รหัสโครงการ SUT3-302-53-12-29

รายงานการวิจัย

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

Genetic Variation in *Doritaenopsis* hybrids induced mutation *in vitro*

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-302-53-12-29

รายงานการวิจัย

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

Genetic Variation in *Doritaenopsis* hybrids induced mutation *in vitro*

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อารักษ์ ธีรอำพน

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2555-2556

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2557

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2555-2556 ในการนี้ขอขอบคุณหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้บริการห้องฉายรังสีแกมมาที่มีโคบอลท์-60 เป็นต้นกำเนิดรังสีใช้ในการฉายแบบโครนิก ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและฟาร์มมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้บริการห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและโรงเรือนเลี้ยงกล้วยไม้ ขอขอบคุณบุคคลที่เกี่ยวข้องได้แก่ คุณนิภาวัลย์ เหมไธสง หัวหน้างานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คุณเทวารักษ์ ติชาวัน หัวหน้างานไม้ดอกไม้ประดับ คุณวันดี ธีรอำพน ผู้ช่วยวิจัย ทั้งนี้ บุคคลที่ต้องกล่าวขอบคุณและยกย่องอย่างยิ่ง คือ นายจินดา เดชบุญ บัณฑิตปริญญาโทภายใต้การกำกับดูแล ซึ่งปฏิบัติหน้าที่ด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการช่วงวิกฤติเป็นอย่างดี เป็นผู้ที่บากบั่นเก็บรายละเอียดของทุกข้อมูลด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยทักษะ ความรู้ ความสามารถ และความรับผิดชอบอย่างสูง จนทำให้การดำเนินงานของโครงการวิจัยเป็นไปด้วยความเรียบร้อยตามวัตถุประสงค์ สร้างความพึงพอใจแก่หัวหน้าโครงการวิจัยและอาจารย์ที่ปรึกษา

อารักษ์ ธีรอำพน

สิงหาคม 2557

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสายพันธุ์กล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ให้มีลักษณะที่ดี แตกต่างไปจากเดิม ด้วยการใช้สารโคลชิซินและรังสีแกมมาในสภาพปลอดเชื้อ แบ่งเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้สารโคลชิซินชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD มี 7 ซ้ำ โดยการนำโปรโตคอร์มที่มีขนาด 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 จากนั้นนำโปรโตคอร์มไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง VW สังเกตการเปลี่ยนแปลงของโ ปรโตคอร์ม พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลารับสารโคลชิซินทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มลดลง และเมื่อ โปรโตคอร์มเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนจนมีอายุ 10 เดือน บันทึกการเจริญเติบโตและปริมาณดีเอ็นเอ พบว่า ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้น ให้น้ำหนักสด จำนวนใบ ความยาวใบ จำนวนราก ความยาวราก และความหนาแน่นปากใบลดลง ในขณะที่เส้นผ่าศูนย์กลางราก ความกว้างใบ ความหนาของใบ และความยาวปากใบมีแนวโน้มสูงขึ้น นอกจากนี้ต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยด์สูง โดยเฉพาะเมื่อใช้สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นาน 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยด์สูงที่สุด คือ 60 เปอร์เซ็นต์ ต้นเตตระพลอยด์ที่ได้มีใบสั้นและกว้าง แผ่นใบหนา รากสั้น และมีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นดิพลอยด์ การทดลองที่ 2 เพื่อศึกษาปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 7 ซ้ำ โดยการนำโปรโตคอร์มที่มีขนาด 2-3 มิลลิเมตร ไปฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 0, 50, 100, 150 และ 200 เกรย์ จากนั้นนำโปรโตคอร์มไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง VW สังเกตการเปลี่ยนแปลงของโปรโตคอร์ม เมื่อโปรโตคอร์มเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนจนมีอายุ 10 เดือน บันทึกการเจริญเติบโตและปริมาณดีเอ็นเอ พบว่า ต้นที่ได้ฉายรังสีแกมมามีน้ำหนักสด ความยาวใบ ความกว้างใบ ความหนาใบ จำนวนราก ความยาวราก และเส้นผ่าศูนย์กลางรากลดลง แต่มีจำนวนใบมาก ในขณะที่ความหนาแน่นและความยาวของปากใบ และปริมาณดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น ใบหลอด ใบแฉก ใบด่าง ใบยาวเรียวเล็ก ใบหดสั้นและหนาขึ้น ใบเปลี่ยนสีไปจากเดิมจากสีเขียวปนน้ำตาลแดงเป็นสีเขียวทั้งใบ และมีเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์สูงขึ้นเมื่อได้รับปริมาณรังสีแกมมามากขึ้น โดยที่ระดับ 200 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์สูงที่สุด คือ 24.29 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาออกปลูกในสภาพโรงเรือน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้น้อยลงเมื่อได้รับปริมาณรังสีแกมมาที่สูงขึ้น โดยต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์หลังจากนำไปปลูกในสภาพโรงเรือนสูงที่สุด คือ 57.14 เปอร์เซ็นต์

Abstract

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 a colchicine treated. The experimental design was Factorial in CRD with 7 replications. The 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 the increasing in the concentration and the duration of colchicine could make percent survival of PLBs decreased. After 10 months, morphology, physiology and DNA content were investigated. The results showed that the higher the concentrations and the longer durations could decrease 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 the high percentage of tetraploid plant. Especially, the plant exposure to colchicine at 0.1 % (w/v) 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 transferring 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 were decrease with an increasing exposure dosage. However, the number of leaves increased. While, stomatal density, stomatal length and DNA contents were showed not any differences. 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 radiation doses of 200 Gy (24.29 %). Furthermore, the higher radiation exposured gave affected the higher mortality of the plants after removing from tissue culture. Plant exposured to gamma radiation at 50 Gy showed the highest survival rate of mutation (54.54 %).

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

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

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

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นและระยะเวลาในการใช้สารโคลชิซิน และระดับรังสีแกมมาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis*

2. เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพันธุศาสตร์ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากการได้รับสารโคลชิซินและรังสีแกมมา

3. เพื่อเป็นแนวทางและการปรับปรุงให้ได้กล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่ที่มีดอกขนาดใหญ่ สีสันสดใส และมีลักษณะแปลกใหม่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นหนทางไปสู่การพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ตัดดอกหรือกล้วยไม้กระถาง ซึ่งเป็นพืชที่มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทย และให้เป็นที่ต้องการของตลาดโลก

ขอบเขตของการวิจัย

ในการวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาหาความเข้มข้นและระยะเวลาในการใช้สารโคลชิซินและรังสีแกมมา เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพันธุศาสตร์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์กล้วยไม้ให้มีความหลากหลายมากขึ้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความเข้มข้นและระยะเวลาในการใช้สารโคลชิซิน และระดับรังสีแกมมาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis*

2. ทราบถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพันธุศาสตร์เพื่อแยกความแตกต่างของกล้วยไม้สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการใช้สารโคลชิซินและรังสีแกมมาได้

3. ทำให้ได้กล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะแปลกใหม่เกิดขึ้นซึ่งอาจพัฒนาเป็นพันธุ์ทางการค้าต่อไป

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของข้อมูล

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 ใบแบนกว้างค่อนข้างหนา สีเขียวหรือสีเขียวอมม่วง ช่อดอกตั้ง ยาว แข็ง และตรง ดอกมีสีแดงอ่อนถึงสีแดงอมม่วง กลีบเลี้ยงและกลีบดอกคู่ล่างกางและลู่ไปทางด้านหลัง ทำให้เห็นเส้าเกสรเด่นชัด ดอกจะทยอยบานจากโคนถึงปลายช่อดอก และมีช่วงฤดูการออกดอกตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงเดือนธันวาคม(ดวงกันยา อุบลหล้า, 2550; อบฉันท์ ไทยทอง, 2549) นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์ย่อยหรือวาไรตี้ (variety) ซึ่งพบในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย คือ พันธุ์บีสโซเนียนา (*Doritis pulcherrima* var. buyssoniana) หรือที่เรียกกันว่า แดงอุบล ซึ่งมีดอกขนาดใหญ่กว่าปกติ และพบว่า มีโครโมโซมเป็น 2 เท่าของม้าวิ่งทั่วไป คือ 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) สำหรับประเทศไทยพบ กล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิสในธรรมชาติ 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 ทั้ง

รูปทรงและสีของดอก เช่น ดอกกลมใหญ่ กลีบดอกหนา ดอกมีหลากหลายสีและมีลวดลายแปลกตา การที่กล้วยไม้สกุลฟาแลนอป-ซิสมีดอกที่สวยงาม และไม่ต้องการแสงมาก จึงนิยมปลูกเลี้ยงเป็นไม้กระถางเพื่อประดับตกแต่งภายในอาคาร สวนหย่อม และนำมาประดับแจกันหรือเป็นของขวัญในโอกาสสำคัญต่างๆ

จากลักษณะเด่นดังกล่าว นักปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้จึงนิยมนำกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสกุล ฟาแลนอปซิส มาผสมข้ามสกุลกัน เพื่อให้ได้ดอกที่มีสีชมพูสด และลวดลายที่แปลกไปจากเดิม ทำให้ได้เป็นสกุลใหม่ คือ *Doritaenopsis* โดยมีลูกผสมที่ได้มีการจดบันทึกไว้ใน Sander's List of Orchid Hybrids (หนังสือที่รวบรวมรายชื่อลูกผสมกล้วยไม้ มีการตีพิมพ์ครั้งแรกเมื่อ ค.ศ. 1947) ต้นแรก คือ *Doritaenopsis* Arashi ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง *Phalaenopsis lindeni* กับ *Doritis pulcherrima* (Arditti, 2008) กล้วยไม้สกุลนี้มีลักษณะดอก ช่อดอก และสีสันลวดลายที่สวยงาม จึงเป็นที่ต้องการของตลาดอย่างมาก (Sheehan, 2002) แต่กล้วยไม้ลูกผสมข้ามชนิดหรือข้ามสกุล ต้นที่ได้มักมีขนาดดอกเล็กลง แต่ขนาดต้นใหญ่ขึ้น และมักจะแสดงอาการเป็นหมัน คือ เมื่อนำไปผสมพันธุ์จะไม่ติดฝัก บางครั้งติดฝักแต่หลุดไป หรือฝักแก่แล้วไม่มีเมล็ด เป็นต้น เนื่องจากสายพันธุ์ของพ่อและแม่มีความแตกต่างกันของโครโมโซม จึงส่งผลให้โครโมโซมของลูกผสมไม่สามารถเข้าคู่กันได้ ดังนั้น จึงได้มีการชักนำให้เกิดการสร้างโครโมโซมเพิ่มขึ้นในลูกผสมเพื่อให้สามารถผสมพันธุ์กับต้นอื่นและผลิตเมล็ดได้ (ระพี สาคริก, 2516) แต่กล้วยไม้เป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตช้า และมีอัตราการงอกของเมล็ดในสภาพธรรมชาติค่อนข้างต่ำ ส่งผลให้มีโอกาสที่จะได้ต้นที่มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมหรือการกลายพันธุ์ในธรรมชาติเป็นไปได้น้อย จึงต้องมีการใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์เข้ามาช่วยชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น (Arditti, 1977)

การกลายพันธุ์ในพืช

การกลายพันธุ์ คือ การเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต อันเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของยีนจากสภาพหนึ่งไปเป็นอีกสภาพหนึ่ง เช่น ยีนเด่นอาจเปลี่ยนเป็นยีนด้อย หรือยีนด้อยเปลี่ยนเป็นยีนเด่น เรียกว่า การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) และยังรวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซมแบบต่างๆ เช่น การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน การสูญหาย หรือการเพิ่มเข้ามาของโครโมโซมที่ครอบคลุมมากกว่าหนึ่งยีน เรียกว่า 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 รังสีต่างๆ ที่มีในธรรมชาติ และสารเคมีต่างๆ ที่ปะปนอยู่ในสภาพแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงของยีนจากสื่อเหล่านี้อาจมีเพียงเล็กน้อยและอัตราต่ำ แต่มีความสำคัญต่อวิวัฒนาการของพืช และในปัจจุบันนี้มีการแนะนำว่าการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น

ตามธรรมชาติ อาจเกิดจากหน่วยชนิดหนึ่งเรียกว่า transposons ที่เคลื่อนที่ไปตามหรือระหว่างโครโมโซม เมื่อไปจับใกล้ยีนใดก็ทำให้ยีนนั้นเปลี่ยนสภาพได้ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550)

ปัจจัยที่ทำให้เกิดการกลายตามธรรมชาติของพืช

1. ปัจจัยภายในพืช

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

1.2 ภาวะทางสรีระของพืช อายุในทางสรีระ (physiological ageing) ของเมล็ดพืชมีผลต่อความถี่ของการกลายตามธรรมชาติ มีการปลูกเมล็ดพืชที่เก็บไว้เป็นเวลานาน เปรียบเทียบกับเมล็ดที่เพิ่งเก็บเกี่ยวมาใหม่ พบว่าต้นที่ได้จากเมล็ดที่เก็บไว้เป็นเวลานาน แม้จะเก็บในสภาพที่เหมาะสม มีการกลายตามธรรมชาติหรือมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูงกว่าต้นที่เกิดจากเมล็ดใหม่ ทั้งนี้ ในการเก็บเมล็ดไว้เป็นเวลานานๆ เมล็ดยังมีกระบวนการเมเทบอลิซึม ทำให้มี เมเทบอไลต์ และของเสียอื่นๆ เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยสารที่เกิดขึ้นเหล่านี้ อาจมีสมบัติเป็นสิ่งก่อการกลายขึ้นได้เองตามธรรมชาติ (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554)

1.3 สิ่งก่อการกลายในพืชที่เกิดเองตามธรรมชาติ กระบวนการเมเทบอลิ-ซึมในพืช ทำให้ได้เมเทบอไลต์หลายชนิดที่เป็นสิ่งก่อการกลาย ได้แก่ สารที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ อะมีน 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 พบว่า ต้นที่ได้จากเมล็ดที่ผ่านการให้ความร้อนมีความผิดปกติของโครโมโซมและการกลายสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับความร้อน (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554)

2.3 รังสีที่มีอยู่ในธรรมชาติ หลังจากที่ Muller ค้นพบว่ารังสีมีคุณสมบัติเป็นสิ่งก่อการกลายแล้ว จึงมีความคิดกันว่า รังสีที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติ ได้แก่ รังสีที่เกิดจากการสลายตัวของนิวไคลด์กำมันตรังสี เช่น ยูเรเนียม ทอเรียม รังสีคอสมิกจากนอกโลก ตลอดจน นิวไคลด์กัมมันตรังสีที่มนุษย์นำมาใช้ในด้านการแพทย์ เกษตร และอุตสาหกรรม น่าจะมีส่วนทำให้เกิดการกลายตามธรรมชาติได้ (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554)

2. การกลายพันธุ์ของพืชที่เกิดจากสิ่งกระตุ้น (induce mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจากการที่พืชได้รับสิ่งกระตุ้นการกลายพันธุ์ (mutagen) ซึ่งสิ่งกระตุ้นการกลายพันธุ์นั้นมี 2 ชนิด คือ

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

2.2 สารเคมี มีสารเคมีหลายชนิดสามารถกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ ได้แก่

2.2.1 อัลไคเลติงเอเจนต์ (alkylating agent) คือ สารเคมีพวกที่มีหมู่อัลคีล ซึ่งก่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการที่กลุ่มอัลคีลทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของดีเอ็นเอ ทั้งกับกลุ่มฟอสเฟตและกลุ่มเบสพวกไพริมีดีน จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน นอกนั้นก็ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซมได้ด้วยเช่นกัน สารที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ Ethyl methanesulphonate (EMS) หรือบางครั้งเรียกว่า Radiomimetic substance ซึ่งให้ผลคล้ายกับรังสีอย่างมาก (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550)

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

2.2.3 อะคริดินส์ (acridine) สารเคมีในกลุ่มนี้เป็นพวกสีย้อม ได้แก่ proflavin, acriflavin, acridine orange และ ethidium bromide สารเคมีเหล่านี้มีผลต่อดีเอ็นเอโดยตรง เช่น ethidium bromide ทำให้มีคู่เบสเพิ่มขึ้นหรือลดลง (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550)

2.2.4 สารเคมีอื่นๆ มีอีกหลายชนิดที่ทำให้พืชกลายพันธุ์ เช่น โซเดียมเอ-ไซด์ (sodium azide) มีประสิทธิภาพทำให้กลายพันธุ์สูง ทำให้เกิดการหักขาดของโครโมโซม (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550)

3. ชนิดของการกลายพันธุ์

จากการใช้รังสี แสง และสารเคมี เพื่อก่อให้เกิดการกลายพันธุ์นั้น อาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้หลายรูปแบบ ซึ่งแยกออกได้ ดังนี้

3.1 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับยีนหลายยีน เพราะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง หรือจำนวนโครโมโซม สามารถแบ่งการกลายของโครโมโซมเป็น 2 ชนิด คือ

การกลายเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม การกลายประเภทนี้เป็นผลจากการแตกหักของโครโมโซม ซึ่งอาจเกิดเองได้ตามธรรมชาติหรือจากการเหนี่ยวนำ และการกลายเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554)

4. การเปลี่ยนแปลงของยีน การเปลี่ยนแปลงอาจเป็นสภาพข่มหรือสภาพด้อย การเปลี่ยนแปลงของยีนนี้อาจทำให้ปรากฏผลได้ 2 แบบ คือ

4.1 มาโครมิวตานต์ (macro mutant) หมายถึง การกลายพันธุ์ที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาหรือสามารถแยกได้ด้วยวิธีการง่ายๆ หรือหากแยกไม่ได้ด้วยสายตา ก็อาจแยกได้ด้วยเทคนิคง่ายๆ

4.2 ไมโครมิวตานต์ (micro mutant) คือ การกลายพันธุ์ที่มีค่าในเชิงปริมาณมากกว่าคุณภาพ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของยีนเป็นกลุ่มๆ สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคพิเศษ เช่น วิธีการทางสถิติเท่านั้น เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงโดยวิธีนี้ก็จะทำให้ความปรวนแปรของพืชชนิดนั้นเพิ่มขึ้นจากเดิม และเมื่อมีการคัดเลือกลักษณะใดๆ จากการกลายพันธุ์ อาจทำให้ลักษณะเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่ต้องการก็ได้ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550)

5. การนำพันธุ์กลายไปใช้ประโยชน์

เมื่อได้พันธุ์กลายจากการเหนี่ยวนำแล้ว สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ 2 ทาง คือ

5.1 การใช้ประโยชน์พันธุ์กลายโดยตรง พันธุ์กลายที่มีลักษณะดีตามวัตถุประสงค์ของการปรับปรุงพันธุ์ รวมทั้งลักษณะอื่นๆ ซึ่งเป็นลักษณะเดิมยังคงดีอยู่ ก็สามารถนำไปใช้เป็นพันธุ์ใหม่ได้โดยตรง คือ นำมาขยายพันธุ์และส่งเสริมให้เป็นพันธุ์ปลูกสำหรับเกษตรกร ได้ทันทีหลังจากที่ผ่านการทดสอบพันธุ์และรับรองพันธุ์ของหน่วยงานที่เกี่ยวข้องแล้ว

5.2 การใช้ประโยชน์พันธุ์กลายทางอ้อม พันธุ์กลายที่มีลักษณะน่าสนใจแต่ยังไม่ดีพอที่จะนำมาขยายพันธุ์และส่งเสริมเป็นพันธุ์ใหม่ได้โดยตรง เนื่องจากยังมีลักษณะที่ไม่ดีหรือลักษณะที่ไม่ต้องการร่วมอยู่ด้วย นักปรับปรุงพันธุ์พืช อาจนำพันธุ์กลายลักษณะเช่นนี้ไปใช้ในการผสมพันธุ์ เพื่อถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการจากพันธุ์กลายเข้าไปยังพืชที่ต้องการปรับปรุงซึ่งยังขาดลักษณะนี้อยู่ (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554)

จากลักษณะที่กล่าวมาเรื่องการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชนั้น มีหลายสิ่งที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ แต่สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ได้มีการนำสารโคลชิซิน และรังสีแกมมา มาใช้เป็นสิ่งก่อการกลายพันธุ์เพื่อชักนำให้ได้กล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่

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 มีสูตรเคมี คือ $C_{22}H_{25}NO_6$ เป็นสารอัลคาลอยด์ (Alkaloid) ที่สกัดได้จากเมล็ดและหัวของ *Colchicum autumnale* (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2541) สารนี้จะมีผลยับยั้งการสร้างสายดึงโครโมโซม (spindle fiber) หรือบังคับไม่ให้เส้นใยสายนี้ทำงานได้ตามปกติ ซึ่งส่งผลให้เส้นโครมาติด (chromatid) ของโครโมโซมอันหนึ่ง ๆ เข้าไปอยู่ในเซลล์เดียวกัน ทำให้การแบ่งเซลล์แบบ

ไมโตซิส (mitosis) มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากเดิม 2 เท่า ดังนั้นถึงแม้ว่า mitosis จะเกิดปกติ แต่เซลล์และเนื้อเยื่อที่ได้จะเป็นโพลีพลอยด์ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550) จึงนิยมนำสารโคลชิซินมาใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถเคลื่อนย้ายไปตามส่วนต่างๆ ของพืช โดยยังรักษารูปเดิม และสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เป็นเวลานาน ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับโครงสร้างของยีน และมีประสิทธิภาพสูง (นพพร สายัมพล, 2543) ทำให้มีการใช้ในกล้วยไม้ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของต้นและดอกไปในทางที่ดีขึ้น เช่น ลำต้นอวบใหญ่ ปล้องสั้นและต้นเตี้ยลง ใบกว้างหนาและมีสีเขียวเข้มขึ้น ทำให้มีการสังเคราะห์แสงสูงขึ้น ส่วนดอกจะออกดอกเร็วและมีขนาดใหญ่ขึ้น กลีบเลี้ยงและกลีบดอกเหลื่อมกัน มีความหนาและมีสีเข้มขึ้น อายุการบานของดอกนานกว่าต้นปกติ เพิ่มความต้านทานต่อโรคและแมลง นอกจากนี้ยังช่วยลดความเป็นหมันของต้นลูกผสมได้ ทำให้สามารถนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ได้ โดยที่ยังมีพฤติกรรมเหมือนพันธุ์แท้ (ครรชิต ธรรมศิริ, 2550)

ชิ้นส่วนที่เหมาะสำหรับนำมาชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซม คือ ชิ้นส่วนที่เซลล์กำลังมีการแบ่งตัว (ส่วนของเมล็ดหรือเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ) (Dhawan and Lavama, 1996) ส่วนความเข้มข้นของโคลชิซินนิยมใช้ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.0006 ถึง 3.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงขึ้นไป หากความเข้มข้นมากหรือระยะเวลานานเกินไปจะทำให้เซลล์พืชตายได้ (Dermen, 1940) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นและช่วงเวลาในการใช้สารโคลชิซินขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของกล้วยไม้ซึ่งมีความแตกต่างกัน เช่น ในกล้วยไม้ *Cattleya intermedia* L. Silva et al. (2000) ได้ศึกษาในโปรโตคอร์ม พบว่าระดับความเข้มข้น 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 และพบว่าต้นโพลีพลอยด์ที่ได้มีลักษณะแตกต่างจากต้นดิพลอยด์ คือ มีลำต้นและใบขนาดใหญ่กว่า แต่มีความสูงของต้นและความยาวของใบน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ เช่นเดียวกัน Chaicharoen and Saejew (1980) ได้ศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบและดอก และการงอกของละอองเรณูของดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ใน *Dendrobium phalaenopsis* ที่ได้จากการนำ โปรโตคอร์มแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 9 วัน พบว่าเป็น เตตระพลอยด์ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ การเจริญของต้นเตตระพลอยด์ช้ากว่าของดิพลอยด์ ใบของต้นเตตระพลอยด์หนากว่าและขนาดของเซลล์คุมใหญ่กว่าพวกดิพลอยด์ ดอกของเตตระพลอยด์กลมกว่า การแบ่งตัวของ microsporocyte ของดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ส่วนใหญ่จะปกติ ส่วนการงอกของละอองเรณูของดิพลอยด์ดีกว่าของเตตระพลอยด์มาก และ Kim et al. (1997) ได้มีการศึกษาในกล้วยไม้ *Cymbidium* sp. silky พบว่าความเข้มข้นของ

โคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โปรโตคอร์มตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ดีที่สุด ต้นที่ได้มีจำนวนโครโมโซมเป็นทั้งเตตระพลอยด์ และทริปพลอยด์ และพบว่าระยะเวลาที่ได้รับสารละลายโคลชิซินไม่มีผลแตกต่างกันต่อการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม แต่มีผลต่ออัตราการตายของโปรโตคอร์ม ต้นดิพลอยด์มีความแตกต่างจากต้นเตตระพลอยด์ และทริปพลอยด์ ในด้านรูปร่างของใบและความยาวใบ 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.) พบว่าต้นที่ไม่ได้รับการชักนำมีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 38 ส่วนต้นที่ถูกชักนำด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีจำนวนโครโมโซม 2n = 4x = 76 ยืนยันระดับพลอยดีโดยการตรวจสอบใบกล้วยไม้ม้าวิ่งด้วยเทคนิค โฟลไซโตเมทรี ต้นที่เป็นเตตระพลอยด์มีความยาวของเซลล์คุมเพิ่มขึ้น และสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้ม้าวิ่ง ส่วนระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงโปรโตคอร์มในสารละลายโคลชิซิน คือ 72 ชั่วโมง และ Griesbach (1981) ได้ศึกษาในโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส 3 ชนิด คือ *Phalaenopsis equestris*, *P.fasciata*, *P.*Betty Hauserman พบว่ากรรมวิธีที่ให้สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ประกอบด้วยต้น เตตระพลอยด์และออคตาพลอยด์ (octaploids) 46 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ต้นที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยสารละลายโคลชิซินมีการปลดปล่อยสารประกอบฟีโนลิค (phenolic compound) ในอาหาร จึงต้องทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 – 3 สัปดาห์ ต้นมีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นดิพลอยด์ แล้วยังพบว่าต้นเตตระพลอยด์ในสภาพธรรมชาติสามารถออกดอกได้หลังเพาะเมล็ดนาน 3 ปี แต่ต้นเตตระพลอยด์ที่ได้จากการชักนำสามารถออกดอกได้หลังเพาะเมล็ดนาน 5 ปี สำหรับการทดลองของมลวิภา โสมานันท์ (2521) ในการศึกษา protocorm - like bodies กล้วยไม้ลูกผสมสกุลอะแรนดา (*Aranda*) พบว่าการใช้โคลชิซินเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 9 วัน และ protocorm - like bodies กล้วยไม้ลูกผสมสกุลอะแรคนิส (*Arachnis*) 1 ชนิด โดยใช้ความเข้มข้นของโคลชิซินเหมือนกันแต่ใช้เวลาเพียง 3 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่ออะแรนดาค่อนข้างน้อยประมาณ 1-15 เปอร์เซ็นต์ แต่อะแรคนิสตายมากกว่า คือ 90-97 เปอร์เซ็นต์ และผลจากการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบต้นที่เป็นเตตระพลอยด์และเกือบเป็นเตตระพลอยด์ 135 ต้น เป็นมิกซ์พลอยด์ 2 ต้น เป็นดิพพลอยด์ 66 ต้น จากต้นกล้วยไม้ทั้งหมด 203 ต้น และผลทางด้านความกว้างและความยาวของเซลล์คุมไม่มีความแตกต่างกัน ลักษณะทั่วไปของต้นดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างได้ชัดเจน สำหรับกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย Sanguthai et al. (1973) พบว่าการใช้โคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5, 7 และ 10 วัน สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นเตตระพลอยด์ได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้สารโคลชิซินกับต้นอ่อนกล้วยไม้ดินหมู

กลิ้ง (*Eulophia andamanensis* Reichb.f.) พบว่าต้นอ่อนที่ได้รับโคลชิซิน 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 4 และ 6 ชั่วโมง จะมีการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีเป็นเตตระพลอยด์ (2n=4x) ได้จำนวนถึง 2 ต้นจาก 6 ต้น คิดเป็น 33.33 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้นอื่นไม่สามารถชักนำให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีได้ และต้นเตตระพลอยด์นี้จะมีสัณฐานวิทยาต่างไปจากต้นปกติ คือ ต้นเตี้ย ใบหนา ลำต้นกว้าง ปากใบใหญ่ เซลล์คุมหนา มีจำนวนปากใบต่อตารางไมโครเมตรน้อย (Chinachit and Sreemaung, 2008)

7. การใช้รังสีแกมมาในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

รังสีเป็นพลังงานรูปหนึ่งที่ปล่อยออกมาจากแหล่งกำเนิด สามารถเคลื่อนที่ทะลุทะลวงผ่านวัตถุต่างๆ ที่เป็นตัวกลางได้ โดยมีการถ่ายเทพลังงานให้กับวัตถุที่ผ่าน อาจอยู่ในรูปของคลื่นหรือลำของอนุภาคเล็กๆ ก็ได้ และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของวัตถุนั้นๆ มีการแบ่งรังสีออกเป็น 2 ประเภท คือ

7.1 รังสีชนิดไม่ก่อให้เกิดไอออน (non-ionizing radiation) คือ รังสีที่มีพลังงานต่ำเมื่อผ่านเข้าไปในตัวกลางใดๆ จะไม่สามารถทำให้ตัวกลางนั้นแตกตัวเป็นไอออน (ionization) เนื่องจากมีพลังงานไม่มากพอที่จะผลักอิเล็กตรอนให้หลุดออกจากอะตอมได้ ซึ่งได้แก่ คลื่นแสง คลื่นใต้แดง คลื่นไมโครเวฟ คลื่นวิทยุ คลื่นเสียง เป็นต้น

7.2 รังสีชนิดก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) คือ รังสีที่มีพลังงานสูงอยู่ในช่วง keV-MeV เมื่อรังสีชนิดนี้ผ่านเข้าไปในตัวกลางใดๆ จะทำให้อะตอมของตัวกลางนั้นแตกตัวเป็นไอออน โดยที่พลังงานจากรังสีสามารถผลักให้อิเล็กตรอนในอะตอมของตัวกลาง หลุดออกจากอะตอม เกิดเป็นคู่ไอออน (ion pair) ซึ่งประกอบด้วย อิเล็กตรอนอิสระที่มีประจุลบ และไอออนบวก ซึ่งเป็นอะตอมที่ขาดอิเล็กตรอน ดังนั้น รังสีชนิดนี้เป็นรังสีที่ให้ผลดี และนำมาใช้ประโยชน์ในการเหนี่ยวนำให้พืชกลายพันธุ์ ตัวอย่างรังสีชนิดที่มีพลังงานสูง เช่น รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา รังสีคอสมิก หรืออนุภาคที่มีพลังงานสูง เช่น อนุภาคแอลฟา บีตา อิเล็กตรอน โปรตอน และนิวตรอน เป็นต้น (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554) ในบรรดารังสีก่อให้เกิดไอออนนั้น รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา รังสีนิวตรอน มีความนิยมนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้พืชกลายพันธุ์มากกว่าอนุภาคแอลฟา บีตา หรือโปรตอน

รังสีแกมมาเป็นรังสีประเภทคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า เกิดจากการสลายตัวของนิวเคลียสของ เรดิโอนิวไคลด์ ซึ่งในกระบวนการนี้เกิดสภาพไม่เสถียร (unstable) จึงมีการปรับตัวให้เข้าสู่สภาพเสถียร โดยปลดปล่อยพลังงานส่วนเกินออกมาในรูปรังสีแอลฟา บีตา และแกมมา เรดิโอนิวไคลด์ที่นิยมใช้เพื่อให้รังสีแกมมา คือ โคบอลท์-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 เพื่อไม่ให้พืชหรือชิ้นส่วนของพืชมีโอกาสซ่อมแซมความเสียหายในช่วงที่ได้รับรังสี ทำให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์ค่อนข้างสูง

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

เมื่อเซลล์พืชได้รับรังสี จะส่งผลให้มีการถ่ายพลังงานให้กับโมเลกุลต่าง ๆ ของเซลล์ ทำให้โมเลกุลที่ได้รับพลังงานแตกตัวเป็นไอออน และฟรีเรดิคอล (free radical) ต่าง ๆ มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลใหม่และมีการทำปฏิกิริยาเคมีระหว่างกัน เกิดเป็นโมเลกุลที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างไปจากเดิม เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อเซลล์ที่มีโมเลกุลนี้ทำหน้าที่อยู่ ซึ่งถ้าไม่รุนแรงมากและเซลล์ยังมีชีวิตอยู่ แต่ความสามารถในการแบ่งเซลล์อาจเปลี่ยนแปลงไป เช่น เกิดความล่าช้าในการเข้าสู่การแบ่งเซลล์ เกิดการเปลี่ยนแปลงในสารพันธุกรรมที่สามารถส่งต่อไปยังลูกหลานได้ เรียกว่า เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งถ้ารุนแรงมากจะทำให้ทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวได้ และตายในที่สุด (สิรนุช ลามศรีจันทร์, 2540)

การใช้รังสีแกมมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งพันธุ์กลายที่ได้อาจมีลักษณะที่ต้องการได้ เช่น ลักษณะทรงต้น รูปแบบการด่าง รูปร่างของใบและดอก สีดอกที่แตกต่างออกไปจากเดิม การชักนำนี้สามารถย่นระยะเวลาและประหยัดค่าใช้จ่าย เมื่อเปรียบเทียบกับการปรับปรุงพันธุ์วิธีอื่น (Harten, 1998) แต่เนื่องจากการฉายรังสีนั้นต้องใช้ต้นพืชจำนวนมาก จึงนำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ร่วมด้วย ทำให้สามารถป้องกันการสูญเสียลักษณะที่กลาย และสามารถแยกเอาส่วนที่กลายพันธุ์ออกมาพัฒนาให้เป็นต้นพืชที่แสดงลักษณะพันธุ์กลายออกมาทั้งต้น เป็นการช่วยแก้ปัญหาไคเมอรา และการสูญหายไปของส่วนที่กลายพันธุ์ (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2539) หากต้นที่ได้จากการกลายพันธุ์เป็นลักษณะที่ดีก็สามารถใช้เป็นพันธุ์ใหม่ได้ซึ่งการใช้รังสีแกมมาเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้นั้นมีอยู่บ้าง เช่น การทดลองของ Harn (1970) ซึ่งศึกษาการฉายรังสีแกมมาต่อโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลซิมบิเดียม พบว่าการใช้โปรโตคอร์มทั้งก้อนเพื่อเหนี่ยวนำการ กลายพันธุ์ 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 และจะตายทั้งหมดเมื่อมีปริมาณรังสีเกินกว่า 60 เกรย์ ส่วนในโปรโตคอร์มมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ความสูงของต้น ความยาวของใบและรากลดลง เมื่อได้รับปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น และมีค่า LD_{50} ที่ปริมาณรังสีเท่ากับ 30 เกรย์ และการทดลองของ Thammasiri (1998) ได้ศึกษาการฉายรังสีแกมมาต่อ โปรโตคอร์มของกล้วยไม้แคทลียาพันธุ์แอลมาคี (*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 การฉายรังสีทำให้การเจริญเติบโตของ

โปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ช้าลง บางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย ผลยิ่งรุนแรงขึ้นเมื่อใช้ปริมาณรังสีที่สูงขึ้น และพบว่าปริมาณรังสีที่ระดับ 70 เกรย์ เหมาะสำหรับการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ทั้ง 2 พันธุ์ และมีการทดลองของ ธนะ กุลมุติวัฒน์ และคณะ (2548) ที่ได้ศึกษาใน protocorm - like bodies ของกล้วยไม้ *Dendrobium* Sonia Earsakul มีการฉายรังสีทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง พบว่า ต้นกล้าอายุ 10 เดือนที่ผ่านการฉายรังสีแบบเฉียบพลัน ปริมาณ 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 และยังพบลักษณะที่แตกต่างไปจากต้นปกติ คือ ต้นมีจุดแต้มบนใบ ซึ่งพบในการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ นอกจากการใช้โปรโตคอร์มเพื่อใช้เหนี่ยวนำให้เกิดการการพันธุ์แล้วยังมีการใช้ต้นอ่อนมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ 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) ที่ได้ศึกษาลักษณะรูปร่างและสีดอกของ *Dendrobium* Sonia ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 35 เกรย์ ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ขนาดดอกมีขนาดใหญ่กว่าดอกปกติ 20 เปอร์เซ็นต์ ไปจนถึงขนาดที่เล็กกว่าปกติ 30 เปอร์เซ็นต์ และยังพบความแปรปรวนของช่วงสีม่วงบริเวณกลีบดอก นอกจากนี้แล้วยังพบลักษณะดอกสีขาวทั้งดอกและดอกที่มีกลิ่นหอมด้วย

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ศึกษาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่างๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis*

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

1.2 สารเคมี

1) คลอร็อกซ์ และทวีน 20 สำหรับใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อก้านช่อดอก
2) เอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์
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 เพื่อเตรียมสารละลาย เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์
12) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 1 นอร์มอล
13) ไฮโดรคลอกริก (hydrochloric acid) 1 นอร์มอล
14) น้ำกลั่น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.3 สถานที่ทำการทดลอง

1) อาคารปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2) ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (F3) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3) โรงเรือนเลี้ยงกล้วยไม้ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.4 วิธีการทดลอง

1) ทำการเลือกก้านช่อดอกของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ตาดอกยังไม่พัฒนาจนยืดยาว นำมาถูล้างน้ำผสมสบู่ แล้วเช็ดทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ให้ทั่ว จากนั้นแกะกาบหุ้มข้อออก 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 ที่เติม ฮอร์โมน BAP 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Lin, 1986) จากนั้นนำไปวางในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 40 $\mu mol/m^2s^1$ ทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์

3) หลังเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกเป็นเวลา 6 เดือน เกิดเป็นโปรโตคอร์มที่มีสีเขียว ทำการคัดเลือกโปรโตคอร์มที่มีขนาดใกล้เคียงกันขนาดความยาว 2 - 3 มิลลิเมตร และซับให้แห้งด้วยผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วย้ายลงไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW (1949) ที่มีสารละลายโคลชิซินเป็นส่วนประกอบ

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

5) มีการวางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD มีทั้งหมด 16 ตำรับการทดลองๆ ละ 7 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำใช้ 10 โปรโตคอร์ม ดังนั้นต้องใช้โปรโตคอร์มทั้งหมด 1,120 โปรโตคอร์ม โดยมีการศึกษา 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 0, 0.05, 0.075 และ0.10 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 ทำการเปลี่ยนย้ายโปรโตคอร์มลงในอาหารใหม่ที่ไม่เติมสารโคลชิซิน โดยใช้ช้อนด้ามยาวตักโปรโตคอร์มใส่ลงในขวดที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และล้างให้สะอาด 3 ครั้ง และซับด้วยผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้ง ใช้ปากคีบด้ามยาวคีบโปรโตคอร์มลงในขวดปากกว้างที่บรรจุอาหารแข็งดัดแปลงสูตร VW (1949) ที่เติมกล้วยหอมบด 100 กรัม มันฝรั่งบด 50 กรัม และผง

ถ่านกัมมันต์ 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

2. ศึกษาผลของการฉายรังสีแกมมาแบบโครนิกต่อกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis*

2.1 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

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

2.2 สถานที่ทำการทดลอง

1) อาคารปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2) ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (F3) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3) ห้องฉายรังสีแกมมา ที่มีโคบอลท์-60 เป็นต้นกำเนิดรังสีใช้ในการฉายแบบโครนิก ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4) โรงเรือนเลี้ยงกล้วยไม้ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.3 วิธีการทดลอง

1) ทำการเลือกก้านช่อดอกที่ตาดอกยังไม่พัฒนาจนยืดยาว ของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* มาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ หลังเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกเป็นเวลา 6 เดือน เกิดเป็นโปรโตคอร์มที่มีสีเขียว ทำการคัดเลือกโปรโตคอร์มที่มีขนาดใกล้เคียงกันขนาดความยาว 2 - 3 มิลลิเมตร จากนั้นนำโปรโตคอร์มไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งดัดแปลงสูตร VW (1949) ที่เติมกล้วยหอมบด 100 กรัม มันฝรั่งบด 50 กรัม และผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัม ต่ออาหารปริมาณ 1 ลิตร

2) นำโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงไว้ไปฉายรังสีแกมมาแบบโครนิกโดยมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ตำรับการทดลอง คือ แบ่งตามการฉายรังสีในปริมาณที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ดังนี้ 0, 50, 100, 150 และ 200 เกรย์ ตำรับการทดลองละ 7 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำใช้ 15 โปรโตคอร์ม ดังนั้น ต้องใช้โปรโตคอร์มทั้งหมด 525 โปรโตคอร์ม

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

3. การบันทึกลักษณะ

1) บันทึกอัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มหลังจากการได้รับสารโคลชิซินภายในเวลา 1 เดือน

2) บันทึกจำนวนใบ ความยาวและความกว้างของใบ จำนวนราก ความยาวราก และน้ำหนักสด โดยการสุ่มตัวอย่างตำรับการทดลองละ 7 ซ้ำๆ ละ 3 ต้น มาวัดลักษณะต่างๆ หลังจากนำออกจากขวดเพาะเลี้ยง

3) บันทึกความหนาแน่นของปากใบ โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Cramer (1999) ดังนี้

3.1) นำต้นกล้วยไม้ที่ได้จากตำรับการทดลองๆ ละ 7 ซ้ำๆ 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

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

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) ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี 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) นำน้ำใสที่อยู่ส่วนบนของหลอด มาผสมกับสารละลาย 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 488 นาโนเมตร โดยการใช้โปรแกรม CellQuest ทำการนับจำนวนนิวเคลียสของกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* ที่ได้จากการทดลอง 10,000 นิวเคลียสต่อตัวอย่าง และใช้ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินและรังสีแกมมาเป็นฮิสโทแกรมมาตราฐานในการชี้วัดจำนวนชุดโครโมโซม ซึ่งเครื่องแสดงจำนวนนิวเคลียสในแกน Y และปริมาณดีเอ็นเอในแนวแกน X ของฮิสโทรแกรม

การวิเคราะห์ข้อมูล

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
อภิปรายผล

4.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่างๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis*

4.1.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ

จากผลการทดลองเลี้ยงโปรโตคอร์มในอาหารเหลวสูตร VW ที่มีการเติมสารโคลชิซินในระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.075 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน เมื่อครบระยะเวลาแล้วจึงย้ายโปรโตคอร์มเลี้ยงบนอาหารแข็งดัดแปลงสูตร VW ที่เติมกล้วยหอมบด 100 กรัม มันฝรั่งบด 50 กรัม และผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัม ต่ออาหารปริมาณ 1 ลิตร หลังจากนั้นจะสังเกตเห็นลักษณะของโปรโตคอร์มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง และสีน้ำตาลจนตายในที่สุด เมื่อครบ 4 สัปดาห์ ทำการบันทึกจำนวนโปรโตคอร์มที่มีชีวิต พบว่า ความเข้มข้นที่ได้รับสารโคลชิซินมีผลต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโปรโตคอร์ม โดยโปรโตคอร์มที่แช่ในอาหารที่ไม่มีสารโคลชิซินมีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโปรโตคอร์มสูงที่สุด คือ 97.14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับโปรโตคอร์มที่แช่ในอาหารที่มีสารโคลชิซินในทุกความเข้มข้น ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินก็มีผลต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโปรโตคอร์มเช่นกัน โดยการแช่โปรโตคอร์มเป็นระยะเวลา 1 วัน มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโปรโตคอร์มสูงที่สุด คือ 68.10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางผนวกที่ 1) นอกจากนี้ยังพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารโคลชิซิน โดยการแช่โปรโตคอร์มในอาหารที่ไม่มีสารโคลชิซิน เป็นระยะเวลา 1 วัน มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโปรโตคอร์มสูงที่สุด คือ 98.10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกับโปรโตคอร์มที่แช่ในอาหารที่มีสารโคลชิซินทุกความเข้มข้นในทุกระยะเวลา ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มในสัปดาห์ที่ 4 หลังจากได้รับสารละลาย โคลชิซิน ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน (% w/v)	ระยะเวลา (วัน)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์ม[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* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ

จากผลการทดลองนำโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *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 จึงนำมาบันทึกลักษณะต่างๆ ได้ผลดังนี้

น้ำหนักสด จากผลการชั่งน้ำหนักต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซิน พบว่าความเข้มข้นสารโคลชิซินมีผลต่อน้ำหนักสดของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินมีน้ำหนักสดสูงที่สุด คือ 1.7887 กรัม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินในทุกความเข้มข้น ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินก็มีผลต่อน้ำหนักสดเช่นกัน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มเป็นระยะเวลา 1 วัน มีน้ำหนักสดสูงที่สุด คือ 1.2472 กรัม (ตารางผนวกที่ 2) นอกจากนี้ยังพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่จากการแช่โปรโตคอร์มในอาหารที่ไม่มีสารโคลชิซิน เป็นระยะเวลา 3 วัน มีน้ำหนักสดสูงที่สุด คือ 1.8033 กรัม ซึ่งแตกต่างกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินทุกความเข้มข้นในทุกระยะเวลา (ตารางที่ 2 และรูปที่ 1)

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

ความยาวใบ จากผลการวัดความยาวใบของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซิน พบว่าความเข้มข้นสารโคลชิซินมีผลต่อความยาวใบเฉลี่ยของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินมีความยาวใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 39.22 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินในทุกความเข้มข้น ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินก็มีผลต่อ

ความยาวใบเฉลี่ยเช่นกัน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มเป็นระยะเวลา 1 วัน มีความยาวใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 33.43 มิลลิเมตร (ตารางผนวกที่ 4) นอกจากนี้ยังพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่จากการแช่โปรโตคอร์มในอาหารที่ไม่มีสารโคลชิซิน 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 โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มเป็นระยะเวลา 1 วัน มีความกว้างใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 7.13 มิลลิเมตร (ตารางผนวกที่ 5) นอกจากนี้ยังพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่จากการแช่โปรโตคอร์มในอาหารที่มีสารโคลชิซินเข้มข้น 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 โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มเป็นระยะเวลา 7 วัน มีความหนาใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 332.91 ไมโครเมตร (ตารางผนวกที่ 6) และไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน แต่มีแนวโน้มว่าต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มในอาหารที่มีสารโคลชิซิน เข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน มีความหนาใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 350.30 ไมโครเมตร ซึ่งแตกต่างกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินทุกระยะเวลา (ตารางที่ 2 และรูปที่ 1)

จำนวนราก จากผลการนับจำนวนรากของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซิน พบว่าความเข้มข้นสารโคลชิซินมีผลต่อจำนวนรากเฉลี่ยของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับ

สารโคลชิซิน มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 7.10 รากต่อต้น ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินในทุกความเข้มข้น ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินก็มีผลต่อจำนวนรากเฉลี่ยเช่นกัน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มเป็นระยะเวลา 3 วัน มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 5.29 รากต่อต้น (ตารางผนวกที่ 7) นอกจากนี้ยังพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่จากการแช่โปรโตคอร์มในอาหารที่ไม่มีสารโคลชิซิน เป็นระยะเวลา 5 วัน มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 7.14 รากต่อต้น ซึ่งแตกต่างกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินทุกความเข้มข้นในทุกระยะเวลา (ตารางที่ 3 และรูปที่ 1)

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

เส้นผ่าศูนย์กลางราก จากผลการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางรากของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซิน พบว่าความเข้มข้นสารโคลชิซินมีผลต่อเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 982.48 ไมโครเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินไม่มีผลต่อเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ย (ตารางผนวกที่ 9) และไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน แต่มีแนวโน้มว่าต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มในอาหารที่มีสารโคลชิซิน เข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน มีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 997.98 ไมโครเมตร (ตารางที่ 3 และรูปที่ 1)

ความหนาแน่นปากใบ จากผลการวัดความหนาแน่นปากใบของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซิน พบว่าความเข้มข้นสารโคลชิซินมีผลต่อ

ความหนาแน่นปากใบเฉลี่ยของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน มีความหนาแน่นปากใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 40.41 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินในทุกความเข้มข้น ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินมีผลต่อความหนาแน่นปากใบเฉลี่ยเช่นกัน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มเป็นระยะเวลา 1 วัน มีความหนาแน่นปากใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 37.97 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร (ตารางผนวกที่ 10) และไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน แต่มีแนวโน้มว่าต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มในอาหารที่ไม่มีสารโคลชิซิน เป็นระยะเวลา 1 วัน มีความหนาแน่นปากใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 41.17 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร (ตารางที่ 4 และรูปที่ 2)

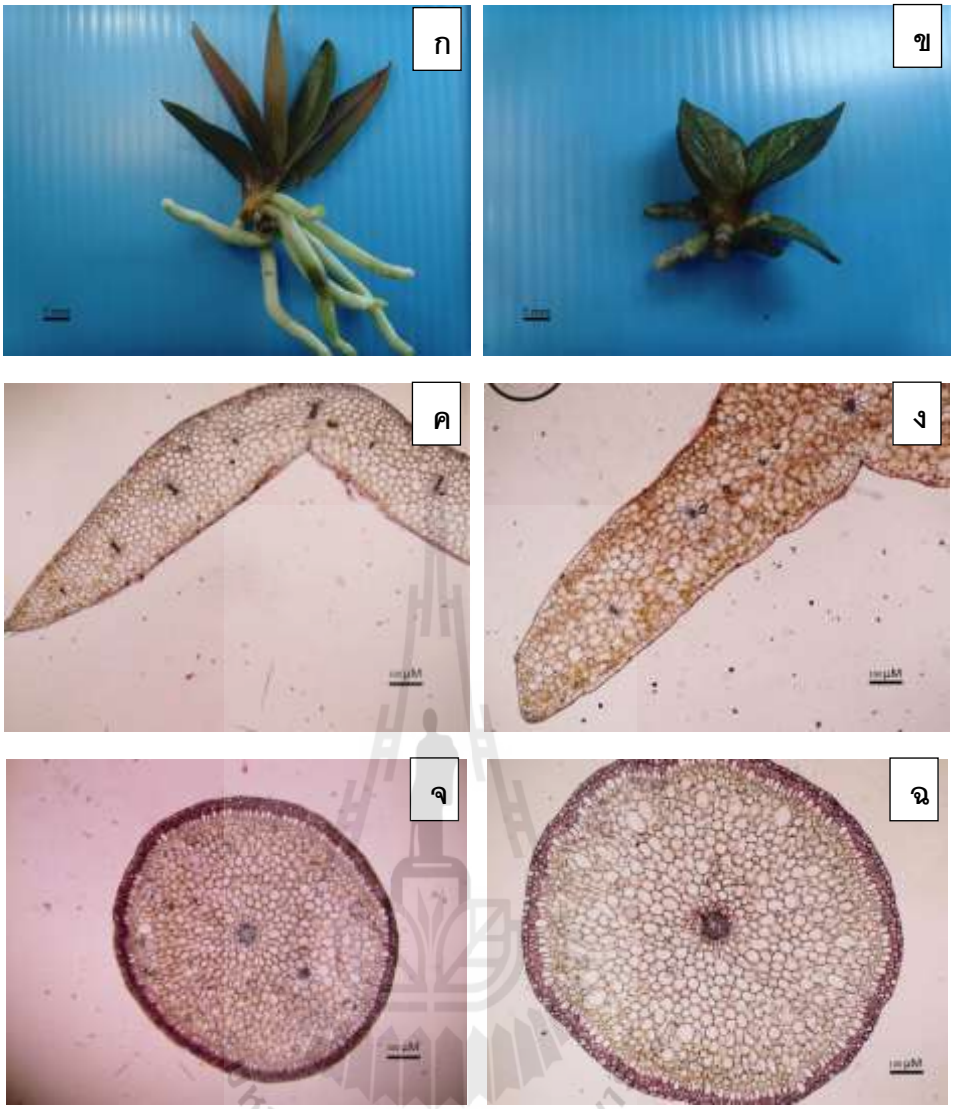
ความยาวปากใบ จากผลการวัดความยาวปากใบของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซิน พบว่าความเข้มข้นสารโคลชิซินมีผลต่อความยาวปากใบเฉลี่ยของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีความยาวปากใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 22.16 ไมโครเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน ส่วนระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินมีผลต่อความยาวปากใบเฉลี่ยเช่นกัน โดยต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มเป็นระยะเวลา 7 วัน มีความยาวปากใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 28.82 ไมโครเมตร (ตารางผนวกที่ 6) และไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน แต่มีแนวโน้มว่าต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการแช่โปรโตคอร์มในอาหารที่มีสารโคลชิซินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน มีความยาวปากใบเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 23.63 ไมโครเมตร (ตารางที่ 4 และรูปที่ 2)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน (% w/v)	ระยะเวลา (วัน)	น้ำหนักสด[1/] (กรัม)	จำนวนใบ	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

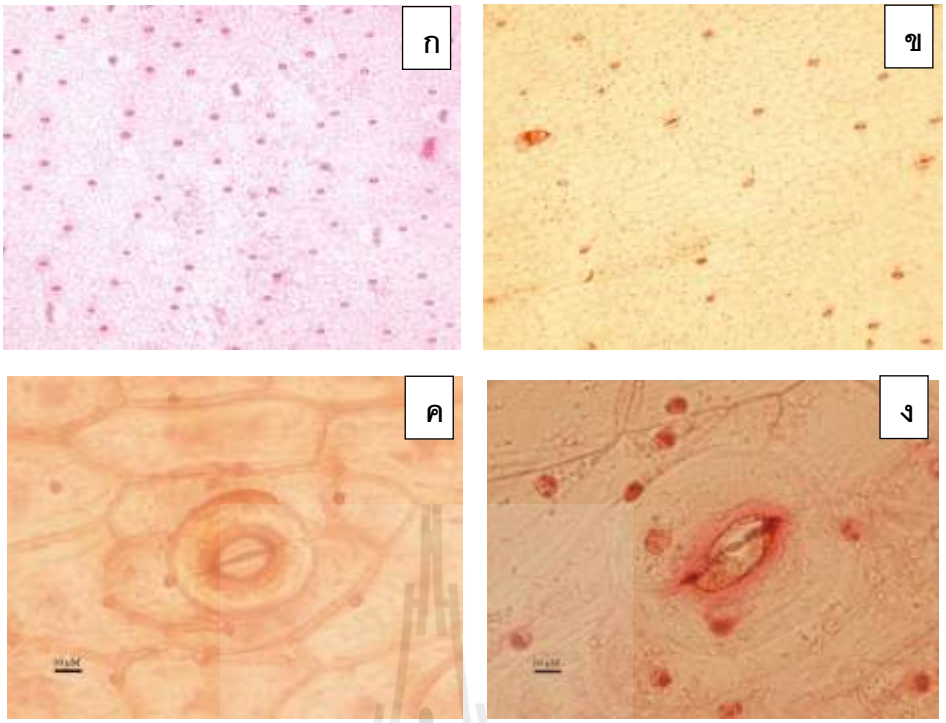
ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน (% w/v)	ระยะเวลา (วัน)	จำนวนราก[1/]	ความยาวราก (มิลลิเมตร)	เส้นผ่าศูนย์กลางราก (ไมโครเมตร)
0	1	7.12 a	29.46 a	896.38
	3	7.10 a	29.62 a	897.87
	5	7.14 a	29.20 a	895.42
	7	7.05 a	29.45 a	899.95
0.05	1	6.05 b	26.18 b	931.50
	3	6.10 b	25.67 bc	945.41
	5	5.67 b	24.59 c	969.58
	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)



รูปที่ 2 แสดงความหนาแน่นและความยาวปากใบของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ ที่มีอายุ 10 เดือน

ก : ความหนาแน่นปากใบของต้นดิพลอยด์

ข : ความหนาแน่นปากใบของต้นเตตระพลอยด์ ที่ได้จากการได้รับสารละลายโคลชิซิน

ค : ความยาวปากใบของต้นดิพลอยด์

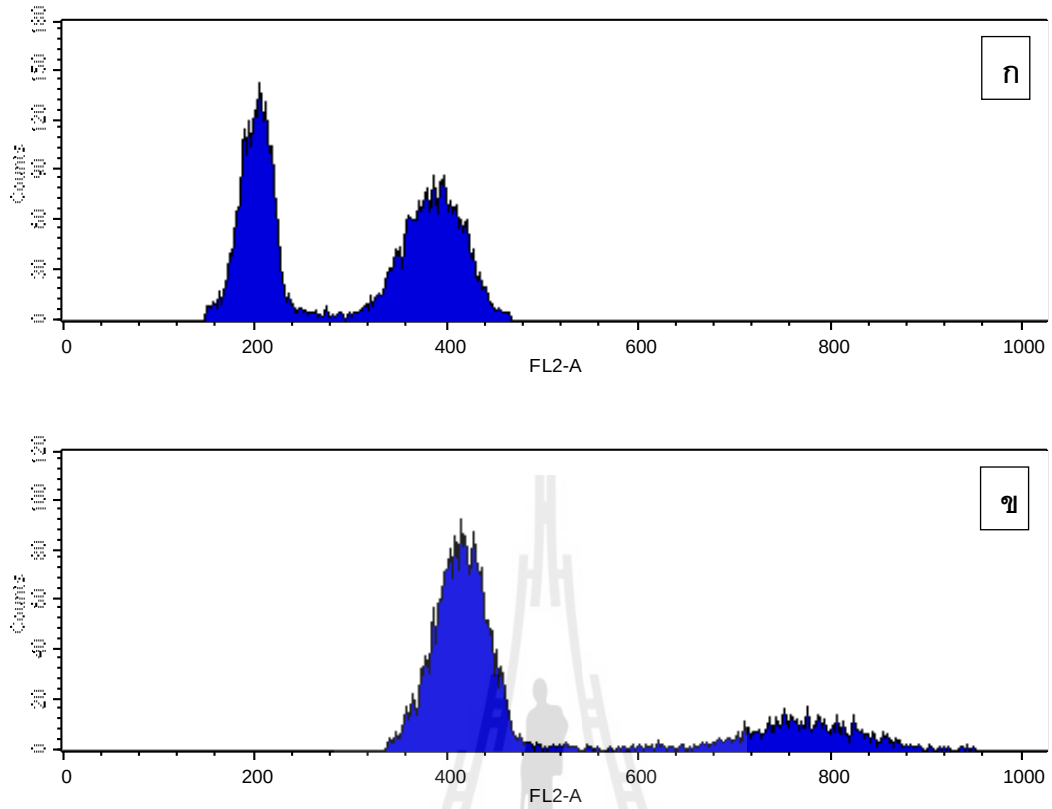
ง : ความยาวปากใบของต้นเตตระพลอยด์ ที่ได้จากการได้รับสารละลายโคลชิซิน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.1.3 เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซมของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ

การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรีของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ พบว่านิวเคลียสจากเซลล์ใบกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีผลทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม เนื่องจากมีฮิสโทแกรมสูงสุดขึ้นบริเวณช่องที่ 400 แสดงว่ามีระดับพลอยดีเป็นต้นเตตระพลอยด์ (2n = 4x) ซึ่งแตกต่างกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่มีฮิสโทแกรมสูงสุดขึ้นบริเวณช่องที่ 200 ซึ่งแสดงว่ามีระดับพลอยดีเป็นต้นดิพลอยด์ (2n = 2x) (รูปที่ 3) และเมื่อพิจารณาลักษณะฮิสโทรแกรมที่วัดจากเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ของต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการแช่สารละลายโคลชิซินในความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบว่าความเข้มข้นและระยะเวลาการได้รับสารโคลชิซินมีผลต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของต้นกล้วยไม้ คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการไม่ได้รับสารโคลชิซินนั้นไม่มีการเกิดต้นเตตระพลอยด์ แต่มีการเกิดต้น เตตระพลอยด์ในต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดการเกิดต้นเตตระพลอยด์สูงขึ้นเมื่อได้รับสารละลายโคลชิซินที่เข้มข้นสูงขึ้นเป็นระยะเวลานานขึ้น (ตารางผนวกที่ 12) โดยต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยด์สูงที่สุด คือ 60 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการได้รับสารละลายโคลชิซิน 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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ

จากการศึกษา พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มลดลง เมื่อได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นสูงและระยะเวลานานขึ้น โปรโตคอร์มที่ตายนั้นจะสังเกตเห็นลักษณะของโปรโตคอร์มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง และสีน้ำตาลจนตายในที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในกล้วยไม้ *Cymbidium* sp. Silky (Kim et al., 1997) ที่พบว่าความเข้มข้นที่สูงขึ้นและระยะเวลาที่ได้รับสารละลายโคลชิซินเพิ่มขึ้น ส่งผลต่ออัตราการตายของโปรโตคอร์มมากขึ้น เช่นเดียวกับสุพัตรา สระธรรม และคณะ (2551) ที่พบว่าโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องแซะหอมเมื่อได้รับสารละลายโคลชิซินเป็นเวลานานขึ้นมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาการได้รับสารละลาย โคลชิซินที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากสารโคลชิซินนั้นสามารถแทรกซึมเข้าไปยังส่วนต่างๆ ของเซลล์พืช และยังเป็นพิษต่อเซลล์พืช การได้รับสารโคลชิซิน ความเข้มข้นที่สูงและระยะเวลานานเกินไปอาจทำให้พืชมีจำนวนชุดโครโมโซมเกินระดับที่ต้องการจนทำให้เซลล์เสียสมดุลและตายในที่สุด โดยสาร โคลชิซินนั้นจะทำให้การทำงานของเซลล์รวมทั้งกระบวนการต่างๆภายในพืชผิดปกติ 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* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ พบว่า ต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้นมีผลทำให้น้ำหนักสด จำนวนใบ ความยาวใบ จำนวนราก และความยาวรากลดลง ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นผลมาจากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนั้นเกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมขึ้น ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน เพราะว่าต้นที่เป็นโพลีพลอยด์นั้นจะมีปริมาณฮอร์โมนออกซินที่ต่ำกว่าต้นดิพลอยด์ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550) แต่ในทางตรงข้ามเส้นผ่าศูนย์กลางราก

ความกว้างและความหนาของใบกลับมีแนวโน้มสูงขึ้น เป็นผลมาจากเซลล์ของต้นกล้วยไม้มีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sarathum et al. (2010) ที่มีการศึกษาในโปรโต- คอร์มกล้วยไม้เอื้องแซะหอม พบว่าต้นโพลีพลอยด์ที่ได้มีลักษณะแตกต่างจากต้นดิพลอยด์ คือ มีลำต้นและใบขนาดใหญ่กว่า แต่มีความสูงของต้นและความยาวของใบน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ เช่นเดียวกับ Chaicharoen and Saejew (1980) ได้ศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ พบว่าการเจริญของต้นเตตระพลอยด์ช้ากว่าของดิพลอยด์ ใบของต้นเตตระ-พลอยด์หนากว่าดิพลอยด์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Kim et al. (1997) ที่ได้มีการศึกษาในกล้วยไม้ *Cymbidium* sp. Silky พบว่าใบของต้นเตตระพลอยด์เกิดความแตกต่างจากต้นดิพลอยด์ในด้านรูปร่างของใบและความยาวใบ และยังมีรายงานของ Chinachit and Sreemaung (2008) ที่ได้ศึกษาในกล้วยไม้ดินหมูกลิ้ง (*Eulophia andamanensis* Reichb.f.) พบว่าต้นเตตระพลอยด์จะมีสัณฐานวิทยาต่างไปจากต้นปกติ คือ ต้นเตี้ย ใบหนา ลำต้นกว้าง แต่ขัดแย้งกับผลการทดลองของมลวิภา โสมานันท์ (2521) ที่ศึกษาในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลอะแรนดา (*Aranda*) พบว่าลักษณะทั่วไปของต้นดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างได้ชัดเจน

