Kasetsart J. (Nat. Sci.) 29 : 150-157 (1995)

ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) ปีที่ 29 : 150-157 (2538)

การศึกษาจำนวนโครโมโซม ลักษณะดอก และความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ดิพลอยด์และออลโลเตตราพลอยด์

Studies on Chromosome Number, Floral Characteristics and Fertility of Diploid and Allotetraploid *Dendrobium superbiens*

สาริณี ไชยเจริญ[1]

Sarinee Chaicharoen

ABSTRACT

Chromosome counts were performed on the root tip of *Dendrobium superbiens*. The diploid plant had only 38 chromosomes, but allotetraploid had 76 chromosomes. The number of flowers in a large diploid inflorescence was much more than those in the tetraploid. The tetraploid plants had larger flowers than those in the diploids and the average width, length and thickness of sepals, petals of both diploids and tetraploids plants were significantly different. The blooming period of allotetraploid flowers longer than diploid flowers in 8 days. The meiotic division in microsporocytes of diploids and allotetraploids plants were normal except some microspore of diploid plants have two to five cells in one group resulting from abnormal division of microsporocytes. The growth of pollen tubes of diploid plants was slow and many of them did not germinate after 3 days, whereas those of allotetraploids were long and numerous on the third day. The fertility of tetraploid plants was higher than that of diploid plants. Numerous seeds of allotetraploid had perfect embryos.

Key words: *Dendrobium*, chromosome, fertility, diploid, allotetraploid

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.

บทคัดย่อ

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ที่เป็นดิพลอยด์พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 38 และออลโลเตตราพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 76 โครโมโซมจำนวนดอกในช่อดอกขนาดใหญ่ของดิพลอยด์มีจำนวนมากกว่าของออลโลเตตราพลอยด์ดอกของออลโลเตตราพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่าดอกดิพลอยด์ กลีบดอกของออลโลเตตราพลอยด์มีความกว้าง ความยาว และความหนามากกว่า กลีบดอกของดิพลอยด์อย่างมีนัยยสำคัญทางสถิติ ช่วงระยะการบานของดอกบนต้นออลโลเตตราพลอยด์พบว่าบานนานกว่าดิพลอยด์เป็นเวลา 8 วัน การแบ่งตัวของ microsporocyte ของดิพลอยด์ และออลโลเตตราพลอยด์ส่วนใหญ่แล้วปกติยกเว้นบาง microspore ของดิพลอยด์มี 2 เซลล์ และ 5 เซลล์ การงอกของ pollen tube ของดิพลอยด์ช้ามากมีเป็นส่วนน้อยที่งอกในเวลา 3 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับออลโลเตตราพลอยด์แล้ว pollen tube มีขนาดยาวและมีจำนวนมาก การศึกษาความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์พบว่า เตตราพลอยด์มีสูงกว่าดิพลอยด์มากและเมล็ดของเตตราพลอยด์มีเอมบริโอที่สมบูรณ์จำนวนมาก

คำนำ

กล้วยไม้จัดเป็นไม้ประดับที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ในประเทศทางยุโรป อเมริกาและประเทศญี่ปุ่นนำดอกไม้ไปประดับตกแต่ง กล้วยไม้เป็นไม้ดอกชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง ประเทศไทยมีการปลูกกล้วยไม้เพื่อใช้เป็นไม้ประดับและส่งเป็นสินค้าออกนำรายได้เข้าประเทศ ซึ่งเป็นผลดีต่อเศรษฐกิจของประเทศ

