การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู โดยใช้สารโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ

Chromosome Doubling of *Habenaria erichmichelii* Christenson Using Colchicine *In Vitro*

นิพนธ์ กิติดี วีณัน บัณฑิตย์ และ ณัฐา โพธาภรณ์*

Nipon Kitidee, Weenun Bundithya and Nuttha Potapohn*

ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

**Corresponding author: Email: natorchid@gmail.com*

(Received: 2 June 2020; Accepted: 16 October 2020)

Abstract: Terrestrial orchids, *Habenaria erichmichelii* Christenson is one of the most beautiful terrestrial orchids. Plant is compact with beautiful flowers and has great potential for commercial use as potted plants. Thus, effects of using colchicine *in vitro* was carried out to double chromosome number of *Habenaria erichmichelii* Christenson by soaking 1-month old germinated protocorms in colchicine at different concentrations, 0.0, 0.01, 0.025, 0.05 and 0.10 % (w/v) for 5 and 10 days. The protocorms were cultured on PGR-free MS medium for 4 months. The results showed that the chromosome number from root - tips of the control group were diploid with 2n = 2x = 42, the chromosome number of those treated with 0.05 % and 0.10 % (w/v) colchicine for 10 days were mixoploid with 2n = 2x = 42 and 2n = 4x = 84. Moreover, soaking in 0.01 % colchicine for 10 days gave better survival rate compared with colchicine at concentration of 0.05 % for 10 days, whereas plant height tended to decrease, stomata density was decreased, and stomata size was increased.

Keywords: Improvement, *Habenaria erichmichelii* Christenson, chromosome number, colchicine

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: กล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู เป็นกล้วยไม้ดินที่มีความสวยงามชนิดหนึ่ง เนื่องจากต้นมีขนาดเล็ก กะทัดรัด มีดอกสวยงาม จึงเป็นที่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ในการทำเป็นไม้กระถาง ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู โดยใช้สารโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำโพรโตคอร์มหลังจากงอกแล้ว 1 เดือน มาแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.0, 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.10 % (w/v) ระยะเวลา 5 และ 10 วัน จากนั้นย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารโคลชิซิน เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของชุดควบคุมมีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 42 ส่วนการแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.05 % และ 0.10 % ระยะเวลา 10 วัน มีจำนวนโครโมโซมเป็นมิกโซพลอยด์ (2n = 2x = 42 และ 2n = 4x = 84) นอกจากนี้ โพรโตคอร์มที่แช่ด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.01 % ระยะเวลา 10 วัน มีอัตราการรอดชีวิตดีกว่าเมื่อเทียบกับการแช่ด้วยสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 % ระยะเวลา 10 วัน ในขณะที่ความสูงต้นมีแนวโน้มที่ลดลง ความหนาแน่นปากใบลดลง และปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น

คำสำคัญ: การปรับปรุงพันธุ์ กล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู จำนวนโครโมโซม โคลชิซิน

คำนำ

กล้วยไม้ในสกุลฮาเบนาเรีย (*Habenaria*) และเพคเทลิส (*Pecteilis*) เป็นกล้วยไม้กลุ่มนางอั้ว ที่มีขนาดเล็กจนถึงขนาดกลาง มีการกระจายพันธุ์ทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อน ในประเทศไทยพบกล้วยไม้ดินสกุลฮาเบนาเรีย จำนวน 37 ชนิด และสกุลเพคเทลิส จำนวน 3 ชนิด (Sitthisatchatham, 2007; Thaithong, 2005) ซึ่งกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู (*Habenaria erichmichelii* Christenson) และลิ้นมังกรสีเหลือง (*Habenaria xanthocheila* Ridl.) ได้แยกออกมาจาก *Habenaria rhodocheila* Hance (Kawchadee *et al.,* 2012) กล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพูมีหัวอยู่ใต้ดิน ใบมีลักษณะแกมใบหอก ปลายใบแหลม จนถึงเรียวแหลม ดอกออกปลายยอด ก้านดอกย่อยมีลักษณะเป็นสัน กลีบดอกชั้นนอก และกลีบดอกชั้นในรูปรีมีลักษณะเหมือนฝาครอบ (hood) กลีบดอกชั้นนอกทั้งสองข้างรูปขอบขนาน เมื่อดอกบานเต็มที่จะบิดม้วนกลีบไปด้านหลังมีสีเขียว มีปาก 3 แฉก แฉกกลางเว้าลึก เป็น 2 แฉกย่อย โดยแฉกด้านข้างทั้งสองกางออก รูปทรงกลม ปากมีหลากหลายสี ตั้งแต่สีแดง ส้ม ชมพู และเหลือง (Hawkes, 1965; Potapohn, 2005; Saikum *et al.,* 2020; Sitthisatchatham, 2007; Teo, 1985) มีวงจรชีวิตการเจริญเติบโตทางลำต้นและการออกดอกในฤดูฝน และพักตัวในช่วงฤดูแล้ง ซึ่งกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพูเหมาะสมในการพัฒนาเป็นไม้กระถางได้ แต่เนื่องจากกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพูมีดอกค่อนข้างบาง และขนาดเล็ก จึงทำให้รูปทรงต้นไม่กะทัดรัดเท่าที่ควร ถ้ามีการพัฒนาให้มีดอกขนาดใหญ่ และดอกหนาขึ้น จะสามารถใช้เป็นไม้กระถางที่สวยงามเหมาะสำหรับใช้เป็นของตกแต่งภายในห้องทำงานหรือบนโต๊ะทำงานได้เป็นอย่างดี การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ในปัจจุบันสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การผสมพันธุ์ การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมโดยการตัดต่อยีนหรือการส่งถ่ายยีน การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีวิธีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของพืช (polyploid) โดยการใช้สารโคลชิซินที่เป็นสารเคมีในการยับยั้งการสร้างไมโครทูบูล (microtubule) ที่ทำให้โครมาติดของโครโมโซมไม่สามารถแยกออกจากกันได้ในระยะอานาเฟส (Caperta *et al*., 2006) จึงได้เซลล์ที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เพื่อให้ได้พืชมีการสร้างลักษณะใหม่ขึ้นมา สามารถสังเกตการเพิ่มชุดโครโมโซมได้จากความหนาแน่นและขนาดของปากใบ ซึ่งทำให้ปัจจุบันมีการนำสารโคลชิซินมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กันอย่างแพร่หลาย

ดังนั้น งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของโคลชิซินและระยะเวลาในการแช่ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพูที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ดินชนิดอื่นต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ผลของโคลชิซินต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมและอัตราการรอดชีวิตของโพรโตคอร์มกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู

ใช้โพรโตคอร์มกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู อายุ 1 เดือน ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) จากนั้นนำโพรโตคอร์มมาแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.0 (กรรมวิธีควบคุม), 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.10% (w/v) แล้ววางบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 °C ในที่มืด ระยะเวลา 5 และ 10 วัน ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาการแช่ครบตามกำหนด ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วย้ายโพรโตคอร์มลงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารโคลชิซิน ภายใต้อุณหภูมิ 25±2 °C ความเข้มแสง 40 μmol $m^{-2}s^{-1}$ ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 เดือน โดยย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมทุกเดือน วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์ (factorial in completely randomized design) จำนวน 5×2 กรรมวิธี ซึ่งมีปัจจัย 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่ ทดลองจำนวน 5 ซ้ำ ซ้ำละ 4 โพรโตคอร์ม บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต ได้แก่ ความสูงต้น เป็นต้น อัตราการรอดชีวิตของโพรโตคอร์ม จำนวนโครโมโซม และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของตัวแปรในแต่ละกรรมวิธี ด้วยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS 16

การตรวจสอบจำนวนโครโมโซม โดยเก็บตัวอย่างปลายรากความยาว 0.5 - 1.0 เซนติเมตร (ที่มีสีขาวขุ่นเล็กน้อย) ในช่วงเวลา 10.00 - 12.00 น. แล้วมาหยุดวงชีพเซลล์ในสารละลาย 8 - hydroxyquinoline sulfate ความเข้มข้น 0.002 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นล้างปลายรากด้วยน้ำกลั่น 2 - 3 ครั้ง จึงนำมารักษาสภาพเซลล์ด้วย acetic alcohol fixative อัตราส่วน 1 : 3 ส่วนของ glacial acetic acid กับ absolute 95 % เป็นเวลา 5 นาที แล้วย่อยผนังเซลล์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มาลิตี ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 3 - 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 1 ครั้ง จากนั้นตัดเอาเฉพาะส่วนปลายให้เหลือเพียง 1 มิลลิเมตร แล้วย้อมสีด้วยสารละลาย lacto-propionic orcein เป็นเวลา 5 นาที ใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมขยี้ปลายรากเบา ๆ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ซับสีส่วนเกินออกด้วยกระดาษทิชชู แล้วนำสไลด์มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดเลนส์ประกอบ นับจำนวนโครโมโซม บันทึกภาพ เปรียบเทียบในแต่ละความเข้มข้นและระยะเวลาที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน นับจำนวนโครโมโซมปลายรากจำนวน 5 ต้น ต้นละ 5 ราก อย่างน้อย 5 เซลล์ต่อแผ่นสไลด์

2. ผลของโคลชิซินต่อความสูงต้น ขนาด และจำนวนเซลล์คุมของกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู

บันทึกข้อมูลความสูงของต้น หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 4 เดือน แล้วนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธี ด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS 16

การศึกษาลักษณะของเซลล์คุม โดยใช้น้ำยาทาเล็บสีใสทาลงบนผิวด้านใต้ใบ เมื่อน้ำยาแห้งจึงลอกเอาน้ำยาทาเล็บออกจากผิวใบ และนำมาวางบนกระจกสไลด์ จากนั้นหยดสีย้อม safranin O 1 - 2 หยด แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า นับจำนวนเซลล์คุมต่อพื้นที่ 1.0 ตารางมิลลิเมตร และวัดขนาดของเซลล์คุม นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธี ด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS 16 (โดยทำการสุ่มจากตัวอย่างกรรมวิธีละ 3 - 5 ใบ ตรวจสอบจำนวน 3 ตำแหน่ง คือ โคนใบ กลางใบ และปลายใบ)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. ผลของโคลชิซินต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมและอัตราการรอดชีวิตของโพรโตคอร์มกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู

จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมด้วยวิธีการ Feulgen squash technique เปรียบเทียบกับการได้รับ

โคลชิซินความเข้มต่าง ๆ กับชุดควบคุม พบว่า โพรโตคอร์มที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินหรือได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.0, 0.01 และ 0.025 % ไม่พบการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม (Table 1) เมื่อความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินเพิ่มขึ้นจำนวนโครโมโซมเป็นมิกโซพลอยด์ โดยชุดควบคุมมีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 42 นอกจากนี้ในการตรวจสอบยังพบว่า การแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.05% ระยะเวลา 10 วัน มีจำนวนโครโมโซมเป็นมิกโซพลอยด์ (2n = 2x = 42 และ 2n =4x = 84) โดยมีจำนวนโครโมโซมที่ผสมกันอยู่ระหว่างดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ เช่นเดียวกับการแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.10% ระยะเวลา 10 วัน มีจำนวนโครโมโซมเป็นมิกโซพลอยด์ (2n = 2x = 42 และ 2n = 4x = 84) โดยมีจำนวนโครโมโซมที่ผสมกันอยู่ระหว่างดิพลอยด์ และเตตระพลอยด์ (Table 1) ซึ่งเหมือนกับผลของโคลชิซินต่อการเติบโตและชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ของเอื้องดินใบหมาก พบว่าต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05% สามารถชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์ได้ นอกจากนี้มีการศึกษาในกล้วยไม้กลุ่มอิงอาศัย เช่น กล้วยไม้เหลืองจันทบูรดำเต็มคอ เอื้องเงิน และเอื้องคำ เป็นต้น จากการศึกษาของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรดำเต็มคอ พบว่า การแช่สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.10% ระยะเวลา 3 วัน มีระดับพลอยดีเป็นเตตระพลอยด์ 100 % (Tilarux and Prasertsiriwat, 2014) ส่วนกล้วยไม้เอื้องเงินสามารถเกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้เมื่อแช่สารโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10% ระยะเวลา 4 วัน ทำให้เกิดต้นที่เป็นเตตระพลอยด์ได้ (Petchang, 2010)

ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของโพรโตคอร์มกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู

เมื่อนำโพรโตคอร์มกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพูอายุประมาณ 1 เดือน มาแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.0, 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.10 % (w/v) ระยะเวลา 5 และ 10 วัน แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 4 เดือน ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่โพรโตคอร์มในสารละลายโคลชิซินมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ อยู่ในช่วง 30 - 60 % เท่านั้น แต่ปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัยมีปฏิสัมพันธ์กัน โดยการเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่มีผลต่อการลดลงของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ซึ่งการแช่โพรโตคอร์มที่ความเข้มข้นต่ำ 0.01 % ระยะเวลา 10 วัน มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าการแช่โพรโตคอร์มที่ความเข้มข้นสูง 0.05 % ระยะเวลา 10 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sarathum *et al.* (2010) รายงานว่า การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน มีผลต่อโพรโตคอร์มของกล้วยไม้เอื้องแซะ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลง เช่นเดียวกับรายงานของ Atichart (2014) พบว่า การแช่โพรโตคอร์มด้วยสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้นสูงและระยะเวลานาน ส่งผลให้กล้วยไม้เอื้องคำมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงเช่นกัน

Table 1. Chromosome doubling of *Habenaria erichmichelii* with different concentrations and exposure times of colchicine subsequent to culturing on PGR - free MS medium for 4 months

Colchicine concentrations (%)	Chromosome doubling	
	5 days	10 days
0.0	2n = 2x = 42 (100 %)	2n = 2x = 42 (100 %)
0.01	2n = 2x = 42 (100 %)	2n = 2x = 42 (100 %)
0.025	2n = 2x = 42 (100 %)	2n = 2x = 42 (100 %)
0.05	2n = 2x = 42 (100 %)	2n = 2x = 42 (80 %), 2n = 4x = 84 (20 %)
0.10	2n = 2x = 42 (100 %)	2n = 2x = 42 (60 %), 2n = 4x = 84 (40 %)