4.2.3 การตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ

จากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา คือ ความหนาแน่นปากใบและความยาวปากใบของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ พบว่าต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้นมีผลทำให้ความหนาแน่นของปากใบลดลง เป็นผลมาจากเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้นและความยาวของปากใบมีความยาวมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Silva et al. (2000) ได้ทำการศึกษาในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Cattleya intermedia* L. พบว่าต้นโพลีพลอยด์มีพื้นที่ปากใบเพิ่มขึ้นและความหนาแน่นของปากใบลดลงเมื่อเทียบกับต้นปกติ เช่นเดียวกัน Chaicharoen and Saejew (1980) ได้ศึกษาขนาดเซลล์คุมของ *Dendrobium phalaenopsis* พบว่า ต้นเตตระพลอยด์มีขนาดของเซลล์คุมใหญ่กว่าพวกดิพลอยด์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Chinachit and Sreemaung (2008) ที่ได้ศึกษาในกล้วยไม้ดินหมูกลิ้ง (*Eulophia andamanensis* Reichb.f.) พบว่า ต้นเตตระ-พลอยด์มีปากใบใหญ่ เซลล์คุมหนา และมีจำนวนปากใบต่อตารางไมโครเมตรน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ และยังมีรายงานของสุลาวัลย์ มหาหิงส์ และสุมนทิพย์ บุนนาค (2551) ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) พบว่าต้นที่เป็นเตตระพลอยด์มีความยาวของเซลล์คุมเพิ่มขึ้น แต่ขัดแย้งกับผลการ

ทดลองของมลวิภา โสมานันท์ (2521) ที่ศึกษาในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลอะแรนดา (*Aranda*) พบว่าต้นเตตระพลอยด์และต้นดิพลอยด์มีความกว้างและความยาวของเซลล์คุมไม่แตกต่างกัน

4.2.4 เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ

จากการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรีของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ พบว่านิวเคลียสจากเซลล์ใบกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีผลทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม ที่มีระดับพลอยดีเป็นต้นเตตระพลอยด์ (2n = 4x) ซึ่งแตกต่างกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่มีระดับพลอยดีเป็นต้นดิพลอยด์ (2n = 2x) และเมื่อพิจารณาลักษณะฮิสโทรแกรมที่วัดจากเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ของต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการแช่สารละลาย โคลชิซินในความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ พบว่าความเข้มข้นและระยะเวลาการได้รับสารละลายโคลชิซินมีผลต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของต้นกล้วยไม้ คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินนั้นไม่มีการเกิดต้นเตตระพลอยด์ แต่มีการเกิดต้นเตตระพลอยด์ในต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยด์สูงขึ้นเมื่อได้รับสารละลายโคลชิซินที่เข้มข้นมากขึ้นและได้รับเป็นระยะเวลานานขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sarathum et al. (2010) ที่ได้มีการศึกษาในโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องแซะหอม พบว่าสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 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 จำนวนโครโมโซมที่เกิดมีทั้งเป็นเตตราพลอยด์ และทริปพลอยด์ เช่นเดียวกันกับการศึกษาของพรพิมล ธัญญสนธิ (2538) ในกล้วยไม้ฟ้ามุ่ย พบว่า protocorm - like bodies (PLBs) ที่ได้รับสารโคลชิซินเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน สามารถเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นต้นเตตระพลอยด์ได้มากที่สุดถึง 8 ต้น จาก 14 ต้น คิดเป็น 57 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Chinachit and Sreemaung (2008) ที่ได้ศึกษาในกล้วยไม้ดินหมูกลิ้ง (*Eulophia andamanensis* Reichb.f.) พบว่าต้นอ่อนที่ได้รับโคลชิซิน 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 ยืนยันระดับพลอยดีโดยการตรวจสอบใบกล้วยไม้ม้าวิ่งด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้ม้าวิ่ง ส่วนระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงโปรโตคอร์มในสารละลายโคลชิซิน คือ 72 ชั่วโมง

4.3 การศึกษาปริมาณรังสีแกมมาที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่างๆ ในกล้วยไม้ลูกผสม สกุล *Doritaenopsis*

4.3.1 ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้วยไม้ลูกผสม สกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา

จากผลการทดลองฉายรังสีแกมมาให้กับโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *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) จึงนำมาบันทึกลักษณะต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 6 ได้ผลดังนี้

น้ำหนักสด การฉายรังสีแกมมามีผลต่อน้ำหนักสดของต้นกล้วยไม้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยจะมีน้ำหนักลดลงเมื่อได้รับรังสีในปริมาณที่สูงขึ้น ได้ผลดังนี้ ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้นมีน้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุด คือ 1.8937 กรัม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาในทั้ง 4 ระดับ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 1.3627 กรัม ไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 100 เกรย์ ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 1.3547 กรัม ส่วนต้นกล้วยไม้ที่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.8783 กรัม แต่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 150 เกรย์ ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 1.0226 กรัม

จำนวนใบ การฉายรังสีแกมมามีผลต่อจำนวนใบเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยจะมีจำนวนใบเฉลี่ยมากขึ้นเมื่อได้รับรังสีในปริมาณที่สูงขึ้น คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ มีจำนวนใบเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 9.99 ใบ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมาและต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50, 100 และ150 เกรย์ ซึ่งมีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 4.24, 4.57, 4.9 และ 5.57 ใบ ตามลำดับ

ความยาวใบ การฉายรังสีแกมมามีผลต่อความยาวใบเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยจะมีความยาวใบเฉลี่ยลดลงเมื่อได้รับรังสีในปริมาณที่สูงขึ้น ได้ผลดังนี้ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้นมีความยาวใบเฉลี่ยมากที่สุด คือ 34.33 มิลลิเมตร รองลงมา คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีความยาวใบเฉลี่ยเท่ากับ 23.59 มิลลิเมตร แต่มีความยาวใบเฉลี่ยไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 100 เกรย์ ซึ่งมีความยาวใบเฉลี่ยเท่ากับ 21.07 มิลลิเมตร ส่วนต้นกล้วยไม้ที่มีความยาวใบเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ ซึ่งมีความยาวใบเฉลี่ยเท่ากับ 16.33 มิลลิเมตร แต่มีความยาวใบเฉลี่ยไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 150 เกรย์ ที่มีความยาวใบเฉลี่ยเท่ากับ 18.84 มิลลิเมตร

ความกว้างใบ การฉายรังสีแกมมามีผลต่อความกว้างใบเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ได้ผลดังนี้ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้นมีความกว้างใบเฉลี่ยมากที่สุด คือ 9.42 มิลลิเมตร แต่มีความกว้างใบเฉลี่ยไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 100 เกรย์ ซึ่งมีความกว้างใบเฉลี่ยเท่ากับ 9.20 มิลลิเมตร รองลงมา คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีความกว้างใบเฉลี่ยเท่ากับ 7.45 มิลลิเมตร แต่ไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 150 เกรย์ ที่มีความกว้างใบเฉลี่ยเท่ากับ 7.31 มิลลิเมตร ซึ่งต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 150 เกรย์ นั้นมีความกว้างใบเฉลี่ยไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ ที่มีความกว้างใบเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 6.15 มิลลิเมตร

ความหนาใบ การฉายรังสีแกมมามีผลต่อความหนาใบเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ได้ผลดังนี้ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้นมีความหนาใบเฉลี่ยมากที่สุด คือ 310.61 ไมโครเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉาย

รังสีแกมมาในทั้ง 4 ระดับ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีความหนาใบเฉลี่ยเท่ากับ 293.62 ไมโครเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 100 และ 150 เกรย์ ที่มีความหนาใบเฉลี่ยเท่ากับ 291.28 และ 288.52 ไมโครเมตร ตามลำดับ ส่วนต้นกล้วยไม้ที่มีความหนาใบน้อยที่สุด คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ ซึ่งมีความหนาใบเฉลี่ยเท่ากับ 274.16 ไมโครเมตร แต่มีความหนาใบเฉลี่ยไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 150 เกรย์

จำนวนราก การฉายรังสีแกมมามีผลต่อจำนวนรากเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ได้ผลดังนี้ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้นมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด คือ 7.38 ราก ซึ่งแตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 100 เกรย์ ที่มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 5.48 ราก รองลงมา คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 5.38 ราก ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 และ 150 เกรย์ ที่มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 5.00 และ 4.62 ราก ตามลำดับ

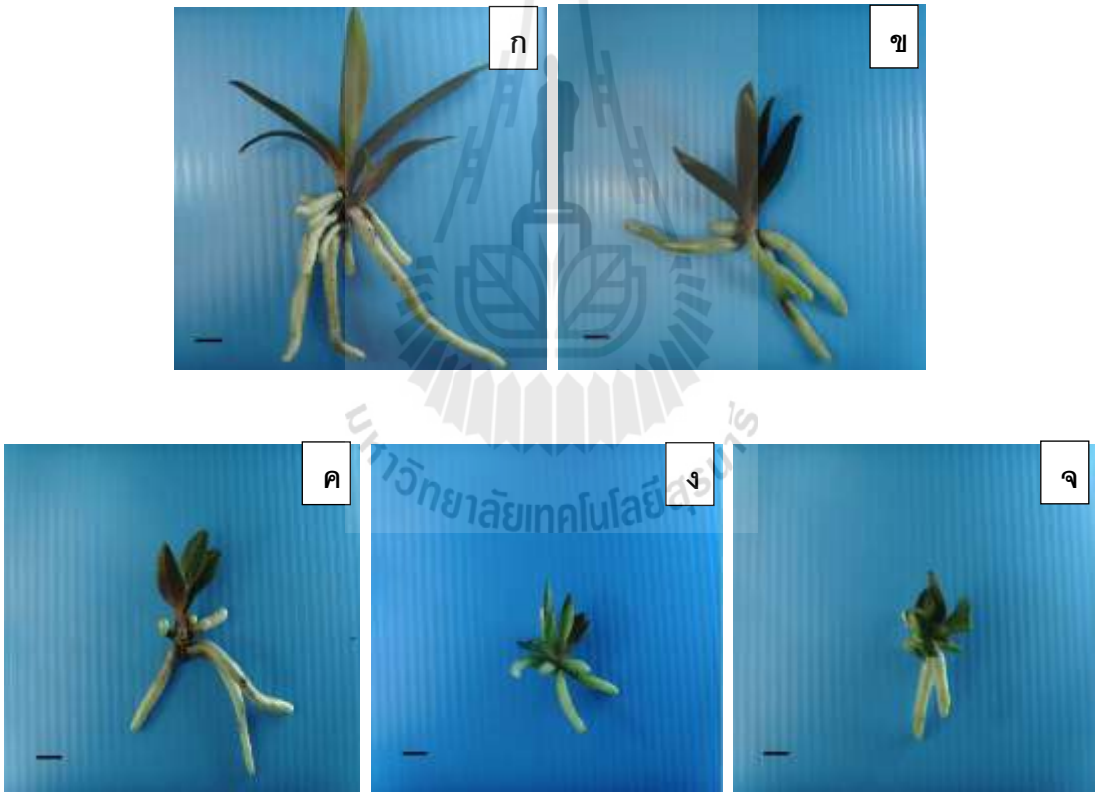
ความยาวราก การฉายรังสีแกมมามีผลต่อความยาวรากเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยจะมีความยาวรากเฉลี่ยลดลงเมื่อได้รับรังสีในปริมาณที่สูงขึ้น คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้นมีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด คือ 32.41 มิลลิเมตร รองลงมา คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 23.54 มิลลิเมตร แต่ไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 100 เกรย์ ที่มีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 21.96 มิลลิเมตร ส่วนต้นกล้วยไม้ที่มีความยาวรากน้อยที่สุด คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ ซึ่งมีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 11.97 มิลลิเมตร

เส้นผ่าศูนย์กลางราก การฉายรังสีแกมมามีผลต่อเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ได้ผลดังนี้ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้นมีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยมากที่สุด คือ 915.38 ไมโครเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาในทั้ง 4 ระดับ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยเท่ากับ 863.37 ไมโครเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 100 เกรย์ ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยเท่ากับ 840.99 ไมโครเมตร ส่วนต้นกล้วยไม้ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยเท่ากับ 783.61 ไมโครเมตร แต่มีเส้นผ่าศูนย์กลางราก

เฉลี่ยไม่แตกต่างกับต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 150 เกรย์ ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางรากเฉลี่ยเท่ากับ 796.85 ไมโครเมตร

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

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



รูปที่ 4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis*

ก : ไม่ได้รับรังสีแกมมา

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

สเกลบาร์ = 5 มิลลิเมตร

4.3.2 เปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์ของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา

การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรีของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆ พบว่านิวเคลียสจากเซลล์ใบกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในทุกอัตรารังสีไม่มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม และไม่พบการเพิ่มหรือขาดหายไปของแท่งโครโมโซม เนื่องจากมีฮิสโทแกรมขึ้นบริเวณช่องที่ 200 ทุกชุดการทดลอง จึงยืนยันได้ว่าต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาทุกต้นเป็นต้นดิพลอยด์ (รูปที่ 5) แต่อาจเกิดการกลายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ เนื่องจากพบต้นที่มีการกลายพันธุ์ คือ พบลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีการเปลี่ยนแปลงไป เช่น ใบหลอด ใบแฉก ใบด่าง ใบยาวเรียวเล็ก ใบหดสั้นและหนาขึ้น ใบเปลี่ยนสีไปจากเดิมจากสีเขียวปนน้ำตาลแดงเป็นสีเขียวทั้งใบ (รูปที่ 6) ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมา พบว่าการฉายรังสีแกมมามีผลต่อการกลายพันธุ์ของต้นกล้วยไม้ คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้นไม่มีการเกิดการกลายพันธุ์ แต่มีการกลายพันธุ์ในต้นที่ได้รับรังสีแกมมา ซึ่งเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์จะสูงขึ้นเมื่อได้รับปริมาณรังสีแกมมาที่สูงขึ้น ดังนี้ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์สูงที่สุด คือ 24.29 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 150, 100 และ 50 เกรย์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์เท่ากับ 17.14, 15.71 และ 10.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อนำต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาออกปลูกในสภาพโรงเรือนนั้น พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้น้อยลงเมื่อได้รับปริมาณรังสีแกมมาที่สูงขึ้น เมื่อนำต้นกล้วยไม้ออกปลูกในสภาพโรงเรือนแล้วจะสังเกตเห็นลักษณะของต้นกล้วยไม้มีอาการฉ่ำน้ำ และเน่าตายในที่สุด แล้วยังพบอาการต้นเหี่ยวแห้งตาย เนื่องจากบางต้นมีสภาพไม่แข็งแรง มีรากสั้นกุด และใบเล็กผิดรูปไปจากต้นปกติ ซึ่งต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์หลังจากนำไปปลูกในสภาพโรงเรือนสูงที่สุด คือ 57.14 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณ 100 และ 150 เกรย์ ซึ่งต้นที่กลายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การรอดหลังจากนำออกปลูกในสภาพโรงเรือนเท่ากับ 45.46 และ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ นั้นตายทั้งหมดเมื่อนำออกปลูกในสภาพโรงเรือน (ตารางที่ 7)

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

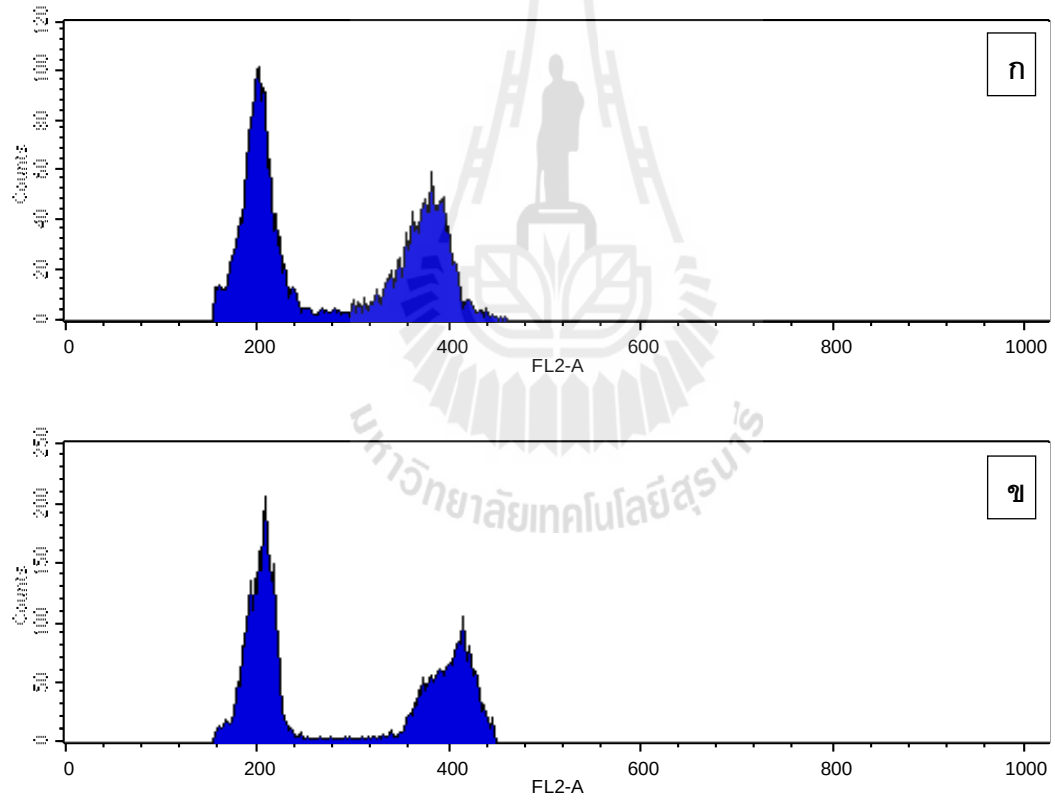
ปริมาณรังสีแกมมา (เกรย์)	น้ำหนักสด[1/] (กรัม)	จำนวนใบ	ความยาวใบ (มิลลิเมตร)	ความกว้างใบ (มิลลิเมตร)	ความหนาใบ (ไมโครเมตร)	จำนวนราก	ความยาวราก (มิลลิเมตร)	เส้นผ่าศูนย์กลางราก (ไมโครเมตร)	ความหนาแน่นปากใบ	ความยาวปากใบ (ไมโครเมตร)
0	1.894 a	4.24 b	34.33 a	9.42 a	310.61 a	7.38 a	32.41 a	915.38 a	40.98	18.48
50	1.3623 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 และเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์หลังจากนำไปปลูกในสภาพโรงเรือนของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* เมื่ออายุ 10 เดือน หลังจากได้รับรังสีแกมมาปริมาณที่แตกต่างกัน

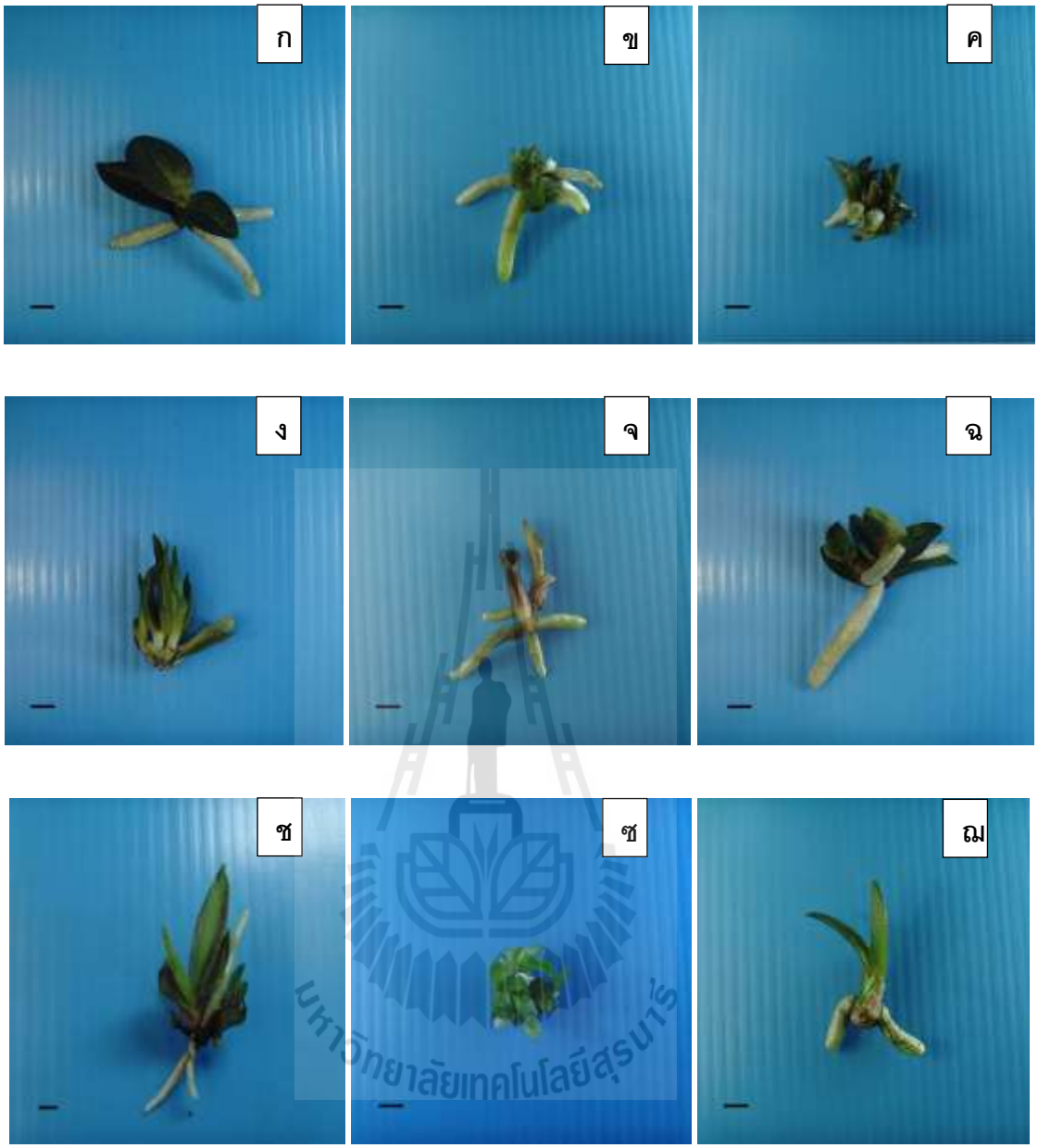
ปริมาณรังสีแกมมา (เกรย์)	เปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์	เปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์หลังจากนำไปปลูกในสภาพโรงเรือน
0	0.00	-
50	10.00	57.14
100	15.71	45.46
150	17.14	16.67
200	24.29	0.00



รูปที่ 5 ฮิสโทรแกรมแสดงระดับพลอยดีของต้นกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการ ฉายรังสีแกมมา 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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.4 วิจารณ์ผลการทดลองผลของปริมาณรังสีแกมมาที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่างๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis*

4.4.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆ พบว่าต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้รับรังสีแกมมาในปริมาณที่สูงขึ้น มีผลทำให้น้ำหนักสด ความยาวใบ ความกว้างใบ ความหนาใบ จำนวนราก ความยาวราก และเส้นผ่าศูนย์กลางรากลดลง ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นผลมาจากการให้รังสีแกมมากับพืชที่เจริญเติบโตอยู่นั้นจะทำให้เกิดผลได้หลายอย่าง คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน หรือเกิดการกลายพันธุ์ ทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมผิดปกติ หรือเปลี่ยนแปลงไป 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 การฉายรังสีทำให้การเจริญเติบโตของโปร-โตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ช้าลง บางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย ผลยิ่งรุนแรงขึ้นเมื่อใช้ปริมาณรังสีที่สูงขึ้น เช่นเดียวกันกับการทดลองของ ธนะ กุลมุติวัฒน์ และคณะ (2548) ที่ได้ศึกษาต้นกล้า *Dendrobium* Sonia Earsakul ที่ได้รับรังสีแบบเฉียบพลัน และต้นกล้าที่ได้รับรังสีแบบโครนิก มีการเจริญเติบโตลดลงตามปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้น

4.4.2 การตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา

จากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา คือ ความหนาแน่นปากใบและความยาวปากใบของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆ เปรียบเทียบกับต้นกล้ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับและรับรังสีแกมมา พบว่า ไม่มีผลทำให้ความหนาแน่นปากใบและความยาวปากใบแตกต่างกัน ซึ่ง

