หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

Dendrobium เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่สุดในวงศ์ Orchidaceae มีรูปลักษณะการเจริญแบบ sympodial และสภาพที่เกิดเป็น epiphyte มีประมาณ 1600 species ถิ่นกำเนิดอยู่แถบเอเชียพบในประเทศไทย พม่า อินเดีย ตอนกลางและใต้ของประเทศจีน ลาว เขมร เวียตนาม ฟิลิปปินส์ เกาหลีใต้ ตอนกลางและใต้ของประเทศญี่ปุ่น มาเลเซีย สิงคโปร์ หมู่เกาะ celebes เกาะสุมาตรา บอร์เนียว อินโดนีเซีย ตอนเหนือของออสเตรเลีย นิวซีแลนด์และหมู่เกาะนิวกินี ในประเทศไทยมีพันธุ์พื้นเมืองประมาณ 135 species รวมอยู่ใน 20 section พบทุกภาคของประเทศ แต่พบมากในภาคเหนือ ภาคใต้มีรองลงไป ภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือพอมีบ้างแต่ไม่มากนัก (Vajrabhaya, 1960; Seidenfaden and Tem Smitinand, 1960)

กล้วยไม้สกุลนี้มีความแตกต่างกันมากทั้งลักษณะ ลำต้น ดอก สีของดอก และใบ นักพฤกษศาสตร์จึงจัดแบ่งสกุลนี้ออกเป็น section ต่าง ๆ ผู้ที่รวบรวมไว้เป็นคนแรกคือ Kränzlin (1910) ต่อมา Schlechter (1914) ได้แบ่งออกเป็น 41 section โดยอาศัยลักษณะใบ ลูกกล้วย (pseudobulb) มีเยื่อหรือไม่มีเยื่อ และดอก โดยดูจำนวนดอกในช่อ ช่วงระยะการบานของดอก ลักษณะต่าง ๆ ของกลีบดอก เช่น รูปร่างของ labellum และขนของ labellum

กล้วยไม้สกุลนี้มีผู้นิยมเลี้ยงทั่วไปเพราะเลี้ยงง่าย ทางเหนือนิยมเลี้ยงพันธุ์พื้นเมือง ส่วนทางภาคกลางนิยมเลี้ยงลูกผสม เช่น Dendrobium Pompadour เพื่อขายดอก ในปีหนึ่ง ๆ ประเทศไทยส่งดอกกล้วยไม้และต้นไปขายยังต่างประเทศเป็นจำนวนมาก จากรายงานในหนังสือสถิติการส่งสินค้าออก

ในปี 2515 ประเทศไทยมีรายได้จากการส่งดอกไม้ไปขายยังต่างประเทศเป็นเงิน 28.3 ล้านบาท และกำลังเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

การเลี้ยงกล้วยไม้พวกหวายเพื่อการค้า จำเป็นที่จะต้องคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะดี คือมีดอกขนาดใหญ่ รูปร่างดอกสวย สีสวย ช่อดอกยาวและดอกดก คุณสมบัติที่กล่าวมานี้มักพบในกล้วยไม้ที่เป็น polyploid (Dendrobium Pompadour ที่นิยมเลี้ยงเพื่อขายดอกก็เป็น polyploid) จากรายงานของ Kamemoto et al (1972) พบว่า Dendrobium ที่เป็น tetraploid มีต้นแข็งแรงและดอกสวย จึงมักพบเสมอว่าพวกกล้วยไม้ที่ได้รับรางวัลมักเป็นพวก polyploid

ลักษณะของพืชทั่ว ๆ ไปที่เป็น polyploid

พืช polyploidทั้งที่พบในธรรมชาติและที่สร้างขึ้นมา มีลักษณะเหมือนกันคือ ลำต้นใหญ่ แข็งแรง ทนทาน ใบสีเขียวเข้ม แผ่นใบไม่เรียบ กว้างและหนา ขนาดของ guard cell pollen ผลและเมล็ดใหญ่กว่า diploid จำนวน germ pore ของ pollen ขนาดดอกและความหนาของกลีบดอกเพิ่มขึ้น ในพวก polyploid, แต่การเจริญเติบโตมักช้ากว่าและ fertility ต่ำกว่า diploid (Blakeslee, 1938; Stebbins, 1956; Swanson, 1961; Kamemoto, Tanaka and Kosaki, 1961; Chaiyasut, 1971)

การเกิด polyploid

polyploid เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติแต่พบน้อยมาก อาจเกิดจากการแบ่งเซลของ sporocyte ผิดปกติ เช่นเกิด complete asynapsis หรือเกิด unreduced gamete ทำให้ได้ offspring ที่เป็น polyploid หรือเกิดจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของ somatic cell ก็ได้ autotriploid (AAA) อาจเกิดจากพ่อและแม่ที่เป็น diploid แต่เกิดจากการผสมของ unreduced gamete ของพ่อหรือแม่กับ gamete ธรรมดา หรือ autotetraploid (AAAA) อาจเกิดจากการเพิ่มโครโมโซมเป็นสองเท่าใน

somatic cell หรือเกิดจากพ่อและแม่ที่เป็น diploid แล้วเกิดการผสมของ unreduced gamete ทั้งคู่ (Swanson, 1961) ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่าเกิด polyploid ได้มากขึ้น (Murashige and Nakano, 1966) ปัจจุบันเริ่มมีการใช้สารเคมีช่วยชักนำให้เกิด polyploid ใน tissue culture มากขึ้น (Nakasone and Kamemoto, 1961; Wimber and Van Cott, 1967)

Fertility ของ polyploid

Stebbins (1956, 1960) และ Kamemoto (1961) กล่าวว่าพวก tetraploid มี fertility สูง แต่ fertility จะต่างกันไปแล้วแต่ชุดของโครโมโซม ถ้าเป็น autotetraploid ที่มีโครโมโซมทั้งสี่ชุดเหมือนกัน (AAAA) fertility จะลดลง เนื่องจากการแบ่งเซลแบบไมโอซิสนั้น homologous chromosome ทั้งสี่จะเลือกจับคู่กันได้หลายแบบเป็น quadrivalent, trivalent, bivalent หรือ univalent ทำให้การแยกของโครโมโซมในระยะแอนนาเฟสผิดไป แทนที่ spore quartet จะมีจำนวนโครโมโซมของแต่ละเซลเป็นครึ่งหนึ่งของเซลแม่ (Sporocyte) กลับได้ spore ที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น aneuploid number มาก และเซลสืบพันธุ์ที่มีโครโมโซมเป็น aneuploid เหล่านี้เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ fertility ของ autotetraploid ลดลง แต่ถ้าเป็น amphidiploid นิวเคลียสประกอบด้วยโครโมโซมเหมือนกันอย่างละสองชุด (AABB) ฉะนั้นในการแบ่งเซลแบบไมโอซิสก็มีแต่ synapsis ของพวกที่เหมือนกันเกิด bivalent เท่านั้น ทำให้ gamete ที่ได้มีจำนวนโครโมโซมปกติคล้าย gamete ของ diploid ซึ่งทำหน้าที่ได้ดีกว่า aneuploid gamete ฉะนั้น fertility ของ amphidiploid จึงสูงคล้ายของ diploid

มีการทดลองที่สนับสนุนว่า fertility ของ polyploid ขึ้นกับ meiotic figure คือ Hilpert (1957) ศึกษาใน ryo (Secale cereal) Rommel (1965) ทดลองกับ sugar beet (Beta vulgaris) Maizonnier (1970) รายงานใน red clover (Trifolium pratense) ว่าถ้าพบจำนวน bivalent มากกว่า multivalent พืชนั้นมี fertility

เพิ่มขึ้น แต่ในพืชบางชนิดสาเหตุของ fertility ไม่ได้ขึ้นกับ meiotic figure เช่น Morrison (1960) ทดลองกับพวกหญ้า (graminae) Chaiyasut (1971) ทดลองกับ sunflower (Helianthus annuus) นอกจากนี้พบว่ายังมีสาเหตุอื่น ๆ อีกที่ทำให้ fertility ของ polyploid ลดลง ผู้ที่ทำการทดลองเกี่ยวกับเรื่องนี้คือ Bosemark (1967) พบว่า sugar-beet ที่เป็น autotetraploid มี fertility ต่ำกว่าของ diploid เนื่องมาจากการเจริญของเนื้อเยื่อใน anther และ megagametophyte ผิดปกติ เป็นเหตุให้ pollen tube และ zygote ฝ่อได้ และการผิดปกติต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้ pollen tube เจริญผิดปกติ หรือเกิด supernumerary microspore สาเหตุอื่นที่ทำให้ fertility ลดลงเนื่องจากเกิด chromosomal aberration (inversion, translocation, deficiency, duplication) Kostoff(1940) พบว่า autotetraploid ซึ่งได้จากพืชที่มีโครโมโซมยาวจะมี fertility ต่ำกว่าพืชที่มีโครโมโซมสั้น เพราะโครโมโซมยาวจะเกิด quadrivalent ได้มากกว่าโครโมโซมสั้น ทำให้การแยกของโครโมโซมในระยะแอนนาเฟสผิดปกติ จึงทำให้ fertility ต่ำลง

พวก triploid มีไมโอซิสที่ยุ่งยากคือ homologous Chromosome ทั้งสามจะมา synapse กันเกิดเป็น trivalent, bivalent และ univalent จึงทำให้โครโมโซมที่แยกไปยังแต่ละขั้วในระยะแอนนาเฟสไม่เท่ากันมากกว่าของ tetraploid เป็นเหตุให้ทั้ง megagametophyte และ microgametophyte ผิดปกติ หรือทำให้การงอกของ pollen tube ผิดปกติ แต่ Muntzing (1951) พบว่า rye ที่เป็น triploid มีเมล็ดน้อยมิได้เกิดจากการเจริญของ pollen tube ผิดปกติ กลับเกิดจากการเจริญของ endosperm ผิดปกติ จึงทำให้ triploid zygote ไม่เจริญเป็น embryo ที่สมบูรณ์

พวก aneuploid ที่มีจำนวนโครโมโซมต่างไปจาก tetraploid เพียง 1 หรือ 2 โครโมโซมจะมี fertility คล้าย tetraploid (Kamemoto, 1961) Ellestrδm and Sjodins(1966)รายงานว่าพวก aneuploid zygote จะฝ่อไปในช่วงระยะการเจริญของ embryo ทำให้ได้เมล็ดดีน้อย ฉะนั้น fertilityของ aneuploid มักต่ำกว่าของพวก euploid

การสำรวจการวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องซึ่งได้กระทำมาแล้ว

ได้กล่าวมาแล้วว่า polyploid เกิดขึ้นได้หลายแบบ เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ และโดยการสร้างขึ้น รายงานการเกิดในแต่ละประเภทมีดังต่อไปนี้

1. ในธรรมชาติ Burnham (1962) ได้รายงานเกี่ยวกับ polyploid ที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ คือ Zea mays (Beadle 1930, 1933) Datura (Bergner, Cartledge และ Blakeslee 1934) Gossypium (Beasley, 1942) Triticum vulgare (Lietal 1945) Pace (Withner1959) ได้อธิบายถึงกล้วยไม้ที่เป็น polyploid ในธรรมชาติ คือ Gyrostachys cernua (n=30) เป็น tetraploidมีเซลและนิวเคลียสขนาดใหญ่ ส่วนต่าง ๆ ของพืชมีขนาดใหญ่กว่าG. gracilis (n=15) ซึ่งเป็น diploid Vajrabhaya & Randolph (1961)พบว่าลูกผสมของ Dendrobium ชนิดต่าง ๆ เช่น (D. Pauline x D. discolor,D.Hawaii Nuix D. Anouk) เกิดเป็น polyploid ได้เนื่องจากเกิด unreduced gameteหรือ Chromosome doubling ในระยะ early embryogeny

2. ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ Bertsch (1967) ได้แสดงความคิดเห็นไว้ว่าการขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยวิธี tissue culture อาจเกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นได้ เซล diploid จะเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น tetraploid และ

เมื่อเซล tetraploidเหล่านี้แบ่งตัวจะเจริญไปเป็นต้น tetraploid ได้ Murashige and Nakano (1967) ได้เลี้ยงเนื้อเยื่อของ Nicotiana tabacum จาก pith ซึ่งประกอบด้วยเซล diploid และ tetraploid หลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ 1 ปี พบแต่เซล tetraploidและ octoploid ประมาณครึ่งหนึ่งของเซลทั้งหมด อีกครึ่งหนึ่งเป็น aneuploid ซึ่งเป็น sub-tetraploid และเมื่อเลี้ยงต่อไปถึง 6 ปี พบว่ามีแต่เซล aneuploid เท่านั้น และเป็นเซล hypertetraploid, Hof (1969)รายงานว่า callus tissue culture ของ Pisum sativum "Alaska" มีเซลที่เป็น polyploid ถ้าอาหารที่ใช้เลี้ยงใส่สาร kinetin ด้วย Demoise and Partanen (1969) เลี้ยงเนื้อเยื่อของ Paeonia suffruticosa ในอาหารเหลวและในวุ้นอาหาร พบว่าในอาหารเหลวเปอร์เซ็นต์ tetraploid เกิดสูงกว่าในวุ้นอาหารและพบเซล octoploidในอาหารเหลวเมื่อเลี้ยงได้ 41 วัน ส่วนในวุ้นอาหารเลี้ยงเป็นเวลานานถึง 112 วัน ก็ไม่พบเซลoctoploid เลย Vajrabhaya (1972, personnal communication) ได้เลี้ยงเนื้อเยื่อของ Dendrobium May Neal "Srisobhon" แล้วแยก ปปลูกในเรือนต้นไม้ พบต้นที่มีลำต้นขนาดใหญ่ แข็งแรง ใบหนา ดอกใหญ่ กลีบดอกกว้าง และหนากว่า diploid เล็กน้อย เมื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมพบว่าเป็น euploid และ aneuploid มีจำนวนโครโมโซมเป็น 76 และ 77 และ D. Lady Hamilton x D. May Neal ซึ่งเป็น triploid แต่เดิมพบต้นที่มีใบหนาผิดปกติ เมื่อนับจำนวนโครโมโซมของพวกนี้ 5 ต้น ปรากฏว่าเป็น hexaploid ทั้ง 5 ต้น(ภาพที่ 2)

3. โดยการสร้างขึ้น ได้มีการชักนำให้เกิด polyploid โดยใช้อุณหภูมิและสารเคมีชนิดต่าง ๆ Blakeslee and Avery (1937) และ Burnham (1962) ได้รายงานถึงผลงานของ Randolph (1932) ว่าได้ประสบผลสำเร็จในการใช้อุณหภูมิราว 38 – 45°C ชักนำให้เกิด polyploid ในข้าวโพด โดยทำในระยะ first division ของ zygote ผลปรากฏว่าได้ tetraploidประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ Lutcov(Burnham,1962) ใช้อุณหภูมิ

ประมาณ 0 – 1.5 °C. เป็นเวลา 24 ชั่ม. กับ Raphanobrassica พบว่ามี diploid และ tetraploid pollen 6.62 และ 2.34 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ถ้าใช้เวลา $1\frac{1}{2} - 1\frac{3}{4}$ ชั่วโมง พบว่า spore mother cell จะแบ่งได้ spore dyads แทนที่จะได้ spore quartet ประมาณ 37.6 – 55.8 เปอร์เซ็นต์ Sax (Burnham, 1962) ได้ทดลองใช้อุณหภูมิต่าง ๆ สลับกัน โดยทดลองกับ Rhoeo ใช้อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 2 – 3 วัน แล้วนำมาไว้ที่อุณหภูมิ 36°C เป็นเวลา 1 วัน พบ microspore ที่เป็น polyploid เป็นจำนวนมาก Blakeslee & Avery (1937) รายงานว่า Nemec ได้ทดลองใช้สารเคมีพวก chloral hydrate และยาเสพติดชนิดอื่น ๆ เพื่อชักนำให้เซลของรากมีโครโมโซมเพิ่มเป็นสองเท่า Burnham (1962) รายงานว่า Kostoff, Nawaschin, Shmuck และ Gusseva ได้ใช้สาร acenaphthene กับต้นอ่อนของหญ้า พบว่าทำให้รากและใบของหญ้าผิดปกติ Fatalisade ก็ได้ทดลองใช้สารชนิดนี้กับยาสูบพบว่าทำให้ยาสูบเป็น polyploid ได้

สารเคมีที่มีผู้นิยมใช้มากและประสบผลสำเร็จในการทำให้พืชเป็น polyploid คือสารโคลชิซีน ($C_{12}H_{25}O_6N$) เพราะไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในโครโมโซม นอกจากไปยับยั้งไม่ให้เกิด spindle fiber (Eigsti 1938,1957; Inoue, 1952) จึงไม่มีการเคลื่อนที่ของโครโมโซมในระยะแอนนาเฟส ทำให้ได้เซลที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่า (tetraploid) หลังจากมีการแบ่งเซล และเมื่อเซลเหล่านี้แบ่งตัวต่อไปโดยไม่มีอิทธิพลของสารโคลชิซีนมาเกี่ยวข้องก็ได้เซลที่เป็น tetraploid ไปเรื่อย ๆ ในขณะเดียวกันถ้ามีสารโคลชิซีนนานเกินพอ เซล tetraploid จะได้รับอิทธิพลของสารโคลชิซีนอีกครั้งหนึ่ง ทำให้จำนวนโครโมโซมเพิ่มเป็นสองเท่าคือเกิดเซล octoploid ในขณะที่เนื้อเยื่ออยู่ในสารโคลชิซีน เซลที่ไม่แบ่งตัวก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เพราะฉะนั้นเซลพวกนี้ยังคงเป็น diploid และเมื่อมันแบ่งตัวหลังเอาออกจากโคลชิซีนแล้วจะได้เซล diploid ทำให้เนื้อเยื่อที่แช่สารโคลชิซีนมีเซลที่เป็น diploid, tetraploid และ octoploid ปนกันอยู่ ซึ่งเจริญไปเป็นต้น mixoploid ลักษณะ mixoploid จะหายไปได้ถ้าต้นที่แตกใหม่แตกจากตาที่มีเนื้อเยื่อเป็น diploid หรือ tetraploid

ล้วน หากการยับยั้ง spindle fiber ไม่สมบูรณ์ มีการเคลื่อนที่ของโครโมโซมบางแห่งในระยะแอนนาเฟส ทำให้จำนวนโครโมโซมผิดไปจากเดิม แต่ไม่ถึงสองเท่ากลายเป็น aneuploid และเซลเหล่านี้อาจแบ่งตัวหลาย ๆ ครั้ง เป็นต้นที่ประกอบด้วยเซล aneuploid ในที่สุด

ผลงานของผู้ที่ประสบความสำเร็จในการใช้สารโคลชิซีนชักนำให้เกิด polyploid ในพืชชนิดต่าง ๆ และในกล้วยไม้ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 และที่ 2 ตามลำดับ

Randolph (1951) รายงานว่า Polyploid ของ Cattleya trianaei ที่ Moore (1943) สร้างขึ้น โดยใช้สารโคลชิซีนกับ pseudo-bulb มีดอกขนาดใหญ่ประมาณสองเท่าและบานได้ทนกว่าดอกที่ได้จากต้นปกติ MacLeod (1947) ได้ใช้สารโคลชิซีนกับต้นอ่อนของลูกผสม Cattleya และดอกอ่อนของ Zygopetalum mackayi กับ Laelia anceps พบว่า Cattleya ออกดอกช้าสีดอกเข้มขึ้น Zygopetalum mackayi มีดอกเล็กลง ส่วน Laelia anceps มีดอกขนาดใหญ่ขึ้น แต่ในรายงานไม่ได้มีการตรวจนับจำนวนโครโมโซมของต้นที่ใช้สารโคลชิซีน

Rotor (1958) ได้ใช้สารละลายโคลชิซีน 0.3 เปอร์เซ็นต์ กับต้นอ่อนของกล้วยไม้ประมาณ 3,000 ต้น ที่มีอายุต่าง ๆ กัน ซึ่งเป็นลูกผสม 70 ชุด จากประมาณ 12 genera (ดูตารางที่ 2) เขาสังเกตพบว่าสารโคลชิซีนทำให้โคนต้นและปลายรากของต้นอ่อนบวมพอง ยอดหยุดเจริญ ภายหลังการทดลองได้ 2 – 3 สัปดาห์ ใบอ่อนที่แตกใหม่หนา การเจริญหยุดไปหลายเดือนกว่าหน่อข้าง ๆ จะแตกขึ้นมาใหม่ ระยะเวลาที่การเจริญหยุดชงักขึ้นกับชนิดของกล้วยไม้ ใน genus Phalaenopsis ใบใหม่เกิดภายหลังการทดลองประมาณ 2 เดือน ในจำพวกนี้มี 80 เปอร์เซ็นต์ที่ใบหนาและลำต้นแข็งแรง Vanda หยุดชงักการเจริญไปประมาณ 6 เดือนกว่าจะเริ่มมีการเจริญใหม่ Cattleya และ Cymbidium

ตารางที่ 1 Polyploid ของพืชสกุลต่าง ๆ ที่สร้างขึ้นจากการใช้สารโคลชิซีน

ปี	ชื่อผู้ทดลอง	พืชที่นำมาทดลอง
1937	Blakeslee & Avery	Datura stramonium, Cosmos, Portulaca grandiflora
1937	Ramusson & Levan	Beta vulgaris
1938	Nebel & Ruttle	Tagetes sp, Petunia sp, Antirrhinum majus, Dianthus sp, Lycopersicum esculentum
1941	Emsweller & Ruttle	Lilium sp, Saintpaulia ionantha, Antirrhinum majus
1952	Batra	Cucumis melo
1953	Kloen & Speckmann	Beta vulgaris
1955	Evan	Trifolium pratense T. repens Medicago sativa
1956	Armstrong & Robertson	Trifolium hybridum
1971	Chaiyasut	Helianthus annuus

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 Polyploid ของกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ ที่สร้างขึ้นจากการใช้สารโคลชิซีน

ปี	ชื่อผู้ทดลอง	พืชที่นำมาทดลอง
1943	Moore	Cattleya trianaei
1947	Mac Leod	Zygopetalum mackayi, Laelia anceps, Cattleya hybrids
1958	Rotor	Cattleya, C. loddigesii x C. granulosa Lc. Cinnalo, Cymbidium, Phalaenopsis Samar, P. Luzon, Vanda Rothschildiana, Aranda Helen Gagan, Dendrobium Caesar, D. dearei x D. moschatum , D. chrysotoxum, Phaius grandifolius, Calanthe vestita var. Williamsii, Oncidium splendidum, Epidendrum fragrans x E. prismatocarpum
1963	Menninger	Cymbidium Coningsbyanum 'Brockhurst'
1967	Wimber & Van Cott	Cymbidium Lunagrad, Cym. Winter Dew, Cym. Green Wood x Cym. Green Giant
1973	Sanguthai et al	Dendrobium Uniwai Crystal
1973	Sanguthai and Sagawa	Vanda Kuniko Sugihara, Vanda Patricia Low

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หยุดชะงักการเจริญนานพอ ๆ กับ Phalaenopsis ส่วน genus อื่น ๆ ไม่ได้รายงานไว้ ในการทดลองเหล่านี้ไม่ได้มีการตรวจนับจำนวนโครโมโซม และขณะที่รายงานกล้วยไม้ยังไม่ออกดอกเลย

Wimber (1967) ได้รายงานถึงผลงานของ Nakasone และ Kamemoto (1966) ว่าได้ทดลองใช้สารโคลชิซีนกับกล้วยไม้สกุล Vanda สำหรับเมล็ดและ Protocorm ด้วยการใส่สารโคลชิซีนในวุ้นอาหาร ต้นอ่อนและกิ่งตัด (cutting) แช่ในสารละลายโคลชิซีน ส่วนช่อดอกและหน่อใช้โคลชิซีนผสมในลาโนลินป้าย ผลการทดลองได้ chimerical tetraploid 2 – 3 ต้น และได้ tetraploid แท้ ๆ 1 ต้น

Menninger (1963) ได้รายงานการใช้สารโคลชิซีนกับ Cymbidium Coningsbyanum 'Brockhurst' (grandiflorum x insigne) ซึ่งเป็น diploid มีจำนวนโครโมโซม 2n = 40 โดยล้างลูกกล้วย (Pseudobulb) ให้สะอาดแล้วใช้เข็มขนาดเล็กมากแทงเข้าไปในตา (bud) ของลำหลัง นำหน่อไปแช่ในสารละลายโคลชิซีน 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 14 นาที หลังจากนั้นอีก 10 วัน ก็นำไปแช่ในสารละลายโคลชิซีนอีกครั้งหนึ่งความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เวลา 1 ชั่วโมง พบว่าหน่อที่แตกใหม่จากตาที่แช่ในสารละลายโคลชิซีนเป็น tetraploid มีจำนวนโครโมโซม 2n = 80 และเมื่อต้น tetraploid ออกดอกก็นำไปเปรียบเทียบกับดอก diploid พบว่าดอก tetraploid มีขนาดใหญ่กว่า กลีบดอกกว้างและหนากว่า diploid

Wimber และ Van Cott (1967) ได้รายงานการใช้สารโคลชิซีนกับลูกผสม Cymbidium 3 ชนิด คือ Cym. Lunagrad, Cym. Winter Dew และ Cym. Green Wood x Cym. Green Giant โดยนำเมล็ดของทั้งสามชนิดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและได้ทำ meristem culture ของ Cym. Green Wood x Cym. Green Giant ด้วย (Wimber, 1963) ประมาณ 4 – 6 สัปดาห์ เมล็ดเจริญเป็น Protocorm

ใส่สารละลายโคลชิซีนลงไปใน flask ปรับความเข้มข้นเป็น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยให้ protocorm แช่ในโคลชิซีน 10 วัน ส่วน protocorm ที่ได้จาก meristem culture แช่ในโคลชิซีน 0.05 เปอร์เซ็นต์ 14 วัน Wimber ตรวจสอบ tetraploid โดยนับจำนวนโครโมโซมในราก วัดขนาดของ guard cell และใช้ลักษณะทั้งสองนี้ช่วยแยก tetraploid จาก diploid พบว่ามี tetraploid ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดและประมาณ 43 เปอร์เซ็นต์ของต้นอ่อนที่ได้จากเนื้อเยื่อ ในปี 1968 Wimber และ Doris Wimber รายงานลักษณะต่าง ๆ ของดอก Cymbidium 'Lunagrad' หลังจากเปรียบเทียบกับขนาดดอก diploid คือขนาดดอก tetraploid ใหญ่กว่า diploid เล็กน้อย กลีบดอกหนาและกว้างกว่า ค่าเฉลี่ยของกลีบดอกเพิ่มทางด้านกว้างมากกว่าขนาดของดอกที่เพิ่มขึ้น แสดงว่าดอก tetraploid มีช่องว่างระหว่างกลีบดอกลดลง ทำให้ดอกกลมรูปร่างดอกสวยขึ้น แต่จำนวนดอกในช่อดอก tetraploid ลดลงประมาณ 2 ดอกต่อ 1 ช่อ

Sanguthai, Sanguthai and Kamemoto (1973) ได้ใช้สารโคลชิซีนความเข้มข้น 0.05, 0.10 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4, 10, 15 และ 20 วัน กับ protocorm like body จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของ Dendrobium Uniwai Crystal (2n=57) พบว่าปริมาณของเนื้อเยื่อที่ตายเพิ่มตามความเข้มข้นของสารโคลชิซีน สำหรับความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของเนื้อเยื่อที่ตายสูงมาก แต่ละความเข้มข้นที่ใช้พบ hexaploid และ mixoploid ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เวลา 5-20 วันได้ผลมากที่สุด คือได้ hexaploid ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์

Sanguthai and Sagawa (1973) ได้ใช้สารโคลชิซีนกับ protocorm like body ของ Vanda Kuniko Sugihara 'Hilo' (2n=38) และ Vanda Patricia Low 'Lynda' (2n=57) โดยใช้ความเข้มข้นของโคลชิซีน

0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน ได้ tetraploid 29.8 เปอร์เซ็นต์ จาก Vanda Kuniko Sugihara 'Hilo' และ hexaploid 28.6เปอร์-เซ็นต์ จาก Vanda Patricia Low 'Lynda'

วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

ในการศึกษานี้ต้องการสร้าง polyploid ของลูกผสม Dendrobium จากต้นที่เป็น diploid (2n=38) triploid (2n=57) และ pentaploid (2n=95) โดยการแช่ callus, protocorn like body และต้นอ่อน ที่มาจากการเพาะเมล็ดและการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ ในสารละลายโคลชิซีนที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วนับจำนวนโครโมโซมจาก apical root tip เพื่อตรวจว่ามีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นหรือไม่แล้วนำ polyploid ที่ได้มาใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสัณฐาน ต้น ใบ และดอก รวมทั้งศึกษา fertility ของต้นและใช้ในการผสมพันธุ์ต่อไป

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ลักษณะต่าง ๆ ผิดไปจากเดิม คาดว่าการเพิ่มจำนวนโครโมโซมทำให้ลักษณะต่าง ๆ ของต้น ใบ และดอกผิดไป อาทิขนาดดอกใหญ่ขึ้น กลีบหนาขึ้น ลักษณะของต้นอวบกว่าเดิม ใบหนา กว้าง และเขียวกว่าเดิม คล้ายการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของพืชชนิดอื่น ๆ และกล้วยไม้สกุลอื่น

2. ประโยชน์ทางการผสมพันธุ์ diploid ของลูกผสมต่าง species (interspecific hybrid) มีลักษณะ completely sterile, partially sterile หรือ male sterile เนื่องจาก gene ไม่สมดุลย์กัน ฉะนั้นเมื่อเป็น tetraploid (allopolyploid หรือ segmental allopolyploid)

จึงคาดว่าทำให้มีโอกาสผสมพันธุ์จากพวกที่เป็นหมันได้และมี gene recombination เพิ่มขึ้นด้วย รวมทั้งเกิดลักษณะแปลก ๆ ได้มากขึ้น ซึ่งจะมีประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ในโอกาสต่อไป

ในกรณี triploid ของลูกผสมต่าง species ซึ่งมีลักษณะ male sterile เมื่อมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากเดิมสองเท่า (hexaploid) ก็คาดว่าจะทำให้fertility สูงขึ้น ในทำนองเดียวกับ allotetraploid

3. ทำให้ทราบระดับโครโมโซมของpolyploid ว่ามากน้อยแค่ไหน ที่ลูกผสม Dendrobium ต่างspecies จะมีชีวิตอยู่ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย