



ผลของระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับสารโคลชิซิน
ต่ออัตราการรอดชีวิตและลักษณะเซลล์ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องคำ
(*Dendrobium chrysotoxum* Lindl.)

Effect of Concentration and Duration of Colchicine
on Survival Rate and Cell Characteristic of
Dendrobium chrysotoxum Lindl. Protocorm

พรทิพย์ อติชาติ¹

บทคัดย่อ

ศึกษาการรอดชีวิตและลักษณะเซลล์ของกล้วยไม้เอื้องคำภายหลังการแช่สารละลายโคลชิซิน โดยแช่โปรโตคอร์ม กล้วยไม้ชนิดนี้ในสารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0 0.01 0.02 0.03 0.04 และ 0.05 % เป็นเวลา 1 2 3 4 และ 5 วัน หลังจากนั้นเลี้ยงโปรโตคอร์ม บนอาหารสังเคราะห์สูตร Vacin and Went (1949) เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าอัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน ทุกระดับความเข้มข้นเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และปริมาณคลอโรฟิลล์ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ภายหลังการแช่ในสารละลายโคลชิซินทุกระดับความเข้มข้นเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กันสูงกว่าชุดควบคุม ขนาดเซลล์พารงคิมาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่แช่สารละลายโคลชิซิน 0.03% เป็นเวลา 1 วัน มีขนาดใหญ่ที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 107.77 ± 6.08 ไมโครเมตร โปรโตคอร์มที่แช่สารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.05% เป็นเวลา 2 วัน มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ที่สุด

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

ABSTRACT

This research was conducted to study survival rate and cell characteristic of *Dendrobium chrysotoxum* after treated with colchicine. The protocorms were submerged in various concentrations of colchicines (0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 and 0.05%) for 1, 2, 3, 4 and 5 days. The survival rate, chlorophyll content and size of parenchyma cell were evaluated after two months of the culture on Vacin and Went (1949) medium. It was found that higher concentration of colchicine and longer treatment duration reduced protocorm survival. Chlorophyll content of treated protocorms were higher than the control. The treated protocorms with 0.03% colchicine for 1 day provided the largest parenchyma cell (107.77 ± 6.08 μm in diameter). Whereas the largest size of parenchymatous nucleus could be observed when protocorms were treated with 0.05% colchicine for 2 days.

คำสำคัญ: กล้วยไม้ เอื้องคำ โคลชิซิน อัตราการรอดชีวิต

Keywords: Orchid, *Dendrobium chrysotoxum*, Colchicine, Survival rate

บทนำ

กล้วยไม้ เอื้องคำ (*Dendrobium chrysotoxum*) เป็นกล้วยไม้พื้นเมืองที่มีสีสันสวยงาม แต่ขนาดของดอกยังมีขนาดเล็ก 3.5 ถึง 4.5 เซนติเมตร. การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เอื้องคำให้มีขนาดดอกใหญ่ขึ้น จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ การศึกษาการเกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้โดยใช้สารโคลชิซิน เป็นแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ให้มีขนาดดอกใหญ่ขึ้น เนื่องจากโคลชิซินเป็นสารอัลคาลอยด์ที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยทำหน้าที่ขัดขวางการแบ่งเซลล์และยับยั้งการสร้างสปินเดิลไฟเบอร์ จึงทำให้โครโมโซมไม่ถูกดึงไปยังขั้วทั้งสองของเซลล์ มีผลทำให้โครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (อัมรา, 2540) ถึงแม้ว่าโคลชิซินจะมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ได้ในพืชหลายชนิด แต่ก็เป็นการที่มีผลต่อเนื้อเยื่อของพืช ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาอัตราความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาที่โปรโทคอร์มกล้วย

ไม้เอื้องคำได้รับสารละลายโคลชิซินที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิต ลักษณะทางกายวิภาค และปริมาณคลอโรฟิลล์ของกล้วยไม้

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. นำโปรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องคำที่ได้จากการเพาะเมล็ด มีอายุ 2 เดือนมาแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0 0.01 0.02 0.03 0.04 และ 0.05% เป็นระยะเวลา 1 2 3 4 และ 5 วัน ตามลำดับ หลังจากแช่โปรโทคอร์มกล้วยไม้ในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ กันแล้ว ล้างโปรโทคอร์มด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับปอดเชื้อ แล้วนำโปรโทคอร์มไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสังเคราะห์สูตร VW (1949) ดัดแปลงที่ไม่มีสารโคลชิซิน เลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสงประมาณ $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน ทำการทดลองแบบ factorial in CRD มีทั้งหมด 30 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 10 ซ้ำ

2. บันทึกอัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องคำ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารโคลชิซิน เป็นเวลา 2 เดือน

3. วัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในโพโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องคำโดยดัดแปลงวิธีของ Arnon (1959) ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

4. ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของกล้วยไม้ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน โดยตัดตามขวางของโพโทคอร์ม นำไปย้อมด้วยสี safranin o วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์พาเรงคิมาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า โดยวัด 10 เซลล์ต่อสไลด์ และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางนิวเคลียสโดยย้อมสีโพโทคอร์มด้วย 45% aceto-orcein เป็นเวลา 30 นาที ขับสีส่วนเกินออก วัดความกว้างและความยาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า จำนวน 10 เซลล์ต่อสไลด์

5. วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละหน่วยทดลองด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 13

ผลการศึกษา

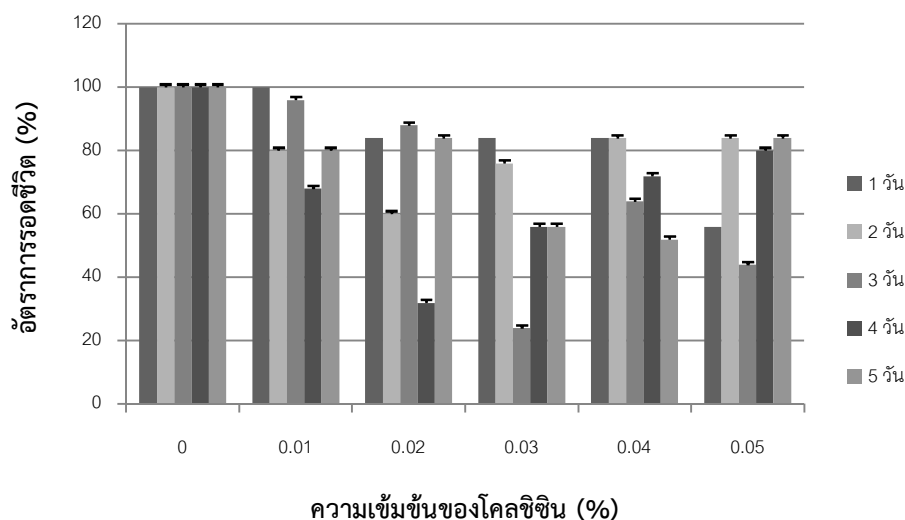
จากการแช่โพโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องคำในสารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ กันเมื่อนำโพโทคอร์มกล้วยไม้ที่ผ่านการแช่สารละลายโคลชิซินมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW (1949) ดัดแปลงเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าเมื่อแช่โพโทคอร์มกล้วยไม้ ในความเข้มข้นที่สูงขึ้น และระยะเวลาในการแช่นานขึ้น มีผลทำให้กล้วยไม้มีอัตราการรอดชีวิตลดลงแตกต่างจากกล้วยไม้ที่ไม่ได้แช่สารอย่างมีระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น

95% โดยอัตราการรอดชีวิตของโพโทคอร์มกล้วยไม้จะลดลงเมื่อแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลาในการแช่นานขึ้น (รูปที่ 1) และโพโทคอร์มกล้วยไม้ที่ได้รับสารจะมีสีซีดลงเนื่องจากขาดคลอโรฟิลล์ และตายในที่สุด เนื้อเยื่อกล้วยไม้จะมีลักษณะช้ำน้ำและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (รูปที่ 2)

