การชักนำให้เกิดความผันแปรทางสัณฐานวิทยาของซานาดูด้วยสารโคลชิซิน
Colchicine-Induced Variation in Xanadu (*Philodendron bipinnatifidium 'Xanadu'*)

นางสาวนูรีฮัน เจ๊ะแวสุหลง[1] นูซีตา อาแว[1] และ ราฮีมา วาแมดีซา[1]*
Nurihan Chewaesulong[1], Nuseeta Awae[1] and Raheema Wamaedeesa[1]*

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดความผันแปรทางสัณฐานวิทยาของซานาดูด้วยสารโคลชิซิน โดยเปรียบเทียบวิธีการที่ชิ้นส่วนได้รับสารโคลชิซิน 2 วิธี วิธีแรกนำชิ้นส่วนซานาดูแช่ในสารโคลชิซิน. โดยนำชิ้นส่วนซานาดูแช่ในสารโคลชิซินความเข้มข้น 2.4 และ 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige & Skoog,1962) และเพาะชิ้นส่วนซานาดูบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซิน 2.4 และ 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 45 วัน พบว่าชิ้นส่วนมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ในทุกทรีตเมนต์ ซานาดูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ผสมสารโคลชิซินความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุดคือ 3.15 เซนติเมตร การแช่ชิ้นส่วนในสารโคลชิซินความเข้มข้น 2.4 มิลลิกรัม/ลิตร ให้จำนวนใบ และจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด คือ 9.00 ใบ และ 4.87 ตามลำดับ เมื่อย้ายปลูกในโรงเรือนนาน 30 วัน พบว่าอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซินความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ความสูงต้นเฉลี่ยมากที่สุดคือ 3.52 เซนติเมตร นอกจากนี้พบว่าต้นซานาดูที่แช่ในสารโคลชิซินความเข้มข้น 2.4 มิลลิกรัม/ลิตร มีความกว้างใบเฉลี่ยมากที่สุดคือ 1.52 เซนติเมตร อย่างไรก็ตามพบว่าการเติมโคลชิซินในอาหารหรือการแช่โคลชิซินส่งผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนใบ และจากการศึกษาลักษณะของปากใบพบว่าต้นซานาดูที่แช่ในสารโคลชิซินความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร และต้นซานาดูที่เพาะบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซินความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งผลให้เซลล์คุมมีขนาดใหญ่กว่า แต่มีความหนาแน่นน้อยกว่าเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน

คำสำคัญ: โคลชิซิน ซานาดู การเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อพืช

Abstract

The morphological induction of Xanadu was studied by colchicine. Colchicine was prepared in two ways including colchicine solution for soaking of Xanadu explant and colchicine added in MS medium. After cultured 45 days, all treatments showed a 100% survival rate for Xanadu explants. MS media added 4.8 mg/l colchicine showed average highest shoot length (3.15 cm.) whereas soaked by 2.4 mg/l colchicine showed highest number of leaf and root (9.00 leaves and 4.87 roots, respectively)

[1]คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์
[1]Faculty of Agriculture; Princess of Naradhiwas University
* Corresponding author: raheema.w@pnu.ac.th

After hardening in greenhouse for 30 days, it was found that MS added 4.8 mg/l gave highest shoot length (3.52 cm.) whereas soaked by 2.4 mg/l colchicine showed highest leaf width (1.52 cm.). However, added colchicine in MS media or soaked in colchicine solution resulted inhibiting leaf number. Regarding both size and density of guard cells, it was found that soaked in colchicine 4.8 mg/l and 4.8 mg/l colchicine added MS medium gave highest length of guard cell and lowest density of stomata compared to control.

Keywords: Colchicine, Xanadu, Plant tissue culture

บทนำ (Introduction)

ปัจจุบันไม้ดอกไม้ประดับหลายสายพันธุ์เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะพืชที่มีลักษณะที่ต่างไปจากเดิม เช่น การเกิดใบด่าง ขนาดต้นหรือใบที่ใหญ่หรือเล็กกว่าปกติ กำลังได้รับความนิยม ฟิโลเดนดรอนซานาดู (*Philodendron bipinnatifidium 'Xanadu'*) เป็นไม้ประดับที่อยู่ในวงศ์ Araceae จัดเป็นไม้ตัดใบชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยม เนื่องจากมีใบที่สวยงาม ใบสีเขียวเข้มเป็นมัน ริมขอบใบเว้าลึกเกือบถึงเส้นกลางใบ บริเวณรอยต่อระหว่างก้านใบกับตัวแผ่นใบมีสีม่วงแดง พุ่มต้นกว้างประมาณ 1.0-1.2 เมตร ต้นโตเต็มที่สูงประมาณ 60-80 เซนติเมตร เป็นพืชที่ชอบความชื้นสูง ไม่ชอบแสงแดดจัด จึงเหมาะที่จะปลูกเป็นไม้กระถางตกแต่งภายในอาคาร หรือปลูกลงดินเพื่อตกแต่งสวนหรือใช้ใบ ที่สำคัญยังช่วยฟอกอากาศและดูดสารพิษในบ้านได้อีกด้วย ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ซานาดูให้เกิดลักษณะใหม่ๆ จึงนับว่าเป็นการสร้างโอกาสในการขยายตลาดของซานาดูได้อีกทางหนึ่ง

การทำให้เกิดการกลายพันธุ์มีทั้งปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอก โดยปัจจัยภายในจะเป็นการกลายที่เกิดจากความผิดปกติภายในจีโนมของพืชเอง ส่วนใหญ่เกิดจากความผิดพลาดในการจำลองดีเอ็นเอรีคอมบิเนชัน และการซ่อมแซม การขาดหรือการเพิ่มของชิ้นส่วนดีเอ็นเอทำให้พืชสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ผิดปกติหรือเกิดจากปฏิกิริยาของ transposable element หรือ mutator gene และปัจจัยภายนอกมักเกิดจากการขาดธาตุอาหารบางชนิด การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างกะทันหันหรือรังสีที่มีอยู่ในธรรมชาติ และยังมีสารเคมีหลายชนิดที่สามารถกระตุ้นให้เกิดกลายพันธุ์ เช่น สารเคมีที่มีหมู่อัลคีน สารเคมีที่มีโมเลกุลคล้ายเบส (base analogues) และสารโคลชิซิน เป็นต้น Pensuriya et al. (2016) ได้ศึกษาผลของสารละลายโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปของลินเดอเนียพบว่าชิ้นส่วนข้อของต้นลินเดอเนียเมื่อได้รับสารละลายโคลชิซินทำให้ จำนวนยอด ความกว้างใบ และจำนวนราก น้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับโคลชิน นอกจากนี้ Balla & Taychasinpitak (2017) ได้ศึกษาผลของสารโคลชิซินที่ทำให้มันเทศประดับในสภาพปลอดเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับชุดของโครโมโซม พบว่ามันเทศประดับใบหยักที่แช่โคลชิซีนความเข้ม 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 2 วัน และ มันเทศประดับใบหยักลึกที่แช่โคลชิซีนระดับความเข้ม 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 2 วัน สามารถชักนำให้เกิด mixoploid คือ ภายในต้นเดียวกันมีเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกัน

ในการปรับปรุงพันธุพืชนิยมใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วย เพื่อการทดสอบต้นพันธุ์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีหรือรังสี ดังนั้นในการทดลองนี้จึงศึกษาการใช้สารเคมีโคลชิซินเพื่อกระตุ้นการเกิดความแปรปรวน

ทางพันธุกรรมในสภาพปลอดเชื้อ อันจะส่งผลให้เกิดลักษณะรูปร่างของต้นซานาดูที่แตกต่างจากต้นเดิม และสามารถทำการคัดเลือกพันธุ์ที่แสดงลักษณะดีต่อไปได้

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)

1. การเตรียมสารละลายโคลชิซินสำหรับการแช่ชิ้นส่วนพืช

นำยารักษาโรคเก๊าท์ ชื่อสามัญโคลชิซิน (Acarpia Farmaceutici Srl) ที่มีปริมาณสารโคลชิซิน 0.6 มิลลิกรัม จำนวน 1 เม็ด มาละลายในน้ำปริมาณ 250 มิลลิลิตร และ 125 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้โคลชิซินความเข้มข้น 2.4 และ 4.8 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การเตรียมอาหารสูตร MS สำหรับเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่ผ่านการแช่โคลชิซิน

ดูดสารสต็อกของสูตรอาหาร MS ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำตาล 30 กรัม ปรับ pH 5.8 เติมวุ้น นำไปต้มให้เดือดแล้วทำการกรอกอาหารใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและปิดฝาให้สนิท และนำขวดอาหารมาทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 25 นาที

3. การเตรียมอาหารผสมสารโคลชิซิน

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ผสมสารโคลชิซินความเข้มข้น 2.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 4.8 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. การชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม

4.1 วิธีการชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยการแช่

นำโคนซานาดูที่ทำการตัดรากและใบ โดยเหลือใบไว้ต้นละ 3 ใบ ไปแช่ในสารโคลชิซินที่มีความเข้ม 0, 2.4 และ 4.8 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 10 ซ้ำๆ ละ 1 ขวดๆ ละ 5 ชิ้น เมื่อครบเวลานำชิ้นส่วนซานาดูที่แช่ในสารโคลชิซินมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เตรียมไว้ตามข้อ 2 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 45 วัน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 7 วัน

4.2 วิธีการชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยผสมโคลชิซินในอาหาร

นำโคนซานาดูมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารโคลชิซินปริมาณความเข้มข้น 2.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 4.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลอง 10 ซ้ำๆ ละ 1 ขวด ๆ ละ 5 ชิ้น ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 45 วัน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 7 วัน

4.3 วิธีการศึกษาลักษณะปากใบ

เลือกใบอ่อนของแต่ละสิ่งทดลอง ตัดให้มีขนาด 1 ตารางเซนติเมตร หลังจากนั้นบี้ให้ใบแผ่ขยายจนบาง นำไปวางบนแผ่นสไลด์ หยดน้ำกลั่น 1-2 หยด แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์นำไปส่องกับกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 100 เท่า บันทึกภาพที่ได้

ผลการทดลอง (Results)

1. ผลของโคลชิซินต่อการรอดชีวิตของชิ้นส่วนซานาดู

จากการแช่ชิ้นส่วนซานาดูในสารโคลชิซินความเข้มข้น 2.4 และ 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige & skoog, 1962) และจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซินความเข้มข้น 2.4 และ 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นระยะเวลา 45 วัน พบว่าทุกสิ่งทดลองให้อัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ (Table 1)

Table 1 The effect of Colchicine on survival percentage of *Xanadu* explant after cultured for 45 days

Treatments	Colchicine concentration (mg/L)	Duration (hrs)	Survival percentage (%)
Soaked in water for 24 hrs	0	0	100
Soaked	2.4	24	100
Soaked	4.8	24	100
added in MS media	2.4	0	100
Added in MS media	4.8	0	100

2. ผลของสารโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตของต้นซานาดูเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

หลังจากเพาะเลี้ยงต้นซานาดูในสภาพปลอดเชื้อนาน 14 วัน พบว่าทุกต้นในทุกการทดลองเริ่มมีการแตกใบใหม่ และเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 28 วัน พบว่ามีความสูงต้นเพิ่มขึ้น หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 45 วัน พบว่ามีจำนวนใบเพิ่มขึ้นและใบมีขนาดใหญ่ขึ้น (Figure 1)

T1 1 d T1 14 d T1 28 d T1 45 d

Figure 1 Growth and development of Xanadu shoot after cultured for 1, 14, 28 and 45 days

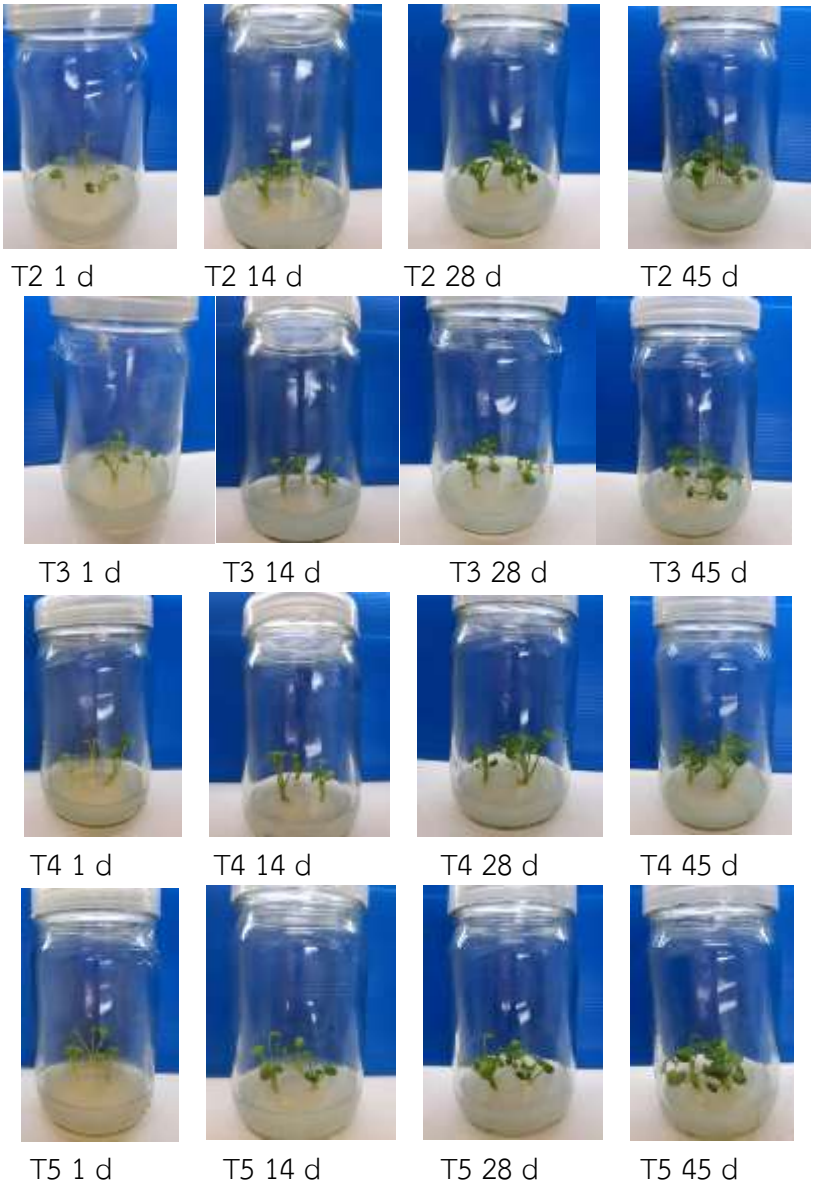


Figure 1 (Continued)

พิจารณาการเจริญเติบโตของต้นซานาดูหลังเพาะเลี้ยงนาน 45 วัน และนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า การแช่ชิ้นส่วนซานาดูเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนซานาดูบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ มีอิทธิพลต่อความสูงของต้น แต่ไม่มีอิทธิพลต่อจำนวนใบ และจำนวนราก

2.1 ความสูงของต้นซานาดู

ความสูงของต้นซานาดูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซินความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุดคือ 3.15 เซนติเมตร แต่ไม่แตกต่างกับต้นซานาดูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซินความเข้มข้น 2.4 มิลลิกรัม/ลิตร มีความสูงเฉลี่ยที่ 3.11 เซนติเมตร รองลงมาคือชิ้นส่วนซานาดูที่แช่ในสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร ชุดควบคุม และ ชิ้นส่วนซานาดูที่แช่ในสารโคลชิซิน

ความเข้มข้น 2.4 มิลลิกรัม/ลิตร มีความสูงเฉลี่ยที่ 2.68, 2.57 และ 2.41 เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 2 และ Figure 2)

2.2 จำนวนใบของต้นซานาดู

จำนวนใบของต้นซานาดูในทุกวิธีการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าต้นจากชิ้นส่วนที่แช่แช่ในสารโคลชิซินความเข้มข้น 2.4 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุดที่ 9.00 ใบ แต่ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม ชิ้นส่วนซานาดูที่แช่ในสารโคลชิซิน 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร ชิ้นส่วนซานาดูที่เพาะบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซิน 2.4 และ 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมีจำนวนใบเฉลี่ย 8.47, 8.20, และ 7.80 ใบตามลำดับ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2)

2.3 จำนวนรากของต้นซานาดู

จำนวนรากของต้นซานาดูในทุกวิธีการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าต้นจากชิ้นส่วนที่แช่ในสารโคลชิซินความเข้มข้น 2.4 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดที่ 4.87 แต่ไม่แตกต่างกับชิ้นส่วนซานาดูที่เพาะบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซิน 2.4 มิลลิกรัม/ ชิ้นส่วนซานาดูที่เพาะบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซิน 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร และชิ้นส่วนซานาดูที่แช่ในสารโคลชิซิน 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมีจำนวนรากเฉลี่ยที่ 4.13, 3.67 และ 3.33 ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 The effect of Colchicine on growth of *Xanadu* explant after cultured for 45 days

สิ่งทดลอง	Colchicine concentration (mg/L)	Duration (hrs)	Average shoot height (cm)	Average leave number (leave)	Average root number (roots)
Soaked in water for 24 hrs	0	0	2.57±0.13 [b]	8.00±0.76	3.67±1.23
Soaked	2.4	24	2.41±0.48 [b]	9.00±1.00	4.87±1.51
Soaked	4.8	24	2.68±0.19 [b]	8.47±0.91	3.33±1.05
added in MS media	2.4	0	3.11±0.17 [a]	8.20±0.86	4.13±1.73
Added in MS media	4.8	0	3.15±0.28 [a]	7.80±0.56	3.67±0.90
F-test			**	ns	ns
C.V. (%)			7.89	7.49	24.39

ns = non-significant differences

** = statistically highly significant as $P < 0.01$

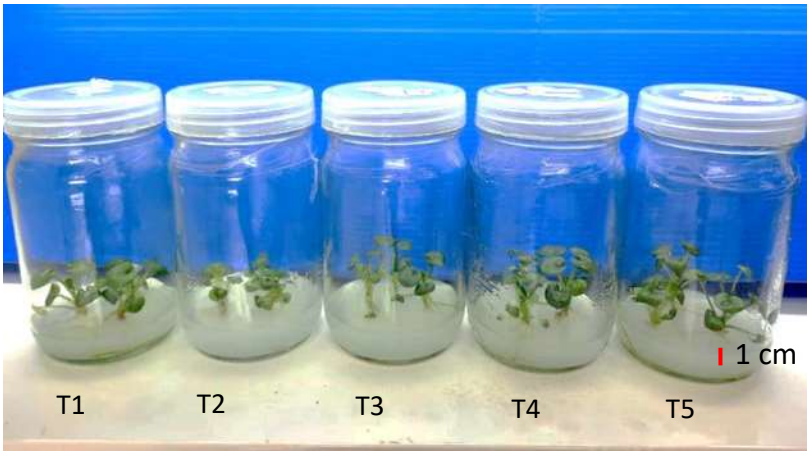


Figure 2 The growth of *Xanadu* shoot after cultured for 45 days, T1 Soaked in water for 24 hrs, T2 soaked in 2.4 mg/L colchicine, T3 soaked in 4.8 mg/L colchicine, T4 2.4 mg/L colchicine added in MS medium, T5 4.8 mg/L colchicine added in MS medium (Scale bar = 1 cm)

3. ผลของสารโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตของต้นซานาดูหลังจากย้ายปลูกในโรงเรือน 30 วัน

หลังการเพาะเลี้ยงซานาดูในสภาพปลอดเชื้อนาน 45 วัน ได้ทำการย้ายต้นไปปลูกในโรงเรือน หลังจากปลูกนาน 30 วัน ได้บันทึกการเจริญเติบโตและนำข้อมูลไปวิเคราะห์ พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซิน 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุดคือ 3.52 เซนติเมตร ใบของต้นซานาดูชุดควบคุม มีจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุดคือ 6.53 ใบ และความกว้างใบของต้นซานาดู ที่แช่ในสารโคลชิซินความเข้มข้น 2.4 มิลลิกรัม/ลิตร มีความกว้างใบเฉลี่ยมากที่สุดคือ 1.52 เซนติเมตร (Table 3 และ Figure 3)

Table 3 The effect of Colchicine on growth of Xanadu explant after cultured for 30 days

Treatments	Colchicine concentration	Duration	Average shoot height (cm)	Average leave number (leave)	Average leave width (cm)
Soaked in water for 24 hrs	0	0	3.26±0.40	6.53±1.25	1.44±0.18
Soaked	2.4	24	3.40±0.34	5.73±1.16	1.52±0.20
Soaked	4.8	24	3.05±0.32	5.93±1.22	1.31±0.19
added in MS media	2.4	0	3.33±0.58	5.93±1.16	1.44±0.31
Added in MS media	4.8	0	3.52±0.55	5.80±0.77	1.48±0.21
F-test			ns	ns	ns
C.V. (%)			7.93	13.56	15.55

ns = non-significant differences

Figure 3 Whole plant of *Xanadu* after growing in greenhouse for 30 days, T1 Soaked in water for 24 hrs, T2 soaked in 2.4 mg/L colchicine, T3 soaked in 4.8 mg/L colchicine, T4 2.4 mg/L colchicine added in MS medium, T5 4.8 mg/L colchicine added in MS medium