กล้วยไม้พันธุ์ใหม่ที่เกิดขึ้นจะได้จากกล้วยไม้พันธุ์ต่างๆ ชนิดนำมาผสมกัน จะได้กล้วยไม้พันธุ์ผสมหรือพันธุ์ทาง (hybrid) ซึ่งมีลักษณะสวยงามแตกต่างกันออกไป อย่างไรก็ตามกล้วยไม้ลูกผสมเหล่านี้เมื่อนำมาผสมข้ามพันธุ์จะมีเปอร์เซนต์การติดฝักต่ำ เพราะมีชุดของโครโมโซมที่แตกต่างกันจึงไม่สามารถที่จะจับคู่กันได้ในการแบ่งตัวแบบไมโอซิส (Wimber, 1983) จึงทำให้กล้วยไม้พวกนี้มีความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ (fertility) ค่อนข้างต่ำหรือเป็นหมัน การที่จะทำให้กล้วยไม้พวกนี้ผสมพันธุ์ต่อไปได้ มีความจำเป็นที่จะต้องเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมเป็น 2 เท่า คือเป็นออลโลเตตราพลอยด์ก็จะทำให้มีความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์สูงขึ้น ในขณะเดียวกันดอกกล้วยไม้ที่เป็น เตตราพลอยด์ นี้ก็จะมีคุณสมบัติที่เด่นบางประการดีกว่าของดิพลอยด์เช่น ดอกใหญ่ขึ้น กลีบดอกหนากว่าเดิม สีของดอกมักจะเข้มกว่าเดิมและระยะการบานของดอกก็จะบานนานกว่าของดิพลอยด์ด้วย

มีรายงานการใช้สารโคลชิซีนสร้างกล้วยไม้ลูกผสม Cymbidium ที่เป็นดิพลอยด์ให้เป็นออลโลเตตราพลอยด์และมีการเปรียบเทียบลักษณะดอกของดิพลอยด์และเตตราพลอยด์ด้วย (Menninger, 1963; Wimber and Van Cott, 1967) พบว่าดอก เตตราพลอยด์ มีขนาดดอกใหญ่กว่ากลีบดอกกว้างและหนากว่าดิพลอยด์ Chaicharoen and Vajrabhaya (1973) ได้ทดลองเพิ่มจำนวนโครโมโซมในกล้วยไม้หวายลูกผสม *Dendrobium Caesar* ที่เป็นดิพลอยด์ให้เป็นออลโลเตตราพลอยด์พบว่าดอกของ เตตราพลอยด์ มีขนาดใหญ่กว่า กลีบดอกกว้างและหนากว่าของดิพลอยด์ จากรายงานยังไม่มีผู้ใดศึกษาเกี่ยวกับความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ ของกล้วยไม้หวายที่เป็นออลโลเตตราพลอยด์เลย

รายงานฉบับนี้ศึกษาจำนวนโครโมโซมลักษณะดอก และความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ (fertility) ของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ที่เป็นดิ

พลอยด์เปรียบเทียบกับออลโลเตตราพลอยด์

อุปกรณ์และวิธีการ

กล้วยไม้ *Dendrobium superbiens* เป็นลูกผสมป่า (natural hybrid) ระหว่าง *D. phalaenopsis* และ *D. undulatum D. superbiens* ที่นำมาศึกษาทดลองต้นที่เป็นออลโลเตตราพลอยด์ได้มาจากการใช้สารละลายโคลชิซีน 0.05% เพิ่มจำนวนโครโมโซมในเนื้อเยื่อแคลลัสที่เป็นดิพลอยด์

การตรวจนับจำนวนโครโมโซม

ตัดรากกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตดียาวประมาณ 1-1.5 ซม. นำมาแช่ในสารละลาย 1-bromonapthalene เก็บรากไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 5°C เป็นเวลา 5-6 ชม. นำรากมา fixed ด้วย acetic acid 90% เป็นเวลา 20 นาที ล้างรากด้วย 70% แอลกอฮอล์ 3 ครั้งเก็บรากไว้ใน 70% แอลกอฮอล์หลังจากนี้ประมาณ 1-2 สัปดาห์ นำมาย้อมสี feulgen หลังจาก hydrolyse ในกรดเกลือ 1 N เป็นเวลา 10 นาที นำรากมาทำสไลด์โดยวิธี squash method โดยใช้สี aceto-orcein 1-2 หยด (Darlington and Cour, 1962) นับจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้จำนวน 37 ต้น โดยนับจำนวนโครโมโซมของรากต้นละ 10 เซลล์

การศึกษาลักษณะช่อดอกและดอก

ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะช่อดอกและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของช่อดอก เปรียบเทียบกับโดยใช้ micrometer วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของช่อดอกดิพลอยด์และออลโลเตตราพลอยด์อย่างละ 10 ช่อ จำนวน 5 ต้นๆ ละ 2 ช่อ

นำดอกของดิพลอยด์และออลโลเตตราพลอยด์มาอย่างละ 10 ดอก วัดความกว้างและความยาวของ sepal, petal, labellum โดยใช้สเกลเป็น ม.ม. วัดความหนาของ petal โดยใช้ micrometer (Chaicharoen and Vajrabhaya, 1973)

ศึกษาการงอกของ Pollen

นำ Pollinia ของดิพลอยด์และออลโลเตตราพลอยด์ไปใส่บน stigma หลังจากนั้น 3-5 วัน นำ pollen มาย้อมด้วยสี aceto-orcein ความเข้มข้น 2% (Chaicharoen and Saejew, 1981) นำมาศึกษาการงอกของ pollen tube ของดิพลอยด์และออลโลเตตราพลอยด์

ศึกษาความสมบูรณ์ของการสืบพันธุ์ (fertility)

การศึกษา fertility ของดิพลอยด์เปรียบเทียบกับออลโลเตตราพลอยด์โดยวิธี cross fertilization ให้ดิพลอยด์เป็นต้นแม่โดยนำ pollen ของดิพลอยด์และออลโลเตตราพลอยด์มาผสม ในทำนองเดียวกันใช้ต้นเตตราพลอยด์เป็นต้นแม่และนำ pollen ของดิพลอยด์และออลโลเตตราพลอยด์มาผสม ทำการทดลองผสมในแต่ละคู่ จำนวน 20 ดอก เพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์การติดฝัก

ผล

การศึกษาจำนวนโครโมโซม

Dendrobium superbiens ที่เป็นดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซม 38 โครโมโซม (Figure 1 A) และออลโลเตตราพลอยด์มีจำนวนโครโมโซม 76 โครโมโซม (Figure 1 B) nearออลโลเตตราพลอยด์มีจำนวนโครโมโซม 74, 75, 77 และ 78 โครโมโซมและ near octoploid มีจำนวน 154 โครโมโซม

การเปรียบเทียบลักษณะดอกดิพลอยด์และออลโลเตตราพลอยด์

ลักษณะดอกของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium*

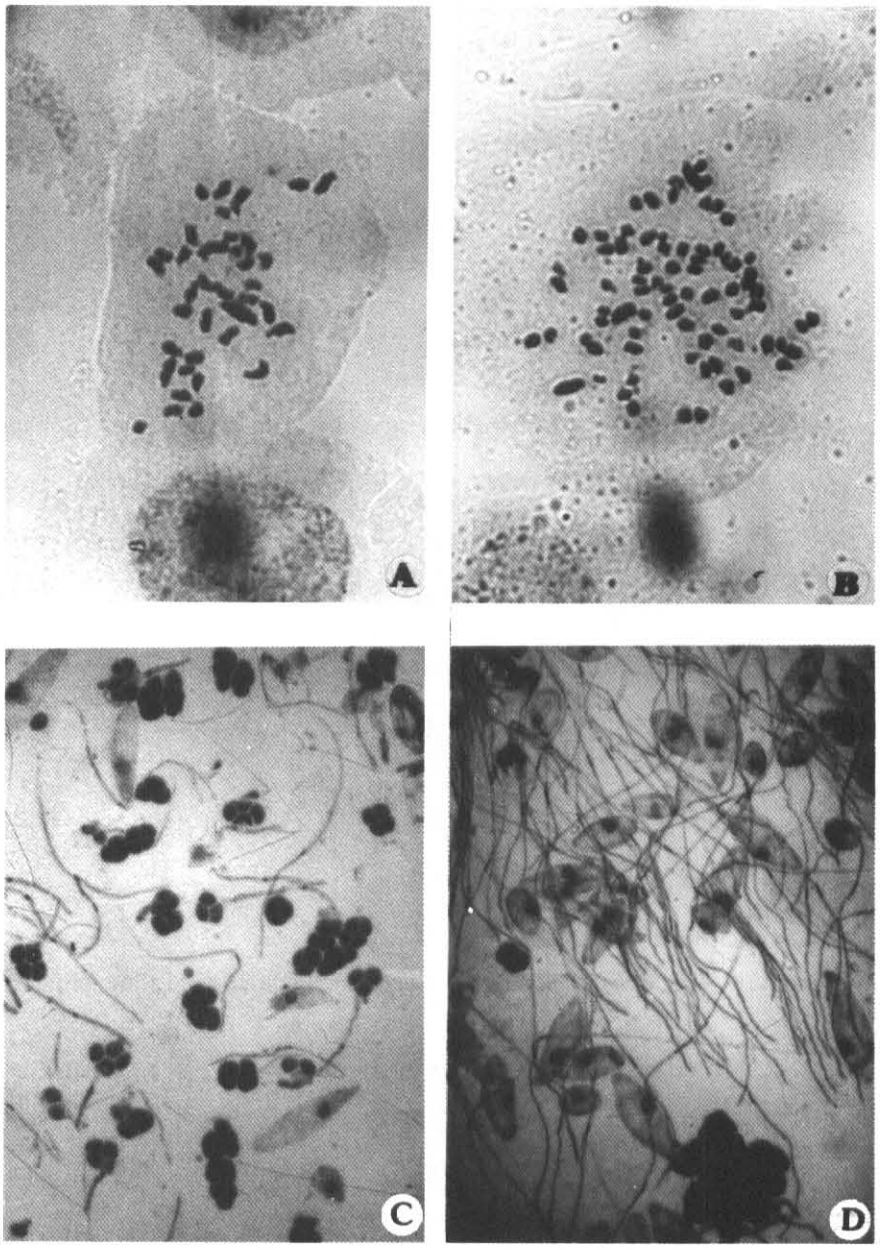


Figure 1 Chromosome number of *Dendrobium superbiens*, (A) diploid = 38 chromosome, (B) allotraploid = 76 chromosome
Pollen germination in 2-3 days of *D. superbiens*, pollen tube of diploid (C) and allotetralpoid (D).



Figure 2 The floral characteristic of *Dendrobium superbiens*, diploid (left) and allotraploid (right).



Figure 3 Theinflorescence of *Dendrobium superbiens*, diploid (left) and allotraploid (right).

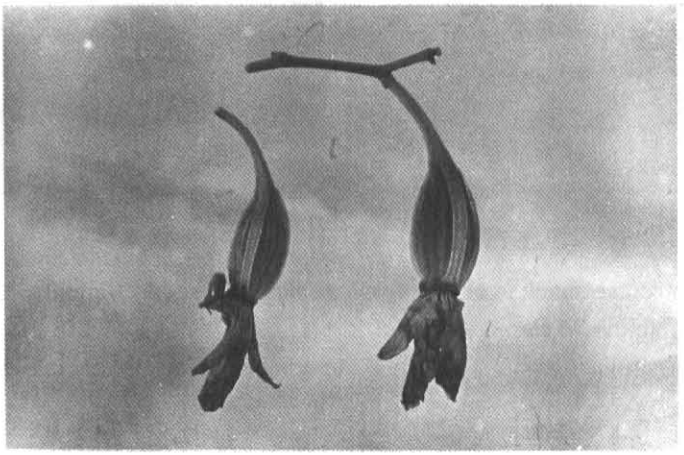


Figure 4 Pods of Dendrobium superbiens, triploid (left) and allotetraploid (right).

superbiens ที่เป็นออลโลเตตราพลอยด์เมื่อเปรียบเทียบกับดิพลอยด์ขนาดดอกของเตตราพลอยด์ใหญ่กว่าดิพลอยด์ กลีบดอกของเตตราพลอยด์มีลักษณะบิดน้อยกว่าแต่กลีบดอกกว้างและหนากว่าของดิพลอยด์ (Figure 2) จำนวน ดอกในแต่ละช่อดอกของเตตราพลอยด์ถ้าเป็นช่อใหญ่มีจำนวนดอกประมาณ 13-15 ดอก ส่วนช่อเล็กมีประมาณ 7-10 ดอก ส่วนจำนวนดอกในช่อดอกของดิพลอยด์นั้นมีจำนวนดอกมากกว่าของเตตราพลอยด์ คือช่อใหญ่มีจำนวนดอกประมาณ 18-20 ดอก และช่อเล็กมีจำนวนดอกประมาณ 7-10 ดอก ซึ่งจะใกล้เคียงกับของเตตราพลอยด์ ก้านช่อดอกของเตตราพลอยด์ตั้งตรงกว่าและมีขนาดใหญ่กว่าของดิพลอยด์เส้นผ่าศูนย์กลางก้านช่อดอกของดิพลอยด์โดยเฉลี่ยเท่ากับ 2.3 ม.ม. และของออลโลเตตราพลอยด์เท่ากับ 3.2 ม.ม. (Figure 3)

