



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเก็บรวบรวมและการศึกษาจำนวนโครโมโซมของ
กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง

(โครงการวิจัยย่อยที่ 1)

โดย

ผศ.ดร. กาญจนา รุ่งรัชกานนท์
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ธันวาคม 2554



รายงานฉบับสมบูรณ์

การเก็บรวบรวมและการศึกษาจำนวนโครโมโซมของ
กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง

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

บทคัดย่อ

การรวบรวมกล้วยไม้สกุลม้าวิงในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง สามารถรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้แดงอุบลได้ 125 รหัส และกล้วยไม้ม้าวิงได้ 113 รหัส กล้วยไม้แดงอุบลพบใน จังหวัดอุบลราชธานี ร้อยเอ็ด สกลนคร เลย กาฬสินธุ์ ศรีสะเกษ มุกดาหาร และประเทศลาว กล้วยไม้ม้าวิง พบในจังหวัดอุบลราชธานี ร้อยเอ็ด เลย กาฬสินธุ์ มุกดาหาร และประเทศลาว

การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิงโดยการใช้ส่วนปลายรากและดอกอ่อน ทำการทดลองเพื่อหาเทคนิคที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้สกุลม้าวิง 3 ชนิด พบว่าการเก็บตัวอย่างปลายรากกล้วยไม้แดงอุบลที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อเวลาที่เหมาะสมที่สุดคือเวลา 9.15 น. แต่เมื่อเก็บปลายรากที่อยู่ในสภาพแปลงช่วงเวลาที่เหมาะสมของกล้วยไม้แดงอุบลมีความแตกต่างกันจากการเก็บในสภาพปลอดเชื้อ คือ กล้วยไม้แดงอุบลจะมีเวลาที่เหมาะสมอยู่ที่เวลา 9.30 น. ส่วนกล้วยไม้ม้าวิงและกล้วยไม้ม้าบิน เวลาที่เหมาะสมที่สุดคือ เวลา 9.45 น. นอกจากนี้การศึกษาการแช่ตัวอย่างปลายรากในสารละลาย 8-hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M พบว่า ควรแช่ตัวอย่างปลายรากนานอย่างน้อย 1 ชั่วโมงก่อนนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อปลายราก การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบล ม้าวิงและม้าบิน 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

การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลต์เซลล์ปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบลที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ ด้วยเทคนิคย้อมสี Feulgen พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลต์ ที่ทำให้เซลล์ติดสีม่วงของ fuschin ที่บริเวณปลายรากเหมาะสมที่สุดคือ 10 นาที

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

การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากดอกอ่อน โดยทำการศึกษาในระยะ diakinesis ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวิง 3 ชนิด พบว่า กล้วยไม้แดงอุบลมีจำนวนโครโมโซม $n = 38$ ส่วนกล้วยไม้ม้าวิงและม้าบินมีจำนวนโครโมโซม $n = 19$

การศึกษาพฤติกรรมกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวิงและสายพันธุ์ลูกผสม โดยศึกษาลักษณะการเข้าคู่กันของโครโมโซมและการสร้างไมโครสปอร์ในกล้วยไม้แดงอุบล ม้าวิง และสายพันธุ์ลูกผสม พบว่า กล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิงมีการเข้าคู่กันของโครโมโซมในระยะ diakinesis ปกติ คือ โครโมโซมมีการเข้าคู่กันเป็น bivalent จำนวน 38 และ 19 คู่ ตามลำดับ ส่วนในสายพันธุ์ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิงบลู และลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล มีการเข้าคู่กันของโครโมโซมที่ผิดปกติ คือ พบทั้งแบบ univalent, bivalent และ trivalent โดยพบโครโมโซมที่เข้าคู่กันเป็น bivalent จำนวน 19.6 และ

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

Plant specimens of *Doritis* orchid in north-east of Thailand were surveyed and collected. There were 125 plants of *Doritis pulcherrima* var. *buyssonianana* and 113 plants of *Doritis pulcherrima* and identified by codes. *Doritis pulcherrima* var. *buyssonianana* 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. *buyssonianana* *in vitro* root-tip sampling was 9.15 am, while suitable time *in vivo* root-tip sampling of *Dor. pulcherrima* var. *buyssonianana* 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. *buyssonianana*, *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. *buyssonianana* 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. *buyssonianana* 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. *buyssonianana*; and $n = 19$ for *Dor. pulcherrima* and *Dor. pulcherrima* var. *chumpornnensis* were found.

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.

บทนำ

กล้วยไม้ที่พบบนโลกมีอยู่ประมาณ 15,000-30,000 ชนิด และมีมากกว่า 800 สกุล เฉพาะที่นำมาปลูกเลี้ยงกันมีมากกว่า 100 สกุล นับได้ว่าวงศ์กล้วยไม้ เป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุดวงศ์หนึ่งของพืชมีดอกซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ในทุกทวีป ยกเว้น ทวีปแอนตาร์กติก (ครรชิต, 2547) กล้วยไม้ในธรรมชาติส่วนใหญ่จะพบมากในเขตอบอุ่นและเขตร้อนของโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณเขตร้อนของทวีปเอเชีย อเมริกาใต้ และแอฟริกา ประเทศไทยเป็นแหล่งหนึ่งที่มีการกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้สูง กล้วยไม้ป่าหรือกล้วยไม้พันธุ์แท้ของไทยที่มีการค้นพบและตรวจสอบรายชื่ออย่างถูกต้องแล้วมีทั้งหมด 177 สกุล จำนวน 1,125 ชนิด (ฐิติพร, 2544) ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ ประเภทแตกกอ และประเภทแวนดา สกุลที่ได้รับความนิยมปลูกเลี้ยงเป็นอย่างมากในประเทศ เช่น สกุลหวาย สกุลคัทลียา สกุลแวนดา สกุลอะแรนดา สกุลมอคคาร่า สกุลรองเท้านารี สกุลช้าง และสกุลม้าวิ่ง เป็นต้น (ไพบูลย์, 2521)

ธุรกิจกล้วยไม้ของประเทศเจริญก้าวหน้าอย่างมากและทำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นอันดับหนึ่งในจำนวนไม้ดอกไม้ประดับทั้งหมดที่มีการส่งออก การส่งออกคิดเป็นมูลค่ากว่า 2,000 ล้านบาทต่อปี ได้ส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่น อเมริกา อิตาลี เนเธอร์แลนด์และจีน เป็นต้น โดยมีพื้นที่ปลูกกล้วยไม้ตัดดอกเพื่อการส่งออกประมาณ 20,000 ไร่ ส่วนใหญ่อยู่ในเขตกรุงเทพฯ และจังหวัดใกล้เคียง ได้แก่ นครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี ปทุมธานี นนทบุรี กาญจนบุรี ออยุธยา และสุพรรณบุรี เนื่องจากสภาพภูมิอากาศเหมาะกับการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ ใกล้เคียงน้ำ ตลาด และมีการคมนาคมขนส่งที่สะดวก (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2552)

สกุลม้าวิ่ง (*Doritis*) หรือ หล้าดอกหิน ละเมียด แต่นิยมเรียกว่า ม้าวิ่ง เป็นกล้วยไม้ที่พบตามพื้นดิน หรือแองหินที่มีอินทรีย์วัตถุติดกันหนาๆ ใบแบนสีเขียว หรือเขียวอมม่วง ดอกมีสีแดงอมม่วง พบกระจายพันธุ์อยู่ในพม่า ไทย อินโดจีน และสุมาตรา ในกล้วยไม้สกุลนี้มีอยู่พันธุ์หนึ่ง ซึ่งมีดอกใหญ่กว่าธรรมดาพบเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีชื่อเรียกว่า “แดงอุบล” หรือ *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* เป็นกล้วยไม้ประเภท Monopodium พบตามธรรมชาติและมีจำนวนโครโมโซมเป็น 2 เท่าของกล้วยไม้ชนิดอื่นในสกุลนี้ การกระจายพันธุ์พบปริมาณมากทางตอนใต้ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดอุบลราชธานี จากการสำรวจและเก็บรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้แดงอุบลในปี 2541-2542 พบว่ากล้วยไม้แดงอุบลมีการกระจายตัวอยู่ในพื้นที่จังหวัดอุบลฯ ในเขต อ.ตระการพืชผล อ. กุดข้าวปุ้น อ.โขงเจียม และ อ.นาจะหลวย แต่ปริมาณที่พบตามธรรมชาติน้อยลงมากเมื่อสอบถามจากชาวบ้านในท้องถิ่น ทั้งนี้อาจเนื่องจากการทำลายโดยศัตรูในธรรมชาติ ไฟป่า สภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงและมนุษย์ที่นำพันธุ์กล้วยไม้ไปจำหน่าย (ศรีประไพ และคณะ, 2544)

กล้วยไม้สกุลนี้ได้มีผู้นำไปผสมพันธุ์กับสกุลฟาเลนอพิชิสมากที่สุดได้เป็นชื่อสกุลใหม่ว่า *Doritanopsis* ซึ่งมีลูกผสมมากมาย นอกจากนี้ยังสามารถนำไปเป็นพ่อพันธุ์เพื่อผสมกับสกุลเข็ม แวนดา และช้างได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามกล้วยไม้ในสกุลนี้ยังนับเป็นพืชพันธุ์ใหม่ในด้านการผลิตเพื่อเป็นการค้า ถึงแม้ว่าจะเป็นกล้วยไม้พื้นเมืองของประเทศไทยแต่มีศักยภาพในการผลิตเป็นการค้า เพื่อการส่งออก นอกเหนือจากเป็นแหล่งพันธุกรรมที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ในประเทศ เช่น มีขนาดดอกใหญ่ มีลักษณะทนทานต่อแมลง ก้านดอกยาวแข็งแรง มีปริมาณดอกมาก มีอายุการปักแจกันได้นาน เป็นต้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้มีการศึกษาถึงการวิจัยและพัฒนาศักยภาพของกล้วยไม้ในสกุลนี้คัดเลือกเป็นพ่อหรือแม่พันธุ์ในการผสมพันธุ์กับกล้วยไม้อื่นที่มีศักยภาพ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้กระถางขนาดเล็กซึ่งสามารถพัฒนาเป็นการค้าต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อเก็บรวบรวมสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างและนำไปใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในอนาคต
2. เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม ลักษณะโครโมโซม และพฤติกรรมการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

ตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

ไพบูลย์ (2521) รายงานว่ากล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง มีหลายชนิดได้แก่ ม้าวิ่ง ม้าบิน แดงอุบลซึ่งมีลักษณะดอกใหญ่และทนทาน แดงอุบล *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* มีชื่อพื้นเมืองว่า แดงอุบล ดอกหิน เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Orchidaceae สกุล *Doritis* Tribe Vandaeae Subtribe Sarcanthinae กล้วยไม้แดงอุบลจัดเป็นพวก Terrestrial plant หรือ Lithophytic plant ที่มีลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ใบขนาดใหญ่ ช่อดอกยาวตั้งมีดอกจำนวนมาก การกระจายตัวของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis*) อยู่ใน Indochina แต่มีข้อสังเกตที่น่าสนใจคือ พืชชนิดนี้ไม่ได้ถูกบันทึกในช่วงการสำรวจเร็วๆ นี้ จากคณะทำการสำรวจชาว Vietnamese-Soviet ซึ่งเป็นสิ่งชี้ให้เห็นว่ามีแนวโน้มที่จะสูญพันธุ์ โดยเฉพาะแดงอุบลที่มีการกระจายพันธุ์แคบมาก พบในประเทศลาวและแถบภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทยเท่านั้น เช่นในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานีมีการกระจายพันธุ์มาก กล้วยไม้ชนิดนี้มีบทบาทในการนำไปผสมพันธุ์เพื่อพัฒนาเป็นไม้ตัดดอก

ส่วนต่างๆ ของดอกกล้วยไม้แดงอุบล กลีบดอก มี 6 กลีบ แบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นนอก (Sepal) 3 กลีบ ชั้นใน (Petal) 3 กลีบ กลีบชั้นนอก (Sepal) อยู่ข้างบน 1 กลีบ เรียก กลีบนอกบน (Dorsal sepal) ขนาด 21-22 x 10-12 มม. กลีบชั้นใน (Petal) กลีบคู่บน 2 กลีบ ขนาดรูปร่างและสีสรรค์เหมือนกันทุกประการเรียก Petal Petal ขนาดใกล้เคียง Sepal ขนาด 21-22 x 10-12 มม. กลีบคู่ล่าง 1 กลีบ มีลักษณะแตกต่างจากกลีบคู่บน มีชื่อเรียกเฉพาะว่า ปาก (Lip, Labellum) ดอกจะมีปาก ลักษณะ 3-lobed lip ทั้ง 3 lobe มีขนาดใกล้เคียงกัน Side lobe จะอยู่บริเวณด้านข้างของปากทั้งสองข้าง ส่วน Mid lobe อยู่บริเวณปลายปากจะสดใสกว่าและมักจะพบว่ามี 2 Keel Side lobe ของปากขนาด 12 x 7 มม. กว้างที่สุดส่วนกลาง mid lobe ของปากยาว 9-11 มม. กว้าง 7-9 มม. กว้างที่สุดที่ส่วนฐาน ปลายปากกลม พื้นที่ยื่นออกมาของปากเรียกว่า Claw กล้วยไม้สกุลนี้มีส่วนของ Claw ยาว บน Claw มีส่วนที่ยื่นออกมา มีลักษณะคล้ายฟันอยู่ 1 คู่ แต่ละอันตั้งอยู่ด้านข้างทั้ง 2 ข้างของ Claw (a pair of raising lateral dents) ปากอยู่ติดกับฐานเส้าเกสร (Column-foot)

เกสร กล้วยไม้เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีลักษณะเฉพาะคือ ส่วนของก้านชูยอดเกสรตัวเมียกับก้านชูยอดเกสรตัวผู้รวมเป็นอวัยวะเดียวกันและยอดเกสรตัวเมียกับเรณูก็ติดอยู่ที่ส่วนนี้ รวมเรียกส่วนนี้ทั้งหมดว่า เส้าเกสร (Column) ที่ปลายสุดของเส้าเกสรจะเป็นที่อยู่ของเรณู เรณูมีฝากรอบ (Anther cap) ปิดมิดชิดเรณูเกาะกันเป็นก้อนแข็ง เรียก ก้อนเรณู (Pollinia) เส้าเกสรส่วนต่อไปถัดจากปลายสุดลงมา จะพบแอ่งกลมๆ เล็กๆ มีน้ำเหนียวๆ อยู่เกือบเต็มแอ่ง เรียก แอ่งยอดเกสรตัวเมีย (Stigmatic cavity) เส้าเกสรเป็นโครงสร้างที่รวมอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียไว้ด้วยกัน มีแผ่นกั้นระหว่างเกสรตัวผู้ (Pollinia) และ

แองเกอร์ตัวเมีย (Stigmatic cavity) เรียกว่า Rostellum มีลักษณะที่เห็นเด่นชัดโผล่ออกมาและ Rostellum นี้มีส่วนของก้านเกสรตัวผู้ (Stipe) ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงยาวติดอยู่ด้วยฐานเส้าเกสร (Column-foot) มีลักษณะยาวเกือบเท่ากับทั้งเส้าเกสร (Column) และมีส่วนของ Lateral sepal ติดอยู่ตลอดความยาวของฐานเส้าเกสร เกสรตัวผู้ (Pollinia) มี 4 อัน รูปร่าง Globular อยู่ติดกันเป็นคู่ ในแต่ละคู่จะมีเกสรตัวผู้ขนาดใหญ่และขนาดเล็กอยู่ติดกัน โดยเกสรตัวผู้ขนาดใหญ่บริเวณส่วนผิวสัมผัสกับเกสรตัวผู้ขนาดเล็กจะมีส่วนโค้งเล็กน้อยรองรับเกสรตัวผู้ขนาดเล็ก ก้านเกสรตัวผู้ (stipe) สีขาวมีลักษณะเป็นเส้นตรงยาว รังไข่ (Ovary) อยู่บริเวณก้านดอกส่วนที่อยู่ชิดกับโคนดอก

ดอก ช่อดอกแบบกระจะ (Raceme) จำนวนดอก/ช่อ 7-29 ดอก ขนาดดอก มีขนาดตั้งแต่ กว้าง 3 ซม. x สูง 2.5 ซม. ถึง กว้าง 5 ซม. x สูง 4 ซม. สีและลักษณะพORMดอกมีความแปรปรวนมากซึ่งมีสีดอกตั้งแต่ชมพูอ่อนจนถึงม่วงเข้ม สีปากมีสีเหมือนกลีบดอก สีอ่อนกว่ากลีบดอก สีเข้มกว่ากลีบดอก มีลวดลายและจุดสีหลายแบบ สี Sidelobe บนปากมีสีเหลือง เหลืองส้ม ชมพูอ่อน ม่วง (ศรีประไพ และคณะ, 2542)

ใบ ใบมีรูปร่าง (Leaf shape) เป็นแบบใบดาบ (Ensiform) ปลายใบ (Leaf apices) เป็นแบบแหลม (Acute) ขอบใบ (Leaf margin) เป็นแบบเรียบ (Entire) ขนาดของใบ (Leaf size) กว้าง 2-6.5 ซม. ยาว 8-20 ซม. การจัดเรียงของใบ (Leaf arrangement) เป็นแบบซ้อนสลับ (Equitant) ลักษณะใบมีหลายแบบ เช่น ใบเขี้ยวยาว ใบเขี้ยวกลมสั้น ใบเขี้ยวขอบน้ำตาลแดง ใบเขี้ยวจุดน้ำตาลกว้างกลม ใบเขี้ยวจุดน้ำตาลเรียวยาว ใบแดงยาว ลักษณะการเจริญเติบโตเจริญเติบโตไปทางยอด ลำต้นเดี่ยว (Monopodial growth) มักพบเป็นกอ ความสูงของต้น 6-20 ซม. (กรณีอยู่ในที่ร่มมากได้แสงแดดไม่เพียงพอต้นจะสูงยาว) การผสมพันธุ์ในธรรมชาติ แมลงช่วยในการผสมพันธุ์ มีการติดฝักในธรรมชาติสูง

2. สภาพที่พบตามธรรมชาติ

ลักษณะภูมิประเทศที่พบ ภูเขาหิน หน้าผา ในป่าเต็งรัง อาจพบได้ตามริมลำธารน้ำ ความสูงจากระดับน้ำทะเล 195-410 เมตร บริเวณที่พบส่วนใหญ่ บนหินหรือหน้าผาที่มีอินทรีย์วัตถุสะสมอยู่หรือหญ้าปกคลุม ใต้ต้นพุดผา เอ็นอ้า เล็บแมว เหมือนดอ ต้นรัง ในกอสลัดได พบได้บ้างที่ขึ้นอยู่บนต้นไม้ เช่น บนต้นพุดผา บนต้นรัง

3. การขยายพันธุ์

การศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) โดยวิธีการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ ได้แยกการทดลองเป็น 2 ส่วน คือ

- (1) ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลร่วมกับผลของแสงต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ด โดยนำฝักกล้วยไม้แดงอุบลอายุ 4 เดือนมาเพาะในอาหารสูตรดัดแปลง Vacin and Went ที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาล 4 ระดับ คือ 0, 10, 20 และ 30 กรัม/ลิตร นำไปเลี้ยงในสภาพแสง 2 แบบ คือ ให้แสงตลอด และเก็บในที่มืด 15 วัน แล้วนำมาให้แสง หลังจากเพาะเมล็ดเป็นเวลา 4 เดือน พบว่า อาหารสูตรดัดแปลง Vacin and Went ที่ไม่มีน้ำตาลและเลี้ยงในที่มืด 15 วันแล้วจึงนำมาให้แสง มีความเหมาะสมต่อการงอกและพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้แดงอุบล (กาญจนา, 2544)

- (2) ศึกษาสูตรอาหารร่วมกับความเข้มข้นของน้ำตาลที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อน โดยนำต้นอ่อนอายุ 5 เดือน ขนาด 2 ซม. มาเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง 3 สูตร คือ สูตรอาหารดัดแปลง Knop สูตรอาหารดัดแปลง Knudson C และสูตรอาหารดัดแปลง Vacin and Went ที่มีระดับน้ำตาล 4 ระดับ คือ 0, 10, 20 และ 30 กรัม/ลิตร หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Vacin and Went ที่ไม่มีน้ำตาลหรือมีน้ำตาล 10 กรัม/ลิตร เหมาะสมต่อการเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้แดงอุบลให้มีการเจริญเติบโตที่ดี (กาญจนา และสุภาพ, 2544)

จากการศึกษาของกาญจนา และคณะ (2543) เรื่องการเพาะเลี้ยงใบอ่อนกล้วยไม้แดงอุบล ได้นำต้นกล้าจากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อซึ่งมีใบอ่อนยาวประมาณ 1-2 ซม. มาทำการศึกษาโดยแยกเป็น 3 การทดลอง คือ

- ศึกษาส่วนของใบอ่อนและวิธีวางชิ้นส่วนใบอ่อนบนอาหารเพื่อชักนำการเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อใบอ่อนที่ศึกษาจะถูกตัดเป็น 2 ส่วนตามขวางของทางยาวใบได้ส่วนโคนใบและส่วนปลายใบ นำชิ้นส่วนใบอ่อนวางบนอาหาร 2 วิธี คือ แบบปักลงในอาหารและแบบนอนบนอาหาร หลังจากการเพาะเลี้ยง 3 เดือนพบว่า การใช้ส่วนโคนใบอ่อนวางนอนบนอาหารเป็นวิธีที่เหมาะสมในการชักนำการเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อ โดยชิ้นส่วนที่เลี้ยงมีการรอดชีวิต 100% มีการพัฒนาเป็นต้นอ่อน 18% ยอด 29% หลายยอด 18% แคลลัส 20% และโปรโตคอร์มร่วมกับแคลลัส 3%
- ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงใบอ่อน นำส่วนโคนใบอ่อนและปลายใบวางนอนบนอาหารสูตร New Dogashima Medium (NDM) ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต Naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0, 0.1, 5.1 และ 5 มก./ล. ร่วมกับ Benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0, 1.0, 0.5, 1 และ 5 มก./ล. ผลการทดลองพบว่า ชิ้นส่วนโคนใบที่เลี้ยงในอาหาร NDM ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA 1 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มและแคลลัสได้ดีที่สุด เท่ากับ 70%
- การทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงใบอ่อน เลี้ยงส่วนโคนใบอ่อนวางนอนบนอาหารสูตรต่างๆ 4 สูตร คือสูตรดัดแปลง Vacin and Went medium (VW) สูตร New Dogashima medium (NDM) สูตร Murashigi and Skoog medium (MS) และ สูตร Ichihashi and Yamashita medium (IY) โดยอาหารทั้ง 4 สูตรเติม NAA 0.1 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. อาหาร NDM เป็นอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของกล้วยไม้แดงอุบล สามารถชักนำยอดหลายยอดได้ 26% แคลลัส 17% และโปรโตคอร์ม 18%

การเลี้ยงก้านช่อดอกอ่อน ทำการเก็บก้านช่อดอกอ่อนจากสภาพธรรมชาติ ศึกษาอิทธิพลของตำแหน่งข้อบนก้านช่อดอกต่อการเจริญและพัฒนาของตาบนก้านช่อดอก นำข้อที่มีตาบนก้านช่อดอกตำแหน่งข้อที่ 1, 2, 3 และ 4 มาเลี้ยงบนอาหาร หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือนพบว่าตำแหน่งตาข้อที่ 1, 2 และ 3 นับจากดอกอ่อนสามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาได้ โดยตาข้อที่ 2 และข้อที่ 3 มีการพัฒนาเป็น ตุ่มตาสีเขียวและยอดอ่อน ส่วนตาข้อที่ 1 มีการพัฒนาเป็นตุ่มตาสีเขียว ยอดอ่อน และช่อดอกอ่อน ในก้านช่อดอก 1 ก้านเมื่อนำตาจากข้อที่ 1, 2 และ 3 มาเลี้ยงในอาหาร New Dogashima medium (NDM) ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. และ BA 5 มก./ล. จะชักนำให้เกิดการพัฒนาได้ประมาณ 21% การศึกษาวิธีการต่างๆ ที่

ใช้ในการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียในการเลี้ยงก้านช่อดอกยังไม่มีประสิทธิภาพที่ดี โดยเฉพาะการควบคุมเชื้อแบคทีเรียยังไม่ได้ผลและตาบนก้านช่อดอกไม่มีการพัฒนาของเนื้อเยื่อ

ในขั้นตอนการขยายปริมาณโปรโตคอร์มเพื่อให้ได้จำนวนมากพบว่า การเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มกล้วยไม้แดงอุบลในอาหารน้ำสูตร New Dogashima medium (NDM) ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA 1 มก./ล. ได้ผลดีที่สุด โปรโตคอร์มมีการพัฒนาเป็นต้นขนาดเล็กไม่มีรากและมีกลุ่มโปรโตคอร์มเกิดขึ้นใหม่ปริมาณมาก เมื่อต้องการให้โปรโตคอร์มพัฒนาเป็นต้น อาหารที่เหมาะสมในการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้แดงอุบลให้เป็นต้นอ่อน พบว่า สูตรอาหารดัดแปลง Vacin and Went (VW) มีแนวโน้มการเจริญเติบโตของต้นดีที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตร New Dogashima medium (NDM) ทั้ง 2 สูตร ให้ผลการเจริญเติบโตของต้นได้ดีกว่าอาหารสูตร Ichihashi and Yamashita medium (IY)

4. เซลล์พันธุศาสตร์

การศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของกล้วยไม้ได้มีรายงานการศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้หลากหลายชนิด (Tanaka และ Kamimoto, 1984) เช่น จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ในสกุล *Acampe* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n$ เท่ากับ 38 และกล้วยไม้สกุล *Acenthephippium* มีจำนวนโครโมโซม $2n$ เท่ากับ 48 สกุล *Doritis* มีจำนวนโครโมโซม $2n = 38, 40$ และ 76 สุนันทิพย์และคณะ (2545) ได้ทำการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ ของกล้วยไม้บางชนิดในเขตอุทยานแห่งชาติภูพาน จังหวัดสกลนครและจังหวัดกาฬสินธุ์ พบว่ากล้วยไม้ที่ทำการศึกษาทั้ง 33 ชนิด มี 24 ชนิด ที่มีจำนวนโครโมโซม $2n = 38$ และมี 4 ชนิด ที่มีจำนวนโครโมโซม $2n = 40$ ไพบูลย์ และนิยดา (ม.ป.ป.) ได้ศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้ในสกุลข้าง 3 ชนิดพบว่าจำนวนโครโมโซมเท่ากันทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ $2n = 38$ ศิริพร (2546) ได้ศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลหวายที่ใช้ตัดดอกและที่นิยมใช้ทำ พ่อ-แม่พันธุ์ พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 38, 57, 76$ และ 78

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวีง

ทำการเก็บรวบรวมกล้วยไม้สกุลม้าวีงในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง ครอบคลุม 5 จังหวัด ได้แก่ สุรินทร์ ศรีสะเกษ ยโสธร อุบลราชธานี และอำนาจเจริญ และรวบรวมในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ครอบคลุม 5 จังหวัด ได้แก่ เลย ร้อยเอ็ด สกลนคร กาฬสินธุ์ มุกดาหาร ทำการเก็บรวบรวมในช่วงฤดูออกดอก ประมาณเดือนมิถุนายน ถึงเดือนตุลาคม จำนวน 15 ครั้ง จากนั้นนำต้นมาปลูกเลี้ยงในโรงเรือนเพาะชำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี บันทึกภาพลักษณะต้นและดอกเพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูลในการวิจัยของโครงการย่อยที่ 1 2 และ 3 ต่อไป

2. การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวีง

2.1 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวีงในสภาพปลอดเชื้อ

ศึกษาโครโมโซมจากปลายรากอ่อนของต้นกล้วยไม้สกุลม้าวีงสายพันธุ์แดงอุบล ที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ เลือกรากที่กำลังมีการเจริญโดยสังเกตจากรากที่มีสีเขียวใสและปลายรากมีสีขาวขุ่นเล็กน้อย ขึ้นต้นศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างรากโดยทำการเก็บตัวอย่างปลายรากอ่อนในเวลา 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 11.00, และ 12.00 น. และศึกษาเวลาที่เหมาะสม โดยเก็บปลายรากอ่อนในเวลา 9.15, 9.30 และ 9.45 น. ทำการตัดส่วนปลายของรากมา 1-2 มิลลิเมตร แล้วหยุดวงชีพของเซลล์เนื้อเยื่อปลายรากในสารละลาย 8- hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M เป็นเวลานาน 3-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แล้วเท 8- hydroxyquinoline ออก ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จากนั้นตรึงเซลล์ในน้ำยาคาร์นอย (Carnoy's solution) สูตรดัดแปลงโดย Kamemoto *et al.*, 1961 แล้วแช่ในตู้เย็น อย่างน้อย 1 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 1 เดือน เพื่อให้สภาพโครโมโซมคงที่ ล้างปลายรากให้สะอาดก่อนนำไปย่อยแยกเซลล์ใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2-3 นาที ล้างน้ำ 4-5 ครั้ง เก็บตัวอย่างรากในกรดน้ำส้ม 45 % อย่างน้อย 1 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 1 เดือน นำปลายรากวางบนแผ่น slide ตัดเฉพาะปลายรากยาวประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร (ต้องเขียนหวกราก root cap ออกเสียก่อน) หยดสี orcein 1-2 หยด แล้วใช้ปลายเข็มเขี่ยแยกเซลล์ของปลายรากออกจากกันให้มากที่สุดแล้วทิ้งไว้ 5-10 นาทีในกล่องขึ้นซึ่งอ้อมตัวด้วยไอกรดน้ำส้ม 45 % เพื่อให้โครโมโซมติดสี นำแผ่น slide มาปิดด้วย cover slip แล้วผ่านเปลวไฟจากตะเกียง alcohol พออุ่นวาง slide บนแผ่นกระดาษซับใช้แผ่นกระดาษซับอีกแผ่นวางทับด้านบน ใช้นิ้วหัวแม่มือค่อยวางบนกระดาษซับกดลงไปบนแนวตั้งฉากเพื่อให้เซลล์แบนที่สุดเท่าที่จะทำได้ ซับสีส่วนเกินออก นำแผ่น slide ไปศึกษาเซลล์ปลายรากใต้กล้องจุลทรรศน์เลือกเซลล์ที่นิวเคลียสมีการแบ่งตัวอยู่ในระยะเมตาเฟส นับจำนวนโครโมโซม แล้วบันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อได้เวลาที่เหมาะสมคือ 9.15 น. แล้วจึงทำการศึกษาความยาวนานในการหยุดวงชีพเซลล์ ด้วยสารละลาย 8- hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M นาน 1, 2, 3, 4, 5, 6, และ 7 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ตามด้วยขั้นตอนต่างๆในการศึกษาโครโมโซมปลายรากดังที่กล่าวมาข้างต้น

2.2 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิงในสภาพแปลง

ศึกษาโครโมโซมจากปลายรากอ่อนของต้นกล้วยไม้สกุลม้าวิงสายพันธุ์แดงอุบล ม้าวิง และม้าบิน ที่อยู่ในสภาพแปลง เลือกรากที่กำลังมีการเจริญโดยสังเกตจากรากที่มีสีเขียวใสและปลายรากมีสีขาว ชุ่มเล็กน้อย ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างรากโดยทำการเก็บตัวอย่างปลายรากอ่อนในช่วงเวลา 8.00 น. ถึง 10.00 น. ทำการตัดส่วนปลายของรากมา 1-2 มิลลิเมตร แล้วหยดวงซีฟของเซลล์เนื้อเยื่อปลายรากในสารละลาย 8- hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M เป็นเวลานาน 3-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็ทำตามวิธีการเช่นเดียวกับการศึกษาโครโมโซมปลายรากที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ และทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวในระยะ metaphase จำนวน 10 เซลล์

2.3 การใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์เพื่อศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิง

การใช้เอนไซม์ช่วยในการย่อยผนังเซลล์ก่อนทำการศึกษาโครโมโซมก็เป็นอีกวิธีหนึ่ง เนื่องจากผนังเซลล์เป็นโครงสร้างที่สำคัญของเซลล์พืชมีหน้าที่ทำให้เซลล์คงรูปร่างอยู่ได้ (สมบุญ, 2548) ส่วนชนิดของเอนไซม์และความเข้มข้นที่ใช้จะแตกต่างกันตามชนิดพืชที่ศึกษา เช่น การศึกษาโครโมโซมในสตรอเบอร์รี่ได้ย่อยผนังเซลล์ด้วย enzyme mixture ที่ประกอบด้วย (4% cellulose, 0.3% pectolyase, 2.1% macerozyme และ 1mM (EDTA) (Preeda *et al.*, 2007) และใน *Crotalaria juncea* L. ก่อนที่จะทำการศึกษาก็ย่อยตัวอย่างใน mixture (2% cellulase, 0.3% pectinase ใน citrate buffer) (Mondin *et al.*, 2006) ดังนั้นในการศึกษาจึงควรมีการเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมกับชนิดของพืช ในงานวิจัยครั้งนี้ได้มีการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์รวมถึงระยะเวลาในการแช่ตัวอย่างใน enzyme solution ที่เหมาะสมในการย่อยผนังเซลล์เพื่อศึกษารูปร่างและลักษณะของโครโมโซมในกล้วยไม้สกุลม้าวิง

2.3.1 ศึกษาชนิดน้ำยาในการตรึงเซลล์ (fixative) และระยะเวลาการแช่ enzyme solution

พืชทดลองที่นำมาศึกษาคือกล้วยไม้แดงอุบลที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างปลายรากที่มีการเจริญเติบโตดี ยาวประมาณ 1-2 ซม. ที่เวลา 9.15 น. แช่ในสารละลาย 8 - hydroxyquinoline ที่อุณหภูมิประมาณ 10 °C เป็นเวลา 4 ชม. ศึกษาชนิดน้ำยาในการตรึงเซลล์ 2 ชนิด นำรากมา fixed ในน้ำยาคาร์นอย (Carnoy's solution) สูตรดัดแปลง (Kamemoto *et al.*, 1961) ที่อุณหภูมิประมาณ 10 °C เป็นเวลา 24 ชม. หรือนำรากมา fixed ในสารที่ประกอบด้วย absolute ethanol และ acetic acid ในอัตราส่วน 3:1 ที่อุณหภูมิประมาณ 10 °C เป็นเวลา 24 ชม. ล้างรากด้วย 95% ethyl alcohol และเก็บรากไว้ใน 70 % ethyl alcohol หลังจากนั้นนำรากที่ตรึงในน้ำยาทั้ง 2 ชนิดมาย่อยผนังเซลล์โดยใช้ enzyme solution ที่ประกอบด้วย 2% cellulase, 0.3% pectinase, 9.1g sorbitol (0.5 M) และ 5 mM CaN₂O₆·4H₂O ปรับ pH 5 แช่ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6, 12, และ 24 ชม. จากนั้นล้างรากด้วยน้ำ ตัดเฉาะปลายรากวางบนแผ่นสไลด์ และย้อมสีรากด้วย orcein 1-2 หยด ใช้ปลายเข็มเขี่ยแยกเซลล์ของปลายรากออกจากกันให้มากที่สุดแล้วทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที นำแผ่นสไลด์ มาปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วผ่านเปลวไฟจากตะเกียง alcohol พออุ่น วางแผ่นสไลด์บนแผ่นกระดาษซับใช้แผ่นกระดาษซับอีกแผ่นวางทับด้านบน ใช้นิ้วหัวแม่มือค่อยวางบนกระดาษซับกดลงไป ในแนวตั้งฉากเพื่อให้เซลล์แบนที่สุดเท่าที่จะทำได้ ซับสีส่วนเกินออก นำแผ่นสไลด์ ไปศึกษาเซลล์ปลาย

รากไต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวในระยะเมตาเฟสและโครโมโซมมีการกระจายตัวดี เปรียบเทียบรูปร่างโครโมโซมและลักษณะของเซลล์ในน้ำยาทั้ง 2 ชนิดและช่วงระยะเวลาการแช่ enzyme solution ที่แตกต่างกัน

2.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ ต่อการกระจายตัวของโครโมโซม

เก็บตัวอย่างปลายรากที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อที่เวลา 9.15 น. นำปลายรากไป pretreatment ด้วยสารละลาย 8- hydroxyquinoline เพื่อหยุดวงชีพจักรของเซลล์ เป็นเวลา 4 ชม. จากนั้นนำตัวอย่างปลายรากตรึงเซลล์ ด้วยน้ำยา Carnoy's solution เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. แต่ไม่เกิน 1 เดือน ศึกษาความเข้มข้นของ enzyme คือ cellulase 2% + pectinase 0.6% และ cellulase 4% + pectinase 0.3% โดยสารอื่นๆที่เป็นองค์ประกอบของ enzyme solution คือ sorbitol และ $\text{CaN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ มีความเข้มข้นเท่ากัน แช่ตัวอย่างใน enzyme solution นาน 12 ชม. ย้อมสีรากด้วย orcein 1-2 หยด นาน 5-10 นาที แล้วนำมาศึกษาโครโมโซมด้วยวิธี Squash method เช่นเดียวกับการศึกษาการตรึงเซลล์

2.4 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลสปลายรากกล้วยไม้แดงอุบลด้วยเทคนิค

Feulgen

ในการศึกษาลักษณะของโครโมโซม นอกจากการ pretreatment ที่ทำให้โครโมโซมหดตัวสั้นที่สุด เพื่อง่ายต่อการศึกษาแล้ว ขั้นตอนที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือ การย้อมสี เพื่อให้ให้เห็นรูปร่างและลักษณะของโครโมโซมได้อย่างชัดเจน และเทคนิค Feulgen ที่ใช้การย้อมสีโครโมโซมด้วย Leuco-basic fuschin ก็เป็นเทคนิคหนึ่ง ที่สีม่วงจะติดเฉพาะนิวเคลียสของเซลล์ ส่วนของไซโตพลาสซึมจะมีลักษณะใส เมื่อนำเซลล์ปลายรากที่อยู่ในระยะที่ต้องการศึกษามาย้อมสีนี้ ก็จะทำให้เห็นลักษณะของโครโมโซมชัดเจนขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาโครโมโซมด้วยเทคนิคนี้ ระยะเวลาของการไฮโดรไลสจะมีความสำคัญต่อการติดสี ซึ่งในพืชแต่ละชนิดก็จะแตกต่างกันออกไป ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาระยะเวลาของการไฮโดรไลสที่เหมาะสมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

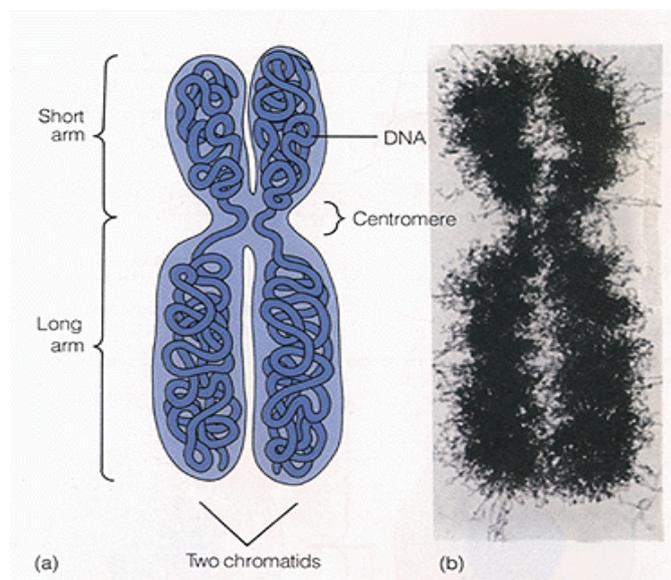
วิธีการทดลอง

เก็บตัวอย่างปลายรากที่กำลังมีการเจริญเติบโต ของกล้วยไม้แดงอุบลที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อที่เวลา 9.15 น. หลังจากนั้นก็นำปลายรากที่เก็บไปหยุดวงชีพจักรของเซลล์ในสารละลาย 8 - hydroxyquinoline ที่อุณหภูมิประมาณ 10°C เป็นเวลา 4 ชม. ก่อนที่จะนำไปเก็บในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ ที่ประกอบด้วย absolute ethanol และ acetic acid ในอัตราส่วน 3:1 ที่อุณหภูมิประมาณ 10°C เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชม. แต่ไม่เกิน 1 เดือน จากนั้นนำปลายรากมาไฮโดรไลสด้วยกรดเกลือ 1 N ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 5, 10, 15, 20 และ 25 นาที และเก็บใน 45% กรดอะซิติก อย่างน้อย 1 ชม. จากนั้นแช่ใน Leuco-basic fuschin ในที่มีดเป็นเวลา 1 ชม. ปลายรากที่ได้จะติดสีม่วงเข้ม แล้วล้างปลายรากด้วยน้ำประปาเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำปลายรากวางบนสไลด์ ตัดปลายรากเฉพาะส่วนที่ติดสีม่วงเข้ม หยด 50% กรดอะซิติก 1 หยด ใช้ปลายเข็มเขี่ยแยกเซลล์ของปลายรากออกจากกันให้มากที่สุด แล้วนำแผ่นสไลด์ มาปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ผ่านเปลวไฟจากตะเกียง alcohol พออุ่น วางแผ่นสไลด์บนแผ่นกระดาษซับใช้แผ่นกระดาษซับอีกแผ่นวางทับด้านบน ใช้นิ้วหัวแม่มือหรือปลายดินสอเคาะเบาๆบน

กระดาศซัปในแนวตั้งฉากเพื่อให้เซลล์แบนที่สุดเท่าที่จะทำได้ ซัปสีส่วนเกินออก ศึกษาเซลล์ปลายราก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูการติดสีที่ระยะเวลาการไฮโดรไลส์ที่แตกต่างกัน

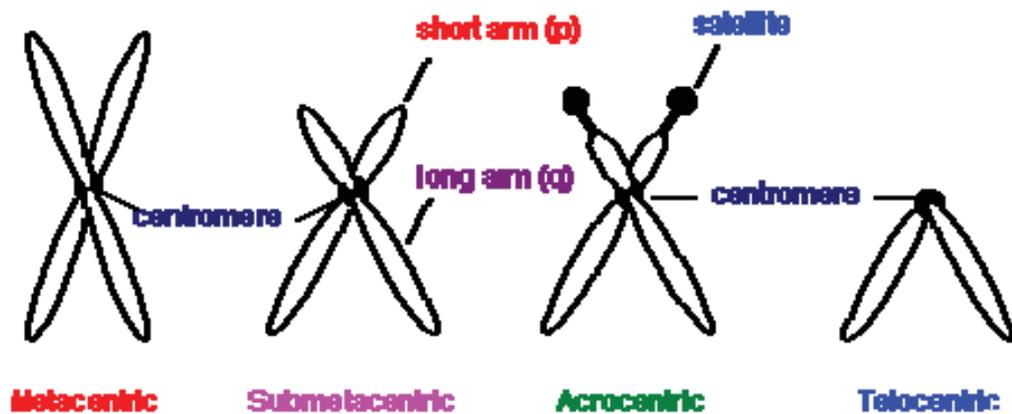
2.5 การศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้มาบีน

ในการศึกษารูปร่างหรือลักษณะของโครโมโซม ระยะการแบ่งเซลล์ที่เหมาะสมที่ใช้ในการศึกษา คือ ระยะเมทาเฟส ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ซึ่งรูปร่างของโครโมโซมก็จะมีลักษณะที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความยาวของโครโมโซมและตำแหน่งของเซนโตรเมียร์ ซึ่งมี 4 แบบ คือ โครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโตรเมียร์อยู่ตรงกลาง (metacentric) อยู่เกือบตรงกลาง (submetacentric) อยู่ค่อนข้างไปทางปลายแห่ง (acrocentric) และอยู่ตรงปลายแห่งของโครโมโซม (telocentric) (ภาพที่ 1 และ 2)



ภาพที่ 1 รูปร่างของโครโมโซม

ที่มา : www.copernicusproject.ucr.edu/.../chromosome.gif



ภาพที่ 2 ตำแหน่งของเซนโตรเมียร์

ที่มา : www.sc.chula.ac.th/.../text3/subtext3/a_3-1.gif

วิธีการทดลอง

เก็บตัวอย่างปลายรากที่กำลังมีการเจริญเติบโต ของกล้วยไม้ม้าบินที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเวลาที่ใช้เก็บตัวอย่างคือเวลา 9.30 น. หลังจากนั้นก็นำปลายรากที่เก็บไปหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ในสารละลาย 8 - hydroxyquinoline ที่อุณหภูมิประมาณ 10 °C เป็นเวลา 4 ชม. ก่อนที่จะนำไปเก็บในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ ที่ประกอบด้วย absolute ethanol และ acetic acid ในอัตราส่วน 3:1 ที่อุณหภูมิประมาณ 10 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชม. แต่ไม่เกิน 1 เดือน จากนั้นนำปลายรากมาไฮโดรไลส์ด้วยกรดเกลือ 1 N ที่อุณหภูมิ 60 °C ประมาณ 2-3 นาที เพื่อให้ปลายรากอ่อนนุ่ม และเก็บใน 45% กรดอะซิติก อย่างน้อย 1 ชม. นำปลายรากวางบนสไลด์ ตัดเฉพาะปลายราก ย้อมสีรากด้วย orcein 1-2 หยด ใช้ปลายเข็มเขี่ยแยกเซลล์ของปลายรากออกจากกันให้มากที่สุดแล้วทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที ใน 45% กรดอะซิติกที่อิมมัว เพื่อช่วยในการติดสี แล้วนำแผ่นสไลด์ มาปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ผ่านเปลวไฟจากตะเกียง alcohol พออุ่น วางแผ่นสไลด์บนแผ่นกระดาษซับใช้แผ่นกระดาษซับอีกแผ่นวางทับด้านบน ใช้นิ้วหัวแม่มือหรือปลายดินสอเคาะเบาๆบนกระดาษซับในแนวตั้งฉากเพื่อให้เซลล์แบนที่สุดเท่าที่จะทำได้ ซับสีส่วนเกินออก นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาเซลล์ปลายรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบิน ที่อยู่ในระยะเมทาเฟส

2.6 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจากดอกอ่อนและระยะการแบ่งเซลล์แบบ

meiosis

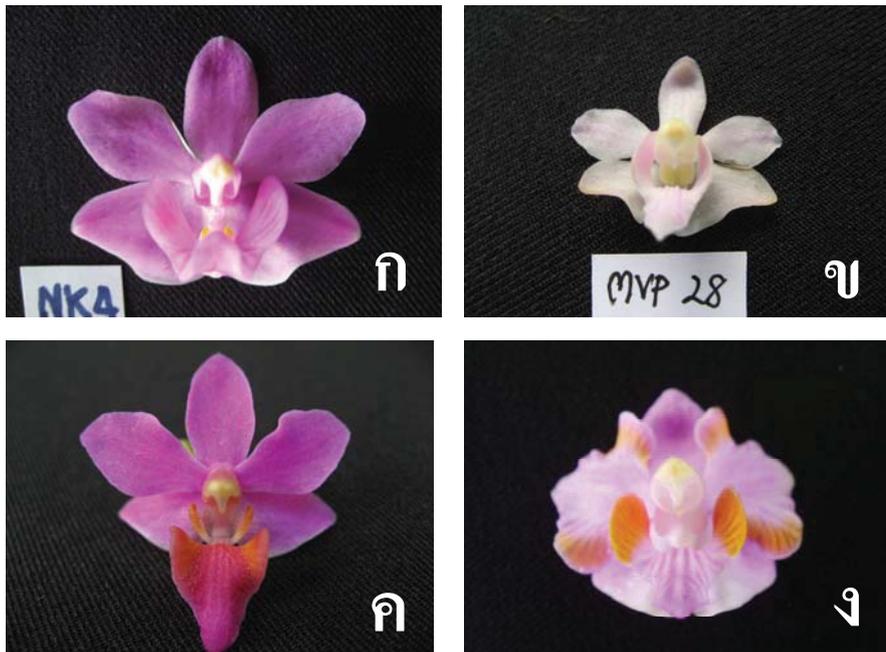
เลือกดอกตูมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งทั้งสายพันธุ์แดงอุบล ม้าวิ่ง และม้าบิน ที่มีขนาดประมาณ 1 ใน 4 ของดอกตูมใกล้บาน ฝาดอกและแกะก้อนเรณู (pollinia) จำนวนเล็กน้อยวางบน slide หยด acetic acid 45% ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 5 นาที ซับกรด acetic acid ออกแล้วย้อมด้วยสี orcein 1-2 หยด เป็นเวลา 2-3 นาที ปิด cover slip แล้วให้ความร้อน หลังจากนั้นใช้ปลายดินสอเคาะเบาๆ เพื่อให้โครโมโซมกระจายตัว ซับสีส่วนเกินออก เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในระยะ diakinesis เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม และบันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การศึกษาพฤติกรรมกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวีงและพันธุ์ลูกผสม

การศึกษาพฤติกรรมกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเป็นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญในด้านของการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเป็นการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งจะแสดงลักษณะหรือพฤติกรรมการเข้าสู่ของโครโมโซมในระหว่างที่มีการแบ่งเซลล์ เป็นการศึกษาที่แสดงถึงความสัมพันธ์ทางด้านพันธุศาสตร์ของต้นพ่อและต้นแม่ที่ทำการผสม อีกทั้งยังสามารถอธิบายสาเหตุความเป็นหมันและคาดคะเนจำนวนโครโมโซมในลูกผสมรุ่นต่อไปได้ (Kamemoto *et al.*, 1961)

วิธีการศึกษา

เลือกดอกตูมของกล้วยไม้สกุลม้าวีงสองสายพันธุ์คือแดงอุบล ม้าวีง ส่วนพันธุ์ลูกผสมที่ใช้ในการทดลอง 2 พันธุ์คือ แดงอุบล x ม้าวีงบลู และ ม้าบิน x แดงอุบล (ดังแสดงในภาพที่ 3) ที่มีขนาดดอกประมาณ 1 ใน 4 ของดอกตูมใกล้บาน ทำการผ่าดอกและแกะก้อนเรณู (pollinia) จำนวนเล็กน้อยวางบน slide หยด acetic acid 45% ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 5 นาที ซับกรด acetic acid ออกแล้วย้อมด้วยสี orcein 1-2 หยด เป็นเวลา 2-3 นาที ปิด cover slip แล้วให้ความร้อน หลังจากนั้นใช้ปลายดินสอเคาะเบาๆเพื่อให้โครโมโซมกระจายตัว ซับสีส่วนเกินออก เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในระยะ diakinesis เพื่อศึกษาลักษณะการเข้าสู่ของโครโมโซม (univalent, bivalent, trivalent และ quadrivalent) และความผิดปกติที่เกิดขึ้นในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในระยะ anaphase I และ telophase I แล้วบันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 3 กล้วยไม้สกุลม้าวีงและสายพันธุ์ลูกผสม

(ก) กล้วยไม้แดงอุบล

(ข) กล้วยไม้ม้าวีง

(ค) กล้วยไม้ลูกผสม (แดงอุบล x ม้าวีงบลู)

(ง) กล้วยไม้ลูกผสม (ม้าบิน x แดงอุบล)

4. การสร้าง sporad ของกล้วยไม้สกุลม้าวิงและพันธุ์ลูกผสม

การศึกษาการสร้าง sporad หรือ sporogenesis เป็นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ Swanson (1957) ได้รายงานว่ ต้นไม้ที่มีการสร้าง sporad ที่ผิดปกติมักจะมี ความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ โดยปกติ micropore ของกล้วยไม้จะอยู่ในระยะ 4 เซลล์หรือที่เรียกว่า tetrad จะมีรูปร่างแตกต่างกัน (ศิริพร, 2546) ซึ่งจะแสดงถึงระดับของความสมบูรณ์พันธุ์ในลูกผสม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ มีการศึกษาลักษณะการสร้าง sporad ของกล้วยไม้สกุลม้าวิงและพันธุ์ลูกผสม

วิธีการศึกษา

เลือกดอกตูมของกล้วยไม้สกุลม้าวิงสองสายพันธุ์คือแดงอุบล ม้าวิง ส่วนพันธุ์ลูกผสมที่ใช้ในการ ทดลอง 2 พันธุ์คือ แดงอุบล x ม้าวิงบลู และ ม้าบิน x แดงอุบล (ดังแสดงในภาพที่ 1) ที่มีขนาดดอก ประมาณ 1 ใน 4 ของดอกตูมใกล้บาน ทำการผ่าดอกและแกะก้อนเรณู (pollinia) จำนวนเล็กน้อยวางบน slide หยด acetic acid 45% ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 5 นาที ซักกรด acetic acid ออกแล้วย้อม ด้วยสี orcein 1-2 หยด เป็นเวลา 2-3 นาที ปิด cover slip แล้วให้ความร้อน หลังจากนั้นใช้ปลายดินสอด เคาะเบาๆเพื่อให้โครโมโซมกระจายตัว ซักสีส่วนเกินออก ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยาย 1000 เท่า ทำการตรวจนับลักษณะ sporad formation ประมาณ 300 sporad / PMCs และหาค่าเฉลี่ย sporad formation ที่พบในแต่ละพันธุ์

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บรวบรวมเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิง

จากการสำรวจกล้วยไม้สกุลม้าวิง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนและตอนล่าง พบกล้วยไม้สกุลม้าวิง 2 ชนิด ได้แก่ กล้วยไม้แดงอุบลและกล้วยไม้ม้าวิง ซึ่งกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิดนี้มีแหล่งที่พบตามธรรมชาติแยกออกจากกัน จากการเก็บรวบรวมพันธุกรรมกล้วยไม้และเชื้อพันธุกรรมไว้ในโรงเรือนเพาะชำพบว่า กล้วยไม้ทั้งสองชนิดมีการเจริญเติบโตและออกดอก ได้จัดกลุ่มกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด ตามแหล่งที่พบได้ดังนี้

กล้วยไม้แดงอุบล

1. จังหวัดอุบลราชธานี พบที่

1.1 ภูพลาญใหญ่ อำเภอบุญชริก (รหัส NK1-NK15)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ใบมีขนาดใหญ่ ลักษณะใบมีหลายแบบ เช่น ใบเขี้ยวยาว ใบเขี้ยวกลมสั้น ใบเขี้ยวขอบน้ำตาลแดง ใบเขี้ยวจุดน้ำตาลกว้างกลม ใบเขี้ยวจุดน้ำตาลเรียวยาว ใบแดงยาว (ภาพที่ 4 และ 5)

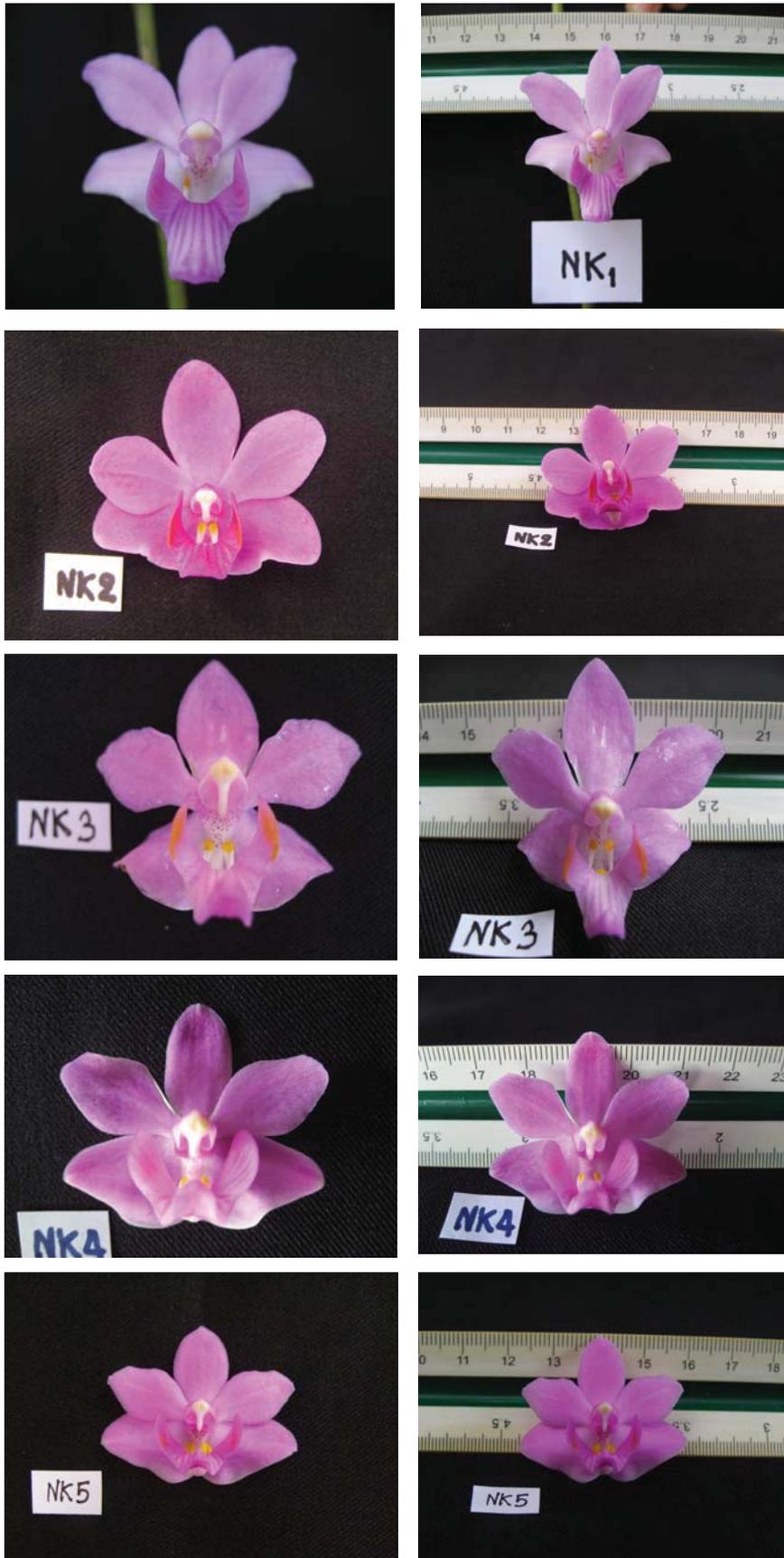


ภาพที่ 4 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส NK1-NK6

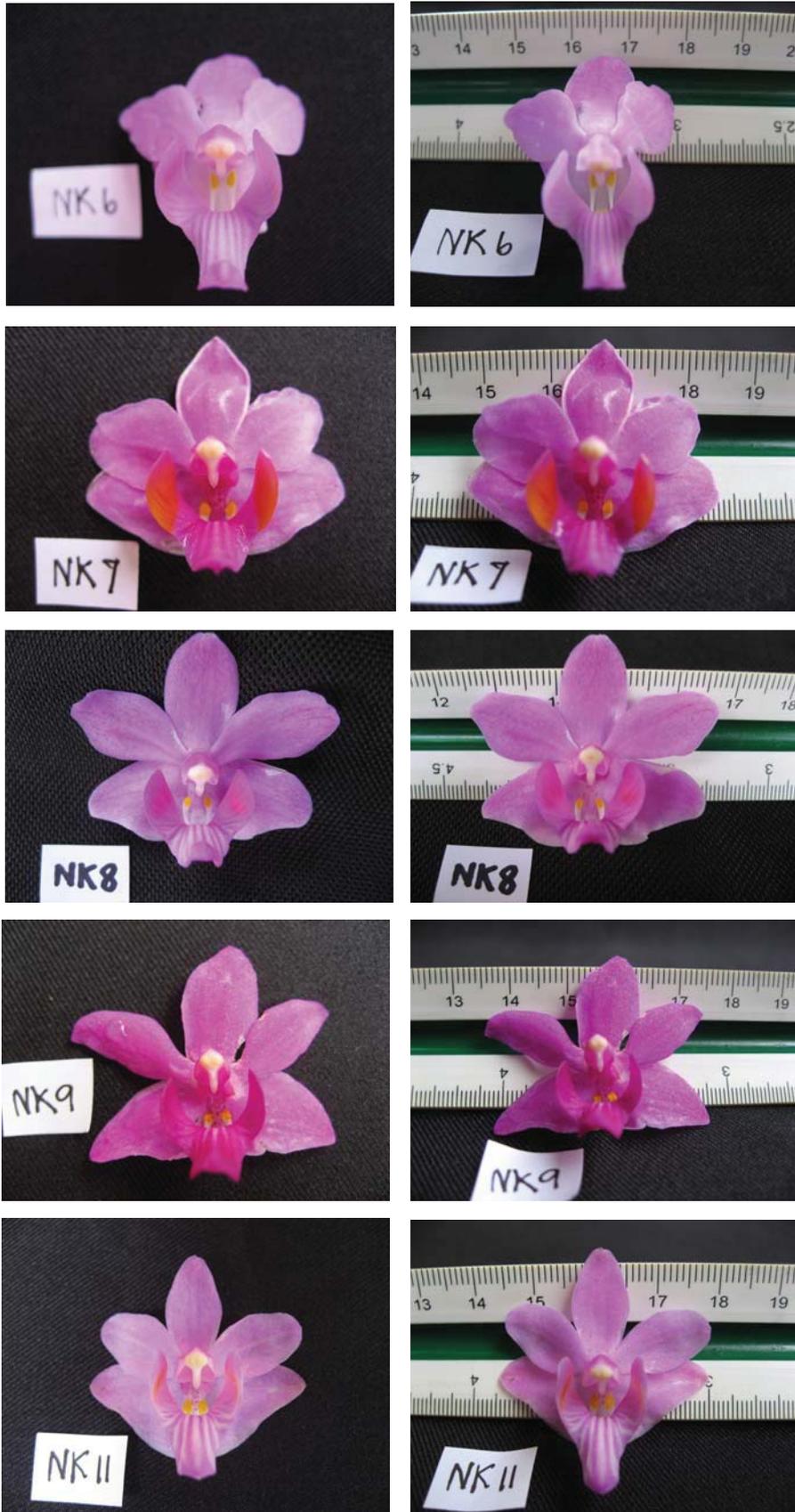


ภาพที่ 5 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส NK7-NK15

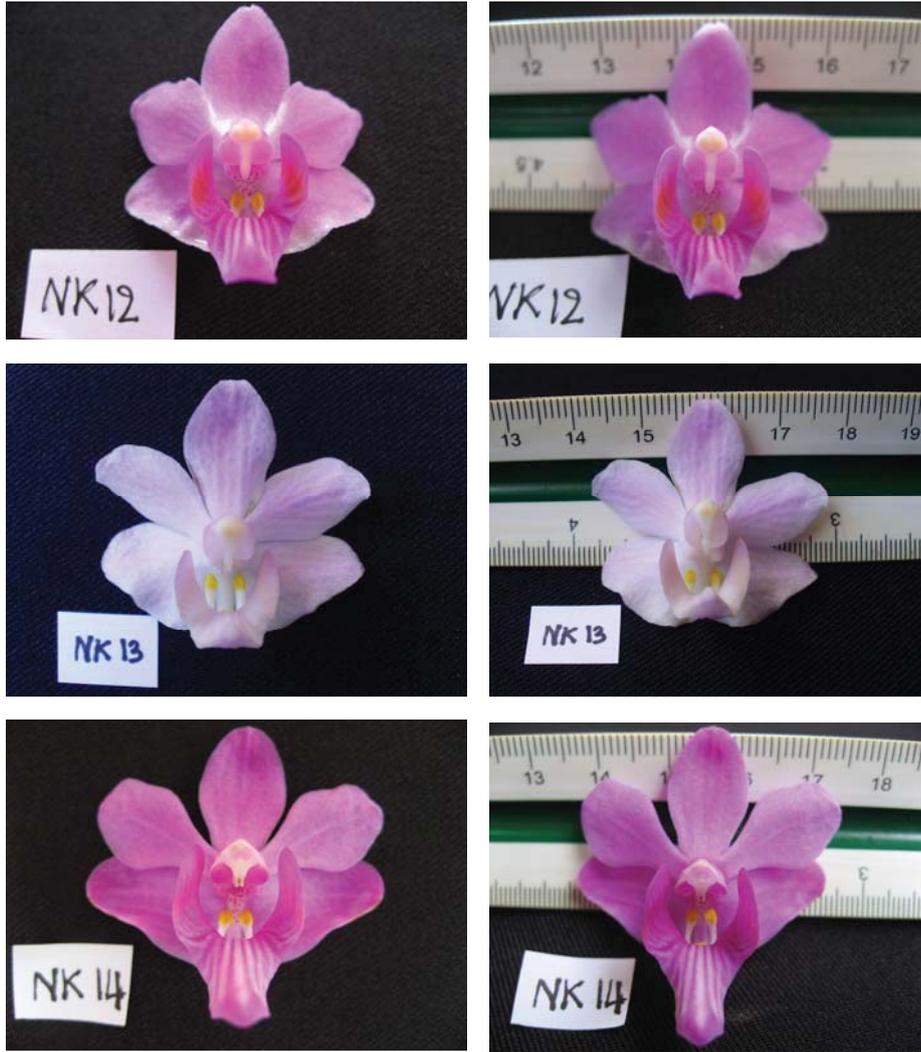
ลักษณะดอก มีความแปรปรวนมาก สีดอกมีตั้งแต่สีชมพูอ่อน – ม่วงเข้ม ปากมีสีเหมือนกลีบดอก สีเข้มกว่ากลีบดอก สี Side lobe บนปากมีสีเหลือง เหลืองส้ม ชมพูอ่อน ม่วง (ภาพที่ 6 7 และ 8)



ภาพที่ 6 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส NK1-NK5



ภาพที่ 7 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส NK6-NK9 และ NK 11



ภาพที่ 8 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส NK12 - NK14

1.2 ตลาดช่องเม็ก อ.โขงเจียม (รหัส cm1- cm17) ยกเว้น cm9

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ใบมีขนาดใหญ่ หลายลักษณะ เช่น ใบเขี้ยวยาว ใบเขี้ยวขอบน้ำตาลแดง ใบเขี้ยวจุดน้ำตาลเรียวยาว (ภาพที่ 9 และ 10)

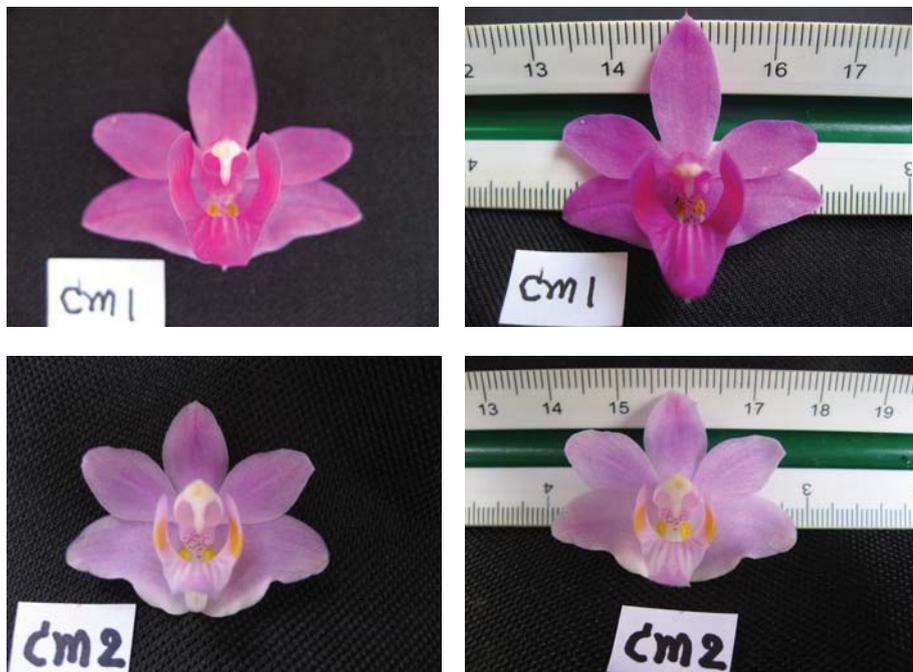


ภาพที่ 9 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส cm1 – cm8 และ cm10- cm13



ภาพที่ 10 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส cm14 – cm17

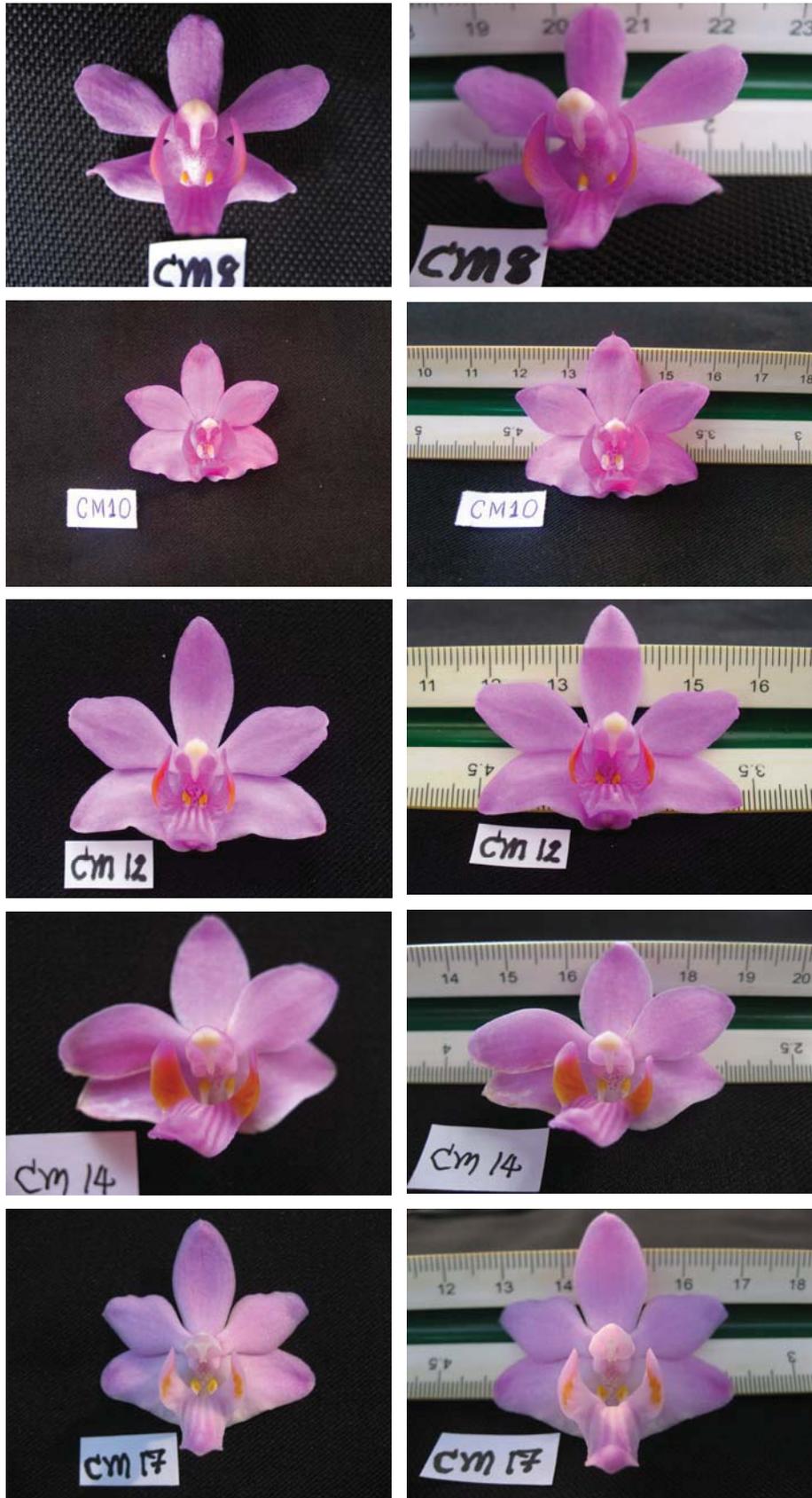
ลักษณะดอก สีดอกมีความแปรปรวน สีดอกมีตั้งแต่สีชมพูอ่อน – ม่วงเข้ม ปากมีสีเหมือนกลีบดอก สีอ่อนกว่ากลีบดอก สีเข้มกว่ากลีบดอก สี Side lobe บนปากมีสีเหลือง เหลืองส้ม ชมพูอ่อน ม่วง (ภาพที่ 11 12 และ 13)



ภาพที่ 11 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส cm1 – cm2



ภาพที่ 12 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส cm3 – cm7



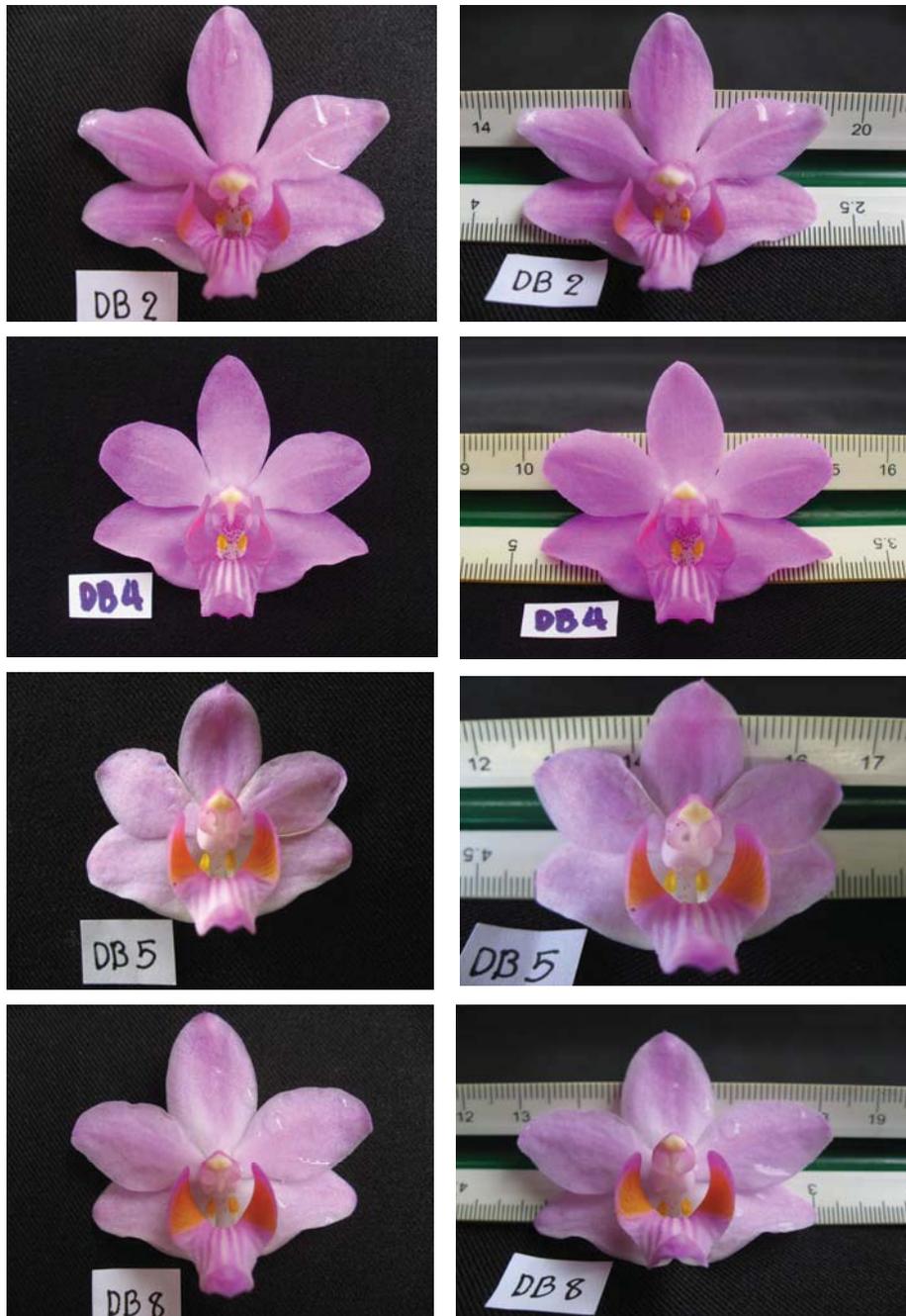
ภาพที่ 13 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส cm8, 10, 12, 14 และ 17

1.3 แม่อำพิง ตลาดช่องเม็ก ชายแดนไทย-ลาว อ.โขงเจียม (รหัส DB1-DB9)
 ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ปลายใบแหลม ใบเขียวเรียวยาว ใบเขียวจุดน้ำตาลเรียวยาว
 ใบแดงยาว (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส DB1 - DB9

ลักษณะดอก ดอกมีขนาดใหญ่ มีสีม่วงอ่อนและสีม่วงเข้ม ปากมีสีเข้มกว่ากลีบดอก
สี Side lobe บนปากมีสีเหลือง เหลืองส้ม (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส DB 2, 4, 5 และ 8

1.4 กล้วยงาคำ อำเภอกุดข้าวปุ้น (รหัส PK1-PK12 และ PKK)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ใบมีลักษณะเรียวยาว หลากแบบ เช่น ใบเขี้ยวยาว ใบเขี้ยว ขอบน้ำตาลแดง ใบเขี้ยวจุดน้ำตาลเรียวยาว ใบแดงยาว (ภาพที่ 16 และ 17)

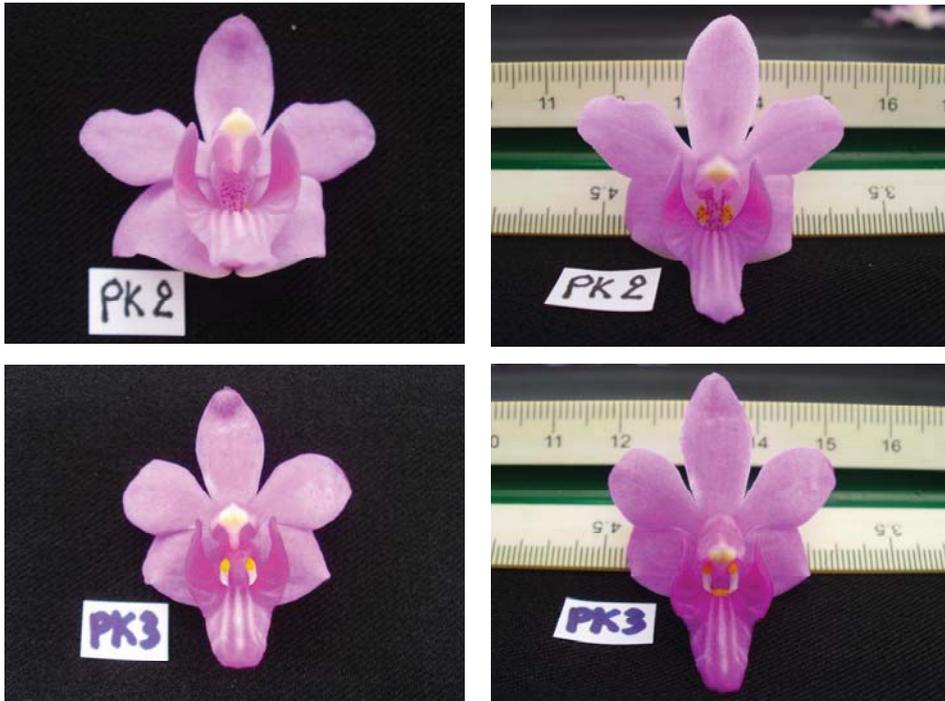


ภาพที่ 16 ลักษณะต้นกล้วยงาคำไม้แดงอุบล รหัส PK1-PK12

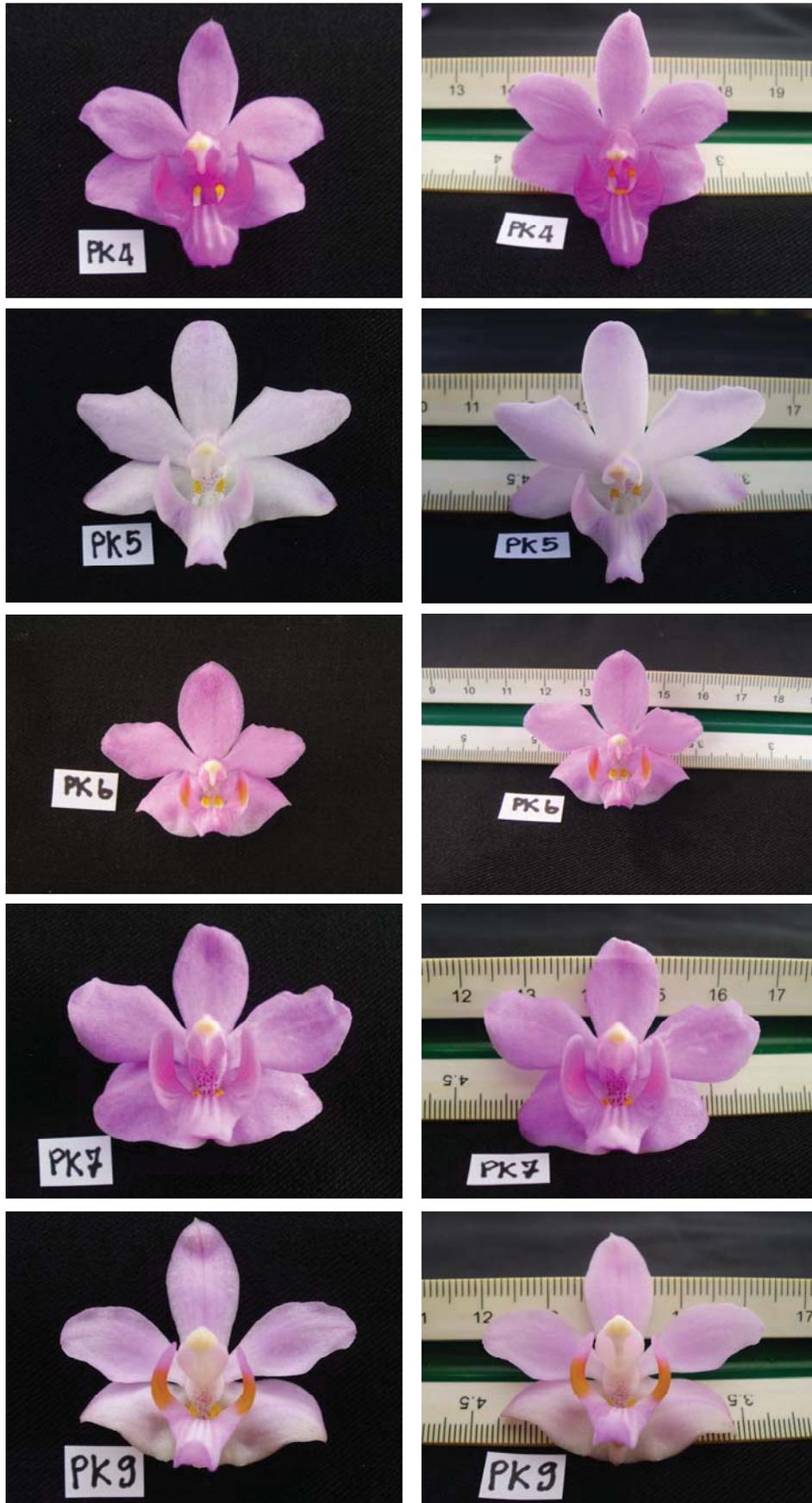


ภาพที่ 17 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส PKK 2, 8 และ 23-3

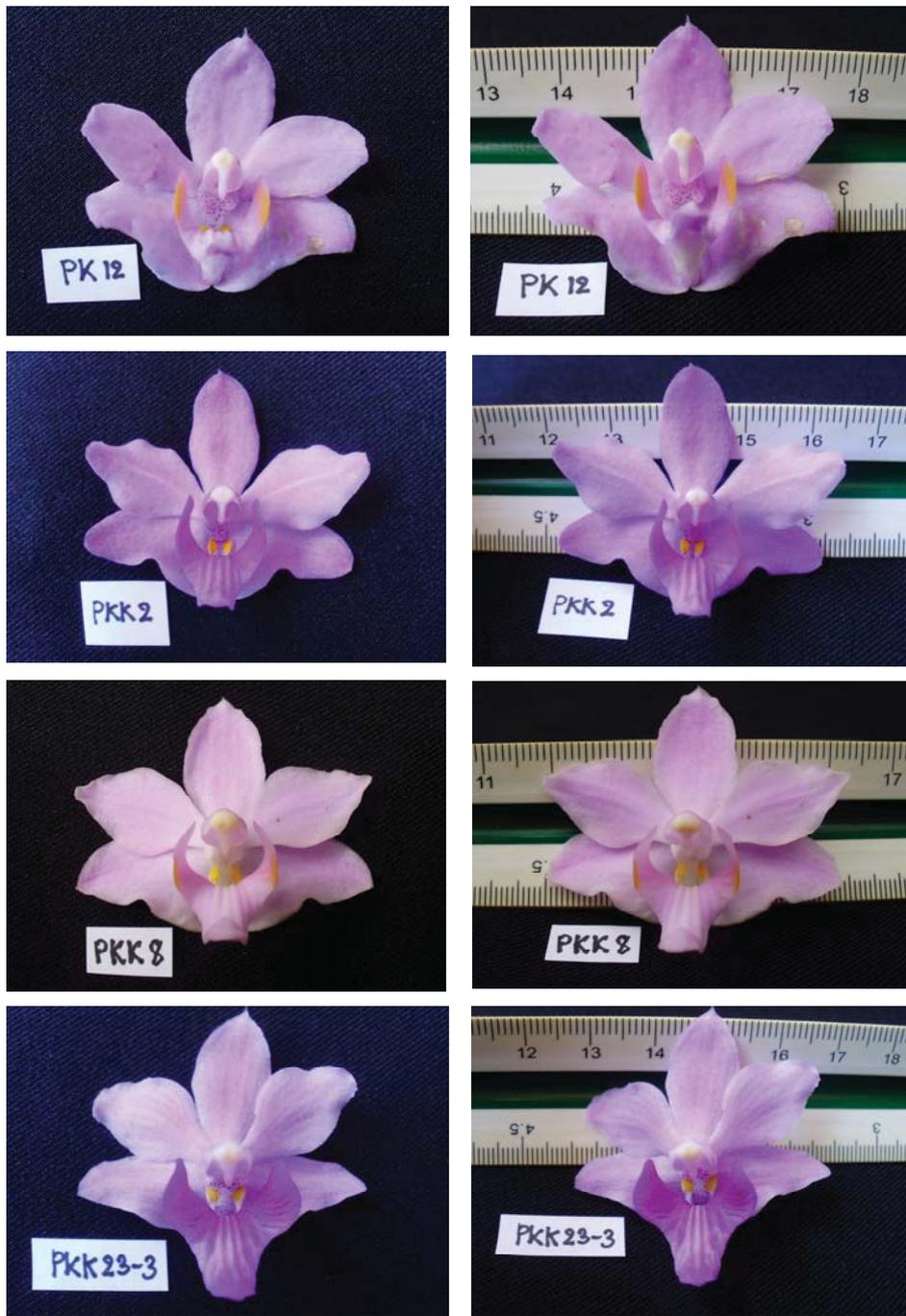
ลักษณะดอก ดอกมีขนาดใหญ่ มีสีม่วงอ่อนและสีม่วงเข้ม ปากมีสีเข้มกว่ากลีบดอก สี Side lobe บนปากมีเหลืองส้ม สีชมพู และสีเข้มกว่ากลีบดอก (ภาพที่ 18 19 และ 20)



ภาพที่ 18 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส PK2 และ PK3



ภาพที่ 19 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส PK4 – PK7 และ PK9



ภาพที่ 20 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส PK12 และ PKK2, 8 และ 23-3

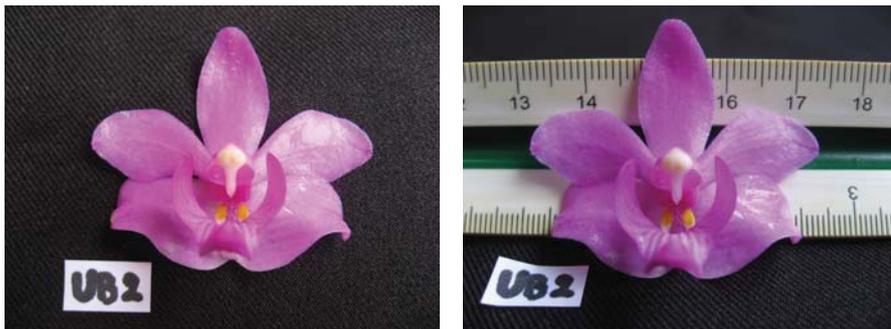
1.5 บ้านแดงหม้อ อำเภอบึงนาราง (UB1-2)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ใบเขียวจุดและขอบน้ำตาลเรียวยาว (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส UB1 และ UB2

ลักษณะดอก ดอกมีขนาดใหญ่ กลีบดอกมีสีม่วงเข้ม ปากมีสีเหมือนกับกลีบดอก สี Side lobe บนปากมีสีเหมือนกับกลีบดอก (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส UB2

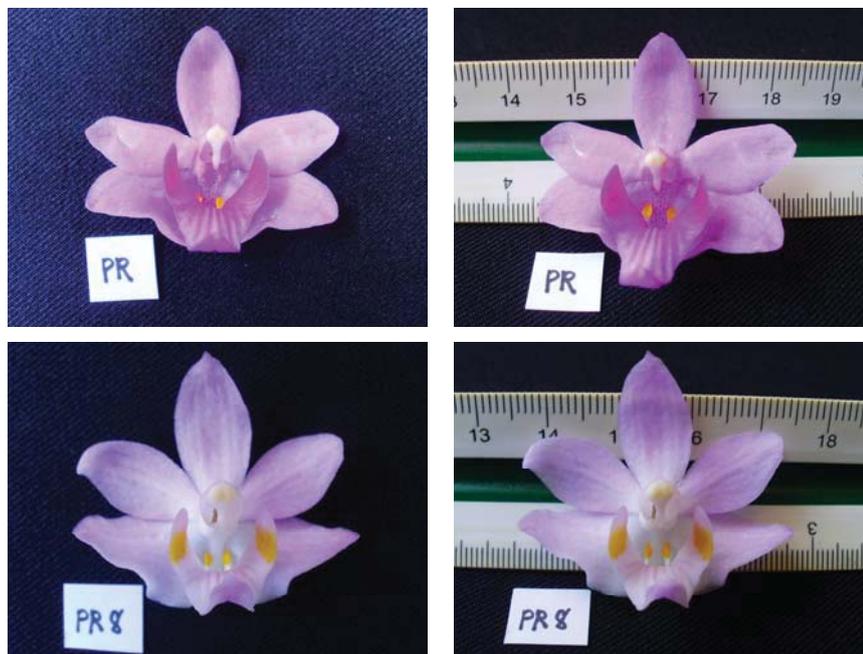
1.6 ภูรัง อำเภอกุดข้าวปุ้น (รหัส PR)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ใบขนาดใหญ่ ปลายใบแหลม ลักษณะใบมีหลายแบบ เช่น ใบเขียวเรียวยาว ใบเขียวขอบน้ำตาลแดง ใบเขียวจุดน้ำตาลกว้างกลม ใบเขียวจุดน้ำตาลเรียวยาว (ภาพที่ 23)

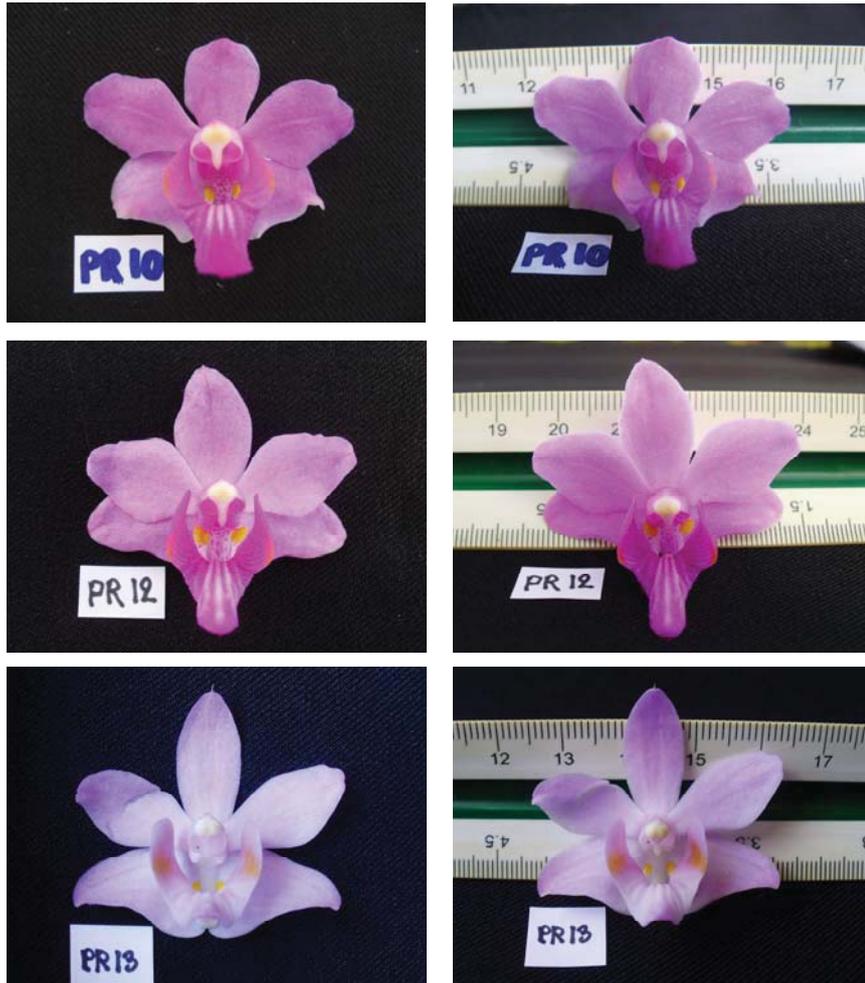


ภาพที่ 23 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส PR, PR 8, 10, 12 และ 13

ดอกมีความกว้างประมาณ 3 – 4 เซนติเมตร สีดอกม่วงอ่อน - เข้ม ปากมีสีเข้มกว่ากลีบดอก ส่วนสี Side lobe บนปากมีสีอ่อนกว่ากลีบดอก สีเหลืองส้ม สีเหลือง (ภาพที่ 24 และ 25)



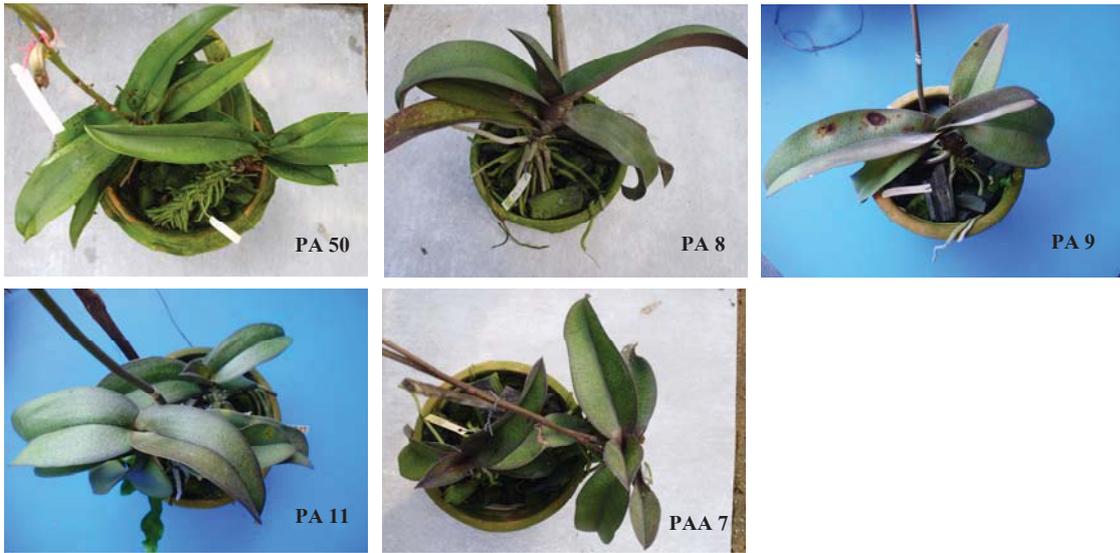
ภาพที่ 24 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส PR และ PR8



ภาพที่ 25 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส PR10, 12 และ 13

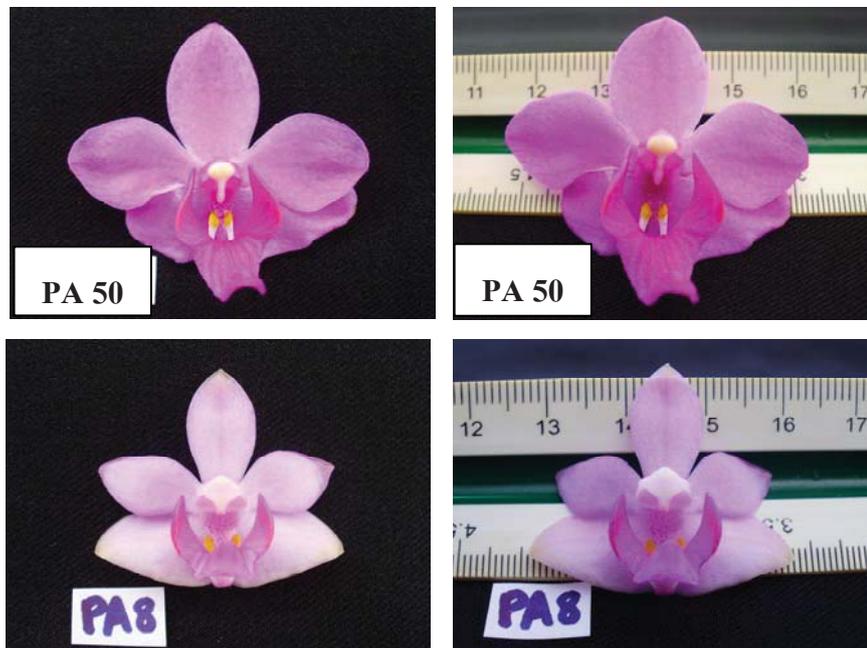
1.7 กล้วยไม้พันธุ์อำเภอกุดข้าวปุ้น (รหัส PA และ PAA)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ปลายใบแหลม ลักษณะใบมีหลายแบบ เช่น ใบเขียวเรียวยาว ใบเขียวขอบน้ำตาลแดง ใบเขียวจุดน้ำตาลกว้างกลม ใบเขียวจุดน้ำตาลเรียวยาว (ภาพที่ 26)

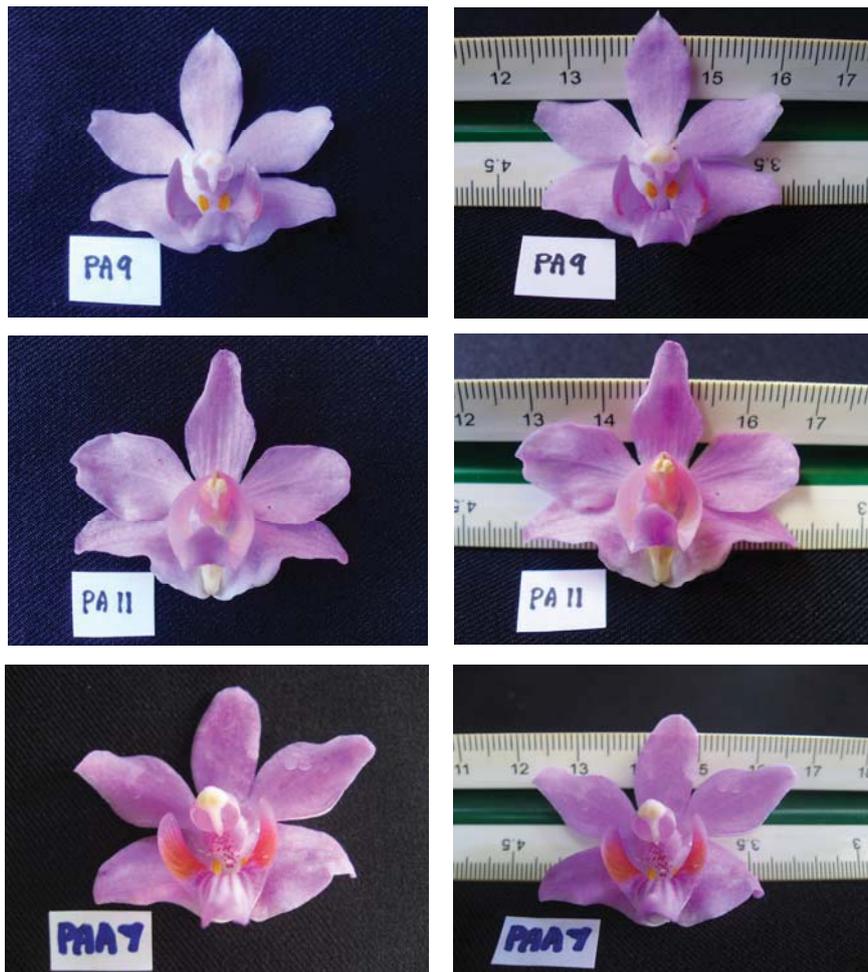


ภาพที่ 26 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส PA50, 8, 9, 11 และ PAA7

สีดอกมีความแปรปรวน ดอกมีความกว้างประมาณ 4 – 5 เซนติเมตร สีดอกมีตั้งแต่สีชมพูอ่อนจนถึงสีม่วงเข้ม ปากมีสีเหมือนและเข้มกว่ากลีบดอก ส่วนสี Side lobe มีสีม่วงเข้มและเหลืองส้มเล็กน้อย (ภาพที่ 27 และ 28)



ภาพที่ 27 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส PA50 และ PA8



ภาพที่ 28 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส PA9, PA11 และ PAA7

1.8 ญนกเต็น อำเภอกุดข้าวปุ้น

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ใบมีขนาดใหญ่ ปลายใบแหลม ลักษณะใบมีหลายแบบ เช่น ใบเขียวเรียวยาว ใบเขียวขอบน้ำตาลแดง ใบเขียวจุดน้ำตาลกว้างกลม ใบเขียวจุดน้ำตาลเรียวยาว (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 29 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส ญนกเต็น1, 3, 10 และ 11

ดอกมีความกว้างประมาณ 3 – 4 เซนติเมตร สีดอกมีสีม่วงเข้ม ปากมีสีเข้มกว่ากลีบดอก ส่วนสี Side lobe บนปากมีสีเหมือนกลีบดอก และมีสีเหลืองส้มเล็กน้อย (ภาพที่ 30 และ 31)



ภาพที่ 30 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส ญนกเต็น1 และ ญนกเต็น3



ภาพที่ 31 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส กุณฑกเต็น10 และ กุณฑกเต็น11

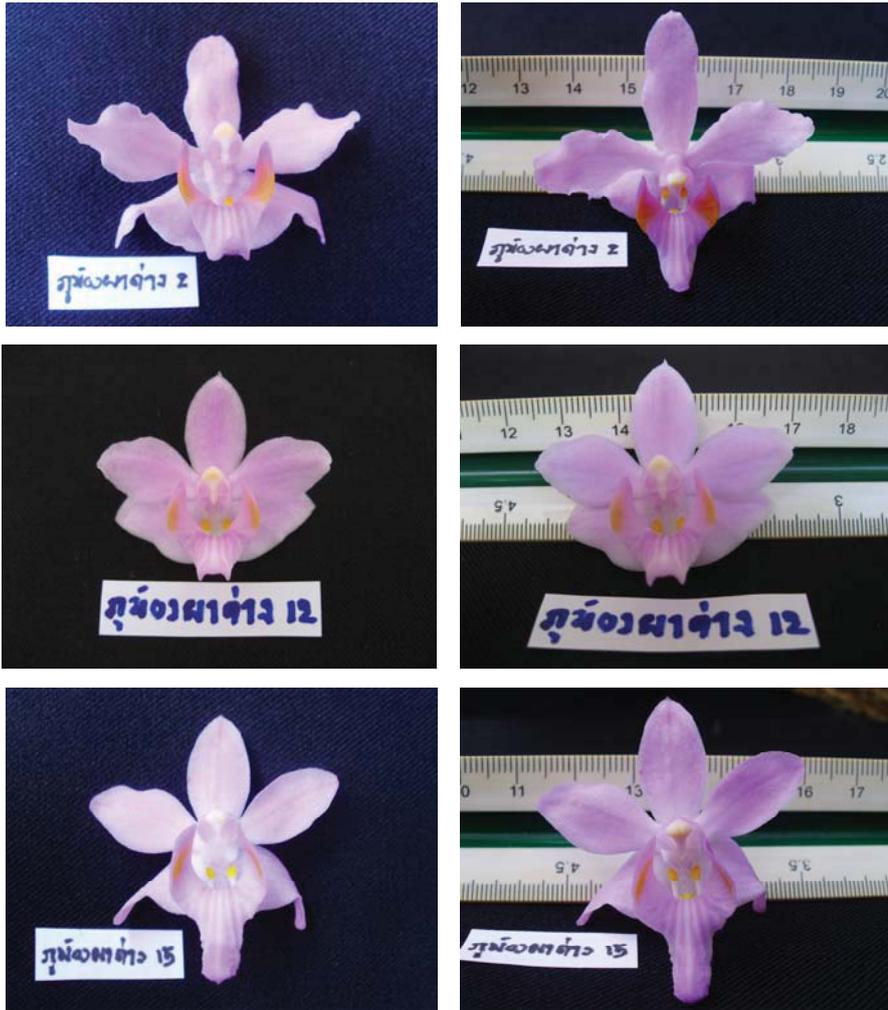
1.9 กุช้องผาด่าง อำเภอกุดข้าวปุ้น

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ใบมีขนาดใหญ่ ปลายใบแหลม ลักษณะใบมีหลายแบบ เช่น ใบเขียวเรียวยาว ใบเขียวขอบน้ำตาลแดง ใบเขียวจุดน้ำตาลกว้างกลม ใบเขียวจุดน้ำตาลเรียวยาว (ภาพที่ 32)



ภาพที่ 32 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส กุช้องผาด่าง 2, 12 และ 15

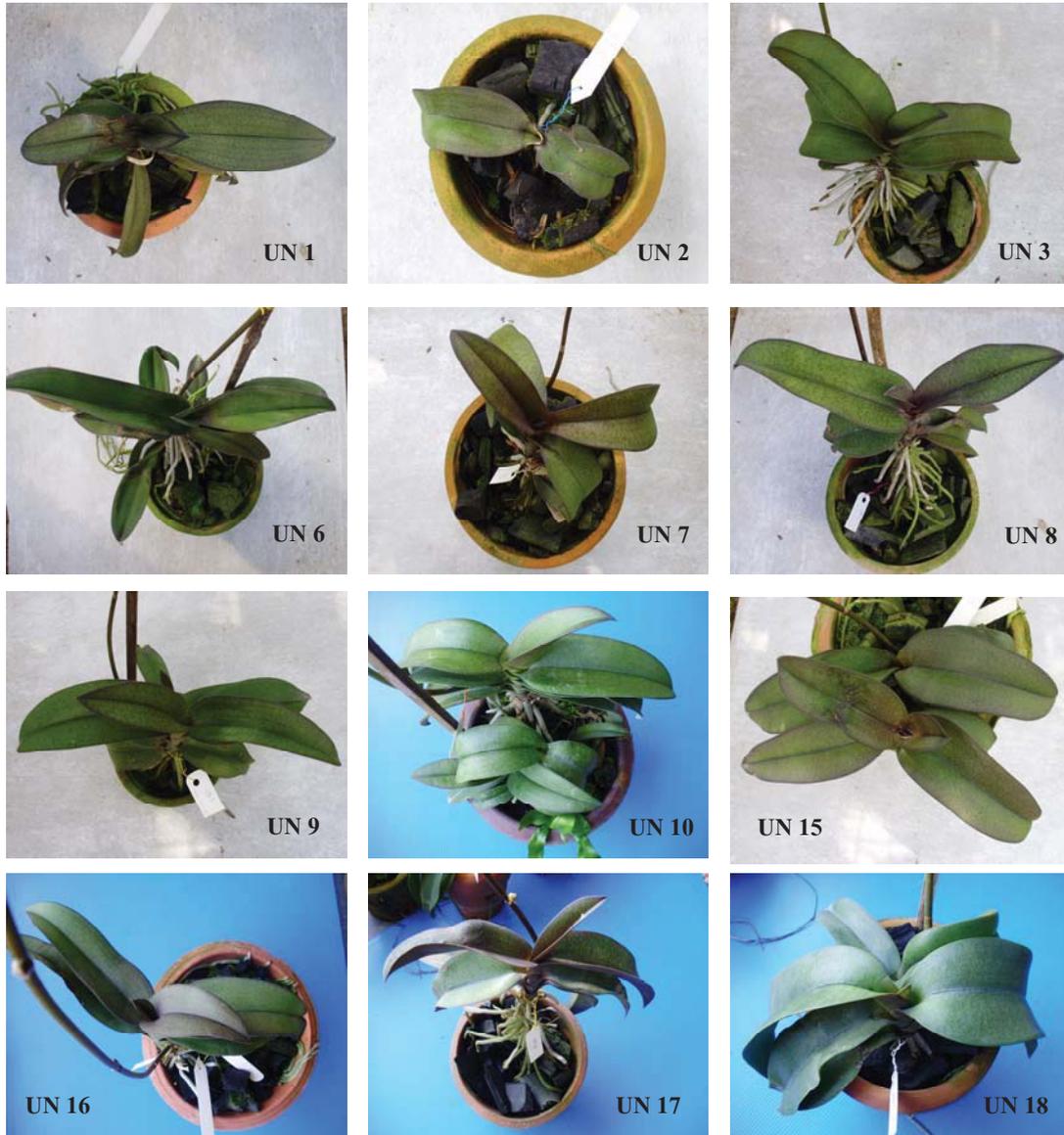
ดอกมีความกว้างประมาณ 3 – 4 เซนติเมตร ดอกมีสีชมพูอ่อน ปากมีสีเหมือนกลีบดอก มีลายเส้นบนปาก ส่วนสีของ Side lobe บนปากมีสีเหลืองส้ม (ภาพที่ 33)



ภาพที่ 33 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส กล้วยไม้ต่าง 2, 12 และ 15

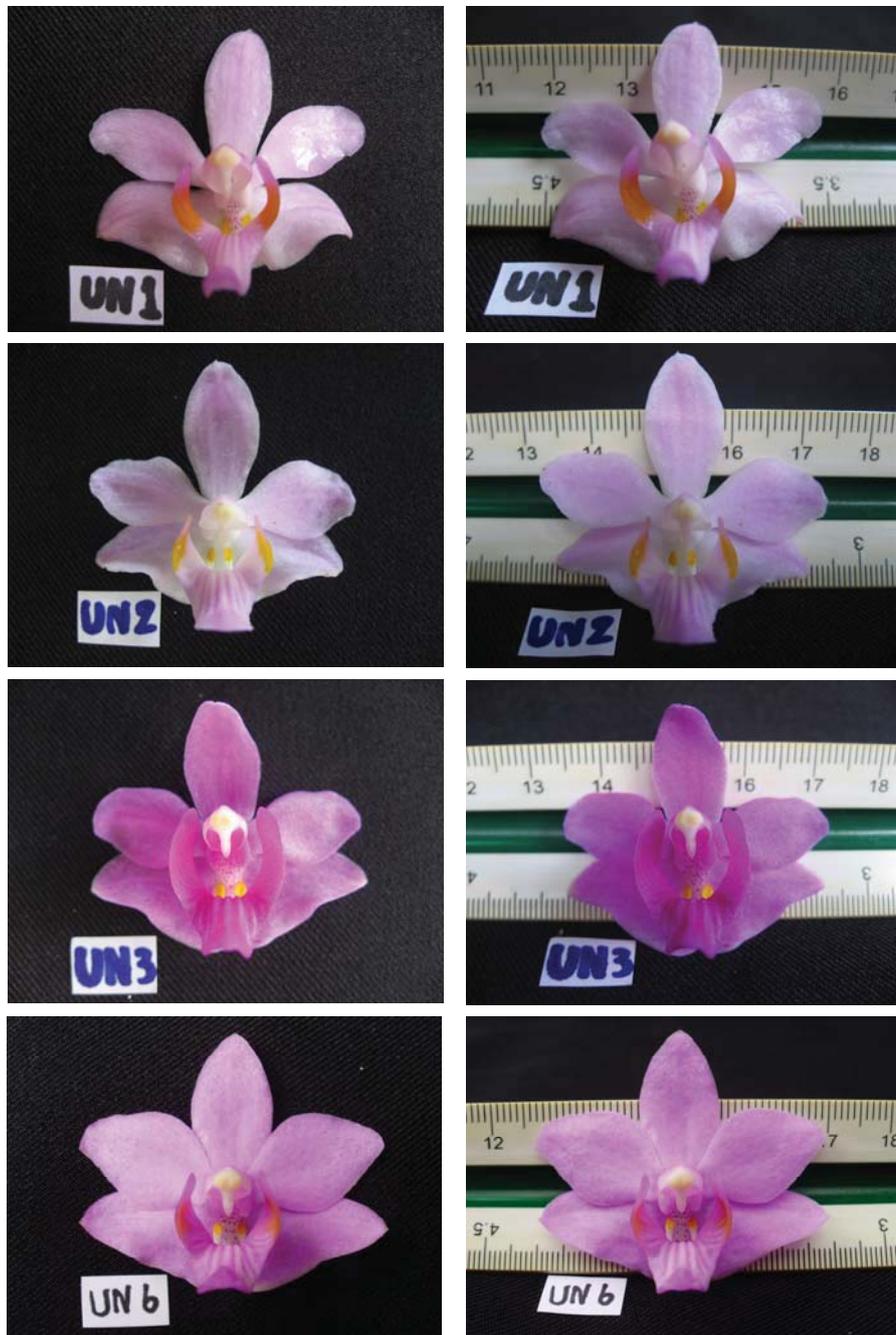
1.10 กลุ่มที่ไม่ทราบแหล่งที่มา (จ. อุบลราชธานี) (รหัส UN)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ใบมีขนาดใหญ่ ปลายใบแหลม ลักษณะใบมีหลายแบบ เช่น ใบเขียวเรียวยาว ใบเขียวขอบน้ำตาลแดง ใบเขียวจุดน้ำตาลกว้างกลม ใบเขียวจุดน้ำตาลเรียวยาว (ภาพที่ 34)

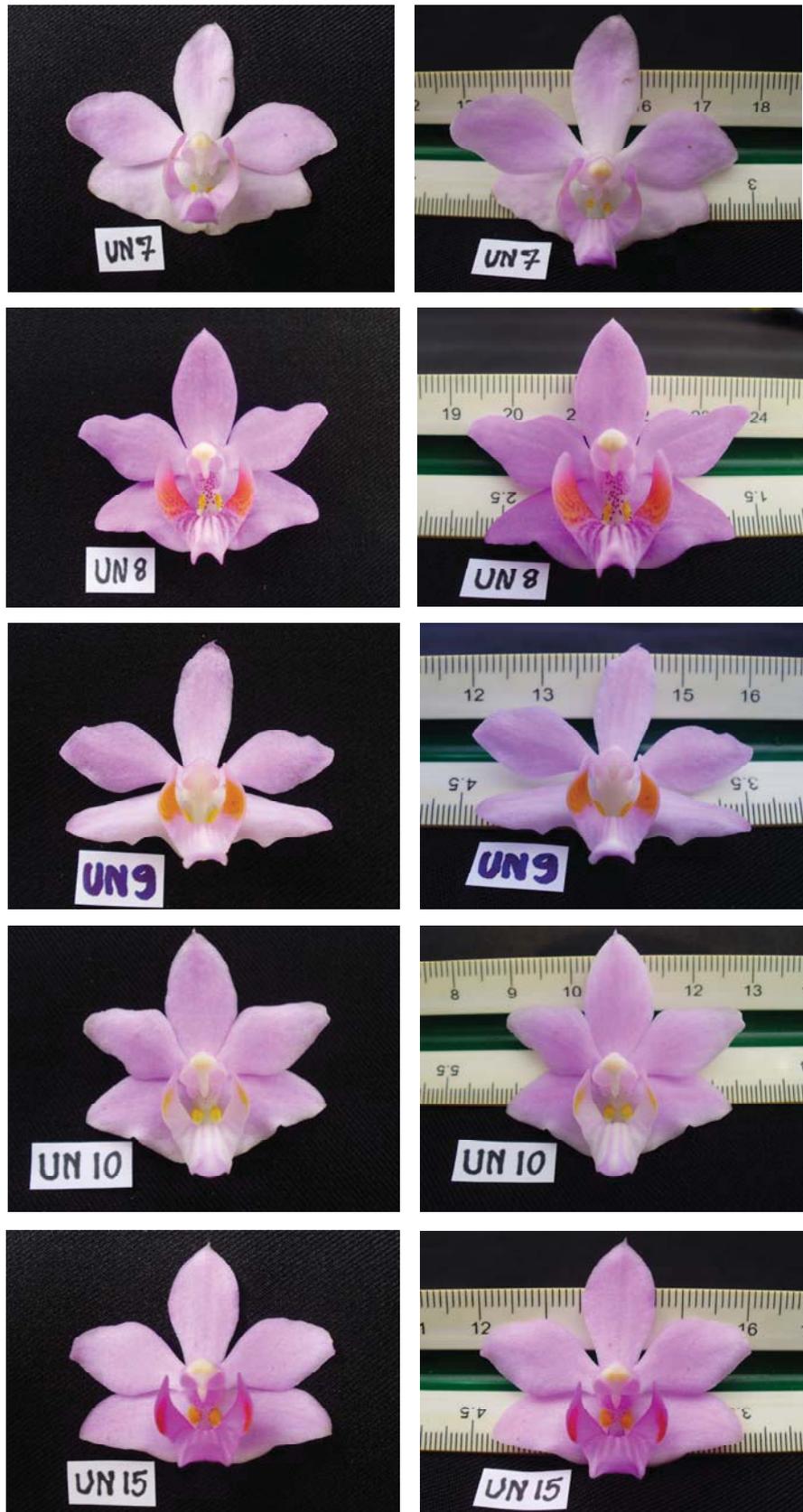


ภาพที่ 34 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส UN1-3, UN6-10 และ UN15-18

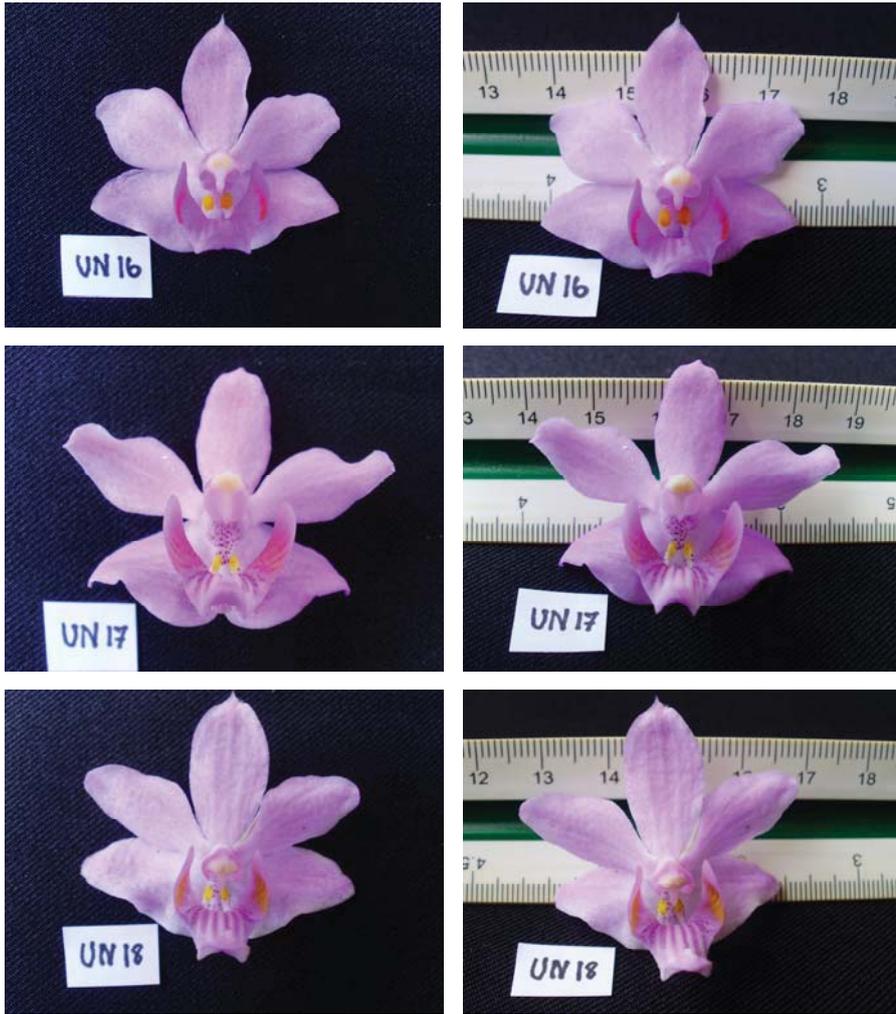
สีดอกมีความแปรปรวน ดอกมีความกว้างประมาณ 3 – 4 เซนติเมตร สีดอกมีตั้งแต่สีชมพูอ่อนจนถึงสีม่วงเข้ม ปากมีสีเหมือนกลีบดอก และสีเข้มกว่ากลีบดอก ส่วนสี Side lobe บนปากมีสีเข้มกว่ากลีบดอก สีเหลืองส้ม และสีเหลือง (ภาพที่ 35 36 และ 37)



ภาพที่ 35 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส UN1 – 3 และ UN6



ภาพที่ 36 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส UN7 – 10 และ UN15



ภาพที่ 37 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส UN16 - 18

2. จังหวัดร้อยเอ็ด พบที่

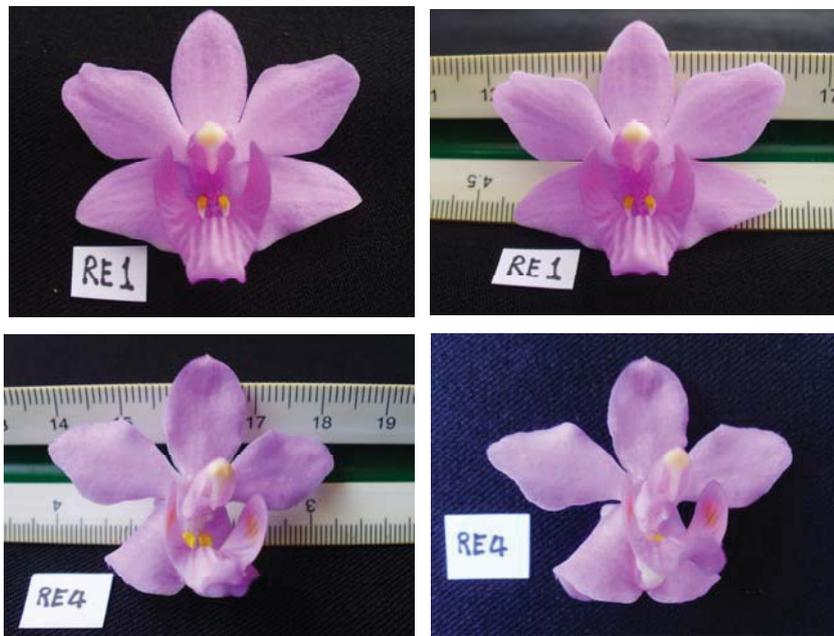
2.1 อำเภอโพนทอง (รหัส RE1, RE3, RE4)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ใบมีลักษณะสีเขียวจุดน้ำตาลเรียวยาว (ภาพที่ 38)



ภาพที่ 38 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส RE1, RE3, RE4

ลักษณะดอก ดอกมีขนาดใหญ่ กลีบดอกมีสีม่วงเข้ม ปากมีสีเหมือนกับกลีบดอก สี Side lobe บนปากมีสีเหลืองส้มเล็กน้อย (ภาพที่ 39)



ภาพที่ 39 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส RE1 และ RE4

3. จังหวัดสกลนคร พบที่

3.1 อำเภอเต่างอย (รหัส SK1-SK3)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ใบมีสีเขียวเรียวยาว เขียวกลมสั้น เขียวจุดน้ำตาลเรียวยาว (ภาพที่ 40)



ภาพที่ 40 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส SK1-SK3

3.2 อำเภอภูพาน (รหัส SK4-SK5)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ใบมีสีเขียวจุดสีน้ำตาลเรียวยาว (ภาพที่ 41)



ภาพที่ 41 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส SK4-SK5

4. จังหวัดเลย พบที่

4.1 ผานกเค้า อำเภอภูกระดึง (รหัส LO1 และ 3)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ใบแดงยาว (ภาพที่ 42)



ภาพที่ 42 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส LO1 และ LO3

5. จังหวัดกาฬสินธุ์ พบที่

5.1 อำเภอสหัสขันธ์ (รหัส Kh 1)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ใบมีสีเขียวจุดสีน้ำตาลเรียวเล็ก (ภาพที่ 43)



ภาพที่ 43 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส Kh 1

5.2 ต่าบลโพน อำเภอคำม่วง (รหัส Kh2)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ใบมีสีเขียวเรียวเล็ก ใบมีสีเขียวจุดและขอบสีน้ำตาล (ภาพที่ 44)

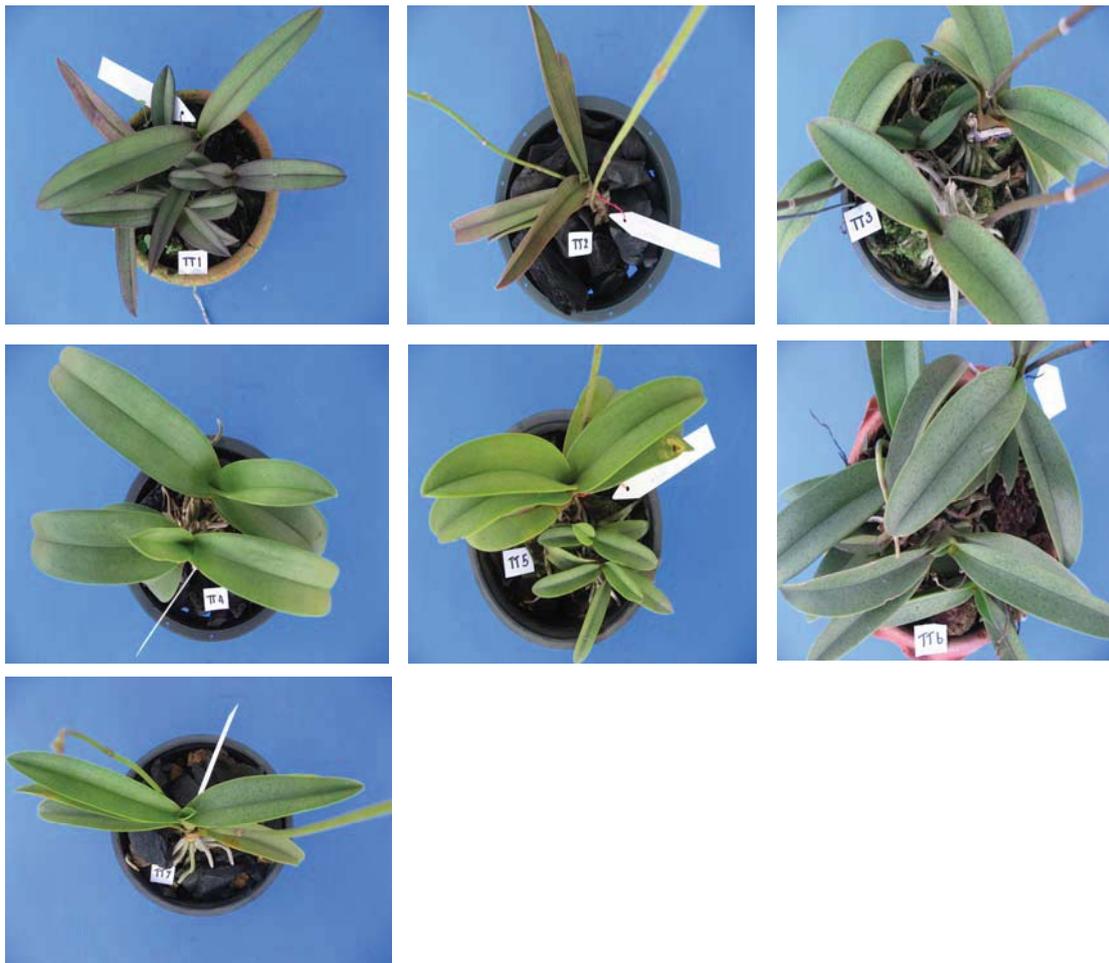


ภาพที่ 44 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส Kh2

6. จังหวัดศรีสะเกษ พบที่

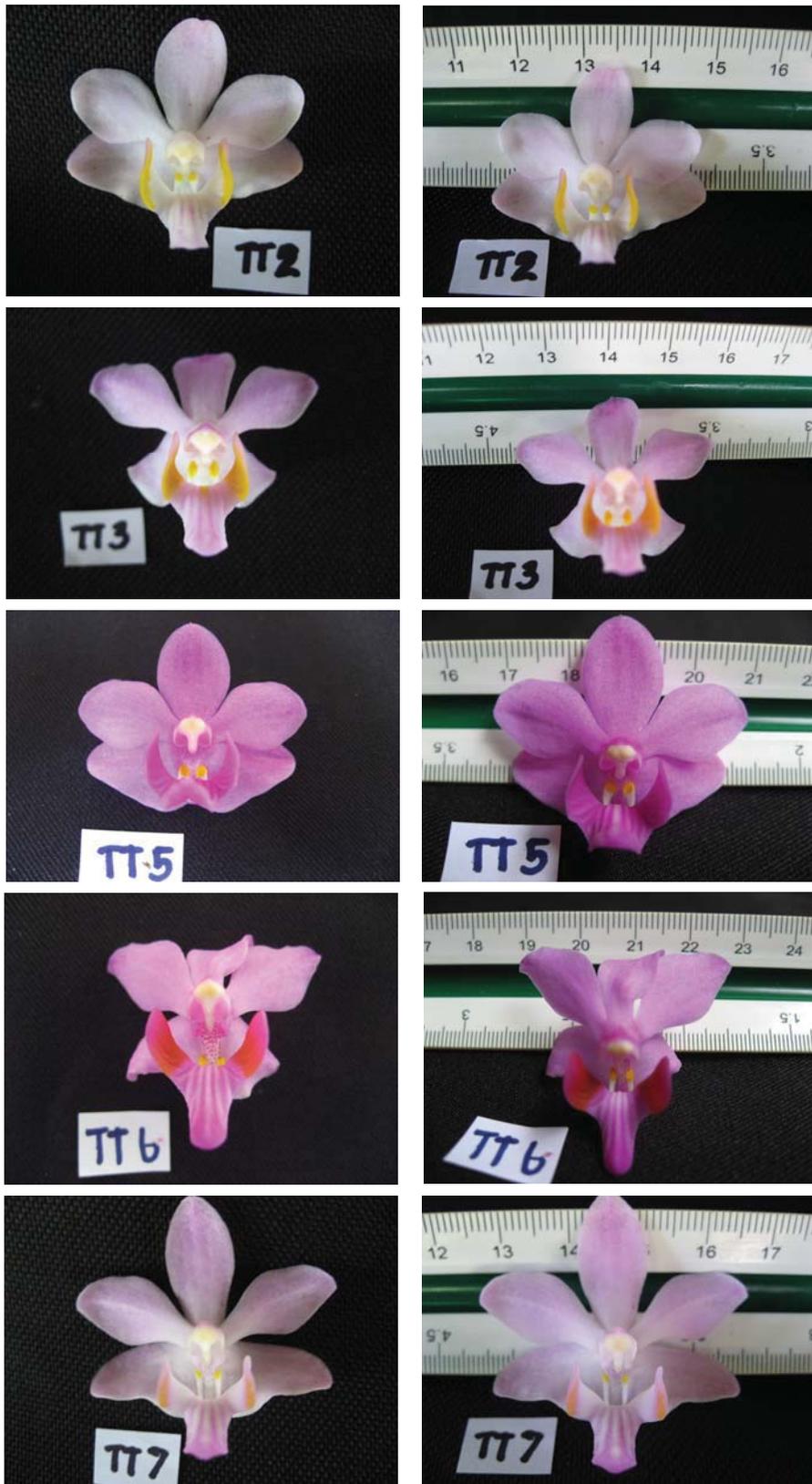
6.1 หมู่บ้านทับทิมสยาม อำเภوخุนหาญ (รหัส TT1 - TT7)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ใบมีลักษณะสีเขียวเรียวยาว (ภาพที่ 45)



ภาพที่ 45 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส TT1 - TT7

ลักษณะดอก ดอกมีขนาดใหญ่ ดอกมีสีม่วงอ่อน – ม่วงเข้ม ปากมีสีเหมือนกลีบดอก สีเข้มกว่า
กลีบดอก สี Side lobe บนปาก มีสีเหลือง ส้ม ม่วง (ภาพที่ 46)



ภาพที่ 46 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส TT2-3 และ TT5-7

7. จังหวัดมุกดาหาร พบที่

7.1 อำเภอคำชะอี (รหัส MD1 และ MD2)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ใบมีลักษณะสีเขียวเรียวยาว (ภาพที่ 47)



ภาพที่ 47 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส MD1 และ MD2

7.2 ตลาดอินโดจีน (จากประเทศลาว) (รหัส MDD)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ใบมีขนาดใหญ่ ลักษณะใบมีหลายแบบ เช่น ใบเขียวยาว ใบเขียวกลมสั้น ใบเขียวขอบน้ำตาลแดง ใบเขียวจุดน้ำตาลกว้างกลม ใบเขียวจุดน้ำตาลเรียว ยาว ใบแดงยาว (ภาพที่ 48 และ 49)

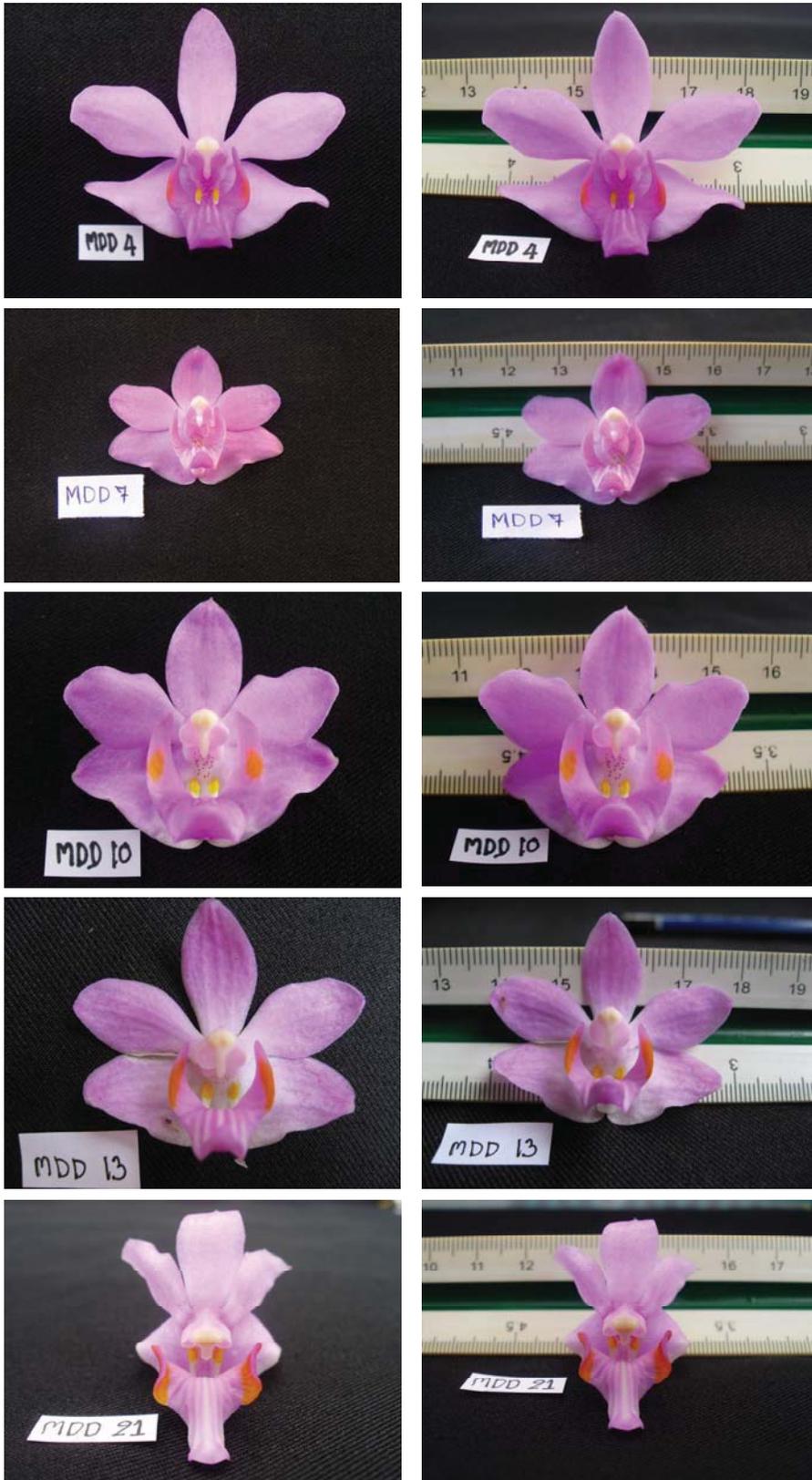


ภาพที่ 48 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส MDD2 - MDD7



ภาพที่ 49 ลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบล รหัส MDD9-16, MDD19, 21, 22 และ 24

ลักษณะดอก ดอกมีสีม่วง ปากมีสีเข้มกว่ากลีบดอก สี Side lobe บนปาก มีสีเหมือนกลีบดอก สีเหลือง และสีเหลืองส้ม (ภาพที่ 50)



ภาพที่ 50 ดอกกล้วยไม้แดงอุบลรหัส MDD4, 7, 10, 13 และ 21

กล้วยไม้ม้าวีง

1.จังหวัดอุบลราชธานี พบที่

1.1 อำเภอโพธิ์ไทร (รหัส MVP1-44)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ใบมีขนาดเล็ก ลักษณะใบมีหลายแบบ เช่น ใบเขี้ยวเรียวยาว ใบเขี้ยวกลมสั้น ใบเขี้ยวขอบน้ำตาลแดง ใบเขี้ยวจุดน้ำตาลกว้างกลม ใบเขี้ยวจุดน้ำตาลเรียวยาว ใบแดงยาว (ภาพที่ 51 - 54)



ภาพที่ 51 ลักษณะต้นกล้วยไม้ม้าวีง รหัส MVP1 – MVP12



ภาพที่ 52 ลักษณะต้นกล้วยไม้มาว้าง รหัส MVP13 – MVP27

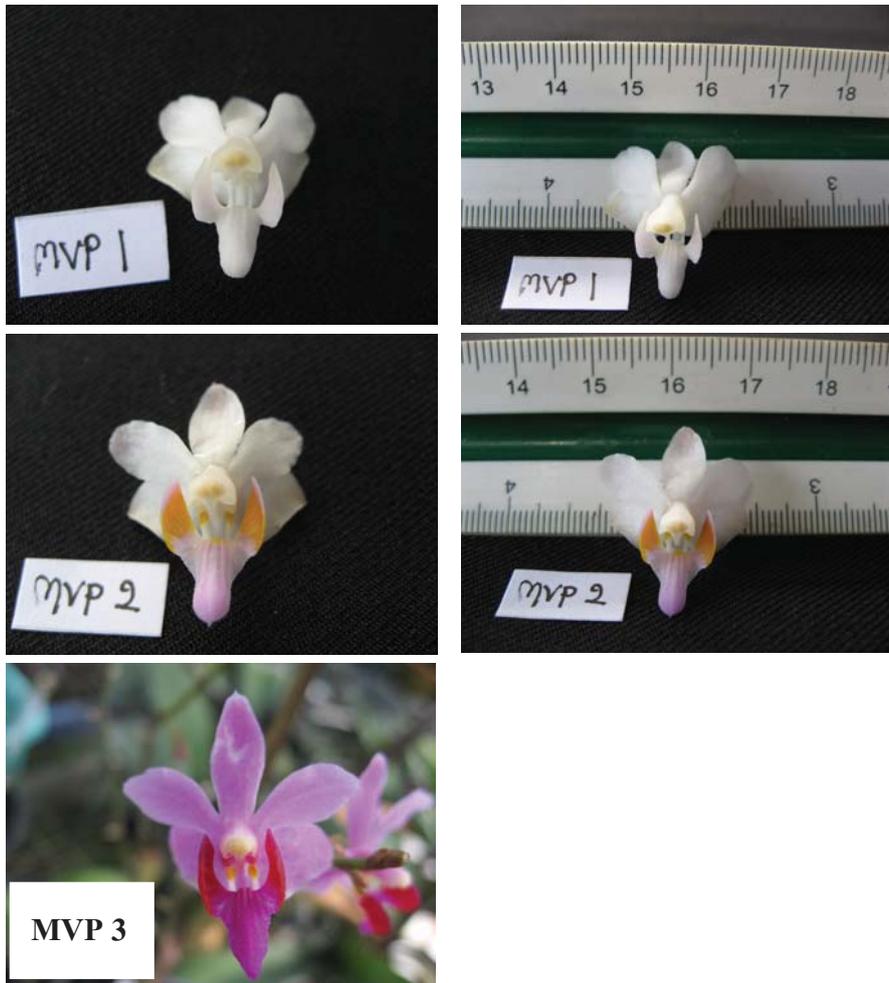


ภาพที่ 53 ลักษณะต้นกล้วยไม้มา้วิ่ง รหัส MVP28 – MVP42

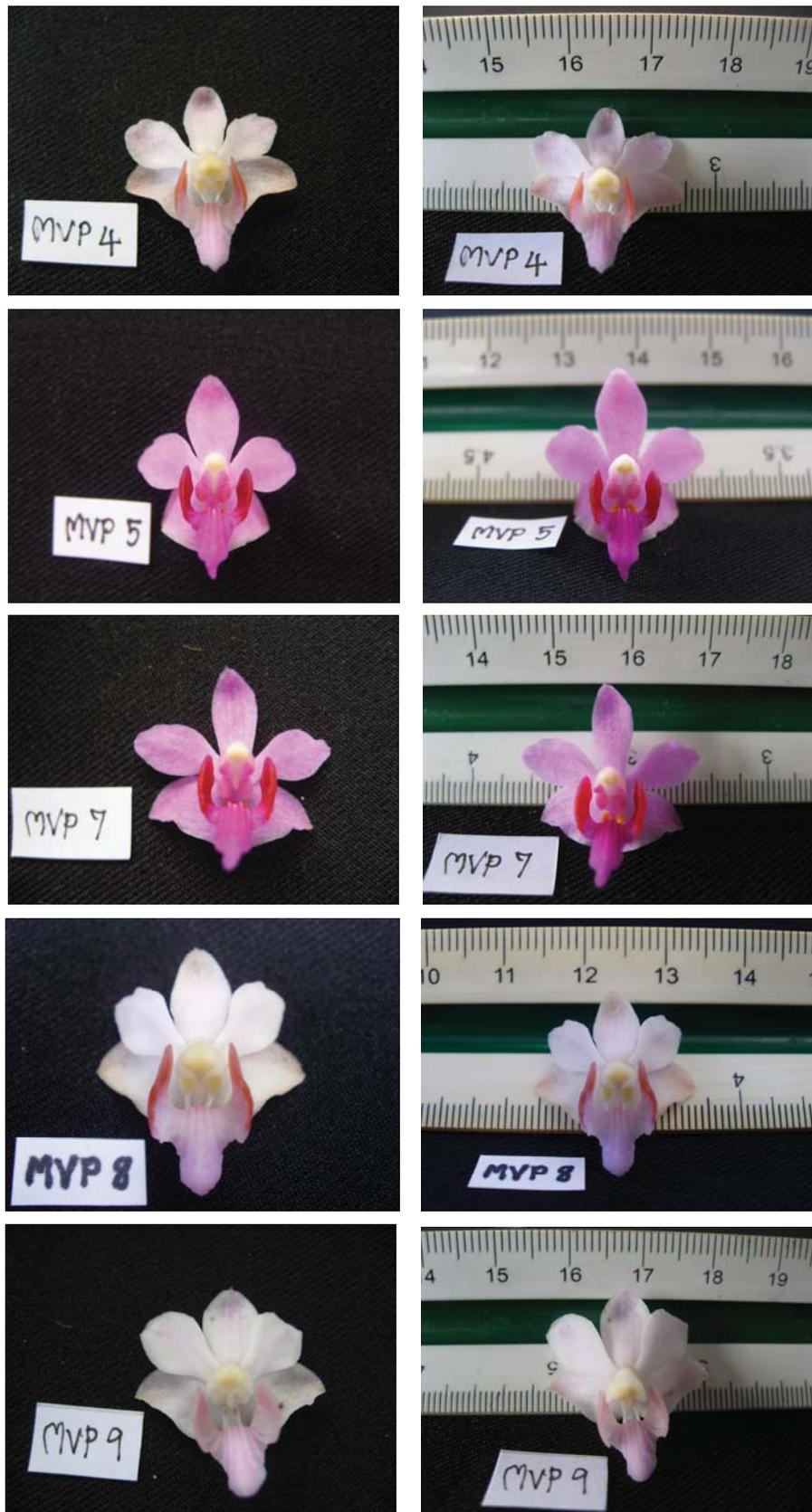


ภาพที่ 54 ลักษณะต้นกล้วยไม้มาว้าง รหัส MVP43 – MVP44

ลักษณะดอก มีขนาดเล็ก สีดอกความแปรปรวนมาก ดอกมีสีตั้งสีขาว – ม่วงเข้ม ปากมีสีเหมือนกลีบดอก สีอ่อนกว่ากลีบดอก สีเข้มกว่ากลีบดอก สี Side lobe บนปาก มีสีเหลือง เหลืองส้ม ชมพูอ่อน ม่วง แดง (ภาพที่ 55 - 62)



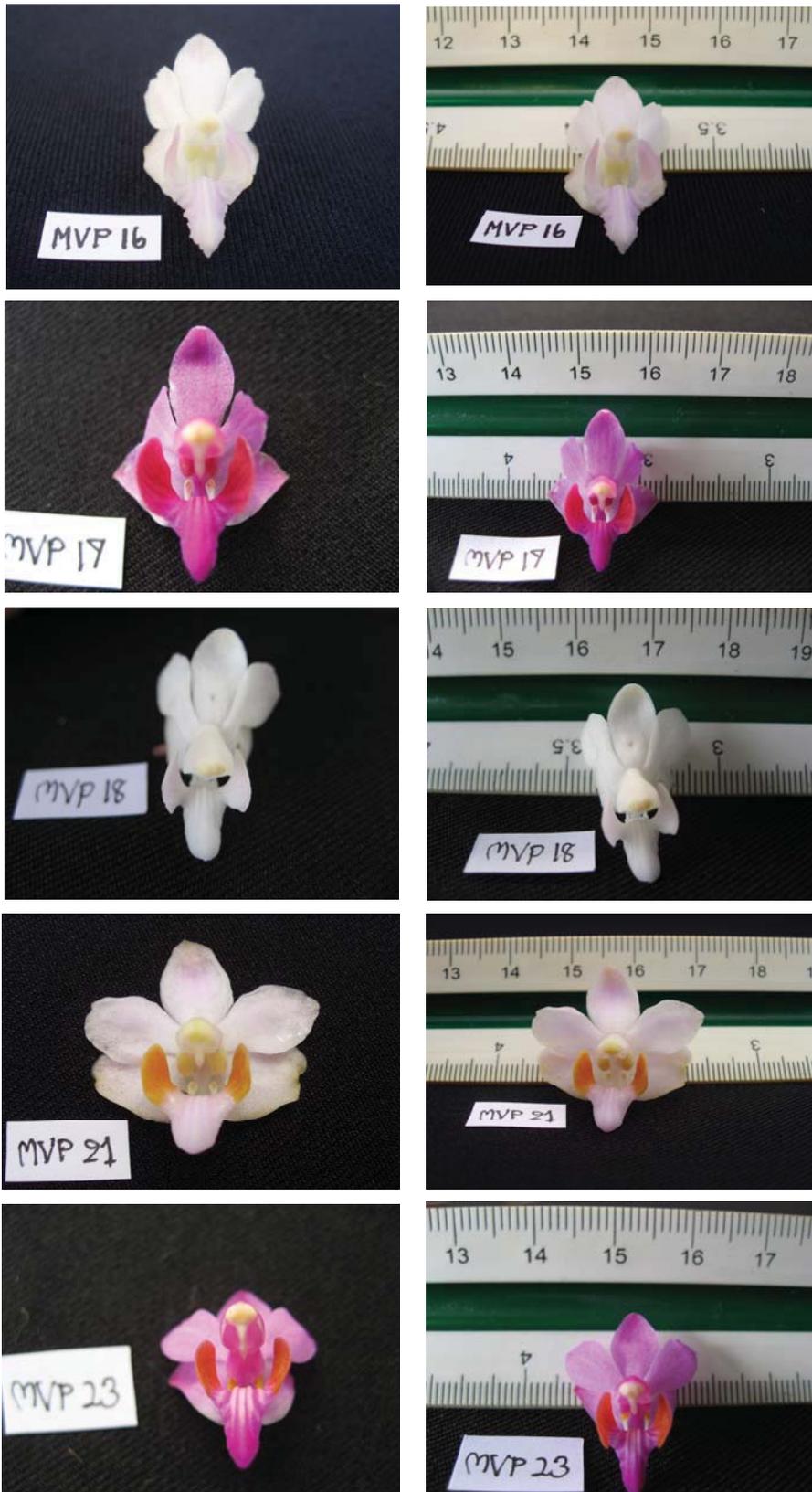
ภาพที่ 55 ดอกกล้วยไม้มาว้าง รหัส MVP1 – MVP3



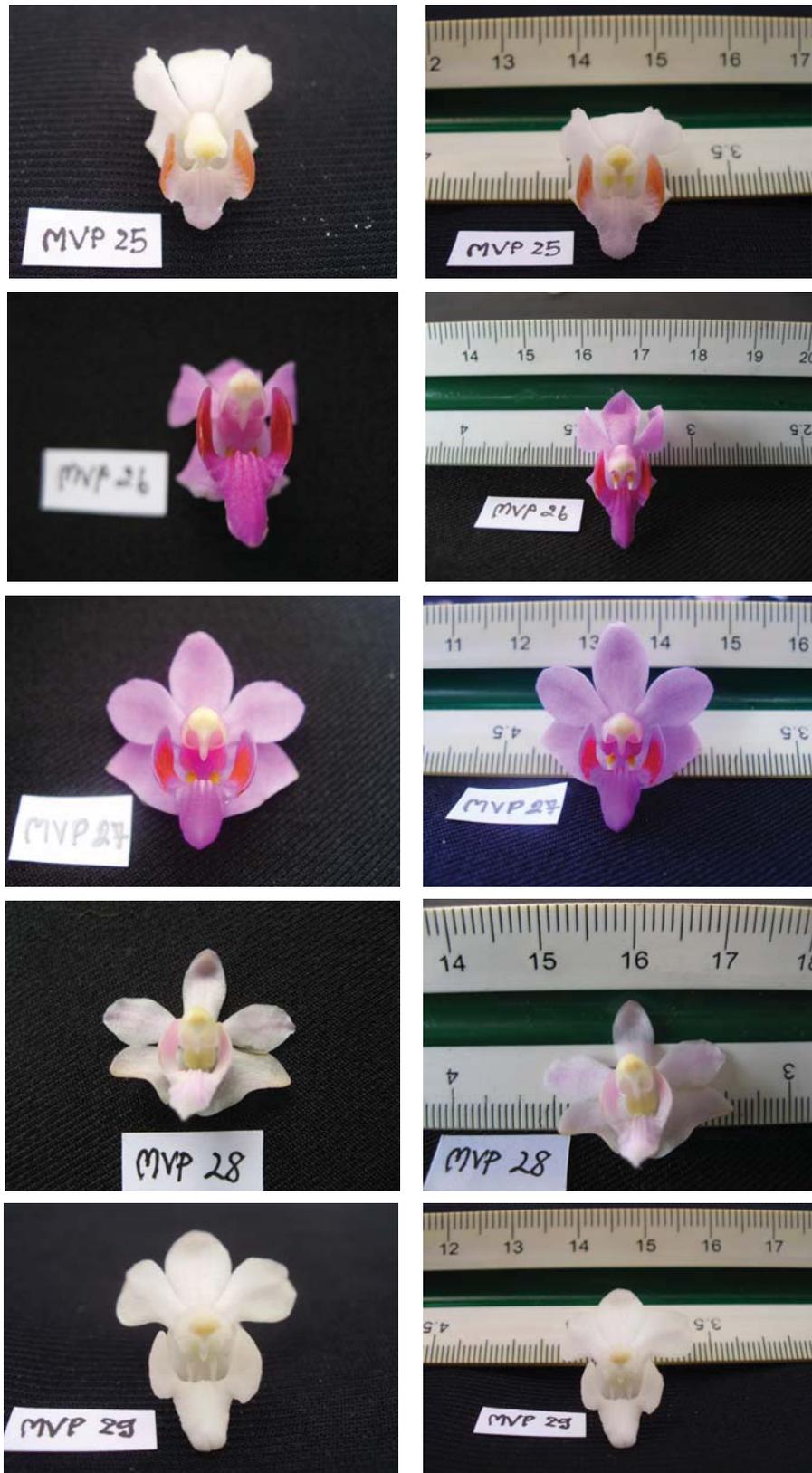
ภาพที่ 56 ดอกกล้วยไม้มาวีจิ่ง รหัส MVP4, 5, 7, 8 และ 9



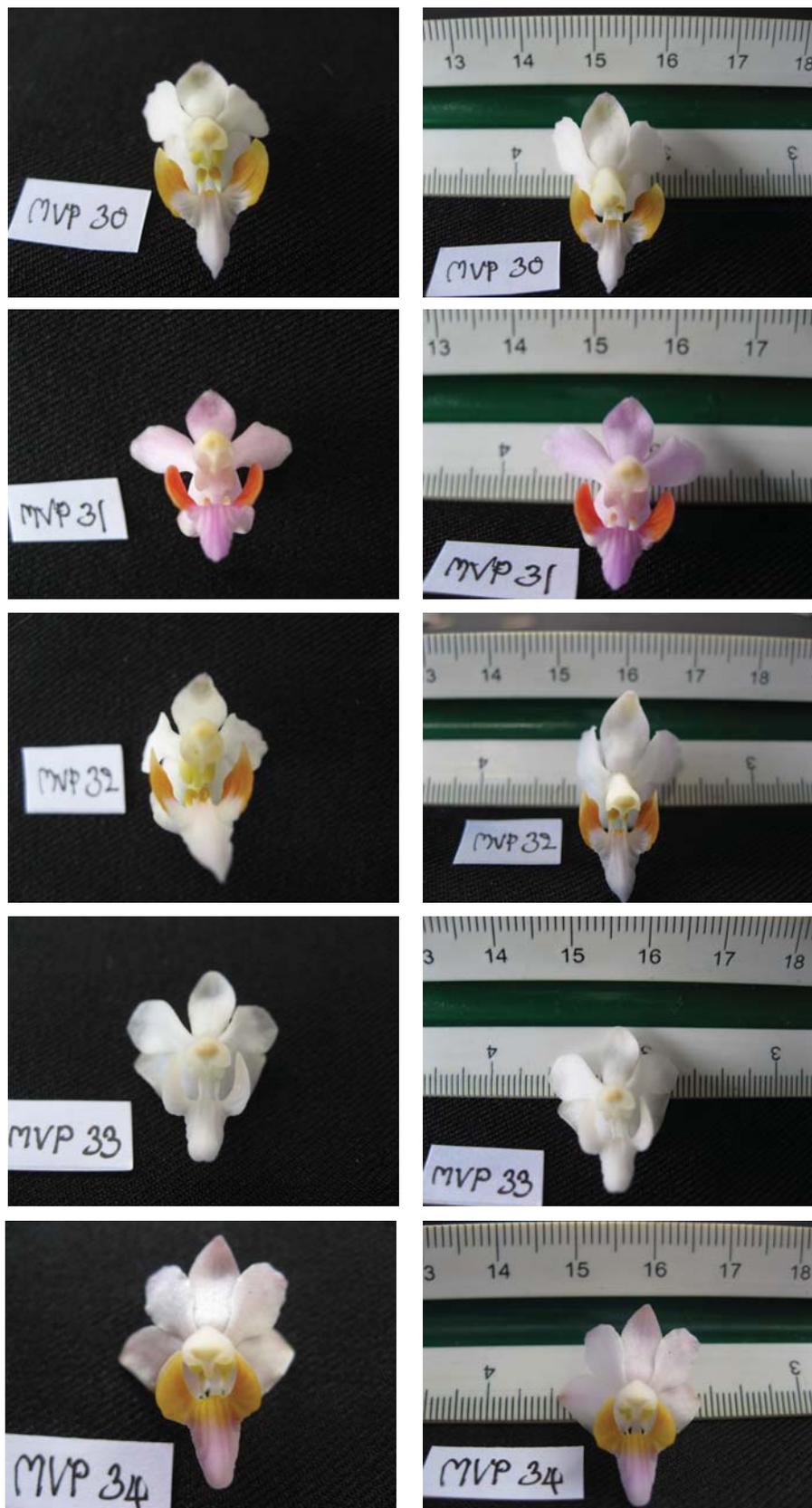
ภาพที่ 57 ดอกกล้วยไม้มาวีจ รหัส MVP10 – MVP14



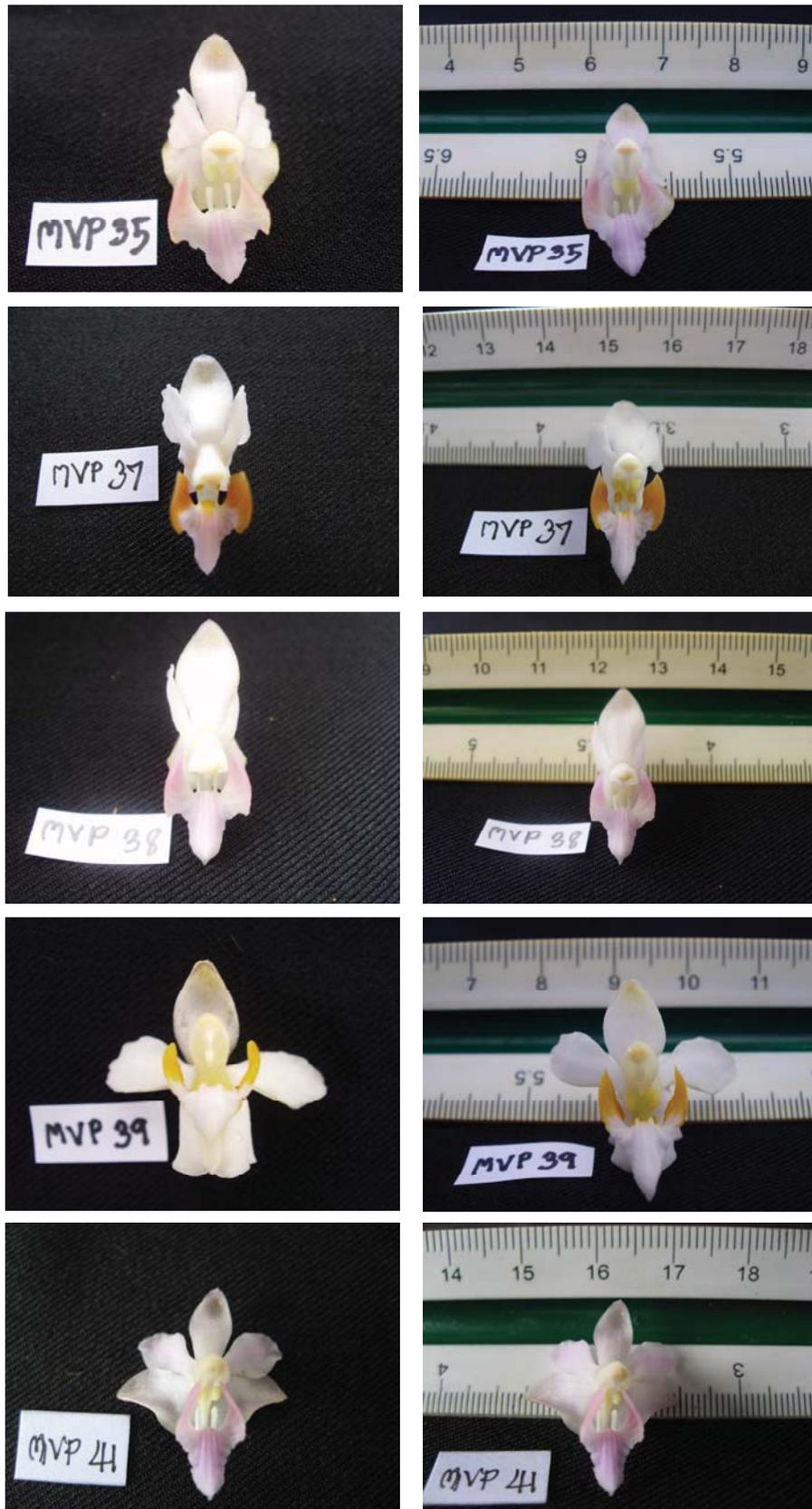
ภาพที่ 58 ดอกกล้วยไม้ม้าวีง รหัส MVP16, 17, 18, 21 และ 23



ภาพที่ 59 ดอกกล้วยไม้ม้าวิ่ง รหัส MVP25 - MVP29



ภาพที่ 60 ดอกกล้วยไม้ม้าวิ่ง รหัส MVP30 – MVP34



ภาพที่ 61 ดอกกล้วยไม้มาวี่ง รหัส MVP35, 37, 38, 39 และ 41



ภาพที่ 62 ดอกกล้วยไม้มาวี่ง รหัส MVP42 – MVP43

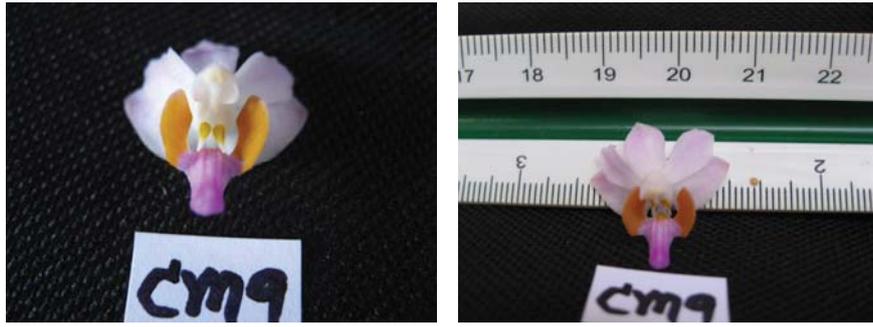
1.2 ตลาดช่องเม็ก อ.โขงเจียม (รหัส cm 9)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดเล็ก ใบมีหลายแบบ เช่น ใบเขี้ยวจุดและขอบสีน้ำตาล ใบเขี้ยวกว้างกลม (ภาพที่ 63)



ภาพที่ 63 ลักษณะต้นกล้วยไม้มาวี่ง รหัส cm9

ลักษณะดอก ดอกมีขนาดเล็ก กลีบดอกมีสีขาว ปากมีสีม่วง สี Side lobe บนปาก มีสีเหลือง เหลืองส้ม (ภาพที่ 64)



ภาพที่ 64 ดอกกล้วยไม้ม้าวิ่ง รหัส cm9

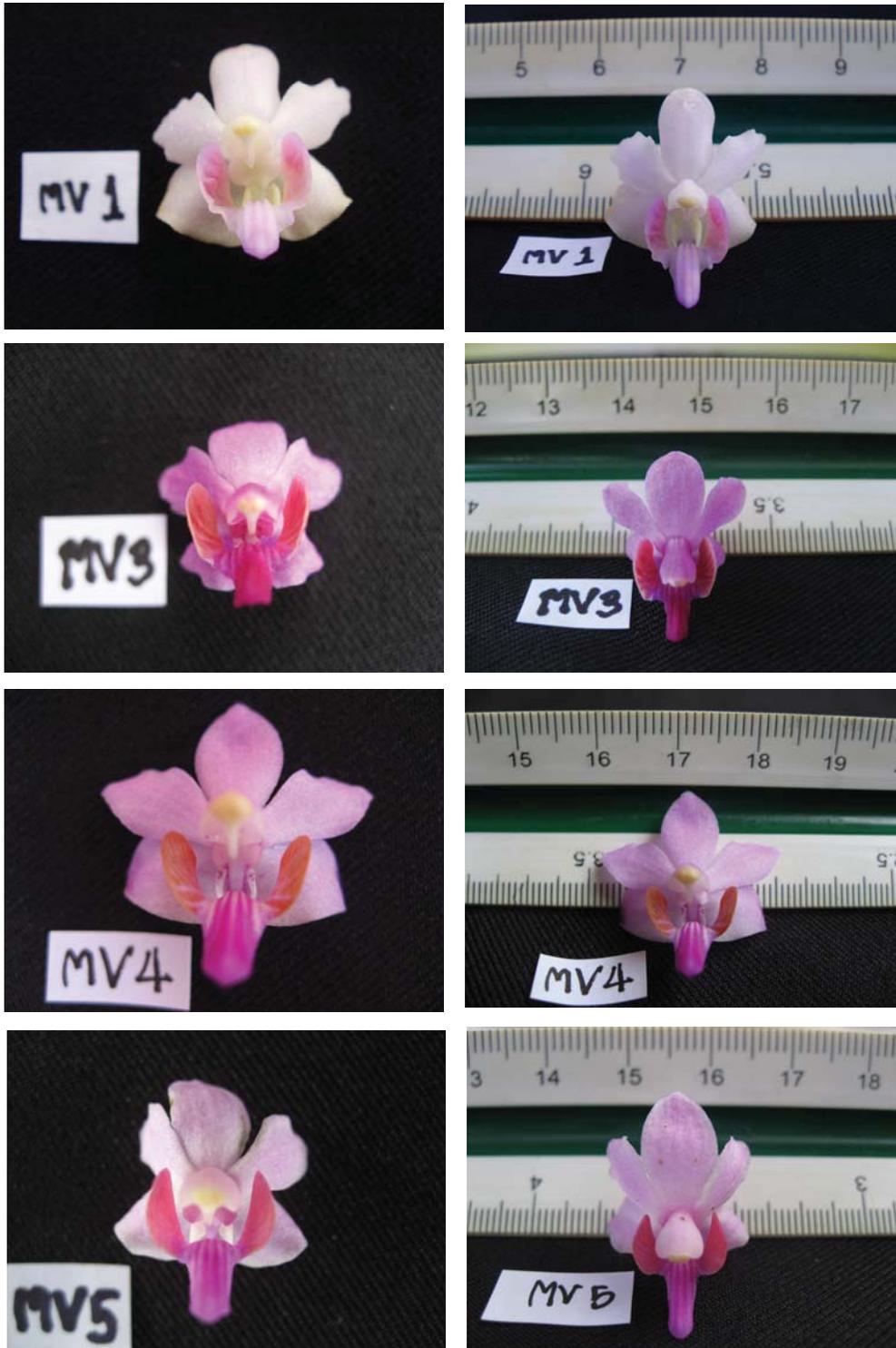
1.3 แม่รำพึง ตลาดช่องเม็ก ชายแดนไทย-ลาว อ.โขงเจียม (รหัส MV1-9)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ปลายใบกลม ลักษณะใบมีหลายแบบ เช่น ใบเขียวกลมสั้น ใบเขียวขอบน้ำตาลแดง ใบเขียวจุดน้ำตาลกว้างกลม (ภาพที่ 65)

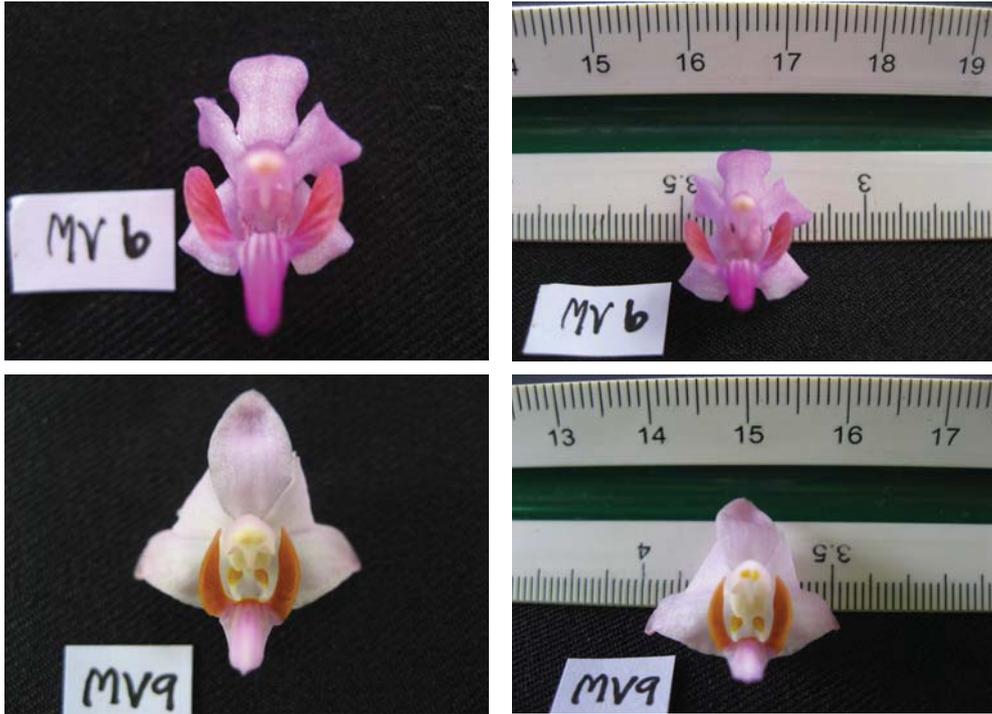


ภาพที่ 65 ลักษณะต้นกล้วยไม้ม้าวิ่ง รหัส MV1- MV9

ลักษณะดอก ขนาดเล็ก มีความแปรปรวนมาก สีดอกมีตั้งแต่สีขาว - ม่วง ปากมีสีเข้มกว่ากลีบ
 ดอก สี Side lobe บนปาก มีสีเหลือง เหลืองส้ม ม่วง แดง (ภาพที่ 66 และ 67)



ภาพที่ 66 ดอกกล้วยไม้มาวี้ง รหัส MV1, 3, 4 และ 5



ภาพที่ 67 ดอกกล้วยไม้มาวี่ง รหัส MV6 และ MV9

2. จังหวัดมุกดาหาร พบที่

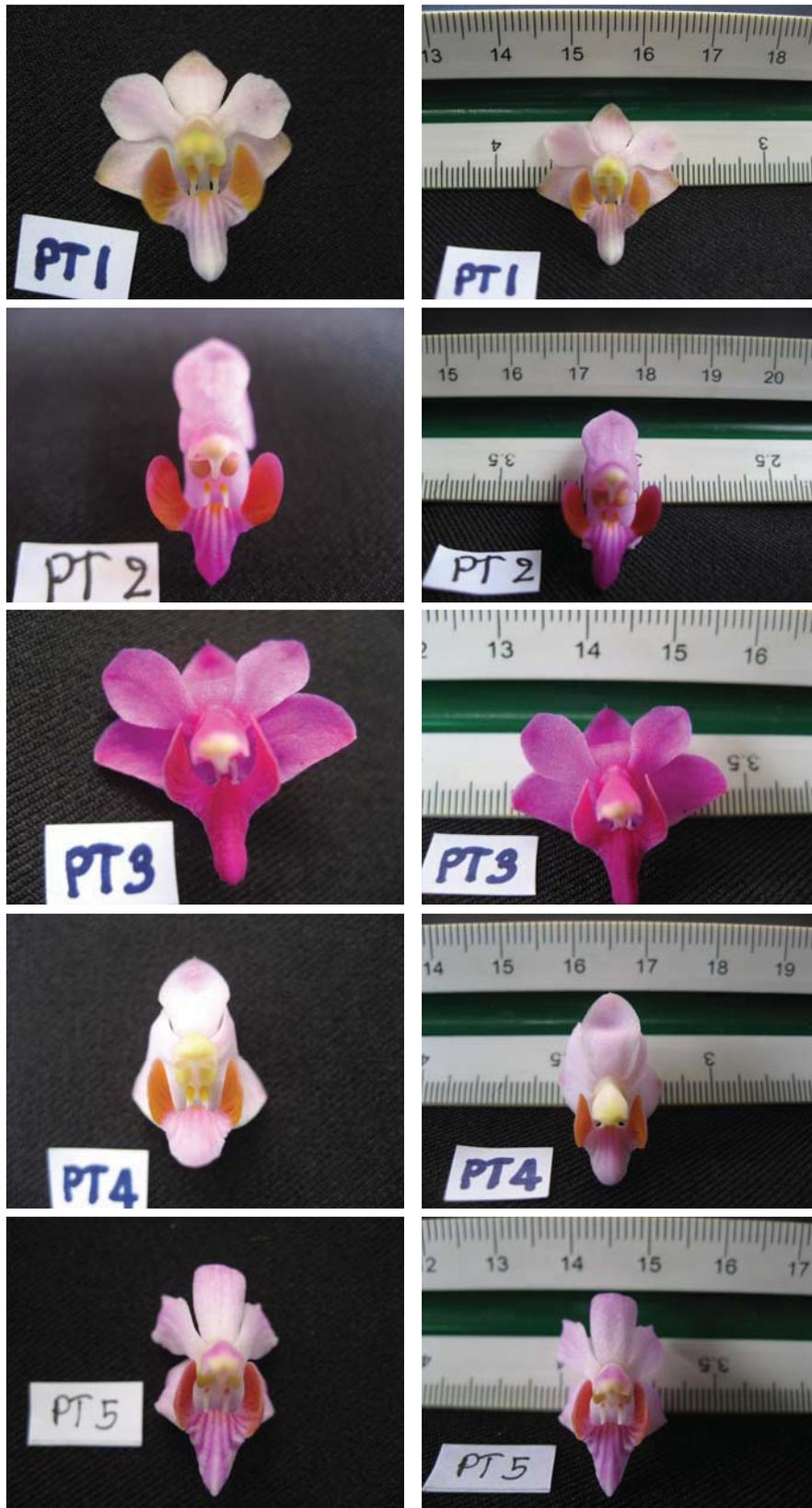
2.1 ภูเขาเทิบ อำเภอเมืองและอำเภอดอนตาล (รหัส PT 1-6)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ปลายใบแหลม สีใบมีหลายลักษณะ เช่น ใบเขียวยาว ใบเขียวจุดน้ำตาลเรียวยาว ใบแดง (ภาพที่ 68)



ภาพที่ 68 ลักษณะต้นกล้วยไม้มาวี่ง รหัส PT1 - PT6

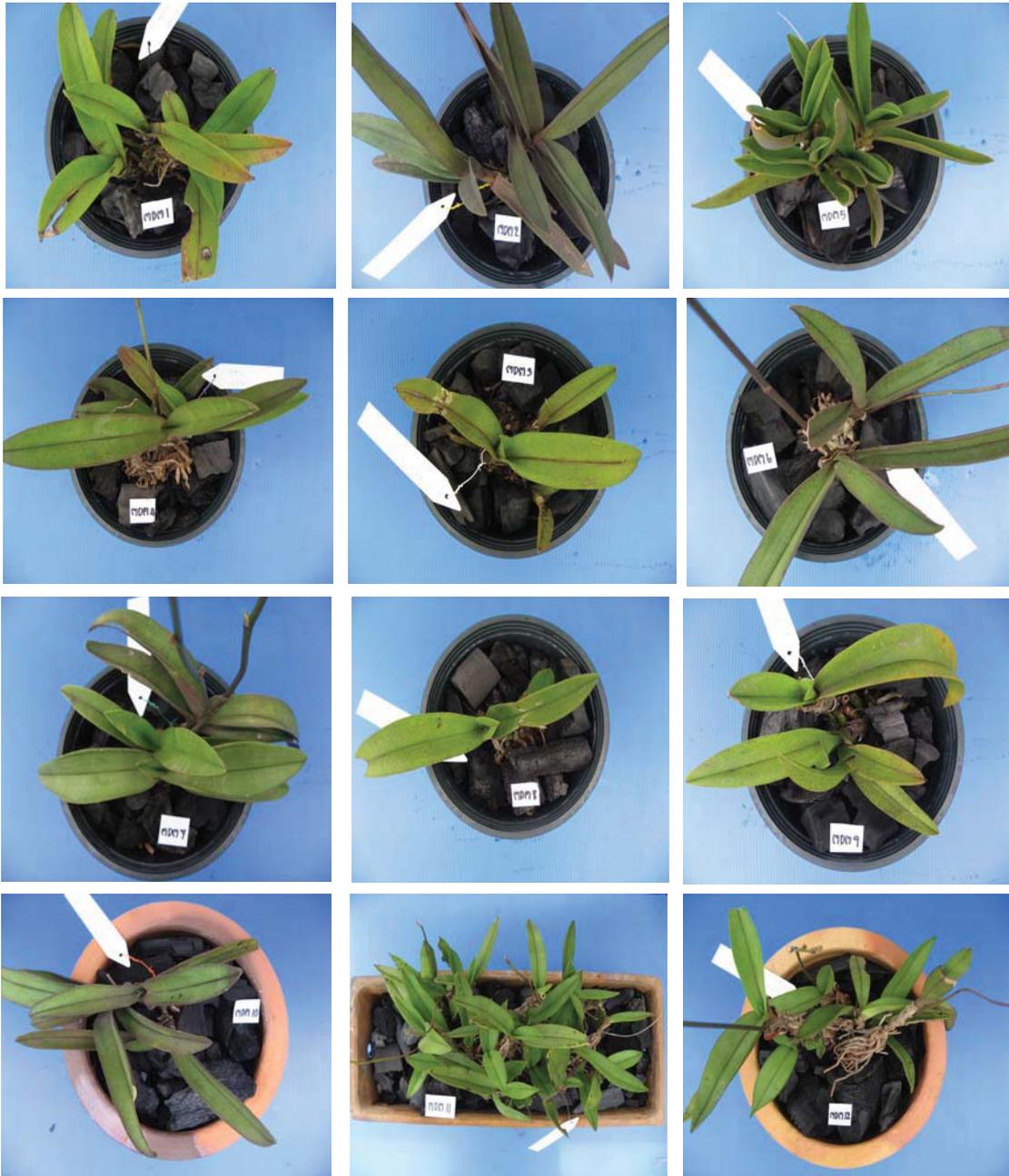
ลักษณะดอก มีขนาดเล็ก สีของดอกมีความแปรปรวน สีดอกมีตั้งแต่สีขาว - ม่วงเข้ม ปากมีสีเข้มกว่ากลีบดอก สี Side lobe บนปาก มีสีเหลือง เหลืองส้ม ม่วง และสีแดง (ภาพที่ 69)



ภาพที่ 69 ดอกกล้วยไม้มาวียง รหัส PT1 - PT5

2.2 ตลาดอินโดจีน (จากประเทศลาว) (รหัส MDM)

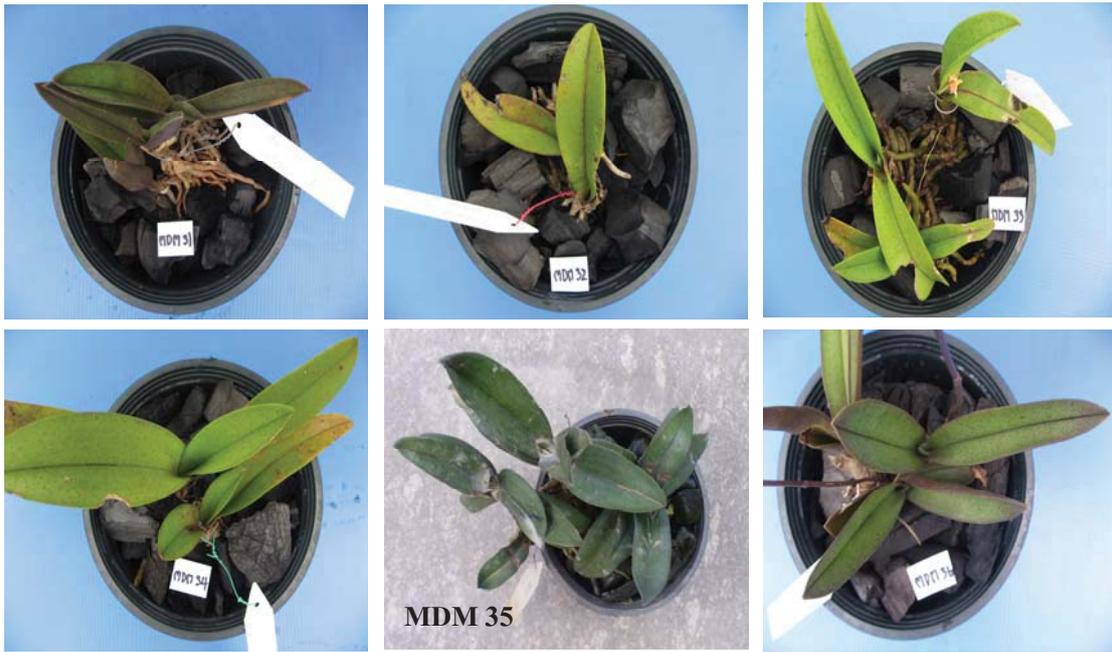
ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ใบมีขนาดเล็ก ปลายใบแหลม ลักษณะใบมีหลายแบบ เช่น ใบเขียวเรียวยาว ใบเขียวขอบน้ำตาลแดง ใบเขียวจุดน้ำตาลกว้างกลม ใบเขียวจุดน้ำตาลเรียวยาว (ภาพที่ 70 71 และ 72)



ภาพที่ 70 ลักษณะต้นกล้วยไม้มีาวัง รหัส MDM1 – MDM12

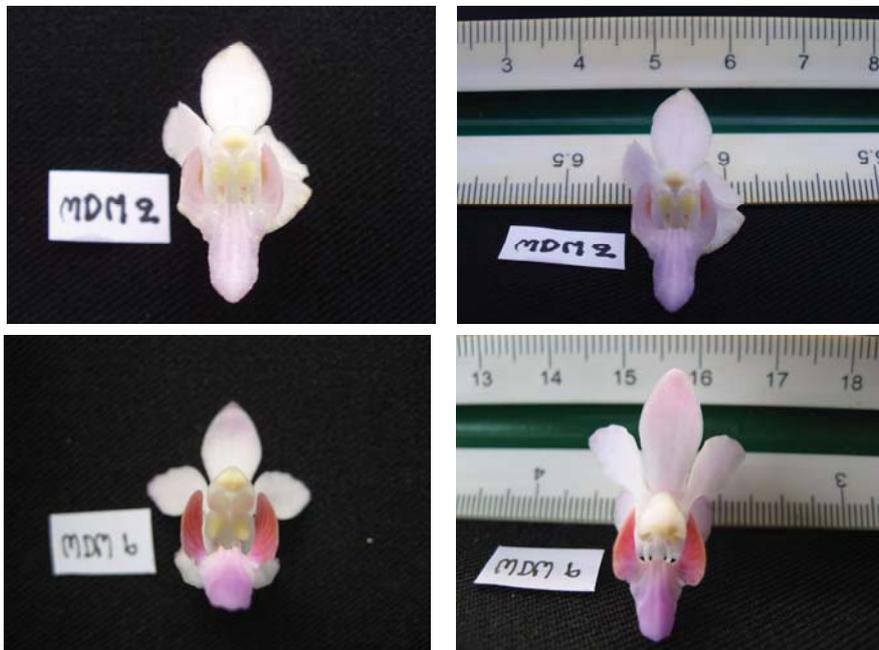


ภาพที่ 71 ลักษณะต้นกล้วยไม้มีาวีง รหัส MDM14 – MDM25 และ MDM28 – MDM30



ภาพที่ 72 ลักษณะต้นกล้วยไม้มาว้าง รหัส MDM31 – MDM36

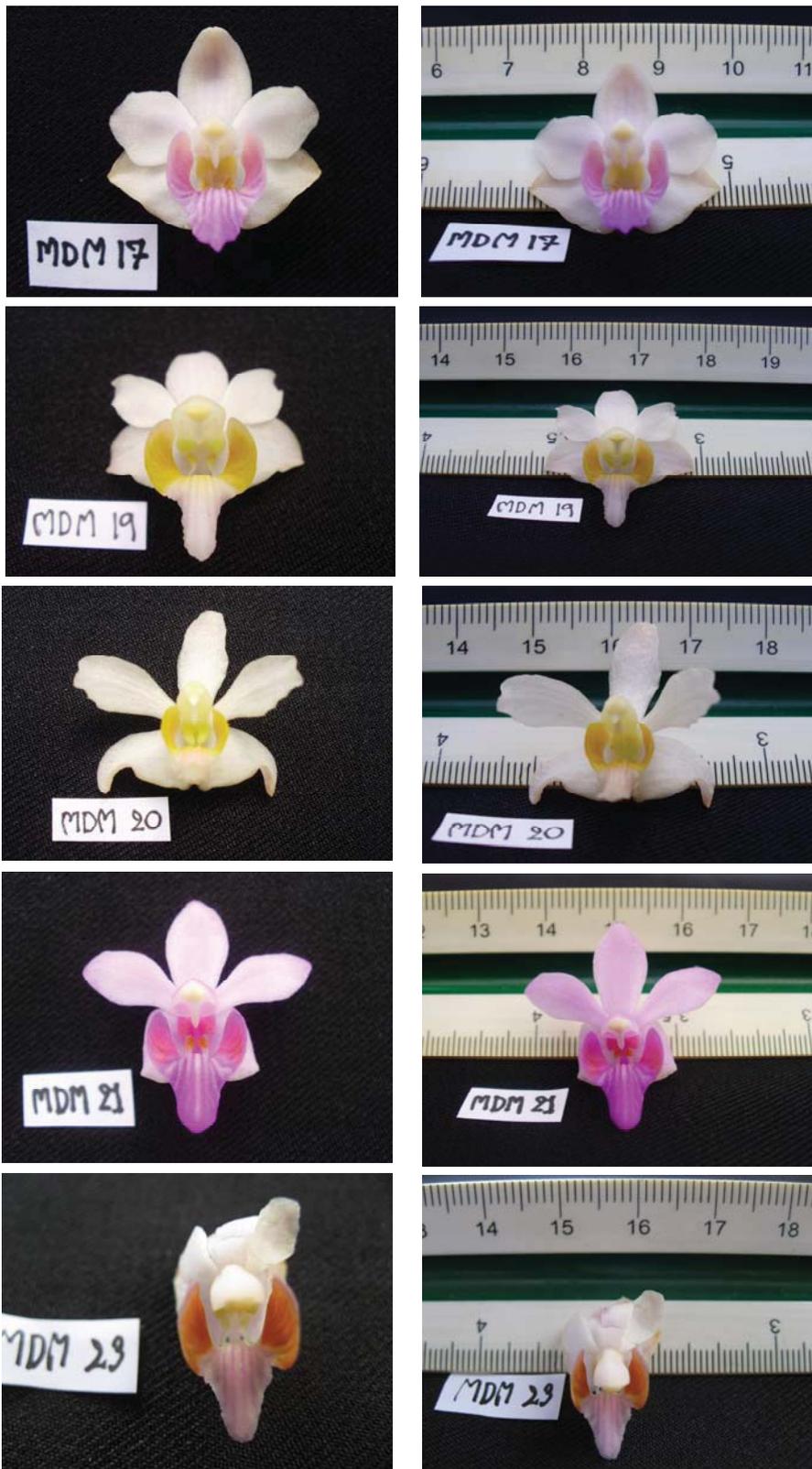
ลักษณะดอก มีขนาดเล็ก สีของดอกมีความแปรปรวน สีดอกมีตั้งแต่สีขาว – ม่วงเข้ม ปากมีสีเข้มกว่ากลีบดอก สี Side lobe บนปาก มีสีเหลือง เหลืองส้ม ม่วง ชมพู แดง (ภาพที่ 73 - 76)



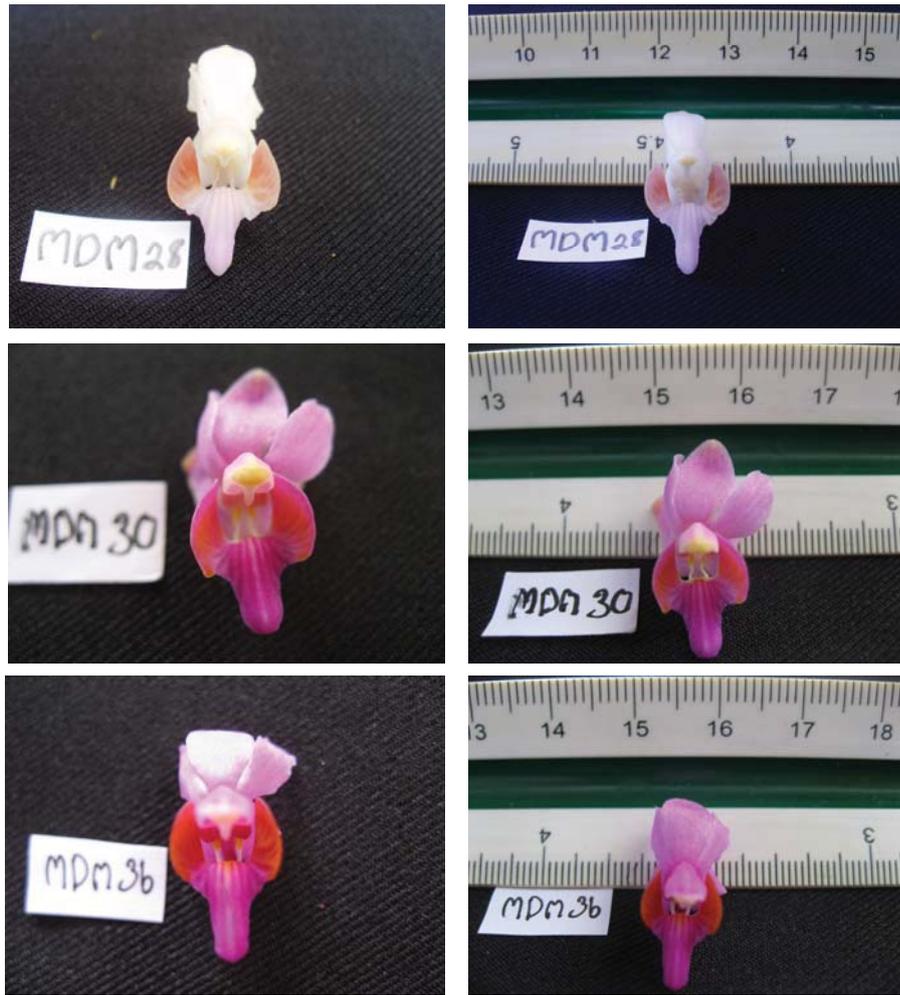
ภาพที่ 73 ดอกกล้วยไม้มาว้าง รหัส MDM2 และ MDM6



ภาพที่ 74 ดอกกล้วยไม้มาวี้ง รหัส MDM7, 10, 12, 14 และ 16



ภาพที่ 75 ดอกกล้วยไม้ม้าวิ่ง รหัส MDM17, 19, 20, 21 และ 23



ภาพที่ 76 ดอกกล้วยไม้มาวียง รหัส MDM28, 30 และ 36

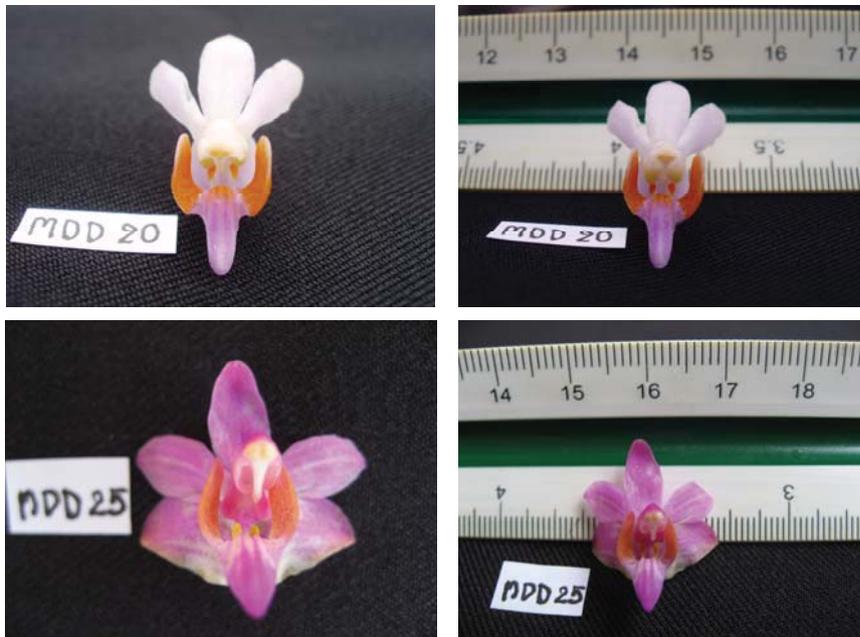
2.3 ตลาดอินโดจีน (จากประเทศลาว) (รหัส MDD)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ใบมีขนาดใหญ่ ลักษณะใบมีหลายแบบ เช่น ใบเตี้ยยาว ใบเตี้ยกลมสั้น ใบเตี้ยขอบน้ำตาลแดง ใบเตี้ยจุดน้ำตาลกว้างกลม ใบเตี้ยจุดน้ำตาลเรียวยาว ใบแดงยาว (ภาพที่ 77)



ภาพที่ 77 ลักษณะต้นกล้วยไม้มาว้าง รหัส MDD1, 8, 17, 18, 20, 25 และ 26

ลักษณะดอก ดอกมีสีม่วง ปากมีสีเข้มกว่ากลีบดอก สี Side lobe บนปาก มีสีเหลืองส้ม (ภาพที่ 78)



ภาพที่ 78 ดอกกล้วยไม้มาวี่ง รหัส MDD20 และ MDD25

3. จังหวัดร้อยเอ็ด พบที่

3.1 อำเภอหนองพอก (รหัส RE2)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นขนาดสั้น ใบมีลักษณะสีเขียวเรียวยาว (ภาพที่ 79)



ภาพที่ 79 ลักษณะต้นกล้วยไม้มาวี่ง รหัส RE2

ลักษณะดอก ดอกมีขนาดเล็ก มีสีขาว ปากมีสีเข้มกว่ากลีบดอก สี Side lobe บนปากมีสี เหมือนกับกลีบดอก (ภาพที่ 80)



ภาพที่ 80 ดอกกล้วยไม้ม้าวิ่ง รหัส RE2

3.2 ซึ้อจากชาวบ้าน (รหัส RO1-RO10)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ขนาดสั้น ใบมีลักษณะเรียวยาวเล็ก สีเขียวจุดและขอบน้ำตาลแดง ใบแดงยาว (ภาพที่ 81 และ 82)



ภาพที่ 81 ลักษณะต้นกล้วยไม้ม้าวิ่ง รหัส RO1-RO6



ภาพที่ 82 ลักษณะต้นกล้วยไม้ม้าวิ่ง รหัส R07-R010

4. จังหวัดเลย พบที่

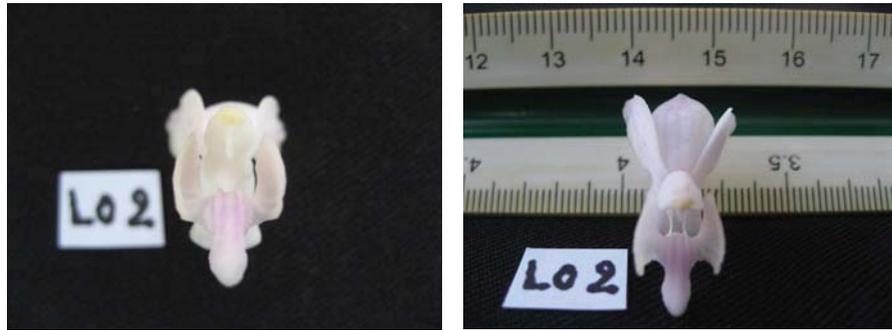
4.1 ผานกเค้า อำเภอกู่กระดิ่ง (รหัส LO 2)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ใบมีสีเขียวเรียวยาว ใบแดงยาว (ภาพที่ 83)



ภาพที่ 83 ลักษณะต้นกล้วยไม้ม้าวิ่ง รหัส LO 2

ลักษณะดอกมีขนาดเล็ก สีดอกมีสีขาว กลีบดอกมีลักษณะดูไปด้านหลัง ปากมีสีเข้มกว่ากลีบดอก มีลายเส้นบนปาก สี Side lobe บนปาก มีสีขาวเหมือนกลีบดอก (ภาพที่ 84)



ภาพที่ 84 ดอกกล้วยไม้มาวี่ง รหัส LO 2

5. จังหวัดกาฬสินธุ์ พบที่

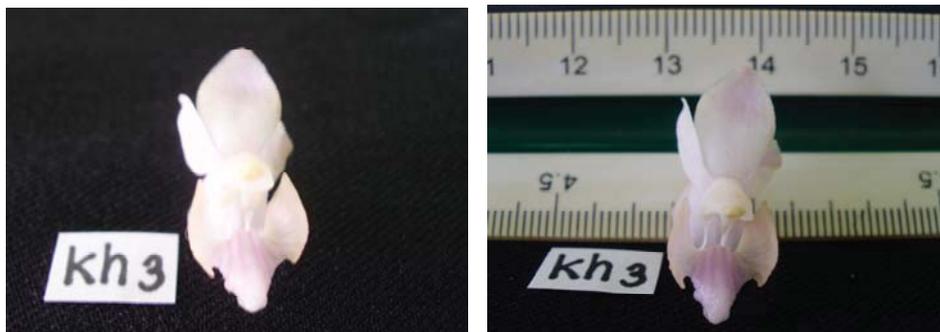
5.1 ตำบลโพน อำเภอคำม่วง (รหัส Kh3)

ลักษณะลำต้นและใบ ลำต้นตั้งตรง ใบมีสีเขียวเรียวเล็ก ใบมีสีเขียวจุดและขอบสีน้ำตาล (ภาพที่ 85)



ภาพที่ 85 ลักษณะต้นกล้วยไม้มาวี่ง รหัส Kh3

ลักษณะดอกมีขนาดเล็ก สีดอกมีสีขาว กลีบดอกมีลักษณะดูไปด้านหลัง ปากมีสีเข้มกว่ากลีบดอก มีลายเส้นบนปาก สี Side lobe บนปาก มีสีขาวเหมือนกลีบดอก (ภาพที่ 86)



ภาพที่ 86 ดอกกล้วยไม้มาวี่ง รหัส Kh3

จากการสำรวจกล้วยไม้สกุลม้าวีงในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กล้วยไม้แดงอุบลพบใน จังหวัดอุบลราชธานี (อ.บุญศรี อ.ช่องเม็ก อ.กุดข้าวปุ้น อ.เขื่องใน) จังหวัดร้อยเอ็ด (อ.โพนทอง) จังหวัดสกลนคร (อ.เต่างอย อ.ภูพาน) จังหวัดเลย (อ.ภูกระดึง) จังหวัดกาฬสินธุ์ (อ.สหัสขันธ์ อ.คำม่วง) จังหวัดศรีสะเกษ (อ.ขุนหาญ) จังหวัดมุกดาหาร (อ.คำชะอี) และประเทศลาว กล้วยไม้ม้าวีง พบในจังหวัดอุบลราชธานี (อ.โพธิ์ไทร อ.ช่องเม็ก) จังหวัดร้อยเอ็ด (อ.หนองพอก) จังหวัดเลย (อ.ภูกระดึง) จังหวัดกาฬสินธุ์ (อ.คำม่วง) จังหวัดมุกดาหาร (อ.เมือง อ.ดอนตาล) และประเทศลาว แหล่งที่พบกล้วยไม้แดงอุบลตามธรรมชาติจะไม่พบกล้วยไม้ม้าวีง ซึ่งกล้วยไม้ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีแหล่งการกระจายพันธุ์ที่แยกออกจากกัน ความแตกต่างระหว่างลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบลและต้นกล้วยไม้ มีความแตกต่างกันในด้านขนาดของใบและต้น โดยต้นกล้วยไม้แดงอุบลส่วนใหญ่เมื่อต้นสมบูรณ์เต็มที่พร้อมออกดอก จะมีขนาดของใบและลำต้นใหญ่กว่าต้นกล้วยไม้ม้าวีง ช่อดอกและดอกกล้วยไม้แดงอุบลมีขนาดใหญ่กว่ากล้วยไม้ม้าวีง และกล้วยไม้ม้าวีงส่วนใหญ่กลีบดอกและกลีบเลี้ยงจะลุ่ไปด้านหลัง สีของดอกกล้วยไม้ม้าวีงมีสีขาว-ม่วง สีดอกกล้วยไม้แดงอุบลมีสีชมพูอ่อน-ชมพูม่วง ทั้งสองชนิดมีส่วน side lobe ที่มีสีแตกต่างจากกลีบดอกและกลีบเลี้ยง จากขนาดของใบ ต้น และดอกกล้วยไม้แดงอุบลที่มีขนาดใหญ่กว่ากล้วยไม้ม้าวีงมีความสอดคล้องกับการศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ทั้งสองสายพันธุ์ โดยกล้วยไม้แดงอุบลมีจำนวนโครโมโซม $2n = 4x = 76$ ส่วนกล้วยไม้ม้าวีงมีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 38$ ซึ่งกล้วยไม้แดงอุบลมีจำนวนโครโมโซมเป็น 2 เท่าของกล้วยไม้ม้าวีง จึงทำให้กล้วยไม้แดงอุบลมีขนาดของใบ ต้น และดอกใหญ่กว่ากล้วยไม้ม้าวีง

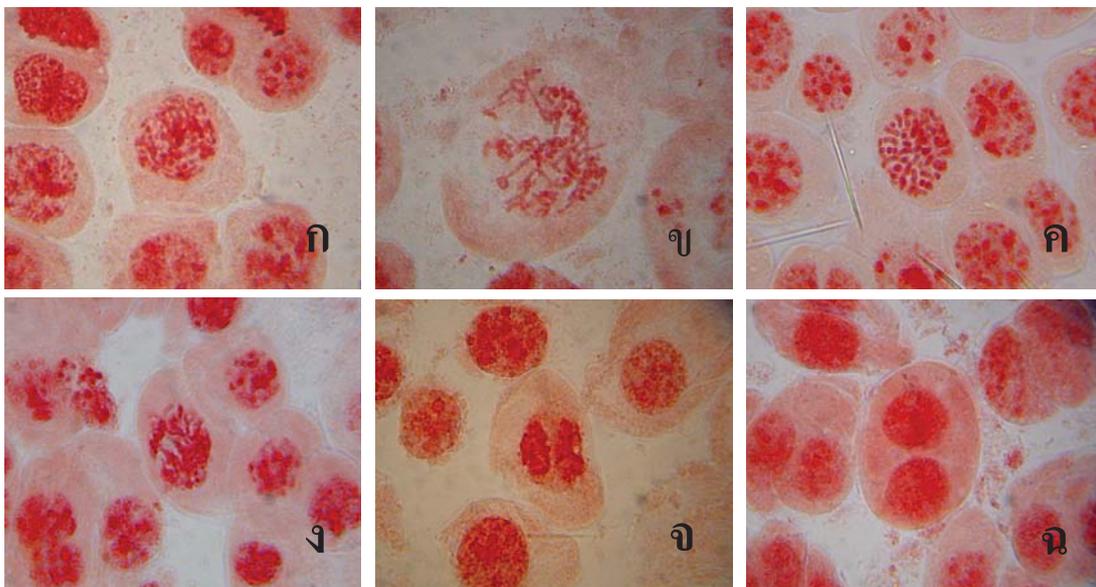
2. การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิง

2.1 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิงในสภาพปลอดเชื้อ

การศึกษาเทคนิคในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้สกุลม้าวิงเพื่อศึกษาโครโมโซมครั้งนี้จะทำการศึกษา โดยการแบ่งระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างและความยาวนานในการหยุดวงซีพีเซลล์ที่แตกต่างกัน เพื่อได้วิธีที่เหมาะสมที่สุดในการปฏิบัติ ผลการทดลองมีดังนี้

2.1.1 ช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดตั้งแต่ 7.00 น. ถึง 12.00 น.

การเก็บตัวอย่างปลายรากในช่วงเวลา 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 11.00, และ 12.00 น. แล้วนำแต่ละวิธีไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากเพื่อศึกษาโครโมโซมนั้น พบว่าการเก็บปลายรากที่เวลา 7.00 ได้เซลล์ปลายรากที่อยู่ในระยะโพรเฟส การเก็บปลายรากที่เวลา 8.00 น. นั้นได้เซลล์ปลายรากที่อยู่ในระยะเริ่มต้นของเมตาเฟส โครโมโซมมีการหดตัวเล็กน้อย แท่งโครโมโซมมีลักษณะบางและยาว ส่วนการเก็บปลายรากในช่วงเวลา 9.00 น. ได้เซลล์ที่มีโครโมโซมหดตัวสั้นเป็นแท่งเห็นได้ชัดเจนสามารถตรวจนับจำนวนของโครโมโซมได้ แต่เซลล์ที่อยู่ในระยะนี้ยังมีจำนวนไม่มากนัก ที่ช่วงเวลา 10.00 น. ภายในเซลล์เริ่มมีการแยกตัวของโครโมโซมไปที่ขั้วเซลล์ทั้งสองด้าน และการเก็บที่เวลา 11.00 น. ได้เซลล์ที่มีโครโมโซมหดตัวสั้นแต่มีจำนวนน้อยมาก เซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะแอนาเฟสคือมีการแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่มที่ขั้วเซลล์ทั้งสองด้าน การเก็บปลายรากที่เวลา 12.00 น. พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะเทโลเฟส เริ่มมีการสร้างผนังเซลล์กั้นระหว่างเซลล์ทำให้สามารถมองเห็นได้ชัดเจนว่าแยกเป็น 2 เซลล์ (ภาพที่ 87)

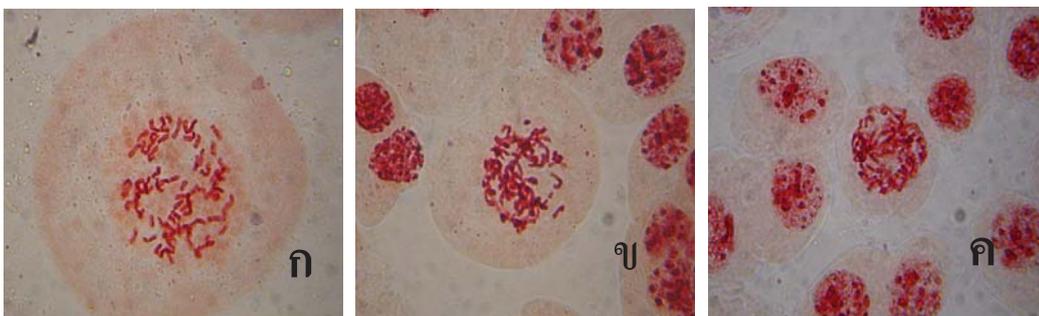


ภาพที่ 87 ลักษณะการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อปลายรากที่เวลาต่างๆ

- (ก) เวลา 7.00 น.โครโมโซมอยู่ในระยะ prophase
- (ข) เวลา 8.00 น.โครโมโซมอยู่ในระยะ early metaphase
- (ค) เวลา 9.00 น.โครโมโซมอยู่ในระยะ metaphase
- (ง) เวลา 10.00 น.โครโมโซมอยู่ในระยะ early anaphase
- (จ) เวลา 11.00 น.โครโมโซมอยู่ในระยะ anaphase
- (ฉ) เวลา 12.00 น. โครโมโซมอยู่ในระยะ telophase

2.1.2. ช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดระหว่าง 9.00 น. ถึง 10.00 น.

การทดลองนี้เป็นการทดลองที่สืบเนื่องมาจากข้อ 1 โดยเก็บตัวอย่างปลาซากที่เวลา 9.15, 9.30 และ 9.45 น. ผลการทดลองปรากฏว่าที่เวลา 9.15 น. พบเซลล์ที่อยู่ในระยะเมตาเฟสจำนวนมาก รูปร่างของโครโมโซมมีลักษณะเป็นแท่งหดสั้นเห็นได้ชัดเจน สามารถตรวจนับจำนวนโครโมโซมได้ ส่วนที่เวลา 9.30 น. เซลล์ที่พบส่วนใหญ่มีลักษณะหดสั้น แต่ไม่มีการกระจายตัวรวมเป็นกระจุกเห็นโครโมโซมไม่ชัดเจน และที่เวลา 9.45 น. โครโมโซมมีลักษณะหดตัวสั้น เซลล์ส่วนใหญ่เริ่มเข้าสู่ระยะแอนาเฟส เริ่มมีการดึงโครโมโซมไปที่ขั้วเซลล์ของด้านตรงข้าม (ภาพที่ 88) การหาเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างซากของกล้วยไม้มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากจะได้เซลล์ของพืชที่นิวเคลียสมีการแบ่งตัวอย่างอยู่ในระยะเมตาเฟสเป็นจำนวนมาก ทำให้ง่ายต่อการศึกษาโครโมโซม ในกล้วยไม้แต่ละชนิดมีเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างซากที่แตกต่างกัน เช่น กล้วยไม้ดินช้างผสมโขง ควรเก็บปลาซากเวลา 11.00 น. (จารุภัทร และฉันทนา, 2549) กุหลาบเหลืองโคราชและช้างสารภี ควรเก็บตัวอย่างซากเวลา 8.30-9.00 น. (Rungruchkanont, 1996)

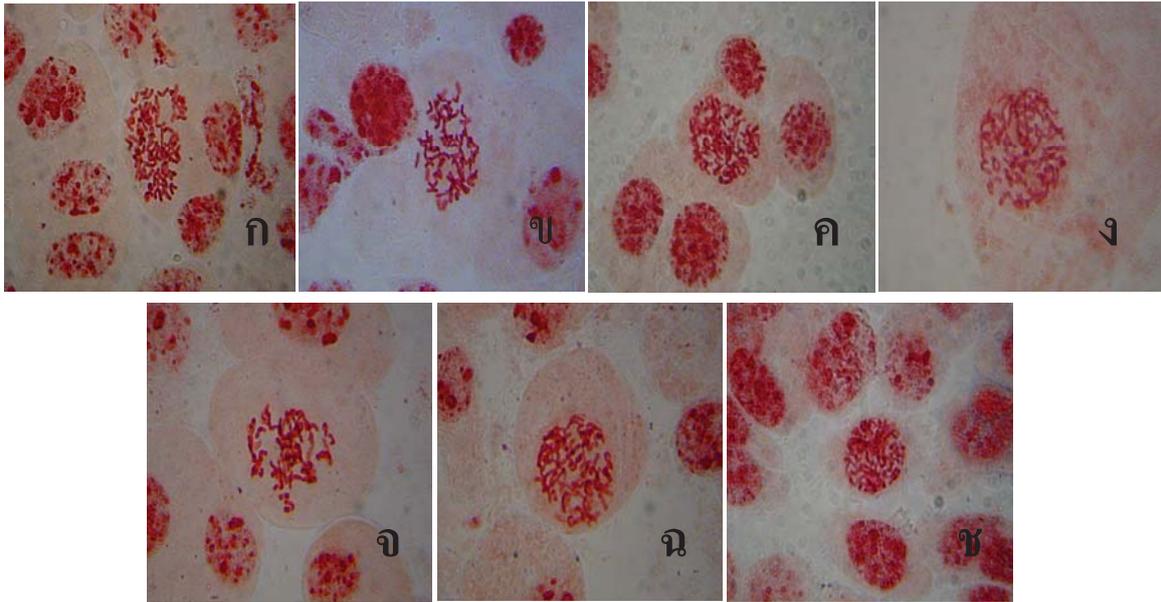


ภาพที่ 88 ลักษณะการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อปลาซากที่เวลา 9.00 น. ถึง เวลา 10.00 น.

- (ก) เวลา 9.15 น. โครโมโซมส่วนใหญ่อยู่ในระยะ metaphase มีรูปร่างเป็นแท่งเห็นชัดเจน
- (ข) เวลา 9.30 น. โครโมโซมมีรูปร่างเป็นแท่งแต่ไม่มีการกระจายตัว
- (ค) เวลา 9.45 น. โครโมโซมเริ่มเข้าสู่ระยะ early anaphase

2.1.3 ความยาวนานที่เหมาะสมในการหยุดวงชีพเซลล์

การทดลองหยุดวงชีพเซลล์ในสารละลาย 8- hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส นาน 1, 2, 3, 4, 5, 6, และ 7 ชั่วโมง โดยใช้ปลาซากที่เก็บเวลา 9.15 น. พบว่าให้ผลที่ไม่แตกต่างกันคือ ภายในเซลล์มีโครโมโซมที่หดตัวสั้น เห็นรูปร่างของโครโมโซมได้ชัดเจน (ภาพที่ 89) ดังนั้นจึงเป็นวิธีการที่ดีที่ช่วยลดเวลาในการเตรียมเนื้อเยื่อปลาซากโดยที่ไม่ต้องใช้เวลาในการหยุดวงชีพเซลล์เป็นเวลานานก็สามารถเห็นโครโมโซมชัดเจนและตรวจนับจำนวนได้ ถ้าทำการเก็บตัวอย่างซากในเวลาที่เหมาะสม ซึ่งตามวิธีการมาตรฐานของ Tanaka และ Kamemoto (1984) ใช้เวลาขั้นตอนนี้นาน 3-5 ชั่วโมง



ภาพที่ 89 การหยุดขวางซีพเซลล์ในสารละลาย 8- hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M ที่เวลาต่างกัน

(ก) แซ่ 1 ชั่วโมง, (ข) แซ่ 2 ชั่วโมง, (ค) แซ่ 3 ชั่วโมง, (ง) แซ่ 4 ชั่วโมง, (จ) แซ่ 5 ชั่วโมง, (ฉ) แซ่ 6 ชั่วโมง และ (ซ) แซ่ 7 ชั่วโมง

2.2 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิงในสภาพแปลง

การเก็บตัวอย่างปลายรากที่อยู่ในสภาพแปลงนั้น จะทำการเก็บตัวอย่างปลายรากทั้ง 3 สายพันธุ์คือ แดงอุบล ม้าวิง และม้าบิน พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการเก็บหรือเวลาที่สามารถพบเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในระยะ metaphase ของทั้งสองสายพันธุ์จะแตกต่างกันคือ แดงอุบล จะมีเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างที่เวลา 9.30 น. ซึ่งเวลาที่เหมาะสมนี้จะช้ากว่าการเก็บตัวอย่างที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ ส่วนสายพันธุ์ม้าวิง เวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างคือ เวลา 9.45 น. สายพันธุ์ม้าบินไม่ได้ทำการเก็บตัวอย่างในสภาพแปลงเนื่องจากต้นแม่เกิดโรคเน่า จึงศึกษาโครโมโซมปลายรากจากต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ และจากการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่า แดงอุบล มีจำนวนโครโมโซม $2n = 76$ ส่วนม้าวิงและม้าบิน มีจำนวนโครโมโซม $2n = 38$ ตามลำดับ (ภาพที่ 90)



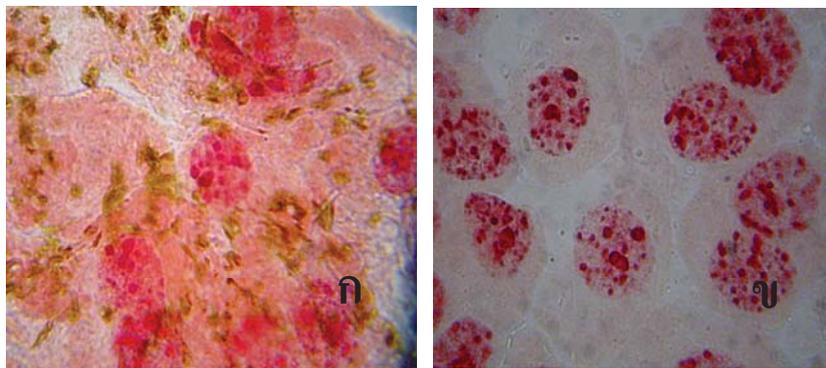
ภาพที่ 90 จำนวนโครโมโซมจากปลายรากของกล้วยไม้สกุลม้าวิง

(ก) จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้แดงอุบล $2n = 76$
 (ข) จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิง $2n = 38$
 (ค) จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบิน $2n = 38$

2.3 การใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์เพื่อศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลมาวี่ง

2.3.1. ศึกษาชนิดน้ำยาในการตรึงเซลล์ (fixative) และระยะเวลาการแช่ enzyme solution

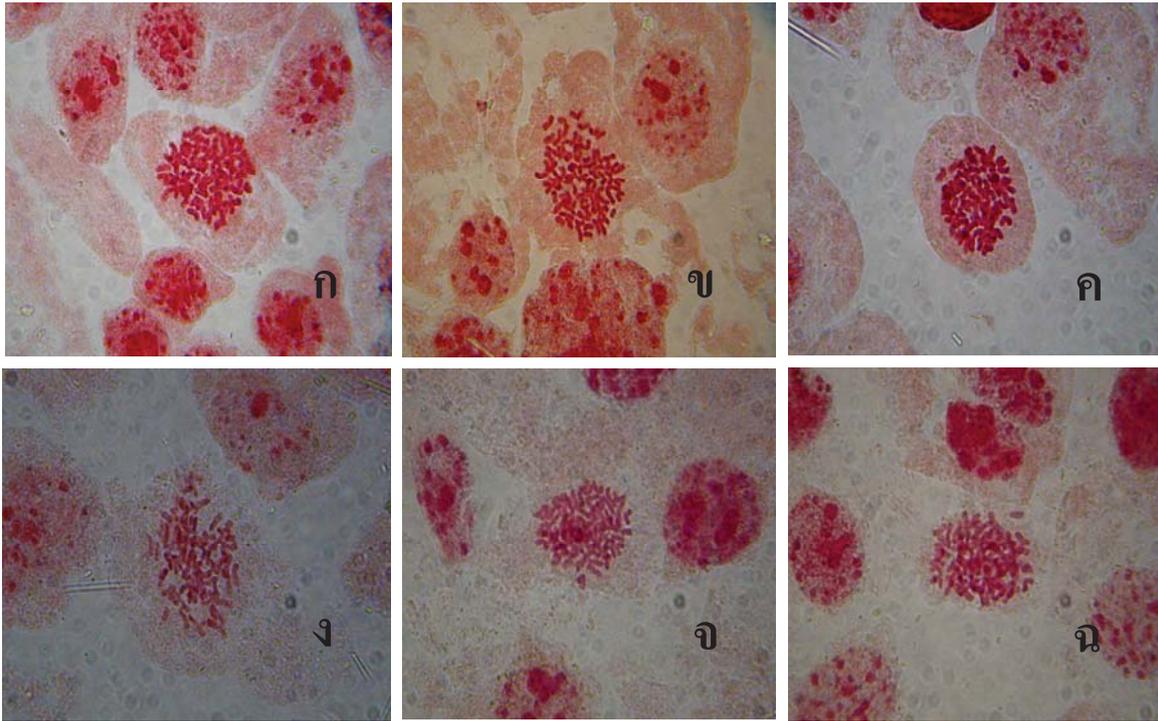
จากผลการทดลองตรึงเซลล์ใน Carnoy's solution และ absolute ethanol, acetic acid ในอัตราส่วน 3:1 พบว่าการตรึงเซลล์ใน absolute ethanol, acetic acid (3:1) จะพบกระจุกเซลล์สีเขียวดบังเซลล์อื่นๆไว้ ส่งผลให้เห็นรูปร่างของโครโมโซมไม่ชัดเจน (ภาพที่ 91ก) ในขณะที่การตรึงเซลล์ใน Carnoy's solution จะไม่พบกระจุกเซลล์นั้นเลย (ภาพที่ 91ข) และระยะเวลาการแช่ enzyme solution พบว่า ที่เวลา 6 ชั่วโมง ปลายรากมีลักษณะยังไม่ยุ่ยมากนักโครโมโซมมีการกระจายตัวเล็กน้อย ที่เวลา 12 ชั่วโมง ปลายรากกำลังยุ่ยทำให้ง่ายต่อการ Squash โครโมโซมมีลักษณะเห็นเป็นแท่งชัดเจนมากขึ้น และที่เวลา 24 ชั่วโมง ปลายรากมีลักษณะยุ่ยมากแต่โครโมโซมก็ยังมีกระจายตัวไม่มากนัก (ภาพที่ 92)



ภาพที่ 91 การตรึงเซลล์เนื้อเยื่อปลายรากในน้ำยา 2 ชนิด

(ก) ตรึงเซลล์ใน absolute ethanol, acetic acid (3:1)

(ข) ตรึงเซลล์ใน Carnoy's solution



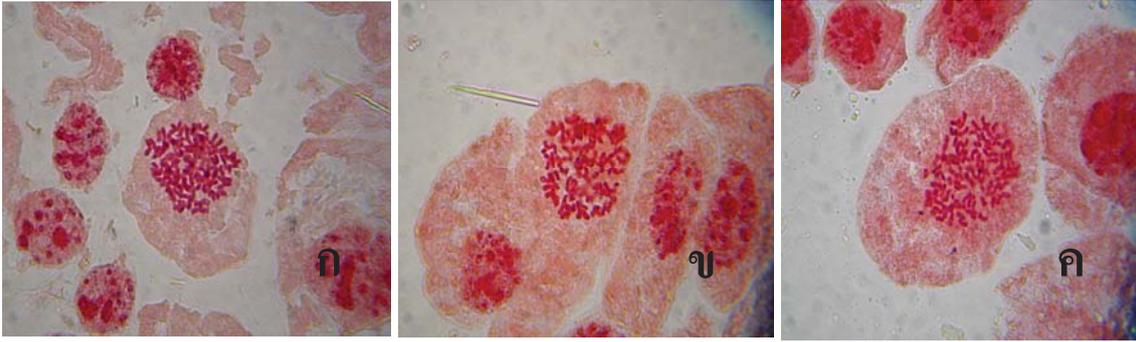
ภาพที่ 92 ลักษณะโครโมโซมของเนื้อเยื่อปลายรากที่ตรึงในน้ำยาและเวลาในการแช่ enzyme solution ต่างกัน

(ก) - (ค) ตรึงเซลล์ใน Carnoy's solution ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชม. ตามลำดับ

(ง) - (ฉ) ตรึงเซลล์ใน absolute ethanol, acetic acid (3:1) ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชม. ตามลำดับ

2.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ ต่อการกระจายตัวของโครโมโซม

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยผนังเซลล์ในการทดลองนี้คือ cellulase และ pectinase ซึ่งทั้ง 2 ชนิดจะใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่างกัน พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของ 2% cellulase และ 0.3% pectinase โครโมโซมมีการกระจายตัวเล็กน้อยแต่ยังไม่สามารถเห็นรูปร่างที่ชัดเจนได้ และเมื่อเพิ่ม cellulase จาก 2% เป็น 4% เซลล์ส่วนใหญ่ยังไม่กระจายตัวแต่เห็นรูปร่างของโครโมโซมชัดเจน เมื่อเพิ่ม pectinase จาก 0.3% เป็น 0.6% เซลล์ที่ได้มีการกระจายตัวมากขึ้น สามารถเห็นรูปร่างของโครโมโซมได้อย่างชัดเจน จากผลการศึกษาพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ pectinase จาก 0.3% เป็น 0.6% ทำให้การศึกษาโครโมโซมโดยใช้วิธี Squash method ง่ายขึ้นและโครโมโซมแยกตัวออกจากกัน (ภาพที่ 93)



ภาพที่ 93 ความเข้มข้นของเอนไซม์ ต่อการกระจายตัวของโครโมโซม

(ก) ใช้ความเข้มข้น 2% cellulase + 0.3% pectinase

(ข) ใช้ความเข้มข้น 4% cellulase + 0.3% pectinase

(ค) ใช้ความเข้มข้น 2% cellulase + 0.6% pectinase

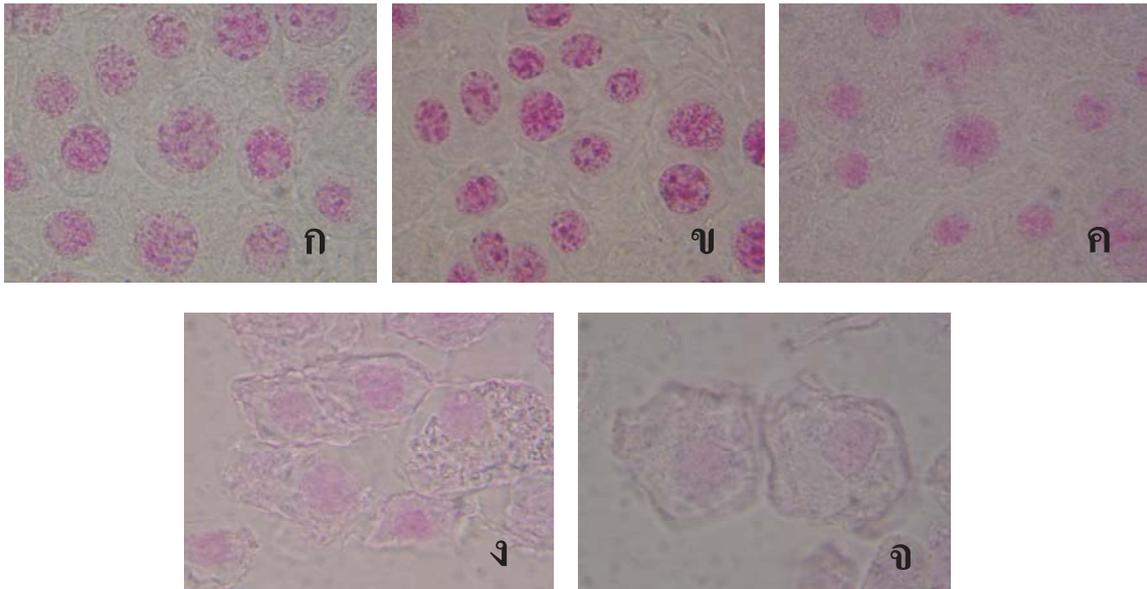
การศึกษาการตรึงเซลล์ ใน Carnoy's solution และ absolute ethanol, acetic acid ในอัตราส่วน 3:1 พบว่า การใช้สาร Carnoy's solution ลักษณะของเซลล์ที่ทำการศึกษามีคลอโรฟิลล์น้อยหรือไม่มีเลย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ในสาร Carnoy's solution ประกอบด้วย chloroform ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ดีสำหรับสารประเภทไขมันและคลอโรฟิลล์ (ศิริพร, 2546) และในวิธีการศึกษาที่มีการไฮโดรไลสด้วยกรดเกลือ 1 N จะไม่มีผลต่อรูปร่างและลักษณะของโครโมโซมโดยได้มีการศึกษาเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์แต่ระยะเวลาในการไฮโดรไลสด้วยกรดเกลือก็จะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่ทำการศึกษา

เอนไซม์ที่นำมาใช้ในการศึกษาโครโมโซมที่ใช้กันมากคือ cellulase และ pectinase เนื่องจากผนังเซลล์พืชประกอบไปด้วยสารประกอบพวก cellulose และ pectin ดังนั้นเอนไซม์ทั้งสองจึงมีความสำคัญ แต่ในทางปฏิบัติการใช้เอนไซม์ควรมีความเข้มข้นที่เหมาะสมกับชนิดพืช เนื่องจากการศึกษาพบว่า ถ้าใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นมากเกินไปลักษณะของเซลล์ที่ทำการศึกษามีปริมาณของไซโตพลาสซึมลดลง และไม่ได้ทำให้การกระจายตัวของโครโมโซมดีขึ้น ดังนั้นอัตราส่วนการใช้เอนไซม์ cellulase และ pectinase จึงมีความสำคัญในกระบวนการศึกษาโครโมโซม

2.4 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลสปลายรากกล้วยไม้แดงอุบลด้วยเทคนิค

Feulgen

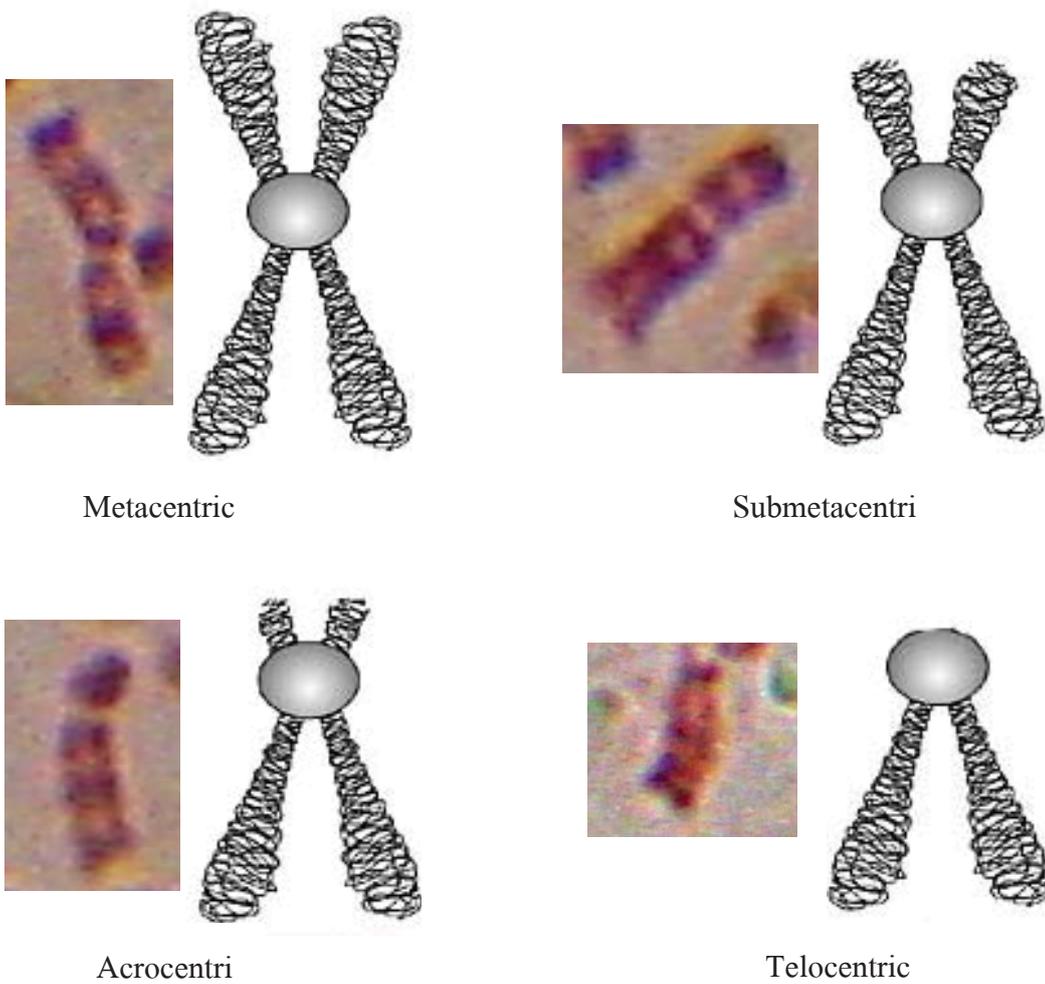
จากการศึกษาระยะเวลาของการไฮโดรไลสเซลล์ปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบลที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ ในกรดเกลือ 1 N โดยแบ่งระยะเวลาเป็น 5, 10, 15, 20 และ 25 นาที พบว่า การติดสีม่วงของ fuschin ที่บริเวณปลายราก จะติดสี เมื่อใช้ระยะเวลาของการไฮโดรไลสนาน 5 และ 10 นาที แต่จะติดสีเข้มและดีที่สุดที่เวลา 10 นาที ที่เวลาไฮโดรไลสนาน 15 นาที การติดสีจะลดลง ส่วนของไซโตพลาสซึมและลักษณะของเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อใช้ระยะเวลาการไฮโดรไลสนานเพิ่มขึ้นคือ 20 และ 25 นาที นอกจากการติดสีของเซลล์ปลายรากจะจางลง ยังพบว่า ส่วนของไซโตพลาสซึมที่ใสจะลดลง อาจเนื่องมาจาก เมื่อใช้ระยะเวลาการไฮโดรไลสนานขึ้น เซลล์ปลายรากจะยุบเกินไป ทำให้ในขั้นตอนของการ Squash เซลล์ปลายรากที่นำมาศึกษาจึงมีลักษณะดังแสดงในภาพที่ 94 ง และ 94 จ



ภาพที่ 94 ระยะเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลส์เซลล์ปลายรากกล้วยไม้แดงอุบลด้วยเทคนิค Feulgen
(ก) 5 นาที (ข) 10 นาที (ค) 15 นาที (ง) 20 นาที และ (จ) 25 นาที

2.5 การศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบิน

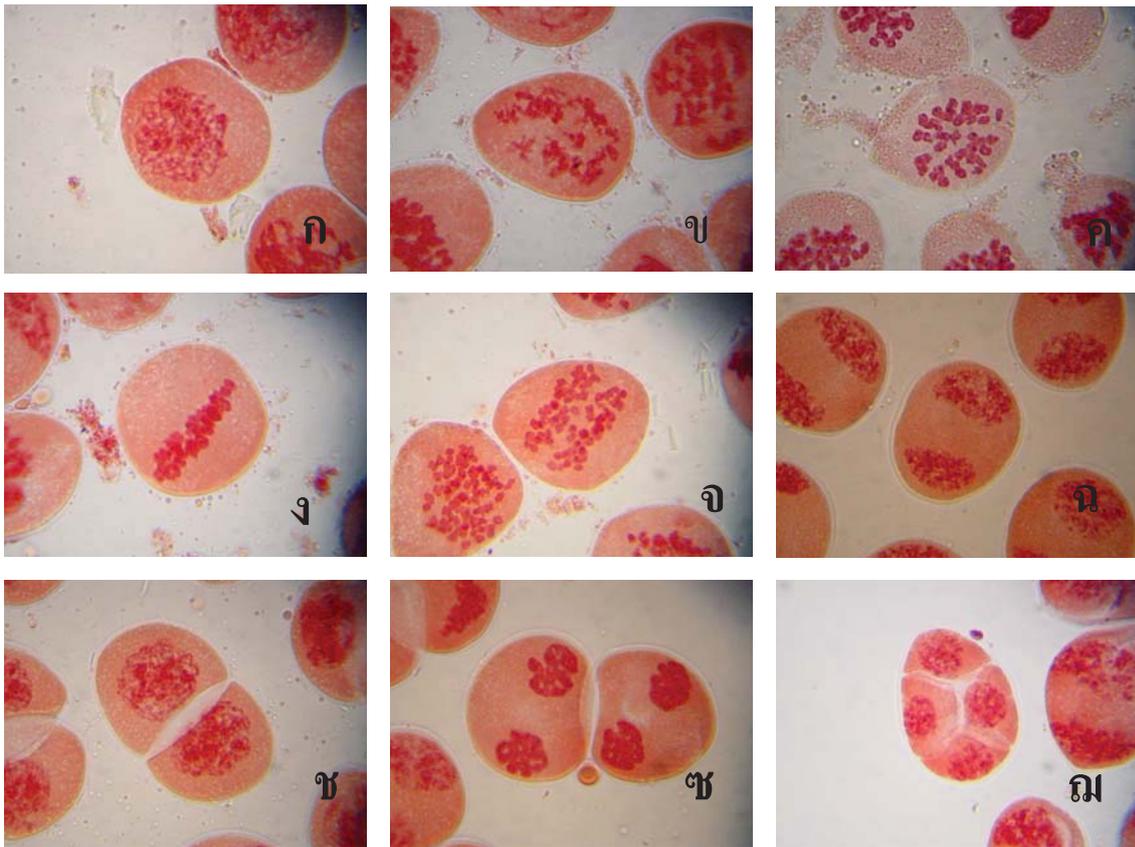
จากการศึกษาลักษณะของโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบิน โดยในเบื้องต้นได้ศึกษาจากตำแหน่งของเซนโตรเมียร์ที่อยู่บนแท่งโครโมโซมในแต่ละแท่งของกล้วยไม้ม้าบิน ที่มีจำนวนโครโมโซม $2n = 38$ เมื่อทำการตรวฉับและศึกษาลักษณะของโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า จากจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบินทั้ง 38 แท่ง มีแนวโน้มว่าจะเป็นกลุ่มของโครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโตรเมียร์อยู่ตรงกลาง (metacentric) จำนวน 13 แท่ง มีโครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโตรเมียร์อยู่เกือบตรงกลาง (submetacentric) จำนวน 14 แท่ง มีโครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโตรเมียร์อยู่ค่อนข้างปลายแท่งของโครโมโซม (acrocentric) จำนวน 10 แท่ง และมีโครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโตรเมียร์อยู่ตรงปลายแท่งของโครโมโซม (telocentric) จำนวน 1 แท่ง (ภาพที่ 95) แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ยังเป็นเพียงการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จึงทำให้ข้อมูลในเบื้องต้นที่ได้เป็นเพียงแนวโน้มของลักษณะโครโมโซมที่อาจจะเกิดขึ้นได้ในกล้วยไม้ม้าบิน และเพื่อเป็นการยืนยันลักษณะของโครโมโซมในกล้วยไม้ม้าบินให้แม่นยำขึ้น จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบและทำคาริโอไทป์ด้วยโปรแกรมอัตโนมัติต่อไป



ภาพที่ 95 ลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบิน

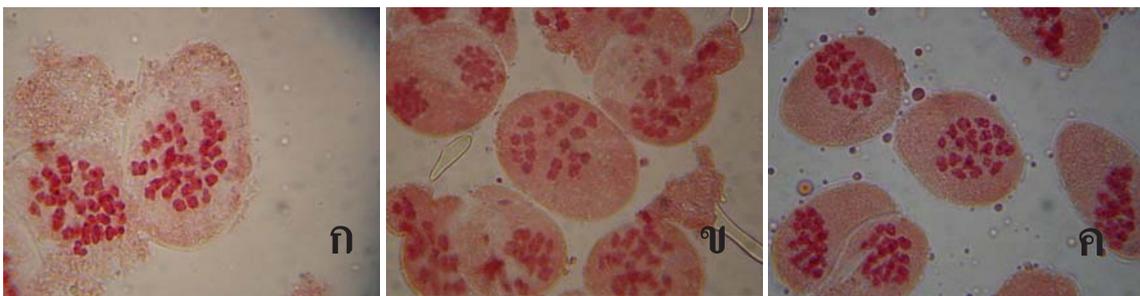
2.6 การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจากดอกอ่อนและระยะการแบ่งเซลล์แบบ meiosis

การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากดอกอ่อนและระยะการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง พบว่าในดอกตูมที่มีขนาดแตกต่างกันจะมีระยะการแบ่งเซลล์ที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 96) และจำนวนโครโมโซมในระยะ diakinesis ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสใน PMCs (pollen mother cell) ของกล้วยไม้แดงอุบล มีจำนวนโครโมโซม $n = 38$ ส่วนกล้วยไม้ม้าวิ่งและม้าบิน มีจำนวนโครโมโซม $n = 19$ (ภาพที่ 97)



ภาพที่ 96 การแบ่งเซลล์แบบ meiosis ในระยะต่างๆ

- (ก) ระยะ zygotene, (ข) ระยะ pachytene, (ค) ระยะ diakinesis, (ง) ระยะ metaphase I, (จ) ระยะ anaphase I, (ฉ) ระยะ telophase I, (ช) ระยะ prophase II, (ซ) ระยะ telophase II และ (ฅ) ระยะ microspore quartet

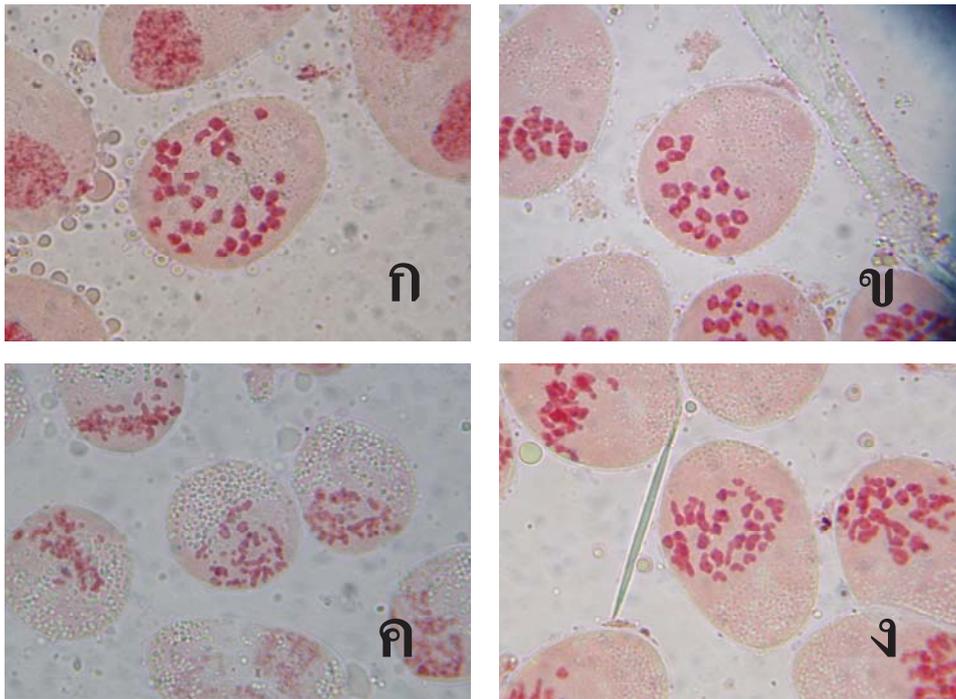


ภาพที่ 97 จำนวนโครโมโซมจากดอกอ่อนของกล้วยไม้สกุลต่างๆ

- (ก) จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้แดงอุบล $n = 38$
 (ข) จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง $n = 19$
 (ค) จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบิน $n = 19$

3. การศึกษาพฤติกรรมกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิงและพันธุ์ลูกผสม

จากการศึกษาพฤติกรรมกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิงและสายพันธุ์ลูกผสมพบว่า พฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้ทั้งแดงอุบลและม้าวิงซึ่งเป็นพันธุ์แท้มีความเป็นปกติ คือ มีการเข้าคู่ของโครโมโซมในระยะ diakinesis เฉลี่ย 38 และ 19 bivalent ตามลำดับ ส่วนในลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าการเข้าคู่ของโครโมโซมผิดปกติ คือ พบทั้ง univalent, bivalent และ trivalent ในลูกผสมสายพันธุ์แดงอุบล x ม้าวิงบลู และม้าบิน x แดงอุบล พบลักษณะการเข้าคู่ที่เป็น bivalent เพียง 19.6 คู่ และ 19.55 คู่ ตามลำดับ (ภาพที่ 98 และ 99)



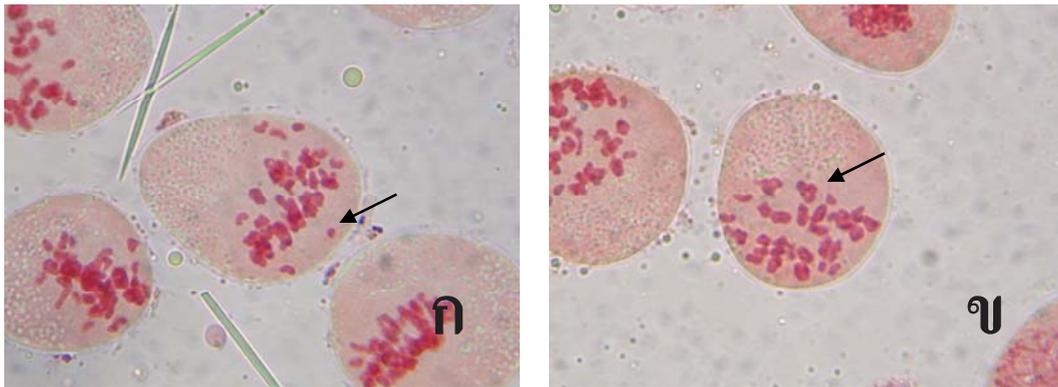
ภาพที่ 98 การจับคู่กันของโครโมโซมในระยะ diakinesis

(ก) กล้วยไม้แดงอุบล (38 bivalent)

(ข) กล้วยไม้ม้าวิง (19 bivalent)

(ค) กล้วยไม้ลูกผสม (แดงอุบล x ม้าวิงบลู) (2.53 trivalent, 19.6 bivalent และ 7.6 univalent)

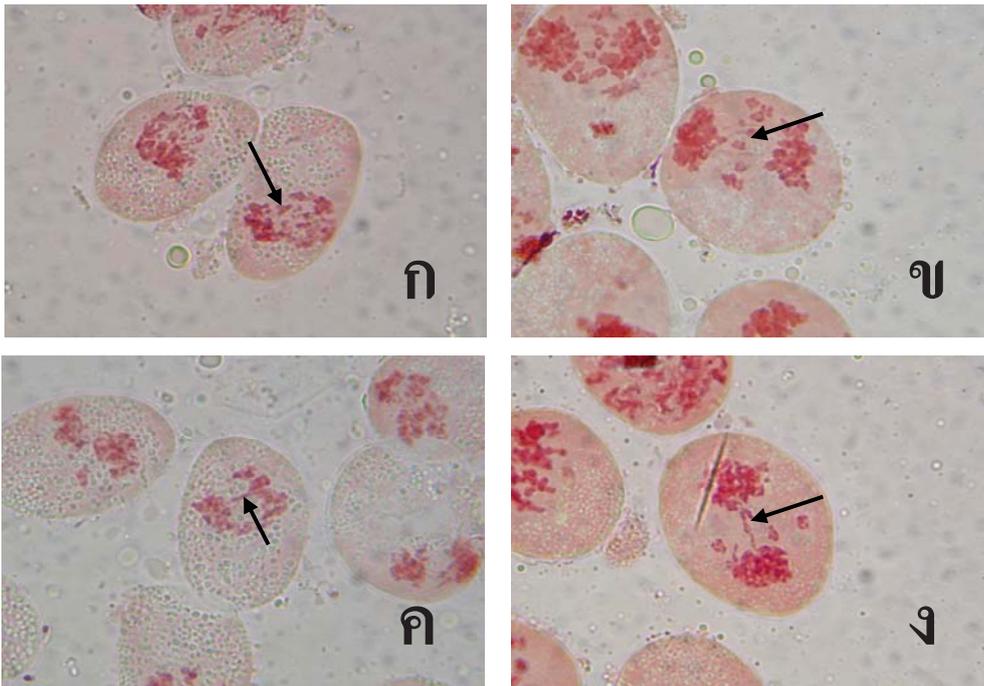
(ง) กล้วยไม้ลูกผสม (ม้าบิน x แดงอุบล) (3.22 trivalent, 19.55 bivalent และ 5.44 univalent)



ภาพที่ 99 การจับคู่กันของโครโมโซมในระยะ diakinesis กล้ายไม้ลูกผสม (ม้าบิน x แดงอุบล)
 (ก) บริเวณลูกศรชี้คือ univalent
 (ข) บริเวณลูกศรชี้คือ trivalent

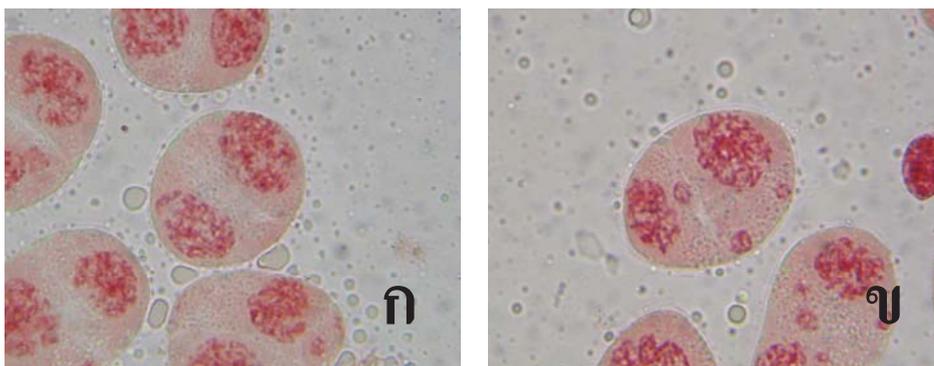
นอกจากลักษณะการจับคู่กันของโครโมโซมแล้ว ยังพบว่าในระยะ anaphase I ของลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์โครโมโซมบางแห่งมีการเคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วเซลล์ได้ช้ากว่าโครโมโซมอื่นหรือมีการเชื่อมต่อกันของโครโมโซม ที่เรียกว่า laggard และ bridge เกิดขึ้นความผิดปกติดังกล่าวแสดงถึงการขาดหายไปหรือการเพิ่มเข้ามาของโครโมโซมในรุ่นลูก โดยในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่งบลู มีเปอร์เซ็นต์การเกิด laggard และ bridge คิดเป็น 77% และ 4% ตามลำดับ ส่วนในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล เปอร์เซ็นต์การเกิด laggard และ bridge สูงถึง 95.33% และ 1% ตามลำดับ (ภาพที่ 100) และเมื่อทำการศึกษาในระยะ telophase I ทั้งของกล้ายไม้แดงอุบล ม้าวิ่ง และพันธุ์ลูกผสมพบว่าในกล้ายไม้แดงอุบลและม้าวิ่งมีลักษณะของเซลล์ปกติ สูงถึง 99.66% และ 99.33% ส่วนลักษณะเซลล์ที่เกิด micronucleus จะพบเป็นส่วนน้อยคือ 0.33% และ 0.66% ตามลำดับ ส่วนในพันธุ์ลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์สามารถพบลักษณะเซลล์ที่เกิด micronucleus สูงขึ้น โดยพบว่า ในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่งบลู มีเซลล์ที่เกิด micronucleus 19.33% และในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล พบมีเซลล์ที่เกิด micronucleus 93.32% ตามลำดับ (ภาพที่ 101)

จากลักษณะเปอร์เซ็นต์การเกิดความผิดปกติที่สูงในลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้จากการศึกษา อาจจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถใช้ในการอธิบายสาเหตุของความสมบรูณ์พันธุ์ที่เกิดขึ้นในกล้ายไม้พันธุ์ลูกผสม ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 100 laggard และ bridge ที่เกิดขึ้นในระยะ anaphase I ของกล้วยไม้สกุลม้าวีงและสายพันธุ์ลูกผสม (บริเวณลูกศรชี้)

- (ก) laggard ในระยะ anaphase I ของกล้วยไม้ลูกผสม (แดงอุบล x ม้าวีงบลู)
- (ข) laggard ในระยะ anaphase I ของกล้วยไม้ลูกผสม (ม้าบิน x แดงอุบล)
- (ค) bridge ในระยะ anaphase I ของกล้วยไม้ลูกผสม (แดงอุบล x ม้าวีงบลู)
- (ง) bridge ในระยะ anaphase I ของกล้วยไม้ลูกผสม (ม้าบิน x แดงอุบล)

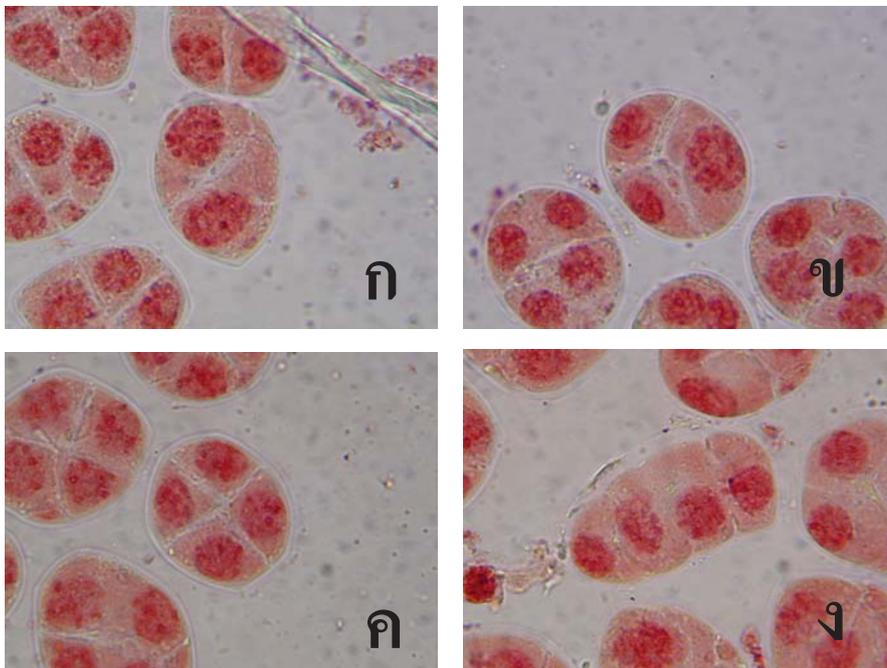


ภาพที่ 101 ความผิดปกติในระยะ telophase I ของกล้วยไม้ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวีงบลู

- (ก) ลักษณะเซลล์ปกติ
- (ข) ลักษณะเซลล์ที่เกิด micronucleus

4. การสร้าง sporad ของกล้วยไม้สกุลม้าวี้งและสายพันธุ์ลูกผสม

จากการศึกษาลักษณะการสร้าง sporad ของกล้วยไม้แดงอุบล ม้าวี้ง และพันธุ์ลูกผสม พบว่า ในกล้วยไม้แดงอุบลและม้าวี้ง มีการสร้าง sporad ที่เป็น tetrad ในอัตราที่สูงคือ 99.22% และ 99% ตามลำดับ ส่วนในลูกผสมสองสายพันธุ์ พบว่าในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวี้งบลู มีการสร้าง sporad ที่ผิดปกติมากที่สุดคือ พบทั้ง diad (3.77%), triad (5.11%) และ tetrad (56%) ตามลำดับ และในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล ลักษณะการสร้าง sporad ก็มีความผิดปกติเช่นเดียวกัน โดยพบทั้ง diad (1.33%), triad (2%) และ tetrad (73.11%) (ภาพที่ 102) ในลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ที่มีการสร้าง sporad แตกต่างกัน โดยจะพบว่าในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวี้งบลู จะมีความผิดปกติที่สูงกว่าในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล จากข้อมูลที่ได้ศึกษาอาจจะทำให้ทราบว่าความสมบูรณ์พันธุ์ในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล อาจจะสูงกว่าในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวี้งบลู ซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 102 sporad formation แบบต่างๆของกล้วยไม้ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล
(ก) dyad , (ข) triad , (ค) tetrad (square) และ (ง) tetrad (linear)

สรุป

การวิจัยนี้ได้บรรลุวัตถุประสงค์ คือ ได้เก็บรวบรวมสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิงในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง และได้ศึกษาโครโมโซมและพฤติกรรมการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิง การเก็บรวบรวมสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิง สามารถรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้แดงอุบลได้ 125 รหัส และกล้วยไม้ม้าวิงได้ 113 รหัส กล้วยไม้แดงอุบลพบใน จังหวัดอุบลราชธานี (อ.บุญทริก อ.ช่องเม็ก อ.กุดข้าวปุ้น อ.เขื่องใน) จังหวัดร้อยเอ็ด (อ.โพนทอง) จังหวัดสกลนคร (อ.เต่างอย อ.ภูพาน) จังหวัดเลย (อ.ภูกระดึง) จังหวัดกาฬสินธุ์ (อ.สหัสขันธ์ อ.คำม่วง) จังหวัดศรีสะเกษ (อ.ขุนหาญ) จังหวัดมุกดาหาร (อ.คำชะอี) และประเทศลาว กล้วยไม้ม้าวิง พบในจังหวัดอุบลราชธานี (อ.โพธิ์ไทร อ.ช่องเม็ก) จังหวัดร้อยเอ็ด (อ.หนองพอก) จังหวัดเลย (อ.ภูกระดึง) จังหวัดกาฬสินธุ์ (อ.คำม่วง) จังหวัดมุกดาหาร (อ.เมือง อ.ดอนตาล) และประเทศลาว ความแตกต่างระหว่างลักษณะต้นกล้วยไม้แดงอุบลและต้นกล้วยไม้ มีความแตกต่างกันในด้านขนาดของใบและต้น โดยต้นกล้วยไม้แดงอุบลส่วนใหญ่เมื่อต้นสมบูรณ์เต็มที่พร้อมออกดอก จะมีขนาดของใบและลำต้นใหญ่กว่าต้นกล้วยไม้ม้าวิง ช่อดอกและดอกกล้วยไม้แดงอุบลมีขนาดใหญ่กว่ากล้วยไม้ม้าวิง และกล้วยไม้ม้าวิงส่วนใหญ่กลีบดอกและกลีบเลี้ยงจะลู่ไปด้านหลัง สีของดอกกล้วยไม้ม้าวิงมีสีขาว-ม่วง สีดอกกล้วยไม้แดงอุบลมีสีชมพูอ่อน-ชมพูม่วง ทั้งสองชนิดมีส่วน side lobe ที่มีสีแตกต่างจากกลีบดอกและกลีบเลี้ยง

การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิง ได้มีการศึกษาเทคนิคต่างๆ เพื่อศึกษาโครโมโซมจากชิ้นส่วนปลายรากและดอกอ่อน ในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้สกุลม้าวิงเพื่อศึกษาโครโมโซม พบว่าการเก็บตัวอย่างปลายรากกล้วยไม้แดงอุบลที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อเวลาที่เหมาะสมที่สุดคือเวลา 9.15 น. การเก็บปลายรากที่อยู่ในสภาพแปลงช่วงเวลาที่เหมาะสมของกล้วยไม้แดงอุบลคือเวลา 9.30 น. ส่วนม้าวิงและม้าบิน เวลาที่เหมาะสมที่สุดคือ เวลา 9.45 น. การศึกษาการแช่ตัวอย่างปลายรากในสารละลาย 8 - hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M พบว่า ควรแช่ตัวอย่างปลายรากอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากต่อไป

การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบล ม้าวิง และม้าบิน พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 76$ 38 และ 38 ตามลำดับ

การใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์เพื่อศึกษาโครโมโซมจากเซลล์เนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบล พบว่า การตรึงเซลล์ใน Carnoy's solution ให้ผลดีคือทำให้ภายในเซลล์ใสเห็นนิวเคลียสชัดเจน ส่วนระยะเวลาในการแช่ enzyme solution ที่เหมาะสมคือ 12 ชั่วโมง ความเข้มข้นของ enzyme solution ที่เหมาะสมคือ cellulose ความเข้มข้น 2% ร่วมกับ pectinase ความเข้มข้น 0.6%

การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลสเซลล์ปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบล ที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ ด้วยเทคนิค Feulgen พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลส ที่ทำให้เซลล์ติดสีม่วงของ fuschin ที่บริเวณปลายรากเหมาะสมที่สุดคือ 10 นาที

การศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบินที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโตรเมียร์อยู่ตรงกลาง (metacentric) มีจำนวน 13 แท่ง โครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโตรเมียร์อยู่เกือบตรงกลาง (submetacentric) มีจำนวน 14 แท่ง โครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโตรเมียร์อยู่ค่อนข้างไปทางปลายแท่งของโครโมโซม (acrocentric) มีจำนวน 10 แท่ง และโครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโตรเมียร์อยู่ตรงปลายแท่งของโครโมโซม (telocentric) มีจำนวน 1 แท่ง

จำนวนโครโมโซมในระยะ diakinesis ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของดอกก่อน กล้วยไม้แดง
อูบลมีจำนวนโครโมโซม $n = 38$ กล้วยไม้ม้าวิ่งและม้าบินมีจำนวนโครโมโซม $n = 19$

การศึกษาพฤติกรรมกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม
กล้วยไม้แดงอูบลและม้าวิ่ง มีการเข้าคู่ของโครโมโซมในระยะ diakinesis เฉลี่ย 38 และ 19 bivalent
ตามลำดับ ลูกผสมสายพันธุ์แดงอูบล x ม้าวิ่งบลู และม้าบิน x แดงอูบล พบ bivalent เพียง 19.6 คู่
และ 19.55 คู่ ตามลำดับ ในระยะ anaphase I และ telophase ของสายพันธุ์ลูกผสมทั้งสองพบ
lagging chromosome, bridge และ micronucleus การสร้าง sporad ในกล้วยไม้แดงอูบลและม้าวิ่งมี
การสร้าง sporad เป็น tetrad สูงถึง 99% ส่วนในลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ลักษณะ sporad ที่เป็น tetrad
จะลดลงเป็น 56% และ 73% ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2542. กล้ายไม้ตัดดอกเพื่อการส่งออก. ใน อะเมซิงไม้ดอกเมืองร้อน. น. 46-50
กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ ศรีประไพ ธรรมแสง วรงค์ นัยวิจิตร ภาคภูมิ สืบบุญการณ และอุทัย อันพิมพ์.
2543. รายงานผลการวิจัยเรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้แดงอุบลและศึกษาการเจริญเติบโต
ของต้นอ่อนในโรงเรือน. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 46 น.
- ครรชิต ธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อัมรินทร์พรินติ้งแอนพับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ.
283 น.
- จารุภัทร ประราศรี และฉันทนา สุวรรณธาดา. 2549. การศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้ดินช้างผสม
โหลง. วารสารเกษตร 22(3): 188-193.
- ฐิติพร พิทยาธุวิจิตร. 2544. การสำรวจกล้วยไม้ป่าในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจาก
พระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามมิ่งกุฎราชกุมารี พื้นที่โคกภูตา อำเภอกุเวียง
จังหวัดขอนแก่น. ศูนย์ศึกษาค้นคว้าและพัฒนาเกษตรกรรม ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คณะ
เกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 5 น.
- นภาพร วงศ์ศรีทา. 2548. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคศาสตร์บางประการของ
กล้วยไม้แดงอุบล. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.
22 น.
- ไพบูลย์ ไพรีพ่ายฤทธิ์. 2521. ตำรากกล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มเล่น. ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคลอาทรการ
พิมพ์, กรุงเทพฯ. 432 น.
- ไพบูลย์ มงคลถาวรชัย และนิยะดา ห่อนาค. ม.ป.ป. รายงานการวิจัยเรื่องการศึกษาโครโมโซมของ
กล้วยไม้สกุลช้าง. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 8 น.
- ระพี สาคริก. 2549. หอมกลีนกล้วยไม้ : สกุลดอโรทิส. คม ชัด ลึก วันอาทิตย์ที่ 7 พฤษภาคม
ระพี สาคริก. 2517. การเพาะปลูกกล้วยไม้ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย. ชวนพิมพ์,
กรุงเทพฯ. 850 น.
- ศรีประไพ ธรรมแสง กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ ภาคภูมิ สืบบุญการณ และอุทัย อันพิมพ์. 2542. รายงาน
ผลการวิจัยเรื่อง การเก็บรวบรวมกล้วยไม้แดงอุบลและการศึกษาการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะ
เมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 43 น.
- ศรีประไพ ธรรมแสง กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ วรงค์ นัยวิจิตร และภาคภูมิ สืบบุญการณ. 2544. รายงาน
ผลการดำเนินโครงการทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม โครงการอนุรักษ์กล้วยไม้แดงอุบล. คณะ
เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 70 น.
- ศิริพร เชื้อจิ้น. 2546. การศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์และความสมบูรณ์พันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวาย
บางพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2548. สรีระวิทยาของพืช. จามจุรีโปรดักท์, กรุงเทพฯ. 237 น.
- สมศักดิ์ รักไพบูลย์สมบัติ. 2535. ทำเนียบกล้วยไม้ไทย. สุริวงค์บุ๊คเซนเตอร์, เชียงใหม่.
- Kamemoto,H., R.Tanaka and K. Kosaki. 1961. Chromosome numbers of orchids in Hawaii.
Univ. Hawaii Agr. Exp. Sta. Bull. 127:1 – 28.

- Mondin, M., J.A. Santos-Serejo and M. L.R. Aguiar-Perecin. 2006. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rRNA gene sites. Departamento de Genetica, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de Sao Paulo, Piracicaba, SP, Brazil.
- Preeda, N., T. Yanagi, K. Sone, S. Taketa and N. Okuda. 2007. Chromosome observation method at metaphase and pro-metaphase stages in diploid and octoploid strawberries. Faculty of Agriculture, Kagawa University, Ikenobe 2393, Miki-choKita-gun,Kagawa 761-0795, Japan.
- Rungruchkanont, K. 1996. Studies on Seed Germination and Plant Growth Development of Thai Wild Orchid, *Aerides houlletiana* and *Acampe rigida*. M.S. Thesis, University of Mahidol, Bangkok.
- Swanson, C.P. 1957. Cytological and Cytogenetic. Prentice Hall, Inc., New Jersey. 596 p.
- Tanaka,R. and H.Kamemoto. 1984. Chromosome in orchids : Counting and numbers, p.323-410. In : J. Arditti (ed.). Orchid Biology Reviews and Perspectives,III. Cornell Univ. Press, New York.
- www.copernicusproject.ucr.edu/.../chromosome.gif
- www.sc.chula.ac.th/.../text3/subtext3/a_3-1.gif

ภาคผนวก

บทความที่ได้รับการนำเสนอในวารสารวิชาการและการประชุมวิชาการ

1. การศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวี้ง นำเสนอในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 7
2. การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวี้งจากดอกอ่อนและปลายราก นำเสนอในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 8
3. พฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวี้งและสายพันธุ์ลูกผสม นำเสนอในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48



วารสาร

ISSN 0125-0369

วิทยาศาสตร์เกษตร

AGRICULTURAL SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 39 ฉบับที่ 3 (พิเศษ) กันยายน - ธันวาคม 2551
Vol.39 No.3 (Suppl.) September - December 2008



คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



1200014150



พืชสวนไทย ใ้ร่วมพระบารมี



การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 7
THE 7th NATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS 2008
วันที่ 26 - 30 พฤษภาคม 2551 ณ โรงแรมอมรินทร์ลากูน อ.เมือง จ.พิษณุโลก

ภาคโปสเตอร์

จัดโดย

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

การศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

Chromosome study on *Doritis* orchid

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์¹ ศรีประไพ ธรรมแสง¹ และ แสงเดือน พลเยี่ยม¹
Karnchana Rungruchkanont¹ Sriprapai Thummasaeng¹ and Sangdaun Phonyiam¹

Abstract

Several appropriate techniques were examined on preparation root-tip for somatic chromosome investigation of *Doritis* orchids. The experiments were 1) duration time for root-tip sampling at 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 11.00 and 12.00 am. 2) suitable time for root-tip sampling at 9.15, 9.30 and 9.45 am. 3) pre-treatment duration in 0.002 M 8-hydroxyquinoline of 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 hours. The most suitable technique of root-tip preparation for chromosome investigation was a duration time for root-tip sampling between 9.00 – 10.00 am. The most suitable time during this period was 9.15 am. and the root-tip should be fix in 8-hydroxyquinoline at least 1 hour. Chromosome numbers from root-tip of *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* are $2n = 76$.

Keyword: Chromosome, *Doritis* orchid, Root-tip

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อศึกษาลักษณะโครโมโซม โดยการทดลองประกอบด้วย 1) การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างปลายราก ทำการทดลองเก็บตัวอย่างปลายรากเวลา 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 11.00, และ 12.00 น. 2) การหาเวลาที่เหมาะสมที่สุดระหว่าง 9.00 น. ถึง 10.00 น. ทำการทดลองเก็บปลายรากเวลา 9.15, 9.30, และ 9.45 น. 3) การหาความยาวนานที่เหมาะสมในการหยุดยั้งเซลล์โดยแช่ปลายรากในสารละลาย 8-hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M นาน 1, 2, 3, 4, 5, 6, และ 7 ชั่วโมง จากผลการทดลองสามารถสรุปวิธีปฏิบัติที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อศึกษาโครโมโซม พบว่า ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างปลายรากคือเวลา 9.00 น. ถึง 10.00 น. และเวลาที่เหมาะสมที่สุดคือเวลา 9.15 น. ส่วนความยาวนานที่เหมาะสมในการหยุดยั้งเซลล์ด้วยสารละลาย 8-hydroxyquinoline ควรแช่อย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่า เซลล์ปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบล มีจำนวนโครโมโซม $2n = 76$

คำสำคัญ: กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง โครโมโซม ปลายราก

คำนำ

กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis*) เป็นกล้วยไม้ที่ขึ้นอยู่ตามพื้นดิน ซอกหินและแอ่งหิน ที่มีอินทรีย์วัตถุทับถม ลักษณะต้นจะสั้น ใบแบนค่อนข้างหนา ใบมีสีเขียวหรือสีเขียวอมม่วง ช่อดอกตั้ง ช่อดอกยาวแข็งและตรง ดอกมีสีแดงอ่อนๆไปจนถึงสีแดงอมม่วง ดอกจะทยอยบานขึ้นไปเรื่อยๆจนถึงปลายช่อดอก (ระพี, 2549) กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่พบกระจายพันธุ์ในประเทศไทยมี 4 สายพันธุ์คือ ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima*) พบทั่วไปทั้งในภาคกลาง ภาคใต้ ภาคเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) พบในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ ม้าบิน (*Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis*) พบที่ภาคใต้ เช่น จังหวัดชุมพร และ *Doritis pulcherrima* var. *coerulea* (ไม่มีชื่อพื้นเมือง) พบทั่วไปในภาคเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (สมศักดิ์, 2535) ซึ่งกล้วยไม้สายพันธุ์ม้าวิ่งและแดงอุบลจะมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก แต่แดงอุบลจะมีขนาดดอก ลำต้นและใบ ใหญ่กว่าม้าวิ่ง การที่กล้วยไม้มีสวนต่างๆใหญ่ขึ้น เนื่องจากมีโครโมโซมมากกว่าปกติ ระพี (2517) กล่าวว่า กล้วยไม้พันธุ์แดงอุบลนี้เป็นเตตระพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซม $2n = 76$ แต่กล้วยไม้ม้าวิ่งเป็นดิพลอยด์ มีโครโมโซม $2n = 38$ ซึ่งเป็นจำนวนปกติ สันนิฐานว่าพันธุ์แดงอุบลที่เป็นเตตระพลอยด์นี้น่าจะกลายพันธุ์มาจากม้าวิ่ง ในการวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาลักษณะโครโมโซมของกล้วยไม้ในสกุลม้าวิ่งโดยเฉพาะม้าวิ่งและแดงอุบล เพื่อหาความสัมพันธ์ทางด้านอนุกรมวิธานและเป็นประโยชน์ในด้านการ

¹ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จ. อุบลราชธานี 34190

¹ Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ubon Rajathane University, Ubon Ratchathani 34190

ปรับปรุงพันธุ์ โดยในเบื้องต้นจะทำการศึกษาด้านเทคนิคที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง เนื่องจากเป็นวิธีการพื้นฐานที่จะนำไปใช้ศึกษาจำนวนโครโมโซมและลักษณะของโครโมโซม

วิธีการทดลอง

ศึกษาโครโมโซมจากปลายรากอ่อนของต้นกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งสายพันธุ์แดงอุบลที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ เลือกรากที่กำลังมีการเจริญโดยสังเกตจากรากที่มีสีเขียวใสและปลายรากมีสีขาวขุ่นเล็กน้อย ขั้นตอนศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างรากโดยทำการเก็บตัวอย่างปลายรากอ่อนในเวลา 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 11.00, และ 12.00 น. และศึกษาเวลาที่ที่เหมาะสม โดยเก็บปลายรากอ่อนในเวลา 9.15, 9.30 และ 9.45 น. ทำการตัดส่วนปลายของรากมา 1-2 มิลลิเมตร แล้วหยดวงซีพของเซลล์เนื้อเยื่อปลายรากในสารละลาย 8- hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M เป็นเวลานาน 3-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส แล้วเท 8- hydroxyquinoline ออก ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จากนั้นตรึงเซลล์ในน้ำยาคาร์นอย (Carnoy's solution) สูตรดัดแปลงโดย Kamemoto *et al.*, 1961 แล้วแช่ในตู้เย็น อย่างน้อย 1 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 1 เดือน เพื่อให้สภาพโครโมโซมคงที่ ล้างปลายรากให้สะอาดก่อนนำไปย้อมแยกเซลล์ใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2-3 นาที ล้างน้ำ 4-5 ครั้ง เก็บตัวอย่างรากในกรดน้ำส้ม 45 % อย่างน้อย 1 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 1 เดือน นำปลายรากวางบนแผ่นสไลด์ ตัดเฉพาะปลายรากยาวประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร (ตัดเขี้ยวหมวกราก root cap ออกเสียก่อน) หยดสี orcein 1-2 หยด แล้วใช้ปลายเข็มเขี่ยแยกเซลล์ของปลายรากออกจากกันให้มากที่สุดแล้วทิ้งไว้ 5-10 นาทีในกล่องขึ้นซึ่งอิมด้วยไอกรดน้ำส้ม 45 % เพื่อให้โครโมโซมติดสี นำแผ่นสไลด์ มาปิดด้วย cover slip แล้วผ่านเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ พออุ่นวางสไลด์ บนแผ่นกระดาษซับใช้แผ่นกระดาษซับอีกแผ่นวางทับด้านบน ใช้นิ้วหัวแม่มือค่อยวางบนกระดาษซับกดลงไปบนแนวตั้งจากเพื่อให้เซลล์แบนที่สุดเท่าที่จะทำได้ ซับสีส่วนเกินออก นำแผ่นสไลด์ ไปศึกษาเซลล์ปลายรากใต้กล้องจุลทรรศน์เลือกเซลล์ที่นิวเคลียสมีการแบ่งตัวอยู่ในระยะเมตาเฟส นับจำนวนโครโมโซม แล้วบันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อได้เวลาที่เหมาะสมคือ 9.15 น. แล้วจึงทำการศึกษาความยาวนานในการหยดวงซีพเซลล์ ด้วยสารละลาย 8- hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M นาน 1, 2, 3, 4, 5, 6, และ 7 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ตามด้วยขั้นตอนต่างๆในการศึกษาโครโมโซมปลายรากดังที่กล่าวมาข้างต้น

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาด้านเทคนิคในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อศึกษาโครโมโซมครั้งนี้เป็นการนำวิธีการศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อพืชโดยวิธีซีพี โดยการแบ่งระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างและความยาวนานในการหยดวงซีพเซลล์ที่แตกต่างกัน เพื่อได้วิธีที่เหมาะสมที่สุดในการปฏิบัติ ผลการทดลองมีดังนี้

1. ช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดตั้งแต่ 7.00 น. ถึง 12.00 น.

การเก็บตัวอย่างปลายรากในช่วงเวลา 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 11.00, และ 12.00 น. แล้วนำแต่ละวิธีไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากเพื่อศึกษาโครโมโซมนั้น พบว่าการเก็บปลายรากที่เวลา 7.00 น. ได้เซลล์ปลายรากที่อยู่ในระยะโพรเฟส การเก็บปลายรากที่เวลา 8.00 น. นั้นได้เซลล์ปลายรากที่อยู่ในระยะเริ่มต้นของเมตาเฟส โครโมโซมมีการหดตัวเล็กน้อย แท่งโครโมโซมมีลักษณะบางและยาว ส่วนการเก็บปลายรากในช่วงเวลา 9.00 น. ได้เซลล์ที่มีโครโมโซมหดตัวสั้นเป็นแท่งเห็นได้ชัดเจน สามารถตรวจนับจำนวนของโครโมโซมได้ แต่เซลล์ที่อยู่ในระยะนี้ยังมีจำนวนไม่มากนัก ที่ช่วงเวลา 10.00 น. ภายในเซลล์เริ่มมีการแยกตัวของโครโมโซมไปที่ขั้วเซลล์ทั้งสองด้าน และการเก็บที่เวลา 11.00 น. เซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะแอนาเฟสคือมีการแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่มที่ขั้วเซลล์ทั้งสองด้าน การเก็บปลายรากที่เวลา 12.00 น. พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะเทโลเฟส เริ่มมีการสร้างผนังเซลล์กันระหว่างเซลล์ทำให้สามารถมองเห็นได้ชัดเจนว่าแยกเป็น 2 เซลล์ (Figure 1, A - F)

2. ช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดระหว่าง 9.00 น. ถึง 10.00 น.

การทดลองนี้เป็นการทดลองที่สืบเนื่องมาจากข้อ 1 โดยเก็บตัวอย่างปลายรากที่เวลา 9.15, 9.30 และ 9.45 น. ผลการทดลองปรากฏว่าที่เวลา 9.15 น. พบเซลล์ที่อยู่ในระยะเมตาเฟสจำนวนมาก รูปร่างของโครโมโซมมีลักษณะเป็นแท่งหดสั้นเห็นได้ชัดเจน สามารถตรวจนับจำนวนโครโมโซมได้ ส่วนที่เวลา 9.30 น. เซลล์ที่พบส่วนใหญ่มีลักษณะหดสั้น แต่ไม่กระจายตัวววมเป็นกระจุกเห็นโครโมโซมไม่ชัดเจน และที่เวลา 9.45 น. โครโมโซมมีลักษณะหดตัวสั้น เซลล์ส่วนใหญ่เริ่มเข้าสู่ระยะแอนาเฟสเริ่มมีการดึงโครโมโซมไปที่ขั้วเซลล์ของด้านตรงข้าม (Figure 1, G - I) การหาเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างรากของกล้วยไม้มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากจะได้เซลล์ของพืชที่นิวเคลียสมีการแบ่งตัวอยู่ในระยะเมตาเฟสเป็นจำนวนมาก ทำให้ง่ายต่อการศึกษาโครโมโซม ในกล้วยไม้แต่ละชนิดมีเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างรากที่แตกต่างกัน เช่น กล้วยไม้ดินช้าง

ผสมไข่ ควรเก็บปลายรากเวลา 11.00 น.(จารุภัทร และฉันทนา, 2549) กุหลาบเหลืองโคราชและข้างสารภี ควรเก็บตัวอย่าง รากเวลา 8.30-9.00 น.(Runggruchkanont, 1996) กล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมควรเก็บตัวอย่างช่วงระหว่าง 7.00 – 10.00 น. (ศิริพร, 2546)

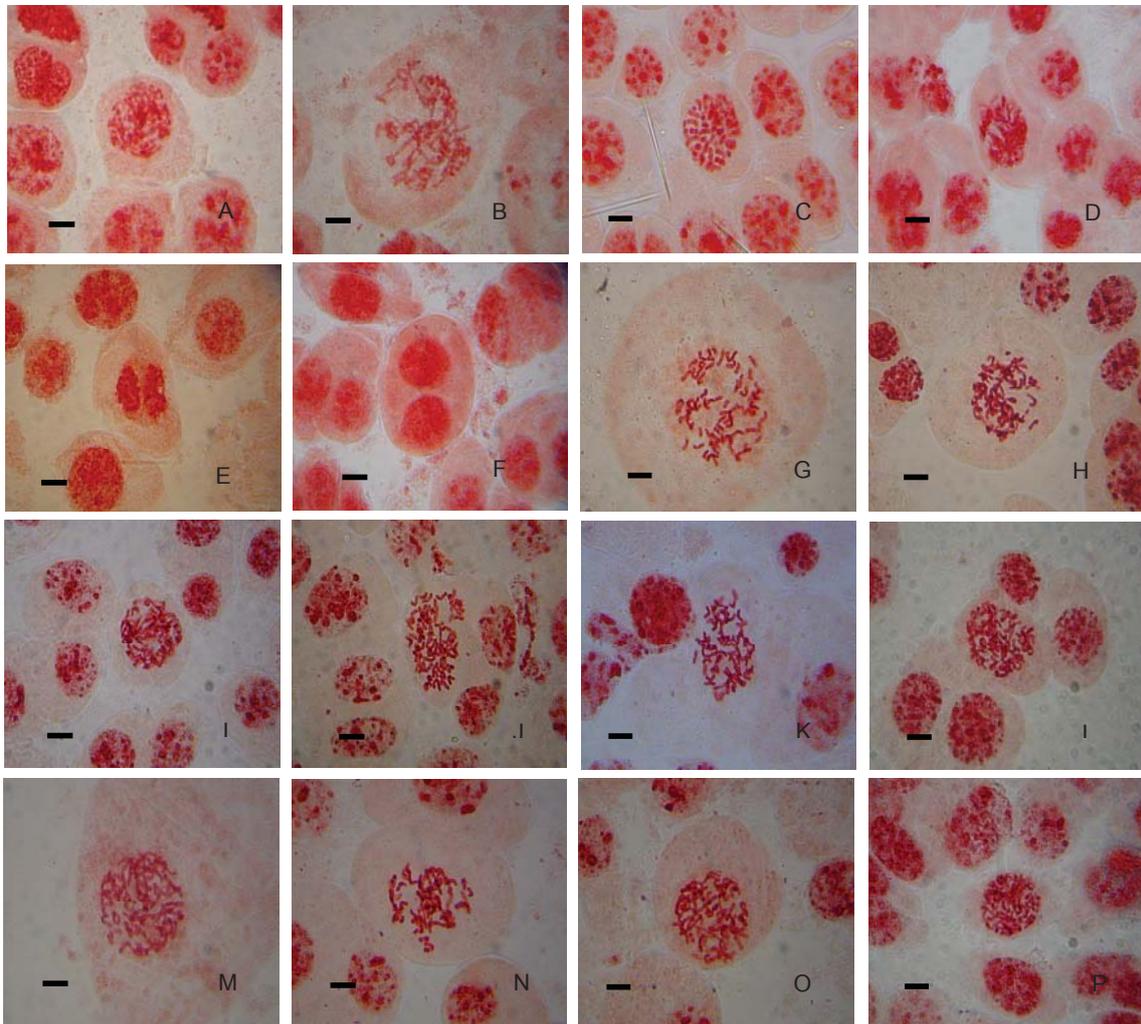


Figure 1 Somatic chromosome of *Doritis* root-tip cells:

(A – F) sampling at different duration of time; (A) 7.00 am. chromosomes in prophase, (B) 8.00 am. chromosome in early metaphase, (C) 9.00 am. chromosomes in metaphase, (D) 10.00 am. chromosome in early anaphase, (E) 11.00 am. chromosomes in anaphase, (F) 12.00 am. chromosomes in telophase
 (G – I) sampling between 9.00 – 10.00 am.; (G) 9.15 am. most chromosomes in metaphase , (H) 9.30 am. chromosomes in late metaphase, (I) 9.45 am. chromosomes in early anaphase
 (J – P) treated root- tip in 0.002 M 8 – hydroxyquinoline at different duration time; (J) 1 hour, (K) 2 hours, (L) 3 hours, (M) 4 hours, (N) 5 hours, (O) 6 hours, (P) 7 hours

Bar = 10 μ m

3. ความยาวนานที่เหมาะสมในการหยุดวงซีพีเซลล์

การทดลองหยุดวงซีพีเซลล์ในสารละลาย 8- hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส นาน 1, 2, 3, 4, 5, 6, และ 7 ชั่วโมง โดยใช้ปลายรากที่เก็บเวลา 9.15 น. พบว่าให้ผลที่ไม่แตกต่างกันคือ ภายในเซลล์มีโครโมโซมที่หดตัวสั้น เห็นรูปร่างของโครโมโซมได้ชัดเจน (Figure 1, J - P) ดังนั้นจึงเป็นวิธีการที่ดีที่ช่วยลดเวลาในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากโดยไม่ต้องใช้เวลาในการหยุดวงซีพีเซลล์เป็นเวลานานก็สามารถเห็นโครโมโซมชัดเจนและตรวจนับจำนวนได้ ถ้าทำการเก็บตัวอย่างรากในเวลาที่เหมาะสม ซึ่งตามวิธีการมาตรฐานของ Tanaka และ Kamemoto (1984) ใช้เวลานั้นตอนนี้นาน 3-5 ชั่วโมง

4. จำนวนโครโมโซม

การศึกษาโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก พบว่า กล้วยไม้แดงอุบลมีจำนวนโครโมโซม $2n = 76$ (Figure 2) ซึ่งผลการศึกษานี้ได้สอดคล้องกับที่ Tanaka และ Kamemoto (1984) ได้รายงานว่ากล้วยไม้แดงอุบลมีจำนวนโครโมโซม $2n = 76$



Figure 2 Chromosome numbers of *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*, $2n = 76$, Bar = 10 μ m

สรุป

การทดลองเพื่อหาเทคนิคที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้สกุลม้าวิง เพื่อศึกษาโครโมโซมพบว่าวิธีที่เหมาะสมที่สุดคือ การเก็บตัวอย่างปลายรากที่เวลา 9.15 น. แต่ตัวอย่างปลายรากเพื่อหยุดวงซีพีเซลล์ในสารละลาย 8 - hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M นาน 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อปลายราก และจากการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่า เซลล์ปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบล มีจำนวนโครโมโซม $2n = 76$

คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

- จารุกัทร ประราศรี และฉันทนา สุวรรณธาดา. 2549. การศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้ดินช้างผสมโขลง. วารสารเกษตร 22(3): 188-193.
ระพี สาคริก. 2549. หอมกลิ้งกล้วยไม้ : สกุลดอกโรทีส. คม ชัด ลึก วันอาทิตย์ที่ 7 พฤษภาคม
ระพี สาคริก. 2517. การเพาะปลูกกล้วยไม้ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย. ชวนพิมพ์, กรุงเทพฯ.
ศิริพร เชื้อจีน. 2546. การศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์และความสมบูรณ์พันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวายบางพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
สมศักดิ์ รักไพบูลย์สมบัติ. 2535. ทำเนียบกล้วยไม้ไทย. สุริวงศ์บุ๊คเซนเตอร์, เชียงใหม่.
Kamemoto, H., R. Tanaka and K. Kosaki. 1961. Chromosome numbers of orchids in Hawaii. Univ. Hawaii Agr. Exp. Sta. Bull. 127:1 – 28.
Rungruchkanont, K. 1996. Studies on Seed Germination and Plant Growth Development of Thai Wild Orchid, *Aerides houlletiana* and *Acampe rigida*. M.S. Thesis, University of Mahidol.
Tanaka, R. and H. Kamemoto. 1984. Chromosome in orchids : Counting and numbers, p.323-410. In : J. Arditti (ed.). Orchid Biology Reviews and Perspectives, III. Cornell Univ. Press, New York.



การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 7
THE 7th NATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS 2008



ขออภัยประกาศเกียรติคุณรางวัลชมเชย

ในการนำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ สาขาไม้ดอกไม้ประดับ
ประเภทนักวิจัย

ให้เท่า

คุณกาญจนา รุ่งรัชกานนท์

มอบให้ไว้ ณ วันที่ 29 พฤษภาคม พ.ศ. 2551

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิระศักดิ์ จายประสาท)

คณบดีคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยเกษตร จังหวัดพิษณุโลก

NARESUAN

UNIVERSITY



วารสาร

ISSN 0125-0369

วิทยาศาสตร์เกษตร

AGRICULTURAL SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 40 ฉบับที่ 3 (พิเศษ) กันยายน - ธันวาคม 2552

Vol.40 No.3 (Suppl.) September - December 2009



“พืชสวนไทยบนเส้นทางสู่ความยั่งยืน”



การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ ๘
THE 8th NATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS 2009

6-9 พฤษภาคม 2552 ณ โรงแรม ดิ เอ็มเพรส เชียงใหม่

การศึกษาจำนวนโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิงจากดอกอ่อนและปลายราก
Study on Chromosome Numbers of *Doritis* Orchid from Flower Buds and Root Tips

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์^{1*}
Karnchana Rungruchkanont^{1*}

Abstract

Chromosome numbers of three *Doritis* orchid varieties, *Dor. pulcherrima* var. *buyssoniana*, *Dor. pulcherrima* and *Dor. pulcherrima* var. *chumpornnensis* were investigated during meiotic and mitotic cell division. Meiotic chromosome numbers from flower buds of $n = 38$ were reported for *Dor. pulcherrima* var. *buyssoniana*; and $n = 19$ for *Dor. pulcherrima* and *Dor. pulcherrima* var. *chumpornnensis*. 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.

Keywords: Chromosome, *Doritis* spp., Orchid

บทคัดย่อ

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิง 3 สายพันธุ์ คือ กล้วยไม้แดงอุบล กล้วยไม้ม้าวิง และกล้วยไม้ม้าบิน ได้ทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมเมื่อมีการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์จากดอกอ่อนและเมื่อมีการแบ่งเซลล์ร่างกายจากปลายราก ผลการศึกษาพบว่า จำนวนโครโมโซมจากดอกอ่อนของกล้วยไม้แดงอุบล $n = 38$ กล้วยไม้ม้าวิง $n = 19$ และกล้วยไม้ม้าบิน $n = 19$ ส่วนจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบล $2n = 76$ กล้วยไม้ม้าวิง $2n = 38$ และกล้วยไม้ม้าบิน $2n = 38$

คำสำคัญ: กล้วยไม้ โครโมโซม สกุลม้าวิง

คำนำ

การศึกษาจำนวนโครโมโซมสามารถทำได้ขณะที่พืชมีการแบ่งเซลล์ ทั้งเซลล์ร่างกาย (mitotic cell division) และเซลล์สืบพันธุ์ (meiotic cell division) mitotic cell division หรือ mitosis เป็นการแบ่งเซลล์ร่างกายเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มากเป็นทวีคูณ ทำให้สิ่งมีชีวิตเจริญเติบโตและถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมไปยังเซลล์ลูก โดยมีสารพันธุกรรม (genetic material) เหมือนเซลล์เดิมทุกประการ การศึกษาจำนวนโครโมโซมโดยการแบ่งเซลล์แบบ mitosis จึงนิยมทำในส่วนของปลายรากที่กำลังเจริญ จำนวนโครโมโซมที่ได้ คือ $2n$ เท่ากับเซลล์ตั้งต้น ส่วน meiotic cell division หรือ meiosis เป็นการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ที่มีการลดจำนวนโครโมโซมลงครึ่งหนึ่งของเซลล์ตั้งต้น จำนวนโครโมโซมที่ได้ คือ n นิยมศึกษาโครโมโซมจากส่วนของ pollen mother cell (PMC) ในอับเรณู เพราะมีจำนวนมาก (นิตยศรี, 2542) การศึกษาโครโมโซมนิยมศึกษาจากเซลล์ร่างกาย เนื่องจากเห็นรูปร่างได้ชัดเจนกว่า ทำให้นับจำนวนโครโมโซมได้ง่าย และสามารถศึกษาคาริโอไทป์ เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ ศึกษาอนุกรมวิธานและวิวัฒนาการ การศึกษาโครโมโซมจาก PMC ในดอกอ่อนใช้ในการศึกษาการจับคู่ของโครโมโซมที่เหมือนกันหรือทำนายการเจริญพันธุ์ การนับจำนวนโครโมโซมทำได้ง่ายกว่าในด้านของจำนวน เนื่องจากนับจำนวนโครโมโซมขณะที่โครโมโซมคู่เหมือนจับคู่แนบชิดกันเป็น bivalent ในระยะ diakinesis ทำให้เห็นจำนวนโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่ง นอกจากนั้นการศึกษาโครโมโซมจากดอกอ่อน *Arabidopsis thaliana* ในระยะ pachytene ยังสามารถใช้ในการศึกษารูปร่าง จำแนกโครโมโซมโดยการติดสีบนโครโมโซมด้วยวิธี Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (Schubert *et al.*, 2001)

กล้วยไม้สกุลม้าวิงเป็นกล้วยไม้สกุลเล็กๆ ที่มีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย ที่นิยมปลูกเลี้ยงและนำมาใช้ในการเป็นพ่อแม่พันธุ์คือ กล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) กล้วยไม้ม้าวิง (*Doritis pulcherrima*) และกล้วยไม้ม้าบิน (*Doritis pulcherrima* var. *chumpornnensis*) มีรายงานการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายราก กล้วยไม้แดงอุบล $2n = 76$ กล้วยไม้ม้าวิง $2n = 38$ และจำนวนโครโมโซมจากดอกอ่อนกล้วยไม้ม้าวิง $n = 19$ (กาญจนา และคณะ,

¹ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190

¹ Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand 34190

* Corresponding author: rungruch@hotmail.com

2551; Tanaka and Kamemoto, 1984) แต่ยังไม่มียารงานจำนวนโครโมโซมกล้วยไม้ม้าบิน หรือการศึกษาโครโมโซมจากเซลล์สืบพันธุ์ของกล้วยไม้แดงอุบลและกล้วยไม้ม้าบิน และการศึกษาลักษณะคาร์ิโอไทป์ของกล้วยไม้สกุลนี้ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความโดดเด่นของดอกที่แตกต่างกันในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลนี้ การศึกษาโครโมโซมจากดอกอ่อนและปลายรากครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งแต่ละชนิด เพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษารูปร่างและจำแนกโครโมโซม รวมทั้งพฤติกรรมการจับคู่ของโครโมโซม อันจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์และศึกษาด้านวิวัฒนาการในอนาคต

วิธีการทดลอง

การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจากดอกอ่อนและระยะการแบ่งเซลล์แบบ meiosis

เลือกดอกตูมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง 3 สายพันธุ์ คือ แดงอุบล ม้าวิ่ง และม้าบิน ที่มีขนาดประมาณ 1 ใน 4 ของดอกตูมใกล้บาน เก็บดอกในช่วงเวลา 9.00-10.00 น. ผ่าดอกและแกะก้อนเรณู (pollinia) จำนวนเล็กน้อยวางบน slide หยด acetic acid 45% ที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 5 นาที ซับกรด acetic acid ออกแล้วย้อมด้วยสี aceto-orcein 1-2 หยด เป็นเวลา 2-3 นาที ปิด cover slip แล้วให้ความร้อน หลังจากนั้นใช้ปลายดินสอเคาะเบาๆ เพื่อให้โครโมโซมกระจายตัว ซับสีส่วนเกินออก เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในระยะ diakinesis จำนวน 10 เซลล์ เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม และเลือกเซลล์อื่นๆ เพื่อศึกษาระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์ pollen mother cell (PMC) ทำการบันทึกภาพได้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจากปลายราก

ศึกษาโครโมโซมจากปลายรากอ่อนของต้นกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง 3 สายพันธุ์ โดยใช้รากกล้วยไม้แดงอุบลและกล้วยไม้ม้าวิ่งที่อยู่ในโรงเรือนสภาพธรรมชาติ และรากกล้วยไม้ม้าบินที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ เลือกรากที่กำลังมีการเจริญโดยสังเกตจากรากที่มีสีเขียวใสและปลายรากมีสีขาวขุ่นเล็กน้อย ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างรากโดยทำการเก็บตัวอย่างปลายรากอ่อนในช่วงเวลา 9.00 น. ถึง 10.00 น. ทำการตัดส่วนปลายของรากมา 1-2 มิลลิเมตร แล้วหยุดวงชีพของเซลล์เนื้อเยื่อปลายรากในสารละลาย 8-hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 M เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10°C แล้วเท 8-hydroxyquinoline ออก ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จากนั้นตรึงเซลล์ในน้ำยาคาร์นอย (Carnoy's solution) แล้วแช่ในตู้เย็น อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ล้างปลายรากให้สะอาดก่อนนำไปย่อยแยกเซลล์ใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 2-3 นาที ล้างน้ำ 4-5 ครั้ง เก็บตัวอย่างรากใน acetic acid 45 % อย่างน้อย 1 ชั่วโมง นำปลายราก วางบนแผ่น slide ตัดเฉพาะปลายรากยาวประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร หยดสี aceto-orcein 1-2 หยด แล้วใช้ปลายเข็มเขี่ยแยกเซลล์ของปลายรากออกจากกันให้มากที่สุดแล้วทิ้งไว้ 5-10 นาที ในกล่องขึ้นซึ่งอ้อมตัวด้วยไอ acetic acid 45 % นำแผ่น slide มาปิดด้วย cover slip แล้วผ่านเปลวไฟจากตะเกียง alcohol พออุ่นวาง slide บนแผ่นกระดาษซับใช้แผ่นกระดาษซับอีกแผ่นวางทับด้านบน ใช้นิ้วหัวแม่มือค่อยวางบนกระดาษซับกดลงไปในแนวตั้งจากเพื่อให้เซลล์แบนที่สุดเท่าที่จะทำได้ นำแผ่น slide ไปศึกษาเซลล์ปลายรากได้กล้องจุลทรรศน์เลือกเซลล์ที่นิวเคลียสมีการแบ่งตัวอยู่ในระยะ metaphase จำนวน 10 เซลล์ นับจำนวนโครโมโซมแล้วบันทึกภาพได้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจากดอกอ่อนและระยะการแบ่งเซลล์แบบ meiosis

การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากดอกอ่อนและระยะการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง พบว่าในดอกตูมที่มีขนาดเล็กเป็นระยะที่เหมาะสมในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบ meiosis เรณูแต่ละเรณูที่กำลังแบ่งเซลล์จะมีระยะการแบ่งเซลล์ที่แตกต่างกัน แต่เนื่องจากเรณูมีจำนวนมากและการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจึงทำให้สามารถเห็นระยะการแบ่งเซลล์ prophase metaphase anaphase telophase และการแบ่ง meiosis ระยะที่สอง จนได้ microspore quartet (Figure 1) กล้วยไม้ส่วนใหญ่มีการแบ่งเซลล์ของ PMC เกิดขึ้นพร้อมกัน แต่ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งพบการแบ่งเซลล์ของ PMC เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเหมือนกล้วยไม้บางชนิดในสกุล Paphiopedilum Selenipedium และ Cypridedium (Yeung, 1987) การนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์สืบพันธุ์ในระยะ diakinesis ของการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ใน PMC เป็นการนับขณะที่โครโมโซมคู่เหมือนจับคู่และแนบชิดกันทำให้เห็นจำนวนโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่ง โดยพบว่ากล้วยไม้แดงอุบลมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 38 ส่วนกล้วยไม้ม้าวิ่งและม้าบิน มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 19 (Figure 2) การนับโครโมโซมจากเซลล์สืบพันธุ์มีประโยชน์มากในกรณีนี้ที่พืชนั้นมีจำนวนโครโมโซมมาก ซึ่งทำให้การนับง่ายขึ้นและความผิดพลาดน้อยกว่าการนับจำนวนโครโมโซมแต่ละแท่งจากเซลล์ร่างกาย (Tyagi, 2002)

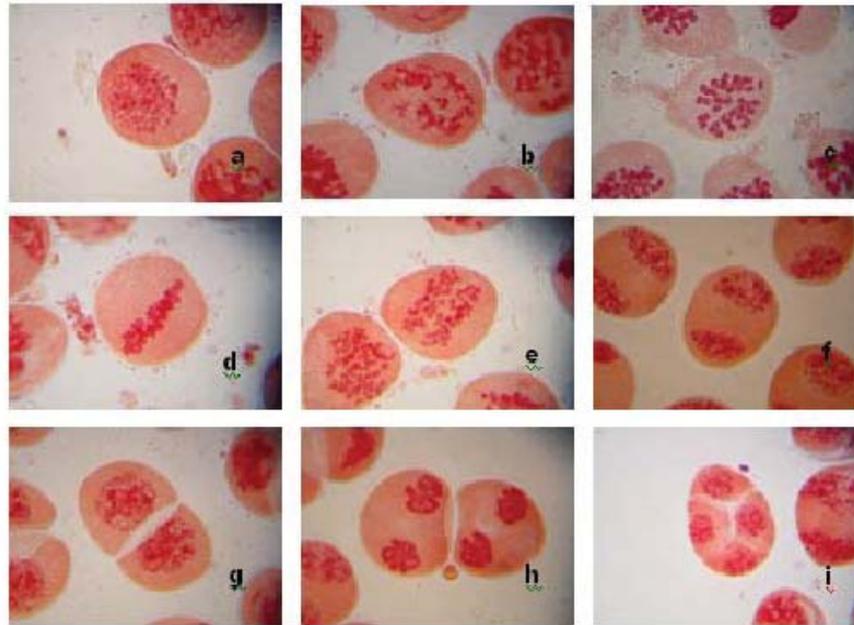


Figure 1 Different stages of meiotic cell division from *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* flower buds (a) zygotene, (b) pachytene, (c) diakinesis, (d) metaphase I, (e) anaphase I, (f) telophase I, (g) prophase II, (h) telophase II, (i) microspore quartet

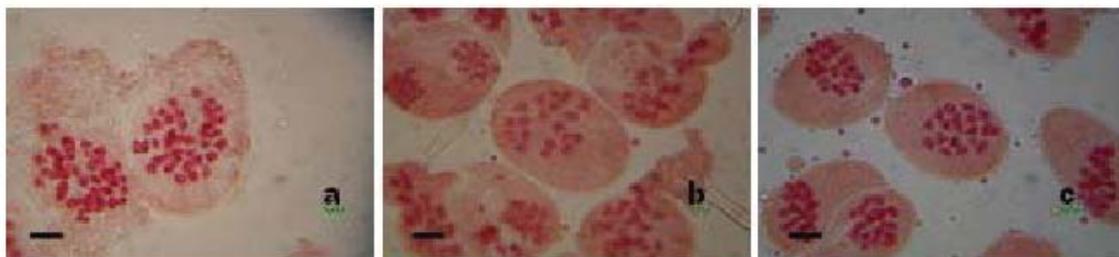


Figure 2 Meiotic chromosome numbers from *Doritis* flower buds, Bar = 10 μ m
 (a) *Dor. pulcherrima* var. *buyssoniana*, $2n$ (bivalent) = $n = 38$
 (b) *Dor. pulcherrima*, $2n$ (bivalent) = $n = 19$
 (c) *Dor. pulcherrima* var. *chumpornnensis*, $2n$ (bivalent) = $n = 19$

การศึกษาโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิงจากปลายราก

การเก็บตัวอย่างปลายรากจากต้นที่อยู่ในโรงเรือนนั้น จะทำการเก็บตัวอย่างปลายราก 2 สายพันธุ์ คือ แดงอุบลและม้าวิง พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการเก็บหรือเวลาที่สามารถพบเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในระยะ metaphase ของทั้งสองสายพันธุ์ จะแตกต่างกันคือ แดงอุบลเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างราก 9.30 น. ส่วนม้าวิงเวลา 9.45 น. ซึ่งเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างรากจากต้นที่อยู่ในโรงเรือนจะช้ากว่าการเก็บตัวอย่างรากจากต้นที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ กาญจนา และคณะ (2551) รายงานเวลาที่เหมาะสมสำหรับเก็บรากแดงอุบลในสภาพปลอดเชื้อ คือ เวลา 9.15 น. ม้าวิงในสภาพปลอดเชื้อควรเก็บรากเวลา 9.30 น. ส่วนการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากรากม้าวินที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าเวลาที่เหมาะสมคือ 9.30 น. ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกันกับม้าวิง และจากการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่า แดงอุบล มีจำนวนโครโมโซม $2n = 76$ ม้าวิง มีจำนวนโครโมโซม $2n = 38$ และม้าวินมีจำนวนโครโมโซม $2n = 38$ (Figure 3) เท่ากับในรายงานของ Tanaka and Kamemoto (1984) ที่รายงานว่ากล้วยไม้แดงอุบล มีจำนวนโครโมโซม $2n = 76$ และม้าวิง $2n = 38$ จากจำนวนโครโมโซมที่เท่ากันของม้าวิงและม้าวิน $2n = 38$ และเป็นครึ่งหนึ่งของแดงอุบล $2n = 76$ มีความสอดคล้องกับลักษณะพื้นฐานวิธานของต้นและดอก โดยขนาดของต้น ใบ และดอกกล้วยไม้ม้าวิงและม้าวินมีขนาดใกล้เคียงกัน ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลมีขนาดของต้น ใบ และดอกใหญ่กว่าม้าวิงและม้าวินเกือบเท่าตัว

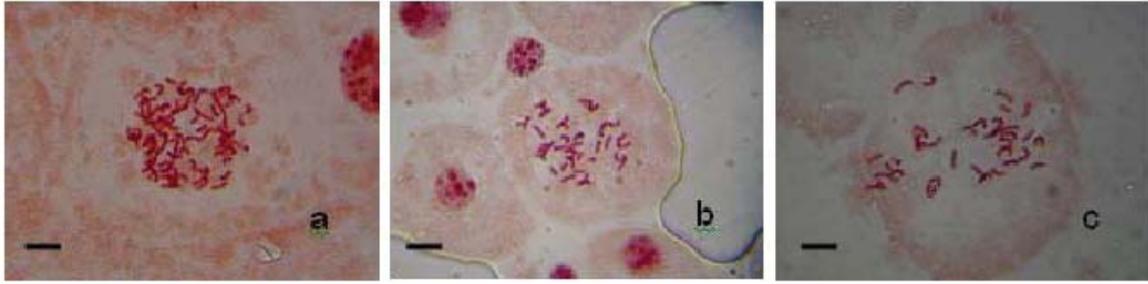


Figure 3 Somatic chromosome numbers from *Doritis* root tips, Bar = 10 μ m

(a) *Dor. pulcherrima* var. *buyssoniana*, $2n = 76$

(b) *Dor. pulcherrima*, $2n = 38$

(c) *Dor. pulcherrima* var. *chumpornnensis*, $2n = 38$

สรุป

จำนวนโครโมโซมจากดอกอ่อนของกล้วยไม้แดงอุบล $n = 38$ กล้วยไม้ม้าวิ่ง $n = 19$ และกล้วยไม้ม้าบิน $n = 19$ ส่วนจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบล $2n = 76$ กล้วยไม้ม้าวิ่ง $2n = 38$ และกล้วยไม้ม้าบิน $2n = 38$

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ และคุณแสงเดือน พลเยี่ยม ผู้ช่วยในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กาญจนา รุ่งรัชกานนท์, ศรีประไพ ธรรมแสง และแสงเดือน พลเยี่ยม. 2551. การศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (บทคัดย่อ). การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 7 จังหวัดพิษณุโลก 26-30 พฤษภาคม 2551. น. 151.
- นิตยศรี แสงเดือน. 2542. พันธุศาสตร์พืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 265 น.
- Schubert, I., P.F. Fransz, J. Fuchs and J.H. de Jong. 2001. Chromosome painting in plants. *Methods in Cell Science*. 23: 57-69.
- Tanaka, R. and H. Kamemoto. 1984. Chromosomes in orchids: counting and numbers. *In* J. Arditti. *Orchid Biology reviews and perspectives*, III. Cornell University Press, London. p. 323-410.
- Tyagi, A.P. 2002. Cytogenetics and reproductive biology of some BELE (*Abelmoschus manihot* Linn., Medic sub-species *manihot*) cultivars. *S. Pac. J. Nat. Sci.* 20: 4-8.
- Yeung, E.C. 1987. Development of pollen and accessory structures in orchids. *In* J. Arditti. *Orchid Biology reviews and perspectives*, IV. Cornell University Press, London. p.193-226 .



เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๔๘ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เล่มที่ 1 สาขาพืช

(Subject: Plants)



ฟื้นเศรษฐกิจชาติ เกษตรศาสตร์กู้วิกฤต พิชิตโลกร้อน

The Roles of Agriculture Science in Fueling Economic Revival, Resolving the Crisis and Battling Global Warming





มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขอรับรองว่าผลงานวิจัย

เรื่อง

พฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวีง
และสายพันธุ์ลูกผสม

โดย

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ แสงเดือน พลเยี่ยม
และสมศักดิ์ อภิสิตธิวาณิช

ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ

สาขาพืช

และได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48
ระหว่างวันที่ 3 - 5 กุมภาพันธ์ 2553

(รองศาสตราจารย์ ดร.พนิต เข้มทอง)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ประธานคณะกรรมการดำเนินงานจัดประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 48

เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 48 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
The Proceeding of 48th Kasetsart University Annual Conference

เล่มที่ 1 สาขาพืช
(Subject: Plants)

จัดโดย (Organized by)

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (Kasetsart University)

ร่วมกับ (in cooperation with)

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (Commission of Higher Education)

กระทรวงศึกษาธิการ (Ministry of Education)

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (Ministry of Agriculture and Cooperatives)

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (Ministry of Science and Technology)

กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

(Ministry of Natural Resource and Environment)

กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร

(Ministry of Information and Communication Technology)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (National Research Council of Thailand)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (The Thailand Research Fund)

3 - 5 กุมภาพันธ์ 2553 (3 - 5 February 2010)

ISBN 978-616-7262-31-4

พฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวิงและสายพันธุ์ลูกผสม

Meiotic Behavior in *Doritis* spp. and *Doritis* Hybrids

แสงเดือน พลเยี่ยม¹ กาญจนา รุ่งรัชกานนท์¹ และสมศักดิ์ อภิสทิธาณิช²

Sangdaun Phonyiam¹ Kamchana Rungruchkanont¹ and Somsak Apisitwanich²

บทคัดย่อ

จากการศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวิงและสายพันธุ์ลูกผสม โดยศึกษาลักษณะการเข้าคู่กันของโครโมโซมและการสร้างไมโครสปอร์ในกล้วยไม้แดงอุบล ม้าวิง และสายพันธุ์ลูกผสม พบว่า กล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิงมีการเข้าคู่กันของโครโมโซมในระยะ diakinesis ปกติ คือ โครโมโซมมีการเข้าคู่กันเป็น bivalent จำนวน 38 และ 19 คู่ ตามลำดับ ส่วนในสายพันธุ์ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิงบลู และลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล มีการเข้าคู่กันของโครโมโซมที่ผิดปกติ คือ พบทั้งแบบ univalent, bivalent และ trivalent โดยพบโครโมโซมที่เข้าคู่กันเป็น bivalent จำนวน 19.6 และ 19.55 คู่ ตามลำดับ จากความผิดปกติของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในลูกผสมทำให้มีเปอร์เซ็นต์ของโครโมโซมที่เคลื่อนไปสู่ขั้วเซลล์ช้ากว่าปกติ (chromosome lagging) และโครโมโซมที่มีโครงสร้างคล้ายสะพาน (chromosome bridge) สูง ทำให้มีการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็นปกติ (tetrad) เพียง 56 และ 73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิง มีการสร้างไมโครสปอร์ที่เป็นปกติ (tetrad) สูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ พฤติกรรมที่เกิดขึ้นนี้แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกล้วยไม้แดงอุบลกับม้าวิงและม้าบินซึ่งจัดอยู่ในสกุลเดียวกัน

ABSTRACT

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. In two hybrids, *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* x *Doritis pulcherrima* and *Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis* x *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*, chromosome synapsis were abnormal. The univalent, bivalents and trivalents were observed. The bivalent chromosome number of both hybrids were 19.6 and 19.55, respectively. Because of abnormally meiotic configuration, the high percentage of chromosome lagging and chromosome bridge were found in both hybrids, consequencing both hybrids had normal tetrad microspores only 56 and 73 percent, respectively. Normally, *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* and *Doritis pulcherrima* had high percentage of normal tetrad microspores upto 99 percent. This meiotic behavior revealed the genetic differences among *Doritis* spp.

Key Words : meiotic behavior, *Doritis*, hybrid

K. Rungruchkanont : rungruch@hotmail.com

¹ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ubonratchathane University

² ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University

คำนำ

กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis*) เป็นกล้วยไม้ที่ขึ้นบนดินหรือเป็นกล้วยไม้อิงอาศัยบนหิน (terrestrial plant หรือ lithophytic plant) ในสภาพธรรมชาติพบเกิดขึ้นเป็นกลุ่มตามพื้นที่ทรายเป็นชอกหินหรือบนหิน หรือในแหล่งที่มีอินทรีย์วัตถุทับถมและตามป่าโปร่ง (อบจันท์, 2545) กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเป็นกล้วยไม้สกุลเล็กๆ ที่มีเพียงไม่กี่ชนิดในโลก ประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดทางธรรมชาติของกล้วยไม้สกุลนี้ ซึ่งประกอบด้วย กล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) กล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) และกล้วยไม้ม้าบิน (*Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis*)

การศึกษาพฤติกรรมกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเป็นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญในด้านของการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเป็นการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งจะแสดงลักษณะหรือพฤติกรรมการเข้าคู่กันของโครโมโซมในระหว่างที่มีการแบ่งเซลล์ ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ทางด้านพันธุศาสตร์ของต้นพ่อและต้นแม่ที่ทำการผสม โดยเฉพาะในลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างชนิดหรือระหว่างสกุลของพืชสองชนิดที่มีจีโนมแตกต่างกัน ซึ่งจะมีผลต่อการเข้าคู่กันของโครโมโซมในระหว่างที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสและการรวมตัวกันของยีน หากลักษณะจีโนมของสายพันธุ์พ่อและแม่แตกต่างกันมาก จะเกิดการเข้าคู่กันไม่ได้ของโครโมโซมคู่เหมือน (Winston *et al.*, 2001 ; Ruualcaba-Ruiz and Rodriguez-Garay, 2002) ทำให้เกิดความผิดปกติในระหว่างการแบ่งเซลล์หรือเมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์ ส่งผลให้เกิดความเป็นหมันหรือความสมบูรณ์พันธุ์ลดลงในลูกผสม Swanson (1957) ได้รายงานไว้ว่า ต้นพืชเมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์และมีการสร้างไมโครสปอร์ที่ผิดปกติมักจะมีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ โดยปกติในกล้วยไม้มีไมโครสปอร์เป็น 4 เซลล์ติดกัน หรือที่เรียกว่าเททเรด (ศิริพร, 2546) ซึ่งลักษณะไมโครสปอร์ที่แตกต่างจากปกติแสดงถึงระดับของความสมบูรณ์พันธุ์ในลูกผสม ดังนั้นการศึกษาพฤติกรรมกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสจึงมีความสำคัญ สามารถอธิบายสาเหตุของความเป็นหมันตลอดจนคาดคะเนจำนวนโครโมโซมในลูกผสมรุ่นต่อไปได้ (Kamemoto *et al.*, 1961)

วิธีการทดลอง

ลักษณะการเข้าคู่กันของโครโมโซมในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม

เลือกดอกตูมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งสองสายพันธุ์คือแดงอุบลและม้าวิ่ง ส่วนสายพันธุ์ลูกผสมคือแดงอุบล x ม้าวิ่งบลู และ ม้าบิน x แดงอุบล ที่มีขนาดดอกประมาณ 1 ใน 4 ของดอกตูมใกล้บาน ทำการผ่าดอกและแกะก้อนเรณู (pollinia) จำนวนเล็กน้อยวางบนสไลด์ หยด acetic acid 45 เปอร์เซ็นต์ 1-2 หยด ลงบนก้อนเรณู วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 10⁰ซ เป็นเวลา 5 นาที ซ้ำ acetic acid ออก แล้วย้อมด้วยสี aceto orcein 1-2 หยด เป็นเวลา 2-3 นาที ปิด cover slip แล้วให้ความร้อน (ครุฑ, 2547) หลังจากนั้นใช้ปลายดินสอเคาะเบาๆ เพื่อให้โครโมโซมกระจายตัว ซ้ำสีส่วนเกินออก เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในระยะ diakinesis เพื่อศึกษาลักษณะการเข้าคู่กันของโครโมโซมในแบบต่างๆ (univalent, bivalent, trivalent และ quadrivalent) และความผิดปกติที่เกิดขึ้นในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในระยะ anaphase I และ telophase I แล้วบันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยาย 1,000 เท่า

การสร้างไมโครสปอร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิงและสายพันธุ์ลูกผสม

เลือกดอกตูมของกล้วยไม้สกุลม้าวิงสองสายพันธุ์คือแดงอุบลและม้าวิง ส่วนสายพันธุ์ลูกผสมคือแดงอุบล x ม้าวิงบลู และ ม้าบิน x แดงอุบล ที่มีขนาดดอกประมาณ 1 ใน 3 ของดอกตูมใกล้บาน ทำการผ่าดอกและแกะก้อนเรณู จำนวนเล็กน้อยวางบนสไลด์ หยด acetic acid 45 เปอร์เซ็นต์ 1-2 หยด ลงบนก้อนเรณู วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 5 นาที ซับ acetic acid ออก แล้วย้อมด้วยสี aceto orcein 1-2 หยด เป็นเวลา 2-3 นาที ปิด cover slip แล้วให้ความร้อน หลังจากนั้นใช้ปลายดินสอเคาะเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัว ซับสีส่วนเกินออก ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยาย 1,000 เท่า ทำการตรวจนับลักษณะการสร้างไมโครสปอร์ จำนวน 300 เซลล์ และหาค่าเฉลี่ยของไมโครสปอร์แบบต่างๆ (monad, dyad, triad และ tetrad) ที่พบในแต่ละสายพันธุ์

ผลการทดลอง

ลักษณะการเข้าคู่กันของโครโมโซมในกล้วยไม้สกุลม้าวิงและสายพันธุ์ลูกผสม

จากการศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิงและสายพันธุ์ลูกผสม พบว่าพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้ทั้งแดงอุบลและม้าวิงซึ่งเป็นพันธุ์แท้มีความเป็นปกติ คือ มีการเข้าคู่กันของโครโมโซมแบบ bivalent ในระยะ diakinesis เฉลี่ย 38 และ 19 คู่ ตามลำดับ ส่วนในลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า การเข้าคู่กันของโครโมโซมผิดปกติ คือ พบทั้ง univalent, bivalent และ trivalent โดยในลูกผสมสายพันธุ์แดงอุบล x ม้าวิงบลู และม้าบิน x แดงอุบล พบลักษณะการเข้าคู่ที่เป็น bivalent เพียง 19.6 และ 19.55 คู่ ตามลำดับ (Fig. 1 และ 2)

นอกจากลักษณะการเข้าคู่กันของโครโมโซมแล้ว ยังพบว่าในระยะ anaphase I ของลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์มีโครโมโซมบางแท่งเคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วเซลล์ได้ช้ากว่าโครโมโซมอื่น (chromosome lagging) หรือโครโมโซมคู่เหมือนไม่แยกออกจากกันหรือแยกจากกันไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างคล้ายสะพาน (chromosome bridge) เกิดขึ้น ความผิดปกติดังกล่าวส่งผลให้เกิดการขาดหายไปหรือการเพิ่มขึ้นของโครโมโซมในรุ่นลูก โดยในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิงบลู มีเปอร์เซ็นต์การเกิด chromosome lagging และ chromosome bridge คิดเป็น 77 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล มีเปอร์เซ็นต์การเกิด chromosome lagging และ chromosome bridge สูงถึง 95.33 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Fig. 3) และในระยะ telophase I ทั้งในกล้วยไม้แดงอุบล ม้าวิง และสายพันธุ์ลูกผสม พบว่าในกล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิงมีลักษณะของเซลล์ปกติสูงถึง 99.66 และ 99.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนลักษณะเซลล์ที่เกิด micronucleus พบเป็นส่วนน้อยคือ 0.33 และ 0.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ในลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์พบลักษณะเซลล์ที่เกิด micronucleus สูงขึ้น โดยพบว่า ในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิงบลู มีเซลล์ที่พบ micronucleus คิดเป็น 19.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล พบเซลล์ที่เกิด micronucleus คิดเป็น 93.32 เปอร์เซ็นต์ (Fig. 4)

จากเปอร์เซ็นต์การเกิดความผิดปกติของโครโมโซมที่สูงในลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้จากการศึกษา อาจจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถใช้อธิบายสาเหตุของความไม่สมบูรณ์พันธุ์ที่เกิดขึ้นในกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสมได้ ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป

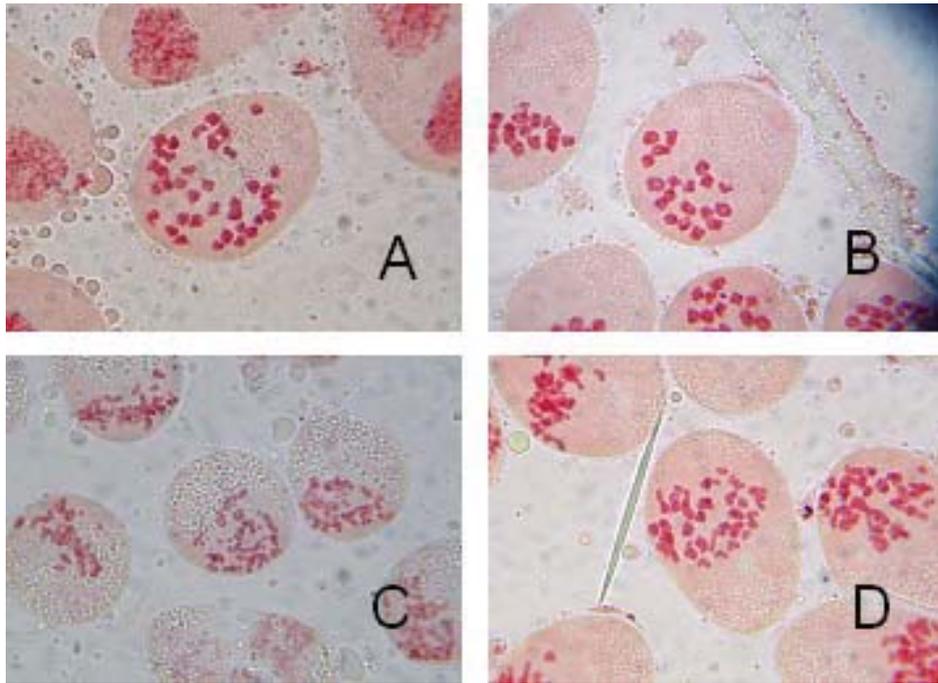


Figure 1 A synopsis of meiotic chromosomes in diakinesis.

- A *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* (38 pairs of bivalents)
- B *Doritis pulcherrima* (19 pairs of bivalents)
- C *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* x *Doritis pulcherrima* (univalents, bivalents and trivalents)
- D *Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis* x *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* (univalents, bivalents and trivalents)

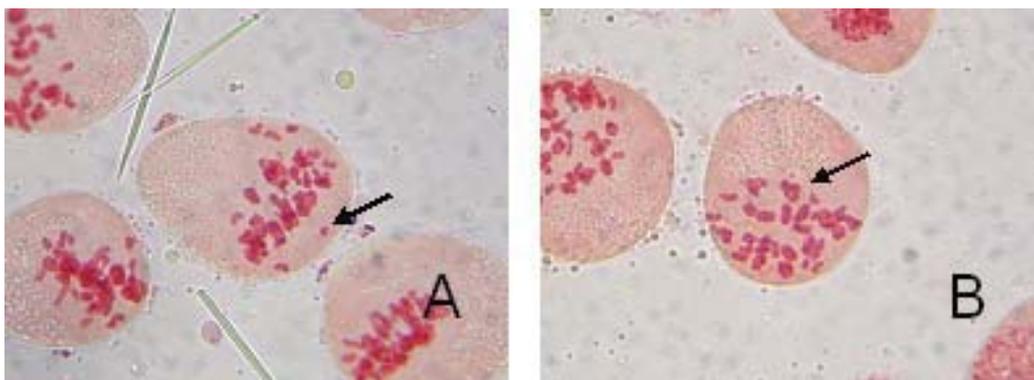


Figure 2 A synopsis of meiotic chromosome in diakinesis of *Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis* x *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*.

- A Univalent chromosome (arrow indicated)
- B Trivalent chromosome (arrow indicated)

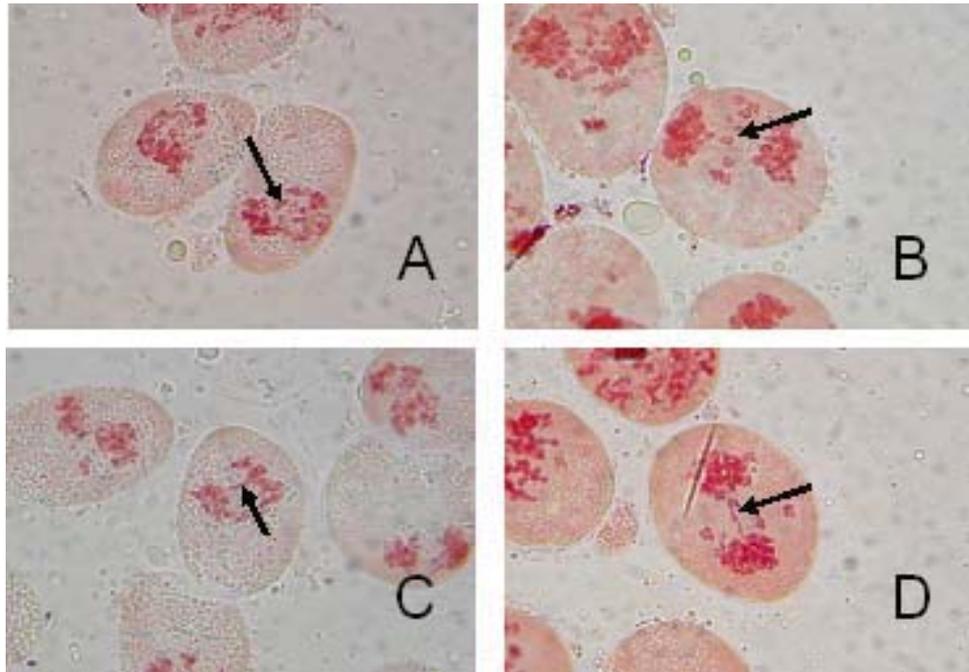


Figure 3 The formation of chromosome lagging and chromosome bridge in anaphase I of *Doritis* hybrids
 A Chromosome lagging of *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* x *Doritis pulcherrima* (arrow indicated)
 B Chromosome lagging of *Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis* x *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* (arrow indicated)
 C Chromosome bridge of *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* x *Doritis pulcherrima* (arrow indicated)
 D Chromosome bridge of *Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis* x *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* (arrow indicated)

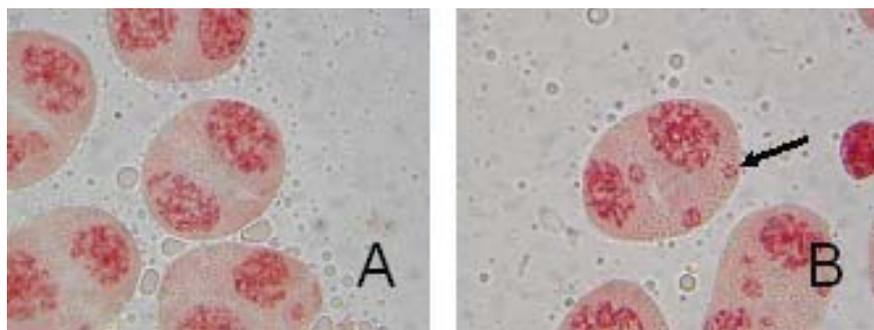


Figure 4 Abnormal cell division in telophase I of *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana* x *Doritis pulcherrima* .
 A Normal cell division
 B Abnormal cell division with micronucleus formation (arrow indicated)

การสร้างไมโครสปอร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิงและสายพันธุ์ลูกผสม

ลักษณะการสร้างไมโครสปอร์ของกล้วยไม้แดงอุบล ม้าวิง และสายพันธุ์ลูกผสม พบว่า ในกล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิง สร้างไมโครสปอร์ที่เป็น tetrad ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงคือ 99.22 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในลูกผสมสองสายพันธุ์ พบว่าในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิงบลู สร้างไมโครสปอร์ที่ผิดปกติมากที่สุดคือ พบทั้ง dyad (3.77 เปอร์เซ็นต์), triad (5.11 เปอร์เซ็นต์) และ tetrad (56 เปอร์เซ็นต์) ส่วนในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล การสร้างไมโครสปอร์มีความผิดปกติเช่นเดียวกัน โดยพบทั้ง dyad (1.33 เปอร์เซ็นต์), triad (2 เปอร์เซ็นต์) และ tetrad (73.11 เปอร์เซ็นต์) (Fig. 5)

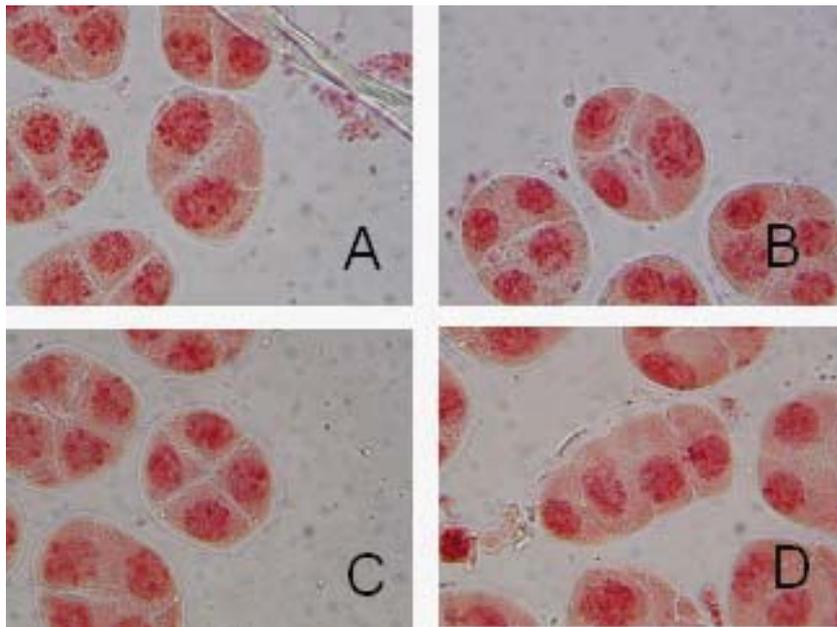


Figure 5 Microspore formation on *Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis* x *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*.

dyad (A), triad (B), tetrad (square) (C) and tetrad (linear) (D)

วิจารณ์ผลการทดลอง

พฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสใน pollen mother cell ของกล้วยไม้แดงอุบล ม้าวิง และสายพันธุ์ลูกผสม มีการเข้าคู่กันของโครโมโซมที่แตกต่างกัน โดยในกล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิงซึ่งเป็นสายพันธุ์แท้ มีการเข้าคู่กันของโครโมโซมเป็นแบบ bivalent ทั้งหมด ทำให้ระยะต่างๆในการแบ่งเซลล์เป็นปกติ เมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์จะพบ ไมโครสปอร์ที่เป็น tetrad สม่่าเสมอ ส่งผลให้มีความสมบูรณ์พันธุ์สูง

ส่วนในลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ คือ แดงอุบล x ม้าวิงบลู และม้าบิน x แดงอุบล การเข้าคู่กันของโครโมโซมมีความแปรปรวนคือพบทั้ง univalent, bivalent และ trivalent จากความผิดปกติในการเข้าคู่กันของโครโมโซมในระยะ diakinesis ที่เกิดขึ้น ส่งผลให้การแบ่งเซลล์ในระยะ anaphase I พบความผิดปกติแบบ chromosome lagging และ chromosome bridge ซึ่งจะมีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ สอดคล้องกับรายงานของ Ruualcaba-Ruiz and Rodriguez-Garay (2002) ที่ได้ศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสใน *Agave*

tequilana Weber var. azul และพบความผิดปกติแบบ chromosome lagging และ chromosome bridge ในระยะ anaphase I ในอัตรา 3 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยความผิดปกติดังกล่าวส่งผลให้ละอองเรณูเป็นหมันสูงถึง 42 เปอร์เซ็นต์ ในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล มีความถี่ในการเกิด chromosome lagging สูงถึง 95.33 เปอร์เซ็นต์ และเกิด chromosome bridge ต่ำกว่าในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่งบลู เมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์พบไมโครสปอร์ที่มีไซโตพลาสซึมแต่เฉพาะ tetrad คือพบทั้ง dyad, triad และ tetrad ในลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ ในลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล ซึ่งมีความผิดปกติในการแบ่งไมโอซิส I มากกว่าในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่งบลู แต่มีเปอร์เซ็นต์การสร้างไมโครสปอร์ที่เป็น tetrad สูงกว่าในลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่งบลู ดังนั้น ในกล้วยไม้ลูกผสมม้าบิน x แดงอุบล น่าจะมีแนวโน้มของความสมบูรณ์พันธุ์สูงกว่าลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่งบลู ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง หรือ *Doritis* นี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างเห็นได้ชัดเจน

สรุป

จากการศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและสายพันธุ์ลูกผสม พบว่ากล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิ่ง มีการเข้าคู่กันของโครโมโซมแบบ bivalent ในระยะ diakinesis เฉลี่ย 38 และ 19 คู่ ตามลำดับ ส่วนในสายพันธุ์ลูกผสมแดงอุบล x ม้าวิ่งบลู และม้าบิน x แดงอุบล พบการเข้าคู่กันของโครโมโซมแบบ bivalent เพียง 19.6 และ 19.55 คู่ ตามลำดับ นอกจากนี้การแบ่งเซลล์ในระยะ anaphase I และ telophase I ของสายพันธุ์ลูกผสมทั้งสองยังพบ chromosome lagging, chromosome bridge และ micronucleus เกิดขึ้น จากลักษณะการสร้างไมโครสปอร์ ในกล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิ่ง พบว่าส่วนใหญ่สร้างไมโครสปอร์ที่เป็น tetrad สูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์การสร้างไมโครสปอร์ที่เป็น tetrad จะลดลงเป็น 56 และ 73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสและลักษณะการสร้างไมโครสปอร์ ที่ได้จากการศึกษาในเบื้องต้นจะเป็นข้อมูลที่สามารถคาดคะเนได้ว่าความสมบูรณ์พันธุ์ที่เกิดขึ้นในลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์อาจจะลดลงเมื่อเทียบกับกล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิ่งซึ่งแสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง หรือ *Doritis* นี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างเห็นได้ชัดเจน

เอกสารอ้างอิง

ศิริพร เชื้อจัน. 2546. การศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์และความสมบูรณ์พันธุ์ของกล้วยไม้สกุล

หวายบางพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ควรชิต ธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์ดิซซิ่ง, กรุงเทพมหานคร.

อบฉันทน์ ไทยทอง. 2545. กล้วยไม้เมืองไทย. สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพมหานคร.

Kamemoto, H., R. Tanaka and K. Kosaki. 1961. Chromosome numbers of orchids in Hawaii.

Hawaii Agric. Expt. Stat. Bull. 127 : 5-11.

Ruualcaba-Ruiz, D. and B. Rodriguez-Garay. 2002. Aberrant meiotic behavior in *Agave tequilana* Weber var. azul. *BMC plant biology*. 2(10) : 1-4.

Swanson, C.P. 1957. *Cytology and Cytogenetics*. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

Winston, C.C.W., A. Thame and Y.M. Wing. 2001. A cytogenetical study of the fertility of three local orchid hybrids. In Proceedings of the 14th Science Research Congress, Singapore.

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

1. โครงการบริการวิชาการแก่ชุมชนประจำปี 2552 การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้เชิงพาณิชย์
2. โครงการบริการวิชาการแก่ชุมชนประจำปี 2553 ค่ายอนุรักษ์กล้วยไม้แดงอุบล
3. โครงการวันวิทยาศาสตร์ประจำปี 2553 “แดงอุบล” กล้วยไม้งามของจังหวัดอุบลราชธานี
4. การนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2553 “แดงอุบล : แหล่งพันธุกรรมการพัฒนาและการอนุรักษ์พืชท้องถิ่นอย่างยั่งยืน

ภาพกิจกรรม โครงการบริการวิชาการแก่ชุมชนประจำปี 2552 การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้เชิงพาณิชย์

กล่าวเปิดการอบรมโดย คณบดีคณะเกษตรศาสตร์
รศ.ดร.วัชรพงษ์ วัฒนกุล

ผู้เข้าร่วมการอบรมถ่ายภาพร่วมกัน



ผศ.ดร. กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ บรรยายหัวข้อ ส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้
การจำแนกประเภทกล้วยไม้และการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้แดงอุบล



ภาพกิจกรรม โครงการบริการวิชาการแก่ชุมชนประจำปี 2553 ค่ายอนุรักษ์กล้วยไม้แดงอุบล



ภาพกิจกรรม โครงการวันวิทยาศาสตร์ประจำปี 2553 “แดงอุบล” กล้วยไม้งามของจังหวัด
อุบลราชธานี

นักเรียนที่เข้าร่วมกิจกรรมวันวิทยาศาสตร์
ชมนิทรรศการกล้วยไม้แดงอุบล



นักเรียนร่วมกิจกรรมตอบคำถามความรู้เกี่ยวกับกล้วยไม้แดงอุบล
เพื่อรับของรางวัล



ภาพกิจกรรม การนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2553
 “แดงอุบล : แหล่งพันธุกรรม การพัฒนาและการอนุรักษ์พืชท้องถิ่นอย่างยั่งยืน”





สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
National Research Council of Thailand (NRCT)

ขอมอบเกียรติบัตรฉบับนี้ แก่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา รุ่งรัชกานนท์

เพื่อแสดงความขอบคุณที่ให้ความสนใจในการนำผลงานวิจัย เรื่อง

แคปซูลปลด : แหล่งพันธุกรรมการพันธุและสารออกฤทธิ์ของธัญพืชอย่างยั่งยืน

ร่วมนำเสนองาน “การนำเสนองานวิจัยแห่งชาติ ๒๕๕๓” (Thailand Research Expo 2010)

ในวโรกาส วันที่ ๓๐ สิงหาคม ๒๕๕๓

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพร ติตติมิตรภาพ)

เลขาธิการคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนและที่ดำเนินการ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อเก็บรวบรวมสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวีงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง
- 2) เพื่อศึกษาเซลล์วิทยาของกล้วยไม้สกุลม้าวีง
- 3) เพื่อศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้สกุลม้าวีง

เปรียบเทียบการดำเนินงานที่เสนอไว้ในแผนงานวิจัยกับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว

กิจกรรม (ตามแผน)	ผลที่คาดว่าจะได้รับ (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน	หมายเหตุ *
1. รวบรวมเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิง	1. ได้เชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิง เก็บรักษาที่โรงเรียน	1. เป็นไปตามแผน	-
2. ศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาโครโมโซม	2. ได้วิธีหรือเทคนิคที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาโครโมโซม	2. เป็นไปตามแผน	-
3. ศึกษาจำนวนโครโมโซมในปลายรากของกล้วยไม้สกุลม้าวิง	3. ได้จำนวนโครโมโซมในปลายรากของกล้วยไม้สกุลม้าวิง	3. เป็นไปตามแผน	-
4. ศึกษาจำนวนโครโมโซมในดอกอ่อนของกล้วยไม้สกุลม้าวิง	4. ได้จำนวนโครโมโซมในดอกอ่อนของกล้วยไม้สกุลม้าวิง	4. เป็นไปตามแผน	-
5. เพิ่มปริมาณกล้วยไม้สกุลม้าวิงโดยการเพาะเมล็ดและอนุบาลต้นอ่อน	5. ได้ลูกกล้วยไม้สกุลม้าวิงปริมาณมากในเรือนอนุบาล	5. เป็นไปตามแผน	-
6. ศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้พันธุ์แท้และลูกผสม	6. ทราบพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในกล้วยไม้พันธุ์แท้และลูกผสม	6. เป็นไปตามแผน	-
7. ศึกษารูปร่างโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิง	7. ได้รูปร่างโครโมโซมของกล้วยไม้ม้าบิน	7. เป็นไปตามแผน	-



งานวิจัยประจำปี 2552

บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ งานการเงิน สำนักงานคณบดี คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โทร. 3516-18
 ที่ ศธ 0529.6.1/ 12266 วันที่ ๕ ต.ค. 2553
 เรื่อง ส่งใบบัญชีสำคัญ

เรียน อธิการบดี ผ่านรองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและบริการ

ตามที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ได้รับอนุมัติงบประมาณจากแผนงานงบประมาณ : งบประมณด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี วิจัยและนวัตกรรม ผลผลิต : ผลงานวิจัยเพื่อสร้างองค์ความรู้ ประจำปีงบประมาณ 2552 โครงการ “การเก็บรวบรวมและการศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง” โดยมี นางสาวกาญจนา รุ่งรัชกานนท์ เป็นหัวหน้าโครงการ งบประมาณที่ได้รับ จำนวน 153,100.-บาท (หนึ่งแสนห้าหมื่นสามพันหนึ่งร้อยบาทถ้วน) นั้น

บัดนี้โครงการดังกล่าวได้เสร็จสิ้นเรียบร้อยแล้ว โดยมีค่าใช้จ่ายเงิน ดังนี้

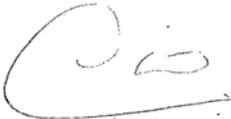
1. ค่าตอบแทน	20,000.-	บาท
- ค่าตอบแทนนักวิจัย	20,000.-	บาท
2. ค่าใช้สอย	121,540.-	บาท
- ค่าจัดบริการ(ทำรูปเล่ม,ผู้ช่วยวิจัย)	121,540.-	บาท
3. ค่าวัสดุ	2,661.-	บาท
- ค่าวัสดุทุกประเภท	2,661.-	บาท
4. ค่าสาธารณูปโภค	13,912.66	บาท
- ค่าสาธารณูปโภคสำหรับหน่วยงานต้นสังกัด	13,912.66.-	บาท
รวมเงินทั้งสิ้น	158,113.66.-	บาท

ดังนั้น ขออนุมัติและเบิกจ่ายค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานเท่ากับจำนวนงบที่ได้รับ เป็นเงิน 153,100.-บาท (หนึ่งแสนห้าหมื่นสามพันหนึ่งร้อยบาทถ้วน)

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ได้ตรวจสอบเอกสารแล้ว
ถูกต้อง เห็นควรอนุมัติ

ช. กิ่ง


 อธิการบดี (วิเศษคุณ)
 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี