การศึกษาพฤติกรรมไมโอซิสและเซลล์พันธุศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม

แสงเดือน พลเยี่ยม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

MEIOTIC BEHAVIOR AND CYTOGENETIC STUDY IN *DORITIS* SPP. AND *DORITIS* HYBRIDS

SANGDAUN PHONYIAM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

MAJOR IN AGRICULTURE

FACULTY OF AGRICULTURE

UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

YEAR 2011

COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์

เรื่อง การศึกษาพฤติกรรมไมโอซิสและเซลล์พันธุศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม

ผู้วิจัย นางสาวแสงเดือน พลเยี่ยม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา รุ่งรัชกานนท์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ถาวร สุภาพรม)

..... กรรมการ

(ดร.สุจิตรา สืบนุการณ์)

..... กรรมการ

(ดร.สุกัญญา คลังสินศิริกุล)

..... คณบดี

(รองศาสตราจารย์ ดร.วัชรพงษ์ วัฒนกูล)

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี รับรองแล้ว

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุทิศ อินทร์ประสิทธิ์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ปฏิบัติราชการแทนอธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2554

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ทางวิชาการ วิธีการดำเนินการวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาและคำชี้แนะในการแก้ไขปัญหาตลอดระยะเวลาการทำวิจัย ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ถาวร สุภาพรม ซึ่งเป็นคณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้เสียสละเวลาในการให้ข้อเสนอแนะ รวมถึงข้อคิดต่าง ๆ และช่วยตรวจแก้ไข จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. สุกัญญา คลังสินศิริกุล และ ดร.สุจิตรา สืบนุการณ์ ที่เป็นกรรมการและผู้ที่ให้คำแนะนำตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ นักวิชาการเกษตรและเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่ช่วยเหลือทางด้านเครื่องมือและอำนวยความสะดวกในระหว่างการทำวิจัย ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ช่วยเหลือทางด้านการทำวิจัย ทั้งให้คำแนะนำและให้กำลังใจตลอดมา ขอขอบคุณคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยจนทำให้ประสบผลสำเร็จ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ-คุณแม่ ที่ช่วยสนับสนุนการเรียน ทั้งทางด้านทุนทรัพย์ และให้กำลังใจในการทำวิจัย รวมถึงญาติพี่น้องทุก ๆ ท่านที่ให้กำลังใจเช่นกันจนทำให้ประสบผลสำเร็จ

(นางสาวแสงเดือน พลเยี่ยม)
ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : การศึกษาพฤติกรรมไมโอซิสและเซลล์พันธุศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม

โดย : แสงเดือน พลเยี่ยม

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา : เกษตรศาสตร์

ประธานกรรมการที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา รุ่งรัชกานนท์

ศัพท์สำคัญ : กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง โครโมโซม ไมโอซิส ลูกผสม

วิทยานิพนธ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์ไมโอซิส ศึกษาลักษณะและรูปร่างโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม และประเมินการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งด้วยสารโคลชิซิน ผลการศึกษาพบว่า กล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล มีความสมบูรณ์พันธุ์สูง มีการแนบชิดของคู่โครโมโซมในระยะไดอะคิเนซิส (diakinesis) และการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็นปกติ (tetrad) ส่วนสายพันธุ์ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง และลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล การแนบชิดของโครโมโซมผิดปกติคือ พบทั้งโครโมโซมเดี่ยว (univalent) โครโมโซมคู่ (bivalent) และโครโมโซม 3 แท่ง (trivalent) นอกจากนี้ยังพบว่าลูกผสมสองสายพันธุ์ มีโครโมโซมที่เคลื่อนไปสู่ขั้วเซลล์ช้ากว่าปกติ (chromosome lagging) โครโมโซมที่มีโครงสร้างคล้ายสะพาน (chromosome bridge) และพบไมโครนิวเคลียส (micronucleus) ในระยะแอนาเฟส I และเทโลเฟส I และมีการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็น tetrad ลดลง เมื่อศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์จากความมีชีวิต การงอกของเรณู และเปอร์เซ็นต์การผสมติดสามารถยืนยันได้ว่า ความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ลดลงเมื่อเทียบกับกล้วยไม้พันธุ์แท้ (แดงอุบลและม้าวิ่ง) จากการศึกษาลักษณะและรูปร่างของโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง พบว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งและม้าบินเป็นดิพลอยด์ที่มีลักษณะและรูปร่างของโครโมโซมคล้ายคลึงกัน ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลเป็นเททระพลอยด์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ อัลโลเททระพลอยด์ (allotetraploid) ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง เป็นทริพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซมร่างกาย 57 แท่ง (2n=57) การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากได้รับสารโคลชิซิน พบว่า ได้ต้นที่เป็นเททระพลอยด์ (2n = 4x) และออกตะพลอยด์ (2n = 8x) และพบต้นมิกโซพลอยด์เกิดขึ้น ต้นออกตะพลอยด์มีความสูงต้นและความยาวรากลดลง ใบมีขนาดเล็ก ลำต้นสั้น และมีจำนวนใบต่อ

ต้นน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ ในขณะที่ต้นมิกโซพลอยด์นั้นไม่แตกต่างจากต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ ทั้งความสูงต้น จำนวนใบต่อต้น ขนาดใบและขนาดลำต้น

ABSTRACT

TITLE : MEIOTIC BEHAVIOR AND CYTOGENETIC STUDY IN *DORITIS* SPP. AND *DORITIS* HYBRIDS

BY : SANGDAUN PHONYIAM

DEGREE : MASTER OF SCIENCE (AGRICULTURE)

MAJOR : AGRICULTURE

CHAIR : ASST. PROF. KARNCHANA RUNGRUCHKANONT, Ph.D

KEYWORDS : *DORITIS* / CHROMOSOME / MEIOSIS / HYBRID

Objectives of this thesis were to determine the meiotic behavior and characteristics of *Doritis* spp. and *Doritis* hybrid chromosomes and to evaluate the increased ploidy level in *Doritis pulcherrima* after colchicine treatment. Meiotic behavior of *Doritis pulcherrima* and *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* (*Doritis* spp.) had normal synapsis of bivalent meiotic chromosomes in diakinesis, high normal tetrad and fertility. In two *Doritis* hybrids, *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* x *Doritis pulcherrima* and *Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis* x *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*, chromosome synapses were abnormal. The univalent, bivalents and trivalents were observed. Because of abnormally meiotic configuration (anaphase I and telophase I), the high percentage of chromosome lagging and micronucleus development were found in both hybrids. Consequently, both hybrids produced low normal tetrad microspores. The fertility of both *Doritis* hybrids was tested on pollen viability, pollen germination and fruit set. These confirmed the lower fertility of both hybrids compared with that of *Doritis* spp. Characteristics of chromosome in *Doritis* spp. have been studied. *Doritis pulcherrima* and *Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis* were diploid and similar. *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* was tetraploid (allotetraploid). *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* x *Doritis pulcherrima* was triploid and had somatic chromosome number of 57, (2n = 57). The increased ploidy level in *Doritis pulcherrima* after colchicine treatment was evaluated. The tetraploid (2n = 4x), octaploid (2n = 8x), and the mixoploid plants were observed. The octaploid plants had shorter stems, smaller leaf size, smaller length of whole plant and smaller leaf number than diploid plants.

The morphology of mixoploid plants was not significantly different from diploid and tetraploid plants in leaf size, stem size, leaf number and length of whole plant.

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : การศึกษาพฤติกรรมไมโอซิสและเซลล์พันธุศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม

โดย : แสงเดือน พลเยี่ยม

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา : เกษตรศาสตร์

ประธานกรรมการที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา รุ่งรัชกานนท์

ศัพท์สำคัญ : กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง โครโมโซม ไมโอซิส ลูกผสม

วิทยานิพนธ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์ไมโอซิส ศึกษาลักษณะและรูปร่างโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม และประเมินการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งด้วยสารโคลชิซิน ผลการศึกษาพบว่า กล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล มีความสมบูรณ์พันธุ์สูง มีการแนบชิดของคู่โครโมโซมในระยะไดอะคิเนซิส (diakinesis) และการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็นปกติ (tetrad) ส่วนสายพันธุ์ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง และลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล การแนบชิดของโครโมโซมผิดปกติคือ พบทั้งโครโมโซมเดี่ยว (univalent) โครโมโซมคู่ (bivalent) และโครโมโซม 3 แท่ง (trivalent) นอกจากนี้ยังพบว่าลูกผสมสองสายพันธุ์ มีโครโมโซมที่เคลื่อนไปสู่ขั้วเซลล์ช้ากว่าปกติ (chromosome lagging) โครโมโซมที่มีโครงสร้างคล้ายสะพาน (chromosome bridge) และพบไมโครนิวเคลียส (micronucleus) ในระยะแอนาเฟส I และเทโลเฟส I และมีการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็น tetrad ลดลง เมื่อศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์จากความมีชีวิต การงอกของเรณู และเปอร์เซ็นต์การผสมติดสามารถยืนยันได้ว่า ความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ลดลงเมื่อเทียบกับกล้วยไม้พันธุ์แท้ (แดงอุบลและม้าวิ่ง) จากการศึกษาลักษณะและรูปร่างของโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง พบว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งและม้าบินเป็นดิพลอยด์ที่มีลักษณะและรูปร่างของโครโมโซมคล้ายคลึงกัน ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลเป็นเททระพลอยด์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ อัลโลเททระพลอยด์ (allotetraploid) ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง เป็นทริพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซมร่างกาย 57 แท่ง (2n=57) การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากได้รับสารโคลชิซิน พบว่า ได้ต้นที่เป็นเททระพลอยด์ (2n = 4x) และออกตะพลอยด์ (2n = 8x) และพบต้นมิกโซพลอยด์เกิดขึ้น ต้นออกตะพลอยด์มีความสูงต้นและความยาวรากลดลง ใบมีขนาดเล็ก ลำต้นสั้น และมีจำนวนใบต่อ

ต้นน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ ในขณะที่ต้นมิกโซพลอยด์นั้นไม่แตกต่างจากต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ ทั้งความสูงต้น จำนวนใบต่อต้น ขนาดใบและขนาดลำต้น

ABSTRACT

TITLE : MEIOTIC BEHAVIOR AND CYTOGENETIC STUDY IN *DORITIS* SPP. AND *DORITIS* HYBRIDS

BY : SANGDAUN PHONYIAM

DEGREE : MASTER OF SCIENCE (AGRICULTURE)

MAJOR : AGRICULTURE

CHAIR : ASST. PROF. KARNCHANA RUNGRUCHKANONT, Ph.D

KEYWORDS : *DORITIS* / CHROMOSOME / MEIOSIS / HYBRID

Objectives of this thesis were to determine the meiotic behavior and characteristics of *Doritis* spp. and *Doritis* hybrid chromosomes and to evaluate the increased ploidy level in *Doritis pulcherrima* after colchicine treatment. Meiotic behavior of *Doritis pulcherrima* and *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* (*Doritis* spp.) had normal synapsis of bivalent meiotic chromosomes in diakinesis, high normal tetrad and fertility. In two *Doritis* hybrids, *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* x *Doritis pulcherrima* and *Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis* x *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*, chromosome synapses were abnormal. The univalent, bivalents and trivalents were observed. Because of abnormally meiotic configuration (anaphase I and telophase I), the high percentage of chromosome lagging and micronucleus development were found in both hybrids. Consequently, both hybrids produced low normal tetrad microspores. The fertility of both *Doritis* hybrids was tested on pollen viability, pollen germination and fruit set. These confirmed the lower fertility of both hybrids compared with that of *Doritis* spp. Characteristics of chromosome in *Doritis* spp. have been studied. *Doritis pulcherrima* and *Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis* were diploid and similar. *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* was tetraploid (allotetraploid). *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* x *Doritis pulcherrima* was triploid and had somatic chromosome number of 57, (2n = 57). The increased ploidy level in *Doritis pulcherrima* after colchicine treatment was evaluated. The tetraploid (2n = 4x), octaploid (2n = 8x), and the mixoploid plants were observed. The octaploid plants had shorter stems, smaller leaf size, smaller length of whole plant and smaller leaf number than diploid plants.

The morphology of mixoploid plants was not significantly different from diploid and tetraploid plants in leaf size, stem size, leaf number and length of whole plant.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฑ
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญในการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 สมมติฐานการวิจัย	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
2 การตรวจเอกสาร	
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	4
2.2 การศึกษาจำนวนโครโมโซมในกล้วยไม้	6
2.2.1 เทคนิคในการศึกษาโครโมโซม	7
2.2.2 การศึกษาโครโมโซมในกล้วยไม้ชนิดต่างๆ	8
2.3 การศึกษาจำนวนโครโมโซมในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง	10
2.4 ความสำคัญของการศึกษาโครโมโซมและแคริโอไทป์	11
2.5 พฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส	12

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5.1 การศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้	14
2.5.2 พฤติกรรมการสร้างไมโครสปอร์กับความสมบูรณ์พันธุ์ของกล้วยไม้	16
2.6 การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในพืช	17
2.7 การเพิ่มจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้	19
2.7.1 สารโคลชิซินกับการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้	20
2.8 คุณค่าในการปรับปรุงพันธุ์	23
3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม	25
3.1.1 วัตถุประสงค์ในการทดลอง	25
3.1.2 วิธีการทดลอง	25
3.1.3 การบันทึกผลการทดลอง	27
3.2 การศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม	27
3.2.1 วัตถุประสงค์ในการทดลอง	27
3.2.2 วิธีการทดลอง	27
3.2.3 การบันทึกผลการทดลอง	28
3.3 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน	28
3.3.1 วัตถุประสงค์ในการทดลอง	28
3.3.2 วิธีการทดลอง	28
3.3.3 การบันทึกผลการทดลอง	29
3.3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	29

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4 ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม 30

4.1.1 การศึกษาลักษณะการเข้าคู่กันของโครโมโซมในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม 30

4.1.2 การศึกษาลักษณะความผิดปกติในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม 31

4.1.3 การศึกษาลักษณะการสร้างไมโครสปอร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม 35

4.1.4 การศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสม 37

4.1.4.1 การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู 37

4.1.4.2 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู 37

4.1.4.3 การศึกษาการผสมติดเป็นคัพภะ (embryo) 40

4.2 การศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม 41

4.2.1 กล้วยไม้ม้าวิ่ง 41

4.2.2 กล้วยไม้ม้าบิน 42

4.2.3 กล้วยไม้แดงอุบล 43

4.2.4 กล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง 43

4.3 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน 57

4.3.1 จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เกิดขึ้นและเปลี่ยนแปลงไปหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน 57

4.3.2 ลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมแบบ mixoploid และแบบ euploid ที่เกิดขึ้นหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน ที่แตกต่างจากลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นดิพลอยด์ 58

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.3 สัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน 61

5 อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม 64

5.1.1 การศึกษาลักษณะการเข้าคู่กันของโครโมโซมในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม 64

5.1.2 การศึกษาลักษณะความผิดปกติในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม 65

5.1.3 การศึกษาลักษณะการสร้างไมโครสปอร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม 66

5.1.4 การศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสม 67

5.1.4.1 การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู 67

5.1.4.2 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู 68

5.1.4.3 การศึกษาการผสมติดเป็นคัพภะ (embryo) 69

5.2 การศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม 69

5.3 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน 71

5.3.1 จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เกิดขึ้นและเปลี่ยนแปลงไปหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน 72

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.3.2 ลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมแบบ mixoploid และแบบ euploid ที่เกิดขึ้นหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซินที่แตกต่างจากลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นดิพลอยด์ 72

5.3.3 สัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน 73

6 สรุป

6.1 การศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม 75

6.2 การศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม 75

6.3 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน 76

เอกสารอ้างอิง **77**

ภาคผนวก

ก การเตรียมสารเคมีในการศึกษาโครโมโซม 88

ข วิธีการศึกษาโครโมโซมด้วยเทคนิค squash method 90

ค การจำแนกรูปร่างของโครโมโซม ตามวิธีการของ Levan et al., 1964 93

ประวัติผู้วิจัย **96**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	การเข้าคู่กันของโครโมโซมในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม	31
4.2	เปอร์เซ็นต์ความถี่ของการพบความผิดปกติในระยะแอนาเฟส I และเทโลเฟส I ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม	33
4.3	การสร้างไมโครสปอร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม	36
4.4	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูในกล้วยไม้แดงอุบล ม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม ที่ทำการผสมตัวเองและผสมสลับ	38
4.5	การผสมติดและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้สายพันธุ์ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล ที่ทำการผสมตัวเองและผสมสลับกับกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล	40
4.6	ความยาวแขนและรูปร่างโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง	44
4.7	ความยาวแขนและรูปร่างโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบิน	47
4.8	ความยาวแขนและรูปร่างโครโมโซมของกล้วยไม้แดงอุบล	50
4.9	ความยาวแขนและรูปร่างโครโมโซมของกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง	54
4.10	ลักษณะของโครโมโซม แบบ mixoploid และแบบ euploid ที่เกิดขึ้นหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน ที่แตกต่างจากลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นดิพลอยด์	59
4.11	เปรียบเทียบสัณฐานวิทยาในแต่ละระดับพลอยดีของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน	62

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	กระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ประกอบด้วย meiosis I และ meiosis II ที่เกิดต่อเนื่องกัน	13
2.2	สูตรโครงสร้างของโคลชิซิน ลักษณะต้น *Colchicum autumnale* และต้นดองดึง *Gloriosa superba* L.	18
3.1	ลักษณะดอกกล้วยไม้ม้าวิ่ง แดงอุบล และสายพันธุ์ลูกผสม	26
4.1	การเข้าคู่กันของโครโมโซมในระยะ diakinesis ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส	32
4.2	การเข้าคู่กันของโครโมโซมในระยะ diakinesis ของกล้วยไม้ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล	33
4.3	ลักษณะการเกิด chromosome lagging และ chromosome bridge ในระยะแอนาเฟส I ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สายพันธุ์ลูกผสม	34
4.4	การแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติในระยะเทโลเฟส I ของกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง	35
4.5	การสร้างไมโครสปอร์ของกล้วยไม้ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล	36
4.6	การศึกษาความมีชีวิตของเรณูในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสมที่ย้อมด้วยสีอะซีโตออซีน	39
4.7	การศึกษาการงอกของเรณูในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสมที่ย้อมด้วยสีอะซีโตออซีน	39
4.8	การผสมติดและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้ม้าวิ่ง x (ม้าบิน x แดงอุบล)	41
4.9	ลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.)	45
4.10	Idiogram ของกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.)	46
4.11	ลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบิน (*Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis*)	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.12	Idiogram ของกล้วยไม้ม้าบิน (*Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis*)	49
4.13	ลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*)	52
4.14	Idiogram ของกล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*)	53
4.15	ลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง	55
4.16	Idiogram ของกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง	56
4.17	จำนวนโครโมโซมจากปลายรากกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน	58
4.18	ลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมแบบ mixoploid ที่พบจำนวนโครโมโซม 2 ระดับพลอยดิในต้นเดียวกันหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน	60
4.19	ลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมแบบ mixoploid ที่พบในต้นที่มีจำนวนโครโมโซม 2x และ 4x หลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน	60
4.20	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน	63

คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ

สัญลักษณ์และอักษรย่อ	คำอธิบาย
ชม.	ชั่วโมง
ซม.	เซนติเมตร
มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
^{o}C	องศาเซลเซียส
HCl	กรดไฮโดรคลอริก
M	โมล
N	นอร์มอล
NDM	New Dogashima Medium
PMCs	เซลล์ต้นกำเนิดเรญู
PPM	หนึ่งส่วนในล้านส่วน (มิลลิกรัม/ลิตร)

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญในการวิจัย

กล้วยไม้ จัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Orchidaceae ซึ่งเป็นวงศ์ใหญ่ที่สุดวงศ์หนึ่งในกลุ่มพืชไม้ดอก ในสภาพธรรมชาติพืชในวงศ์นี้มีอยู่ทั่วโลกมากกว่า 796 สกุล จำแนกได้ประมาณ 19,000 ชนิด (อบฉันท์ ไทยทอง, 2545) ที่มีแหล่งกำเนิดกระจายอยู่อย่างกว้างขวาง สำหรับประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดของกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก โดยมีการสำรวจและพบว่าเป็นกล้วยไม้พื้นเมืองหรือกล้วยไม้ป่ามากถึง 167 สกุล และจำแนกได้ถึง 1,140 ชนิด (อบฉันท์ ไทยทอง, 2545) ที่ขึ้นอยู่ตามธรรมชาติ ในปัจจุบันทั้งภาครัฐและเอกชนได้เห็นความสำคัญของการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ ทำให้มีการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้มากขึ้น ทั้งเป็นการปรับปรุงพันธุ์ภายในชนิดเดียวกัน ข้ามชนิดและข้ามสกุล เกิดเป็นกล้วยไม้พันธุ์ใหม่ๆที่มีสีสัน กลิ่น ขนาด รูปทรงที่สวยงามแปลกตา และมีอายุการใช้งานนานกว่าพันธุ์ดั้งเดิม ด้วยเหตุนี้จึงส่งผลให้อุตสาหกรรมการผลิตและการส่งออกกล้วยไม้ของประเทศไทยมีแนวโน้มเติบโตอย่างต่อเนื่อง กลายเป็นประเทศที่มีการผลิตและการส่งออกดอกกล้วยไม้เป็นอันดับ 1 ของโลก โดยมีประเทศคู่ค้าที่เป็นตลาดใหญ่ที่สุดคือ ญี่ปุ่น รองลงมาคือ สหรัฐ และสหภาพยุโรป มูลค่าการส่งออกในแต่ละปีมีการขยายตัวมากขึ้น ดังจะเห็นได้จาก ใน ปี พ.ศ. 2548 มีมูลค่า 2,539 ล้านบาท ปี พ.ศ. 2549 มีมูลค่า 2,491 ล้านบาท และในปี พ.ศ. 2550 มีมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นเป็น 2,545 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551)

กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis*) เป็นกล้วยไม้สกุลหนึ่งที่มีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย เป็นกล้วยไม้ที่มีสัณฐานวิทยา รูปทรง ขนาดดอกและช่อดอกที่มีความสวยงามโดดเด่น สามารถใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผสมข้ามกับกล้วยไม้ได้หลายสกุล แต่เนื่องจากในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งยังไม่มีรายงานการศึกษาทางด้านพฤติกรรมการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์และลักษณะแคริโอไทป์ (karyotype) ซึ่งเป็นความรู้พื้นฐานที่มีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ ตลอดจนการคาดคะเนลูกผสมที่จะสร้างขึ้น จึงทำให้ต้องมีการศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม

1.2.2 เพื่อศึกษาลักษณะและรูปร่างโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม

1.2.3 เพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งโดยการชักนำด้วยสารโคลชิซิน

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1.3.1 พฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม มีความแตกต่างกันซึ่งมีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์

1.3.2 ลักษณะ จำนวน และรูปร่างโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม แตกต่างกัน

1.3.3 กล้วยไม้ม้าวิ่งที่เกิดจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน มีจำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้น

1.4 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาเฉพาะพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้ม้าวิ่ง แดงอุบล และสายพันธุ์ลูกผสม ศึกษาลักษณะและรูปร่างของโครโมโซมในกล้วยไม้ม้าวิ่ง ม้าบิน แดงอุบล และสายพันธุ์ลูกผสม และศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมในกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากที่มีการชักนำด้วยสารโคลชิซิน

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส โดยสามารถประเมินและคาดคะเนความสมบูรณ์พันธุ์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสมได้

1.5.2 ทราบลักษณะและรูปร่างโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์

1.5.3 กล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมด้วยสารโคลชิซิน มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นและคุณภาพของดอกที่ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมและสามารถพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจได้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

กล้วยไม้ (orchid) จัดเป็นไม้ดอกในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledonous plant) ที่มีอายุยืนหลายปี ในสภาพธรรมชาติมีจำนวนชนิดของกล้วยไม้อยู่ประมาณ 19,000 ชนิด ที่ไม่ใช่กล้วยไม้ลูกผสมหรือกล้วยไม้ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ (อบฉันท์ ไทยทอง, 2545) ในปัจจุบันกล้วยไม้ลูกผสมที่เกิดจากการปรับปรุงพันธุ์โดยมนุษย์มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ทำให้กล้วยไม้มีความหลากหลายทางด้านสัณฐานวิทยา แต่ยังคงเอกลักษณ์ประจำวงศ์กล้วยไม้คือ 1) เรณูจะรวมกันเป็นกลุ่มหรือก้อนเรณู ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการถ่ายละอองเกสรโดยนกหรือแมลง 2) กลีบดอกชั้นในจะเปลี่ยนรูปไปเป็นส่วนที่เรียกว่า "ปาก" 3) เมื่อดอกกล้วยไม้บานก้านดอกจะบิดหรือโค้งให้ปากกลับมาอยู่ด้านล่าง (resupination) และ 4) เกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียจะอยู่บนเส้าเกสร (column) ที่ประกอบด้วย rostellum ในส่วนของยอดเกสรเพศเมีย ลักษณะดังกล่าวจะเกี่ยวข้องกับการถ่ายเรณูของกล้วยไม้จากดอกหนึ่งไปยังอีกดอกหนึ่ง ซึ่งเป็นจุดสำคัญที่ทำให้เกิดวิวัฒนาการของกล้วยไม้ (ครรชิต ธรรมศิริ, 2547)

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis*) เป็นกล้วยไม้สกุลหนึ่งที่มีเพียงไม่กี่ชนิดในโลก จัดอยู่ในกลุ่มที่มีการเจริญเติบโตทางยอด (monopodial growth) เช่นเดียวกับกล้วยไม้ในสกุลแวนด้า คือมีลักษณะลำต้นยาว ชูยอดสูงขึ้นไปเรื่อยๆ และมีการแตกหน่อใหม่จากข้อหรือโคนต้นเดิม กล้วยไม้สกุลนี้จัดเป็นพวกกล้วยไม้ที่ขึ้นบนดินหรือเป็นกล้วยไม้อิงอาศัยบนหิน (terrestrial plant หรือ lithophytic plant) ในสภาพธรรมชาติพบขึ้นเป็นกลุ่มตามพื้นทราย ซอกหินหรือบนหิน หรือในแหล่งที่มีอินทรียวัตถุทับถม ตามป่าโปร่ง (อบฉันท์ ไทยทอง, 2545) ประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดทางธรรมชาติของกล้วยไม้สกุลนี้ ซึ่งประกอบด้วย กล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) กล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) กล้วยไม้ม้าบิน (*Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis*) และ *Doritis pulcherrima* var. *coerulea* (ไม่มีชื่อพื้นเมือง) แต่นักกล้วยไม้เรียกว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งบลู โดยกล้วยไม้ทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความโดดเด่นของดอกที่แตกต่างกัน (ระพี สาคริก, 2530) กล่าวคือ กล้วยไม้ม้าวิ่งมีดอกขนาดเล็ก กลีบดอกลู่ไปด้านหลังทำให้เห็นเส้าเกสรได้ชัดเจน สีของกลีบดอกมีความหลากหลายมีตั้งแต่สีขาวไปจนถึงสีม่วง

เข้ม ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลดอกมีขนาดใหญ่ ๆ กว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งเกือบเท่าตัว ลักษณะของดอกผึ่งผาย สีของกลีบดอกมีตั้งแต่สีม่วงอ่อนจนถึงสีม่วงเข้ม กล้วยไม้ม้าบิน ลักษณะของกลีบดอกชั้นในมีความสวยงามและมีลักษณะคล้ายปีก และ *Doritis pulcherrima* var. *coerulea* มีลักษณะกลีบดอกลู่ไปด้านหลังและมีขนาดของดอกใกล้เคียงกับกล้วยไม้ม้าวิ่ง กลีบดอกมีสีม่วง นอกจากนี้ยังมีรายละเอียดในส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ดังนี้

ราก มีลักษณะอวบน้ำ และมีสีเขียวสามารถสังเคราะห์แสงได้ รากชอบการถ่ายเทอากาศและการระบายน้ำดี (ครรชิต ธรรมศิริ, 2541) เครื่องปลูกที่ใช้ไม่ควรแน่นทึบจนเกินไป และไม่แฉะตลอดจนไม่ใช้เครื่องปลูกที่กลบรากและโคนต้นสูง

ลำต้น กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งมีส่วนของลำต้นตั้งตรงและสั้นเตี้ย โดยกล้วยไม้ในกลุ่มนี้จะมีลักษณะของลำต้นเหมือนกัน แต่ในสายพันธุ์แดงอุบลจะมีขนาดของลำต้นใหญ่กว่าพันธุ์อื่น (ระพี สาคริก, 2516)

ใบ มีลักษณะอวบน้ำและค่อนข้างแข็ง มีการเรียงตัวสลับซ้ายขวาซ้อนกันแน่น ขนาดของใบกว้าง 2 – 6.5 ซม. และยาว 8 - 20 ซม. ลักษณะและสีของใบมีความหลากหลาย มีทั้งใบเขียวยาว ใบเขียวกลมสั้น ใบเขียวขอบน้ำตาลแดง ใบเขียวจุดน้ำตาลใบแดง ลักษณะใบมีรูปร่างเป็นใบดาบ ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ (กาญจนา รุ่งรัชกานนท์, 2545)

ช่อดอก มีลักษณะแข็ง เรียวยาวและตั้งตรง เกิดจากโคนต้นหรือข้อ ก้านช่อดอกยาวประมาณ 15 - 60 ซม. ที่ปลายช่อจะมีดอกซึ่งทยอยบานขึ้นไปเรื่อยๆ เป็นเวลานาน และดอกที่บานก็จะเริ่มค่อยๆร่วงโรยไป

ดอก ดอกเป็นดอกสมบูรณ์ (complete flower) คือมีส่วนประกอบของดอกครบทั้ง 4 ชั้น ประกอบด้วยชั้นของเกสรเพศผู้ เพศเมีย กลีบเลี้ยงและกลีบดอกอยู่ภายในดอกเดียวกัน ดอกของกล้วยไม้ในสกุลนี้มีลักษณะเด่นคือ กลีบเลี้ยงและกลีบดอกคู่ข้างมักจะกางและลู่ออกไปด้านหลัง ทำให้เห็นเส้าเกสร (column) ชัดเจน โคนเส้าเกสรยืดตัวยาว ด้านข้างมีกลีบเลี้ยงคู่ข้างติดอยู่ปลายสุดเป็นกลีบปาก (lip) เหยียดออกมาทางด้านหน้าของดอก ซึ่งมีช่วงกลางโค้งขึ้น ปลายงอนเล็กน้อย หูปาก (side lobe) ทั้งสองข้างตั้งขึ้น ใกล้โคนปากมีติ่งสีเหลืองเรียวยาว 1 คู่ ติดอยู่ สีของดอกมีความหลากหลายตั้งแต่สีขาว ขาวอมชมพู ชมพูอ่อน ไปจนถึงสีม่วงอมชมพูเข้ม (อบฉันท์ ไทยทอง, 2545)

ฝักและเมล็ด ผลหรือฝักกล้วยไม้ หลังจากได้รับการผสมเกสรส่วนของก้านดอกซึ่งเป็นรังไข่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียว และเจริญไปเป็นฝักกล้วยไม้ สำหรับฝักของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจะมีอายุตั้งแต่ผสมเกสรไปจนถึงฝักแก่ใช้เวลาประมาณ 3 เดือน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและความสมบูรณ์ของต้น ลักษณะของฝักจะติดอยู่กับก้านดอกและตั้งเอาปลายชี้ขึ้นด้านบน เมื่อฝักแก่เต็มที่จะ

แตกตามแนวตะเข็บทั้ง 3 แนว ภายในฝักจะมีเมล็ดจำนวนมากกว่าล้านเมล็ด โดยเมล็ดจะมีขนาดเล็กมากจนเป็นผงคล้ายฝุ่น (dust seed) ที่มีลักษณะเรียวยาวและป่องตรงกลางคล้ายลูกรักบี้ ภายในเมล็ดมีคัพภะ (embryo) แต่ไม่มีอาหารสะสมและไม่มีส่วนที่เป็นเอนโดสเปิร์มหรือส่วนที่พัฒนาไปเป็นใบเลี้ยง มีเพียงเปลือกบางๆที่หุ้มเมล็ดอยู่เท่านั้น (สำอาง เนตรนารี, 2548)

ฤดูกาลออกดอก มิถุนายน ถึง พฤศจิกายน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและความสมบูรณ์ของต้นกล้วยไม้

กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง มีการกระจายพันธุ์ในแถบอินเดีย พม่า อินโดนีเซีย มาเลเซีย และประเทศไทย สำหรับแหล่งกำเนิดตามธรรมชาติที่พบในประเทศไทยนั้น กล้วยไม้ม้าวิ่งมีการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวาง สามารถพบได้ทุกภาค ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลมีเขตการกระจายพันธุ์แคบกว่าม้าวิ่ง คือพบได้เฉพาะบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เช่น อุบลราชธานี อุดรธานี หนองคาย เป็นต้น ส่วนกล้วยไม้ม้าบิน แหล่งกำเนิดตามธรรมชาติอยู่ทางภาคใต้ เช่น จังหวัดชุมพร และ *Doritis pulcherrima* var. *coerulea* เป็นกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งอีกชนิดหนึ่งที่ไม่มีชื่อพื้นเมือง พบทั่วไปในภาคเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ระพี สาคริก, 2530 ; สมศักดิ์ รักไพบูลย์สมบัติ, 2535)

2.2 การศึกษาจำนวนโครโมโซมในกล้วยไม้

การศึกษาโครโมโซมเป็นการศึกษาถึงส่วนประกอบภายในเซลล์ โดยโครโมโซมจะมีโครงสร้างที่เป็นแหล่งรวมของหน่วยพันธุกรรมหรือยีนที่อยู่ภายในนิวเคลียส ทำหน้าที่ในการควบคุมการเจริญเติบโตและถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากพ่อแม่ไปสู่รุ่นลูก ซึ่งโครงสร้างของโครโมโซมจะประกอบด้วยสารพันธุกรรมหรือ ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid : DNA) ที่พันรอบโมเลกุลของโปรตีนประเภทฮีสโทนอย่างมีแบบแผน และขดม้วนตัวหลายๆชั้นจนกระชับแน่นและมีขนาดใหญ่จนเห็นเป็นรูปร่างชัดเจน (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2538) โดยโครโมโซมสามารถที่จะจำลองตัวเองได้ และมีพฤติกรรมต่างๆ เกิดขึ้นในระหว่างการแบ่งเซลล์ เช่น การเข้าคู่ การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน และการแยกตัวของโครโมโซม นอกจากนี้ในแต่ละระยะของวัฏจักรเซลล์ขนาดและรูปร่างของโครโมโซมจะแตกต่างกัน (นิตย์ศรี แสงเดือน, 2551) ซึ่งความแตกต่างของโครโมโซมจะเป็นข้อมูลที่สามารถบ่งบอกถึงความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยพืชแต่ละชนิดจะมีจำนวนและรูปร่างลักษณะของโครโมโซมคงที่ ดังนั้น การศึกษาจำนวนและรูปร่างของโครโมโซมจึงเป็นปัจจัยพื้นฐานที่มีความสำคัญต่อการจำแนกความแตกต่างของพืชแต่ละชนิดและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ (อมรา คัมภิรานนท์, 2540) ตัวอย่างเช่น การศึกษาลักษณะ

