ผลของสารโคลชิซีนต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดเซลล์คุมของกล้วยไม้หวาย

Effect of Colchicine on Guard Cell Size of *Dendrobium sonia*

อรุณี ม่วงแก้วงาม, พรสวรรค์ เพชรรัตน์ และวิไลวัลย์ แก้วตาทิพย์

Arunee Muangkaewngam, Phonsawan Phetrat, and Wilaiwan Kaewtathip

คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

arunee.m@yru.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสารโคลชิซีนต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดเซลล์คุมของกล้วยไม้หวายมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบขนาดเซลล์คุมหลังจากได้รับสารโคลชิซีน ทำโดยการวางเลี้ยงต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซีน 5 ความเข้มข้น (0 50 100 150 และ 200 มก/ล) เป็นเวลา 60 นาที บนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ภายใต้การให้แสง 2,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ พบว่าจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมเพิ่มขึ้น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) การจุ่มแช่ต้นกล้วยไม้หวายในสารละลายโคลชิซีนความเข้มข้น 200 มก/ล ให้จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมเฉลี่ยสูงสุด 48.00 เม็ด/เซลล์ ความกว้างและความยาวของเซลล์คุมไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยความกว้างของเซลล์คุมเฉลี่ยสูงสุด 40.40 ไมโครเมตร และความยาวของเซลล์คุมเฉลี่ยสูงสุด 40.81 ไมโครเมตร

คำสำคัญ : โคลชิซีน, เซลล์คุม, กล้วยไม้หวาย, คลอโรพลาสต์

Abstract

The purpose of this research was to compare guard cell size of *Dendrobium sonia* leaf. It was investigated from culturing shoot treated with colchicine solution at 5 concentrations (0 50 100 150 and 200 mg/l) for 60 minutes. The shoots were transferred to MS medium without plant growth regulators. All culture were incubated at 25±2 °C under cool white fluorescent light at intensity of 2,000 lux for 4 weeks. The results revealed that the number of chloroplast in guard cells from plants treated with colchicine was significant higher than those of control. Colchicine at concentration of 200 mg/l gave the highest average number of chloroplast at 48.00 chloroplast/guard cell. There were not significantly different in width and length of guard cell after treated with colchicines. The average width and length of chloroplast were 40.40 µm and 40.81 µm respectively.

Keywords: Colchicine, Guard cell, Dendrobium sonia, Chloroplast

1. บทนำ

กล้วยไม้หวายโซเนีย (*Dendrobium sonia*) อยู่ในวงศ์ Orchidaceae ปัจจุบันมีมากกว่า 796 สกุล 19,000 ชนิด (1) กล้วยไม้เป็นไม้ดอกที่มีความสำคัญมากในตลาดโลก โดยมีมูลค่าประมาณ 400 ล้านเหรียญสหรัฐฯ ส่วนใหญ่เป็นกล้วยไม้เขตร้อน ผู้ส่งออกที่สำคัญได้แก่ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา เวียดนาม จีน และอินเดีย คิดเป็นร้อยละ 68.28 ของการส่งออกรวม ไทยเป็นผู้ส่งออกดอกกล้วยไม้อันดับ 1 ของโลก เนเธอร์แลนด์เป็นผู้ส่งออกต้นกล้วยไม้เป็นอันดับ 1 ของโลก พันธุ์ที่ส่งออกหลัก ได้แก่ สกุลหวาย

อะแรคนิส ออนซ์เดียมีและแวนด้า ผลผลิตกล้วยไม้ไทยเป็นการผลิตเพื่อส่งออกประมาณ 53% ผลิตเพื่อใช้ในประเทศ 47% ปัจจุบันมีผู้ส่งออกกล้วยไม้ไทยประมาณ 200 ราย และเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้ประมาณ 2,000 ราย แหล่งผลิต 5 อันดับแรก ได้แก่ นครปฐม สมุทรสาคร กรุงเทพ ราชบุรี และนนทบุรี คู่ค้าดอกกล้วยไม้ที่สำคัญ ได้แก่ ญี่ปุ่น อเมริกา เวียดนาม จีนและอิตาลี กล้วยไม้เป็นที่ต้องการของตลาดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การผลิตกล้วยไม้ของประเทศไทยมีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว การส่งออกดอกกล้วยไม้ในช่วงปี พ.ศ. 2564 มีปริมาณ 6,986 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่า 584.97 ล้านบาท อัตราการขยายตัวลดลง 0.07% ส่วนต้นกล้วยไม้มีปริมาณ 13,111 พันต้น คิดเป็นมูลค่า 243 ล้านบาท อัตราการขยายตัวเพิ่มขึ้น 96.98% เมื่อเทียบกับปี พ.ศ.2563 (2) แนวโน้มพฤติกรรมผู้บริโภคต่อสินค้ากล้วยไม้ในปัจจุบันพบว่าผู้บริโภคมีความต้องการดอกกล้วยไม้ที่มีคุณภาพและกล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่มีความหลากหลาย ดังนั้นเพื่อเป็นทางเลือกใหม่ให้ผู้บริโภค จึงมีการพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์และปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ให้มีลักษณะแตกต่างไปจากเดิม มีการใช้เทคนิคด้านเทคโนโลยีชีวภาพชักนำการกลายพันธุ์ในหลอดทดลองเพื่อเพิ่มความหลากหลายและขยายฐานพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย ช่วยให้สามารถปรับปรุงพันธุ์ได้รวดเร็วยิ่งขึ้น การชักนำการกลายพันธุ์โดยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพสามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยมคือการใช้สารก่อกลายพันธุ์ สารที่นิยมใช้คือสารโคลชิซีน เนื่องจากสารโคลชิซีนมีคุณสมบัติช่วยเพิ่มชุดโครโมโซมส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกิดการเปลี่ยนของเซลล์คุมทั้งปริมาณและขนาดและจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ เซลล์คุมเป็นเซลล์ที่มีการเปลี่ยนสภาพมาจากเอพิเดอร์มิสด้าน ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่อยู่ด้านท้องใบ กลุ่มเซลล์จะมีลักษณะคล้ายเอพิเดอร์มิสด้านบน แต่มีคิวติเคิลน้อย เซลล์คุมทำหน้าที่ควบคุมการคายน้ำ และการแลกเปลี่ยนก๊าซของพืชทางปากใบ ภายในเซลล์คุมมีเม็ดคลอโรพลาสต์ การชักนำให้พืชกลายพันธุ์โดยใช้สารโคลชิซีนจะส่งผลให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์คุมและจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะใช้เป็นดัชนีบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซม (3) ได้ มีงานทดลองใช้สารโคลชิซีนในดาหลาพบว่าจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารโคลชิซีน (3) สอดคล้องกับการทดลองในหน้าวัวที่จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารโคลชิซีนเพิ่มขึ้น และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้นตามจำนวนชุดโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น (4) มีการศึกษาผลของสารโคลชิซีนโดยนำโปรโตคอร์มของกล้วยไม้เอื้องเงินแช่สารละลายโคลชิซีน ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 และ 5 วัน พบว่าความเข้มข้น 0.50% ทำให้ความหนาและความยาวของปากใบของกล้วยไม้เอื้องเงินสูงสุด (5) สอดคล้องกับการนำต้นหยาดน้ำค้างจุ่มแช่ในสารโคลชิซีน นาน 1 และ 2 วัน พบว่าความกว้างและความยาวของปากใบเพิ่มขึ้น (6) นอกจากนี้ได้มีการทดลองใช้สารโคลชิซีนกับต้นแววมยุรา โดยการตัดใบที่มีก้านใบไปแช่ในสารละลายจากโคลชิซีนระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 0 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์ได้สูงสุด 23.33% ต้นเตตราพลอยด์มีขนาดใบ ขนาดตาดอก ความกว้างของปากดอก และความหนาใบมากกว่าต้นดิพพลอยด์ (7) นอกจากนี้ได้มีการใช้สารละลายโคลชิซีนในกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรชมพู (8) เพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้มีความหลากหลาย โดยใช้เนื้อเยื่อโพรโตคอร์มหลังจากงอก 1 เดือน แช่ในสารละลายโคลชิซีนเป็นเวลา 5 และ 10 วัน เมื่อย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารโคลชิซีน เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของชุดควบคุม 2n=2x=42 ส่วนที่แช่ในสารละลายโคลชิซีนเข้มข้น 0.05% และ 0.10% นาน 10 วัน มีจำนวนชุดโครโมโซม 2n=2x=42 และ 2n=4X=84

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารโคลชิซีนความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์คุมและจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม สามารถนำผลการทดลองที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ต่อไปในอนาคต

3. วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมชิ้นส่วนพืชทำโดยการนำฝักกล้วยไม้หวายโซเนียที่สุกแก่จุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ 95% และลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บริเวณผิวภายนอก จากนั้นใช้ใบมีดผ่าฝักกล้วยไม้และเขี่ยเมล็ดลงเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรMS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาล 3% และผงวุ้น 1% ภายใต้การให้แสง 2,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส หลังจากเมล็ดงอก 3 เดือน จึงนำต้นกล้วยไม้มาจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซีน 5 ความเข้มข้น (0 50 100 150 และ 200 มก/ล) เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงย้ายต้นกล้วยไม้หวายโซเนียมาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาล 3% และวุ้น 1% ภายใต้การให้แสง 2,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน นำใบกล้วยไม้หวายโซเนียใบล่างสุดมาตรวจนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม วัดความกว้างและความยาวของเซลล์คุมด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของสารโคลชิซีน

สถิติที่ใช้ในการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) แต่ละความเข้มข้นทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

4. ผลการศึกษาและการอภิปรายผล

เมื่อนำต้นกล้วยไม้หวายโซเนียที่ผ่านการจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซีน 5 ความเข้มข้น เป็นเวลา 60 นาที แล้ววางเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซีนที่เพิ่มขึ้น โดยสารโคลชิซีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.02%) ให้จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมเฉลี่ยสูงสุด 48.00 เม็ด/เซลล์ (ตารางที่ 1 รูปที่ 1) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง สอดคล้องกับงานวิจัยของอัญญาณี และสมปอง (4) ที่รายงานว่าการจุ่มแช่ nodular callus ของหน้าวัวพันธุ์ Micky Mouse ในสารละลายโคลชิซีนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยโคลชิซีนความเข้มข้น 0.02% จุ่มแช่ 72 ชั่วโมง มีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เฉลี่ยสูงสุด 39.06 เม็ด/เซลล์ นอกจากโคลชิซีนจะมีผลทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม โดยการไปยับยั้งกระบวนการสร้างหรือขัดขวางการทำหน้าที่ของ spindle fiber ภายในเซลล์แล้ว ยังส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชในด้านต่าง ๆ เช่น ใบมีขนาดใหญ่ขึ้น ใบมีสีเขียวเข้มและหนาขึ้น (9) เมื่อพิจารณาในส่วนของความกว้างและความยาวของเซลล์คุมจากการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซีน โคลชิซีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เซลล์คุมมีความกว้างเฉลี่ยสูงสุด 40.40 ไมโครเมตร และความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เซลล์คุมมีความยาวเฉลี่ยสูงสุด 40.81 ไมโครเมตร ผลที่ได้แตกต่างจากงานวิจัยของ ไซนีย๊ะ และคณะ (6) ซึ่งรายงานว่าความกว้างและความยาวของปากใบให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายหลังการจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซีนเข้มข้น 0.05 % เวลา 48 ชั่วโมง ทำให้ปากใบมีความกว้างสูงสุด 17.47 ไมโครเมตร และสารละลายโคลชิซีนความเข้มข้น 0.1 % เวลา 48 ชั่วโมง ชักนำให้ปากใบมีความยาวสูงสุด 18.47 ไมโครเมตร นอกจากนี้มีรายงานผลการแช่โปรโตคอร์มของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรดำเต็มคอในสารโคลชิซีน พบว่าโคลชิซีนความเข้มข้น 0.10% แช่นาน 3 วัน สามารถชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ได้ (10) ซึ่งความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซีนที่ใช้ในการทดลองกับกล้วยไม้หวายโซเนียต่ำกว่างานทดลองดังกล่าวข้างต้น จึงไม่ทำให้ขนาดของเซลล์คุมแตกต่างกันทางสถิติ จึงเห็นได้ว่าพืชแต่ละชนิดตอบสนองต่อสารโคลชิซีนแตกต่างกันทั้งระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการจุ่มแช่

5. สรุปผลการทดลอง

การจุ่มแช่ต้นกล้วยไม้หวายโซเนียในสารละลายโคลชิซีนความเข้มข้น 200 มก/ล ส่งผลให้จำนวนเม็ด

คลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้นเป็น 48 เม็ด/เซลล์ ส่วนความกว้างและความยาวของเซลล์คุมไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยความกว้างของเซลล์คุมเฉลี่ยสูงสุด 40.40 ไมโครเมตร และความยาวของเซลล์คุมเฉลี่ยสูงสุด 40.81 ไมโครเมตร

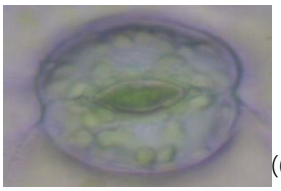
ตารางที่ 1 จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ ความกว้าง ความยาวของเซลล์คุมของกล้วยไม้หวายหลังจากจุ่มแช่ในสารโคลชิซีนความเข้มข้นต่าง ๆ

