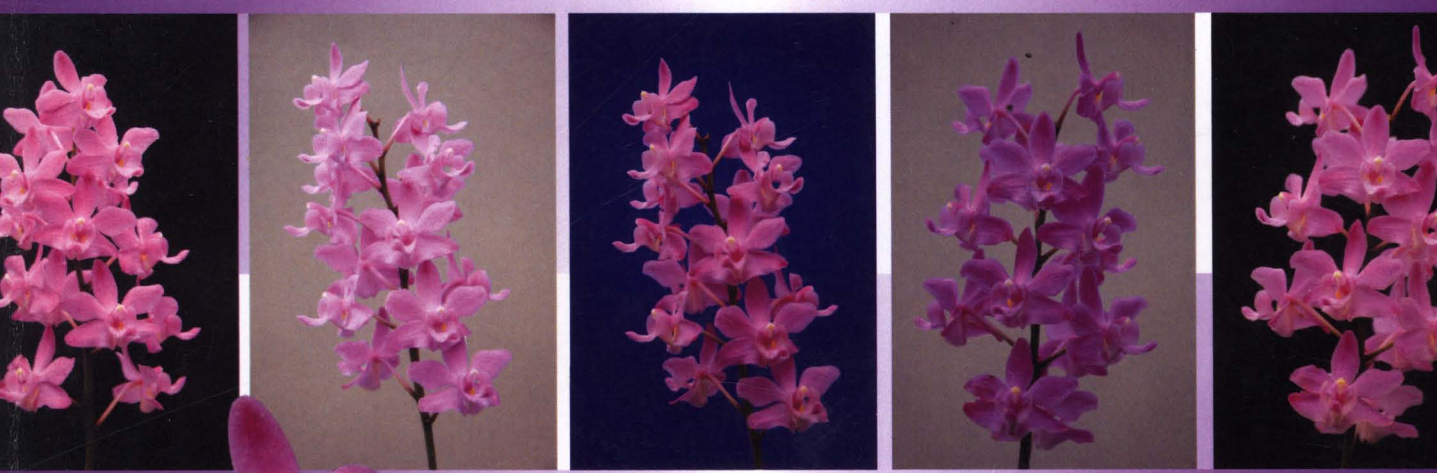
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
245685

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

การเก็บรวบรวมและการศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง



ผศ.ดร. กาญจนา รุ่งรัชกานนท์
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
245685

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเก็บรวบรวมและการศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง

(โครงการวิจัยย่อยที่ 1)

โดย
ผศ.ดร. กาญจนา รุ่งรัชกานนท์
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ธันวาคม 2554

b01829092 245685

รายงานฉบับสมบูรณ์

การเก็บรวบรวมและการศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง

Germplasm Collections and Cytological Investigation of Local Thai *Doritis* Germplasm in North-East of Thailand

ผู้วิจัย
ผศ.ดร. กาญจนา รุ่งรัชกานนท์

สังกัด
คณะเกษตรศาสตร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2550-2552

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทนำ	5
วัตถุประสงค์โครงการ	6
ตรวจเอกสาร	6
วิธีดำเนินการวิจัย	10
ผลการทดลองและวิจารณ์	17
สรุป	91
เอกสารอ้างอิง	93
ภาคผนวก	95
- บทความที่ได้รับการนำเสนอในวารสารวิชาการและการประชุมวิชาการ	96
- กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์	118
- ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนและที่ดำเนินการ	124
- รายงานการเงิน	126

245685

บทคัดย่อ

การรวบรวมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง สามารถรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้แดงอุบลได้ 125 รหัส และกล้วยไม้ม้าวิ่งได้ 113 รหัส กล้วยไม้แดงอุบลพบใน จังหวัดอุบลราชธานี ร้อยเอ็ด สกลนคร เลย กาฬสินธุ์ ศรีสะเกษ มุกดาหาร และประเทศลาว กล้วยไม้ม้าวิ่ง พบในจังหวัดอุบลราชธานี ร้อยเอ็ด เลย กาฬสินธุ์ มุกดาหาร และประเทศลาว

การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งโดยการใช้ส่วนปลายรากและดอกอ่อน ทำการทดลองเพื่อหาเทคนิคที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง 3 ชนิด พบว่าการเก็บตัวอย่างปลายรากกล้วยไม้แดงอุบลที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อเวลาที่เหมาะสมที่สุดคือเวลา 9.15 น. แต่เมื่อเก็บปลายรากที่อยู่ในสภาพแปลงช่วงเวลาที่เหมาะสมของกล้วยไม้แดงอุบลมีความแตกต่างกันจากการเก็บในสภาพปลอดเชื้อ คือ กล้วยไม้แดงอุบลจะมีเวลาที่เหมาะสมอยู่ที่เวลา 9.30 น. ส่วนกล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้ม้าบิน เวลาที่เหมาะสมที่สุดคือ เวลา 9.45 น. นอกจากนี้การศึกษาการแช่ตัวอย่างปลายรากในสารละลาย 8 - hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M พบว่า ควรแช่ตัวอย่างปลายรากนานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อปลายราก การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบล ม้าวิ่งและม้าบิน พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 76 38 และ 38 ตามลำดับ

การใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์เพื่อศึกษาโครโมโซมจากเซลล์เนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบล ได้ทำการศึกษาใน 3 ประเด็น คือ 1) สารที่ใช้ในการตรึงเซลล์ Carnoy's solution หรือ absolute ethanol ร่วมกับ acetic acid ในอัตราส่วน 3:1 ผลการทดลองพบว่า การใช้ Carnoy's solution ให้ผลดีกว่าทำให้ภายในเซลล์ใสเห็นนิวเคลียสชัดเจน 2) ระยะเวลาในการแช่ enzyme solution พบว่าเวลาที่เหมาะสมคือ 12 ชั่วโมง 3) ความเข้มข้นของ enzyme solution การใช้ cellulase ความเข้มข้น 2 % ร่วมกับ pectinase ความเข้มข้น 0.6% ทำให้โครโมโซมแยกตัวออกจากกัน

การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลด์เซลล์ปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบลที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ ด้วยเทคนิคย้อมสี Feulgen พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลด์ ที่ทำให้เซลล์ติดสีม่วงของ fuschin ที่บริเวณปลายรากเหมาะสมที่สุดคือ 10 นาที

การศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบินที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าโครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโตรเมียร์อยู่ตรงกลาง (metacentric) มีจำนวน 13 แท่ง โครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโตรเมียร์อยู่เกือบตรงกลาง (submetacentric) มีจำนวน 14 แท่ง โครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโตรเมียร์อยู่ค่อนไปทางปลายแท่งของโครโมโซม (acrocentric) มีจำนวน 10 แท่ง และโครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโตรเมียร์อยู่ตรงปลายแท่งของโครโมโซม (telocentric) มีจำนวน 1 แท่ง

การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากดอกอ่อน โดยทำการศึกษาในระยะ diakinesis ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง 3 ชนิด พบว่า กล้วยไม้แดงอุบลมีจำนวนโครโมโซม n = 38 ส่วนกล้วยไม้ม้าวิ่งและม้าบินมีจำนวนโครโมโซม n = 19

การศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม โดยศึกษาลักษณะการเข้าคู่กันของโครโมโซมและการสร้างไมโครสปอร์ในกล้วยไม้แดงอุบล ม้าวิ่ง และสายพันธุ์ลูกผสม พบว่า กล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิ่งมีการเข้าคู่กันของโครโมโซมในระยะ diakinesis ปกติ คือ โครโมโซมมีการเข้าคู่กันเป็น bivalent จำนวน 38 และ 19 คู่ ตามลำดับ ส่วนในสายพันธุ์ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่งบลู และลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล มีการเข้าคู่กันของโครโมโซมที่ผิดปกติ คือ พบทั้งแบบ univalent, bivalent และ trivalent โดยพบโครโมโซมที่เข้าคู่กันเป็น bivalent จำนวน 19.6 และ

245685

19.55 คู่ ตามลำดับ จากความผิดปกติของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในลูกผสมทำให้มีเปอร์เซ็นต์ของโครโมโซมที่เคลื่อนไปสู่ขั้วเซลล์ช้ากว่าปกติ (chromosome lagging) และโครโมโซมที่มีโครงสร้างคล้ายสะพาน (chromosome bridge) สูง ทำให้มีการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็นปกติ (tetrad) เพียง 56 และ 73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิ่ง มีการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็นปกติ (tetrad) สูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ พฤติกรรมที่เกิดขึ้นนี้แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกล้วยไม้แดงอุบลกับม้าวิ่งและม้าบินซึ่งจัดอยู่ในสกุลเดียวกัน

Abstract

245685

Plant specimens of *Doritis* orchid in north-east of Thailand were surveyed and collected. There were 125 plants of *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* and 113 plants of *Doritis pulcherrima* and identified by codes. *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* was found in provinces of Ubon Ratchathani, Roi Et, Sakon Nakhon, Loei, Kalasin, Sisaket, Mukdahan and Republic of Lao. *Doritis pulcherrima* was found in provinces of Ubon Ratchathani, Roi Et, Loei, Kalasin, Mukdahan and Republic of Lao.

Cytological investigation of *Doritis* orchids was done on root-tips and young flower buds. Somatic chromosome investigation of three *Doritis* orchid varieties were carried out using a range of techniques. The suitable time for *Dor. pulcherrima* var. *buyssoniana in vitro* root-tip sampling was 9.15 am, while suitable time *in vivo* root-tip sampling of *Dor. pulcherrima* var. *buyssoniana* was 9.30 am. For the other two orchid varieties, *Dor. pulcherrima* and *Dor. pulcherrima* var. *chumpornnensis* a root-tip sampling at 9.45 am was the best. The root-tip should be pre-treated in 0.002M 8-hydroxyquinoline at least 1 h before processing to prepare the root-tip. Somatic chromosome numbers from root tips of *Dor. pulcherrima* var. *buyssoniana*, *Dor. pulcherrima*, and *Dor. pulcherrima* var. *chumpornnensis* were 2n = 76, 2n = 38 and 2n = 38, respectively.

Maceration of the root-tip of *Dor. pulcherrima* var. *buyssoniana* was studied in 3 parts namely, study on two fixatives: Carnoy's solution and absolute ethanol : acetic acid (3:1), study on suitable time for maceration with enzymes and third, suitable concentration of enzyme solution. The results showed that root cells fixed in Carnoy's solution were clear and the nucleus was easily seen. The suitable time for maceration was 12 h and 2% cellulase + 6% pectinase was the best enzyme concentration solution for chromosome spreading.

Suitable hydrolysis time during feulgen staining technique was investigated. Hydrolysis of the *in vitro Dor. pulcherrima* var. *buyssoniana* root-tip in 1 N HCl for 10 min proved the optimal time showing good staining results.

Morphology of *Dor. pulcherrima* var. *chumpornnensis* was studied from *in vitro* root-tip. Chromosomes were classified as metacentric (13 chromosomes), submetacentric (14 chromosomes), acrocentric (10 chromosomes) and telocentric (1 chromosome).

Chromosome numbers of three *Doritis* orchid varieties were investigated during meiotic division (diakinesis). Meiotic chromosome numbers from flower buds of n = 38 for *Dor. pulcherrima* var. *buyssoniana*; and n = 19 for *Dor. pulcherrima* and *Dor. pulcherrima* var. *chumpornnensis* were found.

245685

Meiotic behavior of *Doritis* spp. and *Doritis* hybrids were investigated. It was found that *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* and *Doritis pulcherrima* had normal synapsis of bivalent meiotic chromosomes in diakinesis with the number of 38 and 19 pairs of bivalents, respectively. While chromosome synapsis were abnormal for *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* x *Doritis pulcherrima* and *Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis* x *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*. Univalent, bivalents and, trivalents were also observed. The bivalent chromosome number of both hybrids was 19.6 and 19.55, respectively. Due to abnormally meiotic configuration, a high percentage of chromosome lagging and chromosome bridge was found in both hybrids showing normal tetrad microspores of only 56 and 73 percent, respectively. *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* and *Doritis pulcherrima* had a high percentage (upto 99 %) of normal tetrad microspores. This meiotic behavior indicated the genetic differences among *Doritis* spp.