4. ผลของสารโคลชิซินต่อลักษณะของปากใบและความหนาแน่นของปากใบ

จากการศึกษาลักษณะของปากใบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 100 เท่า พบว่าปากใบของต้นซานดูที่แช่ในสารโคลชิซินความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร และต้นซานาดูที่เพาะบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซินความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร มีขนาดปากใบใหญ่ที่สุด และมีลักษณะค่อนข้างรี เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน ส่วนต้นซานาดูที่แช่ในสารโคลชิซินความเข้ม 2.4 มิลลิกรัม/ลิตร มีลักษณะปากใบค่อนข้างกลม นอกจากนี้ต้นซานาดูที่เพาะบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซินความเข้มข้น 2.4 มิลลิกรัม/ลิตร มีขนาดปากใบเล็กที่สุด และมีลักษณะรูปร่างเป็นวงรี (Figure 4) นอกจากนี้พบว่าต้นที่มีปากใบใหญ่ จะพบความหนาแน่นของปากใบน้อยลง แต่สำหรับต้นที่มีปากใบเล็กจะส่งผลให้มีความหนาแน่นของปากใบมากขึ้น (Figure 5)

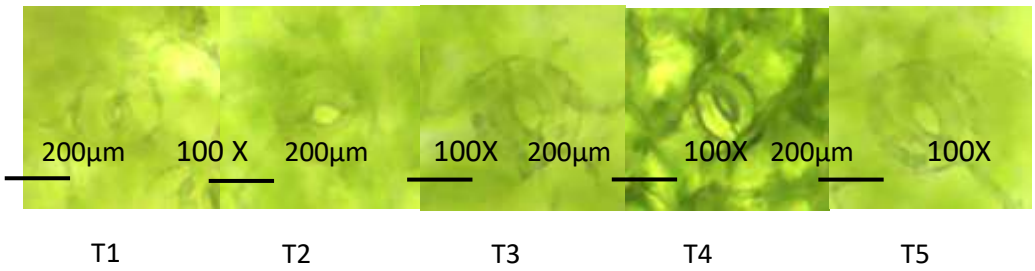
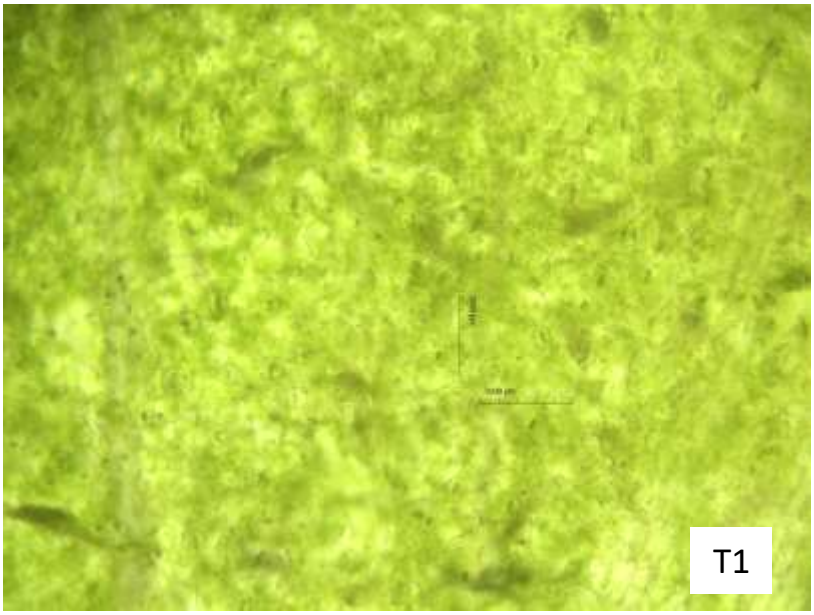


Figure 4 Stromata of *Xanadu* after growing in greenhouse for 30 days (at 100x magnification, scale bar = 200 µm), T1 Soaked in water for 24 hrs, T2 soaked in 2.4 mg/L colchicine, T3 soaked in 4.8 mg/L colchicine, T4 2.4 mg/L colchicine added in MS medium, T5 4.8 mg/L colchicine added in MS medium



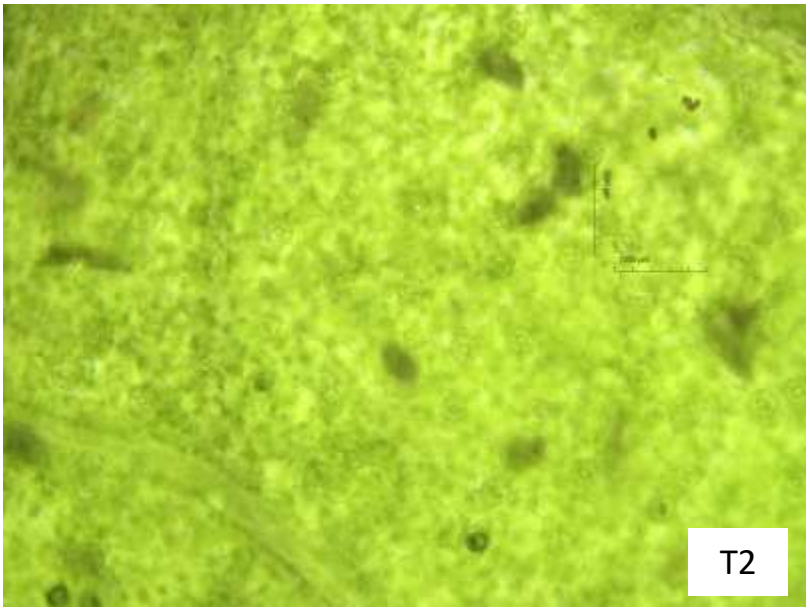
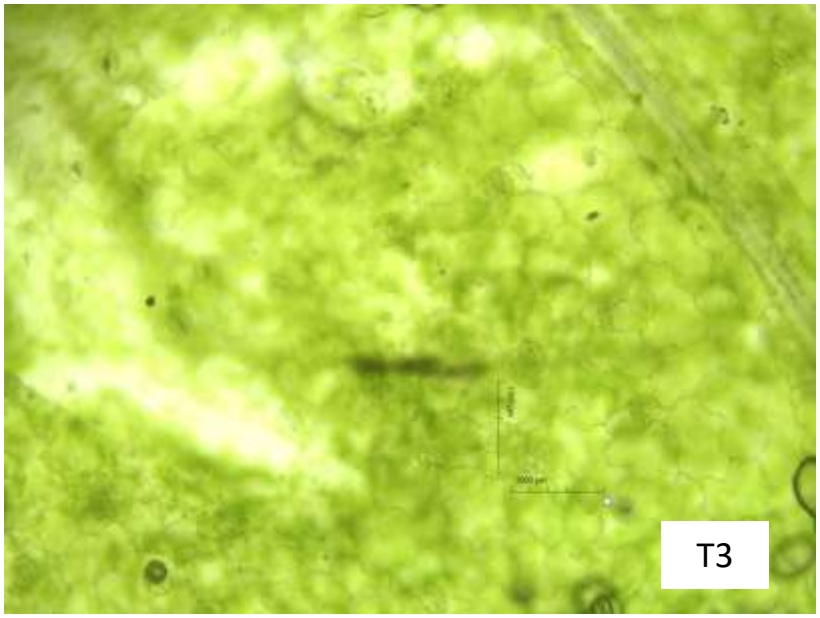


