

ผลของโคลชิซินที่มีต่อกล้วยไม้ดินหมูกิ่งในสภาพปลอดเชื้อ

Effects of Colchicine on *in vitro* Cultured Plantlets of *Eulophia andamanensis* Rchb.f

สุขไพฑ ศรีเมือง และ วิลัยลักษณ์ ชินะจิตร

Soukphathai Semeung and Wilailak Chinachit

Abstract

Eulophia andamanensis. Rchb.f. is a terrestrial orchid which has potential to be commercial pot plant if it is improved by increasing flower size. The effective of colchicine to induce mutation has been reported in several crops. Therefore, this study was emphasized on effectiveness of colchicine to induce alteration of morphology and ploidy level of *in vitro* cultured of *Eulophia andamanensis* Rchb.f. The *in vitro* plantlets were cultured in liquid VS medium containing 0.1 and 0.2% colchicine for 24, 48 and 72 hk then transferrsed to normal culture medium for 4 months then transplant to vermiculite. The fresh weight, size of stem, root length and stomata size of the plantlets treated with colchicine were significantly different. According to flow cytometric analysis, 2 tetraploid plants (from 6 plants) were found in 0.1% colchicine treatment after soaking 24 and 72 hk, whereas at 0.1 % colchicine treatment for 48 hk and 0.2 % colchicine treatment had no effect on alteration of ploidy level.

Key words: *Eulophia andamanensis*, colchicine, ploidy, mutation

บทคัดย่อ

กล้วยไม้ดินหมูกิ่ง (*Eulophia andamanensis*. Rchb.f.) มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นกล้วยไม้กระถางทางการค้าได้ ถ้าหากได้รับการพัฒนาปรับปรุงให้ดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น สารโคลชิซินถูกนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของพืชหลายชนิด การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของสารโคลชิซินต่อสัณฐานวิทยาและการเปลี่ยนแปลงของระดับ ploidy ของกล้วยไม้ดินหมูกิ่ง โดยนำส่วนต้นอ่อน มาแช่ในอาหารสังเคราะห์ VS ที่เติมสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 และ 0.2% นาน 24 48 หรือ 72 ชั่วโมงแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพปกติเป็นเวลา 4 เดือน ย้ายปลูกในเวอร์มิคูไลต์ พบว่า สารโคลชิซินมีผลทำให้น้ำหนักสด ขนาดของลำต้น ความยาวราก และขนาดปากใบ มีความแตกต่างกันทางสถิติ และพบจำนวนต้นที่มีโครโมโซมเปลี่ยนแปลงไปเป็น tetraploid ในกล้วยไม้ดินหมูกิ่งที่ได้รับโคลชิซิน 0.1% นาน 24 และ 72 ชั่วโมง จำนวน 2 ต้น (จากจำนวนทดลอง 6 ต้น) ในขณะที่การได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.1% นาน 48 ชั่วโมง และความเข้มข้น 0.2% ทุกช่วงเวลาทดลองไม่พบต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับ ploidy

คำสำคัญ: กล้วยไม้ดินหมูกิ่ง โคลชิซิน การกลายพันธุ์

บทนำ

กล้วยไม้ดินหมุกกล้วย (Eulophia andamanensis Rchb.f.) เป็นกล้วยไม้ชนิดหนึ่งที่จัดกลุ่มอยู่ในกล้วยไม้ดินขึ้นตามพื้นดิน สร้างต้น ใบ ออกดอกในช่วงฤดูฝน หัวรูปตัววีหรือคล้ายหน่อไม้เล็กๆ ขนาด 3-8.2 ซม. หัวอยู่เหนือดิน ใบรูปแถบขนาด 10-25 x 1.5-2 ซม. แผ่นใบบางและร่วงในฤดูแล้ง มีดอกหลังทิ้งใบ ช่อดอกตรงสูง 20-50 ซม. ดอกในช่อโปร่ง ขนาดดอก 1.5-2 ซม. กล้วยไม้ชนิดนี้ขึ้นเป็นกระจุกแน่นในธรรมชาติแผ่กระจายเป็นบริเวณกว้างขึ้นตามป่าโปร่ง ช่วงเวลาออกดอก มีนาคม-พฤษภาคม (อบฉันท, 2546) แต่เนื่องจากกล้วยไม้ดินหมุกกล้วยมีดอกขนาดเล็ก ถ้าสามารถปรับปรุงให้มีขนาดดอกใหญ่ขึ้น ก็มีแนวโน้มที่จะปรับปรุงให้เป็นไม้กระถางที่สวยงามทางการค้าได้ มีรายงานการใช้สารโคลชิซินชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเพื่อให้ได้คุณลักษณะที่แตกต่างออกไปตามต้องการในพืชหลายๆ ชนิด ดังนั้นการใช้สารโคลชิซินเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ดินหมุกกล้วยให้มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปทางที่ต้องการ เช่น ลักษณะดอกที่ใหญ่ขึ้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของต้นอ่อนกล้วยไม้ดินหมุกกล้วยเมื่อได้รับสารโคลชิซิน

วิธีการศึกษา

พืชที่ใช้ในการทดลอง

พืชที่นำมาใช้ในการศึกษาค้นครั้งนี้ คือ ต้นอ่อนกล้วยไม้ดินหมุกกล้วยที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเลี้ยงบนอาหารสูตร VS (สัจพร, 2545) เติมน้ำตาลซูโครสปริมาณ 2% (w/v) น้ำมะพร้าว 15% (v/v) วัณ 6.5 กรัม/ลิตร pH เท่ากับ 5.8 และตั้งภายใต้ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที คัดเลือกต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงไว้จนต้นมีความสูง 2 ซม. มาใช้ในการทดลองนี้

การใช้สารโคลชิซินกับต้นอ่อนกล้วยไม้ดินหมุกกล้วย

นำต้นอ่อนกล้วยไม้ดินหมุกกล้วยที่มีความสูง 2 ซม. ซึ่งเตรียมไว้ลงเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมและไม่เติมโคลชิซินในระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.2% (สารโคลชิซินเตรียมในสารละลาย DMSO 2% และทำให้ปลอดเชื้อโดยวิธีการกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.2 μ m ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ) เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำต้นอ่อนเหล่านี้ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VS เป็นเวลา 4 เดือน โดยมีการย้ายเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกเดือนในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งมีอุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เมื่อต้นโตพร้อมย้ายปลูก นำขวดเพาะเลี้ยงออกมาปรับสภาพที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายปลูกลงในวัสดุปลูก vermiculite

การบันทึกผล

บันทึกผลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้หมุกกล้วย ซึ่งได้แก่ ความสูง ขนาดลำต้น จำนวนใบ จำนวนราก และความยาวราก จำนวนของปากใบต่อพื้นที่ 0.15 ตารางมิลลิเมตร วัดขนาด และความหนาของปากใบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบระดับ ploidy โดยวิธี flow cytometric analysis ด้วยเครื่อง flow cytometer และบันทึกผลของระดับ ploidy

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองพบว่าต้นกล้วยไม้ดินหมุกกล้วยมีการเจริญและพัฒนาที่แตกต่างกันไปตามกรรมวิธีที่ทดลอง โดยมีน้ำหนักสด ขนาดของลำต้น และความยาวรากแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกล่าวคือ ต้นกล้วยไม้ดินหมุกกล้วยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร VS ซึ่งเติมโคลชิซิน 0.1% นาน 72 ชั่วโมง และโคลชิซิน 0.2% นาน 48 ชั่วโมง มีน้ำหนักสดของต้นสูงสุดคือ 6.85 และ 5.35 กรัม ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนขนาดของลำต้นนั้นพบว่า ต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมโคลชิซิน 0.2% หรือเติม DMSO อย่างเดียว (ไม่มีโคลชิซิน)

นาน 72 ชั่วโมง มีขนาดลำต้นใหญ่ที่สุดและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีอื่นๆ ส่วนความยาวรากพบว่า ต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหาร VS ที่ไม่เติมโคลชิซินมีความยาวรากมากที่สุดอยู่ระหว่าง 1.4 ถึง 2.16 ซม. ไม่แตกต่างทางสถิติกับความยาวรากของต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมโคลชิซิน ส่วนต้นที่มีความยาวรากต่ำที่สุดคือ ต้นที่ได้รับโคลชิซิน 0.2% นาน 48 และ 72 ชั่วโมง ส่วนความสูงต้น จำนวนใบ และ จำนวนราก ไม่มีความแตกต่างทางสถิติทั้งในสภาพที่ได้รับหรือไม่ได้รับสารโคลชิซิน (Table 1)

เมื่อพิจารณาจำนวนของปากใบพบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติแต่มีแนวโน้มว่าการแช่ต้นอ่อนของกล้วยไม้ดินหมูกิ่งในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2% นาน 48 ชั่วโมง มีจำนวนปากใบน้อยที่สุดคือ 33.16

ปากใบ แต่ความหนาของปากใบพบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมโคลชิซิน 0.1% นาน 24 48 และ 72 ชั่วโมง และที่เติม 0.2% นาน 48 ชั่วโมง มีปากใบขนาดใหญ่ที่สุดซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติอยู่ที่ 40.37-34.21 μm ส่วนความหนาของปากใบไม่มีความแตกต่างทางด้านสถิติ (Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ชนิตา (2548) ที่ทำการทดลองกับกล้วยไม้ม้าวังที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร VW ที่เติมโคลชิซินความเข้มข้น 0.05% 0.10% 0.15% และ 0.20% เมื่อเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ พบว่าลักษณะปากใบโดยรวมมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบความยาวและความกว้างของปากใบที่ผิวใบด้านล่างของกล้วยไม้ม้าวังที่ความเข้มข้น 0.15% กับ control พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

Table 1 Effect of colchocine treatment on growth of *Eulophia andamanensis* Rchb.f. plantlets.

Treatment		fresh weight	height of plantlets	No.of leaf	size of stem	root length	No. of root
Culture medium	hour	(g)	(cm)		(cm)	(cm)	
VS + DMSO	24	2.78 de	4.60	5.66	0.77 a	2.16 a	3.00
VS +DMSO	48	4.14 bcd	4.50	5.33	0.70 ab	2.16 a	1.66
VS +DMSO	72	2.41 e	4.70	4.66	0.40 c	1.70 ab	2.66
VS	24	4.70 bc	4.00	4.66	0.66abc	1.56 abc	2.66
VS	48	2.65 de	5.50	5.33	0.60abc	1.40 abc	3.33
VS	72	3.60 cde	5.00	6.00	0.70 ab	1.43 abc	2.33
VS +DMSO+ C 0.1%	24	2.85 de	4.23	4.66	0.56abc	1.16 bc	3.66
VS +DMSO+ C 0.1%	48	5.21 b	7.23	4.33	0.50abc	0.86 bc	3.00
VS +DMSO+ C 0.1%	72	6.85 a	5.66	5.00	0.63abc	1.23 bc	4.66
VS +DMSO+ C 0.2%	24	2.55 e	4.76	4.66	0.53abc	1.36 abc	3.33
VS +DMSO+ C 0.2%	48	5.35 ab	4.33	4.33	0.53abc	0.80 c	2.66
VS +DMSO+ C 0.2%	72	3.25de	4.16	4.00	0.43 bc	0.76 c	2.33
F – Test		*	ns	ns	*	**	ns
C.V.(%)		30.61	24.82	16.70	18.74	24.55	35.80

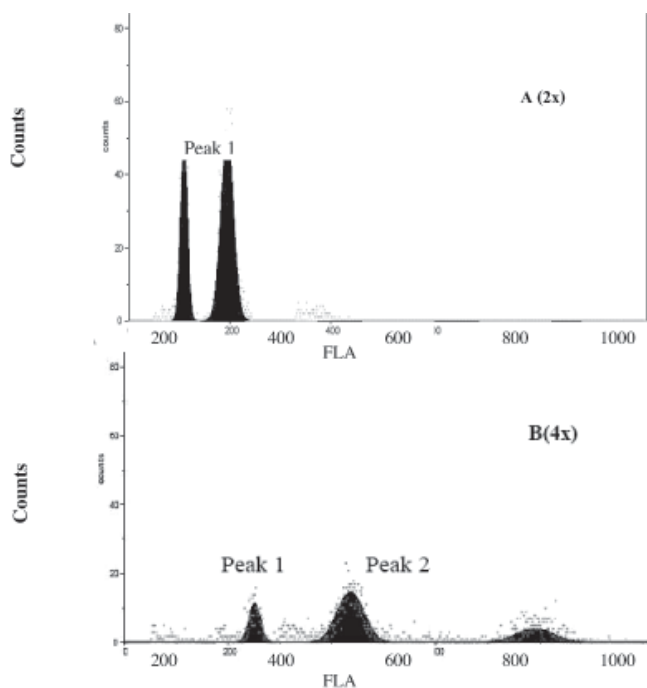
ns,*,** = not significant, significant at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively

*Significantly different ($P < 0.05$), ns=not significantly different **significantly different ($P < 0.01$)

Table 2 Effect of colchicine treatment on number, size and thickness of stomata of *Eulophia andamanensis* Rchb.f.

Treatment		Number of stomata	Size of stomata (μm)	Thickness of stomata (μm)
Culture medium	hour			
VS + DMSO	24	43.16	31.29 c	12.21
VS +DMSO	48	69.83	30.93 c	11.61
VS +DMSO	72	56.11	30.93 c	12.81
VS	24	44.33	35.19 abc	11.84
VS	48	63.83	32.53 bc	11.89
VS	72	51.50	32.69 bc	11.72
VS +DMSO+ C 0.1%	24	44.33	39.00 ab	13.33
VS +DMSO+ C 0.1%	48	52.44	36.89 abc	12.07
VS +DMSO+ C 0.1%	72	55.00	34.21 abc	12.05
VS +DMSO+ C 0.2%	24	59.99	30.23 c	12.48
VS +DMSO+ C 0.2%	48	33.16	40.37 a	14.66
VS +DMSO+ C 0.2%	72	70.66	30.80 c	11.09
F-test		ns	**	ns
C.V.(%)		5.72	8.26	11.11

ns,*,** = not significant, significant at $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively

**Fig. 1 Flow cytometric histograms of 2x, 4x plantlets of *Eulophia andamanensis* Rchb.f**

เมื่อตรวจวัดระดับ ploidy โดยวิธี flow cytometric analysis ด้วยเครื่อง flow cytometer โดยกำหนดให้ระดับของ peak ที่ 200 เป็นตัววัดค่ามาตรฐานของพืชที่เป็น diploid เมื่อนำใบอ่อนของกล้วยไม้ดินหมูกิ่งไปวัดระดับ ploidy ผลปรากฏว่าค่าของ peak อยู่ที่ระดับ 400 จากต้นกล้วยไม้ที่แช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1% นาน 24 ชั่วโมง (Fig.1) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Thao et al. (2003) ซึ่งแช่ต้นอ่อนของ *Alocasia* ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 0.01%, 0.05% และ 0.1% นาน 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.1% นาน 48 ชั่วโมง มีผลทำให้ต้น *Alocasia* มี peak อยู่ที่ flow cytometric สูงถึง 400 (channel)

ผลการตรวจวัดระดับ ploidy ของกล้วยไม้ดินหมูกิ่งนั้นพบว่าการใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0.1% นาน 24 หรือ 72 ชั่วโมง มีผลทำให้ได้ต้นที่เป็น tetraploid (4x) จำนวน 2 ต้นจากทั้งหมด 6 ต้น (Table 3) หรือ 33.33% และยังพบต้นที่เป็น 2x+4x อีก 1 ต้น ในจำนวน

3 ต้นจากกลุ่มที่ได้รับโคลชิซิน 0.1% นาน 48 ชั่วโมง ส่วนในกรรมวิธีที่เลี้ยงในอาหารที่เติมโคลชิซิน 0.2% นาน 24 48 และ 72 ชั่วโมง ไม่พบต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับ ploidy

ลักษณะของต้น tetraploid(4x) ที่ได้จากการแช่สารโคลชิซินนาน 24 ชั่วโมง มีขนาดของลำต้นและขนาดของปากใบ 39.00 ไมโครเมตร ซึ่งใหญ่กว่าต้น 2x ที่ไม่มีการใช้สารโคลชิซินซึ่งมีขนาด 32.53 ไมโครเมตร แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ส่วนต้น tetraploid (4x) ที่ได้จากกรรมวิธีเลี้ยงในสารโคลชิซิน 0.1% นาน 72 ชั่วโมงนั้น มีน้ำหนักสดมากกว่า (6.85 กรัม/ต้น) ในขณะที่ต้น 2x มีน้ำหนักสดเท่ากับ 3.60 กรัม/ต้น ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และขนาดของปากใบมีแนวโน้มใหญ่กว่าต้น 2x ส่วนต้นกล้วยไม้ดินหมูกิ่งที่เป็น 2x+4x พบว่าน้ำหนักและขนาดของปากใบไม่แตกต่างจากต้น 2x ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโคลชิซิน 0.1% นาน 24 ชั่วโมง และจากการสังเกตต้นที่ได้นี้มีลักษณะแกระแกรนด้วย

Table 3 Effects of colchicine treatment on alteration of ploidy level in *Eulophia andamanensis* Rchb.f.

Treatment		No. of plantlets examined	Ploidy segregation		
Colchicine	hour		2x	4x	2x+4x
VS+DMSO	24	3	3	0	0
VS+DMSO	48	3	3	0	0
VS+DMSO	72	3	3	0	0
VS	24	3	3	0	0
VS	48	3	3	0	0
VS	72	3	3	0	0
VS+DMSO+C 0.1%	24	3	1	1	1
VS+DMSO+C 0.1%	48	3	3	0	0
VS+DMSO+C 0.1%	72	3	2	1	0
VS+DMSO+C 0.2%	24	3	3	0	0
VS+DMSO+C 0.2%	48	3	3	0	0
VS+DMSO+C 0.2%	72	3	3	0	0

สรุป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอ่อนของกล้วยไม้ดินหมูกิ่งในอาหารสูตร VS ที่เติม 0.1% โคลชิซิน นาน 24 และ 72 ชั่วโมงพบต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงจาก 2x เป็น 4x ในอัตรา 33.33% โดยลักษณะของต้น 4x มีลักษณะบางอย่างที่ชี้ให้เห็นว่ามีขนาดใหญ่กว่าต้น 2x คือ ขนาดของลำต้น น้ำหนักสดของต้นและขนาดของปากใบ จากผลการทดลองอาจบ่งชี้ได้ว่าสารโคลชิซินทำให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับ ploidy ของกล้วยไม้ดินหมูกิ่งจาก 2x เป็น 4x และมีแนวโน้มที่จะได้ต้นอ่อนกล้วยไม้ดินหมูกิ่งที่ใหญ่ขึ้นเมื่อพิจารณาจากขนาดปากใบและน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นมากกว่าต้นที่เป็น 2x ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารโคลชิซินมาศึกษาเพิ่มเติมถึงการชักนำให้ได้ต้นกล้วยไม้ดินหมูกิ่งที่มีขนาดต้นหรือดอกใหญ่ขึ้นสำหรับนำไปใช้ในการปรับปรุงพัฒนาสายพันธุ์กล้วยไม้ดินหมูกิ่งสำหรับเป็นไม้กระถางต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ชนิดา ดังก้อง. 2548. การชักนำให้เกิด tetraploid ในกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สัจจพร จันทะวงษ์. 2545. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการงอกและพัฒนาของกล้วยไม้ดิน *Geodorum siamense* Rolfe ex Downie and *Habenaria dentate* (Sw.) Schltr. ในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุณีย์ ัญญโนทัย. ม.ป.ป. ไซเตสกับปัญหาการส่งออกพันธุ์พืชไทย. วารสารเคหการเกษตร 715 :159-162.
- อบฉันท ไทยทอง. 2546. กล้วยไม้เมืองไทย. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ.
- Thao, N.T.P., K. Ureshino, I. Miyajima, Y. Ozaki, and H. Okubo. 2003. Induction of tetraploid in ornamental *Alacasia* through colchicine and oryzakine treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72:19-25.