บทที่ 4

การอภิปรายผลการทดลอง

จากการทดลองเกี่ยวกับการชักนำให้เกิด polyploid โดยใช้สารโคลชิซีน แสดงให้เห็นว่าอิทธิพลของสารโคลชิซีนต่อเนื้อเยื่อลูกผสม Dendrobium แต่ละชนิดไม่เท่ากัน ถึงแม้ความเข้มข้นของโคลชิซีนและเวลาที่ใช้เท่ากัน ปริมาณการตายของเนื้อเยื่อลูกผสมบางชนิดก็ต่างกันมาก อาจเนื่องจากคุณสมบัติทางสรีระและพันธุกรรมของลูกผสมแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน จากการทดลองพบว่า D.Caesar เลขที่ 2 ซึ่งเป็น diploid ใช้ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ 3 วัน และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ 10 วัน ปริมาณการตายของเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันคือ 20-30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ D. Caesar เลขที่ 1 ซึ่งเป็น triploid ใช้ 0.2 เปอร์เซ็นต์ 3 วันเท่ากันพบว่าปริมาณการตายของเนื้อเยื่อน้อยกว่าพวก diploid (ตาย 10 - 15 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่าเนื้อเยื่อ triploid ทนต่อสารโคลชิซีนมากขึ้น และระยะการเจริญของเนื้อเยื่อที่นำมาทดลองอาจมีส่วนเกี่ยวข้องด้วยคือ D. Caesar เลขที่ 1 เนื้อเยื่อส่วนใหญ่เป็นต้นอ่อน ส่วนเลขที่ 2 เป็น callus และ protocorm like body

(x) D.May Neal ซึ่งเป็น diploid ใช้ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ 3 วัน, 4 วัน และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ 10 วัน ปริมาณการตายของเนื้อเยื่อ = 10 -15 เปอร์เซ็นต์ ส่วน D. Majestic ซึ่งเป็น pentaploid ใช้โคลชิซีน 0.2 เปอร์เซ็นต์ 3 วัน, 4 วัน และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ 10 วัน มีปริมาณการตายของเนื้อเยื่อ = 5-10 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าใน species เดียวกัน ต้นเดียวกันใช้เวลาและความเข้มข้นของสารโคลชิซีนต่างกันปริมาณการตายของเนื้อเยื่อใกล้เคียงกัน แต่สำหรับ D. superbiens เลขที่ 1 และ 2 ให้ผลผิดกัน คือ D.superbiens เลขที่ 1 ใช้ 0.2 เปอร์เซ็นต์ 3 วัน ปริมาณของเนื้อเยื่อตายมากประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ ส่วน D.superbiens เลขที่ 2 ใช้ 0.05 เปอร์เซ็นต์ 10 วัน ปริมาณเนื้อเยื่อตายเท่ากับ 5-10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ทั้งนี้คงเนื่องมาจากเป็น species เดียวกันแต่ต่างต้นอาจมีลักษณะทางพันธุกรรมต่างกัน ปริมาณการ-

ตายของเนื้อเยื่อจึงต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบ D. Caesar เลขที่ 1 กับ D. Desaputra ซึ่งเป็น triploid เหมือนกัน ใช้โคลชิซีน 0.2 เปอร์เซ็นต์ 3 วัน เท่ากัน พบว่าเนื้อเยื่อของ D. Desaputra ตายมากประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ ส่วน D. Caesar เลขที่ 1 ตายเพียง 10-15 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากลักษณะทางพันธุกรรมของทั้งสองชนิดซึ่งต่างกันมาก ⊗ D. May Neal และ D. Lim Chong Min x D. formosum เนื้อเยื่อเจริญจากเมล็ด ใช้โคลชิซีน 0.2 เปอร์เซ็นต์เท่ากันแต่ D. Lim Chong Min x D. formosum ใช้เวลา 1 วัน ส่วน ⊗ D. May Neal ใช้เวลา 3 วัน พบว่า D. Lim Chong Min x D. formosum เนื้อเยื่อตาย 20- 30 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า ⊗ D. May Neal ซึ่งตายเพียง 10-15 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า D. Lim Chong Min x D. formosum ไวต่อสารโคลชิซีนมากกว่า ⊗ D. May Neal เมื่อเปรียบเทียบพิษของโคลชิซีนที่มีต่อกล้วยไม้กับพืชชนิดอื่น พบว่ากล้วยไม้ทนทานต่อสารโคลชิซีนมากกว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นเท่ากันแต่เวลาที่ใช้นานกว่า และเนื้อเยื่อแช่อยู่ในสารโคลชิซีนตลอดเวลา ในพืชชนิดอื่นเพียงแต่หยดโคลชิซีนลงบนยอดอ่อนของต้นอ่อน ก็มีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตและปริมาณการตายของพืชชนิดนั้นก็มีมากด้วย (Kloen and Speckmann, 1953; Evan, 1955; Chaiyasut, 1971)

การเจริญเป็นต้นและการออกราก

หลังจากแช่สารโคลชิซีนแล้ว สังเกตเห็นการเจริญช้าลงชั่วระยะเวลาหนึ่ง ในระยะนี้เนื้อเยื่อบางก้อนค่อยๆ เหลืองตายไป ส่วนที่เหลือกลับเจริญเป็นปกติ แต่มีบางกลุ่มผิดปกติไปคือ ⊗ D. May Neal เจริญเป็นต้นและออกรากช้า คงเนื่องมาจากต้นนี้ เกิดจากการผสมของต้นพ่อและแม่ที่มีลักษณะต่างกันมาก และเนื้อเยื่อได้จากต้นที่ผสมตัวเองด้วย อาจจะอ่อนแอกว่าชนิดอื่น เป็นสาเหตุที่ทำให้เจริญเป็นต้นช้า และออกรากช้ากว่าปกติ ส่วน D. superbiens เลขที่ 1 การเจริญเป็นต้นของเนื้อเยื่อปกติที่ไม่ได้แช่สารโคลชิซีนจะช้ากว่าชนิดอื่นๆ และหลังจากแช่สารโคลชิซีนแล้วยิ่งไปยับยั้งการเจริญเติบโตจึงทำให้การเจริญเป็นต้นช้ามากขึ้น เพราะฉะนั้นต้องมีการปรับปรุงวุ้นอาหารที่ใช้เลี้ยงให้เหมาะสมเพื่อจะได้เจริญเป็นต้นเร็วขึ้น D. Lim Chong Min x

D. formosum รากเจริญไม่ดีและมีขนาดเล็กกว่าชนิดอื่นๆ คงเนื่องมาจากลักษณะทางพันธุกรรมของมันเอง Rotor (1958) พบว่ากล้วยไม้ต่างgenusกัน ไวต่อสารโคลชิซีนไม่เท่ากัน โคลชิซีนจึงไปยับยั้งการเจริญเติบโตช้าเร็วต่างกัน จากการใช้โคลชิซีน 0.3 เปอร์เซ็นต์ กับต้นอ่อนของ Vanda, Phalaenopsis, Cymbidium และCattleya พบว่า Vanda หยุดชะงักการเจริญไปประมาณ 6-10 เดือน ส่วน Phalaenopsis, Cattleya และ Cymbidium หยุดชะงักการเจริญเติบโตไปประมาณ 2 เดือน ในการทดลองนี้ลูกผสม Dendrobium แต่ละชนิด มาจากต่าง species และต่าง section กัน ลักษณะต่างๆ ย่อมไม่เหมือนกัน อิทธิพลของโคลชิซีนต่อลูกผสมแต่ละชนิดจึงไม่เหมือนกัน

การนับโครโมโซม

การนับโครโมโซมเป็นวิธีที่ดีและได้ผลแน่นอนในการตรวจสอบ polyploid ในการทดลองนี้ได้ตรวจ polyploid ที่เกิดจากการใช้สารโคลชิซีนกับเนื้อเยื่อของลูกผสม Dendrobium ชนิดต่างๆ ด้วยวิธีนับโครโมโซมในปลายราก ในการทดลองก่อนหน้านี้ ได้มีการใช้วิธีนับโครโมโซมจากปลายราก คือ Menninger (1963) ใช้โคลชิซีนกับ bud ของลูกผสม Cymbidium (2n = 40) และนับโครโมโซมของรากจากหน่อที่แตกขึ้นมาใหม่ Winber and Van Cott (1967) ทดลองกับลูกผสม Cymbidium (2n = 40) Sanguthai, Sanguthai and Kamemoto (1973) และ Sanguthai and Sagawa (1973) ทดลองกับลูกผสม Dendrobium (2n = 57) และลูกผสม Vanda (2n = 38 และ 57) ตามลำดับ ได้ตรวจสอบ polyploid ด้วยวิธีนับโครโมโซมจากปลายราก

จากผลการนับโครโมโซมของราก พบว่า D. Caesar เลขที่ 2 และ 3 เมื่อใช้ความเข้มข้นของโคลชิซีน0.2 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน แต่เวลาต่างกัน (3 วัน และ4 วัน ตามลำดับ) ได้ผลต่างกันคือ D. Caesar เลขที่ 2 เป็น diploid 3 ต้น tetraploid และ near tetraploid 6 ต้น near octoploid 2 ต้น (จากที่นับทั้งหมด 11 ต้น) ส่วนเลขที่ 3 ได้ tetraploid และ near tetraploid 3 ต้น octoploid

และ near octoploid 9ต้น ไม่พบ diploid เลย (จากที่นับ 12 ต้น) จึงเห็นได้ว่าความเข้มข้นเท่ากันแต่เวลาที่ใช้นานกว่า ทำให้เซลกลายเป็น polyploid หมดใน D. Caesar เลขที่ 3 และพวกที่เป็น tetraploid แล้ว มีโอกาสเพิ่มจำนวนโครโมโซมสองเท่าเป็น octoploid ได้มากขึ้น D. Caesar เลขที่ 2 เมื่อใช้ความเข้มข้นและเวลาต่างกัน จะให้ผลต่างกันไม่มากนัก คือ 0.05 เปอร์เซ็นต์ 10 วัน ได้ tetraploidและ near tetraploid 14 ต้น (63.64 เปอร์เซ็นต์) octoploid 6 ต้น (27.28 เปอร์เซ็นต์) จากที่นับโครโมโซม 22 ต้น ส่วน 0.2 เปอร์เซ็นต์ 3 วัน เป็น tetraploid และ near tetraploid 6 ต้น (54.54 เปอร์เซ็นต์) octoploid 2ต้น (18.18 เปอร์เซ็นต์) จาก 11ต้น จึงเห็นได้ว่าเมื่อใช้เวลานานกว่าแต่ความเข้มข้นน้อย พบ tetraploidและ octoploid เพิ่มขึ้น คงเนื่องมาจากเวลานานวันเนื้อเยื่อที่แช่ในสารละลายโคลชิซีนมีโอกาสแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่าได้มากกว่า จึงเป็น tetraploid และ octoploid ได้มาก

D. superbiens เลขที่ 1 หลังจากใช้โคลชิซีน 0.2เปอร์เซ็นต์ 3 วัน เป็น tetraploid และ near tetraploid8ต้น (80 เปอร์เซ็นต์) diploid 2 ต้น (20 เปอร์เซ็นต์) จากจำนวน 10 ต้นที่นับจำนวนโครโมโซม ไม่พบพวก octoploid เลย อาจเนื่องจากมีปริมาณการตายของเนื้อเยื่อชนิดนี้ค่อนข้างสูง (40-50 เปอร์เซ็นต์) และการเจริญเป็นต้นช้ามากเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดอื่นๆ เพราะฉะนั้น octoploid อาจจะยังไม่เจริญเป็นต้น หรือตายไปก่อนที่จะเจริญเป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบกับ D. superbiens เลขที่ 2 ซึ่งใช้โคลชิซีน 0.05 เปอร์เซ็นต์ 10 วัน เป็น tetraploid และ near tetraploid23ต้น (62.2 เปอร์เซ็นต์) octoploid 9 ต้น (24.33 เปอร์เซ็นต์) ต่างกับD. superbiens เลขที่ 1 ซึ่งไม่พบ octoploid เลย อธิบายได้ว่า D. superbiens เลขที่ 2 ปริมาณการตายของเนื้อเยื่อน้อยกว่าเลขที่ 1 และเจริญเป็นต้นเร็วกว่าเลขที่ 1 ด้วย

สำหรับ ⊗ D. May Neal ใช้ 0.2 เปอร์เซ็นต์ 3 วัน หรือ 0.05 เปอร์เซ็นต์ 10 วัน ก็ได้ผลพอๆ กัน คือส่วนใหญ่เป็น tetraploid และ near tetraploid พบ near octoploid 1 ต้น จาก 0.2 เปอร์เซ็นต์ 3 วัน การที่ไม่พบ octoploid มากเท่าชนิดอื่นๆ คงเนื่องมาจากเนื้อเยื่อชนิดนี้ เจริญเป็นต้นช้าดังกล่าวมาแล้ว และ octoploid ก็เจริญเป็นต้นช้าเมื่อเทียบกับ diploid หรือ tetraploid จึงอาจยังไม่เจริญเป็นต้นหรือตายไปแล้วก็ได้ D. Lim Chong Min x D. formosum ใช้โคลชิซีน 0.2 เปอร์เซ็นต์เวลาเพียง 1 วันก็ยังได้ tetraploid สูงพอควร คือได้ tetraploid และ near tetraploid 7 ต้น (46.7 เปอร์เซ็นต์) พบ diploid 4 ต้น (26.7 เปอร์เซ็นต์) จากจำนวนที่นับ 15 ต้น จึงเห็นได้ว่าถ้าแช่โคลชิซีนเพียง 1 วันมีเปอร์เซ็นต์ของเซลที่ไม่เพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่ามากกว่าที่ใช้เวลา 3 วัน คือ ⊗ D. May Neal ใช้ 0.2 เปอร์เซ็นต์ 3 วันไม่พบ diploid เลย D. superbiens เลขที่ 1 ใช้ความเข้มข้นและเวลาเท่ากันพบ diploid ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ D. Lim Chong Min x D. formosum ไม่พบ octoploid เลยพบแต่heptaploid เท่านั้น อาจเนื่องจากพวกนี้ต้นมีขนาดเล็ก เจริญช้า และไม่แข็งแรง พวก octoploid อาจตายไปก่อนตัดรากนับจำนวนโครโมโซม เพราะต้นที่มีใบหนาและย่นตายไปก่อนที่จะตัดรากนับจำนวนโครโมโซมหลายต้น

เมื่อเปรียบเทียบ D. Caesar เลขที่ 2 กับ D. superbiens เลขที่ 1 ซึ่งใช้ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ 3 วันเท่ากัน พบว่า D. Caesar เลขที่ 2 ได้ tetraploid และ near tetraploid (54.54 เปอร์เซ็นต์) น้อยกว่า D. superbiens เลขที่ 1 ซึ่งได้ tetraploid และ near tetraploid 80 เปอร์เซ็นต์ แต่ D. Caesar เลขที่ 2 ได้ octoploid ด้วย (18.18 เปอร์เซ็นต์) ส่วน D. superbiens เลขที่ 1 ไม่ได้ octoploid เลย กรณีนี้คงเกี่ยวกับลักษณะทางพันธุกรรมซึ่งไม่เหมือนกัน เพราะ D. superbiens เลขที่ 1 มีปริมาณการตายของเนื้อเยื่อค่อนข้างสูง (40-50 เปอร์เซ็นต์) กว่า D. Caesar เลขที่ 2 (ตาย 20-30 เปอร์เซ็นต์) และการเจริญเป็นต้นของ D. superbiens เลขที่ 1 ก็ช้ากว่าด้วย เป็นสาเหตุที่ทำให้ไม่พบ octoploid

เพราะอาจตายไปแล้วหรือยังไม่เจริญเป็นต้น จึงมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ tetraploid สูงกว่า D. Caesar เลขที่ 2

สำหรับ D. Caesar เลขที่2 กับ D. superbiens เลขที่ 2 หลังจากใช้โคลชิซีน 0.05 เปอร์เซ็นต์ 10วันกับ callus และ protocorm like body พบว่าผลที่ได้ต่างกันเล็กน้อย คือ D. Caesar เลขที่ 2พบ tetraploid และ near tetraploid 14 ต้น (63.64 เปอร์เซ็นต์) octoploid และ near octoploid 6ต้น (27.28 เปอร์เซ็นต์) จากจำนวนทั้งหมด 22ต้น ส่วน D. superbiens เลขที่2 ได้ tetraploid และ near tetraploid 23ต้น (62.2 เปอร์เซ็นต์) octoploid และ near octoploid 9 ต้น (24.33 เปอร์เซ็นต์) จากที่นับโครโมโซม 37ต้น แสดงว่า D. Caesar เลขที่2 และ D. superbiens เลขที่2 เมื่อแช่ callus และ protocorm like body ในโคลชิซีน 0.05 เปอร์เซ็นต์ 10วัน จะมีเซลแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น tetraploid และ octoploid ได้พอๆ กัน และความสามารถของเซล polyploid เหล่านี้ที่จะเจริญเป็นต้นมีได้เท่าๆ กัน จึงพอสรุปได้ว่าพวก diploid ถ้าต้องการได้ tetraploid มากๆ ควรจะใช้ความเข้มข้น0.05 เปอร์เซ็นต์ แต่เวลาให้น้อยกว่า10 วัน เพื่อจะได้ลดเปอร์เซ็นต์การเกิด octoploid ลง และระยะการเจริญของเนื้อเยื่อก็ควรใช้ในระยะที่เป็น callus

สำหรับ D. Caesar เลขที่1 ซึ่งเป็น triploid (2n=57). เนื้อเยื่อที่นำมาแช่สารโคลชิซีนส่วนใหญ่จะเป็นต้นออนแล้ว ความเข้มข้นของโคลชิซีน 0.05 เปอร์เซ็นต์อาจน้อยไป เพราะได้ hexaploid และ near hexaploid 10ต้น (52.6 เปอร์เซ็นต์) จากจำนวน 19 ต้น น้อยกว่าเมื่อใช้0.2 เปอร์เซ็นต์3 วันซึ่งได้hexaploid และ near hexaploid 7ต้น (70 เปอร์เซ็นต์) จากที่นับ 10ต้น เพราะฉะนั้นถ้าเนื้อเยื่ออยู่ในระยะเป็นต้นออนควรใช้ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ 3 วันจะได้ผลมากกว่า 0.05 เปอร์เซ็นต์ 10 วัน

D. Desaputra (2n = 57) พบว่าใช้ความเข้มข้นของโคลชิซีน 0.2 เปอร์เซ็นต์ 2 1/6 วัน และ 3 วัน ได้ผลไม่ต่างกัน คือเมื่อใช้ 2 1/6 วัน ได้ hexaploid และ near hexaploid 16 ต้น (80 เปอร์เซ็นต์) จาก 20 ต้น และ 3 วัน ได้ hexaploid กับ near hexaploid 20ต้น (80 เปอร์เซ็นต์) จาก25 ต้น ที่นับโครโมโซม แสดงว่าเวลาที่ต่างกันประมาณ20 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการเกิดpolyploid ใน D. Desaputra ดังนั้นสำหรับกล้วยไม้ชนิดนี้ใช้ความเข้มข้น0.2 เปอร์เซ็นต์ 2-3 วัน ก็ได้ hexaploid และ near hexaploid สูงพอควร เมื่อเปรียบเทียบกับ D. Caesar เลขที่ 1 จะเห็นว่าการใช้โคลชิซีน 0.2 เปอร์เซ็นต์ 3 วัน เท่ากัน D. Desaputra ได้ hexaploid และ near hexaploid สูงกว่า ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ กรณีนี้เข้าใจว่าระยะของเนื้อเยื่อที่นำมาแช่โคลชิซีนมีส่วนเกี่ยวข้องด้วย เพราะ D. Desaputra เป็น callus และ protocorm like body ส่วน D. Caesar เลขที่ 1 ส่วนใหญ่เป็นต้นออนแล้ว เพราะฉะนั้นเนื้อเยื่อของ D. Desaputra จึงไวต่อสารโคลชิซีน และมีเซลที่กำลังแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่าได้มากกว่า D. Caesar เลขที่ 1 และหลังจากใช้โคลชิซีนกับพวก triploid ทำให้เกิดการขาดหายหรือการเพิ่มของโครโมโซมไม่เป็นชุด ซึ่งพบทั้งใน D. Desaputra และ D. Caesar เลขที่ 1 ฉะนั้นแทนที่จะได้ hexaploid อย่างเดียว เมื่อเริ่มจาก triploid อาจจะได้ลักษณะ aneuploid แปลก ๆ อีกมาก

D. Majestic (ตารางที่ 12) พบว่าเปอร์เซ็นต์ของโคลชิซีน และเวลาที่ใช้ไม่ค่อยมีผลต่อการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่า อาจเนื่องจากเนื้อเยื่อเป็น pentaploid อยู่แล้ว จึงทำให้ปฏิกริยาของโคลชิซีนไปกระทำได้น้อยกว่าพวกเนื้อเยื่อ diploid เพราะจากตารางที่ 5 ซึ่งแสดงเปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่อก็ตายน้อยมากประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น เมื่อเทียบกับ species อื่น ๆ ที่เป็นdiploid ซึ่งใช้ความเข้มข้นและเวลาที่แช่ในโคลชิซีนเท่ากัน นอกจาก D. superbiens เลขที่ 2 แต่ต้นนี้ก็มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่ามากกว่าของ D. Majestic มาก ได้ polyploid ถึง86.53 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้โคลชิซีน 0.05 เปอร์เซ็นต์เวลา

10 วัน ส่วน D. Majestic หากจำนวน 5 ต้นที่นับ ยังเป็น pentaploid 2 ต้น และมี 3 ต้นที่โครโมโซมหายไป 1 กับเพิ่มมา 2 ต้นเท่านั้น การที่ไม่พบจำนวนโครโมโซมเพิ่มจากเดิมสองเท่า แต่พบแค่ระดับ octoploid อาจเนื่องจากเนื้อเยื่อมีโครโมโซมเป็น decaploid (190 โครโมโซม) นั้นตายไปก่อนที่จะเจริญเป็นต้น และต้นที่มีใบหนา ย่น ซึ่งมักจะมีจำนวนโครโมโซมมากนั้นตายไปก่อนที่จะตัดราก นับโครโมโซมหลายต้น จึงทำให้ไม่พบต้นที่มีจำนวนโครโมโซม 190 โครโมโซมหลังจากแช่เนื้อเยื่อในสารโคลชิซีน

เมื่อเปรียบเทียบ polyploid ที่ได้จากการใช้สารโคลชิซีนกับลูกผสม Dendrobium (2n=38) กับลูกผสม Cymbidium (2n=40, จากการทดลองของ Wimber and Van Cott, 1967) และลูกผสม Vanda (2n=40, จากการทดลองของ Sanguthai and Sagawa, 1973) พบว่า D. Caesar เลขที่ 2 และ D. superbiens เลขที่ 2 เมื่อใช้ความเข้มข้นของโคลชิซีน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เวลา 10 วัน เท่ากับลูกผสม Cymbidium ได้ tetraploid และ near tetraploid ประมาณ 62-64 เปอร์เซ็นต์ octoploid ประมาณ 24-27 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลูกผสม Cymbidium นั้นเป็น tetraploid ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบ octoploid เลย และพบ mixoploid มากกว่า สำหรับลูกผสม Vanda นั้น ใช้ความเข้มข้นของสารโคลชิซีนมากกว่าแต่เวลาน้อยกว่า คือใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 5 วัน พบ tetraploid เพียง 29.8 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบ octoploid เลย แต่พบปริมาณของ mixoploid ค่อนข้างสูง (จากที่นับโครโมโซม 47 ต้น เป็น mixoploid 16 ต้น

D. Caesar เลขที่ 1 (2n=57) เมื่อเปรียบเทียบกับ D. Uniwai Crystal (2n=57, จากการทดลองของ Sanguthai, Sanguthai and Kamemoto, 1973) ใช้โคลชิซีน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เวลา 10 วัน

เท่ากัน ได้ hexaploid ใกล้เคียงกัน แต่ mixoploid ต่างกัน คือ D. Caesar เลขที่ 1 เป็น hexaploid และ near hexaploid 10 ต้น และ mixoploid 1 ต้นจากจำนวนต้นที่นับโครโมโซม 19 ต้น ส่วน D. Uniwai Crystal พบ hexaploid 5 ต้น และmixoploid 5 ต้น จากจำนวนที่นับโครโมโซม 10 ต้น

จากการเปรียบเทียบผลการทดลองนี้กับของ Wimber and Van Cott (1967) Sanguthai, Sanguthai and Kamemoto(1973)และ Sanguthai and Sagawa (1973) พบว่าในการทดลองนี้ได้ต้นที่เป็น polyploid มากกว่า และได้พวก mixoploid น้อยกว่า อาจเนื่องมาจากผู้อื่นละลายโคลชิซีนในอาหารเหลว ส่วนในการทดลองนี้ใช้โคลชิซีนในน้ำกลั่น การที่เนื้อเยื่ออยู่ในน้ำกลั่นเป็นเวลานาน ทำให้เนื้อเยื่อขาดธาตุ อาหาร และสารที่จำเป็นในการเคลื่อนที่ของโครโมโซม เพราะฉะนั้นอำนาจของโคลชิซีนที่ทำให้การเคลื่อนที่ของโครโมโซมน้อยลง ยิ่งแสดงได้ชัดขึ้น เป็นเหตุให้เซลเหล่านั้นกลายเป็น polyploid ได้มากขึ้นเมื่อเซลเหล่านี้เจริญเป็นต้น โอกาสที่จะได้ต้นที่เป็น polyploid จึงมีมากด้วย และเมื่อมีเซลที่เป็น polyploid มาก โอกาสที่ mixoploid จะเกิดจาก chimera ของ callus หรือ protocorm-like body ย่อมลดลง เพราะเซลส่วนใหญ่ในกลุ่มที่จะเจริญเป็นต้นกลายเป็น polyploid

การพบต้นที่เจริญจาก callus เป็นpolyploid อาจจะไม่ตรงกับจำนวนเซลที่เป็น polyploid ในcallus เพราะเซลเหล่านี้สามารถเจริญเป็นต้นได้ไม่เท่ากัน โดยเฉพาะพวกที่เป็น polyploid มีโอกาสเป็นต้นได้น้อยลง (Murashige

and Nakano 1967) และพวกที่เป็น aneuploid ซึ่งมี genic imbalance นั้น ยิ่งเจริญเป็นต้นได้น้อย เพราะการที่จะเกิดเป็นต้นได้เซลเหล่านี้ต้องมี organogenic capacity มิฉะนั้นจะแบ่งตัวต่อไปหรือตายโดยไม่เป็นต้นได้เลย และพวกที่กลายเป็นต้นแล้วส่วนหนึ่งก็จะเจริญช้ามาก หรือตายไปขณะที่ยังอยู่ในวุ้นอาหาร หรือหลังเอาออกปลูกอย่างธรรมดา ฉะนั้นการที่ได้ต้นมาเพื่อนับโครโมโซมเป็นเพียงส่วนหนึ่งของเซลที่เกิด polyploid และ aneuploid เท่านั้น

การเลี้ยงเนื้อเยื่อในวุ้นอาหารก็เกิดเป็น polyploid ได้โดยไม่ต้องใช้สารโคลชิซีน ซึ่ง Murashige and Nakano (1966) พบในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบ (Nicotiana tabacum L. 'Wisconsin'38) และให้เหตุผลว่าเซลที่เป็น diploid ใน tissue culture ถ้าไม่สามารถรักษา totipotency ไว้ได้จึงมีโอกาสที่จะเกิดเป็น tetraploidได้เท่า ๆ กับการเป็น diploid เหมือนเดิม ซึ่ง ร.ศ.ดร.ถาวร วัชราภัย ก็พบเช่นเดียวกันนี้ ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของลูกผสม Dendrobium ในวุ้นอาหาร โดยมิได้แช่สารโคลชิซีนจาก D. May Neal 'Srisobhon' (2n=38) และ D. Lady Hamilton x D. May Neal (2n=57) โดยพบต้นที่มีลักษณะแปลกออกไป คือ D. May Neal 'Srisobhon' บางต้น มีใบหนากว่าเดิม และดอกใหญ่ขึ้น เมื่อนับจำนวนโครโมโซมพบเป็น tetraploid 5 ต้น จากต้นที่ออกดอกแล้ว 210 ต้น ซึ่งประมาณ 2.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ D. Lady Hamilton x D. May Nealซึ่งได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อของ triploid พบต้นที่มีใบหนา 20 ต้น จากจำนวนทั้งหมด 414 ต้น เมื่อนับโครโมโซมของพวกใบหนา 5 ต้น พบว่าเป็น hexaploid ทั้งหมด และพวกใบบาง 5 ต้น เป็นtriploid ทั้งหมด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ hexaploid ได้ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์

การทดลองครั้งนี้นับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากเท่านั้น ซึ่งรากกล้วยไม้เป็น adventitious root เจริญมาจากบริเวณ interfasicular parenchyma (pith ray) (Esau, 1953) ถ้าการเจริญเป็นต้นของกล้วยไม้ เจริญมาจากเนื้อเยื่อชั้นต่าง ๆ เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Satina and Blakeslee(1941) ซึ่งศึกษา

ใน Datura stramonium พบว่า shoot apex และ floral apex ประกอบด้วย เซล 3 ชั้น นับจากข้างนอกเข้ามา เป็น L-I, L-II และ L-III ตามลำดับ ชั้น L-I เจริญเป็น epidermis L-II เจริญไปเป็นส่วนของใบ sepal และ petal ส่วน L-III เจริญไปเป็น reproductive organ Dermen (1947) ก็ได้ศึกษา periclinal chimera ใน cranberry พบว่า L-I เจริญไปเป็น epidermis L-II เจริญไปเป็น cortex ส่วนนอก microsporogenous tissue และ megasporocyte และ L-III เจริญไปเป็น cortex, stele และ pith ของลำต้น จากผลการทดลองของ 2 คนนี้จะเห็นว่า L-II และ L-III เจริญไปเป็นอวัยวะแต่ละส่วนของพืชไม่เหมือนกัน สำหรับในกล้วยไม้ยังไม่มีผู้ใดศึกษาว่าชั้นต่าง ๆ เจริญไปเป็นส่วนใดของพืช ถ้าเป็นแบบเดียวกับการทดลองของ Dermen ก็จะพบว่า L-III เจริญไปเป็นราก และถ้าเหมือนกับการทดลองของ Satina and Blakeslee ชั้น L-III ก็จะเจริญไปเป็นส่วนของ reproductive organ ดังนั้นเมื่อนับโครโมโซมของรากพบว่าเป็น polyploid ก็แสดงว่า L-III เป็น polyploid และในการทดลองนี้ก็พบ mixoploid ด้วย แสดงว่า L-III ประกอบด้วยเซลซึ่งมีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน เมื่อตัดรากนับโครโมโซมจึงพบจำนวนโครโมโซมที่ต่างกันได้ แต่ mixoploid ที่พบจะมีเซล diploid หรือ triploid ปนใน tetraploid หรือ hexaploid เพียงไม่กี่เซล ซึ่งต่อไปอาจเพิ่มหรือลดจำนวนนี้อีกก็ได้ จากผลการทดลองของ Intuwong (1973) พบว่ากลุ่มเซลของเนื้อเยื่อเจริญเกิดอยู่บนชั้น hypodermal และจากการทดลองของ ร.ศ.ดร.ถาวร วัชราภัย (personnal communication) พบว่า callus เจริญมาจากบริเวณ epidermis เพราะฉะนั้นถ้าระยะที่นำเนื้อเยื่อมาแช่สารโคลชิซีนอยู่ในระยะ protocorm หรือหลังจากนั้นแล้ว อาจเกิด chimera ได้แต่ถ้าเซลของ callus ที่เจริญจาก epidermis ของ protocorm หรือ plantlet อีกทีหนึ่ง ก็น่าจะมีจำนวนโครโมโซมเท่ากันทั้งก้อน และเมื่อเจริญเป็นต้นก็จะได้ต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันหมด แต่ถ้าระยะเนื้อเยื่อที่นำมาแช่สารโคลชิซีนเป็น callus ต้นที่ได้ก็มีโอกาสเป็น chimera ได้เหมือนกัน

การวัด guard cell และความหนาของใบ

จากการวัดความกว้างและยาวของคู่ guard cell ของ diploid เปรียบเทียบกับ tetraploid ของ D. Caesar เลขที่ 2 และ D. May Neal "Srisobhon" และ triploid เปรียบเทียบกับ hexaploid ของ D. Caesar เลขที่ 1 และ D. Lady Hamilton x D. May Neal พบว่าแตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการวัด guard cell ของกล้วยไม้นี้ Wimber and Van Cott (1967) ก็ได้วัดความยาวของ guard cell ของลูกผสม Cymbidium ซึ่งเป็น diploid เปรียบเทียบกับ tetraploid ที่ได้จากการใช้สารโคลชิซีนกับ protocorm พบว่าแตกต่างกัน แต่พบว่า diploid บางต้นมี guard cell ยาวเกือบเท่ากับ tetraploid และให้เหตุผลว่าอาจเนื่องมาจากลักษณะทางพันธุกรรม หรืออาจเป็น mixoploid ก็ได้ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ก็พบว่า D. Caesar เลขที่ 2 มี 1 ต้นที่ความยาวของคู่ guard cell เท่ากับ tetraploid บางต้น แต่อย่างไรก็ตามการวัด guard cell นี้สามารถนำมาใช้คัดเลือกต้นที่คิดว่าจะเป็น polyploid ในชั้นแรกได้ เพื่อประหยัดเวลาในการศึกษาเกี่ยวกับ polyploid

การวัดความหนาของใบ diploid เปรียบเทียบกับ tetraploid และ triploid กับ hexaploid ของลูกผสม Dendrobium ที่กล่าวมาแล้ว ก็พบว่ามีความหนาของใบแตกต่างกัน การวัดความหนาของใบกล้วยไม้ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมต่างกันไม่ปรากฏว่ามีผู้ใดทำมาก่อน เพียงแต่สังเกตและรายงานว่าใบของ polyploid หนากว่า diploid เท่านั้น จากการทดลองนี้ได้พบความแตกต่างของใบ tetraploid มีความหนามากกว่าใบ diploid เมื่อวัดความหนาของใบจากต้นที่โตเต็มที่แล้วอย่างใน D. May Neal 'Srisobhon' แต่ถ้าวัดความหนาของใบขณะที่ต้นยังโตไม่เต็มที่อย่างใน D. Caesar เลขที่ 2 พบว่า ความหนาของใบ diploid เท่ากับและหนากว่า tetraploid บางต้น ฉะนั้นในการที่จะใช้ลักษณะความหนาของใบมาคัดเลือก polyploid ในชั้นแรกแบบเดียวกับใช้ลักษณะความกว้างและยาวของคู่ guard cell นั้น จะต้องวัดความหนาของใบขณะที่ต้นเจริญเต็มที่แล้ว หรือจากต้นที่ยังเลี้ยง-

ในวุ้นอาหารก็พอจะสังเกตได้ว่า diploid และ tetraploid มีใบที่แตกต่างกัน คือ tetraploid มีใบเขียวกว่าและหนากว่า diploid เล็กน้อย ส่วน octoploid มีใบเขียวเข้ม ยน และหนากว่า tetraploid มาก

การเปรียบเทียบลักษณะลำต้น และดอกของ diploid และ tetraploid ของ D. Caesar เลขที่ 3

ลำต้นของ tetraploid ใหญ่กว่าและแข็งแรงกว่า diploid ก้านช่อดอกมีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งสามารถทานน้ำหนักของดอกได้ดีกว่าเดิมทำให้ก้านช่อโน้มลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนจำนวนดอกในช่อ อาจจะน้อยกว่าหรือมากว่านี้ก็ได้ เพราะในการทดลองนี้เปรียบเทียบอย่างละ 1 ต้น เท่านั้น สีของ petal, sepal และ lip ของ tetraploid เข้มกว่าของ diploid เล็กน้อย และขนาดก็ใหญ่ขึ้นทั้งด้านกว้างและด้านยาว แต่จะเพิ่มทางด้านกว้างมากกว่าด้านยาว โดยดูจากอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างในตารางที่ 19 จะเห็นว่าส่วนต่าง ๆ ของดอกกว้างขึ้นมากกว่ายาวออก ยกเว้น lateral sepal แสดงว่าเมื่อเป็น tetraploid ช่องว่างระหว่างกลีบดอกลดลง จึงทำให้ดอกมีลักษณะกลมขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะที่นักเลี้ยงกล้วยไม้ต้องการมาก สำหรับอัตราส่วน lateral sepal ของ tetraploid จะมากกว่าของ diploid เล็กน้อย แสดงว่าในกรณีนี้ lateral sepal ของ tetraploid เพิ่มทางด้านยาวมากกว่าด้านกว้าง เมื่อเปรียบเทียบการทดลองนี้กับของ Menninger (1963) ซึ่งทดลองกับลูกผสม Cymbidium Coningsbyanum 'Brockhurst' ซึ่งเป็น diploid (2n=40) และได้ tetraploid (2n=80) จากการใช้สารโคลชิซีนกับ lateral bud ของ pseudobulb ได้รายงานว่าดอก tetraploid มีขนาดใหญ่กว่า diploid, dorsal sepal และ lip ของ tetraploid กว้างกว่า diploid ส่วน Wimber and Doris Wimber (1968) ได้ติดตามผลการใช้โคลชิซีนกับลูกผสม Cymbidium ซึ่งเป็น diploid พบว่า Cymbidium 'Lunagrad' เมื่อเป็น tetraploid จะให้ดอกใหญ่กว่า diploid กลีบดอกหนา tepal จะเพิ่มทางด้านกว้างมากกว่าขนาดออกที่เพิ่มขึ้นซึ่งทำให้ดอกกลมขึ้น จำนวนดอกในช่อ tetraploid ลดลงไปประมาณ 2 ดอก ในการทดลองเขาวัดความกว้างของดอก sepal, petal

(ไม่ได้วัดความยาว) และความหนาของ tepal ในการทดลองนี้ได้วัดทั้งด้านกว้างและยาวของ tepal เปรียบเทียบระหว่าง diploid กับ tetraploid รวมทั้งรายงานส่วนอื่น ๆ ที่เปลี่ยนแปลงด้วย

จากการตรวจดู pollen quartet ของ diploid และ tetraploid พบ pollen ที่ไม่สมบูรณ์ทั้งคู่ ซึ่งตามปกติแล้ว allotetraploid จะมี pollen ที่สมบูรณ์และ fertility สูงขึ้น แต่ลักษณะ pollen ของ tetraploid ที่ได้ไม่ดีไปกว่า diploid และไม่งอกเลย อาจเนื่องมาจากลูกผสมต้นนี้ มาจาก D. phalaenopsis x D. stratiotes ซึ่งตามรายงานของ อ.รัชนีกร อุบตระกูล (2504) พบว่า D. stratiotes เองมีเปอร์เซ็นต์การงอกของ pollen ผิดปกติได้มาก จาก 0-70 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุหนึ่งที่ทำให้ pollen ของ tetraploid ไม่ดีไปกว่า diploid เนื่องจาก genic sterility มากกว่าการขาด homologous chromosome ในไมโอซิส ซึ่งมักเกิดขึ้นกับ interspecific hybrid ทั่ว ๆ ไป pollen ของทั้ง diploid และ tetraploid ของลูกผสมชนิดนี้มีหยดน้ำมันด้วย แสดงว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้นใน pollen ก่อนที่ดอกจะบาน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ pollen ของ diploid ที่มี fertility สูง จะไม่พบหยดน้ำมันเลย