ทางด้านกายวิภาควิทยาของโครโมโซม การศึกษาพฤติกรรมการเข้าคู่ของโครโมโซมในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (กฤษฎา สัมพันธารักษ์, 2546)

2.2.1 เทคนิคในการศึกษาโครโมโซม

โครโมโซมเป็นโครงสร้างทางพันธุกรรมที่มีคุณสมบัติเฉพาะคือ สามารถทำปฏิกิริยากับสีย้อมที่เป็นเบส เช่น เมธิลกรีน (methyl green) ฮีมาทอกไซลีน (hematoxylin) เบสิกฟูชิน (basic fuchsin) คาร์มีน (carmine) และออร์ซีน (orceine) (สุมนทิพย์ บุญนาค และปิยะธิดา ธีระกุลพิศุทธิ์, 2550) ในกล้วยไม้การศึกษาจำนวนโครโมโซมในแต่ละชนิดจะมีขั้นตอนในการศึกษาแตกต่างกันออกไปและมีวิธีในการเตรียมตัวอย่างสำหรับศึกษาโครโมโซม ดังนี้

2.2.1.1 การหยุดวงชีพจักรเซลล์ (pretreatment) เป็นวิธีการใช้สารเคมีบางชนิดที่มีผลต่อการยับยั้งการสร้างสายใยสปินเดิล เพื่อทำให้โครโมโซมไม่ถูกดึงไปยังแต่ละขั้วเซลล์ โครโมโซมมีการหดตัวสั้นและกระจายอยู่ภายในเซลล์หลังจากทำการ squash ทำให้ง่ายต่อการศึกษาจำนวนและรูปร่างโครโมโซม ซึ่งสารเคมีที่นิยมใช้ ได้แก่ โคลชิซิน, 8-hydroxyquinolin, p-dichlorobenzene และ α-bromonapthalene

2.2.1.2 การคงสภาพของเนื้อเยื่อ (fixation) เพื่อหยุดการทำงานของเซลล์ให้เร็วที่สุด ในขณะที่โครงสร้างและองค์ประกอบของเซลล์ยังคงมีลักษณะเหมือนเดิม สารเคมีนั้นมีหลายชนิดตามความเหมาะสมของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาศึกษา เช่น สารละลายที่มีส่วนผสมของ absolute alcohol 1 : 3 ส่วน กับ glacial acetic acid 1 ส่วน หรือ Carnoy's fluid เป็นต้น

2.2.1.3 การย่อยสลาย (maceration) เป็นวิธีที่ทำให้เซลล์แยกตัวออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆให้มากที่สุด เพื่อลดจำนวนเซลล์ที่อยู่ซ้อนทับกันหลายๆ ชั้น โดยใช้กรดเป็นตัวช่วยทำลายที่ยึดระหว่างเซลล์ซึ่งชนิดและความเข้มข้นของกรดที่นิยมใช้คือ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 N นอกจากนี้ยังมีการใช้เอนไซม์ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้โครโมโซมมีการกระจายตัวมากขึ้น ได้แก่ เอนไซม์ cellulase, pectinase และ macerozyme ทั้งนี้ความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้จะขึ้นอยู่กับพืชแต่ละชนิด

2.2.1.4 การย้อมสี (staining) เป็นวิธีที่ทำให้สามารถตรวจสอบจำนวนและจำแนกลักษณะของโครโมโซมในพืชแต่ละชนิดได้ สีที่ใช้ในการย้อมโครโมโซมได้แก่ acetocarmine, propionic carmine, aceto-orcein, lacto-propionic orcein, carbol fuchsin และ Feulgen stain เป็นต้น ซึ่งในพืชแต่ละชนิดจะมีระยะเวลาที่ใช้ในการย้อมสีแตกต่างกัน ในปัจจุบันได้มีอีกวิธีหนึ่งคือ การย้อมโครโมโซมให้เป็นแถบ (band) โดยส่วนของโครโมโซมที่ติดสีจะเป็นส่วนของโครมาติน การเกิดแถบจะมีประโยชน์ในการวิเคราะห์จีโนมของพืชแต่ละชนิด ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ C – banding, G – banding, Q – banding และ N- banding โดยในพืชนิยมย้อมด้วย C – banding และ

N- banding ควบคู่กัน แล้วนำผลที่ได้มารวมกันเป็นข้อมูลของโครโมโซมแท่งเดียวกัน เนื่องจากในพืชแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะในแต่ละแท่งโครโมโซม (สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช, 2545)

การศึกษาโครโมโซมส่วนของเนื้อเยื่อที่นำมาศึกษาคือ เนื้อเยื่อเจริญ เช่น ปลายรากหรือปลายยอด โดยศึกษาในระยะต่างๆของการแบ่งเซลล์ ซึ่งระยะการแบ่งเซลล์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการศึกษารูปร่างและจำนวนของโครโมโซมคือ ระยะเมตาเฟส (metaphase) ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสหรือไมโอซิส เนื่องจากระยะดังกล่าวโครโมโซมจะหดตัวสั้นที่สุดทำให้สามารถมองเห็นรูปร่างของโครโมโซมได้ชัดเจน (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2538 ; อมรา คัมภิรานนท์, 2540 ; ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ, 2543) สำหรับการศึกษาโครโมโซมในกล้วยไม้จะมีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับพืชอื่นๆคือ กล้วยไม้เป็นพืชอิงอาศัยที่มีการสร้างรากอากาศ ทำให้ในการเก็บตัวอย่างปลายรากสามารถทำได้รวดเร็วและได้ตัวอย่างที่สะอาด การศึกษาโครโมโซมยังสามารถทำได้จากเซลล์สืบพันธุ์ในระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของ pollen mother cell (PMCs) การแบ่งเซลล์จะเกิดขึ้นพร้อมกันทำให้เพิ่มโอกาสในการนับจำนวนโครโมโซม แต่การศึกษาโครโมโซมในกล้วยไม้นั้นยังมีข้อจำกัดอยู่คือ โครโมโซมมีขนาดเล็กและมีโครโมโซมจำนวนมาก (Withner, 1974)

นอกจากนี้ฤดูกาลและช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างก็มีผลต่อการศึกษาโครโมโซม ศิริพร เชื้อจีน (2546ก) กล่าวว่า ฤดูกาลที่เหมาะสมในการเก็บปลายรากกล้วยไม้คือ ช่วงต้นฤดูฝน เนื่องจากรากกล้วยไม้เริ่มมีการเจริญเติบโตและมีรากใหม่ๆ เกิดขึ้น ทำให้มีโอกาสพบเซลล์ที่กำลังมีการแบ่งตัวมากกว่าฤดูกาลอื่นๆ ส่วนช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บปลายรากกล้วยไม้หวายคือ ช่วงเวลา 7.00 - 8.00 น. ที่มีสภาพท้องฟ้าโปร่งใส เป็นต้น

2.2.2 การศึกษาโครโมโซมในกล้วยไม้ชนิดต่างๆ

การศึกษาโครโมโซมในกล้วยไม้แต่ละชนิดจะมีช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างและวิธีการในการศึกษาที่แตกต่างกันออกไป ตัวอย่างเช่น

สาริณี ไชยเจริญ (2538) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ที่เป็นดิพลอยด์ และอัลโลเททระพลอยด์ (allotetraploid) โดยเก็บและแช่ตัวอย่างปลายรากในสารละลาย 1-bromonapthalene เป็นเวลา 5 - 6 ชม. ก่อนที่จะนำไปตรึงเซลล์ด้วย acetic alcohol ความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที หลังจากนั้นย่อยแยกเซลล์ใน 1 N HCl นาน 10 นาที และย้อมด้วยสี Feulgen แล้วทำการ squash method โดยใช้สี aceto-orcein จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมพบว่า กล้วยไม้หวายที่เป็นดิพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซม 2n = 38 ส่วนอัลโลเททระพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซม 2n = 76

จารุภัทร ประราศี และฉันทนา สุวรรณธาดา (2549) ได้ศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้ดินช้างผสมโขลง จากเนื้อเยื่อปลายราก พบว่า การเก็บตัวอย่างปลายรากเวลา 11.00 น. แล้ว

นำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ โดยไม่ต้องผ่านการหยุดวงชีพเซลล์ ในสารละลาย paradichlorobenzene (PDB) และย้อมด้วยสี carbol fuchsin นาน 1 ชม. เป็นวิธีการเตรียมปลายรากที่เหมาะสม และจากการตรวจนับโครโมโซม พบว่า เซลล์ปลายรากของกล้วยไม้ดินช้างผสมโขลงมีจำนวนโครโมโซม 2n = 56

สุมนทิพย์ บุญนาค และปิยะธิดา ธีระกุลพิศุทธิ์ (2550) ทำการศึกษาหาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก ของกล้วยไม้ม้าวิ่ง โดยการนำตัวอย่างปลายรากแช่ในสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกระตุ้นให้เซลล์อยู่ในระยะเมตาเฟส หลังจากนั้นตรึงเซลล์ใน acetic alcohol 90 เปอร์เซ็นต์ ก่อนที่จะนำไปย่อยแยกเซลล์ใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C เป็นเวลา 5 - 10 นาที พบว่า กล้วยไม้ม้าวิ่งมีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 38

ทรงชัย แซ่ตั้ง (2551) ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของกล้วยไม้เอื้องใบไผ่ พบว่า ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างปลายรากอยู่ในช่วง 8.00 – 10.00 น. และหยุดวงชีพเซลล์ในสารละลาย PDB นาน 3 ชม. แล้วย้อมด้วยสี carbol fuchsin นาน 30 นาที ผลจากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของเอื้องใบไผ่คือ 2n = 2x = 40

Cox et al. (1998) ได้มีการศึกษาจำนวนโครโมโซมในกล้วยไม้ 3 สกุล คือ *Cypripedium*, *Paphiopedilum* และ *Phragmipedium* โดยการคัดเลือกปลายรากที่กำลังมีการเจริญเติบโตแล้วนำไปหยุดวงชีพเซลล์ในสารละลาย 8-hydroxyquinoline ที่ความเข้มข้น 0.002 M ที่อุณหภูมิ 18 ^{o}C เป็นเวลา 4 – 5 ชม. จากนั้นตรึงเซลล์ใน absolute ethanol : glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3:1 (v/v) ที่อุณหภูมิ 48 ^{o}C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม.หลังจากนั้นย้ายปลายรากไปแช่ใน acetic acid ความเข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 5 นาที และย่อยแยกเซลล์ใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C นาน 15 วินาที แล้วย้อมด้วยสี Feulgen ในที่มืดและอุณหภูมิ 4 ^{o}C นาน 30 นาที – 24 ชม. จากนั้นทำการ squash method โดยใช้สี aceto-orcein ความเข้มข้น 2เปอร์เซ็นต์ พบว่ากล้วยไม้สกุล *Paphiopedilum* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 – 28 และกล้วยไม้สกุล *Phragmipedium* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 18 – 32 ส่วนกล้วยไม้สกุล *Cypripedium* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 20

Surenciski et al. (2007) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ *Cyrtopodium hatschbachii* โดยนำตัวอย่างปลายรากมาหยุดวงชีพเซลล์ในสารละลาย 8-hydroxyquinoline ที่ความเข้มข้น 0.002 M ที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C เป็นเวลา 5 ชม. และตรึงเซลล์ใน lactic acid : ethyl ethanol อัตราส่วน 5:1 ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C นาน 12 ชม. แล้วเก็บตัวอย่างในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C หลังจากนั้นย่อยแยกเซลล์ใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C นาน 8 นาที แล้วย้อมด้วยสี Feulgen จากนั้นทำการ squash method โดยใช้สี aceto-orcein พบว่า กล้วยไม้ *Cyrtopodium hatschbachii* มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n = 46

Giuseppina et al. (2010) ได้ทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ใน tribe Neottieae 3 ชนิด ได้แก่ *Epipactis aspromontana*, *Epipactis schubertiorum* และ *Neottia nidus-avis* โดยหยุดวงชีพเซลล์ในโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชม. และทำการตรึงเซลล์ด้วย absolute ethanol : chloroform : glacial acetic acid : formalin ในอัตราส่วน 5:1:1:1 (v/v) นาน 5 นาที หลังจากนั้นย่อยแยกเซลล์ใน 5.5 N HCl ที่อุณหภูมิ 20 ^{o}C เป็นเวลา 20 นาที แล้วย้อมด้วยสี Feulgen พบว่าในกล้วยไม้ *E. aspromontana* และ *E. schubertiorum* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 38 ส่วนกล้วยไม้ *Neottia nidus-avis* มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n = 2x = 36

Grabiele et al. (2010) ได้ทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมในกล้วยไม้ *Sacoila argentina* ซึ่งเป็นกล้วยไม้ป่าที่พบทางตอนเหนือของประเทศ Argentina โดยทำการศึกษาในรังไข่ที่อ่อนและนำมาแช่เพื่อหยุดวงชีพเซลล์ในสารละลาย 1-bromonaphthalene ที่อิ่มตัวในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชม. และย่อยแยกเซลล์ใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C นาน 2 นาที แล้วทำการ squash method โดยใช้สี aceto-orcein ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า กล้วยไม้ *Sacoila argentina* มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n = 2x = 46

2.3 การศึกษาจำนวนโครโมโซมในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

ในการศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ระพี สาคริก (2516) ได้รายงานจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิ่ง พบว่า กล้วยไม้แดงอุบลเป็นเททระพลอยด์ (tetraploid) คือมีจำนวนโครโมโซม 2n = 4x = 76 ส่วนกล้วยไม้ม้าวิ่งเป็นดิพลอยด์ (diploid) มีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 38 เช่นเดียวกับ สุมนทิพย์ บุญนาค และปิยะธิดา ธีระกุลพิศุทธิ์ (2550) ที่ได้ทำการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของกล้วยไม้ม้าวิ่งในเขตพื้นที่โคกภูตากา อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น โดยใช้เทคนิค aceto-orcein squash and Feulgen stain techniques ในชิ้นส่วนปลายรากของกล้วยไม้ พบว่า กล้วยไม้ม้าวิ่งมีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 38 ในทำนองเดียวกับ กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ และคณะ (2551) ได้รายงานว่าเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งคือ การเก็บตัวอย่างปลายรากที่ช่วงเวลา 9.00 – 10.00 น. ส่วนความยาวนานที่เหมาะสมในการหยุดวงชีพของเซลล์ด้วยสารละลาย 8–hydroxyquinoline ควรแช่อย่างน้อย 1 ชม. และจากการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่า เซลล์ปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบล มีจำนวนโครโมโซม 2n = 76 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tanaka and Kamemoto (1984) ที่พบว่ากล้วยไม้แดงอุบลมีจำนวนโครโมโซมมากกว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งเกือบเท่าตัว ทำให้เกิด

ข้อสัณนิษฐานว่ากล้วยไม้แดงอุบลซึ่งเป็นเททระพลอยด์อาจจะเกิดมาจากกล้วยไม้ม้าวิ่งซึ่งเป็นพันธุ์พื้นฐาน

อย่างไรก็ตามในการจำแนกชนิดพืชโดยทั่วไปจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นข้อมูลที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์หาชื่อวิทยาศาสตร์และจำแนกพืชในแต่ละชนิด แต่ในกลุ่มพืชที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมักจะมีรูปร่างลักษณะคล้ายคลึงกัน บางครั้งอาจทำให้เกิดความสับสนในการวิเคราะห์หาชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง ดังนั้นในปัจจุบันการจำแนกชนิดพืชจึงต้องอาศัยลักษณะอื่นๆร่วมด้วย เช่น จำนวนโครโมโซม แคริโอไทป์ (สุมนทิพย์ บุญนาค และปิยะธิดา ธีระกุลพิศุทธิ์, 2550) ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคด้านชีวโมเลกุลมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของกล้วยไม้ เช่น กล้วยไม้สกุลหวายโดยการใช้ลำดับเบสใน internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA ของกล้วยไม้แต่ละชนิดมาวิเคราะห์ลำดับเบสโดยวิธี Neighbor joining method เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายจำนวน 12 ชนิด พบว่า จากระยะห่างทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย ทั้ง 12 ชนิดออกเป็น 4 กลุ่ม และสามารถยืนยันได้ว่ากล้วยไม้ *Epigeneium makaharai* ไม่จัดอยู่ในกล้วยไม้สกุลหวาย (Tsai et al., 2004)

2.4 ความสำคัญของการศึกษาโครโมโซมและแคริโอไทป์

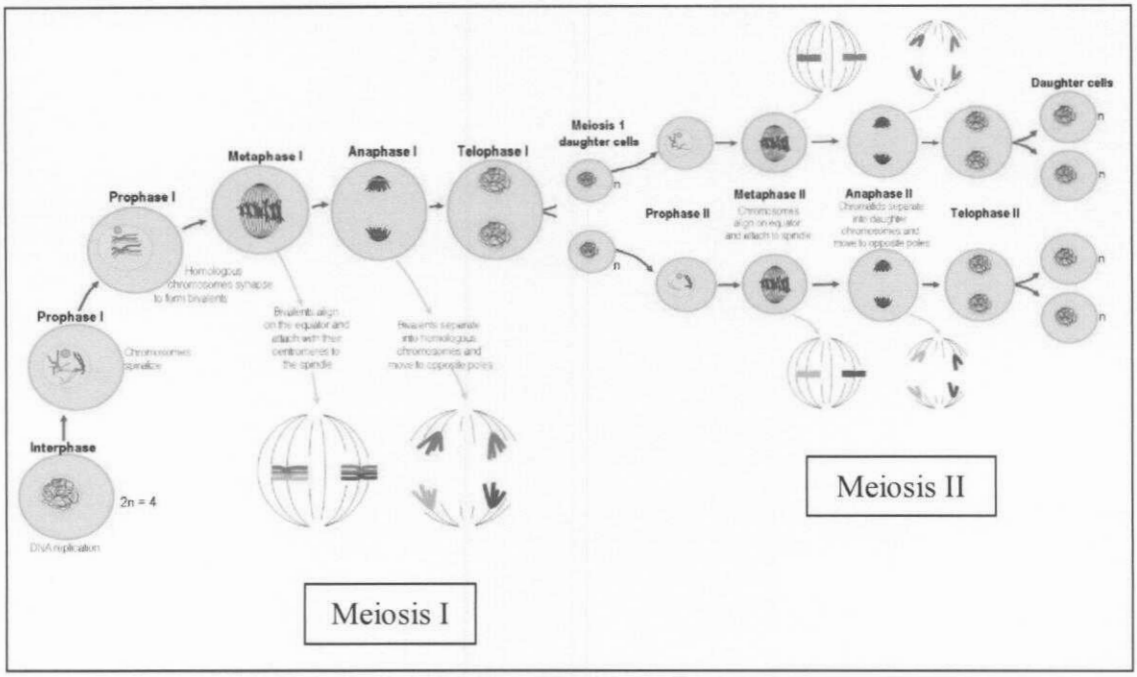
การศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้เป็นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญต่อนักปรับปรุงพันธุ์เป็นอย่างมาก ทั้งในด้านการจัดจำแนกชนิดและการสร้างลูกผสม เนื่องจากความเป็นหมันของต้นลูกผสมที่เกิดขึ้น (hybrid sterility) มักจะเกี่ยวข้องกับการไม่เข้าคู่กันของโครโมโซมในขณะที่มีการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ ในระหว่างสายพันธุ์พ่อ – แม่ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม (Winston et al., 2001) แต่ในบางครั้งการนับจำนวนโครโมโซมอาจจะเกิดความผิดพลาดเนื่องจากโครโมโซมมีขนาดเล็กและมีจำนวนมากหรือในกล้วยไม้สกุลเดียวกันมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน ทำให้ไม่สามารถจัดจำแนกรูปร่างของโครโมโซมได้ แต่สิ่งหนึ่งที่พืชแต่ละชนิดจะมีลักษณะเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวคือ ลักษณะแคริโอไทป์ ซึ่งแสดงถึงจำนวน ขนาด และรูปร่างของโครโมโซม Wilfret and Kamemoto (1971) ได้ศึกษาแคริโอไทป์ของกล้วยไม้สกุลหวาย 23 ชนิด พบว่า ค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซม S% (ความยาวของโครโมโซมที่เล็กที่สุด / ความยาวของโครโมโซมที่ใหญ่ที่สุด) และค่าเฉลี่ย F% (ความยาวของโครโมโซมแขนสั้น / ความยาวของโครโมโซมทั้งหมด) ของกล้วยไม้สกุลหวายแต่ละชนิดแตกต่างกัน ซึ่งค่า S% ที่มีค่ามากแสดงว่าลักษณะโครโมโซมไม่มีความแตกต่างกันและในทางตรงกันข้าม ถ้าค่า S% มีค่าน้อยหมายถึง

ลักษณะโครโมโซมนั้นแตกต่างกัน ส่วนค่า F% เป็นค่าที่บอกถึงรูปร่างของโครโมโซมโดยใช้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ นอกจากนี้ในการจัดทำแคริโอไทป์ในพืชชนิดต่างๆหากลักษณะของโครโมโซมส่วนใหญ่มีรูปร่างของโครโมโซมเป็นแบบเมตาเซนทริก (metacentric) และมีจำนวนรูปร่างของโครโมโซมเป็นแบบซับเมตาเซนทริก (submetacentric) บ้างเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าลักษณะแคริโอไทป์ของพืชชนิดนั้นมีแนวโน้มจะเป็นแบบ symmetric karyotype (Begum and Alam, 2005) นั่นคือ โครโมโซมในแต่ละแท่งของพืชชนิดนั้นมีตำแหน่งของเซนโทรเมียร์เหมือนกันและมีลักษณะของโครโมโซมไม่แตกต่างกัน

2.5 พฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส

การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส เป็นกระบวนการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่มีการลดจำนวนโครโมโซมลงครึ่งหนึ่ง เพื่อทำให้พืชที่เป็นดิพลอยด์เมื่อมีการผสมพันธุ์กันสามารถยังคงรักษาความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นไว้ได้ การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเป็นกลไกที่มีความสำคัญเนื่องจากทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนระหว่างโครโมโซมคู่เหมือน ส่งผลให้เกิดการรวมตัวกันของยีนและเกิดความแตกต่างกันทางพันธุกรรมในรุ่นลูก ทำให้พืชชนิดนั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากขึ้นและอาจก่อให้เกิดเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ (speciation) ในที่สุด (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2538) ขบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสประกอบด้วย 2 ระยะ คือ meiosis I และ meiosis II ที่เกิดต่อเนื่องกัน (ภาพที่ 2.1)

ในกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส I จะได้เซลล์ลูกจำนวน 2 เซลล์โดยแต่ละเซลล์จะมีจำนวนโครโมโซมเป็นแฮพลอยด์ (haploid : n) คือจำนวนโครโมโซมจะลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของเซลล์ต้นกำเนิดโดยในแต่ละโครโมโซมจะประกอบด้วย 2 โครมาทิด เมื่อเริ่มเข้าสู่การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส II เซลล์ลูกทั้งสองเซลล์จะแบ่งตัวเพื่อแยกโครมาทิดคู่เหมือน ทำให้ได้เซลล์ลูกที่มีโครโมโซมเป็นแฮพลอยด์จำนวน 4 เซลล์ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการแบ่งเซลล์ ในกล้วยไม้ เรณู (pollen) จะเกิดจากการรวมกลุ่มกันของเซลล์ลูกในระยะไมโอซิส II เรียกว่า สปอร์แรด (sporad) และเรียกเซลล์ลูกทั้ง 4 นั้นว่าเทแทรด (tetrad) ส่วนเซลล์ลูกแต่ละเซลล์เรียกว่า ไมโครสปอร์ (microspore)



ภาพที่ 2.1 กระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ประกอบด้วย meiosis I และ meiosis II ที่เกิดต่อเนื่องกัน (Strachan and Read, 1996)

การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในระยะเมตาเฟส I เป็นระยะที่มีความสำคัญเนื่องจากโครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) ที่เข้าคู่กันจะมาเรียงกันที่บริเวณกึ่งกลางเซลล์เพื่อที่จะแยกตัวไปสู่ขั้วเซลล์ในระยะแอนาเฟส เรียกกระบวนการแยกตัวนี้ว่า disjunction และเรียกคู่ของโครโมโซมคู่เหมือนว่า ไบวาเลนท์ (bivalent) ซึ่งการเข้าคู่กันของโครโมโซมนั้นจะขึ้นอยู่กับระดับความเหมือนกันระหว่างชุดโครโมโซมของสายพันธุ์พ่อ - แม่ ในกล้วยไม้มักจะพบความแตกต่างกันระหว่างชุดโครโมโซมของสายพันธุ์พ่อ - แม่ที่นำมาผสม ส่งผลให้การเข้าคู่กันของโครโมโซมเกิดไม่สมบูรณ์หรือไม่เกิดการเข้าคู่กันของโครโมโซมเรียกโครโมโซมที่ไม่มีการเข้าคู่หรืออยู่เดี่ยวๆ นี้ว่า ยูนิวาเลนท์ (univalent) ซึ่งการเกิดยูนิวาเลนท์นี้จะทำให้เกิดการแบ่งตัวที่ไม่สมดุลของโครโมโซมในเซลล์ลูก ส่งผลให้ไมโครสปอร์ที่ถูกสร้างขึ้นเป็นอะนิวพลอยด์ (aneuploid) คือมีจำนวนของโครโมโซมที่ผิดปกติไปและไม่สามารถทำหน้าที่ได้ ดังนั้น การศึกษาลักษณะการเกิดเทแทรดจึงสามารถที่จะพิสูจน์ถึงการทำหน้าที่ได้หรือไม่ได้ของไมโครสปอร์ แม้ว่าจะมีการแบ่งตัวของโครโมโซมที่เป็นปกติแต่มีการแบ่งจำนวนของโครโมโซมที่ไม่สมดุลทั้งในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส I และ II เนื่องจากการเข้าคู่กันของโครโมโซมเกิดไม่สมบูรณ์ เมื่อเข้าสู่กระบวนการแบ่งไซโตพลาสซึมจะมีบางโครโมโซมที่ไม่อยู่ในไมโครสปอร์ เรียกโครโมโซมนี้ว่า chromosome lagging หรือ laggards ซึ่งเกิดจากโครโมโซมที่เป็นแบบยูนิวาเลนท์มีการแยกตัวไปสู่

แต่ละขั้วเซลล์หรือมีการแยกตัวเข้าสู่ขั้วแต่เกิดความพลาดในการรวมกลุ่มกันของโครโมโซม จนในที่สุดโครโมโซมเหล่านั้นจะถูกสร้างเป็นไมโครไซท์ (microcytes) หรือไมโครนิวคลีไอ (micronuclei) ซึ่งการเกิดไมโครไซท์หรือไมโครนิวคลีไอนี้จะเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสมบูรณ์พันธุ์ได้

ในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสที่มีการสร้าง sporad ที่ผิดปกติคือ มีจำนวนของไมโครสปอร์แตกต่างไปจาก 4 ไมโครสปอร์ เช่น การเกิดไมโครสปอร์แบบโมแนด (monads), ไดแอด (dyads),ไตรแอด (triads) และโพลีแอด (polyads) โดยลักษณะการเกิดไมโครสปอร์แบบต่างๆ นี้ จะขึ้นอยู่กับจำนวนของ laggard หรือการกระจายตัวของโครโมโซมที่เป็นแบบยูนิวาเลนท์ ซึ่งจะไปมีผลต่อการทำงานของยีนและส่งผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ คือเซลล์สืบพันธุ์ที่ได้จะไม่สามารถทำหน้าที่ได้ ในไมโครสปอร์ที่เป็นโมแนด ซึ่งเกิดจากการไม่แยกตัวของโครโมโซมทั้งในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส I และ II ทำให้ได้เซลล์สืบพันธุ์ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็นเททระพลอยด์ (โครโมโซมมี 4 ชุด) ส่วนไมโครสปอร์ที่เป็นไดแอด สามารถที่จะเกิดได้ 2 ลักษณะ คือ 1) เกิดจากการไม่แยกตัวของโครโมโซมในไมโอซิส I แต่มีการแบ่งเซลล์เป็นปกติในไมโอซิส II หรือ 2) มีการแบ่งเซลล์เป็นปกติในไมโอซิส I แต่ไม่มีการแยกตัวของโครโมโซมในเซลล์ลูกทั้งสองเซลล์ในไมโอซิส II ซึ่งการไม่แยกตัวของโครโมโซม (non-disjunction) เกิดจากการมีโครโมโซมที่ไม่เคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วเซลล์ในระยะแอนาเฟส และไมโครสปอร์ที่เป็นไตรแอด เกิดขึ้นเนื่องจากเซลล์ลูกเซลล์ใดเซลล์หนึ่งหรือทั้งสองเซลล์ไม่มีการแยกตัวของโครโมโซมในไมโอซิส II หรือทั้งสองกลุ่มของโครโมโซมในระยะแอนาเฟส II มีการรวมกันเนื่องจากการเกิดสายใยสปินเดิลเป็นคู่ แต่อย่างไรก็ตามการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็นแบบไดแอดและไตรแอด เซลล์สืบพันธุ์ที่ได้สามารถที่จะทำหน้าที่ได้เมื่อมีจำนวนชุดโครโมโซมครบ (Winston et al., 2001)

2.5.1 การศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้

การศึกษาพฤติกรรมในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสมีความสำคัญและเป็นข้อมูลพื้นฐานในด้านการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากจำนวนการเข้าคู่ของโครโมโซมในระหว่างที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสจะเป็นเครื่องบ่งชี้ที่ดีถึงความสัมพันธ์ทางด้านพันธุศาสตร์ของต้นพ่อหรือแม่พันธุ์ที่นำมาผสมเพื่อทำการปรับปรุงพันธุ์

สาริณี ไชยเจริญ (2538)ได้ศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* เนื่องจาก *D. superbiens* เป็นกล้วยไม้ลูกผสมที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ เมื่อเปรียบเทียบต้นดิพลอยด์และต้นที่ได้รับการชักนำให้เป็นเททระพลอยด์ พบว่า กล้วยไม้หวายที่เป็นดิพลอยด์มีเปอร์เซ็นต์การติดฝักเพียง 16 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ในขณะที่กล้วยไม้หวายเททระพลอยด์มีเปอร์เซ็นต์การติดฝักเพิ่มมากขึ้นเป็น 62 เปอร์เซ็นต์

ขท.3129
ข้อมูลท้องถิ่น
ปก1ฉบ
QK
ส๑5๗

ศิริพร เชื้อจีน (2546ก) ได้รายงานว่า เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์จะขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์ของการเข้าคู่ของโครโมโซมในลูกผสม และเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์ไม่ควรเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ หรือสูงกว่าชนิดของพ่อ – แม่ เนื่องจากชนิดพืชที่ต่างกันก็ควรจะมีโครโมโซมหรือยีนที่แตกต่างกัน แม้ว่าจะเป็นชนิดที่มีความใกล้เคียงกันก็ตาม เพราะถ้าหากความสมบูรณ์พันธุ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าโครโมโซมทุกคู่มีลักษณะเหมือนกันและควรจะเป็นชนิดเดียวกัน

ศิริพร เชื้อจีน (2546ข) อ้างอิงจาก Dobzhansky (1953) รายงานสาเหตุของการเป็นหมันในลูกผสมของพืชต่างชนิดกันว่า โครโมโซมในลูกผสมจะไม่สามารถเข้าคู่กันได้อย่างปกติในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส โครโมโซมบางแท่งอาจจับคู่กันเป็น bivalent หรืออยู่เดี่ยวๆ เป็น univalent ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมือนกันของโครโมโซมในพืชแต่ละชนิด ถ้าชนิดของพืชต่างกันมากโครโมโซมก็ไม่สามารถเข้าคู่กันได้ ส่งผลให้ลูกผสมนั้นตาย (hybrid breakdown) เนื่องจาก gamete มีจำนวนโครโมโซมไม่ครบ

Kamemoto et al. (1961) ได้รายงานว่า พฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสสามารถอธิบายสาเหตุของความเป็นหมันได้ เนื่องจากระดับการเข้าคู่กันของโครโมโซมมีส่วนสัมพันธ์กันกับระดับความเป็นหมันหรือไม่เป็นหมัน และยังสามารถคาดคะเนจำนวนโครโมโซมในรุ่นต่อไปได้

McConnell and Kamemoto (1993) ได้ศึกษาผลของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในลูกผสมที่มีจีโนมแตกต่างกัน (intergenomic hybrid) ในกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสม 3 สายพันธุ์คือ *Dendrobium* Jaquelyn Thomas 0580-3, *D.* Jaquelyn Thomas 0580-8 และ *D.* Neo-Hawii Y972 ซึ่งเกิดจากการผสมข้ามระหว่างหมู่ *Phalaenanthe* และหมู่ *Ceratobium* พบว่า ลูกผสมที่เป็นดิพลอยด์ที่เกิดขึ้นแสดงพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสมีความไม่สม่ำเสมอ โดยพบทั้ง bivalent และ univalent โดยมีการเข้าคู่กันของโครโมโซมแบบ bivalent 14.3 – 18.9 คู่ และ 0.2 – 9.4 univalent แต่เมื่อเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่าให้เป็น amphidiploid ลูกผสมทั้ง 3 สายพันธุ์มีการเข้าคู่ของโครโมโซมเป็นปกติ (38 bivalent) และเกือบปกติ (37.8 bivalent)

Ruualcaba-Ruiz and Rodriguez-Garay (2002) พบว่าความผิดปกติของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเกิดจากความผิดปกติทางด้านโครงสร้างของโครโมโซม ตัวอย่างเช่น ความผิดปกติที่เกิดจากการสลับเปลี่ยนทิศของชิ้นส่วนโครโมโซมและมีการเข้าคู่แนบชิดกับโครโมโซมในสภาพเฮเทโรไซกัส (heterozygous inversion) หรือความผิดปกติที่เกิดจากการที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของโครโมโซมขาดหายไป (deletion) และความผิดปกติที่เกิดจากส่วนของโครโมโซมเพิ่มขึ้นมามากกว่าปกติ (duplication) ซึ่งความผิดปกติดังกล่าวจะมีผลทำให้ความมีชีวิตของเรณูลดลง

2.5.2 พฤติกรรมการสร้างไมโครสปอร์กับความสมบูรณ์พันธุ์ของกล้วยไม้

นอกจากพฤติกรรมการเข้าคู่กันของโครโมโซมในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส กระบวนการสร้างไมโครสปอร์ (microspore formation) เมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์ เป็นรูปแบบหนึ่งที่ใช้ในการเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์ในต้นที่เป็นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ ในกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมระหว่างหมู่ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Dendrobium* Jaquelyn Thomas 0580-3, *D.* Jaquelyn Thomas 0580-8 และ *D.* Neo-Hawii Y972 ที่เป็นดิพลอยด์ มีการสร้างไมโครสปอร์ที่ผิดปกติคือ พบทั้งที่เป็น tetrad, dyad และ monad โดยมีเปอร์เซ็นต์การสร้างไมโครสปอร์ที่เป็นกลุ่มละสี่ (tetrad) ต่ำ เนื่องมาจากในลูกผสมที่เป็นดิพลอยด์มีการเข้าคู่กันของโครโมโซมที่เป็นคู่ปกติ (bivalent) ต่ำ จึงส่งผลให้การสร้างไมโครสปอร์ผิดปกติและลูกผสมที่ได้มีความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง ในขณะที่ลูกผสมที่เป็นเททระพลอยด์มีการเข้าคู่ของโครโมโซมเป็นปกติ เมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์ไมโครสปอร์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจึงเป็นปกติ (tetrad) ทำให้ลูกผสมของเททระพลอยด์มีความสมบูรณ์พันธุ์มากกว่าดิพลอยด์

ศิริพร เชื้อจีน (2546ก) ได้รายงานว่าในกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างหมู่ที่อยู่ในสกุลเดียวกันมักมีการเข้าคู่กันของโครโมโซมผิดปกติและมีความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง เช่น ลูกผสม *Dendrobium* Caesar ที่เกิดจากการผสมระหว่าง *D. phalaenopsis* ในหมู่ *Phalaenanthe* และ *D. stratiotes* ในหมู่ *Ceratobium* พบว่าลูกผสมที่เกิดขึ้นแสดงพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสผิดปกติและมีความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง (Kamemoto et al., 1964) และบ่อยครั้งที่การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ไม่มีการลดจำนวนโครโมโซมลงและสามารถทำงานได้ ส่งผลให้เกิดลูกผสมที่เป็นทริพลอยด์ (triploid) เททระพลอยด์ (tetraploid) และเพนตะพลอยด์ (pentaploid) โดยการทำงานของเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่มีการลดจำนวนโครโมโซมเพื่อผลิตลูกผสมในกล้วยไม้สกุลหวายระหว่างหมู่ ทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์ลดลงมากขึ้น (Haruyaki et al., 1999) แต่กล้วยไม้สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้เนื่องจาก

(1) การถ่ายเรณูของดอกหนึ่งๆสามารถผลิตเมล็ดได้ 500,000 - 1,000,000 เมล็ด ดังนั้นในลูกผสมที่มีความสมบูรณ์ 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเมล็ดได้ 5,000 - 10,000 เมล็ด และเมื่อลูกผสมมีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์ อาจผลิตเมล็ดได้ 50 - 100 เมล็ด

(2) เนื้อเยื่อ endosperm ในกล้วยไม้ส่วนมากจะมีความบกพร่องและเนื่องจาก embryo endosperm ไม่มีความสัมพันธ์กัน ดังนั้น กล้วยไม้จึงสามารถมีชีวิตอยู่ได้

(3) embryo ของกล้วยไม้ สามารถเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสังเคราะห์ให้สามารถมีชีวิตรอดได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ

Lee (1994) ได้ศึกษาลูกผสมของกล้วยไม้ *Mokara* พบว่าการเกิด univalent และ laggard มีความสัมพันธ์กับการเกิด microspore ที่เป็น dyad กับ microcytes ซึ่งมีผลมาจากการแยกตัวของโครโมโซมในระยะแอนาเฟส ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง

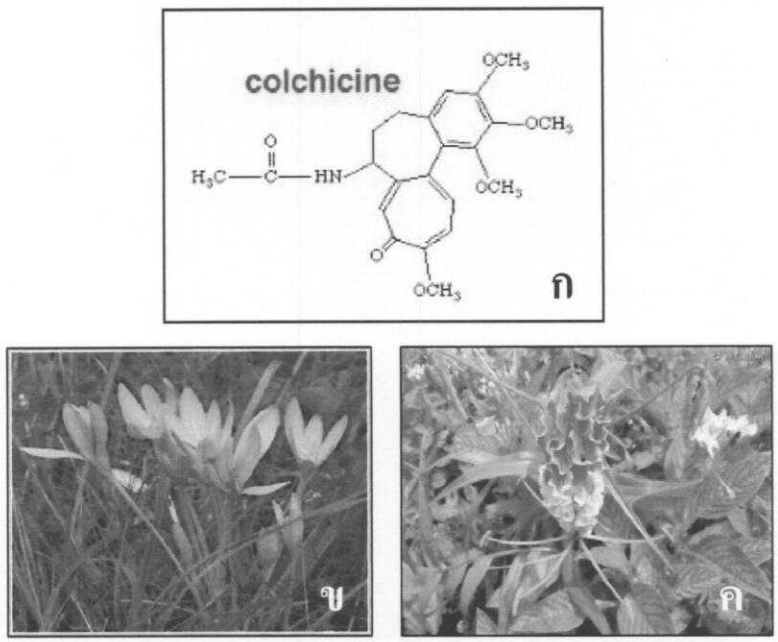
Winston et al. (2001) ได้ศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของลูกผสม 3 สายพันธุ์คือสายพันธุ์ *Renanthera* Singapore Botanic Gardens สายพันธุ์ *Arachnoglottis* และสายพันธุ์ *Mokara* Singa Gold พบว่าการเข้าคู่ของโครโมโซมในสายพันธุ์ *Renanthera* Singapore Botanic Gardens ที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเป็นปกติ ทำให้มี microspore ที่เป็น tetrad สม่ำเสมอและมีความสมบูรณ์พันธุ์สูง แต่ในสายพันธุ์ *Arachnoglottis* และสายพันธุ์ *Mokara* Singa Gold การเข้าคู่ของโครโมโซมผิดปกติ คือพบทั้ง univalent และ trivalent ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ของ microspore ที่เป็น polyad สูง

2.6 การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในพืช

พืชโพลีพลอยด์ หมายถึงพืชที่มีจำนวนชุดโครโมโซมมากกว่า 2 ชุด ซึ่งเป็นจำนวนที่มากกว่าพืชปกติที่มีโครโมโซมเพียง 2 ชุด เรียกว่า ดิพลอยด์ (2x) ถ้าหากพืชนั้นมีจำนวนชุดโครโมโซม 3 ชุด เรียกว่า ทริพลอยด์ (3x) หรือ 4 ชุด เรียกว่า เททระพลอยด์ (4x) และ 5 ชุด เรียกว่า เพนตะพลอยด์(5x) เป็นต้น และนอกจากนี้ยังรวมไปถึงพืชที่มีจำนวนโครโมโซมชุดเดี่ยวผสม (amphihaploid) พืชที่มีโครโมโซมชุดเดียวกันมากกว่า 2 ชุด (autopolyploid) และพืชที่มีโครโมโซมต่างชุดกันมากกว่า 2 ชุด (allopolyploid หรือ amphidiploid) (กฤษฎา สัมพันธารักษ์, 2546) ซึ่งการเกิดโพลีพลอยด์สามารถเกิดได้เองในธรรมชาติแต่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดน้อยมาก โดยกระบวนการเกิดโพลีพลอยด์ในธรรมชาติเกิดได้ 2 ลักษณะคือ เกิดจากความผิดปกติของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในระหว่างการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ส่งผลให้ไม่มีการลดจำนวนโครโมโซมในเซลล์สืบพันธุ์ลง (unreduced gamete) หรือเกิดจากความผิดปกติของการแบ่งเซลล์ร่างกายแบบเอนโดไมโทซิส คือโครโมโซมมีการเพิ่มขึ้นจำนวนขึ้นเป็นสองเท่า แต่ไม่มีการแบ่งไซโตพลาสซึม ทำให้เซลล์มีจำนวนโครโมโซมเป็น 4 ชุด (ประภา ศรีพิจิตต์, 2550) ส่วนการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์หรือการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยการกระทำของมนุษย์สามารถทำได้โดยการใช้สารเคมีหลายชนิดที่มีคุณสมบัติยับยั้งการสร้างสายใยสปินเดิล (spindle fiber) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่ช่วยในการแยกตัวของโครโมโซมไปสู่ขั้วเซลล์ในระยะแอนาเฟส เช่น โคลชิซิน (colchicine) ออริซาลิน (oryzalin) ไตรฟลูราลิน (trifluralin) อะมิโพรฟอสเมธิล (amiprophos-methyl) ไนตรัสออกไซด์

(nitrous oxide) (Ranney, 2007) โดยสารโคลชิซินเป็นสารที่ใช้มากที่สุดเนื่องจากให้ผลค่าเฉลี่ยในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ที่สม่ำเสมอที่สุด (จตุพร หงส์ทองคำ, 2551ข ; อ้างอิงจาก อดิศร กระแสชัย , 2539)

สารโคลชิซิน เป็นสารประเภทอัลคาลอยด์ ชื่อว่า acetyltrimethyl colchicine acid มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{22}H_{25}NO_6$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 399.43 โคลชิซินเป็นสารบริสุทธิ์ที่มีลักษณะเป็นเกล็ดหรือเป็นผงสีเหลือง ละลายได้ดีในน้ำและแอลกอฮอล์ สลายตัวในที่มีแสง โดยโคลชิซินสามารถสกัดได้จากส่วนหัวและเมล็ดของพืชพวก autumm crocus (*Colchicum autumnale*) และต้นดองดึง (*Gloriosa superba* L.) (จตุพร หงส์ทองคำ, 2551ก) (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 (ก) สูตรโครงสร้างของโคลชิซิน (ข) ลักษณะต้น *Colchicum autumnale* และ (ค) ต้นดองดึง *Gloriosa superba* L. (Hartung, 1954)

โคลชิซินได้นำมาใช้ประโยชน์ในด้านปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างแพร่หลายคือ ใช้ในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยโคลชิซินจะมีหน้าที่ยับยั้งการสร้างสายใยสปินเดิล ที่ทำหน้าที่ในการแยกตัวของโครโมโซมในระหว่างที่มีการแบ่งเซลล์ โดยสารโคลชิซินจะไปยับยั้งการสร้างไมโครทูบูล (microtubule) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสายใยสปินเดิล และมีโครงสร้างเป็นโปรตีนทูบูลิน (tubulin) โดยสารโคลชิซินจะเข้าไปยับยั้งกระบวนการ polymerization และจับกับทูบูลินเพื่อทำให้กระบวนการสร้างไมโครทูบูลผิดปกติ แล้วส่งผลให้สายใยสปินเดิลเกิดไม่สมบูรณ์หรือ

ขาดหายไป ด้วยเหตุนี้จึงทำให้โครโมโซมไม่แยกตัวออกจากกันและไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังขั้วเซลล์ในระยะแอนาเฟสได้ ทำให้เซลล์ที่เกิดในลักษณะนี้มีจำนวนชุดโครโมโซมที่เหมือนกันเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (chromosome doubling) (Ranney, 2007)

โดยลักษณะของพืชโพลีพลอยด์เป็นลักษณะที่ต้องการทางด้านพืชคือ สามารถฟื้นฟูความเป็นหมันของต้นลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพืชต่างชนิดกันให้สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์และติดเมล็ดเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ต่อไป หรือการเพิ่มชุดโครโมโซมของต้นพืชที่เกิดจากการเลี้ยงอับละอองเกสรหรือไมโครสปอร์ ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมชุดเดียว (haploid) ให้เป็นต้นที่มีโครโมโซม 2 ชุด (dihaploid) ที่เหมือนกัน เพื่อสร้างต้นที่เป็นสายพันธุ์แท้ (pure line) ในระยะเวลาที่สั้นกว่าการผสมพันธุ์โดยวิธีปกติ และช่วยให้ได้ลักษณะที่ดีขึ้น เช่น ดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น สีของดอกเข้มขึ้น กลีบดอกหนาขึ้น ลำต้นอวบใหญ่ ปล้องสั้นและเตี้ยลง เป็นต้น (นิตย์ศรี แสงเดือน, 2551) ทั้งนี้เนื่องจากพืชที่เป็นโพลีพลอยด์จะมีขนาดของเซลล์ใหญ่ขึ้น โดยสามารถตรวจสอบได้จาก เซลล์คุมปากใบที่มีขนาดใหญ่ขึ้นแต่มีจำนวนต่อพื้นที่ลดลง ละอองเกสรเพศผู้มีขนาดใหญ่ขึ้น และมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น (สาริณี ไชยเจริญ, 2538 ; Silva et al., 2000; จตุพร หงส์ทองคำ, 2551ก) ในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* พบว่ามีหลายชนิดที่เป็นโพลีพลอยด์และมีลักษณะของดอกดีขึ้น เช่น *Dendrobium phalaenopsis* ที่เป็นเททระพลอยด์ พบว่า รูปทรงดอกดีขึ้น สีดอกเข้มขึ้น นอกจากนี้ยังมีกล้วยไม้สกุลอื่นๆที่เป็นโพลีพลอยด์ อาทิเช่น สกุล *Vanda, Cattleya, Cymbidium, Paphiopedilum* และ *Phalaenopsis* (Haruyaki et al., 1999)

2.7 การเพิ่มจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้

กล้วยไม้ที่เป็นโพลีพลอยด์ (polyploid) หมายถึง กล้วยไม้ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมมากกว่าสองชุด โดยทั่วไปกล้วยไม้ที่เป็นโพลีพลอยด์จะมีลักษณะต่างๆเหนือกว่าดิพลอยด์ เช่น ขนาดของดอก ความแข็งแรงของดอก และอายุการใช้งานของดอกเพิ่มขึ้น (Chaicharoen and Saejew, 1981)กล้วยไม้โพลีพลอยด์สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ โดยเกิดจากความผิดปกติในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อ-แม่ที่เป็นดิพลอยด์ไม่มีการลดจำนวนโครโมโซมลง หรือเกิดจากความผิดปกติในการแบ่งเซลล์ สุมนทิพย์ บุญนาค (2550) กล่าวว่า จำนวนโครโมโซมอาจไม่ได้ขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว อาจจะแปรผันตามสภาพแวดล้อมหรือภูมิประเทศได้ ซึ่งลักษณะทางกายภาพจะมีผลชักนำให้เกิดปรากฏการณ์ polyploidy ได้ Felix and Guerra (2000) ได้รายงานว่ากล้วยไม้ในสกุล *Catasetum* และ *Oncidium* ที่เป็นกล้วยไม้ดินและกล้วยไม้ที่อาศัยบนหินมีระดับพลอยดิที่สูงกว่ากล้วยไม้อิงอาศัย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิดโพลีพลอยด์จะ

ขึ้นอยู่กับแหล่งที่อยู่อาศัยของกล้วยไม้แต่ละชนิด การเพิ่มความถี่ของการเกิดโพลีพลอยด์หรือการชักนำโครโมโซมของกล้วยไม้สามารถเพิ่มขึ้นได้โดยการใช้สารโคลชิซิน กับ protocorm-like bodies และการเพิ่มจำนวนโครโมโซมจะทำให้ลักษณะของต้นและดอกกล้วยไม้เปลี่ยนไป เช่น ลำต้นอวบใหญ่ ปล้องสั้น ใบกว้าง หนา และเขียวขึ้น ส่วนในดอกจะมีขนาดของดอกใหญ่ขึ้น หนาขึ้น และสีเข้มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในการเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดโครโมโซม อาจจะทำให้เกิดความผิดปกติของต้นกล้วยไม้ได้ (ศิริพร เชื้อจีน, 2546ก)

2.7.1 สารโคลชิซินกับการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้

สารโคลชิซินเป็นสารเคมีที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดพืชโพลีพลอยด์ โดยในพืชแต่ละชนิดรวมทั้งกล้วยไม้ชนิดต่างๆจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นโพลีพลอยด์ เช่น

สาริณี ไชยเจริญ (2538) กล่าวว่า กล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ที่เป็นเททระพลอยด์มีขนาดดอกใหญ่กว่าดิพลอยด์ กลีบดอกของต้นเททระพลอยด์มีความกว้าง ความยาว และความหนามากกว่ากลีบดอกของต้นดิพลอยด์ การบานของดอกต้นเททระพลอยด์บานได้นานกว่าดิพลอยด์เป็นเวลา 7 วัน การแบ่งตัวของ microsporocyte ของดิพลอยด์และเททระพลอยด์ส่วนใหญ่ปกติ ยกเว้นบาง microspore ของดิพลอยด์มี 2 เซลล์และ 5 เซลล์ การงอกของ pollen tube ในดิพลอยด์ช้ามากมีส่วนน้อยที่งอกในเวลา 3 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับเททระพลอยด์ซึ่ง pollen tube ยาวและมีจำนวนมาก จากการศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์พบว่า ต้นที่เป็นเททระพลอยด์มีความสมบูรณ์พันธุ์และมีเมล็ดที่มีเอมบริโอสมบูรณ์มากกว่าดิพลอยด์

สุมนทิพย์ บุญนาค (2550) ได้ศึกษาความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้ม้าวิ่ง พบว่าโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วัน สามารถชักนำให้กล้วยไม้ม้าวิ่งมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2n = 4x = 76 และ 2n = 8x = 152 ลักษณะใบของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นโพลีพลอยด์มีความหนา สีเขียวเข้ม ปริมาณคลอโรฟิลล์ และขนาดเซลล์คุมเพิ่มขึ้น แต่มีจำนวนเซลล์คุมต่อพื้นที่น้อยกว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นดิพลอยด์

วิไลลักษณ์ ชนะจิตร และสุขไผท ศรีเมือง (2551) พบว่าสารโคลชิซินมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีในกล้วยไม้ดินหมูกลิ้ง (*Eulophia andamanensis* Reichb.f) ต้นอ่อนของกล้วยไม้ดินหมูกลิ้งที่ได้รับสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 4 ชม. และ 6 ชม. มีการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีเป็นเททระพลอยด์ จำนวน 2 ต้นจาก 6 ต้น คิดเป็น 33.33 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นเททระพลอยด์จะแตกต่างไปจากต้นปกติคือ ต้นเตี้ย ใบหนา ลำต้นกว้าง ปากใบใหญ่ เซลล์คุมหนา มีจำนวนใบต่อตารางไมโครเมตรน้อย

จตุพร หงส์ทองคำ (2551ก) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของสารโคลชิซิน และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) เอื้องเงิน (*Dendrobium draconis* Rchb.f) และมิสสิงคโปร์ (*Dendrobium* Miss Singapore) โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม พบว่า ในกล้วยไม้ม้าวิ่งและเอื้องเงินการใช้สารโคลชิซิน ที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3 วัน และในกล้วยไม้มิสสิงคโปร์การได้รับสารโคลชิซิน ที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3 วัน มีประสิทธิภาพต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ได้ดีที่สุด

ทรงชัย แซ่ตั้ง (2551) พบว่า กล้วยไม้เอื้องใบไผ่ (*Arundina graminifolia* D.Don. Hochr) ที่ได้รับสารโคลชิซิน กับชิ้นส่วนโปรโตคอร์ม ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลานาน 10 วัน สามารถชักนำให้จำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าได้

สุลาวัลย์ มหาหิงส์ และสุมนทิพย์ บุนนาค (2551) ได้ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินและระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้ม้าวิ่ง โดยเลี้ยงโปรโตคอร์มในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร NDM ที่มีสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. จากนั้นย้ายมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร NDM เป็นเวลา 3 เดือน ทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของกล้วยไม้ม้าวิ่งโดยวิธี aceto-orcien squash technique พบว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งที่ไม่ได้รับการชักนำมีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 38 ส่วนกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ผ่านการชักนำโดยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 72 ชม. มีจำนวนโครโมโซม 2n = 4x = 76 แต่เนื่องจากการชักนำโดยใช้สารโคลชิซินที่ความเข้มข้นสูงทำให้อัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนลดลง ดังนั้นสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 72 ชม. เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้ม้าวิ่ง เพื่อยืนยันการเกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้ม้าวิ่งได้มีการตรวจสอบใบกล้วยไม้ม้าวิ่งด้วยโฟลไซโทเมทรี และวัดความยาวของเซลล์คุม พบว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นเททระพลอยด์มีความยาวของเซลล์คุมเพิ่มขึ้นจากต้นปกติ

วชิรพัฒน์ จิวานิจ และคณะ (2552) ศึกษาผลของโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มและการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง โดยนำโปรโตคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งซึ่งมีรูปร่างค่อนข้างกลมในระยะ G_1 อายุ 25 วัน ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในอาหารเหลวสูตร VW ดัดแปลงมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีโคลชิซินเข้มข้น 0, 0.01, 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืดเป็นระยะเวลา 5 และ 10 วันจากนั้นย้ายมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของโปรโตคอร์มทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 14 สัปดาห์ พบว่า การเพิ่มความเข้มข้น และระยะเวลาที่ได้รับโคลชิซินทำให้เปอร์เซ็นต์การตายของโปรโตคอร์มมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มมีแนวโน้มช้าลง หลังจากเลี้ยง 14 สัปดาห์โปรโตคอร์มที่ได้รับ

โคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 วัน มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงถึง 94.67 เปอร์เซ็นต์ และมีเพียง 0.88 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่เจริญเติบโตจนถึงเป็นระยะ G_4 ซึ่งเป็นระยะที่มีรากเกิดขึ้น โปรโตคอร์มที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 10 วัน มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นสองเท่าเป็นเททระพลอยด์ได้สูงสุด 25 เปอร์เซ็นต์ โดยต้นเททระพลอยด์ที่เกิดขึ้นมี 2 แบบ คือ ต้นที่คล้ายต้นดิพลอยด์ปกติและต้นที่มีลักษณะผิดปกติ โดยมีใบหนา สีเขียวเข้ม และต้นเล็ก

รัชนี เพ็ชร์ช้าง (2553) ศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการให้โคลชิซินต่อการเจริญและจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้เอื้องเงิน (*Dendrobium draconis* Rchb. f.) โดยนำโปรโตคอร์มหลังการงอก 1 เดือน มาแช่ในอาหารที่มีสารละลายโคลชิซีนความเข้มข้น 0.05, 0.10 และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 และ 5 วัน จากนั้นจึงย้ายโปรโตคอร์ม มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร VW จนถึงสัปดาห์ที่ 14 ทำการศึกษาการเจริญเติบโตและจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของเอื้องเงิน พบว่า ความสูง และจำนวนใบของเอื้องเงินไม่แตกต่างกันกับชุดควบคุมแต่มีลักษณะของลำต้นใหญ่กว่า แต่ใบมีสีเขียวเข้มกว่าชุดควบคุม ส่วนความหนาและความยาวของปากใบและความหนาของใบจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินเพิ่มสูงขึ้น แต่การรอดชีวิตของเอื้องเงินจะลดลง การศึกษาจำนวนโครโมโซมของชุดควบคุมและกลุ่มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 38$ ส่วนกลุ่มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.10 เปอร์เซ็นต์ และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 4 และ 5 วัน มีจำนวนโครโมโซม $2n = 4x = 76$ และสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาแช่สาร 4 วันเหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดเททระพลอยด์ในเอื้องเงิน

Chaicharoen and Saejew (1981) ได้ศึกษาผลของสารโคลชิซินกับโปรโตคอร์มของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium phalaenopsis* พบว่า โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 9 วัน มีการเปลี่ยนแปลงของระดับพลอยดิเป็นเททระพลอยด์ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ในต้นเททระพลอยด์มีการเจริญเติบโตช้ากว่าดิพลอยด์ แต่มีขนาดของใบ เซลล์คุมปากใบ และขนาดของดอกใหญ่กว่าดิพลอยด์

Silva et al. (2000) ศึกษาผลของสารโคลชิซินกับ protocorm-like bodies ของกล้วยไม้ *Cattleya intermedia* L. พบว่าโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน สามารถชักนำให้เกิดต้นมิกโซพลอยด์ (mixoploid) และเททระพลอยด์ตามลำดับ โดยในต้นเททระพลอยด์และดิพลอยด์มีพื้นที่ปากใบและความหนาแน่นของปากใบต่อพื้นที่แตกต่างกัน ซึ่งจะไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอก เช่น น้ำ และอุณหภูมิ

Sarathum et al. (2010) ทำการศึกษาความเข้มข้นของสารโคลชิซิน และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้ *Dendrobium scabrilingue* L. โดยการแช่ protocorm-like bodies (PLBs) ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.000, 0.025, 0.050, 0.075 และ 0.100 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3, 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า สารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 14 วัน ชิ้นส่วน PLBs มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดคือ 36.8 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นเททระพลอยด์ได้ถึง 43.1 เปอร์เซ็นต์ โดยต้นเททระพลอยด์ที่เกิดขึ้นจะมีใบที่กว้างและหนาขึ้น สีใบเขียวเข้มขึ้น และขนาดของลำต้นและรากเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับต้นดิพลอยด์ปกติ

2.8 คุณค่าในการปรับปรุงพันธุ์

การปรับปรุงพันธุ์ หมายถึง การพัฒนาหรือการปรับปรุงสายพันธุ์ใหม่ให้มีลักษณะที่ดีขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิมเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของผู้ผลิตและผู้บริโภค การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เพื่อเป็นการสร้างสิ่งมีชีวิตใหม่ๆที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม แล้วมีการคัดเลือกและนำไปสู่การเกิดวิวัฒนาการในที่สุด สำหรับการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์ ทั้งการผสมข้ามภายในชนิดเดียวกัน ข้ามชนิดและข้ามสกุล ทำให้ได้กล้วยไม้พันธุ์ใหม่ที่มีความหลากหลาย ซึ่งปัจจัยที่ทำให้กล้วยไม้มีความแตกต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับ 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยภายนอก เช่น สภาพแวดล้อม การจัดการ และอีกปัจจัยหนึ่งคือ ปัจจัยภายใน ซึ่งเกี่ยวกับลักษณะทางพันธุศาสตร์และเป็นปัจจัยที่มีหน้าที่ควบคุมและถ่ายทอดลักษณะต่างๆจากรุ่นหนึ่งสู่อีกรุ่นหนึ่ง โดยอาศัยโครโมโซมที่อยู่ภายในเซลล์ (ระพี สาคริก, 2516) ดังนั้น ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้จึงจำเป็นต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐานคือ 1) ความรู้เกี่ยวกับการถ่ายทอดลักษณะต่างๆ เช่น ฤดูการออกดอก รูปร่างดอก ขนาดดอก ช่อดอก และสีของดอก 2) จำนวนชุดโครโมโซม เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนโครโมโซมสามารถลดความเป็นหมันของต้นลูกผสมและทำให้ลักษณะของต้นและดอกเปลี่ยนไป (ครรชิต ธรรมศิริ, 2547)

กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง เป็นกล้วยไม้สกุลหนึ่งที่มีสมาชิกน้อยและมีเพียงไม่กี่ชนิดในโลก จึงทำให้มีลูกผสมที่เกิดจากการปรับปรุงพันธุ์ข้ามชนิดภายในสกุลเดียวกันไม่มากนัก แต่เนื่องจากกล้วยไม้ในสกุลนี้มีลักษณะและรูปร่างของดอกที่โดดเด่นหลายประการ ทำให้มีการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้ามระหว่างสกุลม้าวิ่งกับกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตประเภทโมโนโพเดียลได้หลายสกุล เช่น สกุลเข็ม สกุลช้าง และสกุลแวนด้า (ระพี สาคริก, 2516) ในปัจจุบันลูกผสมที่ได้จากการ

ปรับปรุงพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่เป็นที่รู้จักและนิยมปลูกเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายคือ *Doritaenopsis* เป็นกล้วยไม้สกุลใหม่ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่าง *Doritis* กับ *Phalaenopsis* ซึ่งกล้วยไม้ทั้งสองสกุลมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก (กาญจนา รุ่งรัชกานนท์, 2545) กล้วยไม้สกุลนี้มีลักษณะดอกที่เป็นเอกลักษณ์ที่มีความสวยงาม สีของกลีบดอกมีความหลากหลายคือ มีตั้งแต่สีขาว สีชมพูไปจนถึงสีม่วงเข้ม และมีช่วงการบานของดอกนานขึ้น ทำให้กล้วยไม้สกุล *Doritaenopsis* เป็นกล้วยไม้ลูกผสมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (Cui et al., 2004)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาพฤติกรรมไมโอซิสและเซลล์พันธุศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม ได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 การทดลองคือ (1) การศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม (2) การศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม และ (3) การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน โดยมีรายละเอียดของขั้นตอนการวิจัย ดังนี้

3.1 การศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม

3.1.1 วัตถุประสงค์ในการทดลอง

3.1.1.1 เพื่อศึกษาลักษณะการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม

3.1.1.2 เพื่อศึกษาลักษณะความผิดปกติที่เกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม

3.1.1.3 เพื่อศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของสายพันธุ์ลูกผสม

3.1.2 วิธีการทดลอง

เลือกต้นกล้วยไม้ม้าวิ่ง และแดงอุบล ที่กำลังมีการเจริญเติบโตและออกดอกในช่วงเดือน มิถุนายน ถึง สิงหาคม พ.ศ. 2552 ในโรงเรือนเพาะชำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ส่วนสายพันธุ์ลูกผสมที่ทำการศึกษา ซึ่งมีการออกดอกในช่วงเวลาเดียวกันจะได้จากสวนของเกษตรกรผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี จากนั้นทำการศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ดังนี้

เลือกดอกตูมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง แดงอุบล และสายพันธุ์ลูกผสม (ภาพที่ 3.1) ที่มีขนาดของดอกประมาณ 1 ใน 4 ของตูมใกล้บาน ผ่าดอกและแกะก้อนเรณู (pollen) จำนวนเล็กน้อยวางบนสไลด์ หยดกรดน้ำส้ม (acetic acid) 45 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 10 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นซับกรดน้ำส้มออก แล้วย้อมสีด้วยอะซีโตออซีน (aceto-orcein) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาประมาณ 3 นาที ในกล่องที่มีกรดน้ำส้ม 45 เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover slip) แล้วให้ความร้อน จากนั้นใช้นิ้วหัวแม่มือหรือปลายดินสอกดลงในแนวตั้งฉาก

เพื่อให้เซลล์กระจาย และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 1,000 เท่า ศึกษาการเข้าคู่กันของโครโมโซมในระยะ diakinesis ลักษณะความผิดปกติของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ในระยะแอนาเฟส I เทโลเฟส I และลักษณะการสร้างไมโครสปอร์ และบันทึกภาพ

กล้วยไม้ม้าวิ่ง (2n = 2x =38)

(*Doritis pulcherrima* Lindl.)

กล้วยไม้แดงอุบล (2n = 4x = 76)

(*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*)

ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง

ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล

ภาพที่ 3.1 ลักษณะดอกกล้วยไม้ม้าวิ่ง แดงอุบล และสายพันธุ์ลูกผสม

การศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสม ใช้วิธีการตรวจสอบ 2 วิธีคือ

(1) การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู ศึกษาในกล้วยไม้ม้าวิ่ง แดงอุบล ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง และลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล โดยทำการผสมตัวเอง (self cross) และผสมสลับ (reciprocal cross) คือนำ pollen ของสายพันธุ์ลูกผสมไปใส่บนยอดเกสรเพศเมีย (stigma) ของกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล และนำ pollen ของกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล ไปใส่บนยอดเกสรเพศเมีย (stigma) ของสายพันธุ์ลูกผสม หลังจากนั้นประมาณ 5 วัน นำ

เรณูที่อยู่บนยอดเกสรเพศเมีย (stigma) มาเขี่ยลงบนสไลด์และย้อมด้วยสี aceto-orcein ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำมาศึกษาความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์การติดสี aceto-orcein ของ pollen) และการงอกของ pollen tube ของกล้วยไม้ม้าวิ่งแดงอุบลและสายพันธุ์ลูกผสม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้กำลังขยาย 400 เท่า และบันทึกภาพ

(2) การศึกษาการผสมติดเป็นคัพภะ (embryo) โดยนำสายพันธุ์ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล ทำการผสมตัวเองและผสมสลับ กับกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล เพื่อให้ติดฝัก นำฝักที่มีอายุประมาณ 2 - 3 เดือนมาเพาะในอาหารวิทยาศาสตร์ที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ เลี้ยงไว้เป็นเวลา 1 - 2 เดือน ก่อนที่จะนำมาศึกษาการผสมติดเป็นคัพภะ (embryo)

3.1.3 การบันทึกผลการทดลอง

3.1.3.1 ลักษณะการเข้าคู่กันของโครโมโซมในระยะ diakinesis หรือ metaphase I (นับจำนวน univalent, bivalent, trivalent และ quadrivalent) จำนวน 25 เซลล์ต่อพันธุ์

3.1.3.2 ตรวจนับลักษณะความผิดปกติ (เปอร์เซ็นต์การเกิด chromosome lagging และ chromosome bridge) ที่เกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส จำนวน 100 เซลล์ต่อพันธุ์

3.1.3.3 ตรวจนับลักษณะการสร้างไมโครสปอร์ ประมาณ 300 ไมโครสปอร์ และหาค่าเฉลี่ยของไมโครสปอร์ที่พบในแต่ละพันธุ์

3.1.3.4 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู ในแต่ละพันธุ์

3.1.3.5 เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูในแต่ละพันธุ์

3.1.3.6 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้พันธุ์ผสมและการพัฒนาเป็นต้นอ่อน

3.2 การศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม

3.2.1 วัตถุประสงค์ในการทดลอง

3.2.1.1 เพื่อศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม

3.2.1.2 เพื่อจัดทำแคริโอไทป์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม

3.2.2 วิธีการทดลอง

ทำการตรวจนับจำนวน somatic chromosome จากปลายราก โดยเก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้ม้าวิ่ง ม้าบิน แดงอุบล และสายพันธุ์ลูกผสม ที่กำลังมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 09.00 – 10.00 น. นับจำนวนโครโมโซม ด้วยวิธีของ Kamemoto et al. (1961) โดยนับจำนวน 10 เซลล์ต่อพันธุ์

ในการศึกษาลักษณะและรูปร่างของโครโมโซม ตลอดจนการทำแคริโอไทป์ของกล้วยไม้ม้าวิ่ง ม้าบิน แดงอุบล และสายพันธุ์ลูกผสม รูปร่างโครโมโซมที่ศึกษามี 4 แบบคือ

3.2.2.1 Metacentric

3.2.2.2 Submetacentric

3.2.2.3 Acrocentric

3.2.2.4 Telocentric

3.2.3 การบันทึกผลการทดลอง

3.2.3.1 จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง ม้าบิน แดงอุบล และสายพันธุ์ลูกผสม

3.2.3.2 จำนวนของโครโมโซมที่มีลักษณะเป็น metacentric, submetacentric, acrocentric และ telocentric ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม โดยการจำแนกรูปร่างของโครโมโซมจำแนกตามวิธีของ Levan et al., 1964 (ภาคผนวก ค)

3.3 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน

3.3.1 วัตถุประสงค์ในการทดลอง

3.3.1.1 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนโครโมโซมหลังการชักนำด้วยโคลชิซิน

3.3.1.2 เพื่อศึกษาลักษณะที่ผิดปกติของโครโมโซมหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน

3.3.1.3 เพื่อตรวจสอบและยืนยันจำนวนโครโมโซมในแต่ละระดับพลอยดิ

3.3.2 วิธีการทดลอง

ทำการคัดเลือกต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้น 75 ppm เป็นเวลา 7-15 วัน ที่กำลังเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ โดยคัดเลือกต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดิเป็น ดิพลอยด์ เททระพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และออกตะพลอยด์ โดยการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเบื้องต้นด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ (flow cytometer) ทำการศึกษาลักษณะโครโมโซม ลักษณะความผิดปกติ และจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากมีการชักนำด้วยสารโคลชิซิน ตามวิธีการศึกษาดังนี้

ทำการตรวจนับจำนวน somatic chromosome จากปลายราก โดยเก็บตัวอย่างปลายรากของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่กำลังแบ่งเซลล์ ในช่วงเวลา 09.00 – 10.00 น. หลังจากนั้นนับและตรวจสอบโครโมโซมตามวิธีของ Kamemoto et al. (1961) โดยนับจำนวน 10 เซลล์ในแต่ละระดับพลอยดิ

3.3.3 การบันทึกผลการทดลอง

3.3.3.1 จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เกิดขึ้นและเปลี่ยนแปลงไปหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน

3.3.3.2 ลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมแบบ mixoploid และแบบ euploid ที่เกิดขึ้นหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน ที่แตกต่างจากลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นดิพลอยด์

3.3.3.3 สัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน โดยศึกษาลักษณะต่างๆ จำนวน 20 ซ้ำ (ต้น) / ระดับพลอยดิ ดังนี้

1) ความสูงของต้น

2) จำนวนใบต่อต้น

3) ขนาดใบ (ความหนา ความกว้าง ความยาว)

4) ขนาดลำต้น (ความกว้าง และความยาว)

5) ขนาดของราก

3.3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีระดับพลอยดีเป็นสิ่งทดลอง คือ ดิพลอยด์ เททระพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และออกตะพลอยด์ รวมเป็น 4 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 20 ซ้ำ (ต้น) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซินด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) วิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS

ระยะเวลาทำการวิจัย

มีนาคม 2552 ถึง สิงหาคม 2554

สถานที่ทำการวิจัย

ทำการทดลอง ณ เรือนเพาะชำและห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คณะเกษตรศาสตร์ และศูนย์วิเคราะห์โครโมโซม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม

ทำการศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสจากดอกอ่อนที่มีขนาด 1 ใน 4 ของดอกตูมใกล้บาน โดยกล้วยไม้ม้าวิ่ง และลูกผสม มีขนาดของดอก 0.4 - 0.5 ซม. ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลมีขนาดของดอก 0.5 - 0.6 ซม. และทำการศึกษาการเข้าคู่กันของโครโมโซม ลักษณะความผิดปกติในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส การสร้างไมโครสปอร์ในกล้วยไม้ม้าวิ่ง แดงอุบล ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง และลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล ตลอดจนการศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสม

4.1.1 การศึกษาลักษณะการเข้าคู่กันของโครโมโซมในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม

จากการศึกษาพฤติกรรมไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า พฤติกรรมไมโอซิสของกล้วยไม้ทั้งม้าวิ่งและแดงอุบลซึ่งเป็นพันธุ์แท้เป็นปกติ คือ มีการเข้าคู่กันของโครโมโซมแบบ bivalent ในระยะ diakinesis เฉลี่ย 19 และ 38 คู่ตามลำดับ ส่วนในลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าการเข้าคู่กันของโครโมโซมมีความผิดปกติ คือ พบโครโมโซมที่ไม่มีการเข้าคู่กัน (univalent) และโครโมโซมที่มีการเข้าคู่กันแบบ bivalent และ trivalent โดยในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง และลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล พบลักษณะการเข้าคู่กันที่เป็นปกติ (bivalent) เพียง 19.6 และ 19.55 คู่ ตามลำดับ ส่วนลักษณะการเข้าคู่กันที่ผิดปกติที่พบในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง พบว่ามีโครโมโซมที่ไม่มีการเข้าคู่กัน 7.6 univalent และโครโมโซมที่มีการเข้าคู่กันผิดปกติ 2.53 trivalent ในขณะที่ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบลมีโครโมโซมที่ไม่มีการเข้าคู่กัน 5.44 univalent และโครโมโซมที่มีการเข้าคู่กันผิดปกติ 3.22 trivalent ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1 และ ภาพที่ 4.1) ซึ่งลักษณะการเข้าคู่ที่ผิดปกติคือการไม่เข้าคู่กันของโครโมโซมแบบ univalent และการเข้าคู่กันของโครโมโซมแบบ trivalent (ภาพที่ 4.2) ที่พบในลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์มีจำนวนที่แตกต่างกัน

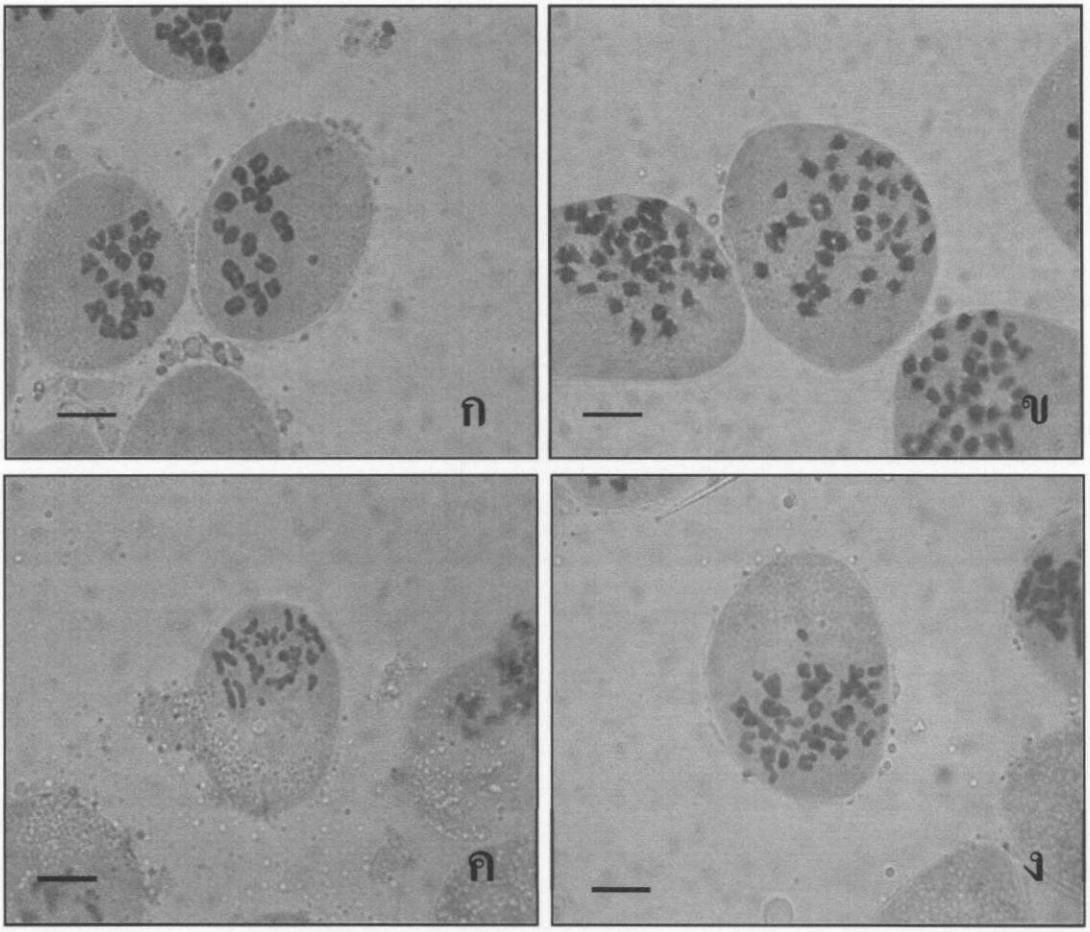
4.1.2 การศึกษาลักษณะความผิดปกติในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม

นอกจากลักษณะการเข้าคู่กันของโครโมโซมแล้ว ยังพบว่าในระยะแอนาเฟส I ของลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์มีโครโมโซมบางแท่งมีการเคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วเซลล์ได้ช้ากว่าโครโมโซมอื่น (chromosome lagging) หรือโครโมโซมคู่เหมือนไม่มีการแยกออกจากกันหรือแยกจากกันไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างคล้ายสะพาน (chromosome bridge) เกิดขึ้น ความผิดปกติดังกล่าวส่งผลให้เกิดการขาดหายไปหรือการเพิ่มเข้ามาของโครโมโซมในรุ่นลูก โดยในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง มีเปอร์เซ็นต์การเกิด chromosome lagging และ chromosome bridge คิดเป็น 77 เปอร์เซ็นต์ และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล มีเปอร์เซ็นต์การเกิด chromosome lagging และ chromosome bridge สูงถึง 95.33 เปอร์เซ็นต์ และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2 และ ภาพที่ 4.3) และเมื่อทำการศึกษาในระยะเทโลเฟส I ทั้งในกล้วยไม้ม้าวิ่ง แดงอุบล และสายพันธุ์ลูกผสม พบว่าในกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลมีลักษณะของการแบ่งเซลล์ปกติสูงถึง 99.33 เปอร์เซ็นต์ และ 99.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลักษณะความผิดปกติของเซลล์ที่เกิด micronucleus พบเป็นส่วนน้อยคือ 0.67 เปอร์เซ็นต์ และ 0.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ในสายพันธุ์ลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์พบเซลล์ที่ผิดปกติคือเกิด micronucleus สูงขึ้น โดยพบว่าในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง พบเซลล์ที่เกิด micronucleus 19.33 เปอร์เซ็นต์ และในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล พบเซลล์ที่เกิด micronucleus สูงถึง 93.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2 และ ภาพที่ 4.4)

ตารางที่ 4.1 การเข้าคู่กันของโครโมโซมในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม

สายพันธุ์	ลักษณะการเข้าคู่กันของโครโมโซม[1/]			
	Univalent	**Bivalent**	**Trivalent**	**Quadrivalent**
ม้าวิ่ง	-	19	-	-
แดงอุบล	-	38	-	-
แดงอุบล x ม้าวิ่ง	7.6	19.6	2.53	-
ม้าบิน x แดงอุบล	5.44	19.55	3.22	-

[1/] ค่าเฉลี่ยจากจำนวนเซลล์ที่ตรวจนับ 25 เซลล์ต่อสายพันธุ์



ภาพที่ 4.1 การเข้าคู่กันของโครโมโซมในระยะ diakinesis ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส

(scale bar = 10 μm)

(ก) กล้วยไม้ม้าวิ่ง มีการเข้าคู่กันของโครโมโซมเท่ากับ 19 คู่ (19 II)

(ข) กล้วยไม้แดงอุบล มีการเข้าคู่กันของโครโมโซมเท่ากับ 38 คู่ (38 II)

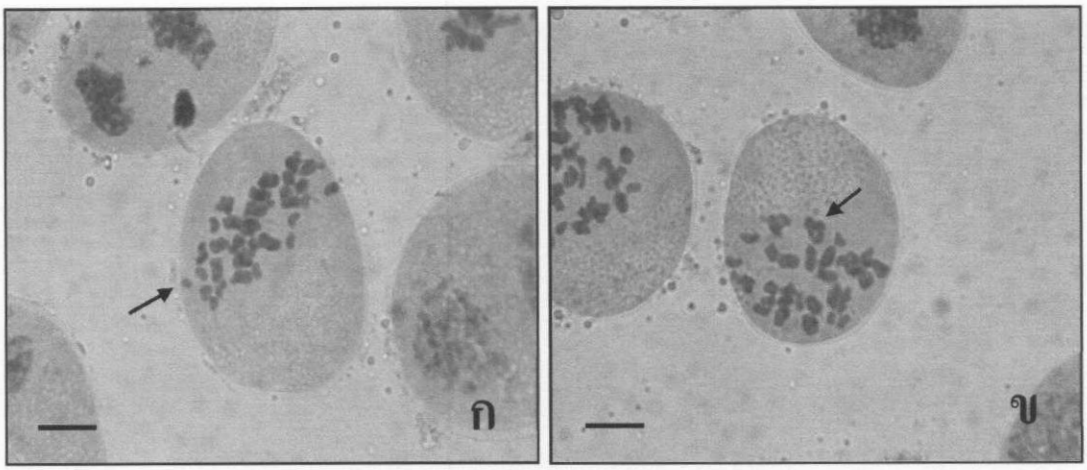
(ค) กล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง มีการเข้าคู่กันของโครโมโซม

(7.6 I + 19.6 II + 2.53 III)

(ง) กล้วยไม้ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล มีการเข้าคู่ของโครโมโซม

(5.44 I + 19.55 II + 3.22 III)

(I = univalent, II = bivalent และ III = trivalent)



ภาพที่ 4.2 การเข้าคู่กันของโครโมโซมในระยะ diakinesis ของกล้วยไม้ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล (scale bar = 10 μm)

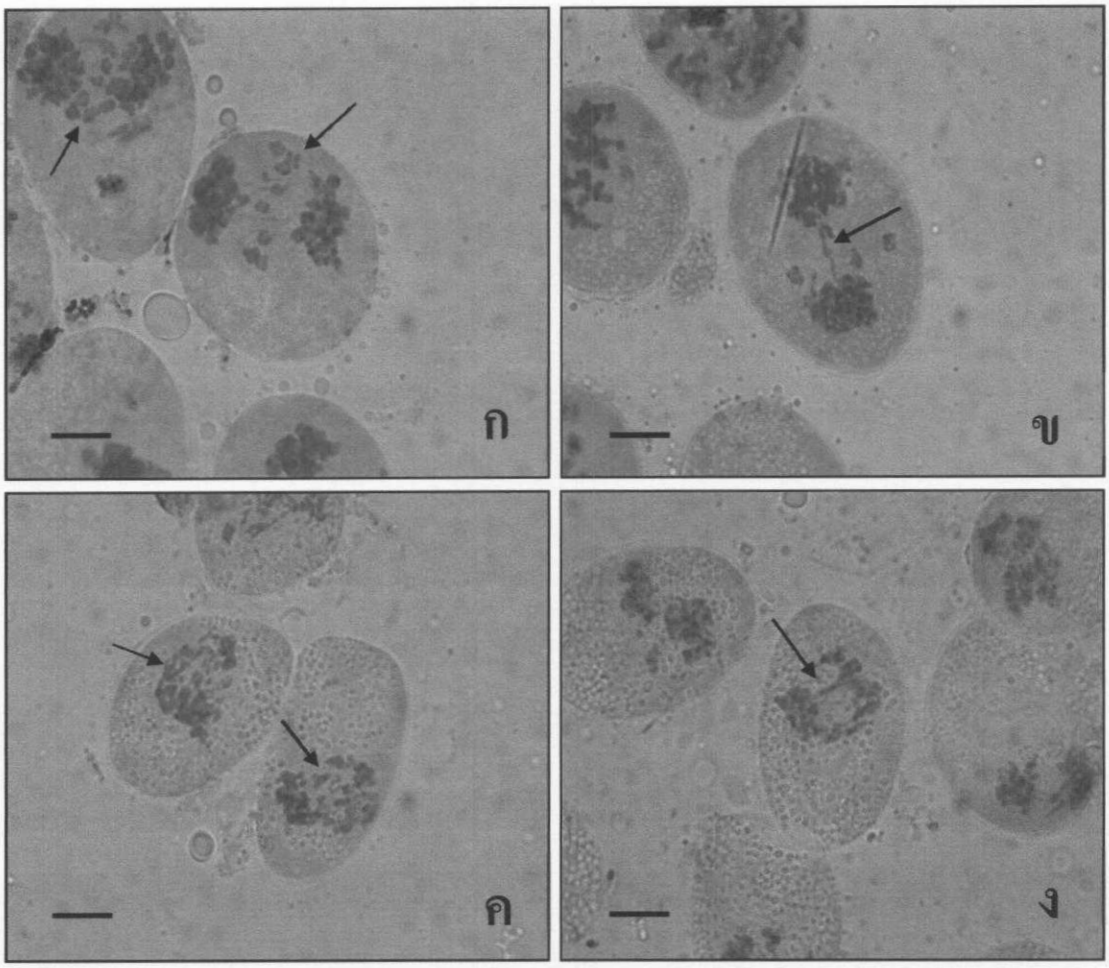
(ก) บริเวณลูกศรชี้ คือ univalent

(ข) บริเวณลูกศรชี้ คือ trivalent

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์ความถี่ของการพบความผิดปกติในระยะแอนาเฟส I และ เทโลเฟส I ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม

สายพันธุ์	แอนาเฟส I [1/]			เทโลเฟส I [1/]	
	normal	chromosome lagging	chromosome bridge	normal	micronucleus
ม้าวิ่ง	88	12	-	99.33	0.67
แดงอุบล	88	12	-	99.67	0.33
แดงอุบล x ม้าวิ่ง	19	77	4	80.67	19.33
ม้าบิน x แดงอุบล	3.67	95.33	1	6.67	93.33

[1/] ค่าเฉลี่ยจากการตรวจนับจำนวน 100 เซลล์ต่อสายพันธุ์



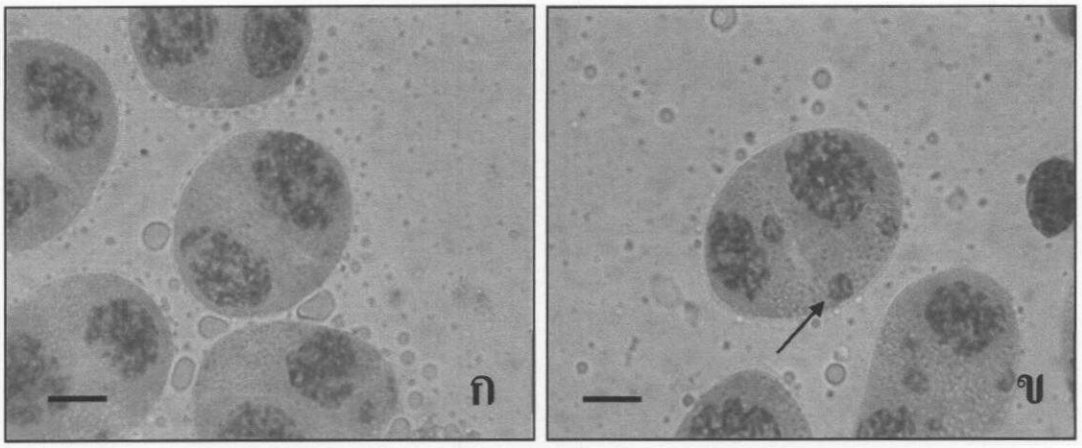
ภาพที่ 4.3 ลักษณะการเกิด chromosome lagging และ chromosome bridge ในระยะแอนาเฟส I ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สายพันธุ์ลูกผสม (scale bar = 10 μm)

(ก) บริเวณลูกศรชี้คือ chromosome lagging ของกล้วยไม้ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล

(ข) บริเวณลูกศรชี้คือ chromosome bridge ของกล้วยไม้ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล

(ค) บริเวณลูกศรชี้คือ chromosome lagging ของกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง

(ง) บริเวณลูกศรชี้คือ chromosome bridge ของกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง



ภาพที่ 4.4 การแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติในระยะเทโลเฟส I ของกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง (scale bar = 10 μm)

(ก) เซลล์ปกติ

(ข) เซลล์ที่ผิดปกติ บริเวณลูกศรชี้คือ micronucleus

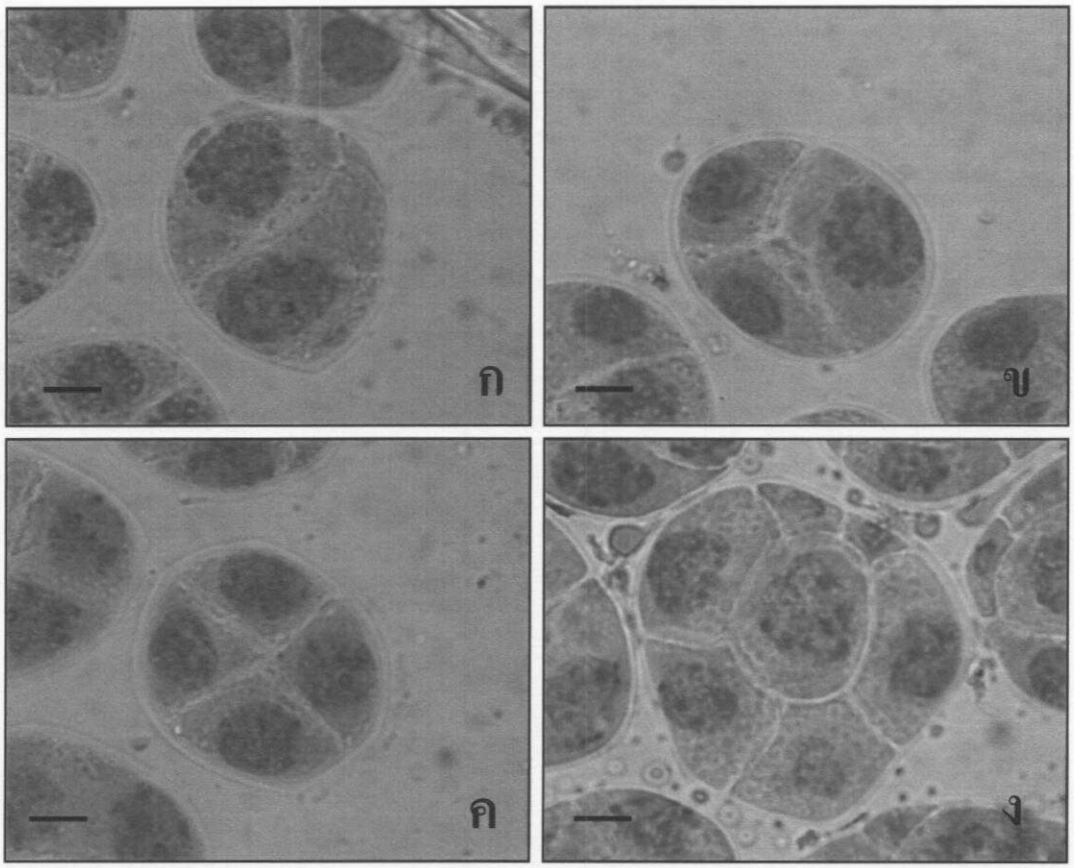
4.1.3 การศึกษาลักษณะการสร้างไมโครสปอร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม

จากการศึกษาลักษณะการสร้างไมโครสปอร์ของกล้วยไม้ม้าวิ่ง แดงอุบล และสายพันธุ์ลูกผสม พบว่า ในกล้วยไม้ม้าวิ่ง และแดงอุบล มีการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็น tetrad ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงคือ 99 เปอร์เซ็นต์ และ 99.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในลูกผสมสองสายพันธุ์ พบว่าในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง มีการสร้างไมโครสปอร์ที่ผิดปกติมากคือ พบทั้ง dyad (3.78 เปอร์เซ็นต์), triad (5.11 เปอร์เซ็นต์), tetrad (56 เปอร์เซ็นต์) และ polyad (35.11 เปอร์เซ็นต์) ส่วนในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล ลักษณะการสร้างไมโครสปอร์มีความผิดปกติเช่นเดียวกัน โดยพบทั้ง dyad (1.33 เปอร์เซ็นต์), triad (2 เปอร์เซ็นต์), tetrad (48.78 เปอร์เซ็นต์) และ polyad (47.89 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 4.3 และ ภาพที่ 4.5)

ตารางที่ 4.3 การสร้างไมโครสปอร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม

สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยของการสร้างไมโครสปอร์ (%) [1/]				
	monad	dyad	triad	tetrad	polyad
ม้าวิ่ง	-	-	1	99	-
แดงอุบล	-	0.11	0.67	99.22	-
แดงอุบล x ม้าวิ่ง	-	3.78	5.11	56	35.11
ม้าบิน x แดงอุบล	-	1.33	2	48.78	47.89

[1/] ค่าเฉลี่ยจากการตรวจนับ 300 ไมโครสปอร์ (จำนวน 3 ซ้ำ) ต่อสายพันธุ์



ภาพที่ 4.5 การสร้างไมโครสปอร์ของกล้วยไม้ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล (scale bar = 10 μm)
(ก) dyad, (ข) triad, (ค) tetrad และ (ง) polyad

4.1.4 การศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสม

4.1.4.1 การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู

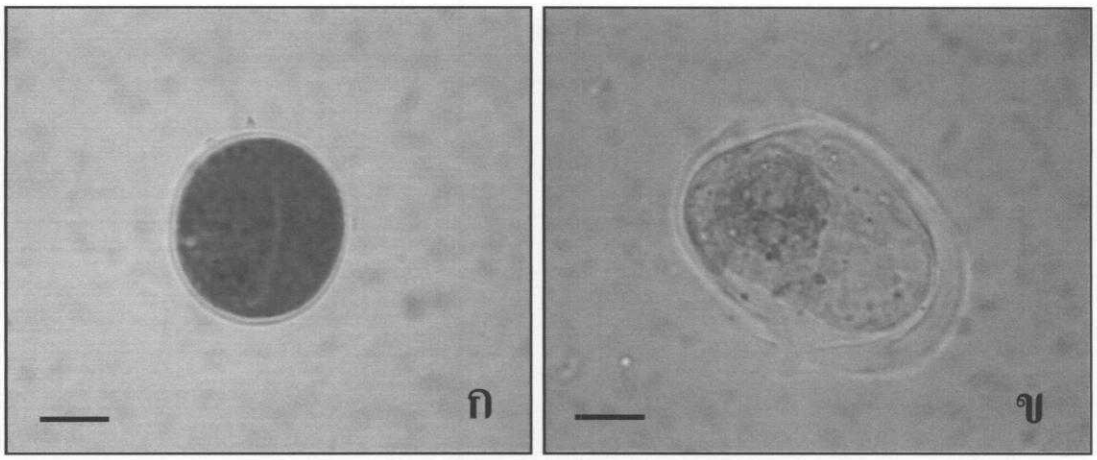
จากการศึกษาความมีชีวิตของเรณูในกล้วยไม้แดงอุบล ม้าวิ่ง สายพันธุ์ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง และลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล พบว่า ในกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลเมื่อทำการผสมตัวเอง ความมีชีวิตของเรณูหรือการย้อมติดสีอะซีโตออซีนสูงถึง 91.5 และ 92.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อทำการผสมสลับ (reciprocal cross) ระหว่างกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลพบว่าความมีชีวิตของเรณูยังคงสูงเช่นเดียวกันคือ 85.9 และ 89.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อทดสอบความมีชีวิตของเรณูในกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลซึ่งเป็นสายพันธุ์แท้ โดยการผสมกับลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง และลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล พบว่า ความมีชีวิตของเรณูในกล้วยไม้ม้าวิ่งลดลงเป็น 41.5 และ 52.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลความมีชีวิตของเรณูก็ลดลงในทำนองเดียวกันคือ 44 และ 53.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อผสมกับลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง และลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล ตามลำดับ ส่วนความมีชีวิตของเรณูในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง ที่เกิดจากการผสมตัวเอง พบว่ามีเรณูที่มีชีวิตเพียง 31.7 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการผสมกับกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล ความมีชีวิตของเรณูลดลงเหลือเพียง 24.7 และ 26.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล ที่เกิดจากการผสมตัวเอง พบว่ามีเรณูที่มีชีวิต 46.5 เปอร์เซ็นต์ และมีความมีชีวิตของเรณูเป็น 46.2 และ 51.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผสมกับกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4 และ ภาพที่ 4.6)

4.1.4.2 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู

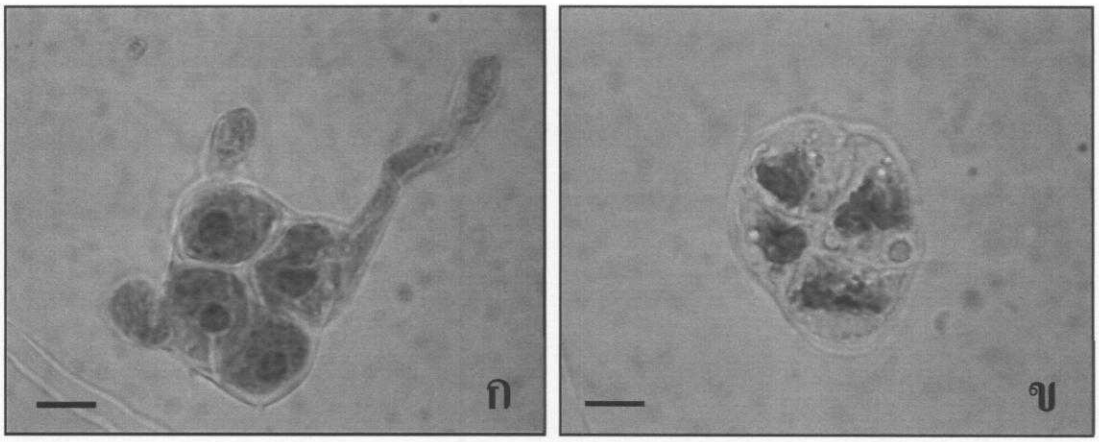
ผลการวิเคราะห์การงอกของเรณูทั้งในกล้วยไม้ม้าวิ่ง แดงอุบล สายพันธุ์ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง และลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล พบว่า เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูในกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลที่เกิดจากการผสมตัวเองและการผสมสลับมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่สูงคือมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำเรณูกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลทำการผสมกับลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง พบว่าการงอกของเรณูในกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลลดลงเหลือเพียง 40.4 และ 42.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับการผสมกับลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล ที่พบว่าการงอกของเรณูในกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลลดลงเป็น 47.7 และ 49.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง ที่เกิดจากการผสมตัวเองและการผสมกับกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล พบว่าเรณูนั้นไม่สามารถงอกได้เลย เนื่องจากเรณูมีความมีชีวิตต่ำ ส่วนลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล พบว่าเรณูสามารถงอกได้เพียง 44.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการผสมตัวเองและเมื่อผสมกับกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล พบว่ามีการงอกของเรณูเท่ากับ 43.9 และ 44.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4 และ ภาพที่ 4.7)

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูในกล้วยไม้ม้าวิ่ง แดงอุบล และสายพันธุ์ลูกผสม ที่ทำการผสมตัวเองและผสมสลับ

คู่ผสม	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต	เปอร์เซ็นต์การงอก
ม้าวิ่ง ผสมตัวเอง	91.5	87.5
แดงอุบล ผสมตัวเอง	92.1	89.4
ม้าวิ่ง x แดงอุบล	85.9	83.6
แดงอุบล x ม้าวิ่ง	89.6	87
(แดงอุบล x ม้าวิ่ง) ผสมตัวเอง	31.7	ไม่งอก
(แดงอุบล x ม้าวิ่ง) x ม้าวิ่ง	41.5	40.4
(แดงอุบล x ม้าวิ่ง) x แดงอุบล	44	42.7
ม้าวิ่ง x (แดงอุบล x ม้าวิ่ง)	24.7	ไม่งอก
แดงอุบล x (แดงอุบล x ม้าวิ่ง)	26.8	ไม่งอก
(ม้าบิน x แดงอุบล) ผสมตัวเอง	46.5	44.6
(ม้าบิน x แดงอุบล) x ม้าวิ่ง	52.6	47.7
(ม้าบิน x แดงอุบล) x แดงอุบล	53.9	49.5
ม้าวิ่ง x (ม้าบิน x แดงอุบล)	46.2	43.9
แดงอุบล x (ม้าบิน x แดงอุบล)	51.6	44.7



ภาพที่ 4.6 การศึกษาความมีชีวิตของเรณูในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสมที่ย้อมด้วยสีอะซีโตออซีน (scale bar = 10 µm)
(ก) เรณูที่มีชีวิต
(ข) เรณูที่ไม่มีชีวิต



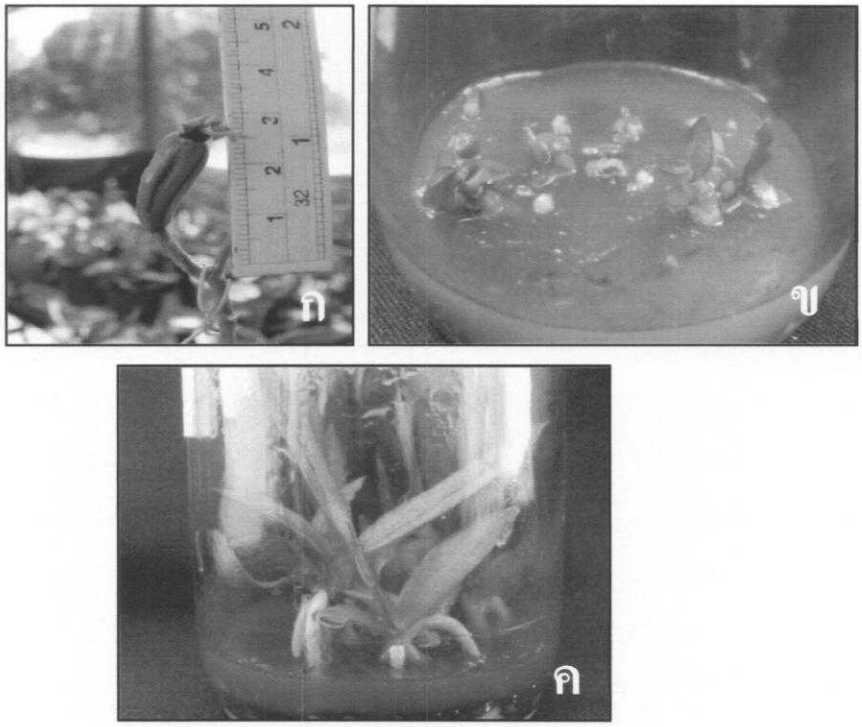
ภาพที่ 4.7 การศึกษาการงอกของเรณูในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสมที่ย้อมด้วยสีอะซีโตออซีน (scale bar = 10 µm)
(ก) เรณูที่งอก
(ข) เรณูที่ไม่งอก

4.1.4.3 การศึกษาการผสมติดเป็นคัพภะ (embryo)

ผลของการถ่ายเรณูเพื่อศึกษาการผสมติดและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่เกิดจากการผสมตัวเองและการผสมสลับ ของกล้วยไม้ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล พบว่า คู่ผสมที่ 1 ซึ่งเกิดจากกล้วยไม้ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบลผสมตัวเอง หลังจากการผสมเกสรกล้วยไม้ลูกผสมสามารถผสมติดและมีการพัฒนาเป็นฝัก แต่เมื่อนำฝักที่มีอายุประมาณ 2 - 3 เดือนมาเพาะในอาหารวิทยาศาสตร์ที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ และเลี้ยงไว้เป็นเวลา 1 - 2 เดือน เพื่อศึกษาการพัฒนาเป็นต้นอ่อน พบว่า กล้วยไม้ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบลผสมตัวเองไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้และให้ผลในทำนองเดียวกันในคู่ผสมที่ 2 ((ม้าบิน x แดงอุบล) x แดงอุบล) คู่ผสมที่ 3 ((ม้าบิน x แดงอุบล) x ม้าวิ่ง) และคู่ผสมที่ 4 (แดงอุบล x (ม้าบิน x แดงอุบล)) ในขณะที่คู่ผสมที่ 5 ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างกล้วยไม้ม้าวิ่ง x (ม้าบิน x แดงอุบล) มีการผสมติดเป็นฝัก และหลังจากนำฝักมาเพาะเมล็ด พบว่าเมล็ดภายในฝักสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้จำนวน 6 ต้น (ตารางที่ 4.5 และ ภาพที่ 4.8)

ตารางที่ 4.5 การผสมติดและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้สายพันธุ์ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล ที่ทำการผสมตัวเองและผสมสลับกับกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล

คู่ผสม	จำนวนดอกที่ผสม	จำนวนดอกที่ผสมติด	จำนวนต้นที่ได้
1. (ม้าบิน x แดงอุบล) ผสมตัวเอง	1	1	0
2. (ม้าบิน x แดงอุบล) x แดงอุบล	1	1	0
3. (ม้าบิน x แดงอุบล) x ม้าวิ่ง	1	1	0
4. แดงอุบล x (ม้าบิน x แดงอุบล)	1	1	0
5. ม้าวิ่ง x (ม้าบิน x แดงอุบล)	2	1	6



ภาพที่ 4.8 การผสมติดและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้ม้าวิ่ง x (ม้าบิน x แดงอุบล)
(ก) การติดฝัก
(ข) ต้นอ่อนหลังเพาะเมล็ด 6 เดือน
(ค) ต้นกล้วยไม้อายุ 1 ปี

4.2 การศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม

การศึกษาลักษณะของโครโมโซม ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาถึงจำนวนของโครโมโซม รูปร่างและลักษณะของโครโมโซมโดยใช้ตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ (centromere) ในการจำแนกรูปร่างของโครโมโซมออกเป็น 4 ประเภท คือ เมตาเซนทริก (metacentric) ซับเมตาเซนทริก (submetacentric) อะโครเซนทริก (acrocentric) และเทโลเซนทริก (telocentric) ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ซึ่งประกอบด้วย กล้วยไม้ม้าวิ่ง ม้าบิน และแดงอุบล รวมทั้งสายพันธุ์ลูกผสม

4.2.1 กล้วยไม้ม้าวิ่ง

จากการศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง พบว่า กล้วยไม้ม้าวิ่งมีจำนวนโครโมโซมจากปลายรากเท่ากับ $2n = 2x = 38$ และเมื่อศึกษาลักษณะ รูปร่างของโครโมโซมในระยะเมตาเฟสโดยนำมาจัดเรียงแคริโอไทป์ พบว่า กล้วยไม้ม้าวิ่งมีรูปแบบของแคริโอไทป์เป็น 6 เมตาเซนทริก 24 ซับเมตาเซนทริก และ 8 อะโครเซนทริก (6M + 24Sm + 8A) (ภาพที่ 4.9) โดย

ขนาดและรูปร่างของโครโมโซมในแต่ละแท่งได้มาจากการคำนวณค่า relative length และค่า centromeric ratio (ตารางที่ 4.6) และเมื่อนำค่า relative length ที่ได้จากการคำนวณมาจัดเรียงขนาดของโครโมโซมจากโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่สุดไปจนถึงโครโมโซมที่มีขนาดเล็กสุดของแต่ละคู่ในจำนวนโครโมโซม 1 ชุด (haploid) จะได้ idiogram ของกล้วยไม้ม้าวิ่ง (ภาพที่ 4.10) ลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง พบว่า โครโมโซมคู่ที่ 1 เป็นโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่และมีตำแหน่งเซนโทรเมียร์อยู่ตรงกลาง จึงจัดเป็นเมตาเซนทริกขนาดใหญ่ ส่วนโครโมโซมคู่ที่ 3 และคู่ที่ 5 จัดเป็นเมตาเซนทริกเช่นเดียวกันแต่เป็นเมตาเซนทริกที่มีขนาดเล็กกว่าโครโมโซมคู่ที่ 1 โครโมโซมคู่ที่ 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 17 และ 19 มีลักษณะและรูปร่างของโครโมโซมขนาดใกล้เคียงกันและมีตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่ค่อนไปข้างใดข้างหนึ่ง ทำให้แขนข้างหนึ่งยาวกว่าแขนอีกข้างหนึ่ง จึงจัดเป็นซับเมตาเซนทริก และโครโมโซมคู่ที่ 13, 15, 16 และ 18 เป็นโครโมโซมที่มีรูปร่างแบบอะโครเซนทริก เนื่องจากเป็นโครโมโซมที่มีลักษณะเป็นแท่ง มีตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่ใกล้กับแขนข้างใดข้างหนึ่ง ทำให้มองเห็นแขนทั้งสองข้างยาวไม่เท่ากันอย่างชัดเจน (ตารางที่ 4.6)

4.2.2 กล้วยไม้ม้าบิน

กล้วยไม้ม้าบินเป็นกล้วยไม้ชนิดหนึ่งในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จากการศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ พบว่า กล้วยไม้ม้าบินมีจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากเท่ากันกับกล้วยไม้ม้าวิ่งคือ $2n = 2x = 38$ และจากการศึกษาลักษณะและรูปร่างของโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบิน โดยการนำโครโมโซมในระยะเมตาเฟสมาจัดทำแคริโอไทป์ พบว่า กล้วยไม้ม้าบินมีรูปแบบของแคริโอไทป์เป็น 8 เมตาเซนทริก 22 ซับเมตาเซนทริก และ 8 อะโครเซนทริก (8M + 22Sm + 8A) (ภาพที่ 4.11) ขนาดและรูปร่างของโครโมโซมในแต่ละแท่งได้มาจากการคำนวณค่า relative length และค่า centromeric ratio (ตารางที่ 4.7) และเมื่อนำค่า relative length ที่ได้จากการคำนวณมาจัดเรียงขนาดของโครโมโซมจากโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่สุดไปจนถึงโครโมโซมที่มีขนาดเล็กสุดของแต่ละคู่ ในจำนวนโครโมโซม 1 ชุด (haploid) จะได้ idiogram ของกล้วยไม้ม้าบิน (ภาพที่ 4.12) โดยโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบิน พบว่า โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 5 และ 7 เป็นโครโมโซมที่จัดอยู่ในประเภทเมตาเซนทริก โดยเป็นโครโมโซมประเภทเมตาเซนทริกที่มีขนาดใหญ่ในคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 ส่วนโครโมโซมคู่ที่ 3, 4, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 17 และ 19 เป็นโครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่ค่อนไปข้างใดข้างหนึ่ง ทำให้แขนข้างหนึ่งยาวกว่าแขนอีกข้างหนึ่ง จัดเป็นซับเมตาเซนทริก และโครโมโซมคู่ที่ 10, 14, 16 และ18 เป็นโครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่ค่อนไปทางปลายด้านหนึ่ง ทำให้แขนทั้งสองข้างยาวไม่เท่ากันอย่างเห็นได้ชัดเจน จึงจัดเป็นโครโมโซมประเภทอะโครเซนทริก (ตารางที่ 4.7)

4.2.3 กล้วยไม้แดงอุบล

จากการศึกษาลักษณะของโครโมโซมของกล้วยไม้แดงอุบล ซึ่งเป็นกล้วยไม้ในสกุลม้าวิ่งที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและขนาดของดอกใหญ่ที่สุด พบว่า จำนวนโครโมโซมปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบลเท่ากับ 2n = 4x = 76 และเมื่อทำการศึกษาถึงลักษณะและรูปร่างของโครโมโซม พบว่า กล้วยไม้แดงอุบลมีรูปร่างและลักษณะของโครโมโซมที่เป็นเอกลักษณ์ โดยมีรูปแบบของแคริโอไทป์คือ 12 เมตาเซนทริก 48 ซับเมตาเซนทริก และ 16 อะโครเซนทริก (12M + 48Sm + 16A) (ภาพที่ 4.13) ขนาดและรูปร่างของโครโมโซมในแต่ละแท่งได้มาจากการคำนวณค่า relative length และค่า centromeric ratio (ตารางที่ 4.8) และเมื่อนำค่า relative length ที่ได้จากการคำนวณมาจัดเรียงขนาดของโครโมโซมจากโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่สุดไปจนถึงโครโมโซมที่มีขนาดเล็กสุดของแต่ละคู่ ในจำนวนโครโมโซม 1 ชุด (haploid) จะได้ idiogram ของกล้วยไม้แดงอุบล (ภาพที่ 4.14) โดยโครโมโซมคู่ที่ 1, 5, 8, 13, 15 และ 28 ของกล้วยไม้แดงอุบลเป็นโครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่ตรงกลาง ที่จัดอยู่ในประเภทเมตาเซนทริก ส่วนโครโมโซมคู่ที่ 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 34, 37 และ 38 เป็นโครโมโซมที่มีลักษณะและรูปร่างที่มีขนาดใกล้เคียงกันและมีตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่ค่อนไปข้างใดข้างหนึ่ง ทำให้แขนข้างหนึ่งยาวกว่าแขนอีกข้างหนึ่ง หรือที่เรียกโครโมโซมประเภทนี้ว่า ซับเมตาเซนทริก ส่วนโครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่ค่อนไปทางปลายด้านหนึ่ง ทำให้แขนทั้งสองข้างยาวไม่เท่ากันอย่างเห็นได้ชัดเจน หรือโครโมโซมที่ จัดเป็นประเภทอะโครเซนทริก คือโครโมโซมคู่ที่ 9, 18, 22, 24, 25, 32, 35 และ 36 (ตารางที่ 4.8)

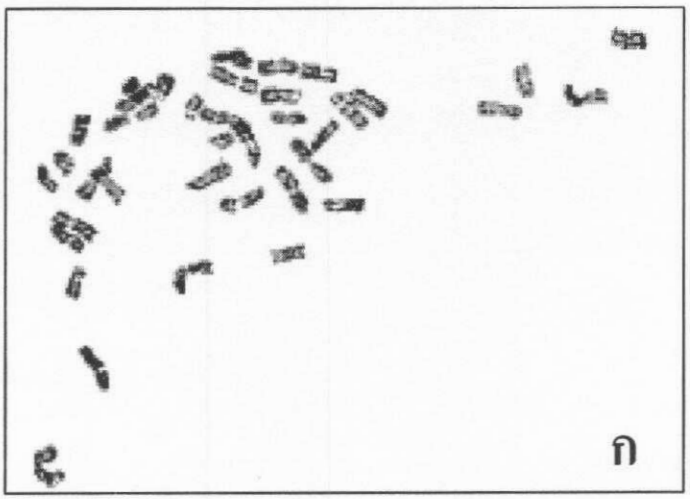
4.2.4 กล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง

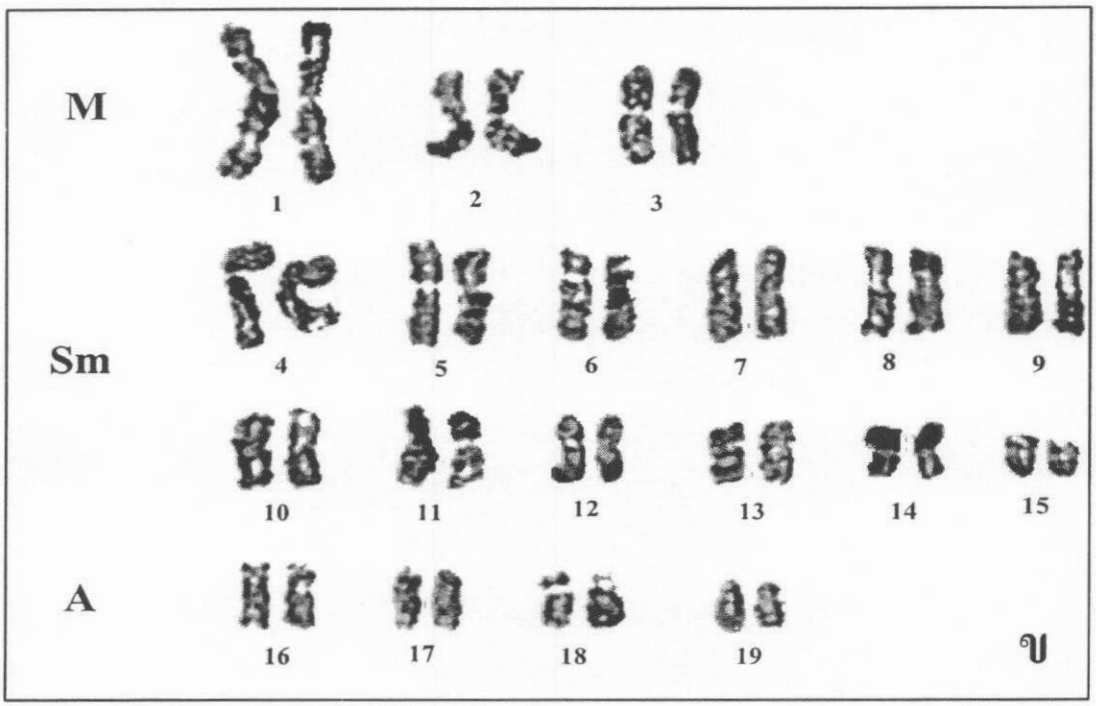
จากการศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง พบว่า กล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง มีจำนวนโครโมโซมจากปลายรากเท่ากับ 2n = 57 และมีลักษณะและรูปร่างของโครโมโซมในระยะเมตาเฟส โดยนำมาจัดเรียงแคริโอไทป์ พบว่า กล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง มีรูปแบบของแคริโอไทป์เป็น 9 เมตาเซนทริก 36 ซับเมตาเซนทริก และ 12 อะโครเซนทริก (9M + 36Sm + 12A) (ภาพที่ 4.15) ขนาดและรูปร่างของโครโมโซมในแต่ละแท่งได้มาจากการคำนวณค่า relative length และค่า centromeric ratio (ตารางที่ 4.9) และเมื่อนำค่า relative length ที่ได้จากการคำนวณมาจัดเรียงขนาดของโครโมโซมจากโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่สุดไปจนถึงโครโมโซมที่มีขนาดเล็กสุดของแต่ละคู่ ในจำนวนโครโมโซม 1 ชุด (haploid) จะได้ idiogram ของกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง (ภาพที่ 4.16)โดยโครโมโซมของกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง พบว่า โครโมโซมคู่ที่ 1 เป็นโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่ และมีตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่ตรงกลาง จัดเป็นเมตาเซนทริกขนาดใหญ่ ส่วนโครโมโซมคู่ที่ 4 และคู่ที่ 8 จัดเป็น

เมตาเซนทริกเช่นเดียวกันแต่เป็นเมตาเซนทริกที่มีขนาดเล็กกว่าโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่ 2, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 14, 15, 16, 17 และ 19 มีลักษณะและรูปร่างของโครโมโซมขนาดใกล้เคียงกัน และจัดเป็นโครโมโซมประเภทซับเมตาเซนทริก และโครโมโซมคู่ที่ 9, 12, 13 และ 18 เป็นโครโมโซมที่มีรูปร่างแบบอะโครเซนทริก (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.6 ความยาวแขนและรูปร่างโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง

คู่ที่	ความยาวแขนข้างสั้น (p) (มม.)	ความยาวแขนข้างยาว (q) (มม.)	ความยาวทั้งหมดของโครโมโซม (มม.)	Relative length (RL)	Centromeric ratio (CR)	รูปร่างโครโมโซม
1	13.33	14.78	28.11	10.34	1.11	M
2	6.65	13.48	20.13	7.4	2.03	Sm
3	8.1	10.97	19.07	7.01	1.35	M
4	6.35	11.07	17.42	6.41	1.74	Sm
5	7.7	9.07	16.77	6.17	1.18	M
6	5.54	10.57	16.11	5.92	1.91	Sm
7	5.35	10.41	15.76	5.79	1.95	Sm
8	5.18	9.57	14.75	5.42	1.85	Sm
9	3.9	10.8	14.7	5.41	2.77	Sm
10	4.8	9.9	14.7	5.41	2.06	Sm
11	5.26	9.2	14.46	5.32	1.75	Sm
12	4.69	8.17	12.86	4.73	1.74	Sm
13	2.45	8.72	11.17	4.11	3.56	A
14	3.66	7.22	10.88	4	1.97	Sm
15	2.62	8.1	10.72	3.94	3.09	A
16	2.3	7.54	9.84	3.62	3.28	A
17	3.37	5.79	9.16	3.37	1.72	Sm
18	2.11	6.46	8.57	3.15	3.06	A
19	2.5	4.27	6.77	2.49	1.71	Sm

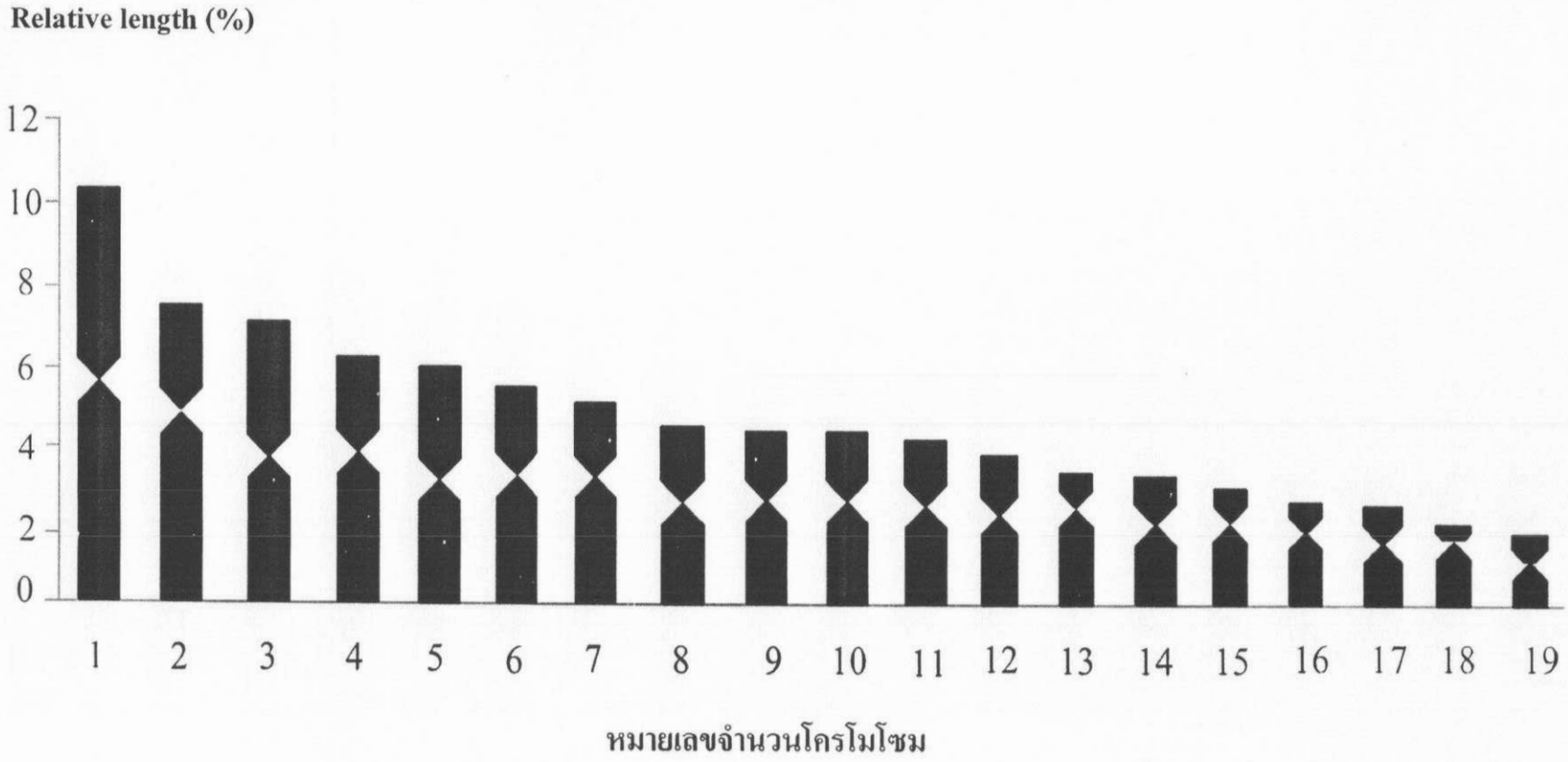




ภาพที่ 4.9 ลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.)

(ก) ระยะเมตาเฟส

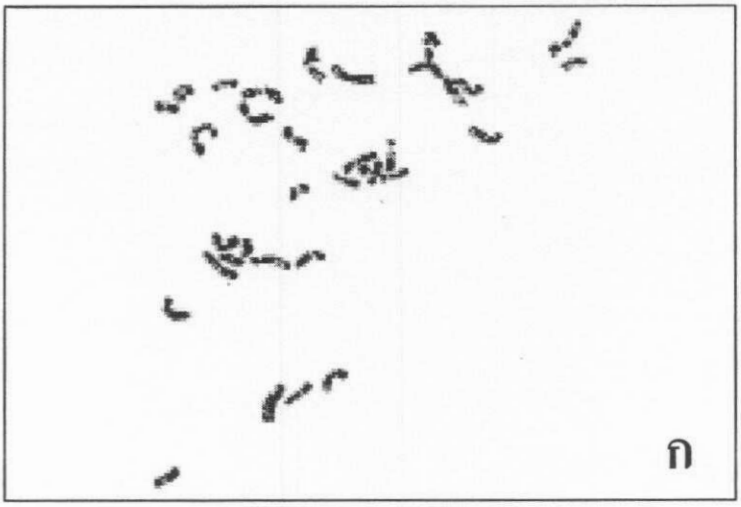
(ข) ลักษณะแคริโอไทป์ (M = metacentric, Sm = submetacentric และ A = acrocentric)

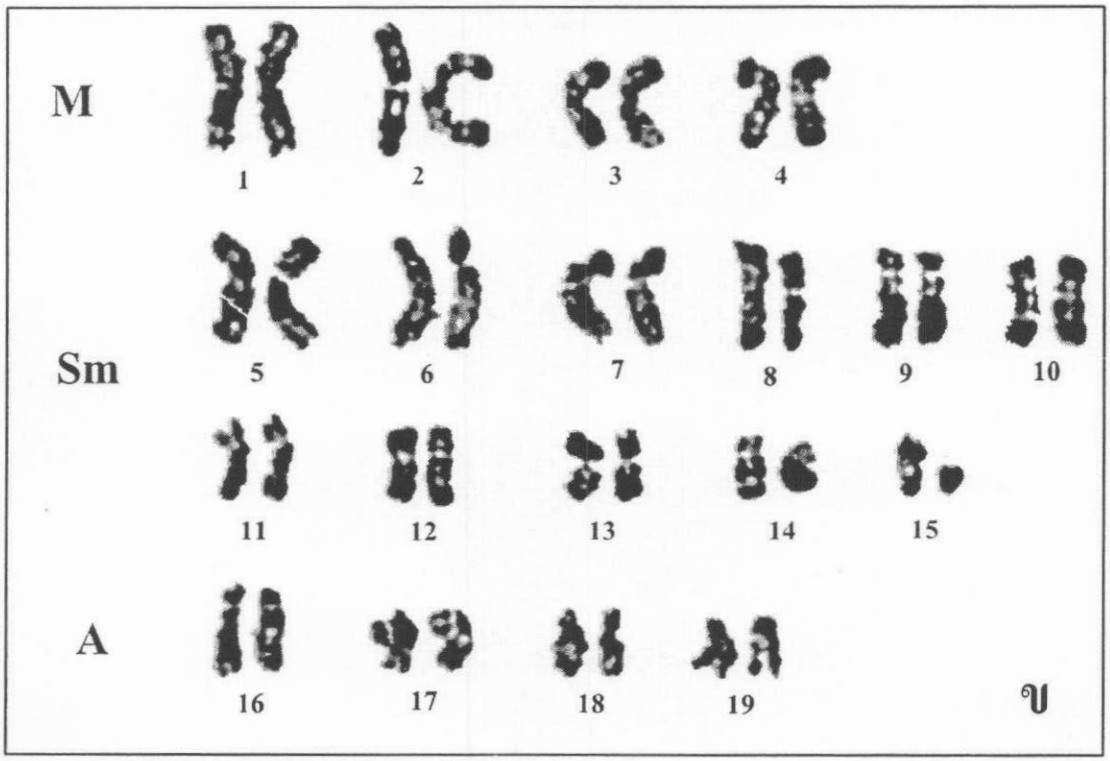


ภาพที่ 4.10 Idiogram ของกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.)

ตารางที่ 4.7 ความยาวแขนและรูปร่างโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบิน

คู่ที่	ความยาวแขนข้างสั้น (p) (มม.)	ความยาวแขนข้างยาว (q) (มม.)	ความยาวทั้งหมดของโครโมโซม (มม.)	Relative length (RL)	Centromeric ratio (CR)	รูปร่างโครโมโซม
1	10.2	11.13	21.33	8.23	1.09	M
2	9.72	9.85	19.57	7.59	1.01	M
3	6.68	11.13	17.81	6.92	1.67	Sm
4	6.25	10.79	17.04	6.62	1.73	Sm
5	7.7	8.57	16.27	6.32	1.11	M
6	6.02	10.05	16.07	6.24	1.67	Sm
7	7.05	7.85	14.9	5.79	1.11	M
8	5.31	9.58	14.89	5.78	1.8	Sm
9	5.38	8.69	14.07	5.46	1.62	Sm
10	3.1	9.98	13.08	5.08	3.22	A
11	3.8	8.93	12.73	4.94	2.35	Sm
12	3.18	9.08	12.26	4.76	2.86	Sm
13	4	7.62	11.62	4.51	1.91	Sm
14	2.28	8.85	11.13	4.32	3.88	A
15	3.51	6.4	9.91	3.85	1.82	Sm
16	2.2	7.32	9.52	3.69	3.33	A
17	3.15	6.18	9.33	3.62	1.96	Sm
18	2.16	6.86	9.02	3.5	3.18	A
19	1.95	5.05	7	2.72	2.59	Sm

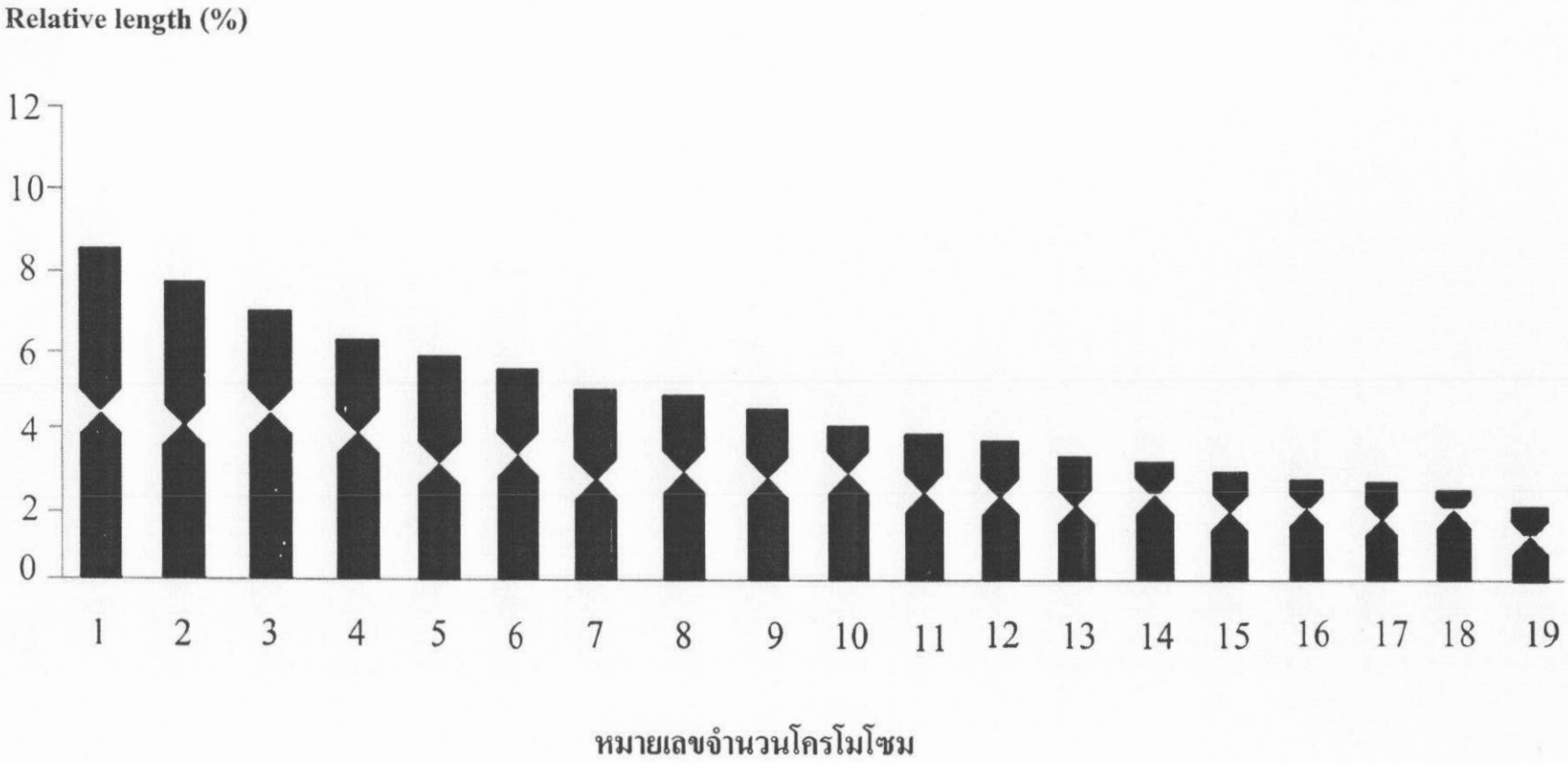




ภาพที่ 4.11 ลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบิน (*Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis*)

(ก) ระยะเมตาเฟส

(ข) ลักษณะแคริโอไทป์ (M = metacentric, Sm = submetacentric และ A = acrocentric)



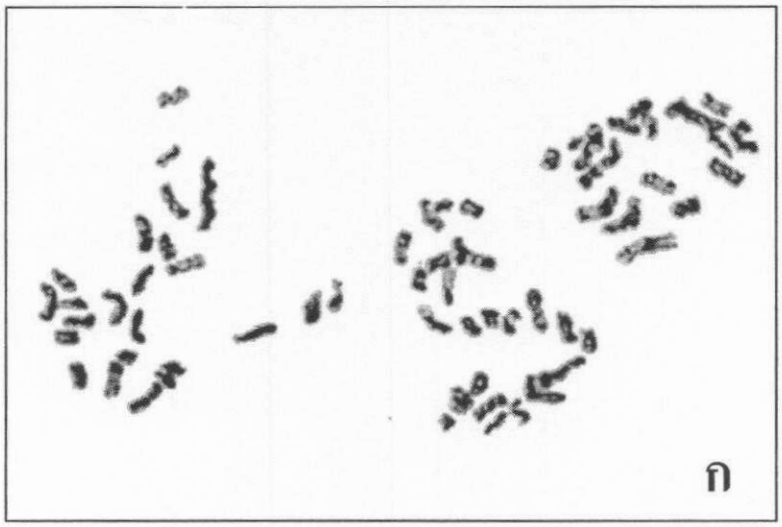
ภาพที่ 4.12 Idiogram ของกล้วยไม้ม้าบิน (*Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis*)

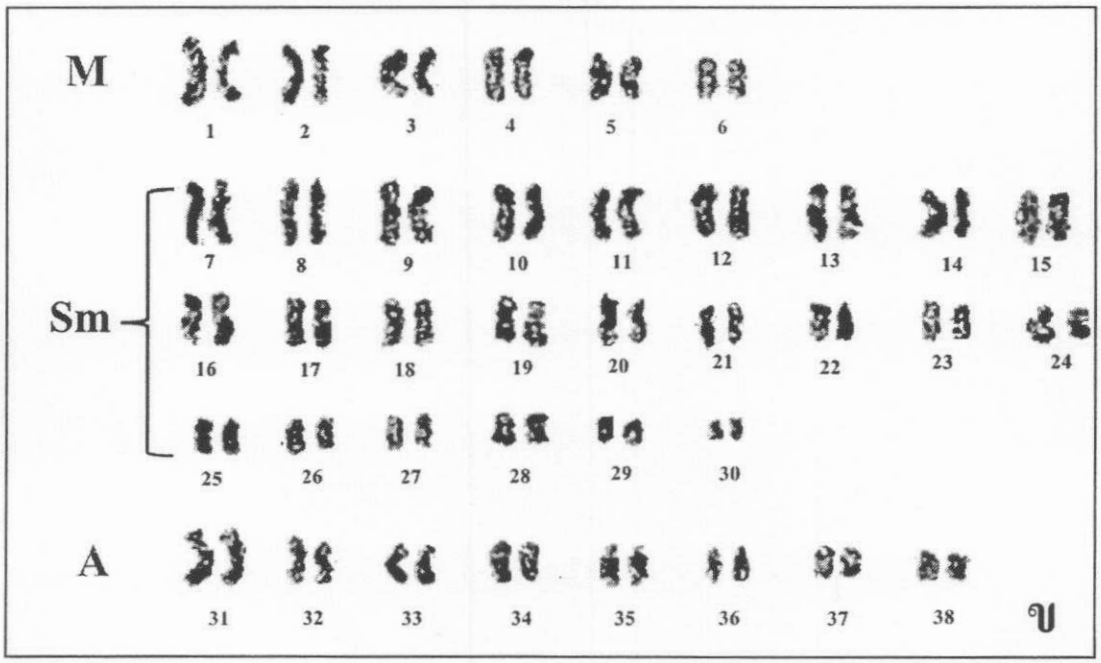
ตารางที่ 4.8 ความยาวแขนและรูปร่างโครโมโซมของกล้วยไม้แดงอุบล

คู่ที่	ความยาวแขนข้างสั้น (p) (มม.)	ความยาวแขนข้างยาว (q) (มม.)	ความยาวทั้งหมดของโครโมโซม (มม.)	Relative length (RL)	Centromeric ratio (CR)	รูปร่างโครโมโซม
1	4.96	5.58	10.54	3.7	1.13	M
2	3.49	6.8	10.29	3.62	1.95	Sm
3	2.55	7.51	10.06	3.54	2.95	Sm
4	3.5	6.49	9.99	3.51	1.85	Sm
5	4.35	5.07	9.42	3.31	1.17	M
6	3.34	5.87	9.21	3.24	1.78	Sm
7	2.74	6.15	8.89	3.12	2.24	Sm
8	4.39	4.4	8.79	3.09	1	M
9	1.7	6.96	8.66	3.04	4.09	A
10	2.36	6.14	8.5	2.99	2.6	Sm
11	3.96	4.5	8.46	2.97	2.53	Sm
12	2.84	5.48	8.32	2.92	1.93	Sm
13	3.39	4.86	8.25	2.9	1.43	M
14	2.66	5.55	8.21	2.89	2.09	Sm
15	3.88	4.06	7.94	2.79	1.05	M
16	2	5.94	7.94	2.79	2.97	Sm
17	2.85	4.92	7.77	2.73	1.73	Sm
18	1.63	6.1	7.73	2.72	3.74	A
19	2.18	5.52	7.7	2.71	1.69	Sm

ตารางที่ 4.8 ความยาวแขนและรูปร่างโครโมโซมของกล้วยไม้แดงอุบล (ต่อ)

คู่ที่	ความยาวแขนข้างสั้น (p) (มม.)	ความยาวแขนข้างยาว (q) (มม.)	ความยาวทั้งหมดของโครโมโซม (มม.)	Relative length (RL)	Centromeric ratio (CR)	รูปร่างโครโมโซม
20	2.13	5.48	7.61	2.67	2.57	Sm
21	2.57	5	7.57	2.66	1.95	Sm
22	1.65	5.77	7.42	2.61	3.5	A
23	2.49	4.75	7.24	2.54	1.91	Sm
24	1.8	5.42	7.22	2.54	3.01	A
25	1.8	5.4	7.2	2.53	3	A
26	2.37	4.78	7.15	2.51	2.02	Sm
27	2.03	4.4	6.43	2.26	2.17	Sm
28	2.58	3.85	6.43	2.26	1.49	M
29	2	4.03	6.03	2.12	2.01	Sm
30	2.22	3.72	5.94	2.09	1.68	Sm
31	2.19	3.69	5.88	2.07	1.68	Sm
32	1.39	4.19	5.58	1.96	3.01	A
33	1.89	3.45	5.34	1.88	1.83	Sm
34	1.9	3.44	5.34	1.88	1.81	Sm
35	1.28	3.88	5.16	1.81	3.03	A
36	1.24	3.76	5	1.78	3.03	A
37	1.78	3.02	4.8	1.69	1.69	Sm
38	1.68	2.81	4.49	1.58	1.67	Sm

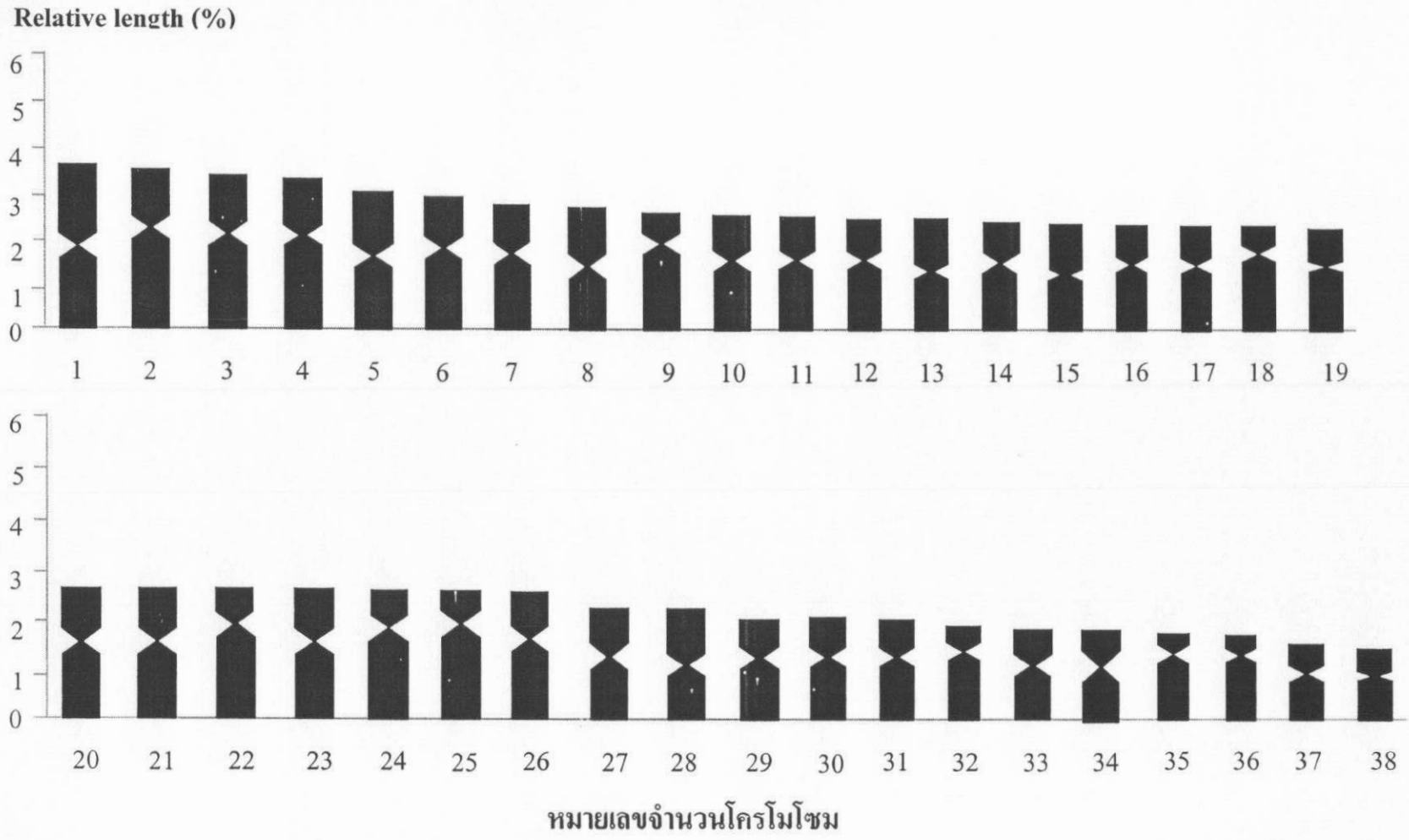




ภาพที่ 4.13 ลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*)

(ก) ระยะเมตาเฟส

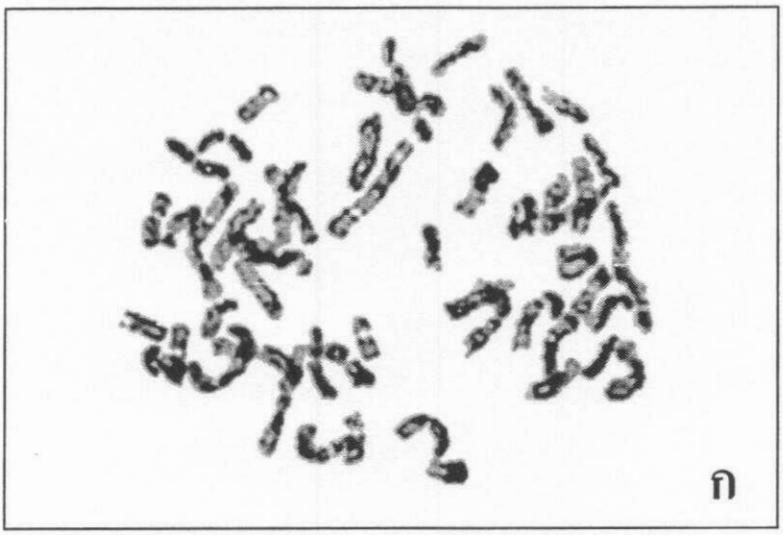
(ข) ลักษณะแคริโอไทป์ (M = metacentric, Sm = submetacentric และ A = acrocentric)

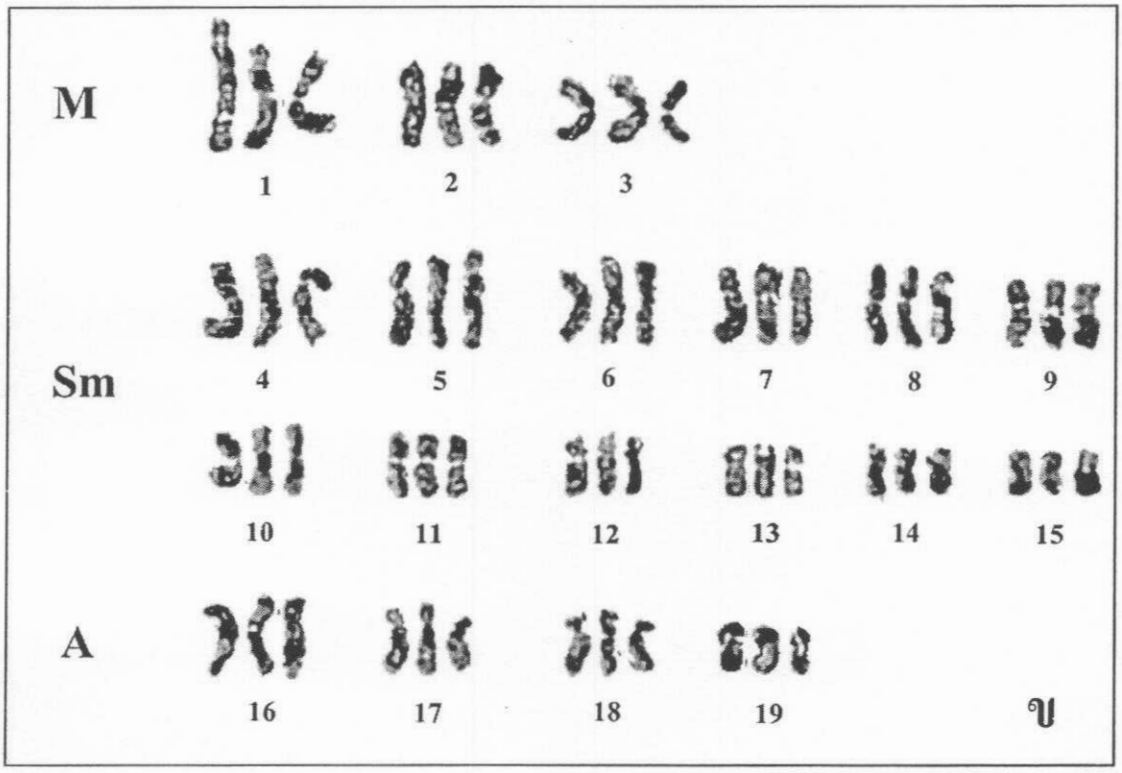


ภาพที่ 4.14 Idiogram ของกล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*)

ตารางที่ 4.9 ความยาวแขนและรูปร่างโครโมโซมของกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง

คู่ที่	ความยาวแขนข้างสั้น (p) (มม.)	ความยาวแขนข้างยาว (q) (มม.)	ความยาวทั้งหมดของโครโมโซม (มม.)	Relative length (RL)	Centromeric ratio (CR)	รูปร่างโครโมโซม
1	8.48	9.11	17.59	8.59	1.07	M
2	5.5	9.5	15	7.32	1.73	Sm
3	3.81	10.01	13.82	6.75	2.63	Sm
4	6.09	6.79	12.88	6.29	1.11	M
5	5.43	7.37	12.8	6.25	1.36	Sm
6	4.78	7.23	12.01	5.86	1.51	Sm
7	4	7.89	11.89	5.81	1.97	Sm
8	5.6	6.17	11.77	5.75	1.1	M
9	2.86	8.8	11.66	5.7	3.08	A
10	4.65	6.1	10.75	5.25	1.31	Sm
11	3.92	6.29	10.21	4.98	1.61	Sm
12	2.42	7.4	9.82	4.79	3.06	A
13	2.33	7.1	9.43	4.6	3.05	A
14	2.9	6.03	8.93	4.36	2.08	Sm
15	3	5.4	8.4	4.1	1.8	Sm
16	2.42	5.05	7.47	3.65	2.09	Sm
17	2.6	4.4	7	3.42	1.69	Sm
18	1.64	5.36	7	3.42	3.27	A
19	2.27	4.13	6.4	3.12	1.82	Sm

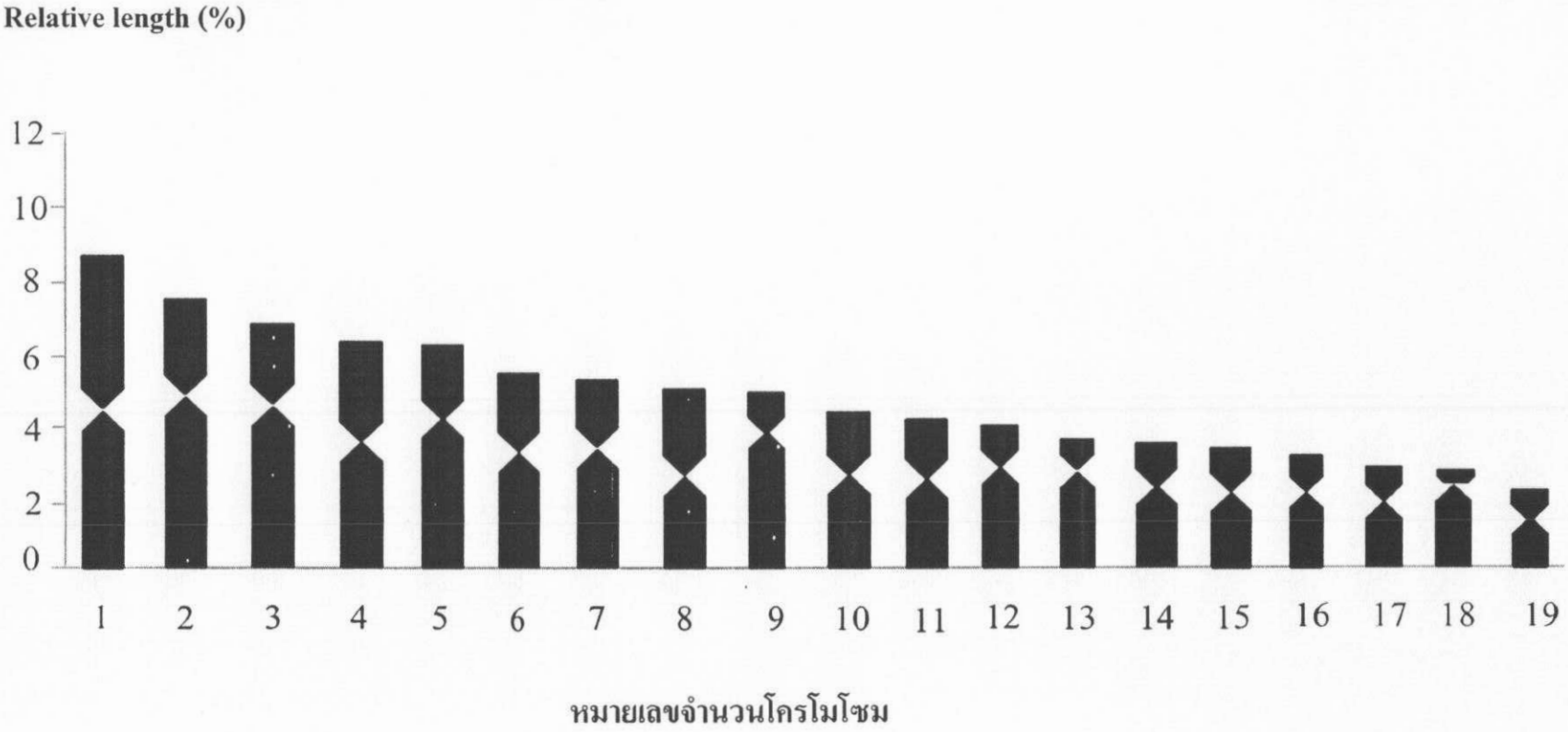




ภาพที่ 4.15 ลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง

(ก) ระยะเมตาเฟส

(ข) ลักษณะแคริโอไทป์ (M = metacentric, Sm = submetacentric และ A = acrocentric)

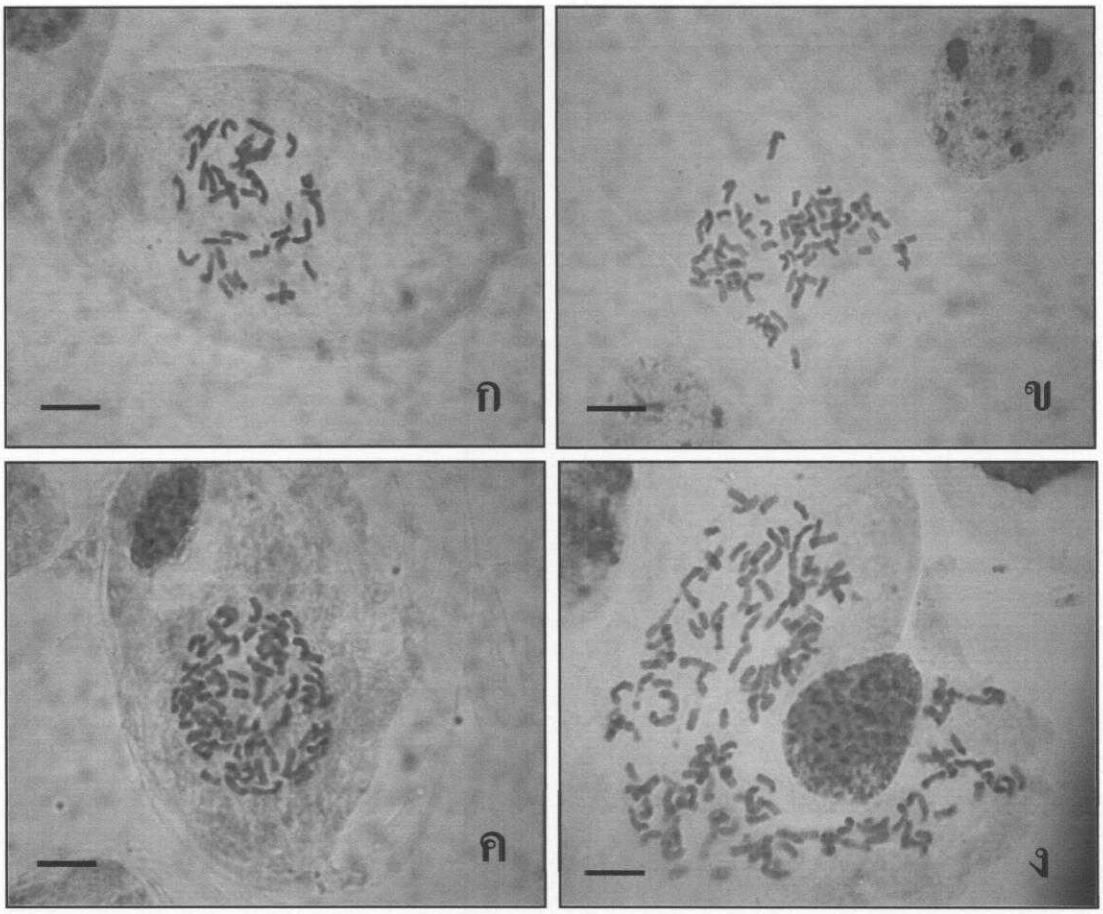


ภาพที่ 4.16 Idiogram ของกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง

4.3 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน

4.3.1 จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เกิดขึ้นและเปลี่ยนแปลงไปหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน

หลังจากที่มีการคัดเลือกต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดิเป็น ดิพลอยด์ เททระพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และออกตะพลอยด์ โดยการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเบื้องต้นด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ทำการสุ่มตัวอย่างกล้วยไม้ม้าวิ่งในแต่ละระดับพลอยดิมาศึกษาจำนวนโครโมโซมปลายราก ผลจากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากที่มีการชักนำด้วยสารโคลชิซิน พบว่า ในกล้วยไม้ม้าวิ่งต้นดิพลอยด์หรือต้นปกติ ซึ่งมีใบค่อนข้างเรียวยาว แผ่นใบบาง มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n = 38 ส่วนกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ได้รับสารโคลชิซินและมีลักษณะต้นผิดปกติคือมีใบค่อนข้างสั้น แผ่นใบหนา อวบน้ำ ใบซ้อนกันแน่น หลังจากตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่า จำนวนโครโมโซมมีจำนวนเพิ่มขึ้น โดยในต้นเททระพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n = 76 และในต้นมิกโซพลอยด์พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n = 38 และ2n = 76 ส่วนกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีลักษณะของต้นสั้นเตี้ย ลำต้นมีขนาดใหญ่ พบว่ามีจำนวนโครโมโซมประมาณ 138 – 152 แท่ง คาดว่าน่าจะเป็นต้นออกตะพลอยด์ (2n = 8x = 152) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถตรวจนับจำนวนโครโมโซมในต้นออกตะพลอยด์ได้แน่นอน เนื่องจากโครโมโซมมีจำนวนมากและซ้อนทับกัน นอกจากนี้ตัวอย่างปลายรากที่นำมาศึกษายังมีจำนวนน้อย เนื่องจากต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งดังกล่าวมีการเจริญเติบโตช้าทำให้การเกิดรากใหม่ๆ ช้ามาก และพบระยะที่มีการแบ่งเซลล์ไม่มากนัก (ภาพที่ 4.17)



ภาพที่ 4.17 จำนวนโครโมโซมจากปลายรากกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน (scale bar = 10 μm)

(ก) ต้นดิพลอยด์ (2n = 38)

(ข) ต้นเททระพลอยด์ (2n = 76)

(ค) ต้นมิกโซพลอยด์ (2n = 76)

(ง) ต้นที่อาจเป็นออกตะพลอยด์ (2n = 152)

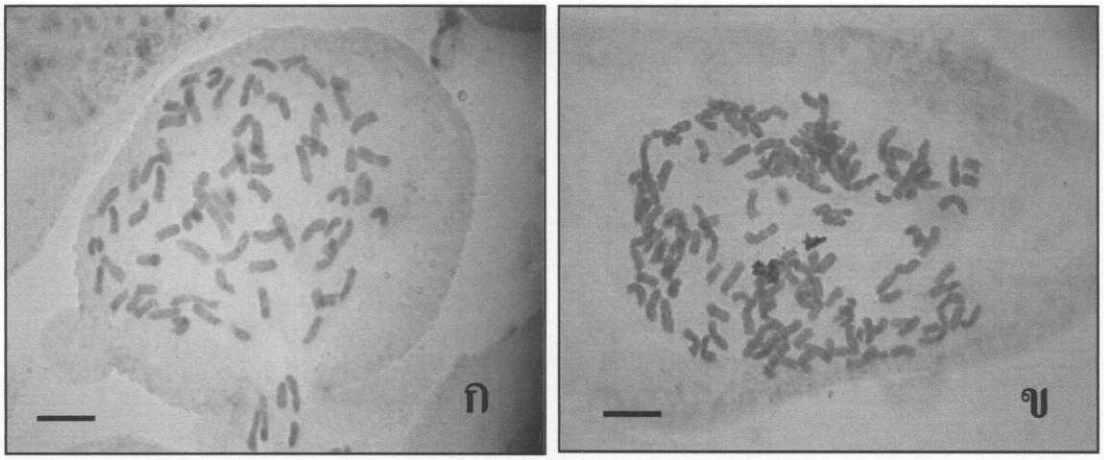
4.3.2 ลักษณะความผิดปกติของโครโมโซม แบบ mixoploid และแบบ euploid ที่เกิดขึ้นหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน ที่แตกต่างจากลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นดิพลอยด์

การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากการชักนำโดยสารโคลชิซิน โดยการศึกษาที่ได้จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมปลายราก จากการศึกษาพบว่าจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งเปลี่ยนแปลงไปจากต้นปกติหรือต้นดิพลอยด์ (2n = 2x = 38)

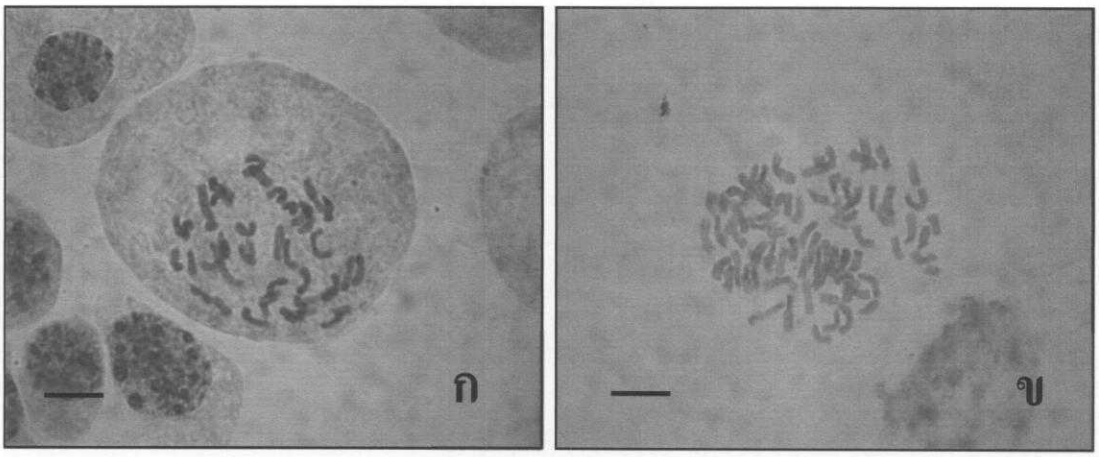
คือ มีระดับพลอยดิเป็น ดิพลอยด์ เททระพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และออกตะพลอยด์ จากการทดลองครั้งนี้พบว่ามีต้นมิกโซพลอยด์เกิดขึ้น เนื่องจากกล้วยไม้ม้าวิ่งได้รับสารโคลชิซินเฉพาะเซลล์ในบางกลุ่ม ส่งผลให้ต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งดังกล่าวมีลักษณะที่แสดงจำนวนโครโมโซมออกมาไม่สม่ำเสมอในต้นเดียวกัน โดยพบการเกิดต้นมิกโซพลอยด์ ที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2 ระดับพลอยดิคือ 2n = 76 และ 2n = 152 (ภาพที่ 4.18) และพบต้นมิกโซพลอยด์ ที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n = 38 และ 2n = 76 (ภาพที่ 4.19) ส่วนลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมแบบ euploid (การเพิ่มขึ้นเป็นชุดโครโมโซม) ในกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากที่มีการชักนำด้วยสารโคลชิซิน พบว่า กล้วยไม้ม้าวิ่งมีระดับพลอยดิเพิ่มขึ้นจาก 2n = 2x เป็น 2n = 4x และ 2n = 8x (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.10 ลักษณะของโครโมโซม แบบ mixoploid และแบบ euploid ที่เกิดขึ้นหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน ที่แตกต่างจากลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นดิพลอยด์

ระดับพลอยดิ	จำนวนต้นที่ศึกษา	จำนวนเซลล์ที่ตรวจนับ	จำนวนโครโมโซมที่นับได้
ดิพลอยด์ (2x)	10	10	38
มิกโซพลอยด์ (แบบ 2x และ 4x)	4	13	38 และ 76
เททระพลอยด์ (4x)	5	11	76
มิกโซพลอยด์ (แบบ 4x ปนอยู่กับ 8x)	1	6	76 และ 152
ออกตะพลอยด์ (8x)	4	13	138-152



ภาพที่ 4.18 ลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมแบบ mixoploid ที่พบจำนวนโครโมโซม 2 ระดับพลอยดิในต้นเดียวกันหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน (scale bar = 10 μm)
(ก) จำนวนโครโมโซม 2n = 76
(ข) จำนวนโครโมโซม 2n = 152



ภาพที่ 4.19 ลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมแบบ mixoploid ที่พบในต้นที่มีจำนวนโครโมโซม 2x และ 4x หลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน (scale bar = 10 μm)
(ก) จำนวนโครโมโซม 2n = 38
(ข) จำนวนโครโมโซม 2n = 76

4.3.3 สัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน

กล้วยไม้ม้าวิ่งเป็นกล้วยไม้ที่จัดอยู่ในประเภทลำต้นเดี่ยว มีการเจริญเติบโตของลำต้นไปทางยอด รากมีลักษณะอวบน้ำ มีลำต้นตั้งตรงและสั้นเตี้ย ใบมีลักษณะแบนและค่อนข้างแข็ง มีการเรียงตัวสลับซ้ายขวาซ้อนกันแน่น หลังจากที่มีการชักนำด้วยสารโคลชิซิน พบว่า กล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีระดับพลอยดิเป็นโพลีพลอยด์คือ ต้นเททระพลอยด์ และออกตะพลอยด์ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างไปจากต้นดิพลอยด์ปกติ (ภาพที่ 4.20) จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์ พบว่า ในแต่ละระดับพลอยดิมีค่าเฉลี่ยขนาดของรากไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ต้นโพลีพลอยด์มีแนวโน้มความสูงต้นและความยาวราก จำนวนใบต่อต้น ความยาวใบและความยาวลำต้นน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ เมื่อระดับพลอยดิสูงขึ้นจนถึงออกตะพลอยด์ค่าเฉลี่ยความสูงต้นร่วมกับความยาวราก (7.27 ซม.) มีค่าน้อยกว่าต้นที่มีระดับพลอยดิเป็นดิพลอยด์ (12.54 ซม.) และเททระพลอยด์ (11.34 ซม.) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนขนาดของใบและลำต้น พบว่า ในต้นเททระพลอยด์มีความหนาของใบมากที่สุด (1.55 มม.) และต้นออกตะพลอยด์มีความยาวของลำต้นน้อยที่สุด (1.36 ซม.) เมื่อเทียบกับต้นดิพลอยด์ (2.23 ซม.) และเททระพลอยด์ (1.83 ซม.) ส่งผลให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นออกตะพลอยด์ที่ปรากฏมีลักษณะลำต้นสั้น ใบเล็ก ส่วนต้นเททระพลอยด์มีความหนาของใบเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับต้นดิพลอยด์ (ตารางที่ 4.11)

ตารางที่ 4.11 เปรียบเทียบสัณฐานวิทยาในแต่ละระดับพลอยดิของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน

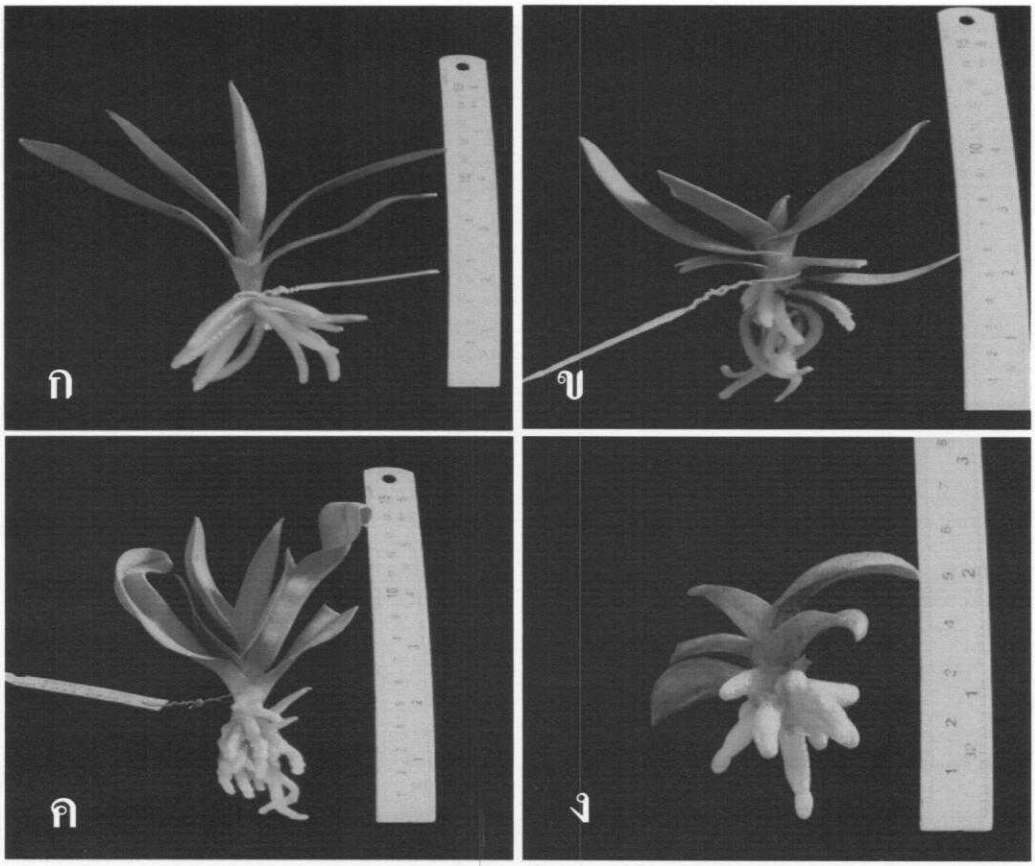
ระดับพลอยดิ	ลักษณะที่ศึกษา							
	ความสูงต้น และความยาวราก (ซม.)	จำนวนใบ/ต้น	ขนาดราก (มม.)	ขนาดใบ			ขนาดลำต้น	
				ความกว้าง (ซม.)	ความยาว (ซม.)	ความหนา (มม.)	ความกว้าง (ซม.)	ความยาว (ซม.)
ดิพลอยด์	12.54ab	7.20ab	3.12	16.69ab	7.27a	1.25b	4.74b	2.23a
เททระพลอยด์	11.34b	6.75b	3.34	19.00a	6.31a	1.55a	5.22ab	1.83b
มิกโซพลอยด์	13.08a	7.83a	3.23	18.38a	7.43a	1.34b	5.28ab	2.08ab
ออกตะพลอยด์	7.27c	5.55c	3.02	14.46b	3.69b	1.20b	6.10a	1.36c
F-test	**	**	ns	**	**	**	*	**
CV (%)	17.38	16.91	15.22	18.11	21.76	17.18	22.76	18.58

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

** ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Rang Test (DMRT)



ภาพที่ 4.20 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน
(ก) ต้นดิพลอยด์
(ข) ต้นเททระพลอยด์
(ค) ต้นมิกโซพลอยด์
(ง) ต้นที่อาจเป็นออกตะพลอยด์

บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม

การศึกษาพฤติกรรมต่างๆของโครโมโซมที่เกิดขึ้นในระหว่างการแบ่งไมโอซิสของ pollen mother cell (PMCs) เป็นการศึกษาในดอกอ่อนของกล้วยไม้ โดยปัจจัยพื้นฐานที่มีความสำคัญคือ ขนาดของดอกที่นำมาศึกษาต้องอยู่ในระยะที่เหมาะสม ซึ่งในการทดลองนี้ดอกอ่อนที่นำมาศึกษามีขนาดประมาณ 1 ใน 4 ของดอกตูมใกล้บาน จากการศึกษาพบว่ากล้วยไม้ม้าวิ่ง ม้าบิน และลูกผสม ดอกอ่อนที่มีขนาด 0.4 - 0.5 ซม. กล้วยไม้แดงอุบล ดอกอ่อนที่มีขนาด 0.5 - 0.6 ซม. เป็นระยะของดอกอ่อนที่เหมาะสมในการศึกษาพฤติกรรมการเข้าคู่กันของโครโมโซมในระยะไมโอซิส I เช่นเดียวกับในกล้วยไม้ลูกผสม 3 สายพันธุ์คือสายพันธุ์ *Renanthera* Singapore Botanic Gardens สายพันธุ์ *Arachnoglottis* และสายพันธุ์ *Mokara* Singa Gold พบว่าระยะดอกที่เหมาะสมต่อการศึกษาการเข้าคู่กันของโครโมโซมคือดอกอ่อนที่มีขนาด 0.4 - 0.45 ซม. (Winston et al., 2001) ในทำนองเดียวกับกล้วยไม้ *Aranthera* Lim Hng Kiang, *Aranda* Wong Bee Yeok และ *Arachnis* hookerana ที่มีการศึกษาพฤติกรรมของโครโมโซมในดอกอ่อนที่มีขนาด 0.45 - 0.6 ซม. (Amelia et al., 2002) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่างระยะพัฒนาการของดอกอ่อนกับระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของ PMCs มีความสำคัญต่อการคัดเลือกขนาดดอกที่เหมาะสมที่จะนำมาศึกษาด้านพฤติกรรมของโครโมโซม

5.1.1 การศึกษาลักษณะการเข้าคู่กันของโครโมโซมในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม

พฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสใน PMCs ของกล้วยไม้ม้าวิ่ง แดงอุบล และสายพันธุ์ลูกผสม มีการเข้าคู่ของโครโมโซมที่แตกต่างกัน โดยในกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลซึ่งเป็นพันธุ์แท้ การเข้าคู่กันของโครโมโซมเป็นปกติ โครโมโซมมีการเข้าคู่กันแบบ bivalent ทั้งหมด พบในกล้วยไม้ม้าวิ่ง 19 คู่ และกล้วยไม้แดงอุบล 38 คู่ (ตารางที่ 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sagawa and Shoji (1968) ที่พบว่ากล้วยไม้ม้าวิ่ง มีจำนวนโครโมโซมของเซลล์สืบพันธุ์ (gametic number) x = 19 และมีจำนวนโครโมโซมเซลล์ร่างกาย (somatic number) 2n = 38 ส่วนในกล้วยไม้แดงอุบล มีจำนวนโครโมโซมเซลล์ร่างกาย (somatic number) 2n = 76 ส่วนในลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ คือ ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง และลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล การเข้าคู่กันของโครโมโซมพบว่า

มีความแปรปรวน คือ พบการเข้าคู่กันของโครโมโซมทั้งแบบ univalent, bivalent และ trivalent (ตารางที่ 4.1) ซึ่งลักษณะการไม่เข้าคู่กันของโครโมโซมหรือ univalent และการเข้าคู่กันของโครโมโซมแบบ trivalent เกิดขึ้นเนื่องจากการสร้างลูกผสมที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมของพ่อ - แม่ที่เหมือนกัน เมื่อมีการแบ่งเซลล์จึงทำให้การเข้าคู่กันของโครโมโซมและการแยกตัวของโครโมโซมเข้าสู่แต่ละขั้วเซลล์เกิดความผิดปกติ คือ โครโมโซมที่เหมือนกันจะมาเข้าคู่แนบชิดกันเป็น trivalent ขณะที่โครโมโซมที่ไม่มีคู่เหมือนจะไม่มีการเข้าคู่และอยู่เป็นโครโมโซมเดี่ยวๆ (univalent) จากการทดลองจะเห็นได้ว่า การเกิด univalent และ trivalent มีความสัมพันธ์กัน กล่าวคือ เมื่อมีการเข้าคู่ของโครโมโซมแบบ trivalent เกิดขึ้นจะพบว่ามีโครโมโซมที่เป็น univalent เกิดขึ้นเช่นเดียวกัน ในตารางที่ 4.1 สายพันธุ์ลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์มีการเกิด univalent 5.4 และ 7.6 univalent ซึ่งมีผลทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง ความถี่ของการเกิด univalent จะมีอิทธิพลต่อความสมบูรณ์ของเรณูและการติดเมล็ดมากที่สุด เนื่องจากการเกิด univalent ทำให้จำนวนโครโมโซมในเซลล์ลูกผิดปกติหรือขาดหายไป เซลล์สืบพันธุ์ทำหน้าที่ไม่ได้ ส่งผลต่อความสมบูรณ์ของเรณู (Winston et al., 2001) ตัวอย่างเช่น ในข้าว พบว่าความสมบูรณ์ของเรณูจะลดลงเมื่อโครโมโซมไม่มีการเข้าคู่กันหรือมี univalent เพิ่มขึ้น ในขณะที่การเกิด bivalent และ quadrivalent จะไม่มีผลต่อความสมบูรณ์ของเรณูและการติดเมล็ด (Luan et al., 2009)

5.1.2 การศึกษาลักษณะความผิดปกติในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม

จากความผิดปกติในการเข้าคู่กันของโครโมโซมในระยะ diakinesis ที่เกิดขึ้นส่งผลให้การแบ่งเซลล์ในระยะแอนาเฟส I พบความผิดปกติแบบ chromosome lagging เป็นความผิดปกติของโครโมโซมทางด้านจำนวนของโครโมโซม ซึ่งเกิดจากการไม่เข้าคู่กันของโครโมโซมหรือการมี univalent เกิดขึ้น ทำให้เมื่อมีการแบ่งเซลล์ในระยะแอนาเฟส I โครโมโซมดังกล่าวไม่เคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วเซลล์หรือเคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วเซลล์ได้ช้ากว่าโครโมโซมอื่น และความผิดปกติของโครโมโซมแบบ chromosome bridge เป็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับโครงสร้างของโครโมโซมแบบ Robertsonian translocation คือ โครโมโซมที่ไม่ใช่โครโมโซมคู่เหมือนมาเชื่อมต่อกัน ส่งผลให้โครโมโซมดังกล่าวมีจำนวนเซนโทรเมียร์อยู่ 2 เซนโทรเมียร์ (dicentric chromosome) เมื่อเข้าสู่การแบ่งเซลล์ในระยะแอนาเฟส I โครโมโซมจะถูกดึงเข้าสู่ขั้วเซลล์ ทำให้โครโมโซมที่มี 2 เซนโทรเมียร์แยกออกจากกันไม่สมบูรณ์ ทำให้จำนวนโครโมโซมในเซลล์ลูกที่ได้ผิดปกติ อาจจะขาดหายไปหรือเพิ่มขึ้น (อมรา คัมภิรานนท์, 2540) ซึ่งความผิดปกติดังกล่าวจะมีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ คือ เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เรณูเป็นหมันได้ สอดคล้องกับรายงานของ Ruualcaba-Ruiz and Rodriguez-Garay (2002) ที่ได้ศึกษาใน *Agave tequilana* Weber var. *azul* และพบความ

ผิดปกติแบบ chromosome lagging และ chromosome bridge ในระยะแอนาเฟส I คิดเป็น 3 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความผิดปกติดังกล่าวส่งผลให้เรณูของ *Agave tequilana* Weber var. *azul* เป็นหมันสูงถึง 42 เปอร์เซ็นต์ ความผิดปกติของโครโมโซมแบบ chromosome lagging และ chromosome bridge สามารถพบได้ในกล้วยไม้ลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ โดยในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบลมีความถี่ในการเกิด chromosome lagging สูงถึง 95.33 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง มีความถี่ในการเกิด chromosome lagging เป็น 77 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2) แต่ความถี่ของการเกิด chromosome bridge ในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบลมีเปอร์เซ็นต์การเกิดที่ต่ำกว่าในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง

แม้ว่าในการศึกษานี้จะทำการศึกษาลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมเฉพาะในระยะไมโอซิส I เท่านั้น แต่ผลจากการศึกษาก็ทำให้ทราบว่าความผิดปกติในระยะแอนาเฟส I และเทโลเฟส I นั้นส่งผลกระทบต่อการแบ่งเซลล์ในระยะต่อๆ มาเป็นอย่างมาก จากการศึกษาในบัวสวรรค์ (Thoibi devi and Borua, 1997) และในข้าว (Song, 2001) พบว่าความผิดปกติของโครโมโซมที่เกิดขึ้นในด้านโครงสร้าง เช่น การเกิด inversion และ translocation ก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์สืบพันธุ์ในรุ่นลูกไม่ปกติ และมีความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง จากการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่าลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมในไมโอซิส I ส่งผลให้เกิดความแปรปรวนในกระบวนการสร้างไมโครสปอร์และความมีชีวิตตลอดจนการงอกของเรณูที่แตกต่างกันระหว่างกล้วยไม้ม้าวิ่ง แดงอุบล และลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์

5.1.3 การศึกษาลักษณะการสร้างไมโครสปอร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม

จากการเข้าคู่กันของโครโมโซมที่เป็นปกติในกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล จึงส่งผลให้ระยะต่างๆ ในการแบ่งเซลล์ส่วนใหญ่เป็นปกติ พบความผิดปกติในระยะแอนาเฟส I และเทโลเฟส I บ้างเล็กน้อยซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ในสภาพธรรมชาติแต่เกิดในเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำ เมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์พบว่าการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็นปกติ (tetrad) มีความสม่ำเสมอสูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3) ส่งผลให้กล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิ่งมีความสมบูรณ์พันธุ์สูง สอดคล้องกับรายงานของอาคม ศรีทองรุ่ง (2521) ที่ศึกษาระดับความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ และการผสมข้ามของกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* และ *Doritis* พบว่าต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ของกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* และ *Doritis* มีการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็นปกติคือมี tetrad มาก ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์และการติดฝักสูง เช่นเดียวกับ Hee et al. (2007) ที่ได้ศึกษาการออกดอกและการสร้างเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อของกล้วยไม้ *Dendrobium* Chao Praya Smile และพบว่าเรณูจากดอกในสภาพแปลงและสภาพปลอดเชื้อมีการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็น tetrad คิดเป็น 79 และ 65 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ จากลักษณะดังกล่าวทำให้เรณูมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำ คือ 52.8 และ 18.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการสร้างไมโครสปอร์มีความสัมพันธ์กับการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสและมีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์

ส่วนลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์พบว่าการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็น tetrad ไม่มีความสม่ำเสมอ คือ พบทั้ง dyad, triad และ tetrad ซึ่งความแปรปรวนที่เกิดขึ้นนี้เป็นผลสืบเนื่องมาจากความผิดปกติในไมโอซิส I โดยในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล ซึ่งมีความผิดปกติในการแบ่งไมโอซิส I มากกว่าในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง และมีเปอร์เซ็นต์การสร้างไมโครสปอร์ที่เป็น tetrad ต่ำกว่าในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง อีกทั้งในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล ยังมีการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็น polyad สูงถึง 47.89 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3) ดังนั้น จะเห็นได้ว่ากล้วยไม้ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล น่าจะมีแนวโน้มของความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำกว่ากล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง ทำนองเดียวกันกับ Sain and Joshi (2003) ที่พบว่าในลูกผสมมีขนาดและรูปร่างของเรณูเปลี่ยนแปลงไป เช่น pentad และ hexad เกิดขึ้นจะมีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของเรณูในลูกผสมระหว่างชนิดในสกุล *Citrullus* จากลักษณะการเข้าคู่กันของโครโมโซมหรือลักษณะความผิดปกติในการแบ่งเซลล์และการสร้างไมโครสปอร์ในไมโอซิส แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้สกุลม้าวิ่งหรือ *Doritis* นี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างเห็นได้ชัดเจน

5.1.4 การศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสม

5.1.4.1 การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู

ความมีชีวิตของเรณูที่ทดสอบด้วยสีอะซีโตออซีน พบว่าในกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลที่ผสมตัวเองและผสมสลับกับกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลมีเปอร์เซ็นต์การติดสีอะซีโตออซีนหรือมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่สูงคือ มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4) แสดงให้เห็นว่าเรณูทั้งในกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลมีความสมบูรณ์พันธุ์สูง และเมื่อนำเรณูของกล้วยไม้พันธุ์แท้ทั้งสองชนิดไปผสมกับลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง และลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล พบว่าความมีชีวิตของเรณูในกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลลดลง ทั้งนี้เนื่องจากการเข้ากันไม่ได้ (incompatibility) ทางสัณฐานวิทยาระหว่างต้นพ่อและต้นแม่ที่ทำการผสม ทำนองเดียวกับ Kamemoto et al. (1999) ที่พบว่าลูกผสมภายในหมวด *Phalaenanthe* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดสูงและสามารถผลิตลูกผสมได้ เมื่อใช้เป็นพ่อพันธุ์จะให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูสูง แต่ถ้าใช้เป็นแม่พันธุ์จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูปานกลาง ซึ่งเปอร์เซ็นต์การงอกที่แตกต่างกันเกิดขึ้นเนื่องจากการเข้ากันไม่ได้ระหว่างต้นพ่อและแม่พันธุ์ ส่วนในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง เรณูที่เกิดจากการผสมตัวเองและการผสมกับกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลส่วนใหญ่จะไม่มีชีวิต แสดงให้เห็นว่าเรณูของลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง นั้นมีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ ในทำนองเดียวกับลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล ที่

มีความมีชีวิตของเรณูต่ำเช่นเดียวกัน สอดคล้องกับรายงานของ Sain and Joshi (2003) ที่พบว่าในลูกผสมระหว่างชนิดในสกุล *Citrullus* มีความสมบูรณ์พันธุ์ของเรณูต่ำ (21.5 – 40.1 เปอร์เซ็นต์) เนื่องจากความผิดปกติที่เกิดขึ้นในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ซึ่งความแตกต่างของความสมบูรณ์พันธุ์ของเรณูนั้นแสดงให้เห็นว่าลักษณะทางพันธุกรรมมีความแตกต่างกัน เช่นเดียวกันกับรายงานของ Bures et al. (2010) กล่าวว่าความมีชีวิตของเรณูในต้นลูกผสมทุกต้นของ *Cirsium* ต่ำกว่าพันธุ์แท้ โดยความมีชีวิตของเรณูในลูกผสมจะลดลงเสมอเมื่อเกิดจากสายพันธุ์พ่อแม่ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมและสายพันธุ์พ่อแม่นั้นมีความมีชีวิตของเรณูต่ำ ในด้านของการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป หากต้องการใช้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง และม้าบิน x แดงอุบล เป็นพ่อแม่พันธุ์ ควรใช้ลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์เป็นต้นแม่พันธุ์มากกว่าที่จะใช้เป็นต้นพ่อพันธุ์ เนื่องจากมีความมีชีวิตของเรณูต่ำ ศิริพร เชื้อจีน (2546ก) พบว่า กล้วยไม้หวาย *Dendrobium* Pegasus "Veerawut' ที่เป็นทริพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซม 2n = 57 และมีการแบ่งไมโอซิสที่ผิดปกติ เมื่อทำการผสมพันธุ์พบว่า กล้วยไม้หวาย *Dendrobium* Pegasus "Veerawut' สามารถใช้ทำเป็นต้นแม่พันธุ์ได้ และเมื่อผสมพันธุ์กับต้นพ่อที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ กล้วยไม้พันธุ์นี้สามารถติดฝัก และมีเมล็ดสมบูรณ์ได้แต่ไม่มากนัก เมล็ดส่วนใหญ่เป็นเมล็ดลีบ แต่เมื่อใช้ทำเป็นพ่อพันธุ์ พบว่า pollen tube จะไม่งอก ซึ่งในพืชทั่วไปความมีชีวิตของเรณูที่ลดลงจะเกิดขึ้นเสมอในลูกผสมและจะเกิดเป็นบางครั้งในพันธุ์แท้

5.1.4.2 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู

เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับความมีชีวิตของเรณู การมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่สูง ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูในกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลมีสูงเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 4.4) ในขณะที่ในกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง เรณูมีชีวิตต่ำ ส่งผลให้เรณูไม่สามารถงอกได้เมื่อทำการผสมตัวเองและผสมกับกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล เช่นเดียวกันกับลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล ที่มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูต่ำ ทั้งที่เกิดจากการผสมตัวเองและการผสมกับกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล ดังนั้น ผลจากการศึกษาการงอกของเรณูจึงเป็นไปได้ว่าเรณูของลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง และลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล มีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำหรืออาจจะเป็นหมัน ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากความผิดปกติที่เกิดขึ้นในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสและความแปรปรวนที่ได้จากการสร้างไมโครสปอร์ในลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ แม้ว่าพฤติกรรมในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสที่เกิดขึ้นนั้นจะได้รับอิทธิพลมาจากพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ดังเช่นที่มีการศึกษาใน wheat (*Triticum turgidum* L.) (Rezaei et al., 2010) *Punica granatum* L. (Prakash et al., 2010) ข้าว (Rang et al., 2011) ถั่วลิสงและถั่วเหลือง (Prasad et al., 2011) ที่พบว่านอกจากพันธุกรรมแล้วสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิสูง น้ำ ความร้อน ก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้โครงสร้างและการทำหน้าที่ของเซลล์สืบพันธุ์ผิดปกติ ส่งผลให้การสร้างเซลล์สืบพันธุ์

การผสมพันธุ์ ความมีชีวิตและการงอก ตลอดจนการติดเมล็ดหรือผลผิดปกติไป แต่ในการทดลองนี้ได้ทำการผสมพันธุ์และศึกษาการงอกของเรณูในช่วงต้นฤดูฝน (มิถุนายน - กรกฎาคม) ซึ่งเป็นช่วงที่มีอุณหภูมิและความชื้นพอเหมาะ ดังนั้น ความสมบูรณ์พันธุ์ของเรณูที่ต่ำในลูกผสมจึงไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อม แต่เป็นผลเนื่องมาจากพันธุกรรม

5.1.4.3 การศึกษาการผสมติดเป็นคัพภะ (embryo)

ในการศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสมโดยการศึกษาความสามารถในการผสมติดและการพัฒนาเป็นต้นอ่อน ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาเฉพาะในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล เนื่องจากในต้นลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง มีจำนวนต้นและดอกน้อยไม่เพียงพอต่อการศึกษา จากผลการทดลองพบว่าลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล ที่เกิดจากการผสมตัวเองและการผสมสลับกับกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล สามารถผสมติดได้ในทุกคู่ผสมแต่เมื่อนำฝักที่อายุครบ 2 เดือนมาเพาะเมล็ด พบว่าเมล็ดสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้เพียง 6 ต้นในคู่ผสมที่เกิดจาก ม้าวิ่ง x (ม้าบิน x แดงอุบล) จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าผลสืบเนื่องจากความผิดปกติในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสส่งผลให้มีความสมบูรณ์พันธุ์ของเรณูที่ต่ำในลูกผสม มีการสร้างเรณูที่ฝ่อและไม่สามารถพัฒนาเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ได้ ดังเช่นที่มีการศึกษาใน *Alstroemeria* (Sanso and Rulfe, 2007) และพืชในสกุล *Brachiaria* (Boldrini et al., 2006) กล้วยไม้ (ศิริพร เชื้อจีน, 2546ก) เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเมล็ดที่มีมากภายในฝักของกล้วยไม้ (สำอางค์ เนตรนารี, 2548) จะพบว่าในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบลมีเปอร์เซ็นต์ของเมล็ดที่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ในอัตราที่ต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสและการสร้างไมโครสปอร์

จากการทดลองเพื่อศึกษาการผสมติดครั้งนี้ ได้ศึกษาในจำนวนดอกและเมล็ดจากฝักจำนวนน้อยในแต่ละคู่ผสม เนื่องจากต้นลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์มีจำนวนต้นที่น้อยประกอบกับฤดูกาลออกดอกของกล้วยไม้สกุลนี้ที่มีระยะเวลานานคือ ออกดอกเพียงปีละหนึ่งครั้งเท่านั้น แต่จากผลการทดลองก็สามารถประเมินความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสมได้ระดับหนึ่ง หากมีการทดลองในจำนวนต้นและจำนวนดอกในการผสมแต่ละคู่ผสมเพิ่มมากขึ้นก็จะเป็นการเพิ่มโอกาสการผสมติดและทำให้ได้ข้อมูลใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากขึ้น

5.2 การศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม

จากการศึกษาลักษณะของโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง พบว่า กล้วยไม้ม้าวิ่งและม้าบินมีจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากเท่ากันคือ $2n = 2x = 38$ ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลมีจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากมากกว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งและม้าบินเป็นเท่าตัวคือ $2n = 4x = 76$ และเป็นเททระพลอยด์ ซึ่งสอดคล้องกับสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิ่งที่มีลักษณะ

คล้ายคลึงกันมาก แต่มีสิ่งที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดคือ กล้วยไม้แดงอุบลมีขนาดของลำต้น ดอก และใบที่ใหญ่กว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นดิพลอยด์มาก และด้วยความแตกต่างนี้จึงทำให้นักอนุกรมวิธานได้จำแนกกล้วยไม้แดงอุบลเป็นสายพันธุ์ (variety) ของกล้วยไม้ม้าวิ่ง (ระพี สาคริก, 2516 ; สุรางค์รัชต์ อินทะมุสิก, 2551)

การศึกษาแคริโอไทป์เป็นการศึกษาลักษณะของโครโมโซมในแต่ละแท่ง มีประโยชน์ในการจำแนกพืชภายในชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันจากลักษณะความเหมือนหรือความแตกต่างของแคริโอไทป์ซึ่งมีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์และนักอนุกรมวิธาน โดยการจัดเรียงแคริโอไทป์จะศึกษาจากเซลล์ที่อยู่ในระยะเมตาเฟส ซึ่งเป็นระยะที่โครโมโซมขดม้วนตัวแน่นที่สุดและเป็นระยะที่นิยมศึกษาลักษณะของโครโมโซม เนื่องจากมีความสะดวกและชัดเจนต่อการวิเคราะห์รูปร่างและจำนวนโครโมโซม (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2538) แต่ในบางครั้งความยาวของโครโมโซมในแต่ละเซลล์ของพืชชนิดเดียวกันอาจแตกต่างกัน เนื่องจากในแต่ละเซลล์มีความสามารถในการแทรกซึมของสารที่ทำหน้าที่หยุดวงชีพจักรเซลล์และมีระยะเมตาเฟสแตกต่างกัน (Kamemoto et al., 1963) จากการทดลองในครั้งนี้พบว่า กล้วยไม้ม้าวิ่ง ม้าบิน แดงอุบล และลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง มีลักษณะของแคริโอไทป์คล้ายคลึงกัน โดยกล้วยไม้ม้าวิ่งมีรูปแบบของแคริโอไทป์เป็น 6 เมตาเซนทริก 24 ซับเมตาเซนทริก และ 8 อะโครเซนทริก (6M + 24Sm + 8A) ไม่พบโครโมโซมที่มีรูปร่างเป็นแบบ เทโลเซนทริก โครโมโซมส่วนใหญ่มีลักษณะและรูปร่างใกล้เคียงกันคือมีรูปร่างแบบซับเมตาเซนทริก จะแตกต่างและเห็นเด่นชัดในโครโมโซมคู่ที่ 1 ที่มีลักษณะเป็นเมตาเซนทริกขนาดใหญ่ ส่วนกล้วยไม้ม้าบินมีรูปแบบของแคริโอไทป์เป็น 8 เมตาเซนทริก 22 ซับเมตาเซนทริก และ 8 อะโครเซนทริก (8M + 22Sm + 8A) โครโมโซมส่วนใหญ่มีลักษณะและรูปร่างใกล้เคียงกันและมีรูปร่างแบบซับเมตาเซนทริก คล้ายคลึงกับกล้วยไม้ม้าวิ่ง แต่กล้วยไม้ม้าบินพบว่ามีโครโมโซมที่มีรูปร่างของโครโมโซมแบบ เมตาเซนทริกเพิ่มขึ้นมาอีก 1 คู่ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมแบบ inversion ของกล้วยไม้ม้าวิ่ง จากโครโมโซมที่มีรูปร่างเป็นซับเมตาเซนทริกไปเป็นเมตาเซนทริก ของกล้วยไม้ม้าบิน ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลมีรูปแบบของแคริโอไทป์เป็น 12 เมตาเซนทริก 48 ซับเมตาเซนทริก และ 16 อะโครเซนทริก (12M + 48Sm + 16A) จากลักษณะและรูปร่างของโครโมโซมที่พบในกล้วยไม้แดงอุบล พบว่ากล้วยไม้แดงอุบลมีจำนวนของโครโมโซมและรูปแบบแคริโอไทป์เพิ่มขึ้นจากกล้วยไม้ม้าวิ่งเป็นเท่าตัว แต่จากการศึกษาพฤติกรรมไมโอซิสและการสร้างไมโครสปอร์ที่ปกติ และมีความสมบูรณ์พันธุ์สูงของกล้วยไม้แดงอุบล สามารถที่จะประเมินได้ว่ากล้วยไม้แดงอุบลเป็นเททระพลอยด์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบอัลโลเททระพลอยด์ (allotetraploid) ซึ่งเป็นเททระพลอยด์ที่ไม่ได้เกิดมาจากกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นดิพลอยด์เพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้น (chromosome doubling) และกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง

มีจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายราก 2n = 3x = 57 มีรูปแบบของแคริโอไทป์เป็น 9 เมตาเซนทริก 36 ซับเมตาเซนทริก และ 12 อะโครเซนทริก (9M + 36Sm + 12A) จากการศึกษาลักษณะแคริโอไทป์ พบว่า ในโครโมโซมแต่ละชุด มีโครโมโซมที่มีลักษณะเหมือนกับกล้วยไม้แดงอุบลอยู่ 2 แท่ง และมีโครโมโซมที่มีลักษณะเหมือนกับกล้วยไม้ม้าวิ่งอยู่ 1 แท่ง ลักษณะโครโมโซมของลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง มีลักษณะคล้ายคลึงกับกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล โครโมโซมมีรูปร่างเป็นเมตาเซนทริกขนาดใหญ่ในคู่ที่ 1 เช่นเดียวกับกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล จากการศึกษาจำนวนของโครโมโซมปลายราก ลักษณะแคริโอไทป์ และพฤติกรรมไมโอซิสของกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่งเป็นทริพลอยด์ (triploid) ที่เกิดจากกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นดิพลอยด์ผสมกับกล้วยไม้แดงอุบลที่เป็นเททระพลอยด์ และจากการศึกษาลักษณะของโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม พบว่า กล้วยไม้ม้าวิ่ง ม้าบินแดงอุบล และลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง มีรูปร่างลักษณะของโครโมโซมเป็นแบบ เมตาเซนทริก ซับเมตาเซนทริก และอะโครเซนทริก แต่ไม่พบโครโมโซมที่มีรูปร่างแบบ เทโลเซนทริก ซึ่งลักษณะของแคริโอไทป์ ในพืชแต่ละชนิดจะมีลักษณะเฉพาะและเป็นเอกลักษณ์ ดังเช่นที่มีการศึกษาในกล้วยไม้ *Paphiopedilum* (Kamemoto et al., 1963) กล้วยไม้ *Cymbidum* (Sharma et al., 2010) *Capsicum annuum* L. (Rohami et al., 2010) *Alstroemeria diluta* subsp. *cheysantha* Ehr. Bayer (Baeza et al., 2010) และกล้วยไม้ *Bulbophyllum auricomum* Lindl. (Than et al., 2011)

5.3 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน

สารโคลชิซินเป็นสารเคมีที่มีบทบาทต่อการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม การชักนำเพื่อสร้างพืชโพลีพลอยด์จะทำให้พืชมีระดับพลอยดิเปลี่ยนไป ซึ่งส่งผลให้พืชที่เป็นโพลีพลอยด์มีรูปร่างลักษณะต่างๆ ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากการมีเซลล์และนิวเคลียสที่มีขนาดใหญ่ตามสัดส่วนของจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น ในพืชทั่วไปที่มีระดับพลอยดิสูงๆ จะมีจำนวนวันที่ออกดอกและจำนวนข้อที่ออกดอกเพิ่มขึ้น แต่จะมีช่วงเวลาการออกดอกช้าลง โดยต้นโพลีพลอยด์ที่เกิดจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน จะมีขนาดของลำต้นสั้น ใบมีขนาดใหญ่ หนาและมีสีเขียวเข้มกว่าต้นดิพลอยด์ปกติ (สาริณี ไชยเจริญ, 2538 ; Rose et al., 2000; Kim et al., 2003; Kermani et al., 2003; มะลิวรรณ จุรุทา, 2551) โดยวิธีการตรวจสอบต้นโพลีพลอยด์ สามารถตรวจสอบได้หลายวิธี เช่น การวัดปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียสในแต่ละเซลล์ การนับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมปากใบ การวัดขนาดและความหนาแน่นของเซลล์คุมปากใบ และการวัดขนาดเรณู (จตุพร หงส์ทองคำ, 2551ก) ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นการตรวจสอบและคัดเลือกต้นโพลีพลอยด์ในทางอ้อม แต่วิธีการที่สามารถตรวจสอบและยืนยันความเป็นโพลีพลอยด์ได้ดีที่สุดคือ การตรวจนับจำนวน

โครโมโซม ดังที่มีการศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น กุหลาบ (Khosravi et al., 2008) กล้วยไม้ *Dendrobium crumenatum* Sw. (Meesawat et al., 2008) และกล้วยไม้ *Dendrobium draconis* Rchb. f. (รัชนี เพ็ชร์ช้าง, 2553)

5.3.1 จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เกิดขึ้นและเปลี่ยนแปลงไปหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน

กล้วยไม้ม้าวิ่งที่เกิดจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน จากผลการศึกษาสามารถสังเกตได้ว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งมีความแตกต่างกัน คือ กลุ่มที่มีลักษณะปกติจะมีใบที่ค่อนข้างเรียวยาว แผ่นใบบาง ส่วนกลุ่มที่มีลักษณะผิดปกติจะมีลำต้นสั้น ใบสั้น แผ่นใบหนาและอวบน้ำ ซึ่งในกลุ่มที่มีลักษณะผิดปกตินี้ จะพบว่ามีบางต้นที่มีลักษณะของลำต้นสั้นมาก ใบซ้อนทับกันแน่น แผ่นใบหนา สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญเติบโตของกลุ่มที่มีลักษณะผิดปกติจะมีการเจริญเติบโตช้ากว่ากลุ่มที่มีลักษณะปกติ จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมปลายรากพบว่าจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งในกลุ่มที่มีลักษณะปกติมีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 38 (Kamemoto et al., 1964; สุมนทิพย์ บุญนาค และปิยะธิดา ธีระกุลพิศุทธิ์, 2550 ; สุลาวัลย์ มหาหิงส์ และสุมนทิพย์ บุนนาค, 2551) และมีบางต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น mixoploid คือภายในต้นเดียวกันมีจำนวนโครโมโซม 2 ระดับพลอยดิคือ 2n = 38 และ 2n = 76 ซึ่งเกิดจากการได้รับสารโคลชิซินที่ไม่ทั่วถึง ทำนองเดียวกับรายงานของ Griesbach (1981) รายงานว่าโปรโตคอร์มที่มีขนาดใหญ่สามารถทนต่อพิษของสารโคลชิซินได้ดีกว่าโปรโตคอร์มขนาดเล็ก แต่โปรโตคอร์มขนาดใหญ่การได้รับสารโคลชิซินอาจไม่ทั่วถึง โดยเฉพาะเซลล์ที่อยู่ภายในที่ห่างจากเซลล์บริเวณผิว ส่งผลให้เกิดโปรโตคอร์มที่เซลล์มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันหรือการเกิดไคเมอราขึ้นได้ ส่วนในกลุ่มที่มีลักษณะผิดปกติ พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 4x = 76 และในบางต้นที่มีลักษณะลำต้นสั้นมาก ใบซ้อนทับกันแน่น แผ่นใบหนา เมื่อทำการตรวจนับโครโมโซม สามารถนับได้ประมาณ 138-152 แท่ง ซึ่งคาดว่าต้นที่มีลักษณะผิดปกติดังกล่าวน่าจะเป็นต้นออกตะพลอยด์ (2n = 8x = 152) สอดคล้องกับรายงานของ จตุพร หงส์ทองคำ (2551ก) และ วชิรพัฒน์ จิวานิจ (2552) ที่พบว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากที่ได้รับสารโคลชิซินมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2n = 4x = 76 และ 2n = 8x =152 โดยพบว่า กล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นโพลีพลอยด์มีลักษณะใบหนา สีเขียวเข้ม ปริมาณคลอโรฟิลล์และขนาดเซลล์คุมปากใบเพิ่มขึ้น แต่มีจำนวนเซลล์คุมต่อพื้นที่น้อยกว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นดิพลอยด์ และมีการเจริญเติบโตช้ากว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งดิพลอยด์ปกติ

5.3.2 ลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมแบบ mixoploid และแบบ euploid ที่เกิดขึ้นหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน ที่แตกต่างจากลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นดิพลอยด์

กล้วยไม้ม้าวิ่งในต้นปกติมีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 38 หลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน พบว่า จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น โดยพบว่ามีการเกิดเป็นต้น mixoploid ในต้นที่ศึกษาจำนวน 5 ต้น มีจำนวน 2 ต้นที่พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n = 38 และมีจำนวน 2 ต้นที่พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 76 อีกจำนวน 1 ต้นที่ศึกษาพบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2 ระดับพลอยดิภายในต้นเดียวกันคือ 2n = 76 และ 2n = 152 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Xin-Hua et al. (2010) ที่พบว่าในเซลล์เจริญปลายยอดของต้นไม้จันทน์ที่เป็น mixoploid มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2 ระดับพลอยดิคือ 2x ปนอยู่กับ 4x โดยมีสาเหตุเนื่องมาจากความผิดปกติของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสหรือไมโอซิสที่ถูกชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซม ส่วนการศึกษาลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมที่มีการเพิ่มขึ้นเป็นชุดโครโมโซม (euploid) ปรากฏว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งที่เกิดขึ้นหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซินมีระดับพลอยดิเพิ่มขึ้นจาก 2n = 2x เป็น 2n = 4x และ 2n = 8x ทำนองเดียวกับรายงานของ วชิรพัฒน์ จิวานิจ (2552) ที่กล่าวว่านอกจากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมเพื่อยืนยันระดับพลอยดิของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซินแล้ว เมื่อนำกล้วยไม้ม้าวิ่งต้นดิพลอยด์, เททระพลอยด์ และออกตะพลอยด์ไปตรวจวัดหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ พบว่าต้นเททระพลอยด์มีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 เท่าของต้นดิพลอยด์ และต้นที่คาดว่าเป็นออกตะพลอยด์มีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 4 เท่าของต้นดิพลอยด์ และประมาณ 2 เท่าของต้นเททระพลอยด์

5.3.3 สัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังการชักนำด้วยสารโคลชิซิน

จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากที่มีการชักนำด้วยสารโคลชิซิน พบว่า ต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นเททระพลอยด์และออกตะพลอยด์มีขนาดของรากไม่แตกต่างกับต้นดิพลอยด์ปกติ แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นเททระพลอยด์และออกตะพลอยด์ที่ปรากฏอย่างชัดเจนคือ มีลักษณะลำต้นสั้นและมีขนาดใหญ่ ใบกว้างและหนาขึ้น ดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น เซลล์คุมปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น ดังเช่นที่มีการศึกษาใน *Dendrobium phalaenopsis* (Chaicharoen and Saejew, 1981) *Phalaenopsis* (Griesbach, 1981) *Cattleya intermedia L.* (Silva et al., 2000) *Ionocidium* Popcorn (Fan et al., 2003) *Phalaenopsis* (Chen et al., 2009) ในต้นโพลีพลอยด์ที่มีระดับพลอยดิมากขึ้น เช่น ออกตะพลอยด์ จะพบว่ามีลำต้นที่สั้นและใหญ่มาก ความกว้างและความยาวของใบลดลง เรียงสลับซ้อนกันแน่น ส่งผลให้ต้นออกตะพลอยด์มีการเจริญเติบโตทางด้านความสูงต้นและมีจำนวนใบต่อต้นน้อยกว่าต้นเททระพลอยด์ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดโครโมโซมจะมีผลต่อขนาดของนิวเคลียส การ

แสดงออกของยีนและการผลิตเอนไซม์ ทำให้มีการแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโตช้าลงในพืชที่มีระดับพลอยดิเพิ่มขึ้น (ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ, 2546 ; นิตย์ศรี แสงเดือน, 2551) ส่วนต้นเททระพลอยด์ พบว่าลักษณะของใบแตกต่างจากต้นดิพลอยด์คือ ใบมีความหนามากกว่าต้นดิพลอยด์ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาในส่วนต่างๆของต้นเททระพลอยด์ที่เปลี่ยนแปลงไปจากต้นดิพลอยด์ ดังที่มีการศึกษาในกล้วยไม้หวาย (*Dendrobium superbiens*) ที่พบว่าต้นอัลโลเททระพลอยด์ ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 4x = 76 มีดอกขนาดใหญ่ กลีบดอกมีความกว้าง ยาวและหนามากกว่าต้นดิพลอยด์ ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 38 (สารณี ไชยเจริญ, 2538) ทำนองเดียวกับรายงานของ Ketsa et al. (2001) ที่ศึกษาการเหี่ยวของดอกกล้วยไม้หวาย (*Dendrobium* 'Caesar') ดิพลอยด์และเททระพลอยด์ พบว่า ต้นเททระพลอยด์มีกลีบดอกหนา น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของดอกมากกว่าดิพลอยด์ และมีอัตราการหายใจต่ำกว่าดิพลอยด์ จึงทำให้ต้นเททระพลอยด์มีอายุการใช้งานของดอกนานกว่าต้นดิพลอยด์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Atichart and Bunnag (2007) ที่ศึกษาการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้หวาย *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl. พบว่า ต้นโพลีพลอยด์มีลักษณะของราก ลำต้น ใบ ดอก และเซลล์คุมปากใบ มีขนาดใหญ่และหนากว่าต้นดิพลอยด์

ส่วนต้นมิกโซพลอยด์ที่ใช้ในการศึกษา พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แตกต่างกันทางสถิติกับต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ ทั้งความสูงต้น จำนวนใบต่อต้น ขนาดใบและขนาดลำต้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายราก ที่พบว่าภายในต้นมิกโซพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมอยู่ 2 ระดับพลอยดิคือ 2n = 38 และ 2n = 76 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นมิกโซพลอยด์ที่แสดงออกจะอยู่ระหว่างต้นดิพลอยด์และต้นเททระพลอยด์

บทที่ 6
สรุป

6.1 การศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม

การศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส โดยศึกษาการเข้าคู่กันของโครโมโซม ลักษณะความผิดปกติในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในระยะแอนาเฟส I และ เทโลเฟส I การสร้างไมโครสปอร์ในกล้วยไม้แดงอุบล ม้าวิ่ง ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง และลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล ตลอดจนการศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสม พบว่า กล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิ่ง มีการเข้าคู่ของโครโมโซมในระยะ diakinesis ปกติ เฉลี่ย 38 และ 19 คู่ ตามลำดับ ส่วนในสายพันธุ์ลูกผสม แดงอุบล x ม้าวิ่ง และม้าบิน x แดงอุบล พบ bivalent เพียง 19.6 คู่ และ 19.55 คู่ ตามลำดับ นอกจากนี้ในระยะแอนาเฟส I และ เทโลเฟส I ของสายพันธุ์ลูกผสมทั้งสองยังพบ chromosome lagging, chromosome bridge และ micronucleus เกิดขึ้น ส่งผลให้ลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์มีการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็น tetrad ลดลงเป็น 56 เปอร์เซ็นต์และ 48.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิ่งมีการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็น tetrad สูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสม โดยศึกษาจากความมีชีวิต ความงอกของละอองเรณู และเปอร์เซ็นต์การผสมติดสามารถยืนยันได้ว่าความสมบูรณ์พันธุ์ที่เกิดขึ้นในลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ลดลงเมื่อเทียบกับกล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิ่ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง หรือ *Doritis* นี้มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอย่างเห็นได้ชัดเจน

6.2 การศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม

จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม พบว่า กล้วยไม้ม้าวิ่งและม้าบินมีระดับพลอยดิเป็นดิพลอยด์คือ มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ $2n = 2x = 38$ ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลมีระดับพลอยดิเป็นเททระพลอยด์และมีจำนวนโครโมโซม $2n = 4x = 76$ ส่วนกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง มีจำนวนโครโมโซม $2n = 3x = 57$ และจากการศึกษาลักษณะและรูปร่างของโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง โดยใช้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ในการจำแนกรูปร่างและจัดเรียงแคริโอไทป์ พบว่า กล้วยไม้ม้าวิ่งมีรูปแบบของแคริโอไทป์เป็น 6 เมตาเซนทริก 24 ซับเมตาเซนทริก และ 8 อะโครเซนทริก (6M + 24Sm + 8A) ส่วนกล้วยไม้ม้าบินมีรูปแบบของแคริโอไทป์เป็น 8 เมตาเซนทริก 22 ซับเมตาเซนทริก

และ 8 อะโครเซนทริก (8M + 22Sm + 8A) กล้วยไม้แดงอุบลมีรูปแบบของแคริโอไทป์เป็น 12 เมตาเซนทริก 48 ซับเมตาเซนทริก และ 16 อะโครเซนทริก (12M + 48Sm + 16A) และกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง มีรูปแบบของแคริโอไทป์เป็น 9 เมตาเซนทริก 36 ซับเมตาเซนทริก และ 12 อะโครเซนทริก (9M + 36Sm + 12A) จากลักษณะของโครโมโซมที่ศึกษาทำให้ทราบว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายคลึงกับกล้วยไม้ม้าบิน แต่แตกต่างกับกล้วยไม้แดงอุบล และจากลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้แดงอุบล พบว่า กล้วยไม้แดงอุบลเป็นเททระพลอยด์ ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบ อัลโลเททระพลอยด์ (allotetraploid) ส่วนลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่ง มีลักษณะของโครโมโซมคล้ายคลึงกับกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลและเป็นทริพลอยด์

6.3 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน

จากการตรวจนับโครโมโซมปลายรากของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากการชักนำด้วยสารโคลชิซิน พบว่าจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งเปลี่ยนแปลงไปจากต้นดิพลอยด์ปกติที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 38 โดยกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ได้รับสารโคลชิซินมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น ในต้นเททระพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2n = 76 ส่วนกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มีลักษณะของต้นสั้นเตี้ย ลำต้นมีขนาดใหญ่ พบว่ามีจำนวนโครโมโซมประมาณ 138 – 152 แท่ง คาดว่าน่าจะเป็นต้นออกตะพลอยด์ (2n = 8x = 152)และในต้นมิกโซพลอยด์ที่เกิดจากการได้รับสารโคลชิซินเฉพาะเซลล์บางกลุ่มพบว่าภายในต้นเดียวมีจำนวนโครโมโซม 2 ระดับพลอยดีคือ 2n = 76 และ152 และพบต้นมิกโซพลอยด์ ที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n = 38 และ 2n = 76 ส่วนการเพิ่มขึ้นของจำนวนโครโมโซมในลักษณะการเพิ่มขึ้นเป็นชุดโครโมโซม (euploid) พบว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งมีระดับพลอยดีเพิ่มขึ้นจาก 2n = 2x เป็น 2n = 4x และ 2n = 8x และจากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ม้าวิ่งหลังจากที่มีการชักนำด้วยสารโคลชิซิน พบว่าต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เป็นเททระพลอยด์และออกตะพลอยด์มีขนาดของรากไม่แตกต่างกับต้นดิพลอยด์ปกติ แต่ต้นเททระพลอยด์และออกตะพลอยด์มีแนวโน้มของความสูงต้นและความยาวรากลดลง ลำต้นสั้น ปรากฏเห็นเด่นชัดในต้นที่คาดว่าเป็นต้นออกตะพลอยด์ที่พบว่า ลักษณะลำต้นมีขนาดสั้นและใหญ่มากขึ้น แต่มีความกว้างและความยาวของใบลดลง เรียงสลับซ้อนกันแน่นมากกว่าต้นเททระพลอยด์และดิพลอยด์ โดยต้นเททระพลอยด์มีความหนาใบมากที่สุด ส่วนต้นมิกโซพลอยด์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แตกต่างกันทางสถิติกับต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ ทั้งความสูงต้น จำนวนใบต่อต้น ขนาดใบและขนาดลำต้น

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์. 2545. วิทยาการกล้วยไม้เบื้องต้น. เอกสารประกอบการสอน. คณะเกษตรศาสตร์ : มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ ศรีประไพ ธรรมแสง และแสงเดือน พลเยี่ยม. 2551. "การศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง", ว. วิทยาศาสตร์การเกษตร. 39 (3) (พิเศษ) : 191-194.

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2546. ปรับปรุงพันธุ์พืช : พื้นฐาน วิธีการ และแนวคิด. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ครรชิต ธรรมศิริ. 2541. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์อัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

_____. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์อัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

จตุพร หงส์ทองคำ. 2551ก. การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้บางชนิดร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

_____. 2551ข. การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้บางชนิดร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

จารุภัทร ประราศี และฉันทนา สุวรรณธาดา. 2549. "การศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้ดินช้างผสมโขลง", วารสารเกษตร. 22 (3) : 188-193.

ทรงชัย แซ่ตั้ง. 2551. การศึกษาลักษณะและการเพิ่มโครโมโซมของเอื้องใบไผ่. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นิตย์ศรี แสงเดือน. 2551. พันธุศาสตร์พืช. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ. 2543. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____. 2546. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

ประภา ศรีพิจิตต์. 2550. เซลล์พันธุศาสตร์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช. เอกสารประกอบการสอน. ภาควิชาพืชไร่นา : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มะลิวรรณ จุรุทา. 2551. การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาและความสมบูรณ์พันธุ์ของปทุมมาลูกผสม (*Curcuma alismatifolia x C. rhabdota*) ดิพลอยด์และเททระพลอยด์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

ระพี สาคริก. 2516. ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ชวนพิมพ์.

_____. 2530. กล้วยไม้. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัชนี เพ็ชร์ช้าง. 2553. "ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการให้โคลชิซินต่อการเจริญและจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้เอื้องเงิน", วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มมส. 29 (4) : 413-419.

วชิรพัฒน์ จิวานิจ อารักษ์ จันทศิลป์ และลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2552. "ผลของโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มและการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง", ใน การประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 3. น. 64. มหาวิทยาลัยมหิดล.

วชิรพัฒน์ จิวานิจ. 2552. ผลของโคลชิซินต่อการชักนำกล้วยไม้ม้าวิ่งให้เกิดโพลีพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิไลลักษณ์ ชนะจิตร และสุขไผท ศรีเมือง. 2551. "ผลของโคลชิซินที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ ploidy ในกล้วยไม้ดินหมูกลิ้ง (*Eulophia andamanensis* Reichb.f.)", วารสารเกษตร. 39 (3) : 275-277.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2538. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์เอ็นพีซับพลายพริ้นติ้ง.

ศิริพร เชื้อจีน. 2546ก. การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์และความสมบูรณ์พันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวายบางพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____. 2546ข. การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์และความสมบูรณ์พันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวายบางพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

สาริณี ไชยเจริญ. 2538. "การศึกษาจำนวนโครโมโซมลักษณะดอกและความสมบูรณ์พันธุ์ในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ดิพลอยด์และอัลโลเททระพลอยด์", วิทยาศาสตร์เกษตร. 29 (2) : 150-157.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2551. "สถิติการนำเข้า – ส่งออก", http://www.mof.or.th/flowers/pdf/oae-exportvalue-orchid. กรกฎาคม, 2552.

สำอางค์ เนตรนารี. 2548. กล้วยไม้. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์เกษตรสยามบุ๊คส์.

สุมนทิพย์ บุญนาค. 2550. "การชักนำให้เกิดโพลิพลอยด์และการส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase สู่กล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima*)", http://www.orchidcenter.org/research/.../search.php. กันยายน, 2552.

สุมนทิพย์ บุญนาค และปิยะธิดา ธีระกุลพิศุทธิ์. 2550. "เซลล์พันธุศาสตร์ของกล้วยไม้บางชนิดในเขตอนุรักษ์พันธุกรรมพืชพื้นที่โคกภูตากา อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น", วารสารวิจัย มข. 12 (4) : 393-401.

สุพัตรา สระธรรม. 2551. "ผลของระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับสารโคลชิซินของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องแซะหอมต่อการเกิดต้นโพลีพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ", ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. น. 153-160. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรางค์รัชต์ อินทะมุสิก. 2551. การแปรผันทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl. *sensu lato*) ในเขตพรรณพฤกษชาติภาคใต้ของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุลาวัลย์ มหาหิงส์ และสุมนทิพย์ บุนนาค. 2551. การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สมศักดิ์ รักไพบูลย์สมบัติ. 2535. ทำเนียบกล้วยไม้ไทย. เชียงใหม่ : สำนักพิมพ์สุริวงศ์บุ๊คเซนเตอร์.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช. 2545. การอบรมเชิงปฏิบัติการเทคนิคการเตรียมโครโมโซมพืชและ Fluorescence *in situ* hybridization. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อดิศร กระแสชัย. 2539. บทปฏิบัติการ Cytoganetic in Agriculture. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อาคม ศรีทองรุ่ง. 2521. การศึกษาระดับความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ และการผสมข้ามของกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* และ *Doritis*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรา คัมภิรานนท์. 2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อบฉันท์ ไทยทอง. 2545. กล้วยไม้เมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์บ้านและสวน.

Amelia, K.E.M., A. Thame and Y.T. Wing. 2002. "A cytogenetical study of the fertility of three local orchid ", http://www.staff. science. nus. edu..sg/ scilooe / srp 2002/sci_paper/pdf. January, 2009.

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

Baeza, C.M., E. Ruiz and P. Novoa. 2010. "Karyotype of *Alstroemeria diluta* subsp. *cheysantha* Ehr. Bayer (Alstroemeriaceae) ", Chilean Journal of Agricultural Research. 70 (4): 667-669.

Begum, R. and S. Alam. 2005. "Karyotype analysis of seven orchid species from Bangladesh", Bangladesh J. Bot. 34 (1): 31-36.

Boldrini, K.R., S.P. Maria and B.D.V. Cacilda. 2006. "Abnormal timing of cytokinesis in microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae : Paniceae)", Journal of Genetics. 85 (3): 225-228.

Bures, P., P. Smarda., O. Rotreklova., M. Oberreiter., M. Buresova., J. Konecny., A. Knoll., K. Fajmon and J. Smarda. 2010. "Pollen viability and natural hybridization of Central European species of *Cirsium*", Preslia. 82: 391-422.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Chaicharoen, S. and K. Saejew. 1981. "Autopolyploidy in *Dendrobium phalaenopsis*", J. Sci. Soc. Thailand. 7: 25-32.

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

Cox, A.V., G.J. Abdelnour., M.D. Bennett and I.J. Leitch. 1998. "Genome size and Karyotype evolution in the Slipper Orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae)", American Journal of Botany. 85 (5): 681–687.

Cui, Y., D. M. Pandey., E. J. Hahn and K.Y. Paek. 2004. "Effect of drought on physiological aspects of Crassulacean acid metabolism in *Doritaenopsis*", Plant Science . 167: 1219–1226.

Dobzhansky, T. 1953. "Genetic and the origin of Species", Amer. Orch.Soc.Bull. 60: 45-57.

Fan, L.Y., A. Thame and Y.T. Wing. 2003. "Influence of the increase of ploidy levels (from 2n to 4n) on the physical attributes of *Ionocidium* popcorn", http://www.staff.science.nus.edu.sg.scilooesrp_2003sci_paper...lim_yifan.pdf. August, 2011.

Felix, L.P. and M. Guerra. 2000. "Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid orchids", Genetic and Molecular biology. 23 (4): 957-978.

Giuseppina, B., C. Brullo., S. Pulvirenti., A. Scrugli., M.C. Terrasi and S. D. Emerico. 2010. "Advances in chromosomal studies in Neottieae (Orchidaceae): constitutive heterochromatin, chromosomal rearrangements and speciation", Caryologia. 63 (2): 184-191.

Grabiele, M., A.I. Honfi, J.C. Cerutti., V. Fernandez., D. Franco and J.R. Davina. 2010. "Cytogenetic analysis in the terrestrial orchid *Sacoila argentina* (Griseb.) Garay from Paraguay", Cytogenetics. 51: 337- 342.

Griesbach, R.J. 1981. "Colchicine-induced polyploid in *Phaleanopsis* orchid", Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1: 103-107.

Haruyaki, K., D.A. teresita and R.K. Adellheid. 1999. Breeding *Dendrobium* Orchid in Hawaii. University of Hawaii Press, Honolulu.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Hartung, E. F. 1954. "Colchicine", http://www. northdaysimage.ca/colchicine.gif&imgrefur. July, 2010.

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

Kamemoto, H., R. Tanaka and K. Kosaki. 1961. "Chromosome numbers of orchids in Hawaii", Hawaii Agric. Expt. Stat. Bull. 127: 5-11.

Kamemoto, H., R. Sagarik and S. Dieutrakul. 1963. "Karyotypes of *Paphiopedilum* species of Thailand", The Kasetsart Journal. 3 (2): 69-78.

Kamemoto, H., K. Shindo and K. Kosaki. 1964. "Chromosome homology in the *Ceratobium*, *Phalaenanthe* and *Latouria* section of genus *Dendrobium*", Pac. Sci. 18: 104-115.

Kamemto, H., T.D. Amore and A.R. Kuehnle. 1999. "Breeding *Dendrobium* orchid in Hawaii", University of Hawaii Press books, Honolulu.

Ketsa, S., A. Uthairatanakij and A. Prayurawong. 2001. "Senesence of diploid and tetraploid cut inforesences of *Dendrobium* 'Caesar' ", Scientia Horticulturae. 91: 133-141.

Kermani, M. J., V. Sarasan, A. V. Roberts, K. Yokaya, J. Wentworth and V. K. Sieber. 2003. "Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability", Theoretical and Appllied Genetics. 107: 1195-1200.

Kim, M.S., J.Y. Kim. And J.S. Eun. 2003. "Chromosome doubling of a *Cymbidium* hybrid with colchicine treatment in meristem culture", Proceedings of NIOC, Nagoya Japan.

Khosravi, P., M.J. Kermani., G.A. Nematzadeh., M.R. Bihamta and K. Yokoya. 2008. "Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*", Euphytica. 160: 267–275.

Lee, Y.H. 1994. "Genomic and Meiotic analysis of *Mokara* orchids", In Journal of Heradity. 35: 39-43.

Luan, L., X. Wang., W.B. Long., Y.H. Liu., S.B. Tu., X.Y. Xiao and F.L. Kong. 2009. "A Comparative Cytogenetic Study of the Rice (*Oryza sativa* L.) Autotetraploid Restorers and Hybrids", Russian Journal of Genetic. 45 (9): 1074-1081.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

McConnell, J. and H. Kamemoto. 1993. "Morphology and meiotic behavior of three *Dendrobium* amphidiploids and their diploid counterparts", HortScience. 28: 935–937.

Meesawat, U., T. Srisawat., L. Eksomtramage and K. Kanchanapoom. 2008. "Nuclear DNA content of the pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Sw.) with the analysis of flow cytometry", Songklanakarin J. Sci. Technol. 30 (3): 277-280.

Prakash, a., S. Chauhan, A. Rana and V. Chaudhary. 2010. "Study of *in vitro* pollen germination and pollen viability in *Punica granatum* L. (Punicaceae)", Journal of Agricultural Sciences. 1 (3): 224-226.

Prasad, P.V.V., K.J. Boote and L.H. Allen Jr. 2011. "Longevity and temperature response of pollen as affected by elevated growth temperature and carbon dioxide in peanut and grain sorghum", Environment and Experimental Botany. 70: 51-57.

Ranney, T.G. 2007. "Polyploid : From evolution to landscape plant improvement", NortCarolina Cooperation Extention. http://www.des.edu/fletcher/programs/metrial11/ranney/polyploid.htm. April, 2010.

Rang, Z.W., S.V.K. Jagadish, Q.M. Zhou, P.Q. Craufurd and S. Heuer. 2011. "Effect of high temperature and water stress on pollen germination and spikelet fertility in rice", Environment and Experimental Botany. 70: 58-65.

Rezaei, M., A. Arzani and B.E. Sayed-Tabatabaei. 2010. "Meiotic behavior of tetraploid wheats (*Triticum turgidum* L.) and their synthetic hexaploid wheat derivates influenced by meiotic restitution and heat stress", Journal of Genetic. 89 (4): 401-407.

Rose, J.B., J. Kubba and T.R. Tobutt. 2000. "Induction of tetraploid in *Buddleia globosa*", Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 63: 121-125.

Rohami, M., A. Mohammadi., M. Khosroshahli., H. Ahmadi and N. Darandeh. 2010. "Karyotype analysis of several ecotype of *Capsicum annuum* L. in Iran", Not.Bot. Hort. Agrobot.Cluj. 38 (3): 177-180.

Ruualcaba-Ruiz, D. and B. Rodriguez-Garay. 2002. "Aberrant meiotic behavior in *Agave tequilana* Weber var. *azul*", BMC plant biology. 2 (10): 1-4.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Sagawa, Y. and Shoji, T. 1968. "Chromosome numbers in *Phalaenopsis* and *Doritis* ." Bull. of pacific orchid society of Hawaii. 26: 9-13.

Sain, R.S. and P. Joshi. 2003. "Pollen fertility of interspecific F1 hybrid in genus *Citrullus* (Cucurbitaceae)", Current Science. 85 (4): 431-434.

Sanso, A.M. and A.F. Rulfe. 2007. "Meiotic irregularities in *Alstroemeria andina* var. *venustula* (Alstroemeriaceae)", Botanical Studies. 48: 311-317.

Sarathum, S., M. Hegele, S. Tantiviwat and M. Nanakorn. 2010. "Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L.", Europ.J.Hort.Sci. 75 (3): 123–127.

Sharma, S.K., K. Rajkumari., S. Kumaria., P. Tandon and S.R. Rao. 2010. "Karyo-morphologycal characterization of natural genetic variation in some threatened *Cymbidium* species of Northeast India", Caryologia. 63 (1): 99-105.

Silva, P.A.K.X.M., S. Callegari-Jacques and M.H. Bodanese-Zanettini. 2000. "Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques", Ciencia Rural, Santa Maria. 30: 105-111.

Song, Z.P. 2001. "A study of pollen viability and longevity in *Oryza rufipogon, O. sativa* and their hybrids", Genetic resources. IRRN: 26 (2): 31-32.

Strachan, T. and A. P. Read. 1996. "Meiosis: Production of gametes", http://www. geneticssuite.net/node/34. May, 2010.

Surenciski, M.R., M. Dematteis and E.A. Flachsland. 2007. "Chromosome stability in cryopreserved germplasm of *Cyrtopodium hatschbachii* (Orchidaceae)", Ann. Bot.Fennici. 44: 287-292.

Tanaka, R. and H. Kamemoto. 1984. "Chromosomes in orchids: counting and numbers", In Orchid Biology reviews and perspectives, III. p. 323-410. London. Cornell University Press.

Than, M.M.M., A. Pal and S. Jha. 2011. "Chromosome number and modal karyotype in a polysomatic endangered orchid, *Bulbophyllum auricomum* Lindl., the Royal Flower of Myanmar", Plant Syst Evol. 294: 167-175.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Thoibi devi, T. and P.K. Borua. 1997. "Meiotic behavior and pollen fertility in three species of *Zephyranthes* (Amaryllidaceae)", Biology Plantarum. 39 (3): 355-360.

Tsai, C.C., C.I. Peng., S.C. Huang., P.L. Huang and C.H. Chou. 2004. "Determination of the genetic relationship of *Dendrobium* species (Orchidaceae) in Taiwan based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA", Scientia Horticulturae. 101: 315-325.

Wilfret, G.J. and H. Kamemoto. 1971. "Genome and karyotype relationships in the genus *Dendrobium* (Orchidaceae)", Cytologia. 36: 604-613.

Withner, C.L. 1974. The Orchids Scientific Studies. New York: A Wiley-interscience publication. 604 p.

Winston, C.C.W., A. Thame and Y.M. Wing. 2001. "A cytogenetical study of the fertility of three local orchid hybrids", 14th Science Research Congress, Singapore.

Xin-Hua, Z., A. Jaime., T.D. Silva and G.H. Ma. 2010. "Karyotype analysis of *Santalum album* L.", Caryologia. 63 (2): 142-148.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมีในการศึกษาโครโมโซม

ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีในการศึกษาโครโมโซม

วิธีการเตรียมสารละลายในการศึกษาโครโมโซม

1. การเตรียมสารละลายที่ทำหน้าที่หยุดวงชีพจักรเซลล์

1.1 ชั่งสาร 8-hydroxyquinolin มาจำนวน 0.029 กรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.2 ละลายสาร 8-hydroxyquinolin ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล. เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง

1.3 เก็บสารละลาย 8-hydroxyquinolin ความเข้มข้น 0.002 M ที่เตรียมได้ในขวดสีชาและหุ้มอะลูมิเนียม (aluminium foil) ที่อุณหภูมิ 4 - 10 °C

2. การเตรียมสารละลายที่ทำหน้าที่คงสภาพเซลล์

2.1 ตวง absolute alcohol, chloroform และ glacial acetic acid (อัตราส่วน 1:1:2) ใส่ในบิกเกอร์

2.2 ผสมสารทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปแช่ตัวอย่างพืช (ควรเตรียมสารละลายให้เหมาะสมกับตัวอย่าง และควรใช้ให้หมดในการเตรียมแต่ละครั้ง)

3. การเตรียมสี aceto-orcein สำหรับย้อมโครโมโซม

3.1 ชั่งสี orcein มาจำนวน 1 กรัม ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.2 ต้ม glacial acetic acid 100 มล. ให้เดือดแล้วละลายสี orcein ลงไปในกรดที่กำลังเดือดและคนให้สีละลายจนหมด

3.3 ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เพื่อเก็บเป็น stock solution แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 - 10 °C

3.4 หลังจากนั้นเจือจางกรดให้เป็น 45 เปอร์เซ็นต์ ด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองด้วยกระดาษกรองอีกครั้ง จึงนำไปใช้ย้อมโครโมโซม

3.5 เก็บสี orcein ที่ได้ในขวดสีชาขนาดเล็ก เพื่อความสะดวกในการย้อมโครโมโซม

ภาคผนวก ข
วิธีการศึกษาโครโมโซม

ภาคผนวก ข วิธีการศึกษาโครโมโซมด้วยเทคนิค squash method

1. การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

1.1 การเตรียมตัวอย่างปลายราก

1.1.1 เก็บตัวอย่างปลายรากกล้วยไม้เลือกรากที่กำลังมีการเจริญโดยสังเกตจากรากที่มีสีเขียวใสและปลายรากมีสีขาวขุ่นเล็กน้อย ที่ช่วงเวลา 9.30 – 10.00 น.

1.1.2 หยุดวงชีพจักรเซลล์ในสารละลาย 8-hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M เป็นเวลานาน 3 - 6 ชม. ที่อุณหภูมิ 4 - 10 °C

1.1.3 เท 8- hydroxyquinoline ออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง

1.1.4 ตรึงเซลล์ในน้ำยาคาร์นอย (Carnoy's solution) สูตรดัดแปลงโดย Kamemoto et al., 1961 แล้วแช่ที่อุณหภูมิ 4 - 10 °C อย่างน้อย 1 ชม. แต่ไม่เกิน 1 เดือน เพื่อให้สภาพโครโมโซมคงที่

1.2 การเตรียมสไลด์ตัวอย่างปลายราก

1.2.1 นำปลายรากที่เก็บในน้ำยาคาร์นอย (Carnoy's solution) ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นอย่างน้อย 2 ครั้ง

1.2.2 นำไปย่อยแยกเซลล์ใน 1 N HCI ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลานาน 2 - 3 นาที

1.2.3 ล้างน้ำ 2 ครั้ง เก็บตัวอย่างรากในกรดน้ำส้ม 45 เปอร์เซ็นต์ อย่างน้อย 1 ชม.

1.2.4 นำปลายรากวางบนแผ่นสไลด์ ตัดเฉพาะปลายรากยาวประมาณ 0.5 - 1 มล. (ต้องเขี่ยหมวกราก root cap ออกเสียก่อน)

1.2.5 หยดสี orcein 1 - 2 หยด แล้วใช้ปลายเข็มเขี่ยแยกเซลล์ของปลายรากออกจากกันให้มากที่สุดแล้วทิ้งไว้ 5 - 10 นาทีในกล่องชื้นซึ่งอิ่มตัวด้วยไอกรดน้ำส้ม 45 เปอร์เซ็นต์

1.2.6 นำแผ่นสไลด์มาปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วผ่านเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์พออุ่น

1.2.7 วางสไลด์บนแผ่นกระดาษซับใช้แผ่นกระดาษซับอีกแผ่นวางทับด้านบน ใช้นิ้วหัวแม่มือค่อยวางบนกระดาษซับกดลงไปในแนวตั้งฉากเพื่อให้เซลล์แบนที่สุดเท่าที่จะทำได้ ซับสีส่วนเกินออก

1.2.8 นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาเซลล์ปลายรากใต้กล้องจุลทรรศน์

1.2.9 เลือกเซลล์ที่นิวเคลียสมีการแบ่งตัวอยู่ในระยะเมตาเฟสนับจำนวนโครโมโซม แล้วบันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยาย 1,000 เท่า

2. การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ดอกอ่อน

2.1 การเตรียมตัวอย่างและเตรียมสไลด์จากดอกอ่อน

2.1.1 เลือกดอกตูมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งสองสายพันธุ์คือแดงอุบลและม้าวิ่ง ส่วนพันธุ์ลูกผสมคือ แดงอุบล x ม้าวิ่ง และ ม้าบิน x แดงอุบล ที่มีขนาดดอกประมาณ 1 ใน 4 ของดอกตูมใกล้บาน

2.1.2 ใช้มีดทำการผ่าดอกและแกะก้อนเรณู (pollen) จำนวนเล็กน้อยวางบนสไลด์

2.1.3 หยด 45 เปอร์เซ็นต์ acetic acid ที่อุณหภูมิ 4 - 10 ^{0}C เป็นเวลานาน 5 นาที

2.1.4 ซับ acetic acid ออกด้วยกระดาษทิชชู แล้วย้อมด้วยสี aceto orcein 1 - 2 หยด เป็นเวลา 2 - 3 นาที

2.1.5 ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วให้ความร้อน

2.1.6 หลังจากนั้นใช้ปลายดินสอเคาะเบาๆ เพื่อให้โครโมโซมกระจายตัวและใช้กระดาษซับสีส่วนเกินออก

2.1.7 เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในระยะ diakinesis เพื่อศึกษาลักษณะการแนบชิดของโครโมโซม (univalent, bivalent, trivalent และ quadrivalent) และความผิดปกติที่เกิดขึ้นในการแบ่งไมโอซิสในระยะแอนาเฟส I และ เทโลเฟส I

2.1.8 บันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยาย 1,000 เท่า

ภาคผนวก ค

การจำแนกรูปร่างของโครโมโซม ตามวิธีการของ Levan et al., 1964

ภาคผนวก ค การจำแนกรูปร่างของโครโมโซม ตามวิธีการของ Levan et al., 1964

1. วิธีการจำแนกรูปร่างของโครโมโซม

1.1 เลือกเซลล์ที่อยู่ในระยะเมตาเฟส ที่มีการกระจายตัวดี อย่างน้อย 3 เซลล์/พันธุ์

1.2 ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

1.3 นำภาพที่ได้มาวัดขนาดของโครโมโซม ด้วย vernier caliper

1.4 จำแนกรูปร่างของโครโมโซมโดยใช้ตำแหน่งของเซนโทรเมียร์และความยาวของโครโมโซม (ความยาวแขนข้างสั้น (p) และความยาวแขนข้างยาว (q)) ออกเป็น 4 ประเภท คือ เมตาเซนทริก ซับเมตาเซนทริก อะโครเซนทริก และเทโลเซนทริก

1.5 จัดเรียงแคริโอไทป์และทำไอดิโอแกรม (idiogram) จากค่าที่ได้จากการคำนวณ 2 ค่าคือ ความยาวสัมพัทธ์ของโครโมโซม (relative length) และค่าอัตราส่วนของเซนโทรเมียร์ (centromeric ratio) ของโครโมโซมแต่ละแท่ง

2. การคำนวณหาความยาวสัมพัทธ์ของโครโมโซม (relative length of chromosome)

ความยาวสัมพัทธ์ของโครโมโซม คือ เปอร์เซ็นต์ของความยาวของโครโมโซม เป็นค่าที่บอกขนาดของโครโมโซมหนึ่งแท่งเมื่อเทียบกับโครโมโซมอื่นๆ ทั้งจีโนม คำนวณได้จาก

$$\text{ความยาวสัมพัทธ์ของโครโมโซม} = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมที่ศึกษา} \times 100}{\text{ผลรวมความยาวของโครโมโซมทั้งหมดใน haploid}}$$

3. การคำนวณหาอัตราส่วนของเซนโทรเมียร์ (centromeric ratio)

อัตราส่วนของเซนโทรเมียร์หรืออัตราส่วนของความยาวแขน (arm ratio) เป็นค่าที่บอกรูปร่างของโครโมโซมว่าเป็นชนิด เมตาเซนทริก ซับเมตาเซนทริก อะโครเซนทริก และเทโลเซนทริก คำนวณได้จาก

$$\text{อัตราส่วนของเซนโทรเมียร์} = \frac{\text{ความยาวของแขนข้างยาว}}{\text{ความยาวของแขนข้างสั้น}}$$

การจำแนกรูปร่างของโครโมโซมจากตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ โดยใช้ค่าอัตราส่วนของเซนโทรเมียร์ที่ได้จากการคำนวณในการจำแนกรูปร่างของโครโมโซม (ค่า centromeric ratio (CR) จะมีค่ามากกว่า 1 เสมอ) ตามวิธีของ Levan et al., 1964

รูปร่างของโครโมโซม	อักษรย่อ	อัตราส่วนของเซนโทรเมียร์
เมตาเซนทริก	M	1.00 – 1.67
ซับเมตาเซนทริก	Sm	1.68 – 3.00
อะโครเซนทริก	A	3.01 – 7.00
เทโลเซนทริก	T	7.01 - α

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวแสงเดือน พลเยี่ยม

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี พ.ศ. 2550
ศึกษาต่อระดับปริญญาโท หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี พ.ศ. 2551 – 2554

ประวัติการทำงาน พ.ศ. 2550 ผู้ช่วยวิจัยโครงการการเก็บรวบรวมและการศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ผลงานทางวิชาการ กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ ศรีประไพ ธรรมแสง และ แสงเดือน พลเยี่ยม. 2551. การศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง. ว. วิทย์. กษ. 39 (3) (พิเศษ) : 191-194.

แสงเดือน พลเยี่ยม กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ และสมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช. 2553. พฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม. *ใน* การประชุมวิชาการครั้งที่ 48 สาขาพืช หน้า 47-53. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวแสงเดือน พลเยี่ยม
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี พ.ศ. 2550 ศึกษาต่อระดับปริญญาโท หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี พ.ศ. 2551 – 2554
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2550 ผู้ช่วยวิจัยโครงการการเก็บรวบรวมและการศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ผลงานทางวิชาการ	กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ ศรีประไพ ธรรมแสง และ แสงเดือน พลเยี่ยม. 2551. การศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง. ว. วิทย์. กษ. 39 (3) (พิเศษ) : 191-194. แสงเดือน พลเยี่ยม กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ และสมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช. 2553. พฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม. *ใน* การประชุมวิชาการครั้งที่ 48 สาขาพืช หน้า 47-53. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.