ความกว้างและความยาวของ lateral sepal, dorsal sepal, petal และ labellum รวมทั้งความหนาของ petal ของเตตราพลอยด์ มีความกว้าง ความยาว และหนากว่าของดิพลอยด์โดยมีนัยยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Table 1)

ช่วงระยะการบานของดอกดิพลอยด์และออลโลเตตราพลอยด์บนต้น มีช่วงระยะการบานได้นานแตกต่างกัน ระยะการบานของดอกเตตราพลอยด์บานนานกว่าดอกดิพลอยด์เป็นเวลา 8 วันคือดอกเตตราพลอยด์บานได้นาน 36 วัน (ค่าเฉลี่ยจาก 10 ดอก) ส่วนดอกดิพลอยด์บานได้นาน 28 วัน (ค่าเฉลี่ยจาก 10 ดอก)

การงอกของ pollen ของดิพลอยด์และออลโลเตตราพลอยด์

pollen ของดิพลอยด์ซึ่งเป็น interspecific hybrid มีการแบ่งเซลล์ผิดปกติพบ 2 เซลล์ และ 5 เซลล์บ้าง แต่ส่วนใหญ่จะพบ 4 เซลล์

การตรวจสอบการงอกของ pollen พบว่า pollen ของดิพลอยด์ไม่งอกในเวลา 1 วัน ในเวลา 2-3 วัน มีการงอกของ pollen tube บ้างแต่ไม่มากนัก (Figure 1

Table 1 Average width and length of lateral and dorsal sepal, petal, labellum and thickness of petal (10 flowers).

	Diploid	Allotetraploid
Calyx		
width of lateral sepal	8.37[b]	11.25[a]
length of lateral sepal	20.45[b]	22.55[a]
width of dorsal sepal	8.25[b]	10.75[a]
length of dorsal sepal	21.30	23.85
Corolla		
width of petal	13.80[b]	18.50[a]
length of petal	27.50[b]	28.93[a]
width of labellum	20.80[b]	23.5[a]
length of labellum	19.80[b]	21.35[a]
thickness of petal	0.32[b]	0.47[a]

ab Means within a row with no common superscript differ significantly ($P<0.05$)

C) พบ pollen ฝ่อเป็นจำนวนมาก สำหรับ pollen ของเตตราพลอยด์ นั้นมีการงอกของ pollen tube ในเวลา 1 วัน และ ในเวลา 2-3 วัน มีการงอกของ pollen tube เป็นจำนวนมาก (Figure 1 D)

การตรวจสอบความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์

ผลการผสมพันธุ์พบว่าเมื่อใช้ดิพลอยด์เป็นต้นแม่และให้ดิพลอยด์และเตตราพลอยด์เป็นต้นพ่อ ตามลำดับ พบว่ามีการติดฝักประมาณ 16 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ดิพลอยด์เป็นต้นพ่อ และประมาณ 62 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เตตราพลอยด์เป็นต้นพ่อ แสดงว่าเปอร์เซ็นต์ของความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ได้เพิ่มขึ้นประมาณ 46 เปอร์เซ็นต์ในต้นเตตราพลอยด์ ในทำนองเดียวกันถ้าใช้ต้นเตตราพลอยด์เป็นต้นแม่ ให้ดิพลอยด์และเตตราพลอยด์เป็นต้นพ่อพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การติดฝักประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าถึงแม้ต้นแม่เป็นเตตราพลอยด์ แต่ต้นพ่อเป็นดิพลอยด์เปอร์เซนต์การติดฝักก็ไม่เพิ่มขึ้น จะใกล้เคียงกับต้นแม่ที่เป็นดิพลอยด์แต่ถ้าต้นพ่อเป็นเตตราพลอยด์ ต้นแม่จะเป็นดิพลอยด์หรือเตตราพลอยด์ก็ตาม เปอร์เซ็นต์การติดฝักจะใกล้เคียงกันประมาณ 62-70 เปอร์เซ็นต์ฝักของกล้วยไม้ที่เป็นทริพลอยด์ (ดิพลอยด์ x เตตราพลอยด์) และเตตราพลอยด์ (เตตราพลอยด์ x เตตราพลอยด์) แสดงใน Figure 4 สรุปได้ว่าดิพลอยด์ที่เป็น interspecific hybrid ต้นที่เป็นตัวผู้จะมีความเป็นหมันสูงมากประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้เป็น 2 เท่า ในต้นดิพลอยด์เปอร์เซ็นต์ความเป็นหมันจะลดลงไปประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ในต้นเตตราพลอยด์ที่เป็นตัวผู้ ซึ่งจะเป็นผลดีมากในการผสมพันธุ์ข้ามพันธุ์เพื่อให้ได้กล้วยไม้พันธุ์ใหม่ๆ เพิ่มขึ้น

วิจารณ์

โครโมโซมของกล้วยไม้ *D. superbiens* ที่เป็นดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 38 โครโมโซม และออลโลเตตราพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 76 และ near เตตราพลอยด์ เท่ากับ 74, 75, 77 และ 78 โครโมโซม การที่กล้วยไม้ออลโลเตตราพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมไม่เป็น 2 เท่าของดิพลอยด์พบจำนวนโครโมโซมที่เป็น near เตตราพลอยด์ และเป็น aneuploid นั้น สาเหตุเนื่องมาจากสารโคลชิซีนที่ใช้ treat เนื้อเยื่อแคลลัสมีคุณสมบัติยับยั้งการสร้าง spindle fiber ไม่สมบูรณ์ 100 เปอร์เซนต์ จึงมีเซลล์ aneuploid เกิดขึ้นได้ และเซลล์เหล่านี้ก็เจริญเป็นต้น aneuploid ในที่สุด ดอกกล้วยไม้ที่เป็นออลโลเตตราพลอยด์มีขนาดของดอกใหญ่กว่าดิพลอยด์มีความกว้าง ยาว และหนาของ sepal, petal และ labellum มากกว่าของดิพลอยด์ก้านช่อดอกของออลโลเตตราพลอยด์ตั้งตรง และมีขนาดใหญ่กว่าของดิพลอยด์โดยมีนัยสำคัญทางสถิติ ช่วงระยะการบานของดอกออลโลเตตราพลอยด์บานได้นานกว่าดอกดิพลอยด์ประมาณ 1 สัปดาห์ ความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของดิพลอยด์ที่เป็นต้นพ่อ (male) ค่อนข้างต่ำมาก มีความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ประมาณ 12-16 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับออลโลเตตราพลอยด์แล้วมีค่าของ ความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์น้อยกว่าประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ คือออลโลเตตราพลอยด์มีความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ประมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์แต่ความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของต้นแม่ที่เป็นดิพลอยด์และออลโลเตตราพลอยด์จะใกล้เคียงกัน สรุปแล้ว ความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของต้นพ่อที่เป็นออลโลเตตราพลอยด์จะเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์มากในการผสมข้ามพันธุ์เพื่อให้ได้กล้วยไม้พันธุ์ใหม่ๆ เพิ่มขึ้น

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ศ.ดร.ถาวร วัชราภัย และ รศ.มนฑกานต์ วัชราภัย ที่ให้ความร่วมมือในเรื่องกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ที่นำมาศึกษาวิจัยและให้คำแนะนำบางประการเกี่ยวกับงานวิจัยในเรื่องนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารอ้างอิง

ระพี สาคริก. 2516. การเพาะปลูกกล้วยไม้ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 850 น.

Chaicharoen, S. and T.Vajrabhaya. 1973. Induction of Polyploidy in *Dendrobium* by Colchicine Treatment. M.S. Thesis, Chulalongkorn University, Bangkok.

Chaicharoen, S. and K. Saejew. 1981. Autopolyploid in *Dendrobium phalaenopsis*. J. Sci. Soc. Thailand, 7 :25-32.

Darlington, C.D. and L.F. La Cour. 1962. The Handling of Chromosomes. George Allen Unwin Ltd., London 263 p.

Menninger, E.D. 1963. Diary of colchicine-induced tetraploid *Cymbidium*. Amer. Orch. Soc. Bull. 32 : 885-887.

Wimber, D.E. and A.V. Cott. 1967. Artificially induced polyploidy in *Cymbidium*. pp. 27-32. *In* Fifth World Orchid Conference.

Wimber, D.E. 1983. Phragmipedium cytology I-diploidy and polyploidy in the hybrids. Amer. Orch. Soc. Bull. 52 :935-939.