สอดคล้องกับการศึกษาในพืชหลายชนิดที่พบว่า ขนาดปากใบ ความยาวเซลล์ปากใบไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับรังสีแกมมา 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* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆ พบว่านิวเคลียสจากเซลล์ใบกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในทุกอัตรารังสีไม่มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม และไม่พบการเพิ่มหรือขาดหายไปของจำนวนโครโมโซม เนื่องจากมีฮิสโทแกรมขึ้นบริเวณช่องที่ 200 ทุกชุดการทดลอง จึงยืนยันได้ว่าต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาทุกต้นเป็นต้นดิพลอยด์ แต่อาจเกิดการกลายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ เนื่องจากพบต้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น ใบหลอด ใบแฉก ใบด่าง ใบยาวเรียวเล็ก ใบหดสั้นและหนาขึ้น ใบเปลี่ยนสีไปจากเดิมจากสีเขียวปนน้ำตาลแดงเป็นสีเขียวทั้งใบ ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมา พบว่าการฉายรังสีแกมมามีผลต่อการกลายพันธุ์ของต้นกล้วยไม้ คือ ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับรังสีแกมมานั้นไม่มีการกลายพันธุ์ แต่มีการกลายพันธุ์ในต้นที่ได้รับรังสีแกมมา ซึ่งเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์จะสูงขึ้นเมื่อได้รับปริมาณรังสีแกมมาที่มากขึ้น ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์สูงที่สุด คือ 24.29 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาออกปลูกในสภาพโรงเรือนนั้น กลับพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้น้อยลงเมื่อได้รับปริมาณรังสีแกมมาที่สูงขึ้น จะสังเกตเห็นลักษณะของต้นกล้วยไม้มีอาการฉ่ำน้ำ และเน่าตายในที่สุด แล้วยังพบอาการต้นเหี่ยวแห้งตาย เนื่องจากบางต้นมีสภาพไม่แข็งแรง มีรากสั้นกุด และใบเล็กผิดรูปไปจากต้นปกติ ซึ่งต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์หลังจากนำไปปลูกในสภาพโรงเรือนสูงที่สุด คือ 57.14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Thammasiri (1998) ได้ศึกษาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้แคทลียาพันธุ์แอลมาคี (*Brassolaeliocattleya* Alma Kee) และพันธุ์กรีนวิช (*Brassolaeliocattleya* Greenwich) พบว่าปริมาณรังสีระหว่าง 80 กับ 110 เกรย์ เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ และได้ทดลองอีกครั้งโดยใช้จำนวนโปรโตคอร์มเพิ่มขึ้น ผลปรากฏว่า การฉายรังสีทำให้การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ช้าลง บางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย ผลยิ่งรุนแรงขึ้นเมื่อใช้ปริมาณรังสีที่สูงขึ้น และพบว่าปริมาณรังสีที่ระดับ 70 เกรย์ เหมาะสำหรับการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ทั้ง 2 พันธุ์ และสุรวิช วรรณไกรโรจน์ (2526) ก็พบ

เช่นกันว่า การฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมในกุหลาบหินพันธุ์ลาร์โก แต่เมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นการเจริญเติบโตและอัตรารอดชีวิตลดลง และรังสีทำให้ลักษณะใบ การเรียงตัวของใบ ความยาวปล้อง และการแตกกิ่งข้างผิดปกติ

บทที่ 5
บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาผลของระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารโคลชิซินที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่างๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์มลดลง เมื่อได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้น โดยสารละลายจะมีผลทำให้โปรโตคอร์มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง และสีน้ำตาลจนตายในที่สุด

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

3. ลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้น มีผลทำให้ความหนาแน่นของปากใบลดลง แต่มีความยาวของปากใบสูงขึ้น

4. ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินเกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมสูงขึ้นเมื่อได้รับสารละลายโคลชิซินที่เข้มข้นมากขึ้นและเมื่อได้รับเป็นระยะเวลานานขึ้น ซึ่งต้นกล้วยไม้ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นระยะเวลา 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยด์สูงที่สุด คือ 60 เปอร์เซ็นต์

5. ลักษณะภายนอกของต้นดิพลอยด์และเตตระพลอยด์มีความแตกต่างกัน คือ ต้นเตตระพลอยด์มีใบสั้นและกว้าง แผ่นใบหนา รากสั้น และมีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นดิพลอยด์

การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่างๆ ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

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

2. ลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณสูงขึ้น ไม่มีผลทำให้ความหนาแน่นของปากใบและความยาวของปากใบแตกต่างกัน

3. ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับและได้รับการฉายรังสีแกมมาทุกต้นไม่พบการเกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม จึงยืนยันได้ว่าต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาทุกต้นเป็นต้นดิพลอยด์ แต่พบ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีการเปลี่ยนแปลงไป เช่น ใบหลอด ใบแฉก ใบด่าง ใบยาวเรียวเล็ก ใบหด สั้นและหนาขึ้น ใบเปลี่ยนสีไปจากเดิมจากสีเขียวปนน้ำตาลแดงเป็นสีเขียวทั้งใบ โดยต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์สูงที่สุด คือ 24.29 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำออกปลูกในสภาพโรงเรือนนั้น กลับพบว่า มีเปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้วยไม้น้อยลงเมื่อได้รับปริมาณรังสีแกมมาที่สูงขึ้น ต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้วยไม้ที่กลายพันธุ์หลังจากนำไปปลูกในสภาพโรงเรือนสูงที่สุด 57.14 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่าการใช้สารโคลชิซินทุกความเข้มข้น เป็นระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน สามารถชักนำให้เกิดต้นเตตระพลอยด์ได้ ส่วนการทดลองฉายรังสีแกมมาพบต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ ต้นเตตระพลอยด์และต้นที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปนั้นอาจจะเป็นลักษณะที่ดีกับกล้วยไม้ชนิดนี้ได้ แต่ต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ควรที่จะมีการศึกษาความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ และควรที่จะศึกษาผลของสารละลายโคลชิซินในความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน และผลของปริมาณรังสีแกมมาที่มีผลต่อลักษณะรูปร่างของดอก สีของดอก จำนวนดอก ระยะเวลาการออกดอก และความแข็งแรงของต้น เพื่อที่จะใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกลักษณะต้นที่ดีเหมาะสมจะนำไปทำเป็นพันธุ์การค้าต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายการอ้างอิง

ครรชิต ธรรมศิริ. (2550). **เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้.** ปรับปรุงครั้งที่ 2. อัมรินทร์พริ้นติ้งแอนพับ ลิชชิ่ง: 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). ผลของโคลชิซินต่อฟ้ามุ้ยในสภาพปลอดเชื้อ. 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.** ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ 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.

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.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Silva, P. A. K. X., Callegari-Jacques, S. and Bodanese-Zanerttini, M. H. (2000). Induction and 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 แล้วต่อสายยางตรงกลางที่มีกรองอากาศโดยมีสำลีอัดไม่แน่นเกินไปในหลอดแก้วที่ต่อเชื่อมสายยางด้านหนึ่งกับ pipet ที่จุ่มอยู่ในสารละลาย ปลายสายยางอีกดด้านหนึ่งต่อเข้ากับท่อลม 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	ระยะเวลา (วัน) (D)				
(% w/v) (C)	1	3	5	7	เฉลี่ย
	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	ระยะเวลา (วัน) (D)				
(% w/v) (C)	1	3	5	7	เฉลี่ย
	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

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 เดือนหลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน

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

ตารางผนวกที่ 5 ค่าเฉลี่ยความกว้างใบของต้นกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* ที่มีอายุ 10 เดือนหลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (% w/v) (C)	ระยะเวลา (วัน) (D)				เฉลี่ย
	1	3	5	7	
	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)				เฉลี่ย
	1	3	5	7	
	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	ระยะเวลา (วัน) (D)				
(% w/v) (C)	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	ระยะเวลา (วัน) (D)				
(% w/v) (C)	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 เดือนหลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน	ระยะเวลา (วัน) (D)				
(% w/v) (C)	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 เดือนหลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน	ระยะเวลา (วัน) (D)				
(% w/v) (C)	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

ตารางผนวกที่ 11 ค่าเฉลี่ยความยาวปากใบของต้นกล้วยไม้ลูกผสม *Doritaenopsis* ที่มีอายุ 10 เดือน หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (% w/v) (C)	ระยะเวลา (วัน) (D)				เฉลี่ย
	1	3	5	7	
	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)				เฉลี่ย
	1	3	5	7	
	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

ประวัตินักวิจัย

<u>หัวหน้าโครงการวิจัย</u>

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย อารักษ์ ธีรอำพน

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Arak Tira-umphon

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3 4098 00086 xx x

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.

4. หน่วยงาน สาขาวิชาเทคโนโลยีผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา
โทรศัพท์ 0-4422-4358 โทรสาร 0-4422-4281
E-mail address : arak@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

2548 – 2551	ระดับปริญญาเอก จาก มหาวิทยาลัยตูลูส ประเทศฝรั่งเศส (INP/ENSAT, Toulouse, France) หัวข้อวิทยานิพนธ์ <<Influence of the ethylene on the grape berry development and related-genes expression >>
2547	ระดับประกาศนียบัตร จาก มหาวิทยาลัยตูลูส (INP/ENSAT, Toulouse, France) หัวข้อรายงาน << Role of the Ethylene in the Expression of the Glucose-Flavonoid UDP 3 ô-Glucosyltransferase (UFGT) of the Grape Tissues >>
2534 - 2538	ระดับปริญญาโท (เกษตรศาสตร์) วิชาเอก การปรับปรุงพันธุ์พืชสวน วิชารอง พันธุศาสตร์ จาก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หัวข้อวิทยานิพนธ์ << Genetic Variation in Growth and Yield of Crosses between Broccoli and Chinese Kale >>
2530 – 2533	ระดับปริญญาตรี (เกษตรศาสตร์) วิชาเอก พืชสวน มหาวิทยาลัยขอนแก่น

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ ปรับปรุงพันธุ์ เทคโนโลยีชีวภาพ ไฮโดรโปนิกส์ สถิติ

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย – งานวิจัยที่แล้วเสร็จ

- การทดสอบพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดที่เหมาะสมสำหรับการปลูกในจังหวัดนครราชสีมา. 2540.
- การทดสอบระบบการปลูกและสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแตงเทศโดยไม่ใช้ดิน ระยะ 1-2. 2542-2543.

- การผลิตผักคะน้าจีนอนามัยเชิงธุรกิจโดยวิธีผสมผสาน. 2544.
- การฝึกอบรมหลักสูตรการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. 2544.
- ระบบการปลูก สูตรสารละลายธาตุอาหาร ภาชนะปลูกและวัสดุปลูกที่เหมาะสมสำหรับการปลูกผักกาดหอมโดยไม่ใช้ดิน. 2545.
- ความปรวนแปรทางพันธุกรรมของการเจริญเติบโตและผลผลิตในการผสมระหว่างแตงไทยกับแตงแคนตาลูป. 2553.
- การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน : เทคโนโลยีทางเลือก. 2553.
- คลินิกเทคโนโลยี แก้ไข ฟื้นฟู และบริหารจัดการพื้นที่เกษตรกรรมหลังน้ำลด. 2555.
- คลินิกเทคโนโลยี การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. 2555.

7.2 ผู้ร่วมโครงการวิจัย – งานวิจัยที่แล้วเสร็จ

- การปรับปรุงพันธุ์ผัก. 2538.
- แบบของไอโซไซม์ในการอนุรักษ์พันธุ์ไม้ไทย. 2538.
- การปรับปรุงระบบปลูกพืชในโรงเรือน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและลดต้นทุนการผลิต. 2553.
- การฟื้นฟูและเยียวยาผู้ประสบอุทกภัยหลังน้ำลดด้วยงานวิจัยของ วช. 2554.

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

- ความสัมพันธ์ระหว่างความปรวนแปรทางพันธุกรรมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแตงเทศและแตงไทย จากเทคนิค ISSR. 2555. (หัวหน้าโครงการ) - อยู่ระหว่างการเขียนรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
- ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล Doritaenopsis ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ. 2555-2556. (หัวหน้าโครงการ) – อยู่ระหว่างการวิเคราะห์ข้อมูล
- สถานภาพและปัญหาในระบบการผลิต การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวและการตลาดของผักเศรษฐกิจในเขตจังหวัดนครราชสีมา. 2556. (หัวหน้าโครงการ) – อยู่ระหว่างดำเนินการ

7.4 ผลงานวิชาการ

- **Tira-umphon A** (1998) Vegetable Soybean Variety Trial in Nakhon Ratchasima. *Suranaree Journal Science Technology* 7: 232-241
- **Tira-umphon A**, Kumthong U (2001) Soilless Culture System of Melon Testing between NFT and DWT. *Agricultural Science Journal* 32 (1-4): 77-85

- **Tira-umphon A**, Kumthong U (2001) Comparison of Melon Cultivars in Greenhouse and Field in Rainy Season. *Agricultural Science Journal* 32(1-4): 147- 50
- **Tira-umphon A**, Chervin C, El-Kereamy A, Roustan JP, Lamon J, Latche A, Kanellis A, Bouzayen M (2005) Ethylene is required for the ripening of grape. *Acta Horticulturae* (689): 251-256
- **Tira-umphon A**, Roustan JP, Chervin C (2007) The stimulation by ethylene of the UDP glucose-flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase (UFGT) in grape tissues is independent from the MybA transcription factors. *Vitis* 46(4): 210-211
- Chervin C, **Tira-umphon A**, Terrier N, Zouine M, Severac D and Roustan JP (2008) Stimulation of the grape berry expansion by ethylene and affects on related gene transcripts, over the ripening phase. *Physiol. Plant.* (134): 534–546.
- "Chervin C, **Tira-umphon A**, Chatelet, P, Jauneau, A, Boss, PK and Tesniere C (2009) Ethylene and other stimuli affect expression of the UDP glucose-flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase in a non-climacteric fruit. *Vitis* (48): 11-16"

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี