

อิทธิพลของโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตของพันธุ์ฟ้าทะลายโจรพื้นเมือง Influence of Colchicine on the Growth of Native Andrographis Cultivars

สุนทรีย์ สุรสร^{1,*} ศุภสิทธิ์ ลิทธิพานิช² และ กัมปนาท วงศ์เครือสอน³
Suntaree Surson^{1,*}, Suphasit Sittthaphanit² and Khumpanat Wongkerson³

¹ สาขาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร สกลนคร 47000

² ภาควิชาเกษตรและทรัพยากร คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติจังหวัดสกลนคร สกลนคร 47000

³ สาขาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร สกลนคร 47000

¹ Plant Science, Faculty of Agricultural Technology, Sakon Nakhon Rajabhat University, Sakon Nakhon 47000

² Department of Agriculture and Resources, Faculty of Natural Resources and Agro-Industry, Kasetsart University Chalermphrakiat Sakon Nakhon Province Campus, Sakon Nakhon 47000

³ Animal Science, Faculty of Agricultural Technology, Sakon Nakhon Rajabhat University, Sakon Nakhon 47000

รับเรื่อง: 16 มกราคม 2566 Received: 16 January 2023

ปรับปรุงแก้ไข: 5 พฤษภาคม 2566 Revised: 5 May 2023

รับตีพิมพ์: 5 พฤษภาคม 2566 Accepted: 5 May 2023

* Corresponding author: sun_dawn990@hotmail.com

บทคัดย่อ

ความเป็นมาและวัตถุประสงค์: การแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อโควิด-19 ส่งผลให้มีความต้องการฟ้าทะลายโจรเพิ่มขึ้น การชักนำให้ฟ้าทะลายโจรเป็นโพลีพลอยด์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตของฟ้าทะลายโจร การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินอิทธิพลของโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตของฟ้าทะลายโจร

วิธีดำเนินการวิจัย: เมล็ดฟ้าทะลายโจรถูกชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ด้วยการแช่ในโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับ (0.0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์) และใช้เวลาแตกต่างกัน 2 ช่วงเวลา (12 และ 24 ชั่วโมง) วางแผนการทดลองแบบ 5 × 2 แฟคทอเรียลในแผนแบบการทดลองสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in completely randomized design) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัย: ลักษณะความงอกของต้นฟ้าทะลายโจรอายุ 1 เดือน เหนือขึ้นที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างทรีตเมนต์ที่ศึกษา โดยพบความงอกสูงที่สุดในทรีตเมนต์ที่ 3 (0.1, 12) เท่ากับ 12.25 ± 1.97 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ทรีตเมนต์ที่ 5 (0.2, 12) เท่ากับ 12.00 ± 0.61 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซินเป็น 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาแช่ 12 และ 24 ชั่วโมง ส่งผลให้ความงอกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อต้นฟ้าทะลายโจรมีอายุ 3 เดือน ความสูงของต้นกล้า จำนวนใบ และจำนวนข้อมีความแตกต่างกันในแต่ละทรีตเมนต์ โดยมีค่าสูงที่สุดที่ความเข้มข้นโคลชิซินเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังพบว่าต้นฟ้าทะลายโจรที่อายุ 4 เดือน มีจำนวนข้อมากที่สุดในทรีตเมนต์ที่ 1 (0.0, 12) เท่ากับ 11.10 ± 1.40 ข้อ มีจำนวนกิ่งมากที่สุดในทรีตเมนต์ที่ 7 (0.3, 12) เท่ากับ 9.40 ± 2.32 กิ่ง มีจำนวนใบมากที่สุดในทรีตเมนต์ที่ 1 (0, 12) เท่ากับ 77.70 ± 25.06 ใบ และมีความกว้างใบมากที่สุดในทรีตเมนต์ที่ 4 (0.1, 24) เท่ากับ 2.06 ± 0.23 เซนติเมตร แต่มีความยาวใบไม่แตกต่างกันทางสถิติ

สรุป: ต้นฟ้าทะลายโจรผิดปกติที่พบเป็นไคเมอราที่มีลักษณะเป็นมิท็อกโซพลอยด์ ดังนั้น การจำแนกต้นผิดปกติควรทำในขณะเป็นต้นที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว

คำสำคัญ: ฟ้าทะลายโจรพันธุ์พื้นเมือง, โคลชิซิน, สัณฐานของฟ้าทะลายโจร

ABSTRACT

Background and Objectives: The epidemic of coronavirus disease 2019 (COVID-19) causes an increased demand for Andrographis. Inducing polyploidy Andrographis is an alternative way to enhance the Andrographis yield. The aim of this study was to evaluate the effect of colchicine on the growth of Andrographis.

Methodology: Seeds of Andrographis were treated to induce polyploidy using five different colchicine concentrations (0.0, 0.1, 0.2, 0.3, and 0.4%) at two different exposure times (12 and 24 hours). The 5 × 2 factorial in a completely randomized design was used and then compared means among treatments using Duncan's new multiple range test at a confidence interval of 95%.

Main Results: Germination rate of 1-month-old Andrographis plants had significant differences among treatments ($P < 0.05$). The highest germination rate of $12.25 \pm 1.97\%$ was found in T3 (0.1, 12), then T5 (0.2, 12) at $12.00 \pm 0.61\%$. Increasing colchicine concentration up to 0.3 and 0.4% at 12 and 24 hours significantly caused a lower rate of germination ($P < 0.05$). At 3 months old of Andrographis plants, plant height, the number of leaves, and the number of nodes differed among treatments, with the highest values at 0.0% colchicine concentration. Moreover, the 4-month-old Andrographis plants had the highest number of nodes in T1 (0.0, 12) with 11.10 ± 1.40 nodes, the highest number of branches in T7 (0.3, 12) with 9.40 ± 2.32 branches, the highest number of leaves in T1 (0, 12) with 77.70 ± 25.06 leaves, and the widest leaf in T4 (0.1, 24) with 2.06 ± 0.23 cm. No significant differences in leaf length.

Conclusions: The discovered abnormal plants were mixoploidy chimera. Therefore, abnormal plants should be indicated when these trees are fully developed.

Keywords: Indigenous Andrographis, colchicine, Andrographis morphology

บทนำ

ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้มานานมากกว่า 2,000 ปี ฟ้าทะลายโจรจัดเป็นสมุนไพรท้องถิ่นในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น สาธารณรัฐอินเดีย สาธารณรัฐประชาชนจีน สาธารณรัฐสังคมนิยมประชาธิปไตยศรีลังกา และราชอาณาจักรไทย เป็นต้น ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั่วทวีปเอเชีย (Department of Agriculture, 2021) นิยมนำส่วนของใบและลำต้นใต้ดินมาทำเป็นยารักษาโรค โดยเฉพาะโรคไข้หวัดใหญ่ มีงานวิจัยในฟ้าทะลายโจรเกี่ยวกับการต้านไวรัสแบบออกฤทธิ์ได้กว้างขวาง อยู่ในบัญชียาที่องค์การอนามัยโลกให้ใช้ป้องกันและรักษาการติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนบน หลอดลมอักเสบ และทอนซิลอักเสบ ฟ้าทะลายโจรเป็นพืชสมุนไพรที่มีความสำคัญสูงมากในยุคปัจจุบันเมื่อมีผลงานวิจัยยืนยันถึงสรรพคุณในการรักษาโรคไข้หวัด และเป็นสมุนไพรสู้ไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ ด้านสมุนไพร (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2564 ยาสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรได้ขึ้นบัญชียาหลักแห่งชาติด้านสมุนไพร สามารถใช้ในการบรรเทาอาการของโรคหวัดและโรคโควิด-19 ที่มีความรุนแรงน้อย และเพื่อลดการเกิดโรคที่รุนแรง (Technology Transfer and Development Bureau, 2021) เนื่องจากในปัจจุบันเชื้อไวรัสโคโรนาซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคโควิด-19 มีการแพร่กระจายของเชื้อไปอย่างรวดเร็ว เป็นอันตรายต่อสุขภาพและชีวิตของประชากรทั่วโลก ดังนั้น จึงมีความต้องการฟ้าทะลายโจรในประเทศเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก จนกระทั่งในบางช่วงเวลาฟ้าทะลายโจรได้ขาดตลาดมีความพยายามในการเพิ่มผลผลิตฟ้าทะลายโจรโดยการปรับปรุงพันธุ์ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากฟ้าทะลายโจรเป็นพืชผสมตัวเองและมีดอกขนาดเล็กจึงมีปัญหาในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ก่อนการคัดเลือก ดังนั้น จึงเกิดแนวคิดในการเพิ่มศักยภาพการผลิตฟ้าทะลายโจรโดยการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในพืชชนิดนี้ การชักนำให้พืชเป็นโพลีพลอยด์สามารถปรับปรุงผลผลิตและคุณภาพได้ ทำให้พืชมีผลผลิตสูงขึ้น และทนทานต่อสภาพความเครียดจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้มากขึ้น (Sattler *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2019) การชักนำให้พืชเป็นโพลีพลอยด์สามารถทำได้โดยการทรีตด้วยสารโคลชิซิน โดยโคลชิซินเป็นสารที่สกัดจาก *Colchicum autumnale* L. (Caperta *et al.*, 2006) เป็นสารต่อต้านไมโทซิส สามารถชักนำให้พืชเกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่า (Dhooghe *et al.*, 2011) หรือเป็นโพลีพลอยด์

พืชที่เป็นโพลีพลอยด์มีชีวมวลและปริมาณสารสำคัญเพิ่มขึ้น เช่น จากการศึกษาของสุนทรียในส้มเขียวหวาน (Surson *et al.*, 2015) ครามฝักงอ (Surson *et al.*, 2018) ครามฝักตรง (Surson, 2018a) และงาดำ (Surson *et al.*, 2021) พบว่า พืชเหล่านี้มีลำต้นและขนาดใบใหญ่ขึ้น และมีน้ำหนักใบเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ในหลายรายงานยังพบว่า พืชที่เป็นโพลีพลอยด์มีการสร้างสารสำคัญต่าง ๆ เพิ่มขึ้น เช่น ใน *Panax ginseng* C.A. Meyer ที่เป็นออกโคติพลอยด์ที่มีปริมาณสารสำคัญทุติภูมิ (Secondary metabolite) เพิ่มขึ้น (Kim *et al.*, 2004) ใน *Artemisia annua* L. (Clone YUT16) พบว่า รากที่มีชุดโครโมโซมเป็นเตตราพลอยด์ อายุ 14 วัน มีปริมาณสาร artemisinin (ยาสมุนไพรจีนมีฤทธิ์ต้านมาเลเรีย) มากกว่าในรากที่เป็นดิพลอยด์ (De Jesus-Gonzalez and Weathers, 2003) ใน *Centella asiatica* (L.) Urban พบว่า ต้นที่เป็นเตตราพลอยด์และมิท็อกซิพลอยด์มีแนวโน้มที่จะให้ชีวมวล (Biomass) และการผลิตสาร triterpenoid (ช่วยในการสมานแผล และรักษาความผิดปกติทางความคิดและอารมณ์ของผู้สูงวัย) เพิ่มขึ้น ใน *Hyoscyamus muticus* L. เตตราพลอยด์มีสาร scopolamine มากกว่าดิพลอยด์ ถึง 200 เปอร์เซ็นต์

(Dehghan *et al.*, 2012) ใน *Echinacea purpurea* (L.) Moench พบว่า ปริมาณสารสำคัญในเตตราฟลอยด์และดิฟลอยด์มีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่น้ำหนักรากสดและน้ำหนักรากแห้งของเตตราฟลอยด์ของพืชชนิดนี้มีขนาดใหญ่ขึ้น (39.32 และ 40.48 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) (Xu *et al.*, 2014) นอกจากนี้ ยังพบว่า โพลีฟลอยด์มีคุณสมบัติทนทานต่อ biotic stress และ abiotic stress หลายประการ เช่น ในหลายรายงานพบว่า พืชที่เป็นโพลีฟลอยด์ยังมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะความแห้งแล้งและทนเค็ม จากการศึกษาของ Wang *et al.* (2013) พบว่า ใน *Robinia pseudoacacia* L. ที่เป็นเตตราฟลอยด์ มีความทนทานต่อเกลือได้ดีกว่าดิฟลอยด์ จากการศึกษาใน *Coccinia palmata* และ *Lagenaria sphaerica* พบว่า ต้นเตตราฟลอยด์มีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น และทนทานต่อความเครียดจากการขาดน้ำได้ดีกว่าต้นดิฟลอยด์ (Ntuli and Zobolo, 2008) นอกจากนี้ ต้นพืชที่เป็นเตตราฟลอยด์ยังทนทานต่อความเครียดทางสภาพแวดล้อมโดยเฉพาะการขาดน้ำ (Zhang *et al.*, 2015) และทนทานต่อศัตรูพืช อีกทั้งการเป็นโพลีฟลอยด์ยังมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต (Growth rate) อีกด้วย (Otto and Whitton, 2000) การชักนำให้พืชเกิดเป็นโพลีฟลอยด์สามารถทำได้หลายวิธีการ โดยชักนำให้เกิดโพลีฟลอยด์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในชิ้นส่วนตาข้าง ตายอด ในเมล็ดอ่อน และในอับละอองเกสร นอกจากนี้ ยังนิยมทำในเมล็ดที่สุกแก่ทางสรีรวิทยาแล้วในพืชหลายชนิด จากการศึกษาพบว่า มีการชักนำให้เกิดโพลีฟลอยด์ในเมล็ดในพืชหลายชนิด เช่น ในส้มเขียวหวาน (Surson *et al.*, 2015) ในครามงอ (Surson *et al.*, 2018) ในครามฝักตรง (Surson, 2018a) ในงาดำ (Surson *et al.*, 2021) ใน *Robinia pseudoacacia* (Wang *et al.*, 2013) ใน *Hyoscyamus muticus* L. (Dehghan *et al.*, 2012) ใน *Salvia hains* (Grouh *et al.*, 2011) ใน *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Xing *et al.*, 2011) และในฝ้าย *Gossypium arboreum* (Wongpiyasatid *et al.*, 2003) เป็นต้น

วิธีการชักนำให้เกิดโพลีฟลอยด์ที่เป็นเตตราฟลอยด์ด้วยเมล็ดมีข้อได้เปรียบหลายอย่าง ประการแรกการชักนำให้เกิดเตตราฟลอยด์ในเมล็ดจะได้พันธุ์กรรมของต้นเตตราฟลอยด์ที่หลากหลายแตกต่างจากต้นแม่ (Li *et al.*, 2018) ประการที่ 2 คือ เตตราฟลอยด์สามารถผสมข้ามกับดิฟลอยด์พันธุ์เดิมหรือพันธุ์อื่นเพื่อสร้างทรูปลอยด์พันธุ์ใหม่เพื่อทำการคัดเลือกต่อไปได้ และประการสุดท้ายคือเตตราฟลอยด์ที่สร้างขึ้นสามารถผสมข้ามกันเองเพื่อให้ได้เตตราฟลอยด์พันธุ์ดีต่อไป จากการศึกษาการชักนำให้เกิดโพลีฟลอยด์ในฟ้าทะลายโจรของไทยมีผู้รายงานการชักนำให้เกิดโพลีฟลอยด์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่การชักนำให้เกิดโพลีฟลอยด์ด้วยวิธีดังกล่าวมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อย โพลีฟลอยด์ที่เกิดขึ้นจึงมีพันธุกรรมให้คัดเลือกลดน้อย ทำให้การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการดังกล่าวไม่ก้าวหน้า ในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาผลของโคลชิซินที่มีต่อการเจริญเติบโตของฟ้าทะลายโจร ซึ่งเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดนี้ เพื่อให้สามารถคัดเลือกฟ้าทะลายโจรที่มีความเหมาะสมในการให้ผลผลิตทางการเกษตรและมีปริมาณสารสำคัญชนิดต่าง ๆ มากขึ้น เพื่อสร้างรายได้ให้เกษตรกรปลูกและให้ประโยชน์ทางด้านต่าง ๆ ทั้งเป็นอาหาร เครื่องดื่ม ยา และเครื่องสำอางต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์ฟ้าทะลายโจรที่ศึกษา

ต้นฟ้าทะลายโจรที่ใช้ในการศึกษาเป็นฟ้าทะลายโจรพันธุ์พื้นเมือง อายุการเก็บรักษา 1 เดือน จากศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ จังหวัดศรีสะเกษ

ระยะเวลาที่ทำการศึกษา

ช่วงเวลาที่ทำการบันทึกข้อมูลอยู่ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2565

การชักนำให้เกิดโพลีฟลอยด์ในฟ้าทะลายโจร

นำเมล็ดฟ้าทะลายโจรมาทำความสะอาดตาม

ขั้นตอน คือ ล้างน้ำประปาเป็นเวลา 5 นาที ล้างเมล็ดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเป็นเวลา 3 นาที ล้างเมล็ดด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 5 นาที ฟอกล้างเมล็ดในคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที และล้างเมล็ดด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เตรียมโคลชิซินโดยละลายใน DMSO 2 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น แช่เมล็ดฟักทองในโคลชิซิน (Analytical grade) ความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น เพาะเมล็ดฟักทองในภาชนะขนาด 60 หลุม ที่บรรจุพีทมอส โดยวางแผนการทดลองแบบ 5×2 แฟกทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in completely randomized design) มี 2 ปัจจัย คือ ระดับความเข้มข้นของโคลชิซิน 5 ระดับ (0.0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์) และระยะเวลาการแช่เมล็ดในโคลชิซิน 2 ระดับ (12 และ 24 ชั่วโมง) จัดเป็นกลุ่มการทดลองได้ 10 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ ละ 4 ซ้ำ (1 ซ้ำ คือ 1 ภาชนะ) วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม SPSS version 16

การดูแลรักษาต้นฟักทอง

หลังจากการหิรเมล็ดฟักทอง นำเมล็ดไปเพาะในภาชนะขนาด 60 หลุม ที่บรรจุพีทมอสจนเต็มเป็นเวลา 1 เดือน หลังจากนั้นย้ายปลูกลงในกระถางขนาด 10 นิ้ว ที่มีวัสดุปลูกเป็นดิน:แกลบดิบ:ปุ๋ยคอก อัตราส่วน 2:1:1 วางกระถางห่างกัน 50 เซนติเมตรให้น้ำวันละ 1 ครั้ง ด้วยสปริงเกอร์เป็นเวลา 30 นาที

การตรวจสอบความงอกและความผิดปกติ

หลังจากเพาะในภาชนะเป็นเวลา 1 เดือน ตรวจสอบความงอกและความผิดปกติของต้นกล้า (Surson *et al.*, 2021) และตรวจสอบความเป็นโพลีพลอยด์ของต้นกล้าผิดปกติ โดยนับจำนวนเมล็ดที่งอกและจำนวนต้นที่ผิดปกติ และนำไปคำนวณ

เปอร์เซ็นต์ความงอกและเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของต้นกล้า ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความงอก} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอก}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะ}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ} = \frac{\text{จำนวนต้นที่ผิดปกติ}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะ}} \times 100$$

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้า

หลังจากเพาะเมล็ดฟักทองเป็นเวลา 15 วัน ต้นกล้าโผล่ขึ้นมาจากพีทมอสในภาชนะ ทำการสังเกตและจัดจำแนกต้นฟักทองเป็นต้นกล้าปกติ (จาก control ที่ไม่ได้รับโคลชิซิน) กับต้นกล้าผิดปกติ โดยศึกษาเปรียบเทียบกับต้นปกติ หลังจากนั้น เมื่ออายุ 1-4 เดือน เป็นต้นไป จึงศึกษาลักษณะลำต้น โดยการวัดความสูงต้น (วัดจากโคนถึงข้อสุดท้าย) จำนวนข้อต่อต้น (นับจำนวนข้อของลำต้นหลัก) และจำนวนกิ่งต่อต้น (นับจำนวนกิ่งที่งอกจากลำต้นหลัก) และศึกษาลักษณะใบ ได้แก่ จำนวนใบต่อต้น (นับจำนวนใบทั้งหมดที่คลี่กาง) ความยาวใบ (วัดจากปลายใบถึงฐานใบ) และความกว้างใบ (วัดจากกึ่งกลางใบ)

การวิเคราะห์ความเป็นโพลีพลอยด์

หลังจากการเพาะต้นฟักทองเป็นเวลา 5 เดือน ต้นฟักทองที่ถูกจัดจำแนกเป็นต้นผิดปกติได้รับการตรวจสอบความเป็นโพลีพลอยด์เปรียบเทียบกับต้นที่เป็นปกติในชุดควบคุม ด้วยเครื่อง Quantum Analysis Flow Cytometer จากเยอรมัน โดยการสับใบฟักทองแต่ละต้นให้มีขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร น้ำหนัก 0.1-0.5 กรัม ใน plastic Petri dish โดยใช้ Quantum Stain NA UV 2 (A) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ Polyvinyl-Pyrrolidone (PVP) ประมาณ 0.05 กรัม (เพื่อช่วยกำจัดขยะ) กรองสารแขวนลอยนิวเคลียสผ่านตัวกรองขนาด 30 ไมครอน เติมน้ำยาใช้ Quantum Stain NA UV 2 (B) ลงในหลอดสารแขวนลอยตัวอย่างเพิ่มอีก

500 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างที่ได้มา วัดด้วยเครื่อง Flow Cytometer

ผลการทดลองและวิจารณ์

ลักษณะต้นกล้าฟ้ายะลวยอายุ 1 เดือน

จากการศึกษาลักษณะความงอกของ ฟ้ายะลวยโอรที่ได้รับโคลชิซินในระดับความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า ระดับความเข้มข้นของโคลชิซินมีอิทธิพลต่อความงอกของเมล็ดฟ้ายะลวยโอรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) โดยทรีตเมนต์ที่มีความงอกสูงที่สุด คือ ทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (11.38 ± 1.85 เปอร์เซ็นต์) ที่ระดับความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ จะเริ่มมีความงอกลดลง (6.33 ± 1.75 เปอร์เซ็นต์) สอดคล้องกับการศึกษาของ Surson (2018a) ในครามฝักตรงที่พบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดของครามฝักตรงที่ได้รับโคลชิซินมีจำนวนลดลง นอกจากนี้ ในการศึกษาของ Surson *et al.* (2015) ยังพบว่า เมล็ดส้มเขียวหวานที่ได้รับโคลชิซินมีความงอกลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Agafarini *et al.* (2019) ที่พบว่า เปอร์เซ็นต์การงอกของ garden cress ลดลงเมื่อความเข้มข้นของโคลชิซินเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม พบว่า ระยะเวลาการได้รับโคลชิซินในเมล็ดฟ้ายะลวยโอรที่ศึกษาไม่มีอิทธิพลต่อการงอกของฟ้ายะลวยโอร เมื่อสังเกตจากแต่ละทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ

พบว่า แต่ละทรีตเมนต์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยทรีตเมนต์ที่ 3 (0.1, 12) มีความงอกสูงที่สุด รองลงมาคือ ทรีตเมนต์ที่ 5 (0.2, 12) และทรีตเมนต์ที่ 4 (0.1, 24) ตามลำดับ (Table 1)

จากการศึกษาความผิดปกติของต้นกล้าฟ้ายะลวยโอรที่ได้รับโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ซึ่งต้นกล้ามีความผิดปกติ คือ มีลักษณะใบเลี้ยงหงิกงอ ลำต้นมีสีเข้ม ใบเลี้ยงใหญ่ และใบจริงแผ่กางค่อนข้างกลม โดยพบว่าความเข้มข้นของโคลชิซินและระยะเวลาการชักนำให้เมล็ดได้รับโคลชิซินเพิ่มขึ้นไม่มีอิทธิพลต่อความผิดปกติมากนักในระยะต้นกล้า อย่างไรก็ตาม จากการสังเกตพบว่า โคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มที่จะพบต้นกล้าผิดปกติมากกว่าทุกระดับความเข้มข้น (0.33 ± 0.59 และ 0.37 ± 0.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และเนื่องจากฟ้ายะลวยโอรมีการพักตัวและการงอกของเมล็ดแต่ละเมล็ดมีแนวโน้มที่จะงอกโดยใช้ระยะเวลาแตกต่างกันตามธรรมชาติอยู่แล้ว จึงมีแนวโน้มที่จะจำแนกความผิดปกติของพืชชนิดนี้ยากขึ้น เมื่อสังเกตในทรีตเมนต์ต่าง ๆ ที่ได้รับโคลชิซินระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ ในฟ้ายะลวยโอรพื้นเมือง พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (Table 1) อย่างไรก็ตาม การศึกษาในงาดำ พบว่า เมื่อเมล็ดงาได้รับโคลชิซินมากขึ้นจะมีจำนวนต้นกล้าผิดปกติมากขึ้น (Surson *et al.*, 2021)

Table 1 The effect of concentration and duration of colchicine treatment on germination, abnormalities, plant height and number of leaves of indigenous *Andrographis* at the age of 1 month

Factor	Germination (%)	Abnormalities (%)	Plant height (cm)	Number of leaves
Colchicine concentration (%)				
0.00	8.30 ± 2.06 ^b	0.17 ± 0.18	0.63 ± 0.19 ^{ab}	2.84 ± 0.30 ^{ab}
0.10	11.38 ± 1.85 ^a	0.33 ± 0.59	0.53 ± 0.17 ^b	2.90 ± 0.24 ^{ab}
0.20	10.46 ± 2.40 ^a	0.37 ± 0.52	0.77 ± 0.16 ^a	2.95 ± 0.33 ^a
0.30	6.33 ± 1.75 ^b	0.17 ± 0.25	0.55 ± 0.15 ^b	2.61 ± 0.29 ^b
0.40	6.54 ± 1.85 ^b	0.29 ± 0.28	0.59 ± 0.09 ^b	2.58 ± 0.32 ^b
F-test	**	ns	*	*
Duration time (hour)				
12	9.22 ± 2.72	0.30 ± 0.43	0.59 ± 0.15	2.72 ± 0.25
24	7.98 ± 2.80	0.23 ± 0.34	0.63 ± 0.19	2.83 ± 0.38
F-test	ns	ns	ns	ns
Colchicine concentration (%) × Duration time (hour)				
0.0, 12	7.59 ± 1.23 ^{cd}	0.17 ± 0.19	0.60 ± 0.05	2.78 ± 0.12
0.0, 24	9.00 ± 2.66 ^{bc}	0.17 ± 0.19	0.66 ± 0.28	2.90 ± 0.42
0.1, 12	12.25 ± 1.97 ^a	0.42 ± 0.84	0.57 ± 0.23	2.85 ± 0.23
0.1, 24	10.50 ± 1.45 ^{ab}	0.25 ± 0.32	0.49 ± 0.11	2.96 ± 0.28
0.2, 12	12.00 ± 0.61 ^a	0.33 ± 0.47	0.73 ± 0.14	2.91 ± 0.25
0.2, 24	8.92 ± 2.60 ^{bc}	0.42 ± 0.63	0.80 ± 0.19	3.00 ± 0.42
0.3, 12	6.92 ± 1.03 ^{cd}	0.17 ± 0.19	0.46 ± 0.12	2.53 ± 0.17
0.3, 24	5.75 ± 2.28 ^d	0.17 ± 0.34	0.65 ± 0.12	2.68 ± 0.40
0.4, 12	7.33 ± 1.44 ^{cd}	0.42 ± 0.32	0.61 ± 0.84	2.54 ± 0.24
0.4, 24	5.75 ± 2.06 ^d	0.17 ± 0.19	0.56 ± 0.95	2.62 ± 0.43
F-test	**	ns	ns	ns
CV (%)	18.16	74.18	15.75	8.54

Letter (s) in each column indicated least significant differences at probability (P) < 0.05, ns = non-significant, ** Represent significant at the P = 0.01 level, and * Represent significant at the P = 0.05 level

จากการศึกษาลักษณะความสูงของต้นกล้าฟ้ายะลวยอายุ 1 เดือน หลังจากให้เมล็ดที่ได้รับโคลชิซินในระดับความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้นของโคลชิซินมีอิทธิพลต่อความสูงของฟ้ายะลวยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การได้รับโคลชิซินทำให้ความสูงของฟ้ายะลวยส่วนใหญ่ลดลง โดยพบว่าเมื่อได้รับโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ต้นกล้ามีความสูงเฉลี่ย 0.63 ± 0.19 , 0.53 ± 0.17 , 0.77 ± 0.16 , 0.55 ± 0.15 และ 0.59 ± 0.09 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซินมีความสูงน้อยกว่าต้นกล้าที่ไม่ได้รับโคลชิซิน ในการศึกษาครั้งนี้ต้นกล้าฟ้ายะลวยมีความสูงน้อยกว่าเนื่องจากเมล็ดดอกข้าว ซึ่งเป็นผลจากเมล็ดที่ใช้ในการศึกษาเป็นเมล็ดใหม่ที่ยังมีการพักตัวอยู่ จึงอาจมีผลต่อความงอกและความสูงของต้นกล้า อีกทั้งในทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินอาจมีผลต่อความสูงร่วมด้วย สอดคล้องกับการศึกษาของ Surson *et al.* (2015), Surson (2018a), Surson *et al.* (2021) และ Yan *et al.* (2022) เมื่อศึกษาระยะเวลาการได้รับโคลชิซินที่แตกต่างกัน พบว่า การได้รับโคลชิซินเป็นเวลานานขึ้นไม่มีอิทธิพลต่อความสูงของต้นกล้าฟ้ายะลวย ซึ่งอาจเนื่องมาจากระยะเวลาของทั้งสองกลุ่มห่างกันไม่มากที่จะทำให้ความสูงของต้นกล้าแตกต่างกันทางสถิติ การได้รับโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่ทำให้ความสูงของต้นกล้าฟ้ายะลวยในแต่ละทรีตเมนต์แตกต่างกัน (Table 1) สอดคล้องกับการศึกษาของ Surson (2018b) และ Sadat Noori *et al.* (2017)

จากการศึกษาลักษณะจำนวนใบของต้นกล้าฟ้ายะลวยที่เกิดจากการการชักนำเมล็ดด้วยโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้นของโคลชิซินมีอิทธิพลต่อจำนวนใบของต้นกล้าอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.0, 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนใบมากที่สุดและไม่

แตกต่างกันทางสถิติ (จำนวน 2.84 ± 0.30 , 2.90 ± 0.24 และ 2.95 ± 0.33 ใบ ตามลำดับ) เมื่อระดับความเข้มข้นของโคลชิซินเพิ่มขึ้นทำให้เกิดใบของต้นกล้าฟ้ายะลวยลดลง และมีจำนวนใบของต้นกล้าน้อยลงที่ระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยระดับความเข้มข้นที่พบว่ามีจำนวนใบเริ่มลดลง คือ ที่ระดับโคลชิซิน 0.3 เปอร์เซ็นต์ (2.61 ± 0.29 ใบ) เมื่อพิจารณาระยะเวลาการได้รับโคลชิซินที่แตกต่างกัน พบว่า การได้รับโคลชิซิน 12 และ 24 ชั่วโมง ทำให้ต้นกล้าฟ้ายะลวยมีจำนวนใบไม่แตกต่างกันทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Surson *et al.* (2021) ในงานดำ ที่พบว่า งานดำที่ได้รับโคลชิซินเพิ่มขึ้นจะทำให้จำนวนใบของต้นกล้าน้อยลง เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการได้รับโคลชิซินที่แตกต่างกัน พบว่า ไม่ทำให้จำนวนใบแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อสังเกตในทรีตเมนต์ต่าง ๆ พบว่า จำนวนใบของฟ้ายะลวยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 1) สอดคล้องกับการศึกษาในครามฝักตรงที่พบว่า จำนวนใบของต้นกล้าของเมล็ดที่ได้รับโคลชิซิน 6 และ 12 ชั่วโมง มีจำนวนใบไม่แตกต่างกัน จากการศึกษาในหลายการทดลอง พบว่า การได้รับโคลชิซินมีผลต่อการเจริญเติบโต เนื่องจากโคลชิซินทำให้เกิดปรากฏการณ์ gigas effect ซึ่งทำให้ขนาดของอวัยวะต่าง ๆ มีขนาดโตขึ้น เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น อย่างไรก็ตาม โคลชิซินทำให้เกิดความล้มเหลวในการแบ่งเซลล์หรือทำให้แบ่งเซลล์ได้ช้าลง (Zhu *et al.*, 2021) ซึ่งอาจทำให้จำนวนใบลดลงได้

ลักษณะของต้นฟ้ายะลวย (อายุ 3 และ 4 เดือน)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นฟ้ายะลวยอายุ 3 เดือนหลังจากการทรีตเมนต์ด้วยโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า ต้นฟ้ายะลวยในทรีตเมนต์ที่ไม่ได้รับโคลชิซินมีความสูงมากกว่าต้นที่ได้รับโคลชิซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาเฉพาะทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน ทรีตเมนต์ที่ได้รับ

โคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีความสูงมากที่สุด (8.37 ± 1.40 เซนติเมตร) และจากการศึกษาพบว่า ความสูงในทริตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาในลักษณะจำนวนใบพบว่า ทริตเมนต์ที่ไม่ได้รับโคลชิซินและทริตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีจำนวนใบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) อย่างไรก็ตาม พบว่าทริตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินเมื่อมีอายุ 3 เดือน มีจำนวนใบที่ไม่แตกต่างกัน

และพบว่า จำนวนใบในทริตเมนต์ที่ไม่ได้รับโคลชิซินมีจำนวนใบมากกว่าทริตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน เมื่อศึกษาจำนวนข้อของลำต้นหลักของต้นฟ้าทะลายโจร พบว่าจำนวนข้อของลำต้นหลักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) ทริตเมนต์ที่ไม่ได้รับโคลชิซินมีจำนวนข้อมากกว่าทริตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน ในทริตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินที่มีจำนวนข้อมากที่สุด คือ ทริตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (5.25 ± 0.91 ข้อ; Table 2)

Table 2 The effect of concentration and duration of colchicine treatment on plant height, number of leaves and number of nodes of indigenous *Andrographis* at the age of 3 months

Colchicine concentration (%)	Duration time (hour)	Plant height (cm)	Number of leaves	Number of nodes
0.0	12	12.00 ± 2.71^a	31.30 ± 6.74^a	6.10 ± 0.90^a
0.0	24	12.56 ± 1.24^a	31.15 ± 3.29^a	5.70 ± 0.97^{ab}
0.1	12	8.37 ± 1.40^b	20.05 ± 5.31^b	4.55 ± 0.60^{bcd}
0.1	24	7.62 ± 2.33^b	15.00 ± 4.07^{bc}	4.10 ± 0.81^{cd}
0.2	12	4.80 ± 1.26^b	10.00 ± 1.81^c	3.65 ± 0.30^d
0.2	24	5.76 ± 1.26^b	13.95 ± 5.74^{bc}	3.95 ± 1.30^{cd}
0.3	12	7.96 ± 1.98^b	19.25 ± 6.24^b	$4.90 \pm 0.93^{a-d}$
0.3	24	7.74 ± 3.60^b	16.40 ± 6.56^{bc}	$5.00 \pm 1.14^{a-d}$
0.4	12	7.22 ± 1.07^b	15.60 ± 1.99^{bc}	5.25 ± 0.91^{abc}
0.4	24	5.53 ± 1.48^b	12.45 ± 2.85^{bc}	3.80 ± 0.91^{cd}
F-test		**	**	**
CV (%)		27.00	25.97	19.50

Letter (s) in each column indicated least significant differences at probability ($P < 0.05$, ns = non-significant, ** Represent significant at the $P = 0.01$ level, and * Represent significant at the $P = 0.05$ level

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ ฟ้าทะลายโจรอายุ 4 เดือน หลังจากการทริตเมนต์ด้วย โคลชิซินความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า ความสูงของฟ้าทะลายโจรในแต่ละทริตเมนต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$; Table 3)

สอดคล้องกับการศึกษาของ Surson *et al.* (2021) ที่พบว่า ต้นกล้าดำที่ได้รับโคลชิซินและไม่ได้รับโคลชิซิน มีความสูงแตกต่างกันในระยะต้นกล้า เช่นเดียวกับใน garden cress ที่พบว่า การทริตโคลชิซินทำให้การเจริญเติบโตในเดือนแรกลดลง หลังจากนั้นพบว่า การได้รับและไม่ได้รับโคลชิซินมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน

(Aqafarini *et al.*, 2019) อย่างไรก็ตาม อิทธิพลของโคลชิซินในแต่ละพืชแตกต่างกัน เช่น การทรีตโคลชิซินในเมล็ดครามฝักตรง พบว่า ต้นดิพลอยด์และเตตราพลอยด์ที่เจริญเติบโตเต็มที่มีความสูงไม่แตกต่างกัน (Surson, 2018b) ส่วนในครามฝักงอต้นดิพลอยด์มีความสูงมากกว่ามิกลิพลอยด์และเตตราพลอยด์ (Surson *et al.*, 2018) และใน *Raphanus sativa* L. ที่ได้รับโคลชิซินมีความสูงของเตตราพลอยด์มากกว่าดิพลอยด์

จากการศึกษาจำนวนข้อของลำต้นหลักของฟักทะลายโจรเมื่ออายุ 4 เดือน พบว่า จำนวนข้อของลำต้นหลักของแต่ละทรีตเมนต์แตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) และเมื่อได้รับโคลชิซินเป็นเวลานานขึ้นมีแนวโน้มทำให้จำนวนข้อของลำต้นหลักน้อยลง (Table 3) สอดคล้องกับการศึกษาในครามฝักงอที่พบว่า เมล็ดที่ได้รับโคลชิซินที่เป็นมิกลิพลอยด์และเตตราพลอยด์มีจำนวนข้อน้อยกว่าดิพลอยด์ (Surson *et al.*, 2018) แตกต่างจากการศึกษาในงาดำที่พบว่า ต้นผิดปกติที่ได้รับโคลชิซินมีจำนวนข้อต่อต้นมากกว่าต้นปกติที่ไม่ได้รับโคลชิซิน (Surson *et al.*, 2021) อย่างไรก็ตาม ทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินที่มีจำนวนข้อสูงที่สุด คือ ทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (8.65 ± 1.38 ข้อ)

Table 3 The effect of concentration and duration of colchicine treatment on plant height, number of nodes and number of branches of indigenous *Andrographis* at the age of 4 months

Colchicine concentration (%)	Duration time (hour)	Plant height (cm)	Number of nodes	Number of branches
0.0	12	32.00 ± 6.81^a	11.10 ± 1.40^a	8.60 ± 1.57^{ab}
0.0	24	29.45 ± 3.70^{ab}	7.50 ± 1.27^{bc}	7.45 ± 2.18^{ab}
0.1	12	26.27 ± 3.18^{ab}	8.00 ± 0.82^{bc}	9.25 ± 1.83^a
0.1	24	24.45 ± 5.40^{abc}	7.05 ± 1.15^{bc}	7.15 ± 1.49^{ab}
0.2	12	15.40 ± 2.26^c	5.95 ± 0.50^c	4.10 ± 1.73^c
0.2	24	20.97 ± 11.17^{bc}	6.20 ± 1.85^c	7.06 ± 1.06^{ab}
0.3	12	25.73 ± 7.21^{abc}	7.45 ± 1.48^{bc}	9.40 ± 2.32^a
0.3	24	23.80 ± 9.66^{abc}	6.80 ± 2.65^{bc}	5.70 ± 3.32^{bc}
0.4	12	26.70 ± 5.40^{ab}	8.15 ± 0.72^{bc}	7.35 ± 1.02^{ab}
0.4	24	22.10 ± 3.48^{abc}	8.65 ± 1.38^b	6.30 ± 1.18^{abc}
F-test		**	**	*
CV (%)		25.82	18.80	26.10

Letter (s) in each column indicated least significant differences at probability (P) < 0.05 , ns = non-significant, ** Represent significant at the $P = 0.01$ level, and * Represent significant at the $P = 0.05$ level

การศึกษาจำนวนกิ่งของฟ้าทะลายโจรอายุ 4 เดือน พบว่า จำนวนกิ่งในแต่ละทริตเมนต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยพบว่า จำนวนกิ่งของทริตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินมีจำนวนน้อยลง และมีแนวโน้มว่าเมื่อได้รับโคลชิซินเป็นเวลานานขึ้นจะทำให้จำนวนกิ่งลดลง (Table 3) ในทริตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีจำนวนกิ่งมากที่สุด (9.40 ± 2.32 กิ่ง) สอดคล้องกับการศึกษาของ Liu *et al.* (2007) ที่พบว่า จำนวนกิ่งของ *Plantanus acerifolia* เตตราฟลอยด์ที่ได้รับโคลชิซินมีจำนวนกิ่งน้อยกว่าดิฟลอยด์ที่ไม่ได้รับโคลชิซิน เช่นเดียวกับการศึกษาในครามฝักรอ (*Indigofera suffruticosa*; Surson *et al.*, 2018) ที่พบว่า ต้นที่เป็นโพลีฟลอยด์มีจำนวนกิ่งลดลง นอกจากนี้ ในบัวบกยังพบว่าต้นเตตราฟลอยด์ที่ได้รับโคลชิซินมีจำนวนไหลต่อต้านลดลง (Kaensaksiri *et al.*, 2011) อย่างไรก็ตาม

พบว่าใน *Stevia rebaudiana* ที่ได้รับโคลชิซินมีจำนวนกิ่งต่อต้านเพิ่มขึ้น (Talei *et al.*, 2020)

จากการศึกษาจำนวนใบพบว่า จำนวนใบของต้นฟ้าทะลายโจรที่ไม่ได้รับโคลชิซินมีจำนวนใบมากกว่าทริตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน (Table 4) แตกต่างจาก *Stevia rebaudiana* (Talei *et al.*, 2020) และข้าวหอมนิล (Maneerattanarungroj *et al.*, 2016) ที่พบว่า เมื่อได้รับโคลชิซินทำให้มีจำนวนใบมากขึ้น ทั้งนี้ ผลการศึกษาในครามฝักรอพบว่า ต้นที่ได้รับโคลชิซินที่เป็นโพลีฟลอยด์มีจำนวนใบประกอบลดลง (Surson *et al.*, 2018) และพบว่า ในทริตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน 24 ชั่วโมง มีแนวโน้มว่าจะมีจำนวนใบน้อยกว่าทริตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยทริตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีจำนวนใบน้อยที่สุด (26.50 ± 4.01 ใบ; Table 4)

Table 4 The effect of concentration and duration of colchicine treatment on number of leaves, leaf width and leaf length of indigenous *Andrographis* at the age of 4 months

Colchicine concentration (%)	Duration time (hour)	Number of leaves	Leaf width (cm)	Leaf length (cm)
0.0	12	77.70 ± 25.06^a	1.62 ± 0.28^{bc}	6.03 ± 1.21
0.0	24	72.35 ± 25.80^{ab}	1.49 ± 0.29^c	6.80 ± 1.97
0.1	12	61.05 ± 15.24^{abc}	1.91 ± 0.01^{ab}	6.87 ± 0.24
0.1	24	$49.30 \pm 13.74^{b-e}$	2.06 ± 0.23^a	7.18 ± 0.27
0.2	12	26.50 ± 4.01^e	1.59 ± 0.17^{bc}	5.44 ± 0.46
0.2	24	34.00 ± 13.65^{de}	1.85 ± 0.43^{ab}	5.44 ± 1.14
0.3	12	45.55 ± 15.27^{cde}	1.71 ± 0.20^{bc}	5.93 ± 0.67
0.3	24	45.60 ± 12.52^{cde}	1.41 ± 0.12^c	5.45 ± 0.66
0.4	12	$55.60 \pm 13.38^{a-d}$	1.88 ± 0.07^{ab}	6.85 ± 1.02
0.4	24	38.80 ± 5.83^{cde}	1.67 ± 0.22^{bc}	6.65 ± 0.83
F-test		**	**	ns
CV (%)		31.53	39.43	15.65

Letter (s) in each column indicated least significant differences at probability (P) < 0.05 , ns = non-significant, ** Represent significant at the $P = 0.01$ level, and * Represent significant at the $P = 0.05$ level

การศึกษาความกว้างใบ พบว่า แต่ละทรีตเมนต์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) โดยทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินมีแนวโน้มที่จะมีความกว้างใบเพิ่มขึ้น โดยทรีตเมนต์ที่มีความกว้างใบสูงสุด คือ ทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (2.06 ± 0.23 เซนติเมตร) สอดคล้องกับการศึกษาของ Kaensaksiri *et al.* (2011) ในบัวบก (*Centella asiatica* (L.) Urban) Surson *et al.* (2018) ในงาดำ และการศึกษาของ Liu *et al.* (2007) ใน *Platanus acerifolia* สำหรับการศึกษาความยาวใบ พบว่า แต่ละทรีตเมนต์ที่ศึกษามีความยาวใบไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 4) เช่นเดียวกับการ

ศึกษาในบัวบก (Kaensaksiri *et al.*, 2011) และในงาดำ (Surson *et al.*, 2021) อย่างไรก็ตาม ในข้าวหอมมะลิ พบว่า การได้รับโคลชิซินทำให้ความยาวใบลดลง (Maneerattanarungroj *et al.*, 2016)

การตรวจสอบโพลีพลอยด์ของฟ้าทะลายโจร

หลังจากการทรีตเมนต์ฟ้าทะลายโจรในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ได้ทำการเพาะปลูกและจำแนกลักษณะความผิดปกติของต้นกล้าฟ้าทะลายโจร และย้ายลงปลูกในกระถาง (Figure 1)



Figure 1 Native *Andrographis* at 5 months of age: normal plant that did not receive colchicine (A), abnormal plant that received colchicine (B).

เมื่ออายุ 5 เดือน ได้นำต้นที่มีลักษณะปกติและผิดปกติมาตรวจสอบระดับโพลีพลอยด์ ซึ่งพบว่า ต้นที่ได้รับการจำแนกว่าเป็นต้นปกติเป็นต้นดิพลอยด์ทั้งหมด เมื่อตรวจสอบระดับโพลีพลอยด์ของต้นผิดปกติพบว่า ต้นที่ได้รับการจำแนกว่าเป็นต้นผิดปกติมีลักษณะเป็นไคเมอราที่เป็นมิคโซพลอยด์บางส่วน (Figure 2) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ศึกษายังไม่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ทั้งต้น นอกจากนี้ เมล็ดฟ้าทะลายโจรที่นำมาศึกษาเป็นเมล็ดใหม่ ซึ่งอาจยังไม่หยุดการพักตัว

ทำให้เมล็ดมีความงอกน้อย เมล็ดงอกได้ไม่พร้อมกัน และแสดงอาการเมล็ดแข็ง จึงอาจมีผลต่อความงอกและการดูดซึมโคลชิซินได้ในระดับต่ำไม่มากเพียงพอต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในปริมาณมาก นอกจากผลของโคลชิซินแล้วการทยอยงอกอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของฟ้าทะลายโจรได้ส่วนหนึ่ง จากผลดังกล่าวอาจทำให้ต้นฟ้าทะลายโจรที่ได้รับโคลชิซินมีลักษณะการเจริญเติบโตต่างจากต้นที่ไม่ได้รับโคลชิซินได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อศึกษาการทดลองของ Yan *et al.* (2022) ในการทรีตเมนต์ *Buddleja lindleyana*

พบว่า ต้นที่ได้รับโคลชิซินมีลักษณะฟีโนไทป์หลายแบบ เมื่อวิเคราะห์ระดับโพลีพลอยด์จากลักษณะทางสัณฐานที่ผิดปกติจำนวน 30 ต้น กลับพบว่า เป็นต้นเตตราพลอยด์เพียง 3 ต้น และเป็นต้นที่เป็นโคเมอร่า 5 ต้น ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่าการชักนำให้เมล็ดเป็นโพลีพลอยด์

โดยการให้เมล็ดได้รับโคลชิซินอาจทำให้เมล็ดบางส่วนที่ได้รับโคลชิซินเกิดการกลายพันธุ์ของยีน แม้จะไม่เกิดดับเบิลโครโมโซมในต้นพืชที่มีความผิดปกติเหล่านั้นก็ตาม อาจมีความผิดปกติของยีนในต้นพืชที่มีฟีโนไทป์ที่ผิดปกติเกิดขึ้นได้

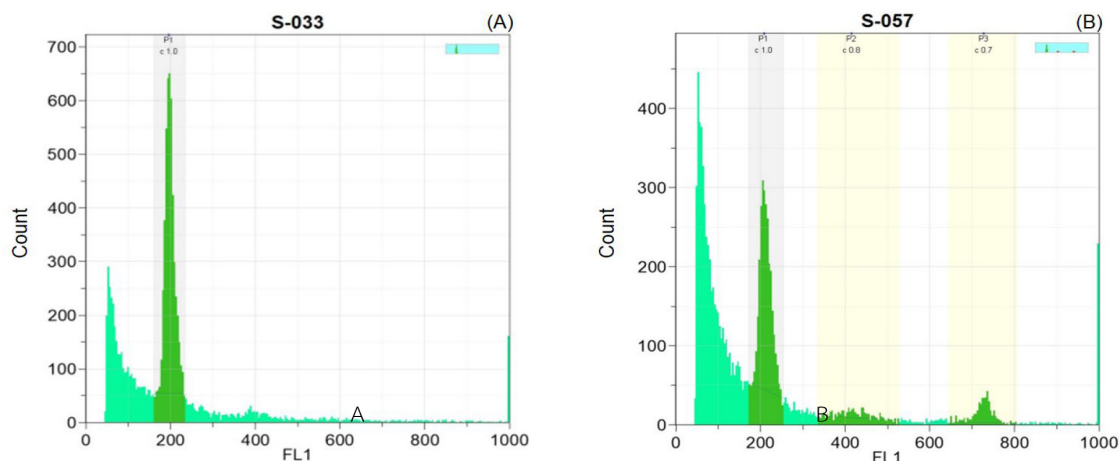


Figure 2 Flow cytometric analysis on DNA content of indigenous *Andrographis* normal plant (A) and abnormal plant (B)

สรุป

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ด้วยสารโคลชิซินในเมล็ดฟ้าทะลายโจรมีอิทธิพลต่อความงอก ความสูง และจำนวนใบของฟ้าทะลายโจรที่อายุ 1 เดือน แต่ไม่มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ การใช้โคลชิซินที่ความเข้มข้นแตกต่างกันส่งผลให้ความสูง จำนวนใบ และจำนวนข้อของต้นฟ้าทะลายโจรที่อายุ 3 เดือน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ในขณะที่ ต้นฟ้าทะลายโจรที่อายุ 4 เดือน มีความแตกต่างกันในลักษณะความสูง จำนวนข้อ จำนวนกิ่ง จำนวนใบ และความกว้างใบ อย่างไรก็ตาม การใช้สารโคลชิซินในการเหนี่ยวนำให้เกิดโพลีพลอยด์นั้นไม่ส่งผลต่อความแตกต่างของความยาวใบ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า สารโคลชิซินมีอิทธิพลต่อลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะทางสัณฐานของฟ้า

ทะลายโจรพันธุ์พื้นเมือง ทั้งนี้ ต้นฟ้าทะลายโจรที่มีความผิดปกติมีลักษณะเป็นโคเมอร่าที่เกิดเป็นมิทอซโพลอยด์ได้ นอกจากนี้ หากต้องการให้ฟ้าทะลายโจรมีจำนวนโครโมโซมที่เป็นโพลีพลอยด์ควรศึกษาเพิ่มเติมที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาอื่นที่เหมาะสมสำหรับพืชชนิดนี้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร ที่ให้การสนับสนุนและให้ความอนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ เพื่อการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Aqafarini, A., M. Lotfi, M. Norouzi and G. Karimzadeh. 2019. Induction of tetraploidy in garden cress: morphological and cytological changes. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 137: 627–635. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01596-5>.
- Caperta, A.D., M. Delgado, F. Ressurreição, A. Meister, R.N. Jones, W. Viegas and A. Houben. 2006. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. *Protoplasma.* 227: 147–153. <https://doi.org/10.1007/s00709-005-0137-z>.
- De Jesus-Gonzalez, L. and P.J. Weathers. 2003. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. *Plant Cell Rep.* 21(8): 809–813. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0587-8>.
- Dehghan, E., S.T. Hakkinen, K. Oksman-Caldentey and F.S. Ahmadi. 2012. Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and *in vitro* hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 110: 35–44. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0127-8>
- Department of Agriculture. 2021. Handbook for Farmers: Paniculata Production. Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok, Thailand. 42 pp. (in Thai)
- Dhooghe, E., K. Van Laere, T. Eeckhaut, L. Leus and J. Van Huylenbroeck. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 104: 359–373. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9786-5>.
- Fu, L., Y. Zhu, M. Li, C. Wang and H. Sun. 2019. Autopolyploid induction via somatic embryogenesis in *Lilium distichum* Nakai and *Lilium cernuum* Komar. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 139: 237–248. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01671-x>.
- Grouh, M.S.H., H. Meftahizade, N. Lotfi, V. Rahimi and B. Baniasadi. 2011. Doubling the chromosome number of *Salvia hains* using colchicine: evaluation of morphological traits of recovered plants. *J. Med. Plant. Res.* 5(19): 4892–4898. <https://doi.org/10.5897/JMPR.9000459>.
- Kaensaksiri, T., P. Soontornchainaksaeng, N. Soonthornchareonnon and S. Prathanaturug. 2011. *In vitro* induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 107: 187–194. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9969-8>.
- Kim, Y.S., E.J. Hahn, H.N. Murthy and K.Y. Paek. 2004. Effect of polyploidy induction on biomass and ginsenoside accumulations in adventitious roots of ginseng. *J. Plant Biol.* 47: 356–360. <https://doi.org/10.1007/BF03030551>.

- Li, Q.Q., J. Zhang, J.H. Liu and B.Y. Yu. 2018. Morphological and chemical studies of artificial *Andrographis paniculata* polyploids. *Chin. J. Nat. Med.* 16(2): 81–89. [https://doi.org/10.1016/s1875-5364\(18\)30033-5](https://doi.org/10.1016/s1875-5364(18)30033-5).
- Liu, G., Z. Li and M. Bao. 2007. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. *Euphytica*. 157: 145–154. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9406-6>.
- Maneerattananurongroj, P., C. Weruwanaruk and P. Maneerattananurongroj. 2016. Effect of colchicine on some morphological and anatomical characteristics of Homnil rice seedling (*Oryza sativa* L.), Landrace rice of Thailand. *Koch Cha Sarn Journal of Science*. 38(2): 72–78.
- Ntuli, N.R. and A.M. Zobolo. 2008. Effect of water stress on growth of colchicine induced polyploid *Coccinia palmate* and *Lagenaria sphaerica* plants. *Afr. J. Biotechnol.* 7(20): 3648–3652.
- Otto, S.P. and J. Whitton. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.* 34: 401–437. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.401>.
- Sadat Noori, S.A., M. Norouzi, G. Karimzadeh, K. Shirkool and M. Niazian. 2017. Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 130: 543–551. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1245-0>.
- Sattler, M.C., C.R. Carvalho and W.R. Clarindo. 2016. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*. 243(2): 281–296. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2450-x>.
- Surson, S. 2018a. Polyploid induction in ‘kram phak troung’ indigo (*Indigofera tinctoria* L.). *Knon Kaen Agr. J.* 46(3): 439–448. (in Thai)
- Surson, S. 2018b. Comparative of growth rate and morphology of ‘kram phak troung’ (*Indigofera tentoria* L.), between diploid and tetraploid plant. *Khon Kean Agr. J.* 46(3): 559–570. (in Thai)
- Surson, S., S. Sitthaphanit and K. Wongkerson. 2021. Polyploidy induction of black sesame (*Sesamum indicum* L.) for yield component improvement. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 43(4): 1049–1055. <https://doi.org/10.14456/sjst-psu.2021.138>.
- Surson, S., S. Sitthaphanit and N. Wongma. 2015. *In vivo* induction of tetraploid in tangerine citrus plants (*Cirus reticulata* Blanco) with the use of colchicine. *Pak. J. Biol. Sci.* 18(1): 37–41. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2015.37.41>.
- Surson, S., S. Sitthaphanit and N. Wongma. 2018. An investigation on polyploidy induction and verification of Kram Ngo plant (*Indigofera suffruticosa*) for biomass production in Northeast Thailand. *Thai J. Agric. Sci.* 51(1): 32–42.

- Talei, D., M.K. Nekouei, M. Mardi and S. Kadkhodaei. 2020. Improving productivity of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* via induced polyploidy. J. Crop. Sci. Biotechnol. 23: 301–309. <https://doi.org/10.1007/s12892-020-00038-5>.
- Technology Transfer and Development Bureau. 2021. Cultivation of *Andrographis paniculata* Herb. Agricultural Land Reform Office, Bangkok, Thailand. 12 pp. (in Thai)
- Wang, Z., M. Wang, L. Liu and F. Meng. 2013. Physiological and proteomic responses of diploid and tetraploid black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) subjected to salt stress. Int. J. Mol. Sci. 14(10): 20299–20325. <https://doi.org/10.3390/ijms141020299>.
- Wongpiyasatid, A., P. Hormchan and N. Rattanadilok. 2003. Preliminary test of polyploidy induction in cotton (*Gossypium arboreum*) using colchicine treatment. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 37: 27–32.
- Xing, S.H., X.B. Guo, Q. Wang, Q.F. Pan, Y.S. Tian, P. Liu, J.Y. Zhao, G.F. Wang, X.F. Sun and K.X. Tang. 2011. Induction and flow cytometry identification of tetraploids from seed-derived explants through colchicine treatments in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. J. Biomed. Biotechnol. 2011: 793198. <https://doi.org/10.1155/2011/793198>.
- Xu, C., T. Tang, R. Chen, C. Liang, X. Liu, C. Wu, Y. Yang, D. Yang and H. Wu. 2014. A comparative study of bioactive secondary metabolite production in diploid and tetraploid *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 116: 323–332. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0406-z>.
- Yan, Y.J., S.S. Qin, N.Z. Zhou, Y. Xie and Y. He. 2022. Effects of colchicine on polyploidy induction of *Buddleja lindleyana* seeds. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 149: 735–745. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02245-0>.
- Zhang, F., H. Xue, X. Lu, B. Zhang, F. Wang, Y. Ma and Z. Zhang. 2015. Autotetraploidization enhances drought stress tolerance in two apple cultivars. Trees. 29: 1773–1780. <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1258-4>.
- Zhu, Y., W. Tang, X. Tang, L. Wang, W. Li, Q. Zhang, M. Li, C. Fang, Y. Liu and S. Wang. 2021. Transcriptome analysis of colchicine-induced tetraploid Kiwifruit leaves with increased biomass and cell size. Plant Biotechnol. Rep. 15: 673–682. <https://doi.org/10.1007/s11816-021-00704-2>.