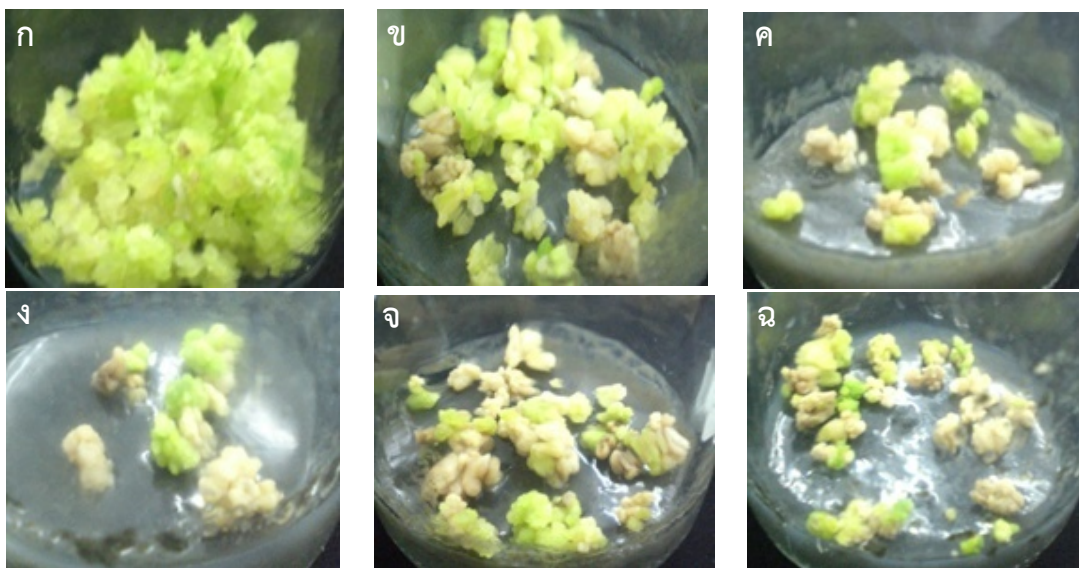
จากการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์รวมจากโพโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องคำ พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ของกล้วยไม้ที่ผ่านการแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินทุกระดับความเข้มข้นไม่แตกต่างกับปริมาณคลอโรฟิลล์รวมของกล้วยไม้ที่ไม่ได้แช่สาร แต่จากการทดลองพบว่าโพโทคอร์มที่แช่ในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.05% เป็นเวลา 2 วันจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์มากที่สุด (รูปที่ 3)

จากการศึกษาขนาดเซลล์พาเรงคิมาของกล้วยไม้เอื้องคำที่แช่ในสารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0 0.01 0.02 0.03 0.04 และ 0.05% เป็นเวลา 1 วัน และเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร VW (1949) ดัดแปลงเป็นเวลา 6 เดือน วัดขนาดเซลล์พาเรงคิมาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า โดยวัด 10 เซลล์ต่อสไลด์ จากการศึกษาขนาดเซลล์ของโพโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องคำที่แช่สารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.03% เป็นเวลา 1 วัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากกลุ่มอื่นๆ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 107.77 ± 6.08 ไมโครเมตร (รูปที่ 4) (ข้อมูลไม่ได้นำเสนอ)

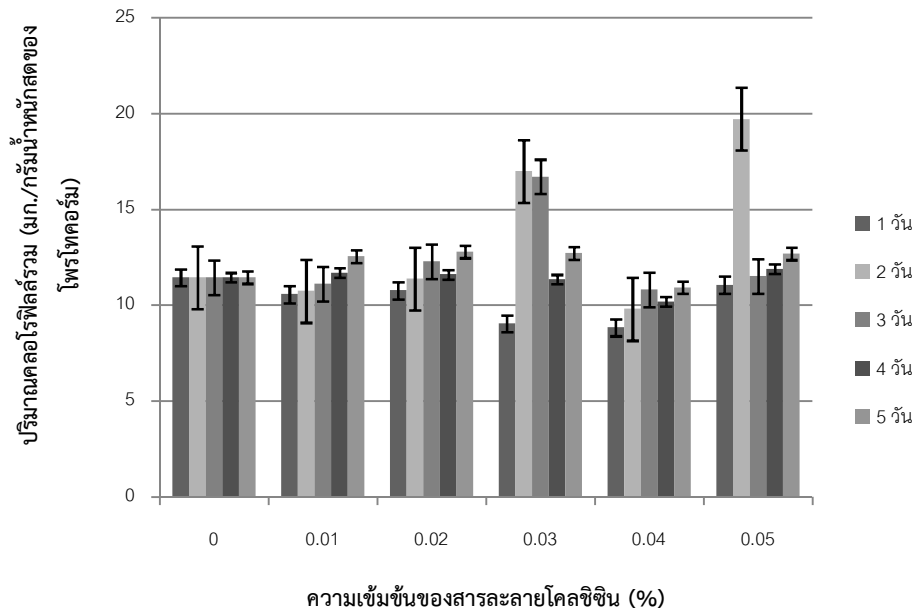
จากการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกของโพโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องคำที่แช่ในสารละลายโคลชิซินกับกลุ่มควบคุมพบว่าโพโทคอร์มที่แช่ในสารละลายโคลชิซินแล้วเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลา 6 เดือน มีขนาดใหญ่ขึ้น (รูปที่ 5)



