ผลของโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิต ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและเซลล์วิทยาของกล้วยไม้ช้างแดง *(Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik)

Effects of Colchicine on Survival Rate, Morphological, Physiological and Cytological Characters of Chang Daeng Orchid *(Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) *In Vitro*

ณัฐพร เกิดสุวรรณ

Nattaporn Kerdsuwan

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Science
Prince of Songkla University
2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิต ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและเซลล์วิทยาของกล้วยไม้ช้างแดง *(Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik)

ผู้เขียน นางสาวณัฐพร เกิดสุวรรณ

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

…….....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พจมาลย์ สุรนิลพงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลของโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิต ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและเซลล์วิทยาของกล้วยไม้ช้างแดง *(Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik)
ผู้เขียน	นางสาวณัฐพร เกิดสุวรรณ
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2553

บทคัดย่อ

จากการเพาะเลี้ยง PLBs (Protocorm-like bodies) กล้วยไม้ช้างแดง *(Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) ที่อยู่ในระยะ GI 5 ซึ่งเป็นระยะที่ PLBs เจริญในช่วง 10-14 วัน ในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครส 2% ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15% แล้วนำมาจุ่มแช่ในสารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า PLBs ที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.14% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) เมื่อวิเคราะห์ด้วยสมการถดถอย การใช้โคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.20% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้อัตราการรอดชีวิต 26% สามารถชักนำต้นเททระพลอยด์ (2n=4X=76) ได้สูงสุด 60% เมื่อตรวจสอบจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากต้นเททระพลอยด์ที่ได้มีความหนาแน่นเซลล์ปากใบสูงสุด 3.00 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร มีสหสัมพันธ์ในทางบวกกับจำนวนชุดโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ของต้นดังกล่าวมีค่าน้อยกว่าในชุดควบคุม (46 เม็ด/เซลล์คุม) คิดเป็น 67% ของชุดควบคุม และมีสหสัมพันธ์ในทางผกผันกับจำนวนชุดโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น จำนวนใบเฉลี่ย (3.5ใบ) เพิ่มขึ้น ส่วนความยาวราก (2.48 เซนติเมตร) ลดลงอย่างแตกต่างทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Thesis Title	Effects of Colchicine on Survival Rate, Morphological, Physiological and Cytological Characters of Chang Daeng Orchid *(Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) *In Vitro*
Author	Miss Nattaporn Kerdsuwan
Major Program	Plant Science
Academic Year	2010

Abstract

PLBs (Protocorm-like bodies) at GI 5 stage of Chang Daeng Orchid *(Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) cultured in liquid NDM medium with 2% sucrose and 15% coconut water (CW) were immersed in five concentrations of colchicine (0, 0.05, 0.10, 0.15 and 0.20%) for 24, 48, and 72 hours. The results showed that the PLBs immersed in colchicine at concentration of 0.14% for 72 hours showed a 50% decrease in survival rate (LD_{50}) as evaluating by regression analysis. PLBs immersed in concentrations with 0.20% of colchicine for 72 hours gave a survival rate of 26% and induced the highest tetraploid at 60% as revealed by root tip chromosome counting. Those tetraploid plants showed the highest stomata densities (3.00 cells/mm^2) that positive correlated with ploidy level. In contrast, the chloroplast numbers of tetraploid plants had a negative correlation with ploidy level. The average number of chloroplasts obtained in tetraploid plants was 46 chloroplasts/guard cells lower than those of diploid plants. For morphological characters, the tetraploid plants have average leave number higher than those of control but the root length was significantly lower when compared with control.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(8)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(9)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	15
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	16
3 ผล	21
4 วิจารณ์	37
5 สรุป	41
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก	51
ประวัติผู้เขียน	52

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อัตราการรอดชีวิตของ PLBs กล้วยไม้ช้างแดง ที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0 (ควบคุม) 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	22
2	ผลของความเข้มข้น และระยะเวลาในการจุ่มแช่สารโคลชิซินต่อจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์คุม	24
3	ผลของความเข้มข้น และระยะเวลาในการจุ่มแช่สารโคลชิซินต่อความกว้างของเซลล์คุม	25
4	ผลของความเข้มข้น และระยะเวลาในการจุ่มแช่สารโคลชิซินต่อความยาวของเซลล์คุม	26
5	ผลของความเข้มข้น และระยะเวลาในการจุ่มแช่สารโคลชิซินต่อความหนาแน่นของเซลล์ปากใบ	28
6	ผลของความเข้มข้น และระยะเวลาการจุ่มแช่สารโคลชิซินต่อลักษณะทางสัณฐานบางประการของกล้วยไม้ช้างแดง	32
7	ผลของความเข้มข้น และระยะเวลาการจุ่มแช่สารโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ช้างแดง	33
8	ค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ของลักษณะเซลล์คุม ความหนาแน่นของเซลล์คุม จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์จำนวนใบ ราก ความยาวใบ ราก และจำนวนชุดโครโมโซม	36

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้ช้างแดง	3
2	มูลค่าการส่งออกดอกกล้วยไม้สดของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2545 – 2550	4
3	สูตรโครงสร้างทางเคมีของโคลชิซิน	8
4	โครงสร้างลำต้น ใบ ดอก และหัวของ *Colchicum autumnale* L.	8
5	ลักษณะของ PLBs ที่อยู่ในระยะ GI 5 (10-14 วัน หลังย้ายเลี้ยง)	17
6	PLBs ระยะ GI 5 กล้วยไม้ช้างแดงที่ปล่อยสารประกอบฟีนอลสีน้ำตาล	22
7	อัตราการรอดชีวิตของ PLBs กล้วยไม้ช้างแดงหลังจุ่มแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	23
8	อัตราการรอดชีวิตของ PLBs กล้วยไม้ช้างแดงหลังจุ่มแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง	23
9	ความหนาแน่นของเซลล์ปากใบของกล้วยไม้ช้างแดงจากการจุ่มแช่ในโคลชิซินความเข้มข้น 0 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง (บาร์ = 25 ไมโครเมตร)	27
10	จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมและขนาดปากใบเฉลี่ยของกล้วยไม้ช้างแดงจากการจุ่มแช่ในโคลชิซินความ เข้มข้น 0 และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (บาร์ = 48 ไมโครเมตร)	29
11	ลักษณะต้นและจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของกล้วยไม้ช้างแดง (บาร์ = 10 เซนติเมตร และ 48ไมโครเมตร)	30
12	ลักษณะต้นและโครโมโซมจากปลายรากกล้วยไม้ช้างแดง (บาร์ = 10 เซนติเมตร และ 5ไมโครเมตร)	34

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

MS	=	Murashige and Skoog (medium)
BA	=	N^6-benzyadenine
VW	=	Vacin and Went (medium)
LD_{50}	=	50 % lethal dose
TDZ	=	Thidiazuron
NDM	=	New Dogashima Medium
PLBs	=	Protocorm-like bodies
2,4-D	=	2,4-Dichlorophenoxy acetic acid
NAA	=	α-Naphthalene acetic acid
GI	=	Growth index
PI	=	Propidium iodine

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

กล้วยไม้ช้างแดง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Rhynchostylis gigantea* var. rubrum Sagarik. เป็นกล้วยไม้ในสกุลช้าง มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย พม่า ทางตอนใต้ของจีน ประเทศในแถบอินโดจีน อินโดนีเซีย และหมู่เกาะทะเลจีนใต้ สำหรับในประเทศไทยพบกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในแถบภาคเหนือ เช่น เชียงใหม่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น หนองคาย มุกดาหาร สกลนคร เลย นครราชสีมา ต่ำลงมาจนถึงตอนเหนือของภาคกลาง เช่น นครสวรรค์ ชัยนาท และภาคตะวันออก เช่น ปราจีนบุรี และแถบจังหวัดกาญจนบุรี โดยกระจายทั่วไปในป่าที่มีระดับความสูงประมาณ 260 - 350 เมตร จากระดับน้ำทะเล (นิรนาม, 2551) กล้วยไม้สกุลช้างมีรูปร่างใหญ่โตกว่ากล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ ในสกุลเดียวกัน มีลักษณะใบหนา แข็ง ยาวประมาณ 25 - 30 เซนติเมตร กว้างประมาณ 5 - 7 เซนติเมตร ปลายใบมน เป็นแฉก 2 แฉก แต่ละใบมีขนาดไม่เท่ากัน รากเป็นรากอากาศ มีขนาดใหญ่ ปลายรากมีสีเขียว ช่อดอกเป็นรูปทรงกระบอกโค้งลง ช่อดอกยาวประมาณ 20 - 40 เซนติเมตร มีดอกแน่น ช่อละ 25 - 60 ดอก ขนาดดอกประมาณ 2.5 - 3.0 เซนติเมตร (รูปที่ 1) กลีบนอกคู่ล่างกว้างยาวเท่า ๆ กันกับกลีบนอกบน ส่วนกลีบในเรียวกว่ากลีบนอก เดือยดอกอยู่ในลักษณะเหยียดตรงไปข้างหน้า ปลายแผ่นปากหนา แข็ง และปลายสองข้างเบนเข้าหากัน ปลายปากมี 3 แฉก สองแฉกข้างมน แฉกกลางมนและมีขนาดเล็กกว่ามาก ใกล้โคนปากด้านบนมีสันนูนเตี้ย ๆ 2 สัน ดอกมีกลิ่นหอมฉุน หอมไกล ดอกบานระหว่างเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ และบานทนประมาณสองหรือสามสัปดาห์ (อบฉันท์, 2543) กล้วยไม้สกุลช้างแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ตามลักษณะสีของดอก คือ ช้างกระ ช้างแดง และช้างเผือก ทั้งสามประเภทเป็นพันธุ์แท้พันธุ์เดียวกัน มีโครโมโซมเหมือนกันและมีจำนวนเท่ากัน คือ $2n = 2x = 38$ มีลักษณะลำต้น ใบ ราก ช่อดอก และดอกคล้ายคลึงกัน แต่ต่างกันตรงที่สีของดอก คือ ช้างกระมีดอกสีขาวประ จุดสีม่วง กล้วยไม้ช้างเป็นที่นิยมเลี้ยงกันมากเนื่องจากเลี้ยงได้ง่ายและออกดอกทุกปี (อุดม และพัชราวดี, 2549)

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกที่มีการส่งออกมากที่สุดในประเทศไทย ปัจจุบันมีการส่งออกในลักษณะต้นและไม้ตัดดอก มีมูลค่าไม่น้อยกว่า 1,200 ล้านบาทต่อปี หรือคิดเป็นร้อยละ 85 ของ

การส่งออกไม้ดอกไม้ประดับทั้งหมดและมูลค่าการส่งออกกล้วยไม้ของไทยเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (สุพัตรา และวีณัน, 2548) แต่การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยทั่วไปใช้วิธีการเพาะเมล็ดในสภาพธรรมชาติ ซึ่งโอกาสที่เมล็ดจะงอกและพัฒนาเป็นต้นได้น้อยมาก (ณัฐา, 2548) โดยในธรรมชาติสามารถงอกเป็นต้นไม่ถึงร้อยละ 0.1 เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้ที่แก่แล้วไม่มีทั้งใบเลี้ยงและเอนโดสเปิร์ม จึงไม่มีอาหารสะสมไว้เลี้ยงต้นอ่อน (สมปอง, 2538) บางครั้งต้นที่ได้อาจเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม เนื่องจากการผสมข้ามกับกล้วยไม้ชนิดอื่นตามธรรมชาติ จึงได้มีการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนชั้นบาง ๆ (thin cell layer) (van Le *et al*., 1999) จากความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างแดงข้างต้น เป็นช่องทางในการใช้วิธีการดังกล่าวเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในหลอดทดลองในระยะเวลาอันสั้น โดยใช้สารก่อกลายพันธุ์โคลชิซิน ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้าง spindle fiber (จรัสศรี, 2548) เพื่อเพิ่มชุดโครโมโซม ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ช้างแดงที่คาดว่าจะได้ดอกที่มีขนาดใหญ่ ระยะการบานของดอกบานนานกว่า 3 สัปดาห์ และสามารถเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว สำหรับในกล้วยไม้ช้างแดงยังไม่มีรายงานการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีนี้มาก่อน ดังนั้นในรายงานฉบับนี้เป็นการศึกษาผลของความเข้มข้นของโคลชิซิน ต่อการเพิ่มชุดโครโมโซม เพื่อพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ ช้างแดงต่อไป

การปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การผลิตลูกผสมจากต้นพ่อแม่พันธุ์ดี (ครรชิต, 2541) การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสี (Irfag and Nawab, 2001) และชักนำให้เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม เรียกว่าการชักนำพืชให้เกิดพอลีพลอยด์ (polyploidy) (กนิษฐา, 2542; สุมนา, 2549) วิธีการเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์กับการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ได้เช่นกัน ซึ่งกล้วยไม้ที่เป็นต้นพอลีพลอยด์มักมีดอกขนาดใหญ่ กลีบกว้าง หนา สีเข้ม รูปทรงดอกดีและแข็งแรงกว่าดอกกล้วยไม้ที่เป็นต้นดิพลอยด์ (diploid) (Norberto, 2005) เนื่องจากการผสมข้ามกับกล้วยไม้ชนิดอื่นตามธรรมชาติ ทำให้ปัจจุบันกล้วยไม้ป่าหลายชนิดมีจำนวนลดลง หลายชนิดหายาก หลายชนิดอาจจะสูญพันธุ์ (อุดม และพัชราวดี, 2549) เพื่อเป็นการป้องกันการโดนทำลายจากการทำลายป่า จำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (van Le *et al*., 1999) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชวิธีหนึ่งและนับเป็นวิธีเดียวที่สามารถขยายพันธุ์กล้วยไม้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น เหมาะที่จะนำมาเป็นเครื่องมือสำหรับการขยายพันธุ์พืชในทางการค้า การส่งออกและการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป การขยายพันธุ์กล้วยไม้ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีบทบาทสำคัญอย่างมากในปัจจุบัน

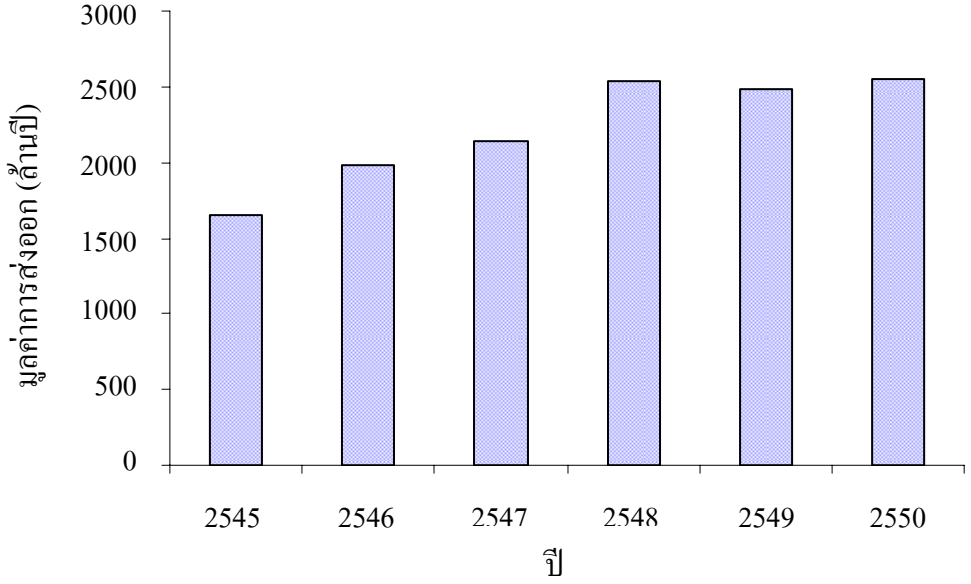
รูปที่ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้ช้างแดง
ที่มา **:** http://www.fernsiam.net/forumII/viewtopic.php?f=5&t=1338

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 ความสำคัญและสถานการณ์ของกล้วยไม้ในปัจจุบัน

กล้วยไม้เป็นพืชที่มีผู้นิยมปลูกเลี้ยงกันทั่วโลก ทั้งนี้เพราะกล้วยไม้มีหลากหลายสีที่พบตามธรรมชาติมีประมาณ 25,000 ชนิด มีทั้งต้นขนาดเล็ก ดอกเท่าหัวเข็มหมุด จนถึงต้นขนาดใหญ่เท่าต้นอ้อย ต้นมีการเจริญเติบโตเป็นกอเกาะบนคบไม้ หรือตามก้อนหิน หรือเจริญเป็นต้นเดี่ยวโดยมีรากอากาศยึดเกาะกิ่งไม้ บางชนิดเป็นกล้วยไม้ดิน เจริญเติบโตงอกงามอยู่ใต้ร่มไม้ที่มีอินทรียวัตถุปกคลุมผิวดิน ดอกมีหลายรูปแบบ มีทั้งชนิดดอกขนาดใหญ่ ดอกเดี่ยวเป็นช่อยาว ดอกสีขาว หรือสีสันสะดุดตา เช่น สีส้ม แดง เหลือง ฟ้า ม่วงสด มีหลายชนิดที่มีกลิ่นหอม การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้เมื่อเทียบกับพืชอื่น ๆ แล้วปลูกเลี้ยงได้ง่าย จึงมีผู้นิยมปลูกเลี้ยงและผสมพันธุ์ข้ามระหว่างพันธุ์ต่าง ๆ ปัจจุบันนี้พบว่ามีการผสมพันธุ์ข้ามชนิดและข้ามสกุลมากกว่า 30,000 คู่ผสม (มาลินี, 2534)

กล้วยไม้จัดเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีมูลค่าการส่งออกมากที่สุดทำรายได้เข้าประเทศกว่าพันล้านบาท นอกจากนี้ประเทศไทยยังได้รับการยกย่องจากประเทศต่าง ๆ ว่าเป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญที่สุดเนื่องจากมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมในการปลูกกล้วยไม้เมืองร้อน กล้วยไม้จึงเป็นพืชส่งออกที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทย กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กำหนดให้กล้วยไม้เป็นหนึ่งในสี่ของพืช Product Champion เนื่องจากเป็นพืชที่ทำรายได้สูงและปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี (สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2549) อุตสาหกรรมกล้วยไม้ของประเทศได้เจริญก้าวหน้าอย่างมาก และทำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นอับดับหนึ่งในจำนวนไม้ดอกไม้ประดับทั้งหมดที่มีการส่งออก ซึ่งการส่งออกดอกกล้วยไม้ และต้นกล้วยไม้มีปริมาณและมูลค่าเพิ่มขึ้นโดยตลอด ในปี 2549 มีผลผลิตส่งออก 23,348 ตัน คิดเป็นมูลค่า 2,490.95 ล้านบาท และในปี 2550 มีผลผลิตส่งออก 24,564 ตัน มูลค่าสูงขึ้นเป็น 2,544.82 ล้านบาท (รูปที่ 2) สามารถส่งออกกล้วยไม้ ไปยังประเทศต่าง ๆ กว่า 76 ประเทศ ตลาดส่งออกที่สำคัญได้แก่ ญี่ปุ่น อิตาลี และอเมริกา ประเทศไทย มีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมในการปลูกกล้วยไม้เมืองร้อน และสามารถส่งออกได้เป็นอันดับ 1 ของโลก (สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2549)



รูปที่ 2 มูลค่าการส่งออกดอกกล้วยไม้สดของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2545 – 2550
ที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2549)

1.2.2 การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยทั่วไปในธรรมชาติมักมีข้อจำกัดคือ ติดฝักน้อย เมล็ดมีขนาดเล็กภายในเมล็ดมีอาหารสะสมน้อยมากหรือไม่มีเลย จึงไม่เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอ เมล็ดจะงอกได้ต้องอาศัยเชื้อราไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) โดยเชื้อราส่งอาหารให้แก่เอ็มบริโอภายในเมล็ด ทำให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตเป็นโปรโตคอร์ม (protocorm) และเป็นต้นกล้วยไม้ที่สังเคราะห์แสงได้เองในระยะต่อมา (Mckendrick, 2000) กล้วยไม้มีเมล็ดต่อฝักมาก แต่ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวเปอร์เซ็นต์การงอกตามธรรมชาติจึงต่ำมาก ดังนั้นจึงได้ทดลองนำเมล็ดกล้วยไม้มาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกให้มากขึ้น ในระยะแรกมีการทดลองเตรียมอาหารโดยใช้เชื้อราไมคอร์ไรซาเลี้ยงร่วมอยู่ในอาหารด้วย ทำให้สามารถเพาะเมล็ดกล้วยไม้ให้เจริญเติบโตขึ้นได้ ต่อมามีการพัฒนาสูตรอาหารที่ไม่ต้องใช้เชื้อราได้สำเร็จ โดยสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเมล็ดกล้วยไม้คือ VW (ไพบูลย์, 2521) ขั้นตอนแรกของการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อคือ การทำให้เมล็ดปราศจากเชื้อ โดยนำฝักแก่ที่ยังไม่แตกมาจุ่มแช่ด้วยเอธานอล 95% ผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว หากเป็นฝักแก่แห้งและแตกแล้วฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ 10% เป็นเวลา 15 - 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ตามลำดับ (Buyun *et al*., 2004) จากนั้นนำเมล็ดมาเลี้ยงในอาหารเหลวหรืออาหารวุ้นสูตรที่เหมาะสม โดยวางเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน

การเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อหรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีปัจจัยที่สำคัญหลายประการ ได้แก่ ชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโต สำหรับชิ้นส่วนพืชที่นิยมใช้ ได้แก่ เมล็ด ตายอด ตาข้าง ช่อดอก ใบ และราก สูตรอาหารสังเคราะห์ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ ได้แก่ สูตรดัดแปลง VW สูตร Knudson C และสูตร MS (ครรชิต, 2538) ร่วมกับน้ำมะพร้าว ความเข้มข้น 10 - 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ เช่น สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ และความเข้มแสง เป็นต้น ปัจจุบันนี้มีรายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หลายสกุลด้วยกัน ปรัชพรรณ และสมปอง (2550) ได้ศึกษาผลของสารอินทรีย์และสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรในหลอดทดลอง พบว่า การเพาะเลี้ยงต้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเพิ่มความเข้มข้นของสารอินทรีย์เป็น 2.5 เท่า ของสูตร MS ปกติ สามารถชักนำยอดรวมเฉลี่ยสูงสุด 4.78 ยอดต่อชิ้นส่วน ภายในระยะเวลา 30 วัน สกุลรัตน์ และสมปอง (2550) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนปลายยอดของ

กล้วยไม้เหลืองจันทรบูรบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับน้ำตาลชนิดต่าง ๆ และผงวุ้นชนิด ต่าง ๆ พบว่า อาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น Phytagel เข้มข้น 0.17 เปอร์เซ็นต์ให้การสร้างโปรโตคอร์มสูงสุด 51.65 เปอร์เซ็นต์ Chang และคณะ (1998) สามารถเพิ่มปริมาณต้นกล้ากล้วยไม้ *Cymbidium ensifolium* var. misericors จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มบนอาหารสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้โปรโตคอร์มมีการพัฒนาของราก และยอดชัดเจนขึ้น Chen และคณะ (2000) สามารถชักนำแคลลัสและเพิ่มปริมาณกล้วยไม้ *Phalaenopsis* จากการเพาะเลี้ยงใบ บนอาหารสูตร VW เติม 2,4-D เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร Malabadi และคณะ (2004) สามารถเพิ่มปริมาณยอดรวมและโปรโตคอร์ม กล้วยไม้ *Vanda coerulea* ได้สูงสุด 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม TDZ เข้มข้น 11.35 ไมโครโมลาร์ Roy และคณะ (2001) สามารถเพิ่มปริมาณ hop (*Humulus lupulus* L.) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ได้ในระยะเวลาอันสั้นบนอาหารสูตร Knudson C เติม TDZ หรือ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ สำหรับการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้สกุลช้างนั้น van Le และคณะ (1999) รายงานการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ ในสูตรอาหาร MS สำหรับเร่งการพัฒนาตายอดจากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม และชักนำการสร้างรากในอาหารเติม forchlofenuron เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์

นอกจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งแล้วยังมีวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เรียกว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวภายใต้สภาพการเขย่าเลี้ยง และมีการควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตและมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว สามารถที่จะย้ายเลี้ยงได้เร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแคลลัส (สมปอง, 2550) Tokuhara และ Mii (2001) รายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นกล้วยไม้ *Phalaenopsis* โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และ BA เข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ ในอาหารเหลวสูตร NDM สำหรับการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น ในการเพิ่มปริมาตรเซลล์ ใช้สูตรอาหารเดียวกันแต่เพิ่มความเข้มข้น NAA เป็น 5.4 ไมโครโมลาร์ จากผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัส

และเซลล์ซัสเพนชั่นช่วยให้การใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ร่วมกับแหล่งชิ้นส่วนพืชในหลอดทดลองมีความเป็นได้สูงมาก

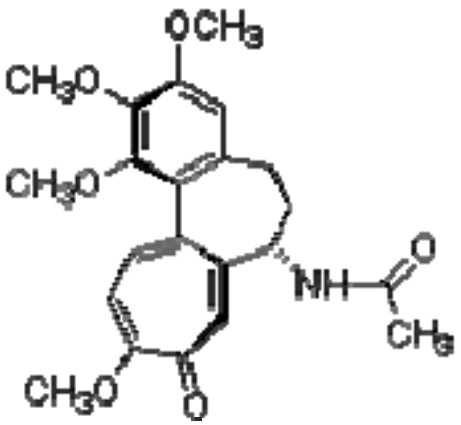
1.2.3 การเพิ่มชุดโครโมโซม

โครโมโซม คือ โครงสร้างทางพันธุกรรม เป็นที่อยู่ของหน่วยกรรมพันธุ์ โครโมโซมทำหน้าที่ เก็บรักษา ถ่ายทอด และแสดงออกของข้อมูลพันธุกรรม จีโนม หมายถึง จำนวนโครโมโซมหรือปริมาณดีเอ็นเอในหนึ่งชุด ถ่ายทอดจากพ่อแม่ให้กับลูก หรือโครโมโซมหรือจีนที่มีในแกมีทของพ่อกับแม่ ดังนั้น 1 ชุด (1x) หมายถึง 1 จีโนม โดยที่สิ่งมีชีวิตชนิดดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมในเซลล์สืบพันธุ์ และในเซลล์ร่างกายมีเป็น 2 ชุด (2x) ในสภาพปกติจะพบสิ่งมีชีวิตที่เป็นดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซม 2n และมีองค์ประกอบของโครโมโซมเป็นจีโนมชุดเดียวกัน 2 ชุด ส่วนพอลีพลอยด์ เป็นสิ่งมีชีวิตที่เซลล์ร่างกายมีจีโนมมากกว่า 2 ชุดขึ้นไป เช่น 3 ชุดจีโนม (triploid, 3x) 4 ชุดจีโนม (tetraploid, 4x) 5 ชุดจีโนม (pentaploid, 5x) เป็นต้น พอลีพลอยด์อาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยมีสาเหตุมาจากเซลล์ที่จำลองโครโมโซมแต่ไม่มีการแบ่งเซลล์ ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของเซลล์ขึ้นมาอีก 1 ชุด (อมรา, 2540) เนื่องจากพอลีพลอยด์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีน้อย มนุษย์จึงหาวิธีชักนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเพื่อให้เกิดพอลีพลอยด์ในพืช เพราะพืชที่เป็นพอลีพลอยด์มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากมักมีผลให้ปริมาณสารในเซลล์เพิ่มขึ้น ขนาดเซลล์ขยายเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีขนาดต้น ใบ และดอกใหญ่ขึ้น ลักษณะเหล่านี้แตกต่างจากลักษณะที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยการผสมเกสร (Griesbach, 1985) จึงมีการนำพอลีพลอยด์มาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เพราะพืชที่เป็นพอลีพลอยด์เมื่อนำมาผสมพันธุ์กับต้นอื่นสามารถทำให้เกิดพันธุ์ใหม่ได้ (ชะบา, 2527)

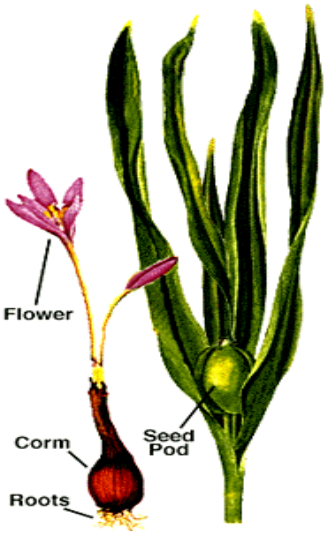
1.2.4 การใช้สารเคมีเพิ่มชุดโครโมโซม

สารเคมีที่ใช้ในการชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ในพืชส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม alkylating agents ตัวอย่างสารเคมีในกลุ่มนี้ คือ โคลชิซิน ซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า Acetyltrimethylcolchicinic acid : (S)-N-(5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzo (a) heptalen-7-yl) acetamine มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 399.43 มีสูตรโครงสร้างคือ $C_{22}H_{25}NO_6$ (รูปที่ 2) (Matthew, 1998) โคลชิซินมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อนเก็บรักษาในที่มืดอุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส ถึง -25 องศาเซลเซียส เป็นสารประกอบอัลคาลอยด์ สกัดได้จากเมล็ดและ

หัวของพืชพวก *Colchicum autumnale* L. (รูปที่ 3) (Snyder, 2007) เป็นสารที่เป็นพิษต่อร่างกาย โคลชิซินถูกค้นพบโดยนักวิทยาศาสตร์ประมาณปี คศ. 1920 ซึ่งเป็นการค้นพบโดยบังเอิญ เมื่อสารละลายโคลชิซินสัมผัสกับเซลล์ที่กำลังแบ่งเซลล์ ส่งผลต่อการยับยั้งการสร้างและการพัฒนาเส้นใยสปินเดิล



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของโคลชิซิน
ที่มา: Matthew (1998)



รูปที่ 4 โครงสร้างลำต้น ใบ ดอก และหัวของ *Colchicum autumnale* L.
ที่มา: Snyder (2007)

การทำงานของสารโคลชิซิน จะไปอุดตามปลายท่อต่าง ๆ ของไมโครทูบูลภายในเซลล์ทำให้ไม่เกิดการสร้างเส้นใยสปินเดิล ในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์ (วัชรินทร์, 2544) โครโมโซมจึงไม่เคลื่อนตัวเข้าสู่ขั้วเซลล์ ทำให้จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า หรือมากกว่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารและระยะเวลาที่ใช้ รวมทั้งชนิดของพืชและชิ้นส่วนที่ใช้ด้วย (อดิศร, 2539 อ้างโดย สมโชค, 2545) ความผิดปกติที่พบนอกเหนือจากการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม แล้วยังมีการเกิด aneuploid คือ การที่จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นหรือลดลงเป็นบางแท่ง และการเกิด chimera คือเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมแบบพลอยดี ในบางส่วนของเนื้อเยื่อพืชซึ่งมักจะพบใน 2 ลักษณะ คือ sectorial ploid-chimera และ periclinal ploid-chimera โดย sectorial ploid-chimera คือเกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงบางส่วนของตาที่เจริญเป็นพลอยดี ส่งผลให้ส่วนที่เปลี่ยนแปลงกลายเป็นพลอยดี แต่ส่วนอื่นยังคงปกติ ส่วน periclinal ploid-chimera เกิดจากเซลล์ชั้นของเอพิเดอร์มิส และเซลล์ชั้นในมีจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกัน ผลที่ได้อาจส่งผลให้เซลล์ปากใบซึ่งเจริญมาจากเซลล์ชั้นนอกแสดงผลเป็นพลอยดี คือลักษณะใหญ่กว่าปกติแต่ขนาดของละอองเรณู ซึ่งเจริญมาจากเซลล์ชั้นในมีลักษณะปกติ (กฤษฎา, 2519 อ้างโดย สมโชค, 2545) การใช้สารโคลชิซินกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด ได้แก่ การแช่ชิ้นส่วนและแช่แคลลัสของหน้าวัวพันธุ์ Double Spathe ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้นของโคลชิซินที่สูงขึ้น ทำให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชลดลง ผลของโคลชิซินมีแนวโน้มให้เกิดลักษณะใบด่าง และความยาวปากใบมากขึ้น แต่จาการศึกษาจำนวนโครโมโซม พบว่าไม่เปลี่ยนแปลง (วิชชุตา, 2537) Griesbach (1981) ศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* ในอาหารเหลวร่วมกับโคลชิซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้โปรโตคอร์ม มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าได้ 50 เปอร์เซ็นต์ Thao และคณะ (2003) นำยอดของต้น Green Velvet ซึ่งเป็นพืชสกุล *Alocasia* แช่ในโคลชิซิน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 30 วัน ซึ่งเป็นวิธีการเดียวกับที่ใช้ใน *Buddleia globosa* (Rose *et al*., 2000) Shao และคณะ (2003) เติมโคลชิซินในอาหารเพาะเลี้ยงส่วนข้อของต้นทับทิม (*Punica granutum*) สามารถชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ได้สูงสุด 20 เปอร์เซ็นต์

วิธีการเพิ่มชุดโครโมโซมมีหลายวิธี จำเป็นต้องเลือกใช้วิธีการให้เหมาะสมกับชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อพืชที่นำมาชักนำ อีกทั้งต้องคำนึงถึงความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินและระยะเวลาที่ให้แก่ชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อพืชด้วย (Blakeslee *et al*., 1937) ชิ้นส่วนพืชที่มีลักษณะแข็งหรือมีอายุมากมักต้องใช้โคลชิซินความเข้มข้นสูง จากการทดลองชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ใน

พืชบางชนิด พบว่า ช่วงความเข้มข้นของโคลชิซินที่เลือกใช้สัมพันธ์กับชิ้นส่วน โดยเรียงลำดับตามชิ้นส่วนที่ต้องการสารโคลชิซินจากความเข้มข้นสูงไปต่ำได้ดังนี้ คือ ตาข้าง เมล็ด ยอดอ่อน และต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามลำดับ และการเพิ่มชุดโครโมโซมในกล้วยไม้ มีการใช้ชิ้นส่วนหลายชนิด เช่น ลำต้น โครงสร้างคล้ายโปรโตคอร์ม แคลลัส และต้นที่สมบูรณ์ โดยทั่วไปความเข้มข้นของโคลชิซินที่ใช้ในการทดลองชักนำกล้วยไม้ให้เกิดพอลีพลอยด์ อยู่ในช่วง 0.01-0.20 % (w/v) (Vichiato *et al*., 2007) มีเฉพาะการทดลองของ Menninger (1963) เท่านั้นที่ใช้โคลชิซินระดับความเข้มข้นสูงถึง 1% (w/v) สำหรับระยะเวลาที่ให้มีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของกล้วยไม้และชิ้นส่วนที่นำมาชักนำ ระยะเวลาที่ใช้นานที่สุดคือ 10 วัน (Griesbach. 1981; 1985) ในการทดลองการชักนำกล้วยไม้ให้เกิดพอลีพลอยด์ พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นพอลีพลอยด์ได้สูงสุด คือ 0.05% (w/v) ส่วนระยะเวลาขึ้นกับชนิดของกล้วยไม้ ในกรณี PLBs ของกล้วยไม้ *Cattleya intermedia* Lindl. ใช้ระยะเวลา 8 วัน (Silva *et al*., 2000) PLBs ของกล้วยไม้พันธุ์ Silky ซึ่งเป็นกล้วยไม้ลูกผสมในสกุล *Cymbidium* ใช้ระยะเวลา 1 สัปดาห์ (Kim *et al*., 2003) PLBs ของกล้วยไม้ในสกุล *Phalaenopsis* ใช้ระยะเวลา 10 วัน (Griesbach, 1985) Griesbach (1981) ได้ทำการเพาะเลี้ยง โปรโตคอร์ม ของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* ในอาหารเหลวร่วมกับโคลชิซิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.0005%) พบว่า สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มที่เป็นต้นพอลีพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าได้ 50 เปอร์เซ็นต์

สำหรับตัวอย่างการใช้โคลชิซินช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ กับชิ้นส่วนพืช เช่น ตาข้างของพืชที่ปลูกตามสภาพธรรมชาติ มักใช้วิธีการหยดสารละลายบนตาข้างโดยตรง ตาข้างของหม่อนใช้ โคลชิซินเข้มข้น 0.4% (ประชาชาติ และสำเริง, 2540) ตาข้างของถั่วเขียวพันธุ์อู่ทอง ใช้โคลชิซินเข้มข้นช่วง 0.1 - 0.5% (มยุรี, 2547) สำหรับเมล็ดมักใช้วิธีการแช่ในสารละลายโคลชิซิน โดยในเมล็ดข้าวโพดใช้สารละลายโคลชิซินเข้มข้นช่วง 0.1 - 0.5% (จักรกฤษณ์ และคณะ, 2545) เมล็ดถั่ว chickpeas (*Cicer arietinum*) ซึ่งเป็นพืชอาหารสัตว์ใช้สารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.25% (Sohoo *et al*., 1970) และเอ็มบริโอของข้าวซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่ยังอ่อนอยู่ ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโคลชิซินผสมอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.01 - 0.05% (ประดิษฐ์ และคณะ, 2537) นอกจากความเข้มข้นของโคลชิซินแล้ว ระยะเวลาการจุ่มแช่ชิ้นส่วนพืชที่ได้รับโคลชิซินเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดพืชพอลีพลอยด์ สิทธิพงษ์ (2553) รายงานว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้น และระยะเวลาการจุ่มแช่สารโคลชิซินที่สูงขึ้นในเมล็ดงอกปาล์มน้ำมัน ส่งผลให้เซลล์คุมมีความยาวมากขึ้น โดยที่โคลชิซินเข้มข้น 7.5 มิลลิโมลาร์ จุ่มแช่นาน 48 ชั่วโมง ให้ขนาด

และความหนาแน่นของเซลล์คุมมีลักษณะแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างชัดเจน โดยทั่วไปแล้วการให้โคลชิซินความเข้มข้นต่ำมักให้เป็นระยะเวลานาน ส่วนความเข้มข้นสูงใช้ระยะเวลาสั้น อย่างไรก็ตามพืชแต่ละชนิดมีความทนต่อพิษของโคลชิซินได้แตกต่างกัน หากชิ้นส่วนพืชได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้นสูงเกินไปหรือนานเกินไปจะทำให้มีอัตราการตายสูง ดังผลในการศึกษาการชักนำผักกาดขาวให้เกิดเป็นพอลีพลอยด์ ซึ่งใช้วิธีการแช่เมล็ดในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.25% และ 0.50% จุ่มแช่นาน 24 ชั่วโมง พบว่า ต้นอ่อนในเมล็ดตายหมด แต่สำหรับเมล็ดผักคะน้า ที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.5% นาน 24 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดคะน้าพอลีพลอยด์ได้ (จักรกฤษณ์ และคณะ, 2545) ดังนั้นในการชักนำพืชให้เกิดพอลีพลอยด์จำเป็นต้องทดลองเพื่อหาระดับความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้พืชมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากและมีเปอร์เซ็นต์การเกิดพอลีพลอยด์สูง อย่างไรก็ตามวิธีการนี้อาจทำให้พืชมีโอกาสเกิดไคเมอราได้สูง

1.2.5 การตรวจสอบการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม

พืชที่เป็นพอลีพลอยด์เป็นพืชที่มีโครโมโซมมากกว่า 2 ชุด ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากพืชที่เป็นดิพลอยด์หลายประการดังนี้ ใบหนาและโตกว่า มีปากใบกว้าง ดอกใหญ่ มีสีเข้ม ผลขนาดใหญ่ อายุการเก็บเกี่ยวช้ากว่าปกติ เนื่องจากมีการแบ่งเซลล์ที่ช้ากว่าปกติ การติดเมล็ดลดลง ละอองเกสรใหญ่กว่า มีความเป็นหมันมาก และมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น การตรวจสอบระดับพลอยดีสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้คือ

1) การศึกษาจำนวนโครโมโซมปลายราก

เป็นวิธีที่ถูกต้องและชัดเจนที่สุด อย่างไรก็ตามการศึกษาจำนวนโครโมโซมส่วนใหญ่ใช้เซลล์จากปลายรากในระยะที่เซลล์กำลังแบ่งเซลล์แบบไมโทซีส ระยะที่เหมาะสมคือระยะเมตาเฟส เพราะเป็นช่วงที่โครโมโซมหดสั้นที่สุด เป็นวิธีการศึกษาที่ค่อนข้างทำได้ยากต้องใช้เทคนิคที่เหมาะสม จึงจะสามารถมองเห็นโครโมโซมในระยะที่ต้องการ ใช้ระยะเวลานานและเทคนิคที่ใช้ในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน นอกจากนี้พืชที่มีจำนวนโครโมโซมมากหรือมีโครโมโซมขนาดเล็กจะทำให้มีโอกาสนับจำนวนได้ผิดพลาดมากขึ้น Griesbach และ Bhat (1990) ศึกษาการชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ใน *Eustoma grandiflorum* โดยหยดโคลชิซินเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ บนเนื้อเยื่อเจริญของต้นที่มีความสูง 2 - 3 เซนติเมตร เป็นเวลา 0 3 และ 5 วัน เมื่อ

ตรวจสอบโครโมโซมปลายราก พบว่า มีความแตกต่างระหว่างต้นดิพลอยด์ (2n = 2x = 18) และเททระพลอยด์ (2n = 4x = 36) Rose และคณะ (2000) ชักนำให้เกิดเททระพลอยด์ใน *Buddleia* โดยใช้ข้อทรีตโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.01 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วัน พบว่า โคลชิซิน เข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ได้ โดยเมื่อนับจำนวนโครโมโซม พบว่า 2n = 4x = 76 รัชนีวรรณ (2546) ศึกษาผลของความเข้มข้นของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของตำลึงที่ผ่านการหยดสารโคลชิซินเข้มข้น 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 8 10 และ 12 ครั้ง ที่ปลายยอดของต้นกล้า พบว่า มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น 4 ชุด (2n = 4x = 48) Yang และคณะ (2006) ศึกษาการใช้โคลชิซินชักนำให้เกิดเททระพลอยด์ในองุ่น (*Vitis vinifera* L.) โดยนำโซมาติกเอ็มบริโอมาทรีตด้วยโคลชิซิน ที่ความเข้มข้น 0 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 2 และ 3 วัน เมื่อนำมาตรวจสอบโครโมโซมปลายราก พบว่า มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นจาก 38 คู่ เป็น 76 คู่

2) การศึกษาลักษณะสัณฐาน และสรีรวิทยา

เมื่อพืชเพิ่มจำนวนโครโมโซมทำให้มีจำนวนอัลลีลของยีนเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีนมากขึ้นด้วย (Fan *et al*., 2003) โดยทั่วไปพืชพอลีพลอยด์มักจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไปจากต้นดิพลอยด์ปกติ จึงสามารถนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางลักษณะมาใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกพืชพอลีพลอยด์ออกจากพืชดิพลอยด์ ทิวา (2533) ศึกษาผลของโคลชิซินที่มีต่อการกลายพันธุ์ในแกลดิโอลัส โดยใช้ความเข้มข้นที่ระดับ 0 - 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาในการแช่ 6 - 36 ชั่วโมง พบว่า โคลชิซินทำให้น้ำหนัก ขนาดของแคลลัส และความสูงของต้นมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของโคลชิซินสูงขึ้น ราตรี (2540) รายงานว่า การแช่ตายอดมังคุดด้วยโคลชิซิน เข้มข้น 500 750 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ความยาวรากเพิ่มขึ้น จำนวนใบลดลง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มียอดรอดชีวิตเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ Escandon และคณะ (2006) ศึกษาการใช้โคลชิซินในการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของ *Bacopa monnieri* โดยจุ่มแช่โคลชิซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า ต้นเททระพลอยด์มีขนาดของใบหนาขึ้น และดอกมีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ รัชนีวรรณ (2546) พบว่า ต้นตำลึงที่ได้รับสารโคลชิซินมีใบหนาขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับใบปกติ

ลักษณะทางสรีรวิทยาเกี่ยวกับกระบวนการหายใจ คายน้ำ และสังเคราะห์แสงของพืช ซึ่งอวัยวะที่ทำหน้าที่เหล่านี้คือ ปากใบ ปริมาณคลอโรฟิลล์ ตลอดจนจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม การเปลี่ยนแปลงของอวัยวะดังกล่าว สามารถที่จะนำมาเป็นเครื่องหมายทางสรีรวิทยาที่บ่งบอกถึงผลของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมได้ โดยเฉพาะ ขนาดของปากใบ เป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวกรวดเร็ว หากตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบว่า ปากใบพืชที่เป็นพอลีพลอยด์ซึ่งได้จากการทรีตด้วยโคลชิซินมีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ และที่สำคัญคือมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นทวีคูณ Pryor (1972) ใช้สารละลายโคลชิซิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ แช่เมล็ดเยอบีร่านาน 1 - 2 ชั่วโมง เพื่อชักนำการเกิดพอลีพลอยด์ พบว่าขนาดของเซลล์ปากใบของต้นที่ได้รับสารเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับต้นควบคุม วิชชุตา (2537) ศึกษาผลของโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.00 0.01 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง กับข้อและแคลลัสที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์ Double Spathe พบว่า ข้อที่จุ่มแช่โคลชิซินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวของปากใบเฉลี่ยสูงที่สุดเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน นอกจากขนาดของปากใบแล้วจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม และความหนาแน่นของเซลล์ปากใบก็ใช้เป็นเครื่องหมายทางสรีรวิทยาได้เช่นเดียวกัน Sari และคณะ (1999) พบว่า สามารถใช้จำนวนคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์คุมของปากใบเป็นตัวบ่งชี้จำนวนชุดโครโมโซมในแตงโมได้ แตงโมแฮพลอยด์มีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ และขนาดปากใบเล็กกว่าแตงโมดิพลอยด์ เมื่อพิจารณาความหนาแน่นของปากใบ พืชที่เป็นพอลีพลอยด์มีความหนาแน่นของปากใบน้อยกว่าความหนาแน่นของปากใบของพืชที่เป็นดิพลอยด์ (นิตย์ศรี และ อำไพ, 2541) ส่วนจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุม นั้นมีรายงานว่า เพิ่มขึ้นเมื่อระดับพลอยดีเพิ่มขึ้น (นิตย์ศรี และ อำไพ, 2541; Chulalaksananukul and Chimnoi, 1999) Ranney (2007) รายงานว่าสามารถนำจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุมมาใช้ตรวจสอบการเป็นพืชพอลีพลอยด์ได้เช่นกัน ขนาดของละอองเรณูเป็นอีกตัวแปรหนึ่งที่ใช้ทำนายผลของพืชพอลีพลอยด์ จากการศึกษาขนาดของละอองเรณูของต้นถั่ว chickpeas พบว่าละอองเรณูของต้นที่เป็นพอลีพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่าละอองเรณูของต้นดิพลอยด์อย่างชัดเจน (Sohoo *et al*., 1970) การงอกของละอองเรณูเป็นตัวบ่งชี้อีกลักษณะ จากการศึกษาในกล้วยไม้ *Dendrobium superbiens* พบว่า ละอองเรณูของต้นที่เป็นอัลโลเททระพลอยด์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกมากกว่าต้นที่เป็นดิพลอยด์ (สาริณี, 2538) เมื่อจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น ขนาดนิวเคลียสใหญ่ขึ้น และส่งผลให้เซลล์ขยายขนาดเพื่อรักษาอัตราส่วนระหว่างปริมาตรของไซโต- พลาสซึมกับปริมาตรของนิวเคลียสให้คงที่ (Fan *et al*., 2003)

3) ศึกษาโดยวิธี flow cytometry

เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้วิเคราะห์ขนาดของนิวเคลียส หรือปริมาณดีเอ็นเอที่เป็นองค์ประกอบในนิวเคลียสด้วยการฉายแสงเลเซอร์ผ่านเซลล์ แล้ววัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้นตามหลักการทางฟิสิกส์ แปรผลออกมาในรูปของปริมาณดีเอ็นเอที่ปรากฏในเซลล์ หรือกลุ่มเซลล์นั้น ๆ ในการใช้ flow cytometry สามารถตรวจสอบได้รวดเร็ว (Dolezel *et al*., 1989; ศิรินันท์, 2548) วิธีการ คือ ทำการแยกเซลล์ออกมาโดยการหั่นส่วนใบพืชเป็นชิ้นบาง ๆ ด้วยมีดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้แยกเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ กรองเซลล์แล้วนำมาย้อมด้วยสารให้สีเรืองแสง เช่น PI (propidium iodine) หรือ DAPI [4,6-bis(2-imidazxoliyl-4H,5H) -2-phenylindol] วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง flow cytometry โดยจะมีการฉีดพ่นสารละลายของเซลล์ที่มีการย้อมสีนิวเคลียสผ่านช่องป้อนด้านหน้าตัวเครื่องให้เซลล์ผ่านลำแสง ซึ่งเมื่อกระทบกับนิวเคลียสที่ย้อมสีเครื่องตรวจจะแปลงค่าการดูดกลืนแสงเป็นกราฟหรือที่เรียกว่า ดีเอ็นเอฮีสโตแกรม เมื่อนำฮิสโตแกรมมาเปรียบเทียบกับเซลล์มาตรฐานที่ทราบปริมาณดีเอ็นเอแล้ว สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพืชโดยอาศัยความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอได้ รวมทั้งบอกถึงความผิดปกติของเซลล์ได้ Koutoulis และคณะ (2005) รายงานการตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมที่เกิดจากการเพิ่มชุดจำนวนโครโมโซมโดยใช้สารโคลชิซินกับต้น hop *(Humulus lupulus* L.) โดยใช้ flow cytometry ในการตรวจสอบการเพิ่มชุดโครโมโซมว่ามีประสิทธิภาพมากที่สุด ตามที่รายงานโดย รัตนา และคณะ (2552) พบว่า สามารถวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลหวายที่ต้องการตรวจสอบได้ Rival และคณะ (1997) วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากแคลลัสปาล์มน้ำมันแล้วย้อมด้วยสี PI พบว่า สามารถวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอได้ และจากการแยกนิวเคลียสจากชิ้นส่วนใบและแคลลัสของปาล์มน้ำมันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แล้วย้อมด้วย PI พบว่า มีปริมาณดีเอ็นเอแตกต่างกัน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาระดับความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลาที่มีต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ช้างแดง
2. เพื่อศึกษาผลของโคลชิซินต่อลักษณะทางสรีรวิทยา เซลล์วิทยา และสัณฐานวิทยาของต้นกล้าในหลอดทดลองเพื่อพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ช้างแดงในอนาคต

บทที่ 2

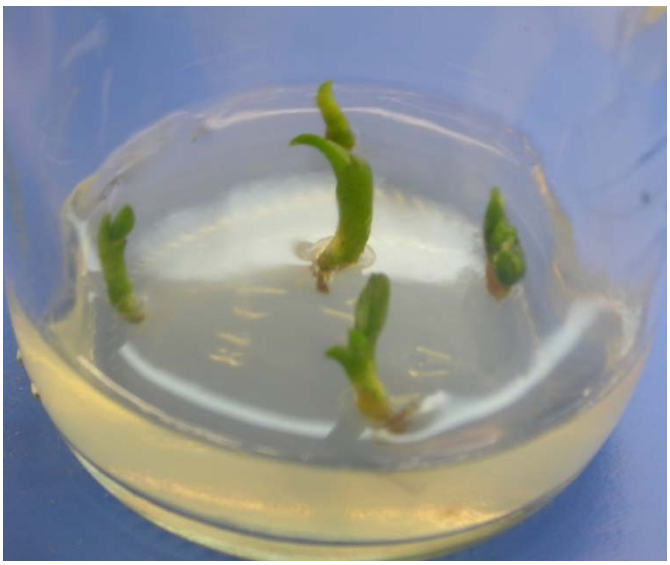
วิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

ใช้ PLBs กล้วยไม้ช้างแดงอายุ 2 เดือน ที่อยู่ในระยะ GI 5 โดยทั่วไปโปรโตคอร์มกล้วยไม้มีระยะการเจริญ และพัฒนาของโปรโตคอร์ม 5 ระยะ คือ GI 2 โปรโตคอร์มเจริญในช่วงสัปดาห์ที่ 5 โปรโตคอร์มบวมใหญ่ขึ้น และหลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด มีสีเขียว GI 3 โปรโตคอร์มเจริญในช่วงสัปดาห์ที่ 9-11 พบว่า โปรโตคอร์ม จะเป็นก้อนกลม ๆ มีสีเขียว และบางโปรโตคอร์มเริ่มมีขนโปรโตคอร์ม ปรากฏให้เห็น ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นบาง ๆ ขึ้นอยู่ที่ฐานโปรโตคอร์ม GI 4 ช่วงสัปดาห์ที่ 11-12 ระยะนี้โปรโตคอร์มมีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด คือเกิดยอดแหลมของโปรโตคอร์ม ซึ่งมีเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และยืดยาวออก เพื่อที่จะเจริญไปเป็นใบ GI 5 สัปดาห์ที่ 13 ต้นอ่อนจะมีใบ 2 ใบ ที่ฐานโปรโตคอร์ม มีตุ่มรากเกิดขึ้นประมาณ 4-5 ตุ่ม และมีรากสีขาว ยาวประมาณ 0.4 เซ็นติเมตร GI 6 สัปดาห์ที่ 13-14 โปรโตคอร์ม มีการยืดยาวเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ ที่ชักนำมาจากการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ โดยย้ายเลี้ยงทุก ๆ 10-14 วัน (รูปที่ 5) ในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 5 ลักษณะของ PLBs ที่อยู่ในระยะ GI 5 (10-14 วัน หลังย้ายเลี้ยง)

1.2 วัสดุสารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สูตร NDM, VW และ MS (รายละเอียดองค์ประกอบธาตุอาหารแสดงในตาราง ภาคผนวกที่ 1)
- น้ำตาลซูโครส
- วุ้นตรานางเงือก
- แอลกอฮอล์เข้มข้น 70 และ95 เปอร์เซ็นต์
- น้ำกลั่น

1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการชักนำและตรวจสอบการกลายพันธุ์

- โคลชิซิน
- แอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน
- สีย้อมโครโมโซม carbol fuchsin
- กรดอะซิติก

2. อุปกรณ์การทดลอง

- ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- ไมโครปิเปต
- หม้อนึ่งความดัน
- กล้องบันทึกภาพ
- เครื่องเขย่าเลี้ยง
- เครื่องคนสารละลาย
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องแก้วประกอบด้วย ขวดปรับปริมาตร กระบอกตวง บิกเกอร์ ฟลาสต์ ปิเปต ขวดเพาะเลี้ยง
- ตู้อบไมโครเวฟ
- อุปกรณ์ในการย้ายเลี้ยง ซึ่งประกอบด้วย ปากคีบ ด้ามมีด ใบมีดผ่าตัด กระดาษชำระ
- ชั้นวางเลี้ยง
- กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์และชุดบันทึกภาพ
- สไลด์แก้ว
- แผ่นปิดสไลด์

วิธีดำเนินการ

1. ศึกษาผลของความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลาจุ่มแช่ต่อการรอดชีวิตของ PLBs

ใช้ชิ้นส่วน PLBs ที่อยู่ในระยะ GI 5 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NDM เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10-14 วัน มาจุ่มแช่ในสารโคลชิซินเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ อินคูเบทบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้าง PLBs ด้วยอาหารเพาะเลี้ยง จนสารละลายโคลชิซินหมด ซับด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อจนแห้ง นำ PLBs ไป

เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ บันทึกอัตราการรอดชีวิตของ PLBs และอัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ LD_{50} หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 1 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของโคลชิซิน ทำการทดลองทั้งหมด 5 การทดลอง การทดลองละ 5 ต้น โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 5×3 ในแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test)

2. ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา

หลังจากทำการเพาะเลี้ยง PLBs ที่ได้จากการทรีตโคลชิซิน 5 ระดับความเข้มข้น 3 ระยะเวลา เป็นเวลา 1 เดือน ทำการย้ายเลี้ยงลงอาหารใหม่สูตรเดิมเพื่อช่วยให้ PLBs พัฒนาเป็นต้นที่แข็งแรงขึ้น หลังจากนั้นย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 1 เดือน เป็นเวลา 6 เดือน จึงทำการวัดขนาดเซลล์ปากใบ จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์ปากใบ และความหนาแน่นของเซลล์ปากใบ โดยตัดใบที่ 2 นับจากยอด จากนั้นใช้มีดโกนลอกด้านหลังใบตามแนวยาวของใบให้บางที่สุดเพื่อให้ได้ชั้นอีพิเดอร์มิส นำส่วนของแผ่นใบที่ลอกได้วางบนแผ่นสไลด์แก้ว หยดด้วยน้ำกลั่น 1-2 หยด ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำสไลด์ไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดคอมพาวด์ ใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า วัดขนาดเซลล์ปากใบ จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์คุม และความหนาแน่นของเซลล์ปากใบจำนวน 10 ปากใบต่อหนึ่งใบ ใช้ต้นละ 1 ใบ โดยใช้ตัวอย่าง 3 ต้น เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นและระยะเวลาการจุ่มแช่สารโคลชิซินและชุดควบคุม โดยใช้แผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล ในแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำต้น อายุ 6 เดือน หลังจุ่มแช่โคลชิซิน มาตรวจสอบผลการทดลองจำนวน 5 ต้น ในแต่ละชุดการทดลอง จึงทำการวัดความยาวใบ ความยาวราก จำนวนใบ และจำนวนราก เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้น และระยะเวลาในการจุ่มแช่สารโคลชิซินและชุดควบคุม โดยใช้แผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล ในแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

4. ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

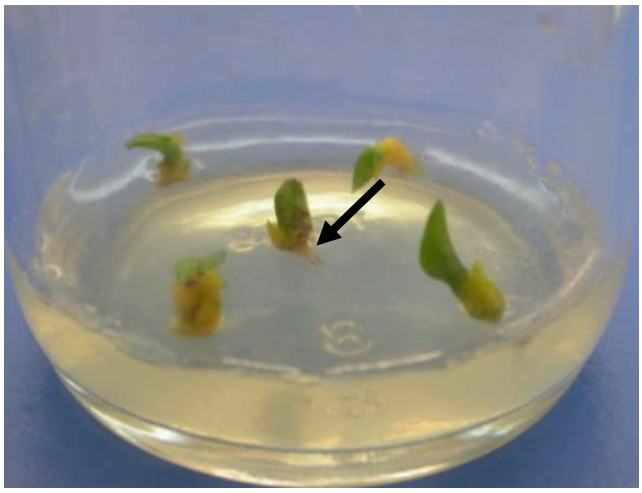
ศึกษาโครโมโซมจากปลายรากด้วยวิธี Feulgen squash ตามวิธีการที่รายงานโดย Sharma and Sharma (1980) ซึ่งมีขั้นตอนโดยย่อดังนี้ คือ เลือกรากที่ปลายรากมีสีเขียวใส ตัดราก ช่วงเวลา 9.00-11.00 น. ยาว 1 เซนติเมตร แช่ในสารละลายอิ่มตัวแอลฟาโบรโมแนฟทาลีน เก็บที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วใส่น้ำยาฟิกเซทีพ (fixative) ซึ่งมีส่วนผสมของเอธานอล 95% และกรดอะซิติกอัตราส่วน 3 : 1 เก็บที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างด้วยเอธานอล 95% 2-3 ครั้ง (เก็บรากไว้ในเอธานอล 70% ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ในกรณีที่ยังไม่ตรวจสอบจำนวนโครโมโซม) ไฮโดรไลซ์ปลายรากเพื่อทำให้เนื้อเยื่ออ่อนนุ่มด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ซับด้วยกระดาษกรอง แช่ในสีย้อม carbol fuchsin เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ล้างรากด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำไปวางบนสไลด์แก้ว ใช้ใบมีดโกนตัดเฉพาะส่วนปลายรากยาว 1-2 มิลลิเมตร หยดสี carbol fuchsin 1-2 หยด ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ แล้วเคาะด้วยยางลบดินสอไม้เบา ๆ เพื่อให้โครโมโซมในระยะเมตาเฟสกระจายตัว นำสไลด์ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดคอมพาวด์ นับจำนวนโครโมโซม บันทึกภาพ โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้น และระยะเวลาการจุ่มแช่โคลชิซิน ตรวจสอบการทดลองละ 5 ต้น ต้นละ 10 เซลล์

บทที่ 3

ผล

1. ผลของความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลาจุ่มแช่ต่อการรอดชีวิตของ PLBs

หลังจากย้าย PLBs ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0 – 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลาต่าง ๆ มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมที่ไม่เติมสารละลายโคลชิซิน พบว่า ทั้ง PLBs ที่ได้รับ และไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ ส่วนใหญ่มีการปล่อยสารสีน้ำตาลออกมา (รูปที่ 6) ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวกฟีนอล หลังจากเพาะเลี้ยง PLBs กล้วยไม้ช้างแดงบนอาหารแข็งสูตรเดิมนาน 1 เดือน จากการตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของ PLBs พบว่า อัตราการรอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาการจุ่มแช่ที่นานขึ้น การจุ่มแช่ที่ระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ให้อัตราการรอดชีวิต 84 57.07 และ 56.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และเมื่อพิจารณาอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของ PLBs ในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน พบว่า ความเข้มข้นของสารที่สูงขึ้นส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตลดลง โคลชิซินความเข้มข้น 0 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิตของ PLBs เฉลี่ย 68.33 65 55.77 44.88 และ 46.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในแต่ละความเข้มข้นของโคลชิซิน ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ให้อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยสูงสุด 84 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 7) เมื่อวิเคราะห์หาค่าด้วยสมการถดถอย (regression analysis) พบว่า สารละลายโคลชิซินที่สามารถชักนำให้ PLBs มีอัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) คือ ที่ความเข้มข้น 0.141 เปอร์เซ็นต์ เมื่อจุ่มแช่นาน 72 ชั่วโมง (รูปที่ 8)



รูปที่ 6 PLBs ระยะ GI 5 กล้วยไม้ช้างแดงที่ปล่อยสารประกอบฟีนอลสีน้ำตาล (ศรชี้)