Table 2. Survival rate of protocorms shoots of *Habenaria erichmichelii* after treating with different concentrations and exposure times of colchicine after culture subsequent to culturing on PGR - free MS medium for 4 months

Colchicine concentrations (%)	Survival rate (%)*		Mean$_{conc}^{ns}$
	5 days	10 days	
0.0	50.00 ± 7.90^{ab}	55.00 ± 12.24^{ab}	52.50 ± 6.92
0.01	50.00 ± 11.18^{ab}	60.00 ± 6.12^{a}	55.00 ± 6.23
0.025	50.00 ± 7.90^{ab}	55.00 ± 5.00^{ab}	52.50 ± 4.48
0.05	45.00 ± 5.00^{ab}	30.00 ± 10.45^{b}	37.50 ± 5.59
0.10	50.00 ± 11.18^{ab}	55.00 ± 9.35^{ab}	52.50 ± 6.92
Mean$_{day}^{ns}$	49.00 ± 3.67	51.00 ± 4.20	
C.V. (%)		19.36	

Colchicine x Days DMRT (0.05) = 237.50

* Mean values followed by the different letters under columns are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

ns = non - significant difference

2. ผลของโคลชิซินต่อความสูงต้น ขนาด และจำนวนเซลล์คุมของกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพู

ผลของความเข้มข้นของโคลชิซินร่วมกับระยะเวลาการแช่ต่อความสูงต้น

ผลของปัจจัยหลัก

ต้นจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.025 % มีค่าเฉลี่ยของความสูงต้นมากที่สุด 0.42 ± 0.05 เซนติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 % มีความสูงต้นเท่ากับ 0.22 ± 0.03 (Table 3, Figure 1)

ผลของปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย

หลังการเลี้ยง 4 เดือน ต้นจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.025 % ระยะเวลา 10 วัน ทำให้มีความสูงต้นเฉลี่ยเท่ากับ 0.46 ± 0.07 เซนติเมตร ซึ่งมากกว่าต้นจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 % ระยะเวลา 10 วัน มีความสูงต้นเฉลี่ย 0.20 ± 0.06 เซนติเมตร แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 3, Figure 1) สอดคล้องกับการศึกษาของ Tipvaree (2009) ศึกษาผลของโคลชิซินต่อการเติบโตและชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ของเอื้องดินใบหมาก พบว่าการให้สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 % มีผลให้ความสูงต้น ความยาวใบ ความยาวราก และจำนวนรากลดลง

ผลของความเข้มข้นของโคลชิซินร่วมกับระยะเวลาการแช่ต่อความหนาแน่นของเซลล์คุม

ผลของปัจจัยหลัก

ใบจากโพรโตคอร์มที่ไม่แช่สารละลายโคลชิซิน มีค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นของเซลล์คุมมากที่สุด 77.20 ± 0.61 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกรรมวิธีที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.10 % นอกจากนี้จำนวนวันที่แช่สารละลายโคลชิซินที่ 5 วัน ให้ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเซลล์คุม 59.62 ± 2.73 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร มากกว่าการแช่สารละลายโคลชิซินที่ 10 วัน โดยมีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเซลล์คุม 56.70 ± 2.31 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร (Table 4)

ผลของปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย

หลังการเลี้ยง 4 เดือน ใบจากโพรโตคอร์มที่ไม่แช่สารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 5 และ 10 วัน มีความหนาแน่นของเซลล์คุมเฉลี่ยมากที่สุด 78.60 ± 0.60 และ 75.80 ± 0.58 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับทุกกรรมวิธีที่มีการแช่สารละลายโคลชิซิน

ระยะเวลา 5 และ 10 วัน ใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 % ระยะเวลา 5 วัน และใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.10 % ระยะเวลา 10 วัน มีความหนาแน่นของเซลล์คุมต่ำสุด 41.20 ± 2.56 และ 44.10 ± 0.48 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ (Table 4)

Table 3. Effects of colchicine concentrations and exposure times on plant height of *Habenaria erichmichelii* after culture on PGR - free MS medium for 4 months

Colchicine concentrations (%)	Plant height (cm)*		Mean$_{conc}$**
	5 days	10 days	
0.0	0.32 ± 0.04^{ab}	0.40 ± 0.10^{ab}	0.36 ± 0.05^{AB}
0.01	0.24 ± 0.06^{ab}	0.42 ± 0.06^{ab}	0.33 ± 0.05^{AB}
0.025	0.38 ± 0.07^{ab}	0.46 ± 0.07^{a}	0.42 ± 0.05^{A}
0.05	0.24 ± 0.04^{ab}	0.20 ± 0.06^{b}	0.22 ± 0.03^{B}
0.10	0.26 ± 0.07^{ab}	0.38 ± 0.03^{ab}	0.32 ± 0.04^{AB}
Mean$_{day}$^{ns}	0.28 ± 0.02	0.37 ± 0.03	
C.V. (%)		0.15	

Colchicine x Days DMRT (0.05) = 0.01

* Mean values followed by the different letters under columns are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

** Mean values followed by the different letters of the same column are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

ns = non - significant difference

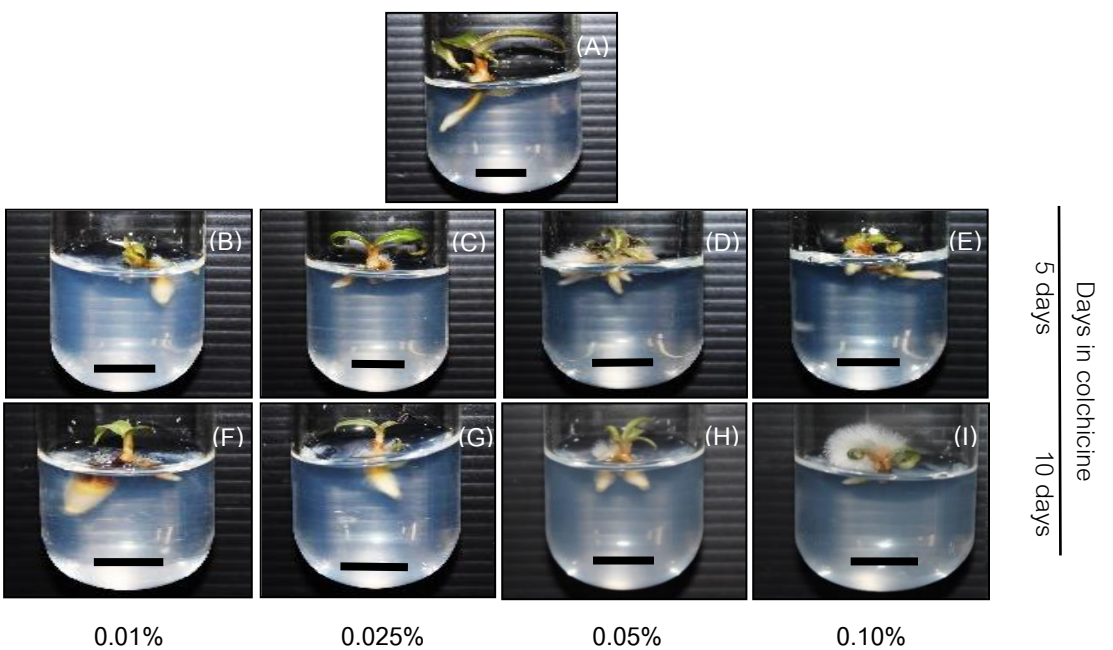

Figure 1. *Habenaria erichmichelii* treated with colchicine at various concentrations and days after culture on PGR - free MS medium for 4 months. (A) = 0.0 % colchicine (control) (B) = 0.01 % colchicine for 5 days (C) 0.025 % colchicine for 5 days (D) = 0.05 % colchicine for 5 days (E) = 0.10 % colchicine for 5 days (F) = 0.01 % colchicine for 10 days (G) = 0.025 % colchicine for 10 days (H) = 0.05 % colchicine for 10 days, and (I) = 0.10 % colchicine for 10 days

Table 4. Effects of colchicine concentrations and exposure times on guard cell density of *Habenaria erichmichelii* after culture on PGR - free MS medium for 4 months

Colchicine concentrations (%)	Guard cell density (0.5 mm^2)*		$Mean_{conc}$**
	5 days	10 days	
0.0	78.60 ± 0.60[a]	75.80 ± 0.58[a]	77.20 ± 0.61[A]
0.01	57.10 ± 0.88[d]	62.00 ± 0.98[c]	59.55 ± 1.02[B]
0.025	69.00 ± 0.57[b]	49.60 ± 0.73[e]	59.30 ± 3.26[B]
0.05	41.20 ± 2.56[f]	52.00 ± 1.78[e]	46.60 ± 3.21[C]
0.10	52.20 ± 1.92[e]	44.10 ± 0.48[f]	48.15 ± 1.73[C]
$Mean_{day}$***	59.62 ± 2.73[A]	56.70 ± 2.31[B]	
C.V. (%)		12.50	

Colchicine x Days DMRT (0.05) = 342.39

* Mean values followed by the different letters under columns are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

** Mean values followed by the different letters of the same column are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

*** Mean values followed by the different letters of the same row are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

ns = non - significant difference

ผลของความเข้มข้นของโคลชิซินร่วมกับระยะเวลาการแช่ต่อความกว้างของเซลล์ปากใบ

ผลของปัจจัยหลัก

ใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 % มีค่าเฉลี่ยของความกว้างของเซลล์ปากใบ 14.51 ± 0.62 µm แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มากกว่าใบจากโพรโตคอร์มที่ไม่แช่สารละลายโคลชิซิน ใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.01 และ 0.025 % นอกจากนี้จำนวนวันที่แช่สารละลายโคลชิซินที่ 10 วัน ให้ค่าเฉลี่ยความกว้างของเซลล์ปากใบ 13.12 ± 0.34 µm มากกว่าเซลล์ปากใบที่แช่สารละลายโคลชิซิน 5 วัน (Table 5, Figure 2)

ผลของปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย

หลังการเลี้ยง 4 เดือน ใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 % ระยะเวลา 5 วัน และใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.10 % ระยะเวลา 10 วัน ทำให้มีความกว้างของเซลล์ปากใบเฉลี่ย 16.35 ± 0.17 และ 15.92 ± 0.58 µm ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มากกว่าใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 % ระยะเวลา 10 วัน ใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.01 % ระยะเวลา 10 วัน ใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.025 % ระยะเวลา 10 วัน ใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.10 % ระยะเวลา 5 วัน ใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.025 % ระยะเวลา 5 วัน ใบจากโพรโตคอร์มที่ไม่แช่สารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 10 วัน ใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.01 % ระยะเวลา 5 วัน และใบจากโพรโตคอร์มที่ไม่เติมสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 5 วัน ซึ่งมีความกว้างของเซลล์ปากใบเฉลี่ย 12.67 ± 0.16, 12.63 ± 0.62, 12.59 ± 0.32, 12.05 ± 0.28, 11.91 ± 0.43, 11.79 ± 0.20, 11.74 ± 0.28 และ 10.29 ± 0.39 µm ตามลำดับ (Table 5, Figure 2)

ผลของความเข้มข้นของโคลชิซินร่วมกับระยะเวลาการแช่ต่อความยาวของเซลล์ปากใบ

ผลของปัจจัยหลัก

ใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.01 % และ 0.05 % มีค่าเฉลี่ยของความยาวของเซลล์ปากใบ 42.78 ± 0.78 และ 45.45 ± 2.64 µm แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งมากกว่าใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.025 และ 0.10 % และใบจากโพรโตคอร์มที่ไม่แช่

สารละลายโคลชิซิน นอกจากนี้จำนวนวันที่แช่สารละลายโคลชิซินที่ 5 วัน ให้ค่าเฉลี่ยความยาวของเซลล์ปากใบ 39.39 ± 1.82 µm มากกว่าความยาวของเซลล์ปากใบที่แช่สารละลายโคลชิซิน 10 วัน ที่เท่ากับ 35.66 ± 1.09 µm (Table 6, Figure 2)

ผลของปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย

หลังการเลี้ยง 4 เดือน ใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 % ระยะเวลา 5 วัน ทำให้มีความยาวของเซลล์ปากใบเฉลี่ย 51.83 ± 2.13 µm แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งมากกว่าใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.01 % ระยะเวลา 5 และ 10 วัน ใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.05 % ระยะเวลา 10 วัน ใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.025 % ระยะเวลา 5 และ 10 วัน ใบจากโพรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.10 % ระยะเวลา 10 และ 5 วัน และใบจากโพรโตคอร์มที่ไม่แช่สารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 5 และ 10 วัน ซึ่งมีความยาวของเซลล์ปากใบเฉลี่ย 44.47 ± 0.66, 41.09 ± 0.94, 39.08 ± 0.98, 38.58 ± 1.49, 36.34 ± 1.36, 35.35 ± 0.39, 33.29 ± 3.04, 28.76 ± 1.05 และ 26.45 ± 0.57 µm ตามลำดับ (Table 6, Figure 2) โดย Fehr (1987) ได้อธิบายเกี่ยวกับพืชที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัว ซึ่งเซลล์จะมีขนาดเพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้ขนาดของปากใบยาวกว่าพืชปกติที่เป็นพืชดิพลอยด์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Silva *et al.* (2000) ศึกษาผลการชักนำให้เกิดโพลี-พลอยด์ของกล้วยไม้แคทลียา พบว่า ต้นที่เป็นดิพลอยด์มีความหนาแน่นของปากใบมากกว่าต้นเตตระพลอยด์ นอกจากนี้ Chinachit and Sreemaung (2008) ศึกษาผลของโคลชิซินที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ ploidy ในกล้วยไม้ดิน หมูกลิ้ง พบว่า กล้วยไม้ดินหมูกลิ้งที่เป็นต้นเตตระพลอยด์มีขนาดปากใบและขนาดเซลล์คุมใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ แต่มีความหนาแน่นของปากใบน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ เช่นเดียวกับ Petbanna (2011) ศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ดินใบหมาก *Spathoglottis plicata* Blume var. *alba* โดยใช้โคลชิซินและออรีซาลินในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ต้นมิกโซพลอยด์มีขนาดเซลล์คุม ความหนาใบ ความยาวปากใบ จำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุม จำนวนหน่อต่อต้นมากกว่าต้นดิพลอยด์

Table 5. Effects of colchicine concentrations and exposure times on stomata width of *Habenaria erichmichelii* after culture on PGR - free MS medium for 4 months

Colchicine concentrations (%)	Stomata width (µm)*		Mean$_{conc}$**
	5 days	10 days	
0.0	10.29 ± 0.39^{c}	11.79 ± 0.20^{b}	11.04 ± 0.32^{C}
0.01	11.74 ± 0.28^{b}	12.63 ± 0.62^{b}	12.19 ± 0.35^{B}
0.025	11.91 ± 0.43^{b}	12.59 ± 0.32^{b}	12.25 ± 0.28^{B}
0.05	16.35 ± 0.17^{a}	12.67 ± 0.16^{b}	14.51 ± 0.62^{A}
0.10	12.05 ± 0.28^{b}	15.92 ± 0.58^{a}	13.99 ± 0.72^{A}
Mean$_{day}$***	12.47 ± 0.43^{B}	13.12 ± 0.34^{A}	
C.V. (%)		1.94	

Colchicine x Days DMRT (0.05) = 18.62

* Mean values followed by the different letters under columns are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

** Mean values followed by the different letters of the same column are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

*** Mean values followed by the different letters of the same row are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

Table 6. Effects of colchicine concentrations and exposure times on stomata length of *Habenaria erichmichelii* after culture on PGR - free MS medium for 4 months

Colchicine concentrations (%)	Stomata length (μm)*		Mean$_{conc}$**
	5 days	10 days	
0.0	28.76 ± 1.05^{f}	26.45 ± 0.57^{f}	27.60 ± 0.68^{D}
0.01	44.47 ± 0.66^{b}	41.09 ± 0.94^{bc}	42.78 ± 0.78^{A}
0.025	38.58 ± 1.49^{cd}	36.34 ± 1.36^{de}	37.46 ± 1.02^{B}
0.05	51.83 ± 2.13^{a}	39.08 ± 0.98^{cd}	45.45 ± 2.64^{A}
0.10	33.29 ± 3.04^{e}	35.35 ± 0.39^{de}	34.32 ± 2.22^{C}
Mean$_{day}$***	39.39 ± 1.82^{A}	35.66 ± 1.09^{B}	
C.V. (%)		7.61	

Colchicine x Days DMRT (0.05) = 74.50

* Mean values followed by the different letters under columns are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

** Mean values followed by the different letters of the same column are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

*** Mean values followed by the different letters of the same row are significantly different according to DMRT at $p < 0.05$

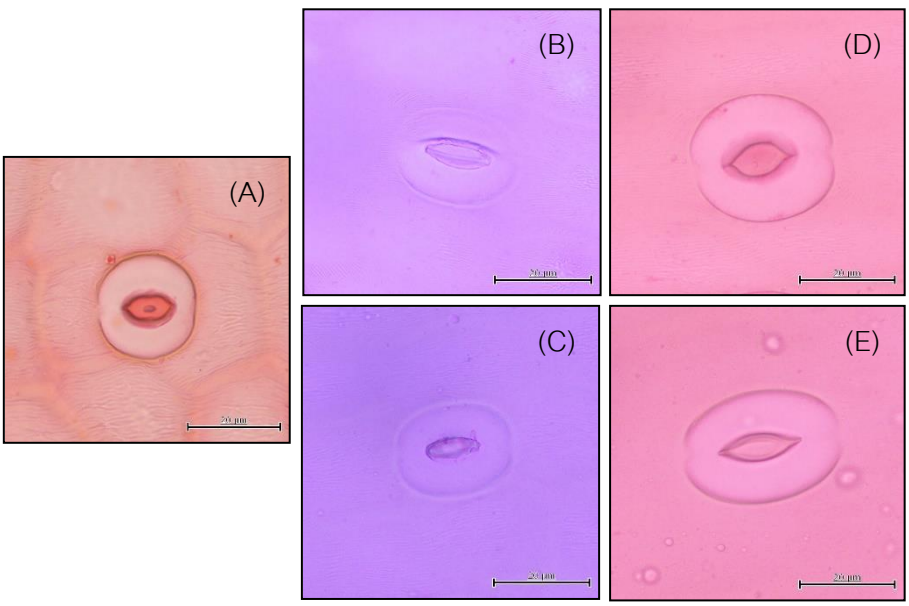

Figure 2. The thickness and length of the stomata cell of *Habenaria erichmichelii* after culture on PGR - free MS medium for 4 months (bar 20 μm) (A) 0.0 % colchicine (control) (B) 0.05 % colchicine for 5 days (C) 0.10 % colchicine for 5 days (D) 0.05 % colchicine for 10 days, and (E) 0.10 % colchicine for 10 days

สรุป

การแช่โพรโตคอร์มของกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพูในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.10 % ระยะเวลา 10 วัน มีจำนวนโครโมโซมเป็นมิกโซพลอยด์ (2n = 2x = 42 และ 2n = 4x = 84) นอกจากนี้โพรโตคอร์มที่แช่ด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.01 % ระยะเวลา 10 วัน มีอัตราการรอดชีวิตดีกว่าเมื่อเทียบกับการแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 % ระยะเวลา 10 วัน ในขณะที่ความสูงต้นมีแนวโน้มลดลง ความหนาแน่นปากใบลดลง และปากใบมีขนาดใหญ่ โดยการใช้สารโคลชิซิน 0.05 % เหมาะแก่การนำไปใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และประหยัดการใช้สารเคมี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์บริการวิชาการและถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์สำหรับการทำงานวิจัย และสำนักงานบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Atichart, P. 2014. Effect of concentration and duration of colchicine on survival rate and cell characteristic of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. protocorm. KKU Science Journal 42(2): 372-379. (in Thai)

Caperta, A.D., M. Delgado, F. Ressurreicao, A. Meister, R.N. Jones, W. Viegas and A. Houben. 2006. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in C-metaphase cells. Protoplasma 227(2-4): 147-153.

Chinachit, W. and S. Sreemaung. 2008. Colchicine affecting the alteration of ploidy level in plantlets of *Eulophia andamanensis* Reichb. f. Agricultural Science Journal 39(3) (Suppl.): 275-277. (in Thai)

Fehr, W.R. 1987. Principles of Cultivar Development Vol.1. New York: Macmillan.

Hawkes, A.D. 1965. Encyclopedia of Cultivated Orchids: An Illustrates, Descriptive Manual of the Members of the Orchidaceae Currently in Cultivation. Faber and Faber, London. 602 p.

Kawchadee, C., W. Bundithya, C. Sotthikul and N. Potapohn. 2012. Interspecific and intergeneric crossability of some *Habenaria* and *Pecteilis*, terrestrial orchids. Journal of Agriculture 28(3): 263-272. (in Thai)

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15(3): 473-497.

Petbanna, U. 2011. Chromosome doubling of *Spathoglottis plicata* Blume var. *alba* using colchicine and oryzalin *in vitro*. M. Sc. Thesis. Walailak University, Nakhon Si Thammarat. 105 p. (in Thai)

Petchang, R. 2010. The effects of colchicine concentration and treatment duration on growth and chromosome number in *Dendrobium draconis* Rchb. f. Journal of Science and Technology Mahasarakham University 29(4): 413-419. (in Thai)

Potapohn, N. 2005. Orchidology 1. Handout. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai. 215 p. (in Thai)

Saikum, C., K. Kunasakdakul and N. Potapohn. 2020. Crossability and *in vitro* seed

germination of some terrestrial orchid species of genus *Habenaria* and *Pecteilis*. Journal of Agriculture 36(1): 47-58. (in Thai)

Sarathum, S., M. Hegele, S. Tantiviwat and M. Nanakorn. 2010. Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. European Journal of Horticultural Science 75(3): 123-127.

Silva, P.A.K.X., S.C. Jacques and M.H.B. Zanettini. 2000. Induction and identrification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidacea) by *in vitro* techniques. Ciencia Rural, Santa Maria 30(1): 105-111.

Sitthisatchatham, S. 2007. Wild Orchid of Thailand. Home and Garden, Bangkok. 495 p. (in Thai)

Teo, C.K.H. 1985, Native Orchids of Peninsula Malaysia. Kyodo-Shing Loong Printing Indrustries (Pte) Ltd., Kuala Lumpur. 119 p.

Thaithong, O. 2005. Orchids of Thailand. Home and Garden, Bangkok. 461 p. (in Thai)

Tilarux, P. and S. Prasertsiriwat. 2014. Effects of colchicine in the induction of polyploidy of *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f. (var. *oculatum*). Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University 16(1): 61-68. (in Thai)

Tipvaree, V. 2009. Effects of colchicine on growth and polyploid induction of *Spathoglottis plicata*. M. S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 82 p. (in Thai)