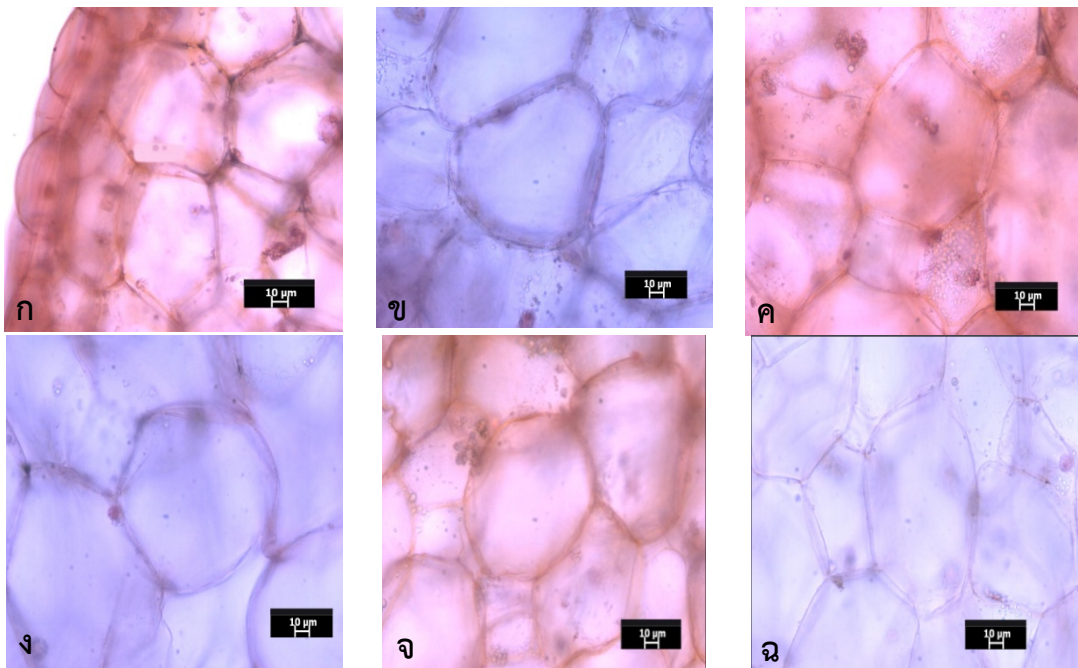
รูปที่ 1 อัตราการรอดชีวิตของโปรโทคอร์มกล้ายไม้เื้องคำที่ได้รับการแช่ด้วยสารละลายโคลิซินระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ กัน



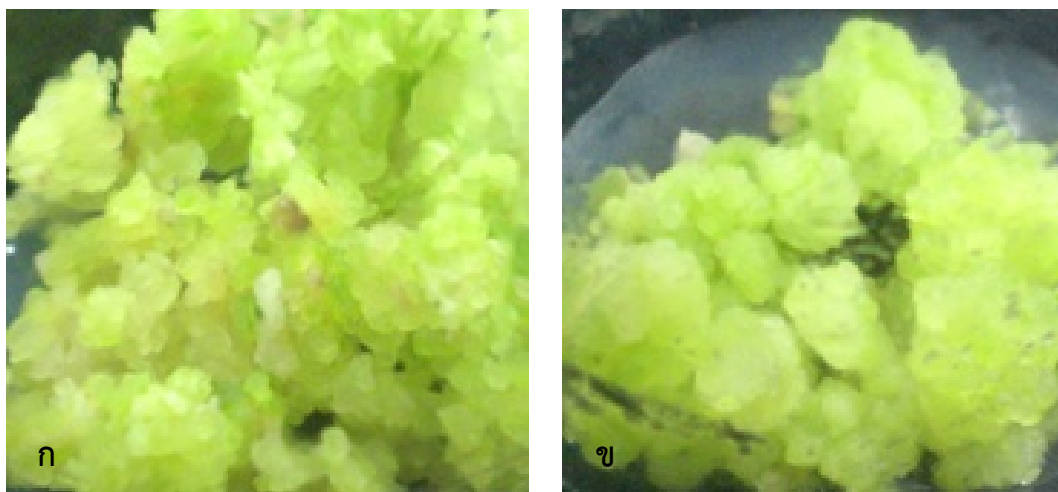
รูปที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของโปรโทคอร์มกล้ายไม้เื้องคำภายหลังการแช่ด้วย สารละลายโคลิซินเป็นเวลา 5 วัน ที่ระดับความเข้มข้น (ก) 0% (ข) 0.01% (ค) 0.02% (ง) 0.03% (จ) 0.04% (ฉ) 0.05% ตามลำดับ ตรวจสอบภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ดัดแปลงที่ปราศจากสารละลายโคลิซินเป็นเวลา 3 เดือน



รูปที่ 3 ปริมาณคลอโรฟิลล์ในโปรโททอร์มกล้วยไม้เอื้องคำที่ได้รับการแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ กัน



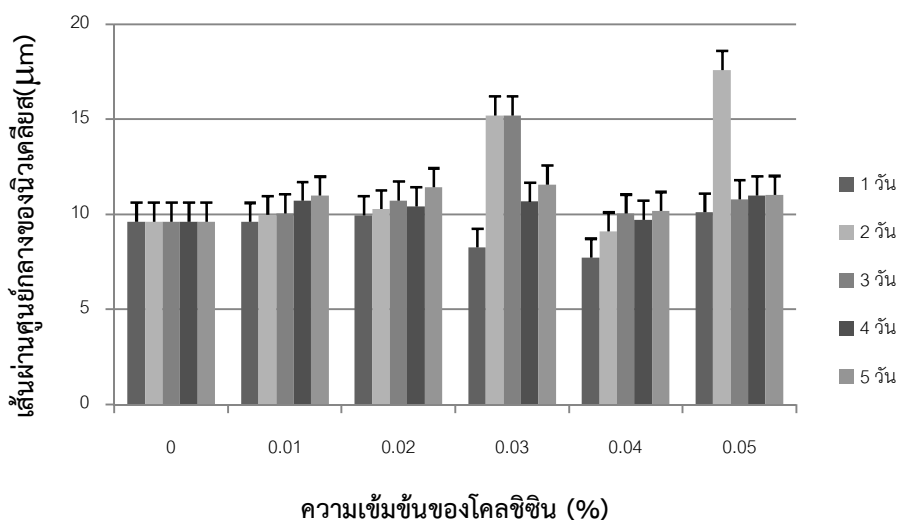
รูปที่ 4 เซลล์พาเร็นคิมาจากโปรโททอร์มกล้วยไม้เอื้องคำที่ได้จากการแช่โปรโททอร์ม 1 วันในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น (ก) 0% (ข) 0.01% (ค) 0.02 % (ง) 0.03 % (จ) 0.04% (ฉ) 0.05 % ตรวจสอบภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เป็นเวลา 6 เดือน



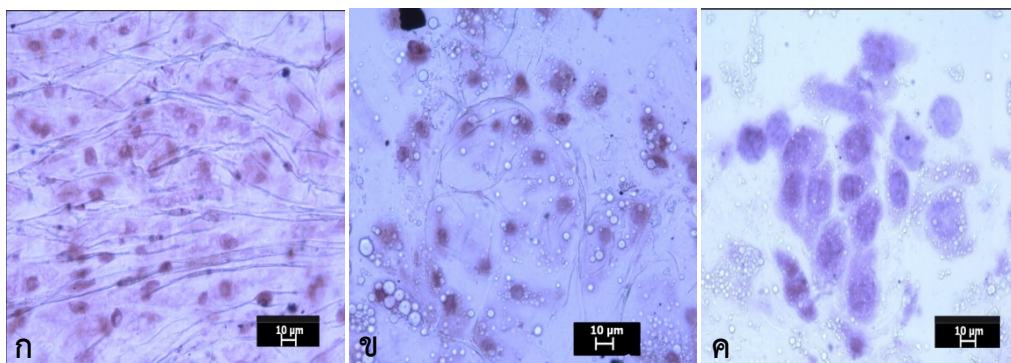
รูปที่ 5 รูปร่างของโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องคำ (ก) กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (ข) โพรโทคอร์มที่ได้รับการแช่ในสารละลายโคลชิซินภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เป็นเวลา 6 เดือน

จากการศึกษาขนาดนิวเคลียสของกล้วยไม้เอื้องคำที่แช่ในสารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.01-0.05% เป็นเวลา 1-5 วัน พบว่าขนาดของนิวเคลียสจากโพรโทคอร์มที่แช่ในสารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.05% เป็นเวลา 2 วัน มีความ

แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับขนาดนิวเคลียสที่แช่ในสารละลายโคลชิซินเป็นเวลา 0 1 3 4 และ 5 วัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยนิวเคลียสมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 17.6 ± 1.56 ไมโครเมตร (รูปที่ 6 และ 7)



รูปที่ 6 ผลของสารละลายโคลชิซินที่มีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางนิวเคลียสของ โพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องคำ



รูปที่ 7 นิวเคลียสของโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องคำภายหลังการแช่เป็นเวลา 2 วัน ในสารละลายโคลชิซิน (ก) 0% (ข) 0.03% (ค) 0.05% ตรวจสอบภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เป็นเวลา 6 เดือน

อภิปรายผล

โพรโทคอร์มกล้วยไม้ที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นสูงชันและระยะเวลาการแช่นานขึ้นจะมีอัตราการรอดชีวิตน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Saratham et al. (2010) ที่รายงานว่า การเพิ่มปริมาณโคลชิซินนั้น มีผลทำให้โพรโทคอร์มของกล้วยไม้เอื้องคำหามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำลงเช่นกัน

โพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องคำที่ผ่านการแช่สารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.03 และ 0.05 % และระยะเวลาที่แช่นาน 2 วันจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์มากขึ้น ขนาดของเซลล์พาราคีมา และขนาดของนิวเคลียสใหญ่กว่าในโพรโทคอร์มกล้วยไม้ที่ไม่แช่สารละลายโคลชิซิน ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Compton et al. (1996); Kuksova et al. (1997); Piheiro et al. (2000); Rose et al. (2000); Shao et al. (2003) พบว่าต้นพืชที่เป็นเตตราพลอยด์ที่ได้จากการชักนำโดยโคลชิซินมีเซลล์ขนาดใหญ่ และมีผลทำให้ทรงต้น รูปทรงใบ และดอกใหญ่ขึ้น ซึ่งพืชที่เป็นโพลีพลอยด์นั้นจะมีรูปร่างลักษณะต่าง ๆ ใหญ่ขึ้นกว่าพืชดิพลอยด์นั้นน่าจะเป็นผลมาจากการที่เซลล์มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้นตามสัดส่วนของโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองในครั้งนี้ สามารถสรุปได้ว่าการแช่โพรโทคอร์มของกล้วยไม้เอื้องคำลงในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.03% เป็นเวลา 1 วัน จะมีผลทำให้เซลล์พาราคีมา มีขนาดใหญ่ที่สุดในขณะที่โพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องคำที่แช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05% เป็นเวลา 2 วัน นั้นกลับมีผลทำให้นิวเคลียสของเซลล์พาราคีมาที่เป็นองค์ประกอบของโพรโทคอร์มนั้นมีขนาดใหญ่ที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินปีงบประมาณ 2552 และขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- อัมรา คัมภีรานนท์. (2540). พันธุศาสตร์ของเซลล์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.
- Aron, D.I. (1959). Copper enzymes in isolating chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant physiology 24: 1-15.

- Compton, M.E., Gray, D.J. and Elmstrom, G.W. (1996). Identification of tetraploid regenerants from cotyledons of diploid watermelon cultured *in vitro*. *Euphytica* 87: 165-172.
- Kuksova, V.B., Piven, N.M. and Gleba, Y.Y. (1997). Somaclonal variation and in vitro induced mutagenesis in grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49: 17-27.
- Pinheiro, A.A., Pozzobon, M.T., Valle, C.B.,Penteado, M.I.O. and Carneiro, V.T.C. (2000). Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizanth* plants using colchicines. *Plant Cell Reports* 19: 274-278.
- Rose, J.B., Kubba, J. and Tobutt, T.R. (2000). Induction of tetraploidy in *Buddleia Globosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 121-125.
- Saratham S., Hegele, M, Tantivivat. S and Nanakorn. M (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.
- Shao, J., Chen C. and Deng, X. (2003). *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 75: 241-246.
- Vacin, E. and Went, F. (1949). Some pH changes in nutrient solution. *Botanical Gazette*. 110; 605-613.

