

ผลของโคลชิซินต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยดีในกล้วยไม้เหลืองจันทร์บุรดาเต็มคอ
(*Dendrobium fredericksianum* Rchb.f. var. *oculatum*)

Effects of Colchicine in the Induction of Polyploidy of *Dendrobium fredericksianum*
Rchb.f. (var. *oculatum*)

ปฐมภรณ์ ทิลารักษ์* และ สาโรจน์ ประเสริฐศิริวัฒน์

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์และเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี

อ.เขาคิชฌกูฏ จ.จันทบุรี 22210

*Email: monmannu@yahoo.com

บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการให้โคลชิซินต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยดีในกล้วยไม้เหลืองจันทร์บุรดาเต็มคอ โดยนำโปรโตคอร์มกล้วยไม้เหลืองจันทร์บุรดาอายุ 1 เดือนหลังจากออกอาหารเหลวสูตร Vacin & Went (VW) ที่ผสมโคลชิซินความเข้มข้น 0.00%, 0.10%, 0.15% และ 0.20% เป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน จากนั้นย้ายโปรโตคอร์มมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร VW เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่า อัตราการรอดของโปรโตคอร์มในแต่ละระดับความเข้มข้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยอัตราการรอดลดลงตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่แช่โคลชิซิน ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แช่โคลชิซินทำให้ได้อัตราการรอดสูงสุด (96.33%) คือความเข้มข้น 0.10% แช่เป็นระยะเวลา 1 วัน จากนั้นนำต้นอ่อนกล้วยไม้เหลืองจันทร์บุรดาเต็มคอมาเลี้ยงจนอายุครบ 9 เดือน แล้วนำมาวัดระดับพลอยดีด้วยวิธี Flow cytometric พบว่า การเกิดโพลีพลอยดีของกล้วยไม้กลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่โคลชิซินมีระดับพลอยดีดีเป็น $2n=2x$ (ดิพลอยด์) และกลุ่มทดลองที่ผ่านการแช่โคลชิซินมีระดับพลอยดีดีเป็น $2n=4x$ (เตตระพลอยด์) ความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่โคลชิซินที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ โคลชิซินความเข้มข้น 0.10% แช่ระยะเวลา 3 วัน ซึ่งมีอัตราการรอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ คือ 94.33% และมีระดับพลอยดีเป็นเตตระพลอยด์ 100 % เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะต้นที่เกิดเตตระพลอยด์และต้นดิพลอยด์ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนโดยต้นที่เกิดเตตระพลอยด์มีลำต้นสั้นหนา ใบและรากสั้นกว่าต้นดิพลอยด์ เมื่อนับจำนวนและวัดขนาดของปากใบพบว่าต้นที่เกิดเตตระพลอยด์จำนวนปากใบน้อยและความยาวเฉลี่ยของปากใบสั้นกว่าต้นดิพลอยด์

คำสำคัญ: กล้วยไม้เหลืองจันทร์บุรดาเต็มคอ โคลชิซิน โพลีพลอยด์ โพลีไซโทเมทรี

Abstract

The effects of colchicine concentrations and immersion time for inducing polyploidy of *Dendrobium fredericksianum* Rchb.f. (var. *oculatum*) was carried out by soaking the 1 month protocorms in a mixture of Vacin&Went (VW) and colchicines with the concentrations of 0.00%, 0.10%, 0.15%, and 0.20% for 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days respectively. The protocorms were then transferred to solid VW medium for 3 months. It was found that the protocorms survival rates were reduced significantly at the level of 0.05 when treated with high concentrations and long periods of immersion time in the colchicines. The highest survival rate of protocorms was

96.33% to be found at a colchicine concentration level of 0.10% and immersion time of 1 day. After that the plantlets were cultured continually on solid VW medium until 9 months of age. Then the ploidy levels of the 9 month plantlets were measured by the flow cytometric method. It was found that the ploidy level of $2n=4x$ occurred in the plantlets which were treated by colchicine while the ploidy level of $2n=2x$ occurred in the plantlets of the control group. The most effective method of treatment was 0.10% colchicine for 3 days which resulted in about 94.33% survival PLBs (protocorm like bodies) and with 100% of tetraploid orchids. The characteristics of the tetraploid plantlets were distinctly different from the diploid plantlets in that they had thicker and shorter stems, shorter leaves and roots, and less than average numbers of stomata and average lengths of guard cells.

Keywords: *Dendrobium friedricksianum* Rchb.f, Colchicine, Polyploidy, Flow-cytometry

บทนำ

กล้วยไม้เหลืองจันทร์บุร หรือ *Dendrobium friedricksianum* Rchb.f เป็นกล้วยไม้ในตระกูลหวายที่มีมีความสวยงามดอกมีสีเหลืองสดใส ถูดยอดอกกุ่มภาพันธุถึงมีนาคม ช่อดอกเกิดที่ปลายลำช่อละ 3-6 ดอก ดอกขนาด 3.5-4 เซนติเมตร มีสายพันธุ์ที่ให้ดอกสีเหลืองล้วน และสายพันธุ์ที่มีแต้มสีม่วงแดงที่โคนกลีบปาก ดอกบานทน 3-4 สัปดาห์ [1] กลีบดอกมีทั้งบิดและไม่บิด บางต้นกลีบเหลืองแต่มีสีชมพูเจือด้วย ปากดอกมีทั้งรูปกลม รูปหัวใจ ขนาดเล็กและใหญ่แตกต่างกัน [2] พบมากในพื้นที่ภาคตะวันออกโดยเฉพาะจังหวัดจันทบุรี กล้วยไม้เหลืองจันทร์บุรนั้นมีราคาค่อนข้างสูงเป็นที่ต้องการของตลาดและนักสะสม ทำให้มีการลักลอบนำออกจากป่ามาจำหน่ายจำนวนมาก จนทำให้ในธรรมชาติมีจำนวนลดลง ลักษณะกล้วยไม้เหลืองจันทร์บุรที่มีราคาสูงและเป็นที่ต้องการมากคือ ที่มีลักษณะดอกใหญ่สีเข้ม แต่ไม่พบลักษณะดังกล่าวในธรรมชาติ หากมีการปรับปรุงพันธุ์ให้ดีขึ้น เช่น ดอกใหญ่ขึ้น และสีเข้มขึ้นจะสามารถนำมาพัฒนาให้เป็นไม้ดอกเพื่อการค้าและส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเลี้ยงเองได้ ซึ่งจะช่วยลดการลักลอบนำกล้วยไม้เหลืองจันทร์บุรในธรรมชาติมาจำหน่ายได้ การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้นั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การผสมข้ามพันธุ์ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมโดยการตัดต่อยีน หรือการส่งถ่ายยีน นอกจากนี้ยังมีวิธีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของพืช (polyploid) โดยใช้สารโคลชิซินที่เป็นสารเคมียับยั้งการสร้างไมโครทิวบูลซึ่งเป็นโครงสร้างของสปินเดิลไฟเบอร์ จึงทำให้โครมาติดของโครโมโซมไม่เกิดการแยกจากกันในระยะอานาเฟส [3] เมื่อสิ้นสุดการ

แบ่งเซลล์จึงได้เซลล์ที่มีโครโมโซมเพิ่มเป็น 2 เท่า ซึ่งลักษณะที่เกิดขึ้นนี้สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้ ในพืชนั้นเมื่อเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ตั้งแต่ 2 ชุดขึ้นไป เรียก โพลีพลอยด์ (polyploid) เช่น เตตระพลอยด์ (tetraploid) หรือ $4n$ คือพืชที่มีโครโมโซม 4 ชุด พืชกลุ่มโพลีพลอยด์ เป็นพืชที่สร้างขึ้นเพื่อให้มีลักษณะใหม่ๆ แต่บางครั้งทำให้พืชมีลักษณะที่ผิดปกติและไม่สามารถเจริญได้ บางครั้งก็ได้พืชที่มีขนาดใหญ่และดอกใหญ่ ในกล้วยไม้มักจะได้ลักษณะดอกที่ใหญ่ขึ้น [4] จึงมีการนำโคลชิซินมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ได้ลักษณะตามที่ต้องการเพื่อให้ดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเข้มขึ้น หรือบานนานขึ้น

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เหลืองจันทร์บุรดำเต็มคอ ซึ่งเป็นกล้วยไม้เหลืองจันทร์บุรที่มีลักษณะดอกที่มีแต้มสีม่วงแดงเต็มโคนกลีบปาก โดยนำโคลชิซินมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์เพื่อให้มีลักษณะที่ตรงตามความต้องการของตลาด เพื่อพัฒนาเป็นกล้วยไม้เพื่อการค้า และข้อมูลจากงานวิจัยดังกล่าวยังเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เหลืองจันทร์บุรที่มีลักษณะดอกสีเหลืองล้วนหรือกล้วยไม้ชนิดอื่นๆ ต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. ผลของโคลชิซินต่ออัตราการรอดของโปรโตคอร์ม (protocorm) กล้วยไม้เหลืองจันทร์บุรดำเต็มคอ

นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้เหลืองจันทร์บุรดำเต็มคออายุ 1 เดือน หลังจากการเพาะเมล็ดบนอาหารแข็งสูตร Vaccin & Went (VW) แخذในอาหารเหลวสูตร VW ที่มี

โคลชิซิน โดยใช้แผนการทดลองแบบ Factorial in CRD ซึ่งมีความเข้มข้นของโคลชิซิน 0.00, 0.10, 0.15 และ 0.20 % (w/v) ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน ตามลำดับ จำนวน 28 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 100 โปรโตคอร์ม แล้วนำโปรโตคอร์ม กลัวยไม้กลับมาเลี้ยงในอาหารสูตรแข็ง VW อีกครั้งจนครบ 3 เดือน หลังจากนั้นบันทึกอัตราการรอดของต้นอ่อนกลัวยไม้และวิเคราะห์ความแตกต่าง ของค่าเฉลี่ยอัตราการรอดของโปรโตคอร์มกลัวยไม้แต่ละทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's multiple rang test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2. การทดสอบระดับพลอยดีของกลัวยไม้เหลืองจันทบูรดำเต็มคอ

ทดสอบระดับพลอยดีด้วยเครื่อง flow cytometer รุ่น PA II โดยนำไปกลัวยไม้เหลืองจันทบูรดำเต็มคอจากตอนที่ 2.1 ซึ่งเลี้ยงบนอาหารสูตร VW จนมีอายุ 9 เดือน ทั้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่โคลชิซิน และกลุ่มทดลองที่ผ่านการแช่โคลชิซิน จำนวน 1 กรัม สับด้วยมีดที่คมบนจานพลาสติก หยดสารละลาย extraction buffer และ staining buffer หลังจากนั้นกรองสารสกัดที่ได้ใน celltrics disposable filters ขนาด 50 ไมครอน และนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาระดับพลอยดีด้วยวิธี flow cytometry

3. ศึกษาผลของโคลชิซินต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้น ขนาดและจำนวนปากใบกลัวยไม้เหลืองจันทบูรดำเต็มคอ

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ขนาดและจำนวนปากใบของกลัวยไม้เหลืองจันทบูรดำเต็มคอโดยนำต้นกลัวยไม้ที่ไม่ผ่านการศึกษานี้มาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกลัวยไม้กลุ่มควบคุมที่มีโครโมโซมเป็น ดิพลอยด์ และต้นกลัวยไม้กลุ่มทดลองที่มีโครโมโซมเป็นเตตระพลอยด์ โดยนำส่วนของใบมานับจำนวนปากใบ และวัดความยาวของเซลล์คุมปากใบ ด้วยเทคนิคการทำให้ใส โดยนำแผ่นใบแช่ในสารละลาย FAA 70% แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด ตัดชิ้นตัวอย่างให้มีขนาดประมาณ 1.5 เซนติเมตร นำไปแช่ในสารละลาย KOH ความเข้มข้น 5% เป็นเวลา 3 วัน แล้วย้ายตัวอย่างไปแช่ในสารละลาย Clorox 6% เป็นเวลา 20-30 นาที (จนชิ้นตัวอย่างใส) หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง ดึงน้ำ

ออกจากตัวอย่างโดยแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 30%, 50% และ 70% ตามลำดับ ขั้นตอนละ 5-10 นาที หลังจากนั้นย้ายไปแช่ในสี safarin-o ความเข้มข้น 0.4% ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 3-4 วัน ย้ายชิ้นตัวอย่างไปแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95%, 100%, 100% ผสมกับไซลีน และไซลีน ขั้นตอนละ 5-10 นาที และฉีกสไลด์ด้วย DePeX แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 10X และ 40X เพื่อบันทึกจำนวน และวัดขนาดของปากใบ เปรียบความแตกต่างของจำนวน และความยาวของปากใบระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น ดิพลอยด์ และกลุ่มทดลองที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นเตตระพลอยด์ โดยวิเคราะห์สถิติ t-Test

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. ผลของโคลชิซินต่ออัตราการรอดของโปรโตคอร์มกลัวยไม้เหลืองจันทบูรดำเต็มคอ

นำโปรโตคอร์มกลัวยไม้เหลืองจันทบูรดำเต็มคออายุ 1 เดือนที่แช่ในอาหารเหลวสูตร VW ที่มีโคลชิซินความเข้มข้น 0.00% 0.10%, 0.15% และ 0.20% เป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน แล้วย้ายมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW เป็นระยะเวลา 3 เดือน เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นของโคลชิซิน พบว่า ความเข้มข้นของโคลชิซินที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้โปรโตคอร์มกลัวยไม้มีอัตราการรอดชีวิตลดลง และอัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มกลัวยไม้ที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินแต่ละความเข้มข้นที่กำหนดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งอัตราการรอดเฉลี่ยสูงสุด 99.14% รองลงมาคือ 89.57%, 85.95% และ 82.69% ที่ความเข้มข้นของโคลชิซิน 0.00%, 0.10%, 0.15% และ 0.20% ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่ในสารละลายโคลชิซินต่ออัตราการรอดของต้นอ่อนกลัวยไม้ พบว่า เมื่อความเข้มข้น และระยะเวลาในการแช่โคลชิซินเพิ่มขึ้นอัตราการรอดของโปรโตคอร์มกลัวยไม้ลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยอัตราการรอดของโปรโตคอร์ม กลัวยไม้ที่ผ่านการแช่โคลชิซินสูงที่สุด คือ 96.33% โดยแช่ในโคลชิซินความเข้มข้น 0.10% เป็นระยะเวลา 1 วัน และอัตรา

การรอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ต่ำที่สุดคือ 74.00% คือ โปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่แช่ในโคลชิซินความเข้มข้น 0.20% เป็นระยะเวลา 7 วัน (ตารางที่ 1) โดยโปรโตคอร์มจะเปลี่ยนสีจากสีเขียว เป็นสีเหลือง และเป็นสีน้ำตาลในที่สุด ซึ่งได้สอดคล้องกับการทดสอบความเข้มข้นของ โคลชิซิน ต่ออัตราการรอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องเงิน ที่ความเข้มข้น 0.05%, 0.10% และ 0.50% เป็นเวลา 4 และ 5 วันพบอัตราการรอดลดลงตามความเข้มข้น และระยะเวลา ในการแช่ในสารละลายโคลชิซินที่เพิ่มขึ้น [5] และใน กล้วยไม้ช้างแดงพบว่าอัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์

มลดลง เมื่อแช่ในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นสูงขึ้น และระยะเวลานานขึ้น [6] โปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องแฉะ เมื่อผ่านการแช่ในโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.10% ระยะเวลา 15 วัน พบว่า โปรโตคอร์มเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียว เป็นสีเหลืองหรือสีน้ำตาล [7] โปรโตคอร์มที่แข็งแรงจะมีความทนทานต่อโคลชิซินมากกว่าโปรโตคอร์มที่อ่อนแอ [6] สารละลายโคลชิซินที่แทรกซึมเข้าไปในเซลล์ทำให้ไซโทพลาสซึมมีความหนืด ส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ เซลล์จึงเกิดความเสียหายและตายในที่สุด [8]

ตารางที่ 1 อัตราการรอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เหลืองจันทร์พุดดำเต็มคอหลังจากผ่านการแช่โคลชิซินความเข้มข้น 0.00, 0.10, 0.15 และ 0.20% (v/w) ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน

ระยะเวลาในการแช่ โคลชิซิน (วัน)	อัตราการรอด (%)			
	ความเข้มข้นของโคลชิซิน (%)			
	0.00	0.10	0.15	0.20
1	100.00ai	96.33bi	92.67ci	91.00di
2	100.00ai	95.67bi	91.67ci	90.33di
3	100.00aij	94.33bij	88.33cij	84.33dij
4	98.67aj	92.33bj	88.00cj	84.33dj
5	99.67aj	87.33bj	85.33cj	82.00dj
6	98.33ak	83.67bk	80.00ck	77.50dk
7	97.33al	77.33bl	75.67cl	74.00dl
ค่าเฉลี่ย	99.14W	89.57X	85.95Y	82.69Z

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากอัตราการรอดของต้นกล้วยไม้เหลืองจันทร์พุดดำเต็มคอที่ผ่านการแช่โคลชิซินที่ระยะเวลาและความเข้มข้นที่ต่างกัน

2. การวัดระดับพลอยดีของกล้วยไม้เหลืองจันทร์พุดดำเต็มคอ

จากการนำไปกล้วยไม้ อายุ 9 เดือนที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW กลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่โคลชิซิน และกลุ่มทดลองที่ผ่านการแช่โคลชิซิน จำนวน

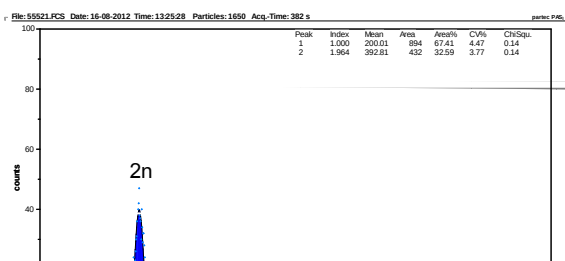
หรีดเมนต์ละ 3 ต้น มาวิเคราะห์หาระดับพลอยดีด้วยวิธี flow cytometry ด้วยเครื่อง Partec PA II พบว่า ต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการแช่โคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ สามารถชักนำให้เกิดโพลีพลอยดีโดยมีระดับพลอยดีเป็น เตตระพลอยดีอยู่ที่ 66.67% และ 100% (ตารางที่ 2) ระดับพลอยดีกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้แช่สารละลายโคลชิซินมีระดับพลอยดี $2n=2x$ โดยปริมาณโครโมโซมของต้นที่เป็นดิพลอยด์ $2n=2x$ จะมี peak ตำแหน่งสูงสุดที่ 200 (ภาพที่ 1) และกลุ่มทดลองที่ผ่านการแช่โคลชิซินให้

ระดับพลอยดีเป็นเตตระพลอยด์ $2n=4x$ ซึ่งมี peak สูงสุดที่ตำแหน่ง 400 (ภาพที่ 2) ทั้งนี้จากการวัดระดับพลอยดีกล้วยไม้เหลืองจินตบูรดาเต็มคอ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเตตระพลอยดีได้ในทุกความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลาที่ใช้ทดสอบ ซึ่งในกล้วยไม้สกุลเดียวกัน เช่น เอื้องคำสามารถชักนำให้เกิดเตตระพลอยด์ ด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0.04% และที่ความเข้มข้นเดียวกันระยะเวลา 1 วัน สามารถชักนำให้เกิดเตตระพลอยด์ 47% [9] ในกล้วยไม้แคทลียาก็สามารถชักให้เกิดโพลีพลอยด์ได้ด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร ระยะเวลา 10 วัน โดยมีความถี่ในการเกิดเตตระพลอยด์ 95% [10] โคลชิซิน

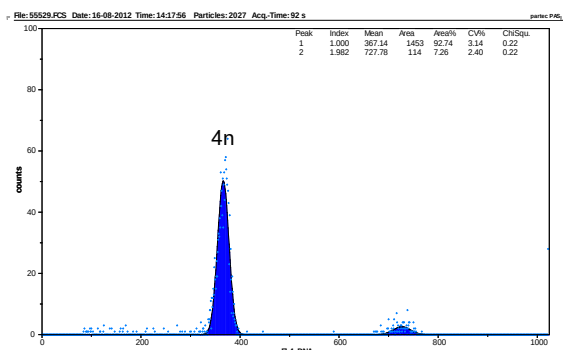
เป็นสาเหตุของการสลายตัวของโครงสร้างไมโครทิวบูลโดยสามารถยับยั้งการสร้างทิวบูลิน ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของไมโครทิวบูล จากการทดสอบผลของโคลชิซินต่อการสร้างทิวบูลินในรากหอมหัวใหญ่ พบว่า เมื่อนำรากหอมหัวใหญ่แช่ในโคลชิซินผ่านไป 2 ชั่วโมง ทิวบูลินสามารถสร้างได้เพียง 25% ทำให้การสร้างไมโครทิวบูลถูกยับยั้ง และพบโครงสร้างของไมโครทิวบูลถูกแยกชิ้นส่วน 70% เมื่อแช่ในโคลชิซินผ่านไป 6 ชั่วโมง [11] ดังนั้นเมื่อโคลชิซินยับยั้งการสร้างไมโครทิวบูล จึงทำให้โครมาติดในระยะอานาเฟสไม่แยกจากกัน ส่งผลให้พืชเกิดโพลีพลอยด์ [3]

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่โคลชิซินต่อระดับพลอยดีในกล้วยไม้เหลืองจินตบูรดาเต็มคอ

ความเข้มข้นของโคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (วัน)	จำนวนต้นในการวิเคราะห์	ระดับพลอยดี (%)	
			ดิพลอยด์	เตตระพลอยด์
0 (ชุดควบคุม)		3	100	-
0.10	1	3	33.33	66.67
	2	3	33.33	66.67
	3	3	-	100
	4	3	-	100
	5	3	-	100
	6	3	-	100
	7	3	-	100
0.15	1	3	33.33	66.67
	2	3	-	100
	3	3	-	100
	4	3	-	100
	5	3	33.33	66.67
	6	3	-	100
	7	3	-	100
0.20	1	3	-	100
	2	3	-	100
	3	3	-	100
	4	3	-	100
	5	3	-	100
	6	3	-	100
	7	3	-	100
รวม		66	10.60	89.40



รูปที่ 1 แสดงระดับพลอยดี 2X ของกล้วยไม้เหลืองจินทบูรดำเต็มคอกกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้แช่สารละลายโคลชิซิน



รูปที่ 2 แสดงระดับพลอยดี 4X ของกล้วยไม้เหลืองจินทบูรดำเต็มคอกกลุ่มทดลองที่ผ่านการแช่โคลชิซิน

3. ผลของโคลชิซินต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้น ขนาดและจำนวนปากใบกล้วยไม้เหลืองจินทบูรดำเต็มคอก

เปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของต้นกล้วยไม้เหลืองจินทบูรดำเต็มคอกกลุ่มควบคุมที่มีโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ และกลุ่มทดลองที่มีโครโมโซมเป็นเตตระพลอยด์ พบว่า ต้นกล้วยไม้กลุ่มดิพลอยด์มีลักษณะผอมยาว ใบและรากยืดยาวเจริญได้ดี ในขณะที่กลุ่มเตตระพลอยด์นั้นลำต้นมีลักษณะหนาสั้น ใบและรากมีขนาดเล็กสั้น (ภาพที่ 3) เช่นเดียวกับผลของโคลชิซินต่อกล้วยไม้เอื้องเงิน พบว่า กล้วยไม้กลุ่มที่แช่โคลชิซินมีลักษณะลำต้นจะใหญ่และโตกว่า ไม่มีสีเขียวเข้มกว่าชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่โคลชิซิน [5] เมื่อนับจำนวน และวัดขนาดของปากใบของต้นกล้วยไม้เหลืองจินทบูรดำเต็มคอก เปรียบเทียบระหว่างต้นกล้วยไม้กลุ่มดิพลอยด์และต้นกล้วยไม้กลุ่มเต

ตระพลอยด์ พบว่า จำนวนปากใบของทั้งสองกลุ่ม มีจำนวนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 3) คือ ต้นกล้วยไม้กลุ่มดิพลอยด์มีจำนวนปากใบเฉลี่ย 105.70 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร (ภาพที่ 4) และต้นกล้วยไม้กลุ่มเตตระพลอยด์ มีจำนวนปากใบเฉลี่ย 73.40 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร (ภาพที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับผลการชักนำให้เกิดโพลิพลอยดีในกล้วยไม้แคทลียาซึ่งพบว่า ต้นดิพลอยด์มีความหนาแน่นของปากใบมากกว่าต้นเตตระพลอยด์ [12] เมื่อวัดขนาดของปากใบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่า ขนาดของปากใบต้นกล้วยไม้กลุ่มดิพลอยด์ และต้นกล้วยไม้กลุ่มเตตระพลอยด์ มีขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือ กลุ่มดิพลอยด์ ปากใบมีความยาวเฉลี่ย 30.00 ไมโครเมตร ในขณะที่กลุ่มเตตระพลอยด์ปากใบมีความยาวเฉลี่ย 25.00 ไมโครเมตร (ตารางที่ 3 และภาพที่ 6) ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากกล้วยไม้เอื้องแปร่งสีฟัน ที่พบว่าความยาวปากใบเฉลี่ยในต้นดิพลอยด์มีขนาดสั้นกว่าต้นโพลิพลอยด์ [13] แต่ในการชักนำให้เกิดโพลิพลอยดีในกล้วยไม้เข็มบีเดียพบว่ ขนาดของปากใบระหว่างต้น ดิพลอยด์และต้นเตตระพลอยด์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ [14] ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของขนาดปากใบนั้นขึ้นกับชนิดของพืช [6]



รูปที่ 3 ลักษณะภายนอก

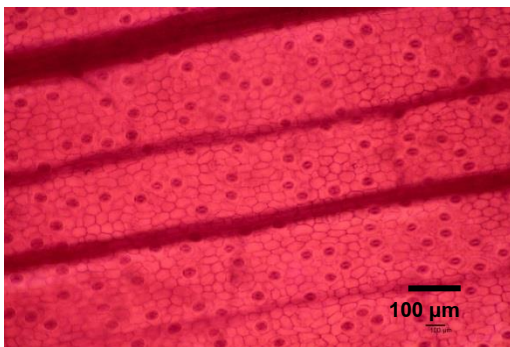
(ก) ต้นกล้วยไม้เหลืองจินทบูรดำเต็มคอกเตตระพลอยด์

(ข) ต้นกล้วยไม้เหลืองจินทบูรดำเต็มคอกดิพลอยด์

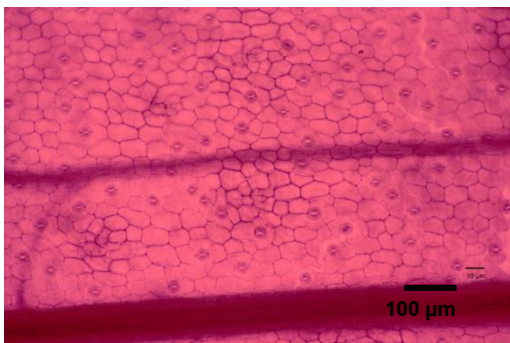
ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยจำนวนปากใบและความยาวปากใบของกล้วยไม้เหลืองจินทบูรดำเต็มคอกโพลิพลอยด์ เปรียบเทียบกับกลุ่มเตตระพลอยด์

ระดับพลอยดี พืช	จำนวนปากใบต่อ ตารางมิลลิเมตร	ความยาวปากใบ (μm)
ดิพลอยด์	105.70a	30.00a
เตตระพลอยด์	73.40b	25.00b

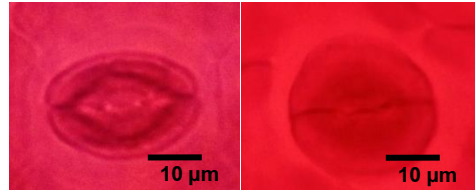
แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากจำนวนและขนาดของปากใบกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรดำเต็มคอ



รูปที่ 4 เซลล์คุมปากใบกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรดำเต็มคอ ดิพลอยด์ (กำลังขยาย 100 เท่า)



รูปที่ 5 เซลล์คุมปากใบกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรดำเต็มคอ เตตระพลอยด์ (กำลังขยาย 100 เท่า)



(ก)

(ข)

รูปที่ 6 ขนาดเซลล์คุมของปากใบเปรียบเทียบระหว่าง

(ก) กล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรดำเต็มคอ ดิพลอยด์

(ข) กล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรดำเต็มคอ เตตระพลอยด์

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดโพลีพลอยดีในกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรดำเต็มคอได้ คือ ใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0.10% ระยะเวลา 3 วัน ซึ่งมีระดับพลอยดีเป็นเตตระพลอยด์ 100 % และมีอัตราการรอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สูง คือ 94.33% จำนวนและความยาวของปากใบของกลุ่มเตตระพลอยด์มีจำนวนและความยาวน้อยกว่ากลุ่มดิพลอยด์ ลักษณะของต้นกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรดำเต็มคอ กลุ่มเตตระพลอยด์แตกต่างจากกลุ่มดิพลอยด์อย่างชัดเจน โดยลักษณะต้นกลุ่มเตตระพลอยด์มีลักษณะลำต้นสั้นหนาใบ และรากสั้น เมื่อเทียบกับกลุ่มดิพลอยด์ ซึ่งน่าจะส่งผลให้กล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรดำเต็มคอมีดอกขนาดใหญ่ขึ้น ในการทดลองหากเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่โคลชิซิน ก็จะมีโอกาสชักนำให้มีจำนวนโครโมโซมมากกว่าเตตระพลอยด์ได้ เนื่องจากความเข้มข้นและระยะเวลาที่สูงที่สุดของการทดลอง คือความเข้มข้นโคลชิซิน 0.20% ระยะเวลา 7 วัน นั้นสามารถชักนำให้เกิดเตตระพลอยด์ 100 % และอัตราการรอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรดำเต็มคอยังสูงถึง 74.00%

เอกสารอ้างอิง

- [1] อบฉันท์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน, 461 หน้า.
- [2] สาโรจน์ ประเสริฐศิริวัฒน์. เหลืองจันทร์บูร. 2549. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: โปรออฟเซ็ท, 70 หน้า.

- [3] Caperta, A.D., Delgado, M., Reaaurreicao, F., Meister, A., Jones, W.V. and Houben, A. 2006. "Colchicine – Induces Polyploidization Depends on Tubulin Polymerization in C-Methaphase Cells". **Protoplasma**. 227(2-4): 147-153.
- [4] Thomas, C. 2012. **Propagation-Colchicine Treatment and Toxicity**. International Carnivorous Plant Society. Arizona State University. Retrieved June 20, 2012, www.carnivorousplants.org.
- [5] รัตน์ เพ็ชรช้าง. 2553. "ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการให้โคลชิซินต่อการเจริญและจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้เอื้องเงิน". วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 29(4):413-419.
- [6] Kerdsuwan, N. and Te-chato, S. 2012. "Effects of Colchicines on Survival Rate, Morphological, Physiological and Cytological Characters of Chang Dang Orchid (*Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) *In vitro*". **Journal of Agriculture Technology**. 8(4): 1451-1460.
- [7] Sarathum, S., Hegele, M. and Nanakorn, M. 2010. "Effect of Concentration and Dauration of Colchicines Treatment on Polyploidy Induction in *Dendrobium scabrilingue* L". **Europ. J. Hort. Sci.** 75(3): 123.
- [8] Cook, J.W. and Loudon, L.D.. 1952. "Colchicine". **The Alkaloid Chemistry and Physiology**. 2: 261-329.
- [9] Atichart, P. 2013. "Polyploid by Colchicines Treatments and Plant Regeneration of *Dendrobium chrysotoxum*". **Thai Journal of Agriculture Science**. 46(1): 59-63.
- [10] Griesbach, R.J. 1981. "Colchicine-Induced Polyploidy in Phalaenopsis Orchids". **Plant Cell Tissue Organ Culture**.1: 103-107.
- [11] Utrilla, L., Sans, J. and De la Torre, C. 1989. "Colchicine-Resistant Assembly of Tubulin in Plant Mitosis". **Protoplasma**. 152: 101-108.
- [12] Paulo, A., Konzen, X., Sidia, C. and Maria, H. 2000. "Induction and Identification of Polyploids in *Cattleya intermedia* LINDL. (Orchidaceae) by *in vitro* Technique". **Ciencia Rural, Santa Maria**. 30(1): 105-111.
- [13] Atichart, P. and Bunnag, S. 2007. "Polyploid Induction in *Dendrobium secundum* (Bl.)Lindl. By *in vitro* Technique". **Thai Journal of Agriculture Science**. 40(1-2): 91-95.
- [14] Kim, M. S., Kim, J. Y. and Eun, J. S. 2003. "Chromosome doubling of a cymbidium hybrid with colchicine treatment in meristem culture". **Proceedings of NIOC 2003, Nagoya, Japan**. 37-40.