การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานา กับเหลืองจันทบูร (*Dendrobium santana x D. friedericksianum*) การขยายพันธุ์ การชักนำดอกและชักนำพอลิพลอยด์ ในสภาพปลอดเชื้อ

Verification of Hybrid between *Dendrobium santana* and *D. friedericksianum* Orchid, Micropropagation, *In Vitro* Flowering and Induction of Polyploid

โสภา ชูเพ็ง

Sopa Choopeng

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Plant Science
Prince of Songkla University

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานา กับเหลืองจันทบูร (*Dendrobium santana x D. friedericksianum*) การขยายพันธุ์ การชักนำดอกและชักนำพอลิพลอยด์ ในสภาพปลอดเชื้อ

Verification of Hybrid between *Dendrobium santana* and *D. friedericksianum* Orchid, Micropropagation, *In Vitro* Flowering and Induction of Polyploid

โสภา ชูเพ็ง

Sopa Choopeng

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Plant Science
Prince of Songkla University
2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร (*Dendrobium santana x D. friedericksianum*) การขยายพันธุ์ การชักนำดอกและชักนำพอลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ

ผู้เขียน นางโสภา ชูเพ็ง

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ดร.ทัศนี ขาวเนียม)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาวดี รามสูตร)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ

(ดร.ทัศนี ขาวเนียม)

.....กรรมการ

(ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำหรับการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางโสภา ชูเพ็ง)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางโสภา ชูเพ็ง)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานา กับเหลืองจันทบูร (*Dendrobium santana x D. friedericksianum*) การขยายพันธุ์ การชักนำดอกและชักนำพอลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ

ผู้เขียน นางโสภา ชูเพ็ง

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อ

การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี (Random amplified polymorphic DNA; RAPD) เพื่อตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานา (*Dendrobium santana)* กับเหลืองจันทบูร *(D. friedericksianum*) โดยใช้ไพรเมอร์ ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 12 ไพรเมอร์ พบว่า มี 6 ไพรเมอร์ คือ OPA03 OPB07 OPB18 OPJ04 OPR11 และ OPT06 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง และให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน สามารถนำไปใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างลูกผสม กับกล้วยไม้หวายซานทานาและเหลืองจันทบูรได้ เมื่อนำชิ้นส่วนข้อของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Vacin and Went (VW) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสูตร VW เติม thidiazuron (TDZ) เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือการเติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีการสร้างยอดสูงสุด การเติมไคโตซานเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงส่งเสริมให้ต้นกล้ามีน้ำหนักสดมากที่สุด การเติม benzyladenine (BA) ทุกความเข้มข้นไม่พบการสร้างดอก อย่างไรก็ตาม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณยอด และต้นกล้ามีน้ำหนักสดมากที่สุด การเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร VW เติม paclobutrazol (PBZ) ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.20 และ 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน สามารถชักนำดอกได้ 3.67 และ 3.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเติม PBZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนรากและความยาวราก แม้ว่าจะมีการสร้างดอกได้แต่เมื่อวางเลี้ยงต่อไปดอกมีสีซีด และเหี่ยวโดยไม่มีการบานของดอก การชักนำพอลิพลอยด์ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรในสภาพปลอดเชื้อ โดยการแช่ชิ้นส่วนข้อในโคลชิซิน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าค่า LD_{50} คือ 0.052 0.041 และ 0.011 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0.05-0.1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24-72 ชั่วโมง ส่งผลให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น 33-50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคโฟลไซโตมิทรี เช่นเดียวกับลักษณะทางสรีรวิทยาที่มีขนาดเซลล์คุมใหญ่ขึ้น และมีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้น แต่ความหนาแน่นของปากใบลดลง

Thesis Title Verification of Hybrid between *Dendrobium santana* and *D. friedericksianum* Orchid, Micropropagation, *In Vitro* Flowering and Induction of Polyploid

Author Mrs. Sopa Choopeng

Major Program Plant Science

Academic Year 2017

ABSTRACT

A RAPD (Random amplified polymorphic DNA) analysis was performed to verify hybridity between *Dendrobium santana* and *D. friedericksianum* by using 12 primers of 10 nucleotides. The results showed that 6 primers, which were OPA03, OPB07, OPB18, OPJ04, OPR11 and OPT06 could amplify a clear profiles of DNA from all samples. All of 6 primers could identify hybrid between *D. santana* and *D. friedericksianum*. Culturing nodal explant of hybrid between *D. santana* and *D. friedericksianum* gave the optimum number of multiple shoot formation. The highest shoot numbers was obtained on VW (Vacin and Went) medium without plant growth regulators or on VW medium supplemented with 5 mg/l TDZ (thidiazuron) or 0.5 mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy-acetic acid). Addition of 2 mg/l chitosan to VW medium promoted the highest fresh weights of plantlets. Addition of BA (benzyladenenine) to culture medium could not initiate flowering *in vitro.* However, 3 mg/l BA containing the culture medium could increase shoot numbers and the highest fresh weight of shoot. PBZ (paclobutrazol) at concentration of 0.25 mg/l with 0.20 mg/l and 0.60 mg/l TDZ could induce *in vitro* flowering at 3.67% and 3.00%, respectively after 45 days of culture. However, the flowers had pale colors and were not bloom. *In vitro* polyploid induction of hybrid between *D. santana* and *D. friedericksianum* was done by soaking nodal explant in colchicine at different concentrations for 24, 48 and 72 hours. The results showed that LD_{50} of colchicine for 24, 48 and 72 hours was 0.052%, 0.041% and 0.011% respectively. The treatment of colchicine at the aboved concentrations and durations increased DNA content from 33 to 50% of the original DNA content as analyzed by flow cytometry technique. This result was in accordance with

physiological characteristics which revealed the bigger size of guard cells and higher density of chloroplasts but lower density of stoma.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความเอื้อเฟื้อจากบุคคลหลายท่าน ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาตั้งแต่การศึกษาระดับปริญญาตรี ปริญญาโท และปรัชญาดุษฎีบัณฑิต ให้ความรู้ คำแนะนำ และความคิดเห็นที่เป็นแนวทางในการทำวิจัย ตลอดจนเขียนวิทยานิพนธ์จนสมบูรณ์ ขอขอบคุณ ดร.ทัศนี ขาวเนียม อาจารย์ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาวดี รามสูตร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน กรรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยตรวจสอบ แก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านที่เคยสอน ให้ความรู้ และคำแนะนำ

ขอขอบคุณคณาจารย์ สาขาวิชาการจัดการพืชสวนและภูมิทัศน์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต ที่คอยช่วยเหลือให้กำลังใจ แบ่งเบาภาระงาน

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อธวัชชัย และคุณแม่ปราณี ทวีคณะโชติ ที่เลี้ยงดู ให้ความรัก ความเข้าใจ สนับสนุนด้านการศึกษาและเป็นกำลังใจที่สำคัญ

ขอขอบคุณ คุณณรงค์ชัย ชูเพ็ง ที่คอยสนับสนุน เคียงข้างและให้กำลังใจเสมอมา และผู้เขียนขอขอบคุณ คุณพรหมพร วิวัฒนวงศา เจ้าของสวนมะพร้าวน้ำหอม super super garden ผู้ให้กำลังใจและคอยช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดจนกัลยาณมิตรทุกท่าน รวมถึงน้องๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนในหลายๆ ด้าน

โสภา ชูเพ็ง

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(9)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(11)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(13)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	17
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	18
วัสดุ	18
อุปกรณ์	19
วิธีการ	20
3 ผล	25
4 วิจารณ์	47
5 สรุป	53
เอกสารอ้างอิง	54
ภาคผนวก	65
ประวัติผู้เขียน	66

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายงานการศึกษาการออกดอกของกล้วยไม้ในหลอดทดลอง	10
2	ชนิดของไพรเมอร์อาร์เอพีดีที่ใช้ในการตรวจสอบลูกผสมระหว่างหวายซานทานกับเหลืองจันทบูรต่อรูปแบบ ขนาด และคุณภาพของดีเอ็นที่เพิ่มปริมาณได้	25
3	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชิ้นส่วนพืชต่อการสร้างยอดของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรหลังวางเลี้ยง 45 วัน	32
4	ผลของ BA 2,4-D และชิ้นส่วนพืชต่อการสร้างยอดของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรหลังวางเลี้ยง 2 เดือน	33
5	ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน	34
6	ผลของ BA ต่อการเจริญเติบโตของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน	35
7	ผลของ PBZ ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างดอกของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน	37
8	ผลของ TDZ ร่วมกับ PBZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญเติบโตของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรหลังวางเลี้ยง 3 เดือน	38
9	ผลของความเข้มข้นโคลชิซินและระยะเวลาต่างๆ ต่ออัตรารอดชีวิต และการสร้างยอด หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหาร VW เป็นเวลา 30 วัน	40
10	ผลของความเข้มข้นโคลชิซินและระยะเวลาต่างๆ ต่อขนาดและความหนาแน่นของเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร	43
11	ค่าเฉลี่ยปริมาณดีเอ็นเอของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ	45

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะดอกของกล้วยไม้ (ก และ ข) หวายซานทานาและ (ค และ ง) เหลืองจันทบูร	2
2	การเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนภายในชิ้นส่วนยอด *D.* Second Love ขณะมีการเปลี่ยนแปลงจากตายอดเป็นตาดอก หลังเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำดอก (TDZ 1.8 µM) เป็นเวลา 40 วัน	8
3	การเตรียมชิ้นส่วนจากต้นกล้าลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร	22
4	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร (lane 1) ซานทานา (lane 2) และลูกผสมระหว่างซานทานากับเหลืองจันทบูร (lane 3-7) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ด้วยไพรเมอร์ OPA03	26
5	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร (lane 1) ซานทานา (lane 2) และลูกผสมระหว่างซานทานากับเหลืองจันทบูร (lane 3-7) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ด้วยไพรเมอร์ OPB07	27
6	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร (lane 1) ซานทานา (lane 2) และลูกผสมระหว่างซานทานากับเหลืองจันทบูร (lane 3-7) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ด้วยไพรเมอร์ OPJ04	28
7	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร (lane 1) ซานทานา (lane 2) และลูกผสมระหว่างซานทานากับเหลืองจันทบูร (lane 3-7) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ด้วยไพรเมอร์ OPT06	29
8	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร (lane 1) ซานทานา (lane 2) และลูกผสมระหว่างซานทานากับเหลืองจันทบูร (lane 3-7) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ด้วยไพรเมอร์ OPR11	30
9	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร (lane 1) ซานทานา (lane 2) และลูกผสมระหว่างซานทานากับเหลืองจันทบูร (lane 3-7) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ด้วยไพรเมอร์ OPB18	31

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	ต้นกล้าลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรหลังวางเลี้ยงบนอาหารแข็งเติมไคโตซานความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน	34
11	ต้นกล้าลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรหลังวางเลี้ยงบนอาหารแข็งเติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน	36
12	ดอกของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรที่พัฒนาหลังวางเลี้ยงบนอาหารแข็งเติม PBZ เข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน มีสีซีดและไม่บาน (ศรชี้)	37
13	การออกดอกในหลอดทดลอง (ศรชี้) ของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร บนอาหารเติม PBZ เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 3 เดือน (บาร์ 1 เซนติเมตร)	39
14	อัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร ที่จุ่มแช่ด้วยโคลชิซินความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ หลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	41
15	ต้นกล้าที่พัฒนาจากชิ้นส่วนข้อของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรที่ได้รับโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ 48 ชั่วโมง หลังเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW เป็นเวลา 60 วัน (บาร์ 1 เซนติเมตร)	42
16	คลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW เป็นเวลา 8 เดือน (บาร์ 1 ไมโครเมตร)	44
17	ฮีสโตแกรมแสดงระดับพลอยดีของข้าว (aa) และลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร (3) ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ	46

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

2,4-D = 2,4-dichlorophenoxy acetic acid

2-iP = 2-isopentenyladenine

ABA = abscisic acid

AC = activated charcoal

BA = benzyladenine

BAP = 6-benzylaminopurine

CW = coconut water

GA_3 = gibberellic acid

Hy = hyponex (Hyponex Japan, 6.5-6-19, N-P-K)

IBA = Indole-3-butyric acid

KC = Knudson C medium

Kn = kinetin

MS = Murashige and Skoog medium

NAA = α-naphthaleneacetic acid

PBZ = paclobutrazol

TDZ = 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazol-5-yl)-urea

VW = Vacin and Went medium

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กล้วยไม้เป็นพืชในวงศ์ Orchidaceae มีผู้นิยมปลูกเลี้ยงกันทั่วโลก เพราะดอกมีสีสันสวยงาม ที่พบตามธรรมชาติมีประมาณ 25,000 ชนิด (species) ซึ่งแหล่งกำเนิดกล้วยไม้ป่าของโลกมี 2 แหล่ง ใหญ่ๆ ด้วยกัน คือ ลาตินอเมริกา และเอเชียแปซิฟิก โดยประเทศไทยเป็นศูนย์กลางแหล่งกำเนิด กล้วยไม้ในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ด้วยความเหมาะสมและได้เปรียบทางภูมิศาสตร์ จากสภาพป่าที่ หลากหลาย มีพรรณไม้ในธรรมชาติขึ้นกระจายอยู่อย่างอุดมสมบูรณ์ รวมถึงกล้วยไม้ป่านานาชนิด โดยเฉพาะกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) ซึ่งมีการเจริญเติบโตแบบซิมโพเดียล (sympodial) หรือเมื่อลำต้นเจริญเติบโตเต็มที่จะแตกยอดเป็นลำต้นใหม่และเป็นกอ เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่สุด เนื่องจากอยู่ตามธรรมชาติเป็นจำนวนมากกว่ากล้วยไม้สกุลอื่นๆ สำหรับกล้วยไม้สกุลหวายที่เป็น กล้วยไม้ป่าของไทยนั้นมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น เอื้องผึ้ง เอื้องม่อนไข่ เอื้องพวงหยก เอื้องช้างน้าว เอื้องสายน้ำครั่ง เอื้องเก้ากิ่ว เอื้องมัจฉานุ และเหลืองจันทบูร เป็นต้น กล้วยไม้เหลืองจันทบูรเป็นหนึ่ง ในกล้วยไม้ป่าสกุลหวายที่มีความสำคัญ และใกล้สูญพันธุ์ เนื่องจากดอกมีลักษณะและสีสันสวยงาม จึงถูกนำออกจากป่าเพื่อการจำหน่ายและขาดการอนุรักษ์ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้กล้วยไม้ป่า ลดจำนวนลง

ในปัจจุบันกล้วยไม้จัดเป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของไทย มีการส่งทั้งดอก และต้นกล้วยไม้ไปจำหน่ายต่างประเทศปีละหลายพันล้านบาท ในช่วงระยะเวลาไม่กี่ปีที่ผ่านมา การค้ากล้วยไม้เติบโตอย่างมากทั้งในด้านปริมาณและมูลค่า ทำให้การผลิตกล้วยไม้เพื่อการค้ามีการ แข่งขันสูงขึ้น จึงได้มีการศึกษาหาวิธีเพิ่มผลผลิตและคุณภาพ เพื่อผลิตกล้วยไม้เชิงการค้าและอนุรักษ์ ตลอดจนสามารถปรับปรุงพันธุ์ให้ดอกขนาดใหญ่ขึ้นด้วยวิธีการเพิ่มจำนวนโครโมโซม หรือทำให้เกิด การกลายพันธุ์โดยการใช้โคลชิซิน ซึ่งจะทำให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม แต่การใช้สาร โคลชิซินกับกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรยังไม่พบรายงานการ ศึกษาวิจัย ดังนั้น จึงได้ทำการทดลองใช้โคลชิซินความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ กับกล้วยไม้ลูกผสม ระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร เพื่อศึกษาผลที่มีต่อการเกิดพอลิพลอยด์ และการ เจริญเติบโตของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร เพื่อเพิ่ม ศักยภาพกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างหวายซานทานากับเหลืองจันทบูรสู่ตลาดและการผลิตในระดับ อุตสาหกรรม และยังสามารถเป็นแนวทางเพื่อปรับใช้กับกล้วยไม้ไทยชนิดอื่นในอนาคตต่อไป

การตรวจเอกสาร

กล้วยไม้หวายซานทานา (*D. santana*) เป็นลูกผสมระหว่างกล้วยไม้ *D. moniliforme* ซึ่งเป็นหวายป่าประเภทนอบิเล่แคระ (dwarf Nobile) กับเหลืองจันทบูร (*D. friedericksianum*) กล้วยไม้ป่าของไทย เมื่อผสมกับเหลืองจันทบูรจึงทำให้หวายซานทานาเป็นกล้วยไม้ที่ออกดอกได้ตลอดปี ออกดอกได้ในขนาดเป็นไม้นิ้ว เมื่อโตขึ้นดอกดกมาก ดอกมีสีเหลือง กลีบดอกหนาและไม่มีกลิ่นหอม (ภาพที่ 1ก และ ข) เมื่อนำกล้วยไม้หวายซานทานามาผสมกับกล้วยไม้เหลืองจันทบูร (ภาพที่ 1ค และ ง) อีกชั้นหนึ่ง จึงได้ลูกไม้ที่เลี้ยงง่ายยิ่งขึ้นและเป็นสายพันธุ์นอบิเล่ที่เลี้ยงในที่ร้อนได้ดี ออกดอกตลอดปี เหมาะสำหรับปลูกเลี้ยงเป็นกล้วยไม้เศรษฐกิจ และเป็นพืชต้นแบบสำหรับศึกษาการชักนำดอกในหลอดทดลอง เพื่อผลิตเป็นสินค้าที่ระลึก สร้างมูลค่าเพิ่มให้ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

ภาพที่ 1 ลักษณะดอกของกล้วยไม้ (ก และ ข) หวายซานทานา และ (ค และ ง) เหลืองจันทบูร

กล้วยไม้จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากมีความนิยมทั้งในและต่างประเทศ ปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งกล้วยไม้เขตร้อน (tropical orchid) เป็นอันดับ 1 ของโลก เป็นสินค้าส่งออกไปยังประเทศต่างๆ เช่น ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อิตาลี จีน และเวียดนาม และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมูลค่าการส่งออกสินค้ากล้วยไม้เดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560 เพิ่มขึ้น 9.64 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเดียวกันของปี พ.ศ. 2559 แนวโน้มพฤติกรรมผู้บริโภคต่อสินค้ากล้วยไม้ พบว่า ปัจจุบันนี้ผู้บริโภคยังคงมีต้องการดอกกล้วยไม้ที่มีคุณภาพและกล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีความหลากหลาย (สำนักงานส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตรและอุตสาหกรรม, 2561) กล้วยไม้สกุลหวายนิยมปลูกทั่วทุกภาคของประเทศไทย เนื่องจากปลูกเลี้ยงง่าย ต้นเจริญเติบโตดี ออกดอกตลอดปี ดอกมีสีสันและลวดลายงดงาม จากความต้องการกล้วยไม้สกุลหวายทั้งในและต่างประเทศที่เพิ่มมากขึ้น การพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ทั้งด้วยวิธีการสร้างลูกผสม และการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ให้มีลักษณะดีเด่นเป็นที่ต้องการของตลาดจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง การจดทะเบียนเพื่อป้องกันการขโมยหรือแอบอ้างกล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่หรือกล้วยไม้ลูกผสม จำเป็นต้องมีวิธีการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ โดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

1. การศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) ตรวจสอบลูกผสม

เทคนิคอาร์เอพีดีเป็นการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) แบบสุ่มโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะเจาะจง ขนาดสั้นๆ 10-20 นิวคลีโอไทด์ เทคนิคนี้สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งในคราวเดียวกัน โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย แต่ต้องมีการทดลองใช้ไพรเมอร์หลายชนิด เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ชนิดใดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเป็นผลจากการที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ 2 บริเวณที่อยู่ไม่ไกลกันมาก โดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางเข้าหากัน (5' --> 3') เทคนิคอาร์เอพีดีสามารถทำได้สะดวกและรวดเร็ว ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย และตรวจสอบผลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) มีรายงานการนำเครื่องหมายอาร์เอพีดีมาใช้จำแนกความสัมพันธ์และความแปรปรวนของกล้วยไม้หวาย (Ferreira *et al.,* 2006a; Khosravi *et al*., 2009; Zha *et al.,* 2009; Xue *et al.,* 2010; Antony *et al.,* 2012) และกล้วยไม้ชนิดอื่นๆ เช่น ฟาแลนอปซิส (Goh *et al.,* 2005; Niknejad *et al.,* 2009) แวนด้า (Lim *et al.,* 1999; Kishor and Sharma, 2009) ช้าง (นฤมล และคณะ, 2556) แคทลียา (Pinheiro *et al.,* 2012)

