การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในแววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง ด้วยการใช้สารโคลชิซินชนิดเม็ด

Polyploid Induction in Yellow Flower Mutant Torenia Using Colchicine Tablets

จิราภรณ์ จิรานภาพันธุ์[1] ธัญญะ เตชะศีลพิทักษ์[1] เฌอมาลย์ วงศ์ชาวจันท์[1] และ เบญญา มะโนชัย[1]

Jiraporn Jiranapapan[1] Thunya Taychasinpitak[1] Shermarl Wongchaochant[1] and Benya Manochai[1]

Abstract

The effects of colchicine tablet solution on yellow flower mutant torenia were studied. Leaves were cut and soaked in different concentrations of colchicine solution : 0, 5, 10, 15 and 20 ppm for 1, 2 and 3 days. It was found that the survival rate of leaves decreased when colchicine concentration and treatment duration were increased. Seven putative polyploidy plants were selected based on morphological and cytological variations, such as slower growth, darker green leaves, thicker and larger leaves, larger flower and increased length of stomata. The results of chromosome counting confirmed that there were seven tetraploid plants and the chromosome number of the tetraploid plants were 2n = 4x = 34. The highest frequency of tetraploid induction was 6 % at 20 ppm of colchicine solution soaked for 1 day. Morphological and cytological characteristics of tetraploid and diploid plants were compared. The results showed that plant height and width of tetraploid plants were decreased whereas numbers of branchs, stem thickness, length, width and thickness of leaves were increased when compared with diploid plants. The flower characteristics of tetraploid plants showed larger flower sizes, late flowering and less number of flowers than those of diploid plants. Pollen and stomata sizes of tetraploid plants were larger than in diploid plants and stomata density were lower than in diploid plants. Pollen sterility of tetraploid plants were less than those of diploid plants.

Keywords : Colchicine, Polyploid induction, Torenia

[1]ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพ 10900

[1]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Jatujak, Bangkok 10900. THAILAND

รับเรื่อง : สิงหาคม 2554

*Corresponding author : agrtyt@ku.ac.th

บทคัดย่อ

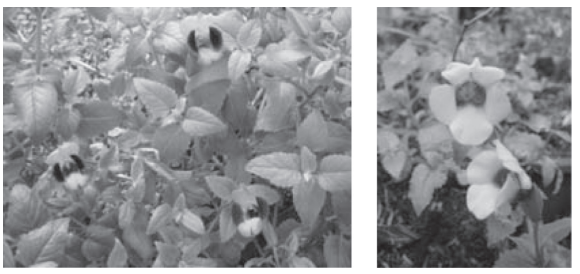
ศึกษาผลของสารละลายยาเม็ดโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงของแววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง โดยตัดใบจากต้นแววมยุราแล้วนำไปแช่ในสารละลายยาเม็ดโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 ppm เป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงที่ระดับความเข้มข้นสูงและเวลาในการแช่นานขึ้น สามารถคัดเลือกต้นที่สันนิษฐานว่าเป็นโพลีพลอยด์ คือ มีการเจริญเติบโตช้าลง ใบมีสีเขียวเข้มขึ้น หนาขึ้น ขนาดใบ ดอก และความยาวของเซลล์ปากใบเพิ่มขึ้นจำนวน 7 ต้น เมื่อนำมานับจำนวนโครโมโซม พบว่าได้ต้นเตตราพลอยด์ทั้งหมด 7 ต้น ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n = 4x = 34 และพบความถี่ในการเกิดเตตราพลอยด์สูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของโคลชิซิน 20 ppm ระยะเวลาในการแช่ 1 วัน มีค่าเป็น 6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเซลล์วิทยาระหว่างต้นดิพลอยด์และต้นเตตราพลอยด์ พบว่าต้นเตตราพลอยด์มีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น คือ ความสูง ความกว้างทรงพุ่มลดลง แตกกิ่งแขนงมากเป็นกระจุก ลำต้นหนา ใบมีขนาดใหญ่ หนา เมื่อเปรียบเทียบกับต้นดิพลอยด์ สำหรับลักษณะดอกของต้นเตตราพลอยด์พบว่าดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น ออกดอกช้า และมีจำนวนดอกน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ นอกจากนี้ต้นเตตราพลอยด์จะมีขนาดละอองเกสรและเซลล์ปากใบใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ จำนวนปากใบต่อพื้นที่ใบน้อยกว่า และเปอร์เซ็นต์ละอองเกสรที่เป็นหมันลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นดิพลอยด์

คำนำ

แววมยุราเป็นไม้ดอกที่อยู่ในวงศ์ Scrophulariaceae นิยมปลูกประดับแปลง ปลูกเป็นไม้กระถาง และนำมาใช้จัดสวนในรูปแบบต่างๆ (Starman, 2005) เนื่องจากแววมยุรามีดอกดก และมีสีสันสวยงาม สามารถออกดอกได้ตลอดทั้งปี ไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล หรือจำนวนชั่วโมงแสงต่อวัน รวมทั้งมีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อน และกึ่งเขตร้อนของทวีปเอเชีย จึงสามารถปลูกและเจริญเติบโตได้ดีในประเทศไทย (Fischer, 2004; Spencer, 2006) แววมยุราเป็นพืชที่สามารถขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเมล็ด การปักชำกิ่ง และการปักชำใบ เนื่องจากเป็นพืชที่สามารถใช้ใบในการชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ (Kanchanapoom *et al.*, 2009) ซึ่งข้อดีของการปักชำใบจะช่วยลดการเกิดไคเมอรา (chimera) มีประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชจากการฉายรังสีหรือใช้สารเคมี จะทำให้ต้นที่เกิดการกลายพันธุ์หรือเพิ่มจำนวนโครโมโซมไม่เกิดลักษณะไคเมอรา วิธีการดังกล่าวเรียกว่า adventitious bud technique ซึ่งต้นใหม่ที่เกิดจากตาพิเศษหากมีการกลายที่เซลล์เริ่มต้นก็จะเป็นต้นกลายทั้งต้น (solid mutant) (Krasaechai, 1996a; Wongpiyasatid, 2007) ในประเทศไทยมีพืชสกุล Torenia หรือแววมยุราจำนวนทั้งหมด 19 ชนิด (Yamazaki, 1985) แต่มีการนำมาใช้ประโยชน์และเป็นที่รู้จักเพียงชนิดเดียวเท่านั้น คือ *Torenia fournieri* ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมในธรรมชาตินั้นยังมีไม่เพียงพอต่อการคัดเลือกพันธุ์ และในตลาดปัจจุบันต้องการไม้ดอกที่มีลักษณะต่างๆ ที่มีความแปลกใหม่ ดังนั้นการผสมพันธุ์ระหว่างพืชต่างชนิด (interspecific hybridization) เป็นการสร้างพืชพันธุ์ใหม่ แต่จะทำให้ลูกผสมส่วนใหญ่เป็นหมัน ทำให้ไม่สามารถทำการผสมพันธุ์คัดเลือกต่อไปได้ จึงเป็นปัญหาต่อการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งสามารถแก้ไขการเป็นหมันได้โดยทำการเพิ่มจำนวนโครโมโซม (Sriwattanapong, 1985) และสารเคมีที่นิยมใช้ คือ สารโคลชิซิน แต่เนื่องจากสารโคลชิซินบริสุทธิ์ออกฤทธิ์คล้ายสารหนู ซึ่งก่ออันตรายได้ด้วยการสัมผัส ถ้าหากได้รับสารในปริมาณมากอาจอันตราย

ถึงแก่ชีวิต (Addink, 2007; Cook and Loudon, 1952) ดังนั้นสารโคลชิซินบริสุทธิ์จึงเป็นอันตรายต่อผู้วิจัยอย่างมาก ถ้าสัมผัสโดยตรง ทั้งในรูปผง หรือสารละลายในขั้นตอนการเตรียมสารละลาย นอกจากนี้การสั่งซื้อสารยังมีข้อจำกัด เนื่องจากไม่ได้มีวางจำหน่ายโดยทั่วไป และมีราคาสูง จึงทำให้เกิดแนวความคิดในการปรับปรุงพันธุ์แววมยุรา ด้วยการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยใช้ยาเม็ดรักษาโรคเก๊าท์ ซึ่งมีสารโคลชิซินอยู่ในเม็ดยาในปริมาณที่กำหนดตามฉลาก และยารักษาโรคเก๊าท์นี้ สามารถหาซื้อได้ตามร้านขายยาทั่วไป ราคาไม่แพง มีความสะดวก และปลอดภัยในขั้นตอนการเตรียมสารละลายมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารโคลชิซินบริสุทธิ์ และการเลือกใช้วิธีการดังกล่าวถือเป็นทางเลือกที่ดีวิธีการหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์แววมยุรา เพื่อให้มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น อีกทั้งยังสามารถนำไปปรับใช้เพื่อเป็นแนวทาง ในการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับชนิดต่างๆ ต่อไปดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้น และระยะเวลาของสารละลายโคลชิซินจากยาเม็ดรักษาโรคเก๊าท์ ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นโพลีพลอยด์ และเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเซลล์วิทยาระหว่างต้นดิพลอยด์ และต้นเตตราพลอยด์ของ แววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง

อุปกรณ์และวิธีการ



ภาพที่ 1 A. แววมยุราพันธุ์ลูกผสมระหว่าง *Torenia fournieri* กับ *Torenia baillonii* B. แววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง

แววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง คอดอกสีม่วงเป็นแววมยุราที่กลายพันธุ์จากพันธุ์ลูกผสมระหว่าง *Torenia fournieri* กับ *Torenia baillonii* ซึ่งมีดอกสีน้ำตาลอมเหลือง มีกลีบสีม่วงเข้มที่พูทั้งสองข้าง คอดอกสีม่วง (ภาพที่ 1 A และ B) โดยแววมยุราพันธุ์กลายนี้เกิดจากการฉายรังสีแกมมาแบบโครนิก ที่ปริมาณรังสี 90 เกรย์ และมีลักษณะที่เป็นหมัน ทำให้ไม่สามารถผสมพันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้ นำมาทดลองเพื่อชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยใช้ยาเม็ดรักษาโรคเก๊าท์ ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมของสารโคลชิซิน 0.6 มิลลิกรัม ต่อ 1 เม็ด มีวิธีการดังนี้

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์

นำยาเม็ดโคลชิซินมาละลายในน้ำกลั่น เพื่อเตรียมสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 ppm ตัดใบที่มีใบติดก้านใบ จากต้นแววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง แล้วนำก้านใบไปแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน หลังจากนั้นนำใบไปปักชำในวัสดุปักชำที่ประกอบด้วยทรายและถ่านแกลบ ในอัตราส่วน 1:1 เมื่อเกิดรากและต้นตั้งตัวได้ย้ายปลูกลงในกระถางขนาด 4 นิ้ว โดยใช้วัสดุปลูกที่ประกอบด้วย ทราย ถ่านแกลบ ขุยมะพร้าว กาบมะพร้าวสับ ปุ๋ยหมัก อัตราส่วน 1:1:1:1:1/2 ใส่ปุ๋ยเม็ดละลายช้าสูตรเสมอ 14-14-14 อัตรา 5 กรัม ต่อกระถาง และให้ปุ๋ยชนิดเกล็ดละลายน้ำสูตร 21-21-21 อัตรา 30 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร ทุกสัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

การคัดเลือกต้นที่เป็นโพลีพลอยด์

เมื่อต้นแววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลืองมีอายุ 90 วัน คัดเลือกต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ มีการเจริญเติบโตช้าลง ใบมีสีเขียวเข้มขึ้น หนาใบและดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น กำหนดรหัสต้นดังนี้ ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน-เวลา-ลำดับของต้น เช่น 15-1-1 คือ ต้นที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 15 ppm เป็นเวลา 1 วัน ต้นที่ 1 และ 20-1-2 คือ ต้นที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 20 ppm เป็นเวลา 1 วัน ต้นที่ 2 และนำไปวัดความยาวของเซลล์ปากใบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

การศึกษาจำนวนโครโมโซม

ตรวจสอบจำนวนโครโมโซมของต้น ที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และมีความยาวของเซลล์ปากใบเฉลี่ยมากกว่าต้นในชุดควบคุมเพื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยตัดปลายรากที่มีลักษณะสมบูรณ์จากต้นแววมยุรา นำไปแช่ในสารละลาย 8-hydroxyquinoline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ย้ายปลายรากลงแช่ในน้ำยาคงสภาพเซลล์ คาร์นอย I (3 ethyl alcohol : 1 acetic acid) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาย่อยด้วยสารละลาย hydrochloric acid 1 N ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แช่สีย้อม leuco-basic fuschin ในที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ตัดปลายรากส่วนที่ติดสีเข้มวางบนสไลด์ หยด 50% acetic acid 1 หยด และ aceto-carmine 1 หยด ทำการ squash หลังจากนั้นนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟส นับจำนวนโครโมโซม และบันทึกภาพ

เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเซลล์วิทยาระหว่างต้นดิพลอยด์และต้นเตตราพลอยด์

นำกิ่งแววมยุรา พันธุ์กลายดอกสีเหลืองของต้นดิพลอยด์และต้นเตตราพลอยด์ ชนิดละ 20 กิ่ง ความยาวประมาณ 7 เซนติเมตร ปักชำในวัสดุปักชำที่ประกอบด้วยทรายและถ่านแกลบ ในอัตราส่วน 1:1 เมื่อเกิดรากและต้นตั้งตัวได้ย้ายปลูกลงในกระถางขนาด 4 นิ้ว โดยใช้วัสดุปลูกที่ประกอบด้วย ทราย ถ่านแกลบ ขุยมะพร้าว กาบมะพร้าวสับ ปุ๋ยหมัก อัตราส่วน 1:1:1:1:1/2 ใส่ปุ๋ยเม็ดละลายช้าสูตรเสมอ 14-14-14 อัตรา 5 กรัม ต่อกระถาง และให้ปุ๋ยชนิดเกล็ดละลายน้ำสูตร 21-21-21 อัตรา 30 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร ทุกสัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยให้ชนิดพลอยดี (ploidy) ที่ต่างกันเป็นทรีทเมนต์ แบ่งออกเป็น 2 ทรีทเมนต์ ทรีทเมนต์ละ 20 ซ้ำ บันทึกการเจริญเติบโตของลำต้น เช่น ความสูง ความกว้างทรงพุ่ม จำนวนกิ่งแขนง ความหนาลำต้น ความกว้างใบ ความยาวใบ และความหนาใบ การเจริญเติบโตของดอก เช่น ความกว้างดอก ความยาวดอก จำนวนดอก และความหนากลีบดอก ลักษณะทางเซลล์วิทยา เช่น ความกว้าง ความยาวของเซลล์ปากใบ จำนวนปากใบต่อพื้นที่ใบ ขนาดละอองเกสร และความเป็นหมันของละอองเกสรของต้นดิพลอยด์และต้นเตตราพลอยด์ โดยเปอร์เซ็นต์ความเป็นหมันของละอองเกสรคำนวณได้จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความเป็นหมัน} = \frac{\text{จำนวนละอองเกสรที่เป็นหมัน}}{\text{จำนวนละอองเกสรที่นับทั้งหมด}} \times 100$$

ผลและวิจารณ์

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์

เมื่อนำก้านใบจากต้นแววมยุรา พันธุ์กลายดอกสีเหลืองไปแช่ในสารละลายยาเม็ดโคลชิซินความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 ppm โดยในแต่ละความเข้มข้นใช้เวลาในการแช่ คือ 1, 2 และ 3 วัน หลังจากนำใบไปปักชำในวัสดุปักชำที่ประกอบด้วยทรายและถ่านแกลบ ในอัตราส่วน 1:1

บันทึกผลการรอดชีวิตที่ 90 วัน พบว่าชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยสูงสุด โดยเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายสูงขึ้น และระยะเวลาในการแช่นานขึ้น และที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายยาเม็ดโคลชิซิน 20 ppm ระยะเวลาในการแช่ 3 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยต่ำที่สุด คิดเป็นร้อยละ 6.00 (ตารางที่ 1) เนื่องมาจากสารโคลชิซินไม่ได้จำกัดอยู่ที่เฉพาะการแบ่งเซลล์เท่านั้น แต่จะแพร่เข้าไปในส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ ทำให้เกิดความเป็นพิษได้เมื่อได้รับความเข้มข้นสูง (Dermen, 1940) โดยสารโคลชิซินมีผลทำให้ความหนืดของไซโตพลาซึมเปลี่ยนแปลงไป การทำงานของเซลล์จึงผิดปกติ หรือชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมทำให้เซลล์เสียสมดุลและตายได้ (Cook and Loudon, 1952)

เมื่อต้นแววมยุรามีอายุ 90 วัน หลังปักชำใบ คัดเลือกต้นที่คาดว่าจะเป็นโพลีพลอยด์ โดยพืชจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ มีการเจริญเติบโตช้าลง ใบมีสีเขียวเข้มขึ้น หนาขึ้น ใบและดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น หลังการปักชำใบ 120 วัน ทำการวัดความยาวของเซลล์ปากใบ และคัดเลือกต้นที่มีความยาวของเซลล์ปากใบมากกว่าต้นในกลุ่มชุดควบคุม (ภาพที่ 2 A และ B) ซึ่งจากการคัดเลือกต้นที่มีความยาวของเซลล์ปากใบเฉลี่ยมากกว่าต้นในชุดควบคุม มีจำนวนทั้งหมด 7 ต้น กำหนดรหัสดังนี้ ต้นที่ 1 15-1-1, ต้นที่ 2 15-2-1, ต้นที่ 3 15-2-2, ต้นที่ 4 20-1-1, ต้นที่ 5 20-1-2, ต้นที่ 6 20-1-3 และต้นที่ 7 20-2-1 โดยพบว่าต้น 20-1-2 มีความยาวของเซลล์ปากใบเฉลี่ยมากที่สุด คือ 32.00 ± 4.12 ไมโครเมตร ส่วนต้นในชุดควบคุมมีความยาวของเซลล์ปากใบเฉลี่ย คือ 16.50 ± 2.24 ไมโครเมตร (ตารางที่ 2) หลังจากคัดเลือกต้นที่มีความยาวของเซลล์ปากใบเพิ่มขึ้นแล้วนำต้นที่คัดเลือกและต้นควบคุมมาศึกษาจำนวนโครโมโซม พบว่า ต้นควบคุมมีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n = 2x = 17 (ภาพที่ 3 A) สำหรับต้นที่ได้รับสารละลายยาเม็ดโคลชิซิน มีจำนวนโครโมโซมเปลี่ยนแปลงได้ต้นเตตราพลอยด์ทั้งหมด 7 ต้น มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n = 4x = 34 (ภาพที่ 3 B) ซึ่งเป็นต้นที่ได้ทำการคัดเลือกในเบื้องต้นและสันนิษฐานว่า เป็นต้นโพลีพลอยด์ เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และมีความยาวของเซลล์ปากใบมากกว่าต้นในกลุ่มชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ศึกษาเรื่องการชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์และการเกิดตามธรรมชาติของต้นเตตราพลอยด์ โดยมักสังเกตพบว่าขนาด และจำนวนของเซลล์ปากใบ และจำนวนของคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ภายในเซลล์คุม (guard cell) จะมีการเปลี่ยนแปลงในกรณีที่โครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อเปรียบเทียบกับต้นดิพลอยด์ (Beck *et al.*, 2003; Cohen and Yao, 1996; Nigel *et al.*, 2007; Speckmann *et al.*, 1965) นอกจากนี้ Ye *et al.* (2010) พบว่าการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเซลล์ปากใบ สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกเบื้องต้นสำหรับต้นที่สันนิษฐานว่า เป็นเตตราพลอยด์จากประชากรขนาดใหญ่ของต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน เนื่องจากโคลชิซินจัดเป็นสารก่อกลายพันธุ์ประเภท antimitotic agent ซึ่งจะมีผลขัดขวางการแบ่งเซลล์ในกระบวนการไมโตซิส (mitosis) โดยการเข้าทำปฏิกิริยารวมตัวกับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ microtubule ทำให้ไม่สามารถต่อกันเป็น spindle fiber ที่จะเข้าจับกับโครโมโซม จึงทำให้โครโมโซมไม่เคลื่อนเข้าสู่ขั้วเซลล์ในระยะแอนาเฟส (anaphase) จำนวนโครโมโซมภายในเซลล์จึงเพิ่มขึ้นเป็น สองเท่า และจากการที่เซลล์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มเป็นสองเท่านี้ มีผลทำให้ขนาดของเซลล์ใหญ่ขึ้น (Elliott, 1958) เมื่อศึกษาความถี่ของการเกิดเตตราพลอยด์ของแววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายยาเม็ดโคลชิซิน 20 ppm ระยะเวลาในการแช่ 1 วัน จะสามารถชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์มากที่สุด คือ 3 ต้น และมีความถี่ของการเกิดเตตราพลอยด์สูงที่สุด คือ 6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นแววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง หลังปักชำใบ 90 วัน

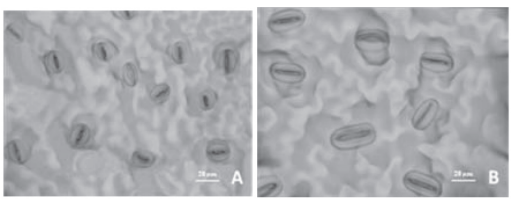
ความเข้มข้นของสารโคลชิซิน (ppm)	ระยะเวลาที่แช่ก้านใบ (วัน)			ค่าเฉลี่ย ± SD
	1	2	3	
0	100.00	96.00	90.00	96.50 ± 4.73
5	88.00	66.00	42.00	73.50 ± 24.89
10	86.00	62.00	32.00	69.50 ± 29.14
15	84.00	44.00	16.00	60.00 ± 36.81
20	44.00	36.00	6.00	45.50 ± 37.43
ค่าเฉลี่ย ± SD	80.40 ± 21.28	60.80 ± 23.26	37.20 ± 32.64	

ตารางที่ 2 ความยาวของเซลล์ปากใบของต้นแววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลืองที่คัดเลือกได้จากการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ด้วยสารโคลชิซิน หลังปักชำใบ 120 วัน

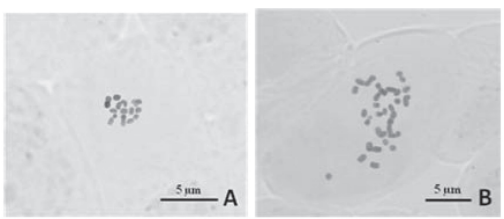
ชนิดพืช	ความยาวเซลล์ปากใบเฉลี่ย ± SD (ไมโครเมตร)
ต้นในชุดควบคุม (Control)	16.50 ± 2.24
ต้นที่คัดเลือก (ความเข้มข้นสารโคลชิซิน-เวลา-ลำดับของต้น)	
15-1-1	25.50 ± 2.75
15-2-1	30.50 ± 2.75
15-2-2	27.50 ± 1.78
20-1-1	30.00 ± 1.78
20-1-2	32.00 ± 4.12
20-1-3	29.50 ± 4.48
20-2-1	23.00 ± 2.10

ตารางที่ 3 ความถี่ของการเกิดเตตราพลอยด์ของแววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง หลังจากได้รับสารละลายยาเม็ดโคลชิซิน

ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน (ppm)	ระยะเวลาที่แช่ก้านใบ (วัน)	จำนวนต้นทั้งหมด (ต้น)	จำนวนต้นเตตราพลอยด์ (ต้น)	ความถี่ของการเกิดเตตราพลอยด์ (เปอร์เซ็นต์)
15 ppm	1 วัน	50	1	2
	2 วัน	50	2	4
	3 วัน	50	0	0
20 ppm	1 วัน	50	3	6
	2 วัน	50	1	2
	3 วัน	50	0	0



ภาพที่ 2 เซลล์ปากใบของต้นแววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง หลังปักชำใบ 120 วัน (กำลังขยาย 400 เท่า) A. ต้นควบคุม (Control) B. ต้นที่เกิดการเปลี่ยนแปลงภายหลังการได้รับสารละลายยาเม็ดโคลชิซิน (bar = 20 µm)



ภาพที่ 3 จำนวนโครโมโซมของต้นแววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง หลังปักชำใบ 120 วัน (กำลังขยาย 1000 เท่า) A. ต้นควบคุม (Control) (2n = 17) B. ต้นที่เกิดการเปลี่ยนแปลงภายหลังการได้รับสารละลายยาเม็ดโคลชิซิน (2n = 34) (bar = 5 µm)

เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเซลล์วิทยาระหว่างต้นดิพลอยด์และต้นเตตราพลอยด์ของแววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง

เมื่อนำกิ่งแววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลืองของต้นดิพลอยด์และต้นเตตราพลอยด์ ชนิดละ 20 กิ่ง ความยาวประมาณ 7 เซนติเมตร มาปักชำในวัสดุปักชำที่ประกอบด้วยทรายและถ่านแกลบ ในอัตราส่วน 1:1 ศึกษาการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น เช่น ความสูง ความกว้างทรงพุ่ม จำนวนกิ่งแขนง ความหนาลำต้น ความกว้างใบ ความยาวใบ และความหนาใบ พบว่าหลังจากปักชำ 60 วัน ต้นดิพลอยด์และต้นเตตราพลอยด์มีการเจริญเติบโต ทางด้านลำต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยต้นดิพลอยด์มีความสูง และความกว้างทรงพุ่มมากกว่าต้นเตตราพลอยด์ เนื่องจากเมื่อสารโคลชิซิน ชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่า ทำให้ต้นโพลีพลอยด์มีอัตราการ

เจริญเติบโตช้ากว่าปกติ (Chandrasekharan *et.al*, 1975) โดยต้นโพลีพลอยด์ จะมีวัฏจักรของการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิสยาวนานกว่าต้นปกติหรือต้นดิพลอยด์ เพราะต้องใช้เวลาในการสังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์เพิ่มขึ้น จึงทำให้มีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นปกติ หรือต้นดิพลอยด์ (Derman, 1940) และพบว่าต้นเตตราพลอยด์จะมีจำนวนกิ่งแขนง ความหนาลำต้น ความกว้างใบ ความยาวใบ และความหนาใบมากกว่าต้นดิพลอยด์ เนื่องจากโคลชิซินยังอาจมีการสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึม มีผลทำให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา เช่น ใบหนา ย่น ใบบิดเบี้ยวได้ (Dermen, 1940; Havas, 1940) (ตารางที่ 4) (ภาพที่ 4 A และ B) เมื่อศึกษาการเจริญเติบโตของดอก พบว่าหลังจากปักชำ 60 วัน ต้นเตตราพลอยด์มีดอกขนาดใหญ่กว่า แต่มีจำนวนดอกน้อยกว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนความหนากลีบดอกของต้นดิพลอยด์และต้นเตตราพลอยด์ไม่มีความแตกต่างกัน เนื่องจากการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมมักได้ต้นต่างๆ ที่มีลักษณะผิดไปจากต้นดิพลอยด์ (diploid) เช่น มีการเพิ่มขนาดของเซลล์เนื้อเยื่อเจริญ เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นอวบน้ำมากขึ้น ทำให้อวัยวะหรือส่วนประกอบต่างๆ ของพืชมีขนาดใหญ่ขึ้นด้วย เช่น ลำต้น ใบ ราก ดอก และผล ซึ่งลักษณะนี้เรียกว่า gigas (Tipvaree, 2005) นอกจากนี้โดยปกติแล้วอัตราการเจริญของออโตโพลีพลอยด์จะช้ากว่าดิพลอยด์ (diploid) จึงทำให้การเกิดดอกเกิดช้า ดอกและใบมีสีเข้มขึ้น ลำต้นเตี้ย ข้อและปล้องสั้น (Silayoi, 2002) (ตารางที่ 5) (ภาพที่ 4 C) เมื่อศึกษาลักษณะทางเซลล์วิทยา เช่น ความกว้าง ความยาวของเซลล์ปากใบ จำนวนปากใบต่อพื้นที่ใบ ขนาดละอองเกสร และความเป็นหมันของละอองเกสร พบว่าต้นเตตราพลอยด์มีละอองเกสร และเซลล์ปากใบขนาดใหญ่มากกว่า แต่มีจำนวนปากใบต่อพื้นที่ใบน้อยกว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้เพราะว่าการใช้สารละลายโคลชิซินจะทำให้จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น จึงมีผลทำให้ขนาดของเซลล์ที่กำลังเจริญมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีจำนวนเซลล์รวมลดลง (Tipvaree, 2005) ส่วนความเป็นหมันของละอองเกสรของต้นเตตราพลอยด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากต้นดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n = 17 และเป็นหมัน เมื่อเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเป็นเท่าตัว คือ 2n = 34 จะทำให้ลูกชั่วต่อมาไม่เป็นหมัน และกลายเป็นจีโนมอัลโลเตตราพลอยด์ โครโมโซมจากฝ่ายพ่อและแม่จะไม่มาจับคู่กัน การจับคู่จะเกิดขึ้นระหว่างโครโมโซมที่มีจีโนมเหมือนกัน จะจับคู่เป็นไบวาเลนต์ และแยกตัวจากกันอย่างปกติ (Sripichitt, 2007) (ตารางที่ 6) (ภาพที่ 5 A และ B)

สรุป

ความเข้มข้นของสารโคลชิซิน และระยะเวลาการให้สารที่แตกต่างกันมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นแววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจะลดลงที่ระดับความเข้มข้นสูง และระยะเวลานานขึ้น และการใช้สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 1 วัน มีความเหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นโพลีพลอยด์ โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์ 3 ต้น ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n = 4x = 34 นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเซลล์วิทยาระหว่างต้นดิพลอยด์และต้นเตตราพลอยด์ พบว่าต้นเตตราพลอยด์มีการเจริญเติบโตช้าลง แตกกิ่งแขนงมากเป็นกระจุก ลำต้นหนา ใบหนา ใบและดอกมีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ ออกดอกช้าจึงทำให้มีจำนวนดอกลดลง นอกจากนี้ต้นเตตราพลอยด์จะมีขนาดละอองเกสร และเซลล์ปากใบใหญ่กว่า จำนวนปากใบต่อพื้นที่ใบน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ และพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ละอองเกสรที่เป็นหมันของต้นเตตราพลอยด์ลดลง

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นระหว่างต้นดิพลอยด์และต้นเตตราพลอยด์ของแวววยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง หลังปักชำกิ่ง 60 วัน

ชนิดพืช	ความสูงเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ความกว้างเฉลี่ย (เซนติเมตร)	จำนวนกิ่งแขนงเฉลี่ย (กิ่ง)	ความหนาลำต้นเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ความกว้างใบเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ความยาวใบเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ความหนาใบเฉลี่ย (เซนติเมตร)
ต้นดิพลอยด์	11.02[a1/]	14.40[a]	10.16[b]	0.14[b]	1.66[b]	2.18[b]	0.024[b]
ต้นเตตราพลอยด์	8.81[b]	11.22[b]	13.36[a]	0.20[a]	2.18[a]	2.48[a]	0.031[a]
F-test	**	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	4.79	4.14	2.06	12.43	6.38	2.97	15.12

หมายเหตุ [1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 99% โดยใช้วิธี DMRT

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของดอกระหว่างต้นดิพลอยด์และต้นเตตราพลอยด์ของแวววยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง หลังปักชำกิ่ง 60 วัน

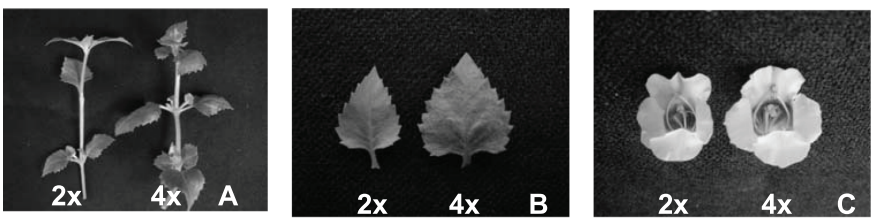
ชนิดพืช	ความกว้างดอกเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ความยาวดอกเฉลี่ย (เซนติเมตร)	จำนวนดอกเฉลี่ย (ดอก)	ความหนากลีบดอกเฉลี่ย (เซนติเมตร)
ต้นดิพลอยด์	1.60[b1/]	1.89[b]	10.35[a]	0.013[a]
ต้นเตตราพลอยด์	1.97[a]	2.17[a]	4.49[b]	0.014[a]
F-test	**	**	**	ns
C.V. (%)	7.76	8.34	8.34	9.99

หมายเหตุ [1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 99% โดยใช้วิธี DMRT

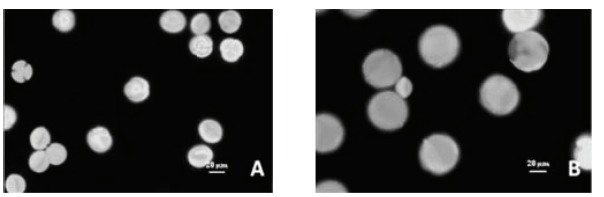
ตารางที่ 6 เปรียบเทียบลักษณะทางเซลล์วิทยาระหว่างต้นดิพลอยด์และต้นเตตราพลอยด์ของต้นแววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง หลังปักชำใบ 60 วัน

ชนิดพืช	ความกว้างเซลล์ปากใบเฉลี่ย (ไมโครเมตร)	ความยาวเซลล์ปากใบเฉลี่ย (ไมโครเมตร)	จำนวนปากใบต่อพื้นที่ใบเฉลี่ย	ขนาดละอองเกสรเฉลี่ย (ไมโครเมตร)	ความเป็นหมันของละอองเกสร (%)
ต้นดิพลอยด์	11.00 ± 2.85[b1/]	17.50 ± 1.46[b]	8.00 ± 1.15[a]	28.00 ± 1.05[b]	87.30 ± 3.76[a]
ต้นเตตราพลอยด์	17.50 ± 2.32[a]	28.50 ± 2.74[a]	5.20 ± 0.79[b]	42.50 ± 5.15[a]	35.00 ± 5.40[b]
F-test	**	**	**	**	**
C.V. (%)	2.21	11.45	14.98	5.70	8.56

หมายเหตุ [1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 99% โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 4 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่างต้นดิพลอยด์ (2x) และต้นเตตราพลอยด์ (4x) ของแววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง A. ลักษณะลำต้น B. ลักษณะใบ C. ลักษณะดอก



ภาพที่ 5 เปรียบเทียบลักษณะทางเซลล์วิทยาระหว่างต้นดิพลอยด์และต้นเตตราพลอยด์ของแววมยุราพันธุ์กลายดอกสีเหลือง (กำลังขยาย 400 เท่า) A. ละอองเกสรของต้นดิพลอยด์ B. ละอองเกสรของต้นเตตราพลอยด์ (bar = 20 µm)

เอกสารอ้างอิง

Addink, W., 2007. Colchicine :used in plant breeding work to induced mutation (polyploidy). Available Source: http://www.geocities.com/RainForest/Vines/2259/colchicines.htm., November 6, 2010.

Beck, S.L., R.W. Dunlop, A. Fossey, 2003. Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, Acacia mearnsii (de Wild). Botanical Journal of the Linnean Society 41, 177–181.

Chandrasekharan, S. N., Parthasarathy, S. V., Krishnawamy, N., Hirohashi, N., 1975. Cytogenetics and Plant Breeding. Madras: P. Varadachary & Co.

Cohen, D.,J.L. Yao, 1996. In vitro chromosome doubling of nine Zantedeschia cultivars. Plant Cell Tissue and Organ Culture 47, 43–49.

Cook, J.W. and L.D. Loudon. 1952. Colchicine. The Alkaloid Chemistry and Physiology. 2: 261-329.

Dermen, H. 1940. Colchicine polyploid and technique. The Botanical Review .6: 599-635.

Elliott, F.C. 1958. Plant Breeding and Cytogenetic. McGraw-Hill, Inc, New York. 395 p.

Fischer, E. 2004. The Families and Genera of Vascular Plants. In: JW Kadereit, ed., Volume VII. Springer-Verlag, New York.

Havas, L. 1940. Colchicine chronology. Jour. Hered. 31 : 115-117.

Kanchanapoom, K., N. Buntin and K. Kanchanapoom. 2009. Micropropagation through adventitious shoot regeneration from leaf culture of *Torenia fournieri* Lind. Songklanakarin J. Sci. Technol. 31 (6): 587-590.

Krasaechai, A. 1996a. Floricultural crop improvement by induced mutation. Chiangmai University. (in thai)

_____. 1996b. Cytogenetics in agriculture. Chiangmai University. (in thai)

Nigel, A.R.U., H. Jennie, M. Therese, 2007. Generation and characterization of colchicine-induced autotetraploid Lavandula angustifolia. Euphytica 156, 257–266.

Silayoi, B. 2002. Polyploidy. Available Source: http://kroo.ipst.ac.th/biology/main.php?url=article_view&article_id=9, November 6, 2010. (in thai)

Speckmann, G.J., J.J. Post, H. Dijkstra, 1965. The length of stomata as an indicator for polyploidy in rye grasses. Euphytica 14, 225–230.

Spencer, R. 2006. Horticultural flora of South Eastern Australia. Spencer, R. (eds). UNSW Press, Melbourn.

Sripichitt, P. 2007. Cytogenetics in Plant Breeding. Kasetsart University, Bangkok. (in thai)

Sriwattanapong, S. 1985. Plant breeding. Kasetsart University, Bangkok. (in thai)

Starman, T. W. 2005. Focus on vegetative annuals: Torenia. Greenhouse Grower 92-94.

Tipvaree, V. 2005. Effects of Colchicine on Growth and Polyploid Induction of *Spathoglottis* plicata. M. S. Thesis. Chiangmai University. (in thai)

Wongpiyasatid, A. 2007. Mutation : For plant breeding. Kasetsart University, Bangkok. 279 p. (in thai)

Yamazaki, T. 1985. A Revision of the Genera *Limnophila* and *Torenia* from Indochina. *J Fac Sci Univ Tokyo III* 13: 575-624.

Ye, Y.M., J. Tong , X.P. Shi , W. Yuan and G.R. Li. 2010. Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Scientia Horticulturae. 124: 95–101.