Figure 4 (Continued)



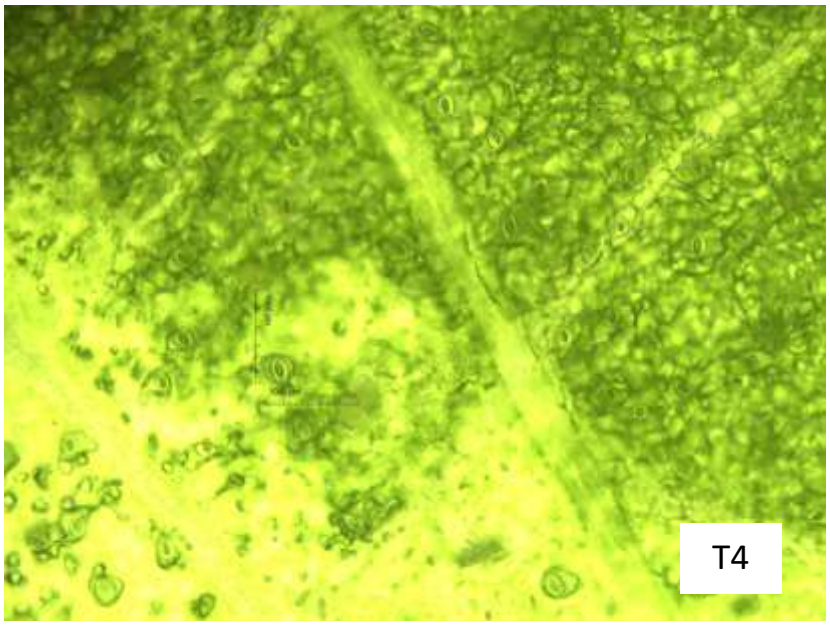


Figure 4 (Continued)

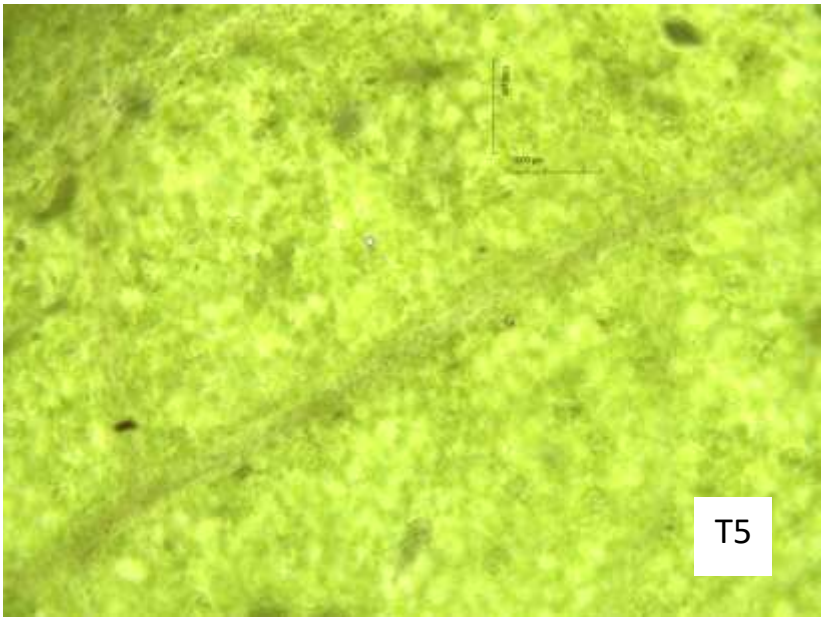


Figure 5 The effect of colchicine on stomatal density per 14 mm^3 of leaf area,T1 Soaked in water for 24 hrs, T2 soaked in 2.4 mg/L colchicine, T3 soaked in 4.8 mg/L colchicine, T4 2.4 mg/L colchicine added in MS medium, T5 4.8 mg/L colchicine added in MS medium

วิจารณ์ (Discussion)

จากการนำชิ้นส่วนซานาดูแช่ในสารโคลชิซินความเข้มข้น 2.4 และ 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และจากการเพาะชิ้นส่วนซานาดูบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซิน 2.4 และ 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร ภายหลังการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 45 วัน พบว่าการทดลองทุกทรีตเมนต์มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับ Samala et al. (2015) ได้ทำการทดลองจุ่มแช่ต้นหยาดน้ำค้างในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ คือ 0, 0.05, 0.1 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงพบว่าความเข้มข้นของสารสูงไม่ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของต้นหยาดน้ำค้างลดลง เนื่องจากความเข้มข้น และระยะเวลาดังกล่าวไม่เหมาะสมต่อพืชชนิดนี้

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าต้นซานาดูที่ได้รับโคลชิซินให้ความสูงไม่ต่างกันทางสถิติกับต้นซานาดูที่ไม่ได้รับโคลชิซิน และเมื่อเปรียบเทียบวิธีการให้สารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน พบว่า การเติมสารโคลชิซินในอาหารมีแนวโน้มให้ต้นซานาดูสูงกว่าการแช่ ทั้งนี้เนื่องจากการแช่สารโคลชิซินทำให้ชิ้นส่วนซานาดูได้รับสารเพียง 24 ชั่วโมง แต่การที่ผสมสารโคลชิซินในอาหารสูตร MS ทำให้ชิ้นส่วนดูดซับสารโคลชิซินได้ตลอดเวลา ทำให้เกิดการะสะสมของสารโคลชิซินในเนื้อเยื่อได้มากกว่า จึงทำให้มีโอกาสเกิดเป็นโพลีพลอยด์ได้มากกว่า และส่งผลต่อความสูงของต้นซานาดูทำให้ต้นซานาดูที่ได้รับโคลชิซินด้วยการเติมในอาหารมีแนวโน้มต้นสูงกว่าต้นที่ไม่ได้รับโคลชิซินหรือต้นที่ได้รับโคลชิซินด้วยวิธีการแช่ สอดคล้องกับการทดลองของ Azizan et al. (2021) ซึ่งได้ศึกษาผลของโคลชิซินความเข้มข้นตั้ง 1.00% - 2.5% ต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน (*Stevia Rebaudiana* Bertoni) โดยผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของโคลชิซินที่ต่างกันนั้นส่งผลให้ลักษณะสัณฐานวิทยา เช่น ความสูง ความยาวใบและความหนาใบมีความแตกต่างกันอย่าง

มีนัยสำคัญ และพบว่าการแช่โคลชิซินปริมาณ 2.00% ส่งผลให้ต้นหญ้าหวานมีความสูงมากกว่าต้นที่ไม่ได้แช่โคลชิซิน นอกจากนี้ Youssef (2003) รายงานว่าเมื่อนำต้นฟิโลเดนดรอน (*Philodendron scandens*) มาแช่ในโคลชิซินความเข้มข้นต่ำ ในระยะเวลาสั้นๆ ส่งผลให้ต้นฟิโลเดนดรอนมีการเพิ่มความสูงของต้น และมีความยาวใบมากขึ้นกว่าต้นที่ไม่ได้แช่สารละลายโคลชิซิน

หลังจากเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 45 วัน จึงทำการย้ายปลูกในโรงเรือนเป็นเวลา 30 วัน พบว่าความสูงของต้นซานาดูที่เพาะในอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซินความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร มีความสูงมากที่สุด และต้นซานาดูที่แช่สารโคลชิซินความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร มีความสูงน้อยที่สุด นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาความกว้างของใบพบว่าใบของต้นซานาดูที่ได้รับสารโคลชิซินมีความกว้างใบมากกว่าต้นไม่ได้รับสารโคลชิซิน ซึ่งขัดแย้งกับ Pensuriya (2017) ที่ได้ทำการทำลองให้สารโคลชิซินในชิ้นส่วนลินเดอเนียที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ พบว่าความกว้างใบของต้นที่ได้รับสารโคลชิซินมีความแตกต่างกันทางสถิติกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน เนื่องจากสารโคลิซินไปชะงักการเจริญเติบโตในส่วนของใบและมีความเป็นพิษทำให้ใบสั้นลง และมีผลต่อความกว้างใบด้วย แต่หากนำไปปลูกในสภาพโรงเรือน จะทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของความกว้างใบมากขึ้น Sungkaew (2015) ได้ทำการทดลองให้สารละลายโคลชิซินในความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ ในต้นลินเดอเนียในส่วนของข้อ พบว่าความเข้มข้นที่มากขึ้นและระยะเวลาในการแช่สารมากขึ้นทำให้มีความยาวใบลดลง และมีความกว้างใบเพิ่มขึ้นตามละดับ และจากการศึกษาจำนวนใบที่นำมาย้ายปลูกในโรงเรือน พบว่ามีจำนวนใบที่น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เนื่องจากสภาพอากาศภายนอกที่มีความร้อนหรือความชื้นมากเกินไป ทำให้ใบเหี่ยว และแห้งตายรวมถึงปัจจัยอื่นๆ เช่น โรค และแมลง

