โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของโคลชิซินต่อการงอกของเรณูในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช
The effect of colchicine on pollen germination of *Dendrobium 'Suree Peach'*

ชื่อนิสิต นางสาวศรนันท์ แก้วอนุ **เลขประจำตัว** 5832145823

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

ผลของโคลชิซินต่อการงอกของเรณูในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช

ศรนันท์ แก้วอนุ

วิทยาปฏิบัตินี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

The effect of colchicine on pollen germination of *Dendrobium* 'Suree Peach'

Soranan Kaewanu

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment

of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Genetics Program, Department of Botany

Faculty of Science, Chulalongkorn University

Acadamic Year 2018

ชื่อโครงงานวิทยาศาสตร์	ผลของโคลชิซินต่อการงอกของเรณูในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช
ชื่อนิสิต	นางสาวศรนันท์ แก้วอนุ
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	อาจารย์ ดร.วราลักษณ์ เกษตรานันท์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลนาถ อบสุวรรณ
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาพฤกษศาสตร์อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของภาคการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.วราลักษณ์ เกษตรานันท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลนาถ อบสุวรรณ)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.อรุณรัตน์ คิดอยู่)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงงานวิทยาศาสตร์ ผลของโคลชิซินต่อการงอกของเรณูในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช

ชื่อนิสิต นางสาวศรนันท์ แก้วอนุ

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน อาจารย์ ดร.วราลักษณ์ เกษตรานันท์

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลนาถ อบสุวรรณ

ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

เรณูของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช นำมาเพาะบนอาหารวุ้น เพื่อหาสูตรอาหารและเวลาที่เหมาะสมต่อการงอกของเรณูด้วยวิธี *in vitro* pollen germination ใช้สูตรอาหารทั้งหมด 6 สูตร ได้แก่ สูตรอาหารของ Brewbaker and Kwack และน้ำกลั่น ผสมกับซูโครสเข้มข้น 0%, 2% และ 10% โดยใช้ความเข้มข้นของวุ้นเท่ากับ 0.7% พบว่า ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูเริ่มนับได้ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมงหลังจากเริ่มเพาะบนอาหารวุ้น โดยเรณูแบบไม่คลุก stigma fluid ที่เพาะบนอาหารวุ้นสูตร Brewbaker and Kwack เติมซูโครสเข้มข้น 10% มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูมากที่สุดคือ 34.46% เมื่อนำเรณูไปแช่ในสารโคลชิซิน ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซม ในระดับความเข้มข้น 0.10%, 0.15% และ 0.20% เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง และย้อมสี acetocarmine พบว่า สารโคลชิซินเข้มข้น 0.14% คือค่า LC_{10} หรือระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูเท่ากับ 90% และเมื่อนำสารโคลชิซินเข้มข้น 0.14% ผสมในสูตรอาหาร Brewbaker and Kwack เติมซูโครสเข้มข้น 10% แล้วเพาะเรณูเป็นเวลา 120 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับอาหารวุ้นในชุดควบคุมที่ไม่ผสมโคลชิซิน พบว่า เรณูที่เพาะในสูตรอาหารผสมโคลชิซินมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูเท่ากับ 1.49% ซึ่งน้อยกว่าเรณูเพาะในสูตรอาหารปกติที่มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูเท่ากับ 53.85%

Title	The effect of colchicine on pollen germination of *Dendrobium* 'Suree Peach'
Student name	Soranan Kaewanu
Program	Genetics
Department	Botany
Advisor	Dr. Waraluk Kasettranan
Co-advisor	Asst.Prof.Dr. Kullanart Obsuwan
Academic year	2018

Abstract

Pollen of *Dendrobium* 'Suree Peach' were treated on the nutrient agar. This study educates the nutrient agar and eligible period for pollen germination by *in vitro* pollen germination. Nutrient agar included 6 formulas such as Brewbaker and Kwack and distriled water, mixed with 0% w/v sucrose, 2% w/v sucrose and 10% w/v sucrose added 0.7% w/v agar. Percent of pollen germination can be measured at 120 hours after pollen culture. Furthermore, pollen that not covered with stigma fluid in Brewbaker and Kwack, 10% w/v sucrose and 0.7% w/v agar has 34.46 percent of pollen germination. Then, soaked pollen in 0.10% w/v, 0.15% w/v and 0.20% w/v colchicine solution that is a familiar chemical in polyploid induction and stained with acetocarmine. The results found that 0.14% w/v colchicine solution is LC_{10}. So, Pollen in 0.14% w/v colchicine solution has 90 percent of pollen viability. Finally, Pollen in Brewbaker and Kwack, 10% w/v sucrose and 0.7% w/v agar mixed with 0.14% w/v colchicine solution has 1.49 percent of pollen germination less than pollen in nutrient agar without colchicine that has 53.85 percent of pollen germination.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.วราลักษณ์ เกษตรานันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลนาถ อบสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานร่วม เป็นอย่างยิ่งที่ได้มอบความกรุณา ให้ความช่วยเหลือทั้งคำปรึกษา และกำลังใจตลอดระยะเวลาที่ทำโครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.อรุณรัตน์ คิดอยู่ กรรมการสอบที่กรุณาตรวจสอบ และแก้ไขโครงงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ยุพิน จินตภากร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ ที่ช่วยอนุเคราะห์สารเคมีบางชนิดที่ต้องใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณมานะออร์คิดฟาร์ม ที่เอื้อเฟื้อกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช สำหรับทำการทดลองในโครงงานนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนสนับสนุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ประจำปีการศึกษา 2561 รวมทั้งสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และเคมีภัณฑ์

ขอขอบพระคุณเพื่อน ทั้งเพื่อนร่วมภาคและเพื่อนต่างคณะที่ให้กำลังใจ และความช่วยเหลือในทุกเรื่อง รวมทั้งพี่ในห้องปฏิบัติการ 306 ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, รุ่นพี่ และรุ่นน้องทุกคนที่ให้คำปรึกษา และกำลังใจ

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ น้องสาว และแมวที่เป็นกำลังใจสำคัญ และเชื่อมั่นในตัวผู้เขียนเสมอมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณพลังใจของผู้เขียนเองที่ไม่สิ้นหวังกับการงอกของเรณูไปเสียก่อน

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ญ
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงาน	11
ผลการทดลอง	16
1. ศึกษาสูตรอาหารและเวลาที่เหมาะสมต่อการงอกของเรณู ด้วยวิธี *in vitro* pollen germination ในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช	16
2. ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่เหมาะสม ต่อเรณูของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช	24
3. ศึกษาการงอกของเรณูเมื่อได้รับสารโคลชิซิน	32
อภิปรายผลการทดลอง	33
สรุปผลการทดลอง	36
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก ก สูตรที่ใช้ในการคำนวณเปอร์เซ็นต์ของเรณู	41
ภาคผนวก ข สูตรอาหาร	43
ภาคผนวก ค ตารางผลการวิเคราะห์สถิติ IBM SPSS Statistics version22	48
ภาคผนวก ง ตารางบันทึกข้อมูลอื่นๆ	54

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูในระยะเวลา 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมงที่เพาะบนอาหารวุ้น 6 สูตร 18

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ Two-way ANOVA ของตัวแปร 2 ตัวแปร 23

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูในระยะเวลา 24, 72, 96 ที่แช่ในสารโคลชิซิน 4 ชุดการทดลอง 26

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณูที่แช่ในสารโคลชิซิน ในระยะเวลา 96 และ 120 ชั่วโมง 29

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ t-independent test ของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูที่แช่ในสารโคลชิซิน ระยะเวลา 120 ชั่วโมง 32

ตารางที่ 6 สารที่ใช้ในการเตรียมสูตรอาหาร Brewbaker and Kwack ในการทดลองที่ 1 44

ตารางที่ 7 สารที่ใช้ในการเตรียมสูตรอาหารน้ำกลั่น ในการทดลองที่ 1 45

ตารางที่ 8 สารที่ใช้ในการเตรียมสารละลายโคลชิซิน ในการทดลองที่ 2 46

ตารางที่ 9 สารที่ใช้ในการเตรียมสูตรอาหาร Brewbaker and Kwack ในการทดลองที่ 3 47

ตารางที่ 10 ค่าสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมงด้วย Two-way ANOVA 49

ตารางที่ 11 ค่าสถิติความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมงด้วย Duncan’s Multiple Range Test 49

ตารางที่ 12 ค่าสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูที่ระยะเวลา 144 ชั่วโมงด้วย Two-way ANOVA 50

ตารางที่ 13 ค่าสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูที่ระยะเวลา 168 ชั่วโมงด้วย Two-way ANOVA 50

ตารางที่ 14 ค่าสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงด้วย One-way ANOVA 51

หน้า

ตารางที่ 15 ค่าสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมงด้วย One-way ANOVA 51
ตารางที่ 16 ค่าสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมงด้วย One-way ANOVA 52
ตารางที่ 17 ค่าสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมงด้วย One-way ANOVA 52
ตารางที่ 18 ค่าสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมงด้วย Independent t-test 53
ตารางที่ 19 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูหลังจาก 72 ชั่วโมง เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น 6 สูตร 55
ตารางที่ 20 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูหลังจาก 96 ชั่วโมง เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น 6 สูตร 56
ตารางที่ 21 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูหลังจาก 120 ชั่วโมง เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น 6 สูตร 57
ตารางที่ 22 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูหลังจาก 144 ชั่วโมง เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น 6 สูตร 58
ตารางที่ 23 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูหลังจาก 168 ชั่วโมง เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น 3 สูตร ได้แก่ 59
ตารางที่ 24 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ความตาย ของเรณูหลังจาก 24 ชั่วโมง 60
ตารางที่ 25 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ความตาย ของเรณูหลังจาก 72 ชั่วโมง 60
ตารางที่ 26 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ความตาย ของเรณูหลังจาก 96 ชั่วโมง 61
ตารางที่ 27 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ความตาย ของเรณูหลังจาก 120 ชั่วโมง 61
ตารางที่ 28 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูหลังจาก 120 ชั่วโมง เมื่อเพาะอาหารวุ้นที่ผลมโคลชิซินและไม่ผสมโคลชิซิน 62

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 6

ภาพที่ 2 ลักษณะของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช 6

ภาพที่ 3 วิธีการถ่ายเรณูกล้วยไม้ด้วยมือ (hand pollination) 8

ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของโคลชิซิน 9

ภาพที่ 5 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูในระยะเวลา 120 ชั่วโมง 19

ภาพที่ 6 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูในระยะเวลา 144 ชั่วโมง 20

ภาพที่ 7 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูในระยะเวลา 168 ชั่วโมง 21

ภาพที่ 8 การงอกของเรณูในระยะเวลาต่าง ๆ 22

ภาพที่ 9 การติดสีย้อม aceto carmine เข้มข้น 1%ของเรณู 24

ภาพที่ 10 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่แช่ในน้ำกลั่นและสารโคลชิซิน เข้มข้น 0.10%, 0.15% และ 0.20% ในระยะเวลา 72, 96 และ 120 ชั่วโมง 27

ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารโคลชิซิน (x) และเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณู (y) เมื่อแช่เรณูในสารละลายโคลชิซินเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง และทดสอบความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีการย้อมสี acetocarmine เข้มข้น 1% 30

ภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารโคลชิซิน (x) และเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณู (y) เมื่อแช่เรณูในสารละลายโคลชิซินเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง และทดสอบความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีการย้อมสี acetocarmine เข้มข้น 1% 31

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

กล้วยไม้ (Orchidaceae) เป็นไม้ดอกหรือไม้ประดับวงศ์หนึ่งที่ได้รับความนิยมอย่างมาก ทั้งในประเทศไทยและในต่างประเทศ โดยสามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้ทั้งหมดได้มากกว่า 800 สกุล และมากกว่า 20,000 ชนิดด้วยกัน (อลิษา สุขดี, 2559 : ออนไลน์) ในประเทศไทยนั้นสภาพภูมิอากาศและแหล่งน้ำส่วนใหญ่เหมาะสมต่อการปลูกกล้วยไม้เขตร้อนหลายพันธุ์ ทำให้ประเทศไทยเป็นผู้นำในการผลิตกล้วยไม้เขตร้อนของโลก และเป็นประเทศที่มีอัตราการส่งออกดอกกล้วยไม้เขตร้อนมากที่สุดเป็นอันดับแรกของโลกอีกด้วย โดยประมาณร้อยละ 80 ของกล้วยไม้เขตร้อนที่ส่งออกทั้งหมดเป็นกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) (ปรางนุช เลิศหิรัณย์, 2560 : ออนไลน์) เนื่องจากกล้วยไม้ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก ลักษณะการแสดงออกของกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ เช่น สีดอก รูปร่างใบ รวมถึงลวดลายของดอกจึงมีความสวยงามอันเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวส่งผลให้กล้วยไม้เป็นสินค้าเศรษฐกิจที่นิยมปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งในด้านความสวยงาม และออกดอกนานมากขึ้น (สุทัศน์ ลิมปิยประพันธ์, 2554)

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ในประเทศไทยมักใช้วิธีการถ่ายเรณูด้วยมือ (hand pollination) ในการสร้างและคัดเลือกพันธุ์ใหม่ที่จะนำเมล็ดไปเพาะในอาหารวุ้นเพื่อเพิ่มผลผลิตต่อไป วิธีการถ่ายเรณูด้วยมือ จะทำให้ได้กล้วยไม้ลูกผสมที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization) หรือข้ามสกุล (intergeneric hybridization) และใช้ต้นทุนต่ำกว่าการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม นอกจากนี้ วิธีการนี้ยังสามารถใช้ต่อยอดการเพาะเลี้ยงและการเก็บรักษาเรณูระหว่างรอผสมพันธุ์ (ระพี สาคริก, 2502) องค์ประกอบสำคัญของการถ่ายเรณูด้วยมือ ได้แก่ เรณู (pollen) หากเรณูที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้มีคุณภาพดี จะส่งผลให้การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ประสบผลสำเร็จมากขึ้นด้วย ซึ่งคุณสมบัติของเรณูที่มีคุณภาพในที่นี้พิจารณาจากความสามารถในการงอกหลอดเรณู (pollen tube) ของเรณู ในสภาพธรรมชาติกล้วยไม้ใช้ stigma fluid ในการกระตุ้นการงอกหลอดเรณู และมีบทบาทในการเจริญเติบโตของเรณู (Lack and Diaz, 1990) โดยปริมาณของเรณูที่งอก

หลอดเรณูมีความสัมพันธ์กับความมีชีวิตของเรณู (pollen viability) (Sulusoglu and Cavusoglu, 2014)

นอกจากนี้ การเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มศักยภาพของกล้วยไม้ลูกผสม เพื่อผลิตกล้วยไม้ลูกผสมที่มีลักษณะดีและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากขึ้น เนื่องจากจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นของเรณูในกล้วยไม้จากการชักนำให้เกิด chromosome mutation ส่งผลให้กล้วยไม้ลูกผสมมีดอกขนาดใหญ่และมีอายุดอกนานกว่าเดิม (อลงกลด แทนออมทอง และ สราวุธ แก้วศรี, 2561) โดยในสภาพธรรมชาติจำนวนโครโมโซมของเรณูในพืชดอกทั่วไปอาจมีมากกว่า 1 ชุดได้ หากโครโมโซมไม่แยกตัวออกจากกัน (non disjunction) ในช่วงแอนาเฟส I และช่วงแอนาเฟส II ของการแบ่งตัวแบบไมโอซิส ซึ่งเกิดขึ้นน้อยและไม่สามารถควบคุมได้ เนื่องจากอยู่ภายใต้การควบคุมของสารพันธุกรรมภายในเรณูนั้น ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์พืชดอกส่วนใหญ่จึงมักชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยใช้สารเคมีประเภทโคลชิซิน (colchicine) ชักนำเรณูให้มีจำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้น เช่น เปลี่ยนจาก 1 ชุดไปเป็น 2 ชุดก่อนนำไปถ่ายเรณู (Gao, Lin and Kang, 2004 cited in Song et al., 2015) ซึ่งการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมในเรณูขึ้น 2 เท่านี้ส่งผลให้ประสบความสำเร็จในการสร้างต้นอ่อนแบบทริพลอยด์ (triploid) ในพืชดอกหลายชนิด (อดิศร กระแสชัย, 2539) แต่ยังไม่มีการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินถึงผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การงอกหลอดเรณูของเรณูในกล้วยไม้สกุลหวายในประเทศไทย

ด้วยเหตุนี้ การศึกษาในโครงงานนี้จึงทดสอบความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีการทดสอบการงอกหลอดเรณูของเรณูในหลอดทดลอง (*in vitro* pollen germination) รวมทั้งหาระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินต่อการมีชีวิตของเรณู ในการทดสอบการงอกหลอดเรณูในหลอดทดลองของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Laelia* พบว่า เรณูของกล้วยไม้พันธุ์นี้สามารถงอกได้ดีในอาหารวุ้นที่ใช้วุ้น 1.5% และน้ำตาลซูโครส 1% (Stort and Galdino, 1984) ส่วนการทดสอบการงอกหลอดเรณูในหลอดทดลองของกล้วยไม้ชนิดหวายแคระ พบว่า เรณูที่เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นที่ไม่ใส่น้ำตาลซูโครสสามารถรักษาเปอร์เซ็นการงอกหลอดเรณูได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (ศิรัชตนันท์ โรจนวิจิตร และคณะ, 2559) ดังนั้น การทดสอบการงอกหลอดเรณูของเรณูในโครงงานนี้จึงศึกษาสูตรอาหารวุ้นร่วมกับการใช้ stigma fluid ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการงอกหลอดเรณูได้ และศึกษาระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ส่งผลต่อการงอกหลอดเรณูของเรณูในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์

พีช (*Dendrobium* ‘Suree Peach’) จากมานะ ออร์คิด ฟาร์ม จังหวัดนครปฐม ซึ่งกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีชนี้เป็นพันธุ์ที่มีดอกสีชมพูอ่อน ได้รับความนิยมในประเทศญี่ปุ่นอันเป็นตลาดส่งออกกล้วยไม้รายใหญ่ของประเทศไทย และเป็นพันธุ์ที่เหมาะแก่ระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาเพราะมีดอกตลอดทั้งปี

สุดท้ายนี้ ผลการศึกษาที่ได้จะสามารถนำไปใช้เพิ่มโอกาสและเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ให้กล้วยไม้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากขึ้น รวมถึงสร้างทางเลือกในการเก็บรักษาเรณู และต่อยอดในการเตรียมเรณูด้วยการกระตุ้นการงอกของหลอดเรณู เพื่อเพิ่มคุณภาพในการถ่ายเรณูให้แก่เกษตรกรอีกด้วย

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของโคลชิซินต่อการงอกของเรณูในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์สุรีย์พีช

การตรวจเอกสาร

1. กล้วยไม้

กล้วยไม้ (Orchidaceae) เป็นไม้ดอกหรือไม้ประดับวงศ์หนึ่งที่ได้รับความนิยมอย่างมาก ทั้งในประเทศไทยและในต่างประเทศ โดยสามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้ทั้งหมดได้มากกว่า 800 สกุล และพันธุ์มากกว่า 20,000 พันธุ์ด้วยกัน (อลิษา สุขดี, 2559 : ออนไลน์) ซึ่งในประเทศไทยนั้นสภาพภูมิอากาศและแหล่งน้ำส่วนใหญ่เหมาะสมต่อการปลูกกล้วยไม้เขตร้อน รวมทั้งมีการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เพื่อสร้างลูกผสมตามความนิยมของพื้นที่นั้น จึงทำให้กล้วยไม้ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก (สุทัศน์ ลิมปิยประพันธ์, 2554)

ประเทศไทยเป็นผู้นำในการผลิตกล้วยไม้เขตร้อนของโลก และเป็นประเทศที่มีอัตราการส่งออกดอกกล้วยไม้เขตร้อนมากที่สุดเป็นอันดับแรกของโลก โดยในปีพ.ศ. 2561 พบว่าสินค้าดอกกล้วยไม้ที่ประเทศไทยส่งออกคิดเป็นสัดส่วน 80% ของจำนวนสินค้าดอกกล้วยไม้ในตลาดกล้วยไม้โลก (ปรางนุช เลิศหิรัณย์, 2560 : ออนไลน์) โดยประมาณ 80% ของดอกกล้วยไม้เขตร้อนที่ส่งออกทั้งหมดเป็นกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) อันดับรองลงมา ได้แก่ กล้วยไม้สกุลอะแรนด้า (*Aranda*) อะแรคนิส (*Arachnis*) ออนซิเดียม (*Oncidium*) และแวนด้า (*Vanda*) ตามลำดับ ซึ่งพบว่ากล้วยไม้ที่เป็นที่นิยมในตลาดกล้วยไม้นั้นมีความแตกต่างกันตามพื้นที่ เช่น ตลาดกล้วยไม้ในภูมิภาคเอเชียนิยมกล้วยไม้ที่มีดอกสีอ่อน ตลาดกล้วยไม้ในภูมิภาคยุโรปนิยมกล้วยไม้ที่มีดอกสีม่วงแดงเข้ม เป็นต้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2560 : ออนไลน์)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช

กล้วยไม้สกุลหวายเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว หรือ monocotyledonous plant ที่มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่สำคัญหลายประการ ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ที่ทำให้จำแนกกล้วยไม้สกุลนี้ออกจากสกุลต่าง ๆ ได้ (ครรชิต ธรรมสิริ, 2547)

รากของกล้วยไม้สกุลหวายเป็นรากอากาศ มีลักษณะอวบน้ำ มีหน้าที่หลักในการยึดเกาะกับวัสดุปลูก สะสมอาหาร รวมถึงสามารถเปลี่ยนเป็นหัวใต้ดินหรือไหลเพื่อช่วยการขยายพันธุ์ โครงสร้างของรากมีเนื้อเยื่อที่หุ้มรากด้านนอกค่อนข้างหนาและมีลักษณะคล้ายฟองน้ำหรือ velamen จึงทำให้รากของกล้วยไม้สามารถดูดซับน้ำและแร่ธาตุได้ดี รวมถึงคุณสมบัติในการช่วยป้องกันการระเหยของน้ำในรากอีกด้วย (ทัศนัย ปัญจันทร์สิงห์, 2560)

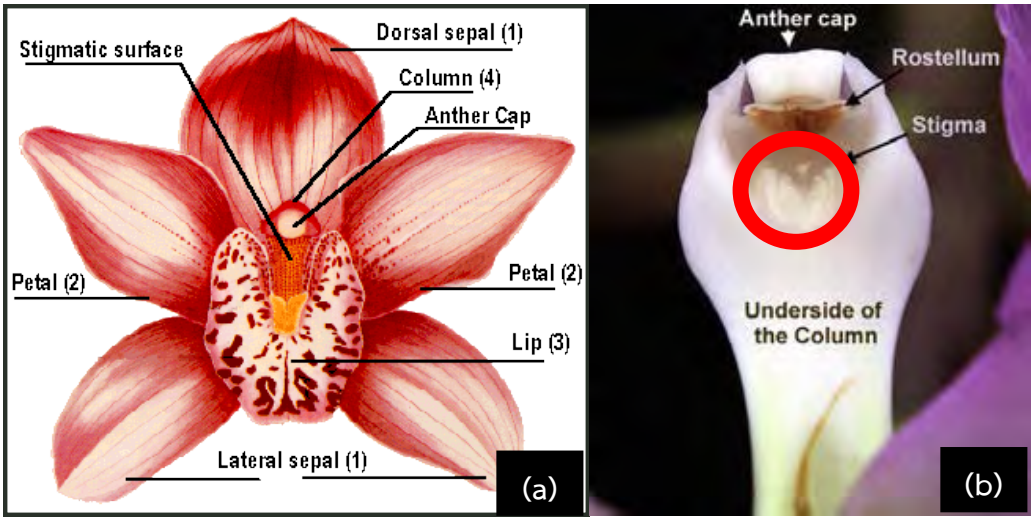
ใบของกล้วยไม้สกุลหวายมีการเรียงตัวแบบสลับตลอดลำต้น เส้นใบเป็นแบบขนาน ส่วนดอกของกล้วยไม้สกุลหวายมีโครงสร้างที่พิเศษกว่าดอกไม้ชนิดอื่น โดยโครงสร้างของดอกประกอบด้วยวงกลีบรวม 2 ชั้น ได้แก่ วงชั้นนอกจำนวน 3 กลีบ และวงชั้นในจำนวน 3 กลีบ โดยกลีบชั้นในที่อยู่ด้านล่าง และมีลักษณะต่างจากกลีบอีก 2 กลีบ เรียกว่า ปาก (lip) (ระพี สาคริก, 2530) ภายในดอกมีเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียอยู่ด้วยกันบริเวณตรงกลางดอก เรียกว่า เส้าเกสร (column) โดยมีจงอยเกสรเพศเมียหรือ rostellum กั้นระหว่างเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียไม่ให้เกิด self-pollination แต่ถ้าดอกใกล้โรย จงอยเกสรเพศเมียจะเหี่ยวลง ทำให้เกิด self-pollination ได้ นอกจากนี้ ยังพบว่า มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่เป็นดอกแยกเพศ (Pridgeon et al., 1999)

ปลายของเส้าเกสรจะพบฝาครอบอับเรณูที่ภายในมีเรณูอยู่รวมกันเป็นก้อน เรียกว่า กลุ่มเรณู (pollinia) ดังภาพที่ 1 องค์ประกอบเหล่านี้เรียกว่า อับเรณู (anther) และมียอดเกสรเพศเมีย (stigma) อยู่ถัดจากอับเกสรเพศผู้ลงมาทางบริเวณใต้ปลายเส้าเกสร บริเวณยอดเกสรเพศเมียมีแอ่งขนาดเล็กที่มีน้ำเมือกเหนียวคล้ายแป้งเปียก เรียกว่า stigma fluid (ระพี สาคริก, 2502, 2530) ซึ่งมีบทบาทในการช่วยยึดเรณูให้ติดแน่น รวมทั้งกระตุ้นการงอกหลอดเรณู และการเจริญเติบโตของเรณู โดยมีสารอินทรีย์ เช่น น้ำตาล ไขมัน และกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ stigma fluid ยังมีส่วนช่วยในการถ่ายเรณูแบบอาศัยพาหะ เช่น แมลง เพราะ stigma fluid มีเนื้อสัมผัสเหนียว ทำให้ติดกับพาหะได้ดี (Lack and Diaz, 1990; Konar and Linskens, 1966)

ลำต้นของกล้วยไม้สกุลหวายมีการเจริญเติบโตแบบแตกกอ มีลำต้นชนิดเหง้า (rhizome) และมีลำลูกกล้วย (pseudobulb) ที่มีหน้าที่ในการเก็บน้ำและสารอาหาร (ระพี สาคริก, 2530) ซึ่งลักษณะลำต้นของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช มีลักษณะลำลูกกล้วยรูปรี ยาวประมาณ 45 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.64 เซนติเมตร บริเวณลำต้นมีใบรูปไข่แคบที่มีความกว้างประมาณ 5.69 เซนติเมตร และมีความยาวประมาณ 45 เซนติเมตร (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

ดอกของสุรีย์พีชมีการเรียงตัวในช่อดอกกระจะ (ภาพที่ 2(a)) จำนวนดอกบนช่อดอกแต่ละช่อมีจำนวน 10-17 ดอก ความยาวช่อดอกรวมทั้งหมดประมาณ 44.10 เซนติเมตร ดอกมีกลิ่นหอม มีรูปร่างดอกแบบกึ่งฟอร์มกลม (ภาพที่ 2(b)) ดอกมีความกว้างประมาณ 6.30 เซนติเมตร และมีความยาวประมาณ 6.77 เซนติเมตร สีพื้นของกลีบดอกมีสีขาว มีแต้มกลีบดอกสีชมพูอ่อน ก้อน

เรณูมีสีเหลือง ฝาครอบอับเรณูในดอกสั้นมาก เรณูภายในอับเรณูจึงไม่เสี่ยงต่อการเป็นโรคและไม่ได้รับผลจากความแปรปรวนของสภาพอากาศ (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

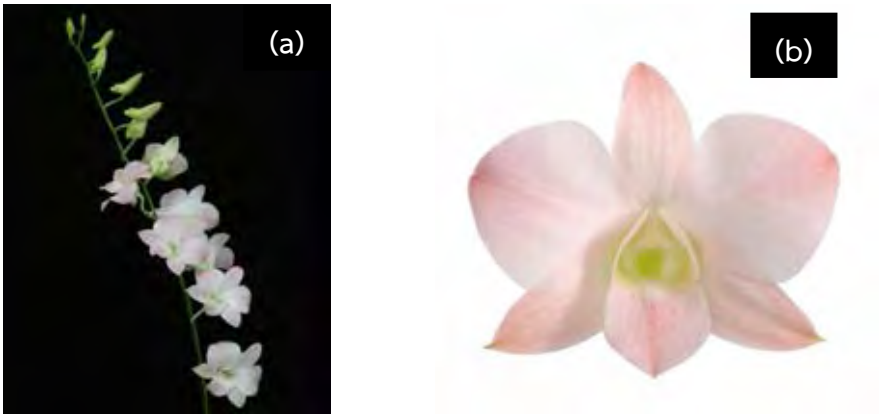


ภาพที่ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย

(ที่มา : https://photography-on-the.net/forum/showthread.php?t=1417055)

(a) องค์ประกอบของดอกกล้วยไม้

(b) เส้าเกสรของดอกกล้วยไม้



ภาพที่ 2 ลักษณะของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

(a) ช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช

(b) ดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีชในประเทศไทย

กล้วยไม้สกุลหวายในประเทศไทยมีบทบาทในด้านเศรษฐกิจค่อนข้างมาก เนื่องจากลักษณะการแสดงออก เช่น สีดอก รูปร่างใบ รวมถึงลวดลายของดอกที่มีความสวยงามและเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว ส่งผลให้กล้วยไม้เป็นสินค้าเศรษฐกิจที่นิยมปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งในด้านความสวยงามและความทนทานเพิ่มมากขึ้น (สุทัศน์ ลิมปิยประพันธ์, 2554)

