หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

Arachnis เป็นกล้วยไม้พวกกิ่งโดด (monopodial orchid) มีความสัมพันธ์กับสกุล Renanthera มาก มีประมาณ 15 species ถิ่นกำเนิดกระจายอยู่ในอินโดจีน ตั้งแต่พม่า ถึง มาเลย์เซีย ลำต้นยาวเกาะกิ่งไม้หรือหิน มีดอกมาก ขนาดกลีบดอกและกลีบเลี้ยงใกล้เคียงกัน ลักษณะกลีบแคบ ยาว ม้วนตามขอบ ขึ้นในที่แดดจัด (Holttum, 1953)

Aranda คือ ลูกผสมข้ามสกุลระหว่าง Arachnis กับ Vanda เป็นลูกผสมที่แข็งแรงมาก ให้ดอกดก สีคล้าย Vanda ที่ใช้ผสม ดอกคล้าย Arachnis แต่กลีบดอกกว้างกว่าเล็กน้อย ชอบแดดจัด และทนทานต่อโรคได้ดี แต่มักเป็นหมัน ดังนั้นการผสมพันธุ์เพื่อปรับปรุงต่อไปจึงทำได้ยาก (Holttum, 1953; Sheehan, 1972)

กล้วยไม้ทั้งสองสกุลนี้ เป็นไม้ตัดดอกที่แพร่หลายมากในสิงคโปร์และมาเลย์เซีย บัดนี้มีผู้นำเข้ามาปลูกในประเทศไทย และได้ผลดี ซึ่งดอกกล้วยไม้ประเภทนี้เริ่มเป็นสินค้าออกเพิ่มขึ้นจาก Dendrobium x Pompadour และกำลังเพิ่มขึ้นทุกปี การเลี้ยงกล้วยไม้เพื่อการค้าจำเป็นต้องคัดเลือกพันธุ์ที่ดีคือ มีดอกใหญ่ รูปร่างดอกสวย สีสวย ช่อดอกยาว ดอกดก และก้านดอกแข็งแรง ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้มักพบในพวกที่เป็น polyploid (Emsweller & Ruttle 1941; Wimber, 1968; Kamemoto et al., 1972; กัญญา ไชยเจริญ, 2516)

พืชที่เป็นลูกผสมข้ามสกุลทั้งหลาย มักจะมีปัญหาเกี่ยวกับความสามารถในการผสมพันธุ์ต่อไป เนื่องจากโครโมโซมทั้ง 2 ชุด ที่ได้จากพ่อและแม่ต่างกันมาก เช่น Aranda มีโครโมโซมชุดหนึ่งจาก Arachnis (A) และอีกชุดหนึ่งจาก Vanda (V) จึงมีชุดของโครโมโซมเป็น AV เวลาเกิด ไมโอซีส โครโมโซมขาดคู่ที่แท้จริง จึงมีปัญหาเกี่ยวกับ synapsis เป็นเหตุให้การสร้าง gametes ผิดปกติไปมาก การเพิ่มจำนวนของโครโมโซมเป็น 2 เท่า จะช่วยแก้

ปัญหานี้ได้เพราะจะมีชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น polyploid ชนิด amphidiploid (AAVV) ดังนั้น synapsis ในไมโอซีส จะมี bivalent มาก จึงสามารถมี gametes ที่ปกติได้มาก ผลคือการผสมพันธุ์ดีขึ้น (Emsweller & Ruttle, 1941; Ackerman & Dermen, 1972)

การวิจัยครั้งนี้เป็นความพยายามที่จะสร้าง polyploid เพื่อให้ได้กล้วยไม้ที่มีลักษณะดี มีความสามารถในการผสมพันธุ์ดีขึ้น เหมาะสำหรับคัดเลือกเพื่อผสมพันธุ์ใหม่ ๆ มาปลูกเพื่อใช้เป็นไม้ตัดดอกที่ดีต่อไป

การสำรวจและวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องที่ได้ทำมาแล้ว

Polyploid เกิดขึ้นได้หลายวิธี ซึ่งมีรายงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

1. การเกิด polyploid ในธรรมชาติ Burnham (1962) ได้รายงานเกี่ยวกับ polyploid ที่เกิดขึ้นในธรรมชาติคือ Zea mays (Beadle, 1930, 1933) Datura (Bergner et al., 1934) Gossypium (Beasley, 1942) และ Triticum vulgare (Lutal, 1945) Vajrabhaya and Randolph (1961) พบว่าลูกผสมของ Dendrobium ชนิดต่าง ๆ เกิดเป็น polyploid ได้ เนื่องจากเกิด unreduced gamete หรือเกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น 2 เท่า ในระยะ early embryony

2. เกิดจากการขยายพันธุ์ด้วยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ต้นที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นได้ (Bertsch, 1967) โดยที่จำนวนโครโมโซมใน callus จะต่างกันออกไปในแต่ละเซล (Torrey et al., 1967) และอาจเกิด aneuploid ขึ้นได้ (Heinz et al., 1969) เซลที่กลายเป็น tetraploid เมื่อแบ่งตัวเจริญเป็นต้นจะกลายเป็นต้น tetraploid ต่อไป Murashige and Nakano (1967) เลี้ยงเนื้อเยื่อของ Nicotiana tabacum หลังจากเลี้ยงไปได้ 1 ปี จะพบแต่เซลที่เป็น polyploid คือมี tetraploid และ octoploid ประมาณครึ่งหนึ่ง อีกครึ่งหนึ่งเป็น aneuploid ที่เป็น subtetraploid และเมื่อเลี้ยงไปอีก 6 ปี พบว่ามีแต่เซล aneuploid ที่เป็น hyper-

tetraploid เท่านั้น Hof (1969) รายงานว่า callus ของ Pisum sativum 'Alaska' มีเซลที่เป็น polyploid ถ้าเลี้ยงด้วยอาหารที่ใส่ kinetin Demoise & Partanen (1969) เลี้ยงเนื้อเยื่อของ Paeonia suffruticosa ในวุ้นอาหารและอาหารเหลว พบว่าในอาหารเหลวมีเปอร์เซนต์ tetraploid สูงกว่า Kao et al. (1970) เลี้ยงเนื้อเยื่อของ Triticum monococcum (2n = 14) Triticum aestivum (2n = 42) และ Glycine max (2n = 40) พบว่ามีแต่เซลที่มีจำนวนโครโมโซมต่างจากเดิมมาก และลักษณะของโครโมโซมก็ผิดปกติไป ส่วน Haplopappus gracilis (2n = 4) ยังคงมีจำนวนและลักษณะของโครโมโซมเหมือนเดิม แสดงว่าพืชที่มีโครโมโซมมาก มีความสามารถในการดำรงชีวิตของเซลได้ ถึงแม้ว่าเสียสมดุลย์ของ gene ไปบ้าง ส่วนพวกที่มีโครโมโซมน้อย เมื่อเสียสมดุลย์ของ gene มีผลกระทบกระเทือนมาก ทำให้มันไม่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ จึงเหลือแต่เซลที่เป็นปกติเท่านั้น กัญญา ไชยเจริญ (2516) รายงานจากการถามส่วนตัวว่า ศาสตราจารย์ถาวร วัชราภัย เลี้ยงเนื้อเยื่อของ Dendrobium x May Neal 'Srisobhon' พบต้นที่เป็น tetraploid (2n = 76) และ aneuploid (2n = 77) และ (Den. x Lady Hamilton x Den. x May Neal) ซึ่งเป็น triploid เมื่อนับโครโมโซมของต้นที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าบางต้นเป็น hexaploid

3. เกิดจากการสร้างขึ้น มีหลายวิธีที่สามารถชักนำให้เกิด polyploid ขึ้นได้ เช่น การใช้อุณหภูมิสูงและต่ำ แต่เกิดผลน้อยมาก (Randolph, 1932; Burnham, 1962) Avery (1937) รายงานว่า Nemec ได้ทดลองใช้สารเคมีพวก chloral hydrate และยาเสพติดอื่น ๆ เพื่อชักนำให้เซลของรากมีโครโมโซม เพิ่มเป็น 2 เท่าได้ Burnham (1962) รายงานว่า Kostoff et al. ได้ใช้สาร acenaphthene กับต้นอ่อนของหญ้า พบว่าทำให้รากและใบผิดปกติ

สารเคมีที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการชักนำให้เกิด polyploid คือ โคลชิซีน ($C_{12}H_{25}O_6N$)(Blakeslee, 1938) Wellensick (1939) เป็นผู้เริ่มต้นใช้สารโคลชิซีนเป็นตัวชักนำให้เกิด polyploid ในพืช สารโคลชิซีนจะเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น 2 เท่า

โดยไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในโครโมโซม เพียงแต่ไปยับยั้งการเกิด spindle fiber (Levan, 1938; Eigsti, 1938, 1957) การแยกตัวของโครมาติดไม่หยุดแต่ช้าลง ไม่มีการเคลื่อนที่ของโครโมโซมในระยะที่ควรเป็น anaphase ดังนั้นทำให้โครโมโซมในเซลเพิ่มเป็น 2 เท่า หลังจากการแบ่งเซล (Inoue, 1952) และเมื่อเซลนี้แบ่งตัวต่อไป โดยไม่มีอิทธิพลของโคลชิซีนมาเกี่ยวข้อง ก็จะได้เซลที่เป็น tetraploid ไปเรื่อย ๆ แต่ถ้ามีสารโคลชิซีนนานเกินไป เซลที่เป็น tetraploid ยังคงรับสารต่อไป ทำให้โครโมโซมเพิ่มเป็น 2 เท่าอีก เป็น octoploid และในขณะที่เนื้อเยื่ออยู่ในโคลชิซีน เซลที่ยังไม่แบ่งตัวก็จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นเซลในเนื้อเยื่อที่แช่ในโคลชิซีนแล้ว มักจะมีจำนวนโครโมโซมต่าง ๆ กันเป็น mixoploid (Emsweller & Rutlle, 1941) แต่ mixoploid จะหายไปได้ ถ้าได้ต้นใหม่ที่เจริญมาจากเซลหรือกลุ่มเซลที่เป็น diploid หรือ tetraploid ล้วน ๆ หรือเกิดจากการคัดเลือกตามธรรมชาติ ถ้าการยับยั้งการสร้าง spindle fiber ไม่สมบูรณ์ มีการเคลื่อนที่ของโครโมโซมบางแห่งในระยะ anaphase จะทำให้เซลมีจำนวนโครโมโซมผิดไปจากเดิม แต่ไม่ถึง 2 เท่า กลายเป็น aneuploid (Blakeslee, 1937; Levan & Albert, 1938) สารโคลชิซีนมีผลที่สุดในระยะ G_2 ของ cell cycle (Hagino et al., 1977) การใช้สารโคลชิซีนจึงมีผลต่อเซลที่กำลังเจริญรวดเร็วเท่านั้น ซึ่งมักนิยมใช้กับตา ยอดอ่อน ต้นอ่อน ๆ และวิธีล่าสุดที่ให้ผลดีมาก คือ ใช้กับเนื้อเยื่อที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีการใช้สารโคลชิซีนชักนำให้เกิด polyploid มากทั้งในกล้วยไม้และพืชอื่น ๆ ซึ่งมีรายงานดังต่อไปนี้

การใช้สารโคลชิซีนกับกล้วยไม้

1. ใช้กับต้นกล้วยไม้ในธรรมชาติ Randolph (1951) รายงานว่า polyploid ของ Cattleya trianaei ที่ Moore (1943) สร้างขึ้นโดยใช้สารโคลชิซีนกับ pseudobulb มีขนาดดอกใหญ่ประมาณ 2 เท่า และบานทนกว่าดอกที่ได้จากต้นปกติ

Macleod (1947) ใช้สารโคลชิซีนกับต้นอ่อนของลูกผสม Cattleya และดอกอ่อนของ Zygopetalum mackaii กับ Laelia anceps พบว่า Cattleya ออกดอกช้าและสีเข้มขึ้น Zygopetalum กลีบดอกเล็กลง ส่วน Laelia ดอกใหญ่ขึ้น แต่ในรายงานไม่มีการ

อาหารเหลว ตรวจสอบ polyploid โดยการนับโครโมโซมจากปลายรากและวัดขนาดของ guard cell พบ tetraploid ประมาณ 40% ของต้นอ่อนที่ได้จากเนื้อเยื่อ Wimber & Wimber (1968) รายงานลักษณะต่าง ๆ ของดอก Cym. x Lunagrad เปรียบเทียบระหว่าง tetraploid และ diploid ปรากฏว่าดอกของ tetraploid ใหญ่กว่าเล็กน้อย กลีบดอกหนาและกว้าง ค่าเฉลี่ยของกลีบดอกเพิ่มทางด้านกว้างมากกว่าขนาดของดอกที่เพิ่มขึ้น ทำให้มีช่องว่างระหว่างกลีบดอกลดลง ดอกกลมขึ้น และมีรูปร่างดอกสวยขึ้น แต่จำนวนดอกในช่อดอกของ tetraploid ลดลงประมาณ 2 ดอกต่อ 1 ช่อ

Sanguthai et al., (1973) ทดลองใช้สารโคลชิซีนผสมในอาหารเหลวที่เลี้ยง protocorm-like body ของ Dendrobium x Uniwai Crystal ซึ่งเป็น triploid (2n = 57) ใช้โคลชิซีนเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.15% การตายของเนื้อเยื่อแปรตามความเข้มข้นของโคลชิซีน พบ hexaploid และ mixoploid มากที่สุดเมื่อใช้สารโคลชิซีน 0.1% โดยมี hexaploid ประมาณ 50% ซึ่งมีข้อสั้น ลำต้นหนา ใบกว้าง และสั้น มีสีเข้มมากขึ้น

Sanguthai and Sagawa (1973) แช่ protocorm-like body ของ Vanda x Kuniko Sugihara 'Hilo' HCC/AOS (2n = 38) และ Vanda x Patricia Low 'Lynda' (2n = 57) ในอาหารเหลวที่มีโคลชิซีน 0.1% 5 วันได้ tetraploid จาก Vanda x Kuniko Sugihara 'Hilo' 29.8% และ hexaploid จาก Vanda x Patricia Low 'Lynda' 28.6%

กัญญา ไชยเจริญ (2516) ใช้สารละลายโคลชิซีน 0.05 และ 0.2% ในน้ำกลั่นกับ callus, protocorm-like body และต้นอ่อนของลูกผสม Dendrobium 6 พันธุ์ รวม 9 cultivar มีทั้ง diploid, triploid และ pentaploid จากการนับโครโมโซมของต้นที่มาจาก diploid 130 ต้น พบว่าเป็น tetraploid และ near tetraploid 63.07% octoploid และ near octoploid 20.77% เป็น mixoploid เพียง 1 หรือ 2 ต้นเท่านั้น ส่วนพวกที่ยังคงเป็น diploid มี 11.54% ต้นที่มาจาก triploid 74 ต้น ยังคง

เป็น triploid 21.63% hexaploid และ near hexaploid 71.63% นอกนั้นเป็น pentaploid และ mixoploid ส่วนพวกที่เริ่มต้นจาก pentaploid 24 ต้น ส่วนใหญ่ยังคงเป็น pentaploid คือ 79.17% เป็น heptaploid 8.33% near octoploid 12.5% ไม่พบต้นที่เป็น decaploid เลย ลักษณะของต้น tetraploid คล้ายคลึงกับ diploid แต่สีใบเขียวเข้มและหนากว่า ความกว้างและยาวของ guard cell ก็มากกว่า ดอกมีขนาดใหญ่ ความกว้างและหนาของกลีบดอกเพิ่มขึ้น ขนาดของเรณูใหญ่กว่า แต่เรณูทั้งของ diploid และ tetraploid ไม่งอกใน stigmatic fluid เลย ส่วน octoploid มีใบหนามากขึ้น ผิวใบเป็นคลื่นและเจริญช้ามาก hexaploid มีใบสีเขียวเข้มกว่า กว้างและย่นเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับ triploid

<u>การใช้สารโคลชิซีนกับพืชอื่น</u> Heinz and Mee (1970) ทำ suspension culture ของอ้อยแล้วเลี้ยงต่อไปในอาหารที่ไม่มี 2,4-D แต่มีโคลชิซีน 50 และ 500 ppm. 4 วัน พวกที่แช่ใน 500 ppm. ตายหมด ส่วนพวกที่แช่ใน 50 ppm. ได้เป็นต้น 1,000 ต้น เป็นพวกผ่าเหล่าที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ 300 ต้น เมื่อตรวจสอบโครโมโซมจากปลายรากจากต้นที่ได้จากการแช่โคลชิซีน 46 ต้น พบว่าเป็น diploid 22 ต้น tetraploid 22 ต้น และ mixoploid 2 ต้น เมื่อศึกษาเซลของ tetraploidพบว่ามี nucleolus มาก ขณะที่รายงานต้นยังไม่โตนัก แต่คาดไว้ว่า เมื่อเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น 2 เท่า ก็จะช่วยเพิ่มความสามารถในการผสมพันธุ์ให้ดีขึ้น เป็นประโยชน์ในการผสมเพื่อคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

Ackerman and Dermen (1972) รายงานการใช้โคลชิซีน 0.05% กับ <u>Camellia</u> 'Fragrant Pink' ประมาณ 5-6 ต้น ได้กิ่งที่เจริญจากตา ที่ใช้โคลชิซีน 3 กิ่ง เป็น 2-4-4 chimera 2 กิ่ง และเป็น 2-2-4 หนึ่งกิ่ง พบว่าส่วนมากมีใบหนา สีเข้มขึ้น และบางใบด่าง เมื่อตรวจสอบเรณูของดอกที่ได้จากกิ่งที่เป็น 2-4-4 chimera พบว่าเป็นปกติถึง 77% จากเดิมซึ่งปกติเพียง 5% เท่านั้น และนับโครโมโซมจากปลายรากของกิ่งที่เป็น 2-4-4 ทั้ง 2 กิ่ง พบว่าเป็น tetraploid

Behera et al., (1974) ศึกษาลักษณะที่ผิดปกติ ที่เกิดจากการใช้โคลชิซีนเข้มข้นต่าง ๆ กัน กับ Amaranthus caudatus และ A. dubius พบว่าลักษณะผิดปกติขึ้นกับความเข้มข้นของโคลชิซีนที่ใช้ บางต้นยอดบิดกันเป็นเกลียว เจริญช้า อาจสูญเสีย apical dominance ระยะเวลาที่มีดอกนานออกไป แผ่นใบเล็ก แคบ ใบหนาหงิกงอ shoot apex เปลี่ยนจากรูปโดมเป็นรูปแบน ๆ เกิด periclinal chimera ต่าง ๆ ซึ่งคิดว่า บางทีโคลชิซีนอาจมีผลต่อการทำงานของ auxin หรือการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการเจริญ

วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ต้องการสร้าง polyploid ของลูกผสม Arachnis และ Aranda ด้วยการแช่ callus และ protocorm-like body ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในสารละลายโคลชิซีน แล้วนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของ diploid และpolyploid ถึงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของต้น ใบ รวมทั้งคาดว่าจะได้ต้นที่มี fertility ดีขึ้นด้วย

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ลักษณะต่าง ๆ ดีขึ้น คาดว่าการเพิ่มจำนวนโครโมโซม ทำให้ลักษณะต่าง ๆ ของต้น ดอก ใบ ดีขึ้นไปจากเดิม เช่น ขนาดดอกใหญ่ขึ้น กลีบหนาขึ้น ลักษณะลำต้นแข็งแรงกว่าเดิม ใบกว้าง หนา และสีเขียวเข้มขึ้น คล้ายกับการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของพืช และกล้วยไม้อื่น ๆ

2. ประโยชน์ในการผสมพันธุ์ diploid ของลูกผสมข้ามสกุล มีลักษณะเป็นหมัน เนื่องจากขาดคู่ของโครโมโซม ดังนั้นเมื่อเป็น tetraploid และโครโมโซมจับคู่กันเป็น bivalent ส่วนใหญ่ จึงคาดว่าทำให้มีโอกาสผสมพันธุ์จากพวกที่เป็นหมันได้ และมี gene recombination เพิ่มขึ้น รวมทั้งเกิดลักษณะแปลก ๆ ได้มากขึ้น ซึ่งมีประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ในโอกาสต่อไป