จากการศึกษาลักษณะของปากใบ พบว่าต้นซานาดูที่แช่ในสารโคลชิซินความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร และต้นซานาดูที่เพาะบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซินความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร มีขนาดปากใบใหญ่ เมื่อเทียบกับต้นไม่ได้รับโคลชิซิน สอดคล้องกับ Kerdsuwan & Te-chato (2015) ที่ทำการทดลองเพาะเลี้ยงปลายยอดแววมยุราในอาหารสูตร MS แล้วนำมาจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ พบว่าแววมยุรามีความหนาแน่นของเซลล์คุมลดลงในต้นที่พัฒนามาจากปลายยอดที่ได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้น เป็นผลมาจากปากใบและเซลล์ในชั้นอีพิเดอร์มิสขยายขนาดใหญ่ขึ้นตามจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น ต้น mixoploid มีขนาดของเซลล์คุมกว้างกว่าชุดควบคุม และมีความหนาแน่นของเซลล์คุมน้อยกว่าชุดควบคุม นอกจากนี้จากการทดลองของ Moghbel (2015) ซึ่งได้ทำการทดลองจุ่มแช่ชะเอมเทศและดอกคำฝอยด้วยโคลชิซินที่มีความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการวิจัยชี้ว่าพืชทั้งสองชนิดมีปากใบที่ใหญ่กว่าพอสมควร โดยความยาวของปากใบชะเอมที่ได้รับสารโคลชิซินมีขนาดใหญ่กว่าอย่างมีนัยสำคัญ

อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของปากใบที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้ เป็นเพียงการเปลี่ยนแปลงด้านการเจริญเติบโตจากชิ้นส่วนเดิมที่ได้รับสารโคลชิซินเท่านั้น ซึ่งอาจยังไม่แสดงถึงการกลายพันธุ์หรือผันแปรทางพันธุกรรมเป็นต้นพันธุ์ใหม่ ดังนั้นข้อมูลผลการทดลองดังกล่าวนี้ยังไม่สามารถบ่งชี้ถึงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาในต้นที่กลายพันธุ์อย่างชัดเจนได้ ดังนั้นควรมีการบันทึกข้อมูลเพิ่มเติมเช่นเดียวกับการรายงานของ Kerdsuwan & Te-chato (2015) ซึ่งได้มีการตรวจชุดโครโมโซมที่เกิดขึ้นในใบ

ของต้นแววมยุราที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดหลังจากได้รับโคลชิซิน ซึ่งจะสามารถนำมาใช้บ่งชี้ได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของปากใบเกิดจากการเปลี่ยนปลงในระดับโครโมโซม

สรุป (Conclusion)

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดความผันแปรทางสัณฐานวิทยาของซานาดูด้วยสารโคลชิซิน โดยนำชิ้นส่วนซานาดูแช่ในสารโคลชิซินความเข้มข้น 2.4 และ 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และจากการเพาะชิ้นส่วนซานาดูบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซิน 2.4 และ 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร ภายหลังการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 45 วัน พบว่าการทดลองทุกทรีตเมนต์มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับความสูงของต้นซานาดูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซินความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุดคือ 3.15 เซนติเมตร การแช่ชิ้นส่วนในสารโคลชิซินความเข้มข้น 2.4 มิลลิกรัม/ลิตร ให้จำนวนใบ และจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด คือ 9.00 ใบ และ 4.87 ตามลำดับ

จากการย้ายปลูกในโรงเรือนนาน 30 วัน พบว่าความสูงต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซินความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุดคือ 3.52 ในส่วนของจำนวนใบชุดควบคุมให้จำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุดคือ 6.53 ใบ นอกจากนี้ความกว้างใบของต้นซานาดูที่แช่ในสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 2.4 มิลลิกรัม/ลิตร มีความกว้างใบเฉลี่ยมากที่สุดคือ 1.52 เซนติเมตร

จากการศึกษาลักษณะของปากใบ พบว่าต้นซานาดูที่แช่ในสารโคลชิซินความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร และต้นซานาดูที่เพาะบนอาหารสูตร MS ที่ผสมสารโคลชิซินความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/ลิตร มีขนาดปากใบ และเซลล์คุมที่ใหญ่และยังพบว่าความหนาแน่นของเซลล์คุมน้อยกว่าเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน

เอกสารอ้างอิง (References)

Azizan, N. I., Shamsiah, A., A, H. N., & Hussein, S. (2021). Morphological characterization of colchicine-induced mutants in Stevia rebaudiana. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 7. 757, p. 012006. West Sumatera, Indonesia: IOP Publishing Ltd.

Balla, N., & Taychasinpitak, T., (2017). Induce polyploid ornamental sweet potato in vitro by colchicine tablet. TSTJ. 25(2), 260-266. (in Thai)

Kerdsuwan, S. & Te-chato, S. (2015). Effects of colchicine on polyploid induction in torenia. Songklanakarin J. Pl. Sci. 2(1), 17-23. (in Thai)

Moghbel, N., Borujeni, M. K. & Bernard, F. (2015). Colchicine effect on the DNA content and stomatasize of *Glycyrrhiza glabra* var. glandulifera and *Carthamus tinctorius* L. cultured in vitro. JGEB. 13,1-6. http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.02.002

Pensuriya, B., Taychasinpitak, T., Wongchaochant S. & Sukprasert, P. (2017). Induced polyploid in *Lindernia* sp. by colchicine in vitro. Agricultural Sci. J. 48 (1), 23–35. (in Thai)

Samala, S., Jansedom, H., & Saehan, O. (2015). Effect of colchicine on morphological characteristics of in vitro *Drosera burmannii*. Songklanakarin J. Pl. Sci. 2 (1), 24-28. (in Thai)

Youssef, M. A. H. (2003). Introduction of mutations and variation by using mutagens on some indoor plants. Moshtohor: Horticultural Department, Faculty of Agricultural Moshtohor, Zagazig University.