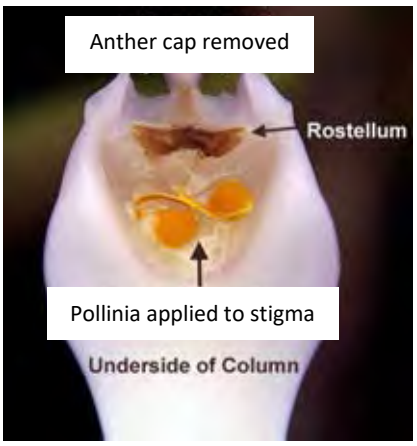
สำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีชนั้น เกิดจากกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสมขาวเบนซ์และกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสมขาวเหลือบส้มหรือสีส้มโอรส โดยใช้ระยะเวลาในการสร้างพันธุ์สุรีย์พีช ตั้งแต่ปีพ.ศ.2538 -พ.ศ.2546 ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ สีของดอกและความยาวของช่อดอก (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

2. **การถ่ายเรณูด้วยมือ** (hand pollination)

การถ่ายเรณูด้วยมือเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ เพื่อสร้างและคัดเลือกพันธุ์ใหม่ที่จะนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นเพิ่มผลผลิตต่อไป โดยวิธีการถ่ายเรณูด้วยมือจะทำให้ได้กล้วยไม้ลูกผสมที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากขึ้น และใช้ต้นทุนต่ำกว่าการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (ระพี สาคริก, 2502) การถ่ายเรณูด้วยมือสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดอื่นแล้วประสบความสำเร็จหลายชนิด เช่น ดอกผักแว่นดอย (Meng, Su and Wen, 2016) รวมถึงพืชไร่ต่าง ๆ เช่น น้ำเต้า ข้าวโพด มะเขือเทศ เป็นต้น (Hampton, 2014; Seed Savers Exchange, 2018a, 2018b)

วิธีการถ่ายเรณูกล้วยไม้ด้วยมือ

วิธีการถ่ายเรณูกล้วยไม้ด้วยมือเป็นวิธีพื้นฐานในการถ่ายเรณูกล้วยไม้ อุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการถ่ายเรณูด้วยมือ ได้แก่ เข็มเขี่ย หรือ คีมขนาดเล็ก หรือ ไม้จิ้มฟัน โดยขั้นตอนแรกในการถ่ายเรณูด้วยมือ คือ การใช้เข็มเขี่ยเปิดฝาครอบเรณูออกด้วยความระมัดระวัง จากนั้น ใช้เข็มเขี่ยนำเรณูไปวางไว้ในยอดเกสรเพศเมียที่มี stigma fluid อยู่ ทำให้เรณูติดแน่นอยู่ใน stigma fluid ดังภาพที่ 3 หากนักปรับปรุงพันธุ์ต้องการผสมข้ามสายพันธุ์ สามารถนำเรณูไปไว้บนยอดเกสรตัวเมียของดอกของกล้วยไม้ที่มีสายพันธุ์แตกต่างกันได้ โดยอายุของดอกกล้วยไม้ที่ใช้ในการผสมพันธุ์มีผลต่อความมีชีวิตของเรณู (Kauth et al, 2007)

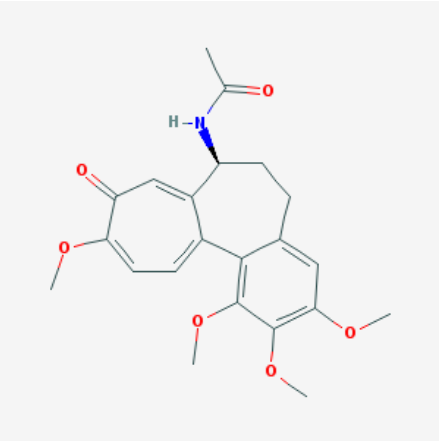


ภาพที่ 3 วิธีการถ่ายเรณูกล้วยไม้ด้วยมือ (hand pollination)

(ที่มา : https://lab.troymeyers.com/flasking/article.php?number=19)

3. **โคลชิซิน** (colchicine)

โคลชิซินเป็นสารแอลคาลอยด์ชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นสารสกัดที่พบในเมล็ดของ *Colchicum autumnale* L. หรือพืชชนิดหนึ่งในวงศ์ดองดึง (COLCHICACEAE) ลักษณะของโคลชิซินบริสุทธิ์จะมีลักษณะเป็นเกล็ดหรือเป็นผงสีเหลือง โคลชิซินมีสมบัติการละลายค่อนข้างดีทั้งในน้ำและแอลกอฮอล์ ชื่อเรียกตามระบบ IUPAC ว่า N-[(7S)-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxo-6,7-dihydro-5H-benzo[a]heptalen-7-yl]acetamide และมีสูตรเคมีคือ $C_{22}H_{25}NO_6$ ดังภาพที่ 4 มีการนำโคลชิซินมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ โดยใช้เป็นส่วนประกอบของยารักษาโรคเกาท์ แต่หากรับประทานเข้าไปโดยตรงจะส่งผลเสียต่อระบบทางเดินอาหาร บริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้ (National center for biotechnology information, 2018 : Online) นอกจากนี้ นักปรับปรุงพันธุ์พืชยังนิยมใช้โคลชิซินในการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยการกลายพันธุ์อีกด้วย (Gao, Lin and Kang, 2004 cited in Song et al., 2015)



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของโคลชิซิน

(ที่มา : https://meshb.nlm.nih.gov)

วิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ระดับโครโมโซมด้วยโคลชิซิน

โคลชิซินเป็นสารที่นิยมใช้ในการชักนำพืชให้เกิดการกลายพันธุ์ เนื่องจากโคลชิซินทำให้เกิดกระบวนการยับยั้งการพอลิเมอไรเซชัน (depolymerization) ของเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) โดยโคลชิซินจะเข้าไปจับกับโปรตีนทิวบูลิน (tubulin) ที่ปลายไมโครทิวบูล (microtubule) และยับยั้งการสร้างไมโครทิวบูล เส้นใยสปินเดิลจึงหยุดการสร้าง ส่งผลให้เส้นใยสปินเดิลมีความผิดปกติหรือขาด

เนื่องจากเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการแบ่งจำนวนโครโมโซมในระยะเมทาเฟส (metaphase) ของกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitotic cell division) เมื่อเส้นใยสปินเดิลผิดปกติหรือขาด จะทำให้ซิสเตอร์โครมาติด (sister chromatid) ของโครโมโซมในระยะเมทาเฟสไม่แยกออกจากกัน และไม่เคลื่อนที่ไปยังขั้วตรงข้ามในระยะแอนาเฟส (anaphase) ส่งผลให้เซลล์ลูกมีจำนวนชุดโครโมโซมมากกว่าเดิมเป็น 2 เท่า ซึ่งความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้โคลชิซินในการชักนำมีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ลูก และการเจริญเติบโตของพืชที่นำไปปรับปรุงพันธุ์ (อลงกลด แทนออมทอง และ สราวุธ แก้วศรี, 2561)

ปัจจุบันนี้ มีการวิจัยและปรับปรุงพันธุ์พืชโดยนำโคลชิซินไปใช้ร่วมในการปรับปรุงพันธุ์จำนวนมาก เช่น ในการปรับปรุงพันธุ์พืชในวงศ์กะเพรา มีการใช้โคลชิซินเพื่อชักนำให้เซลล์ลูกมีโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นแบบพอลิพลอยด์ เมื่อชักนำเรณูให้กลายเป็นต้นพืช จะทำให้ใบของพืชมีขนาดใหญ่ขึ้นหลังจากปลูกไว้ 6 เดือน (Huang et al., 2014) ในการปรับปรุงพันธุ์พืชตระกูลแตง

โคลชิซินทำให้มีขนาดของเรณูใหญ่มากขึ้น (Basu and Datta, 1977) และในการปรับปรุงพันธุ์ยูคาลิปตัส มีการใช้โคลชิซินเพื่อชักนำให้เรณูมีโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (Yang et al., 2016) เป็นต้น

4. บทบาทของเรณูในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้

เรณูเป็นองค์ประกอบสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ หากเรณูที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้มีคุณภาพดี จะส่งผลให้การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ประสบผลสำเร็จมากขึ้น ซึ่งคุณสมบัติของเรณูที่มีคุณภาพในที่นี้พิจารณาจากความสามารถในการงอกหลอดเรณูของเรณู (pollen germination) และความมีชีวิตของเรณู (pollen viability) โดยปริมาณของเรณูที่งอกหลอดเรณูมีความสัมพันธ์กับความมีชีวิตของเรณู (Sulusoglu and Cavusoglu, 2014) และหลอดเรณูที่สมบูรณ์จะต้องมีความยาวมากกว่าความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของเรณูนั้น (Brown, 1958)

นอกจากการทดสอบความมีชีวิตของเรณูด้วยการทดสอบการงอกของหลอดเรณูแล้ว ยังสามารถทำได้โดยการย้อมสีได้อีกด้วย ซึ่งการติดสีย้อมของเรณูเกิดจากการทำปฏิกิริยาของสีย้อมกับองค์ประกอบทางเคมีในไซโตพลาสซึมหรือนิวเคลียส (Shivanna, 2003)

ในปัจจุบัน มีการทดสอบความมีชีวิตของเรณูดอกกล้วยไม้ด้วยการย้อมสีเป็นจำนวนมาก สีย้อมที่นิยมใช้ในการทดสอบความมีชีวิตของเรณู ได้แก่ acetocarmine, iodine ใน potassium iodide และ aniline blue ใน lactophenol และ TTC (triphenyl tetrazolium chloride) เป็นต้น (Shivanna and Rangaswamy, 1992) โดยการทดสอบความมีชีวิตของเรณูดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ชนิดหวายแคระ, พันธุ์เอียสกุล และพันธุ์บอม 17 ด้วยการย้อมสี 1% acetocarmine พบว่าเรณูที่มีชีวิตติดสีแดงสม่ำเสมอ ส่วนเรณูที่ไม่มีชีวิตติดสีแดงบางส่วน หรือไม่ติดสี (ศิรัชตนันท์ โรจนวิจิตร และคณะ, 2559) ในการทดสอบความมีชีวิตของเรณูดอกกล้วยไม้รองเท้านารีด้วยการย้อมสี TTC พบว่า เรณูที่มีชีวิตติดสีแดงหรือสีชมพูสม่ำเสมอ ส่วนเรณูที่ไม่มีชีวิตติดสีแดงบางส่วน หรือไม่ติดสี (Diengdoh et al., 2017) ส่วนการทดสอบความมีชีวิตของเรณูพืชดอกชนิดอื่น ๆ เช่น ดอกแพงพวย ดอกบานบุรี ดอกพุดพิชญา และดอกเฟื่องฟ้าด้วยการย้อมสี 5% acetocarmine พบว่าเรณูที่มีชีวิตติดสีแดงสม่ำเสมอ ส่วนเรณูที่ไม่มีชีวิตติดสีแดงบางส่วน หรือไม่ติดสีเช่นเดียวกันกับเรณูของดอกกล้วยไม้ (กรณ์ กรภัทรชัยกุล และคณะ, 2558)

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงาน

พืชทดลอง

- *Dendrobium* ‘Suree Peach’ จากมานะออร์คิดฟาร์ม จังหวัดนครปฐม จำนวน 54 ต้น

วัสดุอุปกรณ์

- Beaker
- Plate
- Duran bottle
- Slide
- Cover slip
- Spatula
- Stirring rod
- Needle
- เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง
- Computer LENOVO G4

สารเคมี

- Distilled water
- สารละลาย Sucrose 2%, 5%, 10% (%w/v)
- Boric acid (100 mg/l)
- Calcium nitrate (300 mg/l)
- Magnesium sulfate (200 mg/l)
- Potassium nitrate (200 mg/l)
- agar
- acetocarmine 1% (%v/v)
- colchicine

วิธีการดำเนินงาน

การเตรียมตัวอย่างกลุ่มเรณู (pollinia) ของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช

1. คัดเลือกต้นที่มีดอกตูมอย่างน้อย 1 ดอก และมีอายุใกล้เคียงกันจากมานะออร์คิด ฟาร์ม จังหวัดนครปฐม

2. เก็บกลุ่มเรณูจากดอกกล้วยไม้ 1 ดอกต่อต้นกล้วยไม้ 1 ต้น โดยเก็บหลังจากดอกกล้วยไม้บานเต็มที่แล้ว 3 วัน เนื่องจากก้อนเรณูมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 100% และแกะออกจากอับเรณูได้ง่าย (ศิรัชตนันท์ โรจนวิจิตร และคณะ, 2559) โดยเก็บกลุ่มเรณูของดอกกล้วยไม้ไว้แยกกัน ดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารและเวลาที่เหมาะสมต่อการงอกของเรณูด้วยวิธี *in vitro* pollen germination ในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช จำนวน 30 ดอก

การทดลองที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เหมาะสมต่อเรณูของกล้วยไม้ จำนวน 16 ดอก

การทดลองที่ 3 ศึกษาการงอกของเรณูเมื่อได้รับสารโคลชิซิน จำนวน 8 ดอก

การทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารและเวลาที่เหมาะสมต่อการงอกของเรณูด้วยวิธี *in vitro* pollen germination ในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช

1. เตรียมอาหารวุ้นที่ใช้ในการทดสอบการงอกของเรณู 2 ประเภท คือ อาหารวุ้นที่มีส่วนผสมหลักตามสูตรของ Brewbaker and Kwack (Brewbaker and Kwack, 1963) และอาหารวุ้นที่ใช้น้ำเป็นส่วนผสมหลัก โดยแต่ละประเภทแบ่งออกเป็น 3 สูตร รวมสูตรอาหารทั้งหมด 6 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1	อาหารสูตร Brewbaker and Kwack+ 0.7% agar
สูตรที่ 2	อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 2% sucrose
สูตรที่ 3	อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 10% sucrose
สูตรที่ 4	น้ำ + 0.7% agar
สูตรที่ 5	น้ำ + 0.7% agar + 2% sucrose
สูตรที่ 6	น้ำ + 0.7% agar + 10% sucrose

2. เตรียมกลุ่มเรณูสำหรับนำมาเพาะบนอาหารวุ้นทั้ง 6 สูตรซึ่งอาหารวุ้นแต่ละสูตรจะทำการทดลองด้วยกลุ่มเรณูจากดอกกล้วยไม้ที่มีอายุใกล้เคียงกัน โดยกลุ่มเรณูแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

2.1. กลุ่มเรณูที่ถูกคลุกใน stigma fluid ของดอกนั้น (Konar and Linsken, 1966) ก่อนนำมาเพาะบนอาหารวุ้น จำนวน 2 จาน

2.2. กลุ่มเรณูที่ไม่ได้คลุกใน stigma fluid จำนวน 2 จาน จากนั้น เก็บจานเพาะที่วางเรณูแล้วในที่มืด อุณหภูมิ 22±2 ºC (Shivanna and Rangaswamy, 1992) เป็นระยะเวลา 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง (ศิรัชตนันท์ โรจนวิจิตร และคณะ, 2559)

3. ตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีการทดสอบการงอกของเรณู

3.1. นำกลุ่มเรณูที่เพาะบนอาหารวุ้นมาทำให้แตกด้วยการขยี้ (ศิรัชตนันท์ โรจนวิจิตร และคณะ, 2559) แล้วนำไปวางบนสไลด์ 2 สไลด์ จากนั้นจึงตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X โดยสุ่มนับจำนวนเรณูทั้งหมด 5 ซ้ำ หรือ 5 บริเวณต่อการบันทึกผล 1 สไลด์ รวมทั้งสิ้น ชุดการทดลองละ 10 ซ้ำ

3.2. บันทึกจำนวนของเรณู ทั้งเรณูที่หลอดเรณูไม่งอกและเรณูที่มีหลอดเรณูงอกออกมา โดยการงอกของหลอดเรณูที่สมบูรณ์จะต้องมีความยาวมากกว่าความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของเรณูนั้น (Brown, 1958)

4. คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูและวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้ จากนั้นจึงแปลงค่าด้วย arcsin และวิเคราะห์โดยการใช้สถิติ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของตัวอย่างด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (IBM SPSS Statistics version22 (An IBM Company), USA.)

การทดลองที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เหมาะสมต่อเรณูของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์สุรีย์พีช

1. เตรียมสารโคลชิซินที่มีระดับความเข้มข้นทั้งหมด 4 ระดับ หรือ 4 ชุดการทดลอง (Gao, Lin and Kang, 2004 cited in Song et al., 2015) ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1	0% (control)
ชุดการทดลองที่ 2	0.10%
ชุดการทดลองที่ 3	0.15%
ชุดการทดลองที่ 4	0.20%

2. นำกลุ่มเรณูแช่ลงในสารโคลชิซินที่เตรียมไว้ โดยใช้ดอกกล้วยไม้ 1 ดอกต่อชุดการทดลอง

3. ตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีการย้อมสี acetocarmine เข้มข้น 1%

3.1. หลังจากแช่กลุ่มเรณูลงในสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นในข้อ 1 เป็นเวลา 24, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง นำกลุ่มเรณูมาทำให้แตกด้วยการขยี้ (ศิรัชตนันท์ โรจนวิจิตร และคณะ, 2559) แล้วย้อมสี acetocarmine ความเข้มข้น 1% แล้วนำไปวางบนสไลด์ จากนั้นจึงตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X โดยสุ่มนับจำนวนเรณูทั้งหมด 5 ซ้ำ หรือ 5 บริเวณต่อการบันทึกผล 1 สไลด์ รวมทั้งสิ้น ชุดการทดลองละ 10 ซ้ำ

3.2. บันทึกจำนวนของเรณูทั้งเรณูที่ไม่ติดสี และเรณูที่ติดสีของ acetocarmine

4. คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูและวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้ จากนั้นจึงวิเคราะห์โดยการใช้สถิติ One-way ANOVA (IBM SPSS Statistics version22 (An IBM Company), USA.)

5. วาดกราฟเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณูเทียบกับความเข้มข้นของสารโคลชิซิน เพื่อคำนวณค่า LC_{10} ในการใช้ระบุความเข้นข้นที่เหมาะสมของสารโคลชิซิน

การทดลองที่ 3 ศึกษาการงอกของเรณูเมื่อได้รับสารโคลชิซิน

1. เตรียมอาหารวุ้นโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการงอกของเรณู (อ้างอิงจากแผนการทดลองที่ 1)

2. เตรียมสารโคลชิซิน แล้วเติมสารโคลชิซินลงในส่วนผสมอาหารวุ้น โดยใช้ระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เหมาะสม (อ้างอิงจากแผนการทดลองที่ 2)

3. นำกลุ่มเรณูมาเพาะบนอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ โดยเปรียบเทียบอาหารวุ้นที่มีสารโคลชิซินและไม่มีสารโคลชิซิน (control) ทำการทดลองด้วยกลุ่มเรณูจากดอกกล้วยไม้ที่มีอายุใกล้เคียงกัน ชุดการทดลองละ 5 ดอก

4. ตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีการทดสอบการงอกของเรณู หลังจากเริ่มเพาะเรณูด้วยระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด (อ้างอิงจากแผนการทดลองที่ 1) นำกลุ่มเรณูที่เพาะบนอาหารวุ้นมาทำให้แตกด้วยการขยี้ (ศิรัชตนันท์ โรจนวิจิตร และคณะ, 2559) แล้วนำไปวางบนสไลด์ จากนั้นจึงตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X โดยสุ่มนับจำนวนเรณูทั้งหมด 5 ซ้ำ หรือ 5 บริเวณต่อการบันทึกผล 1 สไลด์ รวมทั้งสิ้น ชุดการทดลองละ 10 ซ้ำ

4.1. บันทึกจำนวนของเรณูทั้งเรณูที่ไม่งอกและเรณูที่มีหลอดเรณูงอกออกมา โดยการงอกของหลอดเรณูที่สมบูรณ์จะต้องมีความยาวมากกว่าความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของเรณูนั้น (Brown, 1958)

4.2. คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูและวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้ จากนั้นจึงวิเคราะห์โดยการใช้สถิติ independence t-test (IBM SPSS Statistics version22 (An IBM Company), USA.)

5. ทำการทดลองข้อ 1-5 ซ้ำอีก 1 ครั้ง รวมการทดลอง 2 ชุด

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารและเวลาที่เหมาะสมต่อการงอกของเรณูด้วยวิธี *in vitro* pollen germination ในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช

ในการทดลอง ทำการเพาะเรณูกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช บนอาหารวุ้นเข้มข้น 0.7% agar และบันทึกความมีชีวิตของเรณูด้วยการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูระหว่างสูตรอาหาร Brewbaker and Kwack (สูตรที่ 1-3) และสูตรอาหารน้ำกลั่น (สูตรที่ 4-6) โดยเรณูของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช เริ่มนับว่าเกิดการงอกได้เมื่อหลอดเรณูมีความยาวมากกว่าความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของเรณู (ภาพที่ 8c)

ผลการทดลอง พบว่า เรณูที่เพาะบนอาหารวุ้นสูตรน้ำกลั่นทั้ง 3 สูตร (สูตรที่ 4-6) ไม่มีการงอกของเรณูใน 72 ชั่วโมงถึง 168 ชั่วโมง ส่วนเรณูที่เพาะบนอาหารวุ้น 0.7% agar สูตร Brewbaker and Kwack (สูตรที่ 1-3) มีการงอกทุกสูตร ซึ่งเริ่มนับการงอกของเรณูได้ในระยะเวลา 120 ชั่วโมง เป็นต้นไป (ภาพที่ 8c) และเมื่อใช้ One-way ANOVA ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูเปรียบเทียบในสูตรอาหาร Brewbaker and Kwack ทั้ง 3 สูตร ในระยะเวลา 120 ชั่วโมง, 144 ชั่วโมง และ 168 ชั่วโมง พบว่า ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง การงอกของเรณูมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% โดยเรณูแบบไม่คลุก stigma fluid ในสูตรที่ 3 หรือสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 10% sucrose มีการงอกของเรณูมากที่สุด (ตารางที่ 1)

ในระยะเวลา 120 ชั่วโมง เรณูที่เพาะบนอาหารวุ้นสูตรที่ 3 หรือสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 10% sucrose แบบไม่คลุก stigma fluid มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูมากที่สุด คือ 20.59% ซึ่งในสูตรอาหารที่ไม่เติม sucrose (0% sucrose) เรณูของกล้วยไม้พันธุ์นี้ก็สามารถระบุการงอกของเรณูได้เมื่อเพาะในระยะเวลา 120 ชั่วโมง หากมีการใช้ stigma fluid กระตุ้นการงอก (ภาพที่ 5)

เมื่อพิจารณาเฉพาะสูตรอาหาร Brewbaker and Kwack ทำการเปรียบเทียบปริมาณ sucrose 3 สัดส่วน ได้แก่ 0%, 2% และ 10% รวมถึงการคลุกและไม่คลุก stigma fluid ของดอกกล้วยไม้ ว่ามีปฏิสัมพันธ์กันหรือไม่ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย two-way ANOVA (ตารางที่ 2) พบว่า ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง สูตรอาหารและการคลุก stigma fluid มีปฏิสัมพันธ์กัน ส่วนที่

ระยะเวลา 144 ชั่วโมงและ 168 ชั่วโมง พบว่า สูตรอาหารและการคลุก stigma fluid ไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน ทำให้ทราบว่า เมื่อระยะเวลาที่เพาะเรณูยาวนานขึ้น การคลุก stigma fluid จะไม่ส่งผลต่อการงอกของหลอดเรณูแต่อย่างใด การงอกของเรณูจะมากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณน้ำตาลที่อยู่ในสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเรณู โดยอาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 10% sucrose มีการงอกของเรณูมากที่สุดเช่นกัน (ภาพที่ 6 และ 7)

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูในระยะเวลา 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมงที่เพาะบนอาหารวุ้น 6 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar

สูตรที่ 2 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 2% sucrose

สูตรที่ 3 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 10% sucrose

สูตรที่ 4 น้ำ + 0.7% agar

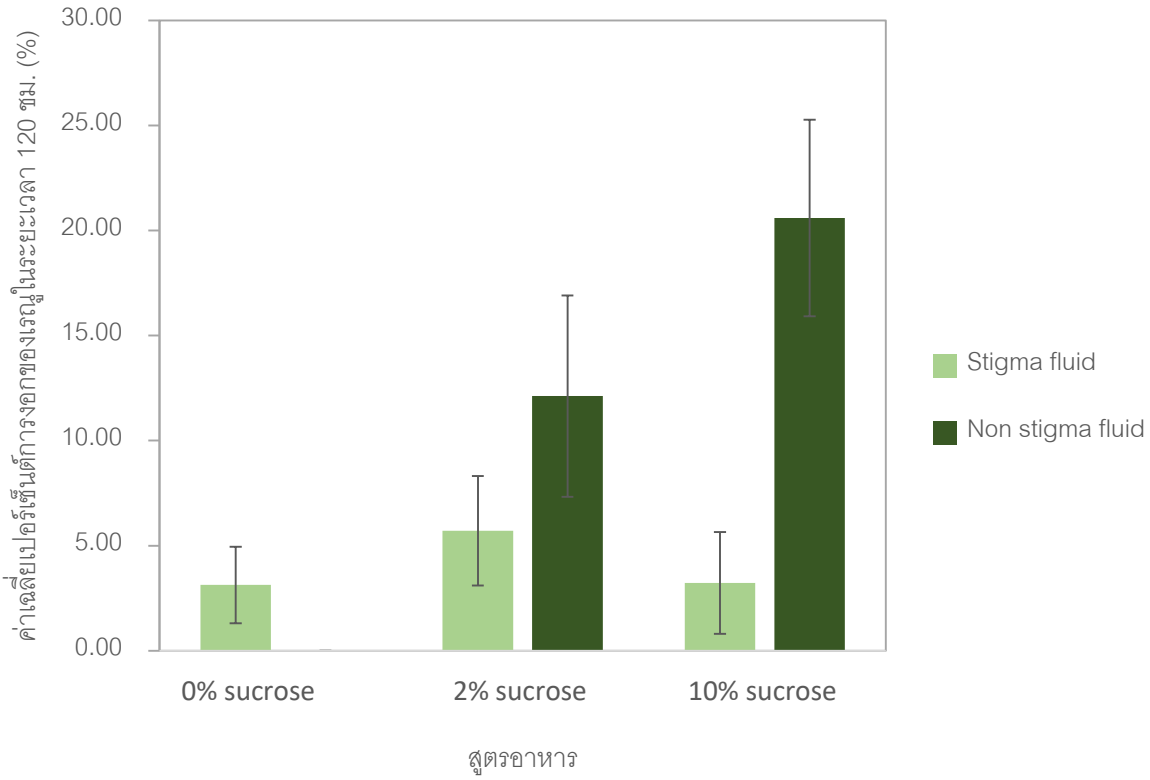
สูตรที่ 5 น้ำ + 0.7% agar + 2% sucrose

สูตรที่ 6 น้ำ + 0.7% agar + 10% sucrose

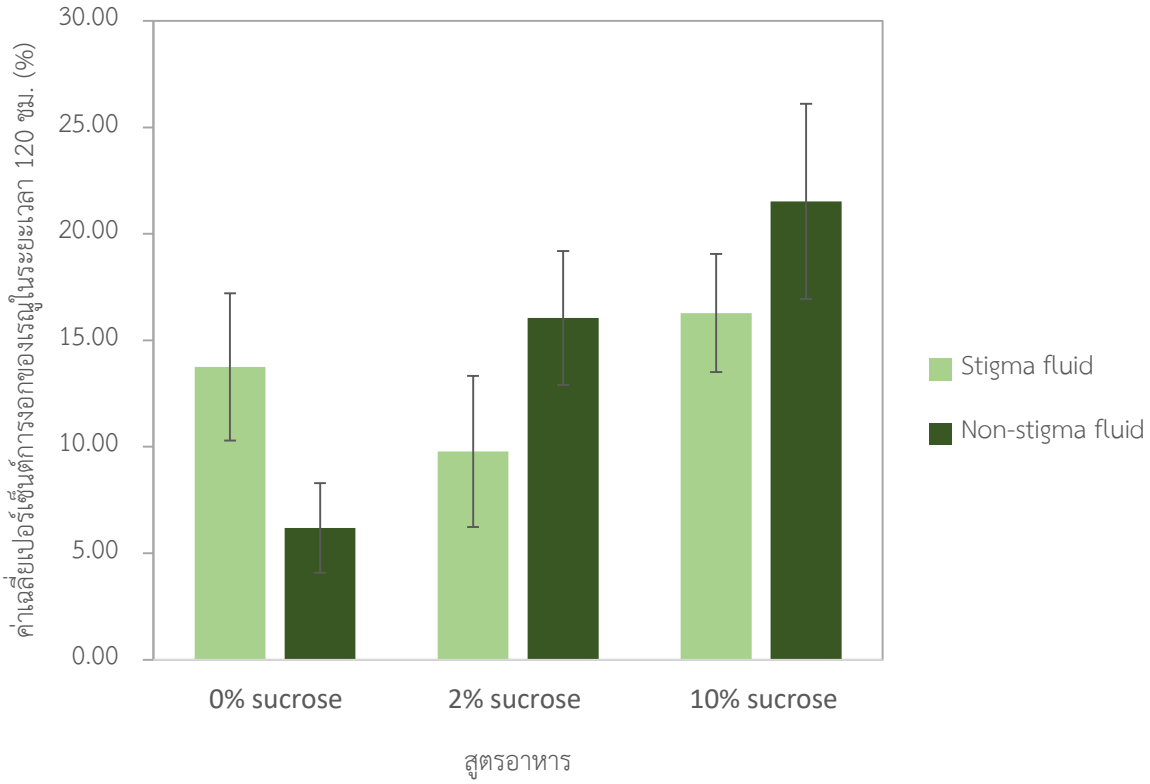
สูตร	Stigma fluid	**การงอกของเรณูในระยะเวลาต่าง ๆ (%) ± SE**				
		72 ชม.	**96 ชม.**	**120 ชม.***	**144 ชม.^{ns}**	**168 ชม.^{ns}**
1	คลุก	0	0	3.13±1.82 ^{ab}	13.75±3.46	17.07±2.59
	ไม่คลุก	0	0	0 ^{a}	6.19±2.10	12.63±2.39
2	คลุก	0	0	5.71±2.60 ^{ab}	9.78±3.55	22.08±2.28
	ไม่คลุก	0	0	12.12±4.79 ^{bc}	16.05±3.14	22.62±3.21
3	คลุก	0	0	3.23±2.42 ^{ab}	16.28±2.17	21.98±5.02
	ไม่คลุก	0	0	20.59±4.68 ^{c}	21.52±4.59	31.46±2.58
4	คลุก	0	0	0	0	0
	ไม่คลุก	0	0	0	0	0
5	คลุก	0	0	0	0	0
	ไม่คลุก	0	0	0	0	0
6	คลุก	0	0	0	0	0
	ไม่คลุก	0	0	0	0	0
			F	3.770	2.852	2.321
			Sig.	0.029	0.066	0.108

* ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูที่มีอักษรต่างกัน หมายความว่า ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95%

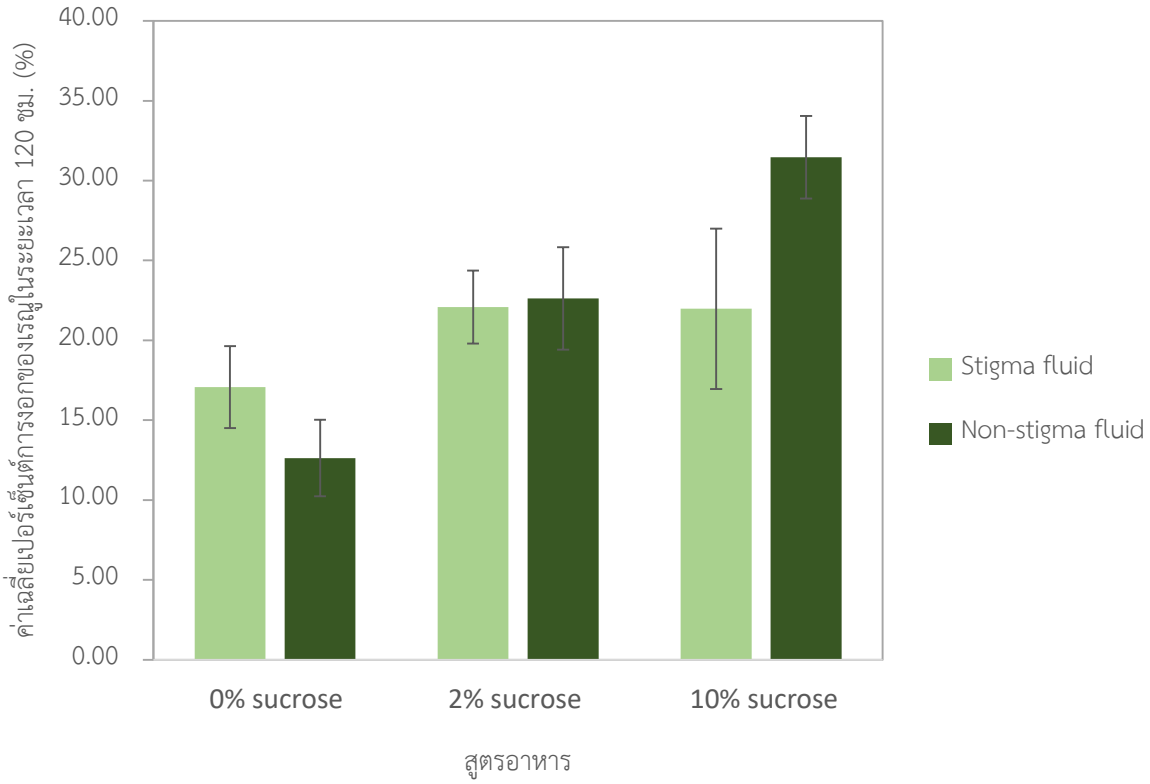
^{ns} ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95%



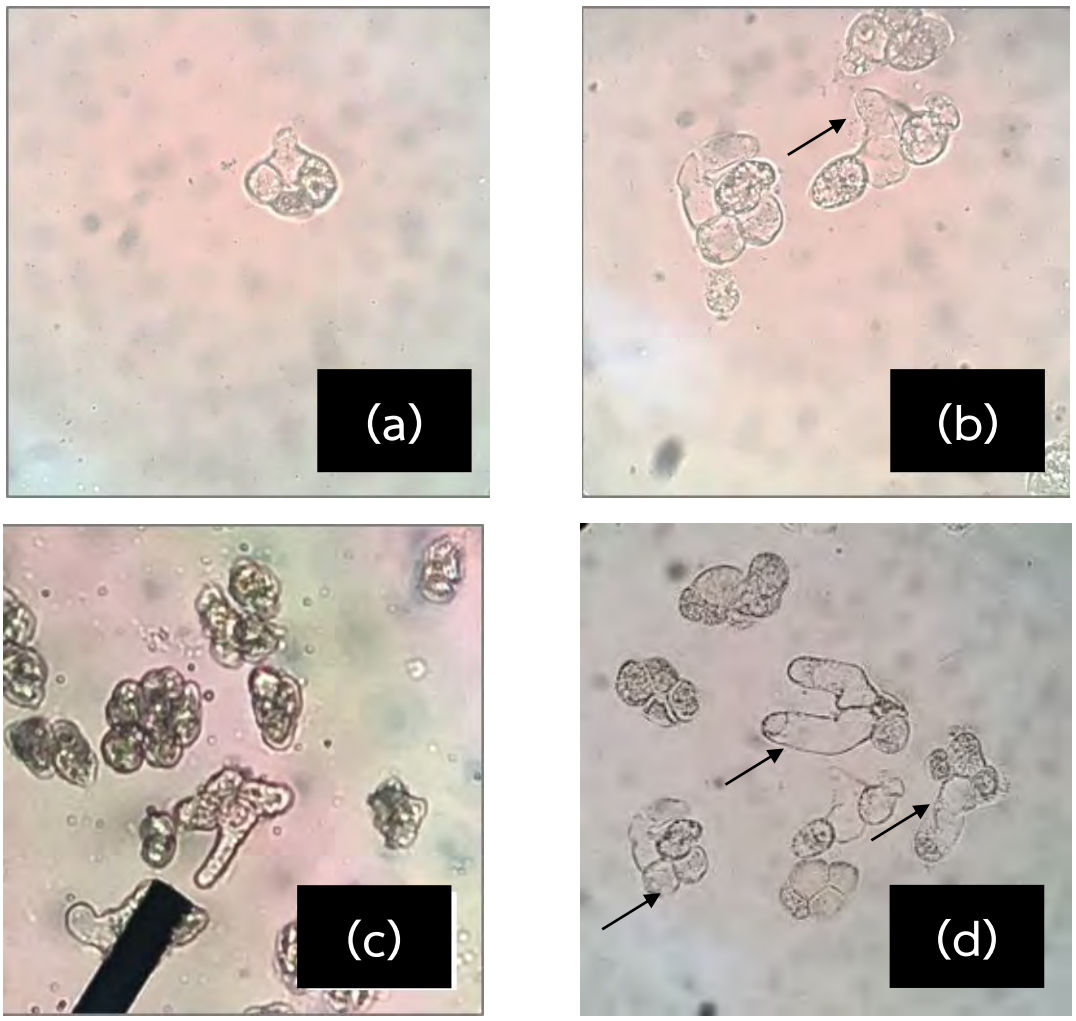
ภาพที่ 5 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูในระยะเวลา 120 ชั่วโมงที่เพาะเรณูบนอาหารวุ้น 3 สูตรที่มี sucrose แตกต่างกัน คือ 0%, 2% และ 10% เปรียบเทียบเรณูที่คลุก stigma fluid และไม่คลุก stigma fluid



ภาพที่ 6 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูในระยะเวลา 144 ชั่วโมงที่เพาะเรณูบนอาหารวุ้น 3 สูตรที่มี sucrose แตกต่างกัน คือ 0%, 2% และ 10% เปรียบเทียบเรณูที่คลุก stigma fluid และไม่คลุก stigma fluid



ภาพที่ 7 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูในระยะเวลา 168 ชั่วโมงที่เพาะเรณูบนอาหารวุ้น 3 สูตรที่มี sucrose แตกต่างกัน คือ 0%, 2% และ 10% เปรียบเทียบเรณูที่คลุก stigma fluid และไม่คลุก stigma fluid



ภาพที่ 8 การงอกของเรณูในระยะเวลาต่าง ๆ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 10% sucrose แบบไม่คลุก stigma fluid

(a) 72 ชั่วโมง พบว่า เรณูเริ่มงอกหลอดเรณู

(b) 96 ชั่วโมง พบว่า เรณูเริ่มงอกหลอดเรณู (ลูกศรชี้)

(c) 120 ชั่วโมง พบว่า หลอดเรณูยาวมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของเรณู (เข็มชี้)

(d) 168 ชั่วโมง พบว่า หลอดเรณูยาวมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของเรณูและพบเรณูที่งอกจำนวนมากขึ้น (ลูกศรชี้)

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ Two-way ANOVA ของตัวแปร 2 ตัวแปร ได้แก่ สูตรอาหารวุ้นหรือปริมาณน้ำตาล (0%, 2% และ 10%) และการคลุก stigma fluid (คลุก และไม่คลุก) เมื่อเพาะเรณูในอาหารวุ้นสูตร Brewbaker and Kwack

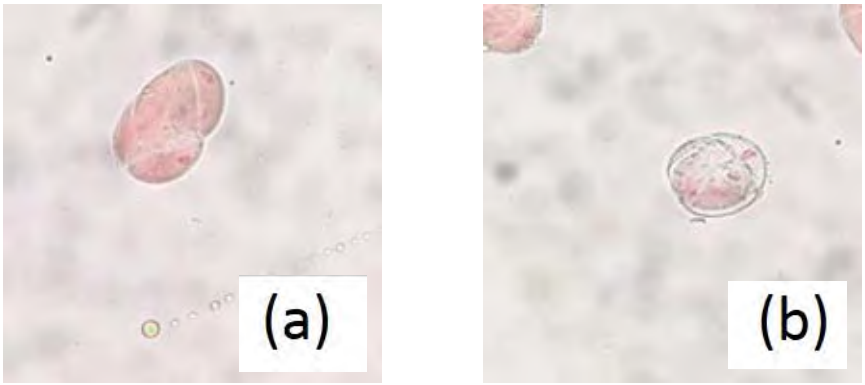
Source	df	120 ชั่วโมง		144 ชั่วโมง		168 ชั่วโมง	
		Mean square	Sig.	Mean square	Sig.	Mean square	Sig.
sucrose	2	.039	.014*	.040	.041*	.086	.001*
stigma	1	.048	.020*	.005	.524^{ns}	.002	.642^{ns}
sucrose * stigma	2	.032	.029*	.033	.066^{ns}	.024	.108^{ns}
Error	54	.008		.012		.011	
Corrected Total	59						

* ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูที่มีอักษรต่างกัน หมายความว่า ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95%

^{ns} ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95%

การทดลองที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เหมาะสมต่อเรณูของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช

ในการทดลอง ทำการแช่เรณูกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช ในสารโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0% (control), 0.10%, 0.15% และ 0.20% โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีการย้อมสี acetocarmine เข้มข้น 1% ซึ่งหลังจากย้อมสี acetocarmine เรณูที่มีชีวิตจะมีสีแดงทั่วทั้งเรณู ส่วนเรณูที่ไม่มีชีวิตจะมีสีแดงบางบริเวณหรือไม่มีสี (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 การติดสีย้อม acetocarmine เข้มข้น 1% ของเรณู

(a) เรณูที่มีชีวิต

(b) เรณูที่ไม่มีชีวิต

เมื่อวิเคราะห์ one-way ANOVA ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูจากการย้อมสี acetocarmine เปรียบเทียบในสารโคลชิซินเข้มข้น 0% (control), 0.10%, 0.15% และ 0.20% พบว่า ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูในสารโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 3)

ส่วนที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง, 96 ชั่วโมง และ 120 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูในสารโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95% ซึ่งค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูในระยะเวลา 72 ชั่วโมง, 96 ชั่วโมงและ 120 ชั่วโมง สามารถแบ่งกลุ่มเรณูเป็น 2 กลุ่มที่ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเรณูที่แช่ในน้ำกลั่น (control), เรณูที่แช่ในสารโคลชิซิน 0.15% และ 0.20% และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเรณูที่แช่ในสารโคลชิซิน

0.10% แสดงให้เห็นว่าสารโคลชิซินมีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู (ตารางที่ 3 และภาพที่ 10)

จากผลการทดลอง พบว่า ในระยะเวลา 72 ชั่วโมง เรณูที่แช่ในสารโคลชิซินเข้มข้น 0.10% มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 63.46% ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่น้อยที่สุด เรณูที่แช่ในสารโคลชิซินเข้มข้น 0.15% และ 0.20% มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 79.21% และ 83.15% ตามลำดับ และเรณูที่แช่ในน้ำกลั่น (control) มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 86.67% ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่มากที่สุด ส่วนในระยะเวลา 96 ชั่วโมง เรณูที่แช่ในสารโคลชิซินเข้มข้น 0.10% มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 81.73% ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่น้อยที่สุด เรณูที่แช่ในสารโคลชิซินเข้มข้น 0.15% และ 0.20% มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 93.48% และ 95.79% ตามลำดับ และเรณูที่แช่ในน้ำกลั่น (control) มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 98.77% ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่มากที่สุด สุดท้าย ในระยะเวลา 120 ชั่วโมง เรณูที่แช่ในสารโคลชิซินเข้มข้น 0.10% มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 80.81% ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่น้อยที่สุด เรณูที่แช่ในสารโคลชิซินเข้มข้น 0.15% และ 0.20% มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 94.68% และ 94.95% ตามลำดับ และเรณูที่แช่ในน้ำกลั่น (control) มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 97.17% ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่มากที่สุด (ตารางที่ 3)

เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง, 96 ชั่วโมง และ 120 ชั่วโมงเท่านั้น ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่า ในทั้ง 3 ระยะเวลา เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่แช่ในสารโคลชิซินเข้มข้น 0.10% แตกต่างจากเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่แช่ในน้ำกลั่น (control) ส่วนเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่แช่ในสารโคลชิซินเข้มข้น 0.15% และ 0.20% ไม่แตกต่างจากเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่แช่ในน้ำกลั่น (control) ดังนั้น เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมงและ 120 ชั่วโมง จึงนำมาใช้ในการหาค่า LC_{10} (lethal concentration at 10%) หรือค่าความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เหมาะสมต่อเรณูของกล้วยไม้มากที่สุด โดยสามารถวิเคราะห์ได้จากกราฟค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณูในแต่ละระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซิน เพื่อคำนวณความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ทำให้เรณูตาย 10% ของจำนวนเรณูทั้งหมด เนื่องจากเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมงและ 120 ชั่วโมงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% และเมื่อนำเปอร์เซ็นต์วามมีชีวิตของเรณูมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณู พบว่า มีค่าคร่อมค่าเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณูที่ตรงกับค่า LC_{10}

จากการทดลอง คำนวณค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณูในระยะเวลา 96 ชั่วโมงและ 120 ชั่วโมง พบว่า เรณูที่แช่ในน้ำกลั่น (control) เท่ากับ 1.23% และ 2.83% ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณูที่น้อยที่สุด และเรณูที่แช่ในสารโคลชิซินเข้มข้น 0.10% มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความตาย 18.27% และ 19.19% ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความตายที่มากที่สุด (ตารางที่ 4)

เมื่อคำนวณความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ทำให้เรณูตาย 10% ของจำนวนเรณูทั้งหมด หรือ ค่า LC_{10} (lethal concentration at 10%) จากสมการถดถอยของกราฟเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณูในแต่ละระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซิน พบว่า เรณูตาย 10% ของจำนวนเรณูทั้งหมดในระยะเวลา 96 ชั่วโมง และ 120 ชั่วโมงเมื่อแช่ในสารโคลชิซินเข้มข้น 0.14% (ภาพที่ 11 และ 12)

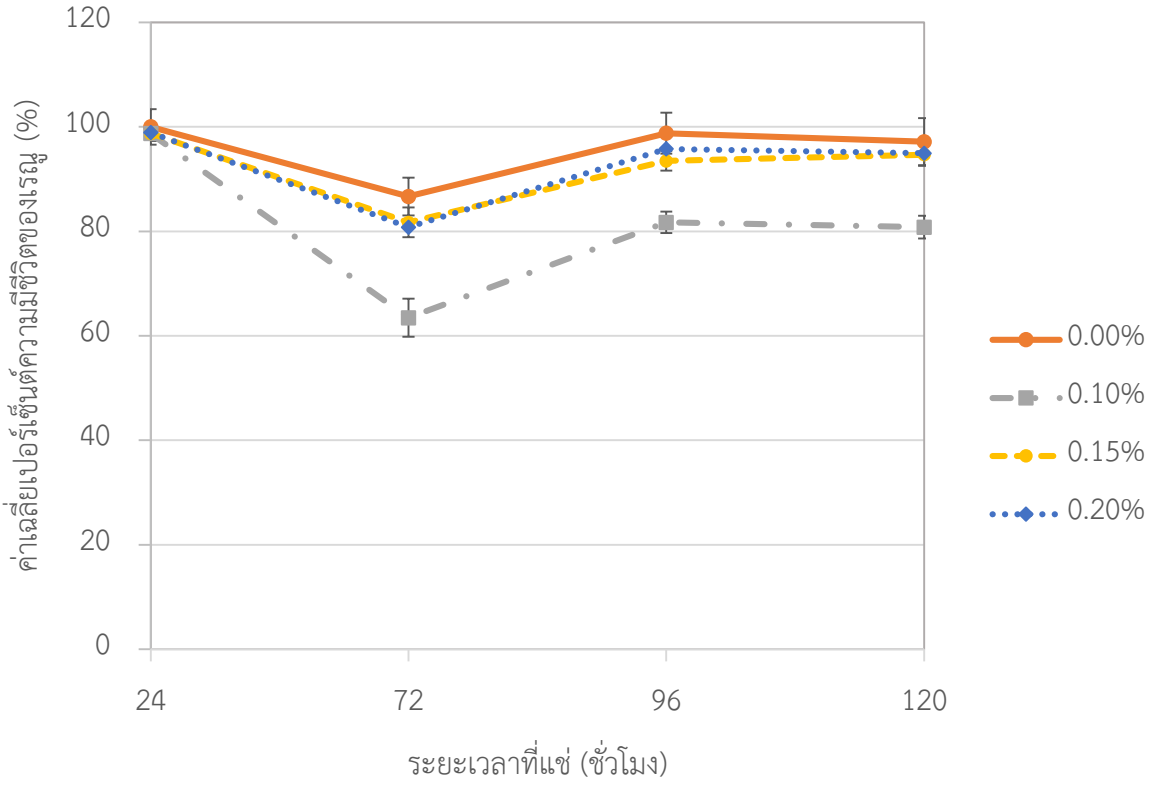
ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูในระยะเวลา 24, 72, 96 และ 120 ชั่วโมงที่แช่ในสารโคลชิซิน 4 ชุดการทดลอง

ชุดการทดลองที่ 1	น้ำกลั่น (control)
ชุดการทดลองที่ 2	0.10%
ชุดการทดลองที่ 3	0.15%
ชุดการทดลองที่ 4	0.20%

ความเข้มข้นของสารโคลชิซิน (%)	**ความมีชีวิตของเรณูในระยะเวลาต่างๆ (%) ± SE**			
	24 ชม. [ns]	**72 ชม.***	**96 ชม.***	**120 ชม.***
0 (control)	100±0.00	86.67±3.38 [a]	98.77±1.43 [a]	97.17±1.40 [a]
0.10	98.73±1.67	63.46±3.61 [b]	81.73±3.63 [b]	80.81±2.85 [b]
0.15	98.75±1.00	79.21±3.92 [a]	93.48±2.03 [a]	94.68±1.88 [a]
0.20	98.90±1.67	83.15±4.50 [a]	95.79±2.16 [a]	94.95±2.14 [a]
F	0.347	4.895	8.351	7.789
Sig.	0.792	0.006	0.000	0.000

* ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่มีอักษรต่างกัน หมายความว่า ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95%

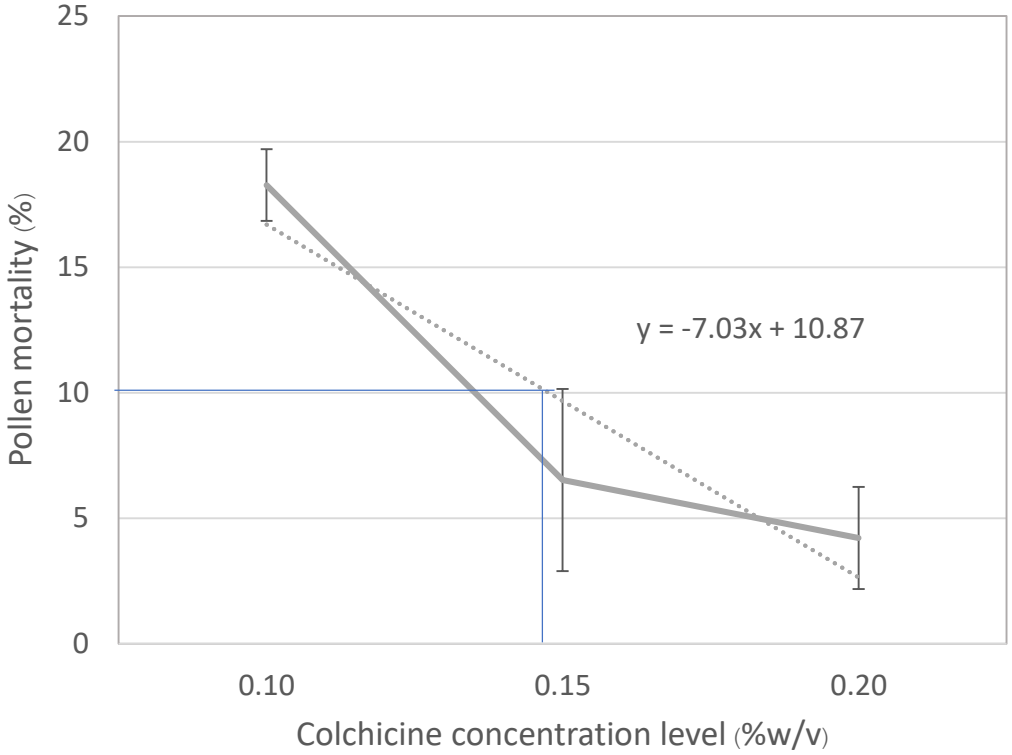
[ns] ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95%



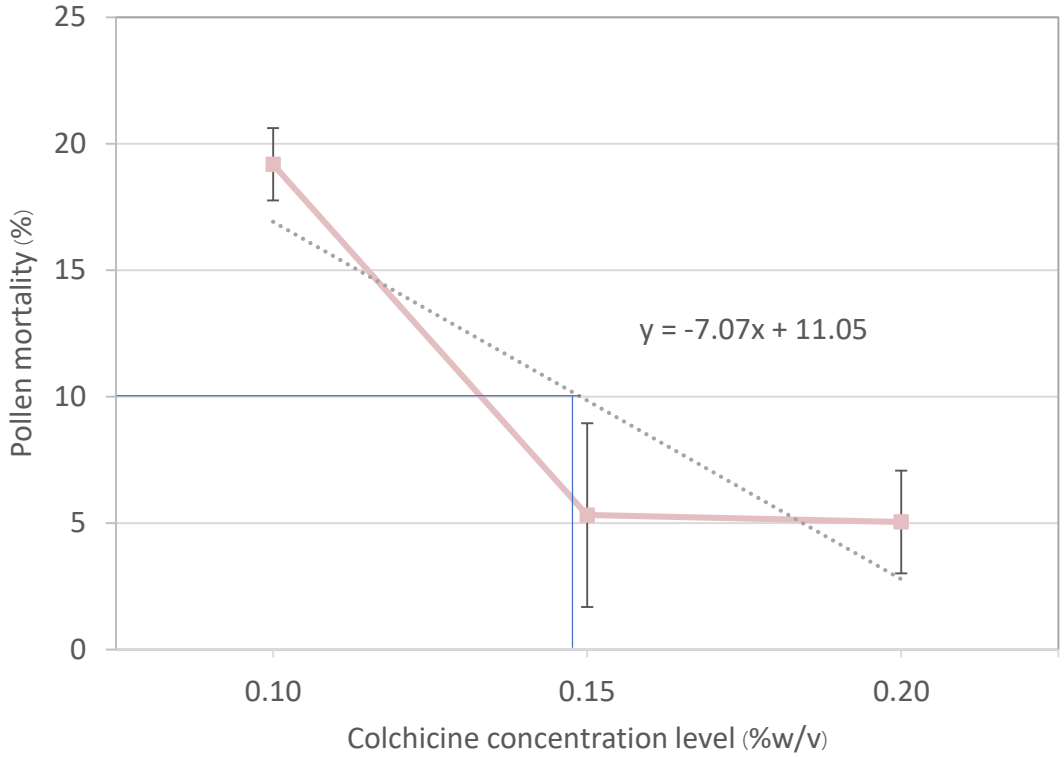
ภาพที่ 10 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่แช่ในน้ำกลั่นและสารโคลชิซินเข้มข้น 0.10%, 0.15% และ 0.20% ในระยะเวลา 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ one-way ANOVA ของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณูที่แช่ในชุดการทดลองทั้ง 4 ชุด ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง และ 120 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (%)	**ความตายของเรณูที่ 96 ชั่วโมง (%) ± SE**	**ความตายของเรณูที่ 120 ชั่วโมง (%) ± SE**
0 (control)	1.23±1.43	2.83±1.40
0.10	18.27±3.63	19.19±2.85
0.15	6.52±2.03	5.32±1.88
0.20	4.21±2.16	5.05±2.14



ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารโคลชิซิน (x) และเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณู (y) เมื่อแช่เรณูในสารละลายโคลชิซินเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง และทดสอบความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีการย้อมสี acetocarmine เข้มข้น 1%



ภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารโคลชิซิน (x) และเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณู (y) เมื่อแช่เรณูในสารละลายโคลชิซินเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง และทดสอบความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีการย้อมสี acetocarmine เข้มข้น 1%

การทดลองที่ 3 ศึกษาการงอกของเรณูเมื่อได้รับสารโคลชิซิน

ในการทดลอง ทำการเพาะเรณูกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช บนอาหารวุ้นสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 10% sucrose ผสมโคลชิซิน และอาหารวุ้นที่ไม่ผสมโคลชิซิน และบันทึกความมีชีวิตของเรณูด้วยการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู

จากผลการทดลอง พบว่า ในระยะเวลา 120 ชั่วโมง การทดลองทั้ง 2 ชุดมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูในอาหารวุ้นที่ไม่ผสมโคลชิซินมากกว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูในอาหารวุ้นที่ผสมโคลชิซิน 0.14% (การทดลองชุดที่ 1: t = 11.815, sig.(2-tailed) = 0.000, การทดลองชุดที่ 2: t = -8.322, sig.(2-tailed) = 0.000)

โดยค่าเฉลี่ยของเรณูทั้ง 2 ชุด พบว่าเรณูที่เพาะในสูตร Brewbaker and Kwack ผสมโคลชิซินมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู 61.26% มากกว่าเรณูที่เพาะในสูตร Brewbaker and Kwack ไม่ผลมโคลชิซินที่มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูเพียง 0.74% ซึ่งผลการทดลองจากเรณูทั้ง 2 ชุดมีความสอดคล้องกัน (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ t-independent test ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูที่แช่ในชุดการทดลอง 2 ชุด ในระยะเวลา 120 ชั่วโมง

ชุดที่	**สูตรอาหาร**	**การงอกของเรณู (%)**	T	Sig(2-tailed)
1	non-colchicine agar	53.85 ± 3.92	11.815	0.000
	colchicine agar	1.49 ± 1.43		
2	non-colchicine agar	68.67 ± 5.49	-8.322	0.000
	colchicine agar	0		
เฉลี่ย	non-colchicine agar	61.26		
	colchicine agar	0.74		

อภิปรายผลการทดลอง

สูตรอาหารและเวลาที่เหมาะสมต่อการงอกของเรณูด้วยวิธี *in vitro* pollen germination ในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช

จากการศึกษาสูตรอาหารและเวลาที่เหมาะสมต่อการงอกของเรณูด้วยวิธี *in vitro* pollen germination ในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช พบว่า เรณูของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูสูงที่สุดเมื่อเพาะบนอาหารวุ้นสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 10% sucrose โดยไม่คลุกเรณูใน stigma fluid และระยะเวลาในการเพาะเรณูที่เหมาะสมในการเพาะเรณู คือ 120 ชั่วโมง โดยเรณูที่เพาะบนอาหารวุ้นสูตร Brewbaker and Kwack สามารถงอกหลอดเรณูได้ ซึ่งสารอาหารในอาหารวุ้นสูตร Brewbaker and Kwack มี boric acid และ calcium nitrate เป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเรณูของไม้ดอกหลายวงศ์ รวมถึงวงศ์กล้วยไม้ด้วย (Shivanna and Rangaswamy, 1992) สารอาหารนั้นเพียงพอสำหรับการกระตุ้นการงอกของเรณูในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช

นอกจากนี้ เวลาที่ดีที่สุดที่เหมาะกับการงอกของสุรีย์พีชนั้น แตกต่างจากการทดลองของศิรัชตนันท์ โรจนวิจิตร และคณะ (2559) ที่ศึกษาการงอกของเรณูไว้ในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์อื่น ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์บอม 17 , เอียสกุล และกล้วยไม้แคระ พบว่าใช้เวลากระตุ้นการงอกเพียง 72 ชั่วโมงซึ่งน้อยกว่าพันธุ์สุรีย์พีชเกือบเท่าตัว เนื่องจากมีสาเหตุจากความแตกต่างทางพันธุกรรม และในการทดลองเพาะเรณูบนอาหารวุ้น พบว่า มีเรณูแตก เนื่องจาก water potential ในอาหารวุ้นสูงกว่าในเรณู เรณูจึงแตกออก

ความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เหมาะสมต่อเรณูของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เหมาะสมต่อเรณูของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช พบว่า เมื่อแช่เรณูในสารโคลชิซินเข้มข้น 0.14% (w/v) ในระยะเวลา 96 ชั่วโมงและ 120 ชั่วโมง ทำให้เรณูตายจำนวน 10% ของจำนวนเรณูทั้งหมด หรือค่า LC_{10} (lethal concentration at 10%) ของการใช้สารโคลชิซินในเรณูของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Roslim, Herman และ Fiatin (2558) ที่ใช้ค่า lethal concentration ในการหาผลกระทบของรังสีแกมมาต่อการงอกของเมล็ดถั่วเขียว โดยการศึกษานี้ใช้ค่า LC_{50} หรือค่าที่ทำให้เมล็ดตาย 50% เนื่องจากสามารถหาความเข้มข้นที่ทำให้เมล็ดตายทั้งหมดได้ นอกจากนี้ค่า lethal concentration ยังสามารถใช้ได้ในการกำหนดความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงอีกด้วย เช่น การศึกษาของภาณุพงษ์ ทองเปรม (2558) ที่ใช้ค่า LC_{10} ในการศึกษาผลกระทบของสารคลอร์ไพริฟอสต่อแมงมุมสุนัขป่า เป็นต้น

ค่า LC_{10} ของการใช้สารโคลชิซินเท่ากับ 0.14% (w/v) โดยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูหลังจากแช่ในสารโคลชิซินที่มีความเข้มข้นระดับต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95% และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูแปรผันตามความเข้มข้นของสารโคลชิซิน นอกจากนี้ ยังพบการแตกของเรณูเกิดขึ้นในทุกชุดการทดลอง การเติม colchicine เข้าไปอาจทำให้ค่า water potential ภายในและภายนอกเรณูต่างกัน ยิ่งมีความเข้มข้นของสารโคลชิซินมากขึ้น จึงทำให้เรณูแตกมากขึ้น สาเหตุนี้ ทำให้พบว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่บันทึกได้มีค่ามากขึ้นเมื่อเติมโคลชิซินมากขึ้น เพราะเรณูที่ไม่มีชีวิตแตกไปหมดจึงเหลือแต่เรณูที่มีชีวิตอยู่ ดังนั้น การวัดคุณภาพของเรณูจึงไม่อาจวัดได้ด้วยการพิจารณาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีการย้อมสี acetocarmine เข้มข้น 1% เพียงอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาความมีชีวิตของเรณูในกล้วยไม้ 25 ชนิดของปิยนุช ศรชัย, วราภรณ์ คำพงษ์ และ เสริมศิริ จันทร์เปรม (2559) ที่พิจารณาความสัมพันธ์ของผลจากการชักนำด้วยโคลชิซินกับความมีชีวิตของเรณู พบว่าทั้งสองปัจจัยไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน

การงอกของเรณูเมื่อได้รับสารโคลชิซิน

จากการศึกษาผลของโคลชิซินต่อการงอกของเรณูในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุริย์พีช พบว่า ในระยะเวลา 120 ชั่วโมง ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูที่เพาะบนอาหารวุ้นบนอาหารวุ้นสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 10% sucrose หรือชุดควบคุมที่ไม่ผสมโคลชิซิน มีค่ามากกว่าเรณูที่เพาะบนอาหารวุ้นสูตรเดียวกัน แต่ผสม 0.14% colchicine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95% กล่าวได้ว่า โคลชิซินมีผลต่อการงอกของเรณู และส่งผลให้การงอกของเรณูลดลง สอดคล้องกับการศึกษาของ Geetha, Vijayabaskaran และ Jayaraman (2004) ในดอกข้าวโพด เมื่อนำโคลชิซินผสมลงไปในอาหารวุ้น และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูกับอาหารวุ้นปกติที่ไม่ผสมโคลชิซิน พบว่า อาหารวุ้นที่ผสมโคลชิซินนั้นไม่สามารถชักนำให้เกิดการงอกของเรณูได้ ปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้ สามารถอธิบายได้ด้วยการศึกษาบทบาทของไมโครทิวบูลในการสร้างหลอดเรณูของ Agouzal และ Quyou (2012) พบว่า การยืดตัวของหลอดเรณูจะขึ้นอยู่กับทิศทางในการขนส่งสารไปยังเซลล์ปลายทางที่เรณูไปรวมด้วย ซึ่งไมโครทิวบูลมีส่วนร่วมในการลำเลียง vegetative cell และ generative cell ไปที่ปลายทาง ด้วยการทำงานร่วมกันของไคเนซินและไดเนอินซึ่งเป็นโปรตีนขนส่ง (motor proteins) ของไมโครทิวบูล หากโคลชิซินทำให้เกิดกระบวนการยับยั้งการพอลิเมอไรเซชันของไมโครทิวบูลแล้ว การเคลื่อนไหวของ vegetative cell และ generative cell จากส่วนฐานไปสู่บริเวณปลายของหลอดเรณูจะช้าลงอย่างมีนัยสำคัญ การเติมโคลชิซินลงไปจึงทำให้หลอดเรณูงอกช้าหรือไม่งอกเลย

สรุปผลการทดลอง

สูตรอาหารและเวลาที่เหมาะสมต่อการงอกของเรณูด้วยวิธี *in vitro* pollen germination ในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช

1. เวลาที่เหมาะสมต่อการงอกของเรณูด้วยวิธี *in vitro* pollen germination ในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช ได้แก่ 120 ชั่วโมง
2. สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเรณูด้วยวิธี *in vitro* pollen germination ในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช ได้แก่ สูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 10% sucrose แบบไม่คลุก stigma fluid โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู 20.59%

ความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เหมาะสมต่อเรณูของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช

1. ความเข้มข้นของสารโคลชิซินและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีการย้อมสี acetocarmine เข้มข้น 1% ไม่มีความสัมพันธ์กัน
2. ค่า LC_{10} (lethal concentration at 10%) ของโคลชิซินในเรณูของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช ได้แก่ 0.14%

การงอกของเรณูเมื่อได้รับสารโคลชิซิน

โคลชิซินมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู โดยเมื่อความเข้มข้นของสารโคลชิซินเพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูจะลดลง เพราะโคลชิซินมีฤทธิ์ยับยั้งการพอลิเมอไรเซชันของไมโครทิวบูล ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการงอกของเรณูหรือมีอัตราการงอกช้าลง

เอกสารอ้างอิง

กรณ์ กรภัทรชัยกุล, ไซหนับ ยู่โซะ, ทิพวรรณ คงอินทร์ และ รูซีลา สะลูโว๊ะ. 2558. สัณฐานวิทยา ความมีชีวิต และการงอกของเรณูพืชดอก 15 ชนิด. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 4 : 622-632.

กรมวิชาการเกษตร. 2548. กล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์การค้าในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร : กรมวิชาการเกษตร

ครรชิต ธรรมสิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. กรุงเทพมหานคร : บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้งแอนพับลิชชิ่ง จำกัด.

ทัศนัย ปัญจันทร์สิงห์. 2560. ความหลากหลายของกล้วยไม้ในศูนย์การศึกษาสามพร้าว มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี. พิมพ์ครั้งที่ 1. อุดรธานี : ศรีอักษรการพิมพ์.

ปรางนุช เลิศหิรัณย์. 2560. สินค้ากล้วยไม้ [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.ditp.go.th/contents_attach/216217/216217.pdf [12 มีนาคม 2561]

ปิยนุช ศรชัย, วราภรณ์ คำพงษ์ และ เสริมศิริ จันทร์เปรม. 2559. ปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสและความมีชีวิตของเรณูกล้วยไม้สกุลหวาย 25 พันธุ์. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 47 : 227-240.

ภาณุพงษ์ ทองเปรม. 2558. พิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของสารจำกัดแมลงคลอร์ไพริฟอสต่อแมงมุมสุนัขป่า. วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ระพี สาคริก. 2502. การผสมเกสรกล้วยไม้. วารสารกสิกร 32 : 213-219.

ระพี สาคริก. 2530. กล้วยไม้. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ช่องนนทรี.

ศิรัชตนันท์ โรจนวิจิตร, ปิยนุช ศรชัย, ดวงกมล สัมฤทธินันท์, หนึ่งฤทัย เดชสังกรานนท์, บุบผา คงสมัย และ เสริมศิริ จันทร์เปรม. 2559. เทคนิคสำหรับการแยกและทดสอบความงอกของเรณูกล้วยไม้สกุลหวายบางพันธุ์. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 47 : 305-316.

สุทัศน์ ลิมปิยประพันธ์. 2554. กล้วยไม้. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : ซีเอ็ดยูเคชั่น.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2560. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2560 [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.oae.go.th/assets/portals/1/files/ebook/agri_situation2560.pdf [14 สิงหาคม 2561]

อดิศร กระแสชัย. 2539. การปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกโดยการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์. เชียงใหม่ : ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อลงกลด แทนออมทอง และ สราวุธ แก้วศรี. 2561. การชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในพืชด้วยสารโคลชิซิน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 : 1-12.

อลิษา สุขดี. 2559. กล้วยไม้ไทย [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://orchid99.blogspot.com/2012/07/blog-post_12.html [12 มีนาคม 2561]

Agouzal, M. and Quyou, A. 2012. The role of microtubules in the growth of pollen tube. Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development 4 : 16-21.

Basu, R.K. and Datta, S.K. 1977. Effects of X- rays and colchicine on pollen of *Trichosanthes anguina* L. (Cucurbitaceae). Grana 16 : 105-109.

Brewbaker, J.L. and Kwack, P.M. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. American Journal of Botany 56 : 859-865.

Brown, A.G. 1958. A simple pollen viability test. Australian Forestry 22 : 10-12.

Diengdoh, R.V., Kumaria, S., Tandon, P. and Das, M.C. 2017. Asymbiotic germination and seed storage of *Paphiopedilum insigne*, an endangered lady's slipper orchid. South African journal of Botany 112 : 215-224.

Gao, P., Lin, W. and Kang, X.Y. 2004. Pollen chromosome doubling of *Eucommia ulmoides* induced by colchicine. Journal Beijing for University 26 : 39-42., Cited in Song, S., Tian, J., Li, Y., Shang, F., Kang, X. and Wang, J. 2015. Morphological characterization and *in vitro* germination of heat-treated pollen in *Eucommia ulmoides*. Silvae Genetica 64 : 99-108.

Geetha, K., Vijayabaskaran, S. and Jayaraman, N. 2014. In vitro studies on pollen germination and pollen tube growth in maize. Journal of Food, Agriculture and Environment 2 : 205-207.

Hampton, M. 2014. Hand Pollinaiton of Tomato for breeding and Seed Production. Florida : University of Florida.

Huang, H., Gao S., Wang, D., Huang, P. and Li, J. 2014. Autotetraploidy induced in Nianmaohuangqin (*Radix Scutellariae viscidulae*) with colchicine *in vitro*. Journal of traditional Chinese Medicine 34 : 199-205.

Kauth, P.J., Johnson, T.R., Stewart, S.L. and Kane M.E. 2007. A classroom exercise in hand pollination and *in vitro* asymbiotic orchid seed germination. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 93 : 223-230.

Konar, R.N. and Linskens, H.F. 1966. Planta 71 : 372-387.

Lack, A.J. and Diaz, A. 1990. The pollination of *Arum maculatum* L. – a historical review and new observations. Watsonia 18 : 333-342.

Meng Y.T., Su H.C. and Wen Y.K. 2016. Floral morphs and seed production from hand-pollination in a population of *Oxalis corymbosa* in Taiwan. Flora 226 : 89-95.

National center for biotechnology information, 2018. Colchicine [Online]. Available from : https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/colchicine#section=Top

Pridgeon, A.M., Cribb, M.W., Chase, M.W. and Rasmussen, F.N. 1999. Genera Orchidacearum. Oxford : Oxford University.

Roslim, D.I., Herman, Fiatin, I. 2015. Lethal dose 50 (LD_{50}) of mungbean (*Vigna radiata* L.Wilczek) cultivar Kampar. Sabrao 47 : 510-516.

Seed Savers Exchange, 2018a. Hand-Pollination : Corn [Online]. Available from : https://www.seedsavers.org/site/pdf/corn-hp.pdf [2 September 2018]

Seed Savers Exchange, 2018b. Hand-Pollination : Squash [Online]. Available from : https://www.seedsavers.org/site/pdf/squash-hp.pdf [2 September 2018]

Shivanna, K.R. 2003. Pollen biology and biotechnology. USA : Science Publishers, Inc.

Shivanna, K.R. and Rangaswamy, N.S. 1992. Pollen Biology. New York : Springer-Verlag.

Stort, M.N.S. and Galdino, G.de L. 1984. Self and cross-pollination in some species of the genus *Laelia* Lindl. (ORCHIDACEAE). Brazilian Journal of Genetics 7: 671 – 676.

Sulusoglu, M. and Cavusoglu, A. 2014. *in vitro* pollen viability and pollen germination in cherry laurel (*Prunus laurocerasus* L.). The Scientific World Journal : 1-7.

Tsai, M., Chen, S. and Kao, W. 2016. Floral morphs and seed production from hand-pollination in a population of *Oxalis corymbose* in Taiwan. Flora 226 : 89-95.

Yang, J., Yao, P., Li, Y., Mo, J., Wang, J. and Kang, X. 2016. Induction of 2n pollen with colchicine during microsporogenesis in Eucalyptus. Euphytica 210 : 69-78.

ภาคผนวก ก

สูตรที่ใช้ในการคำนวณเปอร์เซ็นต์ของเรณู

สูตรที่ใช้ในการคำนวณเปอร์เซ็นต์ของเรณู

เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู

$$\text{เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู (\%)} = \frac{\text{จำนวนเรณูที่งอกหลอดเรณูออกมา}}{\text{จำนวนเรณูทั้งหมด}} \times 100$$

เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู (\%)} = \frac{\text{จำนวนเรณูที่ย้อมติดสีทั่วทั้งเรณู}}{\text{จำนวนเรณูทั้งหมด}} \times 100$$

เปอร์เซ็นต์ความตายของเรณู

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความตายของเรณู (\%)} = \frac{\text{จำนวนเรณูที่ย้อมไม่ติดสี}}{\text{จำนวนเรณูทั้งหมด}} \times 100$$

ภาคผนวก ข

สูตรอาหาร

ตารางที่ 6 สารที่ใช้ในการเตรียมสูตรอาหาร Brewbaker and Kwack ในการทดลองที่ 1 โดยเตรียมสูตรอาหารละ 53.00 ml

ลำดับที่	สารเคมี	จำนวน	หน่วย
สูตร Brewbaker&Kwack			
1	น้ำกลั่น	53.00	ml
2	Sucrose	5.3000	g
3	Boric acid (100 mg/l)	0.0053	g
4	Calcium nitrate (300 mg/l)	0.0159	g
5	Magnesium sulfate (200 mg/l)	0.0106	g
6	Potassium nitrate (200 mg/l)	0.0106	g
7	agar	0.3710	g
สูตร Brewbaker&Kwack + 2%sucrose			
1	น้ำกลั่น	53.00	ml
2	Sucrose	6.3612	g
3	Boric acid (100 mg/l)	0.0053	g
4	Calcium nitrate (300 mg/l)	0.0159	g
5	Magnesium sulfate (200 mg/l)	0.0106	g
6	Potassium nitrate (200 mg/l)	0.0106	g
7	agar	0.3710	g

ลำดับที่	สารเคมี	จำนวน	หน่วย
สูตร Brewbaker&Kwack + 10%sucrose			
1	น้ำกลั่น	53.00	ml
2	Sucrose	10.602	g
3	Boric acid (100 mg/l)	0.0053	g
4	Calcium nitrate (300 mg/l)	0.0159	g
5	Magnesium sulfate (200 mg/l)	0.0106	g
6	Potassium nitrate (200 mg/l)	0.0106	g
7	agar	0.3710	g

ตารางที่ 7 สารที่ใช้ในการเตรียมสูตรอาหารน้ำกลั่น ในการทดลองที่ 1 โดยเตรียมสูตรอาหารละ 53.00 ml

ลำดับที่	สารเคมี	จำนวน	หน่วย
สูตร 0%sucrose			
1	น้ำกลั่น	53.00	ml
2	agar	0.3710	g
สูตร 2%Sucrose			
1	น้ำกลั่น	53.00	ml
2	Sucrose	1.0602	g
3	agar	0.3710	g
สูตร 10%sucrose			
1	น้ำกลั่น	53.00	ml
2	Sucrose	5.3000	g
3	agar	0.3710	g

ตารางที่ 8 สารที่ใช้ในการเตรียมสารละลายโคลซิซิน ในการทดลองที่ 2 โดยเตรียมชุดการทดลองละ 53.00 ml

ลำดับที่	สารเคมี	จำนวน	หน่วย
0% colchicine solution			
1	น้ำกลั่น	53.00	ml
0.10% colchicine solution			
1	น้ำกลั่น	53.00	ml
2	colchicine	0.0530	g
0.15% colchicine solution			
1	น้ำกลั่น	53.00	ml
2	colchicine	0.0795	g
0.20% colchicine solution			
1	น้ำกลั่น	53.00	ml
2	colchicine	0.1060	g

ตารางที่ 9 สารที่ใช้ในการเตรียมสูตรอาหาร Brewbaker and Kwack ในการทดลองที่ 3 โดยเตรียมสูตรอาหารละ 53.00 ml

ลำดับที่	สารเคมี	จำนวน	หน่วย
สูตร Brewbaker&Kwack + 10%sucrose			
1	น้ำกลั่น	53.00	ml
2	Sucrose	10.602	g
3	Boric acid (100 mg/l)	0.0053	g
4	Calcium nitrate (300 mg/l)	0.0159	g
5	Magnesium sulfate (200 mg/l)	0.0106	g
6	Potassium nitrate (200 mg/l)	0.0106	g
7	agar	0.3710	g
สูตร Brewbaker&Kwack + 10%sucrose +0.14% colchicine solution			
1	น้ำกลั่น	53.00	ml
2	20%Sucrose	10.602	g
3	Boric acid (100 mg/l)	0.0053	g
4	Calcium nitrate (300 mg/l)	0.0159	g
5	Magnesium sulfate (200 mg/l)	0.0106	g
6	Potassium nitrate (200 mg/l)	0.0106	g
7	0.7%agar	0.3710	g
8	colchicine	0.0742	g

ภาคผนวก ค

ตารางผลการวิเคราะห์สถิติ IBM SPSS Statistics version22

การทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารและเวลาที่เหมาะสมต่อการงอกของเรณูด้วยวิธี *in vitro* pollen germination ในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช ในระยะเวลา 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง

ตารางที่ 10 Two-way ANOVA จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูที่เพาะในอาหารสูตร Brewbaker and Kwack ที่มีระดับ sucrose แตกต่างกัน 3 ระดับ และการคลุก stigma fluid แตกต่างกันที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
media	.077	2	.039	4.623	.014
stigma	.048	1	.048	5.731	.020
media * stigma	.063	2	.032	3.770	.029
Error	.452	54	.008		
Corrected Total	.640	59			

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมงด้วย Duncan's Multiple Range Test

treatments		N	Subset		
			1	2	3
Duncan[a,b]	Brew-non st	10	0.0000		
	Brew-st	10	.0223	.0223	
	Brew10%-st	10	.0293	.0293	
	Brew2%-st	10	.0408	.0408	
	Brew2%-non st	10		.0961	.0961
	Brew10%-non st	10			.1659

ตารางที่ 12 Two-way ANOVA จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูที่เพาะในอาหารสูตร Brewbaker and Kwack ที่มีระดับ sucrose แตกต่างกัน 3 ระดับ และการคลุก stigma fluid แตกต่างกันที่ระยะเวลา 144 ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
media	.079	2	.040	3.378	.041
stigma	.005	1	.005	.412	.524
media * stigma	.067	2	.033	2.852	.066
Error	.632	54	.012		
Corrected Total	.782	59			

ตารางที่ 13 Two-way ANOVA จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูที่เพาะในอาหารสูตร Brewbaker and Kwack ที่มีระดับ sucrose แตกต่างกัน 3 ระดับ และการคลุก stigma fluid แตกต่างกันที่ระยะเวลา 168 ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
media	.171	2	.086	8.129	.001
stigma	.002	1	.002	.219	.642
media * stigma	.049	2	.024	2.321	.108
Error	.569	54	.011		
Corrected Total	.792	59			

การทดลองที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่เหมาะสมต่อเรณูของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช

ตารางที่ 14 One-way ANOVA จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูด้วยการย้อมสี acetocarmine เข้มข้น 1% ของเรณูที่แช่ในสารโคลชิซินเข้มข้น 0%, 0.10%, 0.15% และ 0.20% ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Colchicine level	.023	3	.008	.347	.792
Error	.801	36	.022		
Corrected Total	.824	39			

ตารางที่ 15 One-way ANOVA จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูด้วยการย้อมสี acetocarmine เข้มข้น 1% ของเรณูที่แช่ในสารโคลชิซินเข้มข้น 0%, 0.10%, 0.15% และ 0.20% ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Colchicine level	1.089	3	.363	4.895	.006
Error	2.669	36	.074		
Corrected Total	3.757	39			

ตารางที่ 16 One-way ANOVA จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูด้วยการย้อมสี acetocarmine เข้มข้น 1% ของเรณูที่แช่ในสารโคลชิซินเข้มข้น 0%, 0.10%, 0.15% และ 0.20% ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
col_conc	1.399	3	.466	8.351	.000
Error	2.010	36	.056		
Corrected Total	3.408	39			

ตารางที่ 17 One-way ANOVA จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูด้วยการย้อมสี acetocarmine เข้มข้น 1% ของเรณูที่แช่ในสารโคลชิซินเข้มข้น 0%, 0.10%, 0.15% และ 0.20% ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
col_conc	1.326	3	.442	7.789	.000
Error	2.043	36	.057		
Corrected Total	3.369	39			

การทดลองที่ 3 ศึกษาการงอกของเรณูเมื่อได้รับสารโคลชิซิน

ตารางที่ 18 Independent t-test จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูในอาหารวุ้นผสมโคลชิซินและอาหารวุ้นที่ไม่ผสมโคลชิซิน ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
								95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Pollen germination	10.697	.004	-8.322	9.000	.000	-.84730	.10182	-1.07763	-.61697

ภาคผนวก ง

ตารางบันทึกข้อมูลอื่น ๆ

การทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารและเวลาที่เหมาะสมต่อการงอกของเรณูด้วยวิธี *in vitro* pollen germination ในกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช ในระยะเวลา 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง

ตารางที่ 19 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูหลังจาก 72 ชั่วโมง เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น 6 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar

สูตรที่ 2 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 2% sucrose

สูตรที่ 3 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 10% sucrose

สูตรที่ 4 น้ำ + 0.7% agar

สูตรที่ 5 น้ำ + 0.7% agar + 2% sucrose

สูตรที่ 6 น้ำ + 0.7% agar + 10% sucrose

สูตรอาหาร	Stigma fluid	**จำนวนเรณูทั้งหมด**	**จำนวนเรณูที่งอกหลอดเรณู**	**จำนวนเรณูที่ไม่งอกหลอดเรณู**	**เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู**
1	คลุก	80	0	80	0
	ไม่คลุก	86	0	86	0
2	คลุก	96	0	96	0
	ไม่คลุก	78	0	78	0
3	คลุก	88	0	88	0
	ไม่คลุก	98	0	98	0
4	คลุก	90	0	90	0
	ไม่คลุก	100	0	100	0
5	คลุก	104	0	104	0
	ไม่คลุก	88	0	88	0
6	คลุก	94	0	94	0
	ไม่คลุก	98	0	98	0

ตารางที่ 20 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูหลังจาก 96 ชั่วโมง เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น 6 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar

สูตรที่ 2 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 2% sucrose

สูตรที่ 3 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 10% sucrose

สูตรที่ 4 น้ำ + 0.7% agar

สูตรที่ 5 น้ำ + 0.7% agar + 2% sucrose

สูตรที่ 6 น้ำ + 0.7% agar + 10% sucrose

สูตรอาหาร	Stigma fluid	**จำนวนเรณูทั้งหมด**	**จำนวนเรณูที่งอกหลอดเรณู**	**จำนวนเรณูที่ไม่งอกหลอดเรณู**	**เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู**
1	คลุก	72	0	72	0
	ไม่คลุก	80	0	80	0
2	คลุก	78	0	78	0
	ไม่คลุก	82	0	82	0
3	คลุก	90	0	90	0
	ไม่คลุก	74	0	74	0
4	คลุก	83	0	83	0
	ไม่คลุก	99	0	99	0
5	คลุก	103	0	103	0
	ไม่คลุก	90	0	90	0
6	คลุก	97	0	97	0
	ไม่คลุก	95	0	95	0

ตารางที่ 21 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูหลังจาก 120 ชั่วโมง เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น 3 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar

สูตรที่ 2 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 2% sucrose

สูตรที่ 3 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 10% sucrose

สูตรที่ 4 น้ำ + 0.7% agar

สูตรที่ 5 น้ำ + 0.7% agar + 2% sucrose

สูตรที่ 6 น้ำ + 0.7% agar + 10% sucrose

สูตรอาหาร	Stigma fluid	**จำนวนเรณูทั้งหมด**	**จำนวนเรณูที่งอกหลอดเรณู**	**จำนวนเรณูที่ไม่งอกหลอดเรณู**	**เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู**
1	คลุก	64	2	62	3.13
	ไม่คลุก	58	0	58	0
2	คลุก	70	4	66	5.71
	ไม่คลุก	66	8	58	12.12
3	คลุก	62	2	60	3.23
	ไม่คลุก	68	14	54	20.59
4	คลุก	81	0	81	0
	ไม่คลุก	79	0	79	0
5	คลุก	101	0	101	0
	ไม่คลุก	94	0	94	0
6	คลุก	85	0	85	0
	ไม่คลุก	89	0	89	0

ตารางที่ 22 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูหลังจาก 144 ชั่วโมง เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น 3 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar

สูตรที่ 2 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 2% sucrose

สูตรที่ 3 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 10% sucrose

สูตรที่ 4 น้ำ + 0.7% agar

สูตรที่ 5 น้ำ + 0.7% agar + 2% sucrose

สูตรที่ 6 น้ำ + 0.7% agar + 10% sucrose

สูตรอาหาร	Stigma fluid	**จำนวนเรณูทั้งหมด**	**จำนวนเรณูที่งอกหลอดเรณู**	**จำนวนเรณูที่ไม่งอกหลอดเรณู**	**เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู**
1	คลุก	80	11	69	13.75
	ไม่คลุก	97	6	91	6.19
2	คลุก	92	9	83	9.78
	ไม่คลุก	81	13	68	16.05
3	คลุก	86	14	72	16.28
	ไม่คลุก	79	17	62	21.52
4	คลุก	98	0	98	0
	ไม่คลุก	100	0	100	0
5	คลุก	86	0	86	0
	ไม่คลุก	87	0	87	0
6	คลุก	92	0	92	0
	ไม่คลุก	99	0	99	0

ตารางที่ 23 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูหลังจาก 168 ชั่วโมง เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น 3 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar

สูตรที่ 2 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 2% sucrose

สูตรที่ 3 อาหารสูตร Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 10% sucrose

สูตรที่ 4 น้ำ + 0.7% agar

สูตรที่ 5 น้ำ + 0.7% agar + 2% sucrose

สูตรที่ 6 น้ำ + 0.7% agar + 10% sucrose

สูตรอาหาร	Stigma fluid	**จำนวนเรณูทั้งหมด**	**จำนวนเรณูที่งอกหลอดเรณู**	**จำนวนเรณูที่ไม่งอกหลอดเรณู**	**เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู**
1	คลุก	82	14	68	17.07
	ไม่คลุก	95	12	83	12.63
2	คลุก	77	17	60	22.08
	ไม่คลุก	84	19	65	22.62
3	คลุก	91	20	71	21.98
	ไม่คลุก	89	28	61	31.46
4	คลุก	75	0	75	0
	ไม่คลุก	88	0	88	0
5	คลุก	101	0	101	0
	ไม่คลุก	90	0	90	0
6	คลุก	92	0	92	0
	ไม่คลุก	97	0	97	0

การทดลองที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่เหมาะสมต่อเรณูของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์สุรีย์พีช

ตารางที่ 24 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณูหลังจาก 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน	จำนวนเรณูทั้งหมด	จำนวนเรณูที่มีชีวิต	จำนวนเรณูที่ไม่มีชีวิต	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู	เปอร์เซ็นต์ความตายของเรณู
0% (control)	82	82	0	100.00	0.00
0.10%	79	78	1	98.73	1.27
0.15%	80	79	1	98.75	1.25
0.20%	91	90	1	98.90	1.10

ตารางที่ 25 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณูหลังจาก 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน	จำนวนเรณูทั้งหมด	จำนวนเรณูที่มีชีวิต	จำนวนเรณูที่ไม่มีชีวิต	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู	เปอร์เซ็นต์ความตายของเรณู
0% (control)	105	91	14	86.67	13.33
0.10%	104	66	38	63.46	36.54
0.15%	101	80	21	**79.21**	20.79
0.20%	89	74	15	**83.15**	16.85

ตารางที่ 26 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณูหลังจาก 96 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน	จำนวนเรณูทั้งหมด	จำนวนเรณูที่มีชีวิต	จำนวนเรณูที่ไม่มีชีวิต	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู	เปอร์เซ็นต์ความตายของเรณู
0% (control)	81	80	1	98.77	1.23
0.10%	104	85	19	81.73	18.27
0.15%	92	86	6	93.48	6.52
0.20%	95	91	4	95.79	4.21

ตารางที่ 27 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ความตายของเรณูหลังจาก 120 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน	จำนวนเรณูทั้งหมด	จำนวนเรณูที่มีชีวิต	จำนวนเรณูที่ไม่มีชีวิต	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู	เปอร์เซ็นต์ความตายของเรณู
0% (control)	106	103	3	97.17	2.83
0.10%	99	80	19	80.81	19.19
0.15%	94	89	5	94.68	5.32
0.20%	99	94	5	94.95	5.05

การทดลองที่ 3 ศึกษาการงอกของเรณูเมื่อได้รับสารโคลชิซิน

ตารางที่ 28 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูหลังจาก 120 ชั่วโมง เมื่อเพาะอาหารวุ้นที่ผสมโคลชิซินและไม่ผสมโคลชิซิน

ชุดที่	สูตรอาหาร	จำนวนเรณูทั้งหมด	จำนวนเรณูที่งอกหลอดเรณู	จำนวนเรณูที่ไม่งอกหลอดเรณู	เปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู
1	non-colchicine agar	73	36	42	53.85
	colchicine agar	67	1	66	1.49
2	non-colchicine agar	78	26	57	68.67
	colchicine agar	46	0	46	0