

วรภัทร ชันโคกกรวด : การงอกของเมล็ดและการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยใช้สารโคลชิซินใน  
ว่านอิงอ่าง *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, ว่านอิงอ่าง, โคลชิซิน, โซเดียม ไฮโปคลอไรท์, การทดสอบความมีชีวิตของเมล็ด

ว่านอิงอ่าง (*Eulophia bicallosa* (D.Don) P.F.Hunt & Summerh.) เป็นกล้วยไม้ดินที่มีดอกสีเขียวอ่อนหรือสีครีมแต้มด้วยจุดสีม่วง ปัจจุบันจัดอยู่ในกลุ่มกล้วยไม้ใกล้ถูกคุกคามในประเทศออสเตรเลีย ส่วนในประเทศไทย จัดว่าเป็นพืชหายากเนื่องจากพบประชากรเพียงสองกลุ่มเท่านั้น จุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อ 1) ศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาในการพอกเมล็ดในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อการมีชีวิตและการงอกของเมล็ด 2) ศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ด และ 3) ศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาในการให้สารโคลชิซินต่อการกระตุ้นให้เกิดโพลีพลอยด์ในว่านอิงอ่าง ในการศึกษาผลของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อการมีชีวิตและการงอกของเมล็ด ผู้วิจัยได้ทำการทดลองโดยการพอกเมล็ดในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 0%, 0.5% และ 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นระยะเวลา 15 และ 10 นาที จากนั้นแบ่งเมล็ดที่ผ่านการพอกเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งนำไปทดสอบร้อยละการมีชีวิตด้วยสารละลายทีซีเข้มข้น 1% (1% TTC) อีกส่วนนำไปทดสอบการงอกโดยนำไปเพาะบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร VW เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นทำการเลือกชุดทดลองที่ดีที่สุดจากร้อยละการมีชีวิตของเมล็ด ร้อยละการงอกของเมล็ด และความสามารถในการควบคุมการปนเปื้อน ในการศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ด ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพาะเมล็ดลงบนอาหารเพาะเลี้ยง 6 ชนิดได้แก่ MM, ½ MM, MS, ½ MS, VW และ ½ VW จากนั้นทำการเก็บผลร้อยละของการงอกและร้อยละของโปรโตคอร์มในระยะต่าง ๆ ทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน แล้วทำการเลือกอาหารเพาะเลี้ยงที่ดีที่สุดจากสูตรอาหารที่ให้ผลร้อยละการงอกและโปรโตคอร์มที่ระยะสูงสุด ในการศึกษาผลของสารโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตและปริมาณดีเอ็นเอ ผู้วิจัยได้นำโปรโตคอร์มอายุ 5 เดือนไปแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0%, 0.025%, 0.05% และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 3 เดือน จัดบันทึกพัฒนาการของโปรโตคอร์ม จำนวนยอดต่อโปรโตคอร์ม ความยาวของยอดและราก ร้อยละการมีชีวิต และเมื่อครบ 3 เดือนทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลโวลูมิเตอร์ วัดขนาดความกว้างความยาวของปากใบ นับจำนวนเซลล์ผิวใบและจำนวนปากใบต่อพื้นที่ ผลการทดลองพบว่า เมล็ดที่ผ่านการพอกแล้วนำไปเพาะ

บนอาหารสูตร VW เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าเมล็ดที่ผ่านการพอกในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 0.5% นาน 5 หรือ 10 นาที ให้ผลร้อยละการรอดชีวิตที่ 62.06 และ 59.10 และให้ผลร้อยละการงอกที่ 58.89 และ 58.42 ตามลำดับโดยไม่มีการปนเปื้อน ส่วนเมล็ดที่ผ่านการพอกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 0.5% หรือ 1.0% นาน 1 นาที ให้ผลร้อยละการรอดชีวิตและการงอกที่สูงกว่า 2 ชุดทดลองที่กล่าวไปแต่มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนที่สูงกว่า ส่วนเมล็ดที่ผ่านการพอกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 1.0% นาน 5 หรือ 10 นาทีส่งผลให้ร้อยละการรอดชีวิตและการงอกลดลง ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจพบโปรโตคอร์มที่ระยะพัฒนาการต่าง ๆ ดังนี้ ระยะ 1 เอ็มบริโอเกิดการบวม ระยะ 2 เอ็มบริโอขยายขนาดมากขึ้นจนเปลือกเมล็ดแตกออกและระยะ 3 เอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสีเขียวและขยายขนาดขึ้นเป็นอย่างมาก จากการทดลองผลของอาหารเพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ ต่อการงอกและเจริญเติบโตของเมล็ดพบว่า อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS และ  $\frac{1}{2}$  MS ให้ผลการงอกสูงสุดคือ  $92.88 \pm 7.02\%$  และ  $89.21 \pm 2.41\%$  และให้โปรโตคอร์มระยะที่สามสูงสุดคือ  $91.40 \pm 8.60\%$  และ  $89.21 \pm 2.41\%$  ตามลำดับ รองลงมาเป็นอาหารเพาะเลี้ยง MM $\frac{1}{2}$ , MM, VW และ  $\frac{1}{2}$ VW ที่ให้ผลร้อยละการงอกและโปรโตคอร์มระยะที่สามตามลำดับ สำหรับผลของโคลชิซิน พบว่าที่ความเข้มข้น 0.025% และ 0.05% โคลชิซินไม่ส่งผลต่อร้อยละการรอดชีวิตและพัฒนาการของโปรโตคอร์ม ส่วนโปรโตคอร์มที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.1% พบว่ามีการลดลงของร้อยละการรอดชีวิตเล็กน้อยเหลือ 88.33 พืชที่ได้รับโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.05% มีการพัฒนารากและรากดีที่สุดในเดือนที่ 3 นับหลังจากการได้รับสารโคลชิซิน โดยพบว่าพืชในชุดทดลองนี้ ให้จำนวนยอดต่อต้นเฉลี่ยสูงสุด (1.24 ยอด) ให้ความยาวของยอดเฉลี่ยสูงสุด (4.15 ซม.) ให้ร้อยละการชักนำยอดเฉลี่ยสูงสุด (35.33%) ให้ความยาวของรากเฉลี่ยสูงสุด (2.51 ซม.) ให้ร้อยละการชักนำรากเฉลี่ยสูงสุด (21.67%) นอกจากนี้ยังพบการขยายตัวของปากใบและเซลล์ผิวในพืชที่ได้รับโคลชิซิน โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 0.025% พืชมีจำนวนเซลล์ผิวใบต่อพื้นที่เฉลี่ยที่ 43.78 เซลล์ต่อ  $0.1 \text{ mm}^2$  ซึ่งน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และที่ความเข้มข้น 0.05% พืชมีขนาดความยาวปากใบเฉลี่ยที่ 36.32 ไมโครเมตร และกว้างเฉลี่ยที่ 30.41 ไมโครเมตร ซึ่งใหญ่กว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนของปริมาณดีเอ็นเอพบว่ามีการเพิ่มขึ้นในพืชที่ได้รับโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.05% และ 0.1% โดยมีการพบกลุ่มประชากรของเซลล์ที่มีปริมาณดีเอ็นเออยู่ประมาณ 4C-8C เทียบกับพืชที่ไม่ได้รับโคลชิซิน (ชุดควบคุม) ซึ่งพบปริมาณดีเอ็นเอ 2C, 2C-4C และ 4C

สาขาวิชาชีววิทยา  
ปีการศึกษา 2566

ลายมือชื่อนักศึกษา วรัญญา  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา กฤษณ์ ใจดี

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 bicallosa* (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

