

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของลินเดอเนียที่ระดับพลอยดีต่างกัน Morphological Changing of *Lindernia* sp. in Ploidy levels Variation

ธัญญา เตชะศีลพิทักษ์, กมลทิพย์ สังข์แก้ว และนุชรรัฐ บาลลา

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

ณัฐพงศ์ จันจุฬา*

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

อนันต์ ปิริยะภักติกิจ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เทคโนธานี

ตำบลคลองห้า อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 10220

Thunya Taychasinpitak, Kamontip Sungkaew and Nutcharat Balla

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhen Campus,

Ladyao, Chatuchak, Bangkok, 10900

Nattapong Chanchula*

Faculty of Agriculture, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage,

Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

Anan Piriya-phattarakit

Thailand institute of Science and Technological Research, Technopolis,

Khlong Ha, Khlong Luang, Pathum Thani 10220

บทคัดย่อ

ลินเดอเนียเป็นไม้ดอกที่มีความสวยงามอีกชนิดหนึ่งที่ต่างประเทศให้ความสนใจในการนำมาประดับตกแต่งเป็นไม้กระถาง โดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่น แต่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของลินเดอเนียและลักษณะที่เป็นที่ต้องการของตลาดยังมีอยู่น้อย จำเป็นต้องมีข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดนี้หรือวงศ์ที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ได้นำต้นพันธุ์ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ย้ายกล่าออกปลูกเพื่อศึกษาระดับพลอยดีต่าง ๆ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นลินเดอเนีย พบว่าต้นที่ระดับพลอยดีสูงขึ้นไปมีการเจริญเติบโตที่ช้าลง มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น ใบและดอกของลินเดอเนียมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่มีลักษณะของข้อปล้องที่สั้นลง ละอองเรณูที่ระดับพลอยดี 2x, 4x และ 8x มี

ขนาดเฉลี่ยเพิ่มขึ้น (20.86 ± 0.97 , 26.44 ± 0.85 และ 30.88 ± 1.09 ไมโครเมตร ตามลำดับ) และขนาดของเซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้นตามระดับพลอยดีที่เพิ่มขึ้น (21.55 ± 1.35 , 30.58 ± 1.10 และ 41.97 ± 1.22 ไมโครเมตร ตามลำดับ) แต่จำนวนเซลล์ปากใบต่อพื้นที่ลดลงเมื่อระดับพลอยดีสูงขึ้น (16.40 ± 2.22 , 9.80 ± 1.32 และ 5.40 ± 0.52 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ)

คำสำคัญ : ลินเดอเนีย; โคลชิซินซินติเมด; โพลีพลอยด์

Abstract

Lindernia sp., an ornamental plant, is popular in many countries particularly in Japan. However, the genetic variations and phenotypic patterns of *Lindernia* sp. were inadequate with the economic demands. Therefore, the induction of *Lindernia* sp. variations is important for further study and supply to flower trade. In this study, the treated *Lindernia* sp. plants with various concentrations of colchicine were transplanted to the field and, consequently, the ploidy level, plant anatomy, and plant morphology were investigated. The slow growth rates, and increases of leaf and flower sizes of the plants with higher ploidy levels were observed. The node lengths of diploid (2x), tetraploid (4x), and octaploid (8x) plants were 20.86 ± 0.97 , 26.44 ± 0.85 , 30.88 ± 1.09 μm , respectively. The guard cell sizes of *Lindernia* sp. increased as observed in 2x (21.55 ± 1.35), 4x (30.58 ± 1.10), and 8x (41.97 ± 1.22) μm , respectively. While the stomata density decreased when the ploidy level increased (16.40 ± 2.22 , 9.80 ± 1.32 , 5.40 ± 0.52 cells/mm², respectively).

Keywords: *Lindernia*; colchicine tablet; polyploid

1. คำนำ

ลินเดอเนียเป็นพืชล้มลุกที่มีความสูงประมาณ 5-20 เซนติเมตร ลำต้นมีลักษณะเป็นเหลี่ยม ทอดเลื้อยแผ่ไปตามพื้นดิน ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามกัน ขอบใบมีทั้งขอบใบหยักฟันเลื่อยและขอบใบเรียบ ดอกมีขนาดเล็ก กลีบดอกเป็นรูปปากเปิดหลากสี เช่น สีขาว สีม่วง ส่วนฐานของดอกเชื่อมต่อกันเป็นหลอดยาว (Smitinand, 1990) สามารถเจริญเติบโตได้ทุกพื้นที่โดยเฉพาะดินทราย นาข้าว แปลงพืชไร่ สวนผลไม้ สวนยางพารา สวนมะพร้าว และสวนปาล์มน้ำมัน ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด ออกดอกตลอดปี จึงเหมาะสมที่นำมาใช้เป็นไม้กระถาง และพืชคลุมดิน เพราะทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี และมีการวิจัยเชิงระบบนิเวศ พบว่า

เป็นพืชที่ทนเค็มและทนแล้งได้ดี อีกทั้งสามารถออกดอกได้ยาวนาน โดยการออกดอกที่ดีที่สุดจะอยู่ในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนมีนาคม (Shinha, 1987) ลักษณะของดอกคล้ายกับแวนมยุรา ซึ่งจัดเป็นไม้ดอกที่นิยมนำมาใช้ประดับ แต่ลินเดอเนียยังไม่เป็นที่รู้จักแพร่หลาย ดอกมีขนาดเล็ก อีกทั้งความหลากหลายทางพันธุกรรมในธรรมชาติยังไม่เพียงพอต่อการคัดเลือกพันธุ์เพื่อนำมาใช้เป็นไม้กระถางหรือไม้คลุมดิน เนื่องจากดอกมีขนาดเล็ก สีสันไม่หลากหลาย และติดเมล็ดจำนวนมาก ส่งผลให้ต้นเสื่อมสภาพเร็วยิ่งขึ้น และเกิดการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วจึงทำให้กลายเป็นวัชพืช ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์โดยการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซม จึงเป็นวิธีหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์ลิน

เดอเนีย เพื่อให้มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น เนื่องจากการชักนำให้เพิ่มจำนวนโครโมโซม มักได้ต้นที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เช่น ส่วนประกอบต่าง ๆ มีขนาดใหญ่ขึ้น ดอกและใบมีสีเขียวเข้มขึ้น ลำต้นเตี้ย ข้อและปล้องสั้น (เบญจมาศ, 2545)

สารเคมีที่นิยมใช้เพิ่มจำนวนโครโมโซม คือ สารโคลชิซิน เนื่องจากเป็นสารประกอบที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ โดยโคลชิซินจะเป็นตัวไปอุดตามปลายท่อต่าง ๆ ของ microtubule ภายในเซลล์ ทำให้ microtubule ไม่สามารถต่อกันเป็น spindle fiber ที่ทำหน้าที่ในการช่วยดึงโครโมโซมระยะเมทาเฟสได้ (อมรา, 2546) ส่งผลให้โครโมโซมไม่แยกออกจากกัน จึงทำให้นิวเคลียสมีโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า จากสมบัตินี้โคลชิซินจึงถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างกว้างขวาง และสารโคลชิซินที่นิยมใช้เป็นสารโคลชิซินบริสุทธิ์ อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้ได้ เนื่องจากถ้าเข้าตาจะทำให้เกิดการระคายเคืองและอักเสบอย่างรุนแรง เมื่อสัมผัสกับผิวหนังจะเกิดการระคายเคืองและเกิดการดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย อีกทั้งยังเป็นพืชต่อระบบทางเดินอาหารและระบบการหายใจ (กรมควบคุมมลพิษ, ม.ป.ป.; Addink, 2007) ดังนั้น สารโคลชิซินบริสุทธิ์จึงเป็นอันตรายต่อผู้ใช้อย่างมาก ยาเม็ดรักษาโรคเกาต์ที่เป็นยาที่มีสารโคลชิซินเป็นองค์ประกอบและมีนักวิจัยได้นำมาใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของพืชบางชนิดได้ผลเป็นอย่างดี เช่น ชักนำให้เกิดโพลีพลอยดีในววมยุราพันธุ์ต่าง ๆ (สันจิตา, 2552; จิราภรณ์, 2554; สิริ, 2556) ซึ่งยาเม็ดรักษาโรคเกาต์ที่มีสารโคลชิซินเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยค่อนข้างปลอดภัยกับผู้ใช่มากกว่าการใช้สารโคลชิซินบริสุทธิ์ จึงทำให้เกิดแนวคิดในการปรับปรุงพันธุ์ลินเดอเนีย โดยใช้ยาเม็ดรักษาโรคเกาต์ที่มีชื่อทางการค้าว่าโคลชิซินร่วมกับการนำเอาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขั้นตอนการปฏิบัติ โดย

ศึกษาความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้แซในสารละลายโคลชิซินที่เหมาะสม เพื่อชักนำให้เกิดต้นโพลีพลอยดีในลินเดอเนีย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการสร้างความผันแปร ทั้งลักษณะต้นและสีดอก เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของลินเดอเนีย อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมที่มีศักยภาพในการพัฒนาพันธุ์พืชในสกุลนี้ต่อไปได้ แต่ในการวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาของต้นลินเดอเนียที่ย้ายออกปลูกจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของต้นลินเดอเนียสายพันธุ์อื่นหรือพืชในวงศ์นี้ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พืชทดลอง

ต้นลินเดอเนียอายุ 30 วัน หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซินชนิดเม็ดด้วยชิ้นส่วนข้อ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน คัดเลือกต้นที่สันนิษฐานว่าจะเป็นโพลีพลอยด์ โดยพืชจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ ใบมีสีเขียวเข้มขึ้น ขนาดใหญ่และหนาขึ้น ขอบใบหยักชัดเจน ลำต้นหนา ปล้องสั้นลง และรากหนาขึ้น ย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร $\frac{1}{2}$ MS เป็นระยะเวลา 30 วัน จึงนำออกปลูก

2.2 การย้ายกล้าออกปลูก

นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องควบคุมออกมาปรับสภาพที่อุณหภูมิห้อง โดยมีการคลายฝาขวดให้เกิดการหมุนเวียนอากาศ และลดความชื้นภายในขวดอย่างช้า ๆ เป็นระยะเวลา 3-5 วัน จากนั้นนำต้นออกจากขวด และล้างอาหารที่ใช้เพาะ เลี้ยงเนื้อเยื่อออกให้หมด ปลูกลงในถาดหลุม โดยใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก รดน้ำให้ชุ่ม จากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติก มัดปากถุงไว้ เพื่อควบคุมความชื้น เมื่อเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ ค่อย ๆ เปิด

ปากถุงพลาสติกเพื่อให้ต้นค่อย ๆ ปรับตัวกับความชื้นที่ลดลง และเมื่อออกปลูกเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

2.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

หลังออกปลูกเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ คัดเลือกต้นที่รอดชีวิตที่ทรีเมนส์ละ 10 ต้น ย้ายลงกระถางขนาด 3 นิ้ว โดยใช้วัสดุปลูกที่ประกอบด้วยทราย ถ่านแกลบ ขุยมะพร้าว กาบมะพร้าวสับ ปุ๋ยหมัก อัตราส่วน 1:1:1:1:1/2 ใส่ปุ๋ยเม็ดละลายช้า สูตรเสมอ 14-14-14 อัตรา 5 กรัมต่อกระถาง และให้ปุ๋ยชนิดเกล็ดละลายน้ำสูตร 21-21-21 อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร โดยการวัดขนาดของเซลล์ปากใบ ขนาดของละอองเกสร วัดปริมาณดีเอ็นเอ และศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เกิดขึ้นภายหลังการได้รับสารโคลชิซิน เพื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน)

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเพื่อวัดระดับพลอยดี

นำใบอ่อนของต้นลินเดอเนียจากต้นชุดควบคุมและต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน จำนวนตัวอย่างละ 1 ใบ วางลงบน plastic petridish สับตัวอย่างใบพืชด้วยใบมีดที่คม หยดสารละลาย extraction buffer 500 ไมโครลิตร (Partec Cy stain UV ploidy, one step DAPI staining solution) จากนั้นกรองสารที่สกัดได้ใส่ใน celltrics disposable filtered ขนาด 30 ไมโครเมตร และนำไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อหาระดับพลอยดีโดยวิธี flow cytometry ด้วยเครื่อง Partec PA II (Web Suwanseree, 2011)

2.5 การศึกษาลักษณะเซลล์ปากใบ

ตัดใบลินเดอเนียจากต้นดิพลอยด์ ต้นเตตระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์ เพื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ปากใบ โดยใช้หย้าทาเล็บสีสทา ลงบนผิวใบด้านบน เมื่อน้ำยาแห้งจึงลอกเอาหย้าทาเล็บออกจากผิวใบ นำมาวางบนกระจกสไลด์

แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ และนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า (400x) ศึกษาจำนวนเซลล์ปากใบต่อพื้นที่ 1.0 ตารางมิลลิเมตร และวัดขนาดของเซลล์ปากใบหรือเซลล์คุม โดยใช้โปรแกรม ZEISS AxioVision 3.1 ที่เชื่อมต่อกับกล้องจุลทรรศน์ (ZEISS, เยอรมัน) และบันทึกภาพ

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติและเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยข้อมูลการเจริญเติบโตของลำต้นและของดอกตามวิธี Duncan's multiple-range test (DMRT) โดยโปรแกรม SPSS 16.0

3. ผลการวิจัย

3.1 การตรวจสอบลักษณะโพลีพลอยด์ด้วยการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ

เมื่อนำใบลินเดอเนียมาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี flow cytometry โดยคัดเลือกลักษณะการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตต่างไปจากชุดควบคุม เช่น มีการเจริญเติบโตช้า ใบหนา ขอบใบมีรอยหยักชัดเจน และลำต้นหนา มาวัดโดยใช้เครื่อง flow cytometer รุ่น Partec II พบว่าผลของการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของลินเดอเนียมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณดีเอ็นเอนิวเคลียส โดยต้นในชุดควบคุมหรือต้นดิพลอยด์ ($2n=2x$) จะมี peak ตำแหน่งสูงสุดที่ 200 (รูปที่ 1) และต้นลินเดอเนียที่สันนิษฐานว่าเป็นโพลีพลอยด์ มีระดับพลอยดีเป็นเตตระพลอยด์ ($2n=4x$) จะมี peak สูงสุดที่ตำแหน่ง 400 ซึ่งมากกว่าต้นดิพลอยด์สองเท่า (รูปที่ 2) และต้นโพลีพลอยด์ที่มีระดับพลอยดีเป็นออกตะพลอยด์ ($2n=8x$) จะมี peak สูงสุดที่ตำแหน่ง 800 ซึ่งมากกว่าต้นดิพลอยด์สี่เท่า (รูปที่ 3) จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่าต้นลินเดอเนียที่ได้รับสารโคลชิซินทุกลินเดอเนียยกกลุ่มออกตะพลอยด์

ความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดเตตระพลอยด์ได้ส่วนต้นออกตะพลอยด์พบว่าที่ระดับ

ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 10 ppm เป็นเวลา 1 และ 3 วัน สามารถชักนำให้เกิดออกตะ-พลอยด์ได้ 2 ต้น และ 1 ต้น ตามลำดับ

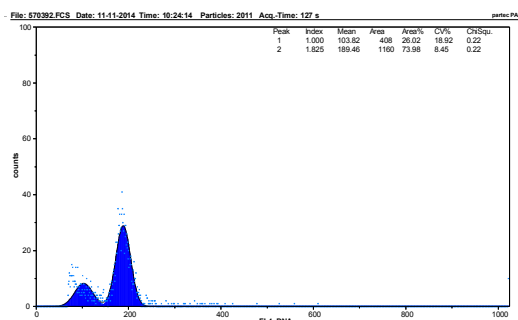
3.2 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ระหว่างต้นดิพลอยด์ ต้นเตตระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์

หลังจากคัดเลือกต้นลินเดอเนียที่มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตต่างไปจากชุดควบคุม (ต้นดิพลอยด์) สามารถคัดเลือกได้ 4 ลักษณะ นำไปวิเคราะห์จำนวนชุดโครโมโซมเพื่อวัดระดับพลอยดี โดยวิธี flow cytometry พบว่า ต้นในชุดควบคุมเป็นต้นดิพลอยด์ โดยต้นจะยืดยาว ลักษณะลำต้นไม่แข็งแรง และมีดอกจำนวนมาก (รูปที่ 4ก) ซึ่งดอกและใบมีขนาดเล็ก (รูปที่ 5ก-5ค, 2x)

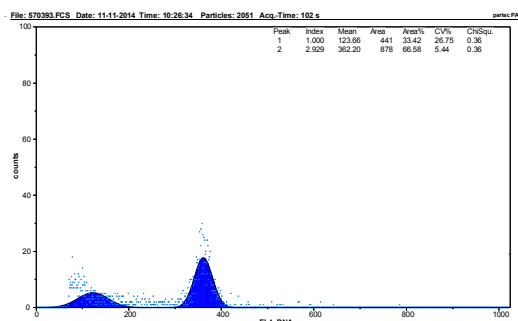
ต้นที่ต่างไปจากชุดควบคุมลักษณะที่ 1 คือ ต้นเตตระพลอยด์ สามารถชักนำให้เกิดได้ในทุกความเข้มข้นของสารโคลชิซินและระยะเวลาที่ใช้ทดสอบ โดยต้นที่ได้จะมีความแข็งแรงมากกว่าต้นดิพลอยด์ ถึงแม้ต้นจะยืดยาวแต่ลักษณะลำต้นแข็งแรง เนื่องจากมีขนาดของลำต้นหนา ส่วนการออกดอกจะช้ากว่า และจำนวนดอกต่อต้นน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ (รูปที่ 4ข) แต่ขนาดของดอกและใบใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ โดยลักษณะใบจะมีขอบใบหยักชัดเจน (รูปที่ 5ก-5ค, 4x)

ลักษณะที่ 2, 3 และ 4 ต้นออกตะพลอยด์สามารถชักนำให้เกิดได้โดยใช้สารโคลชิซินความเข้มข้น 10 ppm เป็นเวลา 1 และ 3 วัน โดยต้นที่ได้มีขนาดของลำต้นหนา ปล้องสั้น จึงทำให้ทรงต้นมีลักษณะเป็นพุ่ม ออกดอกช้ากว่าต้นดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ (รูปที่ 4ค-4จ) แต่ดอกที่ได้มีขนาดใหญ่กว่าและสีดอกเข้มกว่า (รูปที่ 5ก และ 5ข; 8x) และบางดอกมีลักษณะผิดปกติ เช่น เกิดรอยหยักที่กลีบดอก กลีบดอกล่างจากปกติ 3 กลีบ เพิ่มเป็น 4 หรือ 5 กลีบ ดอกไม่บาน และมีเกสรตัวเมียฝ่อ ออกมานอกดอกในขณะที่ดอกตูม ส่วนใบของต้น

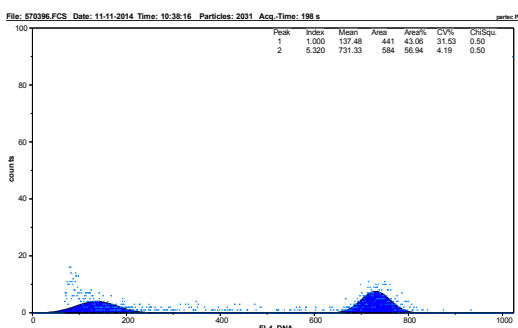
ออกตะพลอยด์มีขนาดแผ่นใบไม่ต่างไปจากต้นเตตระพลอยด์ แต่มีแผ่นใบหนากว่า และมีลักษณะรอยหยักของขอบใบต่างออกไปจากต้นดิพลอยด์ และต้นเตตระพลอยด์ (รูปที่ 5ค; 8x)



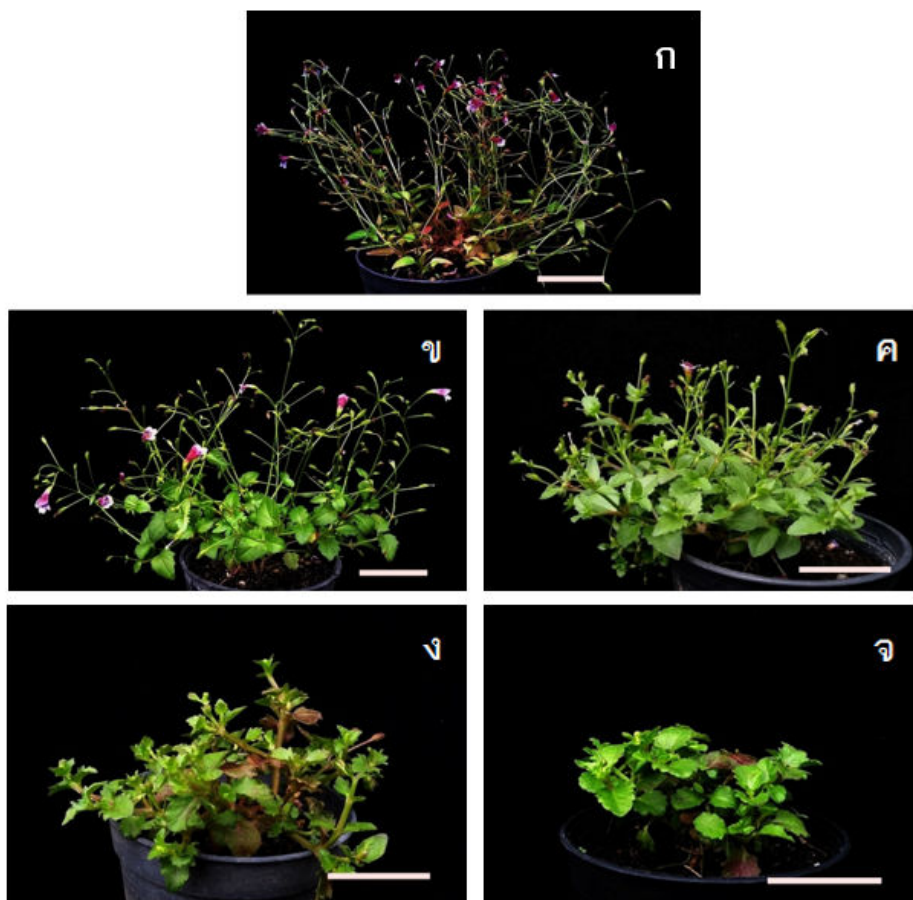
รูปที่ 1 ฮิสโตแกรม flow cytometry ของต้นลินเดอเนียกลุ่มดิพลอยด์



รูปที่ 2 ฮิสโตแกรม flow cytometry ของต้นลินเดอเนียกลุ่มเตตระพลอยด์



รูปที่ 3 ฮิสโตแกรม flow cytometry ของต้น



รูปที่ 4 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่างต้นดิพลอยด์ ต้นเตตระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์ ของลินเดอเนีย (บาร์ = 5 เซนติเมตร) โดย ก คือ ต้นดิพลอยด์, ข คือ ต้นเตตระพลอยด์ (ลักษณะที่หนึ่ง), ค และ ง คือ ต้นออกตะพลอยด์ ได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้น 10 ppm เป็นเวลา 1 วัน (ลักษณะที่สองและสาม ตามลำดับ) และ จ คือ ต้นออกตะพลอยด์ ได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้น 10 ppm เป็นเวลา 3 วัน (ลักษณะที่สี่)

3.3 การเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ปากใบต่อพื้นที่ ขนาดของเซลล์ปากใบ และขนาดของละอองเกสรระหว่างต้นดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และออกตะพลอยด์

เมื่อนำต้นลินเดอเนียกลุ่มดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และออกตะพลอยด์ มาศึกษา ลักษณะทางเซลล์วิทยา คือ จำนวนเซลล์ปากใบต่อพื้นที่ ความยาวของเซลล์ปากใบ และขนาดของ

ละอองเกสร พบว่าต้นดิพลอยด์ ต้นเตตระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์ มีลักษณะทางเซลล์วิทยาต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยต้นดิพลอยด์มีจำนวนเซลล์ปากใบเฉลี่ยสูงสุด 16.40 ± 2.22 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร รองลงมาต้นเตตระพลอยด์และต้นออกตะพลอยด์ โดยมีจำนวนเซลล์ปากใบเฉลี่ย 9.80 ± 1.32 และ 5.40 ± 0.52 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าต้น

ดิพลอยด์มีความหนาแน่นของเซลล์ปากใบมากกว่าต้นเตตระพลอยด์และต้นออกตะพลอยด์ เมื่อวัดความยาวของเซลล์ปากใบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าต้นดิพลอยด์มีความยาวของเซลล์ปากใบเฉลี่ยน้อยที่สุด 21.55 ± 1.35 ไมโครเมตร ขณะที่ต้นเตตระพลอยด์และต้นออกตะพลอยด์

มีความยาวของเซลล์ปากใบเฉลี่ย 30.58 ± 1.10 และ 41.97 ± 1.22 ไมโครเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าต้นเตตระพลอยด์และต้นออกตะพลอยด์มีความยาวของเซลล์ปากใบมากกว่าต้นดิพลอยด์ถึง 2 เท่า



รูปที่ 5 การเปรียบเทียบลักษณะของดอกและใบ ระหว่างต้นดิพลอยด์ (2x) ต้นเตตระพลอยด์ (4x) และต้นออกตะพลอยด์ (8x) ของลินเดอเนีย (บาร์ = 1 เซนติเมตร) โดย ก คือ ลักษณะด้านหน้าของดอก ระหว่างต้นดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และออกตะพลอยด์, ข คือ ลักษณะด้านข้างของดอกระหว่างต้นดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และออกตะพลอยด์ และ ค คือ ลักษณะของใบระหว่างต้นดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และออกตะพลอยด์

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ปากใบต่อพื้นที่ ขนาดของเซลล์ปากใบ และขนาดของละอองเกสร ระหว่างดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และออกตะพลอยด์ของต้นลิ้นเดอเนีย

ชนิดต้นลิ้นเดอเนีย	จำนวนเซลล์ปากใบต่อพื้นที่ (เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร)	ความยาวเซลล์ปากใบ เฉลี่ย (ไมโครเมตร)	ขนาดละอองเกสรเฉลี่ย (ไมโครเมตร)
ต้นดิพลอยด์	16.40±2.22 ^{c1/2/}	21.55±1.35 ^a	20.86±0.97 ^a
ต้นเตตระพลอยด์	9.80±1.32 ^b	30.58±1.10 ^b	26.44±0.85 ^b
ต้นออกตะพลอยด์	5.40±0.52 ^a	41.97±1.22 ^c	30.88±1.09 ^c
F-test	**	**	**
C.V. (%)	45.87	27.35	16.42

4. วิจารณ์

การชักนำให้เกิดต้นโพลีพลอยด์จากต้นดิพลอยด์กลายเป็นต้นออกตะพลอยด์ด้วยการใช้สารโคลชิซินเกิดได้น้อยมาก และในพืชต่าง ๆ ส่วนใหญ่ได้ต้นเตตระพลอยด์ สอดคล้องกับงานวิจัยของปฐมภรณ์และสาโรจน์ (2557) ได้วิเคราะห์หาระดับพลอยดีด้วยวิธี flow cytometry พบว่าระดับพลอยดีของต้นในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน มีระดับพลอยดี $2n=2x$ โดยปริมาณโครโมโซมของต้นที่เป็นดิพลอยด์จะมี peak ตำแหน่งสูงสุดที่ 200 และกลุ่มที่ได้รับสารโคลชิซินมีระดับพลอยดีเป็นเตตระพลอยด์ $2n=4x$ ซึ่งมี peak สูงสุดที่ตำแหน่ง 400 และในกลุ่มไม้เลื้อยจันทบูรดำเต็มคอสามารถชักนำให้เกิดเตตระพลอยด์ได้ในทุกความเข้มข้นของสารโคลชิซินและเวลาที่ใช้ทดสอบและในต้นมะนาว พบว่าต้นที่สันนิษฐานว่าเป็นโพลีพลอยด์มีลักษณะการเกิด peak ที่แสดงปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง 400 ขณะที่กลุ่มควบคุมหรือต้นดิพลอยด์จะเกิด peak ในตำแหน่ง 200 ซึ่งจะเห็นว่าต้นมะนาวที่สันนิษฐานว่าเป็นโพลีพลอยด์จะมีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่ากลุ่มควบคุมสองเท่า ซึ่งแสดงว่าต้นดิพลอยด์มี $2n=2x=2c$ ส่วนต้นที่สันนิษฐานว่าเป็นโพลีพลอยด์มี $2n=4x=4c$ ดังนั้นจึงอาจเรียกได้ว่าเป็นต้นเตตระพลอยด์ (นงนุช และคณะ, 2555) อาจเกิดจากโคลชิซินเป็นสาเหตุของการสลายตัว

ของโครงสร้างไมโครทิวบูล โดยสามารถยับยั้งการสร้างทิวบูลิน ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของไมโครทิวบูลจากการทดสอบผลของโคลชิซินต่อการสร้างทิวบูลินในรากหัวหอมใหญ่ พบว่าเมื่อนำรากหัวหอมใหญ่แช่ในโคลชิซินผ่านไป 2 ชั่วโมง ทิวบูลินสามารถสร้างได้เพียง 25 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การสร้างไมโครทิวบูลถูกยับยั้ง และพบโครงสร้างของไมโครทิวบูลถูกแยกชิ้นส่วน 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่ในโคลชิซินผ่านไป 6 ชั่วโมง (Utrilla *et al.*, 1989) และ Caperta (2006) กล่าวว่าไวรัสสารโคลชิซินมีผลต่อการหยุดการทำงานของกระบวนการแบ่งเซลล์ โดยสารโคลชิซินจะเข้าไปอุดตันในท่อไมโครทิวบูล ซึ่งเป็นสายสั้น ๆ จึงทำให้ไมโครทิวบูลไม่สามารถต่อกันเป็นสาย spindle fiber ได้ ดังนั้นภายในเซลล์ขณะที่เกิดการแบ่งตัวจึงไม่มีสาย spindle fiber ที่ทำหน้าที่สำหรับดึงโครโมโซมในระยะเมทาเฟสออกสู่ขั้วเซลล์ เพื่อเข้าสู่ระยะแอนาเฟส ภายในเซลล์จึงมีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ และเมื่อเซลล์ดำเนินวงจรการแบ่งเซลล์ต่อไปจนถึงขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโครโมโซมที่ไม่มีการแบ่งตัวจึงเกิดการจำลองตัวและเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า เป็นผลให้ภายในเซลล์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น (Segui-Simarro and Nuez, 2008; Yemets and Blume, 2008; Lee *et al.*, 2009 และ Ade and Rai, 2010)

เมื่อเปรียบเทียบต้นดิพลอยด์ เตตระพลอยด์

และออกตะพลอยด์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าต้นดิพลอยด์มีลักษณะลำต้นยืดยาว เลื้อยแผ่ไปตามพื้นดิน ไม่แข็งแรง ออกดอกจำนวนมาก แต่ใบและดอกมีขนาดเล็ก ระยะเวลาในการบานของดอกสั้น และเมื่อออกดอกแล้วระยะ เวลาการมีชีวิตของต้นสั้นลง ซึ่งต่างจากต้นเตตระพลอยด์ คือ แม้จะมีลำต้นที่ยืดยาว แต่ลักษณะ ลำต้นแข็งแรง เนื่องจากมีขนาดลำต้นหนา มีการออกดอกช้ากว่า และมีจำนวนดอกต่อต้นน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ แต่ขนาดของดอกและใบใหญ่กว่า ระยะเวลาในการบานของดอกนานขึ้น ดอกมีสีเข้มขึ้น และการมีชีวิตของต้นนานขึ้น ส่วนต้นออกตะพลอยด์มีขนาดของลำต้นหนา ปล้องสั้น จึงทำให้ทรงต้นมีลักษณะเป็นพุ่ม ใบมีขนาดใหญ่ แผ่นใบหนา ลักษณะรอยหยักของขอบใบต่างไปจากต้น ดิพลอยด์ ออกดอกช้า และในระยะดอกตูม ดอกมีลักษณะกลมมนและใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์และต้น เตตระพลอยด์ จึงทำให้ดอกมีขนาดใหญ่ สีของดอกเข้ม แต่การบานของดอกน้อยและบางดอกกลีบมีลักษณะผิดปกติ สอดคล้องกับการวิจัยของ Gantait และคณะ (2011) พบว่า *Gerbera jamesonii* ต้นเตตระพลอยด์มีการงอกของต้นข้าง แต่ต้นที่ได้มีความแข็งแรงมากขึ้น ใบกว้างและหนาขึ้น ดอกมีขนาดใหญ่ และก้านดอกยาว นอกจากนี้ยังพบว่าดอกมีอายุการปักแจกันยาวนานขึ้นลักษณะเบื้องต้นของลินเดอเนียที่มีระดับพลอยด์ต่างกันสังเกตได้จากลักษณะเบื้องต้นที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น รูปร่าง และขนาดของส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ใบ ดอก ผล และเมล็ด โดยจะทำให้สามารถแยกพืชได้เป็น 2 กลุ่ม คือ พวกที่ตอบสนองต่อสารโคลชิซิน และพวกที่ไม่ตอบสนองต่อสารโคลชิซิน หรืออาจใช้วิธีการวัดขนาดของเซลล์ปากใบ และขนาดของละอองเกสร ซึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่าต้นปกติ (วิมล, 2527) จึงคัดเลือกต้นที่คาดว่าเป็นโพลีพลอยด์ได้ แต่จากการวิจัยครั้งนี้ได้คัดเลือกลักษณะที่ต่างไปจากชุดควบคุม ซึ่ง

คัดเลือกได้ 4 ลักษณะ นำไปวิเคราะห์จำนวนชุดโครโมโซม เพื่อวัดระดับพลอยด์ด้วยวิธี flow cytometry พบว่ามีต้นดิพลอยด์ (ชุดควบคุม) ต้นเตตระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์ จึงได้ศึกษาเซลล์ปากใบและขนาดของละอองเกสรของ ลินเดอเนีย เพื่อเปรียบเทียบลักษณะระหว่างต้นดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และออกตะพลอยด์ พบว่าต้นดิพลอยด์มีจำนวนเซลล์ปากใบต่อพื้นที่มากที่สุด รองลงมา คือ ต้นเตตระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์ ตามลำดับ จึงทำให้ต้นดิพลอยด์มีความหนาแน่นของเซลล์ปากใบมากที่สุด แต่เมื่อวัดขนาดของเซลล์ปากใบและขนาดของละอองเกสรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าต้นดิพลอยด์มีความยาวของเซลล์ปากใบและขนาดของละอองเกสรน้อยที่สุด ตามมาด้วยต้นเตตระพลอยด์ และต้นออกตะพลอยด์ซึ่งมีความยาวของเซลล์ปากใบและขนาดของละอองเกสรมากกว่าต้นดิพลอยด์ถึงสองเท่า ทั้งนี้เนื่องจากสารโคลชิซินมีผลทำให้ขนาดของเซลล์ปากใบเพิ่มขึ้น จำนวนเซลล์ปากใบต่อพื้นที่จึงลดลง (Levin, 2002; Roy, 2009) เช่นเดียวกับต้น *Echinacea purpurea* (Abdoli et al., 2013) ต้นมะนาว (งนุชและคณะ, 2555) ต้นบัวดิน (รัตนภรณ์, 2555) ต้น *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella (Gantait et al., 2011) ต้นแวมยูรา (จิราภรณ์, 2554; สลธิ์, 2556) และกล้วยไม้เอื้องดิน (รัชนี้, 2553) เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากนอกจากสารโคลชิซินจะมีผลต่อการเพิ่มขนาดของเซลล์ปากใบแล้ว ยังมีผลทำให้รูปร่างของแผ่นใบเกิดการเปลี่ยนแปลง เป็นผลทำให้การกระจายตัวของเซลล์ปากใบต่อพื้นที่มีจำนวนเปลี่ยนแปลงด้วย

5. สรุป

ลักษณะของต้นลินเดอเนียที่ระดับพลอยด์ต่างกัน พบว่าเมื่อระดับพลอยด์ที่สูงขึ้นส่งผลทำให้ใบและดอกของลินเดอเนียมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่มี

ลักษณะของข้อปล้องที่สั้นลง ละอองเรณูและขนาดของเซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่จำนวนเซลล์ปากใบต่อพื้นที่ลดลงเมื่อระดับพลอยดีสูงขึ้น

6. รายการอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ, ม.ป.ป., Colchicines, ศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์, แหล่งที่มา : <http://www.msds.pcd.go.th>, 26 สิงหาคม 2559.

จิราภรณ์ จิราภรณ์พันธุ์, 2554, การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในแวมยูราพันธุ์ลูกผสม (*Torenia fournieri* × *Torenia baillonii*) และแวมยูราพันธุ์กลายดอกสีเหลืองด้วยการใช้สารโคลชิซินชนิดเม็ด, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นงนุช เอื้อวงศ์, ชลกรณต์ อวยจินดา, วิไลพร แซ่ลิ่ม, สุพรรณฎิภา เสี่ยงสาย และวิมล ขวัญเกื้อ, 2555, การศึกษาทางสัณฐานและเซลล์วิทยาของมะนาว (*Citrus aurantifolia* Swingle) พอลิพลอยด์ที่ถูกชักนำด้วยสารโคลชิซิน, ว.วิชาการเกษตร 30(3): 258-273.

เบญจมาศ ศิลาอ้อย, 2545, โพลีพลอยด์, สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) สาขาชีววิทยา, แหล่งที่มา : http://kroo.ipst.ac.th/biology/main.php?url=article_view&article_id=9, 25 สิงหาคม 2559.

ปฐมภรณ์ ทิลารักษ์ และสาโรจน์ ประเสริฐศิริวัฒน์, 2557, ผลของโคลชิซินต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้เหลืองจินตบูรดำเต็มคอ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 16(1): 61-68.

รัชณี เพ็ชรช้าง, 2553, ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการให้โคลชิซินต่อการเจริญและจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้เอื้องเงิน, ว.วิทย. เทคโนโลยี. มมส. 29(4): 413-419.

รัตนภรณ์ เกิดเจริญ, 2555, การชักนำบัวดินให้

กลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้รังสีแกมมาและสารโคลชิซิน, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สสิริ บุญบงการ, 2556, การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในแวมยูราพื้นเมือง (*Torenia fournieri*) ด้วยการใช้สารโคลชิซินชนิดเม็ด, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สันติธิดา ตังคจิวงกูร, 2552, การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในแวมยูราด้วยการใช้สายโคลชิซินชนิดเม็ด, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรมา คัมภีรานนท์, 2546, พันธุศาสตร์ของเซลล์, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Abdoli, M., Moieni, A. and Badi, H.N., 2013, Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicines-induced tetraploid plants of *Echinacea purpurea* (L.), Acta Physiol. Plant 35: 2075-2083.

Addink, W., 2007, Colchicine: Used in plant breeding work to induced mutation (polyploidy), Available Source: <http://www.geocities.com/RainForest/Vines/2259/colchicines.htm>, August 20, 2016.

Ade, R. and Rai, M.K., 2010, Review: Colchicines, current advances and future prospects, Bioscience 2(2): 90-96.

Caperta, A.D., Delgado, M., Reaaurreicao, F., Meister, A., Jones, W.V. and Houben, A., 2006, Colchicine-induces polyploidization depends on tubulin polymerization in C-methaphase cells, Protoplasma 227(2-4): 147-153.

- Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S. and Das, P.K., 2011, Induction and identification of tetraploids using in *vitro* colchicines treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella, Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 106: 485-493.
- Lee, H.O., Davidson, J.M. and Duronio, R.J., 2009, Endoreplication: Polyploidy with purpose, Genes Develop. 23: 2461-2477.
- Levin, D.A., 2002, The role of chromosomal change in plant evolution, Oxford University Press, New York.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962, Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Roy, D., 2009, Cytogenetic, Alpha Science International Ltd., U.K.
- Segui-Simarro, J.M. and Nuez, F., 2008, Pathways to doubled haploidy: Chromosome doubling during androgenesis, Cytogenet. Plant Breed. 120: 358-369.
- Shinha, A.R.P., 1987, Colchiploidy in *Lindernia crustacea* (L.) F. Muell., Cytologia 52: 151-155.
- Smitinand, T., 1990, Flora of Thailand, Volume Five Part Two, The Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok.
- Utrilla, L., Sans, J. and Torre, C.D.L., 1989, Colchicine-resistant assembly of tubulin in plant mitosis, Protoplasma 152: 101-108.
- Yemets, A.I. and Blume, Y.B., 2008, Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drugs, Open Hort. J. 1: 15-20.