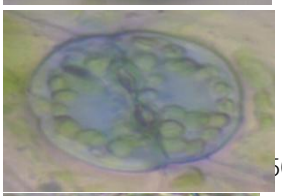
ความเข้มข้นของโคลชิซีน (มก/ล)	จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์	ความกว้างของเซลล์คุม (ไมโครเมตร)	ความยาวของเซลล์คุม (ไมโครเมตร)
0	29.44^{B}	34.92	38.90
50	31.33^{B}	34.36	34.07
100	32.66^{B}	38.75	40.81
150	36.78^{B}	38.68	33.50
200	48.00^{A}	40.42	38.95
F-test	**	ns	^{ns}
CV(%)	11.45	12.27	12.50

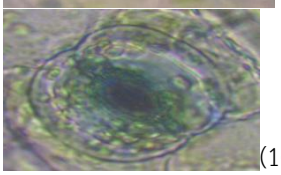
ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

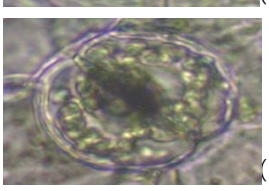
** หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.01)

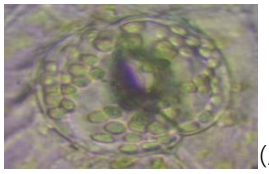
ตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันหมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT


(0)


50 มก/ล)


(100 มก/ล)


(150 มก/ล)


(200 มก/ล)

ภาพที่ 1 จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์จากใบกล้วยไม้หวายหลังจากจุ่มแช่ในสารโคลชิซีนความเข้มข้นต่าง ๆ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต อาจารย์ประจำคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อเสนอแนะที่ผู้วิจัยนำมาใช้จนสามารถดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ได้ตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

[1] ปณิธิ ยองประยูร. (2560). *สถานการณ์กล้วยไม้โลก.* เข้าถึงได้จาก http://www.ditp.go.th/contents_attach/165775.pdf [เข้าถึงเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2565].

[2] *สถานการณ์กล้วยไม้โลก.* เข้าถึงได้จาก: www.ditp.go.th/contents_attach/740010.pdf. [เข้าถึงเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2565].

[3] อรุณี ม่วงแก้วงาม และสมปอง เตชะโต. (2562). ผลของโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิตและลักษณะของเซลล์คุมของดาหลาในสภาวะปลอดเชื้อ. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์,* 6 (1): 13-18.

[4] อัญญาณี จันทร์ภัคดี และสมปอง เตชะโต. (2553). ผลของสารโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิตลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของหน้าวัวพันธุ์ Micky Mouse. *วารสารเกษตร,* 26: 15-25.

[5] รัชนี เพ็ชร์ช้าง. (2553). ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการให้โคลชิซีนต่อการเจริญและจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้เอื้องเงิน. *วารสารวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม,* 29: 413-419.

[6] ไซนีย๊ะ สะมาลา, หัสยา จันทร์สีดา และอรอนงค์ แซ่ฮั้น. (2558). ผลของสารโคลชิซินต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นหยาดน้ำค้างในหลอดทดลอง. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์,* 2: 24-28.

[7] ธัญญะ เตชะศีลพิทักษ์, เฌอมาลย์ วงศ์ชาวจันท์, อภิญญา สาตรา และณัฐพงศ์ จันจุฬา. (2559). การชักนำให้เกิดเตตราพลอยด์ในแววมยุราลูกผสมและการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยา. *Thai Journal of Science and Technology,* 5: 56-66.

[8] นิพนธ์ กิติดี, วีณัน บัณฑิตย์ และณัฐา โพธาภรณ์. (2564). การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรสีชมพูโดยใช้สารโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ. *วารสารเกษตร,* 37 (1): 15-26.

[9] สันติ ช่างเจรจา และรุ่งนภา ช่างเจรจา. (2557). ผลของความเข้มข้นของโคลชิซีนต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย. *วารสารแก่นเกษตร,* 42: 8-11.

[10] ปฐมาภรณ์ ทิลารักษ์ และสาโรจน์ ประเสริฐ ศิริวัฒน์. (2557). ผลของโคลชิซินต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้เหลืองจันทบูรดำเต็มคอ (*Dendrobium friedericksianum* Rchb.f var. oculatum). *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี,* 16: 61-68.