สำหรับการตรวจสอบลูกผสมด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี มีรายงานการศึกษา ในกล้วยไม้บางชนิด เช่น กล้วยไม้หวาย Inthawong และคณะ (2006) รายงานการตรวจสอบพ่อ แม่ และลูกผสมกล้วยไม้สกุลหวาย 5 คู่ผสม โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ด้วยไพรเมอร์ OPF03 และ OPF14 Feng และคณะ (2013) ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวาย *D. nobile* กับ *D. moniliforme* ซึ่งเป็นดิพลอยด์ มีจำนวนชุดโครโมโซม 2n = 38 ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า จากการใช้ไพรเมอร์ จำนวน 500 ไพรเมอร์ สร้างแถบดีเอ็นเอ ทั้งหมด 286 แถบ ขนาด 150-2000 คู่เบส ตรงกับ *D. nobile* จำนวน 136 แถบ และตรงกับ *D. moniliforme* จำนวน 122 แถบ และมีรายงานการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบลูกผสมของกล้วยไม้อื่น เช่น Kishor and Sharma (2009) รายงานการตรวจสอบลูกผสมระหว่าง *Renanthera imschootiana* กับ *Vanda coerulea* ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า ไพรเมอร์ OPA1 สามารถระบุความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมได้โดย ลูกผสมมีแถบโมโนมอร์ฟิค (monomorphic band) ที่ตรงกับพ่อและแม่ ที่ตำแหน่ง 837 คู่เบส แถบโมโนมอร์ฟิคกับต้นแม่ ที่ตำแหน่ง 541 611 และ 1,998 คู่เบส และลูกผสมสร้างแถบพอลิมอร์ฟิค (polymorphic band) ที่ตำแหน่ง 794 941 และ 1,618 คู่เบส

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์เป็นอย่างมากในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมากตามธรรมชาติมีความงอกน้อย จนในปี ค.ศ. 1922 Dr. Lewis Knuson เป็นบุคคลแรกที่ค้นพบและประสบผลสำเร็จในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในอาหารปลอดเชื้อ (Arditti and Ernst, 1993) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความสำคัญต่อการขยายพันธุ์กล้วยไม้ ทั้งด้านการเพิ่มปริมาณกล้วยไม้ที่ใกล้สูญพันธุ์ การเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้เพื่อการค้า และการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ลักษณะที่ดี หรือแปลกใหม่ตรงตามความต้องการ อย่างไรก็ตาม กล้วยไม้แต่ละชนิดมีความต้องการสภาพการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ ชิ้นส่วนพืชเป็นปัจจัยสำคัญขั้นแรก การตัดสินใจเลือกชิ้นส่วนพืชเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ ความพร้อมและเพียงพอของชิ้นส่วน โดยเฉพาะพืชหายากหรือเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ นักวิจัยต้องศึกษาหาชิ้นส่วนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ da Silva และคณะ (2015) รายงานว่า ชิ้นส่วนพืชของกล้วยไม้หวายที่นักวิจัยส่วนใหญ่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ ลำต้นและข้อ (Bhadra *et al.,* 2002; Pyati *et al.,* 2002; Shiau *et al.,* 2005; Huang *et al.,* 2008; Luo *et al.,* 2008; Kumari and George, 2011; Zhao *et al.,* 2013) ปลายยอด (Roy and Banerjee, 2003; Saiprasad *et al.,* 2004; Malabadi *et al.,* 2005; Roy *et*

al., 2007; Gantait *et al.,* 2009, Pant and Thapa, 2012; Pradhan *et al.,* 2013) ใบ (Nasiruddin *et al.,* 2003; Chung *et al.,* 2005; Martin and Madassery, 2006; Chung *et al.,* 2007; Tee *et al.,* 2010) ราก (Maridass *et al.,* 2010) เป็นต้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ประสบผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ นอกจากชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตแล้ว ต้องพิจารณาถึงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น แสง อุณหภูมิ ความชื้นและอากาศภายในขวด

2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ในหลอดทดลอง

มีรายงานการศึกษาปัจจัยต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์กล้วยไม้ในหลอดทดลอง เช่น สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต อุณหภูมิและแสง และสารเติมอื่นๆ เป็นต้น

2.1.1 สูตรอาหาร

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หวายมีมากมายหลายสูตรด้วยกัน เช่น MS (Murashige and Skoog) สูตร ½MS สูตร Knudson C (KC) สูตร Vacin and Went (VW) สูตร B5 (Gamborg *et al.,* 1968) สูตร N6 (Chu *et al.,* 1975) และสูตร Phytotechnology (Asghar *et al.,* 2011) แต่ละสูตรมีองค์ประกอบของอาหารที่แตกต่างกัน การเลือกใช้ขึ้นอยู่กับชนิด ชิ้นส่วนพืช และวัตถุประสงค์ da Silva และคณะ (2015) รวบรวมรายงานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หวาย พบว่า ส่วนใหญ่นิยมเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (79.3 เปอร์เซ็นต์) รองลงมา คือ สูตร KC และสูตร VW ตามลำดับ

2.1.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ที่นิยมนำมาเติมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้มีหลายกลุ่ม ดังนี้ กลุ่มไซโทไคนิน เช่น benzyladenine (BA) kinetin (Kn) 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazol-5-yl)-urea (TDZ) กลุ่มออกซิน เช่น **α**-naphthaleneacetic acid (NAA) Indole-3-butyric acid (IBA) 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) indole acetic acid (IAA) และกลุ่มอื่นๆ เช่น triacotanol (TRIA) เป็นต้น สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หวาย สารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้มากที่สุด คือ BA และ NAA กล้วยไม้หวายต่างชนิดและชิ้นส่วนตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกัน Li และคณะ (2013) รายงานว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อ

การชักนำยอด *D. pendulum* และ *D. primulinum* คือ สูตร ½ MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำยอด *D. heterocarpum* คือ สูตร ½ MS เติม BA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร สูตรสำหรับชักนำราก *D. pendulum* และ *D. heterocarpum* คือ สูตร ½ MS เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกล้วยบด 100 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำราก *D. primulinum* คือ สูตร ½ MS เติม NAA เข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด 100 กรัมต่อลิตร Shiau และคณะ (2005) รายงานการเพิ่มปริมาณยอดจำนวนมากของ *D. candidum* โดยเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.1.3 อุณหภูมิและแสง

อุณหภูมิและแสงที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หวาย พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 25±2 องศาเซลเซียส และให้แสง 10-16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 350-3,000 ลักซ์ หรือ 13.5-150 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที (Da Silva *et al*., 2015)

2.1.4 สารเติมอื่นๆ

นอกจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีรายงานการเติมสารเสริมอื่นๆ เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในหลอดทดลอง เช่น น้ำมะพร้าว กล้วย มันฝรั่ง (Arditti and Emst, 1993) นอกจากสารอินทรีย์ที่กล่าวข้างต้น มีรายงานการใช้ไคโตซาน ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่กำจัดหมู่อะซีติลของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine ตั้งแต่ร้อยละ 50 ขึ้นไป ไคโตซานนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในด้านต่างๆ เพราะปลอดภัยต่อมนุษย์ มีรายงานการเติมไคโตซานในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อกระตุ้นการเติบโตและการพัฒนาของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในหลอดทดลอง (Limpanavech *et al.,* 2008; Nge *et al.,* 2006; Pornpienpakdee *et al.,* 2010; Obsuwan *et al.,* 2010; Prasertsongskun and Chaipakdee, 2011) ไคโตซาน เข้มข้น 15 พีพีเอ็ม กระตุ้นการเติบโตและพัฒนาของโพรโทคอร์มไลค์บอดีส์ (protocorm like bodies) ของกล้วยไม้หวาย (Restanto *et al.,* 2016) Kananont และคณะ (2010) รายงานว่า ไคโตซานส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโพรโทคอร์มกล้วยไม้หวาย 2 ชนิด คือ *D. bigibbum* และ *D. formosum* ในขณะที่ Kaewjampa และคณะ (2012) รายงานว่า สามารถเพิ่มจำนวนโพรโทคอร์มไลค์บอดีส์ของ

ซิมบิเดียมได้เป็นจำนวนมาก เมื่อเลี้ยงบนอาหารเติมไคโตซาน ชนิด HA9 (sodium hyalunomate) เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Sopalun และคณะ (2010) รายงานว่า สามารถเพิ่มปริมาณโพรโทคอร์มไลค์บอดีส์ของว่านเพชรหึง (*Grammatophyllum speciosum*) เป็น 7 เท่า เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½ MS เติมไคโตซาน เข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังรายงานว่าไคโตซานเป็นตัวกระตุ้นให้พืชในหลอดทดลองสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ได้อีกด้วย

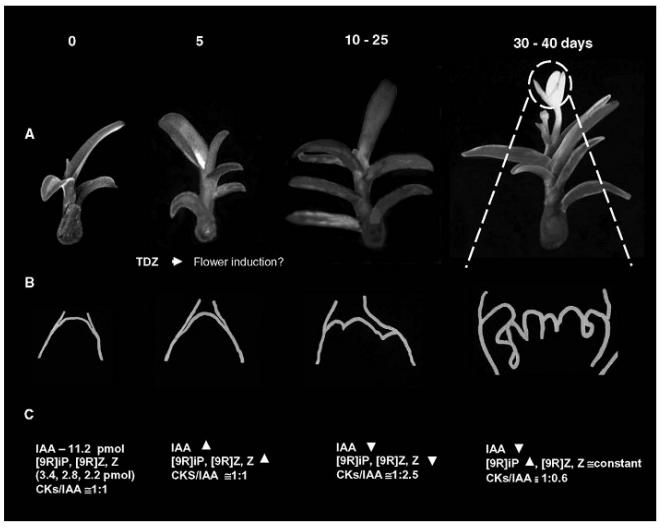
3. การชักนำดอกในหลอดทดลอง

มีรายงานการศึกษาการชักนำดอกในสภาพปลอดเชื้อ รวมไปถึงการศึกษาชีววิทยาของดอกเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ในกล้วยไม้หลายสกุล เช่น สกุลซิมบิเดียม (Chang and Chang, 2003; Kostenyuk *et al*., 1999) กล้วยไม้สกุลหวาย (สมพร และวิทูล, 2550; Hee and Loh, 2007; Hee *et al*., 2009; Sim *et al*., 2007; Wang *et al*., 1997; Wang *et al*., 2009b) ออนซิเดียม (Kerbauy, 1984) หรือในไม้ดอกไม้ประดับอื่นๆ เช่น ต้นแก้ว [*Murraya paniculata* (L.) Jack] (Jumin and Nito, 1995; Jumin and Ahmad, 1999) *Spathiphyllum* (Dewir *et al.,* 2007) คาร์เนชัน (Sangkhla *et al.,* 1994) ไผ่ (Rout and Das, 1994) เป็นต้น การเกิดดอกของพืชแต่ละชนิดในหลอดทดลองต้องการปัจจัยที่แตกต่างกันไป โดยเฉพาะสูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต นอกจากนี้ สภาพแวดล้อมในการวางเลี้ยงก็มีผลต่อการออกดอกในหลอดทดลองของพืชเช่นกัน

การเกิดดอกในหลอดทดลองของกล้วยไม้ นอกจากนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ลูกผสมแล้ว ยังเป็นต้นแบบในการศึกษากลไกของการเกิดดอกและพัฒนาการ การปรับปรุงกล้วยไม้ด้วยวิธีการมาตรฐานใช้เวลานาน เนื่องจากกล้วยไม้สร้างยอด 2-4 ยอดต่อปี และใช้ระยะเวลา 2-3 ปี ในการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นจนผลิตดอก ดังนั้นวงรอบในการปรับปรุงพันธุ์ ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 3-5 ปี การชักนำดอกในหลอดทดลองสามารถช่วยร่นระยะเวลา เป็น 5-6 เดือน (Hee *et al.*, 2007; Sim *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009) เพื่อใช้ในการคัดเลือกลักษณะสี รูปทรง และขนาดดอกก่อนที่จะนำต้นที่มีลักษณะตรงตามความต้องการไปเพิ่มปริมาณเพื่อการค้าต่อไป (Sim *et al.*, 2007) หรือเพื่อศึกษาการผสมเกสรและพัฒนาเมล็ดในหลอดทดลอง (Hee *et al*., 2009; Chang *et al.,* 2010) กล้วยไม้ชนิดแรกที่ประสบผลสำเร็จในการชักนำดอกในหลอดทดลอง คือ *Laeliocattleya* (Knudson, 1930)

3.1 กลไกการเกิดดอก

การสร้างดอก เป็นการพัฒนาจากระยะเจริญเติบโตทางด้านลำต้น เข้าสู่ระยะการสืบพันธุ์ โดยการสร้างดอกหรือช่อดอก กล้วยไม้โดยส่วนใหญ่ ประสบผลสำเร็จในการชักนำการออกดอกในหลอดทดลองจากต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดจากฝักอ่อน (Wang *et al.*, 1997; Sim *et al.*, 2007) นอกจากนี้ มีรายงานการชักนำดอกจากยอดที่พัฒนามาจากชิ้นส่วนอื่น เช่น Guan และ Shi (2009) ประสบผลสำเร็จในการชักนำดอกจากยอดที่พัฒนามาจากชิ้นส่วนลำต้น *D. aurantiacum* var. *denneanum* Duan และ Yazawa (1995) รายงานการชักนำดอกจากยอดที่พัฒนามาจากก้านช่อดอกฟาแลนอปซิส และรายงานว่า มีการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนภายในยอดพืชในขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงตายอดเป็นตาดอก Ferreira และคณะ (2006b) รายงานผลของ TDZ ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมน IAA Zeatin riboside ([9R]-Z) 2-isopentenyl adenine (2-iP) และ 9R-isopentenyl adenosine ([9R]-iP) ภายในเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของ *D.* Second Love ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงจากตายอดเป็นตาดอกในหลอดทดลอง พบว่า TDZ เข้มข้น 1.8 ไมโครโมลาร์ มีผลต่อระดับฮอร์โมนไซโทไคนิน และ IAA ภายในชิ้นส่วนพืช โดยเฉพาะ [9R]-iP และ [9R]-Z โดยตรวจพบระดับไซโทไคนินสูงขึ้นครั้งแรกหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน และพบระดับไซโทไคนินสูงขึ้นเป็นครั้งที่ 2 หลังเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน ซึ่งสัมพันธ์กับการพัฒนาของดอก (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนภายในชิ้นส่วนยอด *D.* Second Love ขณะมีการเปลี่ยนแปลงจากตายอดเป็นตาดอก หลังเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำดอก (TDZ 1.8 μM) เป็นเวลา 40 วัน

(A) ยอด (B) ปลายยอด (C) ระดับ IAA [9R]-iP [9R]-Z Z และ CKs/IAA

ที่มา: Ferreira และคณะ (2006b)

นอกจากนี้ การออกดอกของกล้วยไม้ในหลอดทดลองยังใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษายีนภายในเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นตาดอก เพื่อหากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างดอก เช่น Yu และ Goh (2000) พบยีน *DOMADS*1 ในเนื้อเยื่อตาดอกของหวาย *D.* Madame Thong-In และ Hsu และ Yang (2002) รายงานว่ายีน *OMADS*3 มีความสัมพันธ์กับการสร้างดอกใน *Oncidium* Gower Ramsey

3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการออกดอกในหลอดทดลองของกล้วยไม้

การออกดอกของกล้วยไม้ในหลอดทดลอง เกิดจากหลายปัจจัย เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโต การเตรียมชิ้นส่วนหรือต้นกล้าก่อนการชักนำดอก อัตราส่วนของธาตุอาหาร องค์ประกอบและสถานะอาหาร ตลอดจนสภาพแวดล้อมอื่นๆ ในการวางเลี้ยงเพื่อชักนำดอกในหลอดทดลอง

3.2.1 สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโต โดยเฉพาะกลุ่มไซโทไคนินมีบทบาทสำคัญต่อการชักนำการออกดอกของกล้วยไม้ในหลอดทดลอง มีรายงานว่า BA มีประสิทธิภาพดีสำหรับชักนำดอกกล้วยไม้ในหลอดทดลอง เช่น กล้วยไม้สกุลหวาย (Hee *et al.*, 2007; Sim *et al.*, 2007; Tee *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009) ต้นกล้ากล้วยไม้ชนิดต่างๆ ไม่มีการสร้างดอกเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารปราศจาก BA (Hee *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Sim *et al.*, 2007) เช่น ซิมบิเดียม (Kostenyuk *et al.*, 1999) ฟาแลนอปซิส (Duan and Yazawa, 1995) การเติม BA ร่วมกับน้ำมะพร้าว หรือสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น ส่งเสริมการเกิดดอกของกล้วยไม้ในหลอดทดลอง Wang และคณะ (1997) รายงานว่า ออกซิน ยับยั้งการสร้างดอกของ *D. candidum* โดยลดประสิทธิภาพการกระตุ้นการเกิดดอกเนื่องจากไปลดกิจกรรมของ BA

Guan และ Shi (2009) และ Zhao และคณะ (2013) รายงานว่า การเติม BA ร่วมกับ NAA ลดเปอร์เซ็นต์การสร้างดอกของกล้วยไม้ *D. denneanum* และ *D. wangliangii* Wang และคณะ (2009) รายงานว่า BA ไม่ส่งเสริมการเกิดดอกในหลอดทดลองของ *D. nobile* ส่วน TDZ ความเข้มข้นต่ำ (0.05-0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่งเสริมการเกิดดอกในหลอดทดลอง Chang และ Chang (2003) พบว่า การเติม TDZ เข้มข้น 3.3 ไมโครโมลาร์ หรือ 2-iP เข้มข้น 10-33 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1.5 ไมโครโมลาร์ ในอาหารเพาะเลี้ยง *Cymbidium ensifolium* เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เหมาะสำหรับการชักนำดอก และการบานของดอก

นอกจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตดังกล่าวข้างต้นแล้ว มีรายงานการใช้สารชะลอการเจริญเติบโต ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำดอกกล้วยไม้ในหลอดทดลอง เช่น paclobutrazol (PBZ) ซึ่งเป็นสารชะลอการเจริญเติบโตที่ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของพืช เป็นสารประกอบในกลุ่มไทรอะโซล (triazole) สูตรทางเคมี คือ $C_{15}H_{20}ClN_3O$ มีชื่อการค้าต่างๆ เช่น PP_{333} Cultar และ Clipper เป็นต้น PBZ มีคุณสมบัติยับยั้งการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินในพืช จึงมีผลชะลอการแบ่งเซลล์และการยืดยาวของเซลล์ในบริเวณใต้ปลายยอด แต่ยังคงมีความเจริญเติบโตทางลำต้น อีกทั้งยังเพิ่มการติดผลและคุณภาพของผลผลิต นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นให้เกิดตาดอกเร็วขึ้น โดยขนาดและคุณภาพของดอกคงเดิม (Hopskin and Huner, 2008) Te-chato และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการชักนำยอดของกล้วยไม้หวายเหลืองจันทบูร ขนาด 2-3 เซนติเมตร และมี ข้อ 2-3 ข้อ เลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ PBZ พบว่า PBZ ความเข้มข้น 0.025-0.075 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นการแตกยอดบริเวณข้อ ประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ และ PBZ ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นการเกิดดอก 29 เปอร์เซ็นต์ ดอกมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-4 เซนติเมตร มี 3 กลีบเลี้ยง และ 2 กลีบดอก 1 กลีบปาก เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย ทั้งนี้มีรายงานการเกิดดอกในหลอดทดลองของกล้วยไม้หลายชนิด เช่น กล้วยไม้หวาย ซิมบิเดียม ฟาแลนอปซิส (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 รายงานการศึกษาการออกดอกของกล้วยไม้ในหลอดทดลอง

ชนิดพืช	ชิ้นส่วน	สูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโต	อ้างอิง
Cymbidium ensifolium var. *misericors*	rhizome	½ MS + NAA 1.5 µM + TDZ 3.3-10 µM หรือ 2-iP 10-33 µM	Chang และ Chang (2003)
Cymbidium niveo-marginatum Mak.	rhizome	MS + BAP 5-10 มก/ล หรือ TDZ 2.5 มก/ล	Kostenyuk และคณะ (1999)
Dendrobium candidum	seedling shoot	Pretreatment MS+ABA ย้ายเลี้ยง MS+BA 0.5 มก/ล เกิดดอกภายใน 150 วัน (82.8%)	Wang และคณะ (1997)
Dendrobium candidum Wall. ex. Lindl	seedling protocorm	NAA BA ABA	Wang และคณะ (1993)

ชนิดพืช	ชิ้นส่วน	สูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโต	อ้างอิง
Dendrobium Chao praya smile	seedling	อาหาร 2 ชั้น KC+BAP 11.1 µM	Hee และคณะ (2007)
Dendrobium Madame Thong-In.	seedling	อาหารเหลวดัดแปลงสูตร KC+ BAP 4.4 µM ย้ายต้นกล้าเลี้ยง อาหาร 2 ชั้น K5/KRA = KC+BA 22.2 µM /อาหารแข็ง KC+AC 0.03%	Sim และคณะ (2007)
Dendrobium nobile Lindl.	seedling	pretreatment สูตร ½MS + PP_{333}และ NAA 90 วัน ย้าย ½MS +TDZ และเลี้ยงที่ อุณหภูมิต่ำ	Wang และ คณะ (2009)
Dendrobium Second Love	shoot	อาหารดัดแปลงสูตร VW + TDZ 1.8 µM	Ferreira และ คณะ (2006)
Dendrobium wangliangii	protocorm	½MS + TDZ 2 มก/ล หรือ PP_{333} 0.3 มก/ล และ NAA 0.5 มก/ล	Zhao และคณะ (2013)
*Doriella*Tiny *(Doritis pulcherrima X Kingiella philippinensis)*	nodes	Hy + BA 5 มก/ล + CW 15% + ซูโครส 2.5% (pH 5.6) เกิดดอก 47% (40 วัน) 93% (80 วัน)	Duan and Yazawa (1994)
Laelio cattleya hybrid	nodes	½KC (pH 4.9)	Knudson (1930)
Oberonia recurva Lindl.	seedling	½MS + Kn 13.95 µM และ BA 4.44 µM	Thakur และ Dongarwar (2013)
Oncidium varicosum	seedling	KC	Kerbauy (1984)
Phalaenopsis hybrida	nodes	ABA	Wang และ คณะ (2002)

ชนิดพืช	ชิ้นส่วน	สูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโต	อ้างอิง
Phalaenopsis spp.	nodes	Hy+BAP 22 μM	Duan and Yazawa (1995)
Psygmorchis pusilla Dodson and Dressler	seedling	อาหารดัดแปลงสูตร KC กล้วยบด 6%	Vaz และคณะ (2004)
Spathoglottis plicata Bl.	seedling	Kn และ NAA	Murthy และคณะ (2006)

ABA = abscisic acid, BAP = 6-benzylaminopurine, BA = benzyladenine, NAA = naphthaleneacetic acid, TDZ = 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazol-5-yl)-urea, PP_{333} = paclobutrazol, GA_3 = gibberellic acid, Hy = Hyponex (Hyponex Japan, 6.5-6-19, N-P-K), AC = activated charcoal, CW = coconut water, KC = Knudson C medium, MS = Murashige and Skoog medium, VW = Vacin and Went medium, Kn = kinetin, 2-iP = isopentenyladenine

3.2.2 การเตรียมชิ้นส่วนหรือต้นกล้าก่อนการชักนำดอก

การเตรียมชิ้นส่วนหรือต้นกล้าก่อนการวางเลี้ยงบนอาหารชักนำดอก มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการเกิดดอกในหลอดทดลองของกล้วยไม้ ซึ่งมีวิธีการทำได้หลายวิธี เช่น การตัดราก Kostenyuk และคณะ (1999) รายงานว่า การเลี้ยงไรโซม *Cymbidium niveo-marginatum* Mak บนอาหารเติม BA เพียงอย่างเดียว ชักนำดอกในหลอดทดลองได้ 40 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อตัดรากต้นกล้า ก่อนย้ายปลูกบนอาหารสูตรชักนำดอก หลังการวางเลี้ยง เป็นเวลา 90 วัน พบว่า เกิดช่อดอกเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ มีรายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชหรือต้นกล้าบนอาหารที่เติมสารอินทรีย์บางชนิดหรือสารชะลอการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลาหนึ่ง ก่อนย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำดอก พบว่า สามารถกระตุ้นการสร้างดอกกล้วยไม้สกุลหวาย Wang และคณะ (1997) รายงานว่า การเลี้ยงโพรโทคอร์ม *D. candidium* บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำช่อดอกได้ 27 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเลี้ยงโพรโทคอร์มบนอาหารสูตร MS เติม ABA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 15 วัน แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ภายในเวลา 5 เดือน สามารถชักนำช่อดอก 84 เปอร์เซ็นต์ แต่การวางเลี้ยงโพรโทคอร์มอย่างต่อเนื่องบนอาหารเติม ABA หรือวางเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น (30 วัน) ก่อนย้ายเลี้ยงบนอาหารชักนำดอกไม่พบการสร้างดอก Wang และคณะ (2009) การวางเลี้ยงต้นกล้า *D. nobile* อายุ 2-3 เดือน หลังจากการเพาะเมล็ด บนอาหารสูตร ½MS เติม PP_{333}

เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วัน ก่อนย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS เติม PP_{333} เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการวางเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ คือ กลางวัน 23 องศาเซลเซียส กลางคืน 18 องศาเซลเซียส ช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดช่อดอก และดอกบานปกติ Deb (2009) นำต้นกล้าหวาย *D. Primulinum* สูง 5-7 เซนติเมตร ที่ได้จากการเพาะเมล็ดย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำแอปเปิ้ล 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากน้ำแอปเปิ้ล เติม NAA เข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ และ BA เข้มข้น 12 ไมโครโมลาร์ พบว่า เกิดดอกในหลอดทดลอง 4-5 ดอกต่อช่อ Sim และคณะ (2007) พบว่า มีกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากตายอดเป็นตาดอก เมื่อเลี้ยงโพรโทคอร์มหวาย *D.* Madame Thong-In ในอาหารเหลวสูตร KC ในขณะที่โพรโทคอร์มที่เลี้ยงบนอาหารแข็งเติมเจลไรต์สร้างกลุ่มยอดและราก อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงในอาหารเหลวทำให้ได้ดอกที่มีลักษณะผิดปกติ แต่ดอกจะบานปกติเมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร 2 ชั้น (เททับอาหารเหลวบนอาหารแข็ง) ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สามารถชักนำดอกในหลอดทดลองได้ภายในระยะเวลา 5 เดือน หลังจากเพาะเมล็ด

3.2.3 อัตราส่วนของธาตุอาหารต่อการออกดอกของกล้วยไม้ในหลอดทดลอง

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบด้วยธาตุอาหาร น้ำตาล สารควบคุมการเจริญเติบโตและสารอินทรีย์อื่นๆ อัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรต ธาตุอาหาร และฮอร์โมนพืช เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเกิดดอกในหลอดทดลอง อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS มีองค์ประกอบของไนโตรเจนในปริมาณสูง ส่งเสริมการเจริญเติบโตทางลำต้น และยับยั้งการสร้างตาดอก (Sudhakaran *et al.,* 2006) Tee และคณะ (2008) รายงานว่า การเพิ่มปริมาณฟอสฟอรัสในอาหารมากขึ้น ลดไนโตรเจนให้น้อยลง ช่วยเพิ่มปริมาณการสร้างช่อดอกในหลอดทดลองของกล้วยไม้หวาย *D.* Sonia 17 ดีกว่าการเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่ไม่ได้ปรับอัตราส่วนฟอสฟอรัสและไนโตรเจน ทำนองเดียวกับ การชักนำดอกในหลอดทดลองของ *Doriella* ฟาแลนนอปซิส และหวายบางชนิด พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีไนโตรเจนสูง ทำให้การสร้างดอกลดลงหรือไม่มีการสร้างตาดอก (Duan and Yazawa, 1994) Kostenyuk และคณะ (1999) รายงานว่า การปรับลดปริมาณไนโตรเจน และเพิ่มฟอสฟอรัสในอาหารส่งเสริมการสร้างดอกซิมบิเดียมได้ดีกว่าการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มาตรฐาน

3.2.4 ปัจจัยภายในหลอดทดลอง

ข้อได้เปรียบของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมทั้งภายในและภายนอกหลอดทดลองได้ สภาพแวดล้อมภายในหลอดทดลอง เช่น องค์ประกอบและสถานะของอาหาร การเลือกชิ้นส่วนพืชจากช่วงระยะการเจริญเติบโตและแหล่งที่เหมาะสม การเพาะเลี้ยงบนอาหารสองชั้น (Hee *et al.,* 2007; Sim *et al.,* 2007) เป็นอีกเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการชักนำดอกกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ประสบผลสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเติมเจลไรต์ Hee และคณะ (2007) ศึกษาผลของการเติม BA ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเหลวสูตร KC แล้วเททับบนอาหารแข็งสูตร KC เติมเจลไรต์ และถ่านกัมมันต์ พบว่า BA ส่งเสริมการเกิดช่อดอกจาก 38 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง และการออกดอกเพิ่มเป็น 87 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA 4.4 ไมโครโมลาร์ การเติม BA ในอาหารเหลวชั้นบนส่งเสริมให้ดอกมีลักษณะปกติ นอกจากนี้ พบว่า การคัดเลือกต้นกล้าที่มีลักษณะปกติ สมบูรณ์ แข็งแรง ช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การสร้างดอกในหลอดทดลองจาก 45 เป็น 72 เปอร์เซ็นต์

3.2.5 ปัจจัยภายนอกหลอดทดลอง

ปัจจัยภายนอกหลอดทดลองที่มีความสำคัญต่อการออกดอกของพืช เช่น ช่วงเวลาที่พืชได้รับแสง และความเข้มแสง หรือการออกดอกของพืชบางชนิดขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ กล่าวคือ จะออกดอกต่อเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยอุณหภูมิต่ำเสียก่อน เรียกลักษณะเช่นนี้ ว่า การใช้ความเย็นกระตุ้นให้ออกดอก (vernalization) ซึ่งเป็นลักษณะของพืชในเขตหนาว Vaz และคณะ (2004) พบว่าระยะเวลาการให้แสงมีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างดอก ของ *Psygmorchis pusilla* Dodson and Dresser ช่วงแสงที่เหมาะสม คือ 12-14 ชั่วโมงต่อวัน ส่งเสริมการสร้างช่อดอกในหลอดทดลองและดอกบานปกติ ในขณะที่การให้แสงน้อยกว่านี้ทำให้ดอกไม่บานหรือช่วงเวลาบานสั้นลง ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและสร้างช่อดอก คือ 27 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ต่ำหรือสูงกว่านี้ (22 และ 32 องศาเซลเซียส) ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และไม่พบการสร้างดอกในหลอดทดลอง

4. การชักนำพอลิพลอยด์

การชักนำพืชให้เกิดพอลิพลอยด์ หรือการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเป็นเทคนิคในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมมากขึ้น มักมีผลให้พืชเพิ่มหรือขยายขนาดเซลล์ ส่งผล

ให้ลักษณะของส่วนร่างกายและส่วนสืบพันธุ์ใหญ่ขึ้น ลักษณะเหล่านี้แตกต่างจากพืชพอลิพลอยด์ที่พัฒนาจากการผสมเกสรตามธรรมชาติซึ่งพืชสามารถเกิดพอลิพลอยด์ได้แต่มีน้อย

การชักนำพืชให้เกิดพืชพอลิพลอยด์ ทำได้โดยการใช้สารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ช่วยในการแยกตัวของโครโมโซมในระยะแอนาเฟส เช่น โคลชิซิน ออริซาลิน ไตรฟลูราลิน อะมิโพรฟอสเมธิล และไนตรัสออกไซด์ สารเคมีที่นิยมใช้กันทั่วไป คือ โคลชิซิน ซึ่งเป็นสารประเภทอะโรมาติกอัลคาลอยด์มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ โคลชิซินมีผลต่อไมโครทิวบูล เนื่องจากโคลชิซินไปจับกับโปรตีนทูบูลิน ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของไมโครทิวบูล ทำให้ไมโครทิวบูลไม่สามารถสร้างเป็นเส้นใยยาวที่เรียกว่าเส้นใยสปินเดิลในขณะที่มีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นในระยะแอนาเฟสโครมาทิดจึงไม่สามารถถูกดึงไปที่ขั้วเซลล์ ทำให้เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมจาก 2n เป็น 4n หรือเป็นพอลิพลอยด์ (Starr and Taggart, 1995)

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้โดยการใช้โคลชิซินชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ เป็นเครื่องมือสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มขนาดดอก ลำลูกกล้วย หรือลักษณะอื่นตามต้องการ โดยทั่วไปความเข้มข้นของโคลชิซินที่ใช้อยู่ในช่วง 0.01–1.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สำหรับระยะเวลาที่ให้มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของกล้วยไม้และชิ้นส่วนที่ใช้ เช่น Vichiato และคณะ (2007) รายงานการชักนำเตตระพลอยด์ของ *D. nobile* Lindl. โดยการนำต้นกล้า สูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร แช่สารละลายโคลชิซิน เข้มข้น 0.05 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพมืด เป็นเวลา 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง แล้ว 7 เดือนต่อมา บันทึกอัตรารอดชีวิต ความสูง เส้นรอบวงลำลูกกล้วย และระดับพลอยดี โดยนับจำนวนโครโมโซมในระยะเมตาเฟส พบว่า การใช้โคลชิซินทั้งสองความเข้มข้น แช่เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ไม่มีผลทางสถิติต่ออัตรารอดชีวิต และโคลชิซินทั้งสองความเข้มข้นสามารถชักนำเตตระพลอยด์ (2n=4x=76 โครโมโซม) หลังการแช่เป็นเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง การแช่ต้นกล้าด้วยสารละลายโคลชิซิน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง สามารถชักนำต้นเตตระพลอยด์ได้เป็นจำนวนมาก

Atichart และ Bunnag (2007) รายงานว่า การแช่โพรโทคอร์ม *D. secundum* (Bl.) Lindl. ในสารละลายโคลชิซิน เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 วัน สามารถชักนำต้นพอลิพลอยด์ได้เป็นจำนวนมาก Sarathum และคณะ (2010) รายงานว่า การแช่โพรโทคอร์ม *D. scabrilingue* L. ในสารละลายโคลชิซิน เข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน โพรโทคอร์มมีอัตรารอดชีวิต สูงสุด 36.8 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำต้นเตตระพลอยด์ได้ 43.1 เปอร์เซ็นต์ สาริณี (2538) ศึกษาจำนวนโครโมโซม ลักษณะดอกและความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้หวาย *D. superbiens* ต้นดิพลอยด์ และอัลโลเตตระพลอยด์ ซึ่งเป็นต้นที่ได้มาจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมแคลลัสที่เป็นดิพลอยด์ ด้วยสารละลายโคลชิซิน เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษา พบว่า ต้นดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมปกติ เท่ากับ 2n=2x=38 และต้นอัลโลเตตระพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซม 2n=4x=76 จำนวนดอกในช่อน้อยกว่าต้นที่เป็นดิพลอยด์ แต่กลีบดอกของต้นอัลโลเตตระพลอยด์มี

ขนาดกว้าง ยาว และหนามากกว่า การบานของดอกต้นอัลโลเตตระพลอยด์นานกว่าดิพลอยด์เป็นเวลา 8 วัน เมื่อเปรียบเทียบความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ พบว่า ต้นเตตระพลอยด์มีความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์สูงกว่าต้นดิพลอยด์

นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในกล้วยไม้ชนิดอื่นๆ เช่น Silva และคณะ (2000) ศึกษาผลของโคลชิซินต่อการชักนำพอลิพลอยด์จากโพรโทคอร์มของกล้วยไม้ *Cattleya intermedia* L. ในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้โคลชิซิน เข้มข้น 0.00 0.05 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 และ 8 วัน พบว่า โคลชิซิน เข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดต้นที่เป็นมิกโซพลอยด์ และต้นเตตระพลอยด์ ที่มีขนาดปากใบและความหนาแน่นของปากใบเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติ และสามารถใช้ความหนาแน่นของปากใบเป็นตัวจำแนกความแตกต่างระหว่างต้นปกติกับต้นเตตระพลอยด์

Griesbach (1981) ศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส 3 ชนิด คือ *Phalaenopsis equestris, P. fasciata* และ *P. Betty hauserman* โดยนำฝักกล้วยไม้ที่มีอายุประมาณ 4–5 เดือน มาเพาะบนอาหารสูตร MS แล้วย้ายโพรโทคอร์มจำนวน 50 โพรโทคอร์ม ลงในอาหารเหลวเติมโคลชิซิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร วางบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 50 รอบต่อนาที นาน 10 วัน จากนั้นย้ายโพรโทคอร์มลงในอาหารปราศจากโคลชิซินและย้ายลงในอาหารใหม่ในเดือนต่อมา เมื่อพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์จึงย้ายออกปลูกและตรวจนับโครโมโซม พบว่า สามารถชักนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้นเตตระพลอยด์และออคตาพลอยด์ 46 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ต้นที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยโคลชิซินมีการปลดปล่อยสารประกอบฟีโนลในอาหารจึงต้องย้ายเปลี่ยนอาหารทุก 2 – 3 สัปดาห์ ต้นมีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นดิพลอยด์ ต้นเตตระพลอยด์ในสภาพธรรมชาติสามารถออกดอกได้หลังเพาะเมล็ดนาน 3 ปี แต่ต้นเตตระพลอยด์ที่ได้จากการชักนำสามารถออกดอกได้หลังเพาะเมล็ดนาน 5 ปี

Kim และคณะ (2003) ใช้ส่วนของโพรโทคอร์มที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดของลูกผสมซิมบิเดียมที่เป็นต้นดิพลอยด์ แช่สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.01 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 2 และ 3 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมเป็นสองเท่า พบว่า ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้โพรโทคอร์มตายมากที่สุด ส่วนความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำให้โพรโทคอร์มตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นและเวลาที่ดีที่สุด จำนวนโครโมโซมที่เกิดมีทั้งเป็นเตตระพลอยด์ และทริพลอยด์ และพบว่าระยะเวลาที่ได้รับสารละลายโคลชิซินไม่มีผลแตกต่างกันต่อการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม แต่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของโพรโทคอร์ม นอกจากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในเซลล์ปลายรากแล้ว ลักษณะของต้นพอลิพลอยด์ยังมีความแตกต่างจากต้นดิพลอยด์ในด้านรูปร่างใบและความยาวใบ

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร
2. เพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและชักนำดอกลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรในสภาพปลอดเชื้อ
3. เพื่อศึกษาความเข้มข้นของโคลชิซินและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำพอลิพลอยด์ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัสดุพืช

ในการศึกษานี้ใช้ต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรที่เพาะเมล็ดบนอาหารสูตร VW (Vacin and Went)

2. สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง

สูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นสูตร VW และ MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่างๆ

3. วัสดุสารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารสูตร VW และ MS น้ำตาลซูโครส วุ้น ไฟต้าเจล

3.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น ไคโตซาน BA 2,4-D TDZ PBZ

3.3 สารละลายปรับ pH คือ HCl และ KOH

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการชักนำและตรวจสอบการกลายพันธุ์ เช่น โคลชิซิน กรดอะซิติก และแอลกอฮอล์

3.5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอ ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ [Tris-HCl Triton-X polyvinylpyrrolidone (PVP)] dNTP (dATP dTTP dCTP และ dGTP) ไพรเมอร์ OPA03 OPAB01 OPAB09 OPAB14 OPB04 OPB04 OPB07 OPB08 OPB18 OPJ04 OPN15 OPR11 และ OPT06 แมกนีเซียมคลอไรด์ *Taq* polymerase และสีย้อมดีเอ็นเอ propidium iodide (PI)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

1.1 เครื่องแก้ว เช่น ไปเปต กระบอกตวง บีกเกอร์ ขวดปรับปริมาตร ฟลาสก์
1.2 กระดาษกรองจุลินทรีย์ ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
1.5 ตู้อบฆ่าเชื้อ หม้อนึ่งความดันไอไมโครเวฟ และตู้เย็น

2. อุปกรณ์สำหรับการย้ายเลี้ยงและวางเลี้ยง

2.1 ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2.2 ชุดเครื่องมือย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ปากคีบ ด้ามมีดพร้อมใบมีดผ่าตัด
2.3 เครื่องเขย่าเลี้ยง
2.4 ชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยง ควบคุมอุณหภูมิ 26+2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 8.75 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะของเซลล์คุม

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาเซลล์คุม ได้แก่ ใบมีด ปากคีบ แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์
3.2 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ (compound light microscope) ยี่ห้อ Olympus รุ่น BH2-RFL-T2

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอ

4.1 อุปกรณ์ในการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ ใบมีด หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ กระดาษกรอง ขนาด 20 ไมโครเมตร ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว
4.2 อุปกรณ์ชุดอิเลคโตรโฟรีซิส และการทำพีซีอาร์ ได้แก่ ตู้แช่แข็ง -20 และ -30 องศาเซลเซียส เครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง ไมโครปิเปต เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ เครื่องอิเลคโตรโฟรีซีส (LE Agarose, Promega, USA) เครื่อง XP

Thermal Cycler (บริษัท Bioer Technology จำกัด) รุ่น TC-XP ประเทศญี่ปุ่น เครื่องสเป็กโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Nano drop (ND-1000) เครื่องถ่ายภาพเจล เครื่องเขย่า (vortex)

4.3 เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ FACScalibur Flow Cytometer รุ่น Becton-Dickinson Japan

วิธีการ

1. การศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีตรวจสอบลูกผสม

การเตรียมดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนกล้วยไม้หวายซานทานา เหลืองจันทบูร และลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร โดยวิธี CTAB (hexadecyltrimetyammonium bromide) ที่ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1990) ใช้ตัวอย่างใบอ่อน ประมาณ 1 กรัมน้ำหนักสด ใส่ในโกร่งบดตัวอย่างที่แช่เย็น เติม CTAB buffer ซึ่งประกอบด้วย PVP-40 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ NaCl เข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์ Na_2EDTA เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 CTAB เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร บดตัวอย่างให้ละเอียด เทใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมาทุก 10 นาที เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมสารละลายไอโซโพรพานอล ปริมาตร 650 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ จนเห็นสายดีเอ็นเอ จากนั้นทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอนสู่ก้นหลอด เทสารละลายทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลแช่เย็น เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง วางตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (Tris-HCl (pH 7.0) 10 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA (pH 7.0) 1 มิลลิโมลาร์) ที่อุณหภูมิห้อง เก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้นอะกาโรส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสเจล เข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ละลายด้วย 1x TE buffer ผสมตัวอย่งดีเอ็นเอที่สกัดได้ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร กับ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยอดลงบนอะกาโรสเจล พร้อมดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ DNA) ตรวจสอบภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ด้วย

สารละลาย TBE buffer (Tris Base Boric acid Na_2EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0) เป็นเวลา 20 นาที เปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน นำเจลมาย้อมสีดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation แล้วปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยการเจือจางด้วย TE buffer ให้ได้ความเข้มข้น 2,300-2,800 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร สำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ ขนาด 10 นิวคลิโอไทด์ จำนวน 12 ไพรเมอร์ คือ OPA03 OPAB01 OPAB09 OPAB14 OPB04 OPB07 OPB08 OPB18 OPJ04 OPN15 OPR11 และ OPT06 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ตามวิธีการของ ศิริญญา (2551) ส่วนผสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 60 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10x *Taq* buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ เข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร dNTPs (dCTP, dGTP, dTTP และ dATP) เข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร *Taq* polymerase เข้มข้น 5.0 ยูนิต ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร dH_2O ปริมาตร 17.8 ไมโครลิตร สังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (DNA Thermal Cycler) โดย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 2 รอบ ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 2 รอบ ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 41 รอบ และตามด้วย extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ เพื่อให้เกิดไพรเมอร์ extension สมบูรณ์ แล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบผลการทำพีซีอาร์โดยนำสารละลายดีเอ็นที่สังเคราะห์ได้ ปริมาตร 12 ไมโครลิตร ตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายด้วย TBE buffer ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 50 นาที นำเจลมาย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต 260 นาโนเมตร ถ่ายรูปด้วยเครื่อง gel documentation คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละ

ตัวอย่าง วิเคราะห์ข้อมูลด้วยการตรวจดูจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ตำแหน่งการปรากฏและไม่ปรากฏแถบในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นพ่อ ต้นแม่ และลูกผสมที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร

2.1 ผลของชิ้นส่วนและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างหวายซานทานากับเหลืองจันทบูร

นำต้นกล้าลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร จากการเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร VW ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 4 เดือน มาตัดแยกเป็นชิ้นส่วน ลำต้น ข้อ (ประกอบด้วยลำต้นและข้อ 1 ข้อ) และใบ (ภาพที่ 3) เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW เติม BA หรือ TDZ เข้มข้น 0 1.0 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือเติม 2,4-D เข้มข้น 0 0.5 2.5 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0 1.0 3.0 และ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วยน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.3 หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน บันทึกผล การสร้างยอดเปรียบเทียบกันระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโตและชิ้นส่วนพืช โดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's multiple range test (DMRT)

ภาพที่ 3 การเตรียมชิ้นส่วนจากต้นกล้าลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร

2.2 ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร

นำต้นกล้าลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร อายุ 6 เดือน นับจากเพาะเมล็ดและย้ายเลี้ยง 2 ครั้ง (ย้ายเลี้ยง 2 เดือนต่อครั้ง) บนอาหารสูตร VW ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต จากนั้นย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติมไคโตซาน เข้มข้น 0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรเติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด 70 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.6 วุ้น 6.7 กรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน บันทึกผลจำนวนยอด น้ำหนักสด ความสูงต้น จำนวนใบ ความยาวใบ จำนวนราก และความยาวราก ในแต่ละความเข้มข้นของไคโตซานเปรียบเทียบกัน โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

3. การชักนำดอกลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรในหลอดทดลอง

นำต้นกล้าลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร ที่ได้จากการเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร VW ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 3 เดือน ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW เติม BAP เข้มข้น 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ PBZ เข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ PBZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0 0.04 0.20 0.40 และ 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน บันทึกผลการสร้างยอดรวม และดอก ในแต่ละความเข้มข้นของ BA PBZ และ PBZ ร่วมกับ TDZ โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

4. การชักนำพอลิพลอยด์ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรในหลอดทดลอง

ตัดแยกชิ้นส่วนลำต้นที่ประกอบด้วยลำต้นและข้อ 1 ข้อ ขนาด 1 เซนติเมตร จากต้นกล้าลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ แช่สารโคลชิซิน เข้มข้น 0 0.01 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในอาหารเหลวสูตร VW วางบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส สภาพมืด เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อกำจัดสารละลายโคลชิซินจนหมด วางชิ้นส่วนบนกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อซับให้แห้ง ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ปราศจากสาร

ควบคุมการเจริญเติบโต บันทึกอัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนและอัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของโคลชิซิน ทำการทดลองทั้งหมด 12 การทดลอง การทดลองละ 30 ชิ้นส่วน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT หลังจากเลี้ยงต้นกล้าที่ผ่านการทรีตด้วยโคลชิซิน เป็นเวลา 3 เดือน ตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นที่ได้เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองข้างต้น

การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอโดยโฟลไซโทเมทรี

นำชิ้นส่วนใบต้นกล้าลูกผสมที่คาดว่าเป็นต้นพอลิพลอยด์ และต้นควบคุม จากการศึกษาที่ผ่านมา อย่างละ 10 ต้น แต่ละต้นใช้ 1 ใบ มาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบการเกิดพอลิพลอยด์ ตามวิธีการ ดังนี้ คือ ตัดใบอ่อน ขนาด 1-2 เซนติเมตร (ตัดเส้นกลางใบออก) ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาดเล็ก หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ เติมสารละลาย PVP ปริมาตร 700 ไมโครลิตร สับด้วยใบมีดโกนประมาณ 100 ครั้ง กรองด้วยกรวยกรองขนาด 20 ไมโครเมตร ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ เติมสารละลาย PI ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมด้วยการคว่ำหลอดเบาๆ 2-3 ครั้ง จากนั้นนำไปบ่มในกล่องน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จึงนำตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ Beckman Coulter Flow Cytometry บันทึกผลการนับนิวเคลียส วิเคราะห์ผลที่ได้ และเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอของต้นตัวอย่างและต้นควบคุม เพื่อหาระดับพลอยดี โดยใช้ดีเอ็นเอของข้าวญี่ปุ่นสายพันธุ์ Nipponbare [*Oryza sativa* (cv. ‘Nipponbare’)] ซึ่งทราบระดับพลอยดีแน่นอนแล้ว เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานคำนวณปริมาณดีเอ็นเอ ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{Sample (2C DNA)} = \frac{\text{G1 peak channel of sample}}{\text{G1 peak channel of } \textit{Oryza sativa}} \times 1.08 \text{ pg}$$

บทที่ 3

ผล

1. การศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีตรวจสอบลูกผสม

จากการใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดี ขนาด 10 นิวคลิโอไทด์ จำนวน 12 ไพรเมอร์ เข้าสุ่มจับกับแถบดีเอ็นเอต้นแบบของกล้วยไม้หวายซานทานา เหลืองจันทบูร และลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 334 แถบ เป็นพอลิมอร์ฟิค จำนวน 42 แถบ และมีลักษณะโมโนมอร์ฟิคที่ตรงกับต้นเหลืองจันทบูร จำนวน 133 แถบ ในขณะที่ปรากฏแถบโมโนมอร์ฟิคตรงกับกล้วยไม้หวายซานทานา จำนวน 159 แถบ (ตารางที่ 2)

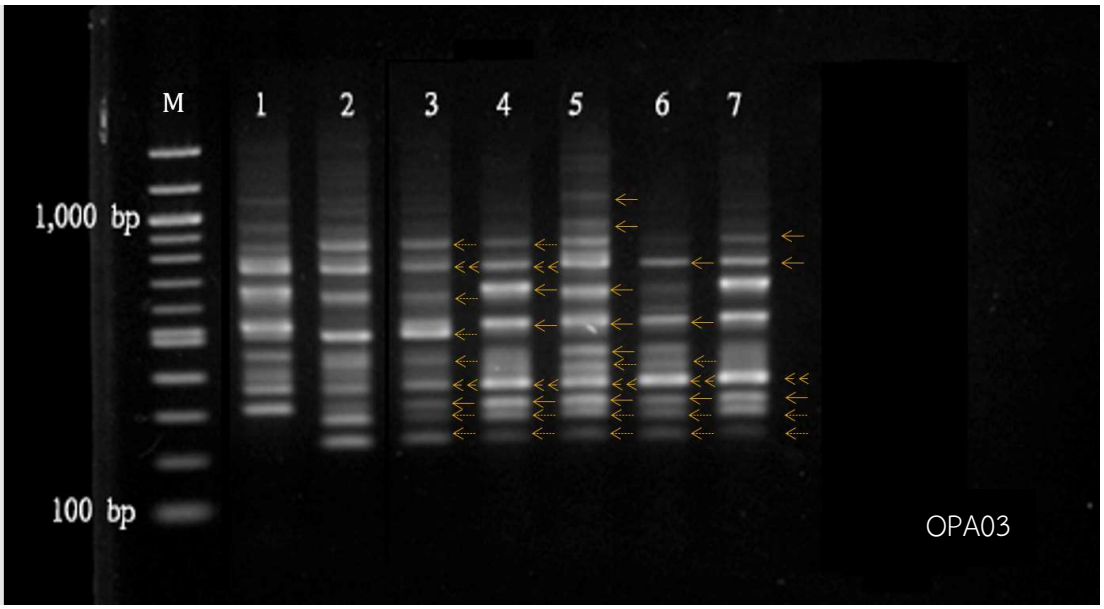
ตารางที่ 2 ชนิดของไพรเมอร์อาร์เอพีดีที่ใช้ในการตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรต่อรูปแบบ ขนาด และคุณภาพของดีเอ็นที่เพิ่มปริมาณได้

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5’ – 3’)	จำนวนแถบทั้งหมด	จำนวนแถบโมโนมอร์ฟิค		จำนวนแถบพอลิมอร์ฟิค	ขนาดของชิ้นส่วน DNA (bp)	ความชัดเจน
			เหลืองจันทบูร	ซานทานา			
OPA03	AGT CAG CCA C	54	24	29	1	250-1,100	++++
OPAB01	CCG TCG GTA G	15	6	8	1	200-1,100	+++
OPAB09	GGG CGA CTA C	17	5	11	1	200-1,100	+++
OPAB14	AAG TGC GAC C	17	8	8	1	200-1,200	++
OPB04	GGA CTG GAG T	19	6	3	10	200-1,517	+++
OPB07	GCT GAC GCA G	37	22	12	3	200-1,300	++++
OPB08	GTC CAC ACG G	14	5	7	2	300-1,517	++
OPB18	GGG AAT TCG G	27	9	12	6	200-1,200	++++
OPJ04	CCG AAC ACG G	30	12	16	2	300-1,000	++++
OPN15	CAG CGA CTG T	25	8	12	5	200- >1,517	+
OPR11	GTA GCC GTC T	47	16	25	6	200- >1,517	++++
OPT06	CAA GGG CAG A	32	12	16	4	300-1,200	++++
รวม		334	133	159	42	200-1,517	

++++ เพิ่มปริมาณได้ทุกตัวอย่าง ให้แถบชัดเจน +++ เพิ่มปริมาณได้ทุกตัวอย่างให้แถบไม่ชัดเจน

++ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ทุกตัวอย่าง ให้แถบชัดเจน + ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ทุกตัวอย่าง ให้แถบไม่ชัดเจน

จากการตรวจสอบลูกผสมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี จำนวน 12 ไพรเมอร์ พบว่า มี 6 ไพรเมอร์ คือ OPA03 OPB07 OPB18 OPJ04 OPR11 และ OPT06 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่างและให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน (ภาพที่ 4-9) สามารถนำไปใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างลูกผสมกับกล้วยไม้หวายซานทานา และเหลืองจันทบูรได้ โดยลูกผสมที่ได้มีรูปแบบของดีเอ็นจากทั้งฝ่ายพ่อและแม่ ที่ 350 800 และ 900 คู่เบส (ภาพที่ 4) 230 260 350 1,050 และ 1,150 คู่เบส (ภาพที่ 5) 350 คู่เบส (ภาพที่ 6) 530 และ 850 คู่เบส (ภาพที่ 7) 130 200 280 700 และ 1,250 bp (ภาพที่ 8) และ 280 คู่เบส (ภาพที่ 9) ตามลำดับ รวมทั้งมีรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างไปจากพ่อและแม่ ที่ 560 และ 650 คู่เบส (ภาพที่ 4) 580 900 และ 1,000 (ภาพที่ 6) 600 และ 730 คู่เบส (ภาพที่ 7) 550 และ 1,150 คู่เบส (ภาพที่ 8) 180 600 650 และ 700 คู่เบส (ภาพที่ 9) ตามลำดับ



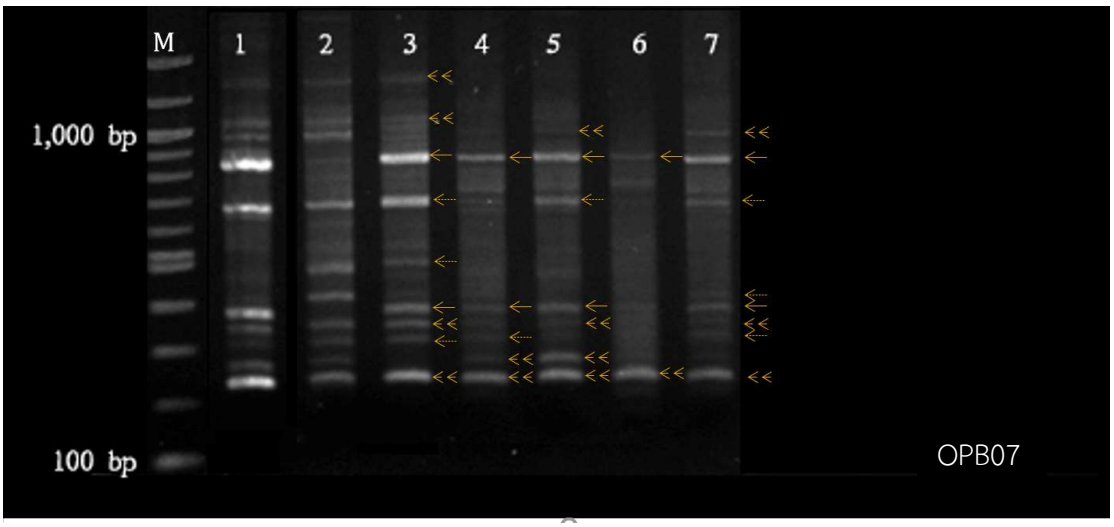
ภาพที่ 4 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร (lane 1) ซานทานา (lane 2) และลูกผสมระหว่างซานทานากับเหลืองจันทบูร (lane 3-7) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPA03

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1,000 คู่เบส

← แถบตรงกับกล้วยไม้เหลืองจันทบูร

<---- แถบตรงกับกล้วยไม้หวายซานทานา

<< แถบตรงกับกล้วยไม้เหลืองจันทบูรและหวายซานทานา



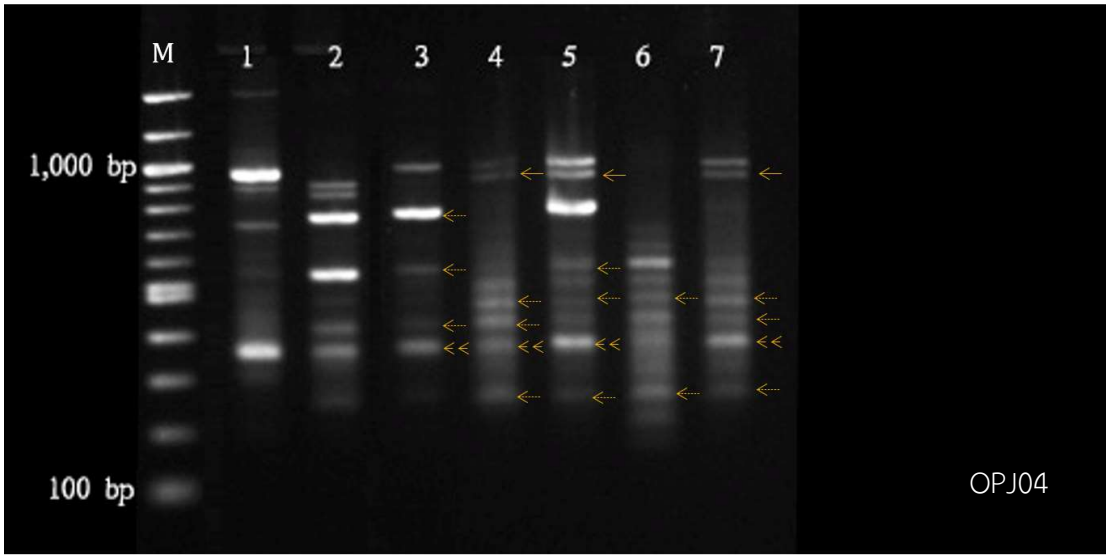
ภาพที่ 5 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร (lane 1) ซานทานา (lane 2) และลูกผสมระหว่างซานทานากับเหลืองจันทบูร (lane 3-7) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPB07

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1,000 คู่เบส

← แถบตรงกับกล้วยไม้เหลืองจันทบูร

<---- แถบตรงกับกล้วยไม้หวายซานทานา

<< แถบตรงกับกล้วยไม้เหลืองจันทบูรและหวายซานทานา



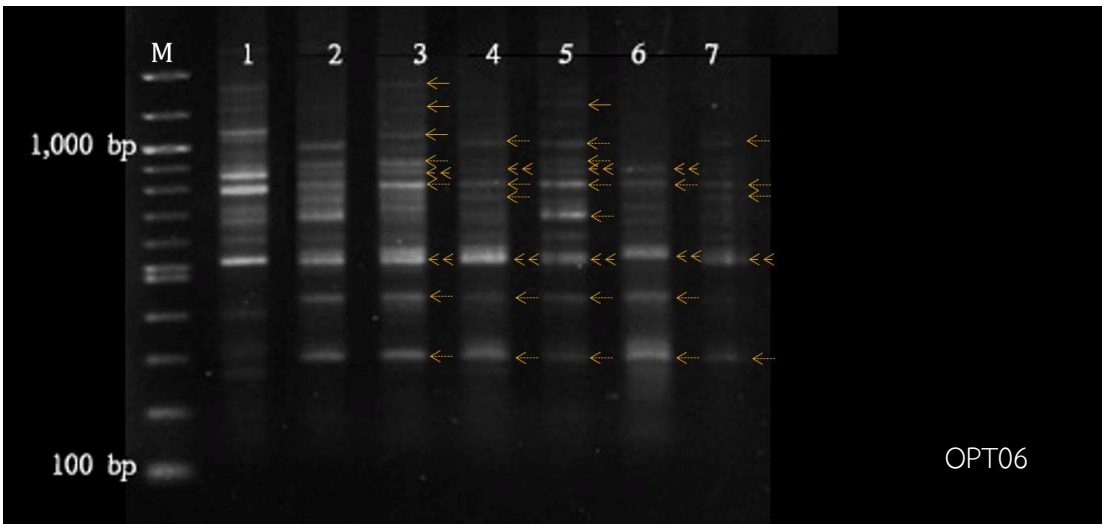
ภาพที่ 6 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร (lane 1) ซานทานา (lane 2) และลูกผสมระหว่างซานทานากับเหลืองจันทบูร (lane 3-7) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ด้วยไพรเมอร์ OPJ04

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1,000 คู่เบส

← แถบตรงกับกล้วยไม้เหลืองจันทบูร

<---- แถบตรงกับกล้วยไม้หวายซานทานา

<< แถบตรงกับกล้วยไม้เหลืองจันทบูรและหวายซานทานา



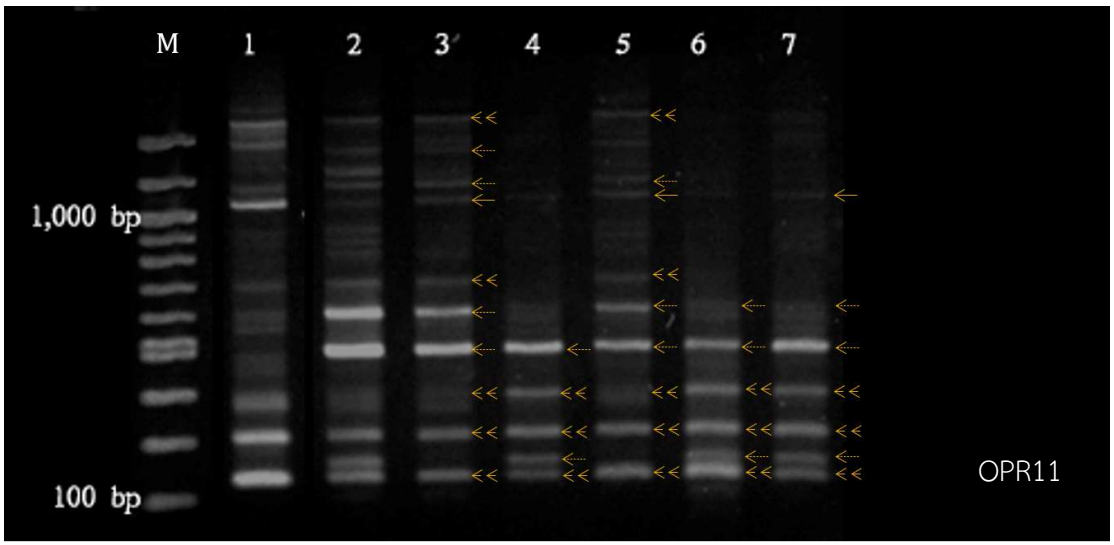
ภาพที่ 7 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร (lane 1) ซานทานา (lane 2) และลูกผสมระหว่างซานทานากับเหลืองจันทบูร (lane 3-7) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ด้วยไพรเมอร์ OPT06

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1,000 คู่เบส

← แถบตรงกับกล้วยไม้เหลืองจันทบูร

<---- แถบตรงกับกล้วยไม้หวายซานทานา

<< แถบตรงกับกล้วยไม้เหลืองจันทบูรและหวายซานทานา



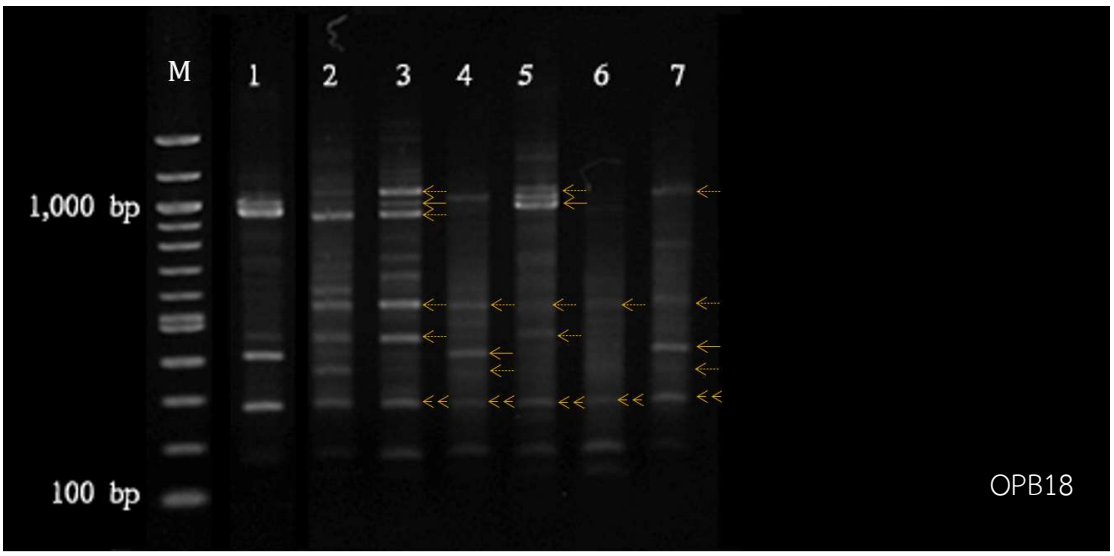
ภาพที่ 8 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร (lane 1) ซานทานา (lane 2) และลูกผสมระหว่างซานทานากับเหลืองจันทบูร (lane 3-7) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ด้วยไพรเมอร์ OPR11

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1,000 คู่เบส

← แถบตรงกับกล้วยไม้เหลืองจันทบูร

<---- แถบตรงกับกล้วยไม้หวายซานทานา

<< แถบตรงกับกล้วยไม้เหลืองจันทบูรและหวายซานทานา



ภาพที่ 9 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร (lane 1) ซานทานา (lane 2) และลูกผสมระหว่างซานทานากับเหลืองจันทบูร (lane 3-7) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ด้วยไพรเมอร์ OPB18

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1,000 คู่เบส

← แถบตรงกับกล้วยไม้เหลืองจันทบูร

<---- แถบตรงกับกล้วยไม้หวายซานทานา

<< แถบตรงกับกล้วยไม้เหลืองจันทบูรและหวายซานทานา

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร

2.1 ผลของชิ้นส่วนและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร

หลังจากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารแข็งสูตร VW เติม BA และ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ชิ้นส่วนข้อมีการสร้างยอดดีที่สุด รองลงมา คือ ชิ้นส่วนลำต้น สำหรับวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ไม่พบการสร้างยอดจากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบทั้งบนอาหารเติมและไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สูตรอาหารปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติม TDZ เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดจากชิ้นส่วนข้อสูงสุด 33.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับการวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตรเติม BA เข้มข้น 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้การสร้างยอด 6.67 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร VW และชิ้นส่วนพืชต่อการสร้างยอดของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังวางเลี้ยง 45 วัน

ความเข้มข้น (มก/ล)		การสร้างยอด (%)			จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน		
BA	TDZ	ใบ	ลำต้น	ข้อ	ใบ	ลำต้น	ข้อ
0	0	0	13.34	33.33^{a}	0	2.00^{a}	1.44^{a}
1	0	0	6.67	6.67^{c}	0	1.00^{b}	1.55^{a}
3	0	0	6.67	6.67^{c}	0	2.00^{a}	1.00^{b}
5	0	0	6.67	6.67^{c}	0	2.00^{a}	1.00^{b}
0	1	0	13.34	20.00^{bc}	0	1.00^{b}	1.00^{b}
0	3	0	13.34	26.67^{ab}	0	1.00^{b}	1.00^{b}
0	5	0	13.34	33.33^{a}	0	2.00^{a}	1.00^{b}
F-test		-	ns	*	-	*	*
C.V.(%)		-	48.10	45.71	-	15.61	17.97

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT

จากการศึกษาผลของ BA และ 2,4-D ต่อการสร้างยอดจากชิ้นส่วนใบและชิ้นส่วนข้อของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน พบการสร้างยอดใหม่จากชิ้นส่วนข้อเท่านั้น (ตารางที่ 4) การเติม BA ร่วมกับ 2,4-D มีผลต่อการสร้างยอดของกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร โดยพบการสร้างยอด สูงสุด 55 เปอร์เซ็นต์ 1.27 ยอดต่อชิ้นส่วน จากชิ้นส่วนข้อที่วางเลี้ยงบนอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับการเลี้ยงชิ้นส่วนบนสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นอื่นๆ

ตารางที่ 4 ผลของ BA 2,4-D ที่เติมในอาหารสูตร VW และชิ้นส่วนพืชต่อการสร้างยอดของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังวางเลี้ยง 2 เดือน

ความเข้มข้น (มก/ล)		การสร้างยอด (%)		จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน	
BA	2,4-D	ใบ	ข้อ	ใบ	ข้อ
0	0	0	0[d]	0	0[b]
0	0.5	0	55.00[a]	0	1.27[a]
0	2.5	0	0[d]	0	0[b]
0	5.0	0	0[d]	0	0[b]
0	10.0	0	0[d]	0	0[b]
1.0	1.0	0	3.33[c]	0	1.00[a]
1.0	3.0	0	0[d]	0	0[b]
1.0	6.0	0	0[d]	0	0[b]
3.0	1.0	0	18.33[b]	0	1.33[a]
3.0	3.0	0	0[d]	0	0[b]
3.0	6.0	0	3.33[c]	0	1.00[a]
6.0	1.0	0	0[d]	0	0[b]
6.0	3.0	0	0[d]	0	0[b]
6.0	6.0	0	0[d]	0	0[b]
	F-test	-	*	-	*
	C.V.(%)	-	16.86	-	51.96

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT

2.2 ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าลูกผสมกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร

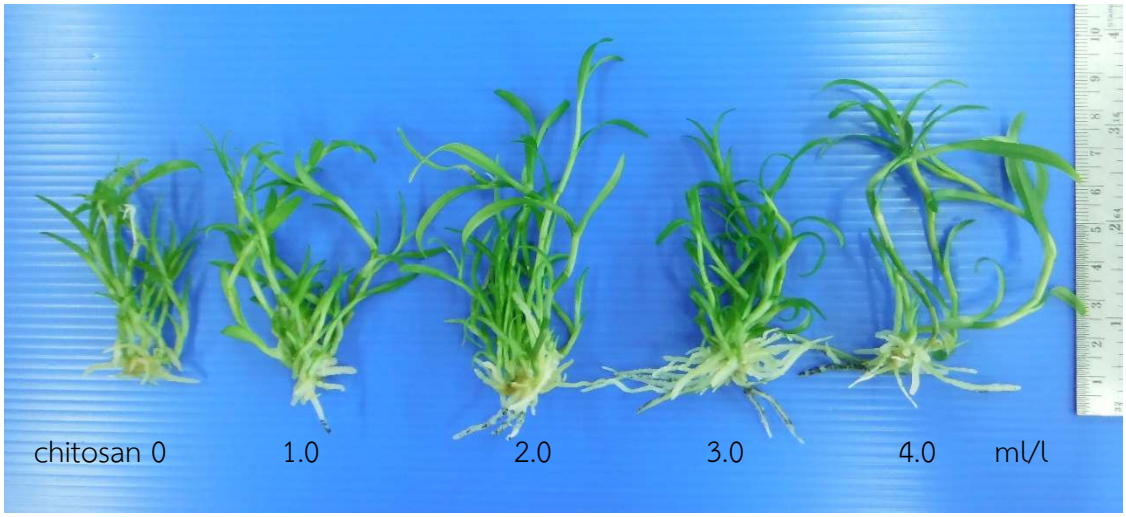
จากการศึกษาผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของลูกผสมระหว่างหวายซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน พบว่า ต้นกล้ามีน้ำหนักสด ระหว่าง 1,061.00-1,782.67 มิลลิกรัม ต้นกล้าที่เลี้ยงบนอาหารเติมไคโตซานทุกความเข้มข้นมีน้ำหนักสดแตกต่างกันทางสถิติ โดยต้นกล้ามีน้ำหนักสดมากที่สุด 1,782.67 มิลลิกรัม บนอาหารเติมไคโตซาน 2 มิลลิลิตรต่อลิตร เมื่อพิจารณาการสร้างยอดจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง พบว่า ไคโตซานทุกความเข้มข้นที่ใช้ให้การสร้างยอดรวมสูงกว่าการไม่เติมแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ไคโตซาน เข้มข้น 2

มิลลิลิตรต่อลิตร ให้จำนวนยอดมากที่สุด 9.92 ยอด แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากไคโตซาน นอกจากนี้ยัง พบว่า การเติมไคโตซานความเข้มข้นสูงขึ้น ช่วยเพิ่มจำนวนรากมากขึ้น อย่างไรก็ตามการเติมไคโตซานไม่มีผลทางสถิติต่อความยาวราก และความสูงต้น (ตารางที่ 5 ภาพที่ 10)

ตารางที่ 5 ผลของไคโตซานที่เติมในอาหารสูตร VW ต่อการเจริญเติบโตของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

ไคโตซาน (มล/ล)	น้ำหนักสด (มก)	จำนวนยอด (ยอด)	จำนวนราก (ราก)	ความยาวราก (ซม)	ความสูงต้น (ซม)
0	1,061.00^{b}	5.97^{b}	7.07^{c}	1.68	6.12
1	1,550.00^{ab}	7.33^{ab}	10.40^{bc}	2.81	6.02
2	1,782.67^{a}	9.92^{a}	13.27^{ab}	1.87	5.88
3	1,490.00^{ab}	7.20^{ab}	13.85^{ab}	2.41	6.25
4	1,503.67^{ab}	6.99^{ab}	14.93^{a}	2.47	7.00
F-test	*	*	*	ns	ns
C.V.(%)	18.65	25.62	18.50	44.32	10.47

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ *แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



ภาพที่ 10 ต้นกล้าลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรหลังวางเลี้ยงบนอาหารแข็งเติมไคโตซานความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน

3. การชักนำดอกลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรในหลอดทดลอง

จากการศึกษาผลของ BA ต่อการเจริญเติบโตของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน พบว่า ต้นกล้าลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร มีน้ำหนักสดมากที่สุด 1,008.33 มิลลิกรัม เมื่อเลี้ยงบนอาหารเติม BA เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับการเลี้ยงบนอาหารเติม BA ความเข้มข้นอื่นๆ (ตารางที่ 6) อย่างไรก็ตาม จำนวนยอดและความสูงยอดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเลี้ยงบนอาหารเติม BA ความเข้มข้นต่างกัน สูตรอาหารเติม BA ให้ความยาวของราก สูงสุด 2.79 เซนติเมตร รองลงมาคือ การเติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารปราศจาก BA แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับการวางเลี้ยงบนอาหารเติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่พบการสร้างดอกจากการวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมและไม่เติม BA ทุกความเข้มข้น ลักษณะต้นที่ปรากฏดังแสดงในภาพที่ 11

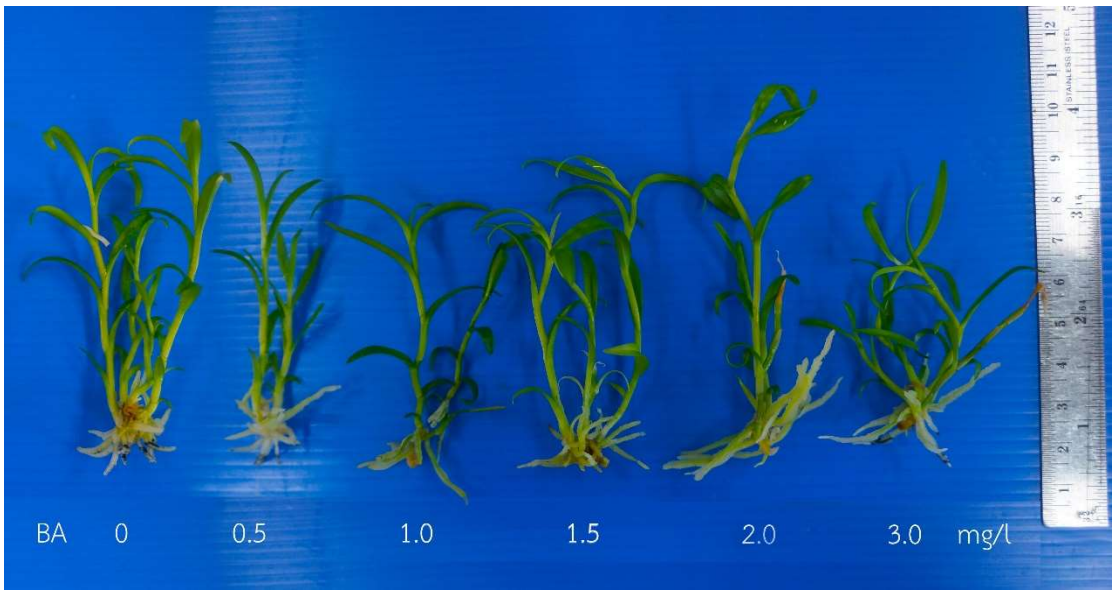
ตารางที่ 6 ผลของ BA ต่อการเจริญเติบโตของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

BA (มก/ล)	น้ำหนักสด (มก)	จำนวนยอด (ยอด)	จำนวนราก (ราก)	ความยาวราก (ซม)	ความสูงต้น (ซม)	การสร้างดอก (%)
0	828.63^{b}	2.78	9.53^{ab}	2.73^{a}	4.66	0
0.5	813.81^{b}	2.82	9.99^{ab}	2.79^{a}	4.78	0
1.0	799.75^{b}	3.31	11.13^{ab}	2.07^{ab}	4.31	0
1.5	691.67^{c}	3.17	8.72^{b}	1.95^{ab}	4.95	0
2.0	739.45^{bc}	3.17	8.72^{b}	1.83^{b}	5.00	0
3.0	1,008.33^{a}	2.83	12.77^{a}	2.74^{a}	5.02	0
F-test	*	ns	*	*	ns	-
C.V.(%)	9.46	14.74	17.89	19.39	15.88	-

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



ภาพที่ 11 ต้นกล้าลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรหลังวางเลี้ยงบนอาหารเติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน

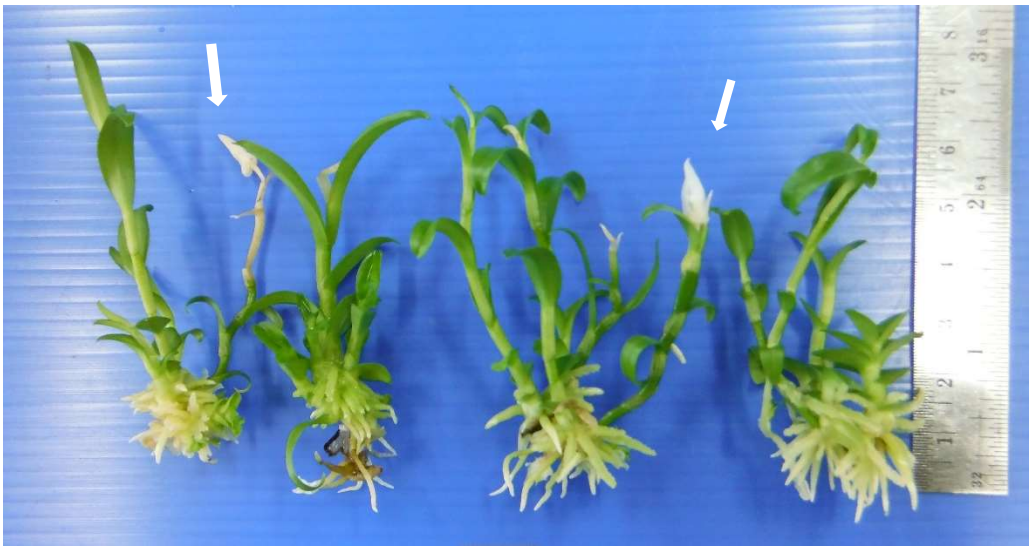
จากการศึกษาผลของ PBZ ต่อการเจริญเติบโตของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังวางเลี้ยง 3 เดือน พบว่า การเติม PBZ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติต่อน้ำหนักสดและจำนวนยอด แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อจำนวนใบและความยาวใบ PBZ ความเข้มข้นสูงขึ้น ส่งผลให้จำนวนใบ และความยาวใบลดลง (ตารางที่ 7) แต่การเติม PBZ ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนรากและความยาวราก อย่างไรก็ตาม พบการสร้างดอก 13.90 เปอร์เซ็นต์ เฉพาะบนอาหารเติม PBZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ดอกมีสีซีด ดอกไม่บาน และเหี่ยวไปในที่สุด (ภาพที่ 12) จึงมีการเติม TDZ เพื่อชักนำการเกิดดอกในหลอดทดลองในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 7 ผลของ PBZ ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างดอกของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

PBZ (มก/ล)	น้ำหนักสด (มก)	จำนวนยอด (ยอด)	จำนวนราก (ราก)	ความยาวราก (ซม)	จำนวนใบ (ใบ)	ความยาวใบ (ซม)	การสร้างดอก (%)
0	914.19	3.63	13.70^{ab}	1.74^{b}	17.93^{a}	2.41^{a}	0^{b}
0.25	933.67	4.07	12.47^{ab}	1.61^{b}	15.01^{ab}	1.58^{b}	13.90^{a}
0.5	1105.22	3.83	13.33^{ab}	2.49^{ab}	14.10^{b}	2.01^{ab}	0^{b}
0.75	1101.33	4.20	17.10^{a}	2.94^{a}	15.23^{ab}	1.89^{ab}	0^{b}
1.0	893.33	3.53	13.63^{ab}	2.50^{ab}	13.97^{b}	1.30^{b}	0^{b}
2.0	853.67	3.83	10.38^{b}	2.02^{ab}	13.50^{b}	1.47^{b}	0^{b}
F-test	ns	ns	*	*	*	*	*
C.V.(%)	25.48	20.28	19.34	26.89	12.65	21.74	8.51

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ *แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



ภาพที่ 12 ดอกของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรที่พัฒนาหลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม PBZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน มีสีซีดและไม่บาน (ศรชี้)

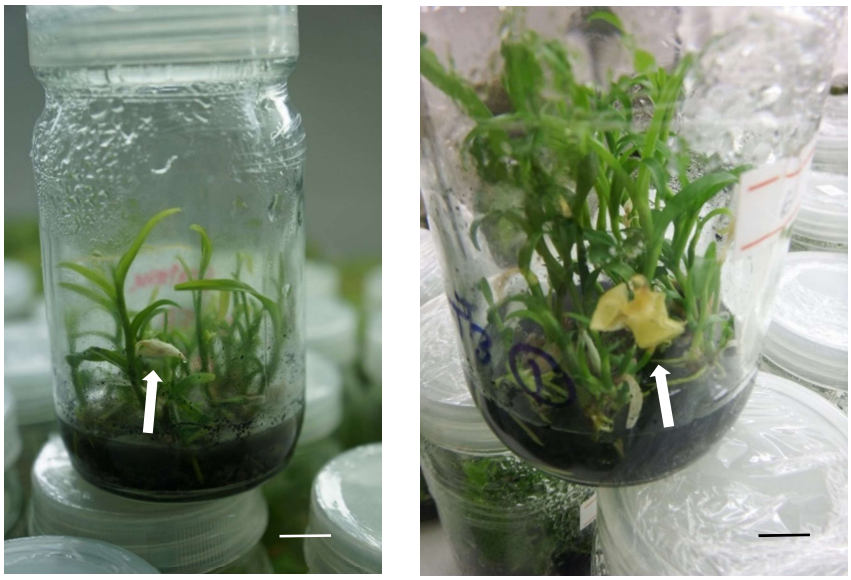
การศึกษาผลของ PBZ ร่วมกับ TDZ ต่อการเจริญเติบโตของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังวางเลี้ยง 3 เดือน พบว่า การเติม PBZ ร่วมกับ TDZ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติต่อน้ำหนักสด (1,283.33-1,891.56 มิลลิกรัม) จำนวนยอด (3.65-4.73 ยอด) จำนวนราก (15.55-23.15 ราก) และความยาวราก (1.10-1.82 เซนติเมตร) ต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมมีความสูงมากที่สุด (6.08 เซนติเมตร) เมื่อเลี้ยงบนอาหารเติม PBZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร แตกต่างทางสถิติกับการเลี้ยงบนอาหารเติม PBZ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นอื่นๆ การเลี้ยงบนอาหารเติม PBZ เพียงอย่างเดียว ส่งเสริมการเปอร์เซ็นต์การสร้างดอกหลังวางเลี้ยง 45 วัน ดีที่สุด 3.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8) แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงบนอาหารเติม PBZ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.04 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม ดอกส่วนใหญ่ไม่บาน เมื่อวางเลี้ยงต่อไป ดอกกลายเป็นสีขาวซีดโดยไม่มีการบานของดอก (ภาพที่ 13ก) จากการศึกษานี้ พบดอกที่บานเพียง 1 ดอก (ภาพที่ 13ข) และเป็นดอกผิดปกติ คือ มีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ กลีบดอก 2 กลีบ เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย แต่ไม่มีกลีบปาก

ตารางที่ 8 ผลของ TDZ ร่วมกับ PBZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญเติบโตของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรหลังวางเลี้ยง 3 เดือน

TDZ (มก/ล)	น้ำหนักสด (มก)	จำนวนยอด (ยอด)	จำนวนราก (ราก)	ความยาวราก (ซม)	ความสูง (ซม)	การสร้างดอก (%)
0	1,672.00	3.68	23.13	1.68	5.02^{b}	3.67^{a}
0.04	1,888.83	3.90	23.15	1.40	5.10^{b}	1.67^{b}
0.20	1,891.56	4.03	19.34	1.46	6.08^{a}	3.00^{ab}
0.40	1,293.17	4.73	15.58	1.82	4.80^{b}	1.33^{b}
0.60	1,283.33	3.65	16.90	1.10	5.15^{b}	3.00^{ab}
F-test	ns	ns	ns	ns	*	*
C.V.(%)	19.36	30.22	24.95	30.30	5.88	39.47

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ *แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



ภาพที่ 13 การออกดอกในหลอดทดลอง (ศรชี้) ของลูกผสมระหว่างหวายซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 3 เดือน (บาร์ 1 เซนติเมตร)
(ก) เติม PBZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
(ข) เติม PBZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. การชักนำพอลิพลอยด์ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร ในหลอดทดลอง

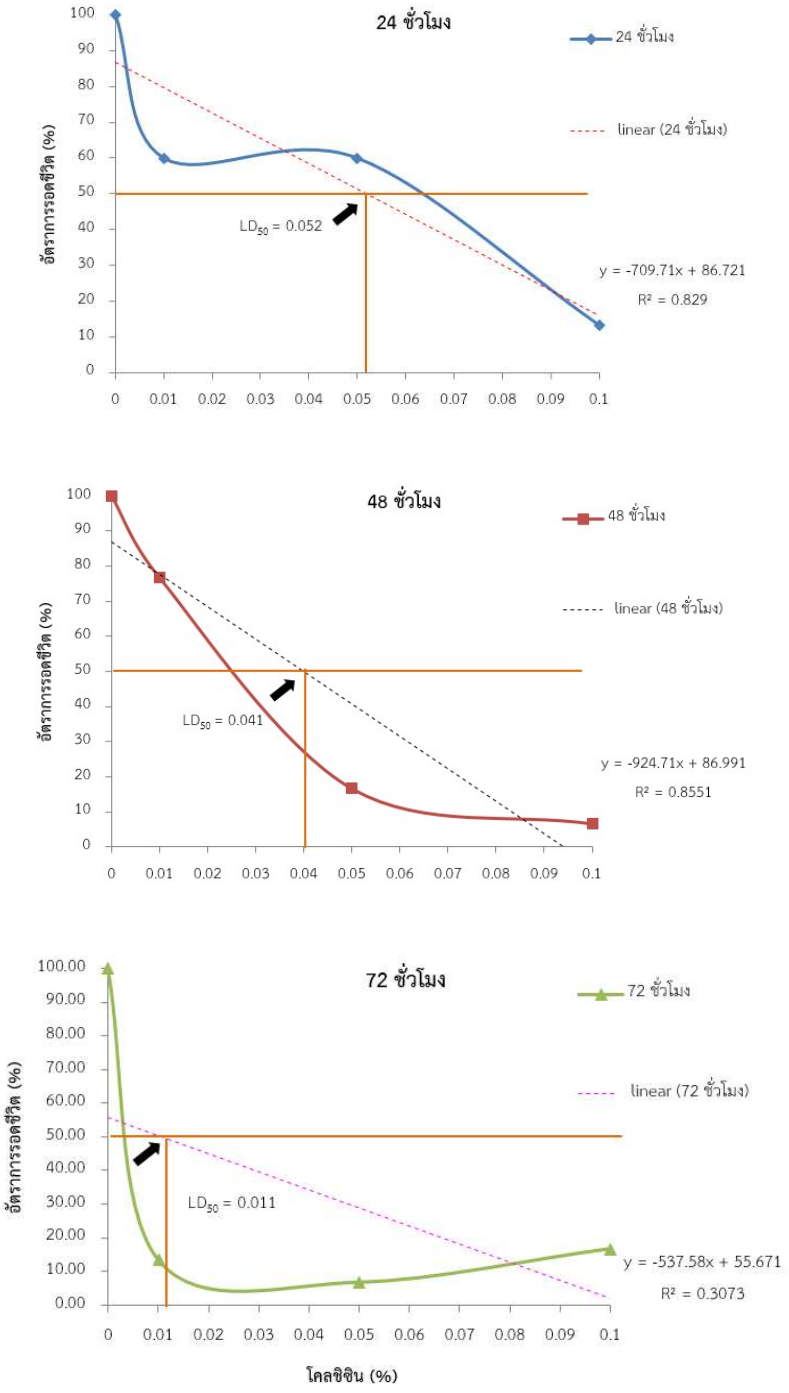
การชักนำพอลิพลอยด์ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร ทำโดยการตัดต้นกล้าที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ ประกอบด้วยลำต้นและ 1 ข้อ ขนาดประมาณ 1.0 เซนติเมตร แช่สารโคลชิซิน เข้มข้น 0.01 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส สภาพมืด เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า ชิ้นส่วนที่ได้รับสารโคลชิซินเข้มข้น 0.01 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้อัตรารอดชีวิต 60.00 60.00 และ 13.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการแช่โคลชิซินความเข้มข้นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้อัตราการรอดชีวิต 76.67 16.67 และ 6.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อแช่สารโคลชิซินเป็นเวลานานขึ้น 72 ชั่วโมง พบว่า ชิ้นส่วนมีอัตรารอดชีวิตโดยเฉลี่ยลดลง คือ 13.33 6.67 และ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ผลของความเข้มข้นโคลชิซินและระยะเวลาต่างๆ ต่ออัตรารอดชีวิต และการสร้างยอด หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เป็นเวลา 30 วัน

โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชม)	จำนวนชิ้นส่วน	อัตรารอดชีวิต (%)	การสร้างยอด (%)
0	-	30	100.00[a]	93.33
0.01	24	30	60.00[c]	33.33
	48	30	76.67[b]	39.29
	72	30	13.33[d]	50.00
0.05	24	30	60.00[c]	39.52
	48	30	16.67[d]	66.67
	72	30	6.67[d]	66.67
0.1	24	30	13.33[d]	83.33
	48	30	6.67[d]	66.67
	72	30	16.67[d]	100.00
F-test			*	ns
C.V. (%)			18.04	59.25

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ *แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT

เมื่อวิเคราะห์ค่า LD_{50} ของการจุ่มแช่โคลชิซินแต่ละความเข้มข้น และเวลาต่างๆ พบว่า ค่า LD_{50} จากการจุ่มแช่โคลชิซิน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง คือ 0.052 0.041 และ 0.011 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 14) และต้นกล้าที่พัฒนาจากชิ้นส่วนข้อลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 14 อัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร ที่จุ่มแช่ด้วยโคลชิซินความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ หลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ภาพที่ 15 ต้นกล้าที่พัฒนามาจากชิ้นส่วนข้อของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร ที่ได้รับโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ 48 ชั่วโมง หลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เป็นเวลา 60 วัน (บาร์ 1 เซนติเมตร)

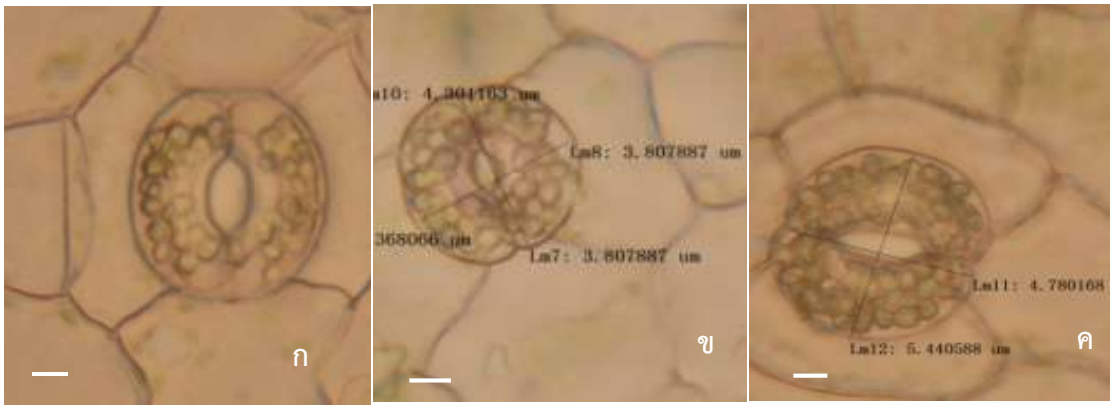
จากการศึกษาผลของโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ ต่อขนาดของเซลล์คุม พบว่า ลูกผสมที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้นสูงเป็นเวลานานขึ้น ทำให้เซลล์คุมมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อตรวจสอบความหนาแน่นของเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม พบว่า ลูกผสมที่ได้รับโคลชิซิน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมมากที่สุด 68.68 คลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุม รองลงมา คือ ลูกผสมที่ได้รับโคลชิซิน เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 48.33 เม็ด สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้รับโคลชิซิน มีเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม 32.56 เม็ด และลูกผสมที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นและระยะเวลาอื่น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้ การให้สารโคลชิซินความเข้มข้น และระยะเวลาแตกต่างกัน ส่งผลให้ลักษณะของคลอโรพลาสต์และเซลล์คุมที่แตกต่างกันด้วย (ภาพที่ 16) เมื่อพิจารณาความหนาแน่นของปากใบ พบว่า เมื่อโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้ความหนาแน่นของปากใบลดลง (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ผลของความเข้มข้นโคลชิซินและระยะเวลาต่างๆ ต่อขนาดและความหนาแน่นของเซลล์คุมและจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร

โคลชิซิน		ขนาดเซลล์คุม (μm)		จำนวน	ความหนาแน่น
ความเข้มข้น (%)	ระยะเวลา (ชม)	ความยาว	ความกว้าง	เม็ดคลอโรพลาสต์ (เม็ด/เซลล์)	ของปากใบ (เซลล์/มม^2)
0	24	3.81^{c}	3.75^{de}	32.56^{c}	19.67^{a}
0.01	24	3.58^{d}	4.14^{c}	30.33^{cd}	14.33^{c}
	48	3.67^{d}	4.69^{b}	21.67^{e}	17.25^{c}
	72	4.94^{a}	4.73^{b}	48.33^{b}	9.00^{f}
0.05	24	3.66^{d}	3.28^{f}	21.00^{e}	20.67^{a}
	48	4.30^{b}	3.86^{de}	33.00^{c}	13.00^{c}
	72	3.94^{c}	3.93^{d}	35.67^{c}	8.67^{e}
0.10	24	4.30^{b}	3.38^{f}	26.00^{de}	14.33^{c}
	48	3.61^{d}	3.72^{e}	24.67^{e}	21.00^{a}
	72	5.04^{a}	5.22^{a}	68.68^{a}	11.00^{d}
F-test		*	*	*	*
C.V.(%)		3.41	2.76	8.92	7.65

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย DMRT



ภาพที่ 16 เซลล์คุมของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW เป็นเวลา 8 เดือน (บาร์ 1 ไมโครเมตร)

ก. ชุดควบคุม

ข. ลูกผสมที่ได้รับโคลชิซิน เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ค. ลูกผสมที่ได้รับโคลชิซิน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

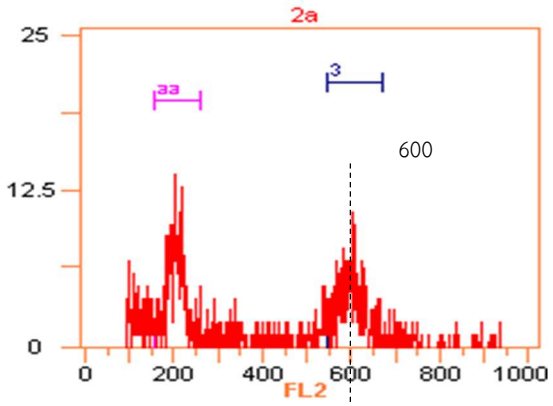
จากการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของต้นลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร โดยใช้ดีเอ็นเอของข้าว ซึ่งมีข้อมูลระดับพลอยดีแน่นอนแล้วเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า ต้นลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร มีระดับพลอยดีเป็นดิพลอยด์ มีปริมาณดีเอ็นเอ เท่ากับ 3.07 พิโคกรัม เมื่อเปรียบเทียบขนาดของคู่เบส คิดเป็น 1.48×10^9 คู่เบส ส่วนที่ผ่านการแช่สารโคลชิซินทุกความเข้มข้นและระยะเวลา พบว่า มีประมาณดีเอ็นเอ เป็น 2.98 ± 0.04 ถึง 3.64 ± 0.09 พิโคกรัม เมื่อเปรียบเทียบขนาดของคู่เบส คิดเป็น 1.44×10^9 คู่เบส ถึง 1.76×10^9 คู่เบส (ตารางที่ 11 ภาพที่ 17) เป็นมิกโซพลอยด์

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานา กับเหลืองจันทบูร ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ

โคลชิซิน		ปริมาณดีเอ็นเอ	Mbp*
ความเข้มข้น (%)	ระยะเวลา (ชม)	±SE (pg $2C^{-1}$)	(bpx10^9)
0	24	3.07±0.11	1.48
0.01	24	3.18±0.03	1.53
	48	3.64±0.09	1.76
	72	3.19±0.12	1.54
0.05	24	3.61±0.27	1.74
	48	3.09±0.07	1.49
	72	3.01±0.07	1.45
0.10	24	3.31±0.19	1.59
	48	2.98±0.04	1.44
	72	3.16±0.21	1.52

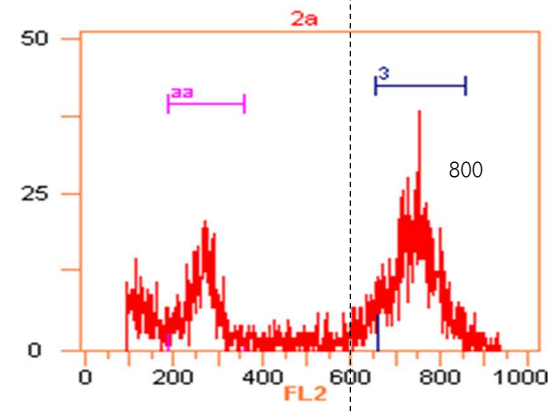
* 1 พิโคกรัมดีเอ็นเอ = 965 Mbp

ก



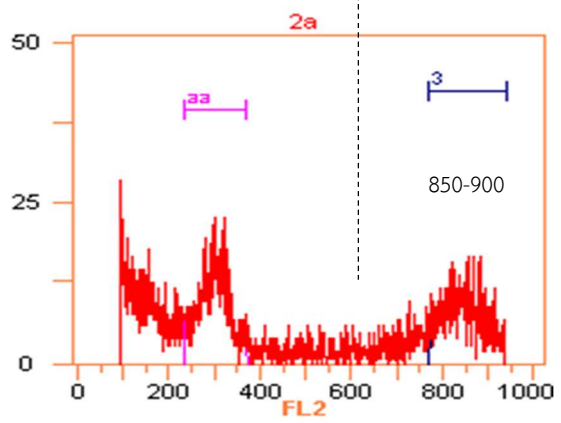
Control

ข



0.1% 24 ชั่วโมง

ค



0.05% 72 ชั่วโมง

ภาพที่ 17 ฮีสโตแกรมแสดงระดับพลอยดีของข้าว (aa) และลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร (3) ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ

ก. ชุดควบคุม

ข. 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ค. 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีตรวจสอบลูกผสม

จากการตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า มี 6 ไพรเมอร์ คือ OPA03 OPB07 OPB18 OPJ04 OPR11 และ OPT06 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง และให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน ในการจำแนกลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรนั้น แถบดีเอ็นเอลูกผสมสามารถเกิดได้ คือ แถบดีเอ็นเอที่เหมือนต้นแม่ แถบดีเอ็นเอที่เหมือนต้นพ่อ แถบดีเอ็นเอที่เหมือนทั้งพ่อและแม่ และแถบดีเอ็นเอที่ต่างจากต้นพ่อและแม่ แถบดังกล่าวอาจเกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ ทำให้มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กสอดแทรกเข้ามา หรือหายไปบริเวณเดิมที่ไพรเมอร์เคยจับได้ ทำให้แถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเปลี่ยนแปลงไป (สุรินทร์, 2552)

ศิริลักษณ์ และคณะ (2547) จำแนกกล้วยไม้ไทยสกุลหวายโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า ไพรเมอร์ OPD03 สามารถสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ได้ทั้งหมด 59 แถบ ทั้งหมดเป็นพอลิมอร์ฟิค แสดงถึงความแตกต่างของกล้วยไม้หวายทั้ง 12 ชนิด แต่เมื่อนำข้อมูลการปรากฏแถบดีเอ็นเอวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ด้วยวิธี cluster analysis พบว่า ไม่สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้ออกตามหมู่ได้ Inthawong และคณะ (2006) ตรวจสอบพ่อ แม่ และลูกผสมกล้วยไม้สกุลหวาย 5 คู่ผสม ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า ลูกผสมมีลักษณะพันธุกรรมจากพ่อและแม่ โดยไพรเมอร์ OPF03 ที่ 736 และ 1,014 คู่เบส เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอของคู่ผสม D017 x D022 ไพรเมอร์ OPF03 ที่ 1,219 และ 1,239 คู่เบส เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอของคู่ผสม D037 x D022 ไพรเมอร์ OPF14 ที่ 831 และ 1,182 คู่เบส เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอของคู่ผสม D030 x D031 และไพรเมอร์ OPF0 ที่ 273 476 490 และ 564 คู่เบส เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอของคู่ผสม D037 x D034 ทำนองเดียวกับรายงานกล้วยไม้ชนิดอื่น เช่น แคทลียา (Benner *et al.,* 1995) และฟาแลนอปซิส (Chen *et al*., 2009)

ในขณะที่ นฤมล และคณะ (2556) ศึกษาการจำแนกพันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมด้วยเครื่องหมาย high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) พบว่า เทคนิค HAT-RAPD ได้ปรับอุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้สูงขึ้น เป็น 46-62 องศาเซลเซียส จากทั่วไปเทคนิคอาร์เอพีดีจะใช้อุณหภูมิการเข้าจับของไพรเมอร์ ประมาณ 35-42 องศาเซลเซียส ซึ่งจะช่วยให้ไพรเมอร์แบบสุ่มเข้าจับที่ตำแหน่งจำเพาะมากยิ่งขึ้น ลดการกระจายตัวในการเกาะให้น้อยลงและให้แถบดีเอ็นเอที่

ชัดเจนกว่า ในขณะที่ Poobathy และคณะ (2013) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกล้วยไม้หวาย *D.* Sonia 28 ภายหลังการทำเมล็ดเทียมและเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลาหนึ่งด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า ไม่มีการกลายพันธุ์

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร

2.1 ผลของชิ้นส่วนและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างหวายซานทานากับเหลืองจันทบูร

จากการศึกษาชิ้นส่วนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร จากการทดลองวางเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารแข็งสูตร VW เติม BA หรือ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ไม่มีการสร้างยอดจากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบ แตกต่างจาก Martin และ Madassery (2006) สามารถชักนำยอดได้มากกว่า 7 ยอดต่อชิ้นส่วน จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบ *D.* Sonia 17 และ *D.* Sonia 18 บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 44.4 ไมโครโมลาร์ Puchooa (2004) รายงานว่า สามารถชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดีส์จากชิ้นส่วนใบ *D.* Sonia ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ Chung และคณะ (2007) สามารถชักนำโซมาติคเอ็มบริโอได้จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบ *D.* Chiengmai Pink เป็นเวลา 30 วัน บนอาหารสูตร ½ MS เติม TDZ เข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และรายงานว่า ผิวใบบริเวณใกล้รอยตัดและชิ้นส่วนปลายใบมีความสามารถเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสได้มากที่สุด ในขณะที่ การศึกษานี้ ไม่สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอหรือยอดได้จากชิ้นส่วนใบจากทุกตำแหน่ง ทั้งนี้อาจเนื่องจากชนิดของกล้วยไม้ที่แตกต่างกัน และสูตรอาหาร VW ที่มีองค์ประกอบของแร่ธาตุและสารอาหารน้อยกว่าอาหารสูตร MS หรืออาจเนื่องจากลักษณะการวางเลี้ยงชิ้นส่วน Tee และคณะ (2010) รายงานว่า สามารถชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดีส์จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *D.* Bobby Mesina Red ในแนวตั้ง บนอาหารสูตร MS เติม BAP เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่สามารถชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดีส์หรือยอดใหม่จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบแบบนอนบนทุกสูตรอาหาร ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงใบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรในการศึกษานี้ควรมีการดัดแปลงโดยการวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบในแนวตั้ง หรือเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่น เพื่อชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดีส์และยอด

จากการศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนลำต้น และข้อของกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร พบว่า ชิ้นส่วนข้อให้การสร้างยอดมากกว่าชิ้นส่วน

ลำต้น เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหารเติม TDZ เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้เพราะ TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ ช่วยในการเจริญเติบโตทางลำต้น และเนื้อเยื่อเจริญตาข้าง พร้อมทั้งชักนำการเพิ่มจำนวนยอดของพืช (Taji and Williams, 1996)

2.2 ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร

จากการศึกษาผลของไคโตซานต่อการเจริญของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน พบว่า ต้นกล้ามีน้ำหนักสดและจำนวนยอดมากที่สุด เมื่อเติมไคโตซาน 2 มิลลิลิตรต่อลิตร เปรียบเทียบกับการเลี้ยงบนอาหารปราศจากไคโตซาน พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) การเติมไคโตซานความเข้มข้นสูงขึ้น ช่วยเพิ่มจำนวนรากมากขึ้น แต่ไม่มีผลแตกต่างทางสถิติต่อความยาวราก และความสูงต้น จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าไคโตซานมีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการสร้างยอดรวมของกล้วยไม้ชนิดนี้ สอดคล้องกับ กุลนาถ และกรกช (2553) รายงานว่า ต้นกล้ากล้วยไม้หวาย *D.* Queen Pink มีน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความสูง และพื้นที่ใบมากที่สุด เมื่อเลี้ยงบนอาหารเติมไคโตซาน เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และรายงานเพิ่มเติมอีกว่า ไคโตซานไม่มีผลในการชักนำให้เกิดก้านช่อดอก *D.* Queen Pink ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเกิดช่อดอกของกล้วยไม้นั้นเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัยรวมไปถึงระยะเวลาและความสมบูรณ์ของต้นมาเกี่ยวข้องด้วย ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองนี้อาจยังไม่เพียงพอ และปัจจัยอื่น ๆ อาจยังไม่เหมาะสม

3. การชักนำดอกกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างหวายซานทานากับเหลืองจันทบูรในหลอดทดลอง

จากการศึกษาผลของ BA ต่อการเจริญเติบโตและการออกดอกของกล้วยไม้ลูกผสมซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน พบว่า ต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร มีน้ำหนักสดมากที่สุด เมื่อเลี้ยงบนอาหารเติม BA เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับการเลี้ยงบนอาหารเติม BA ความเข้มข้นอื่นๆ อย่างไรก็ตาม จำนวนยอดและความสูงของยอดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเลี้ยงบนอาหารเติม BA ความเข้มข้นต่างกัน และไม่พบการสร้างดอกจากการวางเลี้ยงบนอาหารทุกสูตร ในขณะที่ ปรัชพรรณ และสมปอง (2550) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงต้นกล้วยไม้เหลืองจันทบูรบนอาหารเติม NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดรวมต่อชิ้นส่วนพืชเฉลี่ย 2.75

ยอดต่อชิ้นส่วน ภายในเวลา 30 วัน และสามารถชักนำการออกดอกได้ 87.50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 60 วันหลังการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม ดอกมีอาการผิดปกติ คือ มีสีซีดขาว และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในเวลาต่อมา และไม่สามารถบานได้เต็มที่ การศึกษาครั้งนี้ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เพียงอย่างเดียว ไม่ได้ใช้ร่วมกับ NAA ดังนั้นการศึกษาการชักนำดอกในกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างหวายซานทานากับเหลืองจันทบูรในครั้งต่อไปควรทดสอบผลของความเข้มข้นของ NAA เพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าว

PBZ เป็นสารชะลอการเจริญเติบโตที่มีรายงานชักนำดอกในหลอดทดลองของพืชหลายชนิด (Hahn *et al.,* 2006; Bodhipadma *et al.,* 2011; Sarai *et al.,* 2017) รวมทั้งกล้วยไม้ (Te-chato *et al.,* 2009; Sujjaritthurakarn and Kanchanapoom, 2012) จากการศึกษาผลของ PBZ ต่อการเจริญเติบโตและการออกดอกของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร หลังวางเลี้ยง 5 เดือนในการศึกษานี้ พบว่า การเติม PBZ ไม่มีผลทางสถิติต่อน้ำหนักสดและจำนวนยอด แต่การเติม PBZ ความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้จำนวนใบ และความยาวใบลดลง การเติม PBZ ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนราก ทำนองเดียวกับรายงานของ สุลัคน์ (2546) พบว่า PBZ เข้มข้น 1 พีพีเอ็ม ทำให้ต้นกล้ากล้วยไม้ *D. sulcatum* Lindl. มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสด ความยาวใบและจำนวนรากสูงสุด รายงานเพิ่มเติมว่าไม่พบการสร้างดอกจากการวางเลี้ยงทุกสูตรอาหาร Wen และคณะ (2013) รายงานว่า รากของต้นกล้า *D. nobile* ที่เลี้ยงบนอาหารเติม PBZ มีขนาดใหญ่และอวบหนากว่ารากของต้นกล้าที่เลี้ยงบนอาหารปราศจาก PBZ และมีรายงานว่า PBZ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าในหลอดทดลองของกล้วยไม้หลายชนิด และเพิ่มอัตรารอดชีวิตหลังย้ายปลูกในสภาพโรงเรือน

ปรัชพรรณ และสมปอง (2550) รายงานว่าการเพิ่มความเข้มข้นของมายโออินโนซิตอล วิตามินบี 1 บี 6 ไกลซีนในสารอินทรีย์ของอาหารสูตร MS ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรในหลอดทดลอง อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถชักนำการออกดอกในหลอดทดลองได้ นอกจากสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการออกดอกในหลอดทดลองแล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น การเตรียมชิ้นส่วนหรือต้นกล้าก่อนชักนำดอก อัตราส่วนของธาตุอาหาร ปัจจัยแวดล้อมภายในและภายนอกหลอดทดลอง เป็นต้น

จากการศึกษาผลของ PBZ และ TDZ ต่อการเจริญเติบโตและออกดอกในหลอดทดลองของกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างหวายซานทานากับเหลืองจันทบูรครั้งนี้ พบว่า PBZ ร่วมกับ TDZ ไม่มีผลทางสถิติต่อน้ำหนักสด จำนวนยอด จำนวนรากและความยาวราก แต่พบว่า การเติม PBZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ PBZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการสร้างดอกมากที่สุดหลังวางเลี้ยง 45 วัน อย่างไรก็ตาม พบว่า ดอกที่พัฒนาส่วนใหญ่ไม่บาน มีสีซีดและเหี่ยวไปในที่สุด ทำนองเดียวกับ Zhao และคณะ (2013) สามารถชักนำดอก *D. wangliangii* 2 ดอกต่อช่อ บนอาหารสูตร ½ MS เติม TDZ เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ดอก 2-8

ดอกต่อช่อ แต่ดอกที่ชักนำได้มีลักษณะผิดปกติทางสัญฐานวิทยา ในขณะที่ อาหารเติม PP_{333} เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ดอกมีลักษณะปกติ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร การศึกษาครั้งนี้ใช้อาหารสูตร VW และสารควบคุมการเจริญเติบโต PBZ เพียงอย่างเดียว ไม่ได้ใช้ร่วมกับ NAA ดังนั้นการศึกษาการชักนำดอกของกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างหวายซานทานากับเหลืองจันทบูรในครั้งต่อไป ควรทดสอบผลของสูตรอาหาร และความเข้มข้นของ NAA เพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าว

4. การชักนำพอลิพลอยด์ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร ในหลอดทดลอง

จากการแช่ชิ้นส่วนข้อของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ แล้วเปรียบเทียบอัตรารอดชีวิตหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่า การแช่โคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้น นานขึ้น ทำให้อัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วนลดลง เช่นเดียวกับ เอื้องแซะหอม (สุพัตรา, 2551) เอื้องเงินหลวง (รัชนี, 2553) ทั้งนี้เนื่องจากสารโคลชิซินที่มากเกินไปจะเป็นพิษต่อเซลล์พืช ทำให้เซลล์เสียสมดุล ส่งผลให้กระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ผิดปกติและตายในที่สุด อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการชักนำพอลิพลอยด์จากชิ้นส่วนลำต้นในกล้วยไม้สกุลหวาย แต่มีรายงานการเพิ่มระดับพลอยดีของกล้วยไม้หวายโดยการใช้ชิ้นส่วนโพรโทคอร์มและโพรโทคอร์มไลค์บอดีส์ เช่น Sanguthai และคณะ (1973) สามารถชักนำกล้วยไม้หวายเฮกซาพลอยด์และมิกโซพลอยด์ได้เป็นจำนวนมากโดยการแช่โพรโทคอร์มไลค์บอดีส์ในสารละลายโคลชิซิน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ กล้วยไม้หวายเอื้องแซะหอม (*D. scabrilligue*) ที่แช่ในโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 14 วัน ให้โพรโทคอร์มรอดชีวิต 36.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ พบว่า สามารถชักนำต้นพอลิพลอยด์ได้ 43.1 เปอร์เซ็นต์ (Sarathum *et al.*, 2010) ในขณะที่ Watrous และ Wimber (1988) ประสบผลสำเร็จในการชักนำต้นรองเท้านารีเตตระพลอยด์ ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่โพรโทคอร์มในสารละลายโคลชิซิน เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3-10 วัน สำหรับกล้วยไม้ชนิดอื่น เช่น Silva และคณะ (2000) รายงานว่า การแช่โพรโทรคอร์มไลค์บอดีส์ของกล้วยไม้แคทลียาด้วยโคลชิซิน เข้มข้น 0.05-0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน เหมาะสมต่อการเพิ่มระดับพลอยดี ในขณะที่กล้วยไม้ฟาแลนอปซิส ต้องใช้เวลานานขึ้น เป็น 10-14 วัน (Griesbach, 1981) สำหรับการศึกษานี้ การจุ่มแช่ชิ้นส่วนข้อของลูกผสมระหว่างหวายซานทานากับเหลืองจันทบูรด้วยโคลชิซินเข้มข้น 0.05-0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ส่งผลให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น 33-50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคโฟลไซโตมิเตอร์ คาดว่าต้นที่ได้

มีลักษณะเป็นมิกโซพลอยด์โดยบางต้นอาจเป็นทริพลอยด์ เพราะมีปริมาณดีอ็นเอเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดควบคุมถึง 50 เปอร์เซ็นต์

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบขนาดและความหนาแน่นของปากใบ จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ ของกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างหวายซานทานากับเหลืองจันทบูรที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซินและระยะเวลาการจุ่มแช่เป็นเวลานานขึ้น ทำให้ขนาดของเซลล์คุมและจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้น ทำนองเดียวกับขนาดของเซลล์คุมกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ผ่านการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ด้วยสารโคลชิซิน พบว่า ต้นออกตะพลอยด์ มีขนาดเซลล์คุมยาวที่สุด รองลงมา คือต้นเตตระพลอยด์ ส่วนต้นดิพลอยด์มีขนาดเซลล์คุมสั้นที่สุด (วชิรพัฒน์, 2552) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับกล้วยไม้หวาย *D. secuntum* (Atichart and Bunnag, 2007) แคทลียา *Cattleya intermedia* (Silva *et al*., 2000) ฟาแลนอปซิส (Chen *et al.,* 2009) อย่างไรก็ตาม ในกล้วยไม้ลูกผสมซิมบิเดียม พบว่า เซลล์คุมของต้นดิพลอยด์ ทริพลอยด์ และเตตระพลอยด์มีความยาวไม่แตกต่างกัน (Kim *et al.,* 2003) เมื่อศึกษาเปรียบเทียบความหนาแน่นของปากใบต่อพื้นที่ของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูร พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซินและระยะเวลาการจุ่มแช่เป็นเวลานานขึ้น ทำให้ความหนาแน่นของปากใบต่อพื้นที่ลดลง ทำนองเดียวกับ ความหนาแน่นของปากใบกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ลดลงเมื่อระดับพลอยดีเพิ่มขึ้น (วชิรพัฒน์, 2552) แต่แตกต่างจาก ความหนาแน่นของปากใบกล้วยไม้ช้างแดง ที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโคลชิซินที่สูงขึ้น (ณัฐพร, 2553)

บทที่ 5

สรุป

เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอดีพีดี สามารถนำมาใช้ในการจำแนกลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานานากับเหลืองจันทบูร ได้โดยไพรเมอร์ OPA03 OPB07 OPB18 OPJ04 OPR11 และ OPT06 และมีแถบที่เฉพาะขนาด 200-800 คู่เบส

ชิ้นส่วนข้อของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรให้การตอบสนองต่อการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองได้ดีที่สุดโดยสร้างยอดสูงสุด บนอาหารสูตร VW ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสูตร VW เติม TDZ เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร การเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร การเติมไคโตซาน เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ต้นกล้ามีน้ำหนักสดมากที่สุด

การชักนำดอกลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรในสภาพปลอดเชื้อให้ผลดีในอาหารสูตร VW เติม PBZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวใช้ PBZ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.20 และ 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน สามารถชักนำดอกได้ 3.67 และ 3.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อวางเลี้ยงต่อไปส่วนใหญ่ดอกมีสีซีด และเหี่ยวโดยไม่มีการบานของดอก

โคลชิซินชักนำมิกโซพลอยด์ในลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรในสภาพปลอดเชื้อได้ ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.05-0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ความเข้มข้น และระยะเวลาดังกล่าวส่งผลให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น 33-50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคโฟลไซโตมิทรี นอกจากนี้ลูกผสมที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้นเป็นเวลานานขึ้นมีเซลล์คุมขนาดใหญ่ขึ้น และมีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้น แต่ความหนาแน่นของปากใบลดลง

เอกสารอ้างอิง

กุลนาถ อบสุวรรณ และกรกช สว่างศรี. 2553. ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ *Dendrobium* Queen Pink. วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร 41: 477-480.

ณัฐพร เกิดสุวรรณ. 2553. ผลของโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิต ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และเซลล์วิทยาของกล้วยไม้ช้างแดง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นฤมล ธนานันต์, ฐิติพร โท้มโสภา และธีระชัย ธนานันต์. 2014. การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 99-108.

ปฐมาภรณ์ ทิลารักษ์ และสาโรจน์ ประเสริฐศิริวัฒน์. 2557. ผลของโคลชิซินต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้เหลืองจันทบูรดำเต็มคอ (*Dendrobium friedericksianum* Rchb. f var. oculatum). วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 16: 61-68.

ปรัชพรรณ หนูจีน และสมปอง เตชะโต. 2550. ผลของสารประกอบอินทรีย์และสารควบคุมการเจริญและการออกดอกของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรในหลอดทดลอง. วารสารเกษตร 23: 219-226.

รัชนี เพ็ชร์ช้าง. 2553. ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการให้โคลชิซินต่อการเจริญเติบโตและจำนวนโครโมโซมกล้วยไม้เอื้องเงิน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 29: 413-419.

วชิรพัฒน์ จิวานิจ. 2552. ผลของโคลชิซินต่อการชักนำกล้วยไม้ม้าวิ่งให้เกิดพอลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิริญญา ม่วงสอน. 2551. การใช้ EMS เพื่อชักนำการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้เหลืองจันทบูร (*Dendrobium friedericksianum* Rchb.f.) ในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์.

ศิริลักษณ์ อินทะวงศ์, วีณัน บัณฑิตย์ และณัฐา ควรประเสริฐ. 2547. การจำแนกกล้วยไม้ไทยสกุลหวายโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี. วารสารเกษตร 20: 152-158.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล และวิทูล ไชยภักดี. 2550. การออกดอกของกล้วยไม้หวายเหลืองจันทบูร (*Dendrobium friedericksianum* Rchb. f) ในหลอดทดลอง. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่น 35: 180-185.

สาริณี ไชยเจริญ. 2538. การศึกษาจำนวนโครโมโซม ลักษณะดอกและความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ดิพลอยด์และออลโลเตตระพลอยด์. วารสารเกษตรศาสตร์ 29: 150-157.

สำนักงานส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตรและอุตสาหกรรม. 2561. สถานการณ์กล้วยไม้โลก. เข้าถึงได้จาก: http://www.ditp.go.th/contents_attach/165775/165775.pdf. [เข้าถึงเมื่อ 20 กุมภาพันธ์ 2561].

สุพัตรา สระธรรม. 2551. ผลของระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับสารโคลชิซินของโปรโตคอร์ม กล้วยไม้เอื้องแซะหอมต่อการเกิดต้นโพลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาวิทยาศาสตร์, หน้า 153-160

สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Antony, J. J. J., Poobathy, R., Danial, M., Sundarasekar, J. and Subramaniam, S. 2012. Polymorphism analysis of cryopreserved *Dendrobium* Bobby Messina protocorm-like bodies (PLBs) using RAPD markers. Plant Omics. 5: 427-431.

Arditti, J. and Ernst, R. 1993. Micropropagation of Orchids. New York: Wiley Interscience.

Asghar, S., Ahmad, T., Hafiz, I.A. and Yaseen, M. 2011. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. African Journal of Biotechnology 10: 3097-3103.

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

Benner, M.S., Braunstein, M.D. and Weisberg, M.U. 1995. Detection of DNA polymorphisms within the genus *Cattleya* (Orchidaceae). Plant Molecular Biology Reporter 13: 147-155.

Bhadra, S.K. Barua, A.K. Bhattacharjee B. and Hossain, M.M. 2002. *In vitro* micropropagation of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) G. E. C. Fisher. Bangladesh Journal Genet Biotechnology 3: 47-50.

Bodhipadma, K., Noichinda, S., Padyencheun, W., Khunthacharoen, T., Chikhunthod, U. and Leung, D. W. 2011. Influence of preculture treatment and types of explants on shoot growth and *in vitro* flowering of feathered amaranth (*Celosia argentea* var. plumose). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 105: 465-469.

Chang, C. and Chang, W.C. 2003. Cytokinins promotion of flowering in *Cymbidium ensifolium* var. *misericors in vitro*. Plant Growth Regulation 39: 217-221.

Chang, C., Hu, W.H., Chen, Y.C., Su,Y.L. and Chiu. Y.T. 2010. *In vitro* flowering and mating system of *Eulophia graminea* Lindl. Botanical Studies 51: 357-362.

Chen, W.H., Tang, C.Y., and Kao, Y.L. 2009. Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 98: 229-238.

Chu C.C., Wang C.C., Sun C.S., Hsu C., Yin K.C., Chu C.Y. and Bi, F.I. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Scientia Sinica 18: 659–668

Chung, H. H., Chen, J. T. and Chang, W. C. 2005. Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* Chiengmai Pink and subsequent plant regeneration. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 41: 765-769.

Chung, H. H., Chen, J. T. and Chang, W. C. 2007. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium.* Biologia Plantarum 51: 346-350.

Da Silva, J.A.T., Cardoso, J.C., Dobránszki, J. and Zeng, S. 2015. *Dendrobium* micropropagation: a review. Plant Cell Reports 34: 671-704.

Deb, C.R. 2009. Rapid multiplication and induction of early *in vitro* flowering in *Dendrobium primulinum* Lindl. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 18: 241-244.

Dewir, Y.H., Chakrabarty, D., Ali, M. B., Singh, N. Hahn, E.J. and Paek, K.Y. 2007. Influence of GA3, sucrose and solid medium/bioreactor culture on *in vitro* flowering of *Sphathiophyllum* and association of glutathione metabolism. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 90: 225-235.

Doyle, J.J. and Doy, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Duan, J.X. and Yazawa, S. 1994. *In vitro* floral development in *Doriella* Tiny (*Doritis pulcherrima x Kingiella philippinensis*). Scientia Horticulturae 59: 253–264.

Duan, J.X. and Yazawa, S. 1995. Floral induction and development in *Phalaenopsis in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 43: 71-74.

Feng, S., Zhao, H., Lu, J., Liu, J., Shen, B. O. and Wang, H. 2013. Preliminary genetic linkage maps of Chinese herb *Dendrobium nobile* and *D. moniliforme*. Journal of Genetics 92: 205-212.

Ferreira, W.D.M., Kerbauy, G.B. and Pimentel Costa, A.P. 2006a. Micropropagation and genetic stability of a *Dendrobium* hybrid (Orchidaceae). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 42: 568-571.

Ferreira, W.M., Kerbauy, G.B., Kraus, J.E., Pescador, R. and Suzuki, R.M. 2006b. Thidiazuron influences the endogenous levels of cytokinins and IAA during the flowering of isolated shoots of *Dendrobium*. Journal of Plant Physiology 163: 1126-1134.

Gamborg, O.L., Miller, R., and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50: 151-158.

Gantait, S., Mandal, N. and Das, P. K. 2009. Impact of auxins and activated charcoal on *in vitro* rooting of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. cv. Golden Boy. Journal of Tropical Agriculture 47: 84-86.

Goh, M.W.K., Kumar, P.P., Lim, S.H. and Tan, H.T.W. 2005. Random amplified polymorphic DNA analysis of the moth orchids, *Phalaenopsis* (Epidendroideae: Orchidaceae). Euphytica 141: 11-22.

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

Guan, P. and Shi, J.M. 2009.Tissue culture of stem segment and induction of floral buds of *Dendrobium denndanum* Lishizhen. Medicine and Materia Medica Research 20: 205-206.

Hahn, E.J., Paek, K.Y., Dewir, Y.H. and Chakrabarty, D. 2006. Flowering of *Euphorbia millii* plantlets *in vitro* as affected by paclobutrazol, light emitting diodes (LEDs) and sucrose. In XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: International Symposium on Plant Biotechnology pp. 169-174.

Hee, K.H., Loh, C.S. and Yeoh, H.H. 2007. Early *in vitro* flowering and seed production in culture in *Dendrobium* Chao Praya Smile (Orchidaceae). Plant Cell Reports 26: 2055-2062.

Hee, K.H., Yeoh, H.H. and Shiong, C. 2009. *In vitro* flowering and *in vitro* pollination: methods that will benefit the orchid industry. Proceedings of Nagoya International Orchid Congress 2009, Nagoya, Japan, 11 March 2009, pp. 20-24.

Hsu, H.F. and Yang, C.H. 2002. An orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) AP-3 like *MADS* gene regulates floral formation and initiation. Plant Cell Physiology 43: 1198-1209.

Huang, W.C., yin, L.Q., Hu, Y.H., wang, X.Q., zhao, X.F. and Li, X.F. 2008. *In vitro* rapid propagation of *Dendrobium fimbriatum* [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science) 26: 584-587.

Inthawong, S., Bundithya, W., Kuanprasert, N. and Apavatjrut, P. 2006. Analysis of Intersectional Hybrids of *Dendrobium* by RAPD Technique. Kasetsart Journal (Natural Science) 40: 456-461.

Jumin, H.B. and Ahmad, M. 1999. High-frequency *in vitro* flowering of *Murraya paniculata* (L.) Jack. Plant Cell Reports 18: 764-768.

Jumin, H.B. and Nito, N. 1995. Embryogenic protoplast cultures of orange Jessamine (*Murraya paniculata*) and their regeneration on plant flowering *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41: 227-279.

Kaewjampa, N., Shimasaki, K. and Nahar, S.J. 2012. Hyaluronic acid can be a new plant growth regulator for hybrid *Cymbidium* micropropagation. Plant Tissue Culture and Biotechnology 22: 59-64.

Kananont, N., Pichyangkura, R., Chanprame, S., Chadchawan, S. and Limpanavech, P. 2010. Chitosan specificity for the *in vitro* seed germination of two *Dendrobium* orchids (Asparagales: Orchidaceae). Scientia horticulturae 124: 239-247.

Kerbauy, G.B. 1984. *In vitro* flowering of *Oncidium varicosum* mericlones (Orchidaceae). Plant Science Letters 35: 73-75.

Khosravi, A.R., Kadir, M.A., Kadzemin, S.B., Zaman, F.Q. and De Silva, A.E. 2009. RAPD analysis of colchicine induced variation of the *Dendrobium* Serdang beauty. African Journal of Biotechnology 8: 1455-1465.

Kim, M.S., Kim, J.Y. and Eun, J.S. 2003. Chromosome doubling of *Cymbidium* hybrid with colchicines treatment in meristem culture. American Orchid Society Bulletin 32: 885-887.

Kishor, R. and Sharma, G.J. 2009. Intergeneric hybrid of two rare and endangered orchids, *Renanthera imschootiana* Rolfe and *Vanda coerulea* Griff. ex L.(Orchidaceae): Synthesis and characterization. Euphytica 165: 247-256.

Knudson, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Botanical gazette 73:1-25.

Knudson, L. 1930. Flower production by orchid grown non-symbiotically. Botanical Gazette 89: 192-199.

Kostenyuk, I Oh, B.J. and So, I.S. 1999. Induction of early flowering in *Cymbidium neveo-marginatum* Mak. Plant Cell Reports 19: 1-5.

Kumari, I.P. and George, T.S. 2011. *In vitro* clonal shoot morphogenesis of commercial *Dendrobium* orchid cultivars in polyamines supplemented medium. Journal of Tropical Agriculture 49: 118-120.

Li, Y., Zhu, D.H., Pan, H.T. and Zhang, Q.X. 2013. *In vitro* propagation of three *Dendrobium* species from stems. Journal Northeast Forest University 41: 77-81.

Lim, S. H., Teng, P.C.P, Lee, Y. H. and GOH, C. J. 1999. RAPD analysis of some species in the genus *Vanda* (Orchidaceae). Annals of Botany 83: 193-196.

Limpanavech, P., Chaiyasuta, S., Vongpromek, R., Pichyangkura, R., Khunwasi, C., Chadchawan, S. and Bangyeekhun, T. 2008. Chitosan effects on floral production, gene expression, and anatomical changes in the *Dendrobium* orchid. Scientia Horticulturae 116: 65-72.

Luo, J.P., Wang, Y., Zha, X.Q. and Huang, L. 2008. Micropropagation of *Dendrobium densiflorum* Lindl. ex Wall. through protocorm-like bodies: effects of plant growth regulators and lanthanoids. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 93: 333-340.

Malabadi, R.B., Mulgund, G.S. and Kallappa, N. 2005. Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot tip sections. Journal of Plant Physiology 162: 473-478.

Maridass, M., Mahesh, R., Raju, G., Benniamin, A. and Muthuchelian, K. 2010. *In vitro* propagation of *Dendrobium nanum* through rhizome bud culture. International Journal of Biological Technology 1: 50-54.

Martin, K.P. and Madassery, J. 2006. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. Scientia Horticulturae 108: 95-99.

Murthy, S.R., Ramulu, K., Chandrashekar, D. Emmanuel, J. and Pullaiah, T. 2006. *In vitro* flowering of *Spathoglottis plicata* Bl. (Orchidaceae). Phytomorphology: An International Journal of Plant Morphology 53: 117-120.

Nasiruddin, K.M., Begum, R. and Yasmin, S. 2003. Protocorm like bodies and plantlet regeneration from *Dendrobium formosum* leaf callus. Asian Journal of Plant Sciences 13: 955-957.

Nge, K.L., Nwe, N., Chandrkrachang, S. and Stevens, W.F. 2006. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. Plant Science 170: 1185-1190.

Niknejad, A., Kadir, M.A., Kadzimin, S.B., Abdullah, N.A.P. and Sorkheh, K. 2009. Molecular characterization and phylogenetic relationships among and within species of *Phalaenopsis* (Epidendroideae: Orchidaceae) based on RAPD analysis. African Journal of Biotechnology 8: 5225-5240.

Obsuwan, K., Sawangsri, K., Ukong, S. and Uthairatanakij, A. 2010. Effects of chitosan concentration on *in vitro* growth of *Dendrobium* hybrid seedlings. In International Orchid Symposium 878: 289-294.

Pant, B. and Thapa, D. 2012. *In vitro* mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture. African Journal of Biotechnology 11: 9970-9974.

Pinheiro, L.R., Rabbani, A.R.C., da Silva, A.V.C., da Silva Lédo, A., Pereira, K.L.G. and Diniz, L.E.C. 2012. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. Plant Systematics and Evolution 298: 1815-1825.

Poobathy, R., Xavier, R., Sinniah, U.R. and Subramaniam, S. 2013. Molecular stability of protocorm-like bodies of *Dendrobium* Sonia-28 after encapsulation-dehydration and vitrification. Australian Journal of Crop Science 7: 189-195.

Pornpienpakdee, P., Singhasurasak, R., Chaiyasap, P., Pichyangkura, R., Bunjongrat, R., Chadchawan, S. and Limpanavech, P. 2010. Improving the micropropagation efficiency of hybrid *Dendrobium* orchids with chitosan. Scientia Horticulturae 124: 490-499.

Pradhan, S., Paudel, Y.P. and Pant, B. 2013. Efficient regeneration of plants from shoot tip explants of *Dendrobium densiflorum* Lindl., a medicinal orchid. African Journal of Biotechnology 12: 1978-1983.

Prasertsongskun, S. and Chaipakdee, W. 2011. Effect of chitosan on growth and development of *Phalaenopsis cornucervi* (Breda) Blume & Rchb.f. Khon Kaen University Science Journal 39: 113-119.

Puchooa, D. 2004. Comparison of different culture media for the *in vitro* culture of *Dendrobium* (Orchidaceae). International Journal of Agriculture and Biology 6: 884-888.

Pyati, A.N., Murthy, H.N., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. 2002. *In vitro* propagation of *Dendrobium macrostachyum* Lindl. a threatened orchid. Indian Journal of Experimental Biology 40: 620-623.

Ranney, T. G. 2012. Polyploidy: from evolution to landscape plant improvement. Available from: http://www.ces.ncsu.edu/fletcher/programs/nursery/metria/metria11/ranney/index.html. [access 20 March 2018].

Restanto, D.P., Santoso, B., Kriswanto, B. and Supardjono, S. 2016. The Application of chitosan for protocorm like bodies (PLB) induction of orchid (*Dendrobium* sp) *in vitro*. Agriculture and Agricultural Science Procedia 9: 462-468.

Rout, G.R. and Das, P. 1994. Somatic embryogenesis and *in vitro* flowering of 3 species of bamboo. Plant Cell Reports 13: 683-686.

Roy, J. and Banerjee, N. 2003. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. oculatum Hk. f. Scientia Horticulturae 97: 333-340.

Roy, J., Naha, S., Majumdar, M. and Banerjee, N. 2007. Direct and callus-mediated protocorm-like body induction from shoot-tips of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. (Orchidaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 90: 31-39.

Saiprasad, G.V.S., Raghuveer, P., Khetarpal, S. and Chandra, R. 2004. Effect of various polyamines on production of protocorm-like bodies in orchid-*Dendrobium* 'Sonia'. Scientia Horticulturae 100: 161-168.

Sangkhla, D., Davis, T.D. Sankhla, N. and Upadhyaya, A. 1994. *In vitro* production of flowering shoots in 'German Red' carnation: effect of uniconazole and gibberellic acid. Plant Cell Reports 13: 514-518.

Sanguthai, O., Sanguthia, S., and Kamemoto, H. 1973. Chromosome doubling of a *Dendrobium* hybrid with colchicine in meristem culture**.** Na Okika O Hawaii Hawii Orchid Journal 2: 12-16.

Sarai, N., Bodhipadma, K., Noichinda, S., Luangsriumporn, P. and Leung, D.W. 2017. Microshoot culture of Persian violet: Plant regeneration and *in vitro* flowering. Annals of Agricultural Sciences 62: 105-111.

Sarathum, S. Hegele, M. Tantiviwat, S. and Nanakhon, M. 2010. Effect of concentration and duration of colchicines treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. European Journal of Horticultural Science 75: 123-127.

Shiau, Y.J., Nalawade, S.M., Hsia, C.N., Mulabagal, V. and Tsay, H.S. 2005. *In vitro* propagation of the Chinese medicinal plant, *Dendrobium candidum* Wall. Ex Lindl., from axenic nodal segments. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 41: 666-670.

Silva, P.A., Jacques, S.C. and Zanettini, M.H. 2000. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. Ciência Rural 30: 105-111.

Sim, G.E., Loh, C.S. and Goh, C.J. 2007. High frequency early *in vitro* flowering of *Dendrobium* madame Thong-In (Orchidaceae). Plant Cell Reports 26: 383-393.

Sopalun, K., Thammasiri, K. and Ishikawa, K. 2010. Effects of chitosan as the growth stimulator for *Grammatophyllum speciosum in vitro* culture. World Academy of Science, Engineering and Technology 4: 381-383.

Starr, C. and Taggart, R. 1995. Cell biology and genetics, 7th Ed., Belmont: Wadsworth Publishing Company.

Sudhakaran, S., Teixeira da Silva, J.A. and Sreeramanan, S. 2006. Test tube bouquets: *in vitro* flowering. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues 2: 336-346.

Sujjaritthurakarn, P. and Kanchanapoom, K. 2012. *In vitro* flowering of dwarf *Dendrobium*. The International Symposium on Orchids and Ornamental Plants

on the International Horticulture Exposition: Royal Flora Rarchaphruek 2011, 9-12 January 2012, Imperial Mae Ping , Chiang Mai, Thailand.

Taji, A.M. and Williams, R.R. 1996. Tissue culture of Australian plants. Australia: University of New England Press. Armidale.

Te-chato, S., Nujeen, P. and Muangsorn, S. 2009. Paclobutrazol enhance budbreak and flowering of Friederick's *Dendrobium* orchid *in vitro.* Journal of Agricultural Technology 5: 157-165.

Tee, C.S., Wong, C.Q., Lam, X.L. and Maziah, M. 2010. A preliminary study of protocorm-like-bodies (PLBs) induction using leaf ex-plants of *Vanda* and *Dendrobium* orchids. Asia-Pacific Journal of Molecular Biolology and Biotechnology 18: 189-191.

Tee, C.S., Maziah, M. and Tan, C.S. 2008. Induction of *in vitro* flowering in the orchid *Dendrobium* Sonia 17. Biologia Plantarum 52: 723-726.

Thakur, U. and Dongarwar, N. 2013. A new report of *in vitro* flowering and multiple shooting in a wild epiphytic orchid *Oberonia recurva* Lindl. from asymbiotically germinated seedlings. Plant Knowledge Journal 2: 113-118.

Vaz, A.P.A., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. and Kerbauy, G.B. 2004. Photoperiod and temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid. Plant Physiology and Biochemistry 42: 411–415.

Vichiato, M.R. de M., Vichiato, M., Pasqual, M., Castro, D.M. and Dutra, L.F. 2007. Tetraploidy induction and identification in *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). Revista Ciencia Agronomica 38: 385-390.

Wang, G., Xu, Z., Chia, T.F. and Chua, N.H. 1997. *In vitro* flowering of *Dendrobium candidum*. Science in China 4: 35-42.

Wang, W.Y., Chen, W.S., Chen, W.H., Hung, L.S. and Chang, P.S. 2002. Influence of abscisic acid on flowering in *Phalaenopsis hybrida*. Plant Physiology and Biochemistry 40: 97-100.

Wang, Z.H., Feng S.G., Lu, J.J., Shi, N.N. and Liu, J.J. 2009b. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Scientia Horticulturae 122: 440–447.

Wang, Z.H., Wang, L. and Ye, Q.S. 2009a. High frequency early flowering from *in vitro* seedlings of *Dendrobium nobile*. Scientia Horticulturae 122: 328-331.

Watrous, S.B., and Wimber, D.E. 1988. Artificial induction of polyploidy in *Paphiopedilum.* Lindleyana 3: 177-183.

Wen, Z.Z., Lin, Y., Liu, Y.Q., Wang, M., Wang, Y.Q. and Liu, W. 2013. Effects of paclobutrazol *in vitro* on transplanting efficiency and root tip development of *Dendrobium nobile*. Biologia Plantarum 57: 576-580.

Xue, D., Feng, S., Zhao, H., Jiang, H., Shen, B., Shi, N. and Wang, H. 2010. The linkage maps of *Dendrobium* species based on RAPD and SRAP markers. Journal of Genetics and Genomics 37: 197-204.

Yu, H. and Goh, C.J. 2000. Differential gene expression during floral transition in an orchid hybrid *Dendrobium* Madame Thong-In. Plant Cell Reports 19: 926-931.

Zha, X., Luo, J., Wang, J., Wei, Z. and Jiang, S. 2009. Genetic characterization of the nine medicinal *Dendrobium* species using RAPD. African Journal of Biotechnology 8: 2064-2068.

Zhao, D., G. Hu, Chen, Z., Shi, Y., Zheng, L., Tang A. and Long, C. 2013. Micropropagation and *in vitro* flowering of *Dendrobium wangliangii*: A critically endangered medicinal orchid. Journal of Medicinal Plants Research 7: 2098-2110.

ภาคผนวก

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ โสภา ชูเพ็ง
รหัสนักศึกษา 5610630006

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2537
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2542

ทุนการศึกษา

- ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ จากสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนสนับสนุนการพัฒนาอาจารย์ มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

อาจารย์ประจำสาขาวิชาการจัดการพืชสวนและภูมิทัศน์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต อ.เมือง จ.ภูเก็ต 83000

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

โสภา ชูเพ็ง และสมปอง เตชะโต. 2561. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงลูกผสมระหว่างกล้วยไม้หวายซานทานากับเหลืองจันทบูรในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์. (รอตีพิมพ์)

Choopeng, S. and Te-chato, S. 2018. Effect of colchicine on survival rate and ploidy level of hybrid between *Dendrobium santana* x *D. friedericksianum* orchid. International Journal of Agricultural Technology. xxx (in press)

Choopeng, S. and Te-chato, S. 2018. The use of RAPD marker for verification of *Dendrobium* hybrid, *D. santana* x *D. friedericksianum* orchid. International Journal of Agricultural Technology. xxx (in press)