บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

กล้วยไม้จัดอยู่ใน วงศ์ Orchidaceae เป็นไม้ดอกที่มีวิวัฒนาการสูงสุดในบรรดาไม้ดอกทั่วไป กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และเป็นพืชดอกที่มีจำนวนชนิดมากที่สุดในโลก ประมาณ 25,000 ชนิด (Alberto, 1989) ในเอเชียเขตร้อนมีมากถึง 6,800 ชนิด เนื่องจากมีความหลากหลายของสภาพป่าและความแตกต่างในระดับความสูงเหนือน้ำทะเล (Pridgeon, 2000)

กล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* มีชื่อเรียกว่า Moth Orchid เนื่องจากดอกมีลักษณะคล้ายผีเสื้อกลางคืน เป็นกล้วยไม้ที่รู้จักแพร่หลายทั่วโลก มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของเอเชียและเกาะต่างๆ ในมหาสมุทรแปซิฟิก จากศรีลังกาไปจนถึงปาปัวนิวกินี และตอนเหนือของออสเตรเลีย จีนตอนใต้ ไต้หวันและหมู่เกาะในฟิลิปปินส์ *Phalaenopsis amabilis* มีถิ่นกำเนิดแถบหมู่เกาะในฟิลิปปินส์ ส่วน *P. parishii* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบพม่าสามารถพบได้ในป่าทางภาคเหนือของประเทศไทย (Cribb, 1994)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

Phalaenopsis amabilis (L.) Blume (ณัฐา, 2545)

ลำต้น เป็นพวก เจริญเติบโตทางเดียว (monopodial) ส่วนของลำต้นสั้น (ปล้องสั้น)

ราก เป็นรากอากาศ (epiphytic) อวบน้ำ ปลายรากสีเขียว

ใบ ใบเป็นรูปไข่ แบนกว้างอาจมีขนาดกว้างยาวถึง 50 × 10 เซนติเมตร(ซม.) สีเขียวเข้ม อวบน้ำ ปลายใบมน

ดอก มีช่อดอกแบบกระจะ (raceme) ดอกมีขนาดใหญ่และมีอายุการบานของดอกค่อนข้างนาน ดอกมีสีขาว และภายในปากสีเหลือง ลักษณะดอกค่อนข้างกลม ขนาดของดอกกว้าง 4 – 6 ซม. กลีบดอกมีขนาดใกล้เคียงกัน และมีปากแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน 2 ส่วนด้านข้างตั้งขึ้นและมีส่วนกลางรูปหอกปลายแหลม (ภาพที่ 1)

ฝัก เป็นรูปกระสวย สีเขียวเข้ม ยาวประมาณ 7-10 ซม. อายุการถือฝักประมาณ 180 วัน (Arditti, 1984)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 1 *Phalaenopsis amabilis*

***Phalaenopsis parishii* Rchb.f.** (ณัฐา, 2545)

ลำต้น เป็นพวก เจริญเติบโตทางเดียว ส่วนของลำต้นสั้น ต้นค่อนข้างเล็กกระทัดรัด

ราก เป็นรากอากาศ อวบน้ำ ปลายรากสีเขียวอมม่วง

ใบ ใบเป็นรูปไข่ แบนกว้าง สีเขียวเข้ม อวบน้ำ ปลายใบมน

ดอก มีช่อดอกแบบกระจะ ดอกมีสีขาวกว้าง 1-2 ซม.ปากตรงกลางมีสีม่วง ปลายปากสีขาวเหมือนกลีบดอก รูปทรงดอกดูสวยแปลกตา แต่มีอายุการบานของดอกเพียง 5 – 10 วัน ดอกบานช่วงเดือนเมษายน (ภาพที่ 2)

ฝัก เป็นรูปกระสวย สีเขียวเข้ม ยาวประมาณ 2- 4 ซม. อายุการถือฝักประมาณ 150 วัน ฝักที่เกิดในธรรมชาติจะไม่ค่อยสมบูรณ์ (Arditti, 1984)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 2 *Phalaenopsis parishii*

การขยายพันธุ์กล้วยไม้แบบไม่อาศัยเพศในสภาพปลอดเชื้อ

โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ (Protocorm-like Body : PLB) เป็นชื่อเรียกโครงสร้างของพืชที่มีลักษณะคล้ายโปรโตคอร์ม แต่มีต้นกำเนิดมาจากการนำเนื้อเยื่อของพืช เช่น ปลายยอด ปลายราก ใบอ่อน ก้านช่อดอกอ่อน ไปเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (Morel, 1960)

การชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* ได้มีการทดลองทำกับเนื้อเยื่อหลายส่วน เช่น Tanaka and Sakanishi (1980) พบว่าการเติม น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ เพียงพอต่อการเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* ต่อมาในปี 1984 Tanaka and Sakanishi ได้นำใบแก่กล้วยไม้ *Phalaenopsis* ที่ได้ต้นมาจากการเลี้ยงก้านช่อดอกในหลอดแก้วมาเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัม/ลิตร (มก./ล.) และ BA 10 มก./ล. พบว่าสามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ได้ แต่ยังให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ หลังจากนั้น Tanaka และ Sakanishi (1985) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ฮอร์โมนเติมลงในอาหารสูตร MS เพื่อชักนำโปรโตคอร์มไลค์บอดี้จากใบของลูกผสม *P. amabilis*, *P.* hybrids Zada × Zada, *P.* Lavender Lady, *P.* Lipperose และ *P.* Zauberrose ที่ได้ต้นมาจากการเลี้ยงก้านช่อดอกใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หลอดแก้ว พบว่าการใช้ธาตุอาหารหลักสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA 1 มก./ล.ร่วมกับ BA 10 มก./ล. สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนของใบที่นำมาเลี้ยงเกิด PLB ได้ โดยใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 173 วัน แต่พบการปล่อยสาร Phenolic compound จากรอยตัดในทุกชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยงและเมื่ออายุ 239 วันทำการย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร KC ดัดแปลงที่เติม peptone 2000 มก./ล. เป็นเวลา 10 เดือน เพื่อชักนำให้ได้ต้นอ่อน

Robert (1994) ได้ทำการทดลองโดยนำก้านช่อดอกของกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* และ *Doritaenopsis* ที่ดอกบานแล้วมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร XER ที่เติม Thidiazuron (TDZ) พบว่าในกรรมวิธีที่เติม TDZ 2.5 มก./ล. เป็นเวลา 6 เดือน สามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* และ *Doritaenopsis* ได้สูงถึง 80 และ 66.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากจำนวนของก้านช่อดอกที่นำมาชักนำ ต่อมา Ishii *et al.* (1997) ทำการทดลองชักนำให้เกิดโปรโต-คอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้ *P.* Richard Shaffer 'Santa Cruz' จากชิ้นส่วนใบอ่อนที่อายุ 2 เดือน ซึ่งเกิดจากต้นที่นำก้านช่อดอกมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went (VW) ที่เติมน้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิด โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ได้ถึง 96 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการตายเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ Zhou and Tian (1999) พบว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายรากของ *Phalaenopsis* sp. ขนาด 2 มิลลิเมตร(มม.) บนอาหารแข็งสูตร 1/3 MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซอร์บิทอล 0.1 เปอร์เซ็นต์ NAA 0.01 มก./ล.และ BA 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 2 เดือน สามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ได้สูงถึง 65 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่เกิดขึ้น 83 เปอร์เซ็นต์ การทดลองชักนำโปรโตคอร์มไลค์-บอดี้จากโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* Nebula โดย Chen *et al.* (2000) พบว่าโปรโต-คอร์มที่อายุ 1 เดือนตอบสนองต่อการชักนำได้ดีกว่าโปรโตคอร์ม ที่อายุ 2 เดือน โดยโปรโตคอร์ม -อายุ 1 เดือนตอบสนองต่ออาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม TDZ 0.5 มก./ล. และ 2,4-D 0.5 มก./ล.ดีที่สุด และต้องย้ายลงอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม TDZ 0.1 มก./ล. เพื่อชักนำให้เปลี่ยนเป็นต้นและเปลี่ยนอาหารทุกเดือนจนกว่าจะย้ายปลูกในสภาพโรงเรือน

การชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ จากส่วนของใบอ่อนของกล้วยไม้ *Doritaenopsis* hybrid โดยใช้ TDZ BA และ Zeatin พบว่า การเลี้ยงใบอ่อนของ *Doritaenopsis* hybrid บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 2 มก./ล. เป็นเวลา 3 เดือน สามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ ได้มากถึง 72.3 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนโปรโตคอร์มต่อชิ้นมากที่สุด 18 โปรโตคอร์มต่อ 1 ชิ้นส่วนพืชทดลอง และพบว่าใบที่อ่อนกว่า สามารถเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ได้ดีกว่าใบที่แก่ และ สามารถพัฒนางอกรากและยอดได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมต่อไปอีกเป็นเวลา 4-6 เดือน โดยทำการเปลี่ยนอาหารทุกเดือน (Park *et al.*, 2002) ในปีต่อมา Park *et al.* (2003)ได้ทำการชักนำโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ จากส่วนของปลายรากกล้วยไม้ *Doritaenopsis* hybrid โดยใช้ TDZ BA และ Zeatin พบว่า การ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เลี้ยงปลายรากของ *Doritaenopsis* hybrid บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 5 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ ได้มากที่สุด 47.2 เปอร์เซ็นต์ แต่ละชิ้นส่วนของพืชทดลองมีโปรโตคอร์มเกิดขึ้น 2-6 โปรโตคอร์มต่อชิ้นส่วน และเมื่ออายุได้ 8 สัปดาห์ ก็ย้ายลงอาหารสูตร Hyponex เพื่อชักนำให้เกิดยอดและราก

ต่อมาได้มีรายงาน การชักนำการเกิดโซมาติกเอมบริโอจากใบของกล้วยไม้ *P.* Little Steve โดย Huei *et al.* (2005) พบว่าเมื่อใช้อาหารหลักสูตร1/2 MS ที่เติม TDZ 0.5 มก./ล. BA 0.5 มก./ล. และไคนิติน 0.5 มก./ล. แล้วนำไปเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 30 วัน พบว่าโซมาติกเอมบริโอเกิดขึ้นบนอาหารที่เติม TDZ 0.5 มก./ล. และ BA 0. 5 มก./ล. เท่านั้น และเมื่อนำโซมาติกเอมบริโอที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2 MS เป็นเวลา 4 เดือน ได้ต้นกล้วยไม้ขนาดเล็กที่พร้อมย้ายออกปลูกในโรงเรือน และได้มีการทดลองเพิ่มจำนวนของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้ *P. gigantea* โดย Rosmah *et al.* (2006) พบว่าเมื่อเลี้ยงโปรโตคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารแข็งสูตร XER ที่เติมน้ำมะพร้าว10 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ 1 โปรโตคอร์ม สามารถเพิ่มขึ้นเป็น 7 โปรโตคอร์ม หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์

นอกจากนี้ Chen *et al.* (2005) ได้ทำการชักนำโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้ *Epidendrum radicans* จากตาก้านช่อดอก โดยนำก้านช่อดอกที่มีตาติดไปเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS ที่เติม TDZ 1 มก./ล. เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าเริ่มมีการเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ขึ้นมา และยังพบอีกว่าน้ำตาลซูโครสมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ เมื่อให้น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.0825 เปอร์เซ็นต์ มีการเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ได้มากถึง 23.6 โปรโตคอร์มต่ อชิ้นส่วนที่นำมาชักนำ และ Sheelavanthmath *et al.* (2005) ได้ทำการเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Aerides crispum* บนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (1962) ที่เติม BA 0.5 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซนต์ และน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ได้ 100 เปอร์เซ็นต์และเกิดจำนวนโปรโตคอร์มไลค์บอดี้สูงถึง 22 โปรโต - คอร์มต่อชิ้นส่วนพืช ในขณะเดียวกัน Priyono (2005) ได้ ทำการทดลองโดยนำลำต้นของกล้วยไม้ *Vanilla* Planifollia Andrew มาสไลด์ แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตรเฉพาะที่เติมไคนิติน 0.5-2.0 มก./ล. ร่วมกับ ซิสตินหรือพาโคลบิวทาโซล 5-15 มก./ล. พบว่าสามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์ม-ไลค์บอดี้ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ของพืชทดลอง และมีการเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้มากที่สุด 12 โปรโต-คอร์มบนพืชทดลองเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรเฉพาะที่เติมไคนิติน 1.5 มก./ล.ร่วมกับ ซิสตินหรือพาโคลบิวทาโซล 15 มก./ล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเพิ่มจำนวนโครโมโซม

การกลายพันธุ์สามารถพบได้ในธรรมชาติ ซึ่งมีผลต่ออัตราการรอดและการดำรงชีพของพืช ตลอดจนการปรับตัวเข้ากับสภาพนิเวศที่จำเพาะเจาะจง โดยมากการกลายพันธุ์เกิดได้ในอัตราที่ต่ำ แต่กล้วยไม้มีจำนวนเมล็ดมาก จึงสามารถเกิดการกลายพันธุ์สูง การกลายพันธุ์สามารถเกิดได้หลายประเภทคือ การกลายพันธุ์ที่เกิดจากพันธุกรรม ได้แก่ การเพิ่ม การสลับ การเคลื่อนย้าย และการขาดหายไปของชิ้นส่วนโครโมโซม ในกรณีของการเพิ่มจำนวนโครโมโซมสามารถช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ ให้เกิดความสมบูรณ์ของต้นลูกผสมเพื่อสามารถผสมพันธุ์กับต้นอื่นและสามารถผลิตเมล็ดต่อไปได้ การเกิดโพลีพลอยด์ (polyploidy) สามารถพบได้ในพืชมากกว่าในสัตว์ ทำให้เกิดพืชชนิดใหม่ขึ้น และมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อวิวัฒนาการของโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาริโอต (Norberto, 2005)

การเกิดโพลีพลอยด์ เป็นกระบวนการที่มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาของพืช ช่วยรักษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกระบวนการเกิดออลโลโพลีพลอยด์ (allopolyploid) (Harlan and de Wet, 1975) การปรับตัวและวิวัฒนาการของการแบ่งเซลล์พืชโดยไม่มีการลดจำนวนโครโมโซมของเซลล์สืบพันธุ์ลงในช่วงเวลาการแบ่งเซลล์ ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของจำนวนโครโมโซมเป็น 2 เท่า การเกิดออโตเตตราพลอยด์ (autotetraploid) มีอัตราการเกิดการกลายพันธุ์เพียง 10^{-5} เปอร์เซ็นต์ และเกิดขึ้นในช่วงเวลาที่มีการผสมตัวเองและผสมข้ามเพียง 0.2 และ 2.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Ramsey and Douglass, 1998) ซึ่งอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาของพืชเกิดเป็นพืชชนิดใหม่ เช่น การเปลี่ยนแปลงลักษณะการเจริญเติบโต การเปลี่ยนสีดอก การเพิ่มขนาดดอก ทำให้พืชสามารถปรับตัวได้ในสภาพแวดล้อม ที่เปลี่ยนแปลงไป ชิ้นส่วนที่สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ผลดีที่สุดคือส่วนของเมล็ดและเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ การเกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้ส่วนใหญ่เป็นลักษณะที่ดี ช่วยให้เกิดความสมบูรณ์พันธุ์ในลูกผสมที่เป็นหมัน เพิ่มคุณภาพดอก ดอกกว้างขึ้น กลีบเลี้ยงและกลีบดอกเหลื่อมกัน ดอกขนาดใหญ่ สีดอกเข้ม ลำต้นอวบ ข้อและปล้องสั้นลง อายุการบานดอกนานกว่าต้นปกติ (Dhawan and Lavama, 1996)

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในพืช สามารถทำได้โดยการใช้สารเคมีหลายชนิด แต่โคลชิซินเป็นสารที่มีการใช้มากที่สุด เพราะให้ผลค่าเฉลี่ยในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์กับพืชที่สม่ำเสมอที่สุด (อดิศร, 2539)

สารโคลชิซินเป็นสารอัลคาลอยด์ มีชื่อ acetyltrimethyl colchicine acid สูตรโมเลกุล $C_{22}H_{25}O_6$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 399.43 โคลชิซินบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นเกล็ดหรือผงสีเหลืองละลายได้ดีในน้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และแอลกอฮอล์ สลายตัวในที่มีแสง โคลชิซินสกัดได้จากส่วนหัวและเมล็ดของพืช จำพวก Autumn crocus (*Colchicum autumnale*) (รังสฤษฏ์, 2545) และดองดึง (*Gloriosa superba* L.) ที่สามารถพบได้ในประเทศไทย

สารโคลชิซินถูกนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์และด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ได้นำมาใช้ในการเพิ่มโครโมโซมโดยโคลชิซินมีผลต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ของพืช คือทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างสปินเดิลไฟเบอร์ (spindle fiber) ในระยะเมตาเฟสของการแบ่งเซลล์ ทำให้สร้างสปินเดิลไฟเบอร์ไม่สมบูรณ์หรือขาดหายไป ส่งผลให้โครโมโซมไม่แยกออกจากกันและเคลื่อนที่ไปยังขั้วตรงข้ามในระยะแอนาเฟส ดังนั้นเมื่อเกิดเยื่อหุ้มนิวเคลียสมาล้อมรอบโครโมโซมกลางเซลล์ ทำให้ได้นิวเคลียสที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (Addink, 2007)

การใช้โคลชิซินนิยมใช้ในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของพืชแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป ได้มีการศึกษาการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในกล้วยไม้หลายสกุล เช่น การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW (1949) ที่เติมสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ วางบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที ภายใต้สภาพแสงที่ต่อเนื่องเป็นเวลา 5 7 และ 10 วันจากนั้นย้ายชิ้นส่วนของโปรโตคอร์มลงในอาหารใหม่ที่ปราศจากโคลชิซิน พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นเตตราพลอยด์ได้ (Sanguthai *et al*., 1973)

มีการศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* 3 ชนิด คือ *P.equestris*, *P. fasciata* และ *P.* Betty Hauserman โดยนำฝักกล้วยไม้ที่มีอายุประมาณ 4 – 5 เดือนมาเพาะลงในอาหารสูตร MS จากนั้นเมื่อเมล็ดเริ่มเกิดโปรโตคอร์ม จึงย้ายโปรโตคอร์มลงในขวดขนาด 125 มล.ที่ประกอบด้วยอาหารเหลว 25 มล.ร่วมกับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 50 มก. /ล. แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 50 รอบต่อนาทีนาน 10 วัน จากนั้นย้ายโปรโตคอร์มลงในอาหารที่ไม่ใส่โคลชิซินและย้ายลงในอาหารใหม่ในเดือนต่อมา เมื่อต้นออกรากแข็งแรงสมบูรณ์จึงย้ายออกปลูกและตรวจนับโครโมโซม พบว่ากรรมวิธีที่ให้สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 50 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้สูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยต้นเตตราพลอยด์และออคตาพลอยด์ (octaploids) 46 และ 2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ต้นที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยสารละลายโคลชิซินมีการปลดปล่อยสารประกอบฟีโนลิค (phenolic compound) ในอาหารจึงต้องทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 – 3 สัปดาห์ ต้น ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นมีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นดิพพลอยด์ (diploids) ต้น ที่เป็นเตตราพลอยด์ที่เกิดขึ้นในสภาพธรรมชาติสามารถออกดอกได้หลังเพาะเมล็ดนาน 3 ปี แต่ต้นเตตราพลอยด์ที่ได้จากการชักนำสามารถออกดอกได้หลังเพาะเมล็ดนาน 5 ปี การชักนำให้ออกรากที่ดีต้องมีความเข้มข้นของ NAA มากกว่า 150 มก./ล.ขึ้นไป (Griesbach, 1981)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากมีการชักนำเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* แล้ว ยังมีสกุลใกล้เคียงกันอีก คือ การศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง โดยทำการเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ม้าวิ่งในอาหารเหลวสูตร NDM ร่วมกับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.01, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในที่มืด พบว่า อัตราการรอดชีวิตและการเกิดยอดของกล้วยไม้ม้าวิ่งลดลง เมื่อเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่เติมสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นสูง และระยะเวลาเพาะเลี้ยงนานขึ้น สำหรับความเข้มข้นสารละลายโคลชิซินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโตรโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งคือ 0.05 เปอร์เซนต์ ระยะเวลา 3 วัน จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งโดยใช้วิธี squash technique พบว่าจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n = 2x = 38 ส่วนกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n = 4x = 76 และ 2n = 8x = 152 (สุมนทิพย์ และ ปิยะธิดา, 2551)

การใช้ส่วนของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดของกล้วยไม้ *Cymbidium* 'Silky' ที่เป็นต้นดิพพลอยด์ กับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.01 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาที่ได้รับสาร 3 ระยะ คือ 1 2 และ 3 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมเป็นสองเท่า พบว่าความเข้มข้นสารละลายโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โปรโตคอร์มตายมากที่สุด ส่วนกรรมวิธีที่ให้ความเข้มข้นของโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โปรโตคอร์ม ไลค์บอดี้ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ การใช้สารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์เป็นกรรมวิธีที่ดีที่สุด และสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่ม จำนวนชุดโครโมโซมได้ มีทั้งที่เป็นเตตราพลอยด์และทริปพลอยด์ และระยะเวลาที่ได้รับสารละลายโคลชิซินไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมแต่มีผลต่อการตายของโปรโตคอร์ม นอกจากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในเซลล์ปลายรากแล้ว ลักษณะของต้นที่เป็นโพลีพลอยด์ ยังมีความแตกต่างจากต้นทริปพลอยด์ในด้านรูปร่างของใบและความยาวใบเมื่อเทียบกับต้นดิพพลอยด์ (Kim *et al*., 1997)

การชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย จากรายงานของ Kamemoto *et al.* (1999) พบว่าการเลี้ยงโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ของ *Dendrobium phalaenopsis* ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงของ VW ร่วมกับสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 10 วัน ทำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์มากที่สุด

การศึกษาผลของโคลชิซินที่มีผลต่อโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Cattleya intermedia* L. ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อร่วมกับระดับความเข้มข้นของโคลชิซิน 0.00, 0.05, 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 4 และ 8 วัน พบว่าระดับความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์สามารถชักนำให้เกิดต้นที่เป็นมิกโซ-พลอยด์ (mixoploids) และเตตราพลอยด์มีผลทำให้พื้นที่ปากใบและความหนาแน่นของปากใบเพิ่ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

มากขึ้นเมื่อเทียบกับต้นปกติ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ความหนาแน่นของปากใบเป็นตัวจำแนกความแตกต่างระหว่างต้นปกติและต้นเตตราพลอยด์ (Silva *et al*., 2000)

การชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในกล้วยไม้ *Ionocidium* Popcorn ในระยะโปรโตคอร์มโดยสารละลายโคลชิซิน สามารถชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์จากต้นดิพพลอยด์ และเมื่อตรวจสอบโดยวัดขนาดของเซลล์ปากใบ พบว่า ขนาดปากใบของต้นเตตราพลอยด์มีความกว้างและยาวมากกว่าต้นปกติ 23.2 และ 17.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และชั้นเซลล์หนาขึ้น 35.4 เปอร์เซ็นต์ (Fan *et al,.* 2003)

การศึกษาการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้สกุลอะแรนดา (*Aranda*) โดยการใช้สารโคลชิซิน พบว่าวิธีการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยแช่แคลลัสและโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ของลูกผสมอะแรนดา 5 ชนิด ในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.5 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 9 วัน และลูกผสมสกุลอะแรคนิส (*Arachnis*) 1 ชนิด โดยใช้ความเข้มข้นของโคลชิซินเหมือนกันแต่ใช้เวลาเพียง 3 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่ออะแรนดาค่อนข้างน้อยประมาณ 1 - 15 เปอร์เซ็นต์ แต่อะแรคนิสตายมากกว่า คือ 90-97 เปอร์เซ็นต์ และผลจากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากต้นพืชทั้งหมด 203 ต้น พบต้นที่เป็นเตตราพลอยด์ และเกือบเป็นเตตราพลอยด์ 135 ต้น เป็นมิก โซ-พลอยด์ 2 ต้น เป็นดิพพลอยด์ 66 ต้น และผลทางด้านความกว้างและความยาวของปากใบไม่มีความแตกต่างกัน ลักษณะทั่วไปของต้นดิพพลอยด์และเตตราพลอยด์ไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างได้ชัดเจน (มลวิภา, 2521)

นอกจากนี้ สาริณี (2538) ยังได้ลักษณะดอกและความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ต้นดิพพลอยด์ และต้นออลโลเตตราพลอยด์ที่ได้มาจากการใช้สารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มจำนวนโครโมโซมในเนื้อเยื่อแคลลัสที่เป็นดิพพลอยด์ พบว่าต้นดิพพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมปกติเท่ากับ 2 n = 38 และต้นออลโลเตตราพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซม 2n = 76 ต้นออลโลเตตราพลอยด์ มีดอกขนาดใหญ่กว่าต้นที่เป็นดิพพลอยด์ แต่มีจำนวนดอกต่อช่อน้อยกว่า กลีบดอกของต้นเตตราพลอยด์มีขนาดกว้าง ยาว และความหนามากกว่า และการบานของดอกบนต้นออลโลเตตราพลอยด์นานกว่าดิพพลอยด์เป็นเวลา 8 วัน แต่การแบ่งตัวของไมโครสปอร์โรไซต์ (microsporocyte) ของดิพพลอยด์ และออลโลเตตราพลอยด์ส่วนใหญ่แล้วปกติ ยกเว้นบางไมโครสปอร์ (microspore) การงอกของหลอดละอองเกสรของดิพพลอยด์ช้ามาก มีเป็นส่วนน้อยที่งอกในเวลา 3 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับ ออลโลเตตราพลอยด์แล้ว หลอดละอองเกสรเพศผู้ มีขนาดยาว และมีจำนวนมาก การศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ในการสืบพันธุ์พบว่า ต้นเตตราพลอยด์มีความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์สูงกว่าต้นดิพพลอยด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาจำนวนโครโมโซม

การศึกษาถึงส่วนประกอบของเซลล์เป็นข้อมูลที่สามารถบ่งบอกถึงความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตคือโครโมโซม โดยที่พืชแต่ละชนิดมีจำนวนและรูปร่างลักษณะของโครโมโซมที่แน่นอน (กฤษฎา, 2519) การศึกษาลักษณะกายวิภาคของโครโมโซม การศึกษาพฤติกรรมการเข้าคู่ของโครโมโซมในช่วงเวลาการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสม และระดับความแปรปรวนของประชากรเมื่อเกิดการผสมพันธุ์ขึ้น (Clive, 1989) การหาจำนวนโครโมโซมซึ่งถือว่าเป็นการศึกษาพื้นฐานของพืช แต่ละชนิด สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและผสมพันธุ์ได้ โดยขั้นตอนในการศึกษาจำนวนโครโมโซม มีความแตกต่างกันออกไป เช่น

การศึกษาในกล้วยไม้สกุล *Pleione* จำนวน 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มแรกเป็นกลุ่มกล้วยไม้รากอากาศมีจำนวน 2 ชนิด และกลุ่มที่ 2 เป็นกล้วยไม้ดิน ได้มีวิธีการเตรียมตัวอย่างรากโดยเก็บรากมาแช่ลงใน ไฮดรอกซีคิวโนลีน (8 – hydroxyquinoline) นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นแช่ในน้ำยารักษาสภาพนาน 12 ชั่วโมง สำหรับการศึกษาคาริโอไทป์จำเป็นต้องย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริค นาน 30 นาที และแยกเซลล์ด้วยวิธีการ Feulgen squash (Stergianou, 1989) การศึกษาเทคนิควิธีการตรวจนับโครโมโซมจากปลายรากกล้วยไม้ในกลุ่ม Cypripedioideae โดยเก็บปลายรากที่มีการแบ่งเซลล์นำมาหยุดวงชีพเซลล์ด้วย 8-ไฮดรอกซีควิโนลีน นาน 4 – 5 ชั่วโมง รักษาสภาพเซลล์ นาน 1 ชั่วโมง นำไปแช่ลงในกรดอะซีติกเข้มข้น (glacial acetic) นาน 5 นาที แล้วแยกเซลล์ด้วยกรดไฮโดรคลอ ริค นาน 15 นาที และย้อมด้วยสีฟิวเจน (feulgen solution) นาน 30 นาที บดขยี้เซลล์ใน อะซีโตออร์ซีน (aceto- orcein) สามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนที่สุด (Antony *et al*., 1998)

Felix and Guerra (2000) ศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ในกล้วยไม้เผ่า Cymbidieae ทั้งหมด 44 ชนิดของบราซิล โดยเก็บตัวอย่างรากมาแช่ลงใน 8-ไฮดรอกซีควิโนลีน ความเข้มข้น 0.29 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นตรึงเซลล์ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ ที่ประกอบด้วยเอทธานอลและกรดอะซีติก (ethanol/acetic acid) ในอัตราส่วน 3 :1 นาน 3 ถึง 24 ชั่วโมงและเก็บไว้ในสภาพอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการเตรียมสไลด์จึงนำปลายรากมาย่อย (hydrolyse) ด้วย กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 5 นอร์มอล ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20-30 นาที และย้อมด้วยสี Giemsa 2 เปอร์เซ็นต์ หรือ hematoxylin 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากล้วยไม้ในกลุ่ม Cymbidioid มีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ 2n = 10 ในชนิด *Psycmorchis pusilla* มีจำนวนโครโมโซมจนถึง 2n = 168 นอกจากนี้ยังได้ศึกษาวิวัฒนาการของคาริโอไทป์ กล้วยไม้ที่ศึกษาทั้งหมดโดยเฉพาะทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของบราซิลเป็นหลัก โดยพบว่าโครโมโซมมีความหลากหลายคล้ายกับที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าจำนวนโครโมโซม ในเผ่าย่อย Eulophiinae 2n = 44 46 54 และ 92 ใน เผ่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ย่อย Cyrtopodiinae 2n = 54 ในเผ่าย่อย Catasetinae 2n = 52 ใน เผ่าย่อย Zygopetalinae 2n = 40 และ 80 ในเผ่าย่อย Lycastinae 2n = 40 และ 42 ในMaxillariinae 2n = 40 ในเผ่าย่อย Stanhopeinae 2n = 56 ใน subtribe Ornithocephalinae 2n = 12 20 30 36 42 44 56 และ 112 และยังพบว่าในเผ่าย่อย Oncidiinae การแบ่งเซลล์ในระยะอินเตอเฟส(interphase) มีรูปแบบของการแบ่งเซลล์ตั้งแต่simple chromocenter จนถึง complex chromocenter มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน x = 7 ซึ่งสามารถจำแนกลักษณะความสัมพันธ์ของ เผ่า เผ่าย่อย และ สกุล จากจำนวนโครโมโซมพื้นฐานได้

การศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* Chuck Hagen โดยการพัฒนาเทคนิค การย้อมสีเนื้อเยื่อปลายรากอย่างรวดเร็ว รายงานว่าวิธีปฏิบัติที่เหมาะสมคือ การเก็บปลายรากพืชทดลองในช่วงเวลา 10.00 น. หยดสีแลคโตโพรพิโอนิคออร์ซีน (lactopropionic orcein) ลงไป 2 หยดลงบนเนื้อเยื่อ นำกระจกสไลด์ไปลนไฟ เหนือตะเกียงเพื่อให้เนื้อเยื่ออ่อนตัว จากนั้นนำปลายรากไปวางบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วหยด lactopropionic orcein ลงไป 1 หยด ปิดด้วยกระจกสไลด์ แล้วจึงขยี้เนื้อเยื่อ วิธีนี้ได้โครโมโซมที่ติดสีอย่างชัดเจน (Latha, 2002) การศึกษาลักษณะของคาริโอไทป์ (karyotype) และเฮเทอโรโครมาทิน (heterochromatin) การศึกษา จำนวนโครโมโซมจากปลายรากของกล้วยไม้ *Gymnadenia conopsea* s.l. จาก 49 แหล่งของสาธารณรัฐเช็ก โดยเก็บตัวอย่างปลายราก แล้วนำปลายรากของพืช มาหยุดวงชีพเซลล์ด้วยสารละลายพาราไดคลอโรเบนซีน (PDB) ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง แล้วแยกเซลล์ โดยใช้กรดไฮโดรคลอริคนาน 7 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นบดขยี้เซลล์และย้อมด้วยสี lacto propionic orcein พบว่าจำนวนโครโมโซมปกติของ *G. densiflora* คือ 2n = 40 แต่ *G. conopsea* บางต้นเป็นเตตราพลอยด์และเพนตาพลอยด์ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 40 80 และ100 (Marhold *et al*., 2005)

ได้มีการศึกษาในกล้วยไม้ดินเอื้องน้ำต้น *(Calanthe cardioglossa* Schltr.) จากเนื้อเยื่อปลายรากของแหล่งกระจายพันธุ์ 2 แหล่ง โดยการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากให้ได้เซลล์ที่อยู่ในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิสในระยะเมตาเฟส พบว่าการเก็บตัวอย่างปลายรากในเวลา 08.00 น. หยุดวงชีพเซลล์ในสารละลายพาราไดคลอโรเบนซีน เป็นเวลา 36 ชั่วโมง แล้วแช่ปลายรากในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ หลังจากนั้นนำปลายรากไปย้อมด้วยสี คาร์บอลฟุคซิน (carbol fuchsin) นาน 30 นาที โดยที่เทคนิคดังกล่าวสามารถใช้ได้ดีกับเนื้อเยื่อปลายรากจากทั้ง 2 แหล่ง และ มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ 2 n = 44 (จารุวรรณ, 2550) ในขณะที่เนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้ดินช้างผสมโขลง (*Eulophia graminea* Lindl.) พบว่าเทคนิคในการเตรียมเนื้อเยื่อที่เหมาะสมคือเก็บตัวอย่างปลายรากเวลา 11.00 น. จากนั้นนำปลายรากไปรักษาสภาพเซลล์ในสารละลายที่มีส่วนผสมของเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์และกรดอะซิติกเข้มข้นในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 โดยไม่ต้องผ่านการหยุดวงชีพเซลล์ ต่อมานำสไลด์ไปย้อมด้วยสีคาร์บอลฟุคซินนาน 1 ชั่วโมง เมื่อนำ นื้อเยื่อที่ย้อมแล้วไปขยี้แล้วตรวจพบว่าเซลล์ปลายรากมีโครโมโซม 2n = 56 (จารุภัทร, 2549) ต่อมา วีรภัทรา (2552) ได้ทำการศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โครโมโซมปลายรากของเอื้องดินใบหมาก พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการเก็บปลายรากคือ 9.00 น. หยุดวงชีพเซลล์ในสารละลายพาราไดคลอโรเบนซีนเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ย้อมด้วยสีคาร์บอลฟุคซิน นาน 1 ชั่วโมงเป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุด เซลล์ปลายรากมีโครโมโซม $2n = 40$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved