รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อเป็นไม้ประดับกระถาง

โครงการวิจัยย่อยที่ 1

ชุดโครงการวิจัยการพัฒนาสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อเพิ่มศักยภาพในเชิงพาณิชย์

โดย

ผศ.ดร. กาญจนา รุ่งรัชกานนท์

ดร. ทินน์ พรหมโชติ

ดร. ภาณุ เรืองจันทร์

กันยายน 2556

รายงานฉบับสมบูรณ์

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อเป็นไม้ประดับกระถาง

Breeding of *Doritis* sp. for Ornamental Pot Plant

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ผศ.ดร. กาญจนา รุ่งรัชกานนท์	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
2. ดร. สุทิน พรหมโชติ	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
3. ดร. ภาณุ เรืองจันทร์	สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2554-2555

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย และคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ได้สนับสนุนการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และโรงเรือนปลูกเลี้ยงกล้วยไม้

บทสรุปผู้บริหาร

ประเทศไทยเป็นแหล่งที่มีการกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้สูง มีการค้นพบและจำแนกกล้วยไม้ป่าหรือกล้วยไม้พันธุ์แท้ของไทยได้ 1,224 ชนิด ใน 183 สกุล จากความได้เปรียบที่เป็นแหล่งพันธุกรรมของกล้วยไม้และมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ ทำให้ประเทศไทยได้รับการยอมรับว่าเป็นแหล่งผลิตต้นพันธุ์และดอกกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญที่สุดของโลก เนื่องจากสภาพการแข่งขันทางการค้ากล้วยไม้ในตลาดโลกทำให้ภาครัฐมีนโยบายส่งเสริมการส่งออกและวิเคราะห์พบว่าปัญหาหนึ่งที่สำคัญ คือ การขาดพันธุ์กล้วยไม้ใหม่ๆเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งซึ่งเป็นกล้วยไม้พันธุ์แท้ของไทย โดยเฉพาะกล้วยไม้แดงอุบลซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่มีการกระจายพันธุ์เฉพาะถิ่นในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และมีมากที่จังหวัดอุบลราชธานี ให้มีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อใช้ประโยชน์ในการเป็นไม้ประดับกระถาง ซึ่งมีขนาดของลำต้นและช่อดอกกะทัดรัด โดยการวิจัยได้เริ่มต้นจากรวบรวมเชื้อพันธุกรรมที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ ทำการผสมพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสกุลฟาแลนอปซิส กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสกุลเข็ม พบว่า มีเพียง 7 คู่ผสมที่เมล็ดมีการพัฒนาเป็นต้นอ่อน แต่ได้ต้นอ่อนจำนวนน้อยมาก จึงได้ศึกษาเทคนิคการเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้จากชิ้นส่วนใบ และสามารถนำไปใช้เพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้ลูกผสมให้มีปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว

จากปัญหาที่ผลิตต้นอ่อนลูกผสมได้จำนวนน้อย จึงทำการวิจัยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกล้วยไม้ลูกผสมต่างสกุล โดยการศึกษาอายุฝักลูกผสมและอาหารเพาะเลี้ยง พบว่าฝักอ่อนลูกผสมอายุ 2 เดือน มีความเหมาะสมที่จะนำคัพภะไปเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยง และอาหารที่เหมาะสม คือ อาหารสูตร VW ที่เติมสาร kinetin ความเข้มข้น 1 มก./ล. + NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. เมื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของลูกกล้วยไม้ลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อ สูตร ½MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำให้ลูกกล้วยไม้เจริญเติบโตดีที่สุด เมื่อนำลูกกล้วยไม้ออกปลูกในสภาพโรงเรือน ควรใช้วัสดุปลูกเป็นถ่านหุงต้มปิดทับด้วยสแฟกนัมมอส ทำให้ลูกกล้วยไม้เจริญเติบโตดีทั้งทางด้านต้น ใบ และราก

จากการวิจัยครั้งนี้ได้ผลผลิต 4 คู่ผสม คือ 1) แดงอุบล x เข็มแสด 2) แดงอุบล x เข็มแดง 3) แดงอุบล x ฟาแลนอปซิส ขาวปากแดง 4) ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล โดยลูกผสมทั้ง 4 คู่ผสม มีลักษณะของใบที่แตกต่างกัน เมื่อปลูกเลี้ยงต่อไปสามารถปลูกเลี้ยงจนออกดอก 2 คู่ผสม คือ แดงอุบล x เข็มแดง และ ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล ซึ่งทั้งสองคู่ผสมมีความเหมาะสมที่จะเป็นไม้ประดับกระถาง เนื่องจากต้นและช่อดอกมีขนาดกะทัดรัด ดอกมีความทนทาน ต้นสามารถทนทานต่อโรคและแมลง ได้นำกล้วยไม้ทั้งสองคู่ผสมทำการจดทะเบียนกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ที่ The Royal Horticultural Society ณ ประเทศอังกฤษ จำนวน 2 ชื่อ คือ *Asconopsis* Purple Ubon และ *Phalaenopsis* Warin Bride การวิเคราะห์ DNA เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ สามารถแสดงเอกลักษณ์ของลูกผสมที่แตกต่างจากพ่อและแม่ได้และยืนยันการเป็นลูกผสมที่แท้จริงได้

บทคัดย่อ

การสร้างลูกผสมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งมีวัตถุประสงค์ เพื่อผลิตกล้วยไม้เป็นไม้ประดับกระถางที่มีดอกสวยงาม สามารถออกดอกได้ตลอดทั้งปี ได้ดำเนินการวิจัยโดยรวบรวมเชื้อพันธุกรรมที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการสร้างลูกผสม ทำการผสมพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสกุลฟาแลนอปซิส กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสกุลเข็ม ได้ฝักลูกผสมจำนวน 45 คู่ผสม เมื่อนำเมล็ดจากฝักไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ พบว่า มีจำนวน 7 คู่ผสมที่เมล็ดมีการพัฒนาเป็นต้นอ่อน แต่ได้ต้นอ่อนจำนวนน้อยมาก จึงทำการทดลองเพื่อเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้จากชิ้นส่วนใบ โดยการชักนำโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ จากชิ้นส่วนใบอ่อนของกล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบล เมื่อนำส่วนโคนใบเพาะเลี้ยงในอาหาร NDM ที่เติมสาร TDZ ความเข้มข้น 1-10 มก./ล. สามารถชักนำโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ ยอด และราก ซึ่งจุดกำเนิดของการพัฒนาเนื้อเยื่อ คือ การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอที่ชั้นเซลล์ epidermis บริเวณโคนใบ ผลจากการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้ลูกผสมให้มีปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว

การวิจัยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกล้วยไม้ลูกผสมต่างสกุล โดยการศึกษาอายุฝักลูกผสม 4 ระยะ คือ 1, 1.5, 2 และ 2.5 เดือน และอาหารเพาะเลี้ยง 5 สูตร คือ Vacin & Went (VW), VW + 2,4-D ความเข้มข้น 100 มก./ล., VW + Dicamba ความเข้มข้น 50 มก./ล., VW + Kinetin ความเข้มข้น 1 มก./ล. + NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. และVW + Peptone ความเข้มข้น 2 ก./ล. ผลการทดลองพบว่าฝักอ่อนลูกผสมอายุ 2 เดือน มีความเหมาะสมที่จะนำคัพภะไปเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยง และอาหารที่เหมาะสม คือ อาหารสูตร VW ที่เติมสาร kinetin ความเข้มข้น 1 มก./ล. + NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. คัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารนี้สามารถพัฒนาได้ดีที่สุดจำนวนเฉลี่ย 61 คัพภะ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อ นำต้นกล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส x แดงอุบล มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรสังเคราะห์ 2 สูตรคือ สูตร Vacin and Went (VW) และสูตร ½ Murashige & Skoog (MS) และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ Kinetin และ BAP ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า สูตร ½MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำให้ลูกกล้วยไม้เจริญเติบโตดีที่สุด

การศึกษาวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของลูกกล้วยไม้ในสภาพโรงเรือน นำกล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล ปลูกในวัสดุต่างๆ 4 แบบ คือ ปลูกในสแฟกนัมมอส, ปลูกในกาบมะพร้าวสับ, ปลูกในถ่านหุงต้ม และปลูกในถ่านหุงต้มปิดทับด้วยสแฟกนัมมอส ผลการทดลองพบว่า ถ่านหุงต้มปิดทับด้วยสแฟกนัมมอสมีผลทำให้ลูกกล้วยไม้เจริญเติบโตดีทั้งทางด้านต้น ใบ และราก

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของกล้วยไม้ลูกผสม ซึ่งได้ทำการผสมระหว่างสกุลม้าวิ่งและสกุลฟาแลนอปซิส และระหว่างสกุลม้าวิ่งและสกุลเข็ม ได้ผลผลิต 4 คู่ผสม คือ 1) แดงอุบล x เข็มแสด 2) แดงอุบล x เข็มแดง 3) แดงอุบล x ฟาแลนอปซิส ขาวปากแดง 4) ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล โดยลูกผสมทั้ง 4 คู่ผสม มีลักษณะของใบที่แตกต่างกัน เมื่อปลูกเลี้ยงต่อไปสามารถปลูกเลี้ยงจนออกดอก 2 คู่ผสม คือ แดงอุบล x เข็มแดง และ ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล ซึ่งทั้งสองคู่ผสมมีความเหมาะสมที่จะเป็นไม้ประดับกระถาง เนื่องจากต้นและช่อดอกมีขนาดกะทัดรัด ดอกมีความทนทาน ต้นสามารถทนทานต่อโรคและแมลง ได้นำกล้วยไม้ทั้งสองคู่ผสมทำการจดทะเบียนกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ที่ The Royal Horticultural Society ณ ประเทศอังกฤษ จำนวน 2 ชื่อ คือ *Asconopsis* Purple Ubon และ *Phalaenopsis* Warin Bride

การวิเคราะห์ DNA เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ โดยใช้เครื่องหมาย EST-SSR-B34 ตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมของกล้วยไม้ที่ได้รับการผสมพันธุ์ระหว่าง แดงอุบล รหัส NK13 x ฟาแลนอปซิส 1 ขาวปากแดง สามารถแสดงเอกลักษณ์ของลูกผสมที่แตกต่างจากพ่อและแม่ได้และยืนยันการเป็นลูกผสมที่แท้จริงได้

Abstract

The hybridization of *Doritis* orchid was done in order to produce new orchid pot plant with a beautiful flower and year-round flowering. The project was undertaken by collecting plant specimens of *Doritis*, *Phalaenopsis* and *Ascocentrum* as parents. The crosses between *Doritis* and *Phalaenopsis*, and *Doritis* and *Ascocentrum* were done producing 44 hybrid capsules. Hybrid seeds from all capsules were cultured under aseptic condition and it was found that only 6 hybrids developed into plantlets, with only a few plantlets in total. In order to increase plantlet numbers, basal leaf segments of *D. pulcherrima* and *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* were cultured on New Dogashima medium (NDM) with 0-10 mg/l Thidiazuron (TDZ) to induce protocorm-like bodies (PLBs). The result showed that TDZ at 1-10 mg/l produced PLBs, shoot and root. Histological study showed that somatic embryos originated from the epidermal layers at the base of basal leaf segment. Next, somatic embryos developed into three forms, that was PLBs, shoot and root. This technique may thus be applied to increase numbers of *Doritis* hybrid plantlets in short time period.

Increasing the efficiency of intergeneric hybridization was done by 1) the study of capsule age; 1, 1.5, 2 and 2.5 months, and 2) the study of 5 culture media; Vacin & Went (VW), VW + 100 mg/l 2,4-D, VW + 50 mg/l Dicamba, VW + 1 mg/l Kinetin plus 0.1 mg/l NAA and VW + 2 g/l Peptone). The two months old capsule that cultured in VW medium supplement with 1 mg/l Kinetin plus 0.1 mg/l NAA was found to be highly effective, with 61 embryos rescued.

The suitable culture medium for *in vitro* growth of *Doritis* hybrid (*Phalaenopsis* Wedding x *D. pulchrrima* var. *buyssoniana*) was investigated. Seedlings of *Doritis* hybrid were cultured in 2 media; Vacin & Went (VW) and ½ Murashige & Skoog (MS) with no supplement or supplement with 0.5, 1.0 mg/l Kinetin or BAP and with or without 0.1 mg/l NAA. The best response in seedling growth was observed on ½ MS medium without hormone.

The suitable potting substrate on *ex vitro* growth of *Doritis* hybrid plantlets was evaluated. The 4 potting substrates; sphagnum moss, coconut bark, charcoal, and charcoal covered with sphagnum moss, were tested. The charcoal covered with sphagnum moss showed the best plantlet growth in shoot, leaf and root.

The morphology of *Doritis* hybrid was studied in the cross between *Doritis* and *Phalaenopsis*, and *Doritis* and *Ascocentrum* which produce 4 hybrids: 1) *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* x *A. miniatum* 2) *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* x *A.* curvifolium 3) *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* x *P.* Khao Pak Daeng 4) *P.* Wedding x *D. pulcherrima* var. *buyssoniana*. The four hybrids each presented a different leaf pattern and only 2 hybrids, *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* x *A.* curvifolium and *P.* Wedding x *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* had flowers. These two hybrids are suitable as orchid pot

plants because of their compact size of plant and inflorescence, their having long flower life and their pest resistance. The two new hybrids were registered at the Royal Horticultural Society in the name of *Asconopsis* Purple Ubon and *Phalaenopsis* Warin Bride.

A molecular marker was used to identify the genotype of the new hybrid. The EST-SSR-B34 marker indicates the specific genetic profiles of *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* (NK13) x *P.* Khao Pak Daeng hybrid and its parents. Thus this marker proves that the hybridization was successful.

สารบัญเรื่อง **หน้า**

บทนำ 1
วัตถุประสงค์โครงการ 2
ตรวจเอกสาร 2
วิธีดำเนินการวิจัย 5
ผลการทดลองและวิจารณ์ 9
สรุป 46
เอกสารอ้างอิง 47
ภาคผนวก 50
- บทความที่ได้รับการนำเสนอในวารสารวิชาการและการประชุมวิชาการ 51
- กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์ 71
- รางวัลที่ได้รับทางนวัตกรรม 83
- การแสดงวัตถุประสงค์ และเปรียบเทียนกิจกรรมที่วางแผนและที่ดำเนินการ 84
ประวัตินักวิจัย 85

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ที่ใช้เป็นต้นพ่อแม่พันธุ์	9
2	ชนิดกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* และสกุล *Ascocentrum* ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์	10
3	การสร้างลูกผสมต่างสกุลระหว่างสกุลม้าวิ่งและสกุลฟาแลนอปซิส หรือสกุลเข็ม และได้ฝักลูกผสม	11
4	การสร้างลูกผสมต่างสกุลระหว่างสกุลม้าวิ่งและสกุลฟาแลนอปซิสหรือสกุลเข็ม และได้ต้นอ่อนลูกผสม	14
5	เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อต่างๆของชิ้นส่วนโคนใบกล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบลบนอาหาร NDM ที่เติมสาร Thidiazuron ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน	16
6	การพัฒนาของคัพภะลูกผสมกล้วยไม้ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x กล้วยไม้แดงอุบล จากฝักอ่อนที่มีอายุ 1-2.5 เดือน และเพาะบนอาหารสูตรต่างๆเป็นระยะเวลา 2 เดือน	18
7	การเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 เดือน	21
8	การเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 เดือน	22
9	การเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 5 เดือน	23
10	การเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 5 เดือน	24
11	เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW และสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 5 เดือน	24
12	การเจริญเติบโตของลูกกล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล ที่ปลูกเลี้ยงในวัสดุปลูก 4 แบบ	26
13	ลักษณะรูปร่างใบของต้นกล้วยไม้ลูกผสม	30
14	ลักษณะการเจริญเติบโต ความทนทานต่อโรคและแมลง และฤดูออกดอกของกล้วยไม้ลูกผสม	32
15	ลักษณะช่อดอกและดอกของกล้วยไม้ลูกผสม	33

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ต้นพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง	10
2	ต้นพันธุ์กล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิสที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์	12
3	การติดฝักเพื่อสร้างลูกผสมโดยใช้กล้วยไม้ฟาแลนอปซิสเป็นต้นแม่	12
4	การติดฝักเพื่อสร้างลูกผสมโดยใช้กล้วยไม้แดงอุบลเป็นต้นแม่	13
5	การพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อต่างๆ จากชิ้นส่วนโคนใบของกล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบล	15
6	กายวิภาคของการเกิด PLBs และการเกิดต้นใหม่จากเนื้อเยื่อบริเวณฐานของโคนใบกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง	16
7	การพัฒนาของคัพภะลูกผสมจากฝักอายุ 2 เดือน บนอาหารสูตรต่างๆ หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน	19
8	การเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมในอาหารสูตร Vacin and Went และสูตร ½ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลานาน 5 เดือน T1 ไม่เติมสาร, T2 Kinetin 0.5 mg/L, T3 Kinetin 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L, T4 Kinetin 1.0 mg/L, T5 Kinetin 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L, T6 BAP 0.5 mg/L, T7 BAP 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L, T8 BAP 1.0 mg/L, T9 BAP 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L, T10 NAA 0.1 mg/L	25
9	ลักษณะต้น ใบ และราก ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล ที่ปลูกเลี้ยงในวัสดุปลูก 4 แบบ คือ สแฟกนัมมอส กาบมะพร้าว ถ่าน และถ่านปิดทับหน้าด้วยสแฟกนัมมอส	27
10	ลักษณะรูปร่างและสีของต้นและใบกล้วยไม้ลูกผสมคู่ผสมต่างๆ	31
11	กล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล รหัส NK 4 x เข็มแดง	34
12	กล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ใบรูปไข่กลับ	34
13	กล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ใบรูปรี สี grey-brown	34
14	กล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส PK 3 ใบรูปรี สี yellow-green	35
15	การรับรองการจดทะเบียนลูกผสมใหม่ *Asconopsis* Purple Ubon	37
16	ลักษณะของแม่พันธุ์ พ่อพันธุ์ และลูกผสม *Asconopsis* Purple Ubon	38
17	การตีพิมพ์เผยแพร่กล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ในวารสาร The Orchid Review Vol. 120	39
18	การรับรองการจดทะเบียนลูกผสมใหม่ *Phalaenopsis* Warin Bride	41
19	ลักษณะของแม่พันธุ์ พ่อพันธุ์ และลูกผสม *Phalaenopsis* Warin Bride	42
20	การตีพิมพ์เผยแพร่กล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ในวารสาร The Orchid Review Vol. 121	43
21	โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิสแสดงเอกลักษณ์ลูกผสมกล้วยไม้ แดงอุบล รหัส NK 13 x ฟาแลนอปซิส 1 ขาวปากแดง โดยใช้เครื่องหมาย EST-microsatellite – ไพรเมอร์ B34; NK 13 คือ แดงอุบล รหัส NK13, Pha. red คือ ฟาแลนอปซิส 1 ขาวปากแดง, 1-15 คือ ลูกผสมจำนวน 15 ตัวอย่าง/เบอร์ และ M คือ 100 bp ladder	45

บทนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งที่มีการกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้สูง กล้วยไม้ป่าหรือกล้วยไม้พันธุ์แท้ของไทยที่มีการค้นพบและจำแนกได้รวม 1,224 ชนิด ใน 183 สกุล (พัชรียา, 2553) จากความได้เปรียบที่เป็นแหล่งพันธุกรรมของกล้วยไม้และมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ ทำให้ปัจจุบันประเทศไทยได้รับการยอมรับว่าเป็นแหล่งผลิตต้นพันธุ์และดอกกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญที่สุดของโลก โดยประเทศไทยสามารถส่งออกกล้วยไม้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี 2508 จนถึงปัจจุบัน การส่งออกกล้วยไม้ในปี 2550 มีมูลค่า 2,545 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551) กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้กำหนดให้กล้วยไม้เป็นสินค้า product champion และมีนโยบายส่งเสริมการส่งออกให้มีมูลค่าปีละ 10,000 ล้านบาทภายในปี 2558 จากนโยบายนี้ทำให้ประเทศไทยต้องวิเคราะห์ถึงปัญหาต่างๆ อันจะนำไปสู่การแข่งขันในตลาดโลก การตลาดสินค้ากล้วยไม้ในปัจจุบันมีปัญหาหนึ่งที่สำคัญ คือ เรื่อง การขาดพันธุ์กล้วยไม้ใหม่ๆเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค

กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis*) เป็นกล้วยไม้สกุลเล็กๆมีไม่กี่ชนิดในโลก แต่พบว่ามีความสำคัญในการนำไปผสมข้ามกับสกุลอื่นๆ เช่น *Phalaenopsis, Aerides, Ascocentrum, Rhyncostylis Pelatantheria, Neofinetai, Sarcochilus, Ascoglossum, Gastrochilus, Kingiella, Renanthera* และ *Vanda* กล้วยไม้สกุล *Doritis* มีการผสมข้ามสกุลกับสกุล *Phalaenopsis* มากที่สุด และได้ลูกผสมสกุลใหม่เรียกว่า *Doritanopsis* ซึ่งมีลักษณะลำต้นสั้น ออกดอกเป็นช่อ ช่อดอกตั้ง ดอกจะทยอยบานขึ้นไปเรื่อยๆจนถึงปลายช่อดอก เหมาะสำหรับเป็นไม้ดอกกระถาง กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่กระจายพันธุ์ในประเทศไทยมี 4 สายพันธุ์คือ ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima*) พบทั่วไปทั้งในภาคกลาง ภาคใต้ ภาคเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) พบในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ ม้าบิน (*Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis*) พบที่ภาคใต้ เช่น จังหวัดชุมพร และ *Doritis pulcherrima* var. *coerulea* (ไม่มีชื่อพื้นเมือง) พบทั่วไปในภาคเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (สมศักดิ์, 2535) กล้วยไม้สกุลนี้ออกดอกในช่วงฤดูฝน แต่ละสายพันธุ์มีความโดดเด่นที่แตกต่างกัน คือ สายพันธุ์ม้าวิ่งมีขนาดดอกเล็ก กลีบเลี้ยงและกลีบดอกลู่ไปด้านหลัง มีความหลากหลายของสีดอกและสีปากมากที่สุด แต่ลำต้นมีขนาดเล็กเจริญเติบโตช้า มีจำนวนโครโมโซม 2n = 38 สายพันธุ์ม้าบินมีลักษณะเด่นคือที่กลีบเลี้ยงทั้งสองข้างมีรอยหยักเป็นคลื่น สายพันธุ์แดงอุบลมีความเด่นด้านขนาดดอก ลำต้นและใบที่ใหญ่กว่าสายพันธุ์อื่นๆ กลีบดอกตั้ง ฟอร์มดอกกลม ก้านดอกยาวแข็งแรง มีปริมาณดอกมาก มีอายุการปักแจกันได้นาน ที่พบตามธรรมชาติมีโครโมโซม เป็น 2n = 76 มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ดี มีลักษณะทนทานต่อแมลง แต่มีข้อด้อยเรื่องสีของดอกมีเฉพาะโทนสีชมพูอ่อนแดงอุบลจัดเป็นไม้ประจำถิ่นของจังหวัดอุบลราชธานี เนื่องจากพบความหลากหลายของสีดอก ฟอร์มดอก ลักษณะต้นและปริมาณต้นมากที่สุดในจังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งแดงอุบลมีกระจายพันธุ์เฉพาะบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเท่านั้น จากการสำรวจและเก็บรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้แดงอุบลของคณะผู้วิจัยในปี 2541-2542 พบว่าปริมาณที่พบตามธรรมชาติน้อยลงมาก โดยมีสาเหตุจากการทำลายโดยศัตรูในธรรมชาติ เช่น วัว ไฟป่า สภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงและมนุษย์ที่นำพันธุ์กล้วยไม้ไปจำหน่าย (ศรีประไพและคณะ, 2544) จากการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของคณะผู้วิจัยพบว่า กล้วยไม้แดงอุบลและสายพันธุ์อื่นๆในสกุลม้าวิ่งที่เป็นกล้วยไม้พื้นเมืองของประเทศไทยมีศักยภาพในการเป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อผลิตกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ หรือปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะที่ดีขึ้นสามารถผลิตเพื่อเป็นไม้ประดับกระถาง งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะ

ปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อเป็นไม้ประดับกระถาง โดยวิธีการสร้างลูกผสมต่างสกุลให้ออกดอกตลอดปี

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อสร้างกล้วยไม้ลูกผสมต่างสกุล สามารถผลิตเป็นไม้ประดับกระถาง
2. เพื่อสร้างกล้วยไม้ลูกผสมต่างสกุลเพื่อให้ออกดอกตลอดทั้งปี และมีรูปร่างลักษณะดอกสวยสะดุดตา

ตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis*) เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Orchidaceae สกุล *Doritis* Tribe Vandeae Subtribe Sarcanthinae จัดเป็นพวก Terrestrial plant หรือ Lithophytic plant (ไพบูลย์, 2521) ปัจจุบันกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งถูกจัดเข้าไปอยู่ในสกุลฟาแลนอปซิส (*Phalaenopsis*) (Christension, 2001) กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเป็นกล้วยไม้ที่ขึ้นอยู่ตามพื้นดิน ซอกหินและแอ่งหิน ที่มีอินทรีย์วัตถุทับถม ลักษณะต้นจะสั้น ใบแบนค่อนข้างหนา ใบมีสีเขียวหรือสีเขียวอมม่วง ช่อดอกตั้ง ช่อดอกยาวแข็งและตรง ดอกมีสีแดงอ่อนๆไปจนถึงสีแดงอมม่วง ดอกจะทยอยบานขึ้นไปเรื่อยๆจนถึงปลายช่อดอก (ระพี, 2549) กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่พบกระจายพันธุ์ในประเทศไทยมี 4 สายพันธุ์คือ ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima*) พบทั่วไปทั้งในภาคกลาง ภาคใต้ ภาคเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) พบในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ ม้าบิน (*Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis*) พบที่ภาคใต้ เช่น จังหวัดชุมพร และ *Doritis pulcherrima* var. *coerulea* (ไม่มีชื่อพื้นเมือง) พบทั่วไปในภาคเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (สมศักดิ์, 2535) เมื่อพิจารณากล้วยไม้ในสกุลนี้แต่ละชนิดพบว่า *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* มีขนาดของต้น ใบ และดอกใหญ่ที่สุด โดยมีความสูงต้น 6-20 ซม. ใบขนาดใหญ่กว้าง 2-6.5 ซม. ยาว 8-20 ซม. ช่อดอกยาว 37-91 ซม. จำนวนดอก/ช่อ 7-29 ดอก ดอกขนาดกว้าง 3-5 ซม. สูง 2.5-4 ซม. สีดอกตั้งแต่ชมพูอ่อนจนถึงม่วง สีปากมีสีเหมือนกลีบดอก สีอ่อนกว่ากลีบดอก สีเข้มกว่ากลีบดอก มีลวดลายและจุดสีหลายแบบ สี Sidelobe บนปากมีสีเหลือง เหลืองส้ม ชมพูอ่อน ม่วง (ศรีประไพและคณะ, 2544) *Doritis pulcherrima* ลำต้นสูง 5-12 ซม. ใบกว้าง 2-4 ซม. ยาว 7-12 ซม. ก้านช่อดอกยาว 20-50 ซม. มีจำนวนดอก/ช่อ 5-15 ดอก ขนาดดอกกว้าง 1.3-2 ซม. สีม่วงสดหรือสีขาว กลีบเลี้ยงและกลีบดอกลู่ไปด้านหลัง สีของปากมีความหลากหลายมาก (สลิลและนฤมล, 2545; องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2543; อบฉันท์, 2543) *Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis* มีดอกและใบขนาดใกล้เคียงกับม้าวิ่ง ดอกมีลักษณะเด่นคือ ส่วนของกลีบดอก 2 ข้างมีลักษณะคล้ายปีกเป็นรอยหยักเล็กน้อย ซึ่งลักษณะนี้เป็นลักษณะเด่นสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ *Doritis pulcherrima* var. *coerulea* เป็นกล้วยไม้ที่มีขนาดเล็กกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ลักษณะเด่นคือ มีสีฟ้าอมม่วง จึงนิยมเรียกว่า ม้าวิ่งบลู

การขยายพันธุ์

กล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) สามารถขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำฝักอายุ 3-4 เดือนมาเพาะในอาหารสูตรดัดแปลง Vacin and Went

ที่ไม่มีน้ำตาล และเลี้ยงในที่มืด 15 วันแล้วจึงนำมาให้แสง มีความเหมาะสมต่อการงอกและพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้แดงอุบล (กาญจนา, 2544) เมื่อต้นอ่อนขนาด 2 ซม.(อายุประมาณ 5 เดือน) นำมาเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง Vacin and Went ที่ไม่มีน้ำตาลหรือมีน้ำตาล 10 กรัม/ลิตร ซึ่งเหมาะสมต่อการเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้แดงอุบลให้มีการเจริญเติบโตที่ดี (กาญจนาและสุภาพ, 2544)

การขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนใบอ่อนสามารถทำได้ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสกุลใกล้เคียง Park และคณะ (2002) สามารถชักนำโปรโตคอร์มจากส่วนใบอ่อนลูกผสม *Doritanopsis* กล้วยไม้แดงอุบลสามารถขยายพันธุ์จากส่วนของพืชที่เป็น vegetative parts เช่น การเพาะเลี้ยงใบอ่อน โดยนำต้นกล้าจากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อซึ่งมีใบอ่อนยาวประมาณ 1-2 ซม. มาทำการศึกษาส่วนของใบอ่อนและวิธีวางชิ้นส่วนใบอ่อนบนอาหารเพื่อชักนำการเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อ พบว่า การใช้ส่วนโคนใบอ่อนและวางนอนบนอาหารเป็นวิธีที่เหมาะสมในการชักนำการเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อ โดยชิ้นส่วนที่เลี้ยงมีการรอดชีวิต 100% มีการพัฒนาเป็นต้นอ่อน 18% ยอด 29% หลายยอด 18% แคลลัส 20% และโปรโตคอร์มร่วมกับแคลลัส 3% การศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงใบอ่อน พบว่าชิ้นส่วนโคนใบที่เลี้ยงในอาหาร NDM ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA 1 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มและแคลลัสได้ดีที่สุด เท่ากับ 70% (กาญจนาและคณะ, 2543; Rungruchkanont, 2009)

การเลี้ยงก้านช่อดอกอ่อนเป็นอีกวิธีที่สามารถขยายพันธุ์จากส่วนของพืชที่เป็น vegetative parts นำก้านช่อดอกอ่อนจากสภาพธรรมชาติมาฟอกฆ่าเชื้อและนำข้อที่มีตาบนก้านช่อดอกตำแหน่งข้อที่ 1, 2, 3 และ 4 มาเลี้ยงบนอาหาร New Dogashima medium (NDM) ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. และ BA 5 มก./ล. จะชักนำให้เกิดการพัฒนาได้ประมาณ 21% และพบว่าตำแหน่งตาข้อที่ 1, 2 และ 3 นับจากดอกอ่อนสามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาได้ในเวลา 2 เดือนโดยตาข้อที่ 2 และข้อที่ 3 มีการพัฒนาเป็น ตุ่มตาสีเขียวและยอดอ่อน ส่วนตาข้อที่ 1 มีการพัฒนาเป็นตุ่มตาสีเขียว ยอดอ่อน และช่อดอกอ่อน ปัญหาที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกอ่อนคือ การปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย โดยเฉพาะการควบคุมเชื้อแบคทีเรียยังไม่ได้ผล (กาญจนาและคณะ, 2543)

ในขั้นตอนการขยายปริมาณโปรโตคอร์มเพื่อให้ได้จำนวนมากพบว่า การเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มกล้วยไม้แดงอุบลในอาหารน้ำสูตร New Dogashima medium (NDM) ที่เติม NAA 0.1 มก./ล.ร่วมกับ BA 1 มก./ล. ได้ผลดีที่สุด โปรโตคอร์มมีการพัฒนาเป็นต้นขนาดเล็กไม่มีรากและมีกลุ่มโปรโตคอร์มเกิดขึ้นใหม่ปริมาณมาก เมื่อต้องการให้โปรโตคอร์มพัฒนาเป็นต้น อาหารที่เหมาะสมในการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้แดงอุบลให้เป็นต้นอ่อน พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Vacin and Went (VW) มีแนวโน้มการเจริญเติบโตของต้นดีที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตร New Dogashima medium (NDM) ทั้ง 2 สูตร ให้ผลการเจริญเติบโตของต้นได้ดีกว่าอาหารสูตร Ichihashi and Yamashita medium (IY) (กาญจนาและคณะ, 2543)

เซลล์พันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์

การศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์มีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช ได้มีการศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้หลายชนิด (Tanaka and Kamemoto, 1984) จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง พบว่า *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* มีจำนวน 2n = 76 *Doritis pulcherrima* มีจำนวน 2n = 38 (Tanaka and Kamemoto, 1984; กาญจนาและคณะ, 2551) กล้วยไม้พันธุ์แท้ในสกุล *Phalaenopsis, Aerides, Ascocentrum, Rhyncostylis Pelatantheria, Neofinetai, Sarcochilus* ส่วนใหญ่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 38 ซึ่งสกุลเหล่านี้มีลักษณะการ

เจริญเติบโตแบบ monopodium เหมือนกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จึงสามารถผสมข้ามสกุลได้และให้ลูกผสมที่ไม่เป็นหมัน นอกจากนี้มีรายงานลูกผสมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งกับสกุลอื่นๆอีก เช่น *Ascoglossum, Gastrochilus, Kingiella, Renanthera* และ *Vanda* จากรายชื่อลูกผสมพบว่า กล้วยไม้สกุล *Doritis* มีการผสมข้ามสกุลกับสกุล *Phalaenopsis* มากที่สุด และได้ลูกผสมสกุลใหม่เรียกว่า *Doritanopsis* จากบัญชีรายชื่อลูกผสมใน Sander's List พบว่า มีการนำเอา *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* เป็นพ่อแม่พันธุ์ปริมาณน้อย (The Royal Horticultural Society, 1991) ทั้งนี้อาจเนื่องจากพื้นที่การกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้สายพันธุ์นี้ค่อนข้างแคบ ประกอบกับมีจำนวนโครโมโซม 2n =76 ซึ่งเมื่อนำไปใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ผสมกับกล้วยไม้สกุลอื่นๆที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 38 ลูกผสมที่เกิดขึ้นจึงมีโอกาสเป็นหมันสูง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การรวบรวมเชื้อพันธุกรรมเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์

ทำการคัดเลือกกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis*) คือ กล้วยไม้ม้าวิ่ง และกล้วยไม้แดงอุบล ที่มีลักษณะฟอร์มดอกดี สีสันสวยงาม มีความทนทานต่อโรคและแมลง เพื่อใช้เป็นต้นพ่อแม่พันธุ์ และทำการคัดเลือกกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส (*Phalaenopsis*) และสกุลเข็ม (*Ascocentrum*) ที่มีลักษณะดอกสวยงาม มีฤดูกาลออกดอกแตกต่างจากกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง การเก็บเชื้อพันธุกรรมเพื่อเป็นต้นพ่อ ได้ทำการเก็บเกสรที่สมบูรณ์จากดอกบานเต็มที่ นำเกสรเก็บในแคปซูล เขียนชื่อพันธุ์กล้วยไม้ และนำไปเก็บในกล่องฟิล์มปิดให้สนิท เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 10°ซ เพื่อรอนำไปผสมพันธุ์ต่อไป

2. การสร้างลูกผสมกล้วยไม้สายพันธุ์ต่างๆ

ได้ทำการผสมข้ามเพื่อสร้างลูกผสมต่างสกุล โดยนำเกสรกล้วยไม้ที่เก็บไว้ในตู้เย็น มาผสมกับดอกกล้วยไม้ต่างสกุลที่บานเต็มที่ ดังนี้

ลูกผสมสกุลม้าวิ่ง (*Doritis*) และ สกุลฟาแลนอปซิส (*Phalaenopsis*)

ลูกผสมสกุลม้าวิ่ง (*Doritis*) และ สกุลเข็ม (*Ascocentrum*)

สังเกตการติดฝักของลูกผสมหลังจากทำการผสมเป็นเวลา 2-3 เดือน

3. การเพาะเมล็ดลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อ

นำฝักอ่อนที่มีอายุ 2-3 เดือนมาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว ผ่าฝักกล้วยไม้นำเมล็ดใส่ในขวดน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้หลอดหยดดูดน้ำที่มีเมล็ดแขวนลอยอยู่ลงบนวุ้นอาหารสูตร Vacin and Went (VW) จะทำให้เมล็ดกระจายทั่วพื้นผิวอาหาร นำขวดเพาะเมล็ดไปเลี้ยงในที่มืดในห้องเพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 25±2°ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 60-65% เป็นเวลา 1 เดือน หลังจากนั้นนำมาให้แสงภายใต้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 200 ลักซ์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง/วัน บันทึกผลการงอกของเมล็ดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

4. การเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้จากชิ้นส่วนใบ

จากปัญหาจำนวนต้นอ่อนที่ได้น้อยจากการสร้างลูกผสมต่างสกุล จึงได้ศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบจากกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง โดยการชักนำให้เกิด protocorm-like bodies (PLBs) ซึ่งเป็นโครงสร้างพิเศษของกล้วยไม้ที่สามารถขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนต่อไปได้อย่างรวดเร็ว เพื่อเพิ่มปริมาณต้นอ่อนให้มากขึ้นและเป็นการเพิ่มโอกาสในการศึกษาประชากรของลูกผสม

4.1 ทำการศึกษาความเข้มข้นของสาร Thidiazuron (TDZ) ที่เหมาะสมต่อการชักนำ PLBs

นำต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบลที่มีอายุ 10 เดือนในสภาพปลอดเชื้อ ตัดใบอ่อนที่มีขนาด 1-2 ซม. โดยตัดใบให้ถึงส่วนโคนของใบ ใช้ใบมีดตัดใบตามขวางแบ่งเป็น 2 ส่วน คือส่วนปลายใบและส่วนโคนใบ นำส่วนของใบหงายให้ด้านท้องใบสัมผัสอาหารและวางนอนบนอาหารสูตร New Dogashima Medium (NDM) ที่มีสาร TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 3, 5 และ 10 มก./ล. โดยการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลองกรรมวิธีละ 7 ซ้ำๆ ละ 4 ชิ้น ทำการเลี้ยงใบอ่อนในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2°C ความชื้นสัมพัทธ์ 60-65% และได้รับแสง

2000 ลักซ์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง/วัน ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่และบันทึกผลทุกเดือนเป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยเก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิด PLBs ยอด และราก

4.2 การศึกษากายวิภาคการพัฒนาเนื้อเยื่อจากใบ

เก็บตัวอย่างส่วนต่างๆที่เกิดการพัฒนาจากชิ้นส่วนใบ เช่น PLBs ยอด ราก ที่ติดกับชิ้นส่วนใบต้นกำเนิด ตัดเป็นชิ้นประมาณ 0.3x0.5 เซนติเมตร นำตัวอย่างฆ่าและคงสภาพเซลล์ในน้ำยา formalin - acetic acid - ethyl alcohol (FAA) 50% นาน 18 ชั่งโมง นำตัวอย่างไปแช่ใน tertiary butyl alcohol (TBA) ที่ระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 5 ระดับ คือ 50, 70, 85, 95 และ100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ละระดับใช้เวลา 12 ชั่วโมง ทำการแทนที่แอลกอฮอล์โดยแช่ตัวอย่างใน pure TBA 3 ครั้งๆ ละไม่ต่ำกว่า 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายตัวอย่างพืชลงในหลอดแก้วที่มีส่วนผสมของ pure TBA กับ paraplast ไปยังตู้อบที่มีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 48 ชั่วโมง เปลี่ยน paraplast 3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้เวลา 12 ชั่วโมง ทำการฝังเนื้อเยื่อใน paraplast หลังจากนั้นตัดเนื้อเยื่อด้วย rotary microtome ความหนาประมาณ 10-15 ไมครอน นำแถบ paraplast ที่มีชิ้นตัวอย่างติดอยู่ติดบนกระจกสไลด์ ย้อมสไลด์ด้วยสี Toluidine Blue และทำการศึกษาสไลด์ตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกล้วยไม้ลูกผสมต่างสกุล

5.1 ผลของอายุฝักและอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของคัพภะลูกผสมข้ามกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

เลือกดอกกล้วยไม้ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง ที่มีความสดใสและสมบูรณ์ เขี่ยเกสรตัวผู้ทิ้ง และนำเกสรของกล้วยไม้แดงอุบลที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 10°ซ เป็นระยะเวลา 3-4 เดือน มาผสมบริเวณแอ่งเกสรตัวเมีย หลังจากนั้นหยดสาร 2,4-D ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร วันเว้นวัน จนกระทั่งเก็บฝักมาเพาะ ศึกษาปัจจัย 2 ปัจจัย คือ

1. อายุฝัก มี 4 ระยะ คือ 1, 1.5, 2, 2.5 เดือน
2. อาหารเพาะเลี้ยง 5 สูตร คือ
    1. VW
    2. VW + 2,4-D 100 มก/ล
    3. VW + Dicamba 50 มก/ล
    4. VW + Kinetin 1 มก/ล + NAA 0.1 มก/ล
    5. VW + Peptone 2 ก/ล

นำฝักลูกผสมที่มีอายุฝัก 4 ระยะ มาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยจุ่มฝักในแอลกอฮอล์ 95% ผ่านเปลวไฟ วางบนจานแก้ว เมื่อไฟดับแล้ว ผ่าฝักกล้วยไม้ตามความยาวของฝักแยกออกเป็น 2 ส่วน ใช้ปากคีบเลาะเนื้อเยื่อสีขาวซึ่งมีเมล็ดอ่อน นำมาเลี้ยงบนวุ้นอาหารสูตรทั้ง 5 สูตร นำขวดเพาะเมล็ดไปเลี้ยงในที่มืดในห้องเพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 25±2°ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 60-65% เป็นเวลา 1 เดือน หลังจากนั้นนำมาให้แสงภายใต้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 200 ลักซ์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง/วัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน ทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์ฝักที่มีคัพภะพัฒนา และจำนวนคัพภะที่มีการพัฒนา

6. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นกล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส x แดงอุบล ที่มีจำนวนใบ 3 ใบ ราก 3 รากต่อต้น ซึ่งเลี้ยงไว้ในสภาพปลอดเชื้ออายุประมาณ 1 เดือน มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรสังเคราะห์ 2 สูตรคือ สูตร Vacin and Went (VW) และสูตร ½ Murashige & Skoog (MS) และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ Kinetin และ BAP ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 และ 5 เดือน บันทึกผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลโดยวางแผนการทดลองแบบ complete randomized design (CRD) จำนวน 10 สิ่งทดลองๆ ละ 10 ซ้ำ บันทึกข้อมูลโดยนับจำนวนใบต่อต้น วัดความกว้างและความยาวใบ จำนวนรากต่อต้น และวัดความยาวราก แล้วนำข้อมูลที่บันทึกได้ไปวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new Multiple Range Test (DMRT)

7. การศึกษาวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของลูกกล้วยไม้ในสภาพโรงเรือน

นำกล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล ที่เพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาวางในอุณหภูมิห้องเพื่อให้กล้วยไม้ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นนำลูกกล้วยไม้ออกจากขวดเพาะเลี้ยง ล้างวุ้นที่ติดมากับต้นและรากออกให้หมด นำลูกกล้วยไม้ปลูกในวัสดุต่างๆ 4 ปัจจัย คือ 1) ปลูกในสแฟกนัมมอส 2) ปลูกในกาบมะพร้าวสับ 3) ปลูกในถ่านหุงต้ม 4) ปลูกในถ่านหุงต้มปิดทับด้วยสแฟกนัมมอส นำลูกกล้วยไม้ที่ปลูกในวัสดุปลูกทั้ง 4 ปัจจัย เลี้ยงในโรงเรือนที่มีหลังคาพลาสติกใส และพรางแสงด้วยตาข่ายพรางแสง 50% การดูแลรักษาให้น้ำเมื่อวัสดุปลูกเริ่มแห้ง รดปุ๋ยสูตรที่มีไนโตรเจนสูง (30-20-10) สลับกับปุ๋ยสูตรเสมอ (20-20-20) อัตรา 2 กรัม ต่อลิตร ทุกสัปดาห์ หลังจากปลูกเลี้ยงเป็นเวลา 12 เดือน บันทึกผลการเจริญเติบโตของลูกกล้วยไม้ ความสูงต้น จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ จำนวนราก ความยาวราก

8. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของกล้วยไม้ลูกผสม

การสร้างกล้วยไม้ลูกผสมสกุลม้าวิ่งในการวิจัยนี้ ได้ทำการผสมระหว่างสกุลม้าวิ่งและสกุลฟาแลนอปซิส และระหว่างสกุลม้าวิ่งและสกุลเข็ม ได้ผลผลิต 4 คู่ผสม คือ

1. แดงอุบล x เข็มแสด
2. แดงอุบล x เข็มแดง
3. แดงอุบล x ฟาแลนอปซิส ขาวปากแดง
4. ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล

ทำการศึกษาลักษณะต้นและใบ เช่น รูปร่างใบ สีของใบ และขนาดของใบ ศึกษาลักษณะดอก ช่อดอก สีดอก ผลผลิตดอก ศึกษาการเจริญเติบโต ความทนทานต่อโรคและแมลง และฤดูออกดอก หลังจากนั้นคัดเลือกต้นที่มีลักษณะเป็นไม้กระถางที่ดี

9. การจดทะเบียนลูกผสมใหม่

นำลูกผสมใหม่ 2 ชนิด คือ แดงอุบล x เข็มแดง และ ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล ขอจดทะเบียนตั้งชื่อที่ The Royal Horticultural Society, London ประเทศสหราชอาณาจักร ตามแบบฟอร์มของสมาคม และตรวจสอบรายชื่อลูกผสมใหม่ได้ใน website
http://apps.rhs.org.uk/horticulturaldatabase/orchidregister/orchidregister.asp

10. การวิเคราะห์ DNA ตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมสายพันธุ์ใหม่

การเก็บตัวอย่าง

ดำเนินการเก็บตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าที่เกิดจากการผสมระหว่าง แดงอุบล รหัส NK13 x ฟาแลน 1 ขาวปากแดง จำนวน 15 ต้น ซึ่งถูกเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบอ่อนที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB extraction procedure with phenol-chloroform (Sue *et.al.,* 1997) ดังนี้ บดใบกล้วยไม้ให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว แล้วถ่ายผงใบลงในหลอดขนาด 2 ml เติม Extraction buffer 650 µl (100 mM Tris, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8.0), 2%CTAB, 0.3% b-mercaptoethanol) และเติม PVP ประมาณ 50 mg ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 25-60 นาที นำออกมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 4- 6 นาทีและเติม chloroform: octanol (24:1) ปริมาตร 650 µl ผสมโดยกลับหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่เติม chloroform: octanol (24:1) อีกเพื่อกำจัด PVP ในสารละลายปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่เติม 1/2 volume ของ 5 M NaCl ผสมให้เข้ากัน และเติม 2 volume ของ 95% ethanol ที่เย็นจัด ผสมให้เข้ากัน นำมาบ่มไว้ที่ – 20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หรือบ่มที่ 4-6 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน (มากกว่า 12 ชั่วโมง) ปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ตากตะกอนที่ 37 องศาเซลเซียส หรือใน vacuum จนแห้ง (ประมาณ 60 นาที) ละลายตะกอนด้วย TE buffer 300 µl บ่มที่อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส 1 คืน (มากกว่า 12 ชั่วโมง) เติม 3 µl RNase A (10 mg/ml) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และเติม Proteinase K 3 µl (1 mg/ml) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสอีก เป็นเวลา 15-30 นาที เติม phenol: chloroform ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10-20 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 1/10 volume 2 M sodium acetate และ 2 volume absolute ethanol บ่มไว้ในตู้เย็น 1 คืน (มากกว่า 12 ชั่วโมง) ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10-20 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol จำนวน 2 ครั้ง ตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติม TE buffer ปริมาตร 100-200 µl เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ เก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

ปฏิกิริยาพีซีอาร์และการย้อมแถบดีเอ็นเอ

ทำการตรวจสอบลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ EST-SSR-B34 ซึ่งมีลำดับเบส repeat motif คือ (GGC)5 มี forward primer AATCCAAATCCAACACCAACTC และ reverse primer TAATTCCAGCCACAGTCTCCTT โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ ประมาณ 25-30 ng, 0.25 mM dNTPs, 0.25 µM forward และ reverse primers, 1x PCR buffer with 15 mM $MgCl_2$ 1 U *Taq* polymerase แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และมีปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย PCR cycle จำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ long extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาแยกขนาดและความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ด้วย 7 % polyacrylamide gel ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 60 วัตต์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาย้อมด้วย silver nitrate เพื่อตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การรวบรวมเชื้อพันธุกรรมเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์

1.1 กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ได้คัดเลือกต้นกล้วยไม้แดงอุบล และกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีลักษณะฟอร์มดอกดี สีสันสวยงาม มีความทนทานต่อโรคและแมลง เพื่อใช้เป็นต้นพ่อแม่พันธุ์ จำนวน 33 รหัส (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 ชนิดกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ที่ใช้เป็นต้นพ่อแม่พันธุ์

รหัสกล้วยไม้	ชนิดกล้วยไม้	รหัสกล้วยไม้	ชนิดกล้วยไม้
CM 6	แดงอุบล	PA 11	แดงอุบล
CM 14	แดงอุบล	PR 8	แดงอุบล
NK 3	แดงอุบล	DB 2	แดงอุบล
NK 4	แดงอุบล	DB 8	แดงอุบล
NK 8	แดงอุบล	MT 4	แดงอุบล
NK 9	แดงอุบล	MT 9	แดงอุบล
NK 11	แดงอุบล	UN 10	แดงอุบล
NK 12	แดงอุบล	UN 15	แดงอุบล
NK 13	แดงอุบล	MDM 2	ม้าวิ่ง
NK 14	แดงอุบล	MDM 17	ม้าวิ่ง
NK 18	แดงอุบล	MDM 23	ม้าวิ่ง
PA	แดงอุบล	MVP 2	ม้าวิ่ง
PK 3	แดงอุบล	MVP 7	ม้าวิ่ง
PK 5	แดงอุบล	MVP 39	ม้าวิ่ง
PK 12	แดงอุบล	MV 1	ม้าวิ่ง
PK 50	แดงอุบล	MV 6	ม้าวิ่ง
RE 4	แดงอุบล		

ภาพที่ 1 ต้นพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง
(ก) กล้วยไม้แดงอุบล
(ข) กล้วยไม้ม้าวิ่ง

1.2 กล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส (*Phalaenopsis*) และสกุลเข็ม (*Ascocentrum*) ได้ทำการคัดเลือกต้นที่มีลักษณะดอกสวยงาม มีฤดูกาลออกดอกแตกต่างจากกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ซึ่งเป็นสายพันธุ์แท้และลูกผสมจำนวน 8 พันธุ์ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 2 ชนิดกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* และสกุล *Ascocentrum* ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์

ชนิดกล้วยไม้	**สกุลกล้วยไม้**	**ชนิดสายพันธุ์ พันธุ์แท้ / ลูกผสม**
เข็มแสด	*Ascocentrum*	พันธุ์แท้
เข็มแดง	*Ascocentrum*	พันธุ์แท้
เขากวางอ่อน	*Phalaenopsis*	พันธุ์แท้
ผีเสื้อน้อย	*Phalaenopsis*	พันธุ์แท้
ฟาแลน 1 ขาวปากแดง	*Phalaenopsis*	ลูกผสม
ฟาแลน 2 ลายจุด	*Phalaenopsis*	ลูกผสม
ฟาแลน 3 ปลาคราฟ	*Phalaenopsis*	ลูกผสม
ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	*Phalaenopsis*	ลูกผสม

2. การสร้างลูกผสมกล้วยไม้สายพันธุ์ต่างๆ

ได้ทำการผสมข้ามเพื่อสร้างลูกผสมต่างสกุล โดยนำเกสรกล้วยไม้ที่เก็บไว้ในตู้เย็น มาผสมกับดอกกล้วยไม้ต่างสกุลที่บานเต็มที่ ดังนี้

2.1 ลูกผสมสกุลม้าวิ่ง (*Doritis*) และ สกุลฟาแลนอปซิส (*Phalaenopsis*)

2.2 ลูกผสมสกุลม้าวิ่ง (*Doritis*) และ สกุลเข็ม (*Ascocentrum*)

ผลการผสมได้จำนวนคู่ผสมทั้งหมด 45 คู่ผสม และได้ฝักลูกผสม (ตารางที่ 3, ภาพที่ 3 และ 4)

ตารางที่ 3 การสร้างลูกผสมต่างสกุลระหว่างสกุลม้าวิ่งและสกุลฟาแลนอปซิส หรือสกุลเข็มและได้ฝักลูกผสม

ต้นแม่ (ถือฝัก)	ต้นพ่อ (เกสร)	ผลที่ได้
แดงอุบล รหัส CM 6	เข็มแสด	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส NK 3	ฟาแลน 3 ปลาคราฟ	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส NK 4	เข็มแดง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส NK 8	ฟาแลน 2 ลายจุด	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส NK 8	เขากวางอ่อน	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส NK 9	เขากวางอ่อน	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส NK 9	ฟาแลน 3 ปลาคราฟ	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส NK 11	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส NK 12	เข็มแสด	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส NK 13	ฟาแลน 1 ขาวปากแดง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส PA	เข็มแดง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส PK 3	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส PK 3	ฟาแลน 3 ปลาคราฟ	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส PK 5	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส PK 12	ฟาแลน 3 ปลาคราฟ	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส PK 12	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส PK 50	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส RE 4	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส PR 8	ฟาแลน 3 ปลาคราฟ	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส DB 2	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส DB 8	เข็มแสด	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส DB 8	ฟาแลน 2 ลายจุด	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส DB 8	ฟาแลน 3 ปลาคราฟ	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส DB 8	ผีเสื้อน้อย	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส MT 4	เข็มแดง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส MT 9	เข็มแดง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส UN 10	เข็มแสด	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส UN 10	ฟาแลน 2 ลายจุด	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
แดงอุบล รหัส UN 15	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
ม้าวิ่ง รหัส MDM 2	เข็มแดง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
ม้าวิ่ง รหัส MDM 17	เข็มแดง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
ม้าวิ่ง รหัส MDM 17	เข็มแสด	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
ม้าวิ่ง รหัส MDM 23	เข็มแดง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
ม้าวิ่ง รหัส MVP2	เข็มแดง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม

ต้นแม่ (ถือฝัก)	ต้นพ่อ (เกสร)	ผลที่ได้
ม้าวิ่ง รหัส MVP 2	ฟาแลน 2 ลายจุด	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
ม้าวิ่ง รหัส MVP 7	ฟาแลน 2 ลายจุด	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
ม้าวิ่ง รหัส MVP 39	เข็มแดง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
ม้าวิ่ง รหัส MV 1	ฟาแลน 2 ลายจุด	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
ม้าวิ่ง รหัส MV 6	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	แดงอุบล รหัส PA 11	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	แดงอุบล รหัส RE 4	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	แดงอุบล รหัส CM 14	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	แดงอุบล รหัส PK 3	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	แดงอุบล รหัส NK 14	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม
ฟาแลน 2 ลายจุด	แดงอุบล รหัส NK 18	ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม

ภาพที่ 2 ต้นพันธุ์กล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิสที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์

ภาพที่ 3 การติดฝักเพื่อสร้างลูกผสมโดยใช้กล้วยไม้ฟาแลนอปซิสเป็นต้นแม่

ภาพที่ 4 การติดฝักเพื่อสร้างลูกผสมโดยใช้กล้วยไม้แดงอุบลเป็นต้นแม่

3. การเพาะเมล็ดลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อ

การนำเมล็ดจากฝักอ่อนลูกผสมที่มีอายุ 2-3 เดือน มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Vacin and Went (VW) เป็นเวลา 2 เดือน ผลการงอกของเมล็ด พบว่า ลูกผสมที่ได้เป็นต้นอ่อนมีเพียง 7 คู่ผสม (ตารางที่ 4) จากฝักลูกผสม 45 คู่ผสม (ตารางที่ 3) การสร้างลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสกุลเข็ม ซึ่งเป็นสายพันธุ์แท้ตามธรรมชาติ พบว่า สามารถผลิตต้นอ่อนได้ในบางคู่ผสม เช่น แดงอุบล รหัส NK 4 x เข็มแดง และ แดงอุบล รหัส UN 10 x เข็มแสด แต่จำนวนเมล็ดที่งอกมีจำนวนน้อย แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสกุลเข็มมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาก ทำให้โอกาสการผสมติดน้อย ถึงแม้กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสกุลเข็มมีการเจริญเติบโตทางยอด (monopodial growth) และมีระบบรากเป็นรากอากาศที่เหมือนกัน แต่สภาพที่พบในธรรมชาติมีความแตกต่างกัน คือ กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเป็นกล้วยไม้ที่พบขึ้นอยู่บนพื้นดินหรือหิน (terrestrial plant or lithophytic plant) ส่วนกล้วยไม้สกุลเข็มขึ้นอยู่บนต้นไม้ (epiphytic plant) (กาญจนา, 2555) จึงทำให้กล้วยไม้สองสกุลนี้มีความแตกต่างกันมาก

การสร้างลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสกุลฟาแลนอปซิส (สายพันธุ์แท้และสายพันธุ์ลูกผสมทางการค้า) พบว่า ได้ต้นอ่อนลูกผสมจากการผสมระหว่าง แดงอุบล รหัส NK 13 x ฟาแลน 1 ขาวปากแดง (ซึ่งเป็นสายพันธุ์ผสม) และพบว่า ได้ต้นอ่อนลูกผสมจากการใช้ต้นแม่เป็นกล้วยไม้ฟาแลนอปซิสและใช้ก้อนเรณู (พ่อ) เป็นกล้วยไม้แดงอุบล เช่น ฟาแลน 4 เวดดิ้ง x PA 11, ฟาแลน 4 เวดดิ้ง x RE 4, ฟาแลน 4 เวดดิ้ง x PK 3 และ ฟาแลน 4 เวดดิ้ง x NK 14 ซึ่งการใช้กล้วยไม้แดงอุบล (สายพันธุ์แท้) เป็นพ่อมีแนวโน้มการเกิดลูกผสมดีขึ้นโดยได้ต้นอ่อนลูกผสม 4 คู่ผสม จากการผสม 6 คู่ แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับชนิดฟาแลนอปซิสลูกผสมที่นำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ด้วยว่ามีความเป็นหมันสูงหรือไม่ ตัวอย่างเช่น ฟาแลน 2 ลายจุด ไม่ว่าจะใช้เป็นต้นพ่อหรือแม่ ไม่สามารถผลิตลูกผสมได้ การผลิตลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสกุลเข็ม หรือการผลิตลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสกุลฟาแลนอปซิสในครั้งนี้ ถึงแม้ว่าจะได้ต้นอ่อนลูกผสมแต่จำนวนต้นอ่อนที่ได้ในแต่ละคู่ผสมมีจำนวนน้อย ซึ่งเป็นปัญหาต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาประชากรลูกผสมต่อไป จึงต้องทำการศึกษาเทคนิคการเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้จากชิ้นส่วนใบในหัวข้อที่ 4 เพื่อนำความรู้จากการวิจัยไปใช้เพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้ลูกผสมต่างสกุลของสกุลม้าวิ่ง ให้มีปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว

ตารางที่ 4 การสร้างลูกผสมต่างสกุลระหว่างสกุลม้าวิ่งและสกุลฟาแลนอปซิสหรือสกุลเข็ม และได้ต้นอ่อนลูกผสม

ต้นแม่ (ถือฝัก)	ต้นพ่อ (เกสร)	ผลที่ได้
แดงอุบล รหัส CM 6	เข็มแสด	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส NK 3	ฟาแลน 3 ปลาคราฟ	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส NK 4	**เข็มแดง**	**ได้ต้นอ่อน**
แดงอุบล รหัส NK 8	ฟาแลน 2 ลายจุด	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส NK 8	เขากวางอ่อน	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส NK 9	เขากวางอ่อน	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส NK 9	ฟาแลน 3 ปลาคราฟ	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส NK 11	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส NK 12	เข็มแสด	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส NK 13	**ฟาแลน 1 ขาวปากแดง**	**ได้ต้นอ่อน**
แดงอุบล รหัส PA	เข็มแดง	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส PK 3	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส PK 3	ฟาแลน 3 ปลาคราฟ	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส PK 5	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส PK 12	ฟาแลน 3 ปลาคราฟ	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส PK 12	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส PK 50	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส RE 4	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส PR 8	ฟาแลน 3 ปลาคราฟ	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส DB 2	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส DB 8	เข็มแสด	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส DB 8	ฟาแลน 2 ลายจุด	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส DB 8	ฟาแลน 3 ปลาคราฟ	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส DB 8	ผีเสื้อน้อย	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส MT 4	เข็มแดง	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส MT 9	เข็มแดง	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส UN 10	**เข็มแสด**	**ได้ต้นอ่อน**
แดงอุบล รหัส UN 10	ฟาแลน 2 ลายจุด	เมล็ดไม่พัฒนา
แดงอุบล รหัส UN 15	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	เมล็ดไม่พัฒนา
ม้าวิ่ง รหัส MDM 2	เข็มแดง	เมล็ดไม่พัฒนา
ม้าวิ่ง รหัส MDM 17	เข็มแดง	เมล็ดไม่พัฒนา
ม้าวิ่ง รหัส MDM 17	เข็มแสด	เมล็ดไม่พัฒนา
ม้าวิ่ง รหัส MDM 23	เข็มแดง	เมล็ดไม่พัฒนา
ม้าวิ่ง รหัส MVP 2	เข็มแดง	เมล็ดไม่พัฒนา

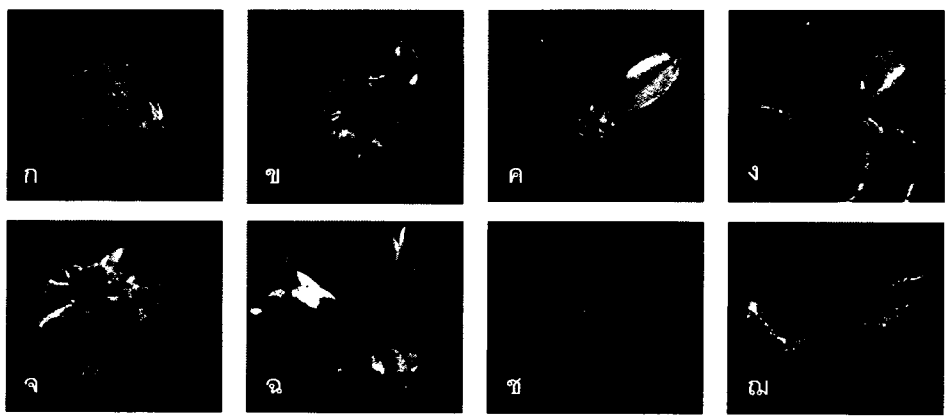
ต้นแม่ (ถือฝัก)	ต้นพ่อ (เกสร)	ผลที่ได้
ม้าวิ่ง รหัส MVP 2	ฟาแลน 2 ลายจุด	เมล็ดไม่พัฒนา
ม้าวิ่ง รหัส MVP 7	ฟาแลน 2 ลายจุด	เมล็ดไม่พัฒนา
ม้าวิ่ง รหัส MVP 39	เข็มแดง	เมล็ดไม่พัฒนา
ม้าวิ่ง รหัส MV 1	ฟาแลน 2 ลายจุด	เมล็ดไม่พัฒนา
ม้าวิ่ง รหัส MV 6	ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	เมล็ดไม่พัฒนา
ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	**แดงอุบล รหัส PA 11**	**ได้ต้นอ่อน**
ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	**แดงอุบล รหัส RE 4**	**ได้ต้นอ่อน**
ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	แดงอุบล รหัส CM 14	เมล็ดไม่พัฒนา
ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	**แดงอุบล รหัส PK 3**	**ได้ต้นอ่อน**
ฟาแลน 4 เวดดิ้ง	**แดงอุบล รหัส NK 14**	**ได้ต้นอ่อน**
ฟาแลน 2 ลายจุด	แดงอุบล รหัส NK 18	เมล็ดไม่พัฒนา

สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

4. การเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้จากชิ้นส่วนใบ

4.1 ทำการศึกษาความเข้มข้นของสาร Thidiazuron (TDZ) ที่เหมาะสมต่อการชักนำ PLBs

ผลการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนโคนใบและปลายใบของกล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบลบนสูตรอาหาร NDM ที่เติม TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0 - 10 มก./ล. เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า ปลายใบกล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบลไม่สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของเนื้อเยื่อ ส่วนของโคนใบกล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบลที่ได้รับสาร TDZ ความเข้มข้น 0 - 10 มก./ล. สามารถชักนำให้มีการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อต่างๆ ได้ เช่น PLBs ยอด และราก (ภาพที่ 5) สาร TDZ ความเข้มข้น 1 - 10 มก./ล. สามารถชักนำใบกล้วยไม้ม้าวิ่งให้เกิด PLBs ได้ 53.6 - 67.9 % และชักนำยอดหรือต้นใหม่จากชิ้นส่วนโคนใบได้ 7.1-21.4 % ส่วนโคนใบของกล้วยไม้แดงอุบลที่ได้รับสาร TDZ ความเข้มข้น 1 – 10 มก./ล. สามารถชักนำ PLBs ได้เพียงเล็กน้อย (7.1 %) แต่สามารถชักนำยอดใหม่ได้ 17.9 – 28.6 % (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 5 การพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อต่างๆ จากชิ้นส่วนโคนใบของกล้วยไม้ม้าวิ่ง (ก-ง) และกล้วยไม้แดงอุบล (จ-ฌ)

(ก, จ) การเกิด PLBs
(ข, ฉ) ยอดที่พัฒนาจาก PLBs
(ค, ช) การเกิดยอด
(ง) การเกิดยอดและราก
(ฌ) การเกิดราก

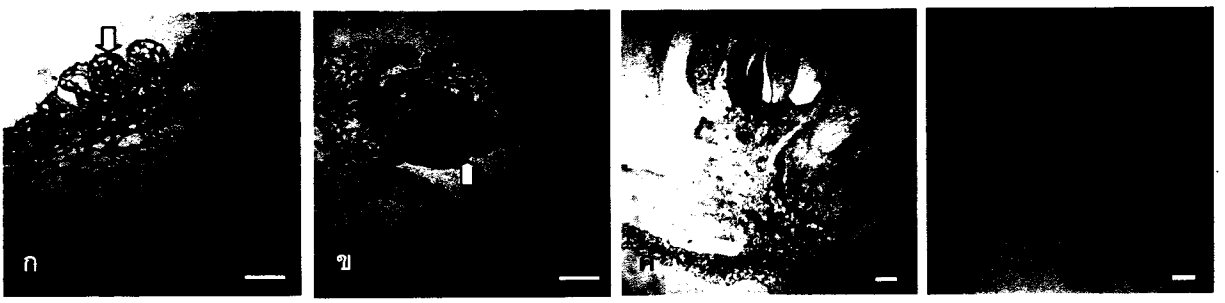
ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อต่างๆของชิ้นส่วนโคนใบกล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบล บนอาหาร NDM ที่เติมสาร Thidiazuron ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

TDZ	ชิ้นส่วนกล้วยไม้ม้าวิ่ง			ชิ้นส่วนกล้วยไม้แดงอุบล		
(มก/ล)	PLBs	ยอด	ราก	PLBs	ยอด	ราก
0	0 b	3.6	7.1	0	0 b	14.3 a
0.1	7.1 b	0	0	3.6	0 b	3.6 b
1	53.6 a	10.7	0	7.1	17.9 a	0 b
3	67.9 a	21.4	0	0	21.4 a	0 b
5	60.7 a	7.1	0	7.1	28.6 a	0 b
10	64.3 a	7.1	0	7.1	17.9 a	0 b
F-test	**	n.s.	n.s.	n.s.	**	**

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี DMRT
n.s. = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ
** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

4.2 การศึกษากายวิภาคการพัฒนาเนื้อเยื่อจากใบ

การศึกษาทางกายวิภาคเนื้อเยื่อที่มีการพัฒนาจากใบ พบเซลล์ชั้น epidermis บริเวณโคนใบเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอ (ภาพที่ 6 ก) โซมาติกเอ็มบริโอมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนและมีพัฒนาการ 3 รูปแบบ คือ PLBs ยอด และราก การพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอเป็น PLBs จะพบเห็นบริเวณที่เป็น meristematic cell หนาแน่นอยู่หลายบริเวณรอบๆ โซมาติกเอ็มบริโอ (ภาพที่ 6 ข) บริเวณที่มี meristematic cell หนาแน่นเหล่านี้สามารถพัฒนาเป็นส่วนยอด หลายยอด หรือเป็น PLBs เพิ่มจำนวนให้มากขึ้น



ภาพที่ 6 กายวิภาคของการเกิด PLBs และการเกิดต้นใหม่จากเนื้อเยื่อบริเวณฐานของโคนใบกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง
(ก) โซมาติกเอ็มบริโอ เกิดจากเซลล์ชั้น epidermis
(ข) การเกิด PLBs ที่ประกอบด้วย meristematic cell หนาแน่น
(ค) การพัฒนาเป็นยอดหลายยอด
(ง) การพัฒนาเป็นยอดและราก
สเกล = 10μm

การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง 2 ชนิด คือ กล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบล จากชิ้นส่วนใบอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ ประสบความสำเร็จเมื่อนำชิ้นส่วนใบโคนใบเลี้ยงในอาหารที่มีสาร TDZ ความเข้มข้น 1-10 มก./ล. ส่วนของโคนใบมีการพัฒนาของเนื้อเยื่อเป็น PLBs หรือยอดได้ดี จากการทดลองเห็นได้ว่า กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งทั้งสองชนิดคือ กล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบล มีศักยภาพในการเพิ่มปริมาณหรือขยายพันธุ์ได้แตกต่างกัน โดยกล้วยไม้ม้าวิ่งสามารถชักนำชิ้นส่วนใบให้เกิด PLBs ได้มาก (54 – 70 %) และเกิดยอดได้น้อย (7 – 21 %) (ตารางที่ 5) ซึ่ง PLBs เป็นโครงสร้างพิเศษของกล้วยไม้ที่สามารถขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนต่อไปได้อย่างรวดเร็ว ในส่วนของกล้วยไม้แดงอุบลสามารถชักนำชิ้นส่วนใบเกิด PLBs ได้เพียง 7 % แต่เกิดยอดได้สูงกว่า (18 – 29 %) โดยผลการเพาะเลี้ยงใบกล้วยไม้แดงอุบลครั้งนี้ ให้ผลสอดคล้องกับ Rungruchkanont (2009) ได้เลี้ยงใบอ่อนกล้วยไม้แดงอุบลในอาหารที่มีสาร NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ร่วมกับสาร BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. สามารถชักนำการเกิด PLBs 18 % และยอด 26 % ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิด PLBs น้อยเมื่อเทียบกับการเกิด PLBs ของกล้วยไม้ม้าวิ่ง จากศักยภาพของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีความสามารถในการขยายพันธุ์ได้ดีกว่ากล้วยไม้แดงอุบล อาจเป็นสาเหตุให้การกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติของกล้วยไม้ม้าวิ่งสามารถการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวางทั่วประเทศ ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลมีการกระจายพันธุ์เฉพาะถิ่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ความแตกต่างทางศักยภาพการเพิ่มปริมาณในกล้วยไม้ทั้งสองชนิดน่าจะมีสาเหตุมาจากจำนวนโครโมโซม กล้วยไม้ม้าวิ่งมีจำนวนโครโมโซม 2n = 38 ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลมีจำนวนโครโมโซม 2n = 76 จึงกล่าวได้ว่ากล้วยไม้แดงอุบลมีระดับพลอยดี (ploidy) มากกว่ากล้วยไม้ม้าวิ่ง ซึ่งเซลล์ที่มีระดับพลอยดีต่างกันจะมีความแตกต่างด้านการพัฒนา สัณฐาน และลักษณะทางสรีรวิทยา เซลล์ที่มีระดับพลอยดีมากจะมีขนาดใหญ่ เนื่องจากระดับพลอยดีควบคุมการแสดงออกของยีน โดยยีน *Cln1* และ *Pcl1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง G_1 cyclins ถูกยับยั้งเมื่อระดับพลอยดีเพิ่มขึ้น ในขั้นตอน cell cycle เซลล์จึงอยู่ในระยะ G_1 ต่อเนื่อง และมีผลทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ (Galitski et al., 1999) การศึกษากายวิภาคการพัฒนาเนื้อเยื่อจากใบพบว่า จุดเริ่มต้นของการพัฒนาเริ่มจากเซลล์ที่ชั้น epidermis มีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอมบริโอ (ภาพที่ 6) โซมาติกเอ็มบริโอมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนและมีพัฒนาการ 3 รูปแบบ คือ โปรโตคอร์ม ยอด และ ราก จากการศึกษาในใบกล้วยไม้หลายชนิด เช่น *Oncidium Phalaenopsis Doritanopsis* การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนา โดยมีการพัฒนาจากเซลล์ชั้น epidermis และโซมาติกเอ็มบริโอเป็นขั้นตอนเริ่มต้นของการเกิด PLBs (Chen et al., 1999; Park et al., 2002; Chen and Chang, 2001; Gow et al., 2009) ซึ่งเหมือนกับการพัฒนาของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง แต่แตกต่างที่ตำแหน่งของใบในการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ โดยกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเกิดเอ็มบริโอที่ตำแหน่งฐานโคนใบเท่านั้น ส่วนกล้วยไม้ 3 ชนิดข้างต้น สามารถเกิดเอ็มบริโอได้ทุกตำแหน่งของใบอ่อน

5. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกล้วยไม้ลูกผสมต่างสกุล

5.1 ผลของอายุฝักและอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของคัพภะลูกผสมข้ามกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

การพัฒนาของคัพภะลูกผสมภายใต้การศึกษาปัจจัย 2 ปัจจัย คือ อายุฝัก มี 4 ระยะ คือ 1, 1.5, 2, 2.5 เดือน และอาหารเพาะเลี้ยง 5 สูตร คือ 1. VW 2. VW + 2,4-D 100 มก/ล 3. VW + Dicamba 50 มก/ล 4. VW + Kinetin 1 มก/ล + NAA 0.1 มก/ล และ 5. VW + Peptone 2 ก/ล ผลการทดลองพบว่า อายุฝักมีผลต่อการพัฒนาของคัพภะ โดยเปรียบเทียบที่สูตร VW และสูตร VW + KN + NAA เมื่ออายุฝัก 1 เดือน มีการพัฒนา 62.5% และ 25% ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยจำนวนคัพภะที่พัฒนา 12 และ 19 คัพภะ ตามลำดับ อายุฝัก 1.5 เดือน มีการพัฒนา 33.3% และ 50% ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยจำนวนคัพภะที่พัฒนา 21.5 และ 56 คัพภะ ตามลำดับ อายุฝัก 2 เดือน มีการพัฒนา 100% และ 100% ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยจำนวนคัพภะที่พัฒนา 12 และ 61 คัพภะ ตามลำดับ อายุฝัก 2.5 เดือน มีการพัฒนา 25% และ 12.5% ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยจำนวนคัพภะที่พัฒนา 1.5 และ 1 คัพภะ

ตามลำดับ (ตารางที่ 6) จะเห็นได้ว่าฝักอายุ 2 เดือนมีความเหมาะสมที่จะนำมาเพาะเลี้ยงมากที่สุด เนื่องจากมีการพัฒนา 100% และมีค่าเฉลี่ยจำนวนคัพภะมากถึง 61 คัพภะ เมื่อฝักมีอายุมากขึ้นถึง 2.5 เดือน มีผลทำให้การพัฒนาและจำนวนคัพภะมีค่าลดลงมาก

ในส่วนของสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงคัพภะลูกผสม พบว่า สูตร VW + KN + NAA เป็นสูตรที่เหมาะสมที่สุด คือ มีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาสูงและมีจำนวนคัพภะที่พัฒนามากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทุกสูตรอาหาร (ตารางที่ 6 และภาพที่ 7)

ตารางที่ 6 การพัฒนาของคัพภะลูกผสมกล้วยไม้ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x กล้วยไม้แดงอุบล จากฝักอ่อนที่มีอายุ 1-2.5 เดือน และเพาะบนอาหารสูตรต่างๆเป็นระยะเวลา 2 เดือน

อายุฝัก (เดือน)	อาหาร	จำนวนซ้ำ	จำนวนซ้ำที่มีการพัฒนา	% ที่มีการพัฒนา	จำนวนคัพภะที่พัฒนา*
1	VW	8	5	62.5	12±13.6
	VW+ 2,4-D	8	0	0	0
	VW + Dicamba	8	0	0	0
	VW + KN + NAA	8	2	25	19±9.9
	VW + Peptone	8	1	12.5	3
1.5	VW	6	2	33.3	21.5±16.2
	VW+ 2,4-D	6	2	33.3	1.5±0.7
	VW + Dicamba	6	0	0	0
	VW + KN + NAA	6	3	50	56±55.2
	VW + Peptone	6	1	16.7	8
2	VW	8	8	100	12±10.4
	VW+ 2,4-D	8	0	0	0
	VW + Dicamba	8	3	37.5	1.9±3.2
	VW + KN + NAA	8	8	100	61.1±82.6
	VW + Peptone	8	4	50	13.8±22.2
2.5	VW	8	2	25	1.5±0.7
	VW+ 2,4-D	8	0	0	0
	VW + Dicamba	8	1	12.5	2
	VW + KN + NAA	8	1	12.5	1
	VW + Peptone	8	1	12.5	1

* ค่าเฉลี่ย ± SE

ภาพที่ 7 การพัฒนาของคัพภะลูกผสมจากฝักอายุ 2 เดือน บนอาหารสูตรต่างๆ หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

จากการวิจัยของ กาญจนา (2553) ที่ได้ศึกษาผลของออกซินต่อการติดฝักและช่วยชีวิตลูกผสมข้ามกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ทำให้ทราบว่า การให้สารออกซิน คือ 2, 4-D ความเข้มข้น 100 มก./ล. ลงในแอ่งเกสรเพศเมียของกล้วยไม้ฟาแลนอปซิสหลังจากการผสมด้วยเกสรกล้วยไม้แดงอุบล มีผลทำให้การติดฝักดีขึ้น และสามารถช่วยชีวิตคัพภะลูกผสมได้สำเร็จ แต่ยังมีจำนวนคัพภะที่รอดชีวิตน้อย จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของอายุฝักและอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ซึ่งผลการทดลอง พบว่า ฝักลูกผสมที่มีอายุ 2 เดือน เป็นระยะที่ควรนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อช่วยชีวิตคัพภะ ทั้งนี้น่าจะเป็นเพราะระยะเวลาดังกล่าวการพัฒนาของแกมีโทไฟต์เพศเมียสมบูรณ์แล้ว และเกิดการปฏิสนธิขึ้น Zhang และ O'Neill (1993) รายงานว่า กล้วยไม้ฟาแลนอปซิสที่ได้ทำการผสมตัวเอง จะมีการพัฒนาของแกมีโทไฟต์เพศเมียจนถึงระยะสมบูรณ์ และเกิดการปฏิสนธิขึ้นต้องใช้ระยะเวลา 84 วัน แต่การวิจัยครั้งนี้ใช้ระยะเวลาเพียง 60 วัน ซึ่งเร็วกว่ารายงานของ Zhang และ O'Neill อาจจะมีสาเหตุเนื่องจากผลของการให้สารออกซินจากภายนอกหลังทำการผสมเกสรร่วมด้วย โดย Kovaleva และคณะ (2005) รายงานว่า การให้สาร IAA และ GA3 ส่งเสริมการเจริญเติบโตของหลอดเรณู แต่การให้สารในกลุ่มไซโตไคนินส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของหลอดเรณู ดังนั้นหลอดเรณูของกล้วยไม้แดงอุบลจึงเจริญเติบโตเร็วและทำให้การปฏิสนธิเกิดได้เร็วขึ้น จึงใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมเพียง 2 เดือน ซึ่งถ้าเปรียบเทียบฝักลูกผสมอายุ 2.5 เดือน (75 วัน) ที่มีอายุใกล้เคียง 84 วัน ในการทดลองของ Zhang และ O'Neill จะพบว่ามีจำนวนคัพภะที่พัฒนาในทุกสูตรอาหารเพียง 1-2 คัพภะเท่านั้น จึงเป็นอายุฝักที่ไม่เหมาะสม ในด้านอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับลูกผสมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง คือ สูตร VW + 1 มก./ล. Kinetin + 0.1 มก./ล. NAA ซึ่งสูตรอาหารนี้สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเมล็ดของลูกผสมกล้วยไม้ Bratonia (Popova และคณะ, 2003) และการใส่สาร Kinetin ความเข้มข้น 2.3 μM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 μM มีความเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ลูกผสม *Ascocenda* 'Kangla' (Kishor และคณะ, 2006) จากการวิจัยยังพบว่าสาร 2, 4-D ที่มีความเหมาะสมที่จะให้แก่ดอกกล้วยไม้หลังจากการผสมเกสร ส่งผลทำให้การติดผลดีขึ้นและยังช่วยชีวิตลูกผสมได้ แต่ไม่เหมาะสมในการนำมาใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงลูกผสมกล้วยไม้ ซึ่งต่างจากการผลิตลูกผสมข้ามระหว่าง durum wheat x maize ที่พบว่าการใส่สาร 2, 4-D และ Dicamba ในอาหารเพาะเลี้ยงจะส่งเสริมการพัฒนาของลูกผสม (Knox และคณะ, 2000; García-llamas และคณะ, 2004)

6. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส x แดงอุบล ในอาหารสูตรสังเคราะห์ 2 สูตร คือ VW และ ½MS พบว่า ในระยะ 3 เดือนแรก การเจริญเติบโตของต้นอ่อนในอาหารสูตร VW และ ½MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ ไม่แตกต่างกันมาก โดยมีจำนวนใบ 3 ใบ มีจำนวนราก 4-5 ราก ขนาดของใบมีแนวโน้มเล็กลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร ½MS ที่เติมสาร BAP และความยาวรากมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร VW ที่เติมสาร BAP ร่วมกับ NAA (ตารางที่ 7 และ 8) เมื่อเปลี่ยนอาหารสูตรเดิมให้แก่ลูกกล้วยไม้และเพาะเลี้ยงต่ออีก 2 เดือน รวมเป็นระยะเวลา 5 เดือน พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการพัฒนาต้นอ่อนของกล้วยไม้ลูกผสม คือ สูตรที่มีสาร BAP ความเข้มข้น 0.5 -1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ขนาดใบเล็กลงทั้งทางด้านความกว้างและความยาวของใบ และความยาวรากลดลง (ตารางที่ 9, 10 และ ภาพที่ 8) จากการทดลองครั้งนี้ทำให้ทราบว่าสูตรอาหาร VW และ ½MS สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส x แดงอุบล และไม่ต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตให้ขนาดความกว้างและความยาวใบมากที่สุด และมีจำนวนรากและความยาวรากใกล้เคียงกับสูตรที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากโดยเฉลี่ยจำนวนมากที่สุด 6.80 รากต่อต้น (ตารางที่ 9) และต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากโดยเฉลี่ยจำนวนมากที่สุด 8.20 รากต่อต้น (ตารางที่ 10) การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนใบในกล้วยไม้ลูกผสม เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบชนิดของสูตรอาหารทั้ง 2 สูตร พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำให้ต้นกล้วยไม้มีขนาดความกว้างและความยาวของใบมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร VW แต่ความยาวของรากในอาหารสูตร VW มีมากกว่าความยาวรากในอาหารสูตร ½ MS ส่วนจำนวนใบและจำนวนรากในอาหารทั้ง 2 สูตรให้ผลไม่แตกต่างกัน โดยมีจำนวนใบเฉลี่ย 3.5 ใบ และจำนวนราก 6.5-6.8 ราก (ตารางที่ 11) ซึ่งผลการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนลูกผสมกล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส x แดงอุบล สอดคล้องกับ Kishor และคณะ (2006) ที่ได้เพาะเลี้ยงกล้วยไม้ลูกผสม *Ascocenda* 'Kangla' และ Kishor และ Sharma (2009) ที่ได้เพาะเลี้ยงกล้วยไม้ลูกผสมระหว่าง *Renanthera imschootiana* X *Vanda coerulea* การให้สาร BAP ความเข้มข้น 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ขนาดของใบเล็กลง และความยาวรากลดลง ทางด้านสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมก็ให้ผลสอดคล้องกันโดยสูตร ½ MS มีผลทำให้ขนาดใบและรากของต้นอ่อนใหญ่กว่าการเพาะเลี้ยงในสูตร VW เหตุผลเนื่องจากสูตร ½ MS เป็นสูตรอาหารที่มีธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองในปริมาณมาก ซึ่งเหมาะสมสำหรับกล้วยไม้ลูกผสมที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับกล้วยไม้สายพันธุ์แท้ที่มีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า

ตารางที่ 7 การเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 เดือน

สารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนใบต่อต้น	ความกว้างใบ (ซม.)	ความยาวใบ (ซม.)	จำนวนรากต่อต้น	ความยาวราก (ซม.)
T1 ไม่เติมสาร	3.00	1.28 a	1.73 a	5.70 a	2.53 ab
T2 Kinetin 0.5 mg/L	3.25	1.15 abc	1.56 abcd	5.25 abc	2.65 a
T3 Kinetin 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L	3.11	1.15 abc	1.48 cd	4.78 bc	2.47 ab
T4 Kinetin 1.0 mg/L	3.30	1.26 ab	1.71 ab	5.20 abc	2.81 a
T5 Kinetin 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L	3.11	1.18 abc	1.59 abcd	4.67 c	2.76 a
T6 BAP 0.5 mg/L	3.33	1.22 abc	1.67 abc	4.44 c	2.16 bc
T7 BAP 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L	3.00	1.11 c	1.40 d	4.40 c	2.15 bc
T8 BAP 1.0 mg/L	3.30	1.13 bc	1.49 cd	4.70 bc	1.86 c
T9 BAP 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L	3.22	1.09 c	1.51 bcd	4.44 c	1.80 c
T10 NAA 0.1 mg/L	3.40	1.18 abc	1.64 abc	5.60 ab	1.96 c

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 8 การเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 เดือน

สารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนใบต่อต้น	ความกว้างใบ (ซม.)	ความยาวใบ (ซม.)	จำนวนรากต่อต้น	ความยาวราก (ซม.)
T1 ไม่เติมสาร	3.20	1.48 a	2.19 a	5.40 abc	2.21 ab
T2 Kinetin 0.5 mg/L	3.40	1.46 ab	1.98 ab	5.30 abcd	2.33 ab
T3 Kinetin 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L	3.10	1.33 bcd	1.93 b	5.80 ab	2.29 ab
T4 Kinetin 1.0 mg/L	3.44	1.38 abc	1.94 b	5.33 abcd	2.56 a
T5 Kinetin 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L	3.40	1.25 cde	1.70 c	4.90 bcd	2.56 a
T6 BAP 0.5 mg/L	3.50	1.20 de	1.62 c	4.50 cd	2.40 ab
T7 BAP 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L	3.20	1.16 e	1.50 c	4.40 d	2.01 b
T8 BAP 1.0 mg/L	3.30	1.16 e	1.64 c	4.89 cd	2.05 b
T9 BAP 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L	3.20	1.20 de	1.71 c	4.50 cd	2.25 ab
T10 NAA 0.1 mg/L	3.20	1.49 a	2.10 ab	6.10 a	2.25 ab

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 9 การเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 5 เดือน

สารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนใบต่อต้น	ความกว้างใบ (ซม.)	ความยาวใบ (ซม.)	จำนวนรากต่อต้น	ความยาวราก (ซม.)
T1 ไม่เติมสาร	3.50 abc	1.57 a	2.20 a	6.50 ab	3.20 ab
T2 Kinetin 0.5 mg/L	3.38 abc	1.38 b	2.01 ab	6.25 abc	2.95 abc
T3 Kinetin 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L	3.11 c	1.36 b	1.79 bcd	6.44 ab	3.02 ab
T4 Kinetin 1.0 mg/L	3.80 a	1.33 b	1.89 bc	5.90 abc	3.06 ab
T5 Kinetin 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L	3.33 abc	1.33 b	1.71 cde	5.89 abc	3.32 a
T6 BAP 0.5 mg/L	3.67 abc	1.29 b	1.70 cde	5.22 bc	2.39 cd
T7 BAP 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L	3.20 bc	1.13 c	1.43 f	5.10 c	2.40 cd
T8 BAP 1.0 mg/L	3.60 abc	1.14 c	1.61 def	5.80 abc	1.90 de
T9 BAP 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L	3.33 abc	1.09 c	1.51 ef	5.67 abc	1.76 e
T10 NAA 0.1 mg/L	3.70 ab	1.34 b	1.89 bc	6.80 a	2.67 bc

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 10 การเจริญและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 5 เดือน

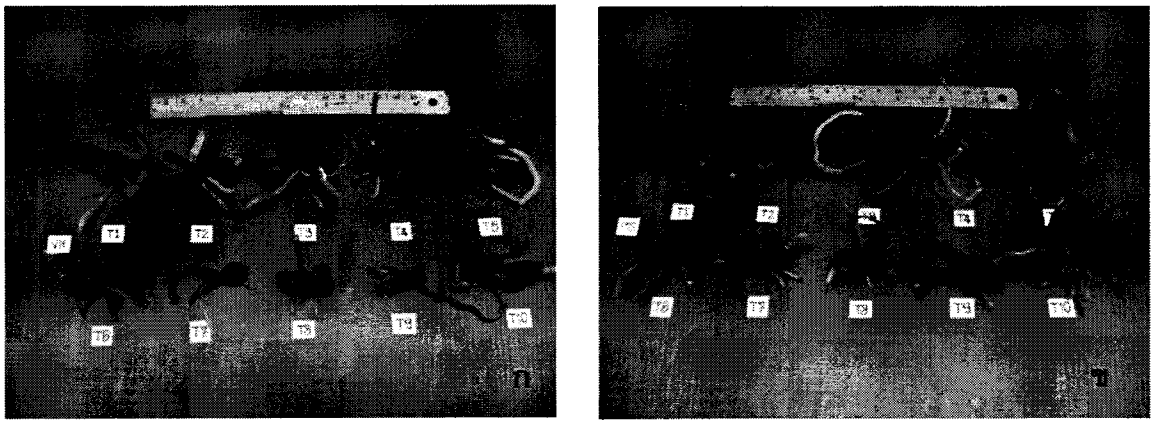
สารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนใบต่อต้น	ความกว้างใบ (ซม.)	ความยาวใบ (ซม.)	จำนวนรากต่อต้น	ความยาวราก (ซม.)
T1 ไม่เติมสาร	3.50	1.71 a	2.72 a	6.80 bc	2.42 c
T2 Kinetin 0.5 mg/L	3.70	1.55 b	2.50 ab	6.50 bc	2.58 bc
T3 Kinetin 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L	3.40	1.46 bc	2.09 cd	7.00 b	2.70 bc
T4 Kinetin 1.0 mg/L	3.56	1.48 bc	2.22 bc	6.11 bc	3.09 ab
T5 Kinetin 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L	3.50	1.36 cd	1.85 de	6.00 bc	3.33 a
T6 BAP 0.5 mg/L	3.60	1.25 de	1.89 de	6.20 bc	2.31 c
T7 BAP 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L	3.20	1.22 e	1.75 e	5.70 c	2.38 c
T8 BAP 1.0 mg/L	3.60	1.21 e	1.80 de	6.20 bc	2.21 c
T9 BAP 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L	3.30	1.28 de	1.93 cde	6.30 bc	2.22 c
T10 NAA 0.1 mg/L	3.50	1.58 b	2.49 ab	8.20 a	2.73 bc

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW และสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 5 เดือน

สูตรอาหาร	จำนวนใบต่อต้น	ความกว้างใบ (ซม.)	ความยาวใบ (ซม.)	จำนวนรากต่อต้น	ความยาวราก (ซม.)
VW	3.50	1.57 b	2.20 b	6.50	3.20 a
½ MS	3.50	1.71 a	2.72 a	6.80	2.42 b

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี LSD



ภาพที่ 8 การเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมในอาหารสูตร Vacin and Went (ก) และสูตร ½ MS (ข) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลานาน 5 เดือน
T1 ไม่เติมสาร, T2 Kinetin 0.5 mg/L, T3 Kinetin 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L, T4 Kinetin 1.0 mg/L, T5 Kinetin 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L, T6 BAP 0.5 mg/L, T7 BAP 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L, T8 BAP 1.0 mg/L, T9 BAP 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L, T10 NAA 0.1 mg/L

7. การศึกษาวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของลูกกล้วยไม้ในสภาพโรงเรือน

ผลการทดลองพบว่า ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล ที่ปลูกในสแฟกนัมมอส ต้นมีความสูงมากที่สุด 2.5 ซม. ซึ่งมากกว่าการปลูกในถ่าน+มอส ถ่าน และกาบมะพร้าว ที่มีความสูงต้น 2.0 1.7 และ 1.6 ซม. ตามลำดับ ทางด้านจำนวนใบ ลูกผสมที่ปลูกในสแฟกนัมมอส และถ่าน+มอส มีจำนวนใบ 5.3 และ 5.2 ใบ ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างทางสถิติจากการปลูกในถ่านที่มีจำนวนใบ 4.4 ใบ แต่แตกต่างทางสถิติจากการปลูกในกาบมะพร้าวที่มีจำนวนใบเพียง 3.3 ใบ ทางด้านความยาวของใบ ลูกผสมที่ปลูกในสแฟกนัมมอส ถ่าน+มอส และถ่าน มีความยาวใบไม่แตกต่างกันโดยมีค่า 4.8 4.6 และ 4.4 ซม. ตามลำดับ แต่ลูกผสมที่ปลูกในกาบมะพร้าวมีความยาวใบน้อยที่สุดเพียง 3.2 ซม. ทางด้านความกว้างของใบ ลูกผสมที่ปลูกในสแฟกนัมมอสมีความกว้างใบมากที่สุด 2.0 ซม. และมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับลูกผสมที่ปลูกในถ่าน+มอส ถ่าน และกาบมะพร้าว ที่มีค่าความกว้างใบ 1.7 1.6 และ 1.5 ซม. ตามลำดับ จำนวนรากของลูกผสมที่ปลูกในถ่าน+มอส ถ่าน สแฟกมันมอส และกาบมะพร้าว มีค่า 13.3 11.2 10.9 และ 9.2 ราก ตามลำดับ โดยรากลูกผสมที่ปลูกในถ่าน+มอส มากกว่ารากลูกผสมที่ปลูกในกาบมะพร้าว ส่วนความยาวราก ลูกผสมที่ปลูกในถ่าน+มอส และ ถ่าน มีค่ายาวที่สุด 12.7 และ 11.4 ซม. ตามลำดับ ซึ่งยาวกว่ารากลูกผสมที่ปลูกในกาบมะพร้าว และสแฟกนัมมอส ที่มีค่า 9.1 และ 8.9 ซม. ตามลำดับ ซึ่งรากที่อยู่ในสแฟกนัมมอส และกาบมะพร้าวมีลักษณะรากฝอ หรือด้านปลายรากฝอตัว (ตารางที่ 12 และภาพที่ 9) การปลูกลูกผสมในสแฟกมัสมอสมีผลทำให้การเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและใบดี แต่เมื่อปลูกเป็นระยะเวลานานระบบรากเจริญเติบโตด้อยกว่าการปลูกด้วยถ่าน+มอส หรือ ถ่าน ดังนั้นการใช้ถ่าน+มอส (ปลูกด้วยถ่านปิดทับด้วยสแฟกนัมมอส) จึงเหมาะสมที่จะเป็นวัสดุปลูกสำหรับปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล เมื่อพิจารณาถึงลักษณะการเจริญเติบโตของพ่อแม่พันธุ์ ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง และ แดงอุบล เป็นกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตทางยอด มีลำต้นเดี่ยว มีระบบรากเป็นรากอากาศ ดังนั้นจึงชอบวัสดุปลูกที่มีการระบายน้ำและระบายอากาศได้ดี แต่สามารถเก็บ

รักษาความชื้นได้ ดังนั้นวัสดุปลูกที่เป็นถ่านจึงทำให้รากของกล้วยไม้ลูกผสมมีความยาวรากมากกว่าการปลูกในกาบมะพร้าวและสแฟกนัมมอส และยังมีผลทำให้รากเขียวสมบูรณ์ ไม่มีอาการปลายรากฝ่อดังเช่นที่ปลูกในกาบมะพร้าวและสแฟกนัมมอส กาบมะพร้าวเป็นวัสดุปลูกที่อุ้มน้ำมาก มีการระบายน้ำได้ช้า จึงเป็นที่นิยมใช้ในการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สกุลหวาย ซึ่งมีระบบรากเป็นรากกึ่งอากาศชอบความชื้นสูง เมื่อนำมาใช้ปลูกกล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล จึงทำให้การเจริญเติบโตทางด้านลำต้น ใบ และรากน้อยกว่าวัสดุอื่นๆ ส่วนของสแฟกนัมมอสเป็นวัสดุปลูกที่อุ้มน้ำไว้รอบตัวมอส ไม่ดูดซึมเข้าไปในตัวมอส จึงสามารถรักษาความชื้นได้ดีในปริมาณที่เหมาะสม (กาญจนา, 2555) จะเห็นได้ว่าลูกกล้วยไม้มีการเจริญเติบโตทางด้านความสูงมากกว่าวัสดุปลูกอื่นๆ และมีขนาดของใบที่ใหญ่ แต่เมื่อปลูกเลี้ยงเป็นระยะเวลานานถึง 1 ปี สแฟกนัมมอสจึงเริ่มเสื่อมสภาพ อุ้มน้ำมากและมีผลทำให้ส่วนของปลายรากฝ่อเช่นเดียวกันกับการใช้วัสดุปลูกกาบมะพร้าว เมื่อนำลูกกล้วยไม้ปลูกในวัสดุปลูกที่เป็นถ่านและปิดทับด้วยสแฟกนัมมอส จึงมีผลทำให้ลูกกล้วยไม้มีการเจริญเติบโตที่ดีทั้งส่วนลำต้น ใบ และราก ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Kishor และคณะ (2006) ที่ใช้วัสดุปลูก อิฐ:ถ่าน (2:1) ปิดทับด้วยสแฟกนัมมอส ทำให้ลูกกล้วยไม้ลูกผสม *Ascocenda* 'Kangla' มีการเจริญเติบโตดีกว่าการใช้วัสดุปลูก อิฐ:ถ่าน:รากเฟิร์น (2:1:1) แต่ไม่สอดคล้องกับ Kishor และ Sharma (2009) ที่รายงานว่าการใช้วัสดุปลูก อิฐ:ถ่าน (2:1) ทำให้ลูกกล้วยไม้ลูกผสม *Renanthera imschootiana* x *Vanda coerulea* มีการเจริญเติบโตดีกว่าการใช้วัสดุปลูก อิฐ:ถ่าน (2:1) ปิดทับด้วยสแฟกนัมมอส

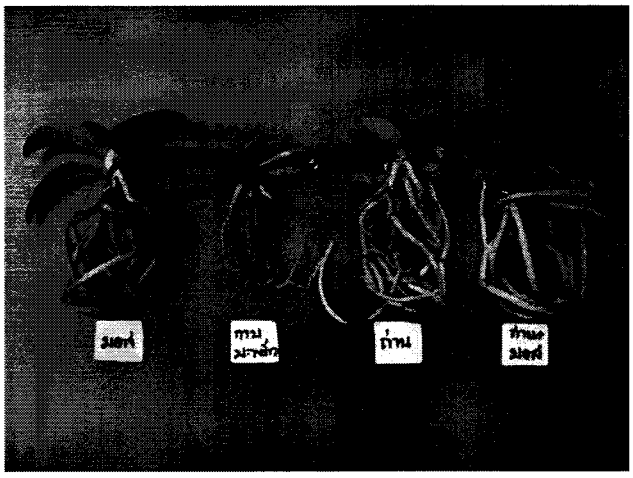
ตารางที่ 12 การเจริญเติบโตของลูกกล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล ที่ปลูกเลี้ยงในวัสดุปลูก 4 แบบ

วัสดุปลูก	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
สแฟกมัสมอส	2.5 ± 0.7 a	5.3 ± 2.7 a	4.8 ± 1.4 a	2.0 ± 0.4 a	10.9 ± 4.2 ab	8.9 ± 2.6 b
กาบมะพร้าว	1.6 ± 0.5 c	3.3 ± 2.3 b	3.2 ± 1.5 b	1.5 ± 0.6 b	9.2 ± 3.6 b	9.1 ± 2.9 b
ถ่าน	1.7± 0.4 bc	4.4 ± 1.7 ab	4.4 ± 0.7 a	1.6 ± 0.3 b	11.2 ± 3.6 ab	11.4 ± 3.1 a
ถ่าน+มอส	2.0 ± 0.4 b	5.2 ± 2.4 a	4.6 ± 1.3 a	1.7 ± 0.4 ab	13.3 ± 5.1 a	12.7 ± 4.3 a
F-test	**	*	**	**	*	**

* แตกต่างทางสถิติด้วยระดับความเชื่อมั่น 95%

** แตกต่างทางสถิติด้วยระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ย±SE ในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี LSD



ภาพที่ 9 ลักษณะต้น ใบ และราก ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล ที่ปลูกเลี้ยงในวัสดุปลูก 4 แบบ คือ สแฟกนัมมอส กาบมะพร้าว ถ่าน และถ่านปิดทับหน้าด้วยสแฟกนัมมอส

8. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของกล้วยไม้ลูกผสม

การสร้างกล้วยไม้ลูกผสมสกุลม้าวิ่งในการวิจัยนี้ ได้ทำการผสมระหว่างสกุลม้าวิ่งและสกุลฟาแลนอปซิส และระหว่างสกุลม้าวิ่งและสกุลเข็ม ได้ผลผลิต 4 คู่ผสม คือ

1. แดงอุบล x เข็มแสด
2. แดงอุบล x เข็มแดง
3. แดงอุบล x ฟาแลนอปซิส ขาวปากแดง
4. ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล

โดยลูกผสม 3 คู่ผสม คือ แดงอุบล x เข็มแสด, แดงอุบล x เข็มแดง และแดงอุบล x ฟาแลนอปซิส ขาวปากแดง ได้ลูกผสมที่มีลักษณะรูปร่างใบ สีของใบ และขนาดของใบ เป็นรูปแบบเดียวกันในแต่ละลูกผสม (ตารางที่ 13 และรูปที่ 10) คือ ลูกผสมแดงอุบล x เข็มแสด มีใบลักษณะรูปแถบ ขนาด 1.8 x 7.3 ซม. สี yellow-green 146 A ตามแผ่นเทียบสีมาตรฐานของ The Royal Horticultural Society ผิวใบเรียบ มีจุดประเล็กๆ สีน้ำตาล ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม โคนใบหุ้มลำต้น ใบเรียงสลับระนาบเดียวกัน ลูกผสมแดงอุบล x เข็มแดง มีใบลักษณะรูปแถบ ขนาด 2.2 x 8.0 ซม. สี yellow-green 146 A ผิวใบเรียบ มีจุดประเล็กๆ สีน้ำตาล ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม โคนใบหุ้มลำต้น ใบเรียงสลับระนาบเดียวกัน ลูกผสมแดงอุบล x ฟาแลนอปซิส ขาวปากแดง มีใบรูปรี ขนาด 3.7 x 9.8 ซม. สี yellow-green 146 A ผิวใบเรียบ ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม โคนใบหุ้มลำต้น ใบเรียงสลับระนาบเดียวกัน

ในส่วนของลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล ในคู่ผสมนี้มีการผสมด้วยแดงอุบล 2 รหัส คือ ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส PK 3 และ ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ลูกผสมคู่นี้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะทางสัณฐานของต้นที่แตกต่างกัน คือ ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส PK 3 ได้ต้น 2 ลักษณะ ดังนี้ 1) ลูกผสมมีใบรูปรี ขนาด 3.7 x 12.1 ซม. สี yellow-green 146 C ผิวใบเรียบ ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม โคนใบหุ้มลำต้น ใบเรียงสลับระนาบเดียวกัน และ 2) ลูกผสมมีใบรูปรี ขนาด 3.5 x 8.4 ซม. สี greyed-orange 136 A ผิวใบเรียบ ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม โคนใบหุ้มลำต้น ใบเรียงสลับระนาบเดียวกัน ซึ่งลูกผสมรหัสนี้มีความแตกต่างทางด้านสีของใบและความยาวใบ

ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ลูกผสมรหัสนี้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะทางสัณฐานของต้นที่แตกต่างกัน 4 ลักษณะดังนี้ 1) ลูกผสมมีใบรูปไข่กลับ ขนาด 6.1 x 11.1 ซม. สี green 137 C ผิวใบเรียบ ขอบใบเรียบ ปลายใบมน, ป้าน หรือ เว้า, บุ๋มเล็กน้อย โคนใบหุ้มลำต้น ใบเรียงสลับระนาบเดียวกัน 2) ลูกผสมมีใบรูปแถบ ขนาด 1.9 x 11.2 ซม. สี grey-brown N 199 A ผิวใบเรียบ ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม โคนใบหุ้มลำต้น ใบเรียงสลับระนาบเดียวกัน 3) ลูกผสมมีใบรูปรี ขนาด 3.1 x 11.4 ซม. สี grey-brown N 199 A ผิวใบเรียบมีจุดประเล็กๆ สีน้ำตาล ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม โคนใบหุ้มลำต้น ใบเรียงสลับระนาบเดียวกัน และ 4) ลูกผสมมีใบรูปรี ขนาด 3.4 x 8.7 ซม. สี greyed-purple 183 A ผิวใบเรียบมีจุดประเล็กๆ สีน้ำตาลแดง ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม โคนใบหุ้มลำต้น ใบเรียงสลับระนาบเดียวกัน ซึ่งลูกผสมรหัสนี้มีความแตกต่างทางด้านขนาด รูปร่างใบ สีของใบและความยาวใบ

เมื่อศึกษาการเจริญเติบโต ความทนทานต่อโรคและแมลง และฤดูออกดอกของกล้วยไม้ลูกผสมทั้งหมด (ตารางที่ 14) พบว่า กล้วยไม้ลูกผสมส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตช้า-ปานกลาง ยกเว้นฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ที่มีลักษณะใบรูปไข่กลับ มีการเจริญเติบโตเร็วและสามารถออกดอกได้ก่อนรหัสอื่นๆ ลักษณะความทนทานต่อโรคและแมลงของลูกผสมเมื่อทำการปลูกเลี้ยงอนุบาลในสภาพโรงเรือนที่มีหลังคาพลาสติกคลุมกันฝน พบว่า ลูกผสมแดงอุบล รหัส UN 10 x เข็มแสด และลูกผสมแดงอุบล รหัส NK 13 x ฟาแลนอปซิส ขาวปากแดง มีความทนทานต่อโรคและแมลงระดับน้อย โดยอ่อนแอต่อโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา ลูกผสมแดงอุบล รหัส NK 4 x เข็มแดง ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส PK 3 ที่มีลักษณะใบรูปรี สี greyed-orange ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ที่มีลักษณะใบรูปแถบ และลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ที่มีลักษณะใบรูปรี สี greyed-purple มีความทนทานต่อโรคและแมลงระดับปานกลาง โดยพบอาการของโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อราบ้างเมื่อสภาพอากาศมีความชื้นสูงในช่วงฤดูฝน ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส PK 3 ที่มีลักษณะใบรูปรี สี yellow-green ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ที่มีลักษณะใบรูปไข่กลับ และลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ที่มีลักษณะใบรูปรี สี grey-brown มีความทนทานต่อโรคและแมลงระดับมาก

จากการศึกษาการออกดอก มีลูกผสม 4 รหัสที่ปลูกเลี้ยงและออกดอก (ตารางที่ 13) คือ ลูกผสมแดงอุบล รหัส NK 4 x เข็มแดง ออกดอกช่วงเดือนมิถุนายน – กรกฎาคม ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส PK 3 ที่มีลักษณะใบรูปรี สี yellow-green ออกดอกช่วงเดือนมิถุนายน – กรกฎาคม ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ที่มีลักษณะใบรูปไข่กลับ ออกดอกได้ตลอดปี และลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ที่มีลักษณะใบรูปรี สี grey-brown ออกดอกช่วงเดือนมิถุนายน – กรกฎาคม มีลูกผสมบางรหัสที่ยังไม่ออกดอกซึ่งจะต้องปลูกเลี้ยงต่อไปให้ต้นมีความสมบูรณ์จนถึงระยะออกดอก

การศึกษาลักษณะช่อดอกและดอกของกล้วยไม้ลูกผสม จากกล้วยไม้ลูกผสมที่มีการออกดอก 4 รหัส ได้ลักษณะและความยาวของช่อดอก จำนวนดอก ขนาดดอก สีดอก และอายุการบานทั้งช่อ ดังแสดงในตารางที่ 15

ลูกผสมแดงอุบล รหัส NK 4 x เข็มแดง มีช่อดอกขนาดสั้นมีดอกดก โดยมีความยาวช่อทั้งหมด 23-25 ซม. ช่วงที่มีดอกยาว 12-13 ซม. มีจำนวนดอก 28-30 ดอก ลักษณะช่อดอกเป็นช่อกระจะ ตั้งตรง ดอกมีขนาดเล็ก กว้าง 2.6-3.0 ซม. สูง 2.2-2.7 ซม. สีม่วง Purple-violet N81A กลีบปากส่วนฐานสีส้ม

orange 24A ส่วนกลางปากสีส้มและมีลายทางยาวสีม่วงแดง Red-purple 64A (ภาพที่ 11) ช่อดอกมีอายุการบาน 40 วัน

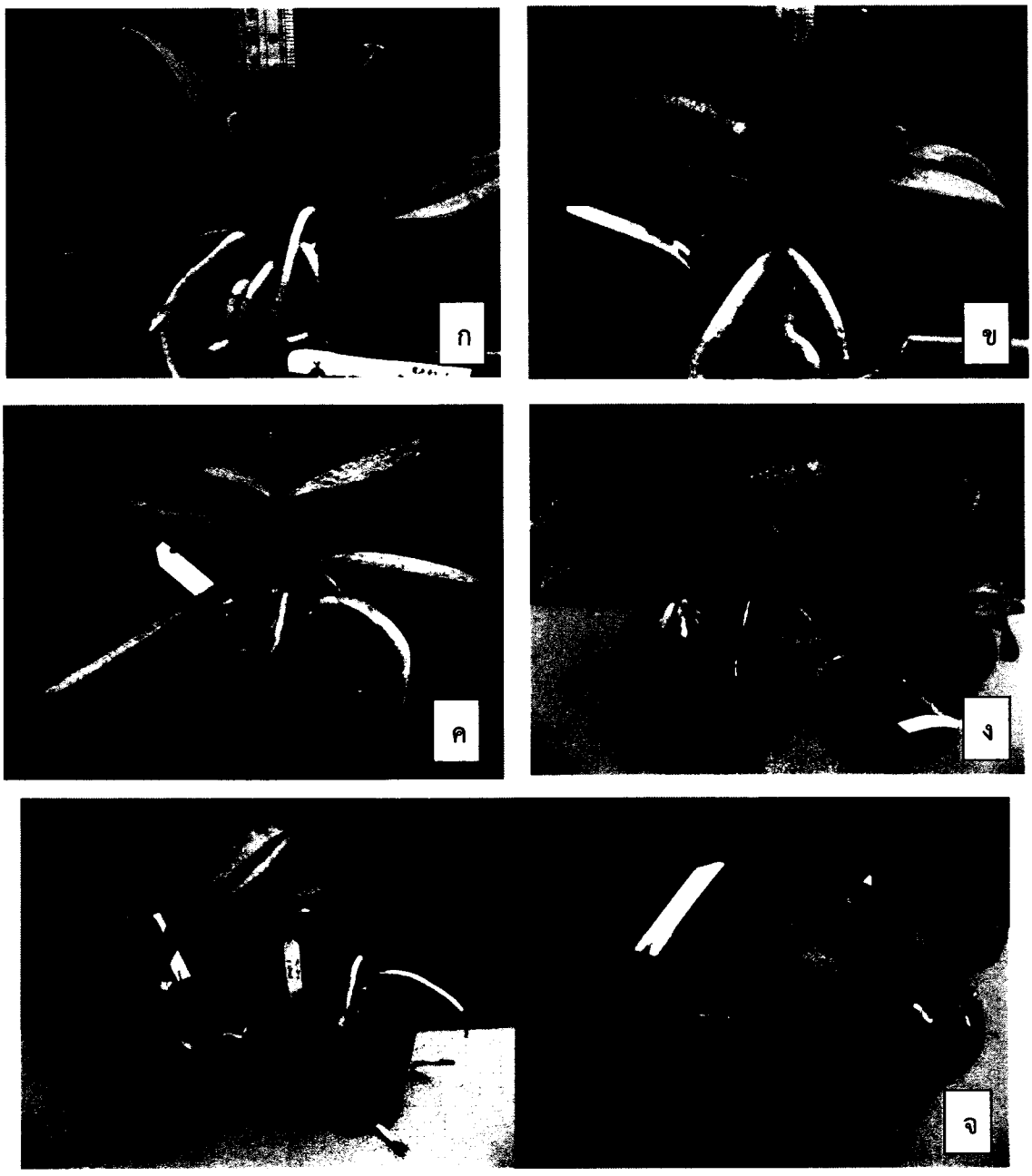
ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ใบรูปไข่กลับ มีช่อดอกยาวปานกลาง โดยมีความยาวช่อทั้งหมด 26-45 ซม. ช่วงที่มีดอกยาว 6-15 ซม. มีจำนวนดอก 6-8 ดอก ลักษณะช่อดอกเป็นช่อกระจะ ปลายช่อโค้ง ดอกมีขนาดใหญ่ กว้าง 5.0-5.5 ซม. สูง 4.5-5.0 ซม. สีม่วง Purple-violet N80B กลีบปากส่วนข้างและส่วนกลางปากสีม่วงเข้ม Purple N78A (ภาพที่ 12) ช่อดอกมีอายุการบาน 60 วัน

ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ใบรูปรี สี grey-brown มีช่อดอกยาวมาก โดยมีความยาวช่อทั้งหมด 63 ซม. ช่วงที่มีดอกยาว 23 ซม. มีจำนวนดอก 13 ดอก ลักษณะช่อดอกเป็นช่อกระจะ ตั้งตรง ดอกมีขนาดใหญ่ กว้าง 5.5 ซม. สูง 4.8 ซม. สีม่วง Purple-violet N80B กลีบปากสีเดียวกันกลีบดอก (ภาพที่ 13) ช่อดอกมีอายุการบาน 71 วัน

ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส PK 3 ใบรูปรี สี yellow-green มีช่อดอกยาวปานกลาง โดยมีความยาวช่อทั้งหมด 35-49.5 ซม. ช่วงที่มีดอกยาว 8-16 ซม. มีจำนวนดอก 8-15 ดอก ลักษณะช่อดอกเป็นช่อกระจะ ปลายช่อโค้ง หรือเป็นช่อแยกแขนง ดอกมีขนาดกว้าง 4.2-4.6 ซม. สูง 3.7-4.2 ซม. สีดอกมีหลายสี เช่น ขาว White N155B, ม่วงอ่อน Purple 76A, ชมพูม่วง Purple-violet N80B, ม่วง Purple N78A (ภาพที่ 14) ช่อดอกมีอายุการบาน 33-45 วัน

ตารางที่ 13 ลักษณะรูปร่างใบของต้นกล้วยไม้ลูกผสม

ชื่อคู่ผสม	ขนาดใบ (ก x ย) ซม.	ลักษณะรูปใบ	สีของใบ	ลักษณะผิวใบ	ลักษณะขอบใบ	ลักษณะปลายใบ	ลักษณะโคนใบ	การเรียงใบ
แดงอุบล รหัส UN 10 x เข็มแสด	1.8 x 7.3	รูปแถบ	Yellow- Green 146 A	เรียบ มีจุดประเล็กๆ สีน้ำตาล	เรียบ	แหลม	หุ้มลำต้น	สลับระนาบเดียว
แดงอุบล รหัส NK 4 x เข็มแดง	2.2 x 8.0	รูปแถบ	Yellow-Green 146 A	เรียบ มีจุดประเล็กๆ สีน้ำตาล	เรียบ	แหลม	หุ้มลำต้น	สลับระนาบเดียว
แดงอุบล รหัส NK 13 x ฟาแลนอปซิส ขาวปากแดง	3.7 x 9.8	รูปรี	Yellow- Green 146 A	เรียบ	เรียบ	แหลม	หุ้มลำต้น	สลับระนาบเดียว
ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส PK 3	3.7 x 12.1	รูปรี	Yellow- Green 146 C	เรียบ	เรียบ	แหลม	หุ้มลำต้น	สลับระนาบเดียว
	3.5 x 8.4	รูปรี	Greyed-Orange 165 A	เรียบ	เรียบ	แหลม	หุ้มลำต้น	สลับระนาบเดียว
ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4	6.1 x 11.1	รูปไข่กลับ	Green 137 C	เรียบ	เรียบ	มน, ป้าน หรือ เว้า, บุ๋มเล็กน้อย	หุ้มลำต้น	สลับระนาบเดียว
	1.9 x 11.2	รูปแถบ	Grey-brown N 199 A	เรียบ	เรียบ	แหลม	หุ้มลำต้น	สลับระนาบเดียว
	3.1 x 11.4	รูปรี	Grey-brown N 199 A	เรียบ มีจุดประเล็กๆ สีน้ำตาล	เรียบ	แหลม	หุ้มลำต้น	สลับระนาบเดียว
	3.4 x 8.7	รูปรี	Greyed-Purple 183 A	เรียบ มีจุดประเล็กๆสีน้ำตาลแดง	เรียบ	แหลม	หุ้มลำต้น	สลับระนาบเดียว



ภาพที่ 10 ลักษณะรูปร่างและสีของต้นและใบกล้วยไม้ลูกผสมคู่ผสมต่างๆ

(ก) แดงอุบล รหัส UN 10 x เข็มแสด (ข) แดงอุบล รหัส NK 4 x เข็มแดง

(ค) แดงอุบล รหัส NK 13 x ฟาแลนอปซิส ขาวปากแดง

(ง) ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส PK 3 ซ้าย ใบรูปรีสี yellow-green
ขวา ใบรูปรีสี greyed-orange

(จ) ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4
จากซ้าย ใบรูปไข่กลับ, ใบรูปแถบ, ใบรูปรีสี grey-brown, ใบรูปรีสี greyed-purple

ตารางที่ 14 ลักษณะการเจริญเติบโต ความทนทานต่อโรคและแมลง และฤดูออกดอกของกล้วยไม้ลูกผสม

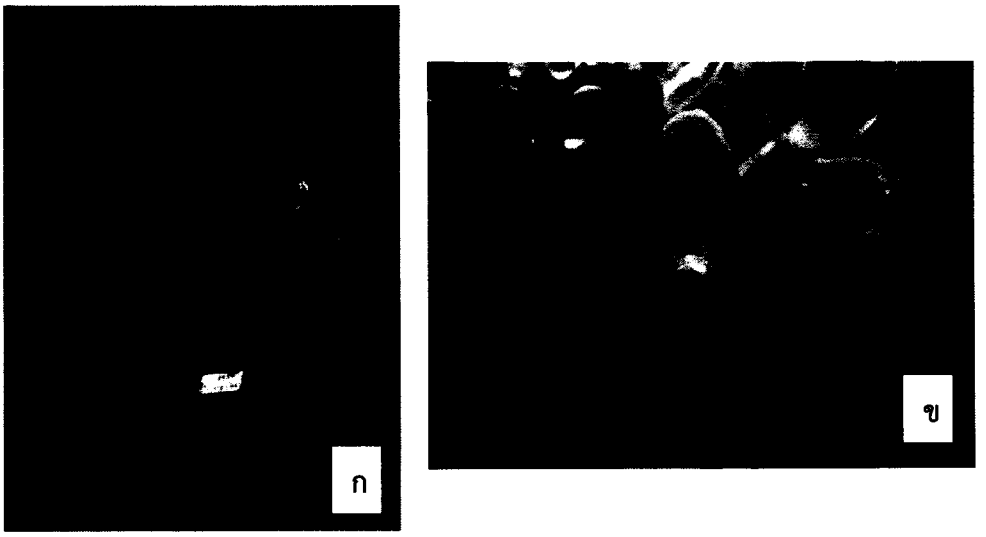
ชื่อคู่ผสม	ลักษณะใบ	การเจริญเติบโต	ความทนทานต่อโรคและแมลง	ฤดูออกดอก
แดงอุบล รหัส UN 10 x เข็มแสด	ใบรูปแถบ	เติบโตช้า ต้นขนาดเล็ก	น้อย	ยังไม่ออกดอก
แดงอุบล รหัส NK 4 x เข็มแดง	ใบรูปแถบ	เติบโตปานกลาง	ปานกลาง	มิ.ย. – ก.ค.
แดงอุบล รหัส NK 13 x ฟาแลนอปซิส ขาวปากแดง	ใบรูปรี	เติบโตช้า ต้นขนาดเล็ก	น้อย	ยังไม่ออกดอก
ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส PK 3	ใบรูปรี สี yellow-green	เติบโตปานกลาง	มาก	มิ.ย. – ก.ค.
	ใบรูปรี สี greyed-orange	เติบโตช้า	ปานกลาง	ยังไม่ออกดอก
ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4	ใบรูปไข่กลับ	เติบโตเร็ว	มาก	ตลอดปี
	ใบรูปแถบ	เติบโตช้า	ปานกลาง	ยังไม่ออกดอก
	ใบรูปรี สี grey-brown	เติบโตปานกลาง	มาก	มิ.ย. – ก.ค.
	ใบรูปรี สี greyed-purple	เติบโตช้า	ปานกลาง	ยังไม่ออกดอก

ตารางที่ 15 ลักษณะช่อดอกและดอกของกล้วยไม้ลูกผสม

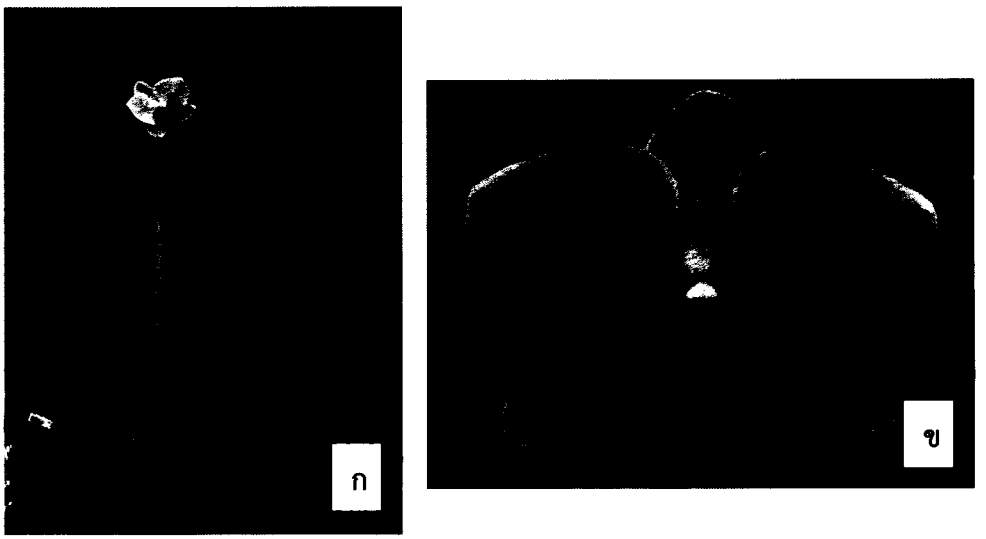
ชื่อคู่ผสม	ความยาวช่อทั้งหมด /ความยาวช่วงที่มีดอก (ซม.)	จำนวนดอก/ช่อ	ลักษณะช่อดอก	สีดอก	ขนาดดอก ก. x ส. (ซม.)	กลีบเลี้ยงด้านข้าง ก. x ย. (ซม.)	กลีบเลี้ยงด้านบน ก. x ย. (ซม.)	กลีบดอก ก. x ย. (ซม.)	กลีบปาก ก. x ย. (ซม.)	อายุการบานทั้งช่อ (วัน)
แดงอุบล รหัส NK 4 x เข็มแดง	23-25/12-13	28-30	ช่อกระจะตั้งตรง	Purple-violet 81A	2.6-3.0 x 2.2-2.7	1 x 1.4	0.8 x 1.4	0.9 x 1.4	0.8 x 0.9	40
ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส PK 3 ใบรูปรี สี yellow-green	35-49.5/8-16	8-15	ช่อกระจะปลายโค้ง, ช่อแยกแขนง	* ขาว, ม่วงอ่อน, ชมพูม่วง, ม่วง	4.2-4.6 x 3.7-4.2	1.2 x 2.1	1 x 2.1	1.4 x 2.1	1.2 x 1.6	33-45
ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ใบรูปไข่กลับ	26-45/6-15	6-8	ช่อกระจะปลายโค้ง	Purple-violet N 80B	5.0-5.5 x 4.5-5.0	1.8 x 2.9	1.8 x 2.9	2.7 x 2.6	1.6 x 1.7	60
ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ใบรูปรี สี grey-brown	63/23	13	ช่อกระจะตั้งตรง	Purple-violet N 80B	5.5 x 4.8	1.8 x 2.7	1.8 x 3.1	2.1 x 2.6	1.5 x 1.8	71

สีดอกเทียบจากแผ่นเทียบสีมาตรฐาน The Royal Horticultural Society

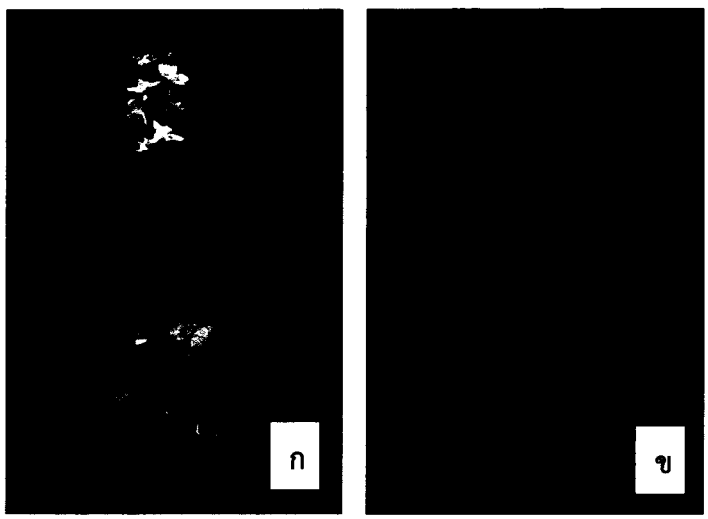
* ขาว RHS # White N155B
ม่วงอ่อน RHS # Purple 76A
ชมพูม่วง RHS # Purple-violet N80B
ม่วง RHS # Purple N78A



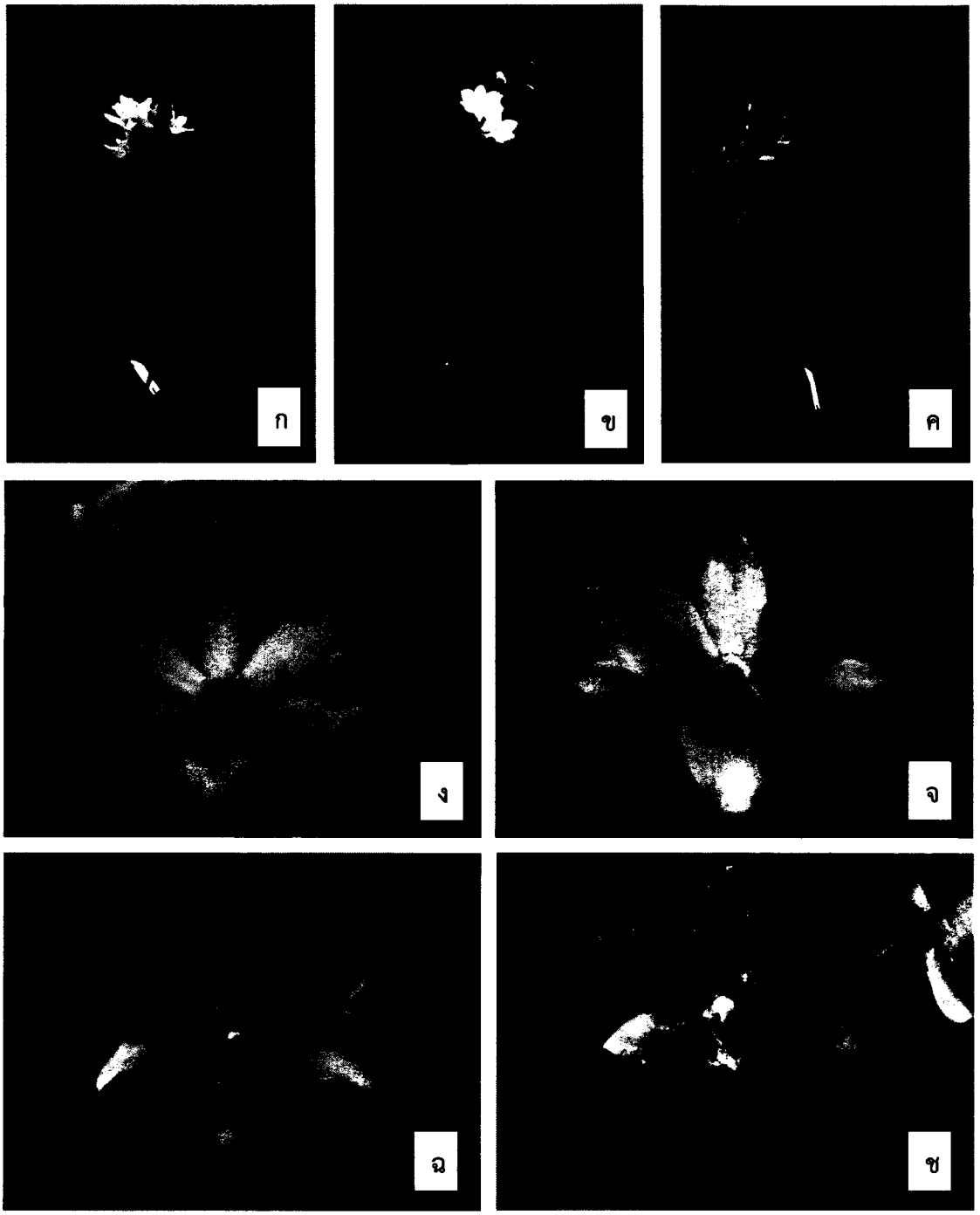
ภาพที่ 11 กล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล รหัส NK 4 x เข็มแดง (ก) รูปร่างช่อดอก (ข) ดอก และสีของดอก



ภาพที่ 12 กล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ใบรูปไข่กลับ
(ก) รูปร่างช่อดอก (ข) ดอก และสีของดอก



ภาพที่ 13 กล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE 4 ใบรูปรี สี grey-brown
(ก) รูปร่างช่อดอก (ข) ดอก และสีของดอก



ภาพที่ 14 กล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส PK 3 ใบรูปรี สี yellow-green
(ก, ข, ค) รูปร่างช่อดอก (ง, จ, ฉ, ช) ดอก และสีของดอก

การประเมินลูกผสมระหว่างสกุลม้าวิ่งและสกุลเข็ม คือ แดงอุบล x เข็มแสด และแดงอุบล x เข็มแดง มีลักษณะใบรูปแถบ (ตารางที่ 13) ซึ่งเป็นลักษณะของกล้วยไม้สกุลเข็มที่มีใบเรียว รูปแถบ และมีการเจริญเติบโตช้า เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตลูกผสมที่ได้รับยีนจากเข็มแสดจะเจริญเติบโตช้ามาก และยังไม่ออกดอก ในขณะที่ลูกผสมที่ได้รับยีนจากเข็มแดงมีการเจริญเติบโตปานกลาง และสามารถออกดอกได้ในระยะเวลา 3 ปี (ตารางที่ 14) ลักษณะดอกและช่อดอกของลูกผสมแดงอุบล x เข็มแดง มีลักษณะ

ระหว่างแดงอุบลและเข็มแดง คือ มีขนาดดอกกึ่งกลางระหว่างแดงอุบลและเข็มแดง ช่อดอกสั้น ดอกเรียงตัวเป็นช่อกระจะ ช่อตั้งตรง มีจำนวนดอกมาก สีดอก purple violet (ตารางที่ 15) ซึ่งลักษณะของลูกผสมแดงอุบล x เข็มแดง มีความเหมาะสมที่จะเป็นไม้ประดับกระถาง เนื่องจากต้นมีขนาดเล็ก ช่อดอกสั้นได้สัดส่วนกับความสูงต้น ดอกมีสีสันเด่นชัด (ภาพที่ 11) ฤดูออกดอก มิถุนายน-กรกฎาคม ซึ่งเป็นฤดูเดียวกับแดงอุบล และมีความทนทานต่อโรคและแมลงปานกลาง

ส่วนการประเมินลูกผสมระหว่างสกุลม้าวิ่งและสกุลฟาแลนอปซิส เนื่องจากลูกผสมที่ได้จากวิจัยครั้งนี้มีพ่อหรือแม่เป็นฟาแลนอปซิสสายพันธุ์ผสมทั้งสิ้น คือ ฟาแลนอปซิส ขาวปากแดง และฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง จึงทำให้ลักษณะลูกผสมที่ได้มีความแปรปรวนของลักษณะฟีโนไทป์มาก โดยเฉพาะคู่ผสมที่ได้รับยีนของฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล มีลักษณะใบและสีที่แตกต่างกันถึง 6 ลักษณะ คือ ใบรูปรี สี yellow-green, ใบรูปรี สี greyed-orange, ใบรูปรี สี grey-brown, ใบรูปรี สี greyed-purple, ใบรูปไข่กลับ และใบรูปแถบ (ตารางที่ 14) เมื่อพิจารณาลักษณะดอกจากต้นที่มีใบและสี 3 ลักษณะ (ตารางที่ 15) สามารถประเมินได้ว่า 1) ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE4 ใบรูปไข่กลับ (ภาพที่ 12) มีลักษณะใบและดอกเหมือนกับต้นแม่ คือ ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง ทุกประการ ลักษณะเช่นนี้เกิดขึ้นเนื่องจาก การพัฒนาของเนื้อเยื่อพลาเซนตาหรือไข่อ่อนภายในฝักของฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง พัฒนาเป็นโปรโตคอร์มและเป็นต้นอ่อน 2) ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส RE4 ใบรูปรี สี grey-brown (ภาพที่ 13) มีลักษณะของลูกผสม คือ ลักษณะช่อดอกยาวคล้ายแดงอุบล ปลายกลีบเลี้ยงและกลีบดอก มน ป้าน ขนาดใหญ่คล้ายฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง แต่เนื่องจากลักษณะช่อดอกยาว จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาเป็นไม้ประดับกระถาง แต่มีศักยภาพที่จะนำไปใช้เป็นไม้ตัดดอก เพราะช่อดอกแข็งแรง มีจำนวนดอกมาก ต้นมีความทนทานต่อโรคและแมลง 3) ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รหัส PK3 ใบรูปรี สี yellow-green (ภาพที่ 14) มีลักษณะลูกผสม คือ ช่อดอกสั้น ปลายช่อดอกโค้งเล็กน้อย และลักษณะปากคล้ายฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง ส่วนของกลีบดอกและกลีบเลี้ยงคล้ายแดงอุบล และมีความแปรปรวนของสีดอก ตั้งแต่ ขาว ม่วงอ่อน ชมพูม่วง และม่วง ลักษณะลูกผสมนี้มีความเหมาะสมที่จะเป็นไม้ประดับกระถาง เนื่องจากต้นมีขนาดเล็ก ช่อดอกสั้นได้สัดส่วนกับความสูงต้น มีจำนวนดอกมาก (8-15 ดอก/ช่อ) ฤดูออกดอกเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม ซึ่งเป็นช่วงเดียวกับแดงอุบล ต้นมีความทนทานต่อโรคและแมลง

9. การจดทะเบียนลูกผสมใหม่

9.1 การจดทะเบียนลูกผสมใหม่ แดงอุบล x เข็มแดง รายละเอียดดังแสดงในภาพที่ 15 - 17

Royal Horticultural Society

REGISTRATION CONFIRMATION

Karnchana Rungruchkanont, Thailand, Registrations, 11th April 2012

(Our Ref: P. 21973)

To save resources the Registration Authority now confirms acceptance of registrations by supplying a print out from the database. Please check the spelling of your grex epithets carefully, as this is how they will appear in print.

Supplied by the Royal Horticultural Society as International Cultivar Registration Authority for Orchid Hybrids

NAME	PARENTAGE	REGISTERED BY
ASCONOPSIS		
Purple Ubon	*Phal.* [*Dor.*] *buyssoniana* [buyssoniana] x *Asctm. curvifolium*	K.Rungruchkanont

One(1) registration accepted by Julian Shaw.

Payment by VISA, with thanks.

Julian Shaw

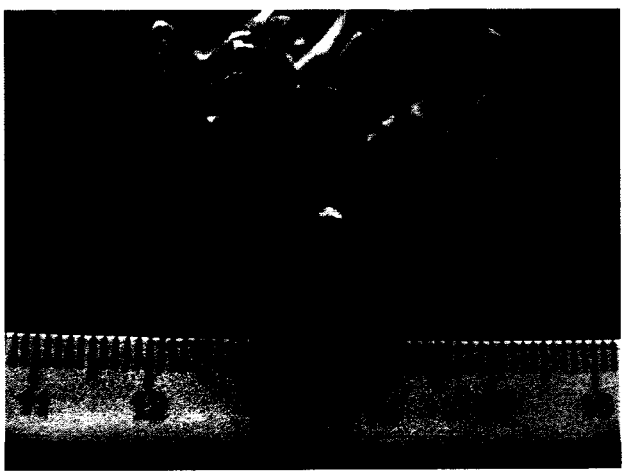
The registration fee has increased to £10.00(US$ 16.50) unfortunately we can no longer accept US$ cheques for less than two registrations, this is due to the high bank charges incurred for cashing them.

Sorry for any inconvenience.
PLEASE NOTE NEW ADDRESS
83 Victoria Road, Selston, Nottinghamshire, NG16 6AR, UK
Email: orcreg@rhs.org.uk

ภาพที่ 15 การรับรองการจดทะเบียนลูกผสมใหม่ *Asconopsis* Purple Ubon

Phalaenopsis buyssoniana X *Ascocentrum curvifolium*

(mother plant) (pollen)

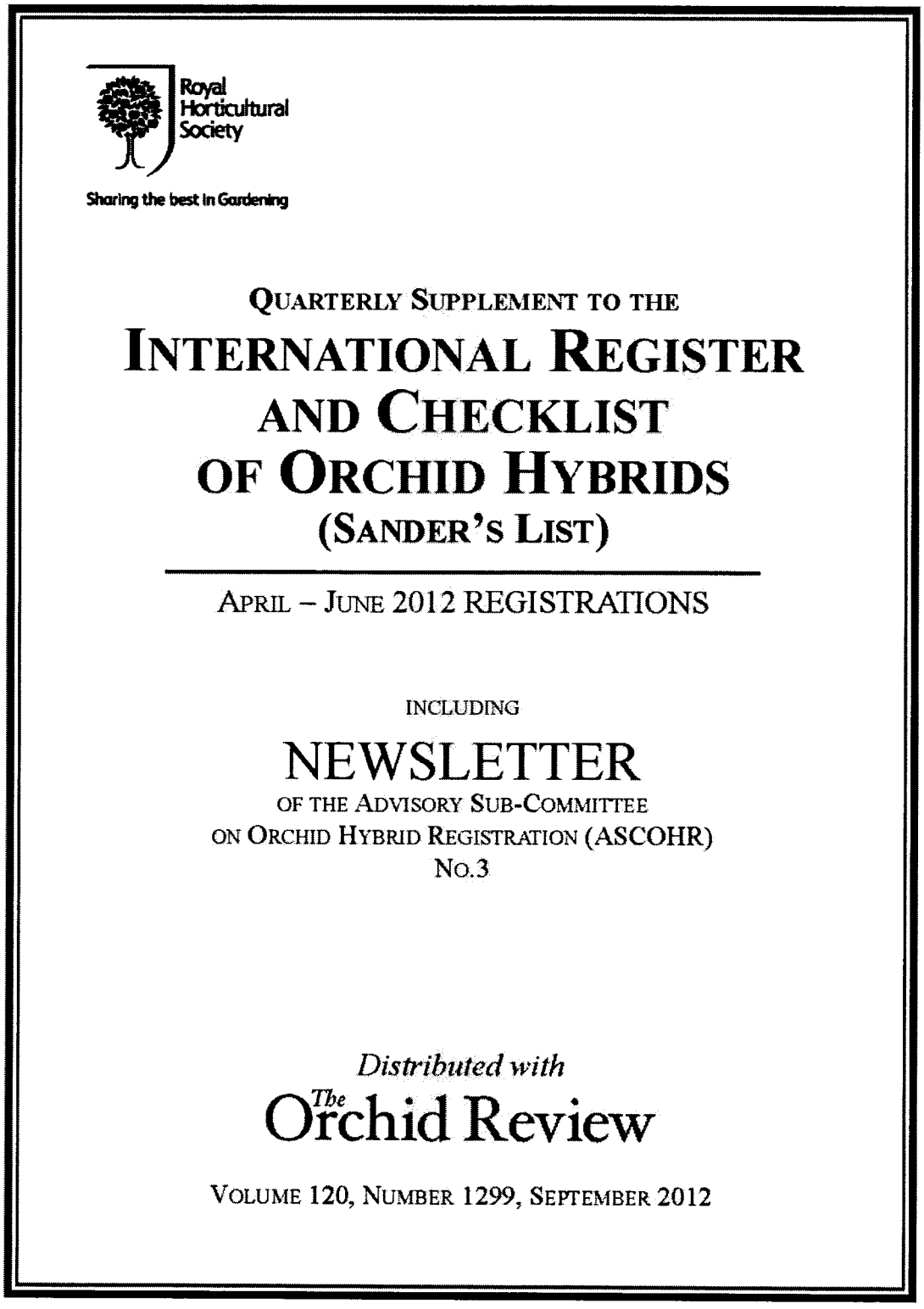


Asconopsis Purple Ubon

ภาพที่ 16 ลักษณะของแม่พันธุ์ พ่อพันธุ์ และลูกผสม *Asconopsis* Purple Ubon

Description of *Asconopsis* Purple Ubon flower

A raceme length 10.0 cm consisted of 16 flowers. The first flower was 2.6 cm in width and 2.2 cm in height. Petals were 0.8 x 1.2 cm, dorsal sepal was 0.7 x 1.2 cm, lateral sepals were 0.9 x 1.2 cm and lip was 0.7 x 1.0 cm. Peduncle was 2.4 cm. General color was purple-violet (RHSCC#81A). Lip color was orange (RHSCC#24A) at the base, the middle of lip was orange with red purple stripe (RHSCC#64A)


Royal Horticultural Society

Sharing the best in Gardening

QUARTERLY SUPPLEMENT TO THE

INTERNATIONAL REGISTER AND CHECKLIST OF ORCHID HYBRIDS

(SANDER'S LIST)

APRIL – JUNE 2012 REGISTRATIONS

INCLUDING

NEWSLETTER

OF THE ADVISORY SUB-COMMITTEE ON ORCHID HYBRID REGISTRATION (ASCOHR)

NO.3

Distributed with

The Orchid Review

VOLUME 120, NUMBER 1299, SEPTEMBER 2012

ภาพที่ 17 การตีพิมพ์เผยแพร่กล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ในวารสาร The Orchid Review Vol. 120

NEW ORCHID HYBRIDS

APRIL – JUNE 2012 REGISTRATIONS

Supplied by the Royal Horticultural Society as International Cultivar Registration Authority for Orchid Hybrids

NAME	PARENTAGE	REGISTERED BY
		(O/U = Originator unknown)
x *Aliceara*		
Florida Panther	*Brat.* [*Mtssa.*] Star Fighter x *Onc.* [*Odm.*] *wyattianum*	Everglades
x *Angulocaste*		
Des Sablons	*Angcst.* Augres x *Ang. clowesii*	E.Young O.F.
Des Varvots	*Ang. cliftonii* x *Angcst.* Paternoster	E.Young O.F.
Vicard Point	*Ang.* Victoire x *Angcst.* Noirmont	E.Young O.F.
x *Ascocenda*		
Harmonie Shinso	*Ascda.* Tubtim Velvet x *Ascda.* Pete Balasky	Shinnyo-en (Hongsilp)
Maui Diamond	*Ascda.* Christine Ang x *V. denisoniana*	Exotic Orchids
Memoria Gary Henington	*Ascda.* Crownfox Moonlight x *V.* Pepe Sanchez	Henington Farms
Ming and Jeanne Wong	*Ascda.* Charlie Barg x *Ascda.* Tubtim Velvet	S.K.Wong (O/U)
Sunspots	*V. denisoniana* x *Ascda.* Suksamran Sunshine	P.D.Virtue
Susan Spring	*Ascda.* Anant Gold x *V.* Rasri Gold	S.Spring (O/U)
x *Asconopsis*		
Kdares Orange Lover	*Ascps.* Irene Dobkin x *Phal. amabilis*	Kdares (Tsai Chi-Chu)
Purple Ubon	*Phal.* [*Dor.*] *buyssoniana* x *Asctm. curvifolium*	K.Rungruchkanont
x *Ballantineara*		
RIO's Ruby Gem	*Gct.* [*Lctna.*] Adamsri x *E.* [*Epi.*] *phoenicea*	Ruben in Orch.
x *Barclia*		
Rosal Barker	*E.* [*Epi.*] Rosalie x *Bark. skinneri*	Ka.Kojima
x *Brassocatanthe*		
Teddy Govender	*Lc.* Ann Akagi x *Bct.* [*Blc.*] Empress Worsley	R.S.Cronje
x *Brassocattleya*		
Betty Joe's Buttons	*Bc.* [*Blc.*] Beautiful Morning x *B. nodosa*	Henington Farms
Jackie's Jungle	*C. percivaliana* x *Bc.* [*Bl.*] Morning Glory	Everglades (A.Easton)
Luscious Lip	*Bc.* [*Bl.*] Morning Glory x *C. loddigesii*	R.S.Cronje
S. y N. Abuela Chochi	*C.* [*Lc.*] Breen's Jenny Ann x *B. pertinii*	Caneva & Gomez
x *Bratonia*		
Toowoomba Regal	*Brat.* [*Mtssa.*] Olmec x *Milt.* Sandy's Cove	J.Woolf (O/U)
Bulbophyllum		
Meen Flambeau	*Bulb. longissimum* x *Bulb. cupreum*	Meen Nursery
Meen Labah Labah	*Bulb.* [*Cirr.*] *auratum* x *Bulb. brienianum*	Meen Nursery
Sri Chandra	*Bulb.* [*Crphm.*] Meen Buddy x *Bulb.* [*Cirr.*] *medusae*	Meen Nursery
Sri Mega	*Bulb.* Meen Ocean Brocade x *Bulb. bicolor*	Meen Nursery
Catasetum		
Amondawa	*Ctsm. osculatum* x *Ctsm. complanatum*	Juan Fernández
Dentigrianum	*Ctsm. denticuletum* x *Ctsm. tigrinum*	Toninho
Jose's Green Gold	*Ctsm. schmidtianum* x *Ctsm. pileatum*	J.L.Hermo (M.Burchette)
Mark's Red Hermosa	*Ctsm. pileatum* x *Ctsm.* Alexis Pardo	M.Margolis
x *Cattkeria*		
Cyclo Skin	*Cka.* Cyclomil x *Bark. skinneri*	Ka.Kojima
Cyclomil	*Bark. scandens* x *C. milleri*	Ka.Kojima
Todas	*Cka.* Cyclomil x *C. walkeriana*	Ka.Kojima
Cattleya		
Agatha Bello	*C.* [*Lc.*] Hawaiian Drumbeat x *C.* [*Lc.*] Tiago Suzuki	R.J.Kinukawa
Alpha Plus Kid	*C.* [*Lc.*] Haw Yuan Angel x *C.* [*Lc.*] Hsinying Excell	Alpha Plus
Anna Elise	*C.* [*Lc.*] Susan Holguin x *C.* [*Lc.*] Mildred Rives	L.M.Wigley (O/U)

ภาพที่ 17 การตีพิมพ์เผยแพร่กล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ในวารสาร The Orchid Review Vol. 120 (ต่อ)

9.2 การจดทะเบียนลูกผสมใหม่ ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล รายละเอียดดังแสดงใน ภาพที่ 18 – 20

Royal Horticultural Society

REGISTRATION CONFIRMATION

Karnchana Rungruchkanont, Thailand, Registrations, 22nd January 2013
(Our Ref: P. 22810)

To save resources the Registration Authority now confirms acceptance of registrations by supplying a print out from the database. Please check the spelling of your grex epithets carefully, as this is how they will appear in print.

Supplied by the Royal Horticultural Society as International Cultivar Registration Authority for Orchid Hybrids

NAME	PARENTAGE	REGISTERED BY
Phalaenopsis Warin Bride	*Phal.* Wedding Promenade x *Phal.* [*Dor.*] *buyssoniana* [buyssoniana]	K.Rungruchkanont

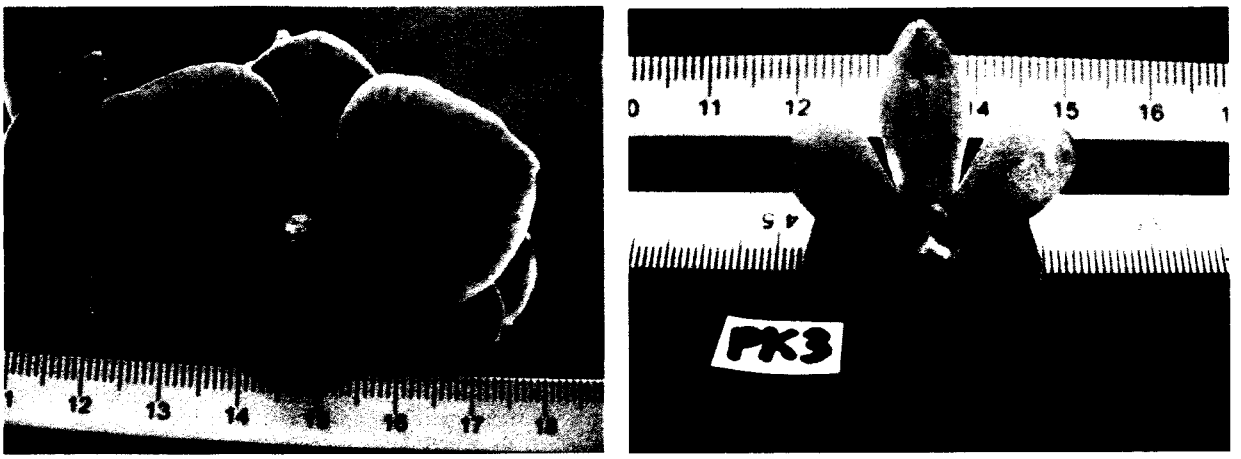
One(1) registration accepted by Julian Shaw.
Payment by VISA, with thanks.

Julian Shaw

The registration fee has increased to £10.00(US$ 16.50) unfortunately we can no longer accept US$ cheques for less than two registrations, this is due to the high bank charges incurred for cashing them.
Sorry for any inconvenience.

PLEASE NOTE NEW ADDRESS
83 Victoria Road, Selston, Nottinghamshire, NG16 6AR, UK
Email: orcreg@rhs.org.uk

ภาพที่ 18 การรับรองการจดทะเบียนลูกผสมใหม่ *Phalaenopsis* Warin Bride



Phalaenopsis Wedding Promenade X *Phalaenopsis buyssoniana*

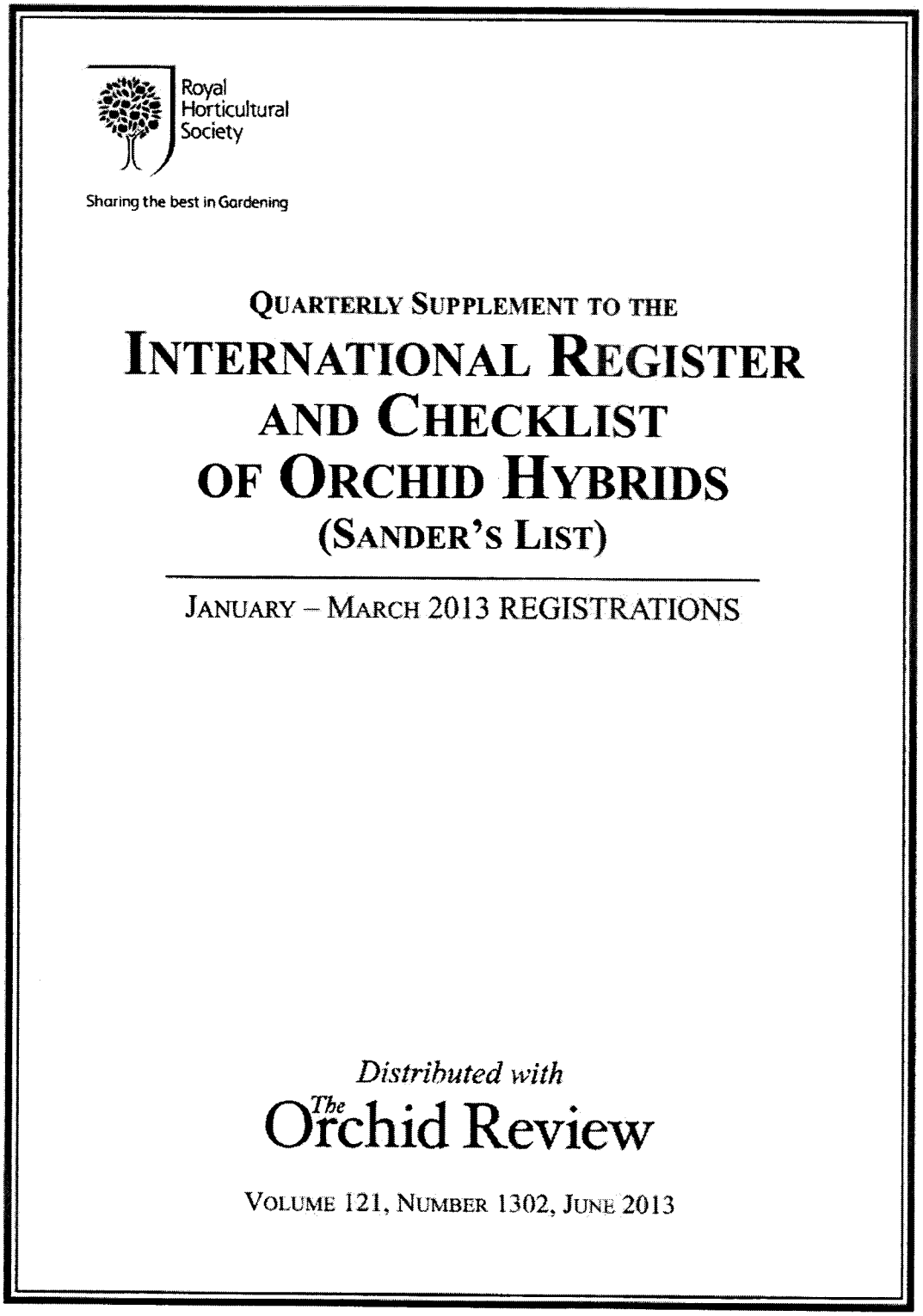
(mother plant) (pollen)

Phalaenopsis Warin Bride

ภาพที่ 19 ลักษณะของแม่พันธุ์ พ่อพันธุ์ และลูกผสม *Phalaenopsis* Warin Bride

Description of *Phalaenopsis* Warin Bride flower

A raceme length 16.0 cm consisted of 15 flowers. The first flower was 4.2 cm in width and 4.1 cm in height. Petals were 1.4 x 2.0 cm, dorsal sepal was 1.1 x 2.1 cm, lateral sepals were 1.3 x 2.1 cm. and lip was 1.6 x 1.7 cm. Peduncle was 2.5 cm. General color was light purple (RHSCC#76A). Lip color was light purple (RHSCC#76A)


Royal Horticultural Society

Sharing the best in Gardening

QUARTERLY SUPPLEMENT TO THE

INTERNATIONAL REGISTER AND CHECKLIST OF ORCHID HYBRIDS

(SANDER'S LIST)

JANUARY – MARCH 2013 REGISTRATIONS

Distributed with

The Orchid Review

VOLUME 121, NUMBER 1302, JUNE 2013

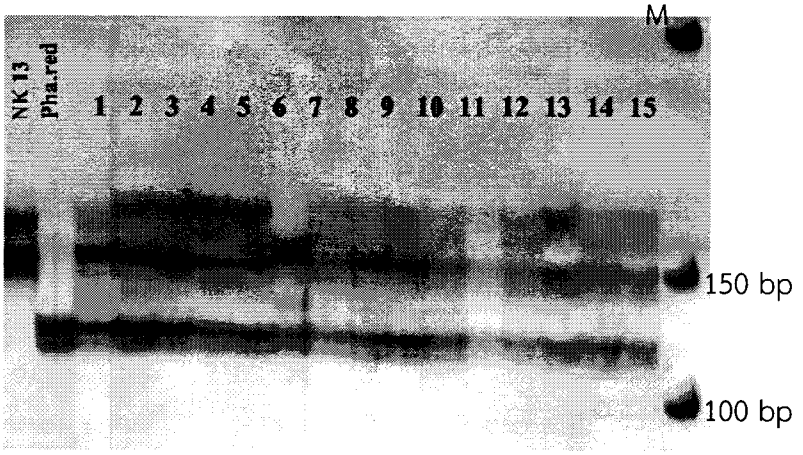
ภาพที่ 20 การตีพิมพ์เผยแพร่กล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ในวารสาร The Orchid Review Vol. 121

NAME	PARENTAGE	REGISTERED BY
Tay Kiah Huan	*Phal.* Michael Chamorro x *Phal.* Dragon Tree Eagle	M.J.Wong
Tiger Vision	*Phal.* Sogo Cake x *Phal.* Tigerling	R.Vernon
Tuanku Aishah Rohani	*Phal.* [*Dtps.*] Shih Hua Gold x *Phal.* Yellow Beauty	Seremban O.N.
Tying Shin Bravo	*Phal.* [*Dtps.*] Yu Pin Fireworks x *Phal.* [*Dtps.*] Formosa Cranberry	Tying Shin Orch.
Tying Shin Eastern Star	*Phal.* Sogo Genki x *Phal.* Yu Pin Easter Island	Tying Shin Orch.
Tying Shin Smile Kitty	*Phal.* [*Dtps.*] Tying Shin Fairy x *Phal.* [*Dtps.*] Yu Pin Fireworks	Tying Shin Orch.
Tying Shin Smile Pixie	*Phal.* [*Dtps.*] Tying Shin Little Pearl x *Phal.* [*Dtps.*] Tying Shin World Class	Tying Shin Orch.
Tying Shin Thor	*Phal.* [*Dtps.*] Yu Pin Fireworks x *Phal.* [*Dtps.*] HF Purplefly	Tying Shin Orch.
Warin Bride	*Phal.* Wedding Promenade x *Phal.* [*Dor.*] *buyssoniana*	K.Rungruchkanont
White Banana	*Phal.* Musashino x *Phal.* Double White	M.Gehring (O/U)
Wilson Tobia	*Phal. hieroglyphica* x *Phal. lueddemanniana*	C.G.Tobia
Wössner Little Star	*Phal.* Sogo Venis x *Phal.* [*Ki.*] *taenialis*	O.Gruss (F.Glanz)
Wu Chun Mei	*Phal.* Tsay's Evergreen x *Phal.* Ang Chee Yang	M.J.Wong
Yaphon So-Soo	*Phal.* Jennifer Palermo x *Phal.* Yaphon Sir	Yaphon Orch.
Yaphon To-Too	*Phal. fimbriata* x *Phal.* K S Happy Eagle	Yaphon Orch.
Yellow Chimera	*Phal.* Tai-I Yellow Bird x *Phal.* Dou-dii Pearl	I-Hsin Biotech. (O/U)
Yellow Panda	*Phal.* Tai-I Yellow Bird x *Phal.* [*Dtps.*] I-Hsin Panda	I-Hsin Biotech. (O/U)
Younghome Beauty Gold	*Phal.* [*Dtps.*] Sin-Yaun Golden Beauty x *Phal.* Emeraude	Young Home Orch.
Younghome Fantasy	*Phal.* Liu's Fantasy x *Phal.* [*Dtps.*] Younghome Orange Lip	Young Home Orch.
Younghome Golden Pixie	*Phal.* [*Dtps.*] Sin-Yaun Golden Beauty x *Phal.* Yushan Green Pixie	Young Home Orch.
Younghome LV	*Phal.* [*Dtps.*] Lianher Blackberry x *Phal.* [*Dtps.*] Younghome Lilien	Young Home Orch.
Phragmipedium		
Bohemian Rhapsody	*Phrag. caudatum* x *Phrag.* Stairway to Heaven	Orchids Ltd [MN] (R-J.Quené)
Cahaba Jewel	*Phrag.* Eric Young x *Phrag.* Saint Eligius	ORCHIDbabies
Nights in White Satin	*Phrag. wallisii* x *Phrag.* Alien Syndrome	Orchids Ltd [MN] (R-J.Quené)
Red Wing	*Phrag.* Robert C. Silich x *Phrag. besseae*	Orchids Ltd [MN] (Jason Fischer)
Thor's Hammer	*Phrag.* Red Lightning x *Phrag. humboldtii* [*warszewiczii*]	Orchids Ltd [MN] (R-J.Quené)
Wössner Carivitt	*Phrag. caricinum* x *Phrag. vittatum*	O.Gruss (F.Glanz)
Wössner Fuchs	*Phrag.* Wössner Supergrande x *Phrag. warszewiczianum*	O.Gruss (F.Glanz)
Wössner Grandurgan	*Phrag.* [*Cyp.*] Grande x *Phrag.* [*Sel.*] Urgandiae	O.Gruss (F.Glanz)
Wössner Schneerose	*Phrag. schlimii* x *Phrag. warszewiczianum*	O.Gruss (F.Glanz)
Pleione		
Aoraki	*Pln.* Rakata x *Pln.* Alishan	H.Ronken
Bantu	*Pln.* Rakata x *Pln.* Soufriere	H.Ronken
Drew Borrey	*Pln. pleionoides* x *Pln.* Alishan	P.Desombre
Nyiarongo	*Pln. aurita* x *Pln. coronaria*	G.Bergel
Sirius	*Pln. formosana* [*pricei*] x *Pln.* Leda	P.Desombre
x *Procaste* *		
Uglybug	*Prom. xanthina* x *Lyc. cruenta*	RHS (B.Berliner)
x *Psychophila*		
RIO's Sweetheart	*Psy. macconnelliae* x *Mcp.* [*Schom.*] *albopurpurea*	Ruben in Orch.
x *Rechingerara*		
Alexandra Kontos	*L.* [*Schom.*] *colombiana* [*wallisii*] x *Rth.* [*Blc.*] Fuchs Orange Nugget	Claude Hamilton
RIO's Christmas Gift	*Rth.* [*Blc.*] Rio's Hohoho x *L.* [*Schom.*] *splendida*	Ruben in Orch.
RIO's Lava	*Rth.* [*Blc.*] Volcano Prince x *L.* [*Schom.*] *undulata*	Ruben in Orch.
Tzeng-Wen Falls	*Rchg.* [*Blc.*] Tzeng-Wen Day x *Rlc.* [*Bc.*] Duh's White	Wong Ching-Tien
x *Renanopsis*		
Jessica Tan Soon Neo	*Rnps.* Embers x *Ren. philippinensis*	Koh Keng Hoe
x *Renanstylis*		
SCBG White Flame	*Ren. citrina* x *Rhy.* [*Slm.*] *retusa* [*violaceum*]	Kunlin Wu (J.Duan)

ภาพที่ 20 การตีพิมพ์เผยแพร่กล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ในวารสาร The Orchid Review Vol. 121 (ต่อ)

10. การวิเคราะห์ DNA ตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมสายพันธุ์ใหม่

จากการใช้เครื่องหมาย EST-SSR-B34 ตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมของกล้วยไม้ที่ได้รับการผสมพันธุ์ระหว่าง แดงอุบล รหัส NK13 x ฟาแลนอปซิส 1 ขาวปากแดง ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ผสมขึ้นในการวิจัยครั้งนี้ ผลการตรวจสอบแถบดีเอนเอที่ปรากฏ พบว่า ตัวอย่างลูกผสมทั้ง 15 ต้น เป็นต้นที่มีพันธุกรรมของทั้งแม่และพ่อ หรือกล่าวได้ว่าทั้ง 15 ต้น เป็นต้นลูกผสมที่แท้จริง เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแสดงทั้งแถบดีเอ็นเอของแม่ แดงอุบล รหัส NK13 (NK13) และของพ่อ ฟาแลนอปซิส 1 ขาวปากแดง (Pha. red) (ภาพที่ 21) โดยต้นแม่จะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 150 bp ขณะที่ต้นพ่อจะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 125 bp และต้นลูกผสมทั้ง 15 ต้น แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีทั้งขนาด 125 และ 150 bp ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการผสมระหว่าง แดงอุบล รหัส NK13 x ฟาแลนอปซิส 1 ขาวปากแดง



ภาพที่ 21 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิสแสดงเอกลักษณ์ลูกผสมกล้วยไม้ แดงอุบล รหัส NK 13 x ฟาแลนอปซิส 1 ขาวปากแดง โดยใช้เครื่องหมาย EST-microsatellite -ไพรเมอร์ B34; NK 13 คือ แดงอุบล รหัส NK13, Pha. red คือ ฟาแลนอปซิส 1 ขาวปากแดง, 1-15 คือ ลูกผสมจำนวน 15 ตัวอย่าง/เบอร์ และ M คือ 100 bp ladder

เนื่องจากลูกผสมที่ได้เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสกุล (interspecific hybridization) ดังนั้นลูกผสมที่ได้ย่อมมีโอกาสที่จะแสดงลักษณะพันธุกรรมแบบ heterozygous การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบไมโครแซทเทลไลท์ (SSR markers) มาใช้ตรวจสอบความเป็นลูกผสมจึงมีความเหมาะสมอย่างยิ่ง เนื่องจากคุณสมบัติหนึ่งของเครื่องหมายดังกล่าว คือ แสดงลักษณะของแถบดีเอ็นเอแบบ co-dominant ซึ่งสามารถจำแนกการเกิดแถบดีเอ็นเอแบบ heterozygous และ homozygous ได้ (สุรีพร, 2554) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Yue *et al.* (2006) ที่พบว่า เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สามารถจัดจำแนกลูกผสมของกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* ออกจากต้นแม่และต้นพ่อได้ นอกจากนี้ยังพบอีกว่า ลูกผสมที่มีพ่อหรือแม่เดียวกัน (sibling) เมื่อนำไปศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic) ยังพบว่าถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเหมาะสมในการศึกษาเอกลักษณ์ของลูกผสม และยังช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์คัดเลือกต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้เกิดจากการผสมออกจากประชากร (population) ที่ต้องการประเมิน (evaluation) ในขั้นตอนของการคัดเลือก (selection) ได้อีกด้วย ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสม

คู่อื่นๆ สามารถศึกษาได้ในโครงการวิจัยย่อยที่ 2 การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากฐานข้อมูล EST และการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

สรุป

การสร้างลูกผสมต่างสกุลได้ทำการผสมทั้งหมด 44 คู่ผสม ได้ฝักลูกผสม 44 คู่ผสม ได้ต้นอ่อนลูกผสมจำนวน 6 คู่ผสม คือ NK 4 x เข็มแดง, UN 10 x เข็มแสด, NK 13 x ฟาแลน 1 ขาวปากแดง, ฟาแลน 4 เวดดิ้ง x PA 11, ฟาแลน 4 เวดดิ้ง x RE 4, ฟาแลน 4 เวดดิ้ง x PK 3 ซึ่งต้นอ่อนจากคู่ผสมทั้ง 6 คู่มีจำนวนน้อยมาก

การเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้จากชิ้นส่วนใบ โดยการชักนำ PLBs จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบล สามารถใช้ส่วนโคนใบเพาะเลี้ยงในอาหาร NDM ที่เติมสาร TDZ ความเข้มข้น 1-10 มก./ล. และสามารถชักนำ PLBs ยอด และรากได้ โดยจุดกำเนิดของการพัฒนาเนื้อเยื่อ คือ การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอที่ชั้นเซลล์ epidermis บริเวณโคนใบ โซมาติกเอมบริโอมีการพัฒนาต่อใน 3 รูปแบบ คือ PLBs ยอด และราก ผลจากการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้ลูกผสมต่างสกุลของสกุลม้าวิ่ง ที่เกิดลูกผสมในจำนวนน้อยมาก เนื่องจากความแตกต่างทางพันธุกรรม ให้มีปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกล้วยไม้ลูกผสมต่างสกุล โดยการศึกษาผลของอายุฝักและอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของคัพภะลูกผสมข้ามกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ฝักอ่อนลูกผสมอายุ 2 เดือน เหมาะสมที่จะนำคัพภะไปเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และอาหารที่เหมาะสม คือ อาหารสูตร VW ที่เติมสาร kinetin 1 มก/ล + NAA 0.1 มก/ล คัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารนี้สามารถพัฒนาได้เฉลี่ย 61 คัพภะ

สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส x แดงอุบล คือ สูตร ½ MS ที่ไม่ต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

การใช้ถ่าน+มอส (ปลูกด้วยถ่านปิดทับด้วยสแฟกนัมมอส) เป็นวัสดุปลูกที่เหมาะสมสำหรับปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล

การศึกษาลักษณะต้นและดอกของลูกผสมระหว่างสกุลม้าวิ่งและสกุลฟาแลนอปซิส และระหว่างสกุลม้าวิ่งและสกุลเข็ม ได้ผลผลิต 4 คู่ผสม คือ แดงอุบล x เข็มแสด, แดงอุบล x เข็มแดง, แดงอุบล x ฟาแลนอปซิส ขาวปากแดง และ ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล ซึ่งมีลักษณะของใบที่แตกต่างกัน เมื่อปลูกเลี้ยงต่อไป สามารถปลูกเลี้ยงจนออกดอก 2 คู่ผสม คือ แดงอุบล x เข็มแดง และ ฟาแลนอปซิส เวดดิ้ง x แดงอุบล ทั้งสองชนิดมีลักษณะดอกสวยงาม มีจำนวนดอกมาก และช่อดอกสั้นได้สัดส่วนกับความสูงต้น ต้นมีความทนทานต่อโรคและแมลง ซึ่งทั้งสองคู่ผสมมีความเหมาะสมที่จะเป็นไม้ประดับกระถาง

การจดทะเบียนลูกผสม สามารถทำการจดทะเบียนกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ที่ The Royal Horticultural Society ณ ประเทศอังกฤษ จำนวน 2 ชื่อ คือ *Asconopsis* Purple Ubon และ *Phalaenopsis* Warin Bride

การวิเคราะห์ DNA ตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ โดยใช้เครื่องหมาย EST-SSR-B34 ตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมของกล้วยไม้ที่ได้รับการผสมพันธุ์ระหว่าง แดงอุบล รหัส NK13 x ฟาแลนอปซิส 1 ขาวปากแดง สามารถแสดงเอกลักษณ์การเป็นลูกผสมของพ่อและแม่ที่ใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์. 2555. กล้วยไม้: เทคโนโลยีและการประยุกต์ใช้งาน. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี. 251 น.

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์. 2553. ผลของออกซินต่อการติดฝักและช่วยชีวิตคัพภะลูกผสมข้ามกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร 41(2) พิเศษ : 381-384.

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์. 2544. ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลร่วมกับแสงต่อการงอกและพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้แดงอุบลในสภาพปลอดเชื้อ. การประชุมทางวิชาการเทคโนโลยีการเกษตรเพื่ออินโดจีน วันที่ 25-31 พฤษภาคม 2544 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ ศรีประไพ ธรรมแสง วรงค์ นัยวินิจ ภาคภูมิ สืบนุการณ์ และอุทัย อันพิมพ์. 2543. รายงานผลการวิจัยเรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้แดงอุบลและศึกษาการเจริญเติบโตของต้นอ่อนในโรงเรือน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 46 น.

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ ศรีประไพ ธรรมแสง และแสงเดือน พลเยี่ยม. 2551. การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง. วิทยาศาสตร์เกษตร 39 (3) พิเศษ : 191-194.

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ และสุภาพ ตรีนอก. 2544. การเปรียบเทียบสูตรอาหารและระดับความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของลูกกล้วยไม้แดงอุบลในสภาพปลอดเชื้อ การประชุมทางวิชาการเทคโนโลยีการเกษตรเพื่ออินโดจีน วันที่ 25-31 พฤษภาคม 2544 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ระพี สาคริก. 2549. หอมกลิ่นกล้วยไม้ : สกุลดอไรทิส. คม ชัด ลึก วันอาทิตย์ที่ 7 พฤษภาคม

พัชรียา บุญกอแก้ว. 2553. บัญชีรายการทรัพย์สินชีวภาพกล้วยไม้ไทย. สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน). 511 น.

ไพบูลย์ ไพรีพ่ายฤทธิ์. 2521. ตำรากล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มเล่น ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคลอาทรการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 432 น.

ศรีประไพ ธรรมแสง, กาญจนา รุ่งรัชกานนท์, ภาคภูมิ สืบนุการณ์, วรงค์ นัยวินิจ, ธีรวุฒิ มาประชา และอุทัย อันพิมพ์. 2544. การสำรวจและเก็บรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้แดงอุบล. การประชุมวิชาการเทคโนโลยีการเกษตรเพื่ออินโดจีน วันที่ 25-31 พฤษภาคม 2544 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2551. ดอกกล้วยไม้สด. สถิตินำเข้า-ส่งออก. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/statistic/export/1301OC.xls

สลิล สิทธิสัจจธรรม และนฤมล กฤษณชาญดี. 2545. คู่มือกล้วยไม้. สำนักพิมพ์สารคดี, กรุงเทพ. 248 น.

สมศักดิ์ รักไพบูลย์สมบัติ. 2535. ทำเนียบกล้วยไม้ไทย. สุรวงศ์บุ๊คเซนเตอร์, เชียงใหม่.

สุรีพร เกตุงาม. 2554. ชีวโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์พืชเบื้องต้น. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี. 195 น.

องค์การสวนพฤกษศาสตร์. 2543. สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม 6 กล้วยไม้ไทย. โอเอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์, กรุงเทพฯ. 134 น.

อบฉันท์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ. 461 น.

Chen, J.T. and W.C. Chang. 2001. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. Plant growth regulation 34: 229-232.

Chen, J.T., C. Chang and W.C. Chang. 1999. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* Gower Ramsay and subsequent plant regeneration. Plant Cell Report 19: 143-149.

Christenson, E.A. 2001. Phalaenopsis: A Monograph. Timber Press, Portland, Oregon. 330p.

Galitski, T., A.J. Saldanha, C.A. Styles, E.S. Lander and G.R. Fink. 1999. Ploidy regulation of gene expression. Science 285: 251-254.

García-llamas, C., A. Martin and J. Ballesteros. 2004. Differences among auxin treatments on haploid production in durum wheat x maize crosses. Plant Cell Report 23: 46-49.

Gow, W.P., J.T. Chen and W.C. Chang. 2009. Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. Acta Physiol Plant 31: 363-369.

Kishor, R. and G.J. Sharma. 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.

Kishor, R., P.S. Sha Valli Khan and G.J. Sharma. 2006. Hybridization and in vitro culture of an orchid hybrid Ascocenda 'Kangla'. Scientia Horticulturae 108: 66-73.

Knox, R.E., J.M. Clarke and R.M. DePauw. 2000. Dicamba and growth condition effects on doubled haploid production in durum wheat crossed with maize. Plant Breeding 119: 289-298.

Kovaleva, L.V., E.V. Zakharova, Y.V. Minkina, G.V. Timofeeva and I.M. Andreev. 2005. Germination and in vitro growth of petunia male gametophyte are affected by exogenous hormones and involve the changes in the endogenous hormone level. Russian Journal of Plant Physiology 52: 521-526.

Park, S.K., E.C. Yeung and D. Chakrabarty. 2002. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. Plant Cell Report 21: 46-51.

Popova, E.V., T.V. Nikishina, G.L. Kolomeitseva and A.S. Popov. 2003. The effect of seed cryopreservation on the development of protocorms by the hybrid orchid *Bratonia.* Russian Journal of Plant Physiology 50(5): 672-677.

Rungruchkanont, K. 2009. *In vitro* young leaf culture of *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana.* J. Ubon Ratchathani University 11 (3): 3-8.

Sue, P., L.G. Bailey and B.R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol component. Plant Molecular Biology Reporter 15 (1): 8-15.

Tanaka, R. and H. Kamemoto. 1984. Chromosome in orchids : Counting and numbers, p.323-410. In : J. Arditti (ed.). Orchid Biology Reviews and Perspectives,III. Cornell Univ. Press, New York.

The Royal Horticultural Society. 1991. Sander's List of Orchid Hybrids. Unwin Brothers Ltd., London.

Yue, G.H., L.T. Lam-Chan and Y. Hong. 2006. Development of simple sequence repeat (SSR) makers and their use in identification of *Dendrobium* varieties. Molecular Ecology Notes 6: 882-834.

Zhang, X.S. and S.D. O'Neill. 1993. Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. The Plant Cell 5: 403-418.

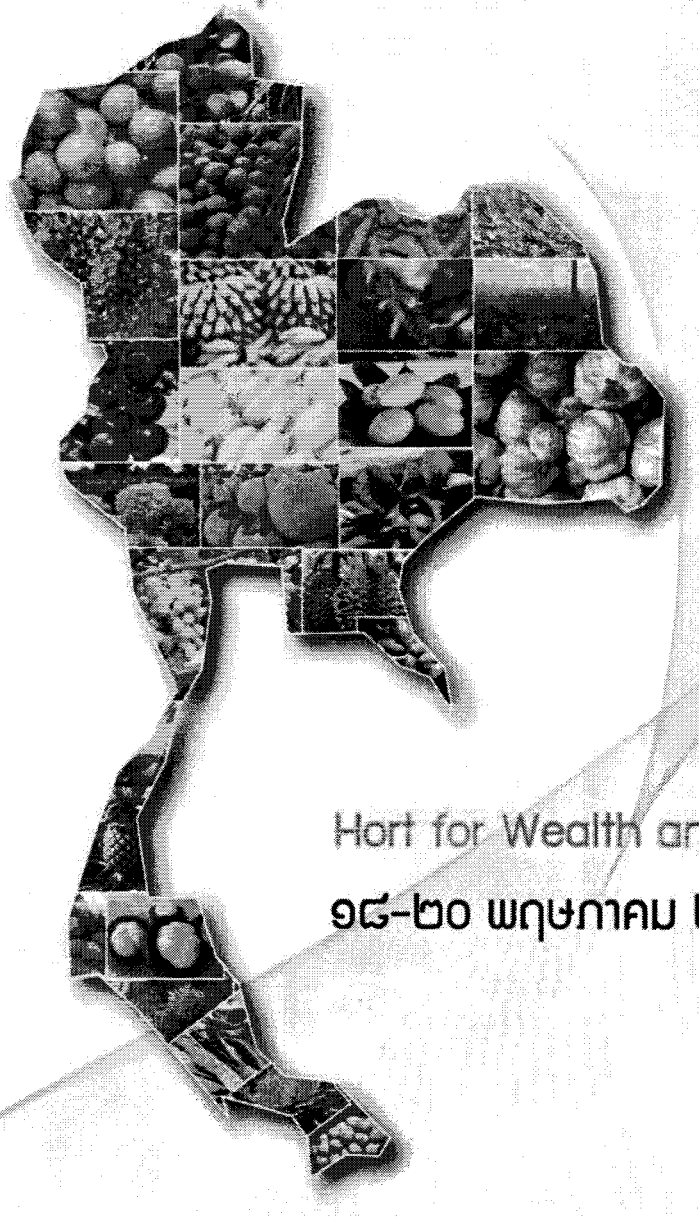
ภาคผนวก

บทความที่ได้รับการนำเสนอในวารสารวิชาการและการประชุมวิชาการ

1. การเกิดโปรโตคอร์มไลด์บอดี้และการพัฒนาเป็นต้นจากใบกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง นำเสนอในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 10 และตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 42 ฉบับที่ 3/1 (พิเศษ) สิงหาคม-ธันวาคม 2554 หน้า 175-178.
2. Role of plant growth regulators on fruit set and embryo culture of interspecific *Phalaenopsis* ร่างบทความวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

วารสาร ISSN 0125-0369
วิทยาศาสตร์เกษตร
AGRICULTURAL SCIENCE JOURNAL
ปีที่ 42 ฉบับที่ 3/1 (พิเศษ) สิงหาคม – ธันวาคม 2554 Vol. 42 No. 3/1 (Suppl.) August – December 2011

การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ ๑๐



Hort for Wealth and Well-being

๑๘-๒๐ พฤษภาคม ๒๕๕๔

การเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้และการพัฒนาเป็นต้นจากใบกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

Establishment of protocorm-like bodies and plant regeneration from leaf explants of *Doritis* spp.

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ [1] และ ประภัสสร วงศ์สาลี [1]

Rungruchkanont, K. [1] and Wongsalee, P. [1]

Abstract

The objectives of this study were to find suitable concentrations of Thidiazuron (TDZ) to induce protcorm-like bodies (PLBs) from leaf segments of *Doritis* spp. and to understand the process of PLBs formation and plant regeneration from leaf segments. Two leaf segment parts (basal and tip segments) from *in vitro* seedlings of *D. pulcherrima* and *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* were cultured on New Dogashima medium (NDM) with TDZ at 0, 0.1, 1, 3, 5 and 10 mg/l for 3 months. The result showed that TDZ at 1-10 mg/l induced basal leaf segments of *D. pulcherrima,* forming 54 -70% PLBs and 7-21% shoot but the same dose induced basal leaf segments of *D. pulcherrima* var. *buyssoniana*, forming only 7% PLBs and 20-29% shoot. It can be stated that *D. pulcherrima* has a higher potential for multiplication than *D. pulcherrima* var. *buyssoniana*. The histological study showed that somatic embryos originated from the epidermal layers at the base of basal leaf segment. Next, somatic embryos developed into three forms, that was PLBs, shoot and root.

Keywords : Basal leaf segment, *Doritis* orchid, Somatic embryo, Thidiazuron

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบความเข้มข้นของสาร Thidiazuron (TDZ) ที่เหมาะสมต่อการชักนำโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ (protocorm-like bodies, PLBs) จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและเพื่อที่จะเข้าใจกระบวนการเกิด PLBs และการพัฒนาเป็นต้น ได้ทำการศึกษาโดยใช้ชิ้นส่วนปลายใบและโคนใบจากต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง 2 ชนิด คือ กล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบล นำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร New Dogashima (NDM) ที่เติมสาร TDZ 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0, 0.1, 1, 3, 5 และ10 มก./ล. เป็นระยะเวลา 3 เดือน ผลการทดลองพบว่า สาร TDZ ความเข้มข้น 1-10 มก./ล. สามารถชักนำชิ้นส่วนโคนใบกล้วยไม้ม้าวิ่งให้เกิด PLBs 54 – 70 % และเกิดยอด 7 - 21 % แต่ชักนำส่วนโคนใบกล้วยไม้แดงอุบลให้เกิด PLBs เพียง 7 % และเกิดยอด 20 – 29 % แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งมีศักยภาพในการเพิ่มปริมาณได้ดีกว่ากล้วยไม้แดงอุบล จากการศึกษาทางกายวิภาคพบว่า จุดกำเนิดของการพัฒนา คือ การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอที่ชั้นเซลล์ epidermis บริเวณโคนใบ โซมาติกเอมบริโอมีการพัฒนาต่อใน 3 รูปแบบ คือ PLBs ยอด และราก

คำสำคัญ : กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ชิ้นส่วนโคนใบ โซมาติกเอมบริโอ สาร Thidiazuron

คำนำ

กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis* spp.) เป็นกล้วยไม้สกุลเล็กๆ ที่มีความใกล้ชิดกับกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส (*Phalaenopsis* spp.) นักอนุกรมวิธานบางท่านได้จัดให้กล้วยไม้ในสกุลม้าวิ่งอยู่ในสกุลฟาแลนอปซิส (Averyanov, 2009) แต่จากความคุ้นเคยและการมีลูกผสมระหว่างสกุลม้าวิ่งและสกุลฟาแลนอปซิสที่ชื่อ สกุลดอริเทนอปซิส (*Doritanopsis* spp.) จึงยังคงนิยมเรียกสกุลม้าวิ่งเช่นเดิมทำให้เข้าใจง่ายและไม่สับสน กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย คือ กล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima)* (2n=38) และกล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) (2n=76) ซึ่งจะมีขนาดดอกใหญ่กว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งเกือบเท่าตัว สภาพแหล่งกำเนิดตามธรรมชาติ พบในที่ค่อนข้างแห้งแล้ง ขึ้นบนพื้นดินทราย บริเวณโขดหินในป่าโปร่ง กล้วยไม้ม้าวิ่งมีการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติอย่างกว้างขวางทั่วประเทศ ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลมีการกระจายพันธุ์เฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบมากในจังหวัดอุบลราชธานี

การขยายพันธุ์กล้วยไม้จากส่วนของใบทำให้ต้นที่ได้มีความแปรปรวนน้อย เทคนิคนี้ประสบความสำเร็จในกล้วยไม้หลายชนิด เช่น *Epidendrum* cv. O'Brienianum, *Laeliocattleya* cv. Portia 'Mayflower', *Vanda* hybrid (*Vanda* TMA x *Vanda* Joaquim), *Renanthera imschootiana*, *Vanda coerulea*, *Oncidium* cv. Grower Ramsey, *Phalaenopsis*

[1]ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี วารินชำราบ อุบลราชธานี 34190

[1]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Warin Chamrap, Ubon Ratchathani 34190

amabilis, *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* ฯลฯ ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงใบของกล้วยไม้แต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต แหล่งที่มาของใบ (ใบในสภาพปลอดเชื้อและใบจากสภาพธรรมชาติ) ตำแหน่งของใบ (ปลายใบและโคนใบ) ทิศทางการวางชิ้นส่วนใบบนอาหาร (วางตั้งและวางนอน) และที่สำคัญที่สุดคือ อายุของใบ (Chugh et al., 2009) จากรายงานของ Chen and Chang (2001) พบว่า การเกิดเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนใบกล้วยไม้ออนซิเดียม ถูกยับยั้งโดยออกซิน เช่น IAA, IBA, NAA และ 2,4-D แต่ได้รับการส่งเสริมโดยไซโตไคนิน เช่น 2ip, Zeatin, Kinetin, BAP และ TDZ โดยสาร TDZ เป็นสารที่ใช้ในการชักนำเอ็มบริโอจากใบกล้วยไม้ออนซิเดียม และกล้วยไม้ฟาแลนอปซิสได้ดีและมีประสิทธิภาพ การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของสาร Thidiazuron ต่อการชักนำ PLBs และการพัฒนาเป็นต้นพืชจากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง 2 ชนิด คือกล้วยไม้ม้าวิ่ง และกล้วยไม้แดงอุบล และศึกษาเซลล์จุดกำเนิดของการเกิด PLBs และการพัฒนาเป็นต้นพืช

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาความเข้มข้นของสาร TDZ ที่เหมาะสมต่อการชักนำ PLBs

นำต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบลที่มีอายุ 10 เดือนในสภาพปลอดเชื้อ ตัดใบอ่อนที่มีขนาด 1-2 ซม. โดยตัดใบให้ถึงส่วนโคนของใบ ใช้ใบมีดตัดใบตามขวางแบ่งเป็น 2 ส่วน คือส่วนปลายใบและส่วนโคนใบ นำส่วนของใบหงายให้ด้านท้องใบสัมผัสอาหารและวางนอนบนอาหารสูตร New Dogashima Medium (NDM) ที่มีสาร TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 3, 5 และ 10 มก./ล. โดยการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลองกรรมวิธีละ 7 ซ้ำๆ ละ 4 ชิ้น ทำการเลี้ยงใบอ่อนในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2°C ความชื้นสัมพัทธ์ 60-65% และได้รับแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง/วัน ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่และบันทึกผลทุกเดือนเป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยเก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิด PLBs ยอด และราก

2. การศึกษากายวิภาคการพัฒนาเนื้อเยื่อจากใบ

เก็บตัวอย่างส่วนต่างๆที่เกิดการพัฒนาจากชิ้นส่วนใบ เช่น PLBs ยอด ราก ที่ติดกับชิ้นส่วนใบต้นกำเนิด ตัดเป็นชิ้นประมาณ 0.3x0.5 เซนติเมตร นำตัวอย่างม่าและคงสภาพเซลล์ในน้ำยา formalin - acetic acid - ethyl alcohol (FAA) 50% นาน 18 ชั่งโมง นำตัวอย่างไปแช่ใน tertiary butyl alcohol (TBA) ที่ระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 5 ระดับ คือ 50, 70, 85, 95 และ100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ละระดับใช้เวลา 12 ชั่วโมง ทำการแทนที่แอลกอฮอล์โดยแช่ตัวอย่างใน pure TBA 3 ครั้งๆ ละไม่ต่ำกว่า 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายตัวอย่างพืชลงในหลอดแก้วที่มีส่วนผสมของ pure TBA กับ paraplast ไปยังตู้อบที่มีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 48 ชั่วโมง เปลี่ยน paraplast 3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้เวลา 12 ชั่วโมง ทำการฝังเนื้อเยื่อใน paraplast หลังจากนั้นตัดเนื้อเยื่อด้วย rotary microtome ความหนาประมาณ 10-15 ไมครอน นำแถบ paraplast ที่มีชิ้นตัวอย่างติดอยู่ ติดบนกระจกสไลด์ ย้อมสไลด์ด้วยสี Toluidine Blue และทำการศึกษาสไลด์ตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการทดลอง

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนโคนใบและปลายใบของกล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบลบนสูตรอาหาร NDM ที่เติม TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0 - 10 มก./ล. เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า ปลายใบกล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบลไม่สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของเนื้อเยื่อ ส่วนของโคนใบกล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบลที่ได้รับสาร TDZ ความเข้มข้น 0 - 10 มก./ล. สามารถชักนำให้มีการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อต่างๆ ได้ เช่น PLBs ยอด และราก (Fig. 1) สาร TDZ ความเข้มข้น 1 - 10 มก./ล. สามารถชักนำใบกล้วยไม้ม้าวิ่งให้เกิด PLBs ได้ 53.6 - 67.9 % และชักนำยอดหรือต้นใหม่จากชิ้นส่วนโคนใบได้ 7.1- 21.4 % ส่วนโคนใบของกล้วยไม้แดงอุบลที่ได้รับสาร TDZ ความเข้มข้น 1 – 10 มก./ล. สามารถชักนำ PLBs ได้เพียงเล็กน้อย (7.1 %) แต่สามารถชักนำยอดใหม่ได้ 17.9 – 28.6 % (Table 1) การศึกษาทางกายวิภาคเนื้อเยื่อที่มีการพัฒนาจากใบ พบเซลล์ชั้น epidermis บริเวณโคนใบเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาโซมาติกเอมบริโอ (Fig. 2 a) โซมาติกเอมบริโอมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนและมีพัฒนาการ 3 รูปแบบ คือ PLBs ยอด และราก การพัฒนาของโซมาติกเอมบริโอเป็น PLBs จะพบเห็นบริเวณที่เป็น meristermatic cell หนาแน่นอยู่หลายบริเวณรอบๆ โซมาติกเอมบริโอ (Fig. 2 b) บริเวณที่มี meristermatic cell หนาแน่นเหล่านี้สามารถพัฒนาเป็นส่วนยอด หลายยอด หรือเป็น PLBs เพิ่มจำนวนให้มากขึ้น

Table 1 Developmental percentage of basal leaf segments of two *Doritis* on NDM medium with different concentrations of Thidiazuron after three months of culture.

TDZ	Explants of *D. pulcherrima*			Explants of *D. pulcherrima* var. *buyssoniana*		
(mg/l)	PLBs	Shoot	Root	PLBs	Shoot	Root
0	0 b	3.6	7.1	0	0 b	14.3 a
0.1	7.1 b	0	0	3.6	0 b	3.6 b
1	53.6 a	10.7	0	7.1	17.9 a	0 b
3	67.9 a	21.4	0	0	21.4 a	0 b
5	60.7 a	7.1	0	7.1	28.6 a	0 b
10	64.3 a	7.1	0	7.1	17.9 a	0 b
F-test	**	n.s.	n.s.	n.s.	**	**

Means within a column not sharing the same letters were significantly different at $P = 0.05$ by DMRT

n.s. = not significant, ** = significant at $P = 0.01$ and n= 7

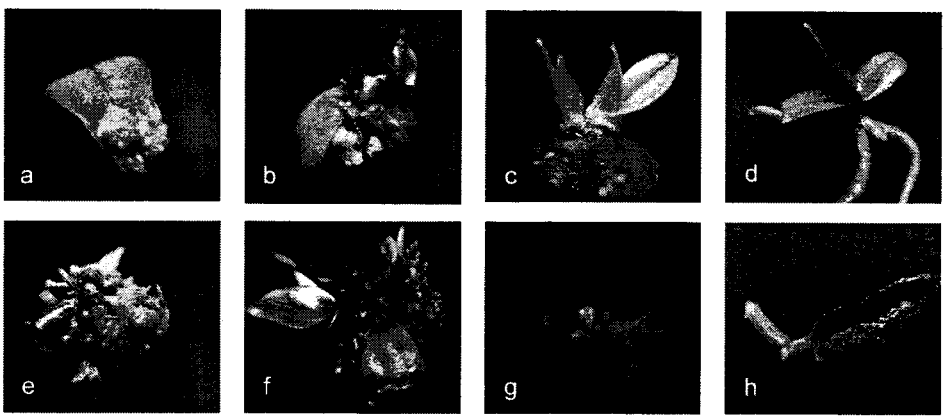


Figure 1 Development of basal leaf segments of two *Doritis*, *D.pulcherrima* (a-d) and D. *pulcherrima* var. *buyssoniana* (e-h), PLBs (a, e), developing shoot from PLBs (b, f), direct shoot (c, g), direct shoot and root (d), direct root (h)

วิจารณ์ผล

การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง 2 ชนิด คือ กล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบล จากชิ้นส่วนใบอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ ประสบความสำเร็จเมื่อนำชิ้นส่วนใบโคนใบเลี้ยงในอาหารที่มีสาร TDZ ความเข้มข้น 1-10 มก./ล. ส่วนของโคนใบมีการพัฒนาของเนื้อเยื่อเป็น PLBs หรือยอดได้ดี จากการทดลองเห็นได้ว่า กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งทั้งสองชนิดคือ กล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบล มีศักยภาพในการเพิ่มปริมาณหรือขยายพันธุ์ได้แตกต่างกัน โดยกล้วยไม้ม้าวิ่งสามารถชักนำชิ้นส่วนใบให้เกิด PLBs ได้มาก (54 – 70 %) และเกิดยอดได้น้อย (7 – 21 %) (Table 1) ซึ่ง PLBs เป็นโครงสร้างพิเศษของกล้วยไม้ที่สามารถขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนต่อไปได้อย่างรวดเร็ว ในส่วนของกล้วยไม้แดงอุบลสามารถชักนำชิ้นส่วนใบเกิด PLBs ได้เพียง 7 % แต่เกิดยอดได้สูงกว่า (18 – 29 %) โดยผลการเพาะเลี้ยงใบกล้วยไม้แดงอุบลครั้งนี้ ให้ผลสอดคล้องกับ Rungruchkanont (2009) ได้เลี้ยงใบอ่อนกล้วยไม้แดงอุบลในอาหารที่มีสาร NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ร่วมกับสาร BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. สามารถชักนำการเกิด PLBs 18 % และยอด 26 % ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิด PLBs น้อยเมื่อเทียบกับการเกิด PLBs ของกล้วยไม้ม้าวิ่ง จากศักยภาพของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีความสามารถในการขยายพันธุ์ได้ดีกว่ากล้วยไม้แดงอุบล อาจเป็นสาเหตุให้การกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติของกล้วยไม้ม้าวิ่งสามารถการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวางทั่วประเทศ ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลมีการกระจายพันธุ์เฉพาะถิ่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ความแตกต่างทางศักยภาพการเพิ่มปริมาณในกล้วยไม้ทั้งสองชนิด

น่าจะมีสาเหตุมาจากจำนวนโครโมโซม กล้วยไม้ม้าวิ่งมีจำนวนโครโมโซม 2n = 38 ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลมีจำนวนโครโมโซม 2n = 76 จึงกล่าวได้ว่ากล้วยไม้แดงอุบลมีระดับพลอยดี (ploidy) มากกว่ากล้วยไม้ม้าวิ่ง ซึ่งเซลล์ที่มีระดับพลอยดีต่างกันจะมีความแตกต่างด้านการพัฒนา สัณฐาน และลักษณะทางสรีรวิทยา เซลล์ที่มีระดับพลอยดีมากจะมีขนาดใหญ่ เนื่องจากระดับพลอยดีควบคุมการแสดงออกของยีน โดยยีน *Cln1* และ *Pcl1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง G_1 cyclins ถูกยับยั้งเมื่อระดับพลอยดีเพิ่มขึ้น ในขั้นตอน cell cycle เซลล์จึงอยู่ในระยะ G_1 ต่อเนื่อง และมีผลทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ (Galitski et al., 1999) การศึกษากายวิภาคการพัฒนาเนื้อเยื่อจากใบพบว่า จุดเริ่มต้นของการพัฒนาเริ่มจากเซลล์ที่ชั้น epidermis มีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอมบริโอ (Fig. 2 a) โซมาติกเอมบริโอมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนและมีพัฒนาการ 3 รูปแบบ คือ โปรโตคอร์ม ยอด และ ราก จากการศึกษาในใบกล้วยไม้หลายชนิด เช่น *Oncidium Phalaenopsis Doritanopsis* การเกิดโซมาติกเอมบริโอเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนา โดยมีการพัฒนาจากเซลล์ชั้น epidermis และโซมาติกเอมบริโอเป็นขั้นตอนเริ่มต้นของการเกิด PLBs (Chen et al., 1999; Park et al., 2002; Chen and Chang, 2006; Gow et al., 2009). ซึ่งเหมือนกับการพัฒนาของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง แต่แตกต่างที่ตำแหน่งของใบในการเกิดโซมาติดเอมบริโอ โดยกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเกิดเอมบริโอที่ตำแหน่งฐานโคนใบเท่านั้น ส่วนกล้วยไม้ 3 ชนิดข้างต้น สามารถเกิดเอ็มบริโอได้ทุกตำแหน่งของใบอ่อน

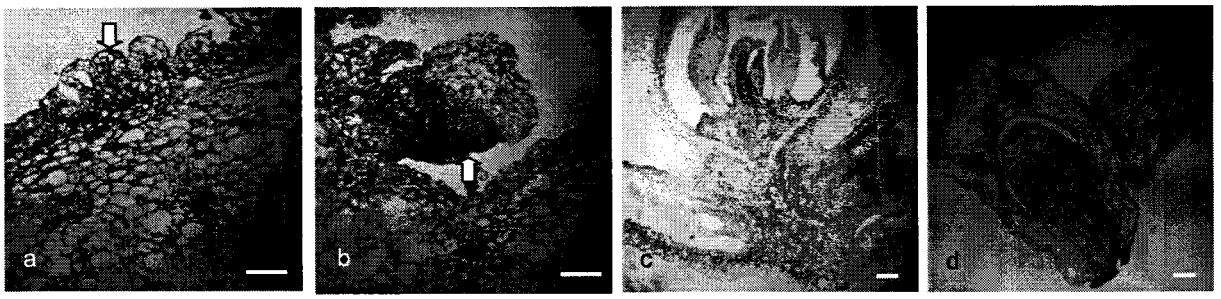


Figure 2 Histology of PLBs formation and plant regeneration from base of basal leaf segments of *Dorits*, embryogenic cell originated from the epidermal layer (a), developing PLBs with high meristermatic cells (b), developing multiple shoots (c), shoot with root (d). Bar = 10μm

สรุปผล

การชักนำ PLBs จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้แดงอุบล สามารถใช้ส่วนโคนใบเพาะเลี้ยงในอาหาร NDM ที่เติมสาร TDZ ความเข้มข้น 1-10 มก./ล. จุดกำเนิดของการพัฒนาเนื้อเยื่อ คือ การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอที่ชั้นเซลล์ epidermis บริเวณโคนใบ โซมาติกเอมบริโอมีการพัฒนาต่อใน 3 รูปแบบ คือ PLBs ยอด และราก ความรู้จากการวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปใช้เพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้ลูกผสมต่างสกุลของสกุลม้าวิ่ง ที่เกิดลูกผสมในจำนวนน้อยมาก เนื่องจากความแตกต่างทางพันธุกรรม ให้มีปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ขอขอบคุณคณะเกษตรศาสตร์ ม. อุบลราชธานี ที่สนับสนุนในการใช้ห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์ต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

Averyanov, L.A. 2009. *Dortis pulcherrima* var. *apiculata* (Orchidaceae): A new variety from southern vietnam and conditions of its natural habitat.. Orchid 78 (12): 9-15.

Chen, J.T. and W.C. Chang. 2001. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. Plant growth regulation 34: 229-232.

Chen, J.T., C. Chang and W.C. Chang. 1999. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* Gower Ramsay and subsequent plant regeneration. Plant Cell Rep. 19:143-149.

Chugh, S., S. Guha and U. Rao. 2009. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. Scientia Hort. 122: 507-520.

Galitski, T., A.J. Saldanha, C.A. Styles, E.S. Lander and G.R. Fink. 1999. Ploidy regulation of gene expression. Science 285: 251-254.

Gow, W.P., J.T. Chen and W.C. Chang. 2009. Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. Acta Physiol Plant 31:363-369.

Park, S.K., E.C. Yeung and D. Chakrabarty. 2002. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. Plant Cell Rep. 21:46-51.

Rungruchkanont, K. 2009. *In vitro* young leaf culture of *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*. J. Ubon Ratchathani University 11 (3) :3-8.

การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ ๑๐

The 10th National Horticultural Congress 2011

ขอมอบเกียรติบัตรเพื่อรับรองว่าผลงานวิจัย ภาคโปสเตอร์

เรื่อง การเกิดโปรโตคอร์มและการพัฒนาเป็นต้นจากใบกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

โดย

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ และ ประภัสสร วงศ์สาลี

ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ และได้นำเสนอในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ ๑๐
ระหว่างวันที่ ๑๘-๒๐ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๕๔

(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนพิภพ เกษมทรัพย์)
ประธานคณะกรรมการดำเนินการ
การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ ๑๐

(ศาสตราจารย์ ดร. สายชล เกตุษา)
ประธานคณะอนุกรรมการฝ่ายวิชาการ
การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ ๑๐

Draft

Role of plant growth regulators on fruit set and embryo culture of interspecific *Phalaenopsis*

Karnchana Rungruchkanont and Thin Promchot

Abstract

Phalaenopsis buyssoniana, a species in *Phalaenopsis* genus that has high chromosome numbers (2n=4x=76), hardly produces interspecific hybrid. In order to overcome this restriction, plant growth regulators were used in this study for 2 phases ; 1) apply *in vivo* after cross pollination to promote fruit set 2) add in culture medium to enhance efficiency of embryo rescue. Auxin treatment applied after cross pollination promoted fruit set of *P. buyssoniana* and *P.* Wedding Promenade. In case of *P.* Wedding Promenade being female parent, 1000 mg L^{-1} 2,4-D had the highest fruit set (73.3%) and enhanced capsule size. While *P. buyssoniana* being female parent, 1000 mg L^{-1} NAA had the highest fruit set (93.3%). The embryos were rescued from 1.5 month old capsule of 2,4-D treated *P.* Wedding Promenade and NAA treated *P. buyssoniana,* in a few numbers. The study of capsule age (1, 1.5, 2 and 2.5 months) and culture medium (100 mg L^{-1} 2,4-D, 50 mg L^{-1}Dicamba, 1 mg L^{-1}Kinetin plus 0.1 mg L^{-1}NAA and 2 g L^{-1} Peptone) were conducted in order to enhance efficiency of embryo rescue. The two months old capsule that cultured in Vacin and Went supplement with 1 mg L^{-1}Kinetin plus 0.1 mg L^{-1}NAA was found highly effective. The synthesis of this interspecific hybrid had been successful when *P.* Wedding Promenade was taken as female parent and *P. buyssoniana* was taken as male parent.

Keywords : auxin, embryo rescue, fruit set, hybrid, *Phalaenopsis* orchid

Introduction

Phalaenopsis is a genus of orchids whose distinctive characteristics make them unique. The flowers of some species supposedly resemble moths in flight. For this reason, the species are sometimes called Moth orchids (Frowine, 2008). All *Phalaenopsis* species are native throughout southeast Asia and northern Australia. Most are epiphytic shade plants; a few are lithophytes. In the wild, some species grow below the canopies of moist and humid lowland forests, protected against direct sunlight; others grow in seasonally dry or cool environments. The species have adapted individually to these three habitats. *Phalaenopsis buyssoniana* Rchb.f. (synonyms: *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) is a lithophyte or terrestrial orchid. It is unlike most other *Phalaenopsis* species with arching inflorescences. *P. buyssoniana* bears pink flowers on an upright flower stem up to 60-120 cm. tall. Its chromosome number is more than other *Phalaenopsis* species, 2n=76, normally 2n=38 (Tanaka and Kamemoto, 1984). This species is found only in northeastern Thailand and Laos. (Christenson, 2001)

Phalaenopsis is by far the most popular type of orchid grown today. During the past decade, commercial production of orchids as potted flowering plants has increased tremendously throughout the world. In the USA, orchids are the second most valuable potted flowering crop, with a total reported wholesale value of US$144 million in 2005 (US Department of Agriculture, 2006). Among all orchid genera sold within the USA, *Phalaenopsis* comprises 85–90% of the potted orchid sales (Nash, 2003) because of their ease of scheduling to meet specific market dates, high wholesale value, and long post-harvest life. In The Netherlands, *Phalaenopsis* was the most valuable potted plant at Dutch flower auctions: 29.4 million plants valued at €143.7 million wholesale were sold in 2005 (Frowine, 2008). According to figures from the Taiwan Orchid Growers

Association published in the May 2007, the export value of *Phalaenopsis* from Taiwan to the USA increased from US$ 8 million in 2005 to US$ 13 million in 2006. World wide sales of Taiwanese Phalaenopsis increased from US$ 27.5 million to 35.4 million from 2005 to 2006. (Frowine, 2008)

Great numbers of *Phalaenopsis* hybrids were produced by orchid breeder in order to serve great marketing demand. *Phalaenopsis pulcherrima* ((synonyms: *Doritis pulcherrima*) is one of the species commonly used in developed multifloras hybrids. *Doritis pulcherrima* has chromosome numbers, 2n =38, and usually used to cross with *Phalaenopsis* species that has the same chromosome number. Nevertheless, it has been no record of *P. buyssoniana* (a member of *Doritis*) to be a parent in *Phalaenopsis* hybrids. The probability is the different in chromosome number or incompatibility alleles restricted the chances of cross-pollination. Plant growth regulators have been used to enhance the success of crossing in many hybrids such as wheat-barley (Khanna et al., 1994), wheat-maize (Kaushik et al., 2004; García-llamas et al., 2004), Lilium hybrid (van Creij et al., 1998), Alstroemeria hybrids (Pulido et al., 1999) and Gossypium hybrids (Rauf et al., 2006). The aim of this research was to examine the potentials of plant growth regulators in promoting *P. buyssoniana* cross.

Materials and Methods

Plant material

Mature plants of *P. buyssoniana* (wild type) and *Phalaenopsis* Wedding Promenade (hybrid) were grown in pots at faculty of Agriculture greenhouse, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani province, Thailand. The cross pollination was done during August to October, 2010 when both *Phalaenopsis* flowering. After flowering, pollinia of *P. buyssoniana* (male) were removed using fine sterilized toothpick and deposited on the stigma of *P.* Wedding Promenade (female). Pollinia from the female parent were removed to prevent self-pollination. Reciprocal cross was also performed.

Effect of auxin on fruit set of interspecific cross

Three kinds of auxin were naphthaleneacetic acid (NAA), indoleacetic acid (IAA) and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), at 1000 mg L^{-1} and alcohol 70% was used as control. The 30 μl of auxin treatments were applied to stigma of female parent after pollination and applied every 2 days for 45 days. Fifteen flowers were used in each treatment. After pollination, physiological changed of female flowers were observed. Then after 45 days fruit set, capsule diameter and capsule length were determined.

Immature embryos establishment in vitro

Green capsules containing the immature embryo were collected from the plant after 45 days of pollination. They were clean with 70% alcohol after that surface sterilization was made by direct flame for 30 second. Green capsules were dissected longitudinally with a sterilized surgical blade. Immature embryos with placenta were removed, and placed to grow on Modified Vacin and Went medium with 10 g/l sucrose (VW). The growth and development of embryo was observed under 3 months.

Capsule age and culture medium on development of immature embryo

Green capsules of *P.* Wedding Promenade (female) x *P. buyssoniana* (male) that treated with 1,000 mg L^{-1} 2,4-D every 2 days, were collected at capsule age of 1, 1.5, 2 and 2.5 months. Capsules were surface sterilized and immature embryos with placenta were cultured on Modified Vacin and Went medium with 10 g/l sucrose (control) and in different treatments. The treatments were: 100 mg L^{-1} 2,4-D, 50 mg L^{-1}Dicamba, 1 mg L^{-}

[1]Kinetin plus 0.1 mg L^{-1}NAA and 2 g L^{-1} Peptone. The growth and development of embryo was observed under 3 months.

Culture condition

The cultures were placed in dark for 1 month and followed by 37.6 μmol m^{-2} s^{-1} illuminate from day light fluorescent tubes (14 h daily) for 2-3 months, under 25 ± 2 °C.

Pollen viability and pollen germination

Self and cross pollinations of *P. buyssoniana* and *P.* Wedding Promenade were done, in order to test pollen viability and pollen germination in natural condition. The seven days pollinia after pollination were moved from stigma of mother plant. A small piece of pollinia was cut out and placed on slide. Pollinia were stained with 1% aceto orcein and covered with cover slip. The observation was done under light microscope at a magnification of 400 times. Pollen viability was count by number of full stained pollens. Pollen was regarded as germinated when pollen tube length was at least twice the pollen grain diameter. Pollen viability and pollen germination were counted in 100 pollens, 6 replicates.

Result

Effect of auxin on fruit set of interspecific cross

The female flowers changed after cross pollination between two Phalaenopsis and reciprocal cross. Two days after pollination, perianths wilted, stigma enlarged and enclosed the pollinia (Fig 1a, 1b). The ovary on pedicel was growth and larger than unpollinated flower during 7 days after pollination (Fig 1c, 1d). At this time, the fail-pollinated flower showed wilting pedicel and flower dropped finally. The effects of three auxins : NAA, IAA and 2,4-D at 1000 mg L^{-1}on fruit set showed in Fig 2. In case of *P.* Wedding Promenade being female parent, 2,4-D had the highest fruit set (73.3%). As NAA, IAA and Alc. (control) presented 66.7%, 46.7% and 26.7%, respectively. When *P. buyssoniana* being female parent, NAA had the highest fruit set (93.3%). As 2,4-D, IAA and Alc. presented only 40.0%, 13.3% and 13.3%, respectively. The effects of three auxins on capsule size showed in Table 1 and 2. There was no difference in capsule diameter of three auxins and control that applied to *P. buyssoniana* flower but the difference was found in 2,4-D that applied to *P.* Wedding Promenade, showing larger capsule diameter than the other treatments except IAA (Table 1). Nevertheless, the auxin treatments had no significant different on capsule length but the application of 2,4-D tend to be the longest capsule (Table 2). From the result, we knew that the average capsule diameter of *P.* Wedding Promenade was 8.4 mm. and the average capsule length was 4.8 cm. Where as, the average capsule diameter of *P. buyssoniana* was 6.4 mm. and the average capsule length was 2.8 cm. The capsule size of *P.* Wedding Promenade was lager than *P. buyssoniana.*

Immature embryos establishment in vitro

The 45 days immature embryos of all auxin treatments were rescued on VW medium. After 3 months of culture, 2,4-D treatment on *P.* Wedding Promenade produced different development stages of embryo such as brown swollen embryo, white swollen embryo, green protocorm and plantlet (Fig. 3). But the other treatments (Alc., NAA, IAA) on *P.* Wedding Promenade could not induce embryo development (Table 3). Among auxin treatments on *P. buyssoniana*, NAA produced different development stages of embryo such as brown swollen embryo, white swollen embryo and green protocorm, where as the other treatments did not. To compare the best auxin treatment in two

Phalaenopsis, 2,4-D applied to *P.* Wedding Promenade showed the best development stages of embryo with 13 green protocorms (5 capsules) and 15 plantlets (4 capsules). As NAA applied to *P. buyssoniana* induced only 25 green protocorms (1 capsule).

Capsule age and culture medium on development of immature embryo

In order to increase efficiency of hybridization, Green capsules of *P.* Wedding Promenade x *P. buyssoniana* that treated with 1,000 mg L^{-1} 2,4-D were collected at 1, 1.5, 2 and 2.5 months. The culture medium treatments were 100 mg L^{-1} 2,4-D, 50 mg L^{-1} Dicamba, 1 mg L^{-1} Kinetin plus 0.1 mg L^{-1}NAA, 2 g L^{-1} Peptone and control. The result found that two months old capsule was suitable time to harvest interspecific *Phalaenopsis* capsule. They presented high percent development embryo (100%) and produced high numbers of developed embryo (61 embryos) (Table 4). The older of 2.5 months decreased number of developed embryo to only 1-2 embryos. The VW supplemented with 1 mg L^{-1} Kinetin plus 0.1 mg L^{-1}NAA was the suitable culture medium for culture interspecific *Phalaenopsis*. The high number of developed embryo was observed in most capsule age, such as 61 embryos in 2 months old capsule, 56 embryos in 1.5 months old capsule and 19 embryos in 1 month old capsule.

Pollen viability and pollen germination

Pollen viability and pollen germination of self and cross pollinations of *P. buyssoniana* and *P.* Wedding Promenade were presented in Table 5. *P.* Wedding Promenade had 73.8- 95.1% pollen viability and *P. buyssoniana* had 94.0-98.0% pollen viability. The pollen of *P. buyssoniana* had 78.1% germination when placed in its stigmatic cavity but the germination was decreased to 47.5% when placed in *P.* Wedding Promenade flower. The same result was presented in pollen of *P.* Wedding Promenade but the germination was lower than those pollinia of *P. buyssoniana.* It presented 61.2% germination when placed in itself but the germination was only 26.0% when it placed in *P. buyssoniana* flower. The ability of pollen germination decreased when pollen was placed in the other stigma variety.

Discussion

The hybridization of *P. buyssoniana* and *P.* Wedding Promenade had been achieved by application of auxins after cross pollination and embryo rescue in suitable medium. The application of different auxins presented different fruit set degree among two mother plants. In case of *P.* Wedding Promenade being female parent, 2,4-D had the highest fruit set (73.3%). While *P. buyssoniana* being female parent, NAA had the highest fruit set (93.3%) (Fig.2). Even *P. buyssoniana* and *P.* Wedding Promenade were in the same *Phalaenopsis* genus but the suitable auxin was difference. However, the application of auxins promoted fruit set of interspecific *Phalaenopsis*. Auxins play role in fruit development in cooperate with GA (Serrani et al., 2008; de Jong et al., 2009; Ruan et al., 2012). Auxins not only promoted fruit set but also increased capsule size. It happened in case of 2,4-D applied to *P.* Wedding Promenade after cross pollination, showing the biggest capsule size (Table 1 and 2). Similar result was found in crosses between wheat and maize, the application of 2,4-D to wheat spikes one day after pollination with maize enabled fertilization frequency and recovered embryo (Laurie and Reymondie, 1991; Wedzony and van Lammeren, 1996; Garacía-Hamas et al., 2004). Auxins have been found in the pollinia of *Dendrobium* and the other orchids (Burg and Dijkman 1967; Ketsa et al., 2001; Stead, 1992) and auxins are known to induce ethylene production in many tissues (Yang and Hoffman, 1984). Auxins function as a primary

pollination signal in the postpollination developmental events of orchid flowers (O'Neill et al., 1993; Porat et al., 1998; Ketsa et al., 2006). In orchid flower, after pollination the signals originating in the stigma were transduced to the other organs of the flower, especially the ovary and perianth (Zhang and O'Neill, 1993). So we early saw the first symptom of perianths wilted in two days and followed by ovary growth after seven days of pollination. The same postpollination event was observed by Zhang and O'Neill (1993) and O'Neill et al. (1993) they found that after Phalaenopsis orchid pollination the signals move rapidly, preceding pollen germination and growth the pollen tubes into the style by at least 4 days and visible wilting symptom found in 48 hr. Both auxin and ethylene contributed to regulation on ovule and ovary development (Rafal et al., 2004; Ketsa et al., 2006) and ethylene induced perianth senescence (Ketsa and Rungkong, 2000). Furthermore, the application of exogenous auxin, such as NAA, induced ovary growth as pollination did (Ketsa et al., 2006). Therefore, the exogenous auxin applied following cross pollination in this experiment could be replaced or promoted cross pollination effect by induced ovary and ovule differentiation resulting in high fruit set. Auxins have been frequently used to stimulate the development of hybrid embryos in order to overcome interspecific and intergeneric crossing barriers. They induce rapid vacuolization and hydrolyzation of the embryo sac which, in turn, restrains fertilization (Matzk, 1991). 45 days old immature embryo of interspecific *Phalaenopsis* culture in VW medium showed high embryo abortion, 59 and 76 brown embryos in treatment 2,4-D applied to *P.* Wedding Promenade and treatment NAA applied to *P. buyssoniana,* respectively. But they got only 25-28 protocorms and plantlets (Table 3). In order to increase efficiency of embryo rescue, we investigated the suitable capsule age and culture medium. The result found that two months old capsule was suitable time to harvest interspecific *Phalaenopsis* capsule. The reason may be it was the time that female gametophyte mature and fertilization happening. Zhang and O'Neill (1993) found that 84 days after self-pollination of *Phalaenopsis*, female gametophyte was mature and fertilization was happen. In this research, the fertilization time was earlier than Zhang and O'Neil's report. It probably was the effect of exogenous auxin application. Koveleva et al. (2005) reported that exogenous applied of IAA and GA3 promoted pollen tube growth while cytokinin hindered its growth. Meanwhile, 2.5 months old capsule (75 days), nearly 84 days, produced only 1-2 developed embryo (Table 4). Among the culture medium treatments; 100 mg L^{-1} 2,4-D, 50 mg L^{-1} Dicamba, 1 mg L^{-1} Kinetin plus 0.1 mg L^{-1}NAA, 2 g L^{-1} Peptone and control, the VW + 1 mg L^{-1} Kinetin plus 0.1 mg L^{-1}NAA was the best culture medium for culture interspecific *Phalaenopsis* (Table 4). The same concentration of Kinetin and NAA was used for hybrid orchid *Bratonia* seed germination (Popova et al., 2003). Additionally, the combination of 2.3 μM kinetin plus 0.5 μM NAA was good for hybrid *Ascocenda* 'Kangla' seedling growth (Kishor et al., 2006). The 2,4-D even though was the suitable hormone for application after cross-pollination, resulting in ovule differentiation and high fruit set, it was not suitable to add in culture medium. The dicamba also was not good to add in culture medium. Even though 2,4-D and dicamba was frequently add in culture medium on haploid production in durum wheat x maize crosses (Knox, et al., 2000; García-llamas et al., 2004).

In order to study the fertility of pollen, pollen viability and pollen germination of self and cross pollinations of *P. buyssoniana* and *P.* Wedding Promenade were illustrated. Both *P. buyssoniana* and *P.* Wedding Promenade presented high pollen viability, 73.8 - 98.0% (Table 5). However, the pollens germinated in lower percentage such as 78.1% in *P. buyssoniana* self pollination and 61.2% in *P.* Wedding Promenade self pollination. So this two *Phalaenopsis* were self fertile. In cross pollination, the ability of pollen germination decreased, resulting 47.5% in *P. buyssoniana* and only 26.0% in *P.* Wedding

Promenade. From the result, we concluded that pollen of *P. buyssoniana* was suitable to be male parent and *P.* Wedding Promenade should be female parent in this cross pollination. As we know *P. buyssoniana* is wild type (species), it produces normal tetrad during meiosis so it is high fertility (Sangdaun, 2011). But *P.* Wedding Promenade is hybrids with chromosome number 2n = 52-55 and has irregular meiotic (unpublished data) so it is low fertility, which should be mother plant in hybridization process. We are concluded that two *Phalaenopsis* cultivars were partially cross compatible.

Reference

Burg, S.P. and Dijkman, M.J. 1967. Ethylene and auxin participate in pollen induced fading of *Vanda* orchid blossoms. Plant Physiology. 42, 1648-1650.

Christenson, E.A. 2001. Phalaenopsis: A Monograph. Timber Press, Portland, Oregon. 330p.

de Jong, M., Mariani, C., Vriezen, W.H. 2009. The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. Journal of Experimental Botany. 60, 1523-1532.

Forwine, S.A. 2008. Moth Orchids. Timber Press, Portland, London. 204p.

García-llamas, C., Martin, A. and Ballesteros, J. 2004. Differences among auxin treatments on haploid production in durum wheat x maize crosses. Plant Cell Report. 23, 46-49.

Kaushik, N., Sirohi, M. and Khanna, V.K. 2004. Influence of age of the embryo and method of hormone application on haploid embryo formation in wheat x maize crosses. Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia, September 26 – October 1, 2004.

Ketsa, S., Bunya-atichart, K. and van Doorn, W.G. 2001. Ethylene production and post-pollination development in *Dendrobium* flowers treated with foreign pollen. Australian Journal of the Plant Physiology. 28, 409-415.

Ketsa, S. and Rugkong, A. 2000. Ethylene production, senescence and ethylene sensitivity of Dendrobium 'Pompadour' flowers following pollination. Journal of Horticultural Science & Biotecnology. 75(2), 149-153.

Ketsa, S., Wisutiamonkul, A. and van Doorn, W.G. 2006. Auxin is required for pollination-induced ovary growth in *Dendrobium* orchids. Functional Plant Biology. 33, 887-892.

Khanna, V.K., Dhaubhadel, S., Kodali, S. and Garg, G.K. 1994. Effect of hormones on wheat-barley crossed, embryo rescue and mitotic and isozymic studies in hybrids. Current Science. 67(12), 1003-1012.

Kishor, R., Sha Valli Khan, P.S. and Sharma, G.J. 2006. Hybridization and in vitro culture of an orchid hybrid *Ascocenda* 'Kangla'. Scientia Horticulturae. 108, 66-73.

Knox, R.E., Clarke, J.M. and DePauw, R.M. 2000. Dicamba and growth condition effects on doubled haploid production in durum wheat crossed with maize. Plant Breeding. 119, 289-298.

Kovaleva, L.V., Zakharova, E.V., Minkina, Y.V., Timofeeva, G.V. and Andreev, I.M. 2005. Germination and in vitro growth of petunia male gametophyte are affected by exogenous hormones and involve the changes in the endogenous hormone level. Russian Journal of Plant Physiology. 52, 521-526.

Laurie, D.A. and Reymondie, S. 1991. High frequencies of fertilization and haploid seedling production in crosses between commercial hexaploid wheat varieties and maize. Plant Breeding. 106, 182-189.

Nash, N. 2003. Phalaenopsis primer: a beginner's guide to growing moth orchids. Orchids. 72, 906-913.

Matzk, F. 1996. Hybrids of crosses between oat and Andropogoneae or Paniceae species. Crop Science. 36, 17-21.

O'Neill, S.D., Nadeau, J.A., Zhang, X.S., Bui, A.Q. and Halevy, A.H. 1993. Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination. The Plant Cell. 5, 419-432.

Phonyiam, S. 2011. Meiotic behavior and cytogenetic study in *Doritis* spp. and *Doritis* hybrids. Master thesis in faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani university, Thailand.

Popova, E.V., Nikishina, T.V., Kolomeitseva, G.L. and Popov, A.S. 2005. The effect of seed cryopreservation on the development of protocorms by the hybrid orchid *Bratonia*. Russian Journal of Plant Physiology. 50(5), 672-677.

Potat, R., Nadeau, J.A., Kirby, J.A., Sutter, E.G. and O'Neill, S.D. 1998. Characterization of the primary pollen signal in the postpollination syndrome of *Phalaenopsis* flowers. Plant Growth Regulation. 24, 109-117.

Pulido, I., Rodríguez, L.E. and Mosquera, T. 1999. Rescue and culture of immature sexual embryos in two crosses of Alstroemeria ('Saxony'x'Tiará' and 'Saxony'x 'Azula'). Acta Horticulturae. 482, 299-304.

Rafal, M., Filek, M., Machačkova, I. and Matthys-Rochon, E. 2004. Ethylene synthesis and auxin augmentation in pistil tissues are important for egg cell differentiation after pollination in maize. Plant Cell Physiology. 45(10), 1396-1405.

Rauf, S., Munir, H., Abdullojon, E. and Basra, S.M. 2006. Role of colchicine and plant growth regulators to overcome interspecific incompatibility. General and Applied Plant Physiology. 32, 223-232.

Ruan, Y., Patrick, J.W., Bouzayen, M., Osorio, S. and Fernie, A.R. 2012. Molecular regulation of seed and fruit set. Trends in Plant Science. 17(11), 656-665.

Serrani, J.C., Ruiz-Rivero, O., Fos, M. and García-Martínez, J.L. 2008. Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. The Plant Journal. 56, 922–934.

Stead, A.D. 1992. Pollination-induced flower senescence: A review. Plant Growth Regulation. 11, 13–20.

Tanaka, R. and Kamemoto, H. 1984. Chromosomes in orchids: counting and numbers. In Orchid Biology: Reviews and Perspectives, III., J. Arditti, editor. Cornell University Press, Ithaca and London, pp 323-410.

US Department of Agriculture. 2006. Floriculture crops 2005 summary. Washington, DC: Agricultural Statistics Board.

van Creij, M.G.M., Kerckhoffs, D.M.F.J. and van Tuyl, J.M. 1998. Application of four pollination techniques and of hormone treatment for bypassing interspecific crossing barriers in *Lilium* L. Proceeding of 19th international symposium on improvement of ornamental plants : breeding ornamentals in the future, France, July 27-30, 1998.

Wedzony, M. and van Lammeren, A.A.M. 1996. Pollen tube growth and early embryogenesis in wheat x maize crossed influenced by 2,4-D. Annals of Botany. 77, 639-647.

Yang, S.F. and Hoffman, N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annual Review of Plant Physiology. 35, 155-189.

Zhang, X.S. and O'Neill, S.D. 1993. Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. The Plant Cell. 5, 403-418.

Figure 1 Physiological change of *P. buyssoniana* flower (a and c) and *P.* Wedding Promenade flower (b and d) after cross pollination.
(a, b) The perianths wilted, stigma enlarged and enclosed the pollinia, 2 days after pollination.
(c, d) The ovary enlarged in diameter and length, 7 days after pollination.

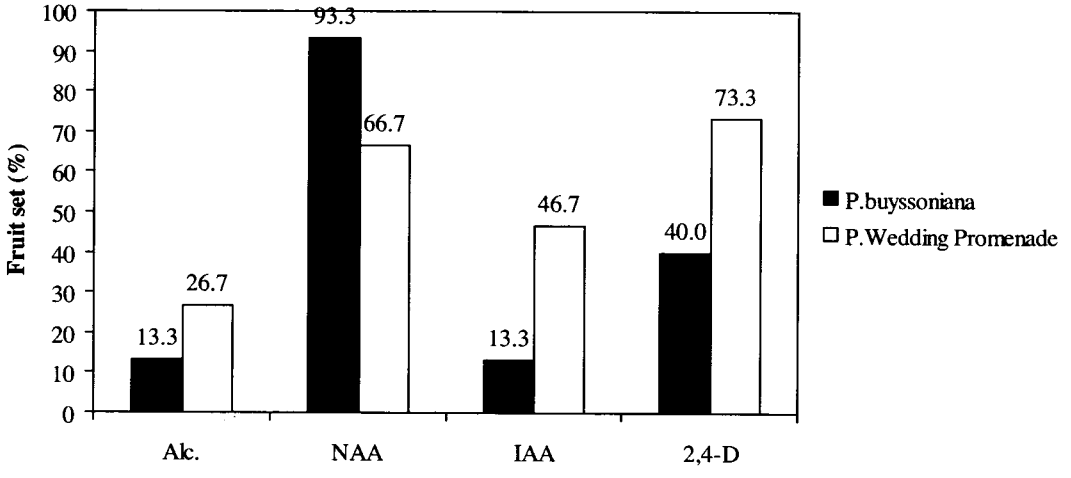


Figure 2 Percentage of fruit set in *P. buyssoniana* and *P.* Wedding Promenade after cross pollination and applied different auxins for 45 days.

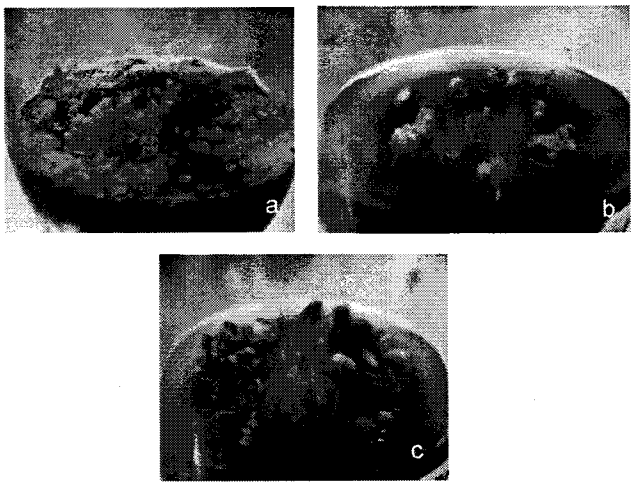


Figure 3 Development of immature embryo from *P.* Wedding Promenade capsule that applied 2,4-D treatment.

(a) white swollen embryo, mostly changed to brown swollen embryo after 2 months of culture

(b) green protocorms

(c) plantlets

Table 1 Capsule diameter of *P. buyssoniana* and *P.* Wedding Promenade after cross pollination and applied different auxins for 45 days.

Female / Treatments	*P. buyssoniana* (mm.)	*P.* Wedding Promenade (mm.)	Average (mm.)
Alc.	6.2 ± 0.1	6.9 ± 0.9 B	6.7 c
NAA	6.5 ± 0.2	7.7 ± 0.4 B	7.0 bc
IAA	6.2 ± 1.0	8.3 ± 0.6 AB	7.8 ab
2,4-D	6.5 ± 0.3	9.5 ± 0.4 A	8.3 a
Average (mm.)	6.4 b	8.4 a	

Means ± S.E. within a column not sharing the same letter were significantly different at *P=0.05* by DMRT, n=15

Average value within a column not sharing the same letter were significantly different at *P=0.05* by DMRT

Average value within a row not sharing the same letter were significantly different at *P=0.05* by DMRT

Table 2 Capsule length of *P. buyssoniana* and *P.* Wedding Promenade after cross pollination and applied different auxins for 45 days.

Female / Treatments	*P. buyssoniana* (cm.)*	*P.* Wedding Promenade (cm.)*	Average (cm.)
Alc.	2.8 ± 0.2	3.8 ± 1.0	3.4 a
NAA	3.0 ± 0.3	4.5 ± 0.6	3.6 a
IAA	3.2 ± 0.2	4.3 ± 0.4	4.0 a
2,4-D	2.5 ± 0.4	5.8 ± 0.5	4.5 a
Average (cm.)	2.8 b	4.8 a	

* Means ± S.E. , n=15

Average value within a column not sharing the same letter were significantly different at *P=0.05* by DMRT

Average value within a row not sharing the same letter were significantly different at *P=0.05* by DMRT

Table 3 Development of immature embryo from *P. buyssoniana* capsule and *P.* Wedding Promenade capsule that applied different auxins treatment, culture in media for 3 months.

Female plant	Treatment	No. capsule	Development of immature embryo (no.)			
			Brown swollen embryo	White swollen embryo	Green protocorm	Plantlet
P.buyssoniana	Alc	2	0	0	0	0
	NAA	14	76.0 (1)	3.0 (1)	25.0 (1)	0
	IAA	2	0	0	0	0
	2,4-D	6	0	0	0	0
*P.*Wedding Promenade	Alc	4	0	0	0	0
	NAA	10	0	0	0	0
	IAA	7	0	0	0	0
	2,4-D	11	59.0±14.5 (5)	3.0 (1)	13.2±11.3 (5)	15.5±7.6 (4)

Value in parentheses shows numbers of capsule that present embryo development

Table 4 Effect of capsule age and culture medium on embryo development of interspecific *Phalaenopsis* after 3 months in culture.

Capsule age (month)	Culture medium	No. replication	No. developing replication	Percent development	No. developed embryo *
1	VW	8	5	62.5	12±13.6
	VW+ 2,4-D	8	0	0	0
	VW + Dicamba	8	0	0	0
	VW + KN + NAA	8	2	25	19±9.9
	VW + Peptone	8	1	12.5	3
1.5	VW	6	2	33.3	21.5±16.2
	VW+ 2,4-D	6	2	33.3	1.5±0.7
	VW + Dicamba	6	0	0	0
	VW + KN + NAA	6	3	50	56±55.2
	VW + Peptone	6	1	16.7	8
2	VW	8	8	100	12±10.4
	VW+ 2,4-D	8	0	0	0
	VW + Dicamba	8	3	37.5	1.9±3.2
	VW + KN + NAA	8	8	100	61.1±82.6
	VW + Peptone	8	4	50	13.8±22.2
2.5	VW	8	2	25	1.5±0.7
	VW+ 2,4-D	8	0	0	0
	VW + Dicamba	8	1	12.5	2
	VW + KN + NAA	8	1	12.5	1
	VW + Peptone	8	1	12.5	1

* mean ± S.E.

Table 5 Pollen viability and pollen germination of *P. buyssoniana* pollinia and *P.* Wedding Promenade pollinia after 7 days of self and cross pollination

Female plant	**Pollinia (male)**	**Pollen viability (%)**	**Pollen germination (%)**
P. Wedding Promenade	*P.* Wedding Promenade	95.1 ± 1.7 a	61.2 ± 9.5 b
P. Wedding Promenade	*P. buyssoniana*	94.0 ± 2.2 a	47.5 ± 17.2 c
P. buyssoniana	*P. buyssoniana*	98.0 ± 2.1 a	78.1 ± 13.6 a
P. buyssoniana	*P.* Wedding Promenade	73.8 ± 11.7 b	26.0 ± 8.0 d

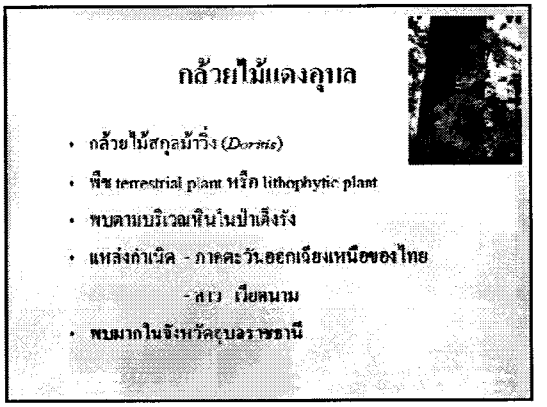
Means ± S.E. within a column not sharing the same letter were significantly different at *P= 0.05* by LSD

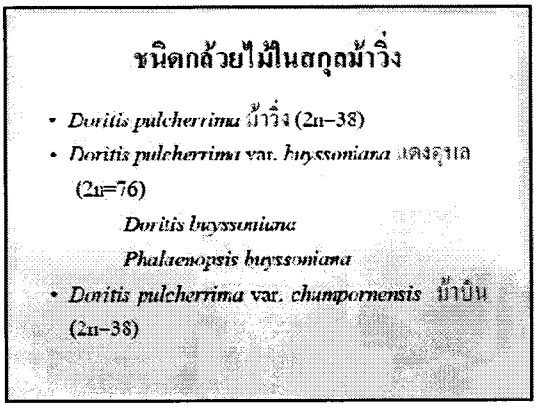
กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

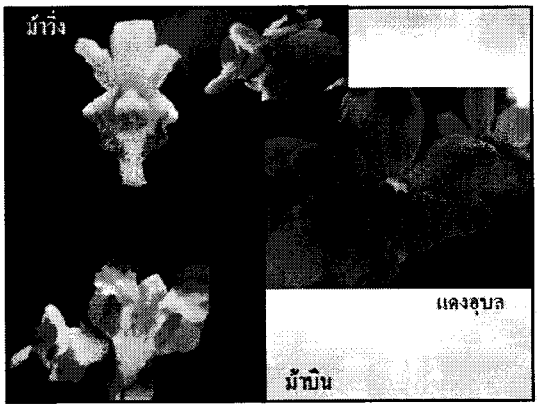
1. โครงการทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม ประจำปี 2556 ชื่อโครงการ การอนุรักษ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง
2. การถวายกล้วยไม้ฟาแลนอปซิส “วาริน วาริน” ซึ่งผลผลิตจากงานวิจัยแด่สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ ในงานพระราชทานปริญญาบัตร เมื่อวันที่ 3 เมษายน 2556
3. การบูรณาการกับการเรียนการสอนวิชาวิทยาการกล้วยไม้เบื้องต้น หลักสูตรปริญญาตรีสาขาเกษตรศาสตร์ ประจำภาคต้นปีการศึกษา 2556
4. การเผยแพร่ผลงาน ในนิทรรศการ “มหกรรมงานวิจัยแห่งชาติ 2556” วันที่ 23-27 สิงหาคม 2556 ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ และบางกอกคอนเวนชั่นเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ จ. กรุงเทพฯ

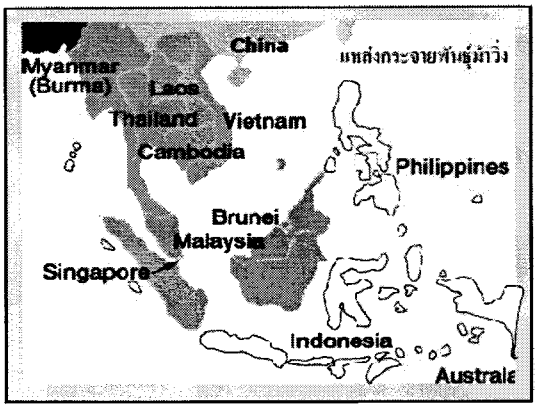
โครงการทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม ประจำปี 2556 ชื่อโครงการ การอนุรักษ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

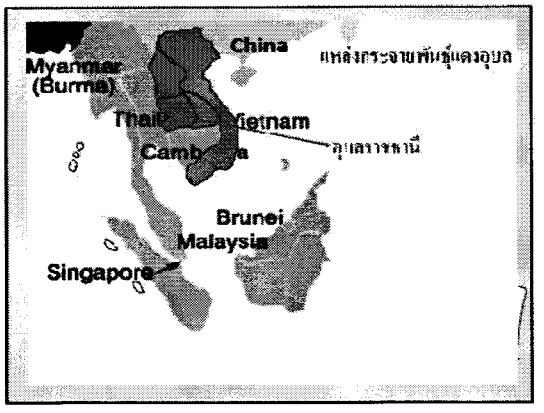
เอกสารประกอบการอบรมการอนุรักษ์กล้วยไม้แดงอุบล

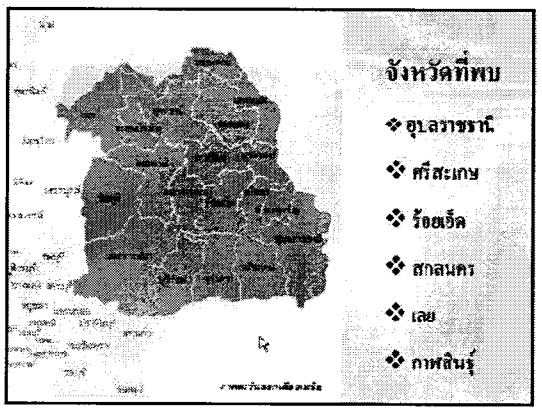




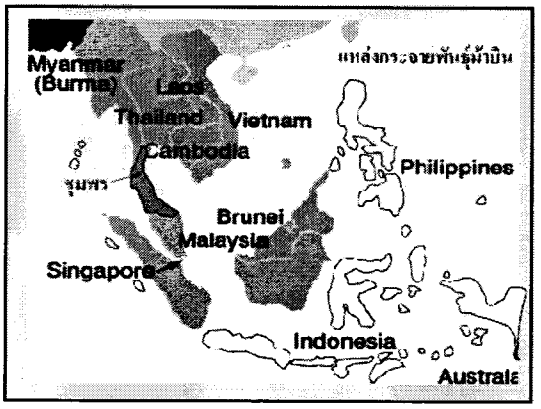




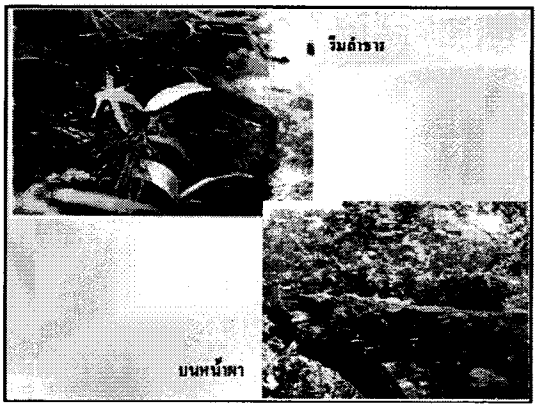



จังหวัดที่พบ
❖ อุบลราชธานี
❖ ศรีสะเกษ
❖ ร้อยเอ็ด
❖ สกลนคร
❖ เลย
❖ กาฬสินธุ์

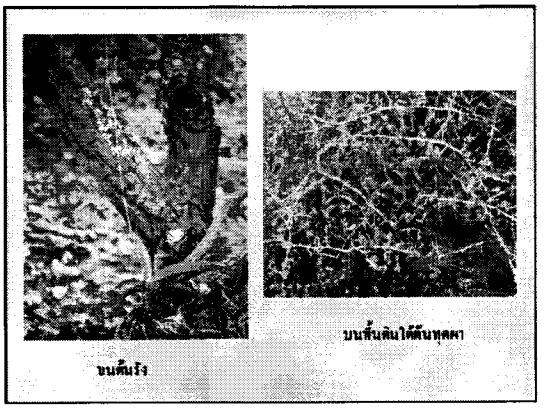
อำเภอที่สำรวจพบ
❖ เทพรัตน์
❖ บุณฑริก
❖ โขงเจียม
❖ เขื่องใน
❖ น้ำยืน
❖ นาจะหลวย

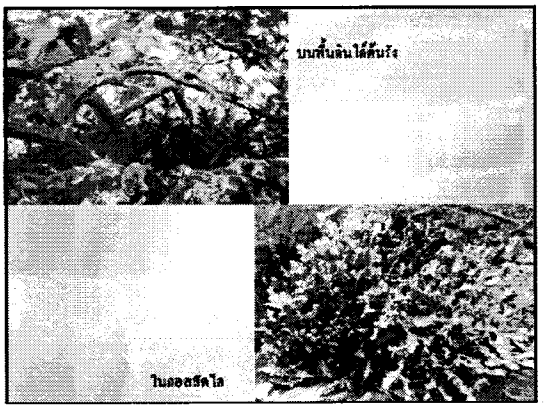

แหล่งกระจายพันธุ์ม้าบิน
Myanmar (Burma)
Laos
Thailand
Vietnam
Cambodia
Philippines
Brunei
Malaysia
Singapore
Indonesia
Australia

ลักษณะภูมิประเทศที่พบ
สภาพภูเขาหิน


ริมลำธาร
บนหน้าผา

บริเวณที่พบกล้วยไม้แดงอุบล
บนต้นจุดดา
บนต้นหรือหน้าผา จอาแจ้ง


ขนดินรัง
บนพื้นดินได้ดีนทุดคา

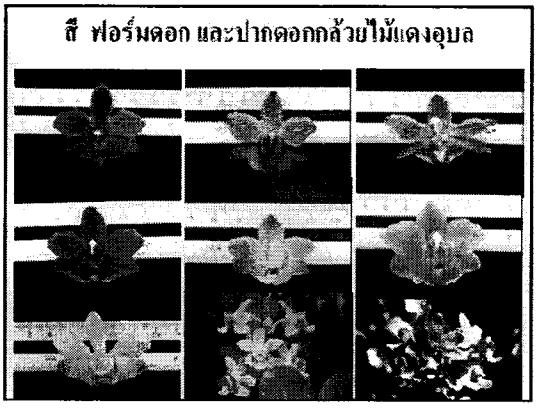

บนพื้นดินได้ดีนรัง
ในออสมิดไล

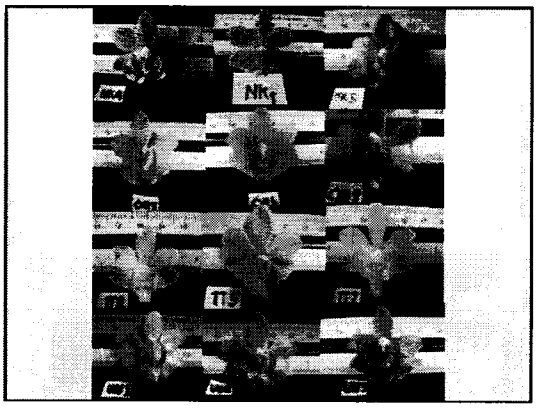
ศัตรูตามธรรมชาติ
วัวกัดกินใบและต้น
หนอนและแมลงกัดกินใบ

เพลี้ยไฟดูดน้ำเลี้ยงดอก
ค่ายเก็บกล้วยไม้มาขาย

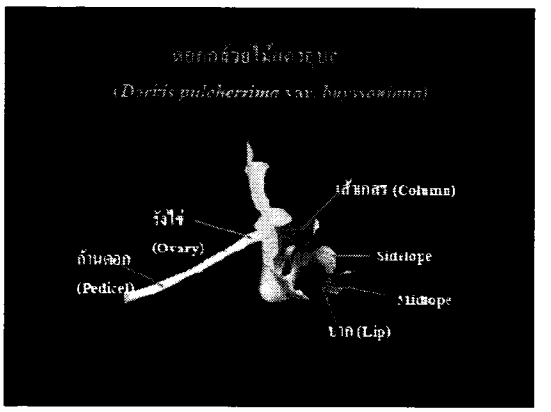
ลักษณะการเจริญเติบโต
แตกหน่อเป็นกอตามธรรมชาติ
(Sympodial growth)

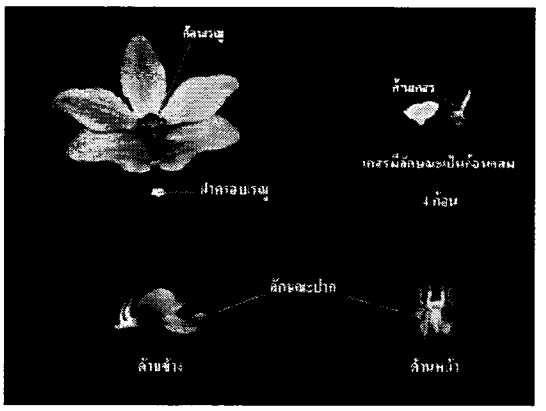
ลักษณะ รูปร่าง และสีของใบ

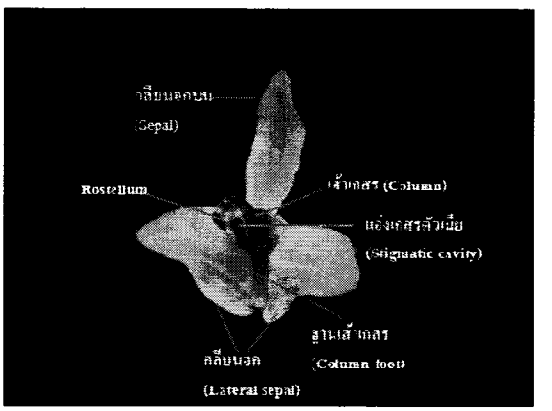

สี ฟอร์มดอก และปากดอกกล้วยไม้แดงอุบล



(Doritis pulcherrima var. buyssoniana)
กลีบนอก (sepal)
กลีบใน (Petal)
กลีบใน (Petal)
เส้าเกสร (Column)
ฝาครอบเกสรตัวผู้ (Aather cap)
ปาก (Lip. Labellum)
กลีบนอก (Lateral sepal)


(Doritis pulcherrima var. buyssoniana)
เส้าเกสร (Column)
รังไข่ (Ovary)
ก้านดอก (Pedicel)
Sidelope
Midlope
ปาก (Lip)


ก้านชูช่อ
ก้านเกสร
เกสรมีลักษณะเป็นก้อนเหนียว
4 ก้อน
ฝาครอบเรณู
ลักษณะปาก
ล้ายช้าง
ล้ายหมี

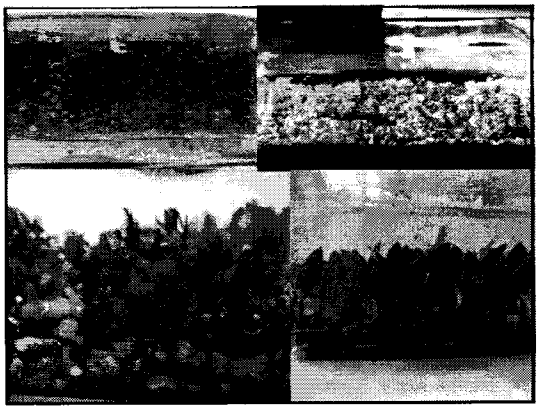

กลีบนอกบน (Sepal)
Rostellum
เส้าเกสร (Column)
แอ่งเกสรตัวเมีย (Stigmatic cavity)
ฐานเส้าเกสร (Column foot)
กลีบนอก (Lateral sepal)

การผสมพันธุ์ในธรรมชาติ

แมลงช่วยในการผสมพันธุ์และติดฝัก การติดฝักและผลการเจริญเติบโตของฝัก

การขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด

ฝักแก่ที่ยังไม่แตก
เพาะในอาหาร VW ไม่มีน้ำตาล เก็บไว้ในที่มืด 15-33 วัน
เมื่อเมล็ดงอกนำมาให้แสง เปลี่ยนถ่ายอาหาร 2-3 ครั้ง จนต้นสูงขนาด



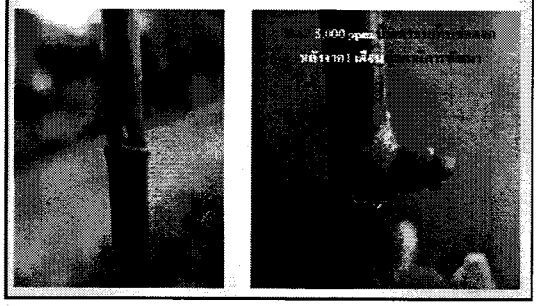
นำขวดที่ต้นกล้วยไม้สูงขนาดไปไว้ในที่มีสภาพอุณหภูมิ
ใกล้เคียงกับโรงเรือนอนุบาลกล้วยไม้ 2-4 สัปดาห์ เพื่อให้ลูก
กล้วยไม้ปรับตัว หลังจากนั้นจึงนำลูกกล้วยไม้ออกจากขวด
ล้างทำความสะอาดรุ้นออก และนำไปปลูกในภาชนะ

การขยายพันธุ์จากใบอ่อน

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อน

นำใบอ่อนมาเลี้ยงในอาหารสูตร New Dogashima medium ที่เติมสาร สาร BAP ความเข้มข้น 1 มก./ล ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล ใช้ใบที่มีส่วนโคนใบติดกับต้นวางนอนราบบนอาหารเป็นเวลา 2-3 เดือน จะได้แคลลัส โปรโตคอร์ม และยอดใหม่หลายยอดเกิดขึ้นบริเวณส่วนโคนก้านใบ

การขยายพันธุ์จากช่อดอก

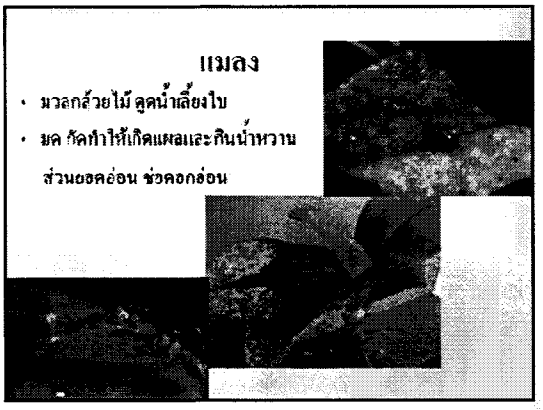


การปลูกเลี้ยง

- ใช้วัสดุปลูกที่มีการระบายน้ำดี เช่น ถ่าน หิน เศษกระถางแคก ปิดทับวัสดุปลูกด้วยใบไม้แห้งบางๆ ถ้าความชื้นต่ำ
- สภาพแสง 50-80% ในช่วงก่อนออกดอกต้องการแสงมาก ถ้าอยู่ในที่ร่มเกินไปไม่ออกดอก (ออกดอกดูฝน)
- ฉีดยาป้องกันมดเมื่อเริ่มแทงช่อดอกอ่อน
- ฉีดยาป้องกันเชื้อรา เมื่อสภาพอากาศมีความชื้นสูง

โรค

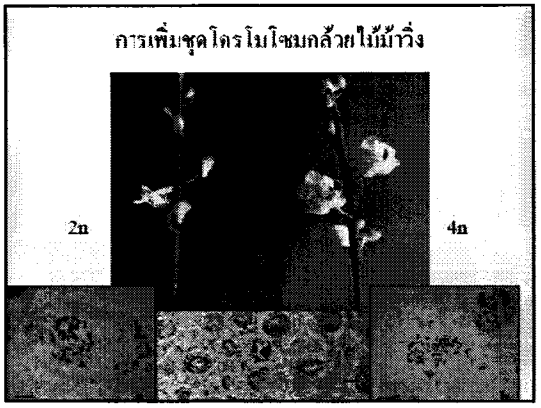
- โรคใบปื้นเหลือง
- โรคเน่าจากเชื้อรา


แมลง
• มวลกล้วยไม้ ดูดน้ำเลี้ยงใบ
• มด กัดทำให้เกิดแผลและกินน้ำหวาน
ส่วนยอดอ่อน ช่วงดอกอ่อน

ดูดน้ำเลี้ยงดอก
หนอนกัดกินใบ

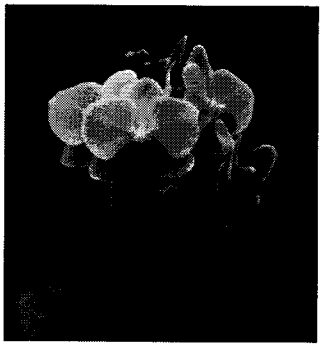
หอยทาก กัดกินรากและใบ

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้แคงอุบล
Asconopsis Purple Ubon
Phalaenopsis Warin Bride


การเพิ่มชุดโครโมโซมกล้วยไม้ม้าวิ่ง
2n
4n

ขอให้ทุกท่านได้ร่วมกันอนุรักษ์กล้วยไม้แคงอุบล
ให้เป็นเอกลักษณ์ของชาวอุบลอย่างยั่งยืน

การถวายกล้วยไม้ฟาแลนอปซิส 'วาริน วาริน' ซึ่งเป็นผลผลิตจากงานวิจัยแด่สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ
ในงานพระราชทานปริญญาบัตร เมื่อวันที่ 3 เมษายน 2556



ข้อมูลกล้วยไม้ฟาแลนอปซิส 'วาริน วาริน' เป็นกล้วยไม้ที่มีการพัฒนาพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนพลาเซนตาและไข่อ่อน ภายในรังไข่ มีคุณลักษณะพิเศษ คือ สามารถปลูกเลี้ยงเจริญเติบโตเร็ว และออกดอกได้ในที่มีอุณหภูมิสูง เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ต้นมีขนาดเล็ก ดอกมีสีม่วง ขนาดกะทัดรัด ช่อดอกเรียงตัวแน่นเป็นระเบียบ เหมาะสำหรับใช้ประดับตกแต่งภายในบ้านและที่ทำงาน เนื่องจากดอกมีอายุการบานนานถึง 2 เดือน และสามารถอยู่ในสถานที่ที่มีแสงน้อยได้

การบูรณาการกับการเรียนการสอนวิชาวิทยาการกล้วยไม้เบื้องต้น

หลักสูตรปริญญาตรีสาขาเกษตรศาสตร์ ประจำภาคต้นปีการศึกษา 2556

Course Syllabus

ภาควิชาพืชสวน

คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

วิชา	: 1202 446 วิทยาการกล้วยไม้เบื้องต้น (Principles of Orchidology)
หน่วยกิต	: 3 หน่วยกิต
จำนวนชั่วโมง / สัปดาห์	: 2-3-4 (บรรยาย-ปฏิบัติการ-ทบทวน)
เงื่อนไข	: ไม่มี
ภาค-ปีการศึกษา	: ต้น / 2556
ผู้ประสานงานวิชา	: ผศ. ดร. กาญจนา รุ่งรัชกานนท์
อาจารย์ผู้สอน	: ผศ. ดร. กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ ผศ. ดร. ยุวดี ชูประภาวรรณ ดร. สุกัญญา คลังสินศิริกุล
นักวิชาการและเจ้าหน้าที่	: นายบรรพต คชประชา น.ส. จำนงค์ จันทะสี นางขนิษฐา วันทา
ตารางเรียน	: บรรยาย Mo, Wed 10.00 - 11.00 ห้อง B 215 : ปฏิบัติการ Wed 13.00 - 16.00 ห้องปฏิบัติการและเรือนเพาะชำ คณะเกษตรศาสตร์
วันสอบกลางภาค	: กำหนดภายหลังตามตารางกลาง
วันสอบปลายภาค	: กำหนดภายหลังตามตารางกลาง
การประเมินผล	: สอบกลางภาค 30 % : สอบปลายภาค 30 % : งานที่มอบหมายและกิจกรรมกลุ่ม 30 % (การอนุรักษ์ฯและสัปดาห์วิทยาศาสตร์ 10%) : เวลาเข้าเรียน 10 %
การตัดเกรดอิงเกณฑ์	: เกรด 8 ระดับคือ A (81-100) B+ (76-80) B (71-75) C+ (66-70) C (61-65) D+ (56-60) D (50-55) F (<50)

หัวข้อบรรยาย	จำนวนชั่วโมง	ว/ด/ป	อ. ผู้สอน
1. บทนำ	1	3 / 6	อ.กาญจนา
2. ประวัติการปลูกกล้วยไม้	1	5 / 6	อ. กาญจนา
3. ส่วนต่างๆของกล้วยไม้	2	10, 12 / 6	อ. กาญจนา
4. การจำแนกกล้วยไม้และกล้วยไม้สกุลต่างๆ	6	17, 19, 24, 26 / 6	1, 3 / 7
4.1 สกุลหวาย			อ. กาญจนา
4.2 สกุลคัทลียา, ออนซิเดียม, ซิมบิเดียม			อ. กาญจนา
4.3 สกุลรองเท้านารี			อ. กาญจนา
4.4 สกุลกุหลาบ, เข็ม, ช้าง, ม้าวิ่ง (กล้วยไม้แดงอุบล)			อ. กาญจนา
4.5 สกุลแวนดา, แอสโคเซ็นดา, ฟาแลนนอปซิส			อ. กาญจนา
4.6 สกุลแมลงปอ, รีแนนเธอรา			อ. กาญจนา
5. การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยไม่ใช้เพศ	1	8 / 7	อ. กาญจนา
6. การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยการผสมเกสร	1	10 / 7	อ. กาญจนา
- การใช้สารออกซินช่วยการผสมข้ามสกุลกล้วยไม้แดงอุบล			
- **การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง**			
7. การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้	1	15 / 7	อ. กาญจนา
- การเพาะเลี้ยงเมล็ดและใบอ่อนกล้วยไม้แดงอุบล			
8. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้			
8.1 โรงเรือนกล้วยไม้และวัสดุปลูก	2	17, 24/ 7	อ. กาญจนา
8.2 น้ำและการรดน้ำ การปรับปรุงคุณภาพของน้ำรดกล้วยไม้	1	5 / 8	อ. กาญจนา
8.3 ปุ๋ยและการให้ปุ๋ยกล้วยไม้	2	7, 14/ 8	อ. กาญจนา
9. ศัตรูของกล้วยไม้และการป้องกันกำจัด			
9.1 แมลงศัตรูกล้วยไม้	2	21, 26 / 8	อ. สุกัญญา
9.2 โรคกล้วยไม้	2	28 / 8, 2 / 9	อ. ยุวดี
10. การเขียนชื่อกล้วยไม้	1	4 / 9	อ. กาญจนา
11. การปลูกกล้วยไม้ลงแปลงและใช้ในการประดับ	1	9 / 9	อ. กาญจนา .
12. การตัดสินกล้วยไม้และสังคมกล้วยไม้	2	11, 16 / 9	อ. กาญจนา
13. เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวกล้วยไม้	2	18, 23 / 9	อ. กาญจนา
- การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตช่วยยืดอายุการใช้งาน			
14. ธุรกิจกล้วยไม้	2	25 / 9	อ. กาญจนา
- โลจิสติกส์ของกล้วยไม้ตัดดอกเพื่อการส่งออก			

การเผยแพร่ผลงาน ในนิทรรศการ "มหกรรมงานวิจัยแห่งชาติ 2556"
วันที่ 23-27 สิงหาคม 2556 ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ และบางกอกคอนเวนชั่นเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์

รางวัลที่ได้รับทางนวัตกรรมจากมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ผลงานวิจัยเรื่อง "การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อเป็นไม้ประดับกระถาง" ในงานประชุมวิชาการ มอบ.วิจัย ครั้งที่ 7

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

มอบเกียรติบัตรนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

ผลงานวิจัยเรื่อง การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อเป็นไม้ประดับกระถาง

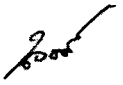
โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ และคณะ

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ได้รับรางวัล ผลงานวิจัยนวัตกรรม

ในการประชุมวิชาการ มอบ.วิจัย ครั้งที่ ๗

ให้ไว้ ณ วันที่ ๒๕ กรกฎาคม พุทธศักราช ๒๕๕๖



(รองศาสตราจารย์ ดร.นงนิตย์ ธีระวัฒนสุข)

อธิการบดีมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

การแสดงวัตถุประสงค์ และเปรียบเทียบกิจกรรมที่วางแผนและที่ดำเนินการ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) เพื่อสร้างกล้วยไม้ลูกผสมต่างสกุล สามารถผลิตเป็นไม้ประดับกระถาง
2) เพื่อสร้างกล้วยไม้ลูกผสมต่างสกุลเพื่อให้ออกดอกตลอดทั้งปี และมีรูปร่างลักษณะดอกสวยสะดุดตา

เปรียบเทียบการดำเนินงานที่เสนอไว้ในแผนงานวิจัยกับกับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการจริง

กิจกรรม (ตามแผน)	ผลที่คาดว่าจะได้รับ (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน	หมายเหตุ
1. รวบรวมเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสกุลอื่นๆเพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์	1. ได้เชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสกุลอื่นๆ เพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์	1. เป็นไปตามแผน	-
2. สร้างลูกผสมกล้วยไม้สายพันธุ์ต่างๆ	2. ได้ฝักกล้วยไม้ลูกผสม	2. เป็นไปตามแผน	-
3. เพาะเมล็ดกล้วยไม้ลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อ	3. ได้ต้นอ่อนของกล้วยไม้ลูกผสม	3. เป็นไปตามแผน	-
4. วิเคราะห์ DNA พิสูจน์ความเป็นพันธุ์ใหม่	4. ได้กล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่	4. เป็นไปตามแผน	-
5. อนุบาลลูกกล้วยไม้ลูกผสมจากการเพาะเมล็ดในโรงเรือนเพื่อเป็นการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA	5. ได้กล้วยไม้ลูกผสมเพื่อทำการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA	5. เป็นไปตามแผน	-
6. คัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะดี	6. ได้กล้วยไม้ลูกผสมที่มีลักษณะดีเหมาะเป็นไม้กระถาง	6. เป็นไปตามแผน	-

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวกาญจนา รุ่งรัชกานนท์
(ภาษาอังกฤษ) Ms Karnchana Rungrachakanont
ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สถานที่ทำงาน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี 34190
โทรศัพท์ 045-353500 โทรสาร 045-288375
E-mail : rungruch@agri.ubu.ac.th

ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ.ที่จบ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
ปร.ด. (เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว)	2550	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย
วท.ม. (ชีววิทยาสภาวะแวดล้อม)	2540	มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย
วท.บ (เกษตรศาสตร์)	2529	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย

สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

Orchidology, Plant tissue culture, Postharvest of ornamental plant

2. ชื่อ (ภาษาไทย) นายทินน์ พรหมโชติ
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Thin Promchot
ตำแหน่งปัจจุบัน พนักงานมหาวิทยาลัย (อาจารย์)
สถานที่ทำงาน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี 34190
โทรศัพท์ 045-353563 โทรสาร 045-288373
E-mail: promchot@agri.ubu.ac.th
agsuthpr@ubu.ac.th

ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
วท.ด. (พืชสวน)	2551	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย
วท.ม. (เกษตรศาสตร์)	2545	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย
วท.บ. (เกษตรศาสตร์)	2541	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย

สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

DNA Markers, Plant Breeding, Quantitative Genetics

3. ชื่อ (ภาษาไทย) นายภาณุ เรืองจันทร์
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Panu Ruangjan
ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย
สถานที่ทำงาน หน่วยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ
สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
54 หมู่ 4 ถ. วิภาวดีรังสิต หลักสี่ กรุงเทพฯ 10210
โทรศัพท์: 025740622-33 ต่อ 1401
โทรสาร: 025731694
E-mail: panu@cri.or.th

ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	**ปีพ.ศ.ที่จบ**	**ชื่อสถานศึกษาและประเทศ**
ปร.ด. (พันธุวิศวกรรม)	2548	มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย
วท.ม. (พืชสวน)	2533	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย
วท.บ (เกษตรศาสตร์)	2529	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย

สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

Molecular Genetic and Genetic Engineering, Plant Breeding, Micropropagation of ornamental plant