natural occurrence of monoploids and polyploids in the Indian catfish, *Heteropneustes fossilis*. www.ias.ac.th.currsci/ apr25/articlrs24.htm (accessed 15/8/08)

Park, S.Y., Murthy, H.Y. and Paek, K.Y. 2003. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis.* Plant Science. 164: 919 - 923

Pramanik, T.K. and Datta, S.K. 1986. Plant regeneration and ploidy variation in culture derived plants of *Asclepias curassavica* L. Plant Cell Reports. 3: 219 - 222.

Przywara, L.,Pandey, K.K. and Sanders, P.M. 1988. Length of stomata as an indicator of ploidy level in *Actinidia deliciosa*. New Zealand Journal of Botany. 26: 179 – 182.

Ranney, T. G. 2007. Polyploidy: from evolution to landscape plant improvement. http:// www.ces.ncsu.edu/fletcher/programs/nursery/metria/metriaranney/polyploidy.htm (accessed 2/2/07)

Rose, J.B., Kubba, J. and Tobutt, K.R. 2000. Induction of tetraploidy in *Buddleia globosa*. Plant cell, Tissue and Organ Culture. 63: 121 - 125.

Saradhuldhat, P. and Silayai, B. 2001. Some chemical treatments on Kluai Khai through tissue culture for mutation breeding.Kasetsart Journal (Natural Science). 35: 231 - 241.

Sharma, A.K. and Sharma, A. 1980. Chromosome Techniques : Theory and Practice. 3rd Ed. Butterworths, London.

Shao, J., Chen, C. and Deng, X. 2003. In vitro induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). Plant cell, Tissue and Organ Culture. 75: 241 - 246.

Silva, P.A.K.X.M., Sidia, C-J. and Maria, H.B-Z. 2000. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (orchidaceae) by in vitro techniques. Ciência Rural. 30(1): 105 - 111.

Sohoo, M.S., Athwal, D.S. and Chandra, S. 1970. Colchicine induced polyploid in chickpeas (*Cicer arietinum* L.) .Theoretical and Applied Genetics. 40: 163 - 168.

Soonthornchainaksaeng, P. 2005. Reports on Chromosome Numbers of Plants in Thailand. Department of Plant Science. Faculty of Science. Mahidol University. Chuan Printing Press Ltd., Part., Bangkok.

Starr, C. and Taggart, R. 1995. Cell Biology and Genetics, 7th Ed.,Wadsworth Publishing Company, Belmont.

Suda,J. 2004. An employment of flow cytometry into plant biosystematics. PhD. Thesis. Faculty of Science. Charles University, Prague.

Thao, N.T.P., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y. and Okubo, H. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 72: 19 - 25.

Tuna, M., Vogel, K.P., Arumuganathan, K. and Gill, K.S. 2001. DNA content and ploidy determination of bromegrass germplasm accessions by flow cytometry. Crop Science. 41: 1629 - 1634.

Vacin, E. and Went, F. 1949. Some pH changes in nutrient solution. Botanical Gazette. 110: 605 - 613.

Vainstein, A. 2002. Breeding for Ornamentals : Classical and Molecular Approaches. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Vichiato, M.R.M., Vichiato, M., Pasqual,M. Castro,D.M. and Dutra, L.F. 2007. Tetraploidy Induction and identification in *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). Rev. Ciênc. Agron., Fortaleza. 38(4): 385 - 390.

ภาคผนวก

การเตรียมอาหารสูตร Vacin and Went ดัดแปลง

การเตรียม Stock Solution

Stock Solution I ประกอบด้วย

KNO_3	5.25 กรัม
KH_2PO_4	2.50 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	5.00 กรัม

นำสารแต่ละชนิดละลายในน้ำกลั่นตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

Stock Solution II ประกอบด้วย

$MgSO_4.7H_2O$	2.50 กรัม
$MnSO_4.H_2O$	0.075 กรัม

นำสารแต่ละชนิดละลายในน้ำกลั่นตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

Stock *myo* – inositol Solution

ละลาย *myo* – inositol 2 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

Stock NaFeEDTA Solution

ละลาย NaFeEDTA 0.8 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียมอาหารสูตร VW ดัดแปลง ปริมาตร 1 ลิตร

1. ใช้ stock solution I 100 มิลลิลิตร stock solution II 100 มิลลิลิตร stock *myo* – inositol solution 5 มิลลิลิตร และ stock NaFeEDTA solution 5 มิลลิลิตร
2. เติม $Ca_3(PO_4)_2$ 0.20 กรัมที่ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล และใช้ความร้อน
4. เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัม
5. เติมน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร
6. ปรับ pH ให้ได้ 4.8 – 5.0
7. เติมวุ้น 8 กรัม (ถ้าต้องการอาหารเหลวก็ไม่ต้องใส่วุ้น)
8. ต้มจนวุ้นละลายหมด
9. เทลงในขวดแก้วปิดฝา แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{0}C นาน 20 นาที
10. ทิ้งไว้ให้เย็นจนอาหารแข็งตัวจึงนำไปใช้

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS

วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นการตายของโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 5 วัน

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Treatment	369.854	3	123.285	13.167	.000
Error	131.086	14	9.363		
Total	500.941	17			

Duncan

		Subset for alpha = 0.05	
treatment	N	1	2
0%	5	78.1300	
0.01%	5	81.5780	
0.05%	3		87.2633
0.1%	5		89.2520
Sig.		.121	.358

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นการตายของโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 10 วัน

\

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Treatment	909.377	3	303.126	37.801	.000
Error	128.303	16	8.019		
Total	1037.680	19			

Duncan

		Subset for alpha = 0.05		
treatment	N	1	2	3
0%	5	77.8260		
0.01%	3	81.1033		
0.05%	6		89.0250	
0.1%	6			94.7550
Sig.		.098	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

การวิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของโพรโทคอร์มที่เจริญอยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้น จากโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 5 วัน หลังย้ายมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่ไม่มีโคลชิซินนาน 14 สัปดาห์

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Treatment	68.975	3	22.992	3.724	.037
Error	86.426	14	6.173		
Total	155.401	17			

Duncan

		Subset for alpha = 0.05	
treatment	N	1	2
0.10%	5	2.6940	
0.05%	3	3.7100	
0.01%	5	5.6000	5.6000
0%	5		7.6700
Sig.		.126	.243

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

การวิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของโพรโทคอร์มที่เจริญอยู่ในระยะที่มีรากเกิดขึ้น จากโพรโทคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 10 วัน หลังย้ายมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่ไม่มีโคลชิซินนาน 14 สัปดาห์

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Treatment	44.295	3	14.765	8.120	.002
Error	29.093	16	1.818		
Total	73.388	19			

Duncan

		Subset for alpha = 0.05		
treatment	N	1	2	3
0.10%	6	.8800		
0.05%	6	1.8833	1.8833	
0.01%	3		3.0800	3.0800
0%	5			4.7480
Sig.		.275	.196	.079

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียสจากเซลล์ชั้นอีพิเดอร์มิสด้านหลังใบของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดีต่าง ๆ

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Treatment	4402.774	2	2201.387	1.154E3	.000
Error	1424.568	747	1.907		
Total	5827.342	749			

Duncan

		Subset for alpha = 0.05		
type	N	1	2	3
diploid	300	7.6333		
tetraploid	300		10.8208	
octaploid	150			14.1250
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความยาวเซลล์คุมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดีต่าง ๆ

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Treatment	15301.397	2	7650.699	512.518	.000
Error	7419.057	497	14.928		
Total	22720.454	499			

Duncan

		Subset for alpha = 0.05		
type	N	1	2	3
diploid	200	33.5875		
tetraploid	200		41.9625	
octaploid	100			47.9530
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groupsin homogeneous subsets are displayed.

วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความหนาแน่นของปากใบของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดีต่าง ๆ

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Treatment	10127.095	2	5063.548	81.707	.000
Error	9109.941	147	61.972		
Total	19237.036	149			

Duncan

		Subset for alpha = 0.05		
type	N	1	2	3
octaploid	30	15.1343		
tetraploid	60		28.3805	
diploid	60			37.5235
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายวชิรพัฒน์ จิวานิจ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4910220073

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2543
ประกาศนียบัตรบัณฑิต (วิชาชีพครู)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2544

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

วชิรพัฒน์ จิวานิจ, อารักษ์ จันทศิลป์ และลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2552. ผลของโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มและการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง. การประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 3 มหาวิทยาลัยมหิดล.