

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์จากเนื้อเยื่อลินเดอเนียด้วยสารละลายโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ Induced Polyploid in *Lindernia* sp. by Colchicine *In Vitro*

บันฑิตา เพ็ญสุริยะ¹ ธีญญะ เตชะศีลพิทักษ์^{1*} เอมมาลย์ วงศ์ขาวจันทน์¹ และ พัฒนา สุขประเสริฐ²

Banthita Pensuriya¹, Thunya Taychasinpitak^{1*}, Shermarl Wongchaochant¹ and Patana Sukprasert²

¹ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

²ภาควิชาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹ Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900 Thailand

² Department of Agricultural Extension and Communication, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900 Thailand

รับเรื่อง: พฤษภาคม 2559 Received: May 2016

รับตีพิมพ์: กรกฎาคม 2559 Accepted: July 2016

* Corresponding author: agrtyt@ku.ac.th

ABSTRACT: *Lindernia* is an herbaceous plant in the family Linderniaceae with small leaves and flowers. It resembles the popular ornamental plant *Torenia*. Colchicine is a substance that has been reported to cause various mutations in plants. The objective of this research was to determine if colchicine would cause changes in the growth habit or morphology of Linderniaceae. *Lindernia* nodes were surface sterilized and cultured *in vitro* on half-strength semisolid MS medium. After subculturing, new nodes were excised and submerged in liquid ½ MS medium with colchicine added at concentrations of 0, 5, 10, 15 and 20 ppm for 1, 2 and 3 days, after which they were cultured on semisolid medium with no colchicine for another 30 days. The survival rate and growth of new shoots was clearly affected by exposure to colchicine. At the concentration of 15 ppm and duration of 3 days, the survival rate was only 15% and the mean number of new shoots was only 5. Plant height, internode length, and leaf length were also reduced in every colchicine treatment. The mean leaf width of *Lindernia* exposed to 5 ppm and 20 ppm colchicine was less than the control. The number of roots was less than control in the 10 ppm and 15 ppm colchicine treatment groups, and mean root length was less than control in the 5 ppm and 10 ppm groups. In screening for putative polyploids, it was observed that plants from the colchicine treatments tended to be shorter, with thicker stems and smaller, curled leaves compared to the control. A tetraploid plant ($2n = 4x$) was found in the 5 ppm colchicine for 2 days treatment group.

Keywords: Tissue culture, linderniaceae, torenia, double chromosome, concentrations

บทคัดย่อ

ลินเดอเนียมีลักษณะต้น ใบ และดอกขนาดเล็ก เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Linderniaceae มีลักษณะคล้ายต้นแววมยุราที่เป็นไม้ดอกประดับ มีรายงานการใช้สารโคลชิซินในการทำให้ต้นพืชเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ ซึ่งจุดประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของสารละลายโคลชิซินต่อการเจริญเติบโต และสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไป โดยนำส่วนข้อของลินเดอเนียมาฟอกฆ่าเชื้อ จากนั้นเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร $\frac{1}{2}$ MS ทำการสับแยกเนื้อเยื่อแล้วแช่ส่วนข้อในอาหารเหลวสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่มีสารละลายโคลชิซินในความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 ppm แขนในระยะเวลาต่าง ๆ คือ 1, 2 และ 3 วัน ในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 30 วัน จากการทดลองพบว่าชิ้นส่วนพืชในส่วนข้อของต้นลินเดอเนียเมื่อได้รับสารละลายโคลชิซินในความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลาต่าง ๆ ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตและจำนวนยอดต่ำด้วย จะเห็นได้ชัดเจนในความเข้มข้นที่ 15 ppm ระยะเวลา 3 วัน อัตราการรอดชีวิตเพียง 15 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอดที่เกิด 5 ยอด ในส่วนของความสูงต้น, ความยาวปล้อง และความยาวใบลดลงในทุกความเข้มข้น ความกว้างใบเมื่อได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 5 ppm และ 20 ppm ทำให้ความกว้างใบต่ำกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน จำนวนรากเห็นได้ชัดในต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน 5 ppm และ 10 ppm ทำให้มีรากสั้นลง และความยาวรากสารละลายโคลชิซินมีผลคือ มีจำนวนรากลดลง ในความเข้มข้น 10 ppm และ 15 ppm เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และจากการคัดเลือกต้นที่คาดว่าจะเกิดโพลีพลอยด์พบว่าต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินจะมีความหนาของลำต้นมากกว่า ความสูงของต้นต่ำกว่า มีใบที่หดรัดลง และมีลักษณะหงิกงอในทุกความเข้มข้นแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 5 ppm

ที่ระยะเวลา 2 วัน ให้ต้นที่มีระดับพลอยดีเป็นเตตระพลอยด์ ($2n = 4x$)

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, มณฑิยันทอง, แววมยุรา, ทวีโครโมโซม, ความเข้มข้น

บทนำ

ลินเดอเนีย (*Lindernia*) เป็นพืชในวงศ์ Linderniaceae มีชื่อในภาษาไทยว่า แว่วโล เป็นพืชสกุลเดียวกับแววมยุรา (*Torenia*) จากการสำรวจในประเทศไทย พบว่ามีพืชในสกุล *Lindernia* 32 ชนิด (Smitinand, 1990) พืชสกุล *Lindernia* โดยทั่วไปเป็นดิพลอยด์ (diploid) ซึ่งจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันไป เท่าที่มีรายงานพบว่า มีจำนวนโครโมโซม $2n = 28$, $2n = 32$ และ $2n = 42$ (Kostermans *et al.*, 1987; Shinha, 1987) พืชในสกุลลินเดอเนียมีลักษณะคล้ายวัชพืช จึงไม่มีการนำมาใช้ประโยชน์ ปัจจุบันมีการนำลินเดอเนียมาใช้เป็นไม้ดอก ลินเดอเนียที่นำมาใช้เป็นไม้ดอกทางการค้า คือ *Lindernia grandiflora* Nutt. โดยลักษณะเด่นของลินเดอเนียคือ ทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี เจริญเติบโตได้ทั่วไปตามธรรมชาติ และพบว่าเป็นพืชที่ทนเค็มและทนแล้งได้ดี มีการออกดอกตลอดปี ดอกมีลักษณะคล้ายแววมยุราซึ่งเป็นไม้ดอกที่กำลังได้รับความนิยมชนิดหนึ่ง แต่ดอกมีขนาดเล็กกว่ามาก และยังไม่เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยใช้สารเคมีจำพวกสารโคลชิซิน

ในปัจจุบันนั้นมีการนำมาใช้กัน จากการทดลองของ Angelo *et al.* (2014) ได้ทำการทดลองใช้สารโคลชิซินและสาร oryzalin ในต้น Hebe 'Oratia Beauty' พบว่าสารสามารถชักนำให้เกิดต้นเตตระพลอยด์ มีลำต้นที่หนาขึ้นมีข้อปล้องที่หดรัดลง Boonbongkarn (2013) ทำการทดลองชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในแววมยุราพื้นเมือง (*Torenia fournieri*) ด้วยสารโคลชิซินชนิดเม็ดพบว่า ได้ต้นแววมยุราที่เป็นต้นเตตราพลอยด์

มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดน้อย เมล็ดฝ่อ หรือการผสมตัวเองไม่ติด ซึ่งถือได้ว่าเป็นประโยชน์อย่างหนึ่งเพราะทำให้ดอกบานนานและเหี่ยวแห้งช้า การทดลองนี้จึงเป็นประโยชน์ในการสร้างความหลากหลายให้ขนาดลำต้น ใบ ดอก ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของลินเดอเนีย อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมที่มีศักยภาพในการพัฒนาพันธุ์พืชในสกุลนี้ต่อไปได้ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชที่ใช้ทำการทดลองคือ ต้นลินเดอเนียความสูง 5–20 เซนติเมตร ลักษณะลำต้นเหลี่ยม เลื้อยตามพื้นดิน ใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามใบมีรูปร่างรูปหอกเรียว กว้าง 5–7 มิลลิเมตร ยาว 15–25 มิลลิเมตร ปลาย

ใบมน ขอบใบเรียบ ใบมีขนทั้งสองด้าน โดยเฉพาะที่ผิวใบด้านบน ด้านล่างมีขนกระจายทั่วทั้งแผ่นใบ แต่มีมากบริเวณเส้นใบ ก้านใบยาว 1–5 มิลลิเมตร ดอกเดี่ยวออกดอกที่ซอกใบ ก้านดอกยาว 4–18 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยงเชื่อมกันเป็นถ้วย ปลายแยกเป็น 5 แฉก ผิวด้านนอกมีขน กลีบดอกรูปปากเปิดสีม่วงขาว ส่วนฐานเชื่อมกันเป็นหลอด กลีบปากบน 1 กลีบ ส่วนปลายแยกเล็กน้อย กลีบปากล่าง 3 กลีบ เกสรเพศผู้มีสองคู่ยาวไม่เท่ากัน เกสรเพศผู้ขนาดสั้นอยู่บริเวณฐานกลีบปากบน เกสรเพศผู้ขนาดยาวอยู่สลับบนฐานของแฉกกลีบปากล่าง เกสรเพศเมียเรียงไขว้อยู่เหนือวงกลีบรูปรี มีฐานฐานดอกรองรับ ก้านชูเกสรเป็นแท่งผลเป็นรูปแคบรูปชูล ยาว 3–4 มิลลิเมตร กว้าง 2–2.5 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยงหุ้มทั้งผล ปลายผลมีก้านเกสรเพศเมียและยอดเกสรเพศเมียติดอยู่ เมล็ดรูปกลมขนาดเล็กมีจำนวนมาก (Smitinand, 1990)

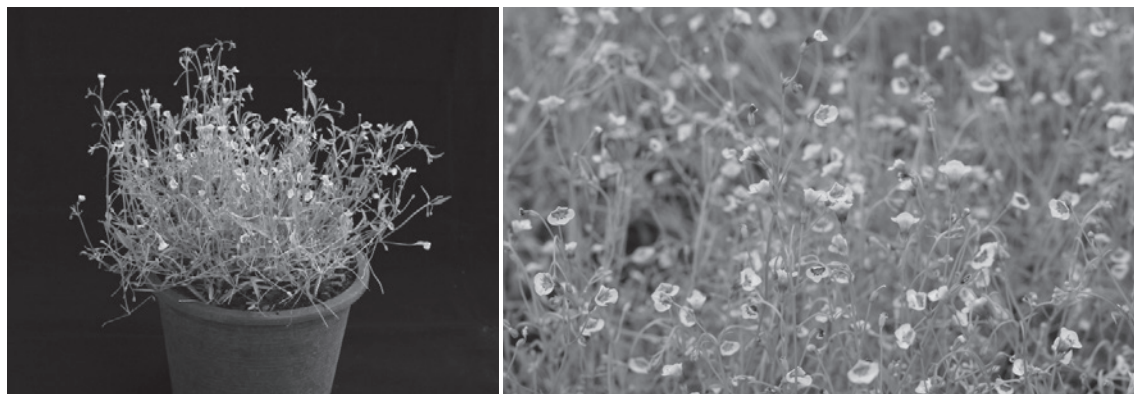


Figure 1 *Lindernia* sp.

ขั้นตอนการเตรียมสารละลายจากยาเม็ดโคลชิซิน

เตรียมสารละลายจากยาเม็ดโคลชิซิน โดยตัวยา 1 เม็ด ประกอบด้วยส่วนผสมของโคลชิซิน 0.6 มิลลิกรัม ทำการเตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ โดยยกตัวอย่างการเตรียมสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 15 ppm วิธีการเตรียมคือ 15 ppm คือ ยา 15 มิลลิกรัม ในตัวทำละลาย 1000 มิลลิตร (น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) ต้องการเตรียมยา 0.6 มิลลิกรัม

ต้องใช้ตัวทำละลาย $(1000/15) \times 0.6 = 40$ มิลลิลิตร ดังนั้น สารละลายความเข้มข้น 15 ppm มีตัวยา 0.6 มิลลิกรัม (ยา 1 เม็ด) ในตัวทำละลาย 40 มิลลิลิตร ในการทดลองเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 ppm แต่ละความเข้มข้นใช้ตัวทำละลาย 160 มิลลิลิตร ดังนั้นใช้เม็ดยาโคลชิซิน 1, 2, 3 และ 4 เม็ด จะได้ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 5, 10, 15 และ 20 ppm ตามลำดับ

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์

นำต้นลินเดอเนียที่มีอายุ 1 เดือนในสภาพปลอดเชื้อ ตัดส่วนของข้อไปแช่ในสารละลายโคลชิซินที่ ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 ppm จากนั้นนำไปแช่ยาด้วยเครื่องเขย่า ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน โดยทำการทดลองแบบ 5×3 Factorial in CRD มี 15 หน่วยทดลองแต่ละหน่วยทดลองมี 10 ข้ำ ข้ำละ 2 ชั้นพีช รวมทั้งหมด 150 ชั้นพีช เมื่อครบเวลาในการให้สารละลายโคลชิซินที่กำหนด ขั้วสารละลายโคลชิซินออก และย้ายลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS เพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ และมีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 30 วัน

การคัดเลือกต้นที่สันนิษฐานว่าจะเป็นโพลีพลอยด์

เมื่อต้นลินเดอเนียมีอายุ 30 วันหลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน คัดเลือกต้นที่สันนิษฐานว่าจะเป็นโพลีพลอยด์ โดยพีชจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ ใบมีสีเขียวเข้มขึ้น ขนาดใหญ่ และหนาขึ้น ขอบใบหยักชัดเจน ลำต้นหนา ปล้องสั้นลง และรากหนาขึ้น ย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS เป็นระยะเวลา 30 วัน จากนั้นบันทึก อัตราการรอดชีวิต จำนวนยอดที่ได้ในแต่ละหน่วยทดลอง ความสูงต้น ขนาดใบ จำนวนราก ความยาวราก และความถี่ของต้นที่คาดว่าจะโพลีพลอยด์

การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อวัดระดับพลอยดีของลินเดอเนียโดยวิธี Flow cytometry

นำใบของต้นลินเดอเนียจากต้นชุดควบคุมและต้นที่คาดว่าจะโพลีพลอยด์ จำนวนอย่างละ 1 ใบ วางลงบน plastic petridish สับตัวอย่างด้วยใบมีดที่คม หยดสารละลาย extraction buffer 500 ไมโครลิตร (Partec Cy stain UV ploidy, one step DAPI staining solution) จากนั้นกรองเอาส่วนสารละลายที่สกัดได้ใส่ใน celltrics disposable filtered ขนาด 30 ไมโครลิตร และนำไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อหา

ระดับพลอยดีโดยวิธี flow cytometry ด้วยเครื่อง Partec PA II

ผลการทดลองและวิจารณ์

อัตราการรอดชีวิตและจำนวนยอดจากการที่ขึ้นส่วนลินเดอเนียได้รับสารโคลชิซินในความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 ppm ระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน เป็นเวลา 30 วันบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS พบว่า หน่วยทดลองที่ได้รับสารโคลชิซิน 0 ppm เป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา หน่วยทดลองที่ได้รับสารโคลชิซิน 10 ppm เป็นระยะเวลา 1 วัน มีอัตราการรอดชีวิตคือ 50 เปอร์เซ็นต์ หน่วยทดลองที่ได้รับสารโคลชิซิน 15 ppm เป็นระยะเวลา 1 วัน มีอัตราการรอดชีวิตคือ 40 เปอร์เซ็นต์ หน่วยทดลองที่ได้รับสารโคลชิซิน 5 ppm เป็นระยะเวลา 2 วัน และ 20 ppm เป็นระยะเวลา 3 วัน มีอัตราการรอดชีวิตคือ 35 เปอร์เซ็นต์ หน่วยทดลองที่ได้รับสารโคลชิซิน 5 ppm เป็นระยะเวลา 1 วัน, 15 ppm เป็นระยะเวลา 2 วัน และ 5 ppm 3 วัน มีอัตราการรอดชีวิตคือ 30 เปอร์เซ็นต์ หน่วยทดลองที่ได้รับสารโคลชิซิน 20 ppm เป็นระยะเวลา 1 วัน, 10 ppm เป็นระยะเวลา 2 วัน และ 10 ppm เป็นระยะเวลา 3 วัน มีอัตราการรอดชีวิตคือ 25 เปอร์เซ็นต์ หน่วยทดลองที่ได้รับสารโคลชิซิน 20 ppm เป็นระยะเวลา 2 วัน มีอัตราการรอดชีวิตคือ 20 เปอร์เซ็นต์ และหน่วยทดลองที่ได้รับสารโคลชิซิน 15 ppm เป็นระยะเวลา 3 วัน มีอัตราการรอดชีวิตคือ 15 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า ความเข้มข้นต่ำและระยะเวลาในการแช่สารโคลชิซินน้อยทำให้มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้น สาเหตุที่ทำให้ต้นพีชมีอัตราการรอดชีวิตต่ำหรือเป็นต้นพีชไม่สามารถใช้งานได้มีสาเหตุมาจากชิ้นส่วนพีชไม่มีการเจริญเติบโต และชิ้นส่วนพีชมีการเจริญเติบโตปกติ แต่เป็นต้นพีชที่มีอาการฉ่ำน้ำ บวม และเป็นต้นพีชที่มีลักษณะใส จากการได้ทดลองตัดขึ้น

ส่วนพืชไปปลูกเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร 1/2 MS พบว่าพืชไม่มีการกลายสภาพกลับเป็นต้นพืชปกติได้จึงให้อาการต้นพืชฉ่ำน้ำนี้เป็นต้นพืชที่ไม่สามารถใช้ในการทดลองต่อไป จำนวนยอดของต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินระยะเวลา 3 วัน ให้จำนวนยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนพืชมากที่สุด 56 ยอด และต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน 15 ppm ระยะเวลา 3 วัน ให้จำนวนยอดน้อยที่สุดคือ 5 ยอด (Table 1) จากผลการทดลองทุกความเข้มข้น และทุกระยะเวลาที่ให้สารละลายโคลชิซินมีแนวโน้มว่าจะให้จำนวนยอดที่น้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน เนื่องจากเมื่อชิ้นส่วนพืชได้รับสารละลาย

โคลชิซินพืชได้รับสารพิษจึงทำให้มีการชะงักการเจริญเติบโต สอดคล้องกับการทดลองของ Sungkaew (2015) ได้ทำการทดลองให้สารละลายโคลชิซินในความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลาต่าง ๆ ในต้นลินเดอเนียในส่วนของการเพาะชำพบว่าความเข้มข้นที่มากขึ้นและระยะเวลาในการเพาะชำมากขึ้นทำให้อัตราการรอดชีวิตและจำนวนยอดลดลงตามลำดับดังเช่น Pinthong (2016) ได้ทำการทดลองให้สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 15 ppm เป็นระยะเวลาต่าง ๆ ในต้นแวมยูราพบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นจะทำให้มีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงตามลำดับ

Table 1 Survival rate and number of new shoots in *Lindernia* that were treated with different concentrations of colchicine for different durations and then cultured on semi-solid half-strength MS medium for 30 days *in vitro*

Colchicine concentration (ppm)	Durations (days)	Survival rate (%)	Number of new shoots (shoots)
0	1	100	34
	2	100	48
	3	100	56
5	1	30	10
	2	35	11
	3	30	17
10	1	50	46
	2	25	14
	3	25	18
15	1	40	21
	2	30	10
	3	15	5
20	1	25	20
	2	20	12
	3	35	21

ความสูงและความยาวปล้อง

ชิ้นส่วนของลินเดอเนียที่ได้รับสารโคลชิซินในความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 ppm ระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน บนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS พบว่า ในปัจจัยความเข้มข้น ความสูงของต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน 5, 10, 15 และ 20 ppm มีความสูง คือ 3.73, 3.54, 3.37 และ 3.54 เซนติเมตรตามลำดับ มีความสูงต่ำกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินคือ 0 ppm มีความสูง 5.96 เซนติเมตร แตกต่างกันทางสถิติ ในปัจจัยระยะเวลาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 2) ความยาวปล้องของต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน 5, 10, 15 และ 20 ppm มีความยาวปล้องคือ 1.39, 1.28, 1.10 และ 1.20 เซนติเมตร ตามลำดับ มีความยาวปล้องต่ำกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินคือ 0 ppm มีความยาวปล้อง คือ 2.07 เซนติเมตร แตกต่างกันทางสถิติ ในปัจจัยระยะเวลาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 2) ผลจากการทดลองข้างต้นสารโคลชิซินมีผลต่อการเจริญเติบโตในด้านความสูง และความยาวปล้องเป็นเพราะว่าต้นพืชอาจมีการชะงักการเจริญเติบโตเมื่อ

ได้รับสารโคลชิซิน สอดคล้องกับการทดลองของ Sungkaew (2015) ได้ทำการทดลองให้สารละลายโคลชิซินในความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลาต่าง ๆ ในต้นลินเดอเนียในส่วนของข้อพบว่า ความเข้มข้นที่มากขึ้น และระยะเวลาในการแช่สารมากขึ้นทำให้มีความยาวปล้องลดลง เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน แต่ในความสูงต้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน Pinthong (2016) ได้ทำการทดลองให้สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 15 ppm เป็นระยะเวลาต่าง ๆ ในต้นแวมยुरาพบว่า เมื่อระยะเวลาเพิ่มมากขึ้นจะทำให้ความสูง และความยาวปล้องมีค่าน้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน และ Boonbongkarn (2013) ได้ทดลองให้สารละลายโคลชิซินในต้นแวมยुरาพื้นเมืองพบว่า ความสูงของต้นมีแนวโน้มต่ำลงเมื่อมีความเข้มข้นและระยะเวลาที่มากขึ้น และ Angelo *et al.* (2014) ได้ทำการทดลองใช้สารโคลชิซินและสาร oryzalin ในต้น Hebe 'Oratia Beauty' พบว่าสารสามารถชักนำให้เกิดต้นเตตระพลอยด์ มีลำต้นที่หนาขึ้นมีข้อปล้องที่หดสั้นลง

