หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 4

การอภิปรายผลการทดลอง

ผลของสารโคลชิซีนที่มีต่อ callus และ protocorm-like body ของลูกผสม Aranda และ Arachnis

จากการทดลองใช้สารละลายโคลชิซีนเข้มข้นต่าง ๆ กับเนื้อเยื่อลูกผสม Aranda และ Arachnis การตายของเนื้อเยื่อลูกผสมต่างชนิดแตกต่างกัน อาจเนื่องจากคุณสมบัติทางสรีระและพันธุกรรมของลูกผสมต่าง ๆ ไม่เหมือนกัน ปกติในพืชต่าง ๆ มีความทนทานต่อโคลชิซีนไม่เท่ากัน และกล้วยไม้ทนต่อโคลชิซีนมากกว่า (Kloen and Speckmann, 1953; Evan, 1955; Chaiyasut, 1971) ซึ่งด้วยเหตุผลเดียวกันกล้วยไม้ต่างชนิดกันย่อมตอบสนองต่อโคลชิซีนไม่เท่ากัน (Rotor, 1958) จากการทดลองพบว่า Aranda x Wendy Scott 'Blue Bird' และ Aranda x Wendy Scott เมื่อแช่ในสารละลายโคลชิซีน 0.05 และ 0.1% 9 วัน มีการตายของเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันประมาณ 10-15% Aranda x Wendy Scott 'No.2' Aranda x Christine 'No.9' และ Aranda x Christine 'No.80' เมื่อใช้สารละลายโคลชิซีน 0.05% และ 0.1% เวลา 9 วัน เหมือนกัน ปรากฏว่าการตายของเนื้อเยื่อมีเพียง 1-2% เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบดูแล้ว Aranda x Wendy Scott 'No.2' ควรจะตอบสนองต่อโคลชิซีนใกล้เคียงกับ Aranda x Wendy Scott อีก 2 ชนิด เพราะเป็นลูกผสมพวกเดียวกันมากกว่าที่จะไปใกล้เคียงกับ Aranda x Christine ตามผลที่ออกมา อาจเป็นเพราะว่า ในการทดลองครั้งนี้ทำกับ Aranda x Wendy Scott 'No.2' เมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ไม่นาน เนื้อเยื่อจึงแข็งแรงกว่า Aranda ทั้ง 4 ชนิดนั้น ทดลองหลังจากย้ายเนื้อเยื่อแล้วหลายครั้ง สังเกตเห็นว่าเนื้อเยื่อไม่ค่อยแข็งแรงนัก อิทธิพลของสารโคลชิซีนจึงปรากฏให้เห็นชัด และ Aranda x Christine ทนทานต่อโคลชิซีนได้ดีกว่า Aranda x Wendy Scott ดังนั้นจึงมีเพียง Aranda

x Wendy Scott 'Blue Bird' และ Aranda x Wendy Scott เท่านั้น ที่ตายเพราะสารโคลชิซีนมากกว่า Aranda ชนิดอื่น ๆ ส่วน Arachnis hookerana 'luteola' ตายมากที่สุดเมื่อแช่ในสารละลายโคลชิซีน 0.05% 3 วัน เนื้อเยื่อตายไปมากกว่า (95-97%) เมื่อแช่ในสารละลายโคลชิซีน 0.1% (90-95%) ซึ่งควรจะเป็นเพราะเนื้อเยื่อที่ใช้ในการทดลองแข็งแรงไม่เท่ากัน ปกติ Arachnis ไวต่อโคลชิซีนอยู่แล้ว (control ตาย 30-40%) เมื่อเนื้อเยื่อไม่แข็งแรงผลของโคลชิซีนจะเกิดขึ้นมาก เมื่อเปรียบเทียบกับ Aranda ซึ่งผลจากการใช้สารละลายโคลชิซีน 0.05 และ 0.1% เท่ากัน ความแตกต่างที่เกิดขึ้นกับ Arachnis ระหว่างการใช้สารละลายโคลชิซีน 0.05 และ 0.1% ควรจะเนื่องมาจากความแตกต่างของเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่ใช้มากกว่า

การเจริญเป็นต้นและการออกราก

หลังจากแช่ในสารละลายโคลชิซีนแล้วนำเนื้อเยื่อมาเลี้ยงในวุ้นอาหาร พร้อมกับเปรียบเทียบกับ control พบว่า Aranda x Wendy Scott 'Blue Bird' และ Aranda x Wendy Scott ที่เป็น control มีเนื้อเยื่อเหลืองซีด และเจริญช้ากว่าต้นอื่น เมื่อแช่ในสารโคลชิซีนแล้ว การเจริญเป็นต้นจึงยิ่งช้ามากและออกรากช้ากว่าปกติ ควรจะมีการปรับปรุงวุ้นอาหารที่ใช้ให้เหมาะสมขึ้น Aranda x Wendy Scott 'No.2' Aranda x Christine No.9 และ Aranda x Christine 'No.80' ทั้ง control และพวกที่แช่ในโคลชิซีนเจริญเป็นต้นเร็วและมีรากมาก ทันทีที่นำขึ้นมาเลี้ยงบนวุ้นอาหาร แทบจะไม่มีการชงักการเจริญเนื่องจากโคลชิซีนให้สังเกตเห็นได้เลย ส่วน Arachnis hookerana 'luteola' ไม่ชอบวุ้นอาหารชนิดนี้นัก control เจริญช้าอยู่แล้ว พวกที่แช่ในโคลชิซีนยิ่งเจริญช้ามาก การที่กล้วยไม้ทดลองเจริญเร็วไม่เท่ากัน เนื่องมาจากความแตกต่างทางกรรมพันธุ์ของแต่ละต้น Rotor (1958) ทดลองในกล้วยไม้ต่างสกุลกัน พบว่าสารโคลชิซีนมีผลยับยั้งการเจริญของสกุลต่าง ๆ ไม่เท่ากัน Vanda หยุดการเจริญไปนานกว่า (6-10 เดือน) Phalaenopsis, Cymbidium และ Cattleya (2 เดือน) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ Aranda ทั้ง 5 ชนิด จึงมีการเจริญ

ใกล้เคียงกัน ส่วน Arachnis เป็นกล้วยไม้ต่างสกุล ผลจึงต่างกันมาก

การนับโครโมโซมจากปลายราก

การนับโครโมโซมจากปลายรากเป็นการตรวจสอบ polyploid ที่ได้ผลแน่นอนและเป็นที่นิยมในปัจจุบัน มีผู้ทดลองใช้วิธีนับโครโมโซมจากปลายรากก่อนหน้านี้มากมาย ตัวอย่างเช่น Menninger (1963) นับโครโมโซมจากปลายรากของ Cymbidium (2n = 40) Wimber & Van Cott (1967) ทดลองกับลูกผสม Cymbidium (2n = 40) Sanguthai et al., (1973) นับโครโมโซมของ Dendrobium (2n = 57) Sanguthai & Sagawa (1973) นับโครโมโซมของ Vanda (2n = 38, 57) กัญญา ไชยเจริญ (2516) ทดลองกับ Dendrobium (2n = 38, 57, 95) Heinz & Mee (1970) ทดลองกับอ้อย (2n = 112) และ Ackerman and Dermen ทดลองกับ Camellia (2n = 30) ในการทดลองครั้งนี้ได้ตรวจสอบ polyploid ที่เกิดจากการใช้สารโคลชิซีนกับ callus และ plb. ของลูกผสม Aranda และ Arachnis โดยวิธีนับโครโมโซมจากปลายราก

จากผลการนับโครโมโซมของ Aranda ทั้ง 5 ชนิด และ Arachnis 1 ชนิด ดังตารางที่ 9 เห็นได้ว่าไม่พบพวกที่มีจำนวนโครโมโซมสูงกว่า tetraploid และ aneuploid เลย การใช้โคลชิซีนเข้มข้นกว่าทำให้เกิด polyploid มากกว่า Aranda x Wendy Scott ทั้ง 3 ชนิด เกิดเป็น polyploid น้อย แสดงว่าลูกผสมพวกนี้ทนทานต่อสารโคลชิซีนได้ดี ควรจะใช้ความเข้มข้นมากกว่านี้หรือใช้เวลานานกว่านี้ ส่วน Aranda x Christine 'No.80' มีเปอร์เซนต์ tetraploidสูงแสดงว่าความเข้มข้นของโคลชิซีนและเวลาที่ใช้เหมาะกับกล้วยไม้ชนิดนี้ เปรียบเทียบกับที่ Sanguthai et al., (1973) ทดลองกับ Den x Uniwai Crystal (2n = 57) ใช้โคลชิซีน 0.05, 0.1 และ 0.15% พบว่าโคลชิซีน 0.1% ให้ผลดีที่สุด ได้ hexaploid 50% และพบ mixoploid มาก Sanguthai & Sagawa (1973) ใช้โคลชิซีน 0.1% กับ Vanda x Kuniko Sugihara 'Hilo' (2n = 38) ได้ tetraploid 29.8% และ Vanda x Patricia Low 'Lynda' (2n = 57) ได้ hexaploid 28.6%

แสดงว่า Vanda เมื่อได้รับโคลชิซีนเกิดเป็น polyploid ได้น้อยกว่า Dendrobium Aranda ซึ่งเป็นลูกผสมของ Vanda ก็คงจะทนต่อสารโคลชิซีนเช่นเดียวกัน ในการทดลองครั้งนี้ไม่พบพวกที่มีจำนวนโครโมโซมสูงกว่า tetraploid และ aneuploid เลย พบ mixoploid เพียงเล็กน้อย แสดงว่ากล้วยไม้ชนิดนี้ไวต่อการเสียสมดุลย์ของ gene มาก พวกที่เป็น mixoploid aneuploid และมีระดับ polyploid สูง จึงไม่สามารถเจริญเป็นต้นได้หรือเจริญเป็นต้นแล้วตายไปก่อนที่จะสามารถนำมานับโครโมโซม (Murashige and Nakano, 1967) กัญญา ไชยเจริญ (2516) ทดลองใช้โคลชิซีน 0.05 และ 0.2% กับ Dendrobium พวกที่เป็น diploid เกิดเป็น tetraploid มาก (63.07%) และพบ octoploid ถึง 20.77% แสดงว่า Dendrobium สามารถดำรงชีวิตอยู่เมื่อมีจำนวนโครโมโซมสูงได้ดีกว่า Aranda

Aranda x Christine 'No.9" เมื่อใช้สารละลายโคลชิซีน 0.05 และ 0.1% นับโครโมโซมแล้วพบว่าเป็น tetraploid และ near tetraploid ถึง 100% เมื่อนับโครโมโซมจาก control ที่เลี้ยงเนื้อเยื่อมาพร้อมกันก็เป็น tetraploid ทั้งหมดเช่นกัน จึงนับโครโมโซมจากต้นที่ปลูกอยู่เดิมที่เรือนต้นไม้ ปรากฏว่าเป็น diploid ทั้งหมด แสดงว่าเนื้อเยื่อเกิดเป็น polyploid ขึ้นเองโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Bertch, 1967; Demoise & Pertanen, 1969; Murashige & Nakano, 1967; Kao et al., 1970, กัญญา ไชยเจริญ, 2516) เมื่อนำเนื้อเยื่อมาเลี้ยงต่อไป callus ก้อนที่นำไปเป็น control เป็น tetraploid อยู่แล้ว ส่วน callus อื่น ๆ ที่นำไปแช่ในสารโคลชิซีนอาจมีบางส่วนเป็น diploid บ้าง เมื่อแช่ในโคลชิซีนก็กลายเป็น tetraploid หมด โดยเปรียบเทียบกับ Aranda x Christine 'No.80' ซึ่งเป็นลูกผสมที่คล้ายกัน เมื่อเริ่มต้นจาก diploid เกิดเป็น tetraploid มาก ส่วนเนื้อเยื่อที่เป็น tetraploid เมื่อแช่ในโคลชิซีนแล้วก็พบแต่ tetraploid ดังเดิม เพราะพวกที่มีจำนวนโครโมโซมสูงกว่านี้ตายไปหมด

Arachnis hookerana 'luteola' เมื่อใช้สารโคลชิซีน 0.05% เป็น tetraploid 60% จากการใช้โคลชิซีน 0.1% เป็น tetraploid 66.7% (ตารางที่ 9) พวกที่ใช้โคลชิซีนเข้มข้นกว่าเกิด tetraploid มากกว่าเล็กน้อย แต่ไม่ชัดเจน กล้วยไม้ชนิดนี้ตายมากเจริญเป็น

ต้นน้อย นับโครโมโซมได้น้อย จึงไม่เห็นความแตกต่างชัดเจนนัก control เกิด near tetraploid 1 ต้น (20%) ซึ่งเกิดเองจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับ Aranda x Christine 'No.9' แต่เกิดน้อยกว่า

จากการเปรียบเทียบการทดลองครั้งนี้กับ Wimber & Van Cott (1967) ทดลองกับ Cymbidium Sanguthai et al., (1973) ทดลองกับ Dendrobium Sanguthai & Sagawa (1973) ทดลองกับ Vanda และ กัญญา ไชยเจริญ (2516) ทดลองกับ Dendrobium ผู้ทดลอง 3 คนแรก ใช้สารโคลชิซีนใส่ในอาหารเหลว พบ mixoploid จำนวนมาก กัญญา ไชยเจริญ ใช้วิธีเดียวกับการทดลองนี้ คือสารละลายโคลชิซีนในน้ำกลั่นซึ่งพบ mixoploid น้อย การที่เนื้อเยื่ออยู่ในน้ำกลั่นนาน ๆ ทำให้ขาดธาตุอาหาร และสารที่จำเป็นในการเคลื่อนที่ของโครโมโซม อำนาจของโคลชิซีนที่ทำให้โครโมโซมเคลื่อนที่น้อยลงจึงแสดงได้ชัดขึ้นทำให้เซลส่วนใหญ่เป็น tetraploid ซึ่งทำให้โอกาสที่จะเกิด mixoploid จาก chimera ของ callus และ plb. จึงน้อยลง ส่วนการที่ กัญญา ไชยเจริญ พบ mixoploid มากกว่าการทดลองครั้งนี้เล็กน้อยเนื่องมาจากความแตกต่างของกล้วยไม้ 2 ชนิด ซึ่งสามารถดำรงชีวิตอยู่เมื่อเป็น mixoploid ไม่เท่ากัน

การทดลองครั้งนี้นับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก ซึ่งรากของกล้วยไม้เป็น adventitious root เจริญมาจาก pith ray (Esau, 1953) จากการทดลองของ Satina & Blakeslee (1951) ซึ่งศึกษา Datura stramonium พบว่า shoot apex และ floral apex ประกอบด้วยเซล 3 ชั้น นับจากข้างนอกเข้ามาเป็น LI LII และ LIII ตามลำดับ L I เจริญไปเป็น epidermis, L II เจริญไปเป็นใบ กลีบเลี้ยง กลีบดอก L III เจริญเป็นreproductive organ Dermen (1947) ศึกษา periclinal chimera ของ cranberry พบว่า L I เจริญเป็น epidermis L II เจริญเป็น cortex microsporogenous tissue และ megasporocyte ส่วน L III เจริญเป็น cortex ชั้นใน stele และ pith ในกล้วยไม้ยังไม่มีผู้ใดศึกษาว่าชั้นใดเจริญไปเป็นส่วนใด แต่ถ้าเหมือนกับการทดลองของ Dermen รากเจริญมาจาก L III การนับโครโมโซมจากปลายรากจึงเป็นการนับโครโมโซม

ของ L III การทดลองทั้งสองเหมือนกันคือ L I เจริญเป็น epidermis ส่วน reproductive organ เจริญมาจาก L II หรือ L III ก็ได้ Ackerman & Dermen (1972) ศึกษา periclinal chimera ของ Camellia โดยศึกษาจากกิ่งที่เป็น 2-4-4 chimera จากการใช้โคลชิซีน พบว่านับโครโมโซมจากปลายรากเป็น tetraploid และ pollen ก็เป็น tetraploid ด้วย เพราะทั้ง L II และ L III เป็น tetraploid การนับโครโมโซมในการทดลองครั้งนี้ ต้นที่เป็น tetraploid อาจเป็น chimera ได้ ดังเช่นต้น Aranda x Wendy Scott 'Blue Bird' 1 ต้น (รูปที่ 3) และ Aranda x Christine 'No.9' 1 ต้น มีจำนวนโครโมโซมจากปลายรากเป็นtetraploid แต่ต้นมีลักษณะผิดไปจาก tetraploid อื่น ๆ คือ ใบหนา ผิวใบย่น และมีข้อสั้นมาก ซึ่งอาจเป็นได้ว่ารากเป็น tetraploid แต่ต้นมีจำนวนโครโมโซมสูงกว่านี้ ดังนั้นทำให้ยืนยันไม่ได้ว่าต้น tetraploid ที่ได้จากการทดลองนี้จะมี reproductive organเป็น tetraploid ด้วย

Aranda ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นหมันเนื่องจากเป็นลูกผสมข้ามสกุล มี genome 2 ชุดที่ต่างกัน (AV) ดังนั้นต้นที่ได้จากการแช่ในโคลชิซีน ที่นับโครโมโซมจากปลายรากได้เป็น tetraploid ถ้ามี reproductive organ เป็น tetraploid ด้วย ก็จะทำให้การผสมพันธุ์ดีขึ้น เนื่องจากกลายเป็น amphidiploid (AAVV) เหมือนกับที่ Ackerman & Dermen (1972) ทดลองกับลูกผสมข้าม species ของ Camellia พบว่าเรณูของต้นที่เป็น tetraploid มี fertility ดี ถึง 77% โดยที่ control ซึ่งเป็น diploid มีเพียง 5% เท่านั้น ส่วน Arachnis ซึ่งเดิมโครโมโซมสามารถจับคู่ได้ดีอยู่แล้ว เพราะมี genome ทั้ง 2 ชุดเหมือนกัน (AA) เมื่อกลายเป็น autotetraploid (AAAA) การจับคู่ของโครโมโซมจะไม่เป็น bivalent ตามปกติ ทำให้ไม่สามารถแบ่งตัวแบบไมโอซิสได้ดี การสร้าง gamete ไม่ดีดังเดิม ดังนั้นจะมี fertility ลดลง

ปกติจำนวนดอกใน 1 ช่อ ของ Aranda มักจะน้อยเมื่อสร้างให้เกิดเป็น polyploid ซึ่งมีลักษณะดอกดีขึ้น แต่คงไม่สามารถแก้ปัญหานี้ได้ ถ้าใช้ Aranda ที่เป็น amphidiploid ผสมกับ Vanda ที่มีจำนวนดอกใน 1 ช่อมาก ลูกที่ได้จะเป็น triploid (AVV) ซึ่งมี genome

1 ชุด เป็นของ Arachnis และ 2 ชุด เป็นของ Vanda ควรจะมีลักษณะดอกดี สีสวย จำนวนดอกใน 1 ช่อ มากขึ้น และน่าจะเลี้ยงในที่แดดจัดได้เช่น Aranda ที่เป็น diploid อื่น ๆ ซึ่งเป็นการปรับปรุงพันธุ์ Aranda ที่ดี

การวัดความกว้าง ยาว ของ guard cell และความหนาของใบ

จากการวัดความกว้าง ยาว ของ guard cell ที่เป็น diploid และ tetraploid เปรียบเทียบกัน พบว่ามักจะไม่แตกต่างกันหรือต่างกันในระดับความเชื่อมั่นเพียง 80% ซึ่งถือว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ Aranda x Wendy Scott 'No.2' Aranda x Wendy Scott 'Blue Bird' Aranda x Wendy Scott และ Arachnis hookerana 'luteola' จึงถือได้ว่ามีความกว้าง ยาว ของคู่ guard cell ของ diploid และ tetraploid ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วน Aranda x Christine 'No.80' มีความกว้างของคู่ guard cell ไม่ต่างกัน แต่ความยาวของ guard cell ต่างกันในระดับความเชื่อมั่นถึง 99% เปรียบเทียบกับที่ Wimber & Van Cott (1967) ทดลองกับ Cymbidium และ กัญญา ไชยเจริญ (2516) ทดลองกับ Dendrobium พบว่า guard cell ของ tetraploid ใหญ่กว่า diploid แต่การทดลองทั้งสองนี้ก็พบ guard cell ของ diploid ที่มีขนาดใกล้เคียงกับ tetraploid ซึ่ง Wimber & Van Cott ให้เหตุผลว่าเป็น mixoploid แต่การทดลองครั้งนี้พบว่า guard cell ของ diploid และ tetraploid เท่ากัน เป็นส่วนมากเกินกว่าที่จะเชื่อว่าเป็น mixoploid ได้ ตามปกติการวัด guard cell สามารถใช้คัดเลือก polyploid ในขั้นแรกได้ ดังเช่น Dermen (1947) ใช้ตรวจสอบ periclinal chimera ของ cranberry การที่การทดลองครั้งนี้ได้ผลต่างจากการทดลองอื่น ๆ อาจเนื่องมาจาก guard cell ของ Aranda และ Arachnis ต่างจากพืชอื่นแต่ Aranda x Christine 'No.80' มี guard cell ของ diploid และ tetraploid ที่ต่างกันมาก ทำให้เชื่อได้ว่า guard cell ของ diploid และ tetraploid ของ Aranda ก็มีความแตกต่างกัน แต่ว่าการทดลองครั้งนี้ใช้กล้วยไม้ที่ยังเล็กเกินไป และต้นที่นำมาวัด guard cell ก็มีน้อยไปเพียง 5 ต้น เท่านั้น เนื่อง

มาจากกล้วยไม้ที่ได้จากการทดลองยังเล็กไม่สามารถคัดเลือกต้นที่โตพอ และมีขนาดใกล้เคียงกันมาทดลองได้มากกว่านี้ ทำให้ผลความแตกต่างที่เกิดขึ้นไม่ชัดเจน

ความหนาของใบของ Aranda x Wendy Scott 'No.2' Aranda x Wendy Scott และ Arachnis hookerana 'luteola' ที่เป็น diploid และ tetraploid ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ Aranda x Wendy Scott 'Blue Bird' ต่างกันในระดับความเชื่อมั่น 90% Aranda x Christine 'No.80' ต่างกันในระดับความเชื่อมั่น 99% ซึ่งการทดลองวัดความหนาของใบนี้เคยมีแต่ที่ กัญญา ไชยเจริญ (2516) ทดลองกับ Dendrobium รายงานว่าถ้าวัดความหนาของใบจากต้นที่ยังไม่โตเต็มที่จะไม่พบความแตกต่างระหว่าง diploid กับ tetraploid แต่ถ้าวัดจากต้นที่โตเต็มที่แล้วใบของ tetraploid จะหนากว่า diploid การทดลองครั้งนี้ต้นที่วัดก็ยังไม่โตนัก ผลที่ได้จึงมีทั้งต่างกันและไม่ต่างกัน Aranda x Christine 'No.80' มีความหนาของใบและขนาดของ guard cell ของ diploid และ tetraploid ต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งกล้วยไม้ชนิดนี้แม้ว่าจะใช้เวลาเลี้ยงเท่ากับชนิดอื่น แต่โตเร็วกว่ามาก ขณะที่วัดจึงมีต้นโตกว่าชนิดอื่น

Aranda x Christine 'No.9' วัดความกว้าง ยาว ของ guard cell และความหนาของใบของ tetraploid อย่างเดียว เพราะ diploid มีแต่ต้นที่เลี้ยงในเรือนต้นไม้ซึ่งโตมากแล้ว ไม่สามารถนำไปเปรียบเทียบกับต้น tetraploid ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อได้