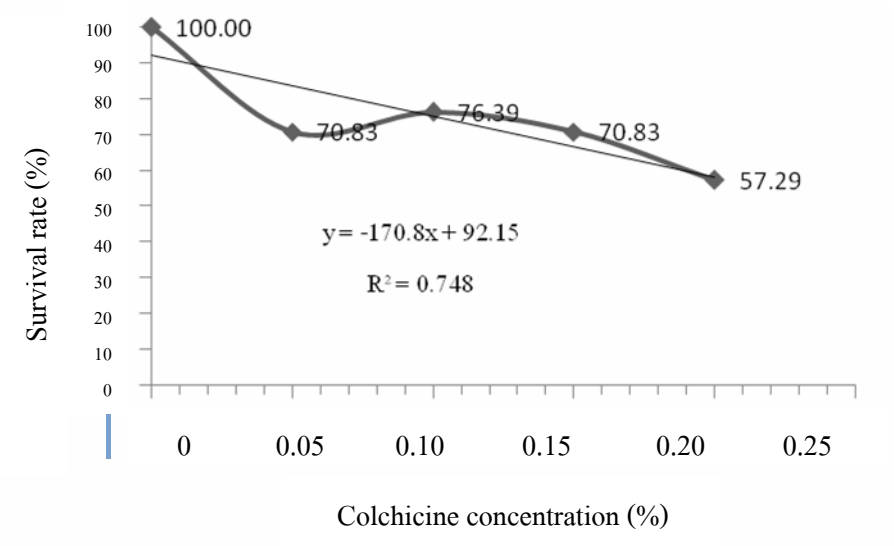
ตารางที่ 1 อัตราการรอดชีวิตของ PLBs กล้วยไม้ช้างแดง ที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0 (ควบคุม) 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้นโคลชิซิน (%)	อัตราการรอดชีวิต (%)			เฉลี่ย**
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	
0	96[a]	96[a]	96[a]	68.33A
0.05	84[ab]	68[ab]	55[bc]	65.00A
0.10	88[ab]	73.33[ab]	56[bc]	55.77B
0.15	72[ab]	68[ab]	70[ab]	44.88C
0.20	80[ab]	55[bc]	25[c]	46.88C
เฉลี่ย[ns]	84.00	57.07	56.60	
C.V. (%)	26.21			

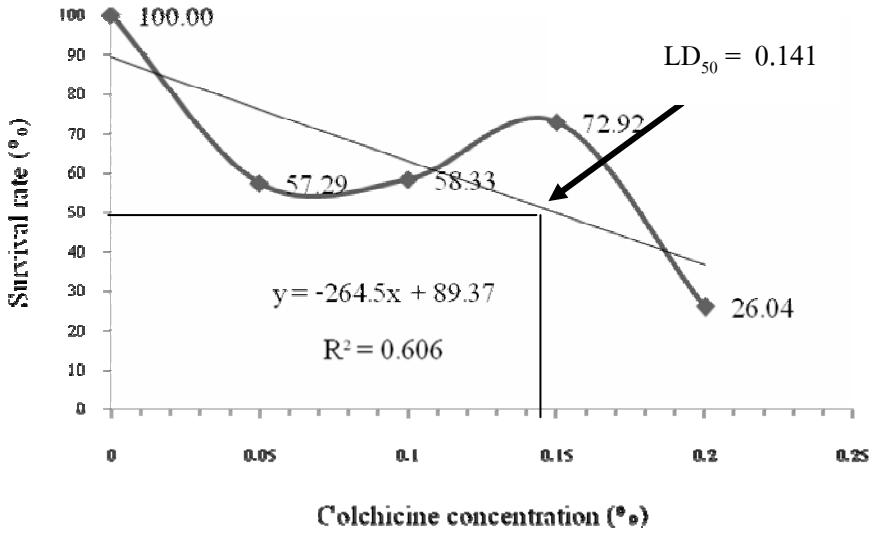
** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยของหน่วยทดลองที่กำกับด้วยตัวอักษรพิมพ์เล็ก(หน่วยทดลอง) พิมพ์ใหญ่ (สิ่งทดลอง)มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



รูปที่ 7 อัตราการรอดชีวิตของ PLBs กล้วยไม้ช้างแดงหลังจุ่มแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 8 อัตราการรอดชีวิตของ PLBs กล้วยไม้ช้างแดงหลังจุ่มแช่ด้วยสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

2. ผลของลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา

2.1 ลักษณะทางสรีรวิทยา

จากการตรวจสอบจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม พบว่า ค่าเฉลี่ยของจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ ลดลงตามความเข้มข้นของโคลชิซินที่สูงขึ้น (ตารางที่ 2) PLBs ที่จุ่มแช่โคลชิซินความเข้มข้น 0 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ 68.33 65.00 55.77 44.88 และ 46.88 คลอโรพลาสต์ต่อปากใบ ตามลำดับ และการจุ่มแช่ PLBs ในโคลชิซิน 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง สามารถชักนำให้พืชมีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมน้อยสุด คือ 40.67 คลอโรพลาสต์ต่อปากใบ (ตารางที่ 2 รูปที่ 10 และ 11)

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้น และระยะเวลาในการจุ่มแช่สารโคลชิซินต่อจำนวนเม็ดคลอโร-พลาสต์ภายในเซลล์คุม

ความเข้มข้น	จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์คุม			เฉลี่ย
โคลชิซิน (%)	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	
0	63.00	73.00	69.00	68.33A
0.05	62.67	63.33	69.00	65.00A
0.10	56.00	58.67	52.67	55.77B
0.15	48.33	40.67	45.67	44.88C
0.20	44.33	49.67	46.67	46.88C
เฉลี่ย^{ns}	54.87	57.07	56.60	
C.V. (%)		7.12		

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

เมื่อพิจารณาขนาดเฉลี่ยของเซลล์ปากใบ จากความกว้าง และความยาว พบว่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโคลชิซินที่สูงขึ้นโดย PLBs ที่ได้รับการจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 0.15 และ 0.20 ให้ความกว้างเซลล์คุมเฉลี่ย 52.22 53.33 และ 55.00 ไมโครเมตร ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้รับสารโคลชิซิน (44.16 ไมโครเมตร) (ตารางที่ 3) การจุ่มแช่ในโคลชิซิน 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง สามารถชักนำให้พืชมีความกว้างเซลล์คุมสูงสุด 61.67 ไมโครเมตร เช่นเดียวกับความยาวเซลล์คุม คือที่โคลชิซินเข้มข้น 0 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ ให้ความยาวเซลล์คุมเฉลี่ย 44.16 49.17 44.17 46.11 และ 49.17 ไมโครเมตร ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม คือ 44.16 ไมโครเมตร การจุ่มแช่ในโคลชิซินเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงสามารถชักนำให้พืชมีความยาวเซลล์คุมสูงสุด 54.17 ไมโครเมตร (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ผลของความเข้มข้น และระยะเวลาในการจุ่มแช่สารโคลชิซินต่อความกว้างของเซลล์คุม

ความเข้มข้น	ความกว้าง (ไมโครเมตร)			เฉลี่ย**
โคลชิซิน (%)	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	
0	42.50	42.50	47.50	44.16B
0.05	48.33	58.33	50.00	52.22A
0.10	50.00	50.00	50.00	50.00AB
0.15	54.17	52.50	53.33	53.33A
0.20	50.00	61.67	53.33	55.00A
เฉลี่ย^{ns}	49.00	53.00	50.83	
C.V. (%)		6.73		

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

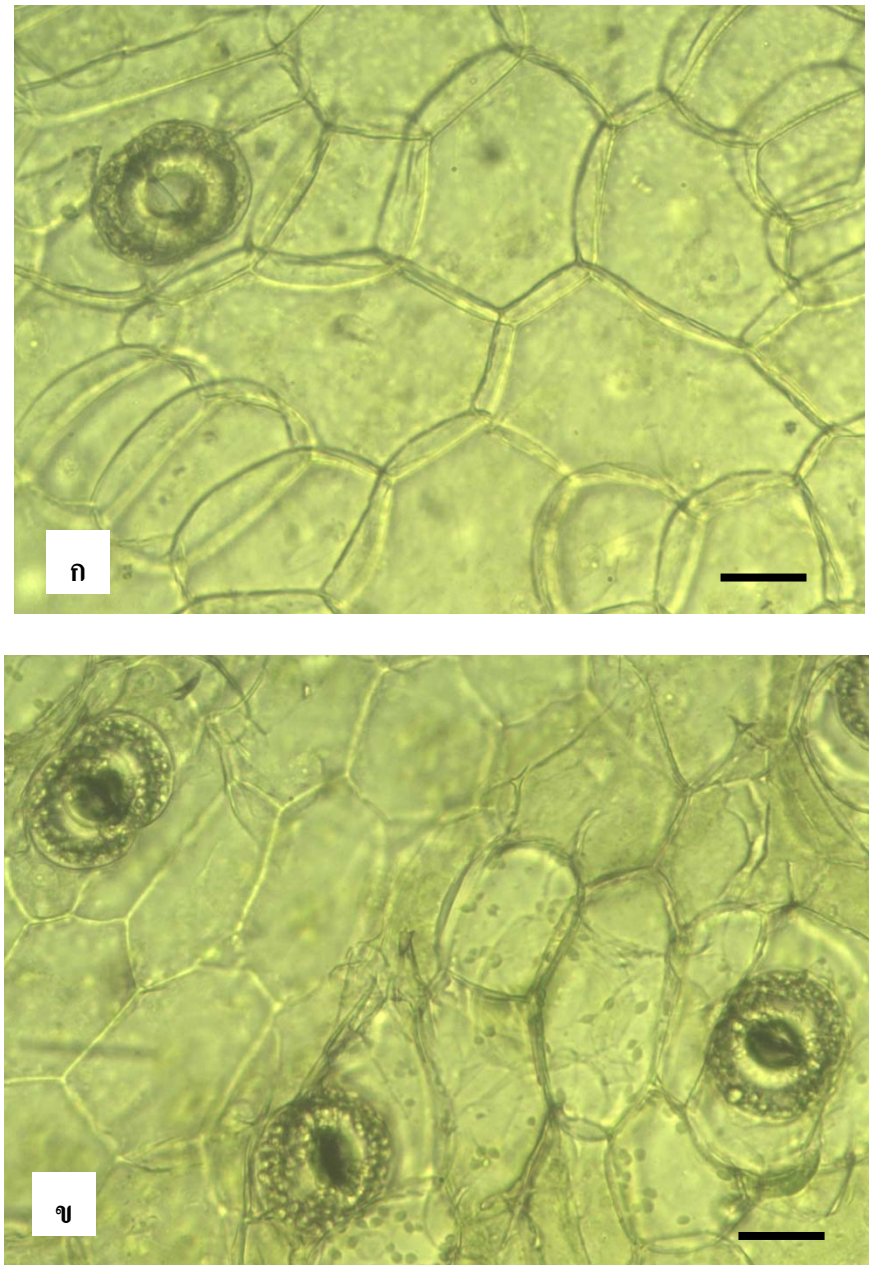
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 4 ผลของความเข้มข้น และระยะเวลาในการจุ่มแช่สารโคลชิซินต่อความยาวของเซลล์คุม

ความเข้มข้น	ความยาว (ไมโครเมตร)			เฉลี่ย[ns]
โคลชิซิน (%)	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	
0	37.50	37.50	45.00	40.00
0.05	47.50	50.00	50.00	49.17
0.10	41.67	43.33	47.50	44.17
0.15	37.50	50.83	50.00	46.11
0.20	47.50	54.17	45.83	49.17
เฉลี่ย[ns]	42.33	47.17	47.67	
C.V. (%)		8.27		

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เมื่อพิจารณาความหนาแน่นของเซลล์ปากใบ พบว่า ความเข้มข้นของโคลชิซินเพิ่มขึ้นส่งผลให้ความหนาแน่นปากใบเพิ่มขึ้นด้วย โคลชิซินเข้มข้น 0 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 ให้ความหนาแน่นของเซลล์ปากใบเฉลี่ย 1.00 1.22 1.22 2.11 2.66 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง การจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง สามารถชักนำให้พืชมีความหนาแน่นของเซลล์ปากใบสูงสุด 3.00 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร (รูปที่ 9, ตารางที่ 5)



รูปที่ 9 ความหนาแน่นของเซลล์ปากใบของกล้วยไม้ช้างแดงจากการจุ่มแช่ในโคลชิซินความเข้มข้น 0 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง (บาร์ = 25 ไมโครเมตร)

ก. โคลชิซินเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์

ข. โคลชิซินเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 72 ชั่วโมง

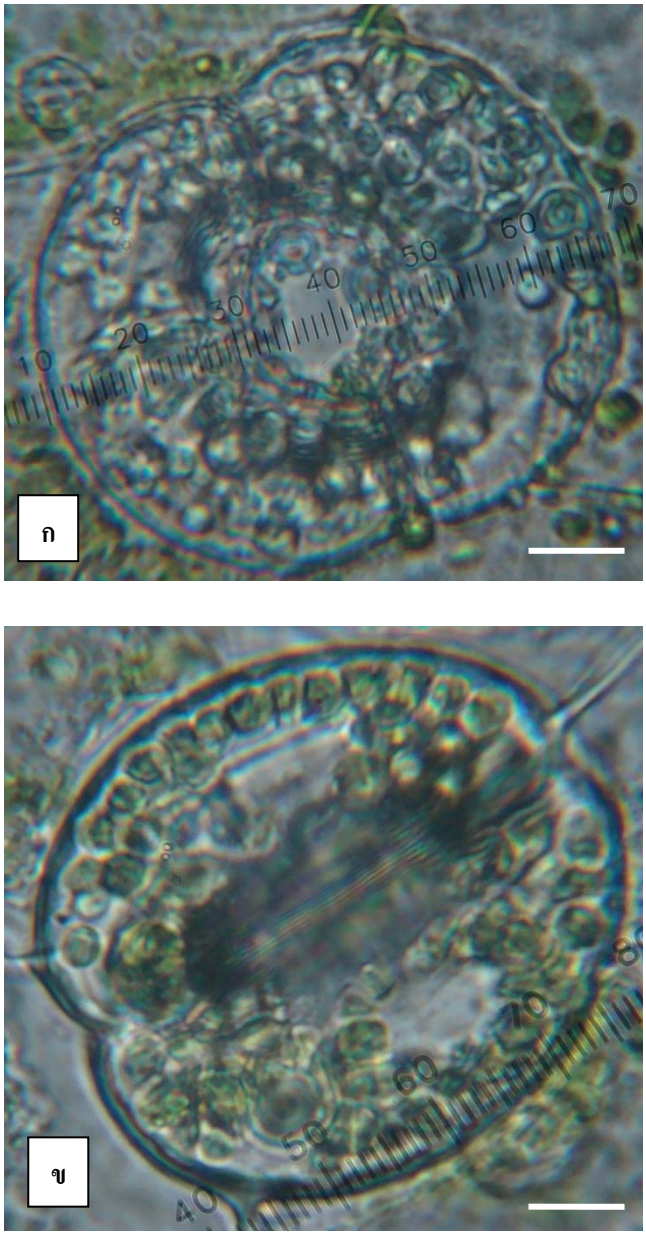
ตารางที่ 5 ผลของความเข้มข้น และระยะเวลาในการจุ่มแช่สารโคลชิซินต่อความหนาแน่นของเซลล์ปากใบ

โคลชิซิน	ความหนาแน่นของเซลล์ปากใบ (เซลล์ต่อตร.มม.)			เฉลี่ย**
(%)	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	
0	1.00	1.00	1.00	1.00B
0.05	1.00	1.33	1.33	1.22B
0.10	1.33	1.33	1.00	1.22B
0.15	2.33	2.00	2.00	2.11A
0.20	2.33	2.67	3.00	2.66A
เฉลี่ย^{ns}	1.60	1.67	1.67	
C.V. (%)		14.76		

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

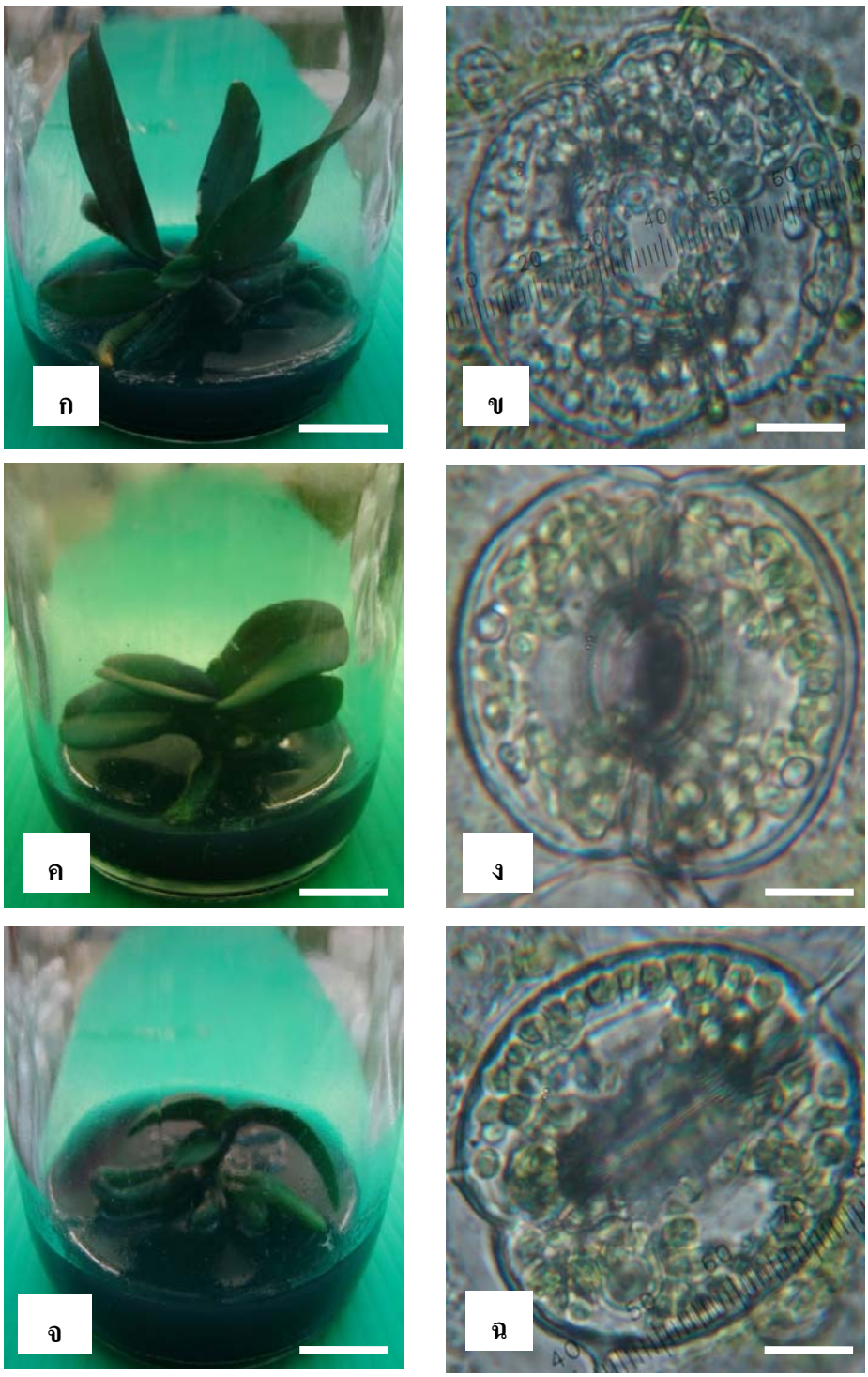
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



รูปที่ 10 จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมและขนาดปากใบเฉลี่ยของกล้วยไม้ช้างแดงจากการจุ่มแช่ในโคลชิซินความ เข้มข้น 0 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง (บาร์ = 48 ไมโครเมตร)

ก. โคลชิซินความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์

ข. โคลชิซินความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 72 ชั่วโมง



รูปที่ 11 ลักษณะต้นและจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของกล้วยไม้ช้างแดง ที่ไม่ทรีต (ก, ข) ทรีตด้วยสารโคลชิซินเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง (ค, ง) และทรีตด้วยสารโคลชิซิน เข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง (จ, ฉ) (บาร์ = 10 ซม. และ 48 ไมโครเมตร)

2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เมื่อทำการตรวจสอบความยาวใบเฉลี่ย จำนวนรากในแต่ละความเข้มข้น และระยะเวลาการจุ่มแช่ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ความยาวใบเฉลี่ยของต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน อยู่ในช่วง 1.50 - 3.02 เซนติเมตร น้อยกว่าชุดควบคุม (2.52) โดยเฉพาะจำนวนรากเฉลี่ยของต้นที่ได้รับสารโคลชิซินทุกระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 2.60 – 4.6 รากต่อต้น ซึ่งน้อยกว่าชุดควบคุม (5.4 ราก) เมื่อทำการตรวจสอบจำนวนใบ พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) เกือบทุกระดับความเข้มข้น และระยะเวลาของการจุ่มแช่โคลชิซินให้จำนวนใบเฉลี่ย 2.20 – 4.20 ใบต่อต้น สูงกว่าชุดควบคุม (2.8 ใบ) เมื่อตรวจสอบด้านความยาวราก พบว่าโคลชิซินความเข้มข้น 0.15% เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง เท่านั้นที่ส่งผลให้ความยาวรากเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นความยาวลดลงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) ยาวรากโดยเฉลี่ย 0.78 – 3.50 เซนติเมตร (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ผลของความเข้มข้น และระยะเวลาการจุ่มแช่สารโคลชิซินต่อลักษณะทางสัณฐานบางประการของกล้วยไม้ช้างแดง

โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา	จำนวนใบ*	ความยาวใบ*	จำนวนราก*	ความยาวราก*
0 (ชุดควบคุม)		2.80*	2.52	5.40	2.86
0.05	24	3.00*	3.02	3.40	1.76
	48	4.00*	2.20	3.40	0.78
	72	3.40*	2.36	3.40	1.54
0.10	24	3.60*	2.04	3.20	1.38
	48	4.20*	1.50	2.60	1.52
	72	3.00*	1.70	3.20	2.82
0.15	24	3.20*	2.44	3.20	2.20
	48	2.40*	2.00	4.60	3.06
	72	2.20*	2.54	3.40	3.50
0.20	24	3.00*	2.28	4.20	2.20
	48	3.80*	2.70	2.80	2.50
	72	3.50*	2.34	3.20	2.48
C.V. (%)		26.60	31.41	34.43	41.13
$LSD_{0.01}$		1.45	1.21	2.06	1.53

* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

3. จำนวนโครโมโซมปลายราก

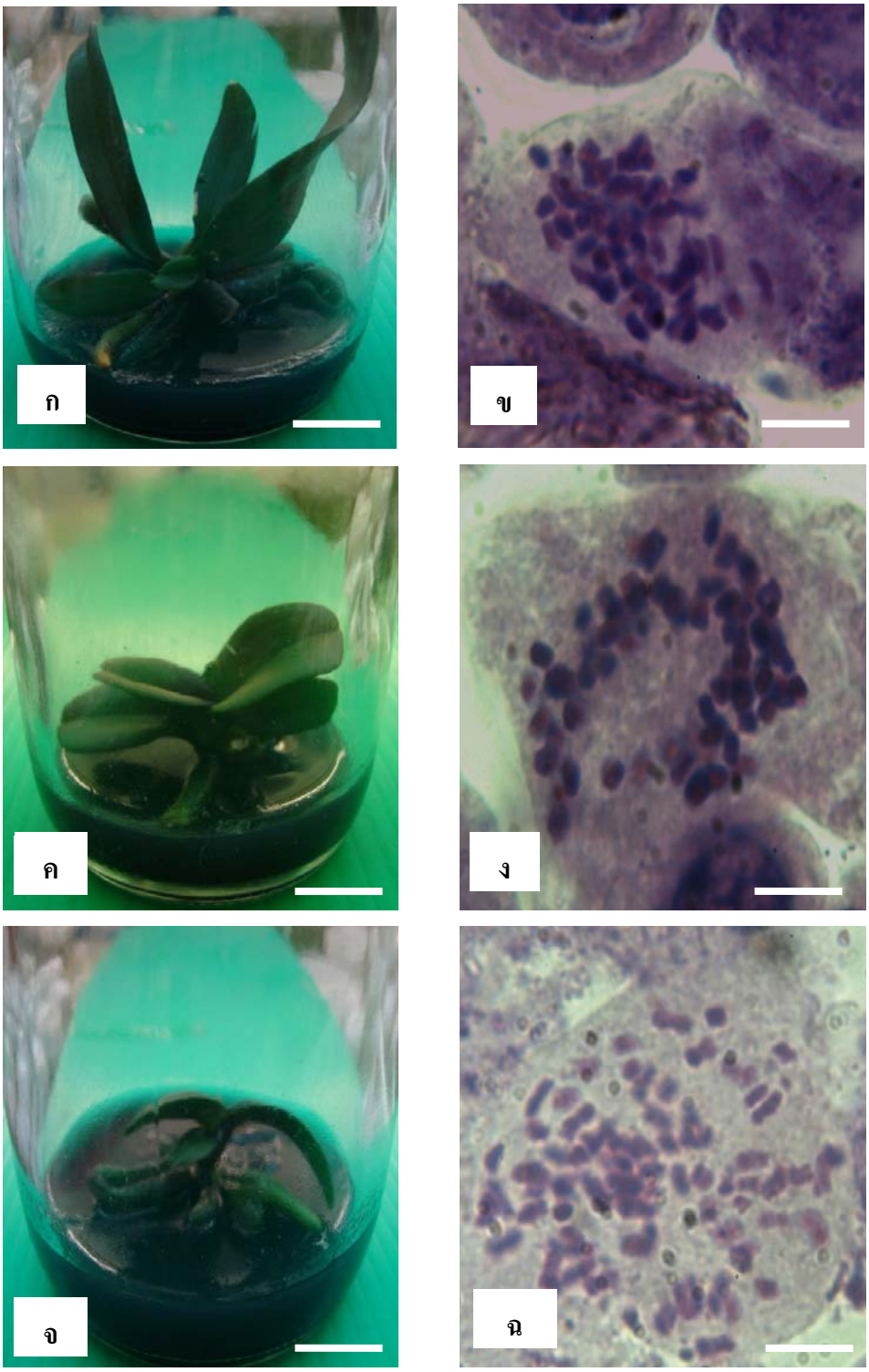
การตรวจสอบจำนวนโครโมโซมปลายรากกล้วยไม้ช้างแดงที่ได้จากการทรีตโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ โดยตรวจสอบ 5 ต้น ๆ ละ 10 – 12 เซลล์ พบต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเททระพลอยด์ 69.09 16.36 และ 14.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7) ความเข้มข้น และระยะเวลาการจุ่มแช่โคลชิซินที่ชักนำให้เกิดพืช เททระพลอยด์มากที่สุด คือ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิด

ต้นเททระพลอยด์ (2n = 2x = 76) ได้ 60 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือที่โคลชิซินเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 48 ชั่วโมง สามารถชักนำได้ 40 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 12ค และ ง) ความเข้มข้น และระยะเวลาการจุ่มแช่โคลชิซินที่ชักนำให้เกิดต้นมิกโซพลอยด์ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมผสมอยู่ระหว่างดิพลอยด์ (2n=2x=38) และเททระพลอยด์ ได้มากที่สุด คือ 0.15 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 48 ชั่วโมง สามารถชักนำได้ 60 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 0.10 และ0.15 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 และ 72 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดต้นมิกโซพลอยด์ได้ 20 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 7 ผลของความเข้มข้น และระยะเวลาการจุ่มแช่สารโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ช้างแดง

โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชม.)	จำนวนต้นที่ตรวจสอบ	ชุดโครโมโซม		
			ดิพลอยด์ (%)	มิกโซพลอยด์ (%)	เตตระพลอยด์ (%)
0 (control)		5	5(100)	0	0
0.05	24	5	5 (100)	0	0
	48	5	5 (100)	0	0
	72	5	3 (60)	1 (10)	1 (10)
0.10	24	5	4 (80)	1 (20)	0
	48	5	3 (60)	1 (10)	1 (10)
	72	0	-	-	-
0.15	24	5	4 (80)	1 (20)	0
	48	5	2 (40)	3 (60)	0
	72	5	4 (80)	0	1 (20)
0.20	24	0	-	-	-
	48	5	2 (40)	1 (20)	2 (40)
	72	5	1 (20)	1 (20)	3(60)
รวม		55	38 (69.09)	9 (16.36)	8 (14.55)

- : ชิ้นส่วนพืชตายหรือเกิดการปนเปื้อน



รูปที่ 12 ลักษณะต้นและโครโมโซมจากปลายรากกล้วยไม้ช้างแดง ที่ไม่ทรีต (ก, ข) ทรีตด้วยสารโคลชิซินเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง (ค, ง) และทรีตด้วยสารโคลชิซินเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง (จ, ฉ) (บาร์ = 10 ซม. และ 5 ไมโครเมตร)

3.1 สหสัมพันธ์ของลักษณะเซลล์คุม ความหนาแน่นของเซลล์คุม จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์จำนวนใบ ราก ความยาวใบ ราก และจำนวนชุดโครโมโซม

จากการประเมินค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์พบว่า การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมมีความสัมพันธ์ทางลบกับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ จำนวนราก ความยาวใบ และความยาวราก คือ -0.87 -0.74 -0.15 และ 0.3 ตามลำดับ แต่มีความสัมพันธ์ในทางบวกต่อ ความยาว ความกว้างเซลล์คุม ความหนาแน่นเซลล์คุม และจำนวนใบ คือ 0.69 0.60 0.92 และ 0.31 ตามลำดับ ส่วนจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ มีความสัมพันธ์ทางลบกับ ความกว้าง ความยาวของเซลล์คุม ความหนาแน่นของเซลล์คุม จำนวนใบและความยาวใบ คือ -0.41 -0.37 -0.81 -0.1 และ -0.05 แต่มีความสัมพันธ์ทางบวกกับจำนวนรากและความยาวใบ คือ 0.69 และ 0.29 ตามลำดับ ความกว้างของเซลล์คุม พบว่า มีความสัมพันธ์ทางลบกับจำนวนรากและความยาวใบ คือ -0.43 และ -0.37 ตามลำดับ แต่มีความสัมพันธ์ทางบวกกับความยาวใบ ความหนาแน่นของเซลล์คุม จำนวนใบและจำนวนราก คือ 0.89 0.65 0.19 และ 0.07 ตามลำดับ ทางด้านความยาวใบ พบว่ามีความสัมพันธ์ทางลบกับจำนวนรากและความยาวใบ คือ -0.42 และ -0.53 ตามลำดับ ความหนาแน่นของเซลล์คุมมีความสัมพันธ์ทางลบกับจำนวนราก ความยาวใบ และความยาวราก คือ -0.57 -0.04 และ -0.35 ตามลำดับ แต่มีความสัมพันธ์ทางบวกกับจำนวนใบ คือ 0.33 เมื่อพิจารณาจำนวนใบ พบว่ามีความสัมพันธ์ทางลบความยาวใบและความยาวราก คือ -0.02 และ -0.41 ตามลำดับ แต่มีความสัมพันธ์ทางบวกกับจำนวนราก คือ 0.3 จำนวนรากมีความสัมพันธ์ทางลบกับความยาวราก คือ -0.07 แต่มีความสัมพันธ์ทางบวกกับ ความยาวใบ คือ 0.14 และทางด้านความยาวใบ พบว่ามีความสัมพันธ์ทางลบกับกับความยาวราก คือ -0.66 (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ของลักษณะเซลล์คุม ความหนาแน่นของเซลล์คุม จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์จำนวนใบ ราก ความยาวใบ ราก และจำนวนชุดโครโมโซม

	ระดับพลอยดี	จน.เม็ดคลอโรพลาสต์(เฉลี่ย)	กว้างเซลล์คุม	ยาวเซลล์คุม	ความหนาแน่นเซลล์คุม	จำนวนใบ	จำนวนราก	ความยาวใบ	ความยาวราก
ระดับพลอยดี	1	-0.87*	0.69*	0.6	0.92**	0.31	-0.74*	-0.15	-0.3
จน.เม็ดคลอโรพลาสต์		1	-0.41	-0.37	-0.81**	-0.1	0.69*	-0.05	0.29
ความกว้างเซลล์คุม			1	0.89**	0.65*	0.19	-0.43	-0.37	0.07
ความยาวเซลล์คุม				1	0.44	0.19	-0.42	-0.53	0.26
ความหนาแน่นเซลล์คุม					1	0.33	-0.57	-0.04	-0.35
จำนวนใบ						1	0.3	-0.2	-0.41
จำนวนราก							1	0.14	-0.07
ความยาวใบ								1	-0.66*
ความยาวราก									1

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 4

วิจารณ์

จากกรจุ่มแช่ PLBs ในโคลชิซินความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ พบว่า อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการจุ่มแช่ที่นานขึ้น แต่เมื่อพิจารณาการรอดชีวิตเฉลี่ยของ PLBs ในแต่ละความเข้มข้นของโคลชิซิน พบว่า ความเข้มข้นของสารที่สูงขึ้นไม่ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตลดลง เช่นเดียวกับการรายงานของ Nguyen และคณะ (2003) พบว่าในพืช *Alocasia* ที่จุ่มแช่ในโคลชิซินเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง ให้อัตราการรอดชีวิตสูงกว่าที่โคลชิซินเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม Pincheiro และคณะ (2000) ได้ทดลองในพืชตระกูลหญ้า *B. brizantha* พบว่า ที่ความเข้มข้นโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิตสูงกว่าโคลชิซินเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาการจุ่มแช่เดียวกัน ซึ่ง Nguyen และคณะ (2003) รายงานว่า ความแปรปรวนของอัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชอาจเกิดจากจำนวนซ้ำในการทดลองน้อยเกินไป ควรเพิ่มจำนวนซ้ำของการทดลองให้มากขึ้นเพื่อลดความแปรปรวนของการทดลอง นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ว่าความไม่สม่ำเสมอของชิ้นส่วนและชนิดพืชที่ใช้ส่งผลให้การตอบสนองต่อความเข้มข้น และระยะเวลาการให้โคลชิซินแตกต่างกัน นอกจากนี้ระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน อาจส่งเสริมการสร้างประกอบพวกฟีนอลิกขึ้นจึงส่งผลให้มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนไม่ลดลง แม้ว่าจะได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาการจุ่มแช่ที่สูงขึ้น แม้ว่าผลของโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิตของพืชมีความไม่สม่ำเสมอในระยะเวลาอันสั้น แต่ในระยะยาวเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำยอดหรือเพิ่มความแข็งแรงของยอด พบว่า อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนลดลง เมื่อเลี้ยงต่อไปจนกระทั่งอายุครบ 4 เดือนหลังจุ่มแช่ พบว่า ไม่มีการรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืช ซึ่งอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง อาจเป็นเพราะพิษของสารโคลชิซินที่มีต่อเซลล์ของชิ้นส่วนพืช โดยสารโคลชิซินมีความสามารถในการแทรกซึมเข้าไปยังส่วนต่าง ๆ ภายในเซลล์ และมีผลทำให้ความหนืด (viscosity) ของไซโตพลาสซึมเปลี่ยนแปลงไป การทำงานของเซลล์ผิดปกติ (วิชุตา, 2537)

สำหรับการตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นที่พัฒนามาจากการทรีตและไม่ทรีต PLBs ด้วยโคลชิซินโดยตรวจสอบขนาดปากใบ ความหนาแน่นปากใบ และจำนวนเม็ด

คลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบผลของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมในพืช ในการศึกษานี้ พบว่า ขนาดปากใบทั้งความยาว และความกว้างเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและระยะเวลาการจุ่มแช่ที่นานขึ้น สอดคล้องกับ รายงานการใช้สารโคลชิซินกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย (ภาสันต์, 2540) เมื่อเปรียบเทียบความยาวเซลล์คุมที่มีระดับพลอยดีต่างกัน พบว่า เซลล์คุมมีความยาวแตกต่างกัน โดยในกล้วยไม้ที่เป็นต้นออกตะพลอยด์มีเซลล์คุมยาวที่สุด รองลงมาคือต้นเททระพลอยด์ ส่วนต้นเททระพลอยด์ มีความยาวของเซลล์คุมสั้นที่สุด นอกจากนี้ในพืชหลายชนิด พบว่า เซลล์คุมยาวขึ้นตามระดับพลอยดีที่สูงขึ้น เช่น กล้วยไม้ *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl. (Atichart and Bunnag, 2007) กล้วยไม้ลูกผสม *Lonocidium* Popcorn (Fan *et al*., 2003) กล้วยไม้ *Cattleya intermedia* Lindl. (Silva *et al*., 2000) อย่างไรก็ตามในกล้วยไม้ลูกผสม *Cymbidium* กลับพบว่า เซลล์คุมของต้นที่เป็นดิพลอยด์ และเททระพลอยด์มีความยาวไม่แตกต่างกัน (Kim *et al*., 2003) Motonobu และคณะ (1997) รายงานว่า ขนาดของปากใบของพืชที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า มีขนาดเท่ากับต้นที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ ในขณะที่ Herrera และคณะ (2002) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเอ็มบริโอกาแฟร่วมกับโคลชิซิน พบว่าขนาดปากใบลดลง แสดงว่าโคลชิซินมีผลต่อความแตกต่างของขนาดปากใบขึ้นกับชนิดของพืช

สำหรับความหนาแน่นของปากใบ พบว่า โดยทั่วไปเมื่อชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นมีความหนาแน่นปากใบลดลง วชิรพัฒน์ (2552) รายงานว่า กล้วยไม้ม้าวิ่งต้นดิพลอยด์ ต้นเททระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์ มีความหนาแน่นของปากใบลดลง ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลมาจากปากใบ และเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสขยายขนาดมากขึ้น ตามจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น *Cattleya intermedia* Lindl. (Silva *et al*., 2003) กล้วยไข่ (Saradhuldhat and Silayai, 2001) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่า เมื่อชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นส่งผลให้ความหนาแน่นของปากใบเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาในกล้วยไม้ลูกผสม *Cymbidium* ที่พบว่า ความหนาแน่นของปากใบเพิ่มขึ้นตามระดับพลอยดีที่เพิ่มขึ้น (Kim *et al*., 2003)

ส่วนจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมซึ่งเป็นตัวแปรหลักที่สำคัญ ที่บ่งบอกถึงการเพิ่มชุดโครโมโซมจาก 1 ชุด เป็น 2 ชุด หรือ หลายชุด โดยทั่วไปเมื่อระดับพลอยดีเพิ่มขึ้นจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของปากใบเพิ่มขึ้นด้วย อาจเป็นจำนวนเท่าตามพลอยดีที่เพิ่มขึ้นหรือไม่ขึ้นกับชนิดของพืช เช่น ขิง (ปิยะดา และอรดี, 2532) เยอบีร่า (Mitoshi และ Asakura, 1996) และ *Platanus acerifolia* (Liu และคณะ, 2007) มีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของปากใบเพิ่มขึ้น ในกรณีของกล้วยไม้ช้างแดงที่ได้จากการศึกษานี้ พบว่า จำนวน

เม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมมีจำนวนลดลง ที่เป็นเช่นนี้เพราะอาจเป็นผลมาจากความผิดปกติในการทำงานของเซลล์ในการสร้างเม็ดคลอโรพลาสต์ซึ่งไม่ทราบกลไกแน่ชัด คาดว่าอาจเนื่องมาจากกระบวนการในการสังเคราะห์โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างคลอโรพลาสต์ในไซโตพลาสซึมผิดปกติ ส่งผลให้จำนวนคลอโรพลาสต์ลดลง และถือว่าเป็นวิธีการที่ง่าย มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และใช้ระยะเวลาสั้น นอกจากนี้สามารถใช้จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมเป็นตัวบ่งชี้การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้เช่นเดียวกัน

Sari และคณะ (1999) ทำการศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมในแตงโม (*C. lanatus*) และ Gu และคณะ (2005) ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมในพุทรา (*Z. jujube* cv. Zhanhua) พบว่าพืชที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็นดิพลอยด์มีขนาดใบเล็กกว่าพืชที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นเททระพลอยด์ แตกต่างจากขนาดใบกล้วยไม้ช้างแดงที่ได้จากการศึกษานี้ พบว่า ความยาวใบ จำนวน และความยาวรากของต้นดิพลอยด์ และเททระพลอยด์นั้นมีแนวโน้มสั้น และเล็กกว่าต้นที่เป็น เททระพลอยด์ ในขณะที่จำนวนใบในต้นเททระพลอยด์มีมากกว่าต้นดิพลอยด์ นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดของต้นเททระพลอยด์มีขนาดเล็กกว่าต้นดิพลอยด์ ผลดังกล่าวเป็นไปในทำนองเดียวกับกล้วยไม้ในสกุล *Phalaenopsis* (Griesbach, 1981) ซึ่งพบว่า กล้วยไม้ที่ทรีตด้วยโคลชิซินมีการเจริญเติบโตช้าลงและชักนำให้เกิดรากยาก และการศึกษาในต้นบัวบกเททระพลอยด์ ที่เป็นผลจากการได้รับโคลชิซิน มีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นบัวบกดิพลอยด์ (Chulalaksananukul and Chimnoi, 1999)

จากการตรวจสอบจำนวนโครโมโซมปลายราก เป็นวิธีที่สามารถบ่งชี้การเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดโครโมโซมได้ชัดเจนที่สุด แต่มักเป็นวิธีสุดท้ายเนื่องจากต้องใช้เทคนิค และความชำนาญในการตรวจสอบ ความผิดปกติที่เกิดกับเซลล์ปากใบนั้นบางครั้งอาจเป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมหรือเกิดจากความเป็นพิษของสารโคลชิซินที่ทำให้การทำงานของเซลล์ผิดปกติไปการตรวจสอบจึงให้ผลไม่แน่นอน จากการตรวจสอบโครโมโซมปลายรากกล้วยไม้ช้างแดงในการศึกษานี้ พบว่า มีการเพิ่มชุดโครโมโซมเป็นสองเท่า (2n=4x=76) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าโคลชิซินมีผลต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยกระบวนการยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิลในช่วงการดึงโครโมโซมในระยะเมตาเฟสได้ ดังที่รายงานโดย อมรา (2540) กล่าวว่าโคลชิซินส่งผลยับยั้งกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์เม็ดคลอโรพลาสต์ สอดคล้องกับการรายงานของ อรพรรณ (2551) ศึกษาผลของโคลชิซินและเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัว (*Anthurium andraeanum* L.) พบว่า ที่ความเข้มข้นของโคลชิซินสูงขึ้น ส่งผลให้ขนาดปากใบเพิ่มขึ้น จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของปากใบลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อนำต้น

ดังกล่าวไปตรวจสอบจำนวนโครโมโซม พบว่า มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (2n=4x=60) จำนวน 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อความมั่นใจว่าผลดังกล่าวมีความถูกต้อง แม่นยำ ควรมีการทำซ้ำให้มากกว่านี้และควรมีการเพิ่มจำนวนประชากรของต้นที่ใช้ในการตรวจสอบเพื่อความถูกต้องในการสรุปผลต่อไป นอกจากนี้อาจใช้วิธีการตรวจสอบโดยวิธีโฟลไซโตเมทรีเพื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสประกอบด้วย และเมื่อประเมินหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะเซลล์คุม ความหนาแน่นของเซลล์คุม จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์จำนวนใบ จำนวนราก ความยาวใบ ราก และจำนวนชุดโครโมโซม พบว่าเมื่อจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นส่งผลให้ความกว้าง ความยาวเซลล์คุม ความหนาแน่นเซลล์คุมและจำนวนใบเพิ่มขึ้นแต่จะมีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม จำนวนราก ความยาวใบ และความยาวรากลดลง ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นตัวช่วยยืนยันผลที่สอดคล้องกันระหว่างลักษณะเซลล์คุม ความหนาแน่นของเซลล์คุม จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์จำนวนใบ จำนวนราก ความยาวใบ และราก ที่มีวามสัมพันธ์ต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมและเป็นวิธีที่ให้ผลค่อนข้างแม่นยำ (สิทธิพงษ์, 2553)

บทที่ 5

สรุป

- โคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 72 ชั่วโมง ให้อัตรารอดชีวิตของ PLBs 26% ชักนำต้นเททระพลอยด์ (2n = 2x = 76) ได้สูงสุด 60 เปอร์เซ็นต์
- โคลชิซินเข้มข้น 0.141 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 72 ชั่วโมง ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) เมื่อวิเคราะห์ด้วยสมการ regression
- ต้นเททระพลอยด์ที่ได้มีความหนาแน่นเซลล์ปากใบสูงสุด 3.00 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร มีสหสัมพันธ์ในทางบวกกับจำนวนชุดโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น
- จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ของต้นดังกล่าวลดลง (46 เม็ด/เซลล์คุม คิดเป็น 67% ของชุดควบคุม) มีสหสัมพันธ์ในทางผกผันกับจำนวนชุดโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น
- จำนวนใบเฉลี่ย (3.5ใบ) เพิ่มขึ้น ส่วนความยาวราก (2.48 เซนติเมตร) ลดลงแตกต่างทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

เอกสารอ้างอิง

กนิษฐา คุ้มวณิชย์. 2542. ผลของสารสกัดเมล็ดดองดึง *Gloriosa superbar* Linn. ที่มีต่อการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ของแตงโม *Citrullus lanatus* Mats & Nakai ในหลอดทดลอง. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ครรชิต ธรรมศิริ. 2538. ผลของรังสีแกมมาต่อโปรโตคอร์มกล้วยไม้กลุ่มแคทลียา. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ; สมาคมพืชสวนแห่งประเทศไทย. (บทคัดย่อ)

จรัสศรี นวลศรี. 2548. การเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซมและการปรับปรุงพันธุ์พืช. *ใน* เอกสารคำสอนวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืชสวน. หน้า 73-97. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

จักรกฤษณ์ ภารการ, สุปาณี บุดดีคง, ยุพิน ไชยโต, วาสนา ไวจำปา และชูเกียรติ ผาโสม. 2545. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์พืชด้วยสารโคลชิซินในข้าวโพดหวาน ผักกาดขาวปลี คะน้า และหอมแดง. เข้าถึงได้จาก http://www.msu.ac.th/biodept/Plant-Breeding /Colchicine.html (เข้าถึงเมื่อ 6 กันยายน 2552)

ชะบา อ่ำรำไพ. 2527. การใช้โคลชิซินชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในแพงพวยฝรั่ง *Catharanthus roseus* G. Don. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณัฐา ควรประเสริฐ. 2548. กล้วยไม้วิทยา 1. เชียงใหม่: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ทิวา รักนิ่ม. 2533. ผลของโคลชิซินที่มีต่อการกลายพันธุ์ของแกลดิโอลัสที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิตย์ศรี แสงเดือน และอำไพ สินพัฒนานนท์. 2541. การชักนำให้เกิดหม่อนเททระพลอยด์โดยใช้โคลชิซินร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสตร์). 32: 424-430.

นิรนาม. 2551. กล้วยไม้สกุลช้าง. เข้าถึงได้จาก http://www.pantown.com/board.php?id=25944&area=3&nano=board7&topic=2&action=view (เข้าถึงเมื่อ 6 ธันวาคม 2551)

ประชาชาติ นพพวง และสำเริง วิชานา. 2540. การสร้างหม่อน Tetraploid จากหม่อนที่มีความต้านทานโรครากเน่า. วารสารวิชาการเกษตร. 15: 179-184.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, เผดิม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, กาญจนา กล้าแข็ง, นิตย์ศรี แสงเดือน, ชัยฤกษ์ มณีพงษ์ และสงกรานต์ จิตรากร. 2537. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนร่วมกับการชักนำด้วยโคลชิซิน. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสตร์) 28: 193-199.

ปรัชพรรณ หนูจีน และสมปอง เตชะโต. 2550. ผลของสารประกอบอินทรีย์และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญ และการออกดอกของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรในหลอดทดลอง. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสตร์) 23: 219-226.

ปิยะดา ตันติสวัสดิ์ และอรดี สหวัชรินทร์. 2532. การปรับปรุงพันธุ์ขิงโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับสารโคลชิซิน. *ใน* การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 27. หน้า 102. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพบูลย์ ไพรีพ่ายฤทธิ์. 2521. ตำรากล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มเล่น. ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคลอาทรการพิมพ์: กรุงเทพ ฯ.

ภาสันต์ ศารทูลทัต. 2540. การชักนำให้กล้วยไข่กลายพันธุ์ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย colchicines และ oryzalin. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 70 หน้า.

มยุรี แก้วภู่. 2547. การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในถั่วเขียวผิวมันพันธุ์อู่ทอง 1 โดยใช้สารโคลชิซินและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยทักษิณ.

มาลินี อนุพันธ์สกุล. 2534. คู่มือการปลูกกล้วยไม้. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพ ฯ: โครงการหนังสือเกษตรชุมชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัชนีวรรณ จึงสงวนสิทธิ์. 2546. ความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยาและเซลล์วิทยาในตำลึงที่เกิดจากการใช้สารโคลชิซิน. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัย-เกษตรศาสตร์.

รัตนา ลาสุข, ราตรี บุญเรืองรอด และจุลภาค คุ้นวงศ์. 2552. การเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า. เข้าถึงได้จาก http://scisoc.or.th. (เข้าถึงเมื่อ 28/01/2552)

ราตรี สุจารีย์. 2540. การปรับปรุงพันธุ์มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) โดยใช้โคลชิซินในหลอดทดลอง. สงขลา: วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลา-นครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

วชิรพัฒน์ จิวานิจ. 2552. ผลของโคลชิซินต่อการชักนำกล้วยไม้ม้าวิ่งให้เกิดพอลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

วัชรินทร์ รัตนพันธ์. 2544. การเพิ่มจำนวนโครโมโซมของขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยด้วยโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตร-ศาสตร์.

วิชชุตา รุ่งเรือง. 2537. ผลของโคลชิซินและรังสีแกมมาที่มีผลต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์ Double Spathe ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหา-บัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิรินันท์ สุวรรณโมลี. 2548. เทคนิคการนับแยกเซลล์ด้วยอุปกรณ์ Flow cytometry ตอนที่ 1. LAB TODAY 4 : 34-38.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์ และสมปอง เตชะโต. 2550. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาล และผงวุ้น ต่อการสร้างโพรโทคอร์มของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร. วารสารสงขลานครินทร์ (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) 29: 247-254.

สมโชค รักษารัก. 2545. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และการขยายพันธุ์อัญชันในสภาพปลอดเชื้อ. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมปอง เตชะโต. 2538. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเศรษฐกิจ. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2550. บทปฏิบัติการรายวิชาเทคโนโลยีเซลล์พืช. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สาริณี ไชยเจริญ. 2538. การศึกษาจำนวนโครโมโซม ลักษณะดอกและความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ดิพลอยด์ และออลโลเททระพลอยด์. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสตร์) 29: 150-157.

สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2549. พื้นที่เพาะปลูก ผลผลิต และผลผลิตกล้วยไม้. เข้าถึงได้จาก http://www.oae.go.th/statistic/year book1. (เข้าถึงเมื่อ 2 มิถุนายน 2553)

สิทธิพงษ์ พรมมา. 2553. การชักนำโพลีพลอยด์ในปาล์มน้ำมันโดยใช้สารโคลชิซินในเมล็ดงอก. สงขลา: วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

สุพัตรา เจริญภักดี และวีณัน บัณฑิตย์. 2548. การวิเคราะห์การแปรปรวนทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับลักษณะดอกของกล้วยไม้สกุลช้าง. วารสารเกษตร 21: 99-105.

สุมนา จำปา. 2549. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเยอบีราโดยใช้สารโคลชิซิน และสารเอทธิล-มีเทนซัลโฟเนต. เชียงใหม่: วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อบฉันท์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. หน่วยปฏิบัติการวิจัยพรรณไม้ประเทศไทย. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อมรา คัมภิรานนท์. 2540. เทคนิคการศึกษาโครโมโซม. *ใน* พันธุศาสตร์ของเซลล์ : กรุงเทพ ฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรพรรณ พูนทอง. 2551. ผลของโคลชิซินและเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัว (*Anthurium andracanum* L.) วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัย-สงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

อุดม นวพานิช และพัชราวดี วัฒนาวิกย์กิจ. 2549. การเก็บรวบรวมและการขยายพันธุ์กล้วยไม้ป่า. วารสารวิจัย มหาวิทยาลัยรามคำแหง 9: 65-87.

Blakesley, D., Allen, A., Pellny, T.K. and Roberts, A.V. 1937. Natural and induced polyploidy in *Acacia dealbata* Link. and *Acacia mangium* Willd. Annals of Botany 90: 391-398.

Buyun, L., Lavrentyeva, A., Kovalska, L. 2004. *In vitro* germination of seeds of some rare tropical orchids. Acta Universitatis Latviensis Biology 676: 159-162.

Chang, C. and Chang, W.C. 1998. Plant regeneration fron callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. misericors. Plant Cell Reports 17: 251-255.

Chen, Y.C., Chen, C. and Chang, W.C. 2000. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis. In Vitro* Cell. Dev. Biologia Plantarum 36: 420-423.

Chen, Y., Liu, X. and Liu, Y. 2005. *In vitro* plant regeneration from the immature seeds of *Cymbidium faberi*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81 : 247-251.

Chulalaksananukul, W and Chimnoi, W. 1999. Polyploid induction in *Centella asiatica* L. urban by colchicines treatment. Journal of Scientific Research Chulalongkorn University 24: 55-65.

Dolezel, J., P. Binarova and Lucretti. S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. Biologia Plantarum 31: 113-120.

Escandon, A., S., Hagiwara,. J., C. and Alderete, L., M. 2006. A new variety of *Bacopa monnieri* obtained by *in vitro* polyploidization. Plant Biotechnology 9 : 181-186.

Fan, L.Y., Thame, A. and Wing, Y.T. 2003. Influence of increase of ploidy level (from 2n to 4n) on the physical ttribytes of *Lonocidium* Popcorn. [Online] Available: http://staff.science.nus.edu.sg/~scilooe/srp_2003/sci_paper/botanic/research_paper/lim_yifan.pdf. (accessed on 5/3/09)

Griesbach, R.J. 1981. Colchicine-induced polyploidy in phalaenopsis orchids. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1: 103-107.

Griesbach, R.J. 1985. Polyploidy in *Phalaenopsis* orchids improvement. The Journal of Heredity 76: 74-75.

Griesbach, R. J. and Bhat, R.N. 1990. Colchicine induced polyploidy in *Eustoma grandiflorum*. HortScience 25: 1284-1286.

Gu, X.F., Yang, A.F., Meng, H. and Zhang, J.R. 2005. *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujube* Mill. Cv. Zhanhua. Plant Cell Report 24: 671-676.

Herrera, J.C., Moreno, L.G., Acuna, J.R., Pena, M.D. and Osorio, D. 2002. Colchicines induced microspore embryogenesis in coffee. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71: 89-92.

Irfag, M. and Nawab, K. 2001. Effect of gamma irradiation on some morphological of three wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Journal of Biological Sciences. 1: 935-937.

Kim, M.S., Kim, J.S. 2003. Chromosome doubling of a *Cymbidium* hybrid with colchicine treatment in meristem culture. [Online] Available: www. Biolo.aichiedu.ac.jp/ NlOC2003porter/10KoreaCym.pdf.(accessed on 16/1/07)

Liu, G., Li, Z. and Bao, M. 2007. Colchicine induction chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. Euphytica 157: 145-154.

Malabadi, R. B., Mulgund G. S., and Nataraja, K. 2004 . Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, an endangered orchid using thidiazuron. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 6: 289–293.

Matthew, J.D. 1998. Colchicine. Virginia: Department of Medicinal Chemistry, Medical College of Virginia, Commonwealth University.

Mckendrick, S. 2000. *In Vitro* Germination of Orchids : a Manual. Ceiba foundation for tropical conservation. [Online] Available: www.Ceiba.org/documents/CFTC proman.pdf (accessed on 8/5/09)

Menninger, E.D. 1963. Diary of a colchicines-induced tetraploid *Cymbidium*. American Orchid Society Bulletin 32: 885-887.

Mitoshi, K. and Asakura, N. 1996. Callus induction, regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera (*Gerbera jamesonii*). Plant Cell Report 16:1-5.

Nguyen, T.P.T., Kenji, U., Ikuo, M., Yukio, O. and Hiroshi, O. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* thought colchicines and oryzalin treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72: 19-25.

Norberto, R.B. 2005. Polyploidy breeding in orchids. Phillippine Orchid Society Online. [Online] Available: www.Philorchidsociety.org/index.php (accessed on 8/5/09)

Pinheiro, A.A., Pozzobon, M.T., Valle, C.B., Pentedo, M.I.O. and Carneiro, V.T.C. 2000. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicines. Plant Cell Report 19: 274-278.

Pryor, R.L. 1972. A tetraploid Gerbera. Scientia Horticulturae 7 : 197-198.

Ranney, T. G. 2007. Polyploidy: from evolution to landscape plant improvement. [Online] Available: http://www.ces.ncsu.edu/fletcher/programs/norsery/metria/metriaranney/ polrploi dy.htm (accessed on 2/2/08)

Rose, J.B., Kubba, J. and Tobutt, K.R. 2000. Induction of tetraploidy in *Buddleia globosa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63: 121-125.

Roy, A., Leggett, G. and Koutoulis, A. 2001. *In vitro* tetraploid induction and generation cof tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Report 20: 489-495.

Saradhuldhat, P. and Silayai, B. 2001. Some chemical treatments on Kluai Khai through tissue culture for mutation breeding. Kasetsart Journal (Natural Science) 35: 231-241.

Sari, N., Abak, K. and Pitrat, M. 1999. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. And NaKai. Scientia Horticulturae 82: 265-277.

Shao, J., Chen, C. and Deng, X. 2003. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 75: 241-246.

Sharma, A.K. and Sharma, A. 1980. Chromosome Techniques : Theory and Practice. 3rd Ed. London: Butterworths.

Silva, P.A.K.X., Sidia, C-J. and Maria, H.B. Z. 2000. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (orchidaceae) by in vitro techniques. Ciencia Rural 30: 105-111.

Snyder, L.A. 2007. "Description and Natural History of the *Autumn Crocus*". [Online] Available: http://biotech.icmb.utexas.edu/botany/acrohst.html (accessed on 6/06/2007)

Sohoo, M.S., Athwal, D.S. and Chandra, S. 1970. Colchicine induced polyploidy in chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Theoretical and Applied Genetics 40:163-168.

Thao, N.T.P., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y. and Okubo, H. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicines and oryzalin treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72: 19-25.

Tokuhara, k. and Mii, M. 2001. Induction of embryogenic and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In Vitro* Cell. Dev. Biol Plant 37: 457-461.

van Le, B., Hang Phuong, N. T., Anh Hong, L.T. and Tran Thanh Van, K. 1999. High frequency shoot regeneration from *Rhynchostylis gigantea* (Orchidaceae) using thin cell layers. Plant Groeth Regulation 28: 179-185.

Vichiato, M.R.M., Vichiato, M., Pasqual, M. Pasqual, M. Castro. D.M. and Dutra, L.F. 2007. Tetraploidy induction and identification in *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). Revista Ciencia Agronomica, Fortaleza 38: 385-390.

Yang, X.M., Cao, Z., Y., Wang, Y., M. and Fang, X.W. 2006. *In vitro* tetraploid induction via colchicines treatment from diploid somatic embryo in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Euphytica 152: 217-224.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS)

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มก./ล.)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
KH_2PO_4	170.00
$MgSO_4 7H_2O$	370.00
$CaCl_2 2H_2O$	440.00
ธาตุอาหารรอง	
H_3BO_3	6.20
Kl	0.83
$MnSO_4 1H_2O$	16.90
$ZnSO_4 7H_2O$	10.60
$CuSO_4 5H_2O$	0.025
$NaMoO_4 2H_2O$	0.25
$CoCl_2 6H_2O$	0.025
ธาตุเหล็ก	
$FeSO_4 7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
อินทรียสาร	
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
PyridoxineHCl* (B6)	0.50
ThiamineHCl* (B1)	0.10
Glycine	2.00
Coconut water 15% (150 มิลลิลิตร)	
Sucrose 3%, Agar 0.6-0.7% (0.75%), pH5.7-5.8	

ตารางภาคผนวกที่ 2 องค์ประกอบของสูตรอาหาร New Dogashima Medium (NDM)

องค์ประกอบ	ปริมาณสารที่ใช้ (มก./ล.)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	480
KNO_3	200
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	470
KCI	150
$MgSO_47H_2O$	250
KH_2PO_4	550
ธาตุอาหารรอง	
$MnSO_44H_2O$	3
$ZnSO_47H_2O$	0.5
H_3BO_4	0.5
$CuSO_45H_2O$	0.025
$Na2MoO_42H_2O$	0.025
$CoCl_26H_2O$	0.025
อินทรียสาร	
Myo-inositol	100
Niacin	1.0
Pyridoxine hydrochloride	1.0
Thiamine hydrochloride	1.0
Calcium pantothenate	1.0
Adenine	1.0
I-Cystein	1.0
d-Biotin, cryst.	0.1
Fe-EDTA	21
Coconut water 15% (150 มิลลิลิตร)	
Sucrose 3%, Agar 0.6-0.7% (0.75%), pH 5.2	

ตารางภาคผนวกที่ 3 สารเคมีที่ใช้ศึกษาโครโมโซม

สารเคมี	**ปริมาณสารที่ใช้**
Paradichlorobenzene	50 มล.
Acetic acid : alcohol	1:3
Hydrochloric acid	1 (นอร์มอล)
Carbon fuchsin	2 %

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวณัฐพร เกิดสุวรรณ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5110620067

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ผลิตกรรมชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี	2550

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ณัฐพร เกิดสุวรรณ และสมปอง เตชะโต. ผลของโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิตและลักษณะทางสรีรวิทยาของกล้วยไม้ช้างแดง*(Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร (ฉบับพิเศษ). (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)

เบญจวรรณ มณี, ณัฐพร เกิดสุวรรณ และสมปอง เตชะโต. การถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ช้างแดงโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร (ฉบับพิเศษ). (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)