# บทที่ 5

## วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของกล้วยไม้ *Phalaenopsis amabilis* และ *P. parishii* เพื่อหาปัจจัยที่ส่งเสริมการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศให้ได้ต้นพันธุ์ดีในปริมาณที่มาก และหาระดับของสารละลายโคลชิซินและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ *P. amabilis* และ *P. parishii* เพื่อประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อการค้า และใช้ประโยชน์ด้านการปรับปรุงพันธุ์ พบว่า

### 1 การชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้โดยสูตรอาหารที่เหมาะสม

1.1 สูตรอาหารพื้นฐานและระดับน้ำตาลที่เหมาะสมต่อชิ้นส่วนใบอ่อนของกล้วยไม้ *P. amabilis* และ *P. parishii*

ผลการศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานและระดับน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนของกล้วยไม้ทั้งสองชนิดพบว่า ชิ้นส่วนของใบอ่อนทุกกรรมวิธีสามารถอยู่รอดได้เนื่องจาก อาหารที่เลี้ยงมีการให้ธาตุอาหารหลักและน้ำตาลที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช แม้ในกรรมวิธีที่ไม่ได้เติมน้ำตาล ชิ้นส่วนพืชก็สามารถอยู่รอดได้เนื่องจากน้ำมะพร้าวมีน้ำตาลเป็นส่ วนประกอบอยู่ด้วย (รังสฤษดิ์, 2545)

อย่างไรก็ตาม ชิ้นส่วนใบอ่อนของกล้วยไม้ทั้งสองชนิดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 สัปดาห์ มีสีที่แตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหารพื้นฐานที่แตกต่างกัน เนื่องจากสูตรอาหารพื้นฐานมีส่วนประกอบของปริมาณธาตุอาหารหลักที่แตกต่างกัน (ตารางภาคผนวกที่ 1, 2 และ 3) สีที่เขียวเข้มขึ้น เนื่องมาจากอาหารพื้นฐานสูตร MS และ SH มีปริมาณ $KNO_3$ ที่ มากกว่าอาหารพื้นฐานสูตร CMU1 สาร $KNO_3$ ให้ไนโตรเจน (N) ที่เป็นธาตุอาหารที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของยอด ใบ และเป็นองค์ประกอบในของพืช และพืชสามารถนำไนโตรเจนในรูป $NO_3^-$ ไปใช้ในกระบวนการภายในพืชได้เลย (สมบุญ, 2538) นอกจากนี้อาหารพื้นฐานสูตร MS และ SH เกิดสารสีดำคล้ำบนอาหารเลี้ยง ที่เป็นสารจำพวก phenolic conpound ที่พืชปล่อยออกมา เมื่อเกิดสารสะสมจะเกิดเป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยง จึงเลือกอาหารหลักสูตร CMU1 มาใช้ในการทดลองที่ 1.2 ที่เติม สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนินเพื่อกระตุ้นให้เกิด PLB

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 การชักนำการเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้

ผลการศึกษาการชักนำการเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ จากชิ้นส่วนใบอ่อนของกล้วยไม้ทั้งสองชนิดพบว่า สามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้จากใบอ่อนของกล้วยไม้ *P. amabilis* ได้โดยมี 4 กรรมวิธี จากการทดลองที่ 1.2.1 จากการศึกษาในครั้งนี้ธาตุอาหารหลักสูตร 1/2 CMU1 เท่านั้นที่สามารถเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ได้ คือ กรรมวิธีที่ 6 ที่มี NAA 0.1 มก./ล. และ TDZ 0.1 มก./ล. เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้จำนวนเฉลี่ย 1.2 โปรโตคอร์ม กรรมวิธีที่ 7 NAA 0.1 มก./ล. และ TDZ 0.1 มก./ล. เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้จำนวนเฉลี่ย 0.1 โปรโตคอร์ม กรรมวิธีที่ 10 NAA 1.0 มก./ล. และ TDZ 0.1มก./ล. เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้จำนวนเฉลี่ย 0.6 โปรโตคอร์ม และกรรมวิธีที่ 11 NAA 1.0 มก./ล. และ TDZ 1.0 มก./ล. เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ จำนวนเฉลี่ย 0.5 โปรโตคอร์ม เห็นได้ว่า NAA และ TDZ จำเป็นสำหรับการสร้าง โปรโตคอร์มไลค์บอดี้แต่ NAA และ TDZ ที่เหมาะสมอยู่ที่ความเข้มข้นต่ำคือ NAA 0.1 มก./ล. และ TDZ 0.1 มก./ล. และในทุกกรรมวิธีสามารถสังเกตเห็นโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ได้ชัดเจนเมื่ออายุ 15 สัปดาห์ แต่ในกรรมวิธีที่ให้อาหารหลักสูตร CMU1 ไม่มีการเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากชิ้นส่วนใบที่นำมาเลี้ยงเป็นส่วนที่อ่อน การให้ธาตุอาหารหลักแบบเต็มสูตร อาจมากเกินความต้องการของเซลล์ที่นำไปใช้ในการเติบโตและส่วนที่เกินนั้น อาจมีผลไปยับยั้งกระบวนการอื่นๆได้ (ลิลลี่, 2546)

ทั้งนี้มีรายงานว่าไซโตไคนินและออกซินในความเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งการเจริญเติบโต และกระบวนการต่าง ๆ ภายในต้นของพืช (ดนัย, 2539) สำหรับการชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น NAA 0.1 มก./ล. และ TDZ 0.1มก./ล. มีการชักนำให้เกิดโปรโตคอร์ม-ไลค์บอดี้มากที่สุดคือ 1.2 โปรโตคอร์ม ซึ่งให้จำนวนโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่มากกว่ากรรมวิธีมีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากทั้ง NAA และ TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของส่วนต่าง ๆ รวมถึงยอดด้วยด้วย เมื่อสัดส่วนของออกซินและไซโตไคนินมีความพอดีที่บริเวณใบจึงมีการชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ขึ้นมาได้ แต่ในการทดลอง 1.2.2 ที่ใช้ TDZ และ 2,4-D การทดลอง 1.2.3 ที่ใช้ BA และ NAA และ การทดลอง 1.2.4 ที่ใช้ BA และ 2,4-D นั้นไม่มีไม่มีการเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้อาจเนื่องมาจากชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสัดส่วนที่ใช้ยังไม่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการเกิด PLB

ในกล้วยไม้ *P. parishii* ไม่สามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ได้ อาจเนื่องชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ยังทำงานร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ภายในพืชเองไม่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เพราะในระดับพันธุกรรมพืชต่างชนิดและ/หรือต่างพันธุ์ตอบสนองต่อชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสัดส่วนที่แตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ออกไป อาจเป็นการแสดงออกของยีนในการควบคุมความไวในการตอบสนอง (sensitivity regulation) (นิตย์, 2542)

**2 การกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน**

การศึกษาเทคนิคและวิธีการที่เหมาะสม ในการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ *P. amabilis* และ *P. parishii* จากโปรโตคอร์มที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าระดับของสารละลายโคลชิซินมีผลต่ออัตราการรอดของโปรโตคอร์มในสภาพปลอดเชื้อ เกิดต้นที่มีลักษณะทางสัณฐานเปลี่ยนแปลงไป ในกรรมวิธีควบคุมโปรโตคอร์มมีอัตราการรอดมากที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ มากกว่ากรรมวิธีที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน เมื่อความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินเพิ่มมากขึ้น อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มลดลง ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่ใช้ คือ 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 วัน อัตราการรอดชีวิตมากที่สุด แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดจำนวนโครโมโซม ในขณะที่การใช้ สารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วันสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดจำนวนโครโมโซมจาก 2n = 2x =38 เป็น 2n = 4x = 76 ซึ่งความเข้มข้นที่ เหมาะสมเพื่อใช้ในการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมกล้วยไม้ *P. amabilis* ต่างจากการศึกษาของกล้วยไม้ชนิดอื่น ในกล้วยไม้ซิมบิเดียมมีการรายงานโดย Kim *et al.* (1997) พบว่า การให้ โคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในกล้วยไม้ *Cymbidium* sp. ‘Silky’ มีผลต่ออัตราการตายของโปรโตคอร์มมากที่สุด และกล้วยไม้สกุลอะแรนด้าสามารถชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์โดยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (มลวิภา, 2521)

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ *P. amabilis* ที่มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเป็น 4x พบว่า ต้นที่มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม มีใบหนาแข็ง รากอวบใหญ่ และลำต้นสั้นกว่าต้นที่ไม่ได้รับโคลชิซิน นอกจากนี้มียังผลต่อขนาดและจำนวนปากใบของ ต้นอีกด้วย กล่าวคือ ขนาดของปากใบของต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าปากใบของต้นปกติ ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีจำนวนปากใบลดลงกว่าต้นปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของพื้นที่ใบเท่ากัน สอดคล้องกับการรายงานของ ชุติมันต์ (2549) ที่ทำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของฝ้าย พบว่าฝ้ายที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นมีขนาดใบใหญ่กว่า ใบมีสีเขียวเข้มกว่า และขนาดปากใบมีขนาดใหญ่กว่าต้นปกติ โดยที่ปากใบของต้นที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นมีขนาดปากใบ เท่ากับ 22 × 23 ไมโครเมตร เปรียบเทียบกับพันธุ์พื้นเมืองที่มีขนาดปากใบ 17.5 × 22.5 ไมโครเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**3 การศึกษาจำนวนโครโมโซม**

การศึกษาเทคนิคการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้ *P. amabilis* เพื่อให้พบเซลล์ที่อยู่ในระหว่างการแบ่งตัวแบบไมโตซิสในระยะเมตาเฟส ซึ่งช่วยให้การหาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ *P. amabilis* เป็นไปอย่างถูกต้องและรวดเร็ว ซึ่งการได้เซลล์ดังกล่าวนั้นมีปัจจัยผันแปรหลายปัจจัย การศึกษาปัจจัยต่างๆได้แก่ ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างปลายราก ช่วงเวลาในการหยุดวงชีพเซลล์ ช่วงเวลาในการย่อยเซลล์ และตลอดจนช่วงเวลาในการย้อมสีเซลล์ ซึ่งพบว่าเทคนิคที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายราก คือ การเก็บตัวอย่างปลายรากในเวลา 8.00 น. คล้ายกับการเตรียมเนื้อเยื่อปลายรากของ กล้วยไม้ชนิดอื่น คือ การเก็บตัวอย่างปลายรากเวลา 8.00 น. ใน *Calanthe cardioglossa* Schltr. (จารุวรรณ, 2550) แต่ในบางชนิดสามารถเก็บในช่วงเวลา 11.00 น. แล้วได้ผลดี เช่น *Geodorum recurvum* (Roxb.) Alston และ *G. siamense* Rolfe ex Downie (ศลิษา, 2549) *Eulophia graminea* Lindl. (จารุภัทร, 2549) หยุดวงชีพเซลล์ในสารละลาย PDB เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาใกล้เคียงกับที่ใช้ในการหยุดวงชีพเซลล์ ใกล้เคียง กับที่ใช้กับเอื้องดินใบหมาก ซึ่งแช่ปลายรากในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ นาน 10 ชั่วโมง (วีรภัทรา, 2552) จากนั้นย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริค 1 นอร์มอล นาน 2 นาที ก่อนนำไปย้อมด้วยสี carbol fuchsin นาน 2 ชั่วโมง โดยเทคนิคดังกล่าวใช้ได้ผลดีกับปลายรากของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* ที่เลี้ยงอยู่บนอาหารสังเคราะห์ในขวดแก้วภาพใต้สภาพโรงเรือน อาจเนื่องจากบนอาหารสังเคราะห์ในขวดแก้วรากฉ่ำน้ำมากกว่าต้นที่เลี้ยงในสภาพโรงเรือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved