ปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสและความมีชีวิตของเรณูกล้วยไม้สกุลหวาย 25 พันธุ์
The Nuclear DNA Content and Pollen Viability of 25 *Dendrobium* Cultivars

ปิยนุช ศรชัย[1,2], วราภรณ์ คำพงษ์ [3], และเสริมศิริ จันทร์เปรม[1,2,4]
Piyanuch Sornchai[1,2], Waraporn Khampong[3] and Sermsiri Chanprame[1,2,4*]

Abstract

Dendrobium is the most popular cut-flowers orchid of Thailand, leading to demand of new cultivars. However, some cultivars have low crossing ability due to the complexity of their genome. The information of nuclear DNA content, size and number of set of genome and pollen viability can aid breeders for the effective selection of parent lines. In this report, nuclear DNA content of 24 commercial *Dendrobium* cultivars and a species, *Dendrobium bigibbum* var. *compactum*, were measured using flow cytometer. The results showed that nuclear DNA content is in the range of 1.61-4.88 pg2C^{-1} with 2-4 sets of genome. In regarding to flower form, they were divided into 4 groups. Group 1, the antelope type (3 cultivars), had nuclear DNA content of 2.59-4.88 pg2C^{-1}. Group 2, the intermediate type (2 cultivars), had DNA content of 1.67-1.77 pg2C^{-1}. Group 3, the semi-*Phalaenopsis* type, had DNA content of 1.85-3.71 pg2C^{-1}. In this group, it could be divided into 3 subgroups according to the range of DNA content; subgroup 3.1 (2 cultivars; 1.85-1.87 pg2C^{-1}), subgroup 3.2 (5 cultivars; 2.15-2.63 pg2C^{-1}), subgroup 3.3 (7 cultivars; 3.09-3.71 pg2C^{-1}). Group 4, the *Phalaenopsis* type, only 1 cultivar contained 1.61 pg2C^{-1} DNA, the other 5 cultivars contained 3.40-3.73 pg2C^{-1} DNA. The pollen viability, germination and crossing ability of these orchid cultivars were investigated and the results showed 100% viability. In contrast, pollen germination and crossing ability using *Den. bigibbum* var. *compactum* as a pod parent varied among cultivars. Cultivars with high percentages of pollen germination had also high crossing ability. However, there was no relationship between nuclear

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, and Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

[2] ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[2] Center for Advanced Studies for Agriculture and Food, Kasetsart University Institute for Advanced Studies, Kasetsart University, Bangkok 10900 Thailand (CASAF, NRU-KU, Thailand)

[3] สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร และ [4]ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

[3] Program in Agricultural Biotechnology and [4] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

รับเรื่อง : กรกฎาคม 2558
รับตีพิมพ์ : สิงหาคม 2558

*Corresponding Author: agrsrc@ku.ac.th

DNA content and pollen germination or crossing ability among these cultivars.

Keywords: Orchid, DNA content, pollen viability, pollen germination, crossing ability

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลหวายมีความสำคัญที่สุดในการส่งออกของประเทศไทยจึงต้องมีพันธุ์ใหม่อย่างต่อเนื่องผ่านการปรับปรุงพันธุ์ อย่างไรก็ตามบางพันธุ์มีความสามารถในการผสมข้ามต่ำ ซึ่งสาเหตุหนึ่งเกิดจากความซับซ้อนของจีโนม ข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณดีเอ็นเอ ขนาดและจำนวนชุดของจีโนม และ ความมีชีวิตและความงอกของเรณู จะสามารถช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์คัดเลือกพ่อ-แม่พันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จึงได้ตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสของกล้วยไม้ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ และตรวจสอบเรณูของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า 24 พันธุ์ และชนิดแท้ 1 ชนิด คือ *Dendrobium bigibbum* var. *compactum* พบว่าปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1.61 – 4.88 pg2C^{-1} สำหรับจีโนม 2 – 4 ชุด เมื่อนำรูปทรงดอกมาพิจารณาร่วมสามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ 1) ฟอร์มดอกแบบ antelope type มี 3 พันธุ์ มีปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 2.59 – 4.88 pg2C^{-1} 2) ฟอร์มดอกแบบ intermediate type มี 2 พันธุ์ ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอ 1.67 และ 1.77 pg2C^{-1} 3) ฟอร์มดอกแบบ semi-*Phalaenopsis* type มี 14 พันธุ์ ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อยคือ กลุ่มย่อยที่ 3.1 มี 2 พันธุ์ ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอ 1.85 – 1.87 pg2C^{-1} กลุ่มย่อยที่ 3.2 มี 5 พันธุ์ มีปริมาณดีเอ็นเอ 2.15 – 2.63 pg2C^{-1} และ กลุ่มย่อยที่ 3.3 มี 7 พันธุ์ ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอ 3.09 – 3.71 pg2C^{-1} และกลุ่มที่ 4) ฟอร์มดอกแบบ *Phalaenopsis* type มี 6 พันธุ์ ซึ่ง 1 พันธุ์มีปริมาณดีเอ็นเอ 1.61 pg2C^{-1} ส่วนอีก 5 พันธุ์ มีปริมาณดีเอ็นเอ 3.40 – 3.73 pg2C^{-1} การตรวจสอบก้อนเรณูของกล้วยไม้ทั้ง 25 พันธุ์พบว่า ทั้งหมดมีชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ แต่มีเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณู และเปอร์เซ็นต์การผสมติดเมื่อนำก้อนเรณูมาผสมกับ *Den. bigibbum* var. *compactum* แตกต่างกัน โดยพบว่าพันธุ์ที่มีการงอกหลอดเรณูดีมีการผสมติดดีด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตาม ปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจพบไม่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการงอกหลอดเรณูและการผสมติด

คำสำคัญ: กล้วยไม้ ปริมาณดีเอ็นเอ ความมีชีวิตของเรณู การงอกของเรณู ความสามารถในการผสม

คำนำ

ปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้ผลิต และส่งออกดอกกล้วยไม้เขตร้อนรายใหญ่ของโลก โดยกล้วยไม้ที่ส่งออกส่วนใหญ่เป็นกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสม ซึ่งได้มีการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์เพื่อตอบสนองความต้องการของตลาดและผู้ปลูกเลี้ยง อย่างไรก็ตามการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ใช้ระยะเวลานาน และกล้วยไม้บางชนิดผสมกันไม่ได้ บางชนิดผสมกันได้แต่ลูกที่ได้มักเป็นหมันซึ่งเมื่อนำไป

ผสมพันธุ์ต่อจะไม่ติดฝัก ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากความแตกต่างกันของจีโนมของพันธุ์พ่อ และแม่ ซึ่งหากมีความแตกต่างกันมากจะส่งผลให้โครโมโซมของลูกผสมไม่สามารถเข้าคู่กันได้ ทำให้โอกาสในการผสมติดมีน้อย (Chuecheen, 2003)

การศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์เป็นเรื่องที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากในด้านการปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างกล้วยไม้ลูกผสม จำนวนและการเข้าคู่กันได้ของโครโมโซมเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ช่วยในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ และวางแผนการในการผสมพันธุ์ ที่จะทำให้นักปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สามารถผลิตลูกผสมได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Chuecheen, 2003) ในปัจจุบันมีการนำเทคนิค flow cytometry เข้ามาช่วยในการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ และสามารถคำนวณขนาดและจำนวนชุดของจีโนม ซึ่งทำได้สะดวกและรวดเร็วกว่าการตรวจดูโครโมโซมใต้กล้องจุลทรรศน์ และยังมีความถูกต้องและแม่นยำอีกด้วย (Cousin *et al*., 2009)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์โดยใช้เทคนิค flow cytometry มีหลายรายงาน เช่น Hiremath *et al.* (2004) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงขนาดของจีโนมและวิวัฒนาการของพืชสกุล *Dalbergia* และ Bennett *et al.* (2005) ได้ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของหญ้าถอดปล้อง *(Equisetum)* พบว่า มีปริมาณเท่ากับ 31.6 pg2C^{-1} สำหรับในกล้วยไม้นั้น มีงานวิจัยของต่างประเทศหลายรายงานที่ใช้โฟลไซโตมิเตอร์ (flow cytometer) ในการศึกษา เช่น Jones *et al.* (1998) ได้ศึกษาปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ 26 สกุล จำนวน 70 ชนิดพบว่า *Cadetia taylori* มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ 1.91 pg2C^{-1} และ *Vanilla phaeantha* มีปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุดคือ 15.19 pg2C^{-1} ส่วนในกล้วยไม้สกุลหวายมีปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1.53-4.23 pg2C^{-1} รวมทั้งพบว่า ผลการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โฟลไซโตมิเตอร์นี้ให้ผลที่สอดคล้องกันกับผลการทำ karyotype โดยในกรณีของ *Den. bigibbum* และ *Den. Phalaenopsis* ที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n = 2N = 38 เท่ากันนั้น พบว่า *Den. bigibbum* ที่มีขนาดของโครโมโซมบางแท่งเล็กกว่าของ *Den. Phalaenopsis* มีปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้จากโฟลไซโตมิเตอร์น้อยกว่าด้วยเช่นกัน จึงเป็นข้อมูลที่ชี้ให้เห็นว่าการใช้โฟลไซโตมิเตอร์อาจช่วยจำแนกชนิดได้ด้วย และนอกจากนี้ในตัวอย่าง *Cattleya walkeriana* ที่ตรวจสอบ พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้มีความสอดคล้องกับระดับ ploidy อีกด้วย ต่อมา Kato *et al.* (2001) ได้ศึกษาปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายบางพันธุ์ พบปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 3.7 – 10.76 pg2C^{-1} สำหรับงานวิจัยในประเทศไทยนั้น Meesawat *et al.* (2008) ได้ศึกษาความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้หวายตะมอย (*Dendrobium crumenatum* Sw.) จากต้นแม่ที่ปลูกในโรงเรือนและต้นลูกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้โฟลไซโตมิเตอร์ พบว่า กล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบางต้นมีการเปลี่ยนแปลงระดับ ploidy

นอกจากข้อมูลปริมาณดีเอ็นเอ และระดับ Ploidy จะมีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้แล้ว ข้อมูลเกี่ยวกับความมีชีวิตของละอองเรณู (pollen vaiability) ก็เป็นสิ่งที่สำคัญสำหรับการผสมพันธุ์ด้วยเช่นกัน การตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเรณูสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การย้อมสี (dye staining) การตรวจสอบความงอกของเรณู (pollen germination) และการตรวจสอบความสามารถในการผสมพันธุ์ (crossing ability) ซึ่งการทดสอบโดยการย้อมสีนั้นเป็นวิธีที่ง่ายและ

เห็นผลได้รวดเร็ว แต่สามารถบอกได้เพียงว่ากลุ่มเรณูมีชีวิตอยู่หรือไม่เท่านั้น ส่วนวิธีการตรวจสอบความงอกของเรณูนั้นใช้เวลาในการทดสอบนานขึ้นประมาณ 3-4 วันแต่ให้ข้อมูลที่ถูกต้องมากกว่าการย้อมสี ส่วนวิธีการทดสอบโดยการผสมพันธุ์นั้นใช้เวลาในการทดสอบนานหลายสัปดาห์ (Shivanna, 2003)

อย่างไรก็ตามในประเทศไทยการศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ และความมีชีวิตของเรณูของกล้วยไม้โดยเฉพาะสกุลหวายซึ่งเป็นสกุลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจยังพบว่ามีน้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ และตรวจสอบความมีชีวิตและความงอกของเรณู รวมทั้งความสามารถในการผสมติดของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าของไทยเพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มเติมสำหรับการประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

เลือกต้นกล้วยไม้ที่มีการเจริญเต็มที่มีลักษณะสมบูรณ์และไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลงโดยศึกษาในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 24 พันธุ์ คือ Miss Teen, Caesar 2N, Caesar 4N, Chanel, Caesar Daeng, Daeng Wassana, Blue, Buranajade, Pinky, Lervia short, Lervia long, Khao Mali, Khao Sanan, Muang Karnbinthai, Tawan Pink, Bom 17, Charak Red, Khao 5N, Earsakul, Anna, Chom poo Lai, Queen Pink, Pompadour, Lai Sirin (ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนคุณเชาวน์ ลิ้มสงวน อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม) และ กล้วยไม้สกุลหวายชนิดแท้ *Dendrobium bigibbum* var. *compactum* (ได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณจิตติรัตนเพียรชัย และ ดร.โมกข์ ทองสมบูรณาธรณ์ ศูนย์บ่มเพาะอาชีพ กล้วยไม้ ระพี กัลยา สาคริก อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี)

การสกัดนิวเคลียสจากใบกล้วยไม้

สกัดนิวเคลียสจากใบกล้วยไม้ที่เจริญเต็มที่แล้ว ด้วยวิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Boonaree (2005) โดยใช้ตัวอย่างใบน้ำหนัก 100 มิลลิกรัม นำมาหั่นเป็นเส้นๆ ตามขวาง ให้มีขนาดกว้างประมาณ 0.5 มิลลิเมตร แช่ใน Cystain UV Precise P nuclei extraction buffer PAII (Partec: Germany) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วสับให้ละเอียดด้วยใบมีดโกน จากนั้นกรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาดช่องเปิด 50 ไมโครเมตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติม staining buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มไว้เป็นเวลา 4 นาที แล้วกรองด้วยแผ่นกรองซ้ำอีก 1 ครั้ง แล้วจึงนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียส ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์รุ่น PAII (บริษัท Partec: Germany) โดยในแต่ละตัวอย่างใช้จำนวนนิวเคลียสประมาณ 10,000 นิวเคลียส ทำการตรวจสอบพันธุ์ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 ต้น แล้วนำมาคิดค่าเฉลี่ย

การคำนวณปริมาณดีเอ็นเอและขนาดจีโนม

นำผลที่ได้จากเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ซึ่งแสดงในรูปกราฟซึ่งระบุค่า peak mean ค่าเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้ peak และเปอร์เซ็นต์ CV มาคำนวณปริมาณดีเอ็นเอ และขนาดของจีโนม โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่ peak mean 2C ของกล้วยไม้สกุลหวายชนิดแท้ *Dendrobium bigibbum*

ที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 1.79 pg2C^{-1} และมีขนาดจีโนมเท่ากับ 864 Mbp (Jones *et al.*, 1998) โดยคำนวณปริมาณดีเอ็นเอ (2C DNA content) ที่มีหน่วยเป็น pg2C^{-1} จากสูตร

$$\text{2C DNA content} = \frac{\text{(sample peak mean) x (2C DNA of } \textit{Dendrobium bigibbum} \text{ var. } \textit{compactum)}}{\textit{Dendrobium bigibbum} \text{ var. } \textit{compactum} \text{ peak mean}}$$

และคำนวณขนาดของจีโนม (genome size) ที่มีหน่วยเป็น Mbp จากสูตร

$$\text{megabase pairs} = \frac{\text{(sample 2C DNA content) x (Mbp of } \textit{Dendrobium bigibbum} \text{ var. } \textit{compactum)}}{\text{2C DNA content of } \textit{Dendrobium bigibbum} \text{ var. } \textit{compactum}}$$

การตรวจสอบความมีชีวิตและความงอกของเรณู

นำก้อนเรณูจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมคลุกลงใน stigma fluid ของดอกกล้วยไม้พันธุ์นั้นๆ แล้วนำมาเพาะบนอาหารวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในที่มืด (Sornchai, 2015) จากนั้นนำมาย้อมด้วยสี acetocarmine ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยหยดน้ำลงบนสไลด์ 1 หยด แล้วเขี่ยก้อนเรณูลงบนสไลด์ ปิดทับด้วย cover slip แล้วขยี้เบาๆ (squeeze) ด้วยมือจากนั้นหยดสีย้อม 2 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์และใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารแขวนลอยที่มีละอองเรณูที่ย้อมสีแล้วมาหยดบน Haemacytometer ปิดด้วย cover slip แล้วตรวจนับละอองเรณูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยละอองเรณูที่ที่มีชีวิต มีลักษณะสมบูรณ์และย้อมติดสีแดงสม่ำเสมอ ส่วนละอองเรณูที่ย้อมไม่ติดสีแดงหรือติดสีไม่สม่ำเสมอจัดเป็นละอองเรณูที่ไม่มีชีวิต และสำหรับความงอกของละอองเรณูนับเฉพาะละอองเรณูที่มีความยาวของหลอดละอองเรณูมากกว่าหรือเท่ากับความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของละอองเรณูนั้นๆ โดยการนับจะนับเฉพาะเรณูที่แยกเป็นเรณูเดี่ยว ๆ ในแต่ละ microscopic field โดยตรวจสอบพันธุ์ละ 5 field นำมาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและความงอกของละอองเรณู เทียบกับจำนวนเรณูที่นับทั้งหมด

การตรวจสอบความสามารถในการผสมของเรณู

นำก้อนเรณูจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมต้นละ 30 ก้อน มาตรวจสอบความสามารถในการผสม โดยนำมาผสมข้าม (cross pollination) ด้วยวิธีการช่วยผสม (hand pollination) โดยใช้ดอกจากต้นแม่คือ *Dendrobium bigibbum* var. *compactum* จำนวน 30 ดอก เป็นตัวรับ ภายหลังจากการผสมเป็นเวลา 15 วัน บันทึกจำนวนดอกที่ผ่านการผสมแล้วและจัดว่าติดฝักโดยรังไข่มีลักษณะบวมพอง แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการผสมติด

ผลและวิจารณ์

จากการจัดกลุ่มของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 25 พันธุ์ ที่ศึกษานี้โดยคำนึงถึงลักษณะ ขนาด และรูปร่างของกลีบดอก เป็นสำคัญ สามารถจัดแบ่งได้เป็น 4 รูปแบบตาม Figure 1 คือ

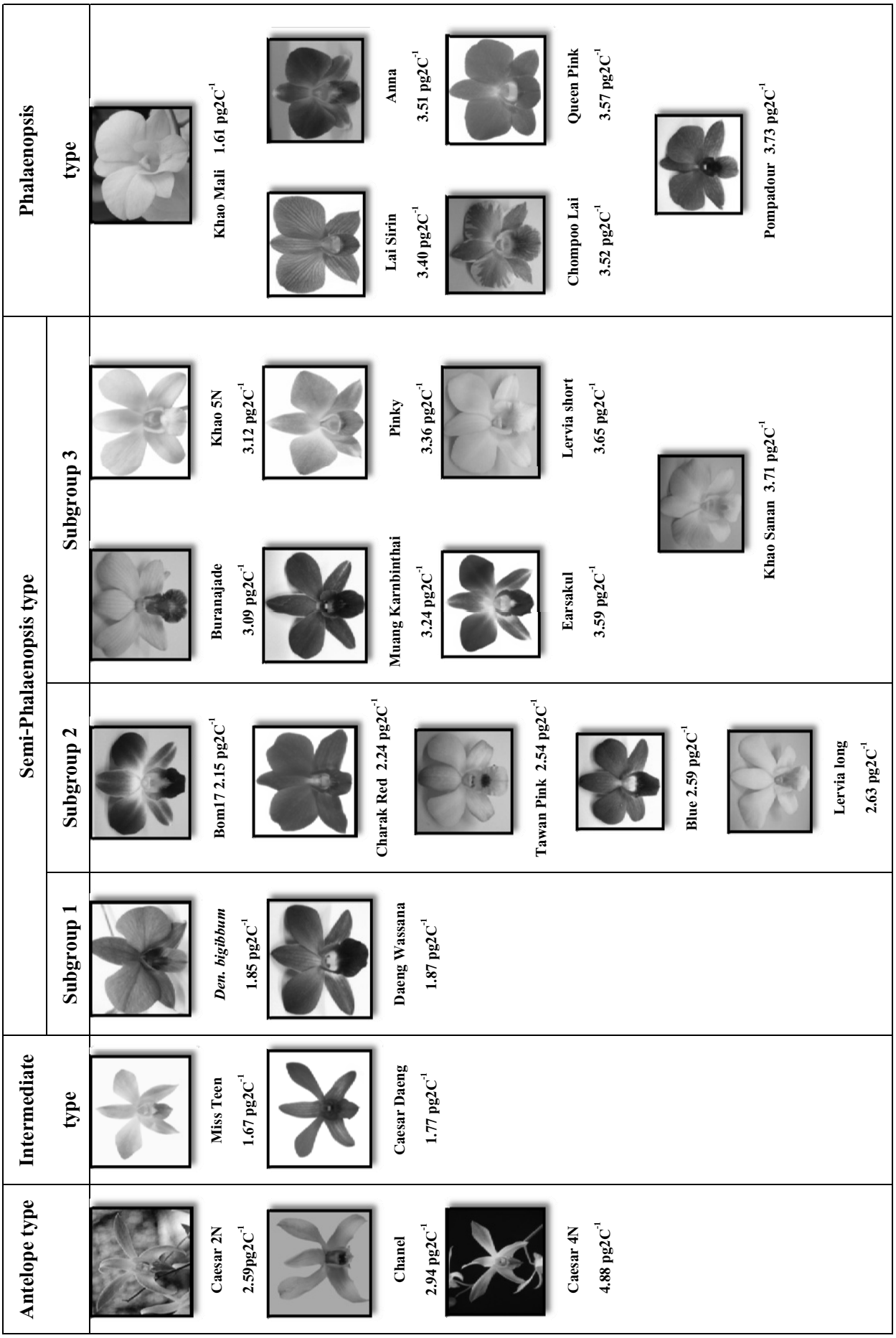
1. รูปแบบฟอร์มกลีบบิด (antelope type) กลีบดอกมีความกว้างของกลีบดอกน้อยมากและกลีบดอกมีลักษณะบิด จำนวน 3 พันธุ์ คือ Caesar 2N, Chanel และ Caesar 4N
2. รูปแบบฟอร์มกลีบแคบ (intermediate type) กลีบดอกมีความกว้างของกลีบน้อย จะพบช่องว่างระหว่างกลีบดอกและกลีบเลี้ยงมากกว่ารูปแบบฟอร์มกึ่งฟอร์มกลม จำนวน 2 พันธุ์ คือ Miss Teen และ Caesar Daeng
3. รูปแบบกึ่งฟอร์มกลม (semi-*Phalaenopsis* type) กลีบดอกจะมีลักษณะกึ่งกลม มีช่องว่างระหว่างกลีบดอกและกลีบเลี้ยง จำนวน 14 พันธุ์ คือ กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์แท้ *Dendrobium bigibbum* var. *compactum*, Daeng Wassana, Blue, Buranajade, Pinky, Lervia short, Lervia long, Khao Sanan, Muang Karnbinthai, Tawan Pink, Bom 17, Charak Red, Khao 5N และ Earsakul
4. รูปแบบฟอร์มกลม (*Phalaenopsis* type) กลีบดอกมีลักษณะกลมแผ่ออกซ้อนทับกับกลีบเลี้ยงโดยไม่มีช่องว่างระหว่างกลีบ จำนวน 6 พันธุ์ คือ Khao Mali, Lai Sirin, Anna, Chompoo Lai, Queen Pink และ Pompadour

ปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสจากการวัดด้วยโฟลไซโตมิเตอร์

ในการวัดปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้ในการทดลองนี้ใช้ชิ้นส่วนใบที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ เนื่องจากเป็นส่วนที่เหมาะสมในการวัดปริมาณดีเอ็นเอ เพราะสามารถสกัดนิวเคลียสได้ในปริมาณมาก และ peak มีฐานแคบและเห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Jones *et al.* (1998), Kato *et al.* (2001) และ Boonaree (2005) ที่เลือกใช้เนื้อเยื่อใบแก่ในการวัดปริมาณดีเอ็นเอเช่นเดียวกัน โดยค่าที่ได้แสดงออกมาเป็นกราฟซึ่งแต่ละพันธุ์อาจที่มีจำนวน peak แตกต่างกัน จำนวน peak มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระดับจำนวนชุดโครโมโซมของตัวอย่างนั้นๆ ซึ่งโดยทั่วไปจะไม่นับ peak แรก เนื่องจากเป็นค่าที่ได้จากนิวเคลียสที่ไม่สมบูรณ์ หรือเศษเซลล์ เพราะเศษเซลล์และเศษนิวเคลียสที่แตกหักก็สามารถย้อมติดสีและถูกตรวจนับได้เช่นกัน ดังนั้นการพิจารณาค่าเฉลี่ยครั้งนี้จึงพิจารณาจากระดับดีเอ็นเอ 2C ภายใต้ peak ที่ 2

ผลจากการตรวจสอบใน *Den. bigibbum* var. *compactum* พบว่า ผลคำนวณซึ่งอ้างอิงตามรายงานของ Jones *et al.* (1998) มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 1.85 pg2C^{-1} และขนาดจีโนม 894 Mbp ซึ่ง

Figure 1 The grouping of orchid cultivars based on flower type and DNA content



ผลที่ได้ใกล้เคียงกับ *Den. bigibbum* จากรายงานเดียวกัน ที่พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเอ 1.79 pg2C^{-1} และมีขนาดจีโนม 864 Mbp สำหรับกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า 24 พันธุ์ พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.61-4.88 pg2C^{-1} มีขนาดจีโนมอยู่ระหว่าง 780-2357 Mbp ซึ่งเมื่อนำรูปแบบของฟอร์มดอกมาวิเคราะห์ร่วมกับปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 4 กลุ่มดังแสดงใน Table 1 และ Figure 1 คือ

กลุ่มที่ 1 ฟอร์มดอกแบบ antelope type ประกอบด้วย 3 พันธุ์ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 2.59 - 4.88 pg2C^{-1} มีขนาดจีโนม 1,254-2,357 Mbp และมีระดับ ploidy เป็น 2N และ 4N โดยในพันธุ์ Caesar 2N มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 2.59 pg2C^{-1} และมีขนาดจีโนมเท่ากับ 1,254.87 Mbp ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับงานของ Saeong (2008) ที่รายงานว่าพันธุ์ Caesar 2N มีปริมาณดีเอ็นเอ 2.52 pg2C^{-1} มีขนาดจีโนม 1,244 Mbp

กลุ่มที่ 2 ฟอร์มดอกแบบ intermediate type ประกอบด้วย 2 พันธุ์ มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 1.67 และ1.77 pg2C^{-1} มีขนาดจีโนม 807 และ856 Mbp และมีระดับ ploidy เป็น 2N ทั้งสองพันธุ์

กลุ่มที่ 3 ฟอร์มดอกแบบ semi-*Phalaenopsis* type ประกอบด้วย 14 พันธุ์มีปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1.85-3.71 pg2C^{-1} โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อยตามช่วงของปริมาณดีเอ็นเอ คือ

กลุ่มย่อยที่ 3.1) ประกอบด้วย 2 พันธุ์ มีปริมาณดีเอ็นเอ 1.85 และ 1.87 pg2C^{-1} มีขนาดจีโนม 894 และ 906 Mbp ซึ่งมีระดับ ploidy เป็น 2N ทั้งสองพันธุ์

กลุ่มย่อยที่ 3.2) ประกอบด้วย 5 พันธุ์ มีปริมาณดีเอ็นเอ 2.15-2.63 pg2C^{-1} มีขนาดจีโนม 1,040-1,273 Mbp และมีระดับ ploidy ทั้ง 2N และ 3N

กลุ่มย่อยที่ 3.3) ประกอบด้วย 7 พันธุ์ มีปริมาณดีเอ็นเอ 3.09-3.71 pg2C^{-1} มีขนาดจีโนม 1,493-1,794 Mbp และมีระดับ ploidy เป็น 3N และ 4N

สำหรับกลุ่มที่ 4 มีฟอร์มดอกแบบ *Phalaenopsis* type ประกอบด้วย 7 พันธุ์ ซึ่งมีเพียงพันธุ์ Khao Mali เท่านั้นที่มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 1.61 pg2C^{-1} มีขนาดจีโนม 780 Mbp และมีระดับ ploidy เป็น 2N ส่วนอีก 5 พันธุ์ มีปริมาณ ดีเอ็นเอ 3.40-3.73 pg2C^{-1} มีขนาดจีโนม 1,643-1,801 Mbp และระดับ ploidy เป็น 4N นอกจากนี้ ในกลุ่มนี้มีข้อสังเกตคือ มี 3 พันธุ์ ที่มีปริมาณดีเอ็นเอใกล้เคียงกันมาก คือพันธุ์ Anna, Chompoo Lai และ Queen Pink ซึ่งทั้ง 3 พันธุ์นี้มีลักษณะดอกคล้ายกันมากแต่มีสีต่างกัน โดยมีข้อมูลจากเจ้าของพันธุ์ว่า พันธุ์ Chompoo Lai นั้นเกิดจากการกลายมาจากพันธุ์ Queen Pink เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีผลทำให้สีดอกเปลี่ยนไป ซึ่งอาจเป็นการเปลี่ยนแปลงระดับยีนเพียงเล็กน้อยทำให้สีดอกเปลี่ยนไปโดยลักษณะดอกยังคงคล้ายเดิม

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ปริมาณดีเอ็นเอ และขนาดจีโนมมีความแปรปรวนค่อนข้างมากระหว่างกล้วยไม้สกุลหวาย ทั้ง 25 พันธุ์ ทั้งนี้เนื่องมาจากกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ลูกผสมส่วนใหญ่เกิดจากการผสมข้ามมาเป็นระยะเวลานานหลายชั่วรุ่น จนไม่อาจทราบต้นกำเนิดที่แน่ชัดของกล้วยไม้บางพันธุ์ โดยอาจเกิดจากการผสมข้ามชนิดของกล้วยไม้ป่า ที่มีแหล่งกำเนิดอยู่ในแถบร้อนของประเทศออสเตรเลีย อินโดนีเซีย และปาปัวนิกีนี เช่น หวายฟาเลนอปซิส (*Den. phalaenopsis*) หวายสแตรติโอเตส (*Den.*

stratiotes) หวายกูลดิไอ (*Den. gouldii*) และหวายชูเลอไร (*Den. schulleri*) เป็นต้น (Inwong and Potapohn, 2010) ซึ่งเป็นผลทำให้ได้กล้วยไม้ลูกผสมที่มีลักษณะแตกต่างกันไปโดยมีความหลากหลายในเรื่องฟอร์มของดอก ขนาด และสีดอกเป็นอย่างมาก ซึ่งการมีต้นกำเนิดพันธุ์ที่แตกต่างกันนี้ส่งผลให้มีปริมาณดีเอ็นเอและขนาดจีโนมแตกต่างกันได้แม้ว่าจะจัดอยู่ในกลุ่มที่มีระดับ ploidy เท่ากันก็ตาม นอกจากนี้ ความหลากหลายของพันธุ์ในปัจจุบันยังอาจเกิดจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์การค้าแล้วได้พันธุ์กลาย เช่น ในกรณีของการกำเนิดพันธุ์กลุ่มบอม (BOM) ต่างๆ ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณดีเอ็นเอและขนาดจีโนมแตกต่างกันได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้อาจเป็นการเพิ่มขึ้นของจีโนมเป็นชุดๆ เช่นที่พบใน หวายตะมอย (*Den. crumenatum* Sw.) จากรายงานของ Meesawat *et al.* (2008) หรืออาจเพิ่มขึ้นหรือลดลงเพียงบางส่วนก็เป็นได้ อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบว่า ปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย ทั้ง 25 พันธุ์ ที่ตรวจวัดได้มีค่าอยู่ระหว่าง 1.61-4.88 pg2C^{-1} ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Jones *et al*. (1998) ที่รายงานว่าดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย 37 ชนิดที่ตรวจสอบ มีปริมาณอยู่ระหว่าง 1.53-4.23 pg2C^{-1}

การตรวจสอบความมีชีวิตของเรณู

การตรวจสอบความมีชีวิตของกล้วยไม้สกุลหวายจำนวน 25 พันธุ์ โดยวิธีการย้อมด้วยสี acetrocarmine ความเข้มข้น 1% พบว่า ละอองเรณูของกล้วยไม้สกุลหวายทุกพันธุ์ มีความมีชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ (Table 1 และ Figure 2) แต่สำหรับความงอกของเรณู พบว่ามีความแตกต่างกันไปในแต่ละพันธุ์ อยู่ในช่วงที่กว้างมาก ตั้งแต่ 4 เปอร์เซ็นต์ ถึง 94 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) โดยพันธุ์ที่มีความงอกของหลอดเรณูมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ คือ *Den. bigibbum* var. *compactum*, Miss Teen, Anna, Lervia long, Chompoo Lai, Queen Pink และ Charak Red ทั้งนี้ความงอกของเรณูอาจขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย (Shivanna, 2003) เช่น ปัจจัยภายในเรณู คือ ปริมาณและกิจกรรมของเอนไซม์และสารเคมีที่จำเป็นภายในเรณูสำหรับเจริญเติบโต ซึ่งขึ้นกับพันธุกรรมของพันธุ์กล้วยไม้นั้นๆ ปัจจัยภายนอกได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น น้ำตาล และธาตุอาหารจากการทดลองซึ่งต้องเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเรณูกล้วยไม้พันธุ์นั้นๆ นอกจากนี้ Ketsa and Wisutiamonkul (2013) อธิบายว่า ธาตุโบรอนจัดเป็นปัจจัยทางเคมีที่สำคัญในการกระตุ้นการงอกของเรณูอย่างมาก ซึ่งใน stigma fluid ของกล้วยไม้สกุลหวายมีโบรอนเป็นองค์ประกอบซึ่งช่วยกระตุ้นการงอกของหลอดเรณูได้ โดยในการทดลองนี้ได้มีการควบคุมปัจจัยภายนอกให้มีความสม่ำเสมอในทุกๆ พันธุ์ได้มากที่สุด ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าความแตกต่างของความงอกของหลอดเรณูในงานวิจัยนี้ขึ้นกับปัจจัยภายในของแต่ละพันธุ์เป็นสำคัญ

สำหรับการตรวจสอบความสามารถในการผสมของเรณูกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 25 พันธุ์ (Table 1, Figure 2) พบว่า การผสมตัวเองของ *Den. bigibbum* var. *compactum* ที่มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดสูงถึงร้อยเปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นธรรมชาติของกล้วยไม้พันธุ์นี้ แต่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าส่วนใหญ่พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดน้อยมากเมื่อใช้ *Den. bigibbum* var. *compactum* เป็นต้นแม่ ยกเว้นพันธุ์ Anna, Miss Teen และ Chompoo Lai ที่สามารถผสมติดฝักได้ดี ทั้งนี้ผล

