วรภัทร ขันโคกกรวด : การงอกของเมล็ดและการขักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยใช้สารโคลชิชินใน ว่านอึ่งอ่าง Eulophia bicallosa (D.Don) P.F.Hunt & Summerh. (SEED GERMINATION AND POLYPLOID INDUCTION USING COLCHICINE IN Eulophia bicallosa (D.Don) P.F.Hunt & Summerh.) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.หนูเดือน เมืองแสน, 128 หน้า

คำสำคัญ: การงอกของเมล็ดกล้วยไม้, การชักนำโพลีพลอยด์, ว่านอึ่งอ่าง, โคลชิซิน, โซเดียม ไฮโปคลอ ไรท์, การทดสอบความมีชีวิตของเมล็ด

ว่านอึ่งอ่าง (Eulophia bicallosa (D.Don) P.F.Hunt & Summerh.) เป็นกล้วยไม้ดินที่มีดอก สีเขียวอ่อนหรือสีครีมแต้มด้วยจุดสีม่วง <mark>ปัจจุบั</mark>นจัดอยู่ในกลุ่มกล้วยไม้ใกล้ถูกคุกคามในประเทศ ออสเตรเลีย ส่วนในประเทศไทย จัดว่าเ<mark>ป็</mark>นพืชห<mark>า</mark>ยากเนื่องจากพบประชากรเพียงสองกลุ่มเท่านั้น จุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อ 1) <mark>ศึกษาผลของค</mark>วามเข้มข้นและระยะเวลาในการพ่อกเมล็ดใน สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อก<mark>ารมี</mark>ชีวิตและก<mark>ารงอ</mark>กของเมล็ด 2) ศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยง ชนิดต่าง ๆ ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ด แล<mark>ะ 3</mark>) ศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลา ในการให้สารโคลชิซินต่อการก<mark>ระต</mark>ุ้นให้เกิดโพลีพลอยด์ในว่า<mark>น</mark>อึ่งอ่าง ในการศึกษาผลของสารละลาย โซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อการม**ี**ชีวิต<mark>และกา</mark>รงอกของเมล็ด ผู้วิจ<mark>ั</mark>ยได้ทำการทดลองโดยการฟอกเมล็ดใน สารละลายโซเดียมไฮโปค<mark>ลอไ</mark>รท์ที่ความเข้มข้น 0%, 0.5% และ 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นระยะเวลา 1 5 และ 10 นาที จากนั้<mark>นแบ่</mark>งเมล็ดที่ผ่านการฟอกเป็นสองส่วน <mark>ส่วนห</mark>นึ่งนำไปทดสอบร้อยละการมีชีวิต ด้วยสารละลายที่ที่ซี่เข้ม<mark>ข้น 1% (1% TTC) อีกส่วนนำไปทดสอ</mark>บการงอกโดยนำไปเพาะบนอาหาร เพาะเลี้ยงสูตร VW ป็นเวลา 4 <mark>สัปดาห์ จากนั้นทำการเลือก</mark>ขุดทดลองที่ดีที่สุดจากร้อยละการมีชีวิตของ เมล็ด ร้อยละการงอกของเมล็ด และความสามารถในการควบคุมการปนเปื้อน ในการศึกษาผลของอาหาร เพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ด ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพาะเมล็ดลงบน อาหารเพาะเลี้ยง 6 ชนิดได้แก่ MM, ½ MM, MS, ½ MS, VW และ ½ VW จากนั้นทำการเก็บผลร้อยละ ของการงอกและร้อยละของโปรโตคอร์มในระยะต่าง ๆ ทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน แล้วทำการเลือก อาหารเพาะเลี้ยงที่ดีที่สุดจากสูตรอาหารที่ให้ผลร้อยละการงอกและโปรโตคอร์มที่ระยะสูงสุด ใน การศึกษาผลของสารโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตและปริมาณดีเอ็นเอ ผู้วิจัยได้นำโปรโตคอร์มอายุ 5 เดือนไปแช่ในสารละลายโคลชิชินความเข้มข้น 0%, 0.025%, 0.05% และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 3 เดือน จดบันทึกพัฒนาการของ โปรโตคอร์ม จำนวนยอดต่อโปรโตคอร์ม ความยาวของยอดและราก ร้อยละการมีชีวิต และเมื่อครบ 3 เดือนทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟไซโตมิเตอร์ วัดขนาดความกว้างความยาวของปากใบ นับ จำนวนเซลล์ผิวใบและจำนวนปากใบต่อพื้นที่ ผลการทดลองพบว่า เมล็ดที่ผ่านการฟอกแล้วนำไปเพาะ

บนอาหารสูตร VW เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าเมล็ดที่ผ่านการพ่อกในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ ความเข้มข้น 0.5% นาน 5 หรือ 10 นาที ให้ผลร้อยละการรอดชีวิตที่ 62.06 และ 59.10 และให้ผลร้อย ละการงอกที่ 58.89 และ 58.42 ตามลำดับโดยไม่มีการปนเปื้อน ส่วนเมล็ดที่ผ่านการฟอกด้วย สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 0.5% หรือ 1.0% นาน 1 นาที ให้ผลร้อยละการรอดชีวิต และการงอกที่สูงกว่า 2 ชุดทดลองที่กล่าวไปแต่มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนที่สูงกว่า ส่วนเมล็ดที่ผ่านการ ฟอกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 1.0% นาน 5 หรือ 10 นาทีส่งผลให้ร้อยละการ รอดชีวิตและการงอกลดลง ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจพบโปรโตคอร์มที่ระยะพัฒนาการต่าง ๆ ดังนี้ ระยะ 1 เอ็มบริโอเกิดการบวม ระยะ 2 เอ็มบริโอขยายขนาดมากขึ้นจนเปลือกเมล็ดแตกออกและระยะ 3 เอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสีเขียวและขยายขนาดขึ้<mark>นเ</mark>ป็นอย่างมาก จากการทดลองผลของอาหารเพาะเลี้ยง ชนิดต่าง ๆ ต่อการงอกและเจริญเติบโตขอ<mark>งเมล็</mark>ดพบว่า อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS และ ½ MS ให้ผล การงอกสูงสุดคือ 92.88  $\pm$  7.02% และ 89.21  $\pm$  2.41% และให้โปรโตคอร์มระยะที่สามสูงสุดคือ 91.40  $\pm$  8.60% และ 89.21  $\pm$  2.41% ตามลำดับ รองลงมาเป็นอาหารเพาะเลี้ยง MM½, MM. VW และ ½VW ที่ให้ผลร้อยละการงอกและโปรโตคอร์มระยะที่สา<mark>มตา</mark>มลำดับ สำหรับผลของโคลชิซิน พบว่าที่ความ เข้มข้น 0.025% และ 0.05% โคลชิซิ<mark>นไม่ส่งผลต่อร้<mark>อยล</mark>ะการรอดชีวิตและพัฒนาการของโปรโตคอร์ม</mark> ส่วนโปรโตคอร์มที่ได้รับสารโคล<mark>ซิซิน</mark>ที่ความเข้มข้น 0.<mark>1%</mark> พบว่ามีการลดลงของร้อยละการรอดชีวิต เล็กน้อยเหลือ 88.33 พืชที่ได้รั<mark>บโคล</mark>ชิชินที่ความเข้มข้น 0.<mark>05%</mark> มีการพัฒนายอดและรากดีที่สุดในเดือน ที่ 3 นับหลังจากการได้รับสารโคลชิซิน โดยพบว่าพืชในชุดทดลองนี้ ให้จำนวนยอดต่อต้นเฉลี่ยสูงสุด (1.24 ยอด) ให้ความยาว<mark>ของ</mark>ยอ<mark>ดเฉลี่ยสูงสุด (4.15 ซม.) ให้ร้</mark>อย<mark>ละก</mark>ารซักนำยอดเฉลี่ยสูงสุด (35.33%) ให้ความยาวของรากเฉล<mark>ี่ยสูงสุ</mark>ด (2.51 ซม.) ให้ร้อยละการชักน<mark>ำรากเฉ</mark>ลี่ยสูงสุด (21.67%) นอกจากนี้ยัง พบการขยายตัวของปากใ<mark>บและเซลล์ผิวในพืชที่ได้รับโคลชิซิน โดย</mark>พบว่าที่ความเข้มข้น 0.025% พืชมี ้ จำนวนเซลล์ผิวใบต่อพื้นที่เฉล<mark>ี่ยที่ 43.78 เซลล์ต่อ 0.1 mm² ซึ่ง</mark>น้อยกว่าชดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และ ที่ความเข็มข้น 0.05% พืชมีขนาดความยาวปากใบเฉลี่ยที่ 36.32 ไมโครเมตร และกว้างเฉลี่ยที่ 30.41 ไมโครเมตร ซึ่งใหญ่กว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนของปริมาณดีเอ็นเอพบว่ามีการเพิ่มขึ้นในพืชที่ ได้รับโคลชิชินที่ความเข็มข้น 0.05% และ 0.1% โดยมีการพบกลุ่มประชากรของเซลล์ที่มีปริมาณดีเอ็นเอ อยู่ประมาณ 4C-8C เทียบกับพีชที่ไม่ได้รับโคลชิซิน (ชุดควบคุม) ซึ่งพบปริมาณดีเอ็นเอ 2C, 2C-4C และ 4C

สาขาวิชาชีววิทยา ปีการศึกษา 2566 ลายมือชื่อนักศึกษา <u>25 กับร</u> ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา **ป**ัน **อากา**  WORAPHAT KHANKHOKKRUAD: SEED GERMINATION AND POLYPLOID INDUCTION USING COLCHICINE IN *Eulophia bicallosa* (D.Don) P.F.Hunt & Summerh. THESIS ADVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR NOODUAN MUANGSAN, Ph.D. 128 PP.

Keywords: orchid seed germination, polyploid induction, *Eulophia bicallosa*, colchicine, sodium hypochlorite, seed viability test

Eulophia biocallosa (D.Don), a terrestrial orchid having flowers that are light green or cream in color flowers with purplish markings, is considered a near-threatened species in Australia. It is also recognized as a rare species in Thailand since just two populations have been reported so far. The objectives of this thesis were to 1) investigate the effect of various Na(OCl) concentrations and durations on viability and seed germination, 2) investigate the effect of various media on seed germination and growth of E. bicallosa s' seeds, and 3) investigate the effect of colchicine concentration and duration on polyploid induction of E. bicallosa. The seeds were treated with Na(OCl) at three concentrations (0.0, 0.5, and 1.0% (w/v)) and three durations (1, 5, and 10 min). After that, 1% TTC was employed for the viability test. Sterilized seeds were then cultured on Vacin and Went (VW) media for four weeks. The optimal condition was chosen based on the percentage of seed viability, seed germination, and a presence of contamination. To investigate the effect of various media on seed germination and growth, seeds of E. bicallosa were cultured on six different types of media (MM, ½ MM, MS, ½ MS, VW, and ½ VW). Seed germination and protocorm development were recorded monthly for 3 months, and the optimal medium was chosen based on the percentage of seed germination and the most advanced seed development stage. To investigate the effect of colchicine on orchid plants, 5-month-old protocorms were treated with four different concentrations of colchicine (0, 0.025, 0.05, and 0.1 (w/v)) for 24 hours and continue cultured on MS medium. The protocorm development, the number of shoots per protocorm, the length of root and shoot, and the survival rate were examined monthly for 3 months. The length and width of stomata, the number of stomata and leaf epidermal cells, and the DNA content were also examined using flow cytometry in the 3<sup>rd</sup> month of culture. The result revealed that, after four weeks of sowing, seed treatments with 0.5% (w/v) Na(OCl) for 5

min and 0.5% (w/v) Na(OCl) for 10 min resulted in high seed viability of 62.06% and 59.10%, respectively, along with seed germination rates of 58.89% and 58.42%, without any contamination. However, seed treatments with 0.5% or 1% (w/v) Na(OCl) concentrations for 1 min resulted in increased seed germination and seed viability but also resulted in contamination. Prolonged treatments (5 min or 10 min) with 1% (w/v) of Na(OCl) caused a decline in seed viability and germination. The development of E. bicallosa seeds was observed through 3 Stages including Stage 1; embryo swelling, Stage 2; embryo getting bigger and rupture of the testa, and Stage 3; where the embryo turned green. For the effect of various media on seed germination and growth, MS and 1/2MS gave the highest percentage of seed germination with 92.88 ± 7.02% and 89.21 ± 2.41%, respectively, and the highest percentage of Stage 3 development seeds with 91.40  $\pm$ 8.60% and 89.21 ± 2.41 respectively followed by MM, ½MM, VW, and ½VW media. For the effect of colchicine treatments, 0.025% and 0.05% colchicine treatments did not affect the survival rate and protocorm development. However, a slight decrease in the survival rate to 88.33% was observed in the 0.1% colchicine treatment. Plants treated with 0.05% colchicine exhibited the greatest shoot and development in the third month after treatment, with the highest average shoots per plant (1.24 shoots per plant), average length of shoot (4.15 cm), average shoot induction percentage (35.33%), average length of root (2.51 cm), and average root induction percentage (21.67%). The size of stomata and leaf epidermal cells also increased due to the effect of colchicine. Plants treated with 0.025% colchicine had a significantly lower number of leaf epidermal cells per area (43.78 cells per 0.1 mm<sup>2</sup>) than plants in the control treatment, and plants treated with 0.05% colchicine had significantly longer stomatal length (36.32 µm) and width (30.41 µm)For the effect of colchicine on DNA content, plants treated with 0.05% and 0.1% colchicine possessed a population of cells with 4C-8C DNA content, while non-colchicine treatment cells (control) possessed 2C, 2C-4C, and 4C DNA content.

School of Biology Academic year 2023 Student's Signature วรกุฬ Advisor's Signature นั้นก่อน มีออกกา