

ผลของสารโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิต ลักษณะทางสรีรวิทยา และสัณฐานวิทยาของหน่อยาวพันธุ์ Micky Mouse

Effect of Colchicine on Survival Rate, Physiology and Morphology of *Anthurium andraeanum* cv. Micky Mouse

อัญญาณี จันทร์ภักดี^{1/} และ สมปอง เตชะโต^{1/}
Aunyanee Junpugdee^{1/} and Sompong Te-chato^{1/}

Abstract: In order to generate genetic viability in *Anthurium andraeanum* cv. Micky Mouse, nodular callus was used to treat with 0, 0.05, 0.1, 0.15 and 0.2% colchicine for 24, 46 and 72 h. Average survival rate of the calli after 21 days of culture was significantly decreased ($P<0.01$) when the concentration was increased to 0.1%. Treated nodular callus at 72 h gave the lowest average number of survival percentage at 45.95, significant difference ($P<0.01$) to the other two times. The average of stomatal size and chloroplast numbers in guard cells were increased when concentration of colchicine increased. Explants treated with 0.2% colchicine for 72 h gave the highest average stomatal size and chloroplast numbers at 1.92 μm in width and 1.91 μm in length, and 39.06 chloroplasts/stomata, respectively. Abnormality of stomata such as, stomatal shapes and chloroplast in guard cell were observed. Leaf sizes of plants obtained from all concentrations and durations of colchicine showed no significant difference. Chimera leaves were obtained which could be classified into three categories: sectorial, periclinal and combination of sectorial and periclinal.

Keywords: *Anthurium andraeanum* Micky Mouse, colchicine, stomata, chloroplast

^{1/}ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

^{1/}Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

บทคัดย่อ: การชักนำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในหน้าวัวพันธุ์ Micky Mouse โดยการใช้ nodular callus จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2% เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่า อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสหลังย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน ลดลงตามความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่สูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นโคลชิซิน 0.1% ให้อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) การจุ่มแช่โคลชิซินเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยต่ำสุด 45.95% แตกต่างทางสถิติ ($P < 0.01$) กับอีก 2 เวลาที่ทดสอบ ต้นหน้าวัวที่ชักนำได้จากแคลลัสที่ผ่านการจุ่มแช่โคลชิซินมาตรวจสอบขนาดและจำนวนเมดคอลลอโรพลาสต์ภายในปากใบพบว่า ค่าเฉลี่ยของขนาดปากใบและจำนวนเมดคอลลอโรพลาสต์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและระยะเวลาในการจุ่มแช่โคลชิซินที่สูงขึ้น โดยที่โคลชิซินเข้มข้น 0.2% จุ่มแช่นาน 72 ชั่วโมงมีขนาดและจำนวนเมดคอลลอโรพลาสต์เฉลี่ยสูงสุดคือกว้าง 1.92 ไมโครเมตร ยาว 1.91 ไมโครเมตร และ 39.06 เม็ดต่อปากใบ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง กับชุดควบคุม นอกจากนี้ยังพบความผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับปากใบ เช่น ปากใบมีรูปร่างผิดปกติ เมดคอลลอโรพลาสต์ภายในปากใบผิดปกติ และไม่เกิดการสร้างเมดคอลลอโรพลาสต์ขึ้นในปากใบ เป็นต้น และเมื่อทำการตรวจสอบขนาดใบพบว่าความยาวและความกว้างของใบเฉลี่ยจากโคลชิซินทุกความเข้มข้นและทุกระยะเวลาการจุ่มแช่ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และพบลักษณะการต่างของใบ 3 ลักษณะคือ ต่างบางส่วนของใบ ต่างบริเวณขอบใบ และ ต่างบางส่วนผสมกับต่างบริเวณขอบใบ

คำสำคัญ: หน้าวัว *Anthurium andraeanum* Micky Mouse โคลชิซิน ปากใบ คอลลอโรพลาสต์

คำนำ

การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับสารเคมีก่อกลายพันธุ์เป็นแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์พืชที่อาจช่วยร่นระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลงได้ สารเคมีก่อกลายพันธุ์มีหลายชนิด แต่ชนิดที่นิยมใช้เพื่อชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่ต้องการเพียง 1-2 ลักษณะ คือสารโคลชิซิน โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ microtubule ทำให้ไม่เกิดการสร้าง spindle fibers ในช่วงของการแบ่งเซลล์ (วัชรินทร์, 2544) ทำให้จำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า หรือมากกว่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ การตรวจสอบลักษณะการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา Gao *et al.* (1996) พบว่า *Salvia miltiorrhiza* ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็น tetraploid มีขนาดใหญ่ขึ้น Rose *et al.* (2000) พบว่า *Buddleia globosa* ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็น tetraploid มีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ขนาดดอกไม่เปลี่ยนแปลง Thao *et al.* (2003) และ นิตยศรี และอำไพ (2541) พบว่า

Alocasia micholitziana และ หม่อน ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็น tetraploid มีขนาดของปากใบและจำนวนเมดคอลลอโรพลาสต์ภายในปากใบมากกว่า diploid นอกจากนี้การตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมด้วยวิธีนับจำนวนโครโมโซมปลายรากเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถแสดงผลที่ชัดเจนของการกลายพันธุ์โดยใช้สารโคลชิซินได้แต่มักถูกใช้เป็นวิธีสุดท้ายในการตรวจสอบ เนื่องจากต้องใช้เวลาในการตรวจสอบ (สมโชค, 2545) หน้าวัวที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือหน้าวัวพันธุ์ Micky Mouse (*Anthurium andraeanum* cv. Micky Mouse) ซึ่งเป็นหน้าวัวพันธุ์ต่างประเทศ มีลักษณะจานรองดอกเป็นรูปหัวใจค่อนข้างกว้างปลายเป็นติ่งแหลมสีแดงสดแต่บริเวณฐานรองดอกเป็นสีเขียว จานรองดอกทั้งสองข้างไม่เท่ากันและกระดกขึ้นเล็กน้อย ฐานรองดอกอยู่ห่างกัน (วัชรพงศ์, 2548) จัดว่าเป็นหน้าวัวที่มีดอกสวยงามแต่มีขนาดจานรองดอกไม่ใหญ่นัก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้ชิ้นส่วน nodular callus จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินเพื่อชักนำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในหน้าวัวชนิดนี้

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุพืช

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ nodular callus อายุ 15-20 วัน หลังย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงของ มูราชิกและสคูค (Murashige and Skoog, 1962) เติม adenine sulphate 0.1 มก./ล. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA (benzyladenine) ร่วมกับ TDZ (thidiazuron) ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. และ 0.75 มก./ล. ตามลำดับ ให้แสง 1,500 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °ซ.

สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง

อาหารสูตร MS พื้นฐาน และ MMS โดยดัดแปลงจากสูตร MS พื้นฐาน คือมีการลดองค์ประกอบของธาตุอาหารหลักบางตัวลงครึ่งหนึ่งจากสูตรเดิมเหลือความเข้มข้น ดังนี้คือ NH_4NO_3 825 มก./ล. KNO_3 950 มก./ล. KH_2PO_4 85 มก./ล. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 13.9 มก./ล. และ Na_2EDTA 18.6 มก./ล. pH 5.7 น้ำตาลซูโครส 3% เติรียมอาหารแล้วนำมาหนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 1.05 กก/ตร.ซม นาน 15 นาที

สิ่งก่อกลายพันธุ์

สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2% ในอาหารเหลวสูตร MMS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 0.75 มก./ล.

วิธีการ

การศึกษาความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลา
จุ่มแช่ต่ออัตราการรอดชีวิตของแคลลัส

จุ่มแช่ nodular callus ในระยะ log phase อายุ 15-20 วันหลังย้ายเลี้ยง ในอาหารเหลวสูตร MMS ที่เติมโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2% วางบนเครื่องเขี่ยนาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการกรองแยกแคลลัส ออกจากสารละลายโคลชิซิน ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อจนสารละลายโคลชิซินหมด ขับด้วยกระดาษกรองหนึ่งฆ่าเชื้อจนแห้ง จึงนำแคลลัส

ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่ทำให้แข็งด้วยวุ้น 0.75% บันทึกอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 21 วัน แต่ละความเข้มข้นของโคลชิซินมีจำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 6 แคลลัส วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test)

การตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ได้จากการจุ่มแช่โคลชิซิน 5 ความเข้มข้น 3 ระยะเวลา เป็นเวลา 21 วัน ทำการย้ายเลี้ยงลงอาหารใหม่สูตรเดิมแต่ลดความเข้มข้นของ TDZ ลงเป็น 0.05 มก./ล. เพื่อชักนำการสร้างยอดของแคลลัส และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน (เปลี่ยนอาหารทุกเดือน) ทำการตัดแยกยอดออกจากแคลลัส และเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2-3 เดือน ทำการวัดขนาดใบ ขนาดเซลล์ปากใบ และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์ปากใบจากใบที่ 3 นับจากยอดแต่ละความเข้มข้น และระยะเวลาการให้สารโคลชิซิน ทำการสุ่มวัดขนาดใบจากยอดที่ได้จากผลของโคลชิซินจำนวน 5 ยอดต่อแคลลัส แต่ละใบสุ่มตรวจสอบขนาดเซลล์ปากใบ และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ จำนวน 6 ตำแหน่ง วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ผลการศึกษา

ความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลาจุ่มแช่ต่อ
การรอดชีวิตของแคลลัส

การจุ่มแช่ nodular callus ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0-0.2% เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยของแคลลัสมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการแช่ที่นานขึ้น (ตารางที่ 1) การจุ่มแช่โคลชิซินเป็นเวลา 72 ชั่วโมงให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเฉลี่ยต่ำสุด 45.95% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) กับระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยของแคลลัสในแต่ละ

Table 1 Survival percentage of callus of *Anthurium andraeanum* cv. Micky Mouse, 21 days after treating with difference concentration and duration of colchicine.

Colchicine (%)	Survival (%)			Average
	24 h	48 h	72 h	
0	71.75abcd	71.75abcd	71.75 abcd	71.75AB
0.05	67.75abcd	92.25 ab	8.25 f	56.08BC
0.1	76.75abcd	16.75 cef	50.00 cde	47.83C
0.15	85.75abc	51.75 bcde	41.75 def	59.75ABC
0.2	80.00abcd	100.00a	58.00bcd	79.33A
Average	76.4A	66.5A	45.95B	
F-test	**			
C.V.(%)	27.72			

** significant difference at $P \leq 0.01$.

Ns non significantly difference.

Means within treatment combination not sharing small letter in common are significantly difference by DMRT.

Mean within treatment not sharing capital letter in common are significantly difference by DMRT.

ความเข้มข้นของโคลชิซิน พบว่า ความเข้มข้นของสารที่สูงขึ้นส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลงในช่วง 0.05-0.1% แต่หลังจากนั้นเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเพิ่มขึ้นอีก และที่ความเข้มข้น 0.2% ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเฉลี่ยสูงกว่าชุดควบคุม อย่างไรก็ตามการแช่สารโคลชิซินเข้มข้น 0.2% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อัตราการรอดชีวิตใกล้เคียง 50% คาดว่าเป็นความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมในหน้าวัวพันธุ์ Micky Mouse

การตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา

ลักษณะทางสรีรวิทยา จากการตรวจสอบจำนวนเม็ตคลอโรพลาสต์ภายในปากใบ พบว่า ค่าเฉลี่ยของจำนวนเม็ตคลอโรพลาสต์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่ที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 2, ภาพที่ 1) โดยในแต่ละระยะเวลาการจุ่มแช่ที่โคลชิซินความเข้มข้น 0.2% สามารถชักนำให้หน้าวัวพันธุ์ดังกล่าวมีจำนวนเม็ตคลอโรพลาสต์เฉลี่ย 37.65, 36.93 และ 39.06

เม็ตคลอโรพลาสต์ ในระยะเวลาการแช่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ สูงกว่าชุดควบคุมซึ่งมีจำนวน 28.98 เม็ตคลอโรพลาสต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) โดยเฉพาะโคลชิซินเข้มข้น 0.2% ระยะเวลาแช่ 72 ชั่วโมงส่งเสริมให้จำนวนเม็ตคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่า แสดงให้เห็นว่ามีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า

และเมื่อพิจารณาขนาดเฉลี่ยของเซลล์ปากใบ พบว่า มีขนาดเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น และระยะเวลาในการแช่ที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 2) โดยระยะเวลาการแช่ 48 และ 72 ชั่วโมง ให้ขนาดปากใบใกล้เคียงกันซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากผลที่ได้เมื่อแช่ 24 ชั่วโมงและชุดควบคุมที่ไม่มีการแช่โคลชิซิน ส่วนความเข้มข้นของโคลชิซินนั้น พบว่า ความเข้มข้น 0.1, 0.15 และ 0.2% ส่งผลให้ขนาดปากใบเพิ่มขึ้นแตกต่างทางสถิติกับความเข้มข้น 0.05% และชุดควบคุมที่ไม่ให้โคลชิซิน

Table 2 Effects of different concentrations and duration of colchicine treatments on chloroplast number, stomata size and leaf size of *Anthurium andraeanum* cv. Micky Mouse.

Time (h)	Colchicine concentration (%)	Chloroplast number	Stomata size (μ m)		Leaf size (cm)	
			Width	Length	Width	Length
24	0	28.98 ^b (21.67-37.17) ^A	1.62 ^b (1.4-1.82) ^B	1.58 ^b (1.4-1.95) ^B		
	0.05	28.91 ^b (22.33-47.33)	1.67 ^b (1.17-2.33)	1.62 ^b (1.43-2.10)		
	0.1	35.11 ^{ab} (24-54.17)	1.84 ^a (1.43-2.52)	1.73 ^{ab} (1.4-2.26)		
	0.15	35.39 ^{ab} (23.67-53.83)	1.82 ^a (1.44-2.39)	1.76 ^{ab} (1.46-2.18)	0.53	0.67
48	0.2	37.65 ^a (24.5-52.83)	1.93 ^a (1.48-2.67)	1.86 ^a (1.47-2.32)	0.51	0.63
	0.05	32.59 ^{ab} (20.67-52.17)	1.85 ^a (1.53-2.62)	1.87 ^a (1.43-2.21)	0.53	0.64
	0.1	-	-	-	0.49	0.56
	0.15	35.33 ^{ab} (25.67-45.83)	1.89 ^a (1.52-2.12)	1.81 ^a (1.43-2.10)	0.57	0.65
72	0.2	36.93 ^{ab} (24.67-52)	1.85 ^a (1.43-2.43)	1.84 ^a (1.48-2.2)	0.5	0.58
	0.05	-	-	-	-	-
	0.1	-	-	-	0.61	0.65
	0.15	-	-	-	0.49	0.56
	0.2	39.06 ^a (26.5-54)	1.92 ^a (1.45-2.2)	1.91 ^a (1.53-2.15)	-	-
					-	-
					-	-
					0.48	0.53
F-test		**	*	*	ns	ns
C.V.(%)		9.86	4.96	6.02	14.41	15.64

- all explants died.

* significant difference at $P \leq 0.05$.

** significant difference at $P \leq 0.01$.

ns non significant difference.

A maximum and minimum numbers of chloroplasts in individual concentration and duration of colchicine.

B maximum and minimum sizes of stomata in individual concentration and duration of colchicine.

Means within column not sharing letter in common are significantly difference by DMRT.

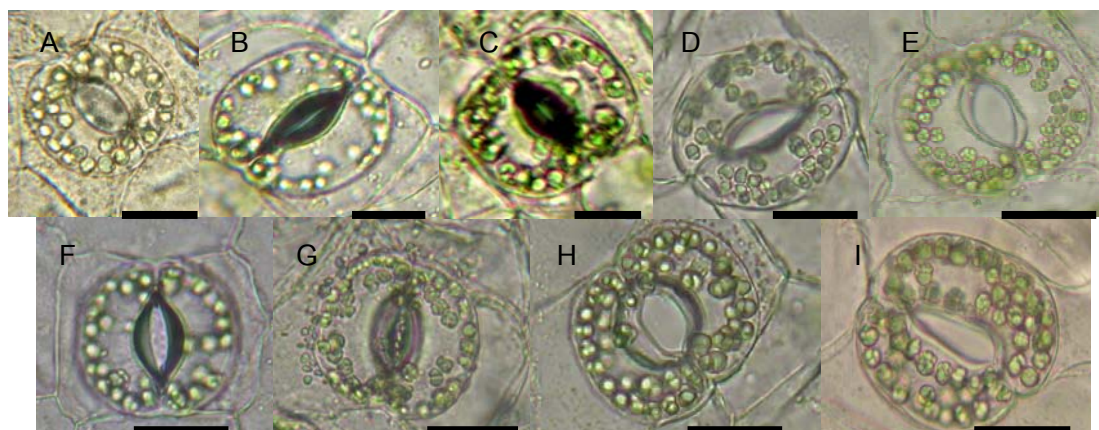


Figure 1 Chloroplast number and stomatal size of *Anthurium andraeanum* cv. Micky Mouse from different concentrations and durations of colchicine. (bar =10 μ m)

- (A) 0% colchicine (control) (B) 0.05% colchicine for 24 h (C) 0.1% colchicine for 24 h
(D) 0.15% colchicine for 24 h (E) 0.2 % colchicine for 24 h (F) 0.05% colchicine for 48 h
(G) 0.15% colchicine for 48 h (H) 0.2% colchicine for 48 h (I) 0.2% colchicine for 72 h

นอกจากนี้ยังพบลักษณะความผิดปกติที่เซลล์ปากใบ คือ

1. รูปร่างปากใบผิดปกติมีเซลล์คุมไม่เต็มเซลล์ พบที่สารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.05 และ 0.2% จุ่มแช่นาน 24 ชั่วโมง และ โคลชิซิน 0.2% จุ่มแช่นาน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2A)

2. รูปร่างปากใบผิดปกติ มีเซลล์คุมรูปร่างเบี้ยว พบที่โคลชิซินเข้มข้น 0.05 และ 0.2% จุ่มแช่นาน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2B)

3. ปากใบไม่เปิด พบที่โคลชิซินเข้มข้น 0.05 และ 0.2% จุ่มแช่นาน 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 2C)

4. ปากใบมีรูปร่างของรูปปากใบผิดปกติ พบที่โคลชิซินความเข้มข้น 0.05 และ 0.2% จุ่มแช่นาน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2D)

5. ปากใบไม่เปิดและไม่เกิดการสร้างเมดคลอโรพลาสต์ พบที่โคลชิซินเข้มข้น 0.2% จุ่มแช่นาน 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 2E)

6. ปากใบมีรูปร่างของปากใบผิดปกติและไม่เกิดการสร้างเมดคลอโรพลาสต์ พบที่โคลชิซินเข้มข้น 0.2% จุ่มแช่นาน 24 และ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2F)

7. ขนาดของเซลล์คุมไม่เท่ากัน พบที่โคลชิซินเข้มข้น 0.15% จุ่มแช่นาน 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 2G)

8. เซลล์คุมเพียงซีกด้านเดียวที่มีคลอโรพลาสต์ พบที่โคลชิซินเข้มข้น 0.05% จุ่มแช่นาน 24 และ 48 ชั่วโมง และที่โคลชิซินเข้มข้น 0.2% จุ่มแช่นาน 24 และ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2H)

9. ลักษณะเมดคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์คุมมีขนาดเล็กและมีจำนวนมาก ซึ่งพบที่โคลชิซินทุกความเข้มข้น (ภาพที่ 2I) และในบางเซลล์ ขนาดเมดคลอโรพลาสต์ทั้งสองด้านไม่เท่ากัน (ภาพที่ 2J)

10. เซลล์คุมด้านใดด้านหนึ่งไม่มีเมดคลอโรพลาสต์ พบที่โคลชิซินเข้มข้น 0.2% จุ่มแช่นาน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2K)

11. ปากใบมีลักษณะติดกันหลายเซลล์ พบที่โคลชิซินเข้มข้น 0.05 และ 0.2% จุ่มแช่นาน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2L)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เมื่อทำการตรวจสอบขนาดใบเฉลี่ยทั้งด้านความกว้างและความยาวใบพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

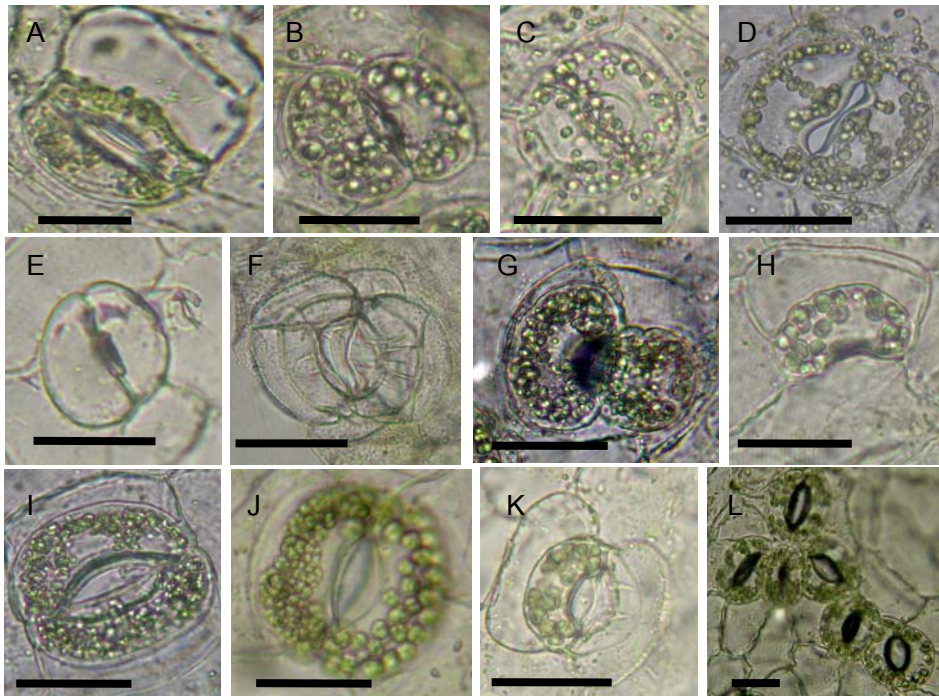


Figure 2 Abnormal stomata of *Anthurium andraeanum* cv. Micky Mouse obtained from colchicine treatment (bar =10 μ m), (A-B) shape of abnormal stomata, (C-D) stomata pore not open and abnormal shape, (E) closed stomata without chloroplast, (F) opened stomata without chloroplast, (G) unequal sizes of guard cell, (H) stomata with half guard cell, (I-J) small size of chloroplast in guard cell, (K) stomata with chloroplast in one guard cell, (L) Aggregated stomata

(ตารางที่ 2) โดยมีขนาดความกว้างใบ 0.48-0.61 เซนติเมตร และมีขนาดความยาวใบ 0.53-0.67 เซนติเมตร นอกจากนี้ยังพบลักษณะใบต่างเมื่อใช้โคลชิซินเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.15% จุ่มแช่นาน 24 ชั่วโมง และโคลชิซินเข้มข้น 0.2% จุ่มแช่นาน 48 ชั่วโมง จำนวน 1.69, 5, 3.33 และ 1.69% ตามลำดับ ลักษณะใบต่างที่พบมี 3 ลักษณะคือ อาการต่างชนิดบางส่วนของใบ (sectorial) (ภาพที่ 3A และ B), อาการใบต่างบริเวณขอบใบ (periclinal) (ภาพที่ 3C) และอาการต่างชนิดบางส่วนของใบผสมกับต่างบริเวณขอบ (combination of sectorial and periclinal) (ภาพที่ 3D)

วิจารณ์

ความเข้มข้นของโคลชิซินและระยะเวลาแช่ ต่อการรอดชีวิตของแคลลัส

โดยทั่วไปการให้สารเคมีก่อการพันธุ์หรือเพิ่มชุดโครโมโซมในหลอดทดลองนั้น ความเข้มข้นสูงขึ้น หรือที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันแต่เวลาได้รับสารเคมีนานขึ้น ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตลดลง (Wu and Mooney, 2002; วิชชุตา, 2537) จากการทดลองจุ่มแช่ nodular callus ในโคลชิซินความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ ใน การศึกษานี้ พบว่า อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของแคลลัส

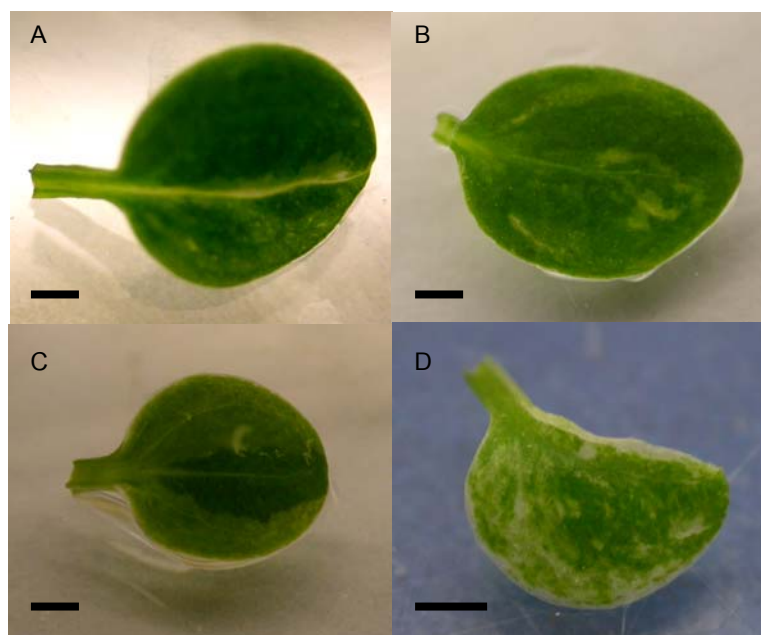


Figure 3 Different chimera in leaves of *Anthurium andraeanum* cv. Micky Mouse obtained from colchicine treatment (bar = 0.1 cm), (A-B) sectorial chimera, (C) Periclinal chimera, (D) combination of sectorial and periclinal

มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการแช่ที่นานขึ้น แต่เมื่อพิจารณาอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของแคลลัสในแต่ละความเข้มข้นของโคลชิซิน พบว่า ความเข้มข้นของโคลชิซินที่สูงขึ้นระดับหนึ่ง (0.05-0.1) ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงขึ้นมีผลให้อัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะความเข้มข้น 0.2% ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเฉลี่ยสูงกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย อาจเป็นไปได้ว่าชิ้นส่วนที่ได้รับสารมีการปรับตัวให้ทนทานต่อโคลชิซินความเข้มข้นสูงได้ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pinheiro *et al.* (2000) ซึ่งทดลองในพืชตระกูลหญ้า *Bracharia brizantha* พบว่าโคลชิซินความเข้มข้น 0.1% ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตสูงกว่าที่ได้จากโคลชิซินความเข้มข้น 0.05% ในระยะเวลาการจุ่มแช่เดียวกัน และการทดลองของ Thao *et al.* (2003) พบว่า ใน *Alocasia* ที่ได้รับการจุ่มแช่โคลชิซินนานเท่ากันทั้งที่ระยะเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง นั้นโคลชิซิน

ความเข้มข้น 0.05% ให้อัตราการรอดชีวิตสูงกว่าโคลชิซินความเข้มข้น 0.01% ซึ่ง Thao *et al.* (2003) รายงานว่าความแปรปรวนของอัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชอาจเกิดจากจำนวนซ้ำในการทดลองมีน้อยเกินไปควรเพิ่มจำนวนซ้ำของการทดลองให้มากขึ้น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของโคลชิซิน 0.05-0.1% มีอัตราการปนเปื้อนสูงมากโดยเฉพาะการแช่สารเป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้ข้อมูลส่วนหนึ่งหายไป เมื่อจำนวนซ้ำลดลงและมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้ค่าที่ได้ต่ำกว่าที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น นอกจากนี้อาจเป็นเพราะความไม่สม่ำเสมอของชิ้นส่วนพืชที่ใช้ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ nodular callus ซึ่งอาจมีองค์ประกอบของเซลล์ที่มีระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนไม่ลดลงแม้ว่าได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาการจุ่มแช่ที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารชักนำยอดและเพิ่มความ

แข็งแรงของยอด พบว่าการรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชลดลง ซึ่งเมื่อทำการเพาะเลี้ยงจนแคลลัสอายุ 4 เดือนหลังจุ่มแช่ พบว่า การรอดชีวิตของแคลลัสที่โคลชิซินเข้มข้น 0.1% จุ่มแช่นาน 48 ชั่วโมง และ โคลชิซินเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.15% จุ่มแช่นาน 72 ชั่วโมงไม่รอดชีวิต การรอดชีวิตที่ลดลงบางส่วนเป็นเพราะพิษของสารโคลชิซินที่มีต่อเซลล์ของชิ้นส่วนพืช โดย สารโคลชิซินมีความสามารถในการแทรกซึมเข้าไปยังส่วนต่าง ๆ ภายในเซลล์ (Dermen, 1940 อ้างโดย วิชชุตา, 2537) และมีผลทำให้ความหนืด (viscosity) ของไซโตพลาสซึมเปลี่ยนแปลงไปทำให้การทำงานของเซลล์ผิดปกติ (Cook and Loudon, 1952 อ้างโดย วิชชุตา, 2537) และอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงบางส่วนเป็นผลมาจากการปนเปื้อนของชิ้นส่วนพืชจากเชื้อรา และแบคทีเรีย

ลักษณะทางสรีรวิทยา และ สัณฐานวิทยา

จากการศึกษานี้ พบว่า โดยภาพรวมค่าเฉลี่ยของจำนวนเมล็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบ และขนาดเซลล์ปากใบเฉลี่ย มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและระยะเวลาการจุ่มแช่ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งจำนวนเมล็ดคลอโรพลาสต์เฉลี่ยในเซลล์ปากใบและขนาดเซลล์ปากใบนั้นสามารถเป็นตัวบ่งชี้การเพิ่มขึ้นของจำนวนโครโมโซมได้ โดยเฉพาะจำนวนเมล็ดคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์ปากใบ (Sari et al., 1999) งานวิจัยของนักวิจัยหลายท่านพบว่าจำนวนคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์ปากใบเป็นตัวบ่งชี้ การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้ในพืชหลายชนิด เช่นในการทดลองของ นิตยศรี และอำไพ (2541) ซึ่งชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมในหม่อนพบว่าหม่อนที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นนั้นมีจำนวนคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้นและมีขนาดเซลล์ปากใบเพิ่มขึ้นด้วย เช่นเดียวกับการทดลองของ Sari et al. (1999) ซึ่งพบว่า แตงโม (*Citrullus lanatus*) ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็น ดิพลอยด์มีจำนวนเมล็ดคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์ปากใบและขนาดเซลล์ปากใบมากกว่าพืชแฮพลอยด์ Gu et al. (2005) พบว่า พุทราจีน (*Zizyphus jujuba* cv. Zhanhua) ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็น เตตระพลอยด์ นั้นมีจำนวนเมล็ดคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์ปากใบและขนาดเซลล์ปากใบมากกว่าพืชดิพลอยด์ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วหากจำนวน

คลอโรพลาสต์ภายในเซลล์ปากใบเพิ่มเป็นสองเท่าของชุดควบคุมก็อนุมานได้ว่าการเพิ่มชุดของโครโมโซมได้เป็นสองเท่า ซึ่งการใช้วิธีการนี้เป็นตัวบ่งชี้การเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดโครโมโซมเป็นวิธีการที่ง่าย มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และใช้ระยะเวลาสั้น แม้ว่า วิชชุตา (2537) พบว่า การใช้สารละลายโคลชิซินเป็นสิ่งที่ก่อกลายพันธุ์ในหน่ววัพันธุ์ Double spathe นั้นไม่สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้ แต่โคลชิซินส่งผลให้ความยาวเซลล์ปากใบมีแนวโน้มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่สูงขึ้นและความผิดปกติที่เกิดกับเซลล์ปากใบในการศึกษาครั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมอย่างไร ก็ตามก็เป็นเพียงส่วนน้อยที่ให้ผลในทางลบจากการศึกษาโครโมโซมปลายรากของต้นที่มีจำนวนคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้น (ไม่ดีพิมพ์) พบว่ามีจำนวนเพิ่มเป็น 4 ชุด และเพื่อเพิ่มความมั่นใจในการศึกษาต่อไปจะได้ศึกษาจำนวนโครโมโซมในต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเพิ่มเติมต่อไป

นอกจากจำนวนคลอโรพลาสต์และขนาดเซลล์ปากใบแล้ว ขนาดใบยังเป็นตัวบ่งชี้การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้เช่นเดียวกับรายงานของ Sari et al. (1999) และ Gu et al. (2005) ซึ่งทำการศึกษาใน *Citrullus lanatus* และ *Zizyphus jujuba* cv. Zhanhua พบว่า พืชที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ มีขนาดใบเล็กกว่าพืชที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นเตตระพลอยด์ และในการทดลองของ Thao et al. (2003) ซึ่งทำการศึกษาใน *Alocasia* พบว่า ต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ มีขนาดความกว้างใบน้อยกว่าต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นเตตระพลอยด์ แต่มีขนาดความยาวใบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในการศึกษาครั้งนี้ ความกว้างและความยาวของใบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับการทดลองของ Zhang et al. (2008) ซึ่งพบว่าขนาดใบของ *Phlox subulata* ที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากขนาดใบแล้วยังพบลักษณะความผิดปกติของใบแบบอื่น ๆ คือใบด่างซึ่งพบ 3 ลักษณะด้วยกันคือ อาการต่างชนิดบางส่วนของใบ (sectorial), อาการใบด่างบริเวณขอบใบ (periclinal) และ อาการต่าง

ชนิดบางส่วนของใบผสมกับต่างบริเวณขอบ (combination of sectorial and periclinal) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ วิชชุตา (2537) และ ปิยะดา และ อรดี (2532) อ้างโดย วชิรินทร์ (2544) ซึ่งพบลักษณะใบต่างในหน้าวัวสายพันธุ์ Double spathe และต้นซึ่งที่ได้รับสารโคลชิซินเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ แต่ลักษณะใบต่างที่พบมีลักษณะต่างเป็นริ้ว

สรุป

การแช่ nodular callus หน้าวัวสายพันธุ์ Micky Mouse ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ พบว่า อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลงตามความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่สูงขึ้น โดยที่โคลชิซินเข้มข้น 0.2% แชนาน 72 ชั่วโมง แคลลัสมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเกือบ 50% เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา พบว่า จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์และขนาดของเซลล์ปากใบ เพิ่มขึ้นเป็น 39.06 เม็ดต่อปากใบ มีความกว้างและความยาวปากใบ 1.93 และ 1.91 ไมโครเมตร ตามลำดับ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม อาจส่งผลให้ได้พืชที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น 2 ชุด หรือเตตระพลอยด์ นอกจากนี้ยังพบลักษณะผิดปกติที่เซลล์ปากใบและที่ใบ โดยความผิดปกติที่พบที่เซลล์ปากใบหลายรูปแบบคือ รูปร่างผิดปกติ ลักษณะเม็ดคลอโรพลาสต์ผิดปกติ ไม่มีการสร้างเม็ดคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์ปากใบ ปากใบปิดตลอดเวลา เซลล์ปากใบมีการสร้างเซลล์คุมเพียงข้างเดียว และเซลล์ปากใบมีลักษณะเซลล์ติดกันจำนวนมาก ลักษณะความผิดปกติที่พบที่ใบคือ ใบมีลักษณะต่างโดยแบ่งลักษณะต่างได้ 3 ลักษณะคือ ต่างบางส่วนของใบต่างบริเวณขอบใบ และต่างบางส่วนผสมกับต่างบริเวณขอบใบ

เอกสารอ้างอิง

- นิตยศรี แสงเดือน และ อำไพ สันพัฒนานนท์. 2541. การชักนำให้เกิดหม่อนเทพราพลอยด์โดยใช้โคลชิซินร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยาศาสตร์เกษตร (วิทย์.) 32: 424-430.
- วชิรพงศ์ หวลบุตรตา. 2548. คู่มือคนรักต้นไม้: หน้าวัว. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ. 94 หน้า.
- วชิรินทร์ รัตนพันธ์. 2544. การเพิ่มจำนวนโครโมโซมของขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยด้วยโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 62 หน้า.
- วิชชุตา รุ่งเรือง. 2537. ผลของโคลชิซินและรังสีแกมมาที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์ Double Spathe ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 76 หน้า.
- สมโชค รักสารรัก. 2545. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และการขยายพันธุ์อัญชันในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 122 หน้า.
- Gao, S.L., D.N. Zhu, Z.H. Cai and D.R. Xu. 1996. Autotetraploid plants from colchicines-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47: 73-77.
- Gu, X.F., A.F. Yang, H. Meng, and J.R. Zhang. 2005. In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua. Plant Cell Rep. 24: 671-676.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.

- Pinheiro, A.A., M.T. Pozzobon, C.B. do Valle, M.I.O. Penteado, and V.T.C. Carneiro. 2000. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. *Plant Cell Rep.* 19: 274-278.
- Rose, J.B., J. Kubba and K.R. Tobutt, 2000. Induction of tetraploidy in *Buddleia globosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 121-125.
- Sari, N., K. Abak and M. Pitrat. 1999. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum and Nakai. *Scientia Horticulturae* 82: 265-277.
- Thao, N.T.P., K. Ureshino, I. Miyajima, Y. Ozaki, and H. Okubo. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 19-25.
- Wu, J.H. and P. Mooney. 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro* *Citrus* somatic embryogenic callus treated with colchicine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 99-104.
- Zhang, Z.H., H.Y. Dai, M. Xiao, and X. Liu. 2008. *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. *Euphytica* 159: 59-65.
-