การทดลองในประเด็นนี้สอดคล้องกับผลเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณู โดยพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูน้อยนั้นมีเปอร์เซ็นต์การผสมติดน้อยไปด้วย แต่สำหรับบางพันธุ์เช่น Lervia long ที่พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูสูง แต่กลับมีเปอร์เซ็นต์การผสมติดน้อยเพียง 5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น อาจเนื่องมาจากความสามารถในการเข้ากันได้ระหว่างพันธุกรรมของพ่อและแม่ที่นอกจากจะมีระดับ ploidy แตกต่างกัน แล้วยังอาจมีต้นกำเนิดพันธุ์ที่ต่างกันมาก ทำให้การผสมติดเกิดขึ้นได้ยาก (Kamemoto *et al*., 1999; Chue-cheen, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าคู่ผสมพันธุ์อื่นๆ ที่มีระดับ ploidy ที่น่าจะสามารถเข้ากันได้กับ *Den. bigibbum* var. *compactum* แต่ยังมีเปอร์เซ็นต์การผสมติดน้อยมากนั้น อาจมีปัจจัยภายในอีกหลายประการที่อาจเกี่ยวข้องเช่น เรณูของกล้วยไม้แต่ละพันธุ์มีองค์ประกอบทางเคมีหลักของสาร 2 ชนิดคือ ACC และออกซิน ซึ่งรวมเรียกว่า pollinia-borne chemicals ที่แตกต่างกัน (Promyou *et al*., 2014) ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้ส่งผลโดยตรงต่อเปอร์เซ็นต์การงอก และการเจริญของหลอดเรณูหลังการผสมเกสร (Luangsuwalai *et al*., 2013) นอกจากนี้อาจเกิดจากกลไกการควบคุมการถ่ายทอดทางพันธุกรรมโดยยีน คือ gametophytic และ sporophytic system เป็นตัวกำหนดการงอกของหลอดเรณูผ่านเข้าไปในเกสรตัวเมีย (Shivanna, 2003)

จากผลการตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเรณู (pollen viability) ทั้งสามวิธีคือ การย้อมสี การตรวจสอบความงอกของเรณู และ การทดสอบผสมพันธุ์ พบว่า วิธีการย้อมสีมีข้อดีคือ ทำได้ง่ายรวดเร็ว เห็นผลในทันที แต่ผลที่ได้ไม่สามารถบ่งชี้ถึงความสามารถในการผสมได้ชัดเจน ขณะที่การผสมดอกนั้นแม้จะให้ข้อมูลเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ได้จริง แต่ใช้เวลาตรวจสอบนานหลายสัปดาห์ และยังมีผลกระทบจากปัจจัยแวดล้อมและปัจจัยทางพันธุกรรมค่อนข้างมากเช่นกัน ดังนั้นการตรวจสอบความงอกของเรณู จึงน่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาระดับความสมบูรณ์พันธุ์ของเกสรเพศผู้ในกล้วยไม้ ซึ่งมีหลายรายงานที่สนับสนุนประเด็นนี้ (Galetta, 1983)

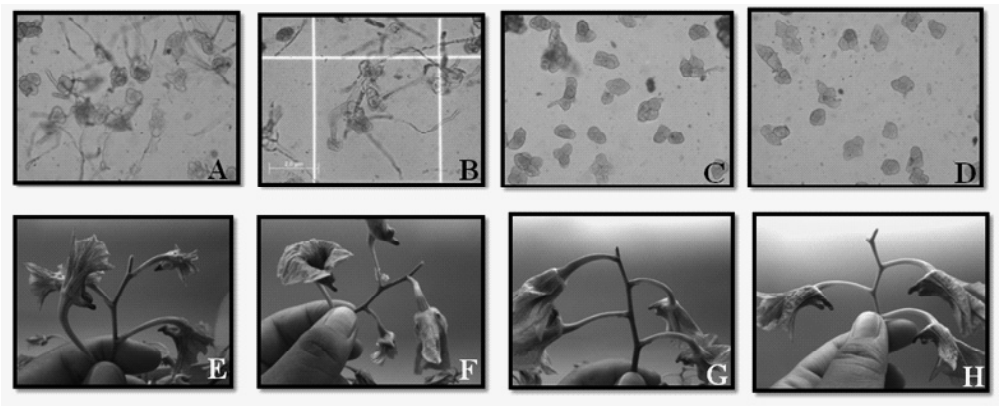


Figure 2 The germinated pollens of *Dendrobium bigibbum* var. *compactum* (A) and Miss Teen (B). The non-germinated pollens of Caesar 2N (C) and Daeng Wassana (D). The pod set of self pollinated *Den. bigibbum* var. *compactum* (E) and cross between *Den. bigibbum* var. *compactum* x Miss Teen (F). The poor pod set of crosses *Den. bigibbum* var. *compactum* x Caesar 2N (G) and *Den. bigibbum* var. *compactum* x Daeng Wassana (H).

Table 1 DNA content, ploidy level, genome size, pollen viability, pollen germination and crossing ability (using *Dendrobium bigibbum* var. *compactum* as a female parent) of 25 *Dendrobium* orchid cultivars

Cultivar	Pollen viability (%)	Pollen germination (%)	Crossing ability (%)	DNA content ($pg2C^{-1}$)	Ploidy level	Genome size (Mbp)
Antelope type						
Caesar 2N	100	24	1.73	2.59	2N	1254.87
Chanel	100	22	1.66	2.94	2N	1423.55
Caesar 4N	100	32	1.33	4.88	4N	2357.02
Intermediate type						
Miss Teen	100	72	78.72	1.67	2N	807.89
Caesar Daeng	100	10	<1	1.77	2N	856.50
Semi-Phalaenopsis (Subgroup 1)						
Den. bigibbum var. *compactum*	100	94	100	1.85	2N	894.97
Daeng Wassana	100	4	<1	1.87	2N	906.75
Semi-Phalaenopsis (Subgroup 2)						
Bom 17	100	6	<1	2.15	2N	1040.89
Charak Red	100	52	6.09	2.24	2N	1081.67
Tawan Pink	100	6	<1	2.57	3N	1223.85
Blue	100	66	4.95	2.59	3N	1250.50
Lervia long	100	10	<1	2.63	3N	1273.68
Semi-Phalaenopsis (Subgroup 3)						
Buranajade	100	16	<1	3.09	3N	1493.42
Khao 5N	100	14	<1	3.12	3N	1507.55
Muang Karnbinthai	100	16	15	3.24	4N	1566.49
Pinky	100	8	<1	3.36	4N	1622.73
Earsakul	100	6	<1	3.59	4N	1736.12
Lervia short	100	20	1.8	3.65	4N	1778.41
Khao Sanan	100	18	7.3	3.71	4N	1794.29
Phalaenopsis type						
Khao Mali	100	8	1.24	1.61	2N	780.00
Lai Sirin	100	6	1.71	3.40	4N	1643.92
Anna	100	70	90.63	3.51	4N	1697.13
Chompoo Lai	100	66	75.82	3.52	4N	1701.18
Queen Pink	100	64	26.54	3.57	4N	1726.61
Pompadour	100	40	2.85	3.73	4N	1801.24

สรุป

กล้วยไม้สกุลหวาย จำนวน 25 พันธุ์ ที่ได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสโดยใช้โฟลไซโตมิเตอร์ พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1.61 – 4.88 pg2C^{-1} มีผลคำนวณขนาดจีโนม 780 – 2,357 Mbp มีจำนวนชุดของจีโนม 2 – 4 ชุด และจากการตรวจสอบละอองเรณูของกล้วยไม้ทั้ง 25 พันธุ์ พบว่ามีชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ทุกพันธุ์ แต่มีเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณู และเปอร์เซ็นต์การผสมติดเมื่อนำก้อนเรณูมาผสมกับ *Den. Bigib bum* var. *compactum* แตกต่างกัน โดยพบว่าส่วนใหญ่พันธุ์ที่มีการงอกหลอดเรณูดีมีการผสมติดดีด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตาม ปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจพบไม่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการงอกของเรณูและการผสมติด

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ภายใต้ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และจาก ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหารภายใต้สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

Bennett, W., M. Lubienski, S. korner and M. Steinberg. 2005. Triploidy in *Equisetum* subgenus *Hippochaete* (Esquistaceae, Pteridophyta). Annl. Bot. 95: 807 – 815.

Boonaree, W. 2005. Study of nucleus and DNA contents from leafs petals and roots of *Dendrobium* Emma 'White' using flow cytometer. Undergraduate Special Problem. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University. Thailand. 14p. (in Thai)

Chuecheen, S. 2003. Cytogenetic and fertility studies in some *Dendrobium* cultivars. M.Sc. Thesis, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. 113p. (in Thai)

Cousin, S., K. Heel, W.A. Cowling and M.N. Nelson. 2009. An efficient high-throughput flow cytometric method for estimating DNA ploidy level in plants. Cytometry. 75A: 1015 – 1019.

Galetta, G.J. 1983. Pollen and Seed Management. P.23 – 47. *In* J.N. More and J. Janick. Methods in Fruit Breeding. Purdue Univ. Press, West Lafayette. Indiana.

Hiremath, S.C. and M. H. Nagasampige. 2004. Genome size variation and evolution in some species of *Dalbergia* Linn.f. (Fabaceae). Caryologia. 4: 367 – 372.

Inwong, M. and N. Potapohn. 2010. Inter-sectional crossability of Thai *Dendro bium* and its commercial cultivars, pp 317-324. *In* Proceeding of 48th Kasetsart University Annual Conference: Plants. 3-5 February 2010, 48th Kasetsart University Annual Conference. Bangkok, Thailand.

Jones, W.E., A.R. Kuehnle and K. Arumuganathan. 1998. Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. Annl. Bot. 82: 189-194.

Kamemoto, H., T.D. Amore and A.R. Kuehnle. 1999. Breeding *Dendrobium* Orchids in Hawaii. University of Hawaii Press books, Honolulu. 176pp.

Kato, J., H. Ito, T. Oguri and S. Ichihashi. 2001. Estimated ploidy level in *Cymbidium* and *Dendrobium* by using flow cytometer. Proc. 7thAPOC. Nagoya, Japan.

Ketsa, S. and A. Wisutiamonkul. 2013. Role of stigma fluid in ovary growth and senescence of pollinate *Dendrobium* flowers. Eur. J. Envir. Sci. 3(1): 43 – 47.

Luangsuwalai, K., E.P. Robert and S. Ketsa. 2013. Compatible and incompatible pollination and the senescence and ovary growth of *Dendrobium* flower. European Journal of Environmental ScienceVol.3. No.1:35-42.

Meesawat, U., T. Srisawat, L. Eksomtramage and K. Kanchanapoom. 2008. Nuclear DNA content of the pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Sw.) with the analysis of flow cytometry. Songkla-nakarin J. Sci. Technol. 30 (3): 277-280.

Promyou, S., S. Ketsa and W. van Doorn 2014. Pollinia-borne chemicals that induce early postpollination effects in *Dendrobium* flowers move rapidly into agar blocks and include ACC and compounds with auxin activity. J. Plant Physiol. 171: 1782-1786.

Saeong, S. 2008. Study of DNA content of the hybrid population *Dendrobium*“Caesar” (2N) and [(*D.*”Sriracha” x D.”Snowfire”) x *D. bigibbum*] using flow cytometer. Undergraduate Special Problem. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University. Thailand. 23p. (in Thai)

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

Sornchai, P. 2015. The Biosafety Assessment of Genetically modified *Dendrobium* orchid possess antisense *CP-ACO*1 gene under screen house condition. Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok. Thailand.216 p. (in Thai)