การชักนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* โดยการใช้สารโคลชิซินและรังสีแกมมาในสภาพปลอดเชื้อ

นายจินดา เดชบุญ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2555

COLCHICINE AND GAMMA IRRADIATION OF *Doritaenopsis* HYBRID TO INDUCE GENETIC VARIATION *IN VITRO*

Jinda Dedboon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science Program in Crop Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2012

การชักนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* โดยการใช้สารโคลชิซินและรังสีแกมมาในสภาพปลอดเชื้อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(อ. ดร.รุจ มรกต)
ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร.อารักษ์ ธีรอำพน)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ผศ. ดร.ฐิติพร มะชิโกวา)
กรรมการ

(รศ. ดร.ยุวดี มานะเกษม)
กรรมการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปิจำนงค์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

จินดา เดชบุญ : การชักนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* โดยการใช้สารโคลชิซินและรังสีแกมมาในสภาพปลอดเชื้อ (COLCHICINE AND GAMMA IRRADIATION OF *Doritaenopsis* HYBRID TO INDUCE GENETIC VARIATION *IN VITRO*) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อารักษ์ ธีรอำพน, 64 หน้า.

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสายพันธุ์กล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ให้มีลักษณะที่ดี แตกต่างไปจากเดิม โดยการใช้สารโคลชิซินและรังสีแกมมาในสภาพปลอดเชื้อ โดยแบ่งเป็น 2 การทดลอง การทดลองแรกเพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้สารโคลชิซินชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ วางแผนการทดลองแบบ Factorial ใน CRD มี 7 ซ้ำ โดยการนำโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่มีขนาด 2-3 มิลลิเมตร ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Vacine and Went (VW) ที่มีสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.05, 0.075 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน จากนั้นนำโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง VW สังเกตการเปลี่ยนแปลงของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลารับสารโคลชิซินทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ลดลง และเมื่อโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนจนมีอายุ 10 เดือน บันทึกการเจริญเติบโตและปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้น ให้น้ำหนักสด จำนวนใบ ความยาวใบ จำนวนราก ความยาวราก และความหนาแน่นปากใบลดลง ในขณะที่เส้นผ่าศูนย์กลางราก ความกว้างใบ ความหนาของใบ และความยาวปากใบมีแนวโน้มสูงขึ้น นอกจากนี้ ต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยด์สูง โดยเฉพาะเมื่อใช้สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นาน 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยด์สูงที่สุดคือ 60 เปอร์เซ็นต์ ต้นเตตระพลอยด์ที่ได้มีใบสั้นและกว้าง แผ่นใบหนา รากสั้น และมีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นดิพลอยด์ การทดลองที่สองเพื่อศึกษาปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 7 ซ้ำ โดยการนำโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่มีขนาด 2-3 มิลลิเมตร ไปฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 0, 50, 100, 150 และ 200 เกรย์ จากนั้นนำโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง VW สังเกตการเปลี่ยนแปลงของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ เมื่อโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนจนมีอายุ 10 เดือน บันทึกการเจริญเติบโตและปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าต้นที่ได้รับการฉายรังสีแกมมามีน้ำหนักสด ความยาวใบ ความกว้างใบ ความหนาใบ จำนวนราก ความยาวรากและเส้นผ่าศูนย์กลางรากลดลง แต่มีจำนวนใบมาก ในขณะที่ความหนาแน่นและความยาวของปากใบ และปริมาณดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น ใบหลอด ใบแฉก ใบด่าง ใบยาวเรียวเล็ก ใบหดสั้นและหนาขึ้น ใบ

เปลี่ยนสีไปจากเดิมจากสีเขียวปนน้ำตาลแดงเป็นสีเขียวทั้งใบ และมีเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์สูงขึ้นเมื่อได้รับปริมาณรังสีแกมมามากขึ้น โดยที่ระดับ 200 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์สูงที่สุด คือ 24.29 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาออกปลูกในสภาพโรงเรือน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้น้อยลงเมื่อได้รับปริมาณรังสีแกมมาที่สูงขึ้น โดยต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์หลังจากนำไปปลูกในสภาพโรงเรือนสูงที่สุด คือ 57.14 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช	ลายมือชื่อนักศึกษา________________________
ปีการศึกษา 2555	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_________________
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม______________

JINDA DEDBOON : COLCHICINE AND GAMMA IRRADIATION OF *Doritaenopsis* HYBRID TO INDUCE GENETIC VARIATION *IN VITRO*. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. ARAK TIRA-UMPHON, Ph.D., 64 PP.

COLCHICINE/GAMMA IRRADIATION/*Doritaenopsis* HYBRID/*IN VITRO*

This study aims to develop *Doritaenopsis* hybrid by colchicine and gamma irradiation. Two experiments were set up *in vitro*. The first experiment was to examine the most effective concentration and the duration of colchicine treatment. The experimental design was Factorial in CRD with 7 replications. The protocorm-like bodies (PLBs) were cultured on Vacine and Went medium (VW) containing different concentrations of colchicine 0, 0.05, 0.075 and 0.1% (w/v). After an incubation period of 1, 3, 5 and 7 days, they were transferred into modified VW medium. The results showed that increasing concentration and duration of colchicine treatment decreased the percent survival of PLBs. After 10 months, morphology, physiology and DNA content were investigated. The results indicated that the higher concentrations and the longer treatment durations decreased the fresh weight, number of leaves, leaf length, number of root, root length and stomatal density of the young plant. In contrast, the root diameter, leaf width, leaf thickness and stomatal length increased. In addition, plant exposured to colchicine gave high percentage of tetraploid plant. Especially, the plant exposure to colchicine at 0.1% for 7 days showed the highest percentage of tetraploid (60%). However, the tetraploid plants were rosette and the rate of growth was slower than that of the diploid plants. The second experiment was to find the suitable dose of gamma irradiation for mutation. The experimental design was in CRD with 7 replications. PLBs were irradiated with gamma radiation at the doses of 0, 50,

100, 150 and 200 Gy before transferred to culture on modified VW for 10 months. The results showed that the fresh weight, leaf length, leaf width, leaf thickness, number of root, root length, and root diameter decreased with the increased exposure dosages. However, the number of leaves increased. While, stomatal density, stomatal length and DNA contents were not significantly different. Moreover, morphological changes such as abnormal leaf, forked leaves, chlorophyll variation, narrow leaves, shortened and thickened leaves, multiple branching and changes in leaf color from green brown to green were observed. In addition, the percentage of mutation was highest at the radiation doses of 200 Gy (24.29%). Furthermore, the higher radiation exposured caused higher mortality rate of the plants. Plant exposured to gamma radiation at 50 Gy showed the highest mutation survival rate (54.54%).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Crop Production Technology	Student’s Signature__________________
Academic Year 2012	Advisor’s Signature__________________
	Co-advisor’s Signature_______________

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ทั้งด้านวิชาการและด้านการดำเนินงานวิจัย จากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ได้แก่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อารักษ์ ธีรอำพน อาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพร มะชิโกวา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำปรึกษา ช่วยแก้ปัญหาและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

อาจารย์ ดร.รุจ มรกต หัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านวิชาการ และการนำเสนอข้อมูลที่ดี

รองศาสตราจารย์ ดร.ยุวดี มานะเกษม ที่กรุณาให้คำแนะนำทางด้านวิชาการ และการนำเสนอข้อมูลที่ดี

ขอขอบคุณ คุณนวลปรางค์ อุทัยดา และคุณสมยง พิมพ์พรม เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยอำนวยความสะดวกทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ และให้คำแนะนำในการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ พี่ น้องบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชทุกท่าน ที่ช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ให้การปฏิบัติงานเป็นไปได้ด้วยดี ให้คำปรึกษาด้านวิชาการ และให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้โอกาสในการศึกษาระดับมหาบัณฑิต แก่ผู้จัดทำวิทยานิพนธ์ด้วยทุนสำหรับผู้มีศักยภาพเข้าศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และมูลนิธิพระบรมราชานุสรณ์พระบาทสมเด็จพระปกเกล้าเจ้าอยู่หัวและสมเด็จพระนางเจ้ารำไพพรรณี ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา เพื่อทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษาจนสำเร็จลุล่วง

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา จนทำให้ประสบความสำเร็จในชีวิต

จินดา เดชบุญ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ค
กิตติกรรมประกาศ จ
สารบัญ ฉ
สารบัญตาราง ฌ
สารบัญรูป ญ
บทที่
1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญของปัญหา 2
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5
2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ความสำคัญของกล้วยไม้ 3
2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้ 3
2.3 การกลายพันธุ์ในพืช 5
2.4 ชนิดของการกลายพันธุ์ 7
2.5 การนำพันธุ์กลายไปใช้ประโยชน์ 8
2.6 การใช้สารโคลชิซินในการชักนำให้เกิดการกลายพันธ์ 8
2.7 การใช้รังสีแกมมาในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ 11
3 วิธีดำเนินการวิจัย 15
3.1 ศึกษาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่าง ๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* 15
3.2 ศึกษาผลของการฉายรังสีแกมมาแบบโครนิกต่อกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* 17

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล และการอภิปรายผล 21
4.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่าง ๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* 21
4.1.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ 21
4.1.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ 23
4.1.3 เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซมของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ 32
4.2 วิจารณ์ผลการทดลองผลของระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่างๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* 35
4.2.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ 35
4.2.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ 35
4.2.3 การตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ 36
4.2.4 เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ 37

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 การศึกษาปริมาณรังสีแกมมาที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่าง ๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* 38
4.3.1 ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 38
4.3.2 เปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์ของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 41
4.4 วิจารณ์ผลการทดลองผลของปริมาณรังสีแกมมาที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่าง ๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* 47
4.4.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 47
4.4.2 การตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 47
4.4.3 เปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์ของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 48
5 บทสรุป 50
รายงานอ้างอิง 52
ภาคผนวก 56
ประวัติผู้เขียน 64

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ในสัปดาห์ที่ 4 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน......22
2 ผลของสารละลายโคลชิซินต่อน้ำหนักสด จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ และความหนาใบ ของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* เมื่ออายุ 10 เดือน หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน......27
3 ผลของสารละลายโคลชิซินต่อจำนวนราก ความยาวราก และเส้นผ่านศูนย์กลางรากของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* เมื่ออายุ 10 เดือน หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน......29
4 ผลของสารละลายโคลชิซินต่อความหนาแน่นปากใบ และความยาวปากใบของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* เมื่ออายุ 10 เดือน หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน......30
5 ผลของสารละลายโคลชิซินต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นดิพลอยด์ และเตตระพลอยด์ของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* เมื่ออายุ 10 เดือน หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน......34
6 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ ความหนาใบ จำนวนราก ความยาวราก เส้นผ่านศูนย์กลางราก ความหนาแน่นปากใบ และความยาวปากใบของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* เมื่ออายุ 10 เดือน หลังจากได้รับรังสีแกมมาปริมาณที่แตกต่างกัน......43
7 ผลของรังสีแกมมาต่อเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์ และเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์หลังจากนำไปปลูกในสภาพโรงเรือนของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* เมื่ออายุ 10 เดือน หลังจากได้รับรังสีแกมมาปริมาณที่แตกต่างกัน......44

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ 28

2 แสดงความหนาแน่นและความยาวปากใบของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ 31

3 ฮิสโทรแกรมแสดงระดับพลอยดีของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* 33

4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* หลังจากฉายรังสีแกมมา 41

5 ฮิสโทรแกรมแสดงระดับพลอยดีของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 45

6 แสดงอิทธิพลของรังสีแกมมาที่มีต่อลักษณะทางสัณฐานของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* 46

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นแหล่งปลูกกล้วยไม้เขตร้อนที่สำคัญของโลก เริ่มมีการปลูกเลี้ยงเพื่อการค้าและส่งออกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2509 และในปี พ.ศ. 2553 สามารถส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกได้ปริมาณ 25,269.84 ตัน ซึ่งคิดเป็นมูลค่าเท่ากับ 2,305.15 ล้านบาท และกล้วยไม้กระถางได้ปริมาณ 929,987 ตัน ซึ่งคิดเป็นมูลค่าเท่ากับ 422.45 ล้านบาท ตลาดส่งออกที่สำคัญ ได้แก่ ญี่ปุ่น สหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา และจีน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) ส่งผลให้การผลิตกล้วยไม้ของประเทศไทยมีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว และมีการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้อย่างต่อเนื่อง ทำให้มีกล้วยไม้พันธุ์ใหม่เกิดขึ้นเพื่อให้เหมาะกับสภาพพื้นที่ปลูกที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ และเพื่อสนองต่อความต้องการของตลาดและประโยชน์ในการใช้งานที่หลากหลาย

นักปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้จึงนิยมนำกล้วยไม้สกุล *Doritis* และ *Phalaenopsis* มาผสมข้ามสกุลกัน เพื่อให้ได้ดอกที่มีสีชมพูสด และลวดลายที่แปลกไปจากเดิม ทำให้ได้เป็นสกุลใหม่ คือ *Doritaenopsis* กล้วยไม้สกุลนี้มีลักษณะดอก ช่อดอก และสีสันลวดลายที่สวยงาม จึงเป็นที่ต้องการของตลาดอย่างมาก (Sheehan, 2002) แต่กล้วยไม้ลูกผสมข้ามชนิดหรือข้ามสกุล ต้นที่ได้มักมีขนาดดอกเล็กลง แต่ขนาดต้นใหญ่ขึ้น และมักจะแสดงอาการเป็นหมัน คือ เมื่อนำไปผสมพันธุ์จะไม่ติดฝัก บางครั้งติดฝักแต่หลุดไป หรือฝักแก่แล้วไม่มีเมล็ด เป็นต้น เนื่องจากสายพันธุ์ของพ่อและแม่มีความแตกต่างกันของจำนวนโครโมโซม จึงส่งผลให้โครโมโซมของลูกผสมไม่สามารถเข้าคู่กันได้ ดังนั้น จึงได้มีการชักนำให้เกิดการสร้างโครโมโซมเพิ่มขึ้นในลูกผสมเพื่อให้สามารถผสมพันธุ์กับต้นอื่นและผลิตเมล็ดได้ (ระพี สาคริก, 2516) แต่กล้วยไม้เป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตช้า และมีอัตราการงอกของเมล็ดในสภาพธรรมชาติค่อนข้างต่ำ ส่งผลให้มีโอกาสที่จะได้ต้นที่มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมหรือการกลายพันธุ์ในธรรมชาติเป็นไปได้น้อย จึงต้องมีการใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์เข้ามาช่วยชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น (Arditti, 1977)

สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ได้มีการนำสารโคลชิซิน และรังสีแกมมา มาใช้เป็นสิ่งก่อการกลายพันธุ์เพื่อชักนำให้ได้กล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่แต่สารโคลชิซิน และรังสีแกมมา มีความเป็นพิษสูงมาก (Dermen, 1940) และจากการทดลองที่ผ่านมาพบว่า การใช้โคลชิซินและรังสีแกมมา ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้จะเกิดประสิทธิภาพหรือไม่นั้น ขึ้นกับความเข้มข้น ระยะเวลา และสายพันธุ์ของกล้วยไม้

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นและระยะเวลาในการใช้สารโคลชิซิน และระดับรังสีแกมมาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis*

2. เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพันธุศาสตร์ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากการได้รับสารโคลชิซินและรังสีแกมมา

3. เพื่อเป็นแนวทางและการปรับปรุงให้ได้กล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่ที่มีดอกขนาดใหญ่ สีสันสดใส และมีลักษณะแปลกใหม่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นหนทางไปสู่การพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ตัดดอกหรือกล้วยไม้กระถาง ซึ่งเป็นพืชที่มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทย และให้เป็นที่ต้องการของตลาดโลก

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ในการวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาหาความเข้มข้นและระยะเวลาในการใช้สารโคลชิซินและรังสีแกมมา เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพันธุศาสตร์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์กล้วยไม้ให้มีความหลากหลายมากขึ้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความเข้มข้นและระยะเวลาในการใช้สารโคลชิซิน และระดับรังสีแกมมาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis*

2. ทราบถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพันธุศาสตร์เพื่อแยกความแตกต่างของกล้วยไม้สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการใช้สารโคลชิซินและรังสีแกมมาได้

3. ทำให้ได้กล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะแปลกใหม่เกิดขึ้นซึ่งอาจพัฒนาเป็นพันธุ์ทางการค้าต่อไป

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของกล้วยไม้

ประเทศไทยเป็นแหล่งปลูกกล้วยไม้เขตร้อนที่สำคัญของโลก เริ่มมีการปลูกเลี้ยงเพื่อการค้าและส่งออกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2509 แลในปี พ.ศ. 2553 สามารถส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกได้ปริมาณ 25,269.84 ตัน ซึ่งคิดเป็นมูลค่าเท่ากับ 2,305.15 ล้านบาท และกล้วยไม้กระถางได้ปริมาณ 29,987 ตัน ซึ่งคิดเป็นมูลค่าเท่ากับ 422.45 ล้านบาท โดยมีตลาดส่งออกที่สำคัญ ได้แก่ ญี่ปุ่น สหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา และจีน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) เนื่องจากกล้วยไม้มีสีสันสวยงาม สีของดอกมีเกือบทุกสี มีทั้งขนาดเล็กและใหญ่ หลากหลายแตกต่างกันไปตามลักษณะประจำพันธุ์ทำให้ผู้บริโภคมีโอกาสเลือกใช้ได้มากตามความต้องการ และที่สำคัญกล้วยไม้เป็นไม้ตัดดอกที่มีอายุการใช้งานนาน ส่งผลให้การผลิตกล้วยไม้ของประเทศไทยมีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว และมีการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้อย่างต่อเนื่อง ทำให้มีกล้วยไม้พันธุ์ใหม่เกิดขึ้นเพื่อให้เหมาะกับสภาพพื้นที่ปลูกที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ และเพื่อสนองต่อความต้องการของตลาดและประโยชน์ในการใช้งานที่หลากหลาย

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชวงศ์ใหญ่วงศ์หนึ่งของพืชมีดอก (Class Angiospermae) ประกอบด้วยสกุล (genera) มากกว่า 800 สกุล และมีประมาณ 30,000 ชนิด (species) ในธรรมชาติมีแหล่งกำเนิดที่สำคัญ 2 แหล่ง คือ ลาตินอเมริกา และเอเชียแปซิฟิก โดยประเทศไทยเป็นศูนย์กลางของแหล่งเอเชียแปซิฟิก ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของกล้วยไม้เขตร้อนที่มีมากกว่า 1,100 ชนิด พบทั้งที่ขึ้นอยู่บนต้นไม้ ผิวดินบนภูเขาและพื้นดิน (ครรชิต ธรรมศิริ, 2550) ส่งผลให้มีความหลากหลายของพันธุ์กล้วยไม้สูง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้มาก แต่มีกล้วยไม้บางชนิดที่ไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ในเชิงการค้า คือ

1. ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherima* Lindl.) ซึ่งเจริญอยู่บนพื้นดิน ซอกหินหรือแอ่งหินที่มีอินทรียวัตถุทับถมในป่าโปร่ง มีการกระจายพันธุ์อยู่ในประเทศอินเดีย อินโดนีเซีย มาเลเซีย พม่า ไทย เนปาล และศรีลังกา เป็นต้น (Arditti, 2008) ลักษณะเด่นของม้าวิ่ง คือ ลำต้นต้นสั้น ใบแบนกว้างค่อนข้างหนาสีเขียวหรือสีเขียวอมม่วง ช่อดอกตั้ง ยาว แข็งและตรง ดอกมีสีแดงอ่อนถึงสีแดง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อมม่วง กลีบเลี้ยงและกลีบดอกคู่ล่างกางและลู่ไปทางด้านหลัง ทำให้เห็นเส้าเกสรเด่นชัด ดอกจะทยอยบานจากโคนถึงปลายช่อดอก และมีช่วงฤดูการออกดอกตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงเดือนธันวาคม (ดวงกันยา อุบลหล้า, 2550; อบฉันท์ ไทยทอง, 2549) นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์ย่อย หรือวาไรตี้ (variety) ซึ่งพบในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยคือ พันธุ์บีสโซเนียนา (*Doritis pulcherrima* var. buyssoniana) หรือที่เรียกกันว่า แดงอุบล ซึ่งมีดอกขนาดใหญ่กว่าปกติ และพบว่ามีโครโมโซมเป็น 2 เท่าของม้าวิ่งทั่วไปคือ มีโครโมโซมเป็นแบบเตตระพลอยด์ที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ (ระพี สาคริก, 2549)

2. กล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส (*Phalaenopsis*) ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตขึ้นทางยอด (monopodial) มีลักษณะลำต้นสั้น ใบกว้าง ค่อนข้างรี หนาและอวบน้ำ รากค่อนข้างใหญ่ ช่อดอกยาว ปกติจะมีใบติดอยู่กับลำต้น 5-6 ใบ ดอกบานอยู่ได้นาน 2-3 สัปดาห์ หรืออาจเป็นเดือน มีการกระจายพันธุ์ในธรรมชาติตั้งแต่ตอนใต้ของไต้หวันไปถึงออสเตรเลีย และจากตะวันตกของฟิลิปปินส์ไปจนถึงหมู่เกาะในมหาสมุทรอินเดีย (ครรชิต ธรรมศิริ, 2550) สำหรับประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิสในธรรมชาติ ได้แก่ เขากวางอ่อน (*Phalaenopsis cornucervi* (Breda) Bl. & Rchb.f.) ผีเสื้อชมพู (*Phalaenopsis lowii* Rchb.f.) ผีเสื้อน้อย (*Phalaenopsis parishii* Rchb.f.) และตากาฉ่อ (*Phalaenopsis decumbens* Holtt.) (ดวงกันยา อุบลหล้า, 2550; อบฉันท์ ไทยทอง, 2549) ซึ่งพันธุ์แท้นั้นจะมีขนาดดอกค่อนข้างเล็กจึงมีการปลูกเลี้ยงไม่มาก แต่ปัจจุบันได้มีการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์สกุลฟาแลนอปซิสจนทำให้ได้ดอกที่สวยงาม ทั้งรูปทรงและสีของดอก เช่น ดอกกลมใหญ่ กลีบดอกหนา ดอกมีหลากหลายสีและมีลวดลายแปลกตา การที่กล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส มีดอกที่สวยงาม และไม่ต้องการแสงมาก จึงนิยมปลูกเลี้ยงเป็นไม้กระถางเพื่อประดับตกแต่งภายในอาคาร สวนหย่อม และนำมาประดับแจกันหรือเป็นของขวัญในโอกาสสำคัญต่าง ๆ

จากลักษณะเด่นดังกล่าว นักปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้จึงนิยมนำกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสกุลฟาแลนอปซิส มาผสมข้ามสกุลกัน เพื่อให้ได้ดอกที่มีสีชมพูสด และลวดลายที่แปลกไปจากเดิม ทำให้ได้เป็นสกุลใหม่คือ *Doritaenopsis* โดยมีลูกผสมที่ได้มีการจดบันทึกไว้ใน Sander's List of Orchid Hybrids (หนังสือที่รวบรวมรายชื่อลูกผสมกล้วยไม้ มีการตีพิมพ์ครั้งแรกเมื่อ ค.ศ. 1947) ต้นแรกคือ *Doritaenopsis* Arashi ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง *Phalaenopsis lindeni* กับ *Doritis pulcherrima* (Arditti, 2008) กล้วยไม้สกุลนี้ มีลักษณะดอก ช่อดอก และสีสันลวดลายที่สวยงาม จึงเป็นที่ต้องการของตลาดอย่างมาก (Sheehan, 2002) แต่กล้วยไม้ลูกผสมข้ามชนิดหรือข้ามสกุล ต้นที่ได้มักมีขนาดดอกเล็กลง แต่ขนาดต้นใหญ่ขึ้น และมักจะแสดงอาการเป็นหมัน คือ เมื่อนำไปผสมพันธุ์จะไม่ติดฝัก บางครั้งติดฝักแต่หลุดไป หรือฝักแก่แล้วไม่มีเมล็ด เป็นต้น เนื่องจากสายพันธุ์ของพ่อและแม่มีความแตกต่างกันของโครโมโซม จึงส่งผลให้โครโมโซมของลูกผสมไม่สามารถเข้าคู่กันได้ ดังนั้นจึงได้มีการชักนำให้เกิดการสร้างโครโมโซมเพิ่มขึ้นในลูกผสมเพื่อให้สามารถผสมพันธุ์กับต้นอื่น

และผลิตเมล็ดได้ (ระพี สาคริก, 2516) แต่กล้วยไม้เป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตช้า และมีอัตราการงอกของเมล็ดในสภาพธรรมชาติค่อนข้างต่ำ ส่งผลให้มีโอกาสที่จะได้ต้นที่มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมหรือการกลายพันธุ์ในธรรมชาติเป็นไปได้น้อย จึงต้องมีการใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์เข้ามาช่วยชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น (Arditti, 1977)

2.3 การกลายพันธุ์ในพืช

การกลายพันธุ์คือ การเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต อันเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของยีนจากสภาพหนึ่งไปเป็นอีกสภาพหนึ่ง เช่น ยีนเด่นอาจเปลี่ยนเป็นยีนด้อย หรือ ยีนด้อยเปลี่ยนเป็นยีนเด่น เรียกว่า การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) และยังรวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซมแบบต่าง ๆ เช่น การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน การสูญหาย หรือการเพิ่มเข้ามาของโครโมโซมที่ครอบคลุมมากกว่าหนึ่งยีนเรียกว่า การกลายพันธุ์ของโครโมโซม (chromosome mutation) (สิรนุช ลามศรีจันทร์, 2540) ซึ่งเกิดจากการที่ยีนและโครโมโซมได้รับการกระตุ้นจากสภาพแวดล้อม หรือสิ่งกระตุ้นภายนอก การเปลี่ยนแปลงสภาพของยีนที่ควบคุมลักษณะหนึ่ง ซึ่งอาจมียีนคู่เดียวหรือหลายคู่ หรือการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม ย่อมทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลักษณะนั้น อาจทำให้ได้ลักษณะใหม่ๆ ที่ดีกว่าเดิม โดยการกลายพันธุ์ของพืชนั้นแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. การกลายพันธุ์ของพืชที่เกิดตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเกิดขึ้นได้อย่างไร ซึ่งอาจเกิดจากสิ่งกระตุ้นที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น แสงอัลตราไวโอเลต รังสีต่าง ๆ ที่มีในธรรมชาติและสารเคมีต่าง ๆ ที่ปะปนอยู่ในสภาพแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงของยีนจากสื่อเหล่านี้ อาจมีเพียงเล็กน้อยและอัตราต่ำ แต่มีความสำคัญต่อวิวัฒนาการของพืชและในปัจจุบันนี้ มีการแนะนำว่า การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ อาจเกิดจากหน่วยชนิดหนึ่งเรียกว่า transposons ที่เคลื่อนที่ไปตามหรือระหว่างโครโมโซม เมื่อไปจับใกล้ยีนใดก็ทำให้ยีนนั้นเปลี่ยนสภาพได้ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550)

ปัจจัยที่ทำให้เกิดการกลายตามธรรมชาติของพืช

1. ปัจจัยภายในพืช

องค์ประกอบทางพันธุกรรมของพืช เป็นการกลายที่เกิดจากความผิดปกติภายในจีโนมของพืชเอง ส่วนใหญ่เกิดจากความผิดพลาดในการจำลองดีเอ็นเอ รีคอมบิเนชัน และการซ่อมแซม การขาดหรือการเพิ่มของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ทำให้พืชสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ผิดปกติ หรือเกิดจากปฏิกิริยาของ transposable element หรือ mutator gene (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554)

1.1 ภาวะทางสรีระของพืช อายุในทางสรีระ (physiological ageing) ของเมล็ดพืชมีผลต่อความถี่ของการกลายตามธรรมชาติ มีการปลูกเมล็ดพืชที่เก็บไว้เป็นเวลานาน เปรียบเทียบกับเมล็ดที่เพิ่งเก็บเกี่ยวมาใหม่ พบว่าต้นที่ได้จากเมล็ดที่เก็บไว้เป็นเวลานาน แม้จะเก็บในสภาพที่เหมาะสม มีการกลายตามธรรมชาติ หรือมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูงกว่าต้นที่เกิดจากเมล็ดใหม่ ทั้งนี้ในการเก็บเมล็ดไว้เป็นเวลานาน ๆ เมล็ดยังมีกระบวนการเมแทบอลิซึม ทำให้มีเมแทบอไลต์ และของเสียอื่นๆ เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยสารที่เกิดขึ้นเหล่านี้ อาจมีสมบัติเป็นสิ่งก่อการกลายขึ้นได้เองตามธรรมชาติ (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554)

1.2 สิ่งก่อการกลายในพืชที่เกิดเองตามธรรมชาติ กระบวนการเมแทบอลิซึมในพืช ทำให้ได้เมแทบอไลต์หลายชนิดที่เป็นสิ่งก่อการกลายได้แก่ สารที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบอะมีน กรดอะมิโน กรดที่ไม่มีไนโตรเจน แอลดิไฮด์ แอลคาลอยด์ ฟีนอล ควิโนน โทรโพโลน คูมาริน ผลผลิตที่เกิดจากการสลายตัวของกรดนิวคลิอิก สิ่งก่อการกลายที่เกิดขึ้นเองภายในพืช มีความสำคัญในวิวัฒนาการของพืชขั้นสูง ตามปกติพืชแต่ละชนิดสามารถคุ้มครองตัวเองจากสิ่งก่อการกลายที่สร้างขึ้นเองได้ โดยการแยกเอนไซม์และซับสเทรตออกจากกัน โดยจัดแยกไว้ในออร์แกเนลล์ต่างกัน หรือมีการควบคุมมิให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีเกิดขึ้น ยกเว้นเมื่อมีภาวะบางอย่างเกิดขึ้น เช่น ต้นมีบาดแผล ทำให้เอนไซม์ไปรวมตัวกับซับสเทรตได้ จึงก่อให้เกิดสารบางอย่างที่เป็นสิ่งก่อการกลายขึ้น (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554)

2. ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมหรือปัจจัยภายนอก

2.1 อาหาร การปลูกพืชในดินที่ขาดธาตุอาหารบางชนิด มีผลต่ออัตราการกลายตามธรรมชาติ ในปี ค.ศ. 1938 Stubb และ Doring ได้ทดลองปลูกต้นลิ้นมังกร ในดินที่ขาดฟอสฟอรัส ไนโตรเจน และกำมะถัน พบว่า ต้นลิ้นมังกรมีอัตราการกลายตามธรรมชาติสูงกว่ากลุ่มที่ปลูกในดินที่ไม่ขาดธาตุดังกล่าว (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554)

2.2 อุณหภูมิ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างกะทันหัน โดยเฉพาะการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น มีผลต่ออัตราการกลายในพืชมีการทดลองให้ความร้อนกับเมล็ดข้าวบาร์เลย์แล้วนำไปปลูกศึกษาความผิดปกติของโครโมโซม พบว่าต้นที่ได้จากเมล็ดที่ผ่านการให้ความร้อนมีความผิดปกติของโครโมโซมและการกลายสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับความร้อน (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554)

2.3 รังสีที่มีอยู่ในธรรมชาติ หลังจากที่ Muller ค้นพบว่ารังสีมีคุณสมบัติเป็นสิ่งก่อการกลายแล้ว จึงมีความคิดกันว่า รังสีที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติได้แก่ รังสีที่เกิดจากการสลายตัวของนิวไคลด์กำมันตรังสี เช่น ยูเรเนียม ทอเรียม รังสีคอสมิกจากนอกโลก ตลอดจนนิวไคลด์กัมมันตรังสีที่มนุษย์นำมาใช้ในด้านการแพทย์ เกษตร และอุตสาหกรรม น่าจะมีส่วนทำให้เกิดการกลายตามธรรมชาติได้ (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554)

2. การกลายพันธุ์ของพืชที่เกิดจากสิ่งกระตุ้น (induce mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจากการที่พืชได้รับสิ่งกระตุ้นการกลายพันธุ์ (mutagen) ซึ่งสิ่งกระตุ้นการกลายพันธุ์นั้นมี 2 ชนิดคือ

2.1 รังสี เป็นสิ่งที่เกิดจากสารกัมมันตภาพมีได้ 2 รูปคือ ในรูปอนุภาคหรือรูปมวล ได้แก่ รังสีแอลฟา รังสีบีตา และนิวตรอน และรังสีในรูปของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ได้แก่ รังสีเอ็กซ์ และรังสีแกมมา เมื่อพืชได้รับรังสีก็อาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้

2.2 สารเคมี มีสารเคมีหลายชนิดสามารถกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ ได้แก่

2.2.1 อัลไคเลติงเอเจนต์ (alkylating agent) คือสารเคมีพวกที่มีหมู่อัลคิล ซึ่งก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยการที่กลุ่มอัลคิลทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของดีเอ็นเอ ทั้งกับกลุ่มฟอสเฟต และกลุ่มเบสพวกไพริมีดีน จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน นอกจากนั้น ก็ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซมได้ด้วยเช่นกัน สารที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวางคือ Ethyl methanesulphonate (EMS) หรือบางครั้งเรียกว่า Radiomimetic substance ซึ่งให้ผลคล้ายกับรังสีอย่างมาก (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550)

2.2.2 สารเคมีที่มีโมเลกุลคล้ายเบส (base analogues) เป็นกลุ่มของสารเคมีที่มีโมเลกุลคล้ายเบสของดีเอ็นเอ จึงสามารถเข้าแทนที่เบสได้ และยังทำให้การแบ่งตัวของดีเอ็นเอเป็นไปตามปกติได้แก่ 5-BU และ 2-AP ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับไทมีน และอะเดนนีน ตามลำดับ สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในอัตราคงที่ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550)

2.2.3 อะคริดินส์ (acridine) สารเคมีในกลุ่มนี้ เป็นพวกสีย้อมได้แก่ proflavin, acriflavin, acridine orange และ ethidium bromide สารเคมีเหล่านี้ มีผลต่อดีเอ็นเอโดยตรง เช่น ethidium bromide ทำให้มีคู่เบสเพิ่มขึ้นหรือลดลง (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550)

2.2.4 สารเคมีอื่น ๆ มีอีกหลายชนิดที่ทำให้พืชกลายพันธุ์ เช่น โซเดียมเอไซด์ (sodium azide) มีประสิทธิภาพทำให้กลายพันธุ์สูง ทำให้เกิดการหักขาดของโครโมโซม (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550)

2.4 ชนิดของการกลายพันธุ์

จากการใช้รังสี แสง และสารเคมี เพื่อก่อให้เกิดการกลายพันธุ์นั้น อาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้หลายรูปแบบ ซึ่งแยกออกได้ ดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับยีนหลายยีน เพราะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง หรือจำนวนโครโมโซม สามารถแบ่งการกลายของโครโมโซมเป็น 2 ชนิด คือ การกลายเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม การกลายประเภทนี้

เป็นผลจากการแตกหักของโครโมโซม ซึ่งอาจเกิดเองได้ตามธรรมชาติหรือจากการเหนี่ยวนำ และการกลายเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554)

2. การเปลี่ยนแปลงของยีน การเปลี่ยนแปลงอาจเป็นสภาพข่มหรือสภาพด้อย การเปลี่ยนแปลงของยีนนี้อาจทำให้ปรากฏผลได้ 2 แบบ คือ

2.1 มาโครมิวตานต์ (macro mutant) หมายถึงการกลายพันธุ์ที่สามารถสังเกตได้ด้วยตา หรือสามารถแยกได้ด้วยวิธีการง่ายๆ หรือหากแยกไม่ได้ด้วยสายตา ก็อาจแยกได้ด้วยเทคนิคง่ายๆ

2.2 ไมโครมิวตานต์ (micro mutant) คือการกลายพันธุ์ที่มีค่าในเชิงปริมาณมากกว่าคุณภาพ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของยีนเป็นกลุ่ม ๆ สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคพิเศษ เช่น วิธีการทางสถิติเท่านั้น เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงโดยวิธีนี้ก็จะทำให้ความปรวนแปรของพืชชนิดนั้นเพิ่มขึ้นจากเดิม และเมื่อมีการคัดเลือกลักษณะใดๆ จากการกลายพันธุ์ อาจทำให้ลักษณะเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่ต้องการก็ได้ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550)

2.5 การนำพันธุ์กลายไปใช้ประโยชน์

เมื่อได้พันธุ์กลายจากการเหนี่ยวนำแล้ว สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ 2 ทาง คือ

1. การใช้ประโยชน์พันธุ์กลายโดยตรง พันธุ์กลายที่มีลักษณะดีตามวัตถุประสงค์ของการปรับปรุงพันธุ์ รวมทั้งลักษณะอื่น ๆ ซึ่งเป็นลักษณะเดิมยังคงดีอยู่ ก็สามารถนำไปใช้เป็นพันธุ์ใหม่ได้โดยตรง คือ นำมาขยายพันธุ์และส่งเสริมให้เป็นพันธุ์ปลูกสำหรับเกษตรกรได้ทันทีหลังจากที่ผ่านการทดสอบพันธุ์และรับรองพันธุ์ของหน่วยงานที่เกี่ยวข้องแล้ว

2. การใช้ประโยชน์พันธุ์กลายทางอ้อม พันธุ์กลายที่มีลักษณะน่าสนใจแต่ยังไม่ดีพอที่จะนำมาขยายพันธุ์และส่งเสริมเป็นพันธุ์ใหม่ได้โดยตรง เนื่องจากยังมีลักษณะที่ไม่ดีหรือลักษณะที่ไม่ต้องการร่วมอยู่ด้วย นักปรับปรุงพันธุ์พืช อาจนำพันธุ์กลายลักษณะเช่นนี้ไปใช้ในการผสมพันธุ์ เพื่อถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการจากพันธุ์กลายเข้าไปยังพืชที่ต้องการปรับปรุง ซึ่งยังขาดลักษณะนี้อยู่ (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554)

จากลักษณะที่กล่าวมาเรื่องการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชนั้น มีหลายสิ่งที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ แต่สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ได้มีการนำสารโคลชิซิน และรังสีแกมมามาใช้เป็นสิ่งก่อการกลายพันธุ์เพื่อชักนำให้ได้กล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่

2.6 การใช้สารโคลชิซินในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

สารโคลชิซิน (colchicine) มีชื่อเรียกตามระบบ IUPAC ว่า N-((7S)-5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzo(a)heptalen-7-yl)-acetamide มีสูตรเคมีคือ $C_{22}H_{25}NO_6$ เป็นสารอัล-

คาลอยด์ (Alkaloid) ที่สกัดได้จากเมล็ดและหัวของ *Colchicum autumnale* (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2541) สารนี้จะมีผลยับยั้งการสร้างสายดึงโครโมโซม (spindle fiber) หรือบังคับไม่ให้เส้นใยสายนี้ทำงานได้ตามปกติ ซึ่งส่งผลให้เส้นโครมาติด (chromatid) ของโครโมโซมอันหนึ่ง ๆ เข้าไปอยู่ในเซลล์เดียวกัน ทำให้การแบ่งเซลล์แบบไมโตซิส (mitosis) มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากเดิม 2 เท่า ดังนั้นถึงแม้ว่า mitosis จะเกิดปกติ แต่เซลล์และเนื้อเยื่อที่ได้จะเป็นโพลีพลอยด์ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550) จึงนิยมนำสารโคลชิซินมาใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถเคลื่อนย้ายไปตามส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยยังรักษารูปเดิม และสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เป็นเวลานาน ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับโครงสร้างของยีน และมีประสิทธิภาพสูง (นพพร สายัมพล, 2543) ทำให้มีการใช้ในกล้วยไม้ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของต้นและดอกไปในทางที่ดีขึ้น เช่น ลำต้นอวบใหญ่ ปล้องสั้นและต้นเตี้ยลง ใบกว้างหนาและมีสีเขียวเข้มขึ้น ทำให้มีการสังเคราะห์แสงสูงขึ้น ส่วนดอกจะออกดอกเร็วและมีขนาดใหญ่ขึ้น กลีบเลี้ยงและกลีบดอกเหลื่อมกัน มีความหนาและมีสีเข้มขึ้น อายุการบานของดอกนานกว่าต้นปกติ เพิ่มความต้านทานต่อโรคและแมลง นอกจากนี้ ยังช่วยลดความเป็นหมันของต้นลูกผสมได้ ทำให้สามารถนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ได้ โดยที่ยังมีพฤติกรรมเหมือนพันธุ์แท้ (ครรชิต ธรรมศิริ, 2550)

ชิ้นส่วนที่เหมาะสำหรับนำมาชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมคือ ชิ้นส่วนที่เซลล์กำลังมีการแบ่งตัว (ส่วนของเมล็ดหรือเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ) (Dhawan and Lavama, 1996) ส่วนความเข้มข้นของโคลชิซินนิยมใช้ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.0006 ถึง 3.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงขึ้นไป หากความเข้มข้นมากหรือระยะเวลานานเกินไปจะทำให้เซลล์พืชตายได้ (Dermen, 1940) อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นและช่วงเวลาในการใช้สารโคล-ชิซินขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของกล้วยไม้ซึ่งมีความแตกต่างกัน เช่น ในกล้วยไม้ *Cattleya intermedia* L. Silva et al. (2000) ได้ศึกษาในโปรโตคอร์ม พบว่า ระดับความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดต้นที่เป็นมิกซ์พลอยด์ (mixoploids) และเตตระพลอยด์ (tetraploids) ได้โดยมีผลทำให้พื้นที่ปากใบและความหนาแน่นของปากใบเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับต้นปกติและยังมีรายงานของ Sarathum et al. (2010) ที่ได้ศึกษาในโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องแซะหอม พบว่าสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลานาน 14 วัน เหมาะสมที่สุด โดยโปรโตคอร์มมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 36.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมโดยวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดต้นโพลีพลอยด์ได้ 58.33 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าต้นโพลีพลอยด์ที่ได้มีลักษณะแตกต่างจากต้นดิพลอยด์คือ มีลำต้นและใบขนาดใหญ่กว่า แต่มีความสูงของต้นและความยาวของใบน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ เช่นเดียวกัน Chaicharoen and Saejew (1980) ได้ศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ลักษณะทางสัณฐาน

วิทยาของใบและดอก และการงอกของละอองเรณูของดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ใน *Dendrobium phalaenopsis* ที่ได้จากการนำโปรโตคอร์มแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 9 วัน พบว่า เป็นเตตระพลอยด์ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ การเจริญของต้นเตตระพลอยด์ช้ากว่าของดิพลอยด์ ใบของต้นเตตระพลอยด์หนากว่าและขนาดของเซลล์คุมใหญ่กว่าพวกดิพลอยด์ ดอกของเตตระพลอยด์กลมกว่า การแบ่งตัวของ microsporocyte ของดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ส่วนใหญ่จะปกติ ส่วนการงอกของละอองเรณูของดิพลอยด์ดีกว่าของเตตระพลอยด์มาก และ Kim et al. (1997) ได้มีการศึกษาในกล้วยไม้ *Cymbidium* sp. silky พบว่า ความเข้มข้นของโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โปรโตคอร์มตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ดีที่สุด ต้นที่ได้มีจำนวนโครโมโซมเป็นทั้งเตตระพลอยด์ และทริปพลอยด์ และพบว่าระยะเวลาที่ได้รับสารละลายโคลชิซินไม่มีผลแตกต่างกันต่อการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม แต่มีผลต่ออัตราการตายของโปรโตคอร์ม ต้นดิพลอยด์ มีความแตกต่างจากต้นเตตระพลอยด์ และทริปพลอยด์ในด้านรูปร่างของใบและความยาวใบ การศึกษาในกล้วยไม้ฟ้ามุ่ยของพรพิมล ธัญญสนธิ (2538) พบว่า protocorm-like bodies (PLBs) ที่ได้รับสารโคลชิซินเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 14 วันสามารถเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นต้นเตตระพลอยด์ได้มากที่สุดถึง 8 ต้น จาก 14 ต้น คิดเป็น 57 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาของสุลาวัลย์ มหาหิงส์ และสุมนทิพย์ บุนนาค (2551) ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) พบว่า ต้นที่ไม่ได้รับการชักนำมีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 38 ส่วนต้นที่ถูกชักนำด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีจำนวนโครโมโซม 2n = 4x = 76 ยืนยันระดับพลอยดี โดยการตรวจสอบใบกล้วยไม้ม้าวิ่งด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี ต้นที่เป็นเตตระพลอยด์มีความยาวของเซลล์คุมเพิ่มขึ้น และสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้ม้าวิ่ง ส่วนระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงโปรโตคอร์มในสารละลายโคลชิซินคือ 72 ชั่วโมง และ Griesbach (1981) ได้ศึกษาในโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส 3 ชนิดคือ *Phalaenopsis equestris*, *P.fasciata*, *P.*Betty Hauserman พบว่า กรรมวิธีที่ให้สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้ 50 เปอร์เซ็นต์ที่ประกอบด้วยต้นเตตระพลอยด์และออคตาพลอยด์ (octaploids) 46 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ต้นที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยสารละลายโคลชิซิน มีการปลดปล่อยสารประกอบฟีโนลิค (phenolic compound) ในอาหาร จึงต้องทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2–3 สัปดาห์ ต้นมีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นดิพลอยด์ แล้วยังพบว่า ต้นเตตระพลอยด์ในสภาพธรรมชาติสามารถออกดอกได้หลังเพาะเมล็ดนาน 3 ปี แต่ต้นเตตระพลอยด์ที่ได้จากการชักนำสามารถออกดอกได้หลังเพาะเมล็ดนาน 5 ปี สำหรับการทดลองของมลวิภา โสมานันท์ (2521) ในการศึกษา protocorm - like bodies กล้วยไม้ลูกผสมสกุลอะแรนดา (*Aranda*) พบว่า การใช้โคลชิซินเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 9 วัน

และ protocorm-like bodies กล้วยไม้ลูกผสมสกุลอะแรคนิส (*Arachnis*) 1 ชนิด โดยใช้ความเข้มข้นของโคลชิซินเหมือนกันแต่ใช้เวลาเพียง 3 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่ออะแรนดาค่อนข้างน้อยประมาณ 1-15 เปอร์เซ็นต์ แต่อะแรคนิสตายมากกว่าคือ 90-97 เปอร์เซ็นต์ และผลจากการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบต้นที่เป็นเตตระพลอยด์ และเกือบเป็นเตตระพลอยด์ 135 ต้น เป็นมิกซ์พลอยด์ 2 ต้น เป็นดิพพลอยด์ 66 ต้น จากต้นกล้วยไม้ทั้งหมด 203 ต้น และผลทางด้านความกว้าง และความยาวของเซลล์คุมไม่มีความแตกต่างกัน ลักษณะทั่วไปของต้นดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างได้ชัดเจน สำหรับกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย Sanguthai et al. (1973) พบว่า การใช้โคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5, 7 และ 10 วัน สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นเตตระพลอยด์ได้ นอกจากนี้ ยังมีการใช้สารโคลชิซินกับต้นอ่อนกล้วยไม้ดินหมูกลิ้ง (*Eulophia andamanensis* Reichb.f.) พบว่า ต้นอ่อนที่ได้รับโคลชิซิน 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 4 และ 6 ชั่วโมง จะมีการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีเป็นเตตระพลอยด์ (2n=4x) ได้จำนวนถึง 2 ต้นจาก 6 ต้น คิดเป็น 33.33 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้นอื่นไม่สามารถชักนำให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีได้ และต้นเตตระพลอยด์นี้ จะมีสัณฐานวิทยาต่างไปจากต้นปกติคือ ต้นเตี้ย ใบหนา ลำต้นกว้าง ปากใบใหญ่ เซลล์คุมหนา มีจำนวนปากใบต่อตารางไมโครเมตรน้อย (Chinachit and Sreemaung, 2008)

2.7 การใช้รังสีแกมมาในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

รังสี เป็นพลังงานรูปหนึ่งที่ปล่อยออกมาจากแหล่งกำเนิด สามารถเคลื่อนที่ทะลุทะลวงผ่านวัตถุต่าง ๆ ที่เป็นตัวกลางได้ โดยมีการถ่ายเทพลังงานให้กับวัตถุที่ผ่าน อาจอยู่ในรูปของคลื่นหรือลำของอนุภาคเล็ก ๆ ก็ได้ และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของวัตถุนั้น ๆ มีการแบ่งรังสีออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. รังสีชนิดไม่ก่อให้เกิดไอออน (non-ionizing radiation) คือรังสีที่มีพลังงานต่ำเมื่อผ่านเข้าไปในตัวกลางใด ๆ จะไม่สามารถทำให้ตัวกลางนั้นแตกตัวเป็นไอออน (ionization) เนื่องจากมีพลังงานไม่มากพอ ที่จะผลักอิเล็กตรอนให้หลุดออกจากอะตอมได้ ซึ่งได้แก่ คลื่นแสง คลื่นใต้แดง คลื่นไมโครเวฟ คลื่นวิทยุ คลื่นเสียง เป็นต้น

2. รังสีชนิดก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) คือรังสีที่มีพลังงานสูงอยู่ในช่วง keV-MeV เมื่อรังสีชนิดนี้ผ่านเข้าไปในตัวกลางใด ๆ จะทำให้อะตอมของตัวกลางนั้นแตกตัวเป็นไอออน โดยที่พลังงานจากรังสีสามารถผลักให้อิเล็กตรอนในอะตอมของตัวกลาง หลุดออกจากอะตอม เกิดเป็นคู่ไอออน (ion pair) ซึ่งประกอบด้วย อิเล็กตรอนอิสระที่มีประจุลบและไอออนบวกซึ่งเป็นอะตอมที่ขาดอิเล็กตรอน ดังนั้นรังสีชนิดนี้เป็นรังสีที่ให้ผลดี และนำมาใช้ประโยชน์ในการเหนี่ยวนำให้พืชกลายพันธุ์ ตัวอย่างรังสีชนิดที่มีพลังงานสูง เช่น รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา รังสีคอสมิก

หรืออนุภาคที่มีพลังงานสูง เช่น อนุภาคแอลฟา บีตา อิเล็กตรอน โปรตอน และนิวตรอน เป็นต้น (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554) ในบรรดารังสีก่อให้เกิดไอออนนั้น รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา รังสีนิวตรอน มีความนิยมนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้พืชกลายพันธุ์มากกว่าอนุภาคแอลฟา บีตา หรือโปรตอน

รังสีแกมมา เป็นรังสีประเภทคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า เกิดจากการสลายตัวของนิวเคลียสของเรดิโอนิวไคลด์ ซึ่งในกระบวนการนี้เกิดสภาพไม่เสถียร (unstable) จึงมีการปรับตัวให้เข้าสู่สภาพเสถียร โดยปลดปล่อยพลังงานส่วนเกินออกมาในรูปรังสีแอลฟา บีตา และแกมมา เรดิโอนิวไคลด์ที่นิยมใช้เพื่อให้รังสีแกมมา คือโคบอลท์-60 (Cobalt-60) และซีเซียม-137 (Cesium-137) (สิรนุช ลามศรีจันทร์, 2540; Taji et al., 2001) ซึ่งการฉายรังสีในพืชสามารถทำได้ 2 แบบ คือ

1) แบบเฉียบพลัน (acute irradiation) เป็นการฉายรังสีปริมาณสูง ๆ และใช้เวลาสั้น เพื่อไม่ให้พืช หรือชิ้นส่วนของพืชมีโอกาสซ่อมแซมความเสียหายในช่วงที่ได้รับรังสี ทำให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์ค่อนข้างสูง

2) แบบเรื้อรัง (chronic irradiation) เป็นการฉายรังสีปริมาณน้อยแต่ช่วงระยะเวลาในการที่ได้รับรังสีนานออกไป เพื่อให้ทุกระยะของการเจริญเติบโตหรือการแบ่งเซลล์ได้รับรังสี ทำให้เกิดความเสียหายน้อยกว่าการได้รับแบบเฉียบพลันในกรณีที่ได้รับปริมาณรังสีเท่ากัน (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2550)

เมื่อเซลล์พืชได้รับรังสี จะส่งผลให้มีการถ่ายพลังงานให้กับโมเลกุลต่าง ๆ ของเซลล์ ทำให้โมเลกุลที่ได้รับพลังงานแตกตัวเป็นไอออน และฟรีเรดิคอล (free radical) ต่าง ๆ มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลใหม่ และมีการทำปฏิกิริยาเคมีระหว่างกัน เกิดเป็นโมเลกุลที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างไปจากเดิม เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ จะส่งผลกระทบต่อเซลล์ที่มีโมเลกุลนี้ทำหน้าที่อยู่ ซึ่งถ้าไม่รุนแรงมากและเซลล์ยังมีชีวิตอยู่ แต่ความสามารถในการแบ่งเซลล์อาจเปลี่ยนแปลงไป เช่น เกิดความล่าช้าในการเข้าสู่การแบ่งเซลล์ เกิดการเปลี่ยนแปลงในสารพันธุกรรมที่สามารถส่งต่อไปยังลูกหลานได้ เรียกว่า เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งถ้ารุนแรงมากจะทำให้ทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวได้และตายในที่สุด (สิรนุช ลามศรีจันทร์, 2540)

การใช้รังสีแกมมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งพันธุ์กลายที่ได้อาจมีลักษณะที่ต้องการได้ เช่น ลักษณะทรงต้น รูปแบบการด่าง รูปร่างของใบและดอก สีดอกที่แตกต่างออกไปจากเดิม การชักนำนี้ สามารถย่นระยะเวลาและประหยัดค่าใช้จ่าย เมื่อเปรียบเทียบกับการปรับปรุงพันธุ์วิธีอื่น (Harten, 1998) แต่เนื่องจากการฉายรังสีนั้น ต้องใช้ต้นพืชจำนวนมาก จึงนำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ร่วมด้วย ทำให้สามารถป้องกันการสูญเสียลักษณะที่กลาย และสามารถแยกเอาส่วนที่กลายพันธุ์ออกมาพัฒนาให้เป็นต้นพืชที่แสดงลักษณะพันธุ์กลายออกมาทั้งต้น เป็นการช่วยแก้ปัญหาไคเมอราและการสูญหายไปของส่วนที่กลายพันธุ์ (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2539) หากต้นที่ได้จากการกลายพันธุ์เป็นลักษณะที่ดีก็สามารถใช้เป็นพันธุ์ใหม่ได้ซึ่งการใช้รังสีแกมมาเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการ

กลายพันธุ์ในกล้วยไม้นั้นมีอยู่บ้าง เช่น การทดลองของ Harn (1970) ซึ่งศึกษาการฉายรังสีแกมมาต่อโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลซิมบิเดียม พบว่าการใช้โปรโตคอร์มทั้งก้อน เพื่อเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ ให้ผลดีกว่าการฝานเป็นแผ่นบาง และโปรโตคอร์มที่มีอายุมากสามารถทนต่อรังสีได้มากกว่าโปรโตคอร์มที่มีอายุน้อย ส่วนปริมาณรังสีที่เหมาะสำหรับการเหนี่ยวนำ คือ 30-40 เกรย์ และยังมีการศึกษาของ Mazuder and Bhowmik (1997) ที่ได้ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อเมล็ดและโปรโตคอร์มของ *Spathoglottis plicata* Bl. ในช่วงปริมาณรังสี 20-160 เกรย์ และ 5-55 เกรย์ ตามลำดับ พบว่าเมล็ดของ *Spathoglottis plicata* Bl. มีการตายเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณรังสีสูงขึ้น และจะตายทั้งหมด เมื่อมีปริมาณรังสีเกินกว่า 60 เกรย์ ส่วนในโปรโตคอร์มมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ความสูงของต้น ความยาวของใบและรากลดลง เมื่อได้รับปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น และมีค่า LD_{50} ที่ปริมาณรังสีเท่ากับ 30 เกรย์ และการทดลองของ Thammasiri (1998) ได้ศึกษาการฉายรังสีแกมมาต่อโปรโตคอร์มของกล้วยไม้แคทลียาพันธุ์แอลมาคี (*Brassolaeliocattleya* Alma Kee) และพันธุ์กรีนวิช (*Brassolaeliocattleya* Greenwich) ที่ปริมาณรังสี 0, 20, 60, 80, 110 และ 130 เกรย์ พบว่าปริมาณรังสีระหว่าง 80 กับ 110 เกรย์ เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ ดังนั้นจึงได้ทดลองอีกครั้งโดยใช้จำนวนโปรโตคอร์มเพิ่มขึ้นและใช้ปริมาณรังสีที่ 0, 70, 100 และ 130 เกรย์ ผลปรากฏว่า การฉายรังสีทำให้การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ช้าลง บางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย ผลยิ่งรุนแรงขึ้นเมื่อใช้ปริมาณรังสีที่สูงขึ้น และพบว่าปริมาณรังสีที่ระดับ 70 เกรย์ เหมาะสำหรับการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ทั้ง 2 พันธุ์ และมีการทดลองของ ธนะ กุลมุติวัฒน์ และคณะ (2548) ที่ได้ศึกษาใน protocorm - like bodies ของกล้วยไม้ *Dendrobium* Sonia Earsakul มีการฉายรังสีทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง พบว่าต้นกล้าอายุ 10 เดือนที่ผ่านการฉายรังสีแบบเฉียบพลันปริมาณ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 เกรย์ มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนต้นกล้าที่ได้รับรังสีแบบเฉียบพลัน ปริมาณ 20, 40, 60, 80 และ 100 เกรย์ และต้นกล้าที่ได้รับรังสีแบบโครนิกปริมาณ 400 และ 800 เกรย์ มีการเจริญเติบโตลดลงตามปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้น ยังมีการศึกษาของ Yasugi et al. (1991) ใน PLBs ของ *Cymbidium* Kenny Wine Color ที่ได้รับรังสีแกมมามีค่า $LD_{50(30)}$ เท่ากับ 2,100 เกรย์ และยังพบลักษณะที่แตกต่างไปจากต้นปกติคือ ต้นมีจุดแต้มบนใบ ซึ่งพบในการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ นอกจากการใช้โปรโตคอร์มเพื่อใช้เหนี่ยวนำให้เกิดการการพันธุ์แล้ว ยังมีการใช้ต้นอ่อนมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น การศึกษาของ Vajrabhaya (1977) พบว่า การเหนี่ยวนำของรังสีแกมมาที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของต้นกล้วยไม้สกุลหวายที่มีความสูง 2-2.5 เซนติเมตร คือ ปริมาณรังสี 50 เกรย์ และ Yasugi et al. (1991) ได้ทำการศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีต่อต้นกล้าขนาดเล็กและขนาดใหญ่ของ *Dendrobium* Malones Hope พบว่ามีค่า $LD_{50(30)}$ ที่ปริมาณรังสีเท่ากับ 1,750 เกรย์ และ 2,075 เกรย์ ตามลำดับ และการทดลองของ Ariffin and Basiran (2002) ที่ได้ศึกษาลักษณะรูปร่าง

และสีดอกของ *Dendrobium* Sonia ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 35 เกรย์ ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ขนาดดอกมีขนาดใหญ่กว่าดอกปกติ 20 เปอร์เซ็นต์ ไปจนถึงขนาดที่เล็กกว่าปกติ 30 เปอร์เซ็นต์ และยังพบความแปรปรวนของช่วงสีม่วงบริเวณกลีบดอก นอกจากนี้แล้วยังพบลักษณะดอกสีขาวทั้งดอกและดอกที่มีกลิ่นหอมด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 ศึกษาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่าง ๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis*

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1) ก้านช่อดอกของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis*
2) ตู้กรองอากาศสำหรับถ่ายขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
3) ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพร้อมชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ
4) เครื่องเขย่า ความเร็ว 100 รอบต่อนาที
5) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
6) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
7) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
8) หม้อนึ่งความดันไอ
9) ขวดแก้วปากกว้างขนาด 4 และ 8 ออนซ์
10) ปิเปต
11) บีกเกอร์
12) กระบอกวัดปริมาตร
13) กรวยแก้ว
14) จานเพาะเลี้ยง (petri dish)
15) ช้อนตักสาร
16) ขวดใส่สารละลายเข้มข้น
17) วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ได้แก่ ด้ามมีดผ่าตัด เบอร์ 4 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 24 ปากคีบ (forceps) ตะเกียงแอลกอฮอล์ ไฟแช็ค ชั้นวางอุปกรณ์ต่าง ๆ
18) แผ่นป้ายสติ๊กเกอร์สำหรับเขียนกรรมวิธีและวันที่ทดลอง

3.1.2 สารเคมี

1) คลอร็อกซ์ และทวีน 20 สำหรับใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อก้านช่อดอก
2) เอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3) สารเคมีที่ใช้ในสูตร VW (Vacine and Went, 1949)

4) น้ำมะพร้าวที่ผ่านการกรองแล้ว

5) มันฝรั่ง

6) ผงถ่านกัมมันต์

7) ผงวุ้น

8) กล้วยหอม

9) น้ำตาลทราย

10) benzylaminopurine (BAP)

11) สารโคลชิซิน 0.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมสารละลายเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

12) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 1 นอร์มอล

13) ไฮโดรคลอกริก (hydrochloric acid) 1 นอร์มอล

14) น้ำกลั่น

3.1.3 สถานที่ทำการทดลอง

1) อาคารปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2) ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (F3) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3) โรงเรือนเลี้ยงกล้วยไม้ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.1.4 วิธีการทดลอง

1) ทำการเลือกก้านช่อดอกของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ตาดอกยังไม่พัฒนาจนยืดยาว นำมาถูล้างน้ำผสมสบู่ แล้วเช็ดทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ให้ทั่ว จากนั้น แกะกาบหุ้มข้อออก และตัดแบ่งเป็นท่อนให้มีตาดอกท่อนละ 3-4 ตาดอก ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยใช้ คลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผสมทวีน 20 เขย่านาน 10 นาที และใช้คลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผสมทวีน 20 เขย่านาน 15 นาที เพื่อทำการฆ่าเชื้ออีกครั้งหนึ่ง จากนั้นล้างในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

2) นำก้านช่อดอกที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วมาตัดเป็นท่อนแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งดัดแปลงสูตร VW ที่เติมฮอร์โมน BAP 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Lin, 1986) จากนั้นนำไปวางในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 40 $\mu mol/m^2s^1$ ทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์

3) หลังเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกเป็นเวลา 6 เดือน เกิดเป็นโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่มีสีเขียว ทำการคัดเลือกโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่มีขนาดใกล้เคียงกันขนาดความยาว 2-3 มิลลิเมตร และซับให้แห้งด้วยผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อ แล้วย้ายลงไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW (Vacine and

Went, 1949) ที่มีสารละลายโคลชิซินเป็นส่วนประกอบ

4) ทำการเตรียมสารละลายโคลชิซิน โดยละลายผงโคลชิซิน 0.25 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมสารละลายเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อก่อนใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงโดยการกรองด้วยแผ่นกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร

5) มีการวางแผนการทดลองแบบ factorial ใน CRD มีทั้งหมด 16 ตำรับการทดลอง ๆ ละ 7 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำใช้ 10 โปรโตคอร์ม ดังนั้นต้องใช้โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ทั้งหมด 1,120 โปรโต-คอร์ม โดยมีการศึกษา 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 0, 0.05, 0.075 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินที่ต่างกัน 4 ระดับ คือ 1, 3, 5 และ 7 วัน จากนั้นปิดฝาขวดนำไปวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 40 $\mu mol/m^2s^1$

6) เมื่อครบกำหนดของแต่ละตำรับการทดลอง ทำการเปลี่ยนย้ายโปรโตคอร์มไลค์-บอดี้ลงในอาหารใหม่ที่ไม่เติมสารโคลชิซิน โดยใช้ช้อนด้ามยาวตักโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ใส่ลงในขวดที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และล้างให้สะอาด 3 ครั้ง และซับด้วยผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้ง ใช้ปากคีบด้ามยาวคีบโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ลงในขวดปากกว้างที่บรรจุอาหารแข็งดัดแปลงสูตร VW (1949) ที่เติมกล้วยหอมบด 100 กรัม มันฝรั่งบด 50 กรัม และผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัม ต่ออาหารปริมาณ 1 ลิตร แล้วปิดปากขวดให้แน่น นำไปวางในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 40 $\mu mol/m^2s^1$ ทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 1 เดือน เพื่อชักนำให้เป็นต้นอ่อนที่มีรากและมีใบจริง 3-4 ใบแล้วจึงย้ายออกปลูก

3.2 ศึกษาผลของการฉายรังสีแกมมาแบบโครนิกต่อกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis*

3.2.1 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่มีห้องฉายรังสีแกมมา (Gamma Room) ซึ่งมีโคบอลท์-60 เป็นต้นกำเนิดรังสีใช้ในการฉายรังสีแบบเรื้อรัง (chronic irradiation) ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2.2 สถานที่ทำการทดลอง

1) อาคารปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2) ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (F3) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3) ห้องฉายรังสีแกมมา ที่มีโคบอลท์-60 เป็นต้นกำเนิดรังสีใช้ในการฉายแบบโครนิก ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4) โรงเรือนเลี้ยงกล้วยไม้ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2.3 วิธีการทดลอง

1) ทำการเลือกก้านช่อดอกที่ตาดอกยังไม่พัฒนา จนยืดยาวของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* มาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ หลังเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกเป็นเวลา 6 เดือน เกิดเป็นโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่มีสีเขียว ทำการคัดเลือกโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่มีขนาดใกล้เคียงกันขนาดความยาว 2-3 มิลลิเมตร จากนั้น นำโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งดัดแปลงสูตร VW (1949) ที่เติมกล้วยหอมบด 100 กรัม มันฝรั่งบด 50 กรัม และผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัม ต่ออาหารปริมาณ 1 ลิตร

2) นำโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงไว้ไปฉายรังสีแกมมาแบบโครนิกโดยมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ตำรับการทดลองคือ แบ่งตามการฉายรังสีในปริมาณที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ดังนี้ 0, 50, 100, 150 และ 200 เกรย์ ตำรับการทดลองละ 7 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำใช้ 15 โปรโตคอร์ม ดังนั้น ต้องใช้โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ทั้งหมด 525 โปรโตคอร์ม

3) เมื่อทำการฉายรังสีเสร็จแล้วนำโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม ในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 40 $\mu mol/m^2s^1$ และมีการเปลี่ยนอาหารทุกๆ เดือน แล้วทำการชักนำให้เกิดเป็นต้น เมื่อได้ต้นที่สมบูรณ์มีใบ 3-4 ใบ แล้วจึงนำออกปลูกภายในโรงเรือน

การบันทึกลักษณะ

1) บันทึกอัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้หลังจากการได้รับสารโคลชิซินภายในเวลา 1 เดือน

2) บันทึกจำนวนใบ ความยาวและความกว้างของใบ จำนวนราก ความยาวราก และน้ำหนักสด โดยการสุ่มตัวอย่างตำรับการทดลองละ 7 ซ้ำ ๆ ละ 3 ต้น มาวัดลักษณะต่าง ๆ หลังจากนำออกจากขวดเพาะเลี้ยง

3) บันทึกความหนาแน่นของปากใบ โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Cramer (1999) ดังนี้

3.1 นำต้นกล้วยไม้ที่ได้จากตำรับการทดลอง ๆ ละ 7 ซ้ำ ๆ ละ 3 ต้น มาตัดใบที่ 3 นับจากยอด (นับใบยอดเป็นใบแรกเมื่อมีความยาวมากกว่า 0.5 มิลลิเมตร) ของต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการทดลอง ทำการลอกผิวใบด้านล่างของต้นกล้วยไม้ที่ได้ จากนั้นย้อมด้วยสี safranin เพื่อนำมาเตรียมสไลด์ชั่วคราว ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2 นำสไลด์ที่ทำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 100x

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

3.4 คำนวณหาความหนาแน่นของปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร โดยใช้สูตร

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

4) บันทึกความยาวของปากใบ โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Przywara et al. (1999) ดังนี้

4.1 เตรียมสไลด์เช่นเดียวกับการหาความหนาแน่นปากใบ จากนั้นนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

4.2 วัดความยาวของปากใบจำนวน 20 เซลล์ต่อหนึ่งใบ จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ยต่อต้น

5) บันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางราก และความหนาของใบ โดยการเฉือนใบและรากเป็นชิ้นบางๆ แล้วย้อมด้วยสี safranin จากนั้นนำมาเตรียมสไลด์ชั่วคราว ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรากและความหนาของใบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

6) ศึกษาปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* ที่ได้จากการทดลอง โดยใช้เครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ (FACSCalibur: Becton Dickinson) ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทำการตรวจปริมาณดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ที่ได้จากตำรับการทดลองๆ ละ 7 ซ้ำๆ ละ 3 ต้น โดยดัดแปลงวิธีการมาจาก Otto (1990) ดังนี้

6.1 เลือกใบที่แผ่ขยายเต็มที่ใบที่ 2 นับจากยอด มีน้ำหนักประมาณ 20-30 มิลลิกรัม จากนั้นนำมาตัดด้วยใบมีดผ่าตัดในสารละลาย Otto I ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M citric acid, 0.5 % (v/v) Tween 20 แล้วนำไปกรองผ่านตะแกรงไนลอนขนาด 42 ไมโครเมตร หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำมาดูดน้ำใสที่อยู่ส่วนบนของหลอดปริมาณ 200 ไมโครลิตร

6.2 นำน้ำใสที่อยู่ส่วนบนของหลอดมาผสมกับสารละลาย Otto II ซึ่งประกอบด้วย 0.4 M Na_2HPO_4 ที่มี RNase 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ propidium iodide 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมอยู่ด้วย ปริมาณ 400 ไมโครลิตร จากนั้นนำมากรองผ่านตะแกรงไนลอนขนาด 42 ไมโครเมตร

6.3 นำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ FACSCalibur Becton Dickinson ซึ่งมีแหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์จากอาร์กอน (argon ion laser) ที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร โดยการใช้โปรแกรม CellQuest ทำการนับจำนวนนิวเคลียสของกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* ที่ได้จากการทดลอง 10,000 นิวเคลียสต่อตัวอย่าง และใช้ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน และรังสีแกมมาเป็นฮิสโทแกรมมาตราฐานในการชี้วัดจำนวนชุดโครโมโซม ซึ่งเครื่องแสดงจำนวนนิวเคลียสในแกน Y และปริมาณดีเอ็นเอในแนวแกน X ของฮิสโทรแกรม (Becton Dickinson Co., Ltd., 1996)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์วาเรียนซ์โดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows Version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006) พร้อมเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New multiple Range Test (DMRT) ซึ่งลักษณะที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ จำนวนใบ ความยาว ความกว้างและความหนาของใบ จำนวนราก ความยาว และเส้นผ่านศูนย์กลางราก น้ำหนักสด ความหนาแน่นของปากใบ และปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารโคลชิซิน และปริมาณรังสีแกมมาที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ จำนวนใบ ความยาว ความกว้างและความหนาของใบ จำนวนราก ความยาวและเส้นผ่านศูนย์กลางราก น้ำหนักสด ความหนาแน่นของปากใบ และปริมาณดีเอ็นเอ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล และการอภิปรายผล

4.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่าง ๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis*

4.1.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ

จากผลการทดลองเลี้ยงโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ในอาหารเหลวสูตร VW ที่มีการเติมสารโคลชิซินในระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.075 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน เมื่อครบระยะเวลาแล้วจึงย้ายโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เลี้ยงบนอาหารแข็งดัดแปลงสูตร VW ที่เติมกล้วยหอมบด 100 กรัม มันฝรั่งบด 50 กรัม และผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัม ต่ออาหารปริมาณ 1 ลิตร หลังจากนั้นจะสังเกตเห็นลักษณะของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง และสีน้ำตาลจนตายในที่สุด เมื่อครบ 4 สัปดาห์ ทำการบันทึกจำนวนโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่มีชีวิต พบว่าความเข้มข้นที่ได้รับสารโคลชิซินมีผลต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ โดยโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่แช่ในอาหารที่ไม่มีสารโคลชิซิน มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้สูงที่สุด คือ 97.14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่แช่ในอาหารที่มีสารโคลชิซินในทุกความเข้มข้น ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินก็มีผลต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เช่นกัน โดยการแช่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้เป็นระยะเวลา 1 วัน มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้สูงที่สุดคือ 68.10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางผนวกที่ 1) นอกจากนี้ยังพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารโคลชิซิน โดยการแช่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ในอาหารที่ไม่มีสารโคลชิซิน เป็นระยะเวลา 1 วัน มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้สูงที่สุด คือ 98.10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกับโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่แช่ในอาหารที่มีสารโคลชิซินทุกความเข้มข้นในทุกระยะเวลา ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ในสัปดาห์ที่ 4 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน (% w/v)	**ระยะเวลา (วัน)**	**เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้[1/]**
0	1	98.10 a
	3	97.14 a
	5	96.19 a
	7	97.14 a
0.05	1	75.24 b
	3	62.86 c
	5	51.43 d
	7	41.90 e
0.075	1	58.10 c
	3	50.48 d
	5	47.62 d
	7	34.29 f
0.1	1	40.95 e
	3	25.71 g
	5	12.38 h
	7	4.76 i
F-test		**
CV. (%)		9.06

[1/]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธีวิเคราะห์แบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.1.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ

จากผลการทดลองนำโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* แช่สารละลายโคลชิซินในระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.075 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร VW ที่เติมกล้วยหอมบด 100 กรัม มันฝรั่งบด 50 กรัม และผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัม ต่ออาหารปริมาณ 1 ลิตร และเมื่อเลี้ยงจนเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนที่มีอายุประมาณ 10 เดือน จึงนำมาบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้ผลดังนี้

น้ำหนักสด จากผลการชั่งน้ำหนักต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซิน พบว่าความเข้มข้นสารโคลชิซินมีผลต่อน้ำหนักสดของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินมีน้ำหนักสดสูงที่สุด คือ 1.789 กรัม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินในทุกความเข้มข้น ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินก็มีผลต่อน้ำหนักสดเช่นกัน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้เป็นระยะเวลา 1 วัน มีน้ำหนักสดสูงที่สุด คือ 1.247 กรัม (ตารางผนวกที่ 2) นอกจากนี้ ยังพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่จากการแช่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ในอาหารที่ไม่มีสารโคลชิซิน เป็นระยะเวลา 3 วัน มีน้ำหนักสดสูงที่สุด คือ 1.803 กรัม ซึ่งแตกต่างกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินทุกความเข้มข้นในทุกระยะเวลา (ตารางที่ 2 และรูปที่ 1)

จำนวนใบ จากผลการนับจำนวนใบของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซิน พบว่าความเข้มข้นสารโคลชิซินมีผลต่อจำนวนใบเฉลี่ยของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินมีจำนวนใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 4.62 ใบต่อต้น ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินในทุกความเข้มข้น ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินไม่มีผลต่อจำนวนใบเฉลี่ย (ตารางผนวกที่ 3) อย่างไรก็ตามต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มไลค์-บอดี้ในอาหารที่ไม่มีสารโคลชิซิน เป็นระยะเวลา 1 วัน มีจำนวนใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 4.67 ใบต่อต้น ซึ่งแตกต่างกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินทุกความเข้มข้นในทุกระยะเวลา (ตารางที่ 2 และรูปที่ 1)

ความยาวใบ จากผลการวัดความยาวใบของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซิน พบว่าความเข้มข้นสารโคลชิซินมีผลต่อความยาวใบเฉลี่ยของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับ

สารโคลชิซินมีความยาวใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 39.22 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินในทุกความเข้มข้น ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินก็มีผลต่อความยาวใบเฉลี่ยเช่นกัน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้เป็นระยะเวลา 1 วัน มีความยาวใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 33.43 มิลลิเมตร (ตารางผนวกที่ 4) นอกจากนี้ ยังพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่จากการแช่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ในอาหารที่ไม่มีสารโคลชิซิน เป็นระยะเวลา 3 วัน มีความยาวใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 39.39 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินทุกความเข้มข้นในทุกระยะเวลา (ตารางที่ 2 และรูปที่ 1)

ความกว้างใบ จากผลการวัดความกว้างใบของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซิน พบว่าความเข้มข้นสารโคลชิซินมีผลต่อความกว้างใบเฉลี่ยของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีความกว้างใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 7.34 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินก็มีผลต่อความกว้างใบเฉลี่ยเช่นกัน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์ม-ไลค์บอดี้เป็นระยะเวลา 1 วัน มีความกว้างใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 7.13 มิลลิเมตร (ตารางผนวกที่ 5) นอกจากนี้ ยังพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่จากการแช่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ในอาหารที่มีสารโคลชิซินเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นระยะเวลา 3 วัน มีความกว้างใบเฉลี่ยสูงที่สุด 7.51 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินทุกระยะเวลา (ตารางที่ 2 และรูปที่ 1)

ความหนาใบ จากผลการวัดความหนาใบของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซิน พบว่าความเข้มข้นสารโคลชิซินมีผลต่อความหนาใบเฉลี่ยของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีความหนาใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 338.87 ไมโครเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินมีผลต่อความหนาใบเฉลี่ยเช่นกัน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์ม-ไลค์บอดี้เป็นระยะเวลา 7 วัน มีความหนาใบเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 332.91 ไมโครเมตร (ตารางผนวกที่ 6) และไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน แต่มีแนวโน้มว่าต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ในอาหารที่มีสารโคลชิซินเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน มีความหนาใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 350.30 ไมโครเมตร ซึ่งแตกต่างกับต้นกล้ากล้วยไม้ ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินทุกระยะเวลา (ตารางที่ 2 และรูปที่ 1)

จำนวนราก จากผลการนับจำนวนรากของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซิน พบว่าความเข้มข้นสารโคลชิซินมีผลต่อจำนวนรากเฉลี่ยของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 7.10 รากต่อต้น ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินในทุกความเข้มข้น ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินก็มีผลต่อจำนวนรากเฉลี่ยเช่นกัน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้เป็นระยะเวลา 3 วัน มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 5.29 รากต่อต้น (ตารางผนวกที่ 7) นอกจากนี้ยังพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่จากการแช่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ในอาหารที่ไม่มีสารโคลชิซิน เป็นระยะเวลา 5 วัน มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 7.14 รากต่อต้น ซึ่งแตกต่างกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินทุกความเข้มข้นในทุกระยะเวลา (ตารางที่ 3 และรูปที่ 1)

ความยาวราก จากผลการวัดความยาวรากของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซิน พบว่าความเข้มข้นสารโคลชิซินมีผลต่อความยาวรากเฉลี่ยของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน มีความยาวรากเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 29.43 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินในทุกความเข้มข้น ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินก็มีผลต่อความยาวรากเฉลี่ยเช่นกัน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้เป็นระยะเวลา 1 วัน มีความยาวรากเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 23.22 มิลลิเมตร (ตารางผนวกที่ 8) นอกจากนี้ยังพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่จากการแช่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ในอาหารที่ไม่มีสารโคลชิซิน เป็นระยะเวลา 3 วัน มีความยาวรากเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 29.62 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินทุกความเข้มข้นในทุกระยะเวลา (ตารางที่ 3 และรูปที่ 1)

เส้นผ่าศูนย์กลางราก จากผลการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางรากของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซินพบว่า ความเข้มข้นสารโคลชิซินมีผลต่อเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 982.48 ไมโครเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินไม่มีผลต่อเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ย (ตารางผนวกที่ 9) และไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน แต่มีแนวโน้มว่าต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ในอาหารที่มีสาร

โคลชิซิน เข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน มีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 997.98 ไมโครเมตร (ตารางที่ 3 และรูปที่ 1)

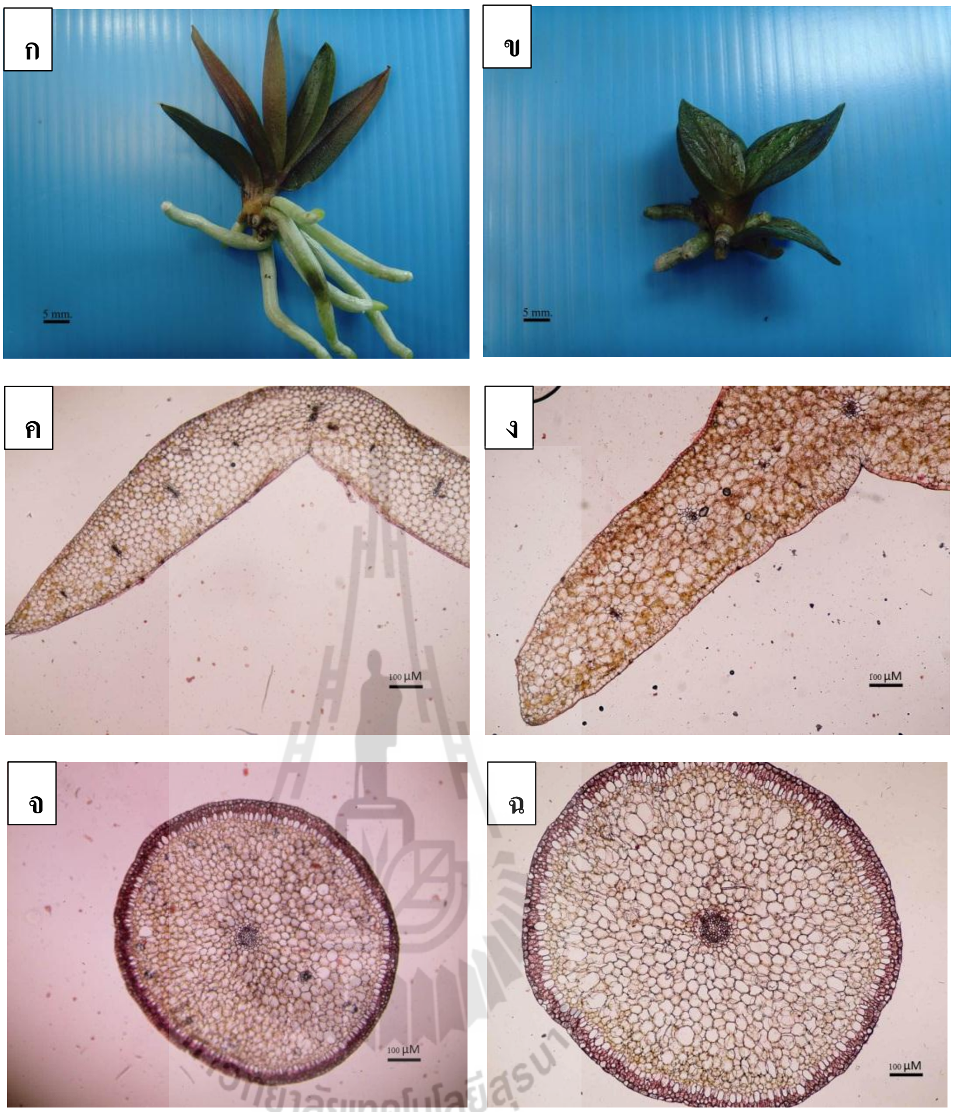
ความหนาแน่นปากใบ จากผลการวัดความหนาแน่นปากใบของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซินพบว่า ความเข้มข้นสารโคลชิซินมีผลต่อความหนาแน่นปากใบเฉลี่ยของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน มีความหนาแน่นปากใบเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 40.41 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินในทุกความเข้มข้น ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินมีผลต่อความหนาแน่นปากใบเฉลี่ยเช่นกัน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้เป็นระยะเวลา 1 วัน มีความหนาแน่นปากใบเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 37.97 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร (ตารางผนวกที่ 10) และไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น และระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน แต่มีแนวโน้มว่าต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ในอาหารที่ไม่มีสารโคลชิซิน เป็นระยะเวลา 1 วัน มีความหนาแน่นปากใบเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 41.17 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร (ตารางที่ 4 และรูปที่ 2)

ความยาวปากใบ จากผลการวัดความยาวปากใบของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซินพบว่า ความเข้มข้นสารโคลชิซินมีผลต่อความยาวปากใบเฉลี่ยของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีความยาวปากใบเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 22.16 ไมโครเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินมีผลต่อความยาวปากใบเฉลี่ยเช่นกัน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้เป็นระยะเวลา 7 วัน มีความยาวปากใบเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 28.82 ไมโครเมตร (ตารางผนวกที่ 6) และไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน แต่มีแนวโน้มว่าต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มไลค์-บอดี้ในอาหารที่มีสารโคลชิซินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน มีความยาวปากใบเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 23.63 ไมโครเมตร (ตารางที่ 4 และรูปที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของสารละลายโคลชิซิน ต่อน้ำหนักสด จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ และความหนาใบ ของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* เมื่ออายุ 10 เดือน หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน (% w/v)	ระยะเวลา (วัน)	น้ำหนักสด[1/] (กรัม)	จำนวน ใบ	ความยาวใบ (มิลลิเมตร)	ความกว้างใบ (มิลลิเมตร)	ความหนาใบ (ไมโครเมตร)
0	1	1.773 a	4.67 a	39.22 a	6.57 b	287.95 c
	3	1.803 a	4.62 a	39.39 a	6.56 b	289.46 c
	5	1.787 a	4.57 a	39.28 a	6.53 b	292.23 c
	7	1.791 a	4.62 a	39.01 a	6.58 b	292.27 c
0.05	1	1.315 b	4.00 b	35.58 b	7.06 ab	312.29 bc
	3	1.193 c	4.05 b	35.59 b	6.91 ab	324.82 ab
	5	1.106 cd	4.10 b	31.37 c	6.83 ab	331.67 ab
	7	1.103 cd	4.05 b	29.54 cd	7.37 a	340.79 ab
0.075	1	1.031 d	4.00 b	30.89 c	7.49 a	323.99 ab
	3	1.079 cd	3.95 b	30.82 c	7.51 a	330.30 ab
	5	1.085 cd	3.81 bc	27.79 de	7.32 a	340.22 ab
	7	1.033 d	3.71 bc	27.26 e	7.03 ab	350.30 a
0.1	1	0.869 e	3.48 cd	28.04 de	7.39 a	326.40 ab
	3	0.773 ef	3.14 d	25.13 f	6.92 ab	339.48 ab
	5	0.714 f	3.14 d	21.34 g	7.10 ab	341.31 ab
	7	0.600 g	2.63 e	20.25 g	5.54 c	348.28 a
F-test		**	**	**	**	**
CV. (%)		8.28	10.18	5.96	8.22	8.17

[1/]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธีวิเคราะห์แบบ Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)



รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ ที่มีอายุ 10 เดือน

ก : ลักษณะต้นดิพลอยด์

ข : ลักษณะต้นเตตระพลอยด์ ที่ได้จากการได้รับสารละลายโคลชิซิน

ค : ลักษณะใบของต้นดิพลอยด์

ง : ลักษณะใบของต้นเตตระพลอยด์ ที่ได้จากการได้รับสารละลายโคลชิซิน

จ : ลักษณะรากของต้นดิพลอยด์

ฉ : ลักษณะรากของต้นเตตระพลอยด์ ที่ได้จากการได้รับสารละลายโคลชิซิน

ตารางที่ 3 ผลของสารละลายโคลชิซินต่อจำนวนราก ความยาวราก และเส้นผ่าศูนย์กลางรากของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* เมื่ออายุ 10 เดือน หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน (% w/v)	ระยะเวลา (วัน)	จำนวนราก[1/]	ความยาวราก (มิลลิเมตร)	เส้นผ่าศูนย์กลางราก (ไมโครเมตร)
0	1	7.12 a	29.46 a	896.38
	3	7.10 a	29.62 a	897.87
	5	7.14 a	29.20 a	895.42
	7	7.05 a	29.45 a	899.95
0.05	1	6.05 b	26.18 b	931.50
	3	6.10 b	25.67 bc	945.41
	5	5.67 b	24.59 c	969.58
	7	5.62 b	21.80 d	971.49
0.075	1	4.52 c	21.99 d	951.14
	3	4.81 c	20.09 e	965.61
	5	4.38 c	17.52 f	986.46
	7	3.62 d	15.99 g	997.98
0.1	1	3.24 d	15.25 g	970.02
	3	3.14 de	12.84 h	989.23
	5	2.71 e	10.13 i	992.64
	7	1.50 f	6.85 j	978.01
F-test		**	**	ns
CV. (%)		8.98	5.46	8.36

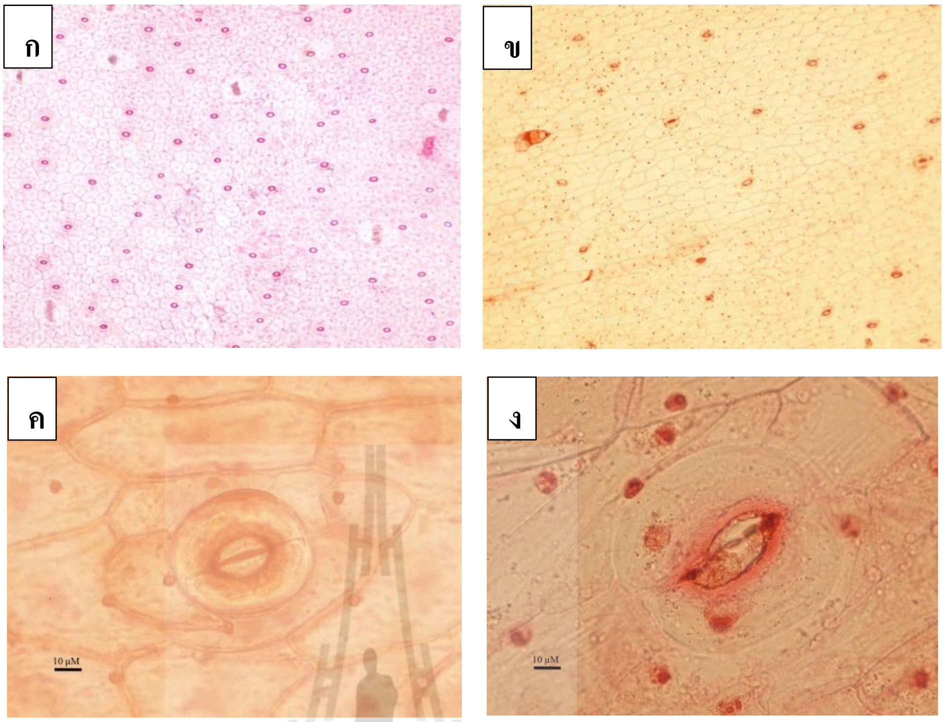
[1/]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธีวิเคราะห์แบบ Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 4 ผลของสารละลายโคลชิซินต่อความหนาแน่นปากใบ และความยาวปากใบของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* เมื่ออายุ 10 เดือน หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน (% w/v)	ระยะเวลา (วัน)	ความหนาแน่นปากใบ[1/] (ปากใบ/ตร.มม.)	ความยาวปากใบ (ไมโครเมตร)
0	1	41.17 a	17.68 f
	3	40.50 ab	17.60 f
	5	40.59 ab	17.88 ef
	7	39.39 abc	17.85 ef
0.05	1	37.85 abcd	18.67 def
	3	37.13 abcd	19.18 cdef
	5	36.95 abcd	19.58 cdef
	7	35.13 cde	20.26 cdef
0.075	1	37.37 abcd	19.83 cdef
	3	35.93 abcde	20.21 cdef
	5	35.41 bcde	20.73 bcd
	7	33.22 de	21.54 abc
0.1	1	35.48 bcde	20.50 bcde
	3	34.08 cde	21.56 abc
	5	33.15 de	22.95 ab
	7	31.06 e	23.63 a
F-test		**	**
CV. (%)		11.32	10.80

[1/]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธีวิเคราะห์แบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 2 แสดงความหนาแน่นและความยาวปากใบของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ ที่มีอายุ 10 เดือน

ก : ความหนาแน่นปากใบของต้นดิพลอยด์

ข : ความหนาแน่นปากใบของต้นเตตระพลอยด์ ที่ได้จากการได้รับสารละลายโคลชิซิน

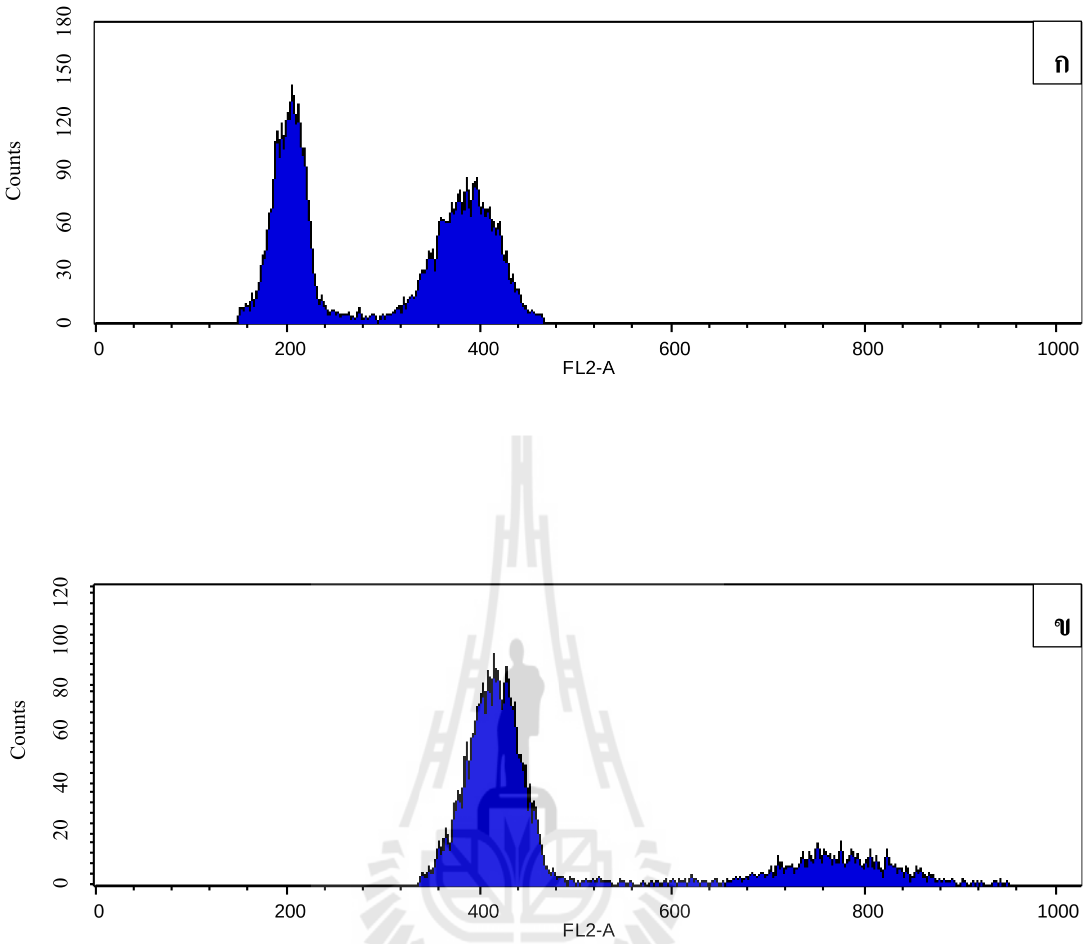
ค : ความยาวปากใบของต้นดิพลอยด์

ง : ความยาวปากใบของต้นเตตระพลอยด์ ที่ได้จากการได้รับสารละลายโคลชิซิน

4.1.3 เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซมของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ

การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรีของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ พบว่านิวเคลียสจากเซลล์ใบกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีผลทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม เนื่องจากมีฮิสโทแกรมสูงสุดขึ้นบริเวณช่องที่ 400 แสดงว่ามีระดับพลอยดีเป็นต้นเตตระพลอยด์ (2n = 4x) ซึ่งแตกต่างกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่มีฮิสโทแกรมสูงสุดขึ้นบริเวณช่องที่ 200 ซึ่งแสดงว่ามีระดับพลอยดีเป็นต้นดิพลอยด์ (2n = 2x) (รูปที่ 3) และเมื่อพิจารณาลักษณะฮิสโทรแกรม ที่วัดจากเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ของต้นกล้วยไม้ ที่ได้จากการแช่สารละลายโคลชิซินในความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบว่าความเข้มข้นและระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซิน มีผลต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของต้นกล้วยไม้คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการไม่ได้รับสารโคลชิซินนั้น ไม่มีการเกิดต้นเตตระพลอยด์ แต่มีการเกิดต้นเตตระพลอยด์ในต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดการเกิดต้นเตตระพลอยด์สูงขึ้น เมื่อได้รับสารละลายโคลชิซินที่เข้มข้นสูงขึ้นเป็นระยะเวลานานขึ้น (ตารางผนวกที่ 12) โดยต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยด์สูงที่สุดคือ 60 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการ ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นระยะเวลา 5 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยด์ 45.45 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 5

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3 ฮิสโทรแกรมแสดงระดับพลอยดีของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่มีอายุ 10 เดือน

ก : ฮิสโทรแกรมแสดงระดับพลอยดีของต้นดิพลอยด์

ข : ฮิสโทรแกรมแสดงระดับพลอยดีของต้นเตตระพลอยด์ ที่ได้จากการได้รับสารละลายโคลชิซิน

ตารางที่ 5 ผลของสารละลายโคลชิซินต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นดิพลอยด์ และเตตระพลอยด์ของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* เมื่ออายุ 10 เดือน หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน (% w/v)	ระยะเวลา (วัน)	ดิพลอยด์	เตตระพลอยด์
0	1	100.00	0.00
	3	100.00	0.00
	5	100.00	0.00
	7	100.00	0.00
0.05	1	90.48	9.52
	3	85.71	14.29
	5	80.95	19.05
	7	76.19	23.81
0.075	1	80.95	19.05
	3	76.19	23.81
	5	71.43	28.57
	7	61.90	38.10
0.1	1	71.43	28.57
	3	61.90	38.10
	5	54.55	45.45
	7	40.00	60.00

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 วิจารณ์ผลการทดลองผลของระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่างๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis*

4.2.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ

จากการศึกษาพบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ลดลง เมื่อได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นสูง และระยะเวลานานขึ้น โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่ตายนั้น จะสังเกตเห็นลักษณะของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง และสีน้ำตาลจนตายในที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในกล้วยไม้ *Cymbidium* sp. Silky (Kim et al., 1997) ที่พบว่า ความเข้มข้นที่สูงขึ้น และระยะเวลาที่ได้รับสารละลายโคลชิซินเพิ่มขึ้น ส่งผลต่ออัตราการตายของโปรโตคอร์มมากขึ้น เช่นเดียวกับสุพัตรา สระธรรม และคณะ (2551) ที่พบว่าโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องแซะหอมเมื่อได้รับสารละลายโคลชิซินเป็นเวลานานขึ้นมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาการได้รับสารละลายโคลชิซินที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากสารโคลชิซินนั้น สามารถแทรกซึมเข้าไปยังส่วนต่าง ๆ ของเซลล์พืช และยังเป็นพิษต่อเซลล์พืช การได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้นที่สูงและระยะเวลานานเกินไปอาจทำให้พืชมีจำนวนชุดโครโมโซมเกินระดับที่ต้องการจนทำให้เซลล์เสียสมดุลและตายในที่สุด โดยสารโคลชิซินนั้น จะทำให้การทำงานของเซลล์รวมทั้งกระบวนการต่างๆภายในพืชผิดปกติ องค์ประกอบในไซโทพลาสซึมทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงไป โดยจะมีผลยับยั้งการสร้างสายดึงโครโมโซม (spindle fiber) หรือบังคับไม่ให้เส้นใยสายนี้ทำงานได้ตามปกติ ซึ่งส่งผลให้เส้นโครมาติด (chromatid) ของโครโมโซมอันหนึ่งๆ เข้าไปอยู่ในเซลล์เดียวกัน ทำให้การแบ่งเซลล์แบบไมโตซิส (mitosis) มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากเดิม 2 เท่า ดังนั้นถึงแม้ว่าการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิสจะเกิดปกติ แต่เซลล์และเนื้อเยื่อที่ได้จะเป็นโพลีพลอยด์ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550)

4.2.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ พบว่า ต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้นมีผลทำให้น้ำหนักสด จำนวนใบ ความยาวใบ จำนวนราก และความยาวรากลดลง ที่เป็นเช่นนี้ อาจเป็นผลมาจากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนั้นเกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมขึ้น ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน เพราะว่าต้นที่เป็นโพลีพลอยด์นั้น จะมีปริมาณฮอร์โมนออกซินที่ต่ำกว่าต้นดิพลอยด์ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550) แต่ในทางตรงข้ามเส้นผ่าศูนย์กลางราก

ความกว้างและความหนาของใบกลับมีแนวโน้มสูงขึ้น เป็นผลมาจากเซลล์ของต้นกล้วยไม้มีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sarathum et al. (2010) ที่มีการศึกษาในโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องแซะหอม พบว่าต้นโพลีพลอยด์ที่ได้มีลักษณะแตกต่างจากต้นดิพลอยด์คือ มีลำต้นและใบขนาดใหญ่กว่า แต่มีความสูงของต้น และความยาวของใบน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ เช่นเดียวกับ Chaicharoen and Saejew (1980) ได้ศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบพบว่า การเจริญของต้นเตตระพลอยด์ช้ากว่าของดิพลอยด์ ใบของต้นเตตระพลอยด์หนากว่าดิพลอยด์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Kim et al. (1997) ที่ได้มีการศึกษาในกล้วยไม้ *Cymbidium* sp. Silky พบว่า ใบของต้นเตตระพลอยด์เกิดความแตกต่างจากต้นดิพลอยด์ในด้านรูปร่างของใบ และความยาวใบ และยังมีรายงานของ Chinachit and Sreemaung (2008) ที่ได้ศึกษาในกล้วยไม้ดินหมูกลิ้ง (*Eulophia andamanensis* Reichb.f.) พบว่า ต้นเตตระพลอยด์จะมีสัณฐานวิทยาต่างไปจากต้นปกติคือ ต้นเตี้ย ใบหนา ลำต้นกว้าง แต่ขัดแย้งกับผลการทดลองของมลวิภา โสมานันท์ (2521) ที่ศึกษาในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลอะแรนดา (*Aranda*) พบว่าลักษณะทั่วไปของต้นดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างได้ชัดเจน

4.2.3 การตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ

จากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาคือ ความหนาแน่นปากใบและความยาวปากใบของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ พบว่าต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้นมีผลทำให้ความหนาแน่นของปากใบลดลง เป็นผลมาจากเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น และความยาวของปากใบมีความยาวมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Silva et al. (2000) ได้ทำการศึกษาในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Cattleya intermedia* L. พบว่าต้นโพลีพลอยด์มีพื้นที่ปากใบเพิ่มขึ้นและความหนาแน่นของปากใบลดลงเมื่อเทียบกับต้นปกติ เช่นเดียวกัน Chaicharoen and Saejew (1980) ได้ศึกษาขนาดเซลล์คุมของ *Dendrobium phalaenopsis* พบว่า ต้นเตตระพลอยด์มีขนาดของเซลล์คุมใหญ่กว่าพวกดิพลอยด์ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาของ Chinachit and Sreemaung (2008) ที่ได้ศึกษาในกล้วยไม้ดินหมูกลิ้ง (*Eulophia andamanensis* Reichb.f.) พบว่าต้นเตตระพลอยด์มีปากใบใหญ่ เซลล์คุมหนา และมีจำนวนปากใบต่อตารางไมโครเมตรน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ และยังมีรายงานของสุลาวัลย์ มหาหิงส์ และสุมนทิพย์ บุนนาค (2551) ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) พบว่าต้นที่เป็นเตตระพลอยด์มีความยาวของเซลล์คุมเพิ่มขึ้น แต่ขัดแย้งกับผลการทดลองของมลวิภา โสมานันท์ (2521) ที่ศึกษาในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลอะแรนดา (*Aranda*) พบว่า ต้นเตตระพลอยด์และต้นดิพลอยด์มีความกว้างและความยาวของเซลล์คุมไม่แตกต่างกัน

4.2.4 เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ

จากการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรีของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่าง ๆ พบว่า นิวเคลียสจากเซลล์ใบกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีผลทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม ที่มีระดับพลอยดีเป็นต้นเตตระพลอยด์ (2n = 4x) ซึ่งแตกต่างกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่มีระดับพลอยดี เป็นต้นดิพลอยด์ (2n = 2x) และเมื่อพิจารณาลักษณะฮิสโทรแกรมที่วัดจากเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ของต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการแช่สารละลายโคลชิซินในความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าความเข้มข้นและระยะเวลาการได้รับสารละลายโคลชิซินมีผลต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของต้นกล้วยไม้ คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินนั้น ไม่มีการเกิดต้นเตตระพลอยด์ แต่มีการเกิดต้นเตตระพลอยด์ในต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยด์สูงขึ้นเมื่อได้รับสารละลายโคลชิซินที่เข้มข้นมากขึ้นและได้รับเป็นระยะเวลานานขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sarathum et al. (2010) ที่ได้มีการศึกษาในโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องแซะหอมพบว่า สารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลานาน 14 วัน เหมาะสมที่สุด โดยโปรโตคอร์มมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 36.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมโดยวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดต้นโพลีพลอยด์ได้ 58.33 เปอร์เซ็นต์ และสอดคล้องกับการทดลองของ Kim et al. (1997) ที่ได้มีการศึกษาในกล้วยไม้ *Cymbidium* sp. Silky พบว่าความเข้มข้นของโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โปรโตคอร์มตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ดีที่สุด จำนวนโครโมโซมที่เกิด มีทั้งเป็นเตตระพลอยด์ และทริปพลอยด์ เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ พรพิมล ธัญญสนธิ (2538) ในกล้วยไม้ฟ้ามุ่ย พบว่า protocorm - like bodies (PLBs) ที่ได้รับสารโคลชิซินเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน สามารถเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นต้นเตตระพลอยด์ได้มากที่สุดถึง 8 ต้น จาก 14 ต้น คิดเป็น 57 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาของ Chinachit and Sreemaung (2008) ที่ได้ศึกษาในกล้วยไม้ดินหมูกลิ้ง (*Eulophia andamanensis* Reichb.f.) พบว่า ต้นอ่อนที่ได้รับโคลชิซิน 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 4 และ 6 ชั่วโมง จะมีการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีเป็นเตตระพลอยด์ (2n=4x) ได้จำนวนถึง 2 ต้นจาก 6 ต้น คิดเป็น 33.33 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้นอื่นไม่สามารถชักนำให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีได้ และยังมีการศึกษาของสุลาวัลย์ มหาหิงส์ และสุมนทิพย์ บุนนาค (2551) ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) พบว่าต้นที่ไม่ได้รับการชักนำมีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 38 ส่วนต้นที่ถูกชักนำด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีจำนวนโครโมโซม 2n = 4x = 76 ยืนยันระดับพลอยดีโดยการตรวจสอบใบกล้วยไม้ม้าวิ่งด้วย

เทคนิคโฟลไซโตเมทรี สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้ม้าวิ่ง ส่วนระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงโปรโตคอร์มในสารละลายโคลชิซินคือ 72 ชั่วโมง

4.3 การศึกษาปริมาณรังสีแกมมาที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่าง ๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis*

4.3.1 ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา

จากผลการทดลองฉายรังสีแกมมาให้กับโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ในปริมาณรังสีเท่ากับ 0, 50, 100, 150 และ 200 เกรย์ จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร VW ที่เติมกล้วยหอมบด 100 กรัม มันฝรั่งบด 50 กรัม และผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัม ต่ออาหารปริมาณ 1 ลิตร จนเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนที่มีอายุประมาณ 10 เดือน (รูปที่ 4) จึงนำมาบันทึกลักษณะต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 6 ได้ผลดังนี้

น้ำหนักสด การฉายรังสีแกมมามีผลต่อน้ำหนักสดของต้นกล้วยไม้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยจะมีน้ำหนักลดลงเมื่อได้รับรังสีในปริมาณที่สูงขึ้น ได้ผลดังนี้ ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้นมีน้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุด คือ 1.894 กรัม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาในทั้ง 4 ระดับ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 1.362 กรัม ไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 100 เกรย์ ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 1.355 กรัม ส่วนต้นกล้วยไม้ที่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.878 กรัม แต่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 150 เกรย์ ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 1.023 กรัม

จำนวนใบ การฉายรังสีแกมมามีผลต่อจำนวนใบเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยจะมีจำนวนใบเฉลี่ยมากขึ้น เมื่อได้รับรังสีในปริมาณที่สูงขึ้นคือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ มีจำนวนใบเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 9.99 ใบ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมาและต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50, 100 และ 150 เกรย์ ซึ่งมีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 4.24, 4.57, 4.9 และ 5.57 ใบ ตามลำดับ

ความยาวใบ การฉายรังสีแกมมามีผลต่อความยาวใบเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยจะมีความยาวใบเฉลี่ยลดลงเมื่อได้รับรังสีในปริมาณที่สูงขึ้น ได้ผลดังนี้ ต้นกล้วยไม้

ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้นมีความยาวใบเฉลี่ยมากที่สุดคือ 34.33 มิลลิเมตร รองลงมาคือต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีความยาวใบเฉลี่ยเท่ากับ 23.59 มิลลิเมตร แต่มีความยาวใบเฉลี่ยไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 100 เกรย์ ซึ่งมีความยาวใบเฉลี่ยเท่ากับ 21.07 มิลลิเมตร ส่วนต้นกล้วยไม้ที่มีความยาวใบเฉลี่ยน้อยที่สุด คือต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ ซึ่งมีความยาวใบเฉลี่ยเท่ากับ 16.33 มิลลิเมตร แต่มีความยาวใบเฉลี่ยไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 150 เกรย์ ที่มีความยาวใบเฉลี่ยเท่ากับ 18.84 มิลลิเมตร

ความกว้างใบ การฉายรังสีแกมมามีผลต่อความกว้างใบเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติได้ผลดังนี้ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้นมีความกว้างใบเฉลี่ยมากที่สุดคือ 9.42 มิลลิเมตร แต่มีความกว้างใบเฉลี่ยไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 100 เกรย์ ซึ่งมีความกว้างใบเฉลี่ยเท่ากับ 9.20 มิลลิเมตร รองลงมาคือต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีความกว้างใบเฉลี่ยเท่ากับ 7.45 มิลลิเมตร แต่ไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 150 เกรย์ ที่มีความกว้างใบเฉลี่ยเท่ากับ 7.31 มิลลิเมตร ซึ่งต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 150 เกรย์ นั้นมีความกว้างใบเฉลี่ยไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ ที่มีความกว้างใบเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ 6.15 มิลลิเมตร

ความหนาใบ การฉายรังสีแกมมามีผลต่อความหนาใบเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติได้ผลดังนี้ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้นมีความหนาใบเฉลี่ยมากที่สุดคือ 310.61 ไมโครเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาในทั้ง 4 ระดับ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีความหนาใบเฉลี่ยเท่ากับ 293.62 ไมโครเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 100 และ 150 เกรย์ ที่มีความหนาใบเฉลี่ยเท่ากับ 291.28 และ 288.52 ไมโครเมตร ตามลำดับ ส่วนต้นกล้วยไม้ที่มีความหนาใบน้อยที่สุดคือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ ซึ่งมีความหนาใบเฉลี่ยเท่ากับ 274.16 ไมโครเมตร แต่มีความหนาใบเฉลี่ยไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 150 เกรย์

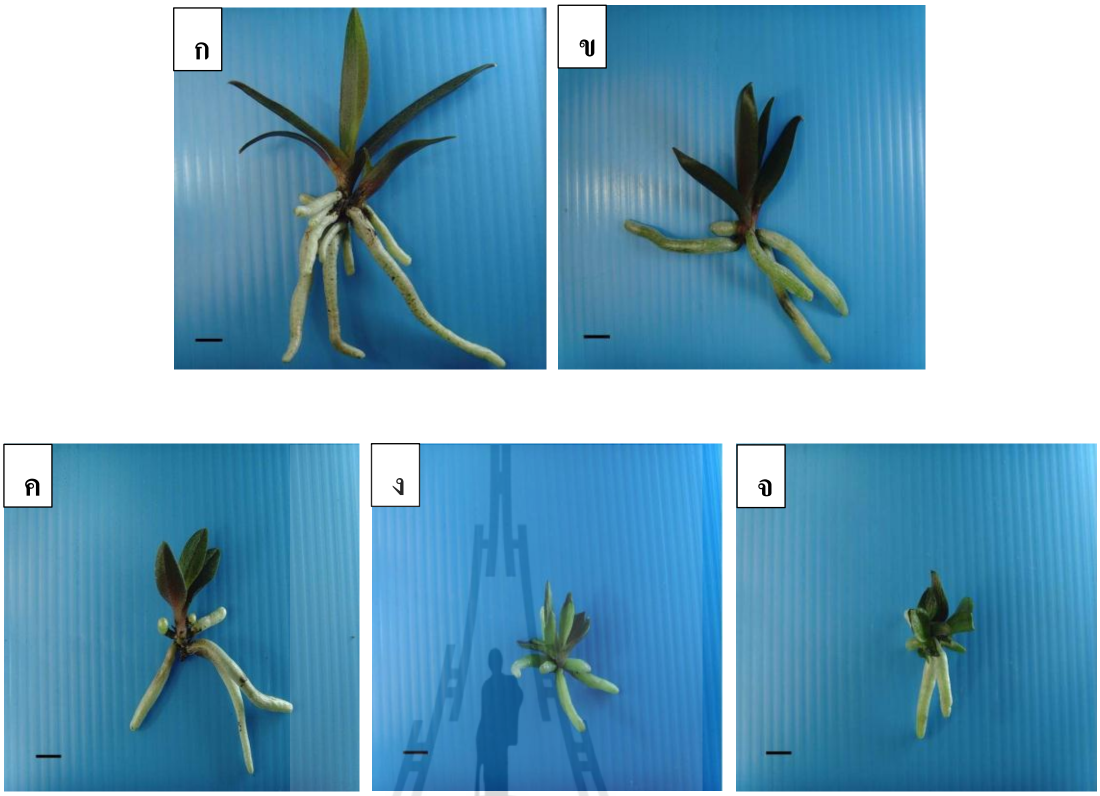
จำนวนราก การฉายรังสีแกมมามีผลต่อจำนวนรากเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติได้ผลดังนี้ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้นมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดคือ 7.38 ราก ซึ่งแตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 100 เกรย์ ที่มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 5.48 ราก รองลงมาคือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 5.38 ราก ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 และ 150 เกรย์ ที่มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 5.00 และ 4.62 ราก ตามลำดับ

ความยาวราก การฉายรังสีแกมมามีผลต่อความยาวรากเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้ อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยจะมีความยาวรากเฉลี่ยลดลง เมื่อได้รับรังสีในปริมาณที่สูงขึ้นคือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้นมีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุดคือ 32.41 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 23.54 มิลลิเมตร แต่ไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 100 เกรย์ ที่มีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 21.96 มิลิเมตร ส่วนต้นกล้วยไม้ที่มีความยาวรากน้อยที่สุดคือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ ซึ่งมีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 11.97 มิลลิเมตร

เส้นผ่าศูนย์กลางราก การฉายรังสีแกมมามีผลต่อเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติได้ผลดังนี้ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้น มีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยมากที่สุดคือ 915.38 ไมโครเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาในทั้ง 4 ระดับ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยเท่ากับ 863.37 ไมโครเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 100 เกรย์ ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยเท่ากับ 840.99 ไมโครเมตร ส่วนต้นกล้วยไม้ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยเท่ากับ 783.61 ไมโครเมตร แต่มีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 150 เกรย์ ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยเท่ากับ 796.85 ไมโครเมตร

ความหนาแน่นปากใบ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมา และต้นที่ได้รับรังสีแกมมาในปริมาณ 50, 100, 150 และ 200 เกรย์ พบว่า ความหนาแน่นปากใบเฉลี่ยมีจำนวนไม่แตกต่างกันคือ มีความหนาแน่นปากใบเฉลี่ยอยู่ในช่วง 40.70-41.51 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร

ความยาวปากใบ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมา และต้นที่ได้รับรังสีแกมมาในปริมาณ 50, 100, 150 และ 200 เกรย์ พบว่า ความยาวปากใบเฉลี่ยมีขนาดไม่แตกต่างกันคือ มีความยาวปากใบเฉลี่ยอยู่ในช่วง 17.68-18.48 ไมโครเมตร



รูปที่ 4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* หลังจากฉายรังสีแกมมา อายุ 10 เดือน

ก : ไม่ได้รับรังสีแกมมา

ข-จ : ได้รับรังสีแกมมาปริมาณ 50, 100, 150 และ 200 เกรย์ ตามลำดับ

สเกลบาร์ = 5 มิลลิเมตร

4.3.2 เปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์ของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา

การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรีของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่าง ๆ พบว่า นิวเคลียสจากเซลล์ใบกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในทุกอัตรารังสีไม่มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม และไม่พบการเพิ่มหรือขาดหายไปของแท่งโครโมโซม เนื่องจากมีฮิสโทแกรมขึ้นบริเวณช่องที่ 200 ทุกชุดการทดลอง จึงยืนยันได้ว่าต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาทุกต้นเป็นต้นดิพลอยด์ (รูปที่ 5) แต่อาจเกิดการกลายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ เนื่องจากพบต้นที่มีการกลายพันธุ์ คือ พบลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีการเปลี่ยนแปลงไป เช่น ใบหลอด ใบแฉก ใบด่าง ใบยาวเรียวเล็กใบหดสั้น และหนาขึ้น ใบเปลี่ยนสีไปจากเดิมจากสีเขียวปนน้ำตาลแดงเป็นสีเขียวทั้งใบ (รูปที่ 6)

ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมา พบว่าการฉายรังสีแกมมามีผลต่อการกลายพันธุ์ของต้นกล้วยไม้คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้นไม่มีการเกิดการกลายพันธุ์ แต่มีการกลายพันธุ์ในต้นที่ได้รับรังสีแกมมา ซึ่งเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์จะสูงขึ้นเมื่อได้รับปริมาณรังสีแกมมาที่สูงขึ้น ดังนี้ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์สูงที่สุดคือ 24.29 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 150, 100 และ 50 เกรย์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์เท่ากับ 17.14, 15.71 และ 10.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อนำต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาออกปลูกในสภาพโรงเรือนนั้น พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้น้อยลงเมื่อได้รับปริมาณรังสีแกมมาที่สูงขึ้น เมื่อนำต้นกล้วยไม้ออกปลูกในสภาพโรงเรือนแล้ว จะสังเกตเห็นลักษณะของต้นกล้วยไม้มีอาการฉ่ำน้ำ และเน่าตายในที่สุด แล้วยังพบอาการต้นเหี่ยวแห้งตาย เนื่องจากบางต้นมีสภาพไม่แข็งแรง มีรากสั้นกุด และใบเล็กผิดรูปไปจากต้นปกติ ซึ่งต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์หลังจากนำไปปลูกในสภาพโรงเรือนสูงที่สุดคือ 57.14 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณ 100 และ 150 เกรย์ ซึ่งต้นที่กลายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การรอดหลังจากนำออกปลูกในสภาพโรงเรือนเท่ากับ 45.46 และ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ นั้นตายทั้งหมดเมื่อนำออกปลูกในสภาพโรงเรือน (ตารางที่ 7)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ ความหนาใบ จำนวนราก ความยาวราก เส้นผ่าศูนย์กลางราก ความหนาแน่นปากใบ และความยาวปากใบ ของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* เมื่ออายุ 10 เดือน หลังจากได้รับรังสีแกมมาปริมาณที่แตกต่างกัน

ปริมาณรังสีแกมมา (เกรย์)	น้ำหนักสด[1/] (กรัม)	จำนวนใบ	ความยาวใบ (มิลลิเมตร)	ความกว้างใบ (มิลลิเมตร)	ความหนาใบ (ไมโครเมตร)	จำนวนราก	ความยาวราก (มิลลิเมตร)	เส้นผ่าศูนย์กลางราก (ไมโครเมตร)	ความหนาแน่นปากใบ	ความยาวปากใบ (ไมโครเมตร)
0	1.894 a	4.24 b	34.33 a	9.42 a	310.61 a	7.38 a	32.41 a	915.38 a	40.98	18.48
50	1.362 b	4.57 b	23.59 b	7.45 b	293.62 b	5.38 b	23.54 b	863.37 b	41.51	18.16
100	1.355 b	4.90 b	21.07 bc	9.20 a	291.28 b	5.48 b	21.96 b	840.99 b	40.83	18.20
150	1.023 c	5.57 b	18.84 cd	7.31 bc	288.52 bc	4.62 b	16.21 c	796.85 c	40.70	17.68
200	0.878 c	9.99 a	16.33 d	6.15 c	274.16 c	5.00 b	11.97 d	783.61 c	41.04	17.78
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**	ns	ns
CV. (%)	11.12	15.76	15.19	14.14	4.58	10.55	16.64	4.25	7.89	3.74

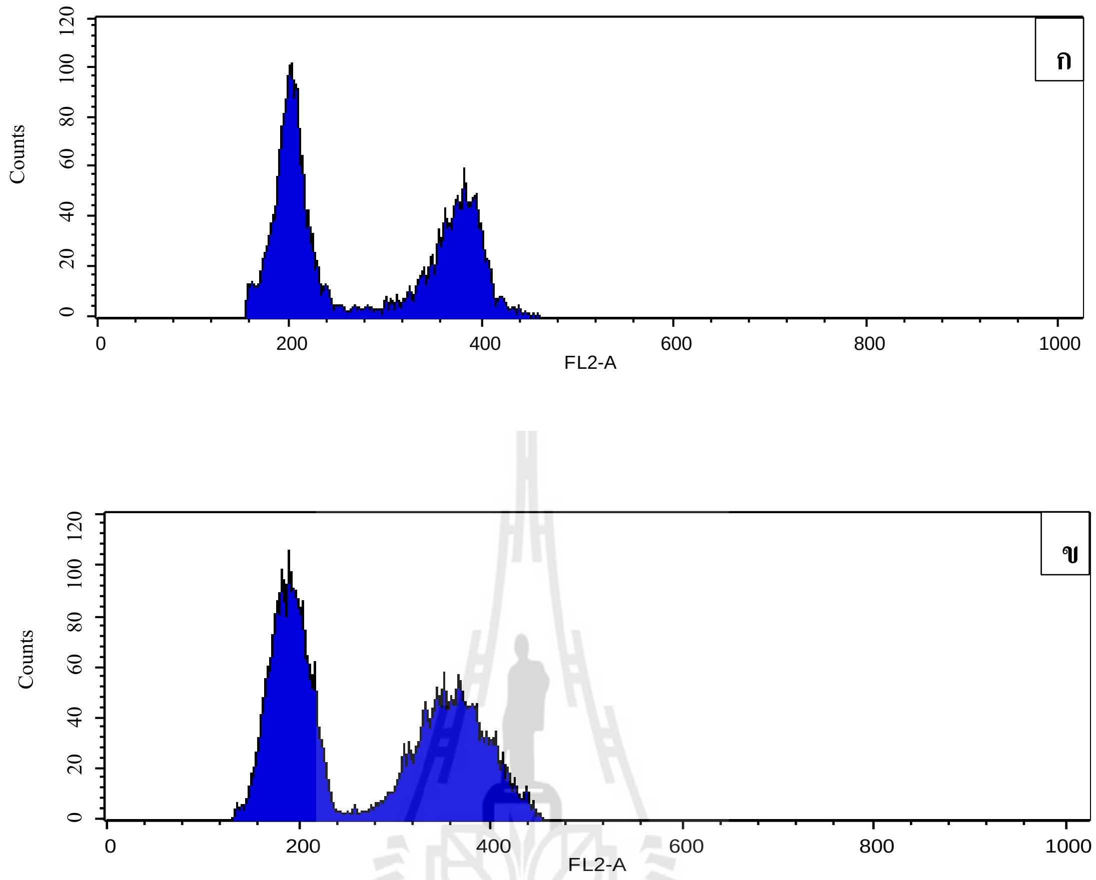
[1/]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธีวิเคราะห์แบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 7 ผลของรังสีแกมมาต่อเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์ และเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์หลังจากนำไปปลูก ในสภาพโรงเรือนของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* เมื่ออายุ 10 เดือน หลังจากได้รับรังสีแกมมาปริมาณที่แตกต่างกัน

ปริมาณรังสีแกมมา (เกรย์)	**เปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์**	**เปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์หลังจากนำไปปลูกในสภาพโรงเรือน**
0	0.00	-
50	10.00	57.14
100	15.71	45.46
150	17.14	16.67
200	24.29	0.00

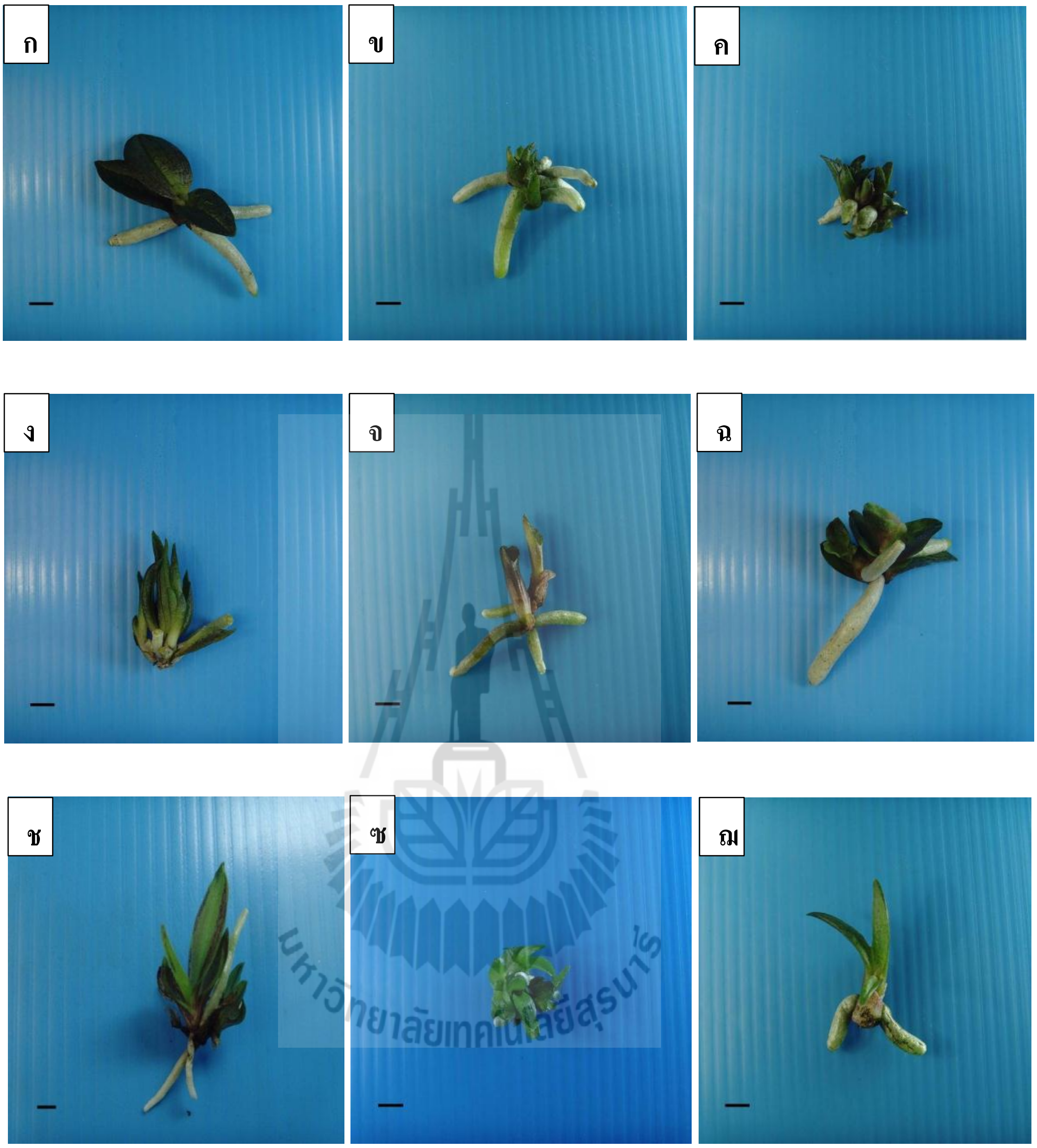
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 5 ฮิสโทรแกรมแสดงระดับพลอยดีของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา เมื่ออายุ 10 เดือน

ก : ฮิสโทรแกรมแสดงระดับพลอยดีของต้นที่ไม่ได้รับรังสีแกมมา

ข : ฮิสโทรแกรมแสดงระดับพลอยดีของต้นได้รับรังสีแกมมา ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไปจากต้นปกติ



รูปที่ 6 แสดงอิทธิพลของรังสีแกมมาที่มีต่อลักษณะทางสัณฐานของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่มีอายุ 10 เดือน

ก-ค : ใบหดสั้นและหนาขึ้น, ง : ใบยาวเรียวเล็ก, จ : ใบหลอด, ฉ : ใบผิดรูป, ช : ใบด่าง

ซ : ใบเปลี่ยนสีไปจากสีเขียวปนน้ำตาลแดงเป็นสีเขียวทั้งใบ, ฌ : ใบแฉก

สเกลบาร์ = 5 มิลลิเมตร

4.4 วิจารณ์ผลการทดลองผลของปริมาณรังสีแกมมา ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่าง ๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis*

4.4.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่าง ๆ พบว่า ต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับรังสีแกมมาในปริมาณที่สูงขึ้น มีผลทำให้น้ำหนักสด ความยาวใบ ความกว้างใบ ความหนาใบ จำนวนราก ความยาวราก และเส้นผ่าศูนย์กลางรากลดลงที่เป็นเช่นนี้ อาจเป็นผลมาจากการให้รังสีแกมมากับพืชที่เจริญเติบโตอยู่นั้นจะทำให้เกิดผลได้หลายอย่าง คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน หรือเกิดการกลายพันธุ์ ทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมผิดปกติหรือเปลี่ยนแปลงไป ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช หรือเกิดการตาย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณรังสีที่ได้รับ ชนิดของรังสี ชนิดและอายุของพืชด้วย (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554) แต่ในทางตรงข้ามจำนวนใบกลับมีแนวโน้มสูงขึ้น อาจเป็นผลมาจากที่รังสีมีผลไปลดปริมาณฮอร์โมนออกซินลง ทำให้การเจริญของตามากขึ้น จึงทำให้มีการเกิดใบเพิ่มขึ้น (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Mazuder and Bhowmik (1997) ที่ได้ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อโปรโตคอร์มของ *Spathoglottis plicata* Bl. ในช่วงปริมาณรังสี 5-55 เกรย์ พบว่าโปรโตคอร์มมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ความสูงของต้น ความยาวของใบและรากลดลง เมื่อได้รับปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น และมีค่า LD_{50} ที่ปริมาณรังสีเท่ากับ 30 เกรย์ คล้ายกับการทดลองของ Thammasiri (1998) ได้ทดลองกับโปรโตคอร์มของกล้วยไม้แคทลียาพันธุ์แอลมาคี (*Brassolaeliocattleya* Alma Kee) และพันธุ์กรีนวิช (*Brassolaeliocattleya* Greenwich) พบว่า การฉายรังสีทำให้การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ช้าลง บางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย ผลยิ่งรุนแรงขึ้นเมื่อใช้ปริมาณรังสีที่สูงขึ้น เช่นเดียวกันกับการทดลองของ ธนะกุลมุติวัฒน์ และคณะ (2548) ที่ได้ศึกษาต้นกล้า *Dendrobium* Sonia Earsakul ที่ได้รับรังสีแบบเฉียบพลัน และต้นกล้าที่ได้รับรังสีแบบโครนิก มีการเจริญเติบโตลดลงตามปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้น

4.4.2 การตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา

จากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาคือ ความหนาแน่นปากใบและความยาวปากใบของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆ เปรียบเทียบกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับและรับรังสีแกมมา พบว่า ไม่มีผลทำให้ความหนาแน่นปากใบและความยาวปากใบแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในพืชหลายชนิดที่พบว่า ขนาดปากใบ ความยาวเซลล์ปากใบไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อได้รับรังสีแกมมา เช่น ต้นลิลลี่กลุ่ม Asiatic hybrid (รัศมี ฟักกลัด, 2536)

ต้นหน้าวัวพันธุ์ Double Spathe (วิชชุดา รุ่งเรือง, 2537) ต้นบีโกเนียเร็กซ์ (นงลักษณ์ เทียนเสรี, 2541)

4.4.3 เปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์ของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา

จากการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรีของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่าง ๆ พบว่า นิวเคลียสจากเซลล์ใบกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในทุกอัตรารังสีไม่มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมและไม่พบการเพิ่ม หรือขาดหายไปของจำนวนโครโมโซม เนื่องจากมีฮิสโทแกรมขึ้นบริเวณช่องที่ 200 ทุกชุดการทดลอง จึงยืนยันได้ว่า ต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาทุกต้นเป็นต้นดิพลอยด์ แต่อาจเกิดการกลายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ เนื่องจากพบต้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น ใบหลอด ใบแฉก ใบด่าง ใบยาวเรียวเล็ก ใบหดสั้นและหนาขึ้น ใบเปลี่ยนสีไปจากเดิม จากสีเขียวปนน้ำตาลแดง เป็นสีเขียวทั้งใบ ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาพบว่า การฉายรังสีแกมมามีผลต่อการกลายพันธุ์ของต้นกล้วยไม้คือ ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้น ไม่มีการกลายพันธุ์ แต่มีการกลายพันธุ์ในต้นที่ได้รับรังสีแกมมา ซึ่งเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์จะสูงขึ้น เมื่อได้รับปริมาณรังสีแกมมาที่มากขึ้น ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์สูงที่สุดคือ 24.29 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาออกปลูกในสภาพโรงเรือนนั้น กลับพบว่า มีเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้น้อยลง เมื่อได้รับปริมาณรังสีแกมมาที่สูงขึ้น จะสังเกตเห็นลักษณะของต้นกล้วยไม้มีอาการฉ่ำน้ำ และเน่าตายในที่สุด แล้วยังพบอาการต้นเหี่ยวแห้งตาย เนื่องจากบางต้นมีสภาพไม่แข็งแรง มีรากสั้นกุด และใบเล็กผิดรูปไปจากต้นปกติ ซึ่งต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์หลังจากนำไปปลูกในสภาพโรงเรือนสูงที่สุดคือ 57.14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Thammasiri (1998) ได้ศึกษาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้แคทลียาพันธุ์แอลมาคี (*Brassolaeliocattleya* Alma Kee) และพันธุ์กรีนวิช (*Brassolaeliocattleya* Greenwich) พบว่าปริมาณรังสีระหว่าง 80 กับ 110 เกรย์ เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ และได้ทดลองอีกครั้งโดยใช้จำนวนโปรโตคอร์มเพิ่มขึ้น ผลปรากฏว่าการฉายรังสีทำให้การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ช้าลง บางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย ผลยิ่งรุนแรงขึ้นเมื่อใช้ปริมาณรังสีที่สูงขึ้น และพบว่าปริมาณรังสีที่ระดับ 70 เกรย์ เหมาะสำหรับการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ทั้ง 2 พันธุ์ และสุรวิช วรรณไกรโรจน์ (2526) ก็พบเช่นกันว่า การฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมใน

กุหลาบหินพันธุ์ลาร์โก แต่เมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นการเจริญเติบโตและอัตรารอดชีวิตลดลง และรังสีทำให้ลักษณะใบ การเรียงตัวของใบ ความยาวปล้อง และการแตกกิ่งข้างผิดปกติ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
บทสรุป

การศึกษาผลของระดับความเข้มข้น และระยะเวลาการใช้สารโคลชิซิน ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่าง ๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ลดลง เมื่อได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้น โดยสารละลายจะมีผลทำให้โปรโตคอร์มไลค์บอดี้เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง และสีน้ำตาลจนตายในที่สุด

2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้น มีผลทำให้น้ำหนักสด จำนวนใบ ความยาวใบ จำนวนราก และความยาวรากลดลง แต่ในทางตรงข้ามเส้นผ่านศูนย์กลางราก ความกว้างและความหนาของใบกลับมีแนวโน้มสูงขึ้น

3. ลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้น มีผลทำให้ความหนาแน่นของปากใบลดลง แต่มีความยาวของปากใบสูงขึ้น

4. ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินเกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมสูงขึ้น เมื่อได้รับสารละลายโคลชิซินที่เข้มข้นมากขึ้นและเมื่อได้รับเป็นระยะเวลานานขึ้น ซึ่งต้นกล้วยไม้ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยด์สูงที่สุดคือ 60 เปอร์เซ็นต์

5. ลักษณะภายนอกของต้นดิพลอยด์และเตตระพลอยด์มีความแตกต่างกันคือ ต้นเตตระพลอยด์มีใบสั้นและกว้าง แผ่นใบหนา รากสั้น และมีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นดิพลอยด์

การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่าง ๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณที่สูงขึ้น มีผลทำให้น้ำหนักสด ความยาวใบ ความกว้างใบ ความหนาใบ จำนวนราก ความยาวราก และเส้นผ่านศูนย์กลางรากลดลง แต่จำนวนใบมีแนวโน้มสูงขึ้น

2. ลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณสูงขึ้น ไม่มีผลทำให้ความหนาแน่นของปากใบและความยาวของปากใบแตกต่างกัน

3. ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับและได้รับการฉายรังสีแกมมาทุกต้นไม่พบการเกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม จึงยืนยันได้ว่าต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาทุกต้นเป็นต้นดิพลอยด์ แต่พบลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีการเปลี่ยนแปลงไป เช่น ใบหลอด ใบแฉก ใบด่าง ใบยาวเรียวเล็ก ใบหดสั้นและหนาขึ้น ใบเปลี่ยนสีไปจากเดิมจากสีเขียวปนน้ำตาลแดงเป็นสีเขียวทั้งใบ โดยต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์สูงที่สุดคือ 24.29 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำออกปลูกในสภาพโรงเรือนนั้นกลับพบว่า มีเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้น้อยลง เมื่อได้รับปริมาณรังสีแกมมาที่สูงขึ้น ต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์หลังจากนำไปปลูกในสภาพโรงเรือนสูงที่สุด 57.14 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่าการใช้สารโคลชิซินทุกความเข้มข้น เป็นระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน สามารถชักนำให้เกิดต้นเตตระพลอยด์ได้ ส่วนการทดลองฉายรังสีแกมมาพบต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ ต้นเตตระพลอยด์ และต้นที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปนั้น อาจจะเป็นลักษณะที่ดีกับกล้วยไม้ชนิดนี้ได้ แต่ต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ ควรที่จะมีการศึกษาความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ และควรที่จะศึกษาผลของสารละลายโคลชิซินในความเข้มข้น และระยะเวลาที่แตกต่างกัน และผลของปริมาณรังสีแกมมาที่มีผลต่อลักษณะรูปร่างของดอก สีของดอก จำนวนดอก ระยะเวลาการออกดอก และความแข็งแรงของต้น เพื่อที่จะใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกลักษณะต้นที่ดีเหมาะสม จะนำไปทำเป็นพันธุ์การค้าต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายการอ้างอิง

ครรชิต ธรรมศิริ. (2550). **เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้.** ปรับปรุงครั้งที่ 2. อัมรินทร์พริ้นติ้งแอนพับลิชชิ่ง: กรุงเทพฯ. 283 หน้า.

ดวงกันยา อุบลหล้า. (2550). Orchid Species [ออนไลน์] ได้จาก: http://orchid1234.comyr.com

ธนะ กุลมุติวัฒน์, จิตราพรรณ พิลึก, ธัญญะ เตชะศีลพิทักษ์ และอรุณี วงศ์ปิยะสถิต. (2548). ผลของรังสีแกมมาต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลในสภาพปลอดเชื้อ. **ว. วิทย.กษ.** 36: 669-672.

นงลักษณ์ เทียนเสรี. (2541). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบีโกเนียเร็กซ์และผลของรังสีแกมมา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นพพร สายัมพล. (2543). **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

พรพิมล ธัญญสนธิ. (2538). ผลของโคลชิซินต่อฟ้ามุ่ยในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 46 หน้า.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง. (2550). **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช.** พิมพ์ครั้งที่ 8. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 372 หน้า.

มลวิภา โสมานันท์. (2521). การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้อะแรนดาโดยการใช้โคลชิซิน. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 81 หน้า.

ระพี สาคริก. (2516). **พันธุ์กล้วยไม้ที่น่าสนใจ.** โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว: กรุงเทพฯ. 165 หน้า.

ระพี สาคริก. (2549). **กล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มต้น. พิมพ์ครั้งที่ 3.** บริษัท วศิระ จำกัด: กรุงเทพฯ. 257 หน้า.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. (2541). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2.** กรุงเทพฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 219 หน้า.

รัศมี ฟักกลัด. (2536). การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในลิลลี่. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 74 หน้า

วิชชุดา รุ่งเรือง. (2537). ผลของโคลชิซินและรังสีแกมมาที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์ Double Spathe ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาริณี ไชยเจริญ. (2538). การศึกษาจำนวนโครโมโซม ลักษณะดอก และความสมบูรณ์พันธุ์ของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ดิพลอยด์และออลโลเตตราพลอยด์. **ว. เกษตรศาสตร์** 2: 150-157.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. (2526). ผลของรังสีและสารเคมีต่อกุหลาบหินพันธุ์ลาโกที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2553). ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร [ออนไลน์] ได้จาก: http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. (2540). **การกลายพันธุ์ของพืช.** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 205 หน้า.

สุลาวัลย์ มหาหิงส์ และ สุมนทิพย์ บุนนาค. (2551). การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. [ออนไลน์] ได้จาก: http://ora.kku.ac.th/res_kku/Abstract/AbstractView.asp?Qid=980809015

อบฉันท์ ไทยทอง. (2549). **กล้วยไม้เมืองไทย.** พิมครั้งที่ 11. อัมรินทร์พริ้นติ้งแอนพับลิชชิ่ง: กรุงเทพฯ. 464 หน้า.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิต. (2539). **การใช้รังสีในการปรับปรุงพันธุ์พืช.** ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทปคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิต. (2550). **การกลายพันธุ์: เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 352 หน้า.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิต. (2554). หลักการและวิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี. **ใน การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการการใช้เทคนิคการกลายพันธุ์เพื่อสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์พืช รุ่นที่ 5**. วันที่ 19-21 ตุลาคม 2554. ศูนย์วิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Arditti, J. (1977). **Orchid Biology Reviews and Perspective. Vol. I**. Colnell University Press: London.

Arditti, J. (2008). **Micropropagation of Orchid. 2nd ed**. Blackwell Publishing Ltd. Australia. 1,523 p.

Ariffin, S. and Basiran, M.N. (2002). Increasing characteristic variation in *Dendrobium* orchids Through Acute Irradiation. ***In* Proc. 17th World Orchid Conference.** Malaysia.

Becton Dickinson Co., Ltd. (1996). **FACSCalibur™ System User's Guide**. [On-line]. Available: http://www.rpciflow.org/pdfs/manuals/facscalibur/FACS%20Calibur%20Instrument%20

Guide.PDF

Chaicharoen, S. and Saejew, K. (1980). Autoploidy in *Dendrobium phalaenopsis*. **J. Sci. Soc.** 7:25-32.

Chinachit, W. and Sreemaung, S. (2008). Colchicine affecting the alteration of ploidy level in plantlets of *Eulophia andamanensis* Reichb.f. **Agricultural Sci. J.** 39(3): 275-277.

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

Dermen, H. (1940). Colchicine polyploidy and technique. **Bot. Rev.** 6: 599-635.

Grisebach, R.J. (1981). Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids. **Plant cell Tiss. Org. Cult.** 1: 103-107.

Harn, C. (1970). Radioentivity of cymbidium protocorm. **Amer. Orchid. Soc. Bull.** 39: 499-505.

Harten, A.M. (1998). **Mutation Breeding: Theory and Practical Applications.** Cambridge University Press, United Kingdom. 353 p.

Kim, M.S., Kim, J.Y. and Eun , J.S. (1997). Chromosome doubling of *Cymbidium* hybrid with colchicines treatment in meristem culture. **Amer. Orchid Soc. Bul.** 32: 885-887.

Levesque, R. and SPSS Inc. (2006). **SPSS Programming and Data Management, 3rd Ed.** SPSS Institute. United State of America.

Lin, C.C. (1986). *In vitro* culture of flower stalk internodes of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. **Lindleyana** 1: 158-163.

Mazuder, P.B. and Bhowmik, G. (1997). Effect of Mutagens on *Spathoglottis plicata* Bl. **J. Orchid Soc. India.** 11: 67-74.

Otto, F.J. (1990). DAPI staining of fixed cells for high-resotion flow cytometry of nucler DNA. In: Methods in cell biology. (Eds) Darzynkiewickz Z and Crissman HA. **San Diego: Academic Press**, 33: 105–110.

Przywara, L., Pandey, K.K. and Sanders, P.M. (1999). Length of stomata as an indicator of ploidly level in *Actinidia deliciosa.* **New Zeal J Bot**. 26: 179-182.

Sanguthai, O., Sanguthai, S. and Kamemoto, H. (1973). Chromosome doubling of a *Dendrobium* hybrid with colchicines in meristem culture. **Na Okika o Hawaii.** 2: 12-16.

Sheehan, T.J. (2002). **Ultimate Orchid.** DK Publishing: London. 358 p.

Silva, P.A.K.X., Callegari-Jacques, S. and Bodanese-Zanerttini, M.H. (2000). Induction and

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (ORCHIDACEAE) by in vitro techniques. **Ciência Rural.** 30(1): 105-111.

Taji, A., Kumar, P. and Lakshmanan, P. (2001). ***In Vitro* Plant Breeding**. Haworth Press, Inc.: New York. 167 p.

Thammasiri, K. (1998). Effect of gamma irradiation on protocorm-like bodies of *Cattleya* Alliance. ***In* Proc. 15th World Orchid Conference**: 403-409.

Vacine, E.F. and Went, F.W. (1949). Some pH change in nutrient solutions. **Bot. Gaz.** 110: 605-613.

Vajrabhaya, T. (1977). **Orchid Biology Reviews and Perpectives II**. Cornell University Press, New York.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

การเตรียม Stock solution Vacine and Went

Stock solution A (100 เท่า) ประกอบด้วยสารเคมี ดังนี้

โปแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)	52.50 กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	25.00 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	50.00 กรัม

นำสารแต่ละชนิดละลายในน้ำกลั่นตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

Stock solution B (100 เท่า) ประกอบด้วยสารเคมี ดังนี้

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	25.00 กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4\ H_2O$)	0.75 กรัม

นำสารแต่ละชนิดละลายในน้ำกลั่นตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

Stock NaFeEDTA solution

นำ $Na_2EDTA.2H_2O$ ปริมาณ 37.22 กรัม และ $FeSO_4.7H_2O$ ปริมาณ 27.8 กรัม ใส่รวมกันใน Erlenmeyer flask ขนาด 2 ลิตร เติมน้ำปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วต่อสายยางตรงกลางที่มีกรองอากาศ โดยมีสำลีอัดไม่แน่นเกินไปในหลอดแก้วที่ต่อเชื่อมสายยางด้านหนึ่งกับ pipet ที่จุ่มอยู่ในสารละลาย ปลายสายยางอีกด้านหนึ่งต่อเข้ากับท่อลม ปิดฝาด้วย foil โดยให้มีช่องสำหรับอากาศออกได้ ปล่อยอากาศผ่านเข้าไปในของเหลวขณะที่คนตลอดเวลา ปรับอากาศที่เป่าให้แรง ระวังอย่าให้ของเหลวกระเด็นขึ้นข้างบน ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 5-6 ชั่วโมง หรือจนสารละลายใสกลายเป็นสีสนิมเหล็ก แล้วปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปใส่ในขวดสีชาเก็บในตู้เย็น

ขั้นตอนการเตรียมอาหารดัดแปลงสูตร Vacine and Went ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1. ใช้ stock solution A ปริมาตร 10 มิลลิลิตร stock solution B ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ stock NaFeEDTA solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2. เติม $Ca_3(PO_4)_2$ ปริมาณ 0.2 กรัม ที่ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N จนสารละลายกลายเป็นของเหลวสีใส

3. เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัม น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร กล้วยปั่น 100 กรัม มันฝรั่งบด 50 กรัม และผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัม

4. เติมน้ำให้ครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 5.4

5. เติมวุ้นปริมาณ 7 กรัม ต้มจนวุ้นละลายหมด

6. เทลงในขวดแก้วปิดฝา แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นจนอาหารแข็งตัวจึงนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การรอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (% w/v) (C)	**ระยะเวลา (วัน) (D)**				**เฉลี่ย**
	1	**3**	**5**	**7**	
	เปอร์เซ็นต์การรอดของโปรโตคอร์ม (%)				
0	98.10	97.14	96.19	97.14	97.14 A
0.05	75.24	62.86	51.43	41.90	57.86 B
0.075	58.10	50.48	47.62	34.29	47.62 C
0.1	40.95	25.71	12.38	4.76	20.95 D
เฉลี่ย	68.10 W	59.05 X	51.90 Y	44.52 Z	55.89

F-test C**, D**, CxD** CV. (%) = 9.06

ตารางผนวกที่ 2 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของต้นกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* ที่มีอายุ 10 เดือนหลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (% w/v) (C)	**ระยะเวลา (วัน) (D)**				**เฉลี่ย**
	1	**3**	**5**	**7**	
	น้ำหนักสด (กรัม)				
0	1.773	1.803	1.787	1.791	1.789 A
0.05	1.315	1.193	1.106	1.103	1.179 B
0.075	1.031	1.079	1.085	1.033	1.057 C
0.1	0.869	0.773	0.714	0.600	0.739 D
เฉลี่ย	1.247 Y	1.212 YZ	1.173 Z	1.132 Z	1.191

F-test C**, D**, CxD** CV. (%) = 8.28

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 3 ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของต้นกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* ที่มีอายุ 10 เดือนหลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (% w/v) (C)	**ระยะเวลา (วัน) (D)**				
	1	**3**	**5**	**7**	**เฉลี่ย**
	จำนวนใบ				
0	4.67	4.62	4.57	4.62	4.62 A
0.05	4.00	4.05	4.10	4.05	4.05 B
0.075	4.00	3.95	3.81	3.71	3.87 B
0.1	3.48	3.14	3.14	2.63	3.15 C
เฉลี่ย	4.04	3.94	3.90	3.89	3.94

F-test C**, D^{ns}, CxD^{ns} CV. (%) = 10.18

ตารางผนวกที่ 4 ค่าเฉลี่ยความยาวใบของต้นกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* ที่มีอายุ 10 เดือน หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (% w/v) (C)	**ระยะเวลา (วัน) (D)**				
	1	**3**	**5**	**7**	**เฉลี่ย**
	ความยาวใบ (มิลลิเมตร)				
0	39.22	39.39	39.28	39.01	39.22 A
0.05	35.58	35.59	31.37	29.54	33.02 B
0.075	30.89	30.82	27.79	27.26	29.19 C
0.1	28.04	25.13	21.34	20.25	23.69 D
เฉลี่ย	33.43 Y	32.73 Y	29.94 Z	29.01 Z	31.28

F-test C**, D*, CxD** CV. (%) = 8.22

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 5 ค่าเฉลี่ยความกว้างใบของต้นกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* ที่มีอายุ 10 เดือนหลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (% w/v) (C)	**ระยะเวลา (วัน) (D)** 1	3	5	7	**เฉลี่ย**
	ความกว้างใบ (มิลลิเมตร)				
0	6.57	6.56	6.53	6.58	6.56 C
0.05	7.06	6.91	6.83	7.37	7.04 AB
0.075	7.49	7.51	7.32	7.03	7.34 A
0.1	7.39	6.92	7.10	5.54	6.74 B
เฉลี่ย	7.13 Y	6.98 YZ	6.94 YZ	6.63 Z	6.92

F-test C**, D*, CxD** CV. (%) = 8.22

ตารางผนวกที่ 6 ค่าเฉลี่ยความหนาใบของต้นกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* ที่มีอายุ 10 เดือนหลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (% w/v) (C)	**ระยะเวลา (วัน) (D)** 1	3	5	7	**เฉลี่ย**
	ความหนาใบ (ไมโครเมตร)				
0	287.95	289.46	292.23	292.27	290.48 B
0.05	312.29	324.82	331.67	340.79	327.39 A
0.075	323.99	330.30	340.22	350.30	336.20 A
0.1	326.40	339.48	341.31	348.28	338.87 A
เฉลี่ย	312.66 Z	321.02 YZ	326.36 YZ	332.91 Y	323.24

F-test C**, D*, CxD^{ns} CV. (%) = 8.17

ตารางผนวกที่ 7 ค่าเฉลี่ยจำนวนรากของต้นกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* ที่มีอายุ 10 เดือนหลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (% w/v) (C)	**ระยะเวลา (วัน) (D)**				
	1	**3**	**5**	**7**	**เฉลี่ย**
	จำนวนราก				
0	7.12	7.10	7.14	7.05	7.10 A
0.05	6.05	6.10	5.67	5.62	5.86 B
0.075	4.52	4.81	4.38	3.62	4.33 C
0.1	3.24	3.14	2.71	1.5	2.65 D
เฉลี่ย	5.23 Y	5.29 Y	4.97 Z	4.45 Z	4.99

F-test C**, D**, CxD** CV. (%) = 8.98

ตารางผนวกที่ 8 ค่าเฉลี่ยความยาวรากของต้นกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* ที่มีอายุ 10 เดือนหลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (% w/v) (C)	**ระยะเวลา (วัน) (D)**				
	1	**3**	**5**	**7**	**เฉลี่ย**
	ความยาวราก (มิลลิเมตร)				
0	29.46	29.62	29.20	29.45	29.43 A
0.05	26.18	25.67	24.59	21.80	24.56 B
0.075	21.99	20.09	17.52	15.99	18.90 C
0.1	15.25	12.84	10.13	6.85	11.27 D
เฉลี่ย	23.22 X	22.06 Y	20.36 Z	18.52 Z	21.04

F-test C**, D**, CxD** CV. (%) = 5.46

ตารางผนวกที่ 9 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางรากของต้นกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* ที่มีอายุ 10 เดือน หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (% w/v) (C)	**ระยะเวลา (วัน) (D)**				
	1	**3**	**5**	**7**	**เฉลี่ย**
	เส้นผ่านศูนย์กลางราก (ไมโครเมตร)				
0	896.38	897.87	895.42	899.95	897.41 B
0.05	931.50	945.41	969.58	971.49	954.50 A
0.075	951.14	965.61	986.46	997.98	975.30 A
0.1	970.02	989.23	992.64	978.01	982.48 A
เฉลี่ย	937.26	949.53	961.03	961.86	952.42

F-test C**, D^{ns}, CxD^{ns} CV. (%) = 8.36

ตารางผนวกที่ 10 ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นปากใบของต้นกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* ที่มีอายุ 10 เดือน หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (% w/v) (C)	**ระยะเวลา (วัน) (D)**				
	1	**3**	**5**	**7**	**เฉลี่ย**
	ความหนาแน่นปากใบ (ปากใบ/ตร.มม.)				
0	41.17	40.5	40.59	39.39	40.41 A
0.05	37.85	37.13	36.95	35.13	36.77 B
0.075	37.37	35.93	35.41	33.22	35.48 BC
0.1	35.48	34.08	33.15	31.06	33.44 C
เฉลี่ย	37.97 Y	36.91 YZ	36.53 YZ	34.70 Z	36.53

F-test C**, D*, CxD^{ns} CV. (%) = 11.32

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 11 ค่าเฉลี่ยความยาวปากใบของต้นกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* ที่มีอายุ 10 เดือนหลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (% w/v) (C)	**ระยะเวลา (วัน) (D)**				
	1	**3**	**5**	**7**	**เฉลี่ย**
	ความยาวปากใบ (ไมโครเมตร)				
0	17.68	17.6	17.88	17.85	17.75 C
0.05	18.67	19.18	19.58	20.26	19.42 B
0.075	19.83	20.21	20.73	21.54	20.58 B
0.1	20.50	21.56	22.95	23.63	22.16 A
เฉลี่ย	19.17 Z	19.64 YZ	20.29 YZ	20.82 Y	19.98

F-test C**, D*, CxD^{ns} CV. (%) = 10.80

ตารางผนวกที่ 12 เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยด์ของต้นกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* ที่มีอายุ 10 เดือนหลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (% w/v) (C)	**ระยะเวลา (วัน) (D)**				
	1	**3**	**5**	**7**	**เฉลี่ย**
	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยด์				
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.05	9.52	14.29	19.05	23.81	16.67
0.075	19.05	23.81	28.57	38.10	27.38
0.1	28.57	38.10	45.45	60.00	43.03
เฉลี่ย	14.29	19.05	23.27	30.48	21.77

ประวัติผู้เขียน

นายจินดา เดชบุญ เกิดเมื่อวันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2528 ณ ตำบลหนองปลาไหล อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี เริ่มศึกษาชั้นประถมปีที่ 1-6 ที่โรงเรียนวัดหนองเกตุใหญ่ ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 1-6 ที่โรงเรียนบางละมุง จังหวัดชลบุรี และสำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตพืช) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2550

ในปี พ.ศ. 2551 ได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยขณะศึกษาได้รับทุนการศึกษาสำหรับผู้มีศักยภาพเข้าศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นอกจากนี้ ยังได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และทุนจากมูลนิธิพระบรมราชานุสรณ์พระบาทสมเด็จพระปกเกล้าเจ้าอยู่หัวและสมเด็จพระนางเจ้ารำไพพรรณี เพื่อทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา

ผลงานวิจัย : ได้เข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานทางวิชาการ ภาคโปสเตอร์ เรื่อง Genetic variation induction in *Doritaenopsis* hybrid by gamma irradiation *in vitro*. ในการประชุมวิชาการ Asia Pacific Orchid Conference ครั้งที่ 11 ระหว่างวันที่ 2-4 กุมภาพันธ์ 2556 ณ จังหวัดโอกินาวา ประเทศญี่ปุ่น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี