บทคัดย่อ

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากมีความสวยงามและหลากหลายสูง จึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีคุณภาพจึงมีความจำเป็น ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ด้วยวิธีกลายพันธุ์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วยวิธีกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี sodium azide (NaN_3) ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ (1) การก่อกลายพันธุ์ protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วย NaN_3 (2) การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลาย ซึ่งประกอบด้วย 3 การทดลอง คือ 2.1) การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา 2.2) การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ 2.3) การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยวิธีการระดับเซลล์ ซึ่งจากการทดสอบหาความเข้มข้นของ NaN_3 ที่เหมาะสมต่อการก่อกลาย-พันธุ์ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล และบันทึกเปอร์เซ็นต์การตายที่ 3 วัน 1 และ 2 สัปดาห์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs เพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ NaN_3 ที่สูงขึ้น โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการก่อกลายพันธุ์ PLBs (LD_{30} และ LD_{50}) ด้วย NaN_3 คือ 0.1 และ 0.5 mM จากการก่อกลายพันธุ์ PLBs ด้วย NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 mM ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนาน 6 เดือน แล้วนำออกปลูกในสภาพโรงเรือน พบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์บางต้นมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงคือ ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้นและถี่ ใบสั้น ใบหนา รากสั้น และรากมีจำนวนน้อย แตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่พบเฉพาะสักษณะรากสั้นและรากมีจำนวนน้อย เมื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM จำนวน 24 ต้น เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 10 ต้น พบว่าได้ต้นสายพันธุ์กลายที่มีพันธุกรรมต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 20 ต้น คิดเป็น 83.3 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ inter simple sequence repeats (ISSR) ทั้ง 11 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์ จำนวน 63 แถบ จาก 194 แถบ คิดเป็น 32.3 เปอร์เซ็นต์ และจากการนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมายโมเลกุล ISSR มาใช้ประเมินความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ พบว่า ISSR มีประสิทธิภาพสูงกว่า เนื่องจากมีค่า Mantel's test cophenetic correlation (0.97) สูงกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา (0.79) และมีความสามารถในการจำแนกต้นสายพันธุ์กลายสูงกว่า จากการนับจำนวนโครโมโซมปริเวณปลายราก พบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์มีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 24$ แสดงว่า NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า NaN_3 สามารถก่อกลาย-พันธุ์ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเครื่องหมายโมเลกุล ISSR เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพ สามารถใช้ในการจำแนกต้นสายพันธุ์กลายได้ตั้งแต่ในระยะแรก ขณะนี้อยู่ระหว่างการปลูกเลี้ยงต้นสายพันธุ์กลายเหล่านี้เพื่อประเมินลักษณะทางพืชสวนต่อไป

ABSTRACT

Orchid is one of the most important economic ornamentals in Thailand. Owing to its beauty and high diversity, there has been a lot of demand domestically and internationally. Therefore, breeding new varieties for high quality is essential. Mutation breeding is an alternative for orchid improvement. The objective of this research was to perform mutation breeding of *Dendrobium* 'Earsakul' using sodium azide (NaN_3) in vitro. The experiment was divided into 2 parts: (1) chemical mutagenesis of *Dendrobium* 'Earsakul' protocorm-like bodies (PLBs) using NaN_3, (2) selection and evaluation of mutants, which was divided into 3 parts: 2.1) selection and evaluation with morphological characters, 2.2) selection and evaluation with molecular markers, and 2.3) selection and evaluation with cytology method. When percentages of mortality were evaluated at 3 days, 1 and 2 weeks after treatment of *Dendrobium* 'Earsakul' PLBs in various concentrations of NaN_3, it was found that percentages of mortality of PLBs increased when concentrations of NaN_3 increased. The 30% (LD_{30}) and 50% (LD_{50}) mortality rates were obtained with 0.1 and 0.5 mM NaN_3, respectively. PLBs were mutagenized at the concentrations of 0, 0.1 and 0.5 mM NaN_3 and cultured for 6 months before being transferred to greenhouse. Morphological alteration has been observed in some putative mutants; dwarf, more and shorter internodes, short and thick leaves, short roots and reduced root numbers, which differed from nonmutagenized controls where only short roots and reduced root numbers were found. When genetic profiles of 24 putative mutants from mutagenesis using 0.1 and 0.5 mM NaN_3 were compared to 10 nonmutagenized controls, altered DNA profiles were found in 20 out of these 24 putative mutants (83.3%). Sixty three polymorphic bands were produced from a total of 194 bands (32.3%) by 11 inter simple sequence repeats (ISSR) primers. Genetic diversity and relatedness were evaluated among NaN_3 mutagenized plants and nonmutagenized controls by means of ISSR analysis and morphological characters. It was found that ISSR offered higher value of Mantel's test cophenetic correlation (0.97) than morphological characters (0.79) and had higher mutant differentiation capability, indicating higher efficiency of ISSR. Counting of chromosome numbers in the root tips showed that NaN_3 mutagenized plants and nonmutagenized controls had the same chromosome number of $2n = 2x = 24$, suggesting that both concentrations of NaN_3 had no effect on chromosome number. These results indicated that NaN_3 can be effectively utilized to mutagenize *Dendrobium* 'Earsakul' PLBs, and ISSR marker is a powerful tool for identification of mutants at an early stage. At present, these identified mutants are being cultured for future evaluation of their horticultural characters.