Table 2 Mean plant height and internode length that were treated with different concentrations of colchicine for different durations and then cultured on semi-solid half-strength MS medium for 30 days *in vitro*

Treatment	Plant height (cm)	Internode length (cm)
A: concentrations of colchicine (ppm)		
0	5.96 ± 0.76 ^a	2.07 ± 0.47 ^a
5	3.73 ± 0.68 ^b	1.39 ± 0.31 ^b
10	3.54 ± 0.99 ^b	1.28 ± 0.46 ^b
15	3.37 ± 1.28 ^b	1.10 ± 0.42 ^b
20	3.54 ± 0.72 ^b	1.20 ± 0.45 ^b
F-test	*	*
B: durations (days)		
1	4.29 ± 1.53	1.73 ± 0.76
2	4.59 ± 1.50	1.53 ± 0.49
3	5.00 ± 1.35	1.54 ± 0.48
F-test	ns	ns
A x B	ns	ns

a, b Mean values in the same column followed by different superscripts are statistically different when compared using Duncan's Multiple Range Test

* Statistically significant difference at 95% confidence level.

ns No statistically significant difference at 95% confidence level.

ความยาวใบและความกว้างใบ

ชิ้นส่วนของลินเดอเนียที่ได้รับสารโคลชิซินในความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 ppm ระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน เป็นเวลา 30 วันบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS พบว่า ในปัจจัยความเข้มข้น ความยาวใบที่ 5, 10, 15 และ 20 ppm มีความยาวใบคือ 0.84, 0.70, 0.64 และ 0.74 เซนติเมตร ตามลำดับ ให้ความยาวใบต่ำกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินมีความแตกต่างกันทางสถิติ ในปัจจัยระยะเวลาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 3) และในปัจจัยความเข้มข้น ความกว้างใบที่ 5 และ 20 ppm มีความกว้างใบคือ 0.38 และ 0.30 เซนติเมตรตามลำดับ มีความแตกต่างกันทางสถิติกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน ในปัจจัยระยะเวลาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 3) จากผลการทดลองข้างต้นทำให้เห็นว่า เมื่อดันลินเดอเนียได้รับสารโคลชิซินจะ

ทำให้ใบมีการหดสั้นลง เนื่องจากสารละลายโคลชิซินไปชะงักการเจริญเติบโตในส่วนของใบและมีความเป็นพิษทำให้ใบมีลักษณะหงิกงอทำให้ใบสั้นลง และมีผลต่อความกว้างใบด้วย แต่หากนำไปออกปลูกในสภาพโรงเรือนจะทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของความกว้างใบได้มากขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Sungkaew (2015) ได้ทำการทดลองให้สารละลายโคลชิซินในความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลาต่าง ๆ ในต้นลินเดอเนียในส่วนของการแช่สารมากขึ้นทำให้มีความยาวใบลดลง และมีความกว้างใบเพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังเช่น Tungkajiwangkoon (2009) ได้ทดลองให้สารละลายโคลชิซินในต้นแววมยุราพบว่าลักษณะใบมีขนาดใหญ่ขึ้น มีความหนาเพิ่มขึ้น มีสีเขียวเข้ม ที่ความเข้มข้น 5 ppm ระยะเวลา 3 วัน

Table 3 Mean leaf length and leaf width that were treated with different concentrations of colchicine for different durations and then cultured on semi-solid half-strength MS medium for 30 days *in vitro*

Treatment	Plant height (cm)	Internode length (cm)
A: concentrations of colchicine (ppm)		
0	1.35 ± 0.32 ^a	0.22 ± 0.05 ^c
5	0.84 ± 0.24 ^b	0.38 ± 0.24 ^a
10	0.70 ± 0.27 ^b	0.25 ± 0.08 ^{bc}
15	0.64 ± 0.22 ^b	0.24 ± 0.07 ^{bc}
20	0.74 ± 0.35 ^b	0.30 ± 0.07 ^b
F-test	*	*
B: durations (days)		
1	0.89 ± 0.53	0.27 ± 0.15
2	1.03 ± 0.40	0.45 ± 0.07
3	1.11 ± 0.26	0.25 ± 0.06
F-test	ns	ns
A x B	*	ns

a, b, c Mean values in the same column followed by different superscripts are statistically different when compared using Duncan's Multiple Range Test

* Statistically significant difference at 95% confidence level.

ns No statistically significant difference at 95% confidence level.

จำนวนรากและความยาวราก

ชิ้นส่วนของลินเดอเนียที่ได้รับสารโคลชิซินในความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 ppm ระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน บนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS พบว่า จำนวนรากในปัจจัยความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 5 และ 10 ppm มีจำนวนรากคือ 7.50 และ 6.45 รากตามลำดับ ให้จำนวนรำน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินคือ 0 ppm มีจำนวนรากคือ 10.40 รากแตกต่างกันทางสถิติในปัจจัยระยะเวลาเมื่อแช่สารเป็นเวลา 1 และ 2 วัน มีจำนวนรากคือ 8.08 และ 7.52 รากตามลำดับ ให้จำนวนรำน้อยกว่าต้นที่แช่สารเป็นเวลา 3 วัน มีจำนวนรากคือ 11.56 ราก แตกต่างกันทางสถิติ (Table 4) ความยาวรากในปัจจัยความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 10 และ 15 ppm มี

ความยาวรากคือ 1.53 และ 1.35 เซนติเมตร ตามลำดับ ให้ความยาวรำน้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินคือ 0 ppm มีความยาวรากคือ 2.18 เซนติเมตร ในปัจจัยระยะเวลาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 4) จากผลการทดลองข้างต้นทำให้เห็นว่า เมื่อชิ้นส่วนลินเดอเนียได้รับสารโคลชิซินจะทำให้มีจำนวนรากและความยาวรากลดลง อาจเป็นผลมาจากความเป็นพิษของสารโคลชิซินทำให้มีการเจริญในส่วนรากลดลง เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน สอดคล้องกับการทดลองของ Sungkaew (2015) ได้ทำการทดลองให้สารละลายโคลชิซินในความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลาต่าง ๆ ในต้นลินเดอเนียในส่วนของการปักชำ พบว่า ทำให้มีจำนวนรากและความยาวรากลดลงแตกต่างกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน Pinthong (2016) ได้ทำการทดลองให้สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น

15 ppm เป็นระยะเวลาต่าง ๆ ในต้นแววมยุราพบว่า ความยาวรากไม่แตกต่างทางสถิติกับต้นที่ไม่ได้รับสาร เมื่อระยะเวลาเพิ่มมากขึ้นจะทำให้มีจำนวนรากและ โคลชิซินแตกต่างกับการทดลองข้างต้น

Table 4 Mean number of roots and Root length that were treated with different concentrations of colchicine for different durations and then cultured on semi-solid half-strength MS medium for 30 days *in vitro*

Treatment	Plant height(cm)	Internode length (cm)
A: concentrations of colchicine (ppm)		
0	10.40 ± 3.27 ^a	2.18 ± 0.46 ^a
5	7.50 ± 3.68 ^{bc}	1.65 ± 0.30 ^{ab}
10	6.45 ± 4.12 ^c	1.53 ± 0.54 ^c
15	8.33 ± 3.52 ^{abc}	1.35 ± 0.33 ^c
20	9.54 ± 4.72 ^{ab}	2.11 ± 1.77 ^a
F-test	*	*
B: durations (days)		
1	8.08 ± 3.78 ^b	1.75 ± 0.61
2	7.20 ± 3.22 ^b	2.04 ± 1.18
3	11.56 ± 3.54 ^a	1.94 ± 0.54
F-test	*	ns
A x B	*	*

a, b, c Mean values in the same column followed by different superscripts are statistically different when compared using Duncan's Multiple Range Test

* Statistically significant difference at 95% confidence level.

ns No statistically significant difference at 95% confidence level.

จำนวนต้นที่คาดว่าจะเป็ โพลีพลอยด์และลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปที่เกิดขึ้น

จากการที่ชิ้นส่วนลินเดอเนียได้รับสารโคลชิซินในความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 ppm ระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน บนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS พบว่า ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดต้นที่คาดว่าจะเป็ โพลีพลอยด์ได้โดยความเข้มข้นที่ 20 ppm ระยะเวลา 3 วัน, ความเข้มข้นที่ 5 ppm ระยะเวลา 3 วัน และความเข้มข้นที่ 10 ppm ระยะเวลา 1 วันสามารถชักนำให้เกิดต้นที่คาดว่าจะเป็ โพลีพลอยด์ได้มากถึง 5 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น (Table 5) จากการคัดเลือกต้นที่คาดว่าจะเป็ โพลีพลอยด์จะพบ

ว่า ต้นจะมีความหนาของลำต้นมากกว่า ความสูงของต้นต่ำกว่า มีใบที่หัดสั้นลงและมีลักษณะหงิกงอ แตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (Figure 2, 3 และ 4) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sungkaew (2015) ได้ทำการทดลองให้สารละลายโคลชิซินในความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลาต่าง ๆ ในต้นลินเดอเนีย จะทำให้มีต้นที่เป็ โพลีพลอยด์ในทุกความเข้มข้น Pinthong (2016) ได้ทำการทดลองให้สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 15 ppm เป็นระยะเวลาต่าง ๆ ในต้นแววมยุราพบว่า ระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินมีผลทำให้เกิดต้นที่เป็ โพลีพลอยด์ในระยะเวลา 12 ชั่วโมง และ

48 ชั่วโมง Jiranapapan (2011) ได้ทำการทดลอง พบว่า ในทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดต้นให้สารละลายโคลชิซินในต้นแววมยุราลูกผสม โพลีพลอยด์ได้เช่นเดียวกัน

Table 5 Number of expected polyploid in *Lindernia* that were treated with different concentrations of colchicine for different durations and then cultured on semi-solid half-strength MS medium for 30 days *in vitro*

Colchicine concentration (ppm)	Durations (days)	Number of new shoots (shoots)
0	1	0
	2	0
	3	0
5	1	3
	2	3
	3	5
10	1	5
	2	4
	3	4
15	1	4
	2	3
	3	3
20	1	2
	2	2
	3	5

Figure 2 *Lindernia* that were treated colchicine 1 days concentrations 0 ppm (A), 5 ppm (B), 10 ppm (C), 15 ppm (D) และ 20 ppm (E) and then cultured on semi-solid half-strength MS medium for 30 days *in vitro*

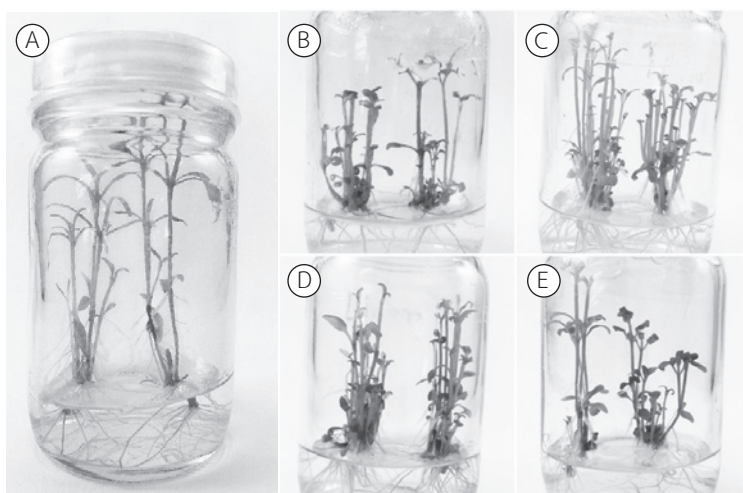


Figure 3 Lindernia that were treated colchicine 2 days concentrations 0 ppm (A), 5 ppm (B), 10 ppm (C), 15 ppm (D) และ 20 ppm (E) and then cultured on semi-solid half-strength MS medium for 30 days *in vitro*

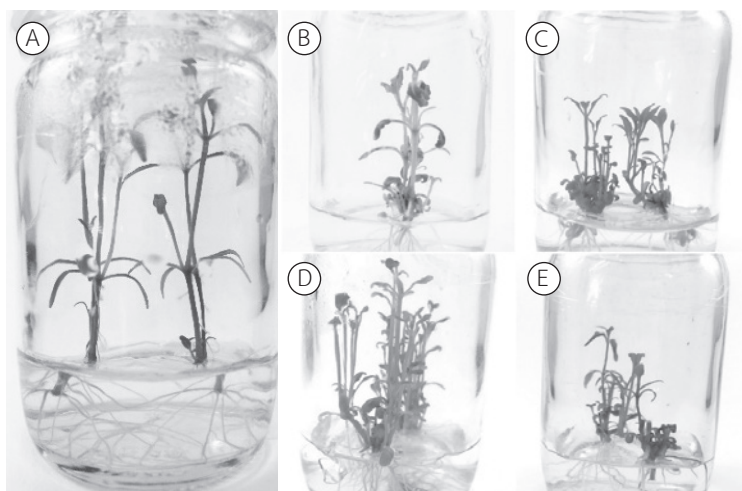
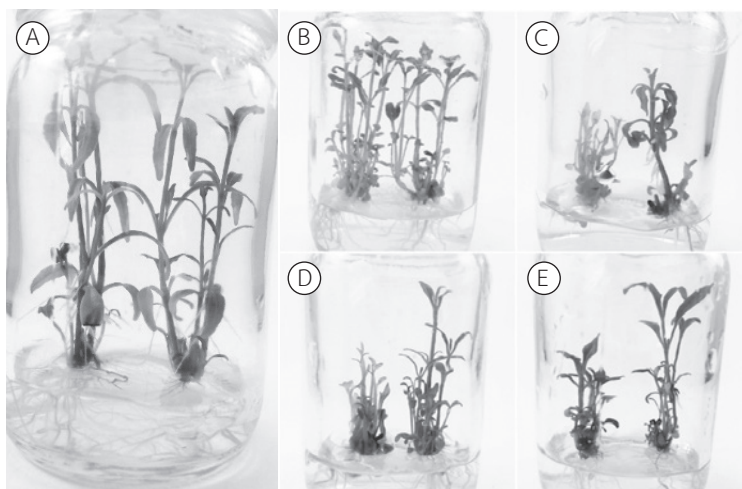


Figure 4 Lindernia that were treated colchicine 3 days concentrations 0 ppm (A), 5 ppm (B), 10 ppm (C), 15 ppm (D) และ 20 ppm (E) and then cultured on semi-solid half-strength MS medium for 30 days *in vitro*



ผลการตรวจสอบลักษณะโพลีพลอยด์ด้วยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อวัดระดับพลอยดีของลินเดอเนีย โดยวิธีการ Flow cytometry

จากการสุ่มตัวอย่างต้นที่คาดว่าโพลีพลอยด์ไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อวัดระดับพลอยดีของลินเดอเนีย โดยวิธีการ Flow cytometry พบว่าต้นชุดควบคุมหรือต้นดิพลอยด์ ($2n = 2x$) จะมี peak

ตำแหน่งสูงสุดที่ 200 ต้นที่มีระดับพลอยดีเป็นเตตระพลอยด์ ($2n = 4x$) จะมี peak ตำแหน่งสูงสุดที่ 400 เช่นในต้นที่ให้สารละลายโคลชิซิน 5 ppm ที่ระยะเวลา 2 วัน (Figure 5) สอดคล้องกับการทดลองของ Angelo *et al.* (2014) ทำการทดลองใช้สารโคลชิซิน ในต้น Hebe 'Oratia Beauty' พบว่าสารสามารถชักนำให้เกิดต้นเตตระพลอยด์ได้

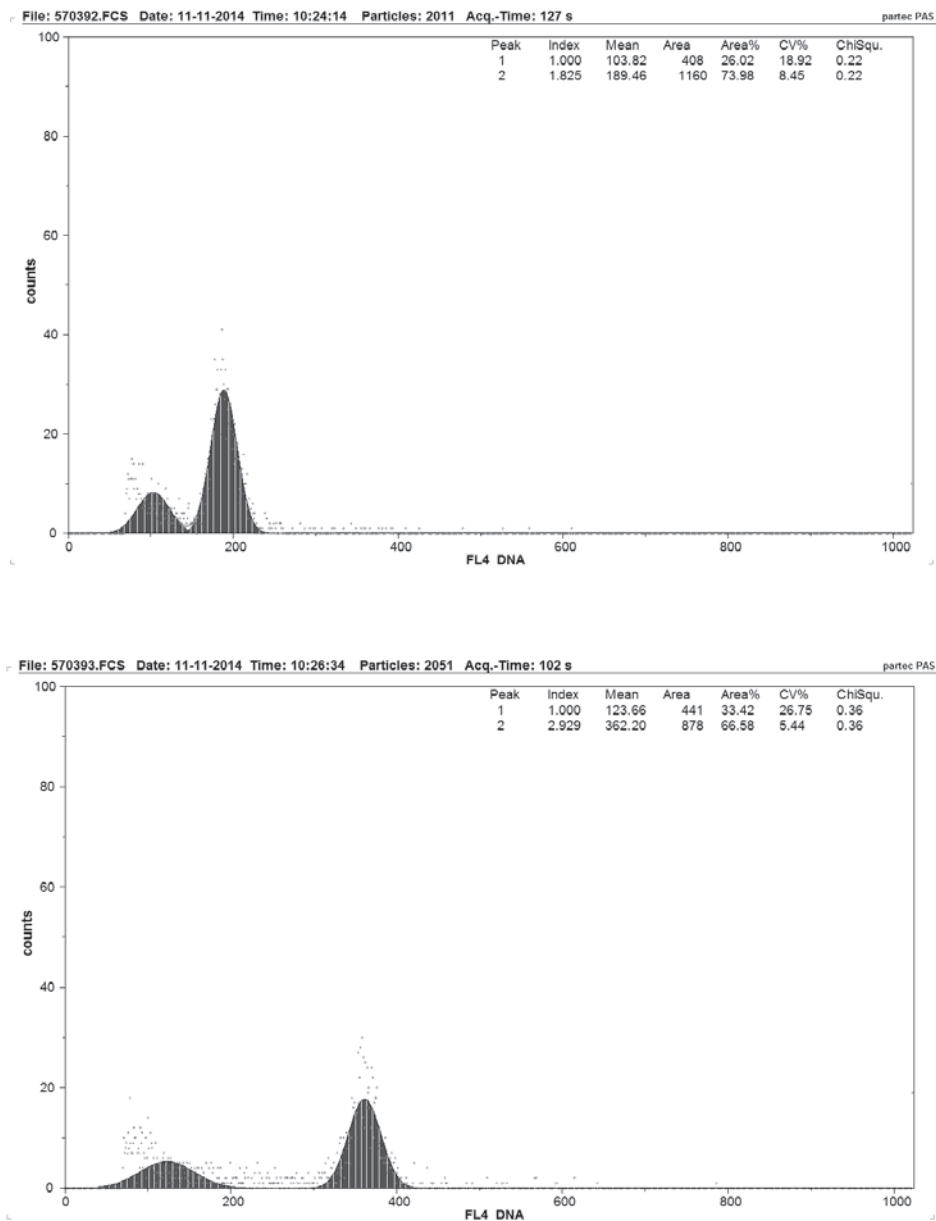


Figure 5 Flow cytometric analysis on DNA contents of *Lindernia* sp. (A) control diploid (B) tetraploid

สรุป

จากการทดลองขึ้นส่วนพืชในส่วนของข้อของต้นลินเดอเนียเมื่อได้รับสารละลายโคลชิซินในความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลาต่าง ๆ ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตและจำนวนยอดต่ำ จะเห็นได้ชัดเจนในความเข้มข้นที่ 15 ppm ระยะเวลา 3 วัน อัตราการรอดชีวิตเพียง 15 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอดที่เกิดขึ้นได้ 5 ยอด ในส่วนของความสูงและความยาวปล้อง และความยาวใบลดลงเห็นได้ชัดในทุกความเข้มข้น ความกว้างใบเมื่อได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 5 ppm และ 20 ppm ทำให้ความกว้างใบต่ำกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน จำนวนราก

เห็นได้ชัดในต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน 5 ppm และ 10 ppm ทำให้มีรากสั้นลง และความยาวรากสารละลายโคลชิซินมีผลคือ มีจำนวนรากลดลง ในความเข้มข้น 10 ppm และ 15 ppm เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และจากการคัดเลือกต้นที่คาดว่า เป็นโพลีพลอยด์จะพบว่าต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน จะมีความหนาของลำต้นมากกว่า ความสูงของต้นต่ำกว่า มีใบที่หดรัดสั้นลงและมีลักษณะหงิกงอ ในทุกความเข้มข้นแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และต้นที่ให้สารละลายโคลชิซิน 5 ppm ที่ระยะเวลา 2 วัน ให้ต้นที่มีระดับพลอยดีเป็นเตตระพลอยด์ ($2n = 4x$)

เอกสารอ้างอิง

- Angelo, G., A. Hunterb and G.C. Douglass. 2014. Polyploid induction *in vitro* using colchicine and oryzalin on Hebe 'Oratia Beauty': Production and characterization of the vegetative traits. Sci. Hortic. 179: 59–66.
- Boonbongkarn, S. 2013. Polyploid Induction in Native *Torenia* (*Torenia fournieri*) using Colchicine Tablets. MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Jiranapapan, J. 2011. Poliploid Induction in *Torenia* Hybrids (*Torenia fournieri* × *Torenia baillonii*) and Yellow Flower Mutant *Torenia* using Colchicine Tablets. MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Kostermans, A.J.G.H. and G. Tjitrosoepomo. 1987. *Lindernia crustacea* – Plantwise Technical Factsheet. Available Source: <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=30864.html>, August 25, 2015.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473–497.
- Pinthong, S. 2016. Polyploid Induction of *In Vitro* *Torenia* Hybrids (*Torenia fournieri* × *Torenia asiatica*) using Colchicine Tablets. Special problem of master degree. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University. (in Thai)
- 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.
- Sungkaew, K. 2015. Poliploid Induction in *In Vitro* *Lindernia* sp. using Colchicine Tablets. MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Tungkajiwangkoon, S. 2009. Polyploid Induction in *Torenia* using Colchicine Tablets. MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)