การใช้สารก่อการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มความหลากหลายของปทุมมา และกระเจียวในสภาพปลอดเชื้อ

APPLICATION OF MUTAGENIC AGENTS FOR INCREASING VARIATION OF PARACURCUMA AND EUCURCUMA *IN VITRO*

วารี อยู่สำราญ

VAREE YOOSUMRAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2568

KMITL-2025-AG-D-064-051

APPLICATION OF MUTAGENIC AGENTS FOR INCREASING VARIATION OF PARACURCUMA AND EUCURCUMA *IN VITRO*

VAREE YOOSUMRAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY IN AGRICULTURE

SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2025

KMITL-2025-AG-D-064-051

COPYRIGHT 2025

SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้สารก่อการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มความหลากหลายของปทุมมา และกระเจียวในสภาพปลอดเชื้อ
ชื่อนักศึกษา	นางสาววารี อยู่สำราญ
รหัสประจำตัว	62604046
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชา	เกษตรศาสตร์
พ.ศ.	2568
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. กัญจนา แซ่เตียว

บทคัดย่อ

ดอกอ่อนของปทุมมา 3 สายพันธุ์ (ปทุมมาลูกผสม) ได้แก่ สายพันธุ์ยูคิ เบอร์กันดี้ และพรพิศิษฐ์ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าดอกอ่อนของปทุมมา สายพันธุ์ยูคิที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดหน่อมากที่สุด 2.67 หน่อ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ ดอกอ่อนของปทุมมา สายพันธุ์เบอร์กันดี้ และพรพิศิษฐ์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดหน่อมากที่สุด 1.66 และ 1.78 ยอด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุด 73.33 และ 76.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปทุมมาทั้ง 3 สายพันธุ์มีความสูงต้นเฉลี่ย 5 เซนติเมตร ช่อดอกอ่อนของกระเจียว 2 สายพันธุ์ (กระเจียวลูกผสม) ได้แก่ สายพันธุ์ Sweetmemory และบ้านไร่เรด นำช่อดอกอ่อนแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือด้านบนและด้านล่าง พบว่าดอกอ่อนด้านล่างมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าด้านบน ดอกอ่อนของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดหน่อมากที่สุด 2.38 หน่อ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุด 83.33 เปอร์เซ็นต์ และดอกอ่อนของกระเจียว สายพันธุ์บ้านไร่เรด ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดหน่อมากที่สุด 1.98 หน่อ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุด 63.33 เปอร์เซ็นต์ และกระเจียวทั้ง 2 สายพันธุ์มีความสูงต้นเฉลี่ย 5 เซนติเมตร

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ และกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory โดยนำโคนต้นปทุมมาแช่ในสารละลาย EMS ระดับความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที พบว่าหน่อปทุมมาที่แช่ในสารละลาย EMS ระยะเวลา

60 นาที มีค่า LD_{50} เท่ากับ 0.85 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 120 นาที มีค่า LD_{50} เท่ากับ 0.57 เปอร์เซ็นต์ โคนต้นปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อที่แช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการต้านโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* พบว่าต้นปทุมมาตายทั้งหมด ไม่มีความต้านทานโรคเหี่ยว เมื่อนำต้นออกปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อและนำมาศึกษาขนาดของปากใบ จำนวนคลอโรพลาสต์ และปริมาณรงควัตถุไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อนำไปศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม ด้วยเทคนิค RAPD พบว่าสามารถจัดกลุ่มต้นปทุมมาได้ 4 กลุ่ม และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน และโคนต้นกระเจียวที่แช่ในสารละลาย EMS ระยะเวลา 60 นาที มีค่า LD_{50} เท่ากับ 2.61 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 120 นาที มีค่า LD_{50} เท่ากับ 1.87 เปอร์เซ็นต์ โคนต้นกระเจียวที่แช่ในสารละลาย EMS ทุกทรีทเมนต์สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าต้นกระเจียวที่ได้รับและไม่ได้รับสารละลาย EMS ทุกทรีทเมนต์บางต้นมีความต้านทานโรคเหี่ยว สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เมื่อนำต้นออกปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อและนำมาศึกษาขนาดของปากใบ ต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ขนาดปากใบลดลง แต่จำนวนคลอโรพลาสต์และปริมาณรงควัตถุไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติและเมื่อนำไปศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม ด้วยเทคนิค RAPD พบว่าสามารถจัดกลุ่มต้นกระเจียวได้ 5 กลุ่ม และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปจากต้นควบคุม

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ และกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory โดยการนำโคนต้นปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อแช่ในสารละลายโคลชิซิน ระดับความเข้มข้น 0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าโคนต้นปทุมมาที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีค่า LD_{50} เท่ากับ 1.62 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า LD_{50} เท่ากับ 2.10 เปอร์เซ็นต์ โคนต้นปทุมมาที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าต้นปทุมมาตายทั้งหมด ไม่มีความต้านทานต่อโรคเหี่ยว เมื่อนำต้นออกปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อ และนำมาศึกษาขนาดของปากใบ จำนวนคลอโรพลาสต์และปริมาณรงควัตถุ ต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีขนาดของปากใบและจำนวนคลอโรพลาสต์สูงสุด แต่มีปริมาณรงควัตถุน้อยสุด การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer จำนวน 5 ต้น พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอ เป็น diploid (2n) และโคนต้นกระเจียวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีค่า LD_{50} เท่ากับ 1.80 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า

LD_{50} เท่ากับ 1.56 เปอร์เซ็นต์ โคนต้นกระเจียวที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยว ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ต้นกระเจียวที่ได้รับและไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินทุกทรีทเมนต์ พบว่าบางต้นมีความต้านทานโรคเหี่ยว สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เมื่อนำต้นออกปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อ ต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีขนาดของปากใบและจำนวนคลอโรพลาสต์สูงสุด ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีปริมาณรงควัตถุลดลง และนำมาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer จำนวน 15 ต้น พบต้น diploid (2n) 4 ต้น monoploid (n) 9 ต้น และต้น mixoploid (n, 2n) 2 ต้น จากการทดลองพบว่ามีต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีปริมาณดีเอ็นเอเป็น monoploid (n) อาจเนื่องมาจากผลของสารละลายโคลชิซิน หรือเกิดจากดอกอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงและได้ต้นที่พัฒนามาจากเซลล์สืบพันธุ์

Thesis Title	Application of mutagenic agents for increasing variation of Paracurcuma and Eucurcuma *In vitro*
Student Name	Miss Varee Yoosumran
Student ID	62604046
Degree	Doctor of Philosophy
Program	Agriculture
Year	2025
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Kanjana Saetiew

Abstract

Young inflorescences of three cultivars (*Curcuma* hybrid): 'Yuki', 'Burgundy', and 'Pornphisit' were cultivated on MS medium supplemented with various concentrations of plant growth regulators, NAA and BA for a period of 8 weeks. The results revealed that the Yuki cultivar, when exposed to 1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA, exhibited the highest shoot proliferation, with an impressive average of 2.67 shoots per plant. This treatment also achieved an 80% shoot induction rate and a plant height averaging 5 cm. Meanwhile, the Burgundy and Pornphisit, which were given 1 mg/L NAA and 1 mg/L BA, grew 1.66 and 1.78 shoots each, with shoot induction rates of 73.33% and 76.67%, and both had an average height of 5 cm. The young inflorescences of the two Eucurcuma (*Curcuma* hybrid), 'Sweetmemory' and 'Banrai Red', were divided into two sections: upper and lower. The lower section exhibited better growth than the upper section. 'Sweetmemory', when cultured on MS medium with 0.5 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA, produced the highest number of shoots 2.38 shoots, with a shoot induction percentage of 83.33%. 'Banrai Red', when cultured on MS medium with 0.5 mg/L NAA and 1 mg/L BA, produced the highest number of shoots 1.98 shoots, with a shoot induction percentage of 63.33%, and both cultivars had an average plant height of 5 cm.

Paracurcuma (Pornphisit) and Eucurcuma (Sweetmemory) cultivars were treated with EMS solution by soaking their shoots at 0, 0.5, and 1% concentrations for 60 and

120 minutes to cause mutation. The results showed that the shoots of Pornphisit soaked in EMS solution for 60 minutes had an LD_{50} value of 0.85%, while for 120 minutes, the LD_{50} value was 0.57%. The basal stem of Pornphisit soaked in 1% EMS solution for 120 minutes failed to continue growing. When tested for resistance to bacterial wilt caused by *R. solanacearum*, all Pornphisit died, indicating no resistance to the disease. After transplanting in greenhouse, examined for stomatal size, number of chloroplasts, and pigment content, no statistically significant differences were found. Genetic variation analysis using the RAPD technique revealed that the Pornphisit could be divided into four groups, all of which exhibited similar morphological characteristics. For Sweetmemory cultivars, the LD_{50} values of EMS treatments were 2.61% for 60 minutes and 1.87% for 120 minutes. All basal stems of Sweetmemory cultivars were treated with EMS found able to grow. Disease resistance testing against *R. solanacearum* showed that some plants, both treated and untreated, were resistant and could continue growing outside of sterile conditions. In EMS-treated Sweetmemory cultivars, stomatal size was reduced, while the number of chloroplasts and pigment content showed no statistically significant differences. Genetic variation analysis using RAPD classified the Sweetmemory into five groups, with some showing morphological differences from the control group.

Mutagenesis of the Pornphisit and Sweetmemory was also induced using colchicine solution at concentrations of 0, 1, and 3% for 12 and 24 hours. The shoots of Pornphisit soaked in colchicine solution for 12 hours had an LD_{50} value of 1.62%, while for 24 hours, the LD_{50} value was 2.10%. The basal stems of Pornphisit soaked in 3% colchicine solution for 12 hours failed to survive and could not continue growing. When tested for resistance to bacterial wilt caused by *R. solanacearum*, all plants died, indicating no resistance to the disease. After transplanting in greenhouse stomatal size, chloroplast number, and pigment content were examined, it was found that plants treated with 3% colchicine for 24 hours exhibited the largest stomatal size and the highest number of chloroplasts but had the lowest pigment content. DNA content analysis using a flow cytometer on five samples showed no changes in ploidy level, with all samples being diploid (2n). For Sweetmemory colchicine treatment for

12 hours resulted in an LD_{50} of 1.80%, and 24 hours resulted in an LD of 1.56%. Basal stems treated with 3% colchicine for 24 hours were unable to grow further. Disease resistance testing against *R. solanacearum* revealed that some plants, both treated and untreated with colchicine, exhibited resistance and were able to grow under. The Sweetmemory treated with 1% colchicine solution for 24 hours had the largest stomatal size and highest chloroplast count but showed a decrease in pigment content. DNA content analysis using a flow cytometer on 15 plants revealed 4 diploid (2n) plants, 9 monoploid (n) plants, and 2 mixoploid (n, 2n) plants. The presence of monoploid plants may have resulted from the effects of colchicine or from regeneration of plants originating from gametic cells in immature floral tissues used in culture.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กัญจนา แซ่เตียว อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน แนะนำแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น และตรวจสอบข้อบกพร่องจนทำให้วิทยานิพนธ์นี้เกิดความสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. งามนิจ ชื่นบุญงาม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ลำแพน ขวัญพูล รองศาสตราจารย์ ดร. มณทินี ธีรารักษ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัชราภรณ์ สุวอ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะในการจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่มีส่วนช่วยให้การทำงานวิจัยประกอบวิทยานิพนธ์ให้ดำเนินไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณทุนวิจัยส่งเสริมส่วนงานวิชาการ รหัสทุน 2565-02-04-002 คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

ขอขอบพระคุณครอบครัว ญาติพี่น้อง และขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้เป็นอย่างดีมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้หากมีข้อผิดพลาดประการใด ข้าพเจ้าขออภัยเป็นอย่างสูง ในข้อบกพร่องและความผิดพลาดนั้น และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์เล่มนี้ คงมีประโยชน์ไม่มากก็น้อยสำหรับผู้ที่มีความสนใจในด้านนี้

วารี อยู่สำราญ

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ง
กิตติกรรมประกาศ		ช
สารบัญ		ซ
สารบัญตาราง		ฐ
สารบัญภาพ		ด
บทที่ 1	**บทนำ**	1
1.1	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2	สมมุติฐานของการศึกษา	2
1.3	ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.4	ขอบเขตของการวิจัย	3
1.5	ขั้นตอนของการศึกษา	3
บทที่ 2	**ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	4
2.1	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของปทุมมาและกระเจียว	4
2.2	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	6
2.3	การกลายพันธุ์	9
2.4	คุณสมบัติของสารละลาย EMS	11
2.5	คุณสมบัติของสารละลายโคลชิซิน	13
2.6	ค่า LD_{50}	17
2.7	การตรวจสอบการกลายพันธุ์ในพืช	18
2.8	โรคที่สำคัญของปทุมมาและกระเจียว	21
บทที่ 3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	24
3.1	พืชทดลอง เครื่องมือและวิธีการ	24
3.2	สถานที่ดำเนินงาน	27
3.3	ระยะเวลาที่ทำการทดลอง	27
3.4	วิธีการดำเนินงาน	27

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงดอกอ่อนปทุมมาและกระเจียวในสภาพปลอดเชื้อ..... 27

3.4.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหน่ออ่อนของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ และกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory โดยใช้สารละลาย EMS 31

3.4.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหน่ออ่อนของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ และกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory โดยใช้สารละลายโคลชิซิน..... 32

3.4.4 การบันทึกข้อมูลในสภาพปลอดเชื้อของต้นปทุมมาและกระเจียวที่ได้รับสารละลาย EMS และสารละลายโคลชิซิน..... 32

3.4.5 การบันทึกข้อมูลหลังจากย้ายปลูกต้นปทุมมาและกระเจียว..... 33

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล..... 37

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล..... 39

4.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงดอกอ่อนปทุมมาและกระเจียวในสภาพปลอดเชื้อ..... 39

4.1.1 ผลของ NAA และ BA ต่อการเจริญเติบโตของดอกอ่อนปทุมมาสายพันธุ์ยูคิ..... 39

4.1.2 ผลของ NAA และ BA ต่อการเจริญเติบโตของดอกอ่อนปทุมมาสายพันธุ์ เบอร์กันดี้ 39

4.1.3 ผลของ NAA และ BA ต่อการเจริญเติบโตของดอกอ่อนปทุมมาสายพันธุ์ พรพิศิษฐ์..... 39

4.1.4 ผลของ NAA และ BA ต่อการเจริญเติบโตของดอกอ่อนกระเจียวสายพันธุ์ Sweetmemory..... 43

4.1.5 ผลของ NAA และ BA ต่อการเจริญเติบโตของดอกอ่อนกระเจียวสายพันธุ์ บ้านไร่เรด..... 44

4.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ โดยใช้สารละลาย EMS..... 49

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.1 อัตราการรอดชีวิตของโคนต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์..... 49

4.2.2 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้นของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์..... 52

4.2.3 การทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยว ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์..... 55

4.2.4 การย้ายปลูกปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ นอกสภาพปลอดเชื้อ..... 55

4.2.5 ความกว้าง ความยาว จำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ และปริมาณรงควัตถุ ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์..... 61

4.2.6 การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน ด้วยเทคนิค RAPD..... 65

4.2.6.1 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism และค่า PICs จากแต่ละคู่ไพรเมอร์..... 69

4.2.6.2 การจัดกลุ่มปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกันด้วยโปรแกรม NTSYS 2.10p..... 70

4.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory โดยใช้สารละลาย EMS..... 72

4.3.1 อัตราการรอดชีวิตของโคนต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory..... 72

4.3.2 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้นของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory..... 75

4.3.3 การทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยว ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory..... 78

4.3.4 การย้ายปลูกกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory นอกสภาพปลอดเชื้อ..... 80

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.5 ความกว้าง ความยาว จำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ และปริมาณรงควัตถุ ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory..... 87

4.3.6 การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน ด้วยเทคนิค RAPD..... 91

4.3.6.1 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism และค่า PICs จากแต่ละคู่ไพรเมอร์..... 94

4.3.6.2 การจัดกลุ่มกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกันด้วยโปรแกรม NTSYS 2.10p..... 95

4.4 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ โดยใช้สารละลาย โคลชิซิน..... 97

4.4.1 อัตราการรอดชีวิตของโคนต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์..... 97

4.4.2 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้นของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์..... 100

4.4.3 การทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยว ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์..... 103

4.4.4 การย้ายปลูกปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ นอกสภาพปลอดเชื้อ..... 103

4.4.5 ความกว้าง ความยาว จำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ และปริมาณรงควัตถุ ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์..... 109

4.4.6 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer..... 113

4.5 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory โดยใช้สารละลาย โคลชิซิน..... 115

4.5.1 อัตราการรอดชีวิตของโคนต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory..... 115

4.5.2 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้นของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory..... 118

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5.3 การทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยว ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory..... 121

4.5.4 การย้ายปลูกกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory นอกสภาพปลอดเชื้อ..... 123

4.5.5 ความกว้าง ความยาว จำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ และปริมาณรงควัตถุ ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory 130

4.5.6 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer..... 134

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 140

บรรณานุกรม..... 143

ภาคผนวก..... 157

ประวัติผู้เขียน..... 161

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ชนิด และลำดับเบสของไพรเมอร์อาร์เอพีดีที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของปทุมมา และกระเจียว ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	36
4.1	เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของดอกอ่อนปทุมมา สายพันธุ์ยูคิ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	42
4.2	เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของดอกอ่อนปทุมมา สายพันธุ์เบอร์กันดี้ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	42
4.3	เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของดอกอ่อนปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	43
4.4	เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของดอกอ่อนกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	47
4.5	เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของดอกอ่อนกระเจียว สายพันธุ์บ้านไร่เรด ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	48
4.6	ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่ออัตราการรอดชีวิตของโคนต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ภายหลังการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	50
4.7	เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	54
4.8	อัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	59
4.9	ความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน เส้นรอบวงหัว และจำนวนตุ้ม หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 6 เดือน ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์	60

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.10	ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่อขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ภายหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	63
4.11	ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่อปริมาณรงควัตถุของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ภายหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	64
4.12	จำนวนแถบดีเอ็นเอจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยเทคนิค RAPD จำนวน 9 ไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism จากแต่ละไพรเมอร์.	69
4.13	ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่ออัตราการรอดชีวิตของโคนต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ภายหลังการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	73
4.14	เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	77
4.15	อัตราการรอดชีวิตหลังจากปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เป็นระยะเวลา 50 วัน บนต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้รับสารละลาย EMS	79
4.16	อัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	85
4.17	ความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน เส้นรอบวงหัว และจำนวนตุ้ม หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 6 เดือน ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory	86
4.18	ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่อขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ภายหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	89
4.19	ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่อปริมาณรงควัตถุของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ภายหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	90

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.20	จำนวนแถบดีเอ็นเอจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยเทคนิค RAPD จำนวน 5 ไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism จากแต่ละไพรเมอร์.	94
4.21	ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่ออัตราการรอดชีวิตของหน่อปทุมมา พันธุ์พรพิศิษฐ์ ภายหลังจากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	98
4.22	เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของปทุมมา พันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	102
4.23	อัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	107
4.24	ความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน เส้นรอบวงหัว และจำนวนตุ้ม หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 6 เดือน ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์.....	108
4.25	ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่อขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ภายหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	111
4.26	ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่อปริมาณรงควัตถุของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ภายหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	112
4.27	ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่ออัตราการรอดชีวิตของหน่อกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ภายหลังจากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	116
4.28	เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	120
4.29	อัตราการรอดชีวิตหลังจากปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ *Ralstonia solanacearum* เป็นระยะเวลา 50 วัน บนต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน.....	122

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.30 อัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 128

4.31 ความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน เส้นรอบวงหัว และจำนวนตุ้ม หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 6 เดือน ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory..... 129

4.32 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่อขนาดของปากใบและจำนวนคลอโรพลาสต์ ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ภายหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 132

4.33 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่อปริมาณรงควัตถุของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ภายหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 133

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ส่วนประกอบของต้นปทุมมา สกุลย่อย Paracurcuma	4
2.2	ส่วนประกอบของต้นกระเจียว สกุลย่อย Euracurcuma	5
2.3	สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารละลาย EMS	12
2.4	การเกิด depurination ของเบสอะดินีน	12
2.5	สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารละลายโคลชิซิน	14
2.6	องค์ประกอบของใยสปินเดิลที่ประกอบด้วยไมโครทิวบูลเป็นโครงสร้างหลัก มีลักษณะเป็นท่อยาว ผนังของไมโครทิวบูลประกอบด้วย 13 โปรโตฟิลาเมนต์ เรียงกันเป็นวงกลม แต่ละ โปรโตฟิลาเมนต์เกิดจากโปรตีนทูบูลินชนิดแอลฟ่าและเบต้ามาเรียงต่อกันในแนวยาว	15
2.7	การแบ่งเซลล์ร่างกายปกติ และการแบ่งเซลล์ร่างกายที่ถูกชักนำด้วยสารละลายโคลชิซิน	15
3.1	ปทุมมา 3 สายพันธุ์ และกระเจียว 2 สายพันธุ์	25
3.2	ช่อดอกของปทุมมา 3 สายพันธุ์ที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อ	28
3.3	ดอกอ่อนของปทุมมา 3 สายพันธุ์ที่นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1 mg/L	29
3.4	ช่อดอกของกระเจียว 2 สายพันธุ์ที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อ	30
3.5	ช่อดอกอ่อนของกระเจียวที่แบ่งออกเป็น 2 ส่วน และดอกอ่อนของกระเจียว 2 สายพันธุ์ที่นำที่นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1 mg/L	30
4.1	การเจริญเติบโตของต้นปทุมมา 3 สายพันธุ์	41
4.2	ดอกอ่อนของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่เลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์	45
4.3	ดอกอ่อนของกระเจียว สายพันธุ์บ้านไร่เรด ที่เลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์	46
4.4	อัตราการรอดชีวิตของโคนต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์	51
4.5	ต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS	53
4.6	ต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ จากต้นที่ได้รับสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร	57
4.7	ดอกปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ จากต้นที่ได้รับสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.8	หัวปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ จากต้นที่ได้รับสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร	58
4.9	ขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ของต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ จากต้นที่ได้รับสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	62
4.10	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-02	66
4.11	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-04	66
4.12	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-10	66
4.13	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-18	67
4.14	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPB-01	67
4.15	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPC-01	67
4.16	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPC-05	68
4.17	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPD-02	68
4.18	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPD-03	68
4.19	Phylogenetic tree ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน และนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10p โดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิค RAPD	71
4.20	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน	71
4.21	อัตราการรอดชีวิตของโคนต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory	74
4.22	ต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS	76
4.23	การปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ไอโซเลท Si16, biovar 4, phylotype I, sequevar 30 ในต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่ หลังปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 50 วัน	79
4.24	ต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากต้นที่ได้รับสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร	82
4.25	ดอกกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากต้นที่ได้รับสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร	83

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.26	หัวกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากต้นที่ได้รับสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร	84
4.27	ขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ของต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากต้นที่ได้รับสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	88
4.28	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-10	92
4.29	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-18	92
4.30	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPAM-01	92
4.31	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPAM-03	93
4.32	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPD-02	93
4.33	Phylogenetic tree ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน และนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10p โดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิค RAPD	96
4.34	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน	96
4.35	อัตราการรอดชีวิตของหน่อปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	99
4.36	ต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ผ่านการแช่สารละลายโคลชิซิน	101
4.37	ต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ จากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร	105
4.38	ตอกปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ จากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร	106
4.39	หัวปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ จากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร	106
4.40	ขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ของต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	110
4.41	ลักษณะกราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร	114

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.42	อัตราการรอดชีวิตของหน่อกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	117
4.43	ต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ผ่านการแช่สารละลายโคลชิซิน	119
4.44	การปลูกเชื้อแบคทีเรีย Ralstonia solanacearum ไอโซเลท Si16, biovar 4, phylotype I, sequevar 30 ในต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่ หลังปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 50 วัน	122
4.45	ต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร	125
4.46	ดอกกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร	126
4.47	หัวกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร	127
4.48	ขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ของต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	131
4.49	ลักษณะกราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร (flow cytometer รอบ 1)	136
4.50	ลักษณะกราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร (flow cytometer รอบ 2)	137
4.51	ลักษณะกราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร	138

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปทุมมาและกระเจียว (*Curcuma* sp.) เป็นไม้ดอกเขตร้อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีถิ่นกำเนิดในแถบทวีปเอเชียเขตร้อน จัดอยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberacea) มีลำต้นใต้ดินเป็นเหง้าหรือหัวแบบไรโซม (rhizome) เจริญเติบโตและให้ดอกได้ดีในช่วงหน้าฝนและจะพักตัว (dormancy) ในฤดูหนาวโดยต้นจะเหี่ยวตายและทิ้งหัวพันธุ์ไว้ใต้ดิน เพื่อรอการเจริญเติบโตในฤดูถัดไป (Hongpakdee *et al*., 2010) ในประเทศไทยมีพื้นที่ผลิตประมาณ 400 ไร่ แหล่งผลิตใหญ่อยู่ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน เลย ชัยภูมิ และกาญจนบุรี ถือเป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญ เนื่องจากช่อดอกมีความหลากหลายในรูปร่างและสีสันของดอกที่สวยงามแปลกตา จึงกลายเป็นพืชที่นิยมใช้เป็นไม้กระถาง และเป็นไม้ดอกอันดับสองรองจากกล้วยไม้ มีมูลค่าการส่งออก 30 – 40 ล้านบาทต่อปี ในขณะที่ตลาดโลกมีความต้องการหัวพันธุ์ปทุมมาไม่น้อยกว่า 200 ล้านบาทต่อปี โดยตลาดปลายทาง ได้แก่ ประเทศเนเธอร์แลนด์ ญี่ปุ่น เยอรมันนี สหรัฐอเมริกาและจีน (เสริมสุข สลักเพ็ชร์, 2563) ในปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาและกระเจียว เพื่อให้ได้ลักษณะที่สวยงามแตกต่างจากพันธุ์เดิม ได้สายพันธุ์การค้าใหม่ ๆ โดยการผสมข้ามชนิดเพื่อให้มีความแตกต่างกันมากขึ้น มีการผสมพันธุ์เพื่อให้ได้ลูกผสมใหม่ ๆ ที่มีลักษณะสวยงาม แต่ในการผสมข้ามชนิดทำได้ยากกว่าการผสมพันธุ์ในพืชชนิดเดียวกัน เนื่องจากมีอุปสรรคต่าง ๆ ตั้งแต่การผสมเกสรจนถึงการพัฒนาของผลและเมล็ด เช่น การบานของดอกไม่พร้อมกัน ละอองเกสรไม่สามารถงอกได้หรืองอกได้แต่ไม่สามารถงอกลงไปถึงรังไข่ได้ การผสมไม่ติดหรือผสมติดแต่เอ็มบริโอหยุดการเจริญเติบโตและตายก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นต้น ปัญหาดังกล่าวทำให้การปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาและกระเจียวนั้นทำได้ยาก และต้องใช้เวลานาน เนื่องจากเมล็ดมีการพักตัว นอกจากนี้ปทุมมาและกระเจียวลูกผสมที่ได้มีข้อจำกัดในการนำไปใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ต่อไป เนื่องจากลูกผสมที่ได้ติดเมล็ดได้น้อยและการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก อีกทั้งสายพันธุ์ที่นำมาผสมข้ามอาจมีจำนวนชุดของโครโมโซมที่แตกต่างกัน จึงทำให้ลูกผสมที่ได้มีลักษณะเป็นหมัน (วิภาดา ทองทักษิณ และคณะ, 2542)

การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ ได้แก่ การใช้รังสีต่าง ๆ เช่น รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา รังสีอัลตาไวโอเลต เป็นต้น ส่วนทางเคมี ได้แก่ dES: diethy1 sulphate, 5-bromouracil, EMS: ethyl methanesulphonate, สารละลายโคลชิซิน เป็นต้น การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลาย EMS และสารละลายโคลชิซิน เป็นที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในระดับยีน ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตัวอย่างการศึกษาในพืชดอกที่ใช้สารละลาย EMS เช่น เบญจมาศ พบว่าต้นเบญจมาศที่ได้มีสีกลีบดอกเปลี่ยนแปลงไปจากสีชมพู เป็นสีชมพูอมส้ม สีชมพูอ่อน สีขาว สีเหลือง หรือสีส้มอ่อน (Latado

et al., 2004) Yoosumran *et al*. (2018) ทำการศึกษาดอกเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS มีสีกลีบเบญจมาศเปลี่ยนแปลงไปจากสีขาวเป็นสีเหลือง มีสีขาวและสีเหลืองในดอกเดียวกัน และ Fang (2011) ศึกษาดอกแอฟริกันไวโอเลตที่ได้รับสารละลาย EMS สีของดอกเปลี่ยนแปลงไปจากสีชมพูอมม่วง เป็นสีม่วงเข้ม และม่วงอ่อน บริเวณขอบกลีบดอกมีสีขาว นอกจากนี้เป็นอีกทางเลือกที่ทำให้ต้นพืชลูกผสมที่มีปัญหาในการติดเมล็ด มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น ทำให้เป็นการเพิ่มโอกาสในการติดเมล็ด เช่นการศึกษาของ Ketmaro *et al*. (2012) ได้ศึกษาผลของโคลชิซินในการเพิ่มความมีชีวิตของละอองเกสร พบว่าการใช้สารละลายโคลชิซิน สามารถชักนำให้ลูกผสมปทุมมาเป็นต้น tetraploid และมีความมีชีวิตของละอองเกสรที่เพิ่มขึ้น ธีรนิติ พวงกฤษ (2555) พบว่าต้นปทุมมาที่มีการเพิ่มชุดโครโมโซมเป็น tetraploid (2n = 4X) และ octaploid (2n = 8X) ลำต้นและใบมีขนาดใหญ่กว่าต้น diploid (2n = 2X) และสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนโครโมโซมของปทุมมาลูกผสมได้สูงถึง 63.33 เปอร์เซ็นต์ และอาจพบลักษณะความต้านทานโรค ต้านทานแมลงและศัตรูพืช การสร้างพันธุ์พืชต้านทานโรค โดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ มีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วเหลืองต้านทานโรคราสนิม ถั่วลิสงต้านทานโรค Leaf spot เปปเปอร์มินต์ต้านทานโรค wilt และลูกแพร์ต้านทานโรคจุดดำ (สิรนุช ลามศรีจันทร์, 2540) ขิงต้านทานโรคเหี่ยว (อังสนา อัครพิศาล, 2533) เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อเพิ่มความหลากหลายให้กับปทุมมาและกระเจียว

1.2 สมมุติฐานของการศึกษา

1.2.1 การใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมสามารถชักนำดอกอ่อนของปทุมมา และกระเจียวให้เกิดหน่อใหม่ได้

1.2.2 การใช้สารก่อกลายพันธุ์ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสม สามารถชักนำให้เกิดต้นกลายพันธุ์ได้

1.3 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.3.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับในการเพาะเลี้ยงดอกอ่อนปทุมมา และกระเจียวในสภาพปลอดเชื้อเพื่อชักนำให้เกิดหน่อ

1.3.2 ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในปทุมมา และกระเจียวจากการใช้สารละลาย EMS

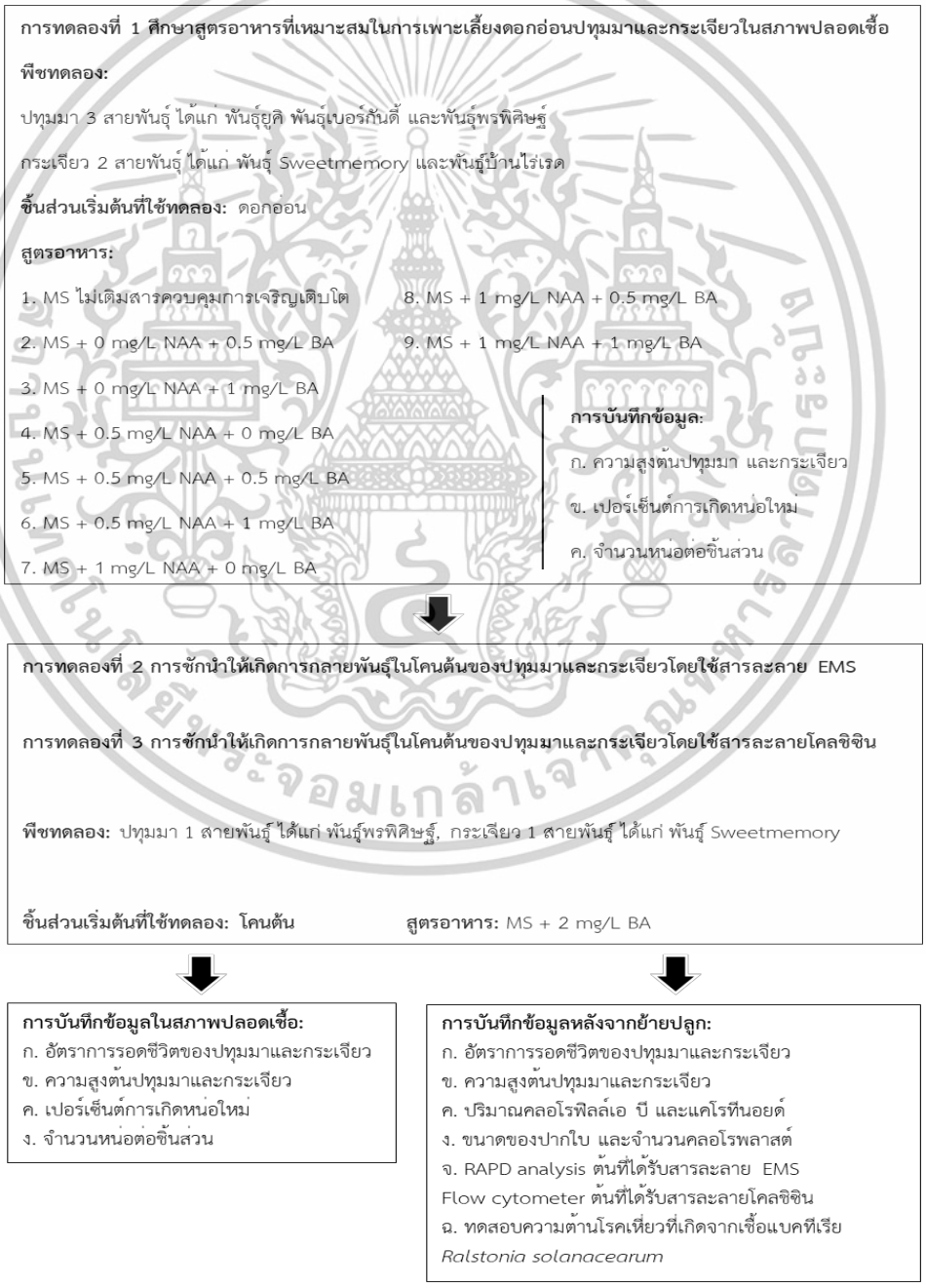
1.3.3 ศึกษาการ double chromosome ของปทุมมา และกระเจียวที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผสมพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 ทำการศึกษาสูตรอาหาร และชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงดอกอ่อนปทุมมา 3 สายพันธุ์ และกระเจียว 2 สายพันธุ์ เพื่อชักนำให้เกิดหน่อใหม่

1.4.2 ทำการศึกษาการกลายพันธุ์ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ และกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory โดยนำหน่อมาแช่ในสารละลาย EMS และโคลชิซิน ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาของสารที่แตกต่างกัน

1.5 ขั้นตอนของการศึกษา

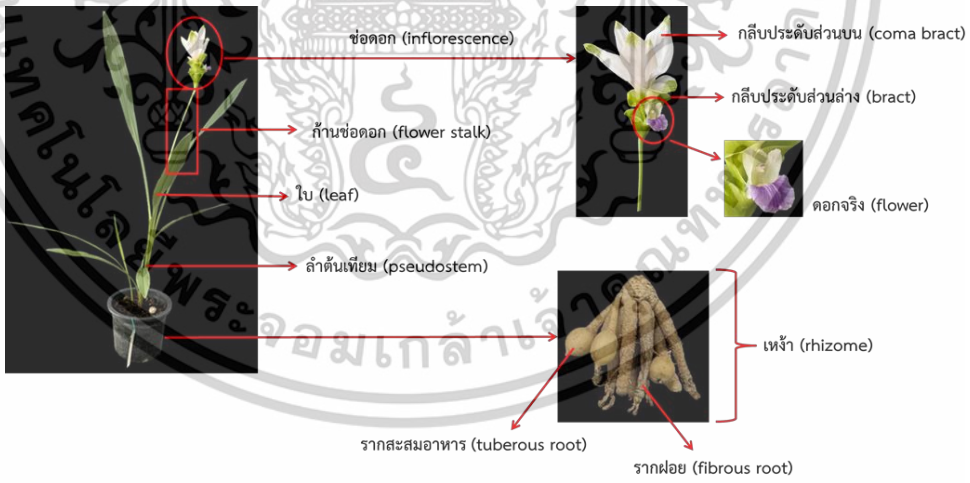


บทที่ 2

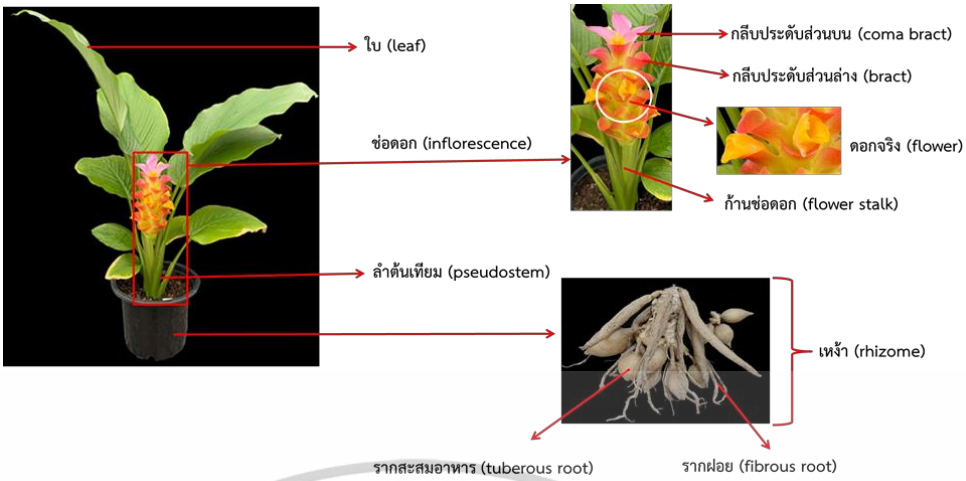
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของปทุมมา และกระเจียว

ปทุมมา และกระเจียว เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกับขิง และข่า (Zingiberacea) อยู่ในสกุลขมิ้น (*Curcuma* sp.) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบประเทศอินโดจีน พม่า และไทย สำหรับในประเทศไทยจะพบเห็นปทุมมาได้แทบทุกภาคของประเทศ แต่ส่วนใหญ่จะพบทางเขตภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งจะมีความหลากหลายของสายพันธุ์มากที่สุด นักพฤกษศาสตร์ได้จำแนกพืชสกุลนี้ออกเป็น 2 สกุลย่อย ได้แก่ สกุลย่อย Paracurcuma หรือกลุ่มปทุมมา ลักษณะเด่นของพืชกลุ่มนี้ คือดอกจริงปากกลีบดอกจะมีสีขาว หรือสีม่วง และการออกดอก ช่อดอกที่เกิดจะเกิดจากตายอดของลำต้นเทียม ก้านช่อดอกยาว (ภาพที่ 2.1) และมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานอยู่ในช่วง 12-18 แท่ง และสกุลย่อย Eucurcumar หรือกลุ่มกระเจียว ลักษณะเด่นของพืชกลุ่มนี้ คือดอกจริงปากกลีบดอกจะมีสีขาว หรือสีเหลือง และการออกดอก ช่อดอกที่เกิดจะเกิดจากเหง้าโดยตรง หรือช่อดอกเกิดจากตายอดของลำต้นเทียม ก้านช่อดอกสั้น ช่อดอกมีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 2.2) และมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 21 แท่ง (สุรวิช วรรณไกรโรจน์, 2540) และ (อรวรรณ วิชัยลักษณ์, 2548)



ภาพที่ 2.1 ส่วนประกอบของต้นปทุมมา สกุลย่อย Paracurcuma



ภาพที่ 2.2 ส่วนประกอบของต้นกระเจียว สกุลย่อย Euracurcuma

พืชในสกุล *Curcuma* เป็นไม้หัวอายุยืนหลายปีที่ไม่มีเนื้อไม้ (herbaceous perennial) มีการพักตัวในช่วงอากาศแห้งแล้ง และช่วงวันสั้น โดยมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั่วไป ดังนี้

ต้น พืชในสกุล *Curcuma* มีลำต้นใต้ดินทำหน้าที่สะสมน้ำ และอาหารเรียกว่า เหง้า ตาข้างของเหง้าจะเจริญเติบโตไปเป็นลำต้นเทียม (pseudostem) ที่เห็นอยู่เหนือดิน โดยลำต้นเทียมมีลักษณะกาบซึ่งเกิดจากโคนก้านใบ แผ่โอบซ้อนกันสูงประมาณ 50 เซนติเมตร เมื่อต้นเริ่มแก่ส่วนของโคนลำต้นใต้ดินจะโป่งออกด้านข้าง และพัฒนาไปเป็นหัว สำหรับเหง้านั้นจะมีลักษณะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันไป เช่น พวกที่แตกเป็นแง่งคล้ายนิ้วมือเหมือนขิง พวกที่เหง้ายืดยาวคลุมพื้นที่กว้าง พวกที่สร้างเหง้าใหม่ที่โคนลำต้นเทียม ซึ่งเกิดจากตาข้างของเหง้าเดิม และพวกที่สร้างเหง้าในแนวดิ่ง

ใบ ใบเป็นใบเดี่ยว (simple leaf) ที่ประกอบด้วยกาบใบที่ห่อรวมตัวกันแน่น เกิดเป็นลำต้นเทียม ก้านใบชูออกจากลำต้นเทียมในมุมที่ต่างกัน แผ่นใบเป็นใบเดี่ยว มีรูปร่างเป็นวงรี แคบบ้าง ป้อมบ้าง โคนใบมนหรือเรียว ขอบใบเรียบ หรือเป็นคลื่น ปลายใบป้าน หรือแหลม เส้นใบขนานแบบเฉียงขึ้น ซึ่งรูปร่างจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืช

ช่อดอก เป็นแบบช่อดอกแน่น (compact spike) มีใบประดับ (bract) โอบรอบช่อดอกทำให้เห็นใบประดับเรียงซ้อนกันเกิดเป็นช่อดอกที่มีลักษณะที่เป็นทรงกระบอก หรือทรงกระสวยภายในเป็นที่อยู่ของดอกจริงประมาณ 2-7 ดอก ส่วนใบประดับส่วนบน (coma bract) มีลักษณะรูปร่าง และสีสันแตกต่างจากใบประดับปกติ นอกจากนี้การเกิดช่อดอกของพืชกลุ่มนี้จะเกิดในตำแหน่งที่แตกต่างกันตามชนิด ซึ่งอาจเกิดจากปลายลำต้นเทียม หรือเกิดจากเหง้าโดยตรง

ดอก ดอกจริงเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ไม่มีก้านช่อดอก สมมาตรของดอกเป็นแบบ bilateral ดอกย่อยมีกลีบเลี้ยงขนาดสั้น ส่วนโคนเชื่อมเป็นวงติดอยู่กับส่วนบนของรังไข่ปลายของกลีบเลี้ยงแยกออกเป็น 3 แฉก กลีบดอกชั้นนอกกลีบบนจะมีความกว้างมากกว่ากลีบล่าง 2 กลีบที่มีรูปร่างเหมือนกัน ส่วนกลีบดอกชั้นในอีก 3 กลีบจะเรียงตัวสลับกับกลีบชั้นนอก กลีบชั้นในที่อยู่ด้านข้าง

2 อัน จะมีรูปร่างเหมือนกัน กลีบล่างมีลักษณะเหมือนปาก ส่วนโคนเป็นร่องลึกตรงกลางมีขอบสันนูนเป็นทาง ขอบหยักเป็นริ้ว (จีรวัฒน์ ภู่บัวเผื่อน, 2535) ดอกจะอยู่ในซอกของใบประดับส่วนล่างของช่อดอก โดยแต่ละใบประดับอาจมีดอกอยู่ 4-6 ดอก ดอกในช่อดอกย่อยเดียวกันจะบานห่างกัน 4-6 วัน การบานของดอกเริ่มจากใบประดับใบแรกบริเวณโคนช่อดอกแล้วบานขึ้นไปทางปลายช่อ โดยเริ่มบานในช่วงเวลา 6.00-7.00 น. และมีอายุการบานของดอกเพียง 1 วัน หลังจากนั้นจะมีการบานของดอกในใบประดับถัดไปต่อเนื่องกันไปทุกวัน

ผล และเมล็ด ผลมีทรงกลมขนาดต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด และความสมบูรณ์ ผลมี 3 พู แบ่งอย่างชัดเจน ภายในมีเมล็ดรูปร่าง และขนาดคล้ายเมล็ดองุ่น ด้านปลายแหลมของเมล็ดมีเยื่อบางสีขาวมีลักษณะเป็นแฉกหลายแฉกติดอยู่ เมล็ดมักมีการพักตัวเหมือนกับการพักตัวของเหง้า

ราก เป็นรากฝอย รากส่วนหนึ่งมีปลายที่บวมพองออกมีลักษณะเป็นตุ้ม ทำหน้าที่เก็บสะสมน้ำและอาหาร ไม่สามารถตัดไปใช้ขยายพันธุ์ได้ ทั้งนี้ตุ้มรากจะค่อย ๆ เหี่ยวไปก่อน เมื่อเก็บรักษาไว้นานหัวพันธุ์ที่ไม่มีตุ้มราก หรือถูกตัดตุ้มรากทิ้งก่อนปลูกก็สามารถงอกได้เช่นเดียวกับหัวพันธุ์ที่มีตุ้มราก (สุรวิช วรรณไกรโรจน์, 2540)

การขยายพันธุ์ของปทุมมา และกระเจียวส่วนใหญ่ทำได้โดยวิธีการเพาะเมล็ด การผ่าเหง้า การแยกเหง้า และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคโนโลยีที่มีประโยชน์อย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นการขยายพันธุ์พืช หรือปรับปรุงพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ การเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช ไม่ว่าจะเป็นอวัยวะ เนื้อเยื่อเซลล์หรือเซลล์ที่ไม่มีผนัง (protoplast) มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และอยู่ในสภาวะควบคุมสิ่งแวดล้อม ส่วนของพืชเหล่านี้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้หลายรูปแบบ คือเป็นต้นโดยตรง หรือเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ เรียกว่าแคลลัส (callus) หรือเกิดเป็นคัพภะ เรียกว่าโซมาติกเอมบริโอ (somatic embryo) และเมื่อตัดเป็นชิ้น ๆ แล้วเปลี่ยนอาหารก็สามารถเพิ่มปริมาณได้ไม่มีที่สิ้นสุด ผลสุดท้ายจะได้ต้นจำนวนมากที่ลักษณะเหมือนกันทุกประการ (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2541)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะประสบความสำเร็จมากน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างที่มีบทบาทควบคุมการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืช สรุปได้ ดังนี้

2.2.1 ปัจจัยภายในพืช (endogenous factors)

2.2.1.1 ลักษณะทางพันธุกรรม (genetic factor) การเจริญและพัฒนาไปเป็นต้น และรากได้ง่ายหรือยากจะแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดพันธุ์ของพืช ถึงแม้ว่าได้เลี้ยงในกลุ่มของอาหารที่เหมาะสม ซึ่งพืชบางชนิดการเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นต้นและรากได้ต้องผ่านขบวนการออร์แก

โนเจเนซิสหรือขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส เป็นต้น (พรพิมล สุริยจันทราทอง, 2545) รายงานของทิพย์สุดา อนันกุล (2540) นำช่อดอกอ่อนและตายอดของกระเจียวพลอยทักษิณ (*Curcuma aurantiana* Van Zijp) พบว่าช่อดอกอ่อนชักนำให้เกิดต้นเฉลี่ย 0.1-1.7 ต้นต่อชิ้นส่วน ในขณะที่ตายอดชักนำให้เกิดต้นเฉลี่ย 0.8-2.2 ต้นต่อชิ้นส่วน

2.2.1.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) ที่ใช้เรียกทั้งสารที่เกิดจากธรรมชาติและสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาซึ่งมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของพืช ถ้าเป็นสารอินทรีย์ที่พบในธรรมชาติซึ่งพืชสร้างขึ้นมาเองจะเรียกว่า ฮอร์โมน สารเหล่านี้พืชจะสร้างขึ้นมาจากอวัยวะแห่งหนึ่ง ซึ่งเป็นคนละที่กับบริเวณที่สารทำงานและออกฤทธิ์ของฮอร์โมนไม่ว่าจะมีปริมาณมากหรือน้อยก็ตาม แต่ในปัจจุบันคำว่าฮอร์โมนมักใช้แทนสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาซึ่งมีอิทธิพลเหมือนกับฮอร์โมนที่พืชสังเคราะห์ขึ้นมา (ประภัสสร สูทกวาทิน, 2547) สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกันมากได้แก่ สารในกลุ่มออกซิน และไซโทไคนิน (แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ, 2547)

2.2.1.2.1 ออกซิน (Auxin) ในธรรมชาติฮอร์โมนกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการยืดของลำต้นและปล้อง ส่วนของพืชโค้งเข้าหาสิ่งเร้า (tropism) การยับยั้งการเจริญของตาข้าง (apical dominance) การหลุดร่วงของ ใบ ดอก และผลการเกิดราก เป็นต้น ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้นำเอาออกซินไปใช้ในการกระตุ้น การแบ่งเซลล์และการเกิดรากออกซินที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีดังต่อไปนี้ คือ indole-3 acetic acid (IAA), indole-3 butyric acid (IBA), naphthalene acetic acid (NAA), naphthoxy acetic acid (NOA), para-chlorophenoxy acetic acid (p-CPA), 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และ 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid (2,4,5-T)

2.2.1.2.2 ไซโทไคนิน (Cytokinin) ฮอร์โมนกลุ่มนี้มีผลกระตุ้นให้พืชเจริญเติบโต ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ กระตุ้นการเกิดยอดขณะที่ยับยั้งการเกิดรากและกระตุ้นให้เกิดแคลลัส เมื่อใช้ร่วมกันกับออกซินในอัตราส่วนที่เหมาะสม ไซโตไคนินเป็นสารประเภทที่ถูกสร้างขึ้นจากบริเวณปลายราก และ ใบอ่อน ไซโตไคนินชนิดที่นิยมใช้ส่วนใหญ่มีดังต่อไปนี้ คือ 6-benzyladenin (BA), 6-benzylaminopurine (BAP), 6-furfurylaminopurine (Kinetin) และ N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea (TDZ) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้น และถูกลำเลียงไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชในปริมาณต่ำ และมีผลต่อกระบวนการตอบสนองทางสรีรวิทยา ตลอดจนการเจริญเติบโตของพืชผลของฮอร์โมนพืช ที่จะแสดงออกในแต่ละส่วนของพืช (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2541)

2.2.2 ปัจจัยภายนอก (exogenous factors)

2.2.2.1 แสง (light) แสงไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการปรุงอาหารของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงแต่แสงช่วยให้เนื้อเยื่อมีการพัฒนาไปเป็นส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ ซึ่งการให้แสงควรพิจารณา ดังนี้ คุณภาพของแสง ความเข้มข้นของแสง และระยะเวลาในการให้แสง

2.2.2.2 อุณหภูมิ (temperature) โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ 25±2 องศาเซลเซียส

2.2.3 ปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเลี้ยง สภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและส่วนประกอบของอาหาร

2.2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุล *Curcuma*

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุล *Curcuma* มีการศึกษาทั้งใน และต่างประเทศ ดังนี้ อัญชลี จาละ (2557) ได้นำช่อดอกอ่อนของปทุมมาขนาด 0.5 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหาร MS และ ½ MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 มิลกรัมต่อลิตร พบว่าสูตรอาหาร MS และ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ผลเหมือนกัน คือมีจำนวนหน่องอกขึ้นมาใหม่สูงสุด ส่วนการทดลองเติมสารพาโคลบิวทราโซลเข้มข้น 0, 0.01, 0.1, 1.0, 5.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 2, 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการเจริญเติบโตลักษณะต่าง ๆ ที่ลดลง โดยเฉพาะความยาวเฉลี่ยก้านใบ เบญจพร ภูกาบหิน และคณะ (2559) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมหาอุดมแดง (*Curcuma pierreana* Gagnep.) เพื่อการอนุรักษ์พืชหายากในประเทศไทย พบว่าหน่ออ่อนที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดมากที่สุดเฉลี่ย 4.20 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช และหน่ออ่อนที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม IAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยมากที่สุด 25.71 รากต่อชิ้นส่วนพืช กรณ์ กรภัทร์ชัยกุล และคณะ (2560) ศึกษาการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของขมิ้นชันในหลอดทดลอง โดยการเพาะเลี้ยงตาจากเหง้า และหน่ออ่อนของขมิ้นชัน พบว่าอาหาร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดต้นมากที่สุด Prathanturarug *et al*., (2005) ศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดของขมิ้นชัน โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตา (bud explants) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม TDZ เข้มข้น 72.64 ไมโครโมลาร์ ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีอัตราการเกิดต้นใหม่เพิ่มขึ้นเป็น 11.4 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช Ferdous *et al*., (2012) ศึกษาการขยายพันธุ์ขมิ้นขาวป่าจากชิ้นส่วนตายอด และตาเหง้าในหลอดทดลอง นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA หรือ Kinetin 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครโมลาร์ เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ NAA และ IBA เข้มข้น 1, 1.5 และ 2 ไมโครโมลาร์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 8 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ชักนำให้เกิดยอดมากที่สุด 10 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ Rahayu and Adil (2012) ศึกษาการเพาะเลี้ยงตาเหง้าว่านชักมดลูก (*C. xanthorrhiza* Roxb.) ในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม TDZ เข้มข้น 0 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอด และรากมากที่สุด

2.3 การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ คือ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมภายในเซลล์ การกลายพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับการสูญหายไปของส่วนของยีน หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) ส่วนการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนส่วนของโครโมโซม การสูญหายไปหรือการเพิ่มเข้ามาของส่วนโครโมโซมที่ครอบคลุมมากกว่าหนึ่งยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของโครโมโซม (chromosome mutation) (สิรนุช ลามศรีจันทร์, 2540)

2.3.1 การกลายพันธุ์ของยีนเป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของยีนที่เกี่ยวข้องกับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide base) เพียงไม่กี่โมเลกุล ในยีนหนึ่ง ๆ สามารถทำให้สารทางพันธุกรรมของยีนนั้นต่างไปจากเดิม การกลายพันธุ์ของยีนแบ่งตามการเกิดได้ 2 ชนิด คือ

2.3.1.1 frameshift mutation การเพิ่ม หรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จากโมเลกุลดีเอ็นเอเพียง 1 โมเลกุล สามารถทำให้กรอบการอ่านของรหัสทีละ 3 โมเลกุล เปลี่ยนไปจากเดิม เป็นผลให้โปรตีนที่สร้างจากยีนดังกล่าวผิดไปจากเดิม ทำให้ไม่สามารถทำงานได้เหมือนเดิม หรือทำงานไม่ได้เลย

2.3.1.2 base substitution การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการแทนที่คู่เบส มีการเข้าแทนที่คู่เบสด้วยเบสอื่นในกลุ่มเดียวกัน เรียกว่า ทรานซิชัน (transition) ส่วนการเปลี่ยนแปลงแบบสลับคู่ของเบสที่ต่างกลุ่มกัน เรียกว่า ทรานสเวอร์ชัน (transvertion) การกลายพันธุ์ของยีนแบบเบสซับสติติวชัน มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า การกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation)

2.3.2 การกลายพันธุ์ของโครโมโซม คือ การเปลี่ยนแปลงจำนวนหรือโครงสร้างของโครโมโซม แบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่

2.3.2.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม (changes in the structure of chromosome) คือ การขาดหายไปของส่วนของโครโมโซม (deletion หรือ deficiency) ทำให้ยีนจำนวนหนึ่งขาดหายไปด้วย หรือการที่มียีนหรือส่วนของโครโมโซมเพิ่มเข้ามามากกว่าปกติ (duplication) หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงกลับทิศทางของส่วนของโครโมโซม (inversion) หรือเกิดการย้ายสลับที่ระหว่างส่วนของโครโมโซมที่ต่างคู่กัน (translocation) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้มีผลมากน้อยต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของยีน และจำนวนยีนที่เกี่ยวข้อง

2.3.2.2 การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม (changes in the number of chromosome) เกิดจากความผิดปกติในกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) โดยที่โครโมโซมที่เป็นคู่กันคู่ใดคู่หนึ่งไม่แยกจากกัน เรียกว่า นอนดิสจังชัน (nondisjunction) หรืออาจเกิดจากการยับยั้งการเคลื่อนที่ของโครโมโซมไปยังขั้วของเซลล์ในระยะแอนาเฟส (anaphase) ทำให้เซลล์สืบพันธุ์บางเซลล์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น และบางเซลล์มีจำนวนโครโมโซมน้อยกว่าปกติเมื่อมีการผสมพันธุ์ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ปกติหรือผิดปกติด้วยกันก็ตาม ทำให้ได้ต้นลูกที่เกิดใหม่มีความผิดปกติในจำนวนโครโมโซม

2.3.3 สาเหตุของการกลายพันธุ์มี 2 ประการ คือ

2.3.3.1 การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) คือ เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยมนุษย์ไม่มีส่วนเกี่ยวข้อง (Harten, 1998) สาเหตุของการกลายตามธรรมชาติไม่เป็นที่แน่ชัดไม่สามารถบอกได้ว่ามาจากปัจจัยใดปัจจัยหนึ่ง หรือหลาย ๆ ปัจจัยร่วมกัน อาจเป็นผลของปัจจัยภายในเซลล์ของพืชเองหรืออาจเกิดจากสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นปัจจัยภายนอกและเกิดขึ้นในอัตราค่อนข้างต่ำ

2.3.3.2 การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำ (induced mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้วิธีการ หรือสิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) ต่าง ๆ เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ได้แก่ สิ่งก่อกลายพันธุ์ โดยสิ่งก่อกลายพันธุ์แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี และสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ สำหรับสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี คือสารเคมีหลายชนิดที่สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ในสิ่งมีชีวิต โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยีนมากกว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง หรือจำนวนชุดโครโมโซมสารเคมีที่มีการศึกษาและนิยมใช้อย่างกว้างขวางในการทำให้เปลี่ยนแปลงที่มียีนมี 4 กลุ่ม คือกลุ่มแรก คือสารเคมีที่มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกับเบสในดีเอ็นเอ กลุ่มสอง คือกลุ่มที่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับเบสในดีเอ็นเอ กลุ่มสาม คือสารที่สามารถเข้าแทนที่เบส purine ในสายดีเอ็นเอได้ เช่น พวก alkylating agents และ กลุ่มสี่ คือสารที่มีสมบัติในการลดหรือเพิ่มเบสในดีเอ็นเอ เช่น acridine สำหรับสารเคมีที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมหรือ polyploid คือสารละลายโคลชิซิน (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2550) ส่วนสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา รังสีอุลตร้าไวโอเลต และอนุภาคนิวตรอน รังสีมีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยมีผลตั้งแต่ระดับโมเลกุลไปจนกระทั่งถึงระดับเซลล์ เนื้อเยื่อและอวัยวะ ผลทางตรงได้แก่ การที่รังสีที่เกิดจากการแตกตัวของประจุ ทำลายโมเลกุลของสารต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ หรือเป็นองค์ประกอบของเซลล์ เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลิอิก โดยเฉพาะดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นสารที่เก็บข้อมูลและถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ส่วนผลทางอ้อม คือรังสีจะทำให้น้ำซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของเซลล์สิ่งมีชีวิตถูกไอออไนซ์ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นอาจรวมตัวกับโมเลกุลอื่น ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์อยู่ภายในเซลล์ ทำให้โครงสร้างทางเคมีของสารนั้นเปลี่ยนแปลงไป หรืออนุมูลอิสระอาจรวมตัวกันใหม่กลายเป็นสารอื่น ๆ ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์หรือสารต่าง ๆ ภายในเซลล์ จากผลของอนุมูลอิสระดังกล่าว อาจทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต จนกระทั่งถึงตายได้ (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2550)

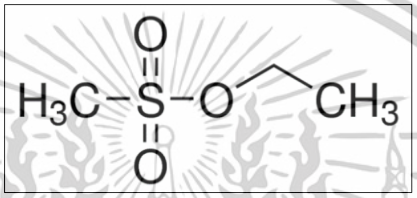
2.3.4 การกลายพันธุ์เนื่องจาก การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ มักทำให้ได้พืชที่กลายพันธุ์ในระดับต่าง ๆ กัน อัตราการกลายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อในสารอาหาร ขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์ และเนื้อเยื่อที่ใช้เพาะเลี้ยง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง โดยปกติเนื้อเยื่อจากตาข้าง (axillary bud) ปลายยอด (shoot tip) และเนื้อเยื่อที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (meristem) มีอัตราการกลายพันธุ์ต่ำ อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการแยกเนื้อเยื่อดังกล่าว และเพาะเลี้ยงต่อไป เพื่อการ

ขยายพันธุ์ หรือแยกเนื้อเยื่อออกจากกันเพื่อให้ได้เซลล์อิสระ หรือย่อยผนังเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ไร้ผนัง (protoplast) พืชที่ได้จากเนื้อเยื่อเซลล์เหล่านี้ มักมีอัตราการกลายพันธุ์สูง และอัตราการกลายพันธุ์จะเพิ่มมากยิ่งขึ้น เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสารอาหารนานขึ้น ก่อนที่จะกระตุ้นให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อพัฒนาเป็นต้นพืช เรียกความแปรปรวนทางพันธุกรรม ที่เกิดจากกลุ่มของเซลล์ (callus) ที่เลี้ยงในสารอาหารว่า somaclonal variation ถ้าเกิดจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนัง เรียกว่า protoclonal variation ถ้าเกิดจากการเพาะเลี้ยงเชื้อสืบพันธุ์ เรียกว่า gametoclonal variation สภาพแวดล้อมในสารอาหารประกอบกับกระบวนการพัฒนาย้อนกลับ (dedifferentiation) และกลับมาพัฒนาใหม่ (redifferentiation) ของเซลล์ เป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ ในบางกรณีการกลายพันธุ์ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ อาจเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ แต่กลับเป็นผลเสียต่อการขยายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงเซลล์อิสระ (single cell) ก่อนหรือหลังการเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ ช่วยให้หลีกเลี่ยงปัญหา การเกิดเซลล์ผิดปกติปนอยู่กับเซลล์ปกติ (chimera) และช่วยให้การค้นหาพืชกลายพันธุ์ที่มีเซลล์ผิดปกติล้วนๆ (uniform mutant) สะดวกยิ่งขึ้น จำนวนของเซลล์ในสารอาหาร สามารถเพิ่มปริมาณได้นับล้านอย่างรวดเร็ว ช่วยเพิ่มโอกาสที่จะได้เซลล์กลายพันธุ์มากยิ่งขึ้น (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2541) จากการศึกษาการใช้สารก่อกลายพันธุ์ในเบญจมาศ พบว่าเบญจมาศสายพันธุ์วิวิค ที่แช่ในสารละลาย EMS ดอกเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลือง สีขาวและสีเหลืองในดอกเดียวกัน และเบญจมาศ สายพันธุ์แคนเทอร์ ที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน ดอกเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีชมพูอมส้ม สีม่วงอ่อน และสีชมพูอ่อนขอบกลีบดอกสีขาว (วารี อยู่สำราญ, 2561)

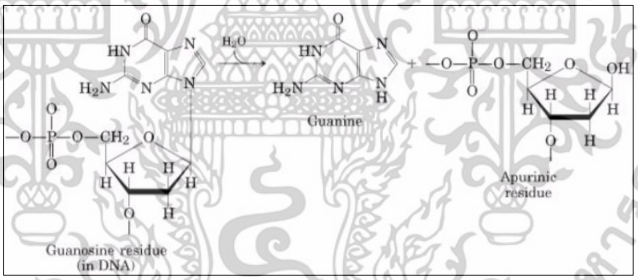
2.4 คุณสมบัติของสารละลาย ethyl methanesulphonate (EMS)

สารละลาย EMS มีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ $CH_3SO_2OC_2H_5$ (ภาพที่ 2.3) เป็นของเหลวใสไม่มีสี มีความหนาแน่น (g/ml) เท่ากับ 1.203 มีจุดเดือดเท่ากับ 85-86 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 10 มิลลิเมตรของปรอท มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 124 ละลายน้ำได้ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารเคมีที่นิยมใช้มากที่สุดในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และใช้ได้ผลดีกับพืชทุกชนิด สารเคมี EMS มีหมู่เอทิล คือ C_2H_5 ซึ่งจะถูกถ่ายให้กับโมเลกุลของดีเอ็นเอ ในปฏิกิริยาแอลคิเลชัน (alkylation) โดยสารละลาย EMS สามารถเข้าทำปฏิกิริยาแอลคิเลชันกับเบสพิวรีน และไพริมิดิน รวมทั้งหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอด้วย และปฏิกิริยาแอลคิเลชันจะเกิดมากที่สุดในตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนิน (G) หลังจากทำปฏิกิริยาแล้วกลายเป็น 7 – ethyguanine หรือเรียกว่า alkylated base guanine การกลายพันธุ์ที่เกิดจากสารเคมี EMS อาจเกิดจากการเข้าแทนที่คู่เบส (single base substitution) การหลุดหายไปของเบสพิวรินจากสารดีเอ็นเอ (depurination) (ภาพที่ 2.4) และการตัดขาดของเส้นเดี่ยว และเส้นคู่ของดีเอ็นเอ (single strand or double strand break) (สิรนุช ลามศรีจันทร์, 2540) โดยปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารละลาย EMS ในการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดี ได้แก่ ความเข้มของสารละลาย EMS ความเข้มข้นที่สูงสามารถเพิ่มโอกาสการกลายพันธุ์ได้ แต่ในขณะเดียวกันก็อาจเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อหรือเซลล์พืช ความเข้มข้นที่นิยมใช้ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 0.1-0.5

เปอร์เซ็นต์ โดยพิจารณาจากชนิดของพืชและระยะเวลาในการแช่สาร (Talebi *et al*., 2012) ระยะเวลาในการแช่สาร ระยะเวลานานขึ้นจะเพิ่มอัตราการกลายพันธุ์ แต่ต้องควบคุมไม่ให้เนื้อเยื่อเสียหาย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดพืชและชิ้นส่วนพืชที่นำมาแช่ (Khan, 2009) และอุณหภูมิ สารละลาย EMS ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส (Harten, 1998) สารละลาย EMS ไม่ควรเตรียมไว้ล่วงหน้า เพราะ EMS ไวต่อการเข้าทำปฏิกิริยามาก ค่าครึ่งชีวิตเปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิและพีเอช สารละลาย EMS พีเอชเท่ากับ 7 ค่าครึ่งชีวิตที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เท่ากับ 93 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ค่าครึ่งชีวิตเหลือ 26 และ 10.4 ชั่วโมง ตามลำดับ (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2550)



ภาพที่ 2.3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารละลาย EMS;
ที่มา:https://en.wikipedia.org/wiki/Ethyl_methanesulfonate



ภาพที่ 2.4 การเกิด depurination ของเบสอะดีนีน; ที่มา: Benjamin, 2000

2.4.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารละลาย EMS

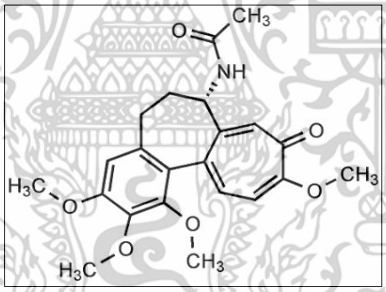
การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลาย EMS นั้นสามารถทำได้ในพืชหลายชนิด จากการศึกษาภายในประเทศมีดังนี้ ปวีณา นวมเจริญ (2541) ศึกษาความแปรปรวนของการผลิตน้ำมัน และกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยที่ผ่านการชักนำด้วยสารละลาย EMS จากการวิเคราะห์โครมาโตกราฟฟี พบว่าแคลลัสจากใบเลี้ยงที่ได้รับสารละลาย EMS มีปริมาณน้ำมันสูงกว่าแคลลัสที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS และไม่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดไขมันหลัก ยุพาภรณ์ ศิริโสม และสมปอง เตชะโต (2551) ศึกษาการกลายพันธุ์ด้วยสารละลาย EMS ของใบกล็อกซิเนียโดยใช้ชิ้นส่วนของใบโดยใช้สารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0-1 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 และ 90 นาที พบว่าลักษณะยอดทั้งหมดผิดปกติ เช่น ยอดมีขนาดเล็ก ใบสีเขียวอ่อน และใบซีด ไซนีย๊ะ สะมะลา และคณะ (2557) นำชิ้นส่วนข้อเบญจมาศในขวดทดลองมาแช่สารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0,

0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 และ 90 นาที พบว่าค่า LD_{50} ที่เวลา 60 นาที คือความเข้มข้น 1.01 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เวลา 90 นาที คือความเข้มข้น 0.44 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นสาร EMS 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 นาที ส่งผลให้เกิดรูของปากใบ 2 รู ต่อปากใบ ดังนั้นการแช่ชิ้นส่วนข้อในสารละลาย EMS เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที และ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที ส่งผลให้ปากใบมีการเปลี่ยนแปลง ชานนท์ ลาภจิตร และเมิง-เจียว เจิง (2560) ได้นำ PLBs (Protocom-likebodies) ของ กล้วยไม้ *Erycina pusilla* มาแช่สาร EMS ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0, 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาในการแช่สารแตกต่างกันคือ 1 และ 2 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน ชิ้นส่วนของ PLBs เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน สารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เวลา 1 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตของ PLBs สูงที่สุด และมีการเจริญเติบโตหลังได้รับสารดีที่สุด นอกจากนี้ยังมีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยทำการทดลองที่ต่างประเทศมีดังนี้ Latado *et al*., (2004) ศึกษาการกลายพันธุ์ของเบญจมาศสายพันธุ์ที่มีดอกสีชมพูเข้ม โดยใช้สารละลาย EMS นำก้านดอกอ่อนแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.77 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง 45 นาที พบว่าเกิดการกลายพันธุ์ทั้งหมด 5.2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้กลีบดอกเปลี่ยนสีจากดอกสีชมพูเข้มเป็น สีชมพูส้ม สีชมพูอ่อนบรอนซ์ สีขาว สีเหลือง และสีส้ม Luan *et al.* (2007) ได้ชักนำการกลายพันธุ์ของในแคลลัสของมันเทศ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถต้านทานต่อความเค็ม โดยใช้สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 ชั่วโมง พบว่าแคลลัสที่จุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 และ 2.5 ชั่วโมง สามารถเจริญและพัฒนาต่อได้ในอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ Kumar *et al*. (2010) ได้นำแคลลัสของลัฟเลมอนมาแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลาย EMS เพิ่มขึ้น อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลง โดยที่ความเข้มข้นของสารละลาย EMS 0.4 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้แคลลัสตายทั้งหมด และยังพบว่ามีเพียงแคลลัสกลุ่มควบคุม และแคลลัสที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นที่สามารถพัฒนาต่อไปได้ คิดเป็น 9 และ 5.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Fang (2011) ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในต้นแอฟริกันไวโอเลตโดยใช้สารละลาย EMS 4 ความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.2, 0.4 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ และเวลาที่แช่สาร 5 เวลา ได้แก่ 0, 30, 60, 120 และ 240 นาที พบว่าที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เวลา 30 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 80 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เวลา 30 นาที และ 120 นาที มีลักษณะของดอกที่แตกต่างไปจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS

2.5 คุณสมบัติของสารละลายโคลชิซิน

โคลชิซิน เป็นสารประกอบอโรมาติกในกลุ่มอัลคาลอยด์ สูตรโมเลกุล $C_{22}H_{25}NO_6$ (ภาพที่ 2.5) น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 399.43 พบในพืชบางชนิด เช่น *Colchicum antumnale* L. มีสมบัติในการเพิ่มชุดของโครโมโซม โดยสารเคมีเหล่านี้จะจับกับโมเลกุลทูบูลินของสปินเดิล ทำให้โมเลกุลไม่ทำหน้าที่ไม่สามารถรวมตัวสร้างไมโครทูบูล ส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างสปินเดิลไฟเบอร์ จึงไม่สามารถแยกโครโมโซมไปที่ขั้วเซลล์ได้ ทำให้เพิ่มจำนวนโครโมโซมจากดิพลอยด์เป็น

โพลีพลอยด์ การใช้โคลชิซินเพื่อเพิ่มชุดโครโมโซมในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะนั้นอาจเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และล้างออกหลังจากเพาะเลี้ยงไปช่วงระยะเวลาหนึ่ง มักใช้กับเมล็ดที่กำลังงอกหรือส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ ความเข้มข้นที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่นิยมใช้และก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ใช้ประโยชน์ได้คือ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ สารโคลชิซินนี้มีผู้นำมาใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชอย่างกว้างขวาง เนื่องจากไม่เป็นอันตรายต่อต้นพืช แม้จะใช้ในอัตราสูง เพราะเป็นสารที่สกัดจากพืช เคลื่อนย้ายไปตามส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยยังคงรักษารูปเดิม และทำหน้าที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เป็นเวลานาน อีกทั้งไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยีน เนื่องจากโคลชิซินสลายตัวเมื่อโดนความร้อนชื้น ส่งผลให้การเพิ่มชุดโครโมโซมลดลง หรือหายไป ดังนั้นจึงต้องกรองด้วยกระดาษกรองมิลลิพอร์ ทำให้สะดวกในการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ อย่างไรก็ตามในพืชบางชนิดโคลชิซินส่งผลให้พืชเป็นหมัน การเจริญเติบโตที่ผิดปกติและเกิดการขาดของโครโมโซมได้ (นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์, 2546) โดยปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารละลายโคลชิซินในการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดี ได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน หากใช้ความเข้มข้นที่สูงเกินไปทำให้เนื้อเยื่อพืชตาย (Eigsti and Dustin, 1995) ระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซิน ระยะเวลาที่นานเกินไปทำให้เป็นพิษต่อเซลล์ และอุณหภูมิของสารละลายโคลชิซิน (Dhooghe *et al*., 2011)

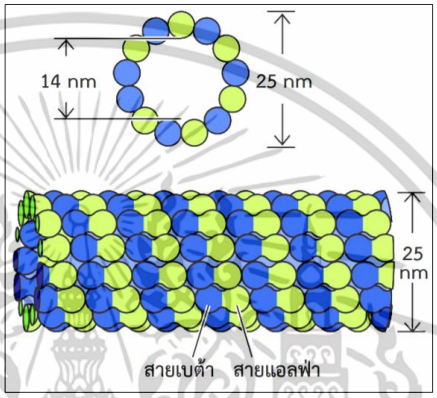


ภาพที่ 2.5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารละลาย โคลชิซิน;
ที่มา https://en.wikipedia.org/wiki/Colchicine

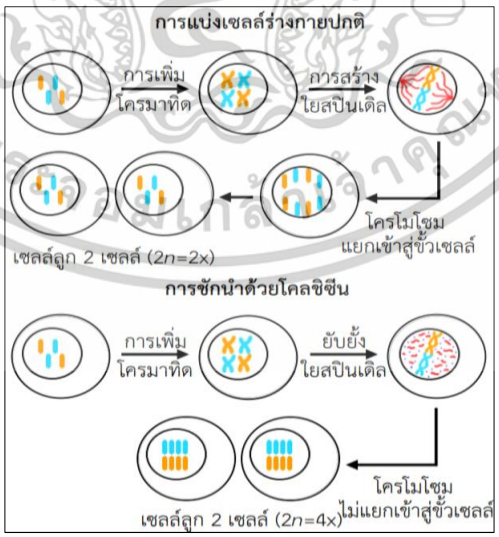
2.5.1 กลไกการยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล

โคลชิซินจะเข้าไปยับยั้งการสร้างไมโครทิวบูล (microtubule) ที่มีโครงสร้างเป็นโปรตีน ไมโครทิวบูล เป็นองค์ประกอบของเส้นใยสปินเดิลมีลักษณะเป็นท่อยาว มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางขอบนอก 25 นาโนเมตร และขอบใน 14 นาโนเมตร ผนังของไมโครทิวบูล ประกอบด้วย 13 โปรโตฟิลาเมนต์ (protofilament) เรียงกันเป็นวงกลม แต่ละโปรโตฟิลาเมนต์ เกิดจากโปรตีนทูบูลิน (tubulin) มาเรียงต่อกันในแนวยาว โปรตีนทูบูลินมี 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดแอลฟ่า (alpha) และเบต้า (bata) ทั้งสองชนิดมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-5 นาโนเมตร และมีน้ำหนักโมเลกุล 50,000 ดาลตัน โดยโปรตีนทูบูลินแต่ละชนิดจะมาจับต่อกันเรียกว่า กระบวนการ polymerization กลายเป็น

ไมโครทิวบูล ส่วนปลายของไมโครทิวบูลที่มีการเจริญยืดยาวออกไปเรียกว่า “ปลายบวก” ซึ่งจะมีการรวมกันของโปรตีนทูบูลินเกิดขึ้น ส่วนปลายที่อยู่ตรงกันข้ามเรียกว่า “ปลายลบ” เป็นปลายที่มีการสลายของไมโครทิวบูล (ภาพที่ 2.6) ในการใช้สารละลาย โคลชิซิน กับพืช โคลชิซิน จะเข้าไปยับยั้งกระบวนการ polymerization โดยจะจับกับโปรตีนทูบูลินและยับยั้งการเพิ่มของโปรตีนทูบูลินที่ด้านปลายบวกทำให้ไม่สามารถสร้างไมโครทิวบูลได้ส่งผลให้เส้นใยสปินเดิลไม่สมบูรณ์หรือมีการขาดหายไป โครโมโซมระยะเมทาเฟสจึงไม่แยกออกจากกันและไม่มีการเคลื่อนที่ไปยังขั้วตรงกันข้ามในระยะแอนาเฟสทำให้เซลล์ที่เกิดในสภาพนี้มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มมากขึ้นเป็น 2 เท่า (ภาพที่ 2.7)



ภาพที่ 2.6 องค์ประกอบของใยสปินเดิลที่ประกอบด้วยไมโครทิวบูลเป็นโครงสร้างหลัก มีลักษณะเป็นท่อยาว ผนังของไมโครทิวบูลประกอบด้วย 13 โปรโตฟิลาเมนต์ เรียงกันเป็นวงกลม แต่ละโปรโตฟิลาเมนต์เกิดจากโปรตีนทูบูลินชนิดแอลฟ่า และเบต้ามาเรียงต่อกันในแนวยาว;
ที่มา: https://honorsbiologycellproject.weebly.com/all-cells-have.html



ภาพที่ 2.7 การแบ่งเซลล์ร่างกายปกติ และการแบ่งเซลล์ร่างกายที่ถูกชักนำด้วยสารละลายโคลชิซิน;
ที่มา: https://gelecekbilimde.net/bitkilerde-ploidi-ve-cekirdeksizlik-iliskisi-karpuz-ornegi/#undefined

2.5.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารละลายโคลชิซิน

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซินนั้นสามารถทำได้ในพืชหลายชนิดจากการศึกษาภายในประเทศมีดังนี้ อุษา เพชรบ้านนา และคณะ (2552) โดยนำต้นกล้ากล้วยไม้ดินใบหมากอายุ 3 เดือน หลังจากเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อมาแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เวลา 48 ชั่วโมง ให้อัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าน้อยที่สุด คือ 66.25 เปอร์เซ็นต์ จำนวนคลอโรพลาสต์ต่อปากใบ ขนาดของปากใบ และจำนวนปากใบต่อพื้นที่ ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละหน่วยการทดลอง ศตปพร เกิดสุวรรณ และคณะ (2558) ศึกษาผลของโคลชิซินต่อการชักนำ polyploid ในแววมยุราในหลอดทดลอง พบว่าปลายยอดที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) จากการตรวจสอบจำนวนโครโมโซมเซลล์ปลายราก พบว่าสามารถชักนำต้น mixoploid (2n = 2x = 18 และ 2n = 4x = 36) ได้สูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาต้น mixoploid พบว่ากลีบดอกล่างมีขนาดใหญ่ขึ้น ดอกมีสีม่วงอมชมพู สีดอกเข้มขึ้น ใบ และรังไข่ขนาดใหญ่กว่าชุดควบคุม บัณฑิตา วงศ์สุริยะ และคณะ (2560) ได้ทำการศึกษาการแช่ชิ้นส่วนข้อของลินเดอเนีย ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Linderniaceae มีลักษณะคล้ายต้นแววมยุรา ในอาหารสูตร ½ MS ที่มีสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าชิ้นส่วนมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ทำให้ชิ้นส่วนพืชมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 15 เปอร์เซ็นต์ จากการคัดเลือกต้นที่คาดว่าเป็น polyploid พบว่าต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีความหนาของลำต้นเพิ่มขึ้น ความสูงของต้นลดลง ใบหดสั้นลง มีลักษณะหงิกงอในทุกความเข้มข้นซึ่งแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน นอกจากนี้ยังมีการใช้สารละลายโคลชิซิน กับพืชอีกหลายชนิดในการทดลองของต่างประเทศดังนี้ Gantait *et al*. (2011) ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมของต้นเยอร์บีราโดยใช้สารละลายโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ส่วนยอดที่เพาะได้ในสภาพปลอดเชื้อไปแช่สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2, 4 และ 8 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ tetraploid ได้ดีที่สุด โดยสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ถึง 64 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการย้ายปลูกพบว่าต้นเยอร์บีราที่เป็น tetraploid มีการเจริญเติบโตช้ากว่า เมื่อเปรียบเทียบกับต้นเยอร์บีราที่เป็น diploid นอกจากนี้ยังพบว่าต้นเยอร์บีราที่เป็น tetraploid มีขนาดใบ ดอกที่ใหญ่ขึ้น และมีก้านชูดอกยาวขึ้นและแข็งกว่าต้นเยอร์บีราที่เป็นต้น diploid และ He *et al*. (2016) ศึกษาการชักนำให้เกิดต้น polyploidy โดยใช้สารละลายโคลชิซินในต้นเบญจมาศ โดยใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ ยอด เมล็ดที่ยังไม่งอก และเมล็ดที่งอกแล้ว นำมาแช่ในสารละลายโคลชิซิน ที่ความเข้มข้น 100, 200, 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาที่ใช้ในการแช่สาร 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า

เมล็ดที่งอกแล้วที่ถูกแช่ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีอัตราการกลายพันธุ์สูงสุด 14.5 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดที่ยังไม่งอกที่ถูกแช่ที่ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ชั่วโมง มีอัตราการกลายพันธุ์สูงสุด 11 เปอร์เซ็นต์ และยอดถูกแช่ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจาก 7 วันพบว่ามีอัตราการกลายพันธุ์สูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อต้นเบญจมาศออกดอกพบว่าต้น tetraploid มีลักษณะของใบ ดอก และปากใบใหญ่กว่าต้น diploid และ Phuc Huy *et al*. (2018) ศึกษาการชักนำให้เกิดต้น polyploidy โดยใช้สารละลายโคลชิซิน ในกล้วยไม้ *Paphiopedilum villosum* นำยอดที่มีความยาว 1.5 เซนติเมตร มาแช่ในสารละลายโคลชิซิน ที่ความเข้มข้น 2, 10 และ 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3, 6 และ 9 วัน ในที่มืด พบว่ามีการชักนำให้เกิดต้น polyploid 19.88 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ระยะเวลา 6 วัน และจากการนำไปตรวจสอบด้วย flow cytometric และการนับจำนวนโครโมโซมปลายราก พบว่ามีการเกิด tetraploid และ mixoploid เช่นเดียวกับ Podwyszynska *et al*. (2018) ศึกษาการเกิดต้น polyploid ในสภาพปลอดเชื้อ และการประเมินต้น tetraploid ของทิวลิป ใช้ทิวลิป 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Fringed Black, Victor และ Pol-D 32 นำตาข้างของทิวลิปทั้งสามสายพันธุ์มาทรีทด้วยสารละลายโคลชิซิน ความเข้มเข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร oryzalin ความเข้มเข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร amprophos methyl ความเข้มเข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตรและ trifluralin ความเข้มเข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสายพันธุ์ Fringed Black มีการเกิดต้น tetraploid และ octoploid มากที่สุด นอกจากนี้ลักษณะของดอกที่พบมีขนาดเล็กกว่าต้นปกติ ก้านช่อดอกมีขนาดสั้นลง Manzoor *et al*. (2018) ศึกษาการชักนำให้เกิด polyploid โดยใช้สารละลายโคลชิซิน ในแกลดิโอลัสสายพันธุ์ ‘White Prosperity’ โดยการใช้หัวของแกลลดิโอลัสมาแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าทุกความเข้มข้นมีอัตราการแตกหน่อใหม่ที่ลดลง ใบ ช่อดอก และกลีบดอกมีลักษณะที่แตกต่างจากต้นปกติ และ Zhou *et al*. (2020) ศึกษาการชักนำให้เกิด polyploid โดยใช้สารละลายโคลชิซิน ในขิงสายพันธุ์ ‘Fengtou’ โดยใช้ชิ้นส่วนของตายอดมาแช่สารละลาย โคลชิซิน ที่ความเข้มข้น 20, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 3, 5 และ 7 วัน พบว่าความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 7 วัน มีการเหนี่ยวนำให้เกิดต้น tetraploid มากที่สุด มีอัตราการเพิ่มขึ้นของโครโมโซม 18 เปอร์เซ็นต์ มีความยาว ความกว้าง และความหนาของใบมากกว่าต้น diploid

2.6 ค่า median lethal dose (LD_{50})

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารที่ร่างกายได้รับกับอาการตอบสนองต่อพิษนั้น ทำโดยนำสัตว์มาทดลองกับสารพิษเพื่อดูว่าสัตว์ทดลองมีอาการตอบสนองต่อสารพิษอย่างไร การศึกษามักเริ่มต้นด้วยการหาค่า median lethal dose (LD_{50}) (มลิวรรณ บุญเสนอ, 2544) โดยค่า LD_{50} หมายถึง ปริมาณของสารพิษหรือวัตถุเคมีหน่วยเป็นมิลลิกรัม เทียบกับน้ำหนักของสัตว์ทดลองหน่วยเป็นกิโลกรัม ที่สามารถทำให้สัตว์ทดลองตายลงครึ่งหนึ่งของจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด

(สมชัย ภัทรธนานันท์, 2539; อรุณี คงศักดิ์ไพศาล และคณะ, 2557) ส่วนในการทดลองหาค่า LD_{50} ในพืชสามารถศึกษาได้จากการให้สารพิษหรือวัตถุเคมีปริมาณหนึ่ง แล้วทำให้พืชตาย 50 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม เมื่อตรวจสอบต้นพืชที่ระยะใดระยะหนึ่งหลังจากการให้สารพิษหรือวัตถุเคมี เช่น 30 วัน ($LD_{50(30)}$) หรือ 60 วัน ($LD_{50(60)}$) เป็นต้น (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2550)

การนำค่า LD_{50} ไปใช้ประโยชน์ในด้านงานวิจัยได้สามารถเลือกความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ที่ให้ระดับการกลายพันธุ์สูงสุดโดยไม่ทำลายพืช ช่วยในการปรับแผนการทดลอง เช่น ถ้าพบว่า LD_{50} ของพืชชนิดหนึ่งคือ 0.2 เปอร์เซ็นต์ EMS นาน 120 นาที นักวิจัยสามารถเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวเพื่อให้ได้ต้นที่มีการกลายพันธุ์ได้มากที่สุด

2.7 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ในพืช

2.7.1 วิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของพืช ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลาย EMS สามารถตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา การตรวจสอบโครงสร้างภายในเซลล์พืช และการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ

2.7.1.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ความแปรปรวนจากการกลายพันธุ์ สามารถตรวจสอบได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้ง่าย จากการสังเกตลักษณะที่เกิดขึ้น มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านยีนบนโครโมโซม ภายหลังการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งลักษณะที่ปรากฏ เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงข้อมูลที่เป็นองค์ประกอบทางจีโนไทป์ และสิ่งแวดล้อมส่งผลให้แสดงลักษณะนั้น ๆ ออกมา เช่น ลักษณะการเจริญเติบโต ลำต้น ใบ ดอก ผล ราก เป็นต้น

2.7.1.2 ตรวจสอบโครงสร้างภายในเซลล์พืช สามารถตรวจสอบได้จากลักษณะรูปร่างของปากใบ การนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ และการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

2.7.1.3 การตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

RAPD เป็นวิธีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR แบบหนึ่งที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) วิธีการนี้มีการเรียกชื่อแบบอื่นได้อีก เช่น arbitrarily primed PCR (AP-PCR), DNA amplification fingerprinting (DAF) หรือ multiple arbitrary amplicon profiling (MAAP) ซึ่งแต่ละวิธีที่เรียกนี้มีข้อแตกต่างกันบ้าง คือ ขนาดของไพรเมอร์ที่ใช้ แต่หลักการไม่แตกต่างกัน คือใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม มีนักวิจัยบางกลุ่มใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดพร้อมกัน ซึ่งก็ใช้ได้เช่นเดียวกัน แต่ที่นิยม คือใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวและใช้วิธีแบบที่เรียกว่า RAPD (Williams *et al*., 1990) โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลี

โอไทด์เพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีสิสในเจลอะกาโรส และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิลเดียมโบรไมด์ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

หลักการทำ RAPD (Principle of RAPD) วิธี RAPD ของ Williams *et al*. (1990) ใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่มีเบสคู่สมกัน โดยไม่จำเป็นต้องทราบว่าไพรเมอร์จะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอส่วนใดบนโครโมโซมใด โอกาสที่จะพบลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับไพรเมอร์คือ 1 ใน 4 โดยประมาณ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอโดยเกิดคู่สมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดมีสัดส่วนเท่า ๆ กันในจีโนม สามารถประมาณค่าของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่จะเกิดขึ้นจากไพรเมอร์ 1 ชนิดได้จากสมการ $b = (2,000 \times 4^{2n}) \times C$ เมื่อ b คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่คาดหมายในหนึ่งไพรเมอร์ n คือความยาวของไพรเมอร์ คิดเป็นจำนวนนิวคลีโอไทด์ และ C คือค่าของขนาดจีโนมหรือค่า C value ตัวอย่างเช่น ข้าวโพดมีจีโนมขนาด 6×10^9 คู่เบส นำมาทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ (10-mer) จะได้แถบดีเอ็นเอประมาณ 10.9 แถบ แต่จากการทดลองของนักวิจัยหลายท่านพบว่า จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอยู่กับขนาดของจีโนม พืชที่มีจีโนมขนาดใหญ่อาจเกิดแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าพืชที่มีจีโนมขนาดเล็กก็ได้ การเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นผลมาจากไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้หลายบริเวณ ถ้าไพรเมอร์ไปเกาะกับดีเอ็นเอ 2 บริเวณที่อยู่ไม่ไกลกันมาก โดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางเข้ากัน (5’ ไป 3’) จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงดังกล่าวได้ แต่ถ้าไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอสายเดียวกันในทิศทางเดียวกัน หรือเกาะกับดีเอ็นเอคนละสาย แต่ทิศทางแยกออกจากกัน หรือเกาะได้ใน 2 สายที่ห่างไกลกันมากแม้ทิศทางจะเข้าหากันก็ไม่สามารถจะเกิดผลผลิตได้ ความแตกต่างของแถบ RAPD หรือพอลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นระหว่างแต่ละตัวอย่างอาจเกิดจาก การมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่มาสอดแทรกในระหว่างตำแหน่ง 2 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะทำให้ไพรเมอร์ทั้งสองโมเลกุลอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นที่เกาะกับไพรเมอร์หายไปหนึ่งตำแหน่งหรือทั้ง 2 ตำแหน่งทำให้ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอจากบริเวณดังกล่าว มีการแทนที่ หรือเปลี่ยนแปลงบริเวณที่เป็นที่เกาะของไพรเมอร์ทำให้ไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายไม่ได้จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กสอดแทรกเข้ามาหรือหายไป ทำให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเปลี่ยนแปลงไป อย่างไรก็ดีพอลิมอร์ฟิซึมของ RAPD มักเกิดขึ้นในลักษณะการมีและการไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ มากกว่าการเปลี่ยนขนาดของแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอของพืชที่พบทั้งจากนิวเคลียส คลอโรพลาสต์ และไมโทรคอนเดรีย ในการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ RAPD พบว่าแถบดีเอ็นเอบางส่วนประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของไมโทคอนเดรีย และน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์มาจากดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ ดังนั้นแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RAPD (RAPD marker) ส่วนใหญ่จึงมาจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส ซึ่งมีการถ่ายทอดมาจากทั้งฝ่ายพ่อและฝ่ายแม่ แม้ว่าเทคนิค RAPD จะทำได้ง่าย รวดเร็วและให้ข้อมูลได้มาก แต่ก็มีข้อเสียในเรื่องการทดลองซ้ำ บางครั้งได้ผลที่ต่างจากเดิมเนื่องจาก RAPD มีความไวต่อการเปลี่ยนสภาวะต่าง ๆ จึงต้องระมัดระวังและควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ นอกจากนี้แถบดีเอ็นเอที่เกิดจาก RAPD ยังแสดงการข่ม (dominance) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้ไม่สามารถบอก

ความแตกต่างระหว่างโฮโมไซกัสและเฮตเทอโรไซกัสได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552) มีการรายงานโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD ในการตรวจสอบความหลากหลายของพืชวงศ์ขิงโดย Vanijajiva (2012) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระดับต่ำของกระชายกระบี่พืชเฉพาะถิ่นที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมาย RAPD พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 19 ชนิดที่นำมาตรวจสอบพบว่ามี ไพรเมอร์ 8 ชนิด ได้แก่ OPA-18, OPAM-01, OPAM03, OPAM-12, OPB-14, OPD-03, OPD-18 และ OPZ-03 ที่สามารถแยกความแตกต่างของกระชายได้

2.7.2 วิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของพืช ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน สามารถตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา การตรวจสอบโครงสร้างภายในเซลล์พืช และการตรวจสอบโครงสร้างภายในเซลล์พืชให้ปฏิบัติตามข้อ 2.7.1.1 และข้อ 2.7.1.2 ตามลำดับ

2.7.2.1 การตรวจนับจำนวนโครโมโซม สามารถตรวจสอบได้จากการนับจำนวนโครโมโซมปลายราก โดยนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีการรายงานการนับจำนวนโครโมโซมในพืชวงศ์ขิงโดย วรรณภา วีระภักดี และคณะ (2540) ได้รวบรวมพืชในสกุลกระเจียว 10 ชนิด มาศึกษาจำนวนโครโมโซมพบว่าจำนวนโครโมโซมที่ตรวจพบมีตั้งแต่ 24-63 แท่งแล้วแต่ชนิดซึ่งจะแตกต่างกัน จากจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน x = 16, 21 นั่นคือ 2n = 2x = 32, 2n = 2x = 42 และ 2n = 3x = 63 แต่ชนิดอื่น ๆ ที่มีจำนวนโครโมโซม 24 และ 56 แท่งจะไม่สอดคล้องกับจำนวนโครโมโซมพื้นฐานนี้

2.7.2.2 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคโฟลไซโทมิเตอร์

โฟลไซโทมิเตอร์ (Flow cytometer) เป็นเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยอ่านค่านิวเคลียสของเซลล์พืชที่ต้องการศึกษาด้วยแสงเลเซอร์ ทำให้สามารถประมาณดีเอ็นเอที่เป็นองค์ประกอบในนิวเคลียสและขนาดของจีโนมพืชที่ต้องการศึกษาได้ นอกจากนี้ยังสามารถบ่งชี้ถึงระดับการเปลี่ยนแปลงเพิ่มหรือลดของจำนวนชุดโครโมโซม รวมทั้งสามารถยืนยันถึงความเสถียรของโครโมโซมพืชที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อเป็นเวลานาน การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอสามารถปฏิบัติได้อย่างรวดเร็ว และให้ผลที่แม่นยำ ปัจจุบันเทคนิคดังกล่าวเป็นที่นิยมเนื่องจากการตรวจสอบการเกิดโพลิพลอยด์ โดยการนับจำนวนโครโมโซมนั้นมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก สารเคมีที่ใช้ในการศึกษามีความจำเพาะและต้องใช้ความชำนาญของผู้ปฏิบัติการสูง การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โฟลไซโทเมทรีจากเนื้อเยื่อเจริญของพืช เช่น แคลลัส ยอด ใบอ่อน และเอ็มบริโอ ได้รับความนิยมสูง วิธีการ คือการเตรียมเซลล์พืชให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วยการสับเนื้อเยื่อด้วยใบมีด หรือการตีด้วยเม็ดบีท นำเซลล์พืชที่สับแล้วใส่ใน plastic Petri dish หลังจากนั้นเติมสาร Quantum Stain NA UV 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม Polyvinyl-Pyrrolidone (PVP) ประมาณ 0.01-0.05 กรัม (เพื่อช่วยกำจัดขยะ) นำไปกรองสารแขวนลอยนิวเคลียสผ่านตัวกรองขนาด 30 ไมครอน ต่อมานำไปเติมสาร Quantum Stain NA UV 2 ลงในหลอดสารแขวนลอยตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร และนำไปวิเคราะห์ระดับพลอยดี (ploidy) ด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ ซึ่งเครื่องจะวิเคราะห์ขณะที่เซลล์เคลื่อนที่ผ่านลำแสงเลเซอร์เป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยการตรวจจับนิวเคลียส และสามารถนับได้เป็นพัน

เซลล์ และเครื่องดังกล่าวจะวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากนิวเคลียส ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับพลอยดี (ploidy) จึงสามารถตรวจสอบระดับพลอยดี (ploidy) ของพืชได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rodrigues *et al*., (2011) ได้ใช้สารละลายโคลชิซิน และ amiprophos-methyl (APM) ในการเพิ่มชุดโครโมโซมในกล้วย แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิคโฟลไซโทมิเตอร์พบว่าสามารถชักนำกล้วยได้เป็นต้น mixoploid (2C, 4C และ 8C) และต้น tetraploid (4C)

2.8 โรคที่สำคัญของปทุมมา และกระเจียว

2.8.1 โรคเหี่ยว หรือโรคหัวเน่า

โรคเหี่ยว หรือโรคหัวเน่า มีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* โดยลักษณะอาการปทุมมาที่เป็นโรคจะแสดงอาการหลังจากที่ได้รับเชื้อแล้วไม่นาน ในระยะต้นกล้าอาการมักรุนแรงมากจนกระทั่งต้นกล้าตาย แต่ในระยะที่พืชโตเต็มที่แล้วอาการจะเริ่มจากใบเหี่ยวห้อยตกลง ต่อมาจะม้วนเป็นหลอด และมีสีเหลือง อาการจะค่อย ๆ ลุกลามจากส่วนล่างขึ้นไปยังส่วนปลายยอด ในที่สุดใบจะม้วนเหลือง และแห้งตายทั้งต้น บริเวณโคนต้น และหน่อที่แตกออกมาใหม่มีลักษณะช้ำ ฉ่ำน้ำ หรืออาการเนื้อแก้ว ต่อมาจะเน่าเปื่อยหลุดออกจากหัวพันธุ์โดยง่าย บริเวณลำต้นมีสีคล้ำ หรือสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัวปทุมมาที่เป็นโรคในระยะแรกมีลักษณะช้ำฉ่ำน้ำ โดยเฉพาะหัวอ่อน ต่อมาเนื้อหัวจะมีสีคล้ำขึ้น และเปื่อยยุ่ย อาการเหล่านี้จะเป็นไปอย่างรวดเร็วในสภาพอากาศที่ร้อนชื้น เมื่อผ่าหัวที่เป็นโรคระยะแรกพบส่วนของท่อน้ำ ท่ออาหารมีสีคล้ำ และมีเมือกสีขาวข้นซึมออก มาตามรอยแผล สำหรับสาเหตุที่พืชแสดงอาการเหี่ยวหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียนั้น พบว่านอกจากจะเกิดจากการอุดตันของท่อน้ำเนื่องจากแบคทีเรียไปเพิ่มจำนวนจนเต็มท่อน้ำ ยังพบว่ามีสารประกอบจำพวก polysaccharides ที่มีส่วนในการอุดตันของท่อน้ำด้วยเช่นกัน เมื่อผ่าลำต้นดูจะพบของเหลวสีขาว ขุ่นไหลออกมาจากส่วนที่เป็นโรค ลักษณะนี้จะพบเฉพาะสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียเท่านั้น (ประเทือง สง่าวงศ์, 2538) นอกจากนี้แบคทีเรียยังสร้างเอนไซม์ cellulase และ polygalacturonases มาย่อยสลายองค์ประกอบของเซลล์ทำให้เซลล์อ่อนตัว และสลายตัวในที่สุด (Huang and Allen, 2000) สารที่ได้จากการสลายตัวของเซลล์นี้จะถูกส่งไปยังส่วนยอด โดยอาศัยแรงดึงจากการคายน้ำ เมื่อถึงส่วนปลายของท่อน้ำโดยเฉพาะพวก vessel จะเกิดการเกาะตัวกันจนมีลักษณะคล้ายวุ้น ทำให้เกิดการอุดตันของท่อลำเลียง เมื่อผ่าตัดลำต้นหรือส่วนของพืชที่เป็นโรคมักพบสีน้ำตาลดำ เนื่องจากเกิด oxidation ของสารประกอบพวก phenol โดยเอนไซม์ phenoloxidase ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นจากกระบวนการนี้จะได้สารประกอบ quinones ซึ่งเกิดการจับตัวกันเป็นสารจำพวก melanin ในภายหลังสารนี้จะแพร่ไปตามเซลล์ และเกาะติดกับเซลล์ต่าง ๆ ได้ง่ายทำให้เซลล์กลายเป็นสีน้ำตาล (ประสาทพร สมิตะมาน, 2527) การแพร่กระจายของโรคเกิดจากหัวพันธุ์ที่ติดเชื้อ เศษซากพืชที่เป็นโรค ดิน และน้ำที่มีเชื้อ โดยเชื้อโรคจะเข้าทำลายพืชทางบาดแผล หรือช่องเปิดธรรมชาติ เชื้อแบคทีเรียจะทำความเสียหายพืชได้ดีในดินที่มี pH 6.8-6.9 และจะลดความเสียหายเมื่อดินมี pH 4.3 โรคนี้จะระบาดในช่วงฤดูฝน อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส ซึ่งดินมีความชื้นสูง

2.8.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum หรือชื่อเดิมคือ *Pseudomonas solanacearum* เชื้อนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีขนาดประมาณ 0.5×1.5 ไมโครเมตร รูปร่างเป็นแบบแท่ง มีแฟลกเจลลา (flagella) ได้ตั้งแต่ 1 ถึงหลายเส้นที่ใช้ในการเคลื่อนไหว ภายในเซลล์จะมีสาร poly-β-hydroxybutyrate ซึ่งจะติดสีน้ำเงิน หรือสีดำ เมื่อนำมาย้อมด้วย Sudan Black B ต้องการออกซิเจนในการเจริญ อุณหภูมิที่เหมาะกับการเจริญอยู่ระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีแคปซูล (ประสาทพร สมิตะมาน, 2527) สามารถสร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase สามารถเปลี่ยนไนเตรท (NO^{3-}) เป็นไนไตรท์ (NO^{2-}) แต่ไม่สามารถย่อยแป้งได้ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสาร intracellular refractile sudanophilic ที่ประกอบด้วย polyhydroxybutyric acid และเชื้อนี้สามารถใช้คาร์บอนจาก แหล่งต่าง ๆ ได้ เช่น glucose, sucrose, galactose, mannose และ ribose (Holt *et al*., 1994) ในสายพันธุ์ก่อโรคสามารถสร้างเอนไซม์ polygalacturonase ย่อยผนังเซลล์ของมันฝรั่ง ทำให้เข้าไปในเนื้อเยื่อ เพิ่มจำนวน และก่อโรคในพืชได้ (Huang and Allen, 2000) ลักษณะของแบคทีเรียชนิดนี้เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง โคโลนีมีขนาดค่อนข้างเล็ก กลม ผิวหน้าเรียบ เมื่ออายุน้อยมีสีขาวขุ่น และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่ออายุมากขึ้น เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร Tetrazolium Chloride Medium (TZC) จะสามารถระบุความรุนแรงได้ กล่าวคือสายพันธุ์ก่อโรคมีลักษณะโคโลนีค่อนข้างกลม ขอบของโคโลนีเป็นเมือกสีขาวขุ่น ตรงกลางมีสีแดง หรือชมพู ส่วนสายพันธุ์ที่สูญเสียความสามารถในการก่อโรค มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ สร้างรงควัตถุสีแดงที่ไม่มีเมือกสีขาวล้อมรอบ (Olson *et al*., 2005)

R. solanacearum เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้เกิดความแตกต่างในทางคุณสมบัติหลายประการ เช่น พืชอาศัย (host range) ลักษณะทางสรีรวิทยา (physiology) ความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) และการแพร่กระจาย ดังนั้นจึงมีการจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียชนิดนี้ไว้หลายแบบด้วยกัน เช่น อาศัยความสามารถในการเข้าทำลายพืชที่แตกต่างกันเป็นตัวจัดจำแนกกลุ่ม โดยให้ชื่อว่า “ race ” โดยพบว่า race 4 สามารถเข้าทำลายขิง ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกับปทุมมา และกระเจียว พบในทวีปเอเชีย ดังนั้นในการเลือกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ควรเลือกที่อยู่ใน race นี้ (กาญจนา วิชิตตระกูลถาวร, 2542)

มีงานวิจัยเกี่ยวกับพืชวงศ์ขิงที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ และรังสี มีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์และมีความต้านทานต่อโรค โดย บุญหงษ์ จงคิด และคณะ (2552) ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ขมิ้นชันเพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพ พบว่าสายพันธุ์ TU04-9-20 Krad-r-lrr-16 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของเหง้าต่อต้นสูงที่สุด มีปริมาณสารเคอร์คูมินในเหง้าสูงที่สุด มีความต้านทานโรคแอนแทรคโนส และหนอนกัดกิน มีจำนวนใบมากที่สุดในกลุ่มสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในชั่วรุ่น M2 โดยรังสีแกมมาเข้มข้น 10 และ 20 กิโลแรคส์ และสารละลาย

โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วเหลืองต้านทานโรคราสนิม ถั่วลิสงต้านทานโรค Leaf spot เปปเปอร์มินต์ต้านทานโรค wilt และลูกแพร์ต้านทานโรคจุดดำ (สิรนุช ลามศรีจันทร์, 2540) ขิงต้านทานโรคเหี่ยว (อังสนา อัครพิศาล, 2533)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พืชทดลอง เครื่องมือและวิธีการ

3.1.1 พืชทดลองปทุมมา 3 สายพันธุ์ และกระเจียว 2 สายพันธุ์

3.1.1.1 ปทุมมา สายพันธุ์ยูคิ (ภาพที่ 3.1A) เป็นปทุมมาลูกผสมพันธุ์บ้านไร่สวีท *Curcuma* hybrid (แม่พันธุ์) กับพันธุ์บัวสีขาว *Curcuma thorelii* Gagnap. (พ่อพันธุ์) ลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือสีกลีบประดับส่วนบนสีขาวอมชมพู ปลายกลีบด้านบนและด้านล่างแต้มสีเขียวอมเหลือง กลีบประดับส่วนล่างสีเขียวหรือ ดอกจริงสีม่วงเข้ม

3.1.1.2 ปทุมมา สายพันธุ์เบอร์กันดี้ (ภาพที่ 3.1B) เป็นปทุมมาลูกผสมพันธุ์บัวลายเมืองกาญจน์ *Curcuma* sp. (แม่พันธุ์) กับพันธุ์ทับทิมสยาม *Curcuma* sp. (พ่อพันธุ์) ลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือสีกลีบประดับสีแดงอมม่วง ปลายกลีบสีน้ำตาล ขีดเขียว ปากดอกจริงสีม่วง โคนปากสีแดงอมชมพู สันปากสีน้ำตาลอมส้ม

3.1.1.3 ปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ (ภาพที่ 3.1C) เป็นปทุมมาลูกผสมพันธุ์ *Curcuma alismatifolia* Gagnep. (แม่พันธุ์) กับปทุมมา *Curcuma alismatifolia* Gagnep. (พ่อพันธุ์) ลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือกลีบประดับส่วนบนสีขาวปลายกลีบประดับฉาบเขียว กลีบประดับส่วนล่างสีเขียวอมเหลือง ดอกจริงสีขาว ปากม่วงโคนปากเหลือง

3.1.1.4 กระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory (ภาพที่ 3.1D) เป็นกระเจียวลูกผสมพันธุ์เพชรเชียงใหม่ *Curcuma* sp. (แม่พันธุ์) กับพันธุ์พลอยทักษิณ *Curcuma aurantiaca* Van Zijp. (พ่อพันธุ์) ลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือกลีบประดับส่วนบนมีสีม่วงอมชมพูอ่อน กลีบประดับส่วนล่างมีสีม่วงอมชมพูเข้ม ดอกจริงปากกลีบดอกสีเหลือง

3.1.1.5 กระเจียว สายพันธุ์บ้านไร่เรด (ภาพที่ 3.1E) เป็นลูกผสมกระเจียวสีแดง เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์เพชรเชียงใหม่ *Curcuma petiolata* Wall. (แม่พันธุ์) กับพันธุ์พลอยทักษิณ *Curcuma aurantiaca* Van Zijp. (พ่อพันธุ์) ลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือสีกลีบประดับส่วนบนสีแดงอมชมพู กลีบประดับส่วนล่างสีส้มแดง ดอกจริงสีเหลืองอมส้ม สันปากสีส้ม

ภาพที่ 3.1 ปทุมมา 3 สายพันธุ์ คือ (A) สายพันธุ์ยูคิ (B) สายพันธุ์เบอร์กันดี้ และ (C) สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ และกระเจียว 2 สายพันธุ์ คือ (D) สายพันธุ์ Sweetmemory และ (E) สายพันธุ์บ้านไร่เรด

ที่มา: https://www.royalparkrajapruek.org/ และ https://www.doa.go.th/pvp/wpcontent/uploads/2019/11/AnnoDOA_Public110.pdf Knowledge/view/131

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

1. NAA (1-Napthalene acetic acid)
2. BA (N6-Benzyladenine)

3.1.2.2 สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อดอกอ่อนปทุมมา และกระเจียว

1. สารละลายเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์
2. สารละลายคลอรอกซ์ (Clorox) 20 เปอร์เซ็นต์ มีโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) 1.2 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร และสารละลายคลอรอกซ์ (Clorox) 5 เปอร์เซ็นต์ มีโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) 0.3 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร
3. สาร Tween-20 (Polyoxyethylene (20) sorbitam monolaurate)

4. น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

3.1.2.3 สารก่อกลายพันธุ์

1. สารละลาย Ethyl methanesulphonate (EMS)
2. สารละลาย โคลชิซิน (โคลชิซิน)

3.1.2.4 สารเคมีสำหรับศึกษาพลอยดีโดยใช้เครื่อง Flow cytometer

1. Cleaning Solution buffer
2. Decontamination Solution buffer
3. QA Bio Control Particles UV
4. QA Reference Beads UV Bright
5. M Quantum Stain NA UV2 (Set)
6. Polyvinyl-Pyrrolidone (PVP)

3.1.2.5 สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

1. สารละลายบัฟเฟอร์ CTAB (Doyle and Doyle. 1987)
2. chloroform (Merck, Germany)
3. isoamyl alcohol (Merck, Germany)

3.1.2.6 สารเคมีสำหรับทำพีซีอาร์

1. ONE PCR (Tag Mix Red) (PCR biosystem, UK)
2. 18 Primers

3.1.2.7 agarose gel สำหรับทำ gel electrophoresis (invitrogen, USA)

3.1.3 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

100 bp DNA Ladder (PCR biosystem, UK)

3.1.4 อุปกรณ์ เครื่องแก้ว และเครื่องมือต่างๆ

3.1.4.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)

3.1.4.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, BSA2202s-CW, Germany)

3.1.4.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BP221S, Germany)

3.1.4.4 เครื่องถ่ายภาพเจล (Syngene, Genegenius, Japan)

3.1.4.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (Eppendrof, Model 5418, USA)

3.1.3.6 เครื่อง PCR (Biometra, T1 thermocycler, Germany)

3.1.4.7 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Eppendrof, Model 6132, Germany)

3.1.4.8 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Schott, CG 842, Germany)

3.1.4.9 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Sanden Intercool, SNH0303D11A, Thailand)

3.1.4.10 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Hirayama, HEV-50, Japan)

3.1.4.11 ไมโครปิเปต (Labnet, USA)

3.1.4.12 เครื่องมือสำหรับย้ายเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ปากคีบ และมีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ขวดใส่แอลกอฮอล์ จานแก้ว และกระดาษสำหรับซับของเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3.1.4.13 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ กระบอกตวง บีกเกอร์ ปิเปต แท่งแก้วคนสาร กรวย ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดรูปชมพู่ ขวด Duran ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.4.14 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ปากกา ดินสอ ไม้บรรทัด สมุดบันทึก กล้องถ่ายภาพ

3.1.4.15 อุปกรณ์สำหรับย้ายปลูก ได้แก่ ดินปลูก มะพร้าวสับ แกลบ กล่องพลาสติก กระถาง 8 นิ้ว ถุงพลาสติก

3.2 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

3.3 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ทำการทดลองระหว่าง มกราคม 2563 – ธันวาคม 2567

3.4 วิธีการดำเนินงาน

3.4.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงดอกอ่อนปทุมมา และกระเจียวในสภาพปลอดเชื้อ โดยแบ่งการทดลอง ดังนี้

การทดลองย่อยที่ 1.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงดอกอ่อนปทุมมา สายพันธุ์ยูคิ

การทดลองย่อยที่ 1.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงดอกอ่อนปทุมมา สายพันธุ์เบอร์กันดี้

การทดลองย่อยที่ 1.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงดอกอ่อนปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์

3.4.1.1 การเตรียมอาหารพื้นฐานที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปทุมมาและกระเจียวทั้ง 5 สายพันธุ์ ในสภาพปลอดเชื้อใช้วิธีเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมด้วย NAA และ BA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.4.1.2 การเตรียมชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นโดยการนำช่อดอกอ่อนของปทุมมาทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยใช้ช่อดอกอ่อนอายุ 1 สัปดาห์ ยังคงมีกาบใบหุ้มอยู่บางส่วน และเริ่มเห็นสีกลีบประดับ (ภาพที่ 3.2A, 3.2B และ 3.2C) มาผ่านน้ำไหล 30 นาที และฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์

70 เปอร์เซ็นต์ 1 นาที คลอร็อกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ 20 นาที คลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.4.1.3 นำช่อดอกอ่อนของปทุมมา 3 สายพันธุ์ ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาชักนำให้เกิดหน่อโดยการเลี้ยงดอกอ่อนตั้งแต่โคนดอกถึงปลายกลีบดอกขนาด 0.4-0.6 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.3A, 3.3B และ 3.3C) บนอาหารแข็ง MS (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมกับ NAA และ BA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปทุมมาวางแผนการทดลองแบบ CRD มีทั้งหมด 9 ทรีทเมนต์ ทำทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด ดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1 = MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

ทรีทเมนต์ที่ 2 = MS + NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีทเมนต์ที่ 3 = MS + NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีทเมนต์ที่ 4 = MS + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีทเมนต์ที่ 5 = MS + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีทเมนต์ที่ 6 = MS + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีทเมนต์ที่ 7 = MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีทเมนต์ที่ 8 = MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีทเมนต์ที่ 9 = MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาพที่ 3.2 ช่อดอกของปทุมมา 3 สายพันธุ์ที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อ (A) สายพันธุ์ยูคิ (B) สายพันธุ์เบอร์กันดี้ และ (C) สายพันธุ์พรพิศิษฐ์

ภาพที่ 3.3 ดอกอ่อนของปทุมมา 3 สายพันธุ์ที่นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1 mg/L (A) สายพันธุ์ยูคิ (B) สายพันธุ์เบอร์กันดี้ และ (C) สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ (bar = 0.5 เซนติเมตร)

การทดลองย่อยที่ 1.4 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงดอกอ่อนกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory

การทดลองย่อยที่ 1.5 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงดอกอ่อนกระเจียว สายพันธุ์บ้านไร่เรด

การเตรียมอาหารพื้นฐาน การฟอกฆ่าเชื้อช่อดอกอ่อนกระเจียวของกระเจียว 2 สายพันธุ์ (ภาพที่ 3.4A และ 3.4B) ทำเช่นเดียวกันกับหัวข้อที่ 3.4.1.1, 3.4.1.2 และการเพาะเลี้ยงดอกอ่อนของกระเจียวทำได้โดยการนำช่อดอกอ่อนของกระเจียวมาตัดแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือช่อดอกอ่อนด้านบน (ภาพที่ 3.5A) และช่อดอกอ่อนด้านล่าง (ภาพที่ 3.5B) หลังจากนั้นนำเฉพาะส่วนของดอกอ่อนตั้งแต่โคนดอกถึงปลายกลีบดอกขนาด 0.4-0.6 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.5C และ 3.5D) มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมกับ NAA และ BA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

วางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design มี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด ต่อทรีทเมนต์ ปัจจัยการทดลองมี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัย a คือ ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (NAA และ BA) มี 9 ระดับคือ

a_1 = MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

a_2 = MS + NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

a_3 = MS + NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

a_4 = MS + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

a_5 = MS + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

a_6 = MS + NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

a_7 = MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

a_8 = MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

a_9 = MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปัจจัย b คือ ช่อดอกอ่อนของกระเจียว มี 2 ระดับ คือ

b_1 = ช่อดอกอ่อนด้านบน

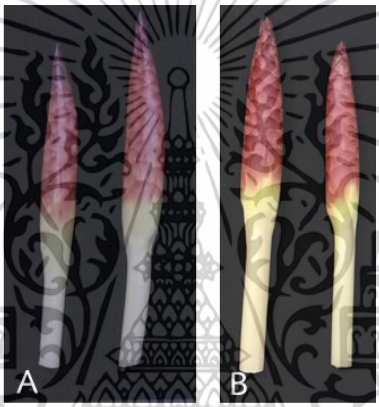
b_2 = ช่อดอกอ่อนด้านล่าง

3.4.1.4 ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นปทุมมาและกระเจียวทั้ง 5 สายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ ดังนี้

ก. การเจริญเติบโตของต้นปทุมมาและกระเจียว โดยการวัดความสูงต้น

ข. เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อใหม่

ค. จำนวนหน่อต่อชิ้นส่วน



ภาพที่ 3.4 ช่อดอกของกระเจียว 2 สายพันธุ์ที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อ (A) สายพันธุ์ Sweetmemory และ (B) สายพันธุ์บ้านไร่เรด

ภาพที่ 3.5 ช่อดอกอ่อนของกระเจียวที่แบ่งออกเป็น 2 ส่วนสายพันธุ์ Sweetmemory (A) ช่อดอกส่วนบน (B) ช่อดอกอ่อนส่วนล่าง (bar = 10 เซนติเมตร) และดอกอ่อนของกระเจียว 2 สายพันธุ์ที่นำที่นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1 mg/L (C) สายพันธุ์ Sweetmemory และ (D) สายพันธุ์บ้านไร่เรด (bar = 0.5 เซนติเมตร)

3.4.2 การทดลองที่ 2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในโคนต้นของปทุมมาและกระเจียว โดยใช้สารละลาย EMS โดยแบ่งการทดลอง ดังนี้

การทดลองย่อยที่ 2.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในโคนต้นของปทุมมาสายพันธุ์พรพิศิษฐ์

การทดลองย่อยที่ 2.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในโคนต้นของกระเจียวสายพันธุ์ Sweetmemory

3.4.2.1 การเตรียมอาหารพื้นฐานที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อใช้วิธีเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นอาหารสูตรพื้นฐานของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่ใช้ในการขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลอง

3.4.2.2 นำโคนต้นของปทุมมาอายุ 8 สัปดาห์จากการทดลองที่ 1 ที่ได้จากการชักนำในสภาพปลอดเชื้อ มาแช่ในสารละลาย EMS ในระดับความเข้มข้นและช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ตามแผนการทดลอง และนำไปเขย่าในที่มีความเร็วรอบ 80 rpm จากนั้นย้ายลงเลี้ยงในอาหารแข็ง MS (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมด้วย BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่มีสภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน แสงไฟที่ใช้จากหลอด LED สีขาว ที่โดยมีค่า PPFD เฉลี่ยประมาณ 30 µmol /m^2/s ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบ 3x2 factorial in completely randomized design มี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ขวด ต่อทรีทเมนต์ ปัจจัยการทดลองมี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัย a คือ ความเข้มข้นของสารละลาย EMS มี 3 ระดับคือ

a_1 = 0 เปอร์เซ็นต์

a_2 = 0.5 เปอร์เซ็นต์

a_3 = 1.0 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัย b คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการแช่สาร มี 2 ระดับ คือ

b_1 = 60 นาที

b_2 = 120 นาที

3.4.3 การทดลองที่ 3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหน่ออ่อนของปทุมมาและกระเจียว โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

การทดลองย่อยที่ 3.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในโคนต้นของปทุมมาสายพันธุ์พรพิศิษฐ์ โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

การทดลองย่อยที่ 3.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในโคนต้นของกระเจียวสายพันธุ์ Sweetmemory โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

การเตรียมอาหารพื้นฐานทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 ในหัวข้อ 3.4.2.1

3.4.3.1 นำโคนต้นของกระเจียวอายุ 8 สัปดาห์จากการทดลองที่ 1 ที่ได้จากการชักนำในสภาพปลอดเชื้อ มาแช่ในสารละลายโคลชิซิน ในระดับความเข้มข้นและช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ตามแผนการทดลอง และนำไปเขย่าความเร็วรอบ 80 rpm จากนั้นย้ายลงเลี้ยงในอาหารแข็ง MS (1962) (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมด้วย BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่มีสภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน แสงไฟที่ใช้จากหลอด LED สีขาว ที่โดยมีค่า PPFD เฉลี่ยประมาณ 30 µmol /m^2/s ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบ 3x2 factorial in completely randomized design มี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ขวด ต่อทรีทเมนต์ ปัจจัยการทดลองมี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัย a คือ ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน มี 3 ระดับคือ

a_1 = 0 เปอร์เซ็นต์

a_2 = 1 เปอร์เซ็นต์

a_3 = 3 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัย b คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการแช่สาร มี 2 ระดับ คือ

b_1 = 12 ชั่วโมง

b_2 = 24 ชั่วโมง

3.4.4 การบันทึกข้อมูลในสภาพปลอดเชื้อของต้นปทุมมาและกระเจียวที่ได้รับสารละลาย EMS และสารละลายโคลชิซิน

3.4.4.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นปทุมมาและกระเจียวในสภาพปลอดเชื้อดังนี้

ก. อัตราการรอดชีวิตของต้นปทุมมาและกระเจียว

ข. การเจริญเติบโตของต้นปทุมมาและกระเจียว โดยการวัดความสูงต้นจากโคนต้นไปจนถึงใบส่วนที่ยาวที่สุด

ค. เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อใหม่

ง. จำนวนหน่อต่อชิ้นส่วน

3.4.5 การบันทึกข้อมูลหลังจากย้ายปลูกต้นปทุมมาและกระเจียว

3.4.5.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological) ที่เปลี่ยนแปลงไปของต้นปทุมมา และกระเจียวที่ย้ายออกปลูกในสภาพโรงเรือน มีขั้นตอนดังนี้

3.4.5.1.1 นำต้นปทุมมาและกระเจียวที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร รุ่น M4 (ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อมาแล้ว 4 ครั้งในทุก ๆ เดือน) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้รับสารละลาย EMS และสารละลายโคลชิซิน ออกปลูกในสภาพแปลง โดยใช้วัสดุปลูก (ดินปลูก มะพร้าวสับ และแกลบ อัตราส่วน 1:1:1)

3.4.5.1.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นปทุมมา และกระเจียว โดยทำการศึกษาดังต่อไปนี้

ก. จำนวนต้นรอดชีวิตของต้นปทุมมา และกระเจียว

ข. ศึกษาลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปของใบ ได้แก่ ขนาดใบ สีใบ รูปร่างใบ

ค. ศึกษาลักษณะของดอกที่เปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ สีดอก รูปร่างดอก ความยาวช่อดอก

ง. วัดความสูงของลำต้นปทุมมา และกระเจียว

3.4.5.2 ตรวจสอบลักษณะการกลายพันธุ์ของต้นปทุมมาและกระเจียว

3.4.5.2.1 ศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ ($\mu g/cm^2$) ของต้นปทุมมา และกระเจียวที่ได้รับสารละลาย EMS และสารละลายโคลชิซิน ดัดแปลงวิธีการของ Lichhtenthaler (1987) โดยนำใบปทุมมาและใบกระเจียวมาเจาะให้เป็นวงกลม จำนวน 10 ชิ้น/ใบ จากนั้นนำใบที่เจาะได้มาบดด้วยโกร่งให้ละเอียด และสกัดด้วย acetone ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อหลอด นำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง และนำส่วนใสไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663, 647 และ 470 นาโนเมตร

วิธีคำนวณหาค่าคลอโรฟิลล์ A, B และแคโรทีนอยด์

คลอโรฟิลล์ A ($\mu g/ml$) = 12.25 (A663) - 2.79 (A647)

คลอโรฟิลล์ B ($\mu g/ml$) = 21.50 (A647) - 5.10 (A663)

แคโรทีนอยด์ (µg/ml) = [1000(A470) - 1.82 (คลอโรฟิลล์A) - 85.02(คลอโรฟิลล์B)]/198

นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า คลอโรฟิลล์ A คลอโรฟิลล์ B และแคโรทีนอยด์โดยคำนวณจาก

ปริมาณคลอโรฟิลล์ (µg/cm^2) = ค่าคลอโรฟิลล์ x 5 ml/พื้นที่ใบ (10 ชิ้น)

พื้นที่ใบคำนวณจาก ¶r^2 = (3.14 x 0.3^2)*10 = 2.826 cm^2

วิธีหาค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ต่อพื้นที่

ในพื้นที่ 2.826 cm^2 มีปริมาณคลอโรฟิลล์ = X µg

ถ้า 1 cm^2 จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ = 1 cm^2 x X µg/2.826 cm^2 เพราะฉะนั้น = Y (µg/cm^2)

X = ปริมาณคลอโรฟิลล์ (µg)

Y = ปริมาณคลอโรฟิลล์ต่อพื้นที่ (µg/cm^2)

3.4.5.2.2 ตรวจสอบลักษณะปากใบของต้นปทุมมา และกระเจียวที่ได้รับสารละลาย EMS และสารละลาย โคลชิซิน โดยเลือกใบที่เจริญเติบโตเต็มที่มา 2 ใบต่อ 1 ทรีทเมนต์ นำมาลอกผิวใบด้าน upper epidermis ด้วยใบมีดโกน จนได้ชั้นเนื้อเยื่อ lower epidermis จากนั้นทำการตัดส่วนของเนื้อเยื่อไปวางบนสไลด์ หยดน้ำสะอาด 1 หยด และปิดด้วยกระจกสไลด์ ศึกษาลักษณะของปากใบ และนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยแต่ละ 1 ใบจะวัดขนาดปากใบทั้งหมด 20 เซลล์ต่อ 1 ใบ

3.4.5.2.3 ตรวจสอบลักษณะการกลายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD กับต้นปทุมมา และกระเจียวที่ได้รับสารละลาย EMS โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 18 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.1) (ดัดแปลงวิธีของ Vanijajiva, 2012) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1.วิธีการสกัดดีเอ็นเอปทุมมา และกระเจียว ด้วยการดัดแปลงวิธีการของ CTAB/Chloroform-Isoamyl Alcohol DNA Extraction Protocol (Doyle and Doyle, 1987) นำใบปทุมมา และกระเจียวที่บดเป็นผงด้วยไนโตรเจนเหลว ปริมาณ 1 กรัม แล้วตักผงใบปทุมมาและกระเจียว ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย CTAB extraction buffer [CTAB 0.2 กรัม, NaCl 1 มิลลิโมลาร์, PVP 0.1 กรัม, Sodium metabisulfate 0.01 กรัม, Tris-HCl (pH 8.0) 100 มิลลิโมลาร์, EDTA 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม 2-mercaptoethanol ปริมาตร 3 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที กลับหลอดทุก ๆ 10 นาที จากนั้นเติม Chlorofrom : isoamy alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาประมาณ 10-15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนปริมาณ 350 ไมโครลิตร ใส่หลอดขนาด

1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมสาร iso-propanal ที่แช่เย็นปริมาตร 0.5 เท่าของสารละลาย ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ 10 ครั้ง จากนั้นนำหลอดไปบ่มในตู้ -20 องศาเซลเซียสเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ ใช้ไมโครปิเปตค่อยๆ ดูดสารละลายออก จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็น ปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ 10 ครั้ง เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที ใช้ไมโครปิเปตค่อย ๆ ดูดสารละลายออก จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็นปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ 10 ครั้ง เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที ใช้ไมโครปิเปตค่อย ๆ ดูดสารละลายออก ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 30 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้ตะกอนดีเอ็นเอละลาย ทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโพรีซิส บนอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นระยะเวลา 40 นาที เปรียบเทียบขนาด และความเข้มข้นดีเอ็นเอกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (PCR biosystem, UK) เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี ใช้ไพรเมอร์จำนวน 18 ไพรเมอร์ ที่มีการรายงานการใช้ตรวจสอบในกระชาย (Vanijajiva, 2012) คือ OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-18, OPAM-01, OPAM-03, OPAM-12, OPAM-18, OPB-01, OPB-14, OPC-01, OPC-05, OPD-02, OPD-03, OPD-08, OPD-18 และ OPK-05 (ตารางที่ 3.1) มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) จากปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 50 นาโนกรัม ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ONE PCR (Tag Mix Red) 12.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9.5 ไมโครลิตร ตั้งอุณหภูมิเครื่องพีซีอาร์ ดังนี้ Pre-denaturation ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 วินาที Annealing ใช้อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Extention ใช้อุณภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ขั้นตอน Denaturation, Annealing และ Extention ทำซ้ำ 45 รอบ Final-extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน 0.5X TBE บัฟเฟอร์ ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ 40 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation เปรียบเทียบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS กับต้นที่ได้รับสารละลาย EMS

ตารางที่ 3.1 ชนิด และลำดับเบสของไพรเมอร์อาร์เอพีดีที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของปทุมมาและกระเจียว ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน (Vanijajiva, 2012)

Primer number	Nucleotide sequence 5′ to 3′	Primer number	Nucleotide sequence 5′ to 3′
OPA-02	TGCCGAGCTG	OPB-01	GTTTCGCTCC
OPA-03	AGTCAGCCAC	OPB-14	TCCGCTCTGG
OPA-04	AATCGGGCTG	OPC-01	TTCGAGCCAT
OPA-10	GTGATCGCAG	OPC-05	GATGACCGCC
OPA-18	AGGTGACCGT	OPD-02	GGACCCAACC
OPAM-01	TCACGTACGG	OPD-03	GTCGCCGTCA
OPAM-03	CTTCCCTGTG	OPD-08	GTGTGCCCCA
OPAM-12	TCTCACCGTC	OPD-18	GAGAGCCAAC
OPAM-18	ACGGGACTCT	OPK-05	TCTGTCGAGG

3.4.5.2.4 ตรวจสอบโพลิพลอยด์โดยการใช้เครื่อง Flow cytometer ทำการสกัดสารพันธุกรรมจากใบของต้นปทุมมาและกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน เลือกใบที่ไม่แก่และไม่อ่อนจนเกินไป โดยการสับใบประมาณ 0.1-0.5 กรัม ด้วยใบมีดให้ละเอียดใส่ใน plastic Petri dish หลังจากนั้นเติมสาร Quantum Stain NA UV2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม Polyvinyl-Pyrrolidone (PVP) ประมาณ 0.01-0.05 กรัม (เพื่อช่วยกำจัดขยะ) นำไปกรองสารแขวนลอยนิวเคลียสผ่านตัวกรองขนาด 30 ไมครอน ต่อมานำไปเติมสาร Quantum Stain NA UV2 ลงในหลอดสารแขวนลอยตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร และนำไปวิเคราะห์ระดับพลอยดีด้วยเครื่อง Flow cytometer

3.4.5.2.5 การทดสอบความต้านโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* มีขั้นตอนดังนี้

1. เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia Solanacearum* ไอโซเลท Si16, biovar 4, phylotype I, sequevar 30 ที่แยกจากปทุมมา ในพื้นที่ปลูก อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ โดยเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วขูดเชื้อด้วยห่วงเขี่ยเชื้อลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของเชื้อโดยการวัดค่าความขุ่นโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ช่วงความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า Optical Density (O.D.) เท่ากับ 0.2 ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 cfu/ml

*หมายเหตุ เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. คัดเลือกต้นปทุมมา และกระเจียวอายุประมาณ 8 สัปดาห์ที่ได้รับสารละลาย EMS และสารละลายโคลชิซิน ย้ายปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อโดยย้ายปลูกในกล่องพลาสติก ที่มีพีทมอสเป็นวัสดุปลูก จำนวน 20 ต้น โดยแบ่งเป็น 4 กล่อง กล่องละ 5 ต้น

3. ทำการปลูกเชื้อลงในพืชทดสอบ โดยมี 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีที่ 1 คือ ใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วรดลงไปที่ต้นปทุมมา และกระเจียว โดยไม่ได้ทำแผลที่ราก (ชุดควบคุม) กรรมวิธีที่ 2 คือ ราดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1-2 มิลลิลิตรต่อต้น โดยไม่ได้ทำแผลที่ราก และกรรมวิธีที่ 3 คือทำแผลบริเวณรากของต้นปทุมมา และกระเจียว ลึกประมาณ 1-2 เซนติเมตร โดยให้ห่างจากต้น 0.5-1 เซนติเมตร แล้วรดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1-2 มิลลิลิตรต่อต้น จากนั้นสังเกตการเกิดโรคหลังการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 50 วัน

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.5.1 นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.5.2 การวิเคราะห์ผลใช้โปรแกรม NTSYS pc 2.10p (Numerical Taxonomy and Multuvariate Analysis System) เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD แล้วบันทึกแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากไพรเมอร์แต่ละคู่ โดยกำหนดสัญลักษณ์ 1 คือ การเกิดแถบดีเอ็นเอ และสัญลักษณ์ 0 คือ การไม่เกิดแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกัน คำนวณค่า Polymorphic Information contents (PICs) เป็นค่าที่บอกถึงโอกาสที่จะพบตัวอย่างที่เลือกแบบสุ่ม 2 ตัวอย่างที่มีความแตกต่างกัน (polymorphism)

$$PICs = 1-\sum Pi^2$$

จากสูตรเมื่อ Pi คือ ความถี่ของแอลลีลที่ i ซึ่ง Pi ประกอบด้วย ความถี่ของจำนวนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอ P_A (absent allele) และความถี่ของจำนวนตัวอย่างพบแถบดีเอ็นเอ Pp (Present allele) (Otto, 1990) วิเคราะห์ความสัมพันธ์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์ต่าง ๆ ทีละคู่ ในรูปของ Jaccard similarity coefficient (Jaccard, 1908) พร้อมทั้งสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree โดยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithemetic Mean (UPGMA) วิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยวิเคราะห์ค่า genetic similarity ใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard และคำนวณค่า Cophenetic correlation (r) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าการจัดกลุ่มที่ได้ยอมรับได้หรือไม่ มีหลักการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ คือ ค่า r จะมีค่าอยู่ในช่วง $-1 \leq r \leq 1$ ไม่มีหน่วย โดยที่แกน x คือค่า correlation coefficient แกน y คือค่า Similarity coefficient โดยมีความสัมพันธ์กันคือถ้าค่า r มีค่าเป็นลบหมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์

แบบผกผันนั้น คือถ้าค่า correlation coefficient เพิ่มขึ้นค่า similarity coefficient จะลดลงหรือถ้าค่า correlation coefficient ลดลง และค่า similarity coefficient จะเพิ่มขึ้น และค่า r = -1 หมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์แบบผกผันกันอย่างสมบูรณ์ ถ้าค่า r มีค่าเป็นบวกหมายความว่า ค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์แบบทางเดียวกันและค่า r = 1 แสดงว่าตัวแปลทั้งสองมีความสัมพันธ์แบบทางเดียวกันอย่าสมบูรณ์ ถ้าค่า r = 0 หมายความว่า ค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient ไม่มีความสัมพันธ์กัน แต่ค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient อาจมีความสัมพันธ์กันในรูปอื่นหรือไม่มีความสัมพันธ์กันเลย (ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์, 2543)

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงดอกอ่อนปทุมมา และกระเจียวในสภาพปลอดเชื้อ

4.1.1 ผลของ NAA และ BA ต่อการเจริญเติบโตของดอกอ่อนปทุมมา สายพันธุ์ยูคิ

นำช่อดอกอ่อนของปทุมมา สายพันธุ์ยูคิมาตัดเฉพาะดอกอ่อนขนาด 0.4-0.6 เซนติเมตร และนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าดอกอ่อนมีขนาดความสูงและความกว้างที่ใหญ่ขึ้น สีของชิ้นส่วนเริ่มต้นเปลี่ยนเป็นสีเขียว และมีการพัฒนาของหน่อใหม่เกิดขึ้น โดยหน่อใหม่มีการพัฒนามาจากบริเวณโคนของดอกอ่อนเมื่อเพาะเลี้ยงดอกอ่อนปทุมมา สายพันธุ์ยูคิ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าดอกอ่อน สายพันธุ์ยูคิที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดหน่อมากที่สุด 2.67 หน่อ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ และความสูงต้นเฉลี่ย 5 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.1B, ตารางที่ 4.1)

4.1.2 ผลของ NAA และ BA ต่อการเจริญเติบโตของดอกอ่อนปทุมมา สายพันธุ์เบอร์กันดี้

นำช่อดอกอ่อนของปทุมมา สายพันธุ์เบอร์กันดี้มาตัดเฉพาะดอกอ่อนขนาด 0.4-0.6 เซนติเมตร และนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าดอกอ่อนมีขนาดความสูงและความกว้างที่ใหญ่ขึ้น สีของชิ้นส่วนเริ่มต้นเปลี่ยนเป็นสีเขียว และมีการพัฒนาของหน่อใหม่เกิดขึ้น โดยหน่อใหม่มีการพัฒนามาจากบริเวณโคนของดอกอ่อนเมื่อเพาะเลี้ยงดอกอ่อนปทุมมา สายพันธุ์เบอร์กันดี้ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าดอกอ่อน สายพันธุ์เบอร์กันดี้ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดหน่อมากที่สุด 1.66 หน่อ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุด 73.33 เปอร์เซ็นต์ และความสูงต้นเฉลี่ย 5 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.1D, ตารางที่ 4.2)

4.1.3 ผลของ NAA และ BA ต่อการเจริญเติบโตของดอกอ่อนปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์

นำช่อดอกอ่อนของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์มาตัดเฉพาะดอกอ่อนขนาด 0.4-0.6 เซนติเมตร และนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าดอกอ่อนมีขนาดความสูงและความกว้างที่ใหญ่ขึ้น สีของชิ้นส่วนเริ่มต้นเปลี่ยนเป็นสีเขียว และมีการพัฒนาของหน่อใหม่เกิดขึ้น โดยหน่อใหม่มีการพัฒนา

มาจากบริเวณโคนของดอกอ่อนเมื่อเพาะเลี้ยงดอกอ่อนปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าดอกอ่อน สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดหน่อมากที่สุด 1.78 หน่อ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุด 76.67 เปอร์เซ็นต์ และความสูงต้นเฉลี่ย 5 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.1F, ตารางที่ 4.3)

จากการทดลองการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงดอกอ่อนปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่าดอกอ่อนของปทุมมาสามรถเจริญเติบโตพัฒนาเป็นหน่อใหม่ได้ดีเมื่อมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ร่วมกัน ทั้งนี้เนื่องจาก NAA เป็นสารควบการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ซึ่งออกซินมีผลกระตุ้นการขยายตัวของเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ และการสร้างราก (Jafrai *et al*., 2016) และ BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ซึ่งไซโทไคนินมีผลต่อการแบ่งเซลล์ซึ่งช่วยการเจริญเติบโตของพืช กระตุ้นการแบ่งเซลล์โดยกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็น ซึ่งส่งผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดยอดและกระตุ้นการเจริญเติบโตของตาข้าง (Bunnag, 2013) โดยสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในทั้งสองกลุ่มเป็นตัวกำหนดที่สำคัญ อัตราส่วนที่สูงของไซโทไคนินต่อออกซินจะกระตุ้นการสร้างยอด แต่หากอัตราส่วนของไซโทไคนินต่อออกซินต่ำ เนื้อเยื่อจะพัฒนาไปเป็นราก (Adriance and Brison, 1955) การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 กลุ่ม พบได้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิงหลายชนิด เช่น การเพาะเลี้ยงหน่อของขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) เมื่อใช้สูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดหน่อใหม่สูงสุด (Nasirujjaman *et al*., 2005) งานวิจัยของ Bharalee *et al*., (2005) พบว่า BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์ของยอด *Curcuma caesia* จากการทดลองดอกอ่อนของปทุมมาทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่ได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถสร้างหน่อใหม่ได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ กิ่งกาญจน์ คำลือ (2555) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหอมหัวใหญ่ พบว่าอาหารสูตร MS สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำรากได้ 10 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามพบว่าดอกอ่อนของปทุมมาทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตและมีการแตกหน่อได้ดีบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA และดอกอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าดอกอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ภาพที่ 4.1A, 4.1C และ 4.1E, ตารางที่ 4.1, 4.2 และ 4.3)

ภาพที่ 4.1 การเจริญเติบโตของต้นปทุมมา (A, B) สายพันธุ์ยูคิ (C, D) สายพันธุ์เบอร์กันดี้ และ (E, F) สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BA นาน 8 สัปดาห์ (bar = 1 เซนติเมตร)

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของดอกอ่อนปทุมมาสายพันธุ์ยูคิ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ (±SE)[1/]	จำนวนหน่อ (±SE)[1/]	ความสูงต้น (ซม.) (±SE)[1/]
NAA	BA			
0	0	46.67±5.77c	1.11±0.19d	5.05±0.05
0	0.5	53.33±5.77bc	1.33±0.19bcd	5.05±0.05
0	1	46.67±5.77c	1.22±0.19cd	5.05±0.04
0.5	0	53.33±5.77bc	1.33±0.19bcd	5.04±0.05
0.5	0.5	60.00±0.00b	1.55±0.19ab	5.06±0.05
0.5	1	56.67±5.77bc	1.44±0.19bc	5.06±0.05
1	0	53.33±5.77bc	1.33±0.19bcd	5.03±0.05
1	0.5	80.00±0.00a	2.67±0.57a	5.04±0.05
1	1	56.67±5.77bc	1.44±0.19bc	5.03±0.05
F-test		**	**	ns
CV%		9.73	11.33	1.02

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของดอกอ่อนปทุมมาสายพันธุ์เบอร์กันดี้ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ (±SE)[1/]	จำนวนหน่อ (±SE)[1/]	ความสูงต้น (ซม.) (±SE)[1/]
NAA	BA			
0	0	53.33±5.77b	1.11±0.38b	5.01±0.01
0	0.5	56.67±5.77b	1.33±0.00ab	5.02±0.01
0	1	63.33±5.77ab	1.44±0.19ab	5.01±0.01
0.5	0	56.66±5.77b	1.11±0.38b	5.02±0.04
0.5	0.5	63.33±5.77ab	1.44±0.19ab	5.00±0.01
0.5	1	63.33±5.77ab	1.33±0.00ab	5.06±0.04
1	0	63.33±5.77ab	1.33±0.00ab	5.02±0.04
1	0.5	56.67±5.77b	1.44±0.19ab	5.03±0.03
1	1	73.33±5.77a	1.66±0.33a	5.02±0.04
F-test		*	*	ns
CV%		9.44	17.69	0.61

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของดอกอ่อนปทุมมาสายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ (±SE)[1/]	จำนวนหน่อ (±SE)[1/]	ความสูงต้น (ซม.) (±SE)[1/]
NAA	BA			
0	0	50.00±0.00c	0.78±0.19c	5.07±0.04
0	0.5	53.33±5.77c	1.11±0.1bc	5.06±0.04
0	1	50.00±0.00c	0.89±0.19bc	5.06±0.04
0.5	0	53.33±5.77c	1.11±0.19bc	5.08±0.01
0.5	0.5	63.33±5.77b	1.11±0.19bc	5.08±0.01
0.5	1	63.33±5.77b	1.11±0.19bc	5.08±0.01
1	0	53.33±5.77c	1.11±0.19bc	5.09±0.00
1	0.5	63.33±5.77b	1.22±0.19b	5.08±0.01
1	1	76.67±5.77a	1.78±0.19a	5.05±0.05
F-test		**	**	ns
CV%		8.70	16.77	0.64

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

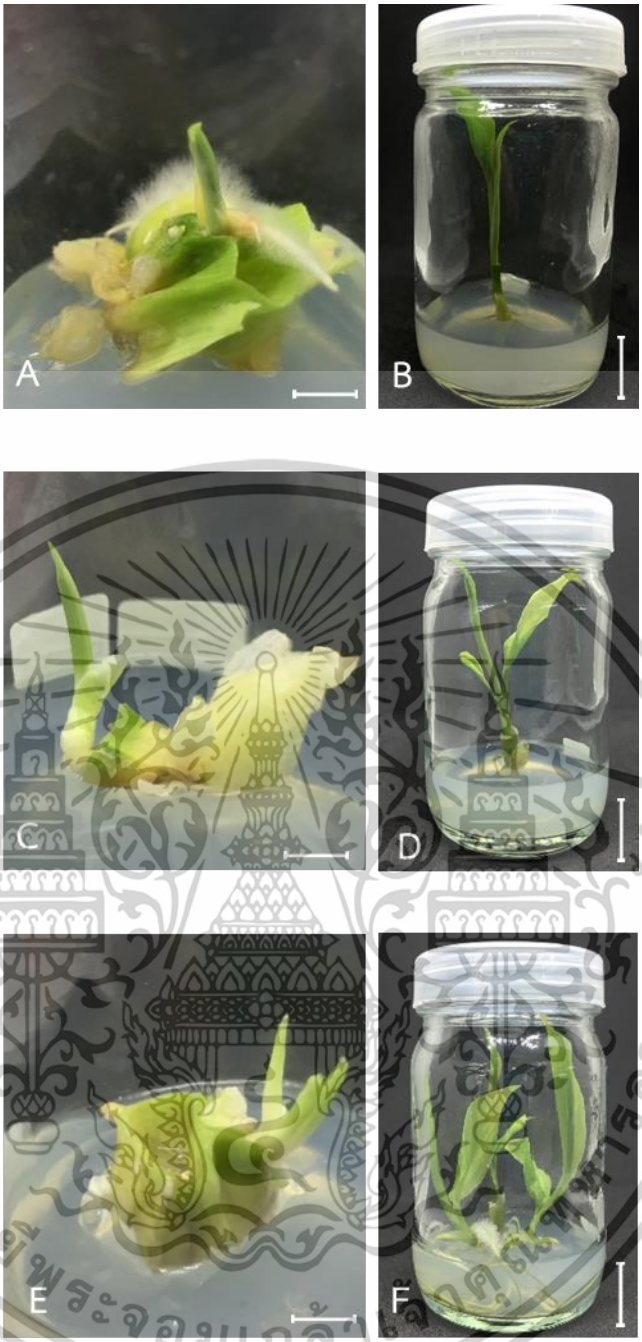
4.1.4 ผลของ NAA และ BA ต่อการเจริญเติบโตของดอกอ่อนกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory

นำช่อดอกอ่อนของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory มาตัดแบ่งออกเป็นช่อดอกอ่อนส่วนบนและช่อดอกอ่อนส่วนล่าง นำเฉพาะดอกอ่อนขนาด 0.5-1 เซนติเมตร ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าดอกอ่อนส่วนล่างกระตุ้นให้เกิดการแตกหน่อได้ดีกว่าดอกอ่อนส่วนบน สีของชิ้นส่วนเริ่มต้นเปลี่ยนเป็นสีเขียว และมีการพัฒนาของหน่อใหม่เกิดขึ้น โดยหน่อใหม่มีการพัฒนามาจากบริเวณโคนของดอกอ่อน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าดอกอ่อนส่วนล่างที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดหน่อมากที่สุด 2.38 หน่อ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุด 83.33 เปอร์เซ็นต์ และความสูงต้นเฉลี่ย 5 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.2F, ตารางที่ 4.4)

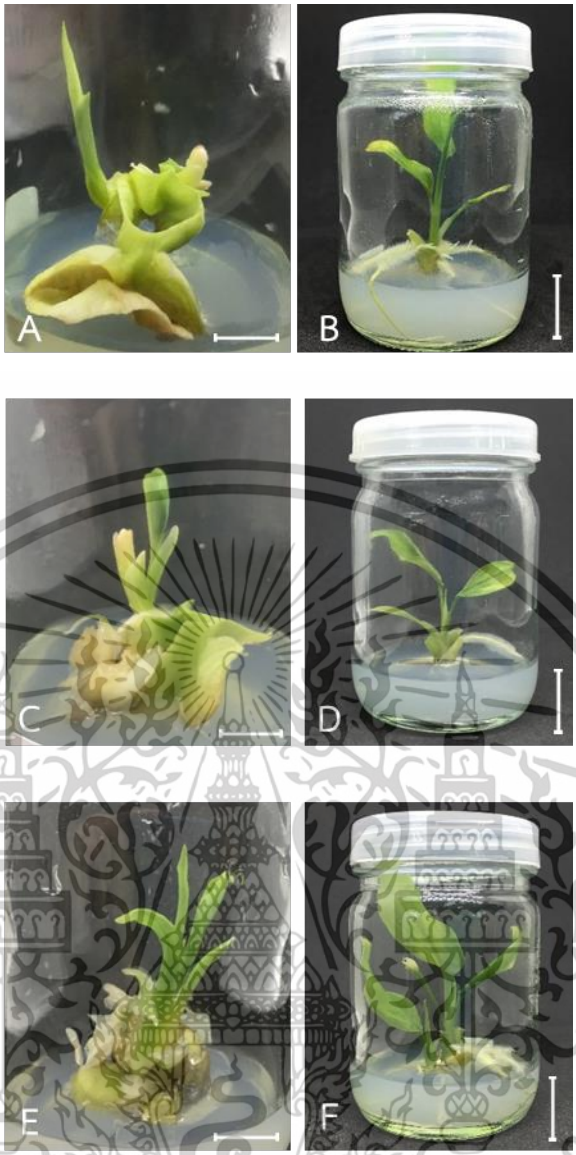
4.1.5 ผลของ NAA และ BA ต่อการเจริญเติบโตของดอกอ่อนกระเจียว สายพันธุ์บ้านไร่เรด

นำช่อดอกอ่อนของกระเจียว สายพันธุ์บ้านไร่เรด มาตัดแบ่งออกเป็นช่อดอกอ่อนส่วนบนและช่อดอกอ่อนส่วนล่าง เช่นเดียวกับช่อดอกอ่อนของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory นำเฉพาะดอกอ่อนขนาด 0.5-1 เซนติเมตร ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าดอกอ่อนส่วนล่างกระตุ้นให้เกิดการแตกหน่อได้ดีกว่าดอกอ่อนส่วนบน สีของชิ้นส่วนเริ่มต้นเปลี่ยนเป็นสีเขียว และมีการพัฒนาของหน่อใหม่เกิดขึ้น โดยหน่อใหม่มีการพัฒนามาจากบริเวณโคนของดอกอ่อน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าดอกอ่อนส่วนล่างที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดหน่อมากที่สุด 1.98 หน่อ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุด 63.33 เปอร์เซ็นต์ และความสูงต้นเฉลี่ย 5 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.3F, ตารางที่ 4.5)

จากการทดลองการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงดอกอ่อนกระเจียวในสภาพปลอดเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าดอกอ่อนของกระเจียวเจริญเติบโตไปเป็นหน่อใหม่ได้ดีเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 กลุ่ม พบได้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิง เช่น การขยายพันธุ์ใน *Curcuma* sp. เมื่อใช้สูตรอาหาร MS และ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีการแตกหน่อใหม่สูงสุด (Jala, 2014) และพืชวงศ์อื่น ๆ เช่น Mujib *et al*. (2008) รายงานว่าการเติม BA ร่วมกับ NAA ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของ *Caladium Bicolor* รวมถึงกระบวนการสร้างเอ็มบริโอจากโซมาติกเซลล์ด้วย และ Ahmed *et al*. (2004) รายงานว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของ BA ร่วมกับ NAA สามารถกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ของ *Caladium* ได้จำนวนมาก จากการทดลองมีการแบ่งดอกอ่อนส่วนบนและส่วนล่างเพื่อชักนำให้เกิดหน่อใหม่ พบว่าดอกอ่อนส่วนล่างของกระเจียวทั้ง 2 สายพันธุ์มีการพัฒนาและเจริญเติบโตได้ดีกว่าดอกอ่อนส่วนบน เนื่องจากการบานของดอกกระเจียวจะบานจากด้านล่างขึ้นด้านบน ดอกที่ติดในกลีบประดับล่างสุดจะเริ่มบานก่อนและจะค่อย ๆ บานไปจนถึงยอดของช่อดอก นอกจากนี้ดอกอ่อนของกระเจียวทั้ง 2 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่ได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำให้เกิดจำนวนหน่อใกล้เคียงกัน ดังนั้นการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชลงในอาหารอาจไม่จำเป็นเสมอไป เพราะอาหารสูตร MS ก็ประกอบไปด้วยธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองที่พืชจำเป็นต้องใช้ (Skoog and Miller, 1957) อย่างไรก็ตามหน่อใหม่จากการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีจำนวนน้อยกว่าหน่อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโต (ภาพที่ 4.2B, 4.2D และ 4.3B, 4.3D)



ภาพที่ 4.2 ดอกอ่อนของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่เลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ (A และ B) ดอกอ่อนส่วนบนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (C และ D) ดอกอ่อนส่วนล่างที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (E และ F) ดอกอ่อนส่วนล่างที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS + 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA (bar = 1 เซนติเมตร)



ภาพที่ 4.3 ดอกอ่อนของกระเจียว สายพันธุ์บ้านไร่เรด ที่เลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ (A และ B) ดอกอ่อนส่วนบนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (C และ D) ดอกอ่อนส่วนล่างที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (E และ F) ดอกอ่อนส่วนล่างที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS + 0.5 mg/L NAA + 1 mg/L BA (bar = 1 เซนติเมตร)

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของดอกอ่อนกระเจียวสายพันธุ์ Sweetmemory ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ (±SE)[1/]	จำนวนหน่อ (±SE)[1/]	ความสูงต้น (ซม.) (±SE)[1/]
NAA	BA			
0	0	40.00±0.00d	0.89±0.17c	5.08±0.04
0	0.5	40.00±0.00d	0.89±0.17c	5.06±0.05
0	1	40.00±0.00d	0.89±0.17c	5.05±0.04
0.5	0	43.33±5.16cd	1.00±0.00c	5.06±0.05
0.5	0.5	68.33±17.22a	2.22±1.02a	5.04±0.04
0.5	1	53.33±5.16b	1.38±0.25b	5.03±0.04
1	0	45.00±5.47cd	1.05±0.13c	5.04±0.05
1	0.5	46.67±5.16c	1.11±0.17c	5.03±0.04
1	1	41.67±4.08d	1.05±0.13c	5.04±0.04
F-test		**	**	ns
ชิ้นส่วนดอก	บน	43.70±5.64b	1.02±0.20a	5.05±0.04
	ล่าง	47.40±9.44a	1.30±0.36b	5.03±0.04
F-test		**	**	ns

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		ชิ้นส่วนดอก			
NAA	BA				
0	0	บน	40.00±0.00e	0.89±0.19d	5.05±0.05
		ล่าง	40.00±0.00e	0.89±0.19d	5.00±0.00
0	0.5	บน	40.00±0.00e	0.89±0.19d	5.06±0.05
		ล่าง	40.00±0.00e	0.89±0.19d	5.06±0.05
0	1	บน	40.00±0.00e	0.89±0.19d	5.05±0.05
		ล่าง	40.00±0.00e	0.89±0.19d	5.04±0.04
0.5	0	บน	43.33±5.77de	1.00±0.00cd	5.06±0.05
		ล่าง	43.33±5.77de	1.00±0.00cd	5.06±0.05
0.5	0.5	บน	53.33±5.77bc	1.33±0.33bc	5.04±0.04
		ล่าง	83.33±5.77a	2.38±0.38a	5.04±0.05
0.5	1	บน	50.00±0.00bcd	1.22±0.19cd	5.03±0.05
		ล่าง	56.67±5.77b	1.55±0.19b	5.03±0.05
1	0	บน	43.33±5.77de	1.00±0.00cd	5.05±0.05
		ล่าง	46.66±5.77cde	1.11±0.19cd	5.03±0.05
1	0.5	บน	43.33±5.77de	1.00±0.00cd	5.06±0.04
		ล่าง	50.00±0.00bcd	1.22±0.19cd	5.00±0.00
1	1	บน	40.00±0.00e	1.00±0.00cd	5.04±0.05
		ล่าง	43.33±5.77de	1.11±0.19cd	5.05±0.05
F-test			**	**	ns
CV%			8.78	16.40	0.98

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของดอกอ่อนกระเจียวสายพันธุ์บ้านไร่เรด ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ (±SE)[1/]	จำนวนหน่อ (±SE)[1/]	ความสูงต้น (ซม.) (±SE)[1/]
NAA	BA			
0	0	36.66±5.16c	0.78±0.17c	5.08±0.01
0	0.5	46.67±8.16ab	1.00±0.20bc	5.08±0.01
0	1	46.67±8.16ab	1.00±0.20bc	5.07±0.02
0.5	0	46.67±8.16ab	1.00±0.00bc	5.09±0.01
0.5	0.5	53.33±5.16a	1.11±0.26ab	5.07±0.03
0.5	1	56.67±15.05a	1.27±0.32a	5.06±0.04
1	0	51.67±7.52ab	1.27±0.32a	5.08±0.01
1	0.5	43.33±5.16b	0.94±0.13bc	5.09±0.01
1	1	55.00±16.43a	1.00±0.20bc	5.07±0.03
F-test		**	**	ns
ชิ้นส่วนดอก	บน	42.96±6.08b	0.95±0.19b	5.08±0.02
	ล่าง	52.22±9.74a	1.13±0.28a	5.07±0.03
F-test		**	**	ns

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		ชิ้นส่วนดอก			
NAA	BA				
0	0	บน	36.66±11.54c	0.78±0.19c	5.08±0.01
		ล่าง	36.66±5.77c	0.78±0.19c	5.08±0.01
0	0.5	บน	40.00±0.00de	0.89±0.19c	5.09±0.01
		ล่าง	53.33±5.77bc	1.11±0.19bc	5.08±0.01
0	1	บน	40.00±0.00de	0.89±0.19c	5.08±0.01
		ล่าง	53.33±5.77bc	1.11±0.19bc	5.06±0.04
0.5	0	บน	46.66±5.77cd	1.00±0.00c	5.09±0.01
		ล่าง	46.66±5.77cd	1.00±0.00c	5.09±0.00
0.5	0.5	บน	53.33±5.77bc	1.11±0.19bc	5.08±0.01
		ล่าง	53.33±5.77bc	1.11±0.38bc	5.07±0.04
0.5	1	บน	43.33±5.77de	1.11±0.38bc	5.06±0.04
		ล่าง	63.33±5.77a	1.98±0.19a	5.06±0.04
1	0	บน	46.66±5.77cd	1.00±0.00c	5.08±0.01
		ล่าง	56.67±5.77ab	1.44±0.19ab	5.08±0.01
1	0.5	บน	40.00±0.00de	0.89±0.19c	5.08±0.01
		ล่าง	46.66±5.77cd	1.00±0.19c	5.09±0.00
1	1	บน	40.00±0.00de	0.89±0.19c	5.08±0.01
		ล่าง	53.33±5.77bc	1.11±0.19bc	5.06±0.05
F-test			**	**	ns
CV%			10.78	19.30	0.53

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ โดยใช้สารละลาย EMS

4.2.1 อัตราการรอดชีวิตของโคนต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์

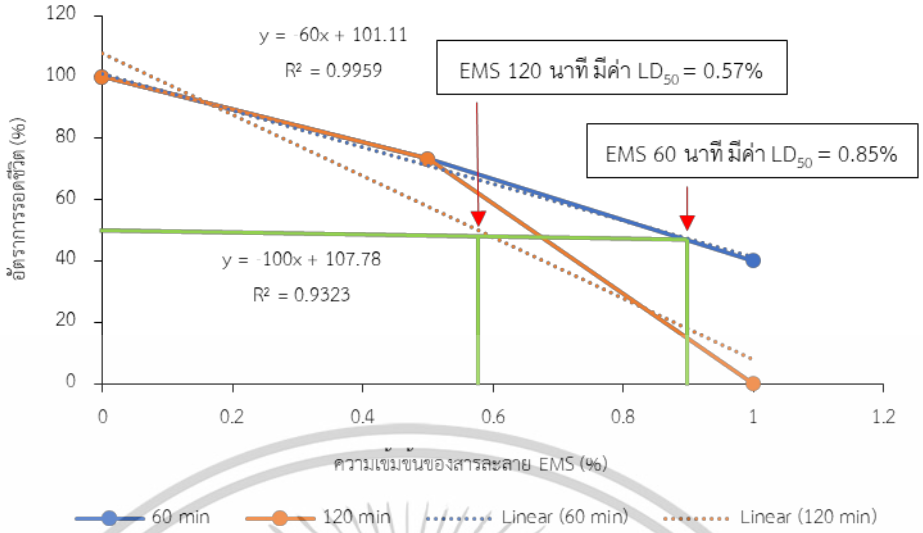
หลังจากแช่โคนต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ขนาด 1 เซนติเมตร โดยใช้สารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลาย EMS พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 โคนต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS และโคนต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ และโคนต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิต 46.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไปพบว่าโคนต้นที่ได้รับสารละลาย EMS มีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง เช่นเดียวกับระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS ระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS 60 นาที มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS 120 นาที เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS ร่วมกัน พบว่าโคนต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที เริ่มมีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง หน่อเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 4 พบว่าโคนต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลาย EMS ทุกความเข้มข้น และทุกระยะเวลา มีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง โดยเฉพาะโคนต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที พบว่าไม่มีอัตราการรอดชีวิต (ตารางที่ 4.6) หน่อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลทั้งหมด เนื่องจากการใช้สารเคมีก่อการกลายพันธุ์ในหลอดทดลองที่มีความเข้มข้นสูง หรือที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันแต่ระยะเวลาที่ได้รับสารเคมีนานขึ้นจะส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตลดลง ความเข้มข้นของสารละลาย EMS ในปริมาณที่สูงจะเข้าทำลายกลุ่มเนื้อเยื่อทำให้เนื้อเยื่อเป็นพิษ ส่งผลให้เกิดการแบ่งเซลล์ที่ผิดพลาด การหยุดชะงักการแบ่งเซลล์หรือทำให้เกิดความผิดปกติในดีเอ็นเอของพืช พืชจึงไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ (Wu and Mooney, 2002; วิชชุตา รุ่งเรือง, 2537) เช่นการศึกษาของศิริญญา ม่วงสอน และสมปอง เตชะโต (2551) นำ PLBs กล้วยไม้เหลืองจันทรบูรมาแช่ในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที ส่งผลให้มีอัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ในความเข้มข้นของสารละลาย EMS ที่สูง ส่วนโคนต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.6) ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ โคนต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ระยะเวลา 60 นาที มีค่า LD_{50} เท่ากับ 0.85 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 120 นาที มีค่า LD_{50} เท่ากับ 0.57 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.4) โดย สมปอง เตชะโต และวิทยา พรหมมี (2542) รายงานว่า LD_{50} ถือเป็นค่าในการประเมินความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ ทั้งนี้เพราะความเข้มข้นดังกล่าวสร้างความเสียหาย และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับหน่วยพันธุกรรมอย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ พืชแต่ละชนิดมีค่า LD_{50} ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนและอายุของชิ้นส่วนพืชที่นำมาแช่ ระยะเวลาในการแช่ และความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ (สิรนุช ลามศรีจันทร์, 2540) โดยพืชบาง

ชนิดมีค่า LD_{50} สูง เช่น การศึกษาของ Latado *et al*. (2004) ได้นำก้านช่อดอกเบญจมาศจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง 45 นาที พบว่ามีค่า LD_{50} เท่ากับ 0.82 เปอร์เซ็นต์ พืชบางชนิดมีค่า LD_{50} ต่ำ เช่นการศึกษาของ Berenschot *et al*. (2008) พบว่าการจุ่มแช่เมล็ดพิทูเนียในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า LD_{50} เท่ากับ 0.11 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่ออัตราการรอดชีวิตของหน่อปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ภายหลังการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) (±SE)[1/]			
		อายุ (สัปดาห์)			
		2	4	6	8
EMS (%)	0	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
	0.5	100.00±0.00a	86.67±10.32b	76.67±8.16b	76.67±10.32b
	1.0	46.67±30.11b	36.67±40.82c	30.00±32.86c	20.00±21.90c
F-test		**	**	**	**
ระยะเวลา	60	91.11±14.52a	88.88±14.52a	80.00±17.32a	71.11±26.67a
(นาที)	120	73.33±30.00b	60.00±45.82b	57.78±45.21b	60.00±45.21b
F-test		**	**	**	**
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)				
0	60	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
	120	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
0.5	60	100.00±0.00a	93.33±11.54a	80.00±0.00b	73.33±11.54b
	120	100.00±0.00a	80.00±0.00b	73.33±11.54b	73.33±11.54b
1.0	60	73.33±11.54b	73.33±11.54b	60.00±0.00c	40.00±0.00c
	120	20.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00d	0.00±0.00d
F-test		**	**	**	**
CV%		5.73	8.95	6.84	7.19

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ



ภาพที่ 4.4 อัตราการรอดชีวิตของโคนต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

4.2.2 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้นของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์

หลังจากการแช่โคนต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ขนาด 1 เซนติเมตร ในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลาย EMS พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อและความสูงต้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยโคนต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อและความสูงต้นสูงสุดเมื่อเทียบกับโคนต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ส่วนระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อและความสูงต้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่จำนวนหน่อมีความแตกต่างทางสถิติ และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นร่วมกับระยะเวลาในการแช่สาร พบว่าโคนต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุด 86.67 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนหน่อสูงสุด 2.53 หน่อ (ภาพที่ 4.5A, ตารางที่ 4.7) หน่อที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อต่ำสุด 60 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนหน่อต่ำสุด 1.53 หน่อ (ภาพที่ 4.5C, ตารางที่ 4.7) เนื่องจากสารละลาย EMS ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation) ทำให้ดีเอ็นเอหรือเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง โคนต้นที่ได้รับสารละลาย EMS จึงมีการเจริญเติบโตน้อยกว่าโคนต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS (สิรนุช ลามศรีจันทร์, 2540) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Qin *et al*. (2011) ได้นำเอ็มบริโอของโลควอตมาแช่ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าความเข้มข้นที่ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้เอ็มบริโอที่รอดชีวิตเกิดการสร้างเอ็มบริโอใหม่สูงสุด 46.8 เปอร์เซ็นต์ และมีการเจริญเติบโตต่อไป นอกจากนี้ในสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงหน่อปทุมมามีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ซึ่ง BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโทไคนินทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการแตกหน่อใหม่โดยกระตุ้นผ่านการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญ โดยส่งเสริมการสังเคราะห์ RNA และโปรตีน ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเพิ่มจำนวนยอดรวมในหลอดทดลอง แสดงให้เห็นว่า BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดหนึ่งในกลุ่มไซโทไคนินที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของพืชชนิดนี้ (Rathore *et al*., 2007) ความสูงของต้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกสัปดาห์ โคนต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS มีความสูงของต้นเฉลี่ยสูงสุดคือ 5.72 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.7) ในขณะที่หน่อที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที มีความสูงของต้นเฉลี่ยต่ำสุดคือ 4.43 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.5C, ตารางที่ 4.7)

ภาพที่ 4.5 ต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที และนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (bar = 1 เซนติเมตร)

ตารางที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ (±SE)[1/]	จำนวนหน่อ (±SE)[1/]	ความสูงต้น (ซม.) (±SE)[1/]
EMS (%)	0	80.00±5.47a	2.50±0.10a	5.49±0.29a
	0.5	68.33±5.16ab	2.00±0.12b	4.83±0.28b
	1.0	60.00±0.00b	1.53±0.11c	4.43±0.16c
F-test		**	**	**
ระยะเวลา	60	71.67±12.36	2.22±0.44a	5.06±0.58
(นาที)	120	71.11±47.07	2.04±0.30b	4.95±0.37
F-test		ns	**	ns
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)			
0	60	86.67±5.77a	2.53±0.11a	5.72±0.14a
	120	73.33±5.77ab	2.46±0.11a	5.26±0.20b
0.5	60	70.00±5.77ab	2.06±0.11ab	5.02±0.26b
	120	66.67±0.00ab	1.93±0.11b	4.65±0.16c
1.0	60	60.00±0.00b	1.53±0.11c	4.43±0.16c
	120	-	-	-
F-test		**	**	**
CV%		16.58	5.48	3.84

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

4.2.3 การทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยว ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์

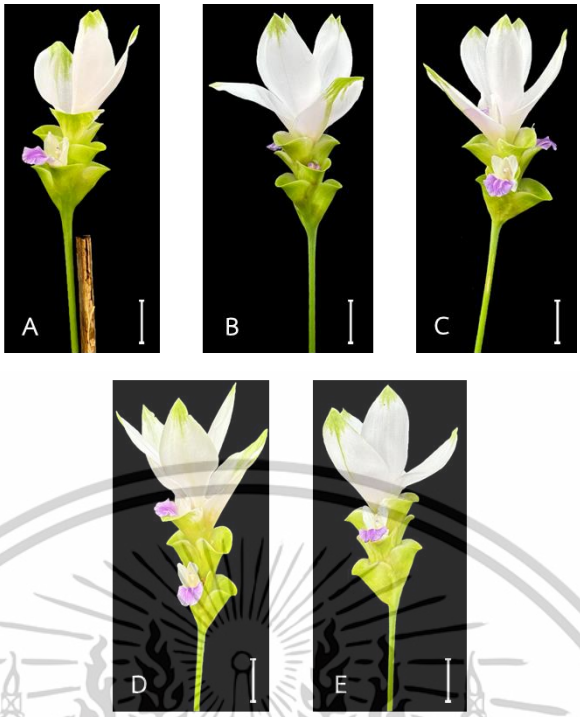
นำต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที และ 120 นาที ที่รอดชีวิตจากการแช่สารละลาย EMS รุ่น M4 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 8 สัปดาห์ มาย้ายปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อโดยย้ายปลูกในกล่องพลาสติก ที่มีพีทมอสเป็นวัสดุปลูก จำนวน 20 ต้น โดยแบ่งเป็น 4 กล่อง กล่องละ 5 ต้น หลังจากนั้นนำไปปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไอโซเลท Si16, biovar 4, phylotype I, sequevar 30 หลังการปลูกเชื้อ เป็นเวลา 50 วัน พบว่าต้นที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อหรือชุดควบคุม ต้นที่ทำแผลที่ราก และต้นที่ไม่ได้ทำแผลที่รากนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ แสดงอาการเหี่ยว และตาย 100 เปอร์เซ็นต์ กาญจนา วิชิตตระกูลถาวร (2542) รายงานว่า เชื้อ *Ralstonia solanacearum* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่แพร่ระบาดในพืชวงศ์ขิงและเชื้อสาเหตุนี้จะเข้าทำลายปทุมมาและก่อโรคกับปทุมมาโดยตรง ทำให้ปทุมมาไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

4.2.4 การย้ายปลูกปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ นอกสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที และ 120 นาที ที่รอดชีวิตจากการแช่สารละลาย EMS รุ่น M4 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มาย้ายปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อ ย้ายออกปลูกจำนวน 20 ต้นต่อ 1 ทรีทเมนต์ ทำได้โดยนำต้นปทุมมาที่มีราก และเจริญเติบโตมีอายุ 8 สัปดาห์ในสภาพปลอดเชื้อนำมาปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ 2-3 วัน โดยการย้ายมาเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นให้ย้ายต้นปทุมมาออกจากขวด ทำการล้างวุ้นที่ติดกับรากให้สะอาดและนำต้นปทุมมาจุ่มน้ำยากันเชื้อราประมาณ 2-3 นาที หลังจากนั้นนำมาปลูกในกล่องพลาสติกที่ใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก รดน้ำให้ชุ่มและปิดฝากล่องพลาสติก เพื่อให้ต้นปทุมมาค่อย ๆ ปรับตัว นำกล่องพลาสติกที่มีต้นปทุมมาวางไว้ในที่มีแสง แต่ไม่ต้องโดนแดดเพราะจะทำให้ต้นปทุมมาที่เพิ่งย้ายมาตาย เมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์ ให้เปิดฝากล่องพลาสติก เพื่อให้ต้นปทุมมามีอากาศถ่ายเท พอต้นปทุมมาเริ่มตั้งตัวแข็งแรงให้ย้ายปลูกในดินผสมมะพร้าวสับและแกลบ อัตราส่วน 1:1:1 เริ่มใส่ปุ๋ยสูตร 16-16-16 ในสัปดาห์ที่ 3 เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลาย EMS พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 ต้นปทุมมาทุกความเข้มข้นมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มมีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงในสัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป ส่วนระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติและเริ่มมีอัตราการรอดชีวิตลดลงในสัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS ร่วมกัน พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 มีอัตราการรอดชีวิต 100เปอร์เซ็นต์ในทุกทรีทเมนต์ อัตราการรอดชีวิตเริ่มลดลงเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป โดยมี

อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย 91-96 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.8) นอกจากนี้ได้ทำการวัดความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก เส้นรอบวงหัว และจำนวนตุ้ม เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เช่นเดียวกับการพิจารณาความเข้มข้นร่วมกับระยะเวลาในการแช่สาร พบว่าต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก เส้นรอบวงหัว และจำนวนตุ้ม ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความสูงต้นเฉลี่ย 60-61 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.6, ตารางที่ 4.9) ความยาวก้านช่อดอกเฉลี่ย 49-50 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.6, ตารางที่ 4.9) เส้นรอบวงดอกเฉลี่ย 11 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.7, ตารางที่ 4.9) เส้นรอบวงหัวเฉลี่ย 5-6 เซนติเมตร และจำนวนตุ้ม 4 ตุ้ม ตามลำดับ (ภาพที่ 4.8, ตารางที่ 4.9) ทุกทรีทเมนต์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ไม่แตกต่างกันโดยใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว (simple leaf) ใบแผ่กว้างมีขนาดใหญ่สีเขียวเข้ม แผ่นใบเรียบหนาแข็ง ใต้ใบไม่มีขน ลักษณะเด่นของดอกคือ ดอกจริงปากกลีบดอกจะมีสีม่วง โคนกลีบดอกสีขาว กลีบประดับส่วนบน เรียกว่า coma bract มีสีขาว ปลายกลีบประดับแหลมสีเขียว กลีบประดับส่วนล่าง เรียกว่า main bract มีสีเขียวอมเหลือง (ภาพที่ 4.7) ในการออกดอก ช่อดอกเกิดจากตายอดของลำต้นเทียม ก้านช่อดอกมีลักษณะยาว (ภาพที่ 4.6) สิรนุช ลามศรีจันทร์ (2540) รายงานว่าการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมีเพื่อให้มีประสิทธิภาพ หรือมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ปริมาณความเข้มข้น และระยะเวลาที่ใช้ ผลการทดลองนี้พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาทุกทรีทเมนต์ไม่แตกต่างกัน อาจเกิดจากปริมาณความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ยังไม่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมา

ภาพที่ 4.6 ต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ จากต้นที่ได้รับสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 60 นาที (B) 0.5% 60 นาที (C) 1% 60 นาที (D) ต้นควบคุม 0% 120 นาที (E) 0.5% 120 นาที และย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน (bar = 20 เซนติเมตร)



ภาพที่ 4.7 ดอกปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ จากต้นที่ได้รับสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 60 นาที (B) 0.5% 60 นาที (C) 1% 60 นาที (D) ต้นควบคุม 0% 120 นาที (E) 0.5% 120 นาที และย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน (bar = 10 เซนติเมตร)

ภาพที่ 4.8 หัวปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ จากต้นที่ได้รับสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 60 นาที (B) 0.5% 60 นาที (C) 1% 60 นาที (D) ต้นควบคุม 0% 120 นาที (E) 0.5% 120 นาที และย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 6 เดือน (bar = 2 เซนติเมตร)

ตารางที่ 4.8 อัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) (±SE)[1/]			
		อายุ (สัปดาห์)			
		2	4	6	8
EMS (%)	0	100.00±0.00	100.00±0.00a	98.33±2.58a	96.67±2.58a
	0.5	100.00±0.00	94.16±2.04b	95.00±0.00b	93.33±2.58b
	1.0	100.00±0.00	93.33±2.88b	93.33±2.88b	91.67±2.88c
F-test		ns	**	**	**
ระยะเวลา	60	100.00±0.00	96.67±3.33	96.67±3.00	95.00±3.33
(นาที)	120	100.00±0.00	96.11±4.08	95.55±2.58	93.88±3.16
F-test		ns	ns	ns	ns
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)				
0	60	100.00±0.00	100.00±0.00a	98.33±2.88	96.67±2.88
	120	100.00±0.00	100.00±0.00a	98.33±2.88	96.67±2.88
0.5	60	100.00±0.00	95.00±0.00b	95.00±0.00	93.33±2.88
	120	100.00±0.00	93.33±2.88b	95.00±2.88	93.33±2.88
1.0	60	100.00±0.00	93.33±2.88b	93.33±0.00	91.67±2.88
	120	-	-	-	-
F-test		ns	*	ns	ns
CV%		0.00	1.89	2.30	3.06

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

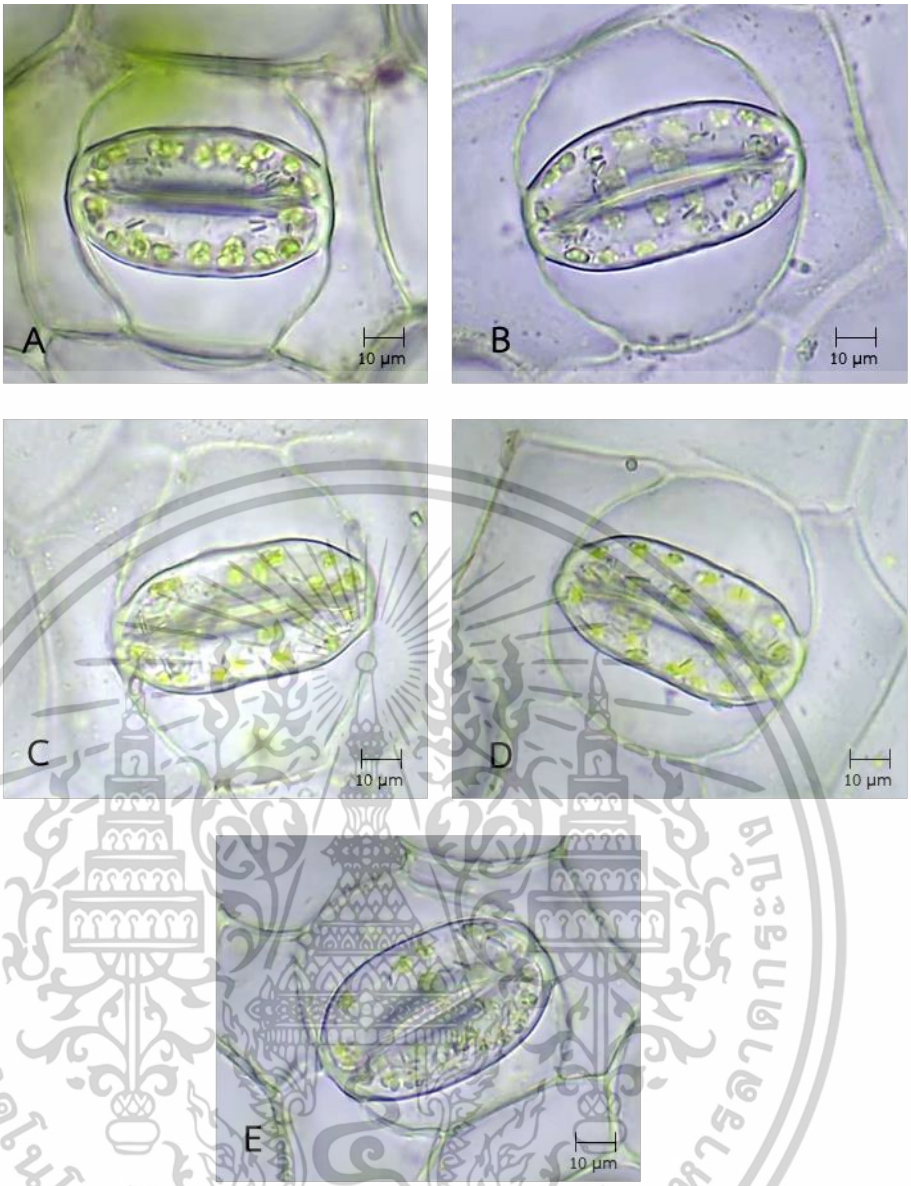
ตารางที่ 4.9 ความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน เส้นรอบวงหัว และจำนวนตุ้ม หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 6 เดือน ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		ความสูงต้น (ซม.) (±SE)[1/]	ความยาวก้านช่อดอก (±SE)[1/]	เส้นรอบวงดอก (±SE)[1/]	เส้นรอบวงหัว (±SE)[1/]	จำนวนตุ้ม (±SE)[1/]
EMS (%)	0	61.19±0.78	50.11±0.61	11.47±0.61	5.88±0.38	4.16±1.16
	0.5	60.87±0.44	49.41±0.75	11.25±0.55	5.80±0.97	4.16±0.75
	1.0	60.68±0.56	49.24±1.00	11.17±0.51	5.67±0.47	4.00±1.00
F-test		ns	ns	ns	ns	ns
ระยะเวลา (นาที)	60	60.99±0.73	49.76±0.86	11.35±0.55	5.90±0.73	4.16±1.05
	120	60.91±0.42	49.59±0.75	11.27±0.66	5.67±0.55	4.11±0.75
F-test		ns	ns	ns	ns	ns
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)					
0	60	61.35±1.11	50.11±0.83	11.57±0.51	6.03±0.25	4.33±1.52
	120	61.02±0.45	50.11±0.50	11.37±0.81	6.00±0.49	4.33±1.00
0.5	60	60.94±0.52	49.41±0.78	11.32±0.76	5.73±1.32	4.00±1.00
	120	60.80±0.46	49.41±0.89	11.18±0.43	5.66±0.72	4.00±0.57
1.0	60	60.68±0.56	49.24±0.89	11.17±0.51	5.60±0.47	4.00±1.00
	120	-	-	-	-	-
F-test		ns	ns	ns	ns	ns
CV%		1.10	1.65	5.58	12.88	25.75

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.2.5 ความกว้าง ความยาว จำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ และปริมาณรงควัตถุ ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์

นำใบของต้นปทุมมาอายุ 8 สัปดาห์ ที่อยู่นอกสภาพปลอดเชื้อที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที มาวัดขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS พบว่าขนาดของปากใบและจำนวนคลอโรพลาสต์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS ร่วมกัน พบว่าขนาดความกว้าง ความยาว และจำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบในทุกทรีทเมนต์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความกว้างของปากใบเฉลี่ย 23.25 ไมโครเมตร ความยาวของปากใบเฉลี่ย 42-45 ไมโครเมตร และจำนวนคลอโรพลาสต์เฉลี่ย 26-29 เซลล์ต่อปากใบ (ภาพที่ 4.9, ตารางที่ 4.10) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ อรุณี ม่วงแก้วงาม (2554) นำยอดดาหลามาแช่ใน สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำใบดาหลามาทำการตรวจนับจำนวนคลอโรพลาสต์ และวัดขนาดของปากใบ เปรียบเทียบกันในแต่ละระดับความเข้มข้นที่ทำการทดลอง ผลการศึกษาสรุปได้ว่าจำนวนคลอโรพลาสต์และขนาดของปากใบไม่แตกต่างกันทางสถิติ อาจกล่าวได้ว่าการทำงานสารละลาย EMS ส่งผลให้ขนาดของปากใบมีการเปลี่ยนแปลง ในเรื่องของขนาด การแบ่งเซลล์และการจัดเรียงเซลล์ ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มหรือลดขนาดของปากใบและจำนวนคลอโรพลาสต์ จากการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS ร่วมกัน พบว่าปริมาณปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ เฉลี่ย 6.25, 2.42 และ 4.85 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11) สารละลาย EMS ทำหน้าที่เข้าไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเบสในดีเอ็นเอไม่ได้ทำหน้าที่โดยตรงกับการสังเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ ดังนั้นหากไม่มีการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับรงควัตถุ พืชที่ได้รับสารละลาย EMS ก็อาจมีปริมาณรงควัตถุที่ไม่เปลี่ยนแปลง (อรุณี วงศ์ปิยะสถิต, 2550) อย่างไรก็ตามคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์มีความจำเป็นต่อการดูดซับพลังงานแสงในกระบวนการสังเคราะห์แสง ดังนั้นปริมาณของคลอโรฟิลล์ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อส่วนใบของพืชจึงสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งบอกถึงความสามารถในการสร้างอาหาร เพื่อการเจริญเติบโตของพืช ตลอดจนการตอบสนองต่อปัจจัยต่าง ๆ ด้านสภาพแวดล้อม (วิรัตน์ ภูมิวิวัฒน์, 2539)



ภาพที่ 4.9 ขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ของต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ จากต้นที่ได้รับสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (A) ต้นควบคุม 0% 60 นาที (B) 0.5% 60 นาที (C) 1% 60 นาที (D) ต้นควบคุม 0% 120 นาที (E) 0.5% 120 นาที (bar = 10 µm)

ตารางที่ 4.10 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่อขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ภายหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		ขนาดปากใบ (±SE)[1/]		จำนวนคลอโรพลาสต์/ปากใบ (±SE)[1/]
		ความกว้าง (µM)	ความยาว (µM)	
EMS (%)	0	25.06±1.26	45.05±1.16	31.44±0.72
	0.5	23.23±0.53	42.99±0.62	30.50±0.86
	1.0	23.14±0.27	42.72±0.55	30.32±0.69
F-test		ns	ns	ns
ระยะเวลา	60	24.17±1.32	43.97±1.48	30.88±0.72
(นาที)	120	23.79±1.35	43.61±1.28	30.50±0.83
F-test		ns	ns	ns
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)			
0	60	25.17±1.75	45.07±1.62	29.20±0.96
	120	24.94±0.95	45.03±0.87	26.83±0.57
0.5	60	23.29±0.17	43.06±0.96	29.25±1.07
	120	23.17±0.82	42.92±0.19	26.76±0.69
1.0	60	23.14±0.27	42.72±0.55	28.55±0.69
	120	-	-	-
F-test		ns	ns	ns
CV%		4.23	2.21	8.38

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

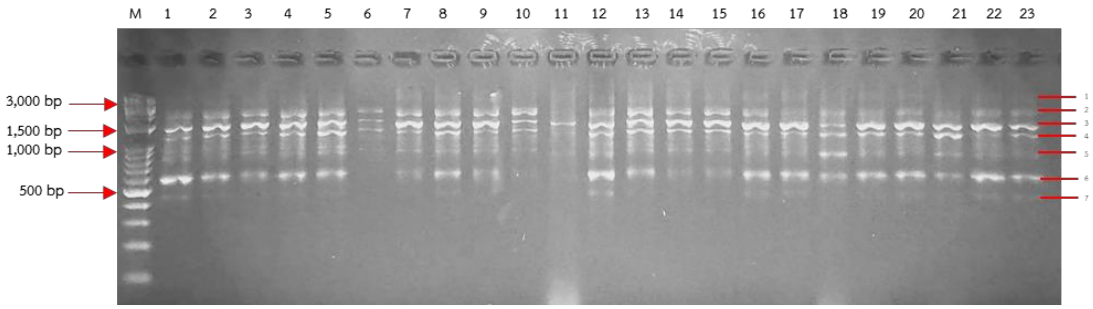
ตารางที่ 4.11 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่อปริมาณรงควัตถุของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ภายหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		ปริมาณรงควัตถุ (ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร) (±SE)[1/]		
		คลอโรฟิลล์เอ	คลอโรฟิลล์บี	แคโรทีนอยด์
EMS (%)	0	6.25±0.08	2.42±0.10	4.85±0.22
	0.5	6.24±0.06	2.41±0.05	4.85±0.06
	1.0	6.22±0.10	2.40±0.09	4.80±0.08
F-test		ns	ns	ns
ระยะเวลา	60	6.24±0.09	2.42±0.07	4.85±0.14
(นาที)	120	6.23±0.02	2.41±0.09	4.82±0.16
F-test		ns	ns	ns
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)			
0	60	6.25±0.12	2.42±0.10	4.85±0.24
	120	6.24±0.03	2.42±0.13	4.85±0.26
0.5	60	6.24±0.10	2.41±0.06	4.85±0.10
	120	6.22±0.10	2.41±0.05	4.85±0.02
1.0	60	6.22±0.10	2.40±0.05	4.75±008
	120	-	-	-
F-test		ns	ns	ns
CV%		1.38	3.77	3.56

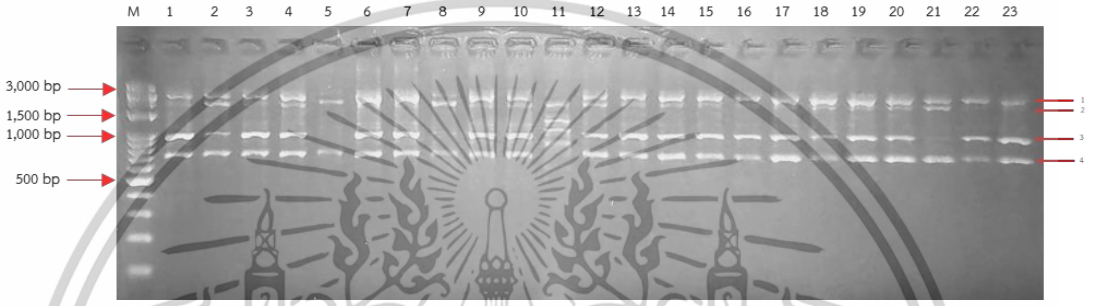
[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.2.6 การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน ด้วยเทคนิค RAPD

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกันจำนวน 23 ตัวอย่างที่มาจากทรีทเมนต์ที่ได้รับการแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที และความเข้มข้น 0, 0.5 ระยะเวลา 120 นาที ที่ย้ายออกปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อ โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างทั้งหมดมาทดสอบด้วยความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้ไพรเมอร์ RAPD จำนวน 18 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.1) พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ 9 ไพรเมอร์ คือ OPA-02 (ภาพที่ 4.10), OPA-04 (ภาพที่ 4.11), OPA-10 (ภาพที่ 4.12), OPA-18 (ภาพที่ 4.13), OPB-01 (ภาพที่ 4.14), OPC-01 (ภาพที่ 4.15), OPC-05 (ภาพที่ 4.16), OPD-02 (ภาพที่ 4.17) และ OPD-03 (ภาพที่ 4.18) ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนจำนวน 7, 4, 5, 5, 7, 6, 7, 4 และ 4 แถบ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.12) ขนาดตั้งแต่ 700-1,500 คู่เบส ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 84 แถบ และให้จำนวนแถบดีเอ็นที่มีความต่าง (Polymorphism) ทั้งหมด 29 แถบ คิดเป็น 34.52 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับรายงานของ จันทร์เพ็ญ ใจซื่อ (2563) ได้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง *Nepenthes khasiana* ด้วยเทคนิค RAPD พบว่ามี 4 ไพรเมอร์มีความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอ เนื่องจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมในต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงรุ่นที่ 3 ที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



ภาพที่ 4.10 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-02



ภาพที่ 4.11 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-04

ภาพที่ 4.12 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-10

ช่อง M = 100 bp DNA Ladder

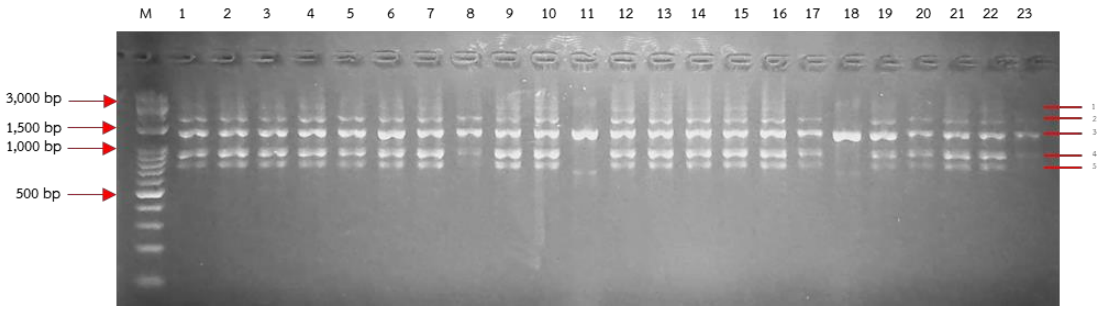
ช่อง 1-3 = EMS 0% 60 นาที

ช่อง 4-9 = EMS 0.5% 60 นาที

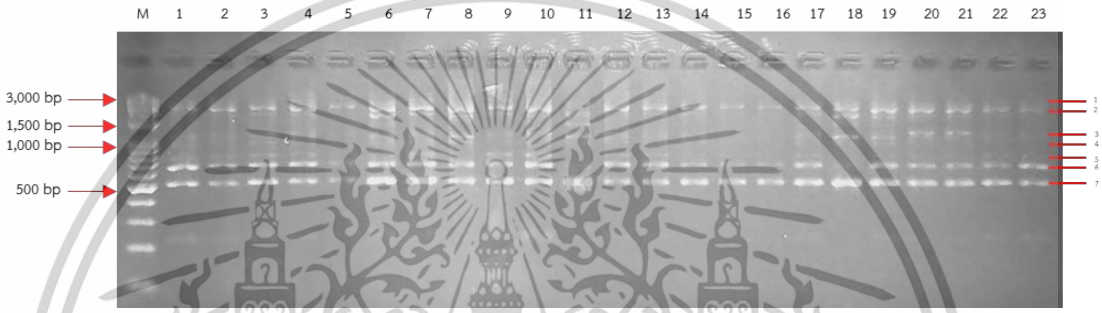
ช่อง 10-14 = EMS 1% 60 นาที

ช่อง 15-17 = EMS 0% 120 นาที

ช่อง 18-23 = EMS 0.5% 120 นาที



ภาพที่ 4.13 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-18



ภาพที่ 4.14 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPB-01

ภาพที่ 4.15 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPC-01

ช่อง M = 100 bp DNA Ladder

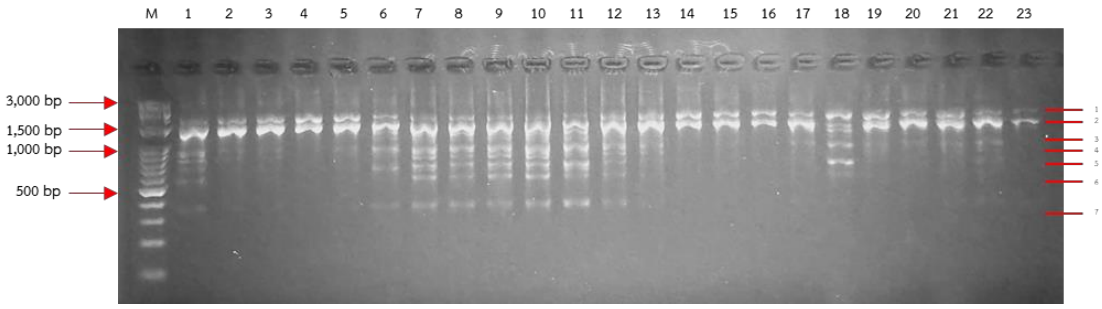
ช่อง 1-3 = EMS 0% 60 นาที

ช่อง 4-9 = EMS 0.5% 60 นาที

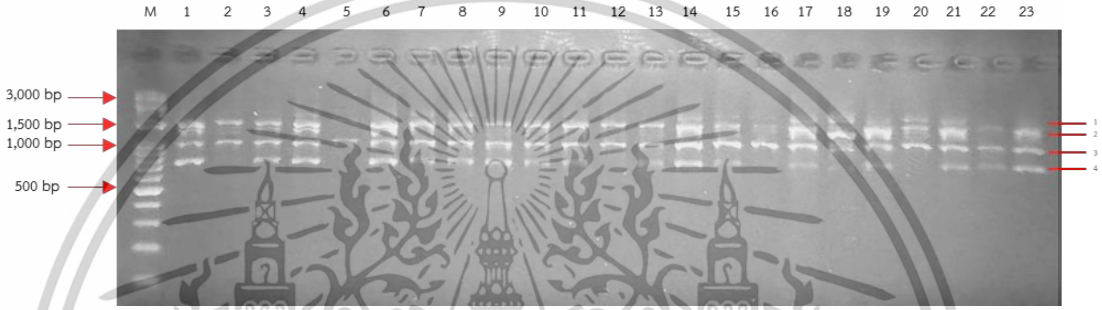
ช่อง 10-14 = EMS 1% 60 นาที

ช่อง 15-17 = EMS 0% 120 นาที

ช่อง 18-23 = EMS 0.5% 120 นาที



ภาพที่ 4.16 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPC-05



ภาพที่ 4.17 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPD-02

ภาพที่ 4.18 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPD-03

ช่อง M = 100 bp DNA Ladder

ช่อง 1-3 = EMS 0% 60 นาที

ช่อง 4-9 = EMS 0.5% 60 นาที

ช่อง 10-14 = EMS 1% 60 นาที

ช่อง 15-17 = EMS 0% 120 นาที

ช่อง 18-23 = EMS 0.5% 120 นาที

4.2.6.1 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism และค่า PICs จากแต่ละคู่ไพรเมอร์

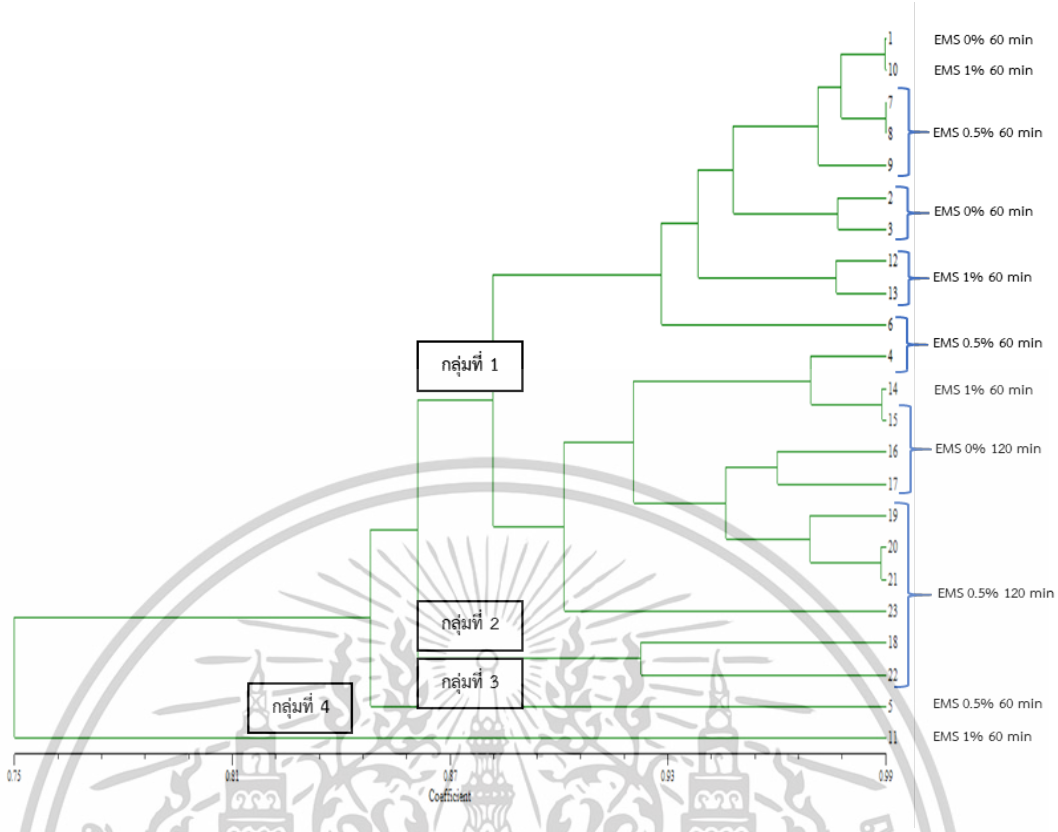
การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยเทคนิค RAPD พบไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างจำนวนทั้งหมด 9 ไพรเมอร์ และให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) โดยไพรเมอร์แต่ละตัวมีค่า PICs ดังต่อไปนี้ OPA-02 มีค่า PICs เท่ากับ 0.09, OPA-04 มีค่า PICs เท่ากับ 0.04, OPA-10 มีค่า PICs เท่ากับ 0.04, OPA-18 มีค่า PICs เท่ากับ 0.15, OPB-01 มีค่า PICs เท่ากับ 0.07, OPC-01 มีค่า PICs เท่ากับ 0.10, OPC-05 มีค่า PICs เท่ากับ 0.32, OPD-02 มีค่า PICs เท่ากับ 0.15 และ OPD-03 มีค่า PICs เท่ากับ 0.24 และให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.13 (ตารางที่ 4.12) ซึ่งค่า PICs ที่ได้มีประสิทธิภาพต่ำ แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่นำมาทำ RAPD มีความแตกต่างกันน้อย ตามรายงานของ Yu *et al*. (2012) PICs มีประสิทธิภาพสูงเมื่อ PICs > 0.5 PICs มีประสิทธิภาพปานกลางเมื่อ 0.25 < PICs < 0.5 และ PICs มีประสิทธิภาพต่ำเมื่อ PICs < 0.2

ตารางที่ 4.12 จำนวนแถบดีเอ็นเอจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยเทคนิค RAPD จำนวน 9 ไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism จากแต่ละไพรเมอร์

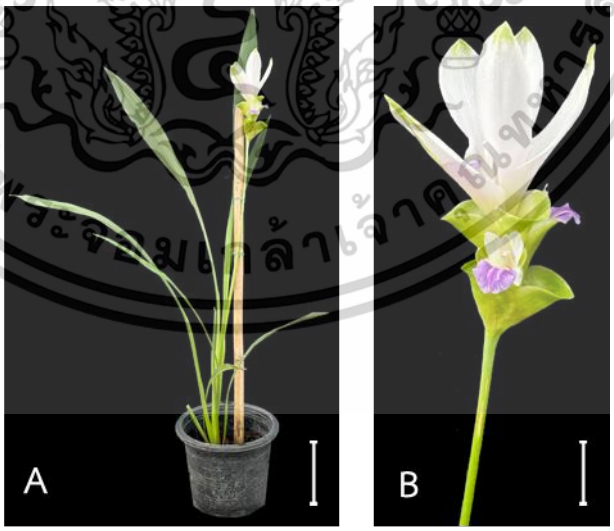
คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง	% polymorphic bands	PICs
OPA02	7	6	85.71	0.09
OPA04	4	2	50.00	0.04
OPA10	5	2	40.00	0.04
OPA18	5	3	60.00	0.15
OPB01	7	3	42.85	0.07
OPC01	6	4	66.67	0.10
OPC05	7	5	71.42	0.32
OPD02	4	2	50.00	0.15
OPD03	4	2	50.00	0.24
รวมทั้งหมด	49	29	202.85	1.20
เฉลี่ย	5.44	3.2	40.57	0.13

4.2.6.2 การจัดกลุ่มปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกันด้วยโปรแกรม NTSYS 2.10p

จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยนำแมทริกซ์ความเหมือนตัวแทนสัมประสิทธิ์แจคคาร์ด (Jaccard's coefficient) เพื่อจัดกลุ่มข้อมูลโดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS 2.10p สามารถจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ โดยพิจารณาจากลักษณะทางจีโนไทป์ สามารถจำแนกได้ 4 กลุ่ม (ภาพที่ 4.19) จากทั้งหมด 23 ตัวอย่างที่ย้ายปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อ และมีค่า cophenetic correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.85 แต่เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ทั้ง 4 กลุ่ม มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน คือ ลักษณะก้านช่อดอกยาว ดอกจริงปากกลีบดอกจะมีสีม่วง โคนกลีบดอกสีขาว กลีบประดับส่วนบน เรียกว่า coma bract มีสีขาว ปลายกลีบประดับแหลมสีเขียว กลีบประดับส่วนล่าง เรียกว่า main bract มีสีเขียวอมเหลือง (ภาพที่ 4.20) แต่เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่า บางตัวอย่างมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD นี้เกิดจากไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอแบบสุ่มและกระจายทั่วจีโนม โดยโพลิมอร์ฟิซึมเกิดจากจำนวนของตำแหน่งที่ไพรเมอร์ไปเกาะไม่เท่ากันหรือบริเวณที่ไพรเมอร์เกาะได้หายไปหรือเพิ่มขึ้นมาหรือมีการเปลี่ยนแปลงเบสในบริเวณที่ไพรเมอร์เกาะ หรือเกิดการหายไปหรือเพิ่มขึ้นมาของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ (สุรีพร เกตุงาม, 2546)



ภาพที่ 4.19 Phylogenetic tree ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน และนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10p โดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิค RAPD



ภาพที่ 4.20 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน (A) ลำต้นของต้นปทุมมา (B) ดอกปทุมมา (bar = 10 เซนติเมตร)

4.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory โดยใช้สารละลาย EMS

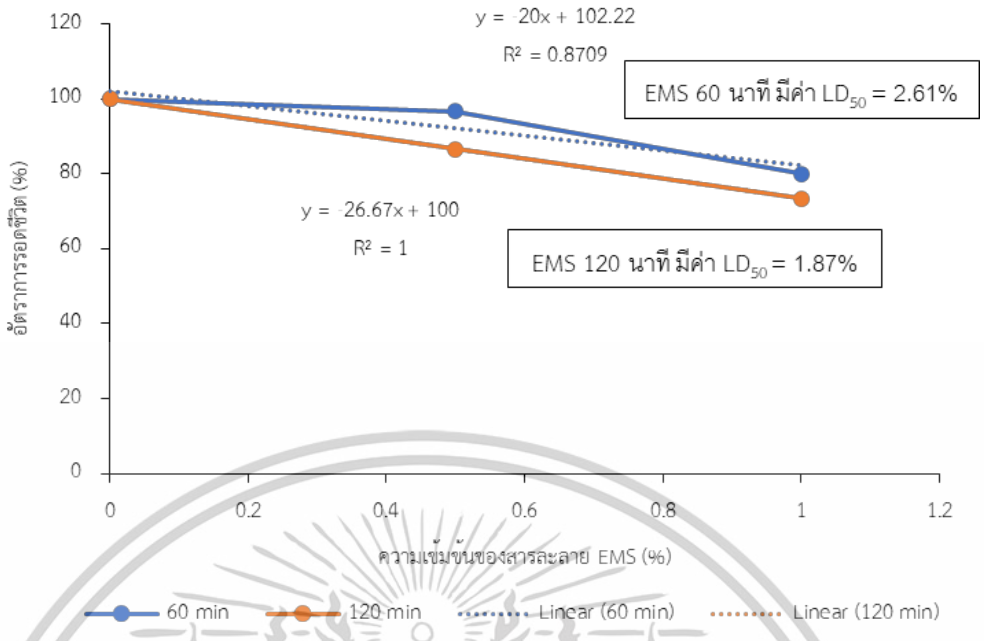
4.3.1 อัตราการรอดชีวิตของโคนต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory

หลังจากการแช่โคนต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ขนาด 1 เซนติเมตร โดยใช้สารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลาย EMS พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 โคนต้นกระเจียวมีอัตราการรอดชีวิตสูง และอัตราการรอดชีวิตเริ่มลดลงเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป ส่วนระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที โคนต้นปทุมมามีอัตราการรอดชีวิตที่สูง และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าหน่อที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS (ต้นควบคุม) มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 2 เป็นต้นไป หน่อที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที และ 120 นาที มีอัตราการรอดชีวิตของหน่อกระเจียวที่ลดลง อย่างไรก็ตามโคนต้นกระเจียวทุกความเข้มข้นมีอัตราการรอดชีวิตทั้งหมด สามารถพัฒนาไปเป็นหน่อใหม่ได้ เป็นเพราะความสำเร็จของการก่อกลายพันธุ์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ธรรมชาติของเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ชนิดเนื้อเยื่อ ขนาดเนื้อเยื่อ และระยะการพัฒนาของเนื้อเยื่อหรือศักยภาพของสารก่อกลายพันธุ์ (ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความเข้มข้นของสาร) นอกจากนี้ระยะเวลาที่ใช้ในการแช่สารก็มีความสำคัญเป็นอย่างมาก ที่จะส่งผลต่อความสำเร็จในการก่อกลายพันธุ์ (Khan *et al*., 2009; Gruszka *et al*., 2012) แต่ที่ความเข้มข้นของสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที พบว่าหน่อกระเจียวมีอัตราการรอดชีวิตลดลงน้อยที่สุด 73.33 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการใช้สารละลาย EMS ที่มีความเข้มข้นสูง และระยะเวลาที่นานขึ้นส่งผลให้หน่อกระเจียวมีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง (Qosim *et al*., 2015) (ตารางที่ 4.13) ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ระยะเวลา 60 นาที มีค่า LD_{50} เท่ากับ 2.61 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 120 นาที มีค่า LD_{50} เท่ากับ 1.87 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.21) อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของสารละลาย EMS สูงสุด 1 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถทำให้กระเจียวตายได้ 50 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นไปได้ว่ากระเจียวมีความทนทานต่อสารละลาย EMS สูง เป็นไปตามที่ สิรนุช ลามศรีจันทร์ (2540) กล่าวว่าพืชบางชนิดมีค่า LD_{50} สูง ทำให้สารก่อกลายพันธุ์ไม่เข้าทำลายเนื้อเยื่อของพืช ทำให้พืชบางชนิดมีการเจริญเติบโตต่อไปได้ เช่นการศึกษาของปวีณา นวมเจริญ (2541) ที่ได้นำชิ้นส่วนใบของคำฝอยมาแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.2 – 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 3 ชั่วโมง สามารถหาค่า LD_{50} ได้ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่า LD_{50} ที่ได้แตกต่างจากปทุมมาและกระเจียวที่มีพันธุกรรมแตกต่างกัน

ตารางที่ 4.13 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่ออัตราการรอดชีวิตของโคนต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ภายหลังการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) (±SE)[1/]			
		อายุ (สัปดาห์)			
		2	4	6	8
EMS (%)	0	100.00±0.00	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
	0.5	100.00±0.00	96.67±5.16a	95.00±5.47b	91.67±7.52b
	1.0	96.67±5.16	86.67±5.16b	85.00±5.47c	76.67±8.16c
F-test		ns	**	**	**
ระยะเวลา	60	98.88±3.33	95.55±7.26	95.55±7.26	92.22±10.92
(นาที)	120	98.88±3.33	93.33±7.07	91.11±7.81	86.67±12.24
F-test		ns	ns	ns	ns
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)				
0	60	100.00±0.00	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
	120	100.00±0.00	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
0.5	60	100.00±0.00	100.00±0.00a	100.00±0.00a	96.67±5.77ab
	120	100.00±0.00	93.33±5.77ab	90.00±5.77b	86.67±5.77bc
1.0	60	96.67±5.77	86.67±5.77b	86.67±5.77bc	80.00±10.00cd
	120	96.67±5.77	86.67±5.77b	83.33±5.77c	73.33±5.77d
F-test		ns	**	**	**
CV%		3.37	4.32	3.57	6.45

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 4.21 อัตราการรอดชีวิตของโคนต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

4.3.2 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้นของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory

หลังจากการแช่โคนต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ขนาด 1 เซนติเมตร ในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลาย EMS พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อและความสูงต้นมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยโคนต้นที่ได้รับสารละลาย EMS มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้นที่ลดลง ส่วนระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ และจำนวนหน่อไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ความสูงต้นมีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS พบว่าหน่อที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุดคือ 83.33 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนหน่อสูงสุด 2 หน่อ (ภาพที่ 4.22A, ตารางที่ 4.14) หน่อที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อต่ำสุด 43.33 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนหน่อต่ำสุด 1.06 หน่อ (ภาพที่ 4.22F, ตารางที่ 4.14) ความสูงของต้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกสัปดาห์ หน่อที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS (ต้นควบคุม) มีความสูงของต้นเฉลี่ยสูงสุดคือ 5.70 เซนติเมตร ในขณะที่หน่อที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที มีความสูงของต้นเฉลี่ยต่ำสุด คือ 4.33 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.22F, ตารางที่ 4.14) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Junaid *et al*. (2008) โดยนำแคลลัสของ *Dracaena sanderiana* มาแช่สารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบว่าแคลลัสที่แช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่ำ และระยะเวลาที่น้อย มีการเกิดแคลลัสมากกว่าแคลลัสที่แช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นสูง และระยะเวลานาน นอกจากนี้ Jayakumar and Selvaraj (2003) รายงานว่าเปอร์เซ็นต์การงอก การเกิดใหม่ และการเจริญเติบโตที่ลดลงเกิดจากความเสียหายของเซลล์เนื้อเยื่อเจริญ เนื่องจากสารละลาย EMS เข้าไปทำลายบริเวณเนื้อเยื่อส่วนนั้น ทำให้มีการพัฒนาการเจริญเติบโตที่ลดลง

ภาพที่ 4.22 ต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที และนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (bar = 1 เซนติเมตร)

ตารางที่ 4.14 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ (±SE)[1/]	จำนวนหน่อ (±SE)[1/]	ความสูงต้น (ซม.) (±SE)[1/]
EMS (%)	0	69.83±5.16a	1.98±0.04a	5.52±0.22a
	0.5	68.33±4.08a	1.35±0.12b	4.94±0.21b
	1.0	45.00±5.42b	1.10±0.10c	4.46±0.18c
F-test		*	**	**
ระยะเวลา	60	66.67±16.58	1.50±0.39	5.13±0.49a
(นาที)	120	55.44±18.10	1.45±0.41	4.82±0.45b
F-test		ns	ns	**
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)			
0	60	83.33±5.77a	2.00±0.00a	5.70±0.12a
	120	70.00±5.77ab	1.96±0.05a	5.35±0.13b
0.5	60	66.67±0.00ab	1.36±0.11b	5.10±0.17c
	120	56.33±5.77ab	1.33±0.15b	4.67±0.12d
1.0	60	46.67±5.77b	1.13±0.05c	4.59±0.03d
	120	43.33±5.77b	1.06±0.15c	4.33±0.19e
F-test		**	**	**
CV%		28.47	7.13	2.80

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.3.3 การทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยว ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory

นำต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที และ 120 นาที รุ่น M4 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 8 สัปดาห์ มาย้ายปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อโดยย้ายปลูกในกล่องพลาสติก ที่มีพีทมอสเป็นวัสดุปลูก จำนวน 20 ต้น โดยแบ่งเป็น 4 กล่อง กล่องละ 5 ต้น หลังจากนั้นนำไปปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไอโซเลท Si16, biovar 4, phylotype I, sequevar 30 หลังการปลูกเชื้อ เป็นเวลา 50 วัน พบว่าการใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อหรือชุดควบคุมมีการตายของต้นกระเจียวบางต้น โดยเฉพาะต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลาย EMS 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที มีอัตราการรอดชีวิต 40 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้นกระเจียวต้นอื่น ๆ ที่ได้รับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อหรือชุดควบคุม มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย 60-100 เปอร์เซ็นต์ การปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่ไม่มีการทำแผลที่ราก พบว่าต้นกระเจียวที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS ระยะเวลา 60 และ 120 นาที, ต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลาย EMS 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที และต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลาย EMS 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลาย EMS 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที มีอัตราการรอดชีวิต 60 เปอร์เซ็นต์ และต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลาย EMS 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที มีอัตราการรอดชีวิต 75 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.23, ตารางที่ 4.15) เนื่องจากต้นกระเจียวอาจมีความต้านทานต่อโรคเหี่ยวที่เกิดขึ้นในต้นอ่อนอยู่แล้ว เช่น ความหนา และความแข็งแรงของผนังเซลล์ wax ที่ปกคลุมลำต้น และผิวใบช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อราบางชนิดเข้าสู่เซลล์ต้นอ่อนได้ (Buchanan *et al*., 2000) หรือมีความต้านทานที่พืชถูกเหนี่ยวนำให้ผลิตขึ้นเพื่อป้องกันตัวเองหลังจากเชื้อก่อโรคเข้าทำลาย การปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่มีการทำแผลที่ราก พบว่าต้นกระเจียวที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS ระยะเวลา 120 นาที มีอัตราการรอดชีวิตน้อยที่สุด 37.5 เปอร์เซ็นต์ และแสดงอาการเกิดโรคมากกว่าทรีทเมนต์อื่น (ภาพที่ 4.23, ตารางที่ 4.15) เนื่องจากเชื้อจะเข้าทางบาดแผล และเจริญอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์พืช (intercellular space) แล้วปล่อยเอนไซม์ย่อยสารเพคตินของผนังเซลล์ (pectolytic enzymes) ทำให้เซลล์พืชแยกหลุดออกจากกัน เนื้อเยื่อพืชก็จะยุบตัวลง ทำให้เกิดอาการเหี่ยวเฉาและไม่สามารถรอดชีวิตได้ (Lucas, 1998) ในขณะที่ต้นกระเจียวต้นอื่น ๆ มีอัตราการรอดชีวิต 50-80 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.23, (ตารางที่ 4.15) ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าสารละลาย EMS ไม่ส่งผลต่อความต้านทานของโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* เพราะต้นที่ได้รับสารละลาย EMS บางต้นยังมีโรคเหี่ยวเกิดขึ้นเมื่อทำการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ลงไปในต้นกระเจียว

ภาพที่ 4.23 การปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ไอโซเลท Si16, biovar 4, phylotype I, sequevar 30 ในต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาในการแช่ หลังปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 50 วัน โดย (T1) ต้นควบคุม 0% 60 นาที (T2) 0.5% 60 นาที (T3) 1% 60 นาที (T4) ต้นควบคุม 0% 120 นาที (T5) 0.5% 120 นาที (T6) 1% 120 นาที

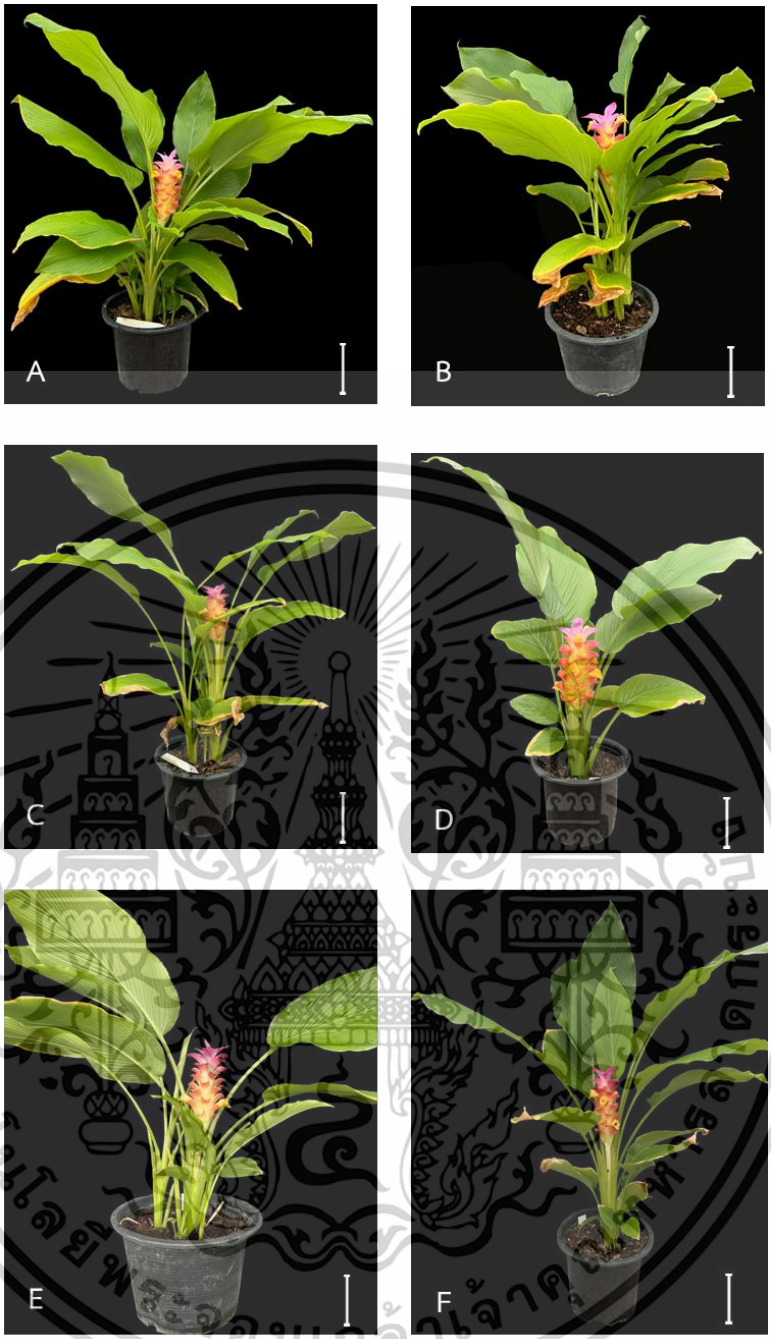
ตารางที่ 4.15 อัตราการรอดชีวิตหลังจากปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เป็นระยะเวลา 50 วัน บนต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้รับสารละลาย EMS

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)		
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)	น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)	ปลูกเชื้อโดยไม่ทำแผลที่ราก	ปลูกเชื้อโดยทำแผลที่ราก
0	60	80	100	50
	120	60	100	37.5
0.5	60	40	60	60
	120	100	100	80
1.0	60	60	100	50
	120	80	75	60

4.3.4 การย้ายปลูกกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory นอกสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที และ 120 นาที รุ่น M4 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มาย้ายปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อ ย้ายออกปลูกจำนวน 20 ต้นต่อ 1 ทรีทเมนต์ ทำได้โดยนำต้นกระเจียวที่มีราก และเจริญเติบโตประมาณ 8 สัปดาห์ในสภาพปลอดเชื้อ นำมาปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ 2-3 วัน โดยการย้ายมาเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นให้ย้ายต้นกระเจียวออกจากขวด ทำการล้างวุ้นที่ติดกับรากให้สะอาด และนำต้นกระเจียวจุ่มน้ำยากันเชื้อราประมาณ 2-3 นาที หลังจากนั้นนำมาปลูกในกล่องพลาสติกที่ใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก รดน้ำให้ชุ่ม และปิดฝากล่องพลาสติก เพื่อให้ต้นกระเจียวค่อยๆ ปรับตัว นำกล่องพลาสติกที่มีต้นกระเจียววางไว้ในที่มีแสง แต่ไม่ต้องโดนแดดเพราะจะทำให้ต้นกระเจียวที่เพิ่งย้ายมาตาย เมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์ ให้เปิดฝากล่องพลาสติก เพื่อให้ต้นกระเจียวมีอากาศถ่ายเท พอต้นกระเจียวเริ่มตั้งตัวแข็งแรงให้ย้ายปลูกในดินผสมมะพร้าวสับและแกลบ อัตราส่วน 1:1:1 เริ่มใส่ปุ๋ยสูตร 16-16-16 ในสัปดาห์ที่ 3 เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลาย EMS พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 ต้นกระเจียวทุกความเข้มข้นมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มมีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงในสัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป ส่วนระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติและเริ่มมีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงในสัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS ร่วมกัน พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป อัตราการรอดชีวิตของกระเจียวเริ่มลดลง ภายหลังจากการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นกระเจียวที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS ระยะเวลา 60 นาที มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 70 เปอร์เซ็นต์ และต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที มีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุด 55 เปอร์เซ็นต์ ทำการวัดความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก เส้นรอบวงหัวและจำนวนตุ้ม เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มของสารละลาย EMS พบว่าความสูงต้นและเส้นรอบวงดอกไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงหัวและจำนวนตุ้มมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยต้นที่ได้รับสารละลาย EMS มีความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงหัวและจำนวนตุ้มลดลง ส่วนระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซิน พบว่าความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอกและเส้นรอบวงหัวไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่จำนวนตุ้มแตกต่างกันทางสิติ โดยระยะเวลา 60 นาที จำนวนตุ้มมากกว่าระยะเวลา 120 นาที เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของสารละลายและระยะเวลาในการแช่สารร่วมกัน พบว่าทุกทรีทเมนต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยจะมีความสูงต้นเฉลี่ย 30-31 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.24A, ตารางที่ 4.17) เส้นรอบวงดอกเฉลี่ย 13-14 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.25A, ตารางที่ 4.17) และเส้นรอบวงหัวเฉลี่ย 5-6 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.26A, ตารางที่ 4.17) แต่ความยาวก้านช่อดอก และจำนวนตุ้มทุกทรีทเมนต์มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความยาวก้านช่อดอกยาวสุด 16.15 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.24A) และมีจำนวนตุ้มมากสุด 12.77 ตุ้ม (ภาพที่ 4.26A,

ตารางที่ 4.17) และทุกทรีทเมนต์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ไม่แตกต่างกัน ลักษณะของใบที่พบเป็นใบเดี่ยว (simple leaf) มีสีเขียวเข้ม ประกอบด้วยกาบใบที่ห่อรวมตัวกันแน่นเกิดเป็นลำต้นเทียม ก้านใบชูออกจากลำต้นเทียมในมุมที่ต่างกัน แผ่นใบเป็นใบเดี่ยว มีรูปร่างเป็นวงรีโคนใบมน ปลายใบแหลม เส้นใบขนานแบบเฉียงขึ้น ใบมีขนสั้นนุ่ม (ภาพที่ 4.24) ลักษณะเด่นของดอก คือดอกจริงปากกลีบดอกสีเหลือง กลีบประดับส่วนบน เรียกว่า coma bract มีสีม่วงอมชมพูอ่อน กลีบประดับส่วนล่าง เรียกว่า main bract มีสีม่วงอมชมพูเข้ม ช่อดอกที่เกิดจะเกิดจากเหง้าโดยตรง มีก้านช่อดอกดอกสั้น และช่อดอกมีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 4.25) ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง (2550) รายงานว่าสารละลาย EMS เป็นสาร alkylating agent ทำให้เกิดกลายพันธุ์แบบจุด (point mutation) โดยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอาจจะส่งผลในระดับยีน ไม่แสดงออกมาทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ไม่เปลี่ยนแปลงจากต้นควบคุม



ภาพที่ 4.24 ต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากต้นที่ได้รับสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 60 นาที (B) 0.5% 60 นาที (C) 1% 60 นาที (D) ต้นควบคุม 0% 120 นาที (E) 0.5% 120 นาที (F) 1% 120 นาที และย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน (bar = 20 เซนติเมตร)

ภาพที่ 4.25 ดอกกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากต้นที่ได้รับสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 60 นาที (B) 0.5% 60 นาที (C) 1% 60 นาที (D) ต้นควบคุม 0% 120 นาที (E) 0.5% 120 นาที (F) 1% 120 นาที และย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน (bar = 10 เซนติเมตร)

ภาพที่ 4.26 หัวกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากต้นที่ได้รับสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 60 นาที (B) 0.5% 60 นาที (C) 1% 60 นาที (D) ต้นควบคุม 0% 120 นาที (E) 0.5% 120 นาที (F) 1% 120 นาที และย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 6 เดือน (bar = 2 เซนติเมตร)

ตารางที่ 4.16 อัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) (±SE)[1/]			
		อายุ (สัปดาห์)			
		2	4	6	8
EMS (%)	0	100.00±0.00	80.00±5.47a	70.83±3.76a	69.17±4.91a
	0.5	100.00±0.00	69.16±3.76b	62.50±5.24b	60.83±6.64b
	1.0	100.00±0.00	65.83±2.04b	58.33±4.08b	56.67±4.08b
F-test		ns	**	**	**
ระยะเวลา	60	100.00±0.00	72.77±7.94	65.55±5.83	63.88±6.97a
(นาที)	120	100.00±0.00	70.55±6.82	62.22±7.54	60.55±7.68b
F-test		ns	ns	ns	ns
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)				
0	60	100.00±0.00	81.67±5.77a	71.67±2.88a	70.00±5.00a
	120	100.00±0.00	78.33±5.77a	70.00±5.00a	68.33±5.77ab
0.5	60	100.00±0.00	70.00±5.00b	65.00±5.00ab	63.33±7.63abc
	120	100.00±0.00	68.33±2.88b	60.00±5.00b	58.33±5.77bc
1.0	60	100.00±0.00	66.67±2.88b	60.00±0.00b	58.33±2.88bc
	120	100.00±0.00	65.00±0.00b	56.67±5.77b	55.00±5.00c
F-test		ns	**	**	**
CV%		0.00	5.92	6.90	8.88

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

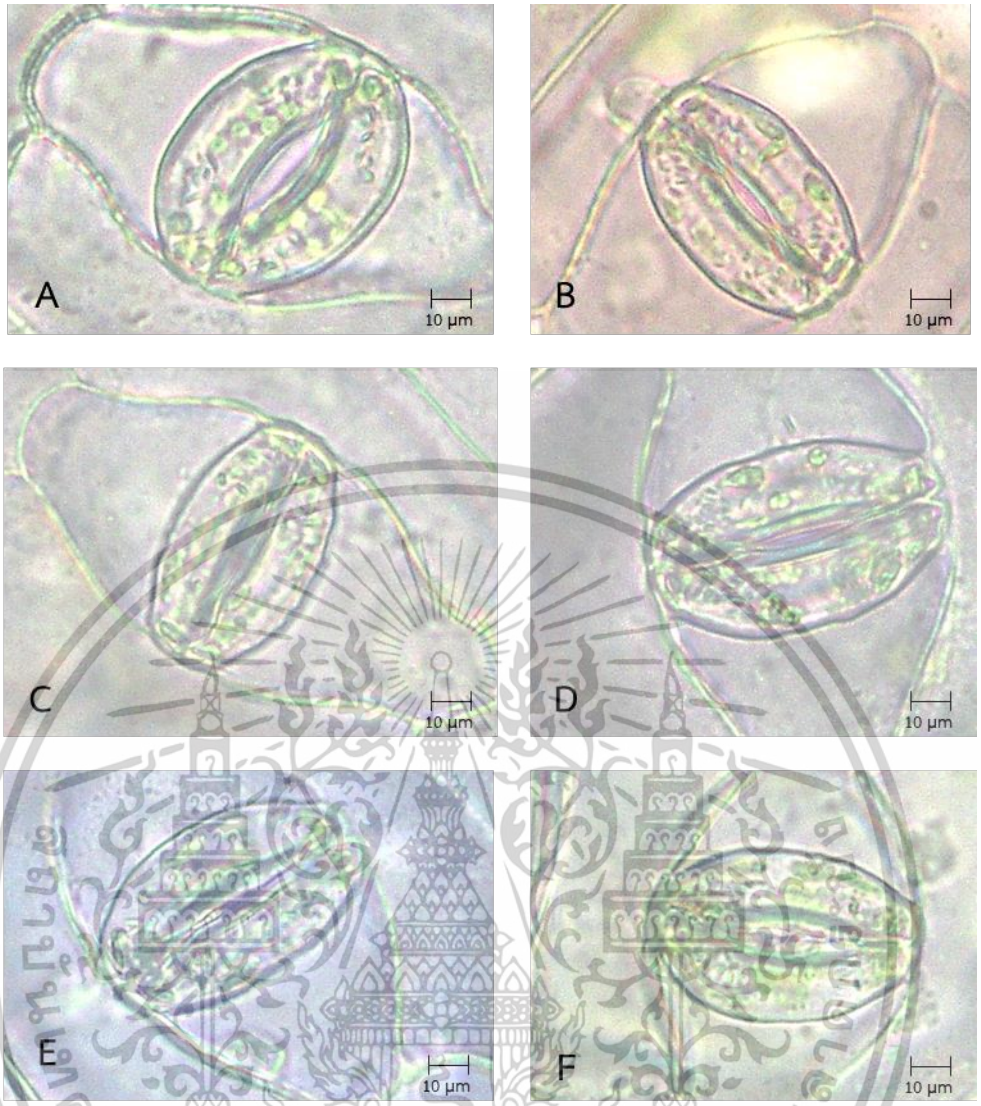
ตารางที่ 4.17 ความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน เส้นรอบวงหัว และจำนวนตุ้ม หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 6 เดือน ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		ความสูงต้น (ซม.) (±SE)[1/]	ความยาวก้านช่อดอก (±SE)[1/]	เส้นรอบวงดอก (±SE)[1/]	เส้นรอบวงหัว (±SE)[1/]	จำนวนตุ้ม (±SE)[1/]
EMS (%)	0	31.22±4.91	16.08±0.54a	14.77±0.49	6.51±0.27b	11.88±1.16a
	0.5	30.52±6.64	15.38±0.31b	14.65±0.85	6.02±0.52ab	10.97±0.36b
	1.0	30.17±4.08	15.12±0.40b	14.00±0.41	5.74±0.43b	10.73±0.46b
F-test		ns	*	ns	*	**
ระยะเวลา (นาที)	60	30.71±6.97	15.60±0.51	14.52±0.52	6.21±0.51	11.57±0.97a
	120	30.56±7.68	15.46±0.66	14.44±0.82	5.98±0.52	10.82±0.59b
F-test		ns	ns	ns	ns	**
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)					
0	60	31.35±5.00	16.15±0.50a	14.86±0.47	6.72±0.19	12.77±0.51a
	120	31.10±5.77	16.10±0.69ab	14.68±0.60	6.31±0.19	11.00±0.88b
0.5	60	30.58±7.63	15.47±0.24abc	14.77±0.47	6.14±0.31	10.98±0.49b
	120	30.46±5.77	15.30±0.40abc	14.54±1.24	5.90±0.73	10.96±0.28b
1.0	60	30.20±2.88	15.17±0.06bc	14.12±0.54	5.76±0.47	10.95±0.28b
	120	30.14±5.00	15.06±0.62c	13.94±0.34	5.72±0.49	10.50±0.55b
F-test		ns	**	ns	ns	**
CV%		2.40	3.05	4.70	7.27	4.83

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.3.5 ความกว้าง ความยาว จำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ และปริมาณรงควัตถุของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory

นำใบของต้นกระเจียวอายุ 8 สัปดาห์ที่อยู่นอกสภาพปลอดเชื้อที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที มาวัดขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS พบว่าขนาดของปากใบมีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่จำนวนคลอโรพลาสต์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS ร่วมกัน พบว่าขนาดความกว้าง และความยาวของปากใบมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยต้นกระเจียวที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS ระยะเวลา 60 นาที มีความกว้างของปากใบมากที่สุด 25.51 ไมโครเมตร ความยาวของปากใบมากที่สุด 36.82 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.27A, ตารางที่ 4.18) จำนวนคลอโรพลาสต์ต่อปากใบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนใหญ่จะมีจำนวนคลอโรพลาสต์โดยเฉลี่ยประมาณ 30 เซลล์ต่อปากใบ (ภาพที่ 4.27, ตารางที่ 4.18) นอกจากนี้ต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที มีขนาดของปากใบลดลง สิรนุช ลามศรีจันทร์ (2540) รายงานว่าสารละลาย EMS ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ ทำให้เซลล์ปากใบลดลง หรือมีขนาดใหญ่กว่าปกติ ผนังเซลล์บางส่วนเกิดความเสียหายทำให้มีโครงสร้างปากใบที่ผิดปกติ จากการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลาย EMS ร่วมกัน พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามต้นกระเจียวที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS ระยะเวลา 60 นาที มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ มากที่สุด 4.06, 2.08 และ 3.09 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.19) Kumar *et al*. (2019) รายงานว่า ในปริมาณสารก่อการกลายพันธุ์ที่สูงขึ้น ทำให้เกิดการลดลงของคลอโรฟิลล์ในการสังเคราะห์แสงอาจเกิดจากการ oxidation ของคลอโรฟิลล์ และความเสียหายของคลอโรพลาสต์ ซึ่งจะลด catabolic เอนไซม์ในใบ



ภาพที่ 4.27 ขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ของต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากต้นที่ได้รับสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (A) ต้นควบคุม 0% 60 นาที (B) 0.5% 60 นาที (C) 1% 60 นาที (D) ต้นควบคุม 0% 120 นาที (E) 0.5% 120 นาที (F) 1% 120 นาที (bar = 10 µm)

ตารางที่ 4.18 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่อขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ภายหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		ขนาดปากใบ (±SE)[1/]		จำนวนคลอโรพลาสต์/ปากใบ (±SE)[1/]
		ความกว้าง (µM)	ความยาว (µM)	
EMS (%)	0	24.77±1.02a	36.37±1.13a	30.48±0.21
	0.5	22.67±0.88b	34.61±0.60b	30.35±0.25
	1.0	21.06±0.50c	32.75±0.80c	30.15±0.14
F-test		**	**	ns
ระยะเวลา (นาที)	60	23.10±1.93a	34.84±1.78a	30.40±0.28
	120	22.57±1.61b	32.32±1.73b	30.25±0.18
F-test		**	**	ns
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)			
0	60	25.51±0.80a	36.82±1.35a	30.56±0.22
	120	24.04±0.57b	35.92±0.87ab	30.40±0.20
0.5	60	22.38±0.60cd	34.42±0.51bc	30.43±0.34
	120	22.96±1.14bc	34.80±0.73bc	30.26±0.15
1.0	60	21.41±0.33de	33.27±0.89cd	30.20±0.21
	120	20.72±0.41e	32.24±0.15d	30.10±0.05
F-test		**	**	ns
CV%		3.07	2.42	0.71

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

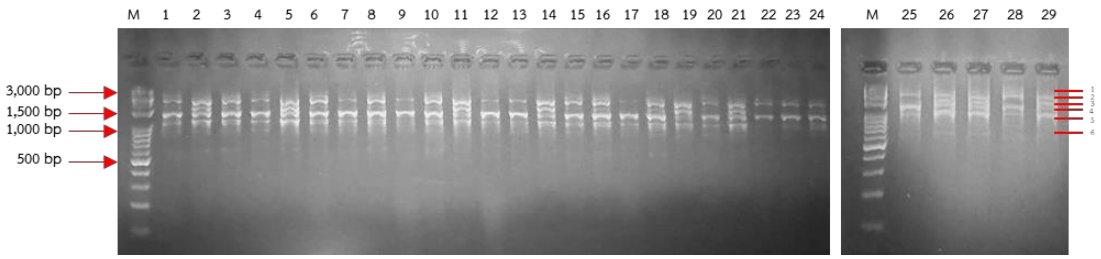
ตารางที่ 4.19 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่อปริมาณรงควัตถุของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ภายหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		ปริมาณรงควัตถุ (ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร) (±SE)[1/]		
		คลอโรฟิลล์เอ	คลอโรฟิลล์บี	แคโรทีนอยด์
EMS (%)	0	3.97±0.25	1.96±0.22	3.04±0.06
	0.5	3.96±0.46	1.79±0.22	3.08±0.33
	1.0	3.66±0.33	1.64±0.14	2.95±0.35
F-test		ns	ns	ns
ระยะเวลา	60	3.87±0.42	1.83±0.30	2.99±0.28
(นาที)	120	3.86±0.33	1.77±0.14	3.06±0.27
F-test		ns	ns	ns
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)			
0	60	4.06±0.01	2.08±0.28	3.09±0.02
	120	3.88±3.77	1.84±0.03	2.98±0.05
0.5	60	3.97±0.69	1.78±0.32	3.11±0.49
	120	3.96±0.22	1.80±0.13	3.05±0.19
1.0	60	3.76±0.23	1.62±0.11	2.87±0.17
	120	3.57±0.43	1.66±0.19	3.04±0.52
F-test		ns	ns	ns
CV%		10.13	11.49	10.32

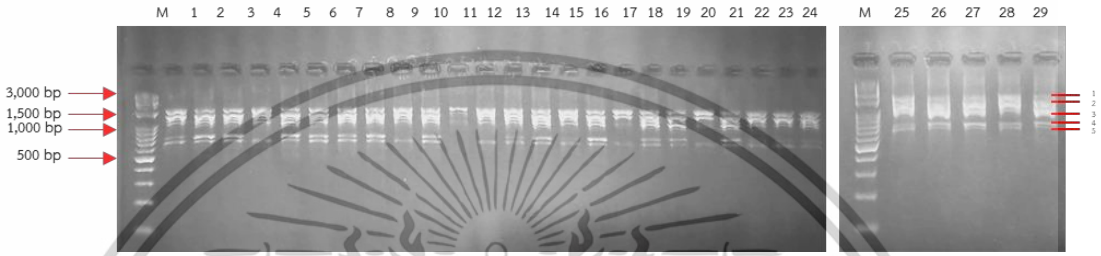
[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.3.6 การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน ด้วยเทคนิค RAPD

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกันจำนวน 29 ตัวอย่างที่มาจากทรีทเมนต์ที่ได้รับการแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที ที่ย้ายออกปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อ โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างทั้งหมดมาทดสอบด้วยความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้ไพรเมอร์ RAPD จำนวน 18 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.1) พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ 5 ไพรเมอร์ คือ OPA-10 (ภาพที่ 28), OPA-18 (ภาพที่ 29), OPAM-01 (ภาพที่ 30), OPAM-03 (ภาพที่ 31) และ OPD-02 (ภาพที่ 32) ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนจำนวน 6, 5, 3, 5 และ 7 แถบ ตามลำดับ ขนาดตั้งแต่ 1,500-3,000 คู่เบส ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 97 แถบ และให้จำนวนแถบดีเอ็นที่มีความต่าง (Polymorphism) ทั้งหมด 11 แถบ คิดเป็น 11.34 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.20) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Boonsrangsom (2020) ศึกษาความหลากหลายของ ‘ว่านชักมดลูก’ (*Curcuma comosa* Roxb.) ในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าสามารถจำแนกออกเป็น 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ ‘Wan Chak Motluk’ (I) และอีกกลุ่มคือ *Curcuma* sp. (II) และยังสามารถแบ่งกลุ่ม ‘Wan Chak Motluk’ ได้เป็น 6 กลุ่มย่อย



ภาพที่ 4.28 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-10



ภาพที่ 4.29 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-18

ภาพที่ 4.30 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPAM-01

ช่อง M = 100 bp DNA Ladder

ช่อง 1-5 = EMS 0% 60 นาที

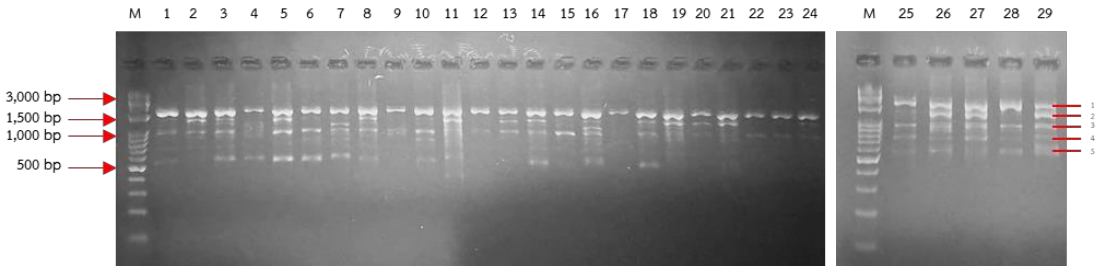
ช่อง 6, 7 = EMS 0.5% 60 นาที

ช่อง 8-10 = EMS 1% 60 นาที

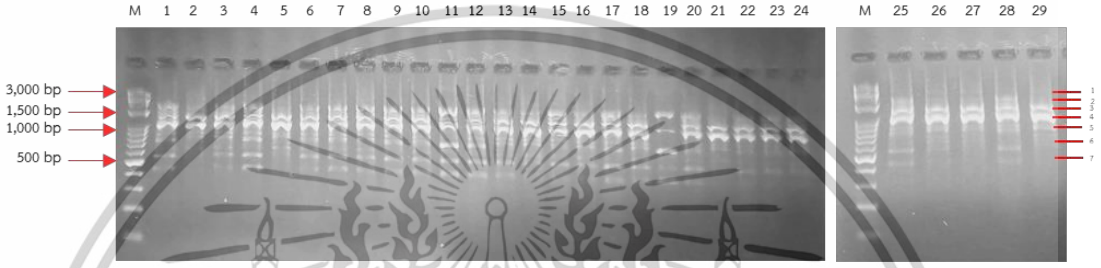
ช่อง 11-18 = EMS 0% 120 นาที

ช่อง 19-26 = EMS 0.5% 120 นาที

ช่องที่ 27-29 = EMS 1% 120 นาที



ภาพที่ 4.31 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPAM-03



ภาพที่ 4.32 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPD-02

ช่อง M = 100 bp DNA Ladder

ช่อง 1-5 = EMS 0% 60 นาที

ช่อง 6, 7 = EMS 0.5% 60 นาที

ช่อง 8-10 = EMS 1% 60 นาที

ช่อง 11-18 = EMS 0% 120 นาที

ช่อง 19-26 = EMS 0.5% 120 นาที

ช่องที่ 27-29 = EMS 1% 120 นาที

4.3.6.1 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism และค่า PICs จากแต่ละคู่ไพรเมอร์

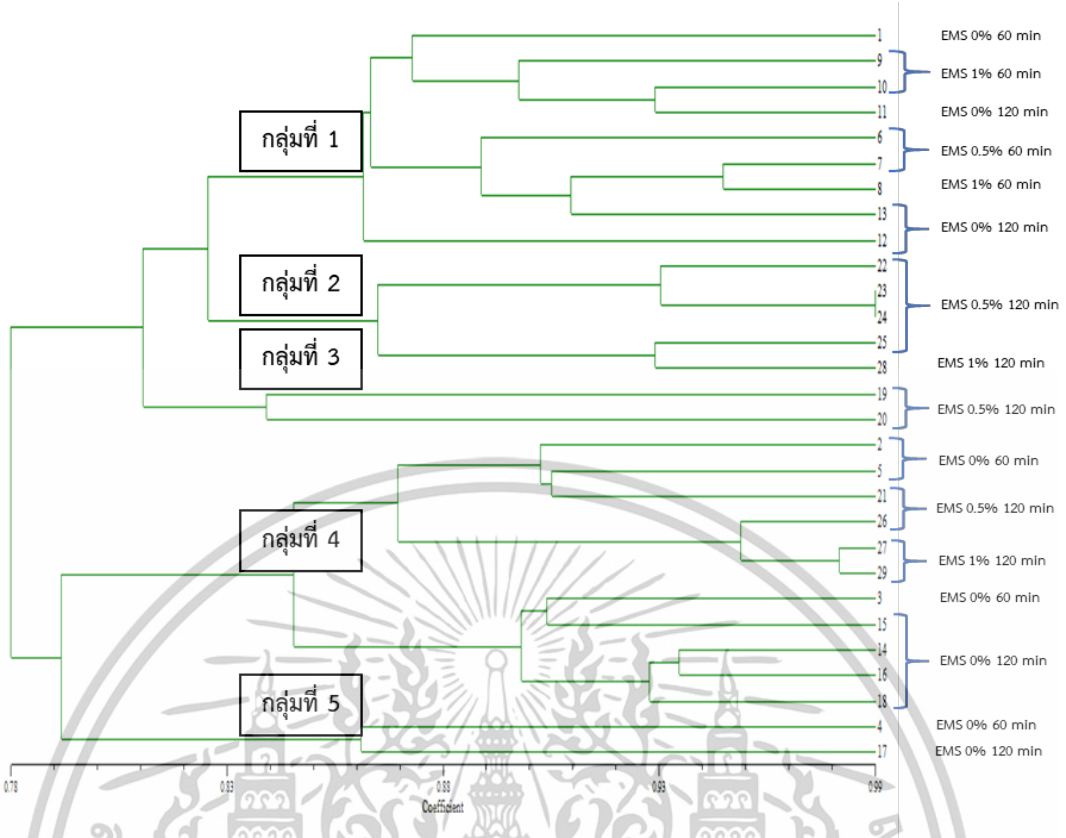
การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยเทคนิค RAPD พบไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างจำนวนทั้งหมด 5 ไพรเมอร์ และให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) โดยไพรเมอร์แต่ละตัวมีค่า PICs ดังต่อไปนี้ OPA-10 มีค่า PICs เท่ากับ 0.12, OPA-18 มีค่า PICs เท่ากับ 0.06, OPAM-01 มีค่า PICs เท่ากับ 0.16, OPAM-03 มีค่า PICs เท่ากับ 0.19 และ OPD-02 มีค่า PICs เท่ากับ 0.12 และให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.13 (ตารางที่ 4.20) ซึ่งค่า PICs ที่ได้มีประสิทธิภาพต่ำ แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่นำมาทำ RAPD มีความแตกต่างกันน้อย ตามรายงานของ Yu *et al*. (2012) PICs มีประสิทธิภาพสูงเมื่อ PICs > 0.5 PICs มีประสิทธิภาพปานกลางเมื่อ 0.25 < PICs < 0.5 และ PICs มีประสิทธิภาพต่ำเมื่อ PICs < 0.2

ตารางที่ 4.20 จำนวนแถบดีเอ็นเอจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยเทคนิค RAPD จำนวน 5 ไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism จากแต่ละไพรเมอร์

คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง	% polymorphic bands	PICs
OPA10	6	4	66.67	0.12
OPA18	5	2	40.00	0.06
OPAM01	3	1	33.33	0.16
OPAM03	5	1	20.00	0.19
OPD02	7	3	42.85	0.12
รวมทั้งหมด	26	11	202.85	0.65
เฉลี่ย	5.2	2.2	40.57	0.13

4.3.6.2 การจัดกลุ่มกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกันด้วยโปรแกรม NTSYS 2.10p

จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยนำแมทริกซ์ความเหมือนตัวแทนสัมประสิทธิ์แจคคาร์ด (Jaccard's coefficient) เพื่อจัดกลุ่มข้อมูลโดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS 2.10p สามารถจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory โดยพิจารณาจากลักษณะทางจีโนไทป์ สามารถจำแนกได้ 5 กลุ่ม (ภาพที่ 4.33) จากทั้งหมด 29 ตัวอย่างที่ย้ายปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อ และมีค่า cophenetic correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.74 แต่เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกได้ออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 มีลักษณะก้านช่อดอกสั้นช่อรูปทรงกระบอกขนาดใหญ่ มีกลีบประดับด้านบนสีชมพูเข้ม ประมาณ 1/3 ของช่อดอก กลีบประดับด้านล่างสีม่วงเข้ม ปลายกลีบประดับมีลักษณะมน และมีดอกจริงสีเหลือง (ภาพที่ 4.34A และ 4.34B) กลุ่มที่ 2 มีลักษณะก้านช่อดอกยาว ช่อรูปทรงกระบอกเรียว มีกลีบประดับด้านบนสีชมพูอ่อนประมาณ 1/3 ของช่อดอก กลีบประดับด้านล่างสีม่วงอ่อน ปลายกลีบประดับมีลักษณะมน และมีดอกจริงสีเหลือง (ภาพที่ 4.34C และ 4.34D) เนื่องจากสารละลาย EMS ทำให้เกิดการเข้าแทนที่คู่เบส โดยการที่มีหมู่เอทิลมาอยู่ในโมเลกุลของ guanine ทำให้คุณสมบัติในการเกิด ionization ที่แตกต่างไปจากปกติ จึงเกิดการจับคู่เบสที่ผิดปกติไปจากเดิมได้ สารละลาย EMS ยังทำให้เกิดการหลุดหายไปของเบสเพียวรีนจากสายดีเอ็นเอ เพราะการที่มีหมู่เอทิลเข้าไปจับอยู่ในตำแหน่งต่าง ๆ ในเบสเพียวรีน ทำให้เกิดการตัดขาดของพันธะที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลกับเบส จึงเกิดการหลุดออกไปของเบสเพียวรีนและเกิดช่องว่างขึ้น ต่อมาเมื่อเซลล์มีกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ อาจจะเกิดความผิดพลาดได้ที่เบสที่แตกต่างไปจากเดิม ซึ่งนำไปสู่การกลายพันธุ์แบบ transition และ transversion ได้ และนอกจากนี้การตัดขาดของหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาลอาจทำให้เกิดการขาดจากกันของดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายคู่ ซึ่งนำไปสู่การหลุดหายไปของส่วนดีเอ็นเอและเกิดการกลายพันธุ์ในที่สุด จึงทำให้ต้นที่ได้รับสารละลาย EMS มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS (Iaea *et al.*, 1977) เทคนิค RAPD สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Zhang *et al*., 2001; Theanphong *et al*., 2016) การประเมินความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย RAPD เป็นวิธีที่น่าเชื่อถือได้มากกว่าในการกำหนดความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และความแปรปรวนเมื่อเทียบกับการประเมินลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียว (Vanijajiva *et al*., 2005; Palai and Rout, 2007)



ภาพที่ 4.33 Phylogenetic tree ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน และนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10p โดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิค RAPD

ภาพที่ 4.34 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน (A และ B) ลำต้นและดอกกระเจียวของกลุ่มที่ 1 (C และ D) ลำต้นและดอกกระเจียวของกลุ่มที่ 2 (bar = 10 เซนติเมตร)

4.4 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

4.4.1 อัตราการรอดชีวิตของโคนต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์

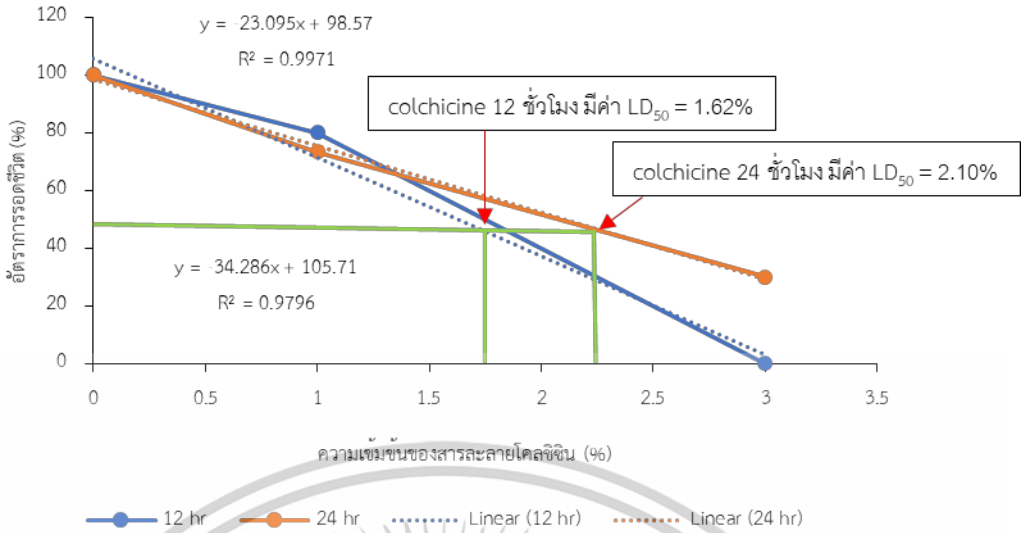
หลังจากการแช่โคนต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ขนาด 1 เซนติเมตร โดยใช้สารละลายโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน พบว่าสัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป โคนต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีอัตราการรอดชีวิตลดลง โดยเฉพาะโคนต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระยะเวลาในการแช่สาร พบว่าระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าระยะเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาความเข้มข้นร่วมกันระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซิน พบว่าโคนต้นปทุมมาที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (ต้นควบคุม) มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 2 หน่อที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตของโคนต้นปทุมมาที่ลดลง และเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป โคนต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง และพบว่าโคนต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง โคนต้นปทุมมาตายทั้งหมด แต่โคนต้นปทุมมาได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตที่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โคนต้นสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ (ตารางที่ 4.21) Takamura and Miyajima (1996) รายงานว่าการนำสารละลายโคลชิซินมาใช้ในการก่อกลายพันธุ์นั้น ต้องหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจากสารละลายโคลชิซินเป็นสารที่มีความเป็นพิษกับพืช แต่ในพืชบางชนิดความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินสูงขึ้นไม่ได้ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตลดลง เช่นงานวิจัยของ Nguyen *et al*. (2003) ศึกษาต้น Alocasia ที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าต้นที่ได้รับความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ และงานวิจัยของ ไซนีย๊ะ สะมาลา และคณะ (2558) ได้นำต้นหยาดน้ำค้างมาแช่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีค่า LD_{50} เท่ากับ 1.62 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า LD_{50} เท่ากับ 2.10 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.35)

การเพิ่มขึ้นของค่า LD_{50} จาก 1.62 เปอร์เซ็นต์ เป็น 2.10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 12 และ 24 ชั่วโมง บ่งชี้ว่าสารละลายโคลชิซินทำให้พืชมีการปรับตัวหรือมีกลไกการป้องกันบางอย่างที่ตอบสนองต่อการใช้สารในระยะเวลาที่นานขึ้น หรือสารอาจมีการสลายตัวเมื่อเวลาผ่านไป ทำให้ประสิทธิภาพของสารลดลง (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2550)

ตารางที่ 4.21 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่ออัตราการรอดชีวิตของหน่อปทุมมา พันธุ์พรพิศิษฐ์ ภายหลังการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) (±SE)[1/]			
		อายุ (สัปดาห์)			
		2	4	6	8
โคลชิซิน (%)	0	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
	1.0	100.00±0.00a	86.67±10.32b	76.67±8.16b	76.67±8.16b
	3.0	46.67±30.11b	25.00±32.86c	20.00±21.90c	15.00±16.43c
F-test		**	**	**	**
ระยะเวลา	12	73.33±14.52b	64.44±17.32b	60.00±45.82b	60.00±45.82b
(ชั่วโมง)	24	91.11±40.00a	76.67±48.76a	71.11±26.67a	67.78±31.13a
F-test		**	**	**	**
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)				
0	12	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
	24	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
1.0	12	100.00±0.00a	93.33±11.54a	80.00±0.00b	80.00±0.00b
	24	100.00±0.00a	80.00±0.00b	73.33±11.54b	73.33±11.54b
3.0	12	20.00±0.00c	0.00±0.00d	0.00±0.00d	0.00±0.00c
	24	73.33±11.54b	50.00±0.00c	50.00±0.00c	30.00±0.00d
F-test		**	**	**	**
CV%		5.73	12.04	12.04	7.37

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ



ภาพที่ 4.35 อัตราการรอดชีวิตของหน่อปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

4.4.2 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้นของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์

หลังจากการแช่โคนต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ขนาด 1 เซนติเมตร โดยใช้สารละลายโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มของสารละลายโคลชิซิน พบว่าโคนต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อลดลง และมีความสูงต้นน้อยกว่าโคนต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ส่วนระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซิน พบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้นมากกว่าโคนต้นที่แช่สารละลายโคลชิซิน 12 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินร่วมกัน พบว่าหน่อปทุมมาที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุดคือ 86.67 เปอร์เซ็นต์ จำนวนหน่อสูงสุด 2.64 หน่อ และความสูงต้นสูงสุด 5.75 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.36A, ตารางที่ 4.22) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สารที่สูงขึ้น ทำให้โคนต้นปทุมมามีการเจริญเติบโตที่ช้า โดยเฉพาะโคนต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อต่ำสุด 60.00 เปอร์เซ็นต์ จำนวนหน่อต่ำสุด 1.55 หน่อ และความสูงต้นต่ำสุด 4.47 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.36E, ตารางที่ 4.22) Murni (2010) รายงานว่าการใช้สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นสูง ระยะเวลานานทำให้เนื้อเยื่อพืชมีการเจริญเติบโตช้า และอาจทำให้เนื้อเยื่อพืชตายได้ Boonbongkarn (2013) ได้ทดลองให้สารละลายโคลชิซินในต้นแววมยุราพื้นเมืองพบว่าความสูงของต้น มีแนวโน้มลดลงเมื่อระดับความเข้มข้น และระยะเวลาที่มากขึ้น Angelo *et al*. (2014) ได้ทำการทดลองใช้สารละลายโคลชิซิน และสาร oryzalin ในต้น Hebe ‘Oratia Beauty’ พบว่าสารละลายโคลชิซินสามารถชักนำให้เกิดต้น tetraploid มีลำต้นที่หนาขึ้น และมีข้อปล้องที่หดสั้นลง

ภาพที่ 4.36 ต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ผ่านการแช่สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (bar = 1 เซนติเมตร)

ตารางที่ 4.22 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของปทุมมา พันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ (±SE)[1/]	จำนวนหน่อ (±SE)[1/]	ความสูงต้น (ซม.) (±SE)[1/]
โคลชิซิน (%)	0	85.00±5.47a	2.60±0.10a	5.52±0.27a
	1.0	73.33±5.16b	2.05±0.12b	4.88±0.27b
	3.0	60.00±0.00b	1.55±0.11c	4.47±0.10c
F-test		**	**	**
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	74.44±7.52	1.96±0.27b	5.09±0.41
	24	76.67±10.54	2.02±0.41a	5.00±0.39
F-test		ns	**	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)			
0	12	86.67±5.77a	2.64±0.11a	5.75±0.17a
	24	83.33±5.77a	2.56±0.11a	5.60±0.17b
1.0	12	76.67±5.77bc	2.16±0.11b	5.06±0.26b
	24	70.00±0.00c	1.95±0.11b	4.69±0.11c
3.0	12	-	-	-
	24	60.00±0.00d	1.55±0.11c	4.47±0.10c
F-test		**	**	**
CV%		5.93	5.48	3.20

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

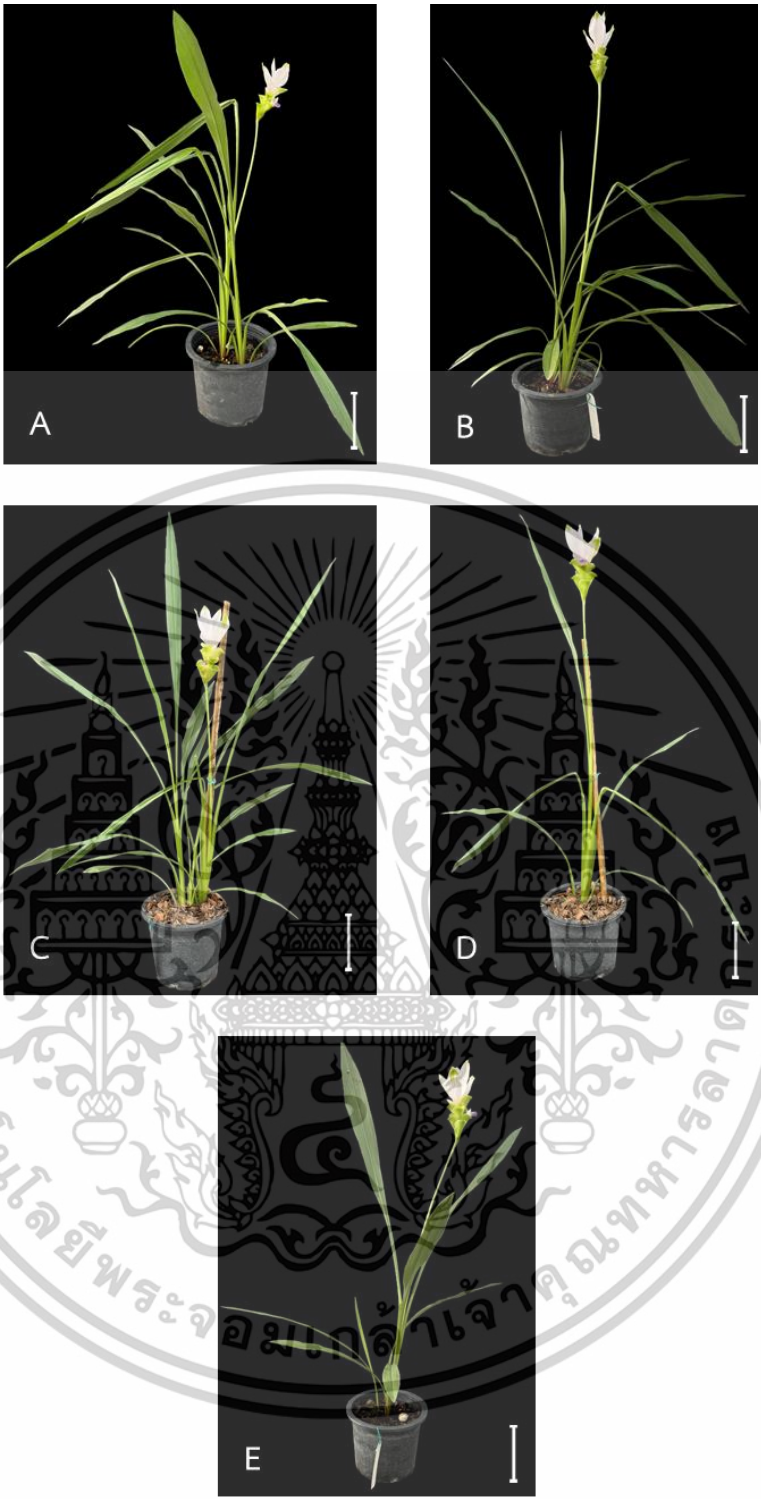
4.4.3 การทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยว ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์

นำต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ที่รอดชีวิตจากการแช่สารละลายโคลชิซิน รุ่น M4 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 8 สัปดาห์ มาย้ายปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อโดยย้ายปลูกในกล่องพลาสติก ที่มีพีทมอสเป็นวัสดุปลูก จำนวน 20 ต้น โดยแบ่งเป็น 4 กล่อง กล่องละ 5 ต้น หลังจากนั้นนำไปปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไอโซเลท Si16, biovar 4, phylotype I, sequevar 30 หลังการปลูกเชื้อ เป็นเวลา 50 วัน พบว่าต้นปทุมมาที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อหรือชุดควบคุม ต้นที่ทำแผลที่ราก และต้นที่ไม่ได้ทำแผลที่นั้นไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ แสดงอาการเหี่ยว และตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองการทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยว ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลาย EMS ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น (การทดลองที่ 4.2.3)

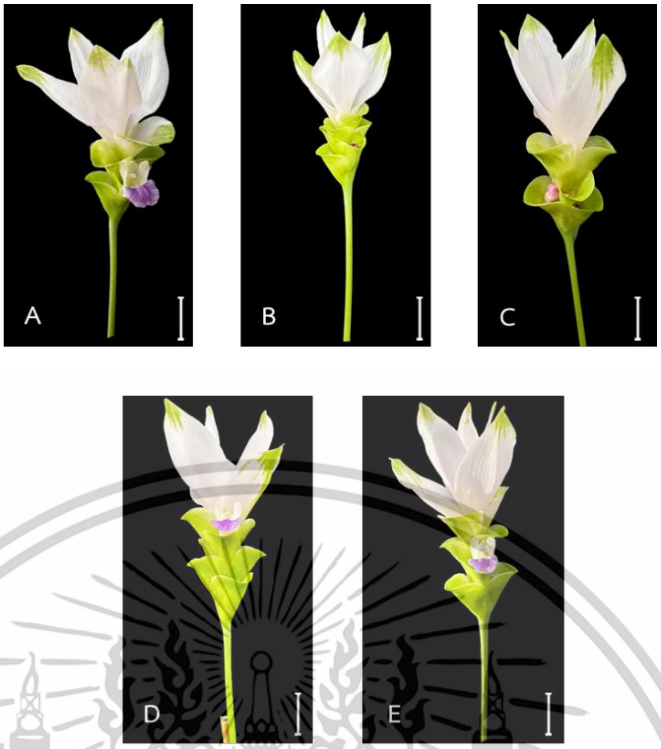
4.4.4 การย้ายปลูกปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ นอกสภาพปลอดเชื้อ

การย้ายปลูกปทุมมานอกสภาพปลอดเชื้อที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ย้ายออกปลูกจำนวน 20 ต้นต่อ 1 ทรีทเมนต์ ที่รอดชีวิตจากการแช่สารละลายโคลชิซิน รุ่น M4 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มาย้ายปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อ ย้ายออกปลูกจำนวน 20 ต้นต่อ 1 ทรีทเมนต์ ทำได้โดยนำต้นปทุมมาที่มีราก และเจริญเติบโตมีอายุ 8 สัปดาห์ในสภาพปลอดเชื้อนำมาปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ 2-3 วัน โดยการย้ายมาเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นให้ย้ายต้นปทุมมาออกจากขวด ทำการล้างวุ้นที่ติดกับรากให้สะอาด และนำต้นปทุมมาจุ่มน้ำยากันเชื้อราประมาณ 2-3 นาที หลังจากนั้นนำมาปลูกในกล่องพลาสติกที่ใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก รดน้ำให้ชุ่ม และปิดฝากล่องพลาสติก เพื่อให้ต้นปทุมมาค่อย ๆ ปรับตัว นำกล่องพลาสติกที่มีต้นปทุมมาวางไว้ในที่มีแสง แต่ไม่ต้องโดนแดดเพราะจะทำให้ต้นปทุมมาที่เพิ่งย้ายมาตาย เมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์ ให้เปิดฝากล่องพลาสติก เพื่อให้ต้นปทุมมามีอากาศถ่ายเท พอต้นปทุมมาเริ่มตั้งตัวแข็งแรงให้ย้ายปลูกในดินผสมมะพร้าวสับและแกลบ อัตราส่วน 1:1:1 เริ่มใส่ปุ๋ยสูตร 16-16-16 ในสัปดาห์ที่ 3 เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตสูงในทุกทรีทเมนต์ ส่วนเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซิน พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตสูงในทุกทรีทเมนต์เหมือนกัน เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินร่วมกัน พบว่าใน สัปดาห์ที่ 2 ทุกทรีทเมนต์มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ สัปดาห์ที่ 4 จนถึงสัปดาห์ที่ 8 ต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลาย

โคลชิซินเริ่มมีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง โดยมีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยประมาณ 91-96 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.23) ทำการวัดความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก เส้นรอบวงหัวและจำนวนตุ้ม เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน พบว่าความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก เส้นรอบวงหัวและจำนวนตุ้มไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซิน พบว่าระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก เส้นรอบวงหัวและจำนวนตุ้มไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของสารละลายและระยะเวลาในการแช่สารละลาโคลชิซินร่วมกัน พบว่าต้นปทุมมาที่ได้รับและไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ทุกระยะเวลา พบว่าความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก เส้นรอบวงหัว และจำนวนตุ้ม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความสูงต้นเฉลี่ย 61 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.37, ตาราที่ 4.24) ความยาวก้านช่อดอกเฉลี่ย 53 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.37, ตาราที่ 4.24) เส้นรอบวงดอกเฉลี่ย 12 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.38, ตาราที่ 4.24) เส้นรอบวงหัวเฉลี่ย 6 เซนติเมตร และจำนวนตุ้มเฉลี่ย 4 ตุ้ม (ภาพที่ 4.39, ตารางที่ 4.24) ทุกทรีทเมนต์ใบเป็นใบเดี่ยว (simple leaf) ใบแผ่กว้างมีขนาดใหญ่สีเขียวเข้ม แผ่นใบเรียบหนาแข็ง ใต้ใบไม่มีขน ลักษณะเด่นของดอก คือดอกจริงปากกลีบดอกจะมีสีม่วง โคนกลีบดอกสีขาว กลีบประดับส่วนบน เรียกว่า coma bract มีสีขาวปลายกลีบประดับแหลมสีเขียว กลีบประดับส่วนล่าง เรียกว่า main bract มีสีเขียวอมเหลืองในการออกดอก ช่อดอกเกิดจะเกิดจากตายอดของลำต้นเทียม ก้านช่อดอกมีลักษณะยาว (ภาพที่ 4.37) จะเห็นได้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินไม่ได้แตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (ต้นควบคุม) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วิบูลย์ ทองภูคีรีไพร และสันติ ช่างเจรจา (2557) ศึกษาผลของโคลชิซินต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณภาพของผลสับปะรด พบว่าการใช้สารโคลชิซินทุกระดับความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสับปะรด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ อนันต์ พิริยะภัทรกิจ และคณะ (2566) ได้ใช้สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 กรัมต่อลิตร โดยหยดสารละลายโคลชิซินลงบริเวณปลายยอดของต้นไทรทิสและไทรซ้อนเงินซ้อนทอง พบว่าการใช้สารละลายโคลชิซินในทุกระดับความเข้มข้นไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดย Stadler *et al*. (1989) รายงานว่าพืชแต่ละชนิดจะมีการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินแตกต่างกัน จึงทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชแสดงออกมาได้ไม่เหมือนกัน พืชบางชนิดอาจจะแตกต่างระดับเซลล์ แต่ไม่แสดงออกมาทางลักษณะทางสัณฐานวิทยา



ภาพที่ 4.37 ต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ จากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 12 ชั่วโมง (B) 1% 12 ชั่วโมง (C) ต้นควบคุม 0% 24 ชั่วโมง (D) 1% 24 ชั่วโมง (E) 3% 24 ชั่วโมง และย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน (bar = 20 เซนติเมตร)



ภาพที่ 4.38 ดอกปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ จากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 12 ชั่วโมง (B) 1% 12 ชั่วโมง (C) ต้นควบคุม 0% 24 ชั่วโมง (D) 1% 24 ชั่วโมง (E) 3% 24 ชั่วโมง และย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน (bar = 10 เซนติเมตร)

ภาพที่ 4.39 หัวปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ จากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 12 ชั่วโมง (B) 1% 12 ชั่วโมง (C) ต้นควบคุม 0% 24 ชั่วโมง (D) 1% 24 ชั่วโมง (E) 3% 24 ชั่วโมง และย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 6 เดือน (bar = 2 เซนติเมตร)

ตารางที่ 4.23 อัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) (±SE)[1/]			
		อายุ (สัปดาห์)			
		2	4	6	8
โคลชิซิน (%)	0	100.00±0.00a	100.00±0.00a	98.33±2.58a	96.67±2.58a
	1.0	100.00±0.00a	96.67±2.58b	93.33±2.58b	91.67±2.58b
	3.0	95.00±0.00b	93.33±2.88b	91.67±2.88b	90.00±54.72b
F-test		**	**	**	**
ระยะเวลา	12	97.22±50.00	96.70±2.58	95.00±3.76	93.33±3.76
(ชั่วโมง)	24	100.00±0.00	98.33±2.63	95.83±3.53	94.16±3.53
F-test		ns	ns	ns	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)				
0	12	100.00±0.00	100.00±0.00a	98.33±2.88a	96.67±2.88a
	24	100.00±0.00	100.00±0.00a	98.33±2.88a	96.67±2.88a
1.0	12	100.00±0.00	96.67±2.88ab	93.33±2.88b	91.67±2.88b
	24	100.00±0.00	96.67±2.88ab	93.33±2.88b	91.67±2.88b
3.0	12	-	-	-	-
	24	100.00±0.00	95.00±0.00c	93.33±2.88b	91.67±2.88b
F-test		ns	**	**	**
CV%		0.00	1.86	3.02	3.08

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

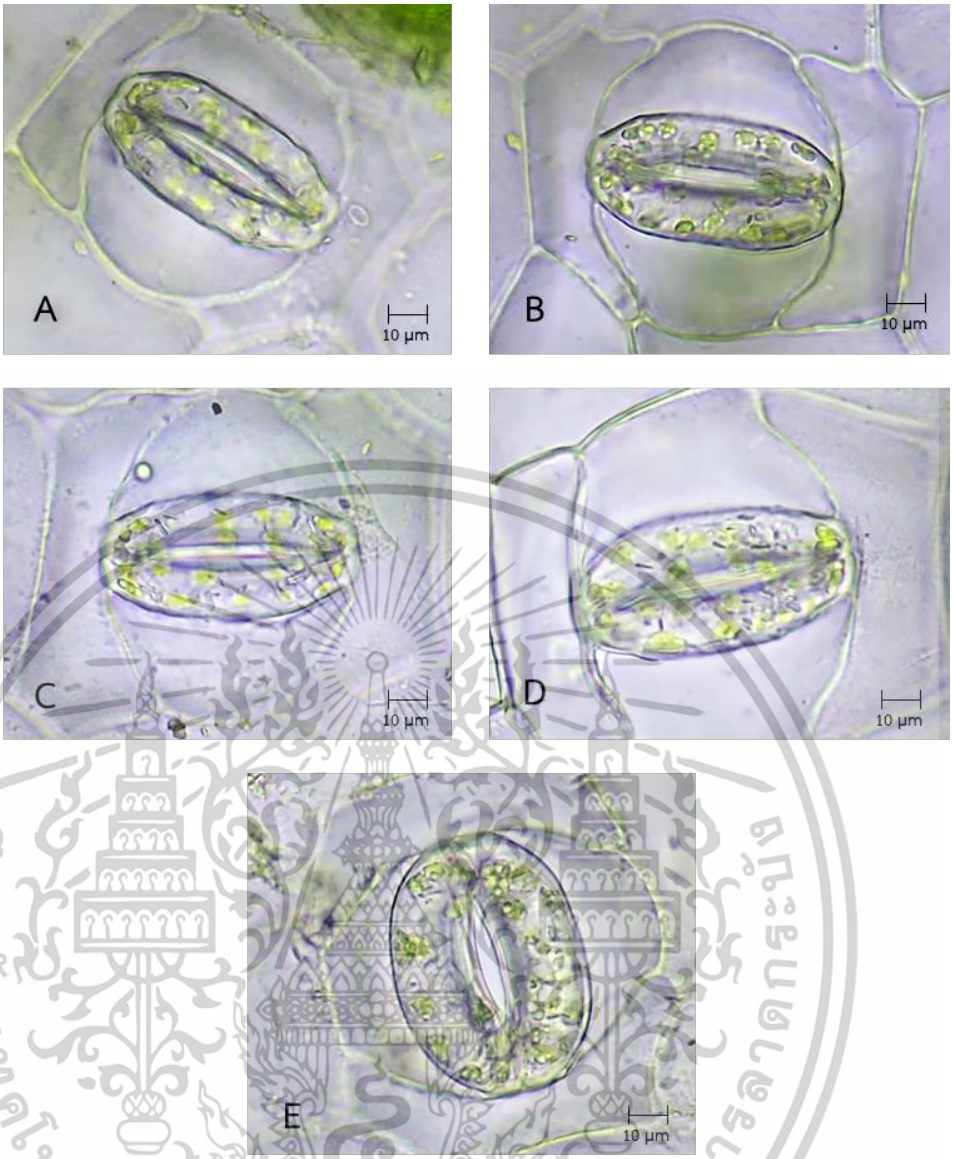
ตารางที่ 4.24 ความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน เส้นรอบวงหัว และจำนวนตุ้ม หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 6 เดือน ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		ความสูงต้น (ซม.) (±SE)[1/]	ความยาวก้านช่อดอก (±SE)[1/]	เส้นรอบวงดอก (±SE)[1/]	เส้นรอบวงหัว (±SE)[1/]	จำนวนตุ้ม (±SE)[1/]
โคลชิซิน	0	61.12±0.29	53.54±1.36	12.35±0.18	6.73±0.27	4.67±0.51
(%)	1.0	61.14±0.47	23.51±0.81	12.22±0.22	6.65±0.32	4.33±0.81
	3.0	61.05±0.34	53.43±2.22	12.01±0.58	6.30±0.25	4.33±2.73
F-test		ns	ns	ns	ns	ns
ระยะเวลา	12	61.19±0.28	53.52±1.22	12.28±0.12	6.43±0.92	4.50±2.16
(ชั่วโมง)	24	61.13±0.41	53.48±1.36	12.20±0.39	6.67±0.24	4.33±0.88
F-test		ns	ns	ns	ns	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)					
0	12	61.33±0.33	53.85±1.73	12.35±0.11	6.73±0.32	4.67±0.57
	24	61.18±0.28	53.55±1.27	12.35±0.27	6.66±0.28	4.67±0.57
1.0	12	61.16±0.27	53.53±0.84	12.23±0.11	6.66±1.28	4.33±1.00
	24	61.11±0.69	53.44±0.36	12.20±0.33	6.63±0.28	4.33±0.57
3.0	12	-	-	-	-	-
	24	61.05±0.34	53.43±2.22	12.01±0.58	6.63±0.25	4.00±1.52
F-test		ns	ns	ns	ns	ns
CV%		0.68	2.79	2.72	9.68	21.15

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.4.5 ความกว้าง ความยาว จำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ และปริมาณรงควัตถุของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์

นำใบของต้นปทุมมาอายุ 8 สัปดาห์ที่อยู่นอกสภาพปลอดเชื้อที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มาวัดขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน พบว่าต้นปทุมมาที่ได้รับสาระลายโคลชิซินมีขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์มากกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ส่วนระยะเวลาในการแช่สาร พบว่าระยะเวลา 24 ชั่วโมงมีมีขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์มากกว่าระยะเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินร่วมกัน พบว่าขนาดความกว้าง ความยาว และจำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 3 เปอร์เซ็นต์ 24 ชั่วโมง มีความกว้าง ความยาว และจำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบมากที่สุด 27.02 ไมโครเมตร, 45.29 ไมโครเมตร และ 31.22 เซลล์ต่อปากใบ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.40E, ตารางที่ 4.25) วิชชุตา รุ่งเรือง (2537) รายงานว่าการใช้สารละลายโคลชิซินให้เกิดการกลายพันธุ์ในหน้าวัว สายพันธุ์ Double spathe นั้นไม่สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้ แต่สารละลายโคลชิซินส่งผลให้ความยาวเซลล์ปากใบมีแนวโน้มที่สูงขึ้น และเซลล์ปากใบมีรูปร่างที่ผิดปกติ จากการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน พบว่าต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ลดลง ส่วนระยะเวลาในการแช่สาร พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์มีปริมาณที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินร่วมกัน พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยต้นปทุมมาที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์มากที่สุด 6.25, 2.92 และ 4.52 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ลดลง โดยเฉพาะต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ 24 ชั่วโมง มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์น้อยที่สุด 4.52, 1.79 และ 3.31 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.26) เนื่องจากสารละลายโคลชิซินมีความเป็นพิษสูงกับพืช จึงทำให้ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีปริมาณคลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ที่ลดลง (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2550) นอกจากนี้ Franck *et al.* (2004) รายงานว่า สารละลายโคลชิซินทำลายเซลล์ปากใบ ส่งผลให้การทำงานของปากใบไม่ปกติ และจำนวนชั้น palisade cell ลดลง ส่งผลให้จำนวนคลอโรพลาสต์ที่อยู่ในชั้นนี้ลดลง และปริมาณรงควัตถุลดลง ส่งผลให้กระบวนการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ลดลง



ภาพที่ 4.40 ขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ของต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (A) ต้นควบคุม 0% 12 ชั่วโมง (B) 1% 12 ชั่วโมง (C) ต้นควบคุม 0% 24 ชั่วโมง (D) 1% 24 ชั่วโมง (E) 3% 24 ชั่วโมง (bar = 10 µm)

ตารางที่ 4.25 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่อขนาดของปากใบและจำนวนคลอโรพลาสต์ ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ภายหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		ขนาดปากใบ (±SE)[1/]		จำนวนคลอโรพลาสต์/ปากใบ (±SE)[1/]
		ความกว้าง (µM)	ความยาว (µM)	
โคลชิซิน (%)	0	21.72±0.45c	42.59±1.79b	29.55±0.75b
	1.0	24.19±0.50b	44.34±0.70ab	30.27±0.64ab
	3.0	27.02±2.81a	45.29±1.34a	31.32±0.38a
F-test		**	**	**
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	22.90±2.76b	43.37±1.80ab	29.94±1.00b
	24	24.34±1.36a	44.13±1.58a	30.33±0.62a
F-test		**	**	**
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)			
0	12	21.83±0.62b	42.47±1.88c	29.67±0.88b
	24	21.60±0.28b	42.41±2.09c	29.44±0.76b
1.0	12	24.17±0.36b	44.34±0.91b	30.10±0.19ab
	24	24.20±0.71b	44.34±0.65b	30.44±0.96ab
3.0	12	-	-	-
	24	27.02±0.81a	45.29±1.43a	31.22±0.38a
F-test		**	**	**
CV%		5.66	3.35	2.33

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

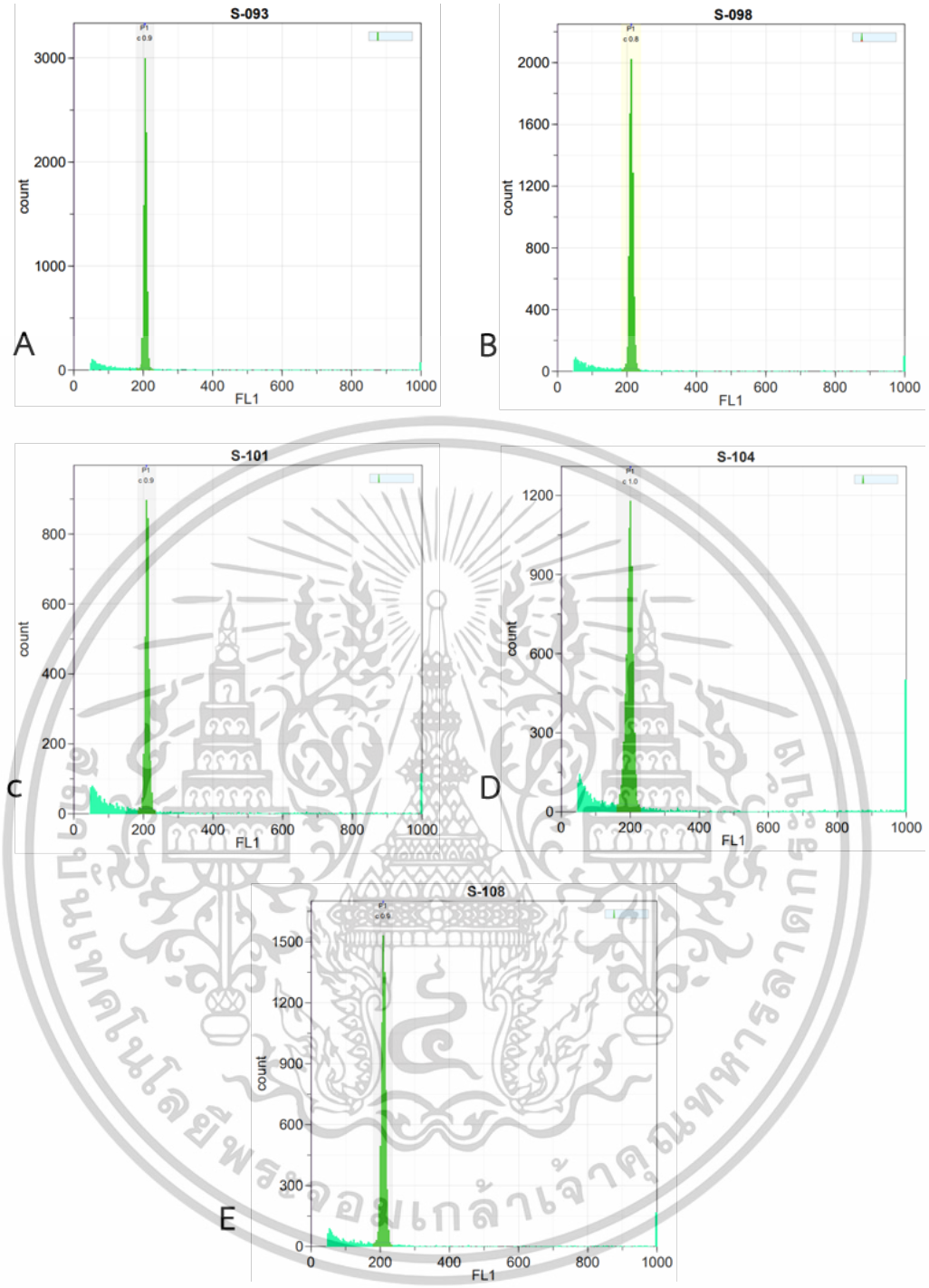
ตารางที่ 4.26 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่อปริมาณรงควัตถุของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ภายหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		ปริมาณรงควัตถุ (ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร) (±SE)[1/]		
		คลอโรฟิลล์เอ	คลอโรฟิลล์บี	แคโรทีนอยด์
โคลชิซิน (%)	0	6.22±0.46a	2.83±0.30a	4.51±0.52a
	1.0	5.29±0.21b	2.39±0.17a	4.06±0.29a
	3.0	4.52±0.54c	1.79±0.53b	3.31±0.41b
F-test		**	**	**
ระยะเวลา	12	5.34±0.84	2.37±0.54	3.97±0.66
(ชั่วโมง)	24	5.72±0.56	2.57±0.33	4.27±0.45
F-test		ns	ns	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)			
0	12	6.25±0.32a	2.92±0.26a	4.52±0.61a
	24	6.19±0.64a	2..74±0.37a	4.50±0.56a
1.0	12	5.34±0.19b	2.40±0.07ab	4.09±0.10ab
	24	5.25±0.26b	2.39±0.25ab	4.03±0.45ab
3.0	12	-	-	-
	24	4.52±0.54c	1.79±0.53b	3.31±0.41b
F-test		**	**	**
CV%		7.84	13.77	11.42

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.4.6 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ โดยใช้เครื่อง Flow cytometer

หลังจากย้ายปลูกปทุมมาที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ได้นำใบมาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer ทั้งนี้ได้นำใบต้นปทุมมาที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง อย่างละ 1 ต้น ใบต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12และ 24 ชั่วโมง อย่างละ 1 ต้น และใบต้นปทุมมาที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง 1 ต้น รวมเป็นทั้งหมด 5 ต้น เมื่อนำมาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอ โดยมีปริมาณดีเอ็นเอ เป็น diploid (2n) เหมือนเดิม (ภาพที่ 4.41) เนื่องจากระบบการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer เป็นการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอทุกเซลล์จากตัวอย่าง การเปลี่ยนแปลงขนาดปากใบ เกิดขึ้นในบางเซลล์ไม่ได้เกิดขึ้นในกลุ่มเซลล์ส่วนใหญ่ภายในต้นพืช ดังนั้นเมื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer จึงไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอ (Dolezel *et al*., 2007; Hawley, 2004) อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์ (2550) รายงานว่าการใช้สารก่อกลายพันธุ์ในบางกรณีไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากสารก่อกลายพันธุ์มีอำนาจในการทะลุทะลวงต่ำไม่สามารถทำให้ทุกเซลล์เป้าหมายเกิดการกลายพันธุ์ได้ทุกเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับพืชที่มีจำนวนเซลล์มาก



ภาพที่ 4.41 ลักษณะกราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 12 ชั่วโมง (B) 1% 12 ชั่วโมง (C) ต้นควบคุม 0% 24 ชั่วโมง (D) 1% 24 ชั่วโมง (E) 3% 24 ชั่วโมง

4.5 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

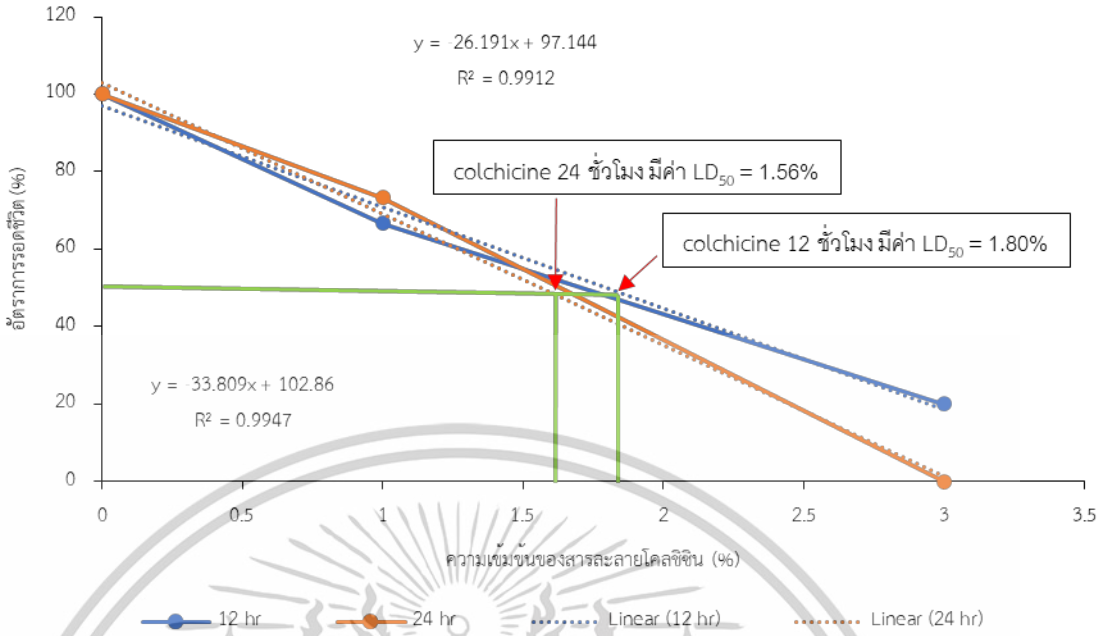
4.5.1 อัตราการรอดชีวิตของโคนต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory

หลังจากการแช่โคนต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ขนาด 1 เซนติเมตร โดยใช้สารละลายโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน พบว่าโคนต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง ส่วนระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซิน พบว่าระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในการแช่สารละลายโคลชิซินร่วมกัน พบว่าโคนต้นกระเจียวที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (ต้นควบคุม) มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 2 เป็นต้นไป โคนต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตของโคนต้นกระเจียวลดลง อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าโคนต้นกระเจียวตายทั้งหมดและไม่สามารถเจริญเติบโตไปเป็นหน่อใหม่ได้ (ตารางที่ 4.27) Nogales (2000) รายงานว่าอัตราการรอดชีวิต และอัตราการงอกใหม่ที่ลดลงเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของโคลชิซิน การแช่เนื้อเยื่อพืชที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินสูง และระยะเวลาที่นานขึ้น ส่งผลให้มีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง Sungkaew (2015) ได้ทำการทดลองให้สารละลายโคลชิซินในส่วนข้อของต้นลินเดอเนีย พบว่าความเข้มข้นที่มากขึ้นและระยะเวลาในการแช่สารที่นานขึ้นทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลงและมีจำนวนยอดลดลง ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีค่า LD_{50} เท่ากับ 1.80 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า LD_{50} เท่ากับ 1.56 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.42) อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์ (2550) รายงานว่า ค่า LD_{50} ของพืชที่ลดลงจากการได้รับสารละลายโคลชิซินนานขึ้นแสดงว่าพืชได้รับความเสียหายจึงทำให้เปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้น หรือกล่าวได้ว่าการสัมผัสสารในระยะเวลานานขึ้นส่งผลให้พืชมีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง

ตารางที่ 4.27 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่ออัตราการรอดชีวิตของหน่อกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ภายหลังการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) (±SE)[1/]			
		อายุ (สัปดาห์)			
		2	4	6	8
โคลชิซิน (%)	0	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
	1.0	96.67±8.16a	96.67±16.73a	70.00±16.73b	70.00±16.73b
	3.0	63.33±23.38b	20.00±10.95b	10.00±10.95c	10.00±10.95c
F-test		**	**	**	**
ระยะเวลา	12	91.11±20.27	73.33±45.21	62.22±36.67	62.22±36.67
(ชั่วโมง)	24	82.22±23.33	71.11±36.67	57.77±45.21	57.77±45.21
F-test		ns	ns	ns	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)				
0	12	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
	24	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
1.0	12	93.33±11.54a	93.33±11.54a	66.67±23.09b	66.67±23.09b
	24	93.33±11.54a	93.33±11.54a	73.33±11.54b	73.33±11.54b
3.0	12	53.33±11.54b	20.00±0.00b	20.00±0.00c	20.00±0.00c
	24	73.33±30.55b	20.00±0.00b	0.00±0.00d	0.00±0.00d
F-test		**	**	**	**
CV%		16.31	6.52	17.56	17.56

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 4.42 อัตราการรอดชีวิตของหน่อกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

4.5.2 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้นของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory

หลังจากการแช่โคนต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ขนาด 1 เซนติเมตร โดยใช้สารละลายโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มของสารละลายโคลชิซิน พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อและความสูงต้นลดลงเมื่อโคนต้นกระเจียวได้รับสารละลายโคลชิซิน ส่วนระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซิน พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อมีความแตกต่างกันทางสถิติ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อมากกว่าระยะเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนหน่อและความสูงต้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของระยะเวลาในการแช่สาร 12 และ 24 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารร่วมกัน พบว่าโคนต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุด 83.33 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนหน่อสูงสุด 2.16 หน่อ ความสูงของต้นเฉลี่ยสูงสุด 5.76 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.43A, ตารางที่ 4.28) อย่างไรก็ตามโคนต้นที่ได้รับสารละลายโคชิซินมีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อและความสูงต้นลดลง โดยเฉพาะโคนต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อต่ำสุด 36.67 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนหน่อต่ำสุด 1.60 หน่อ ชั่วโมง ความสูงของต้นเฉลี่ยต่ำสุด 4.46 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.43E, ตารางที่ 4.28) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sun *et al*. (2018) และ Fu *et al*. (2019) ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในต้นลิลลี่ พบว่าการใช้สารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นทำให้เมล็ดมีอัตราการงอกช้า ต้นกล้ามีการเจริญเติบโตช้า และใบมีสีเข้มกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และยังพบว่าความสามารถในการสร้างยอดโดยใช้สารละลายโคลชิซินลดลงใน *Amelanchier alnifolia* Nutt. และต้นพิทูเนียลูกผสม (Abu-Qaoud and Shtaya, 2014; Kucharska *et al*., 2022) เปอร์เซ็นต์การงอกใหม่ของยอดพิทูเนียลูกผสมลดลงเมื่อแช่สารละลายโคลชิซิน 0.025% เป็นเวลา 2 สัปดาห์ นอกจากนี้ต้นอ่อนที่งอกใหม่จากชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนั้นมีขนาดสั้นและเจริญเติบโตช้า มีใบสีเข้มผิดปกติ (Abu-Qaoud and Shtaya, 2014) และ Pinthong (2016) ได้ทำการทดลองให้สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 15 ppm เป็นระยะเวลาต่าง ๆ ในต้นแววมยุรา พบว่า เมื่อระยะเวลาเพิ่มมากขึ้นจะทำให้ความสูง และความยาวปล้องมีค่าน้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน

ภาพที่ 4.43 ต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ผ่านการแช่สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (bar = 1 เซนติเมตร)

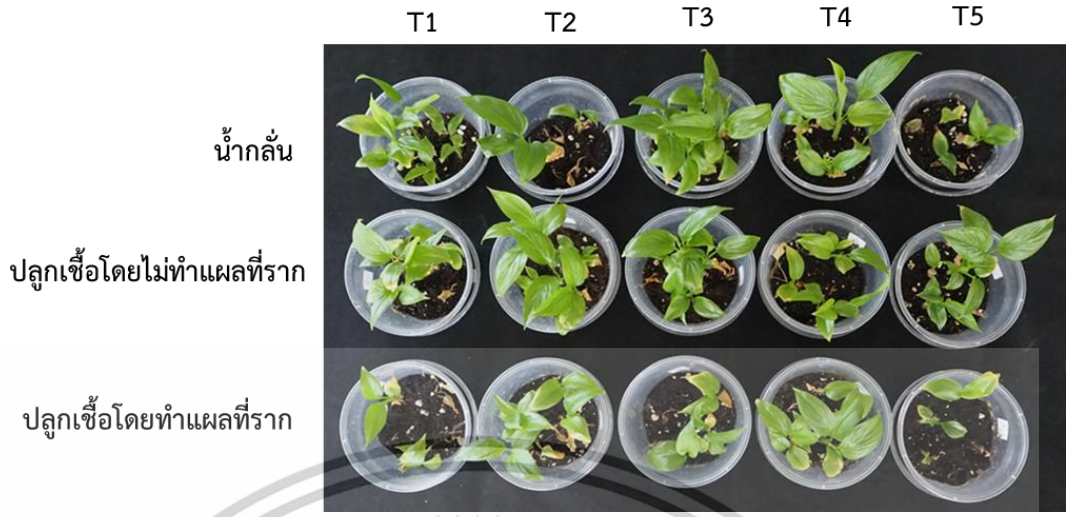
ตารางที่ 4.28 เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ จำนวนหน่อ และความสูงต้น ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		เปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อ (±SE)[1/]	จำนวนหน่อ (±SE)[1/]	ความสูงต้น (ซม.) (±SE)[1/]
โคลชิซิน (%)	0	76.67±10.32a	2.11±0.07a	5.59±0.21a
	1.0	60.00±6.32b	1.61±0.07b	4.92±0.30b
	3.0	36.67±15.27c	1.60±0.10b	4.46±0.15c
F-test		**	**	**
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	63.33±10.32b	1.83±0.26	5.05±0.42
	24	61.11±22.04a	1.80±0.28	5.13±0.58
F-test		**	ns	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)			
0	12	83.33±5.77a	2.16±0.05a	5.76±0.12a
	24	70.00±10.00b	2.06±0.05a	5.42±0.11b
1.0	12	63.33±5.77b	1.63±0.05b	5.16±0.19c
	24	56.67±5.77b	1.60±0.10b	4.67±0.14c
3.0	12	36.67±15.27c	1.60±0.10b	4.46±0.15c
	24	-	-	-
F-test		**	**	**
CV%		15.01	4.27	2.92

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.5.3 การทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยว ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory

นำต้นกระเจียวได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ที่รอดชีวิตจากการแช่สารละลายโคลชิซิน รุ่น M4 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 8 สัปดาห์ มาย้ายปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อโดยย้ายปลูกในกล่องพลาสติก ที่มีพีทมอสเป็นวัสดุปลูก จำนวน 20 ต้น โดยแบ่งเป็น 4 กล่อง กล่องละ 5 ต้น หลังจากนั้นนำไปปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ไอโซเลท Si16, biovar 4, phylotype I, sequevar 30 หลังการปลูกเชื้อครั้งแรก เป็นเวลา 50 วัน พบว่าการใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อหรือชุดควบคุม มีการตายของต้นกระเจียวบางต้น โดยเฉพาะต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตน้อยสุด 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้นกระเจียวต้นอื่น ๆ ที่ได้รับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อหรือชุดควบคุม มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย 75-100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.44, ตารางที่ 4.29) การปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยไม่ทำแผลที่ราก พบว่าต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ และต้นกระเจียวต้นอื่น ๆ ที่ไม่ได้ทำแผลที่รากมีอัตราการรอดชีวิตลดลง เฉลี่ย 60-80 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.44, ตารางที่ 4.29) การปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยทำแผลที่ราก พบว่าต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ และต้นกระเจียวต้นอื่น ๆ ที่ไม่ได้ทำแผลที่รากมีอัตราการรอดชีวิตลดลง เฉลี่ย 50-80 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.44, ตารางที่ 4.29) จะเห็นได้ว่าทั้ง 3 กรรมวิธี มีอัตราการอดชีวิตสูง โดยมีอัตราการรอดชีวิตตั้งแต่ 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป เนื่องจากต้นกระเจียวอาจมีความต้านทานต่อโรคเหี่ยวที่เกิดขึ้นในต้นอยู่แล้ว เช่น ความหนาและความแข็งแรงของผนังเซลล์ wax ที่ปกคลุมลำต้น และผิวใบช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อราบางชนิดเข้าสู่เซลล์ต้นอ่อนได้ (Buchanan *et al*., 2000) หรือมีความต้านทานที่พืชถูกเหนี่ยวนำให้ผลิตขึ้นเพื่อป้องกันตัวเองหลังจากเชื้อก่อโรคเข้าทำลาย ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าสารละลายโคลชิซินส่งผลต่อความต้านทานของโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* เพราะต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินบางต้นมีอัตราการรอดชีวิตสูงเมื่อทำการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ลงไปในต้นกระเจียว



ภาพที่ 4.44 การปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ไอโซเลท Si16, biovar 4, phylotype I, sequevar 30 ในต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่ หลังปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 50 วัน โดย (T1) ต้นควบคุม 0% 12 ชั่วโมง (T2) 1% 12 ชั่วโมง (T3) 3% 12 ชั่วโมง (T4) ต้นควบคุม 0% 24 ชั่วโมง (T5) 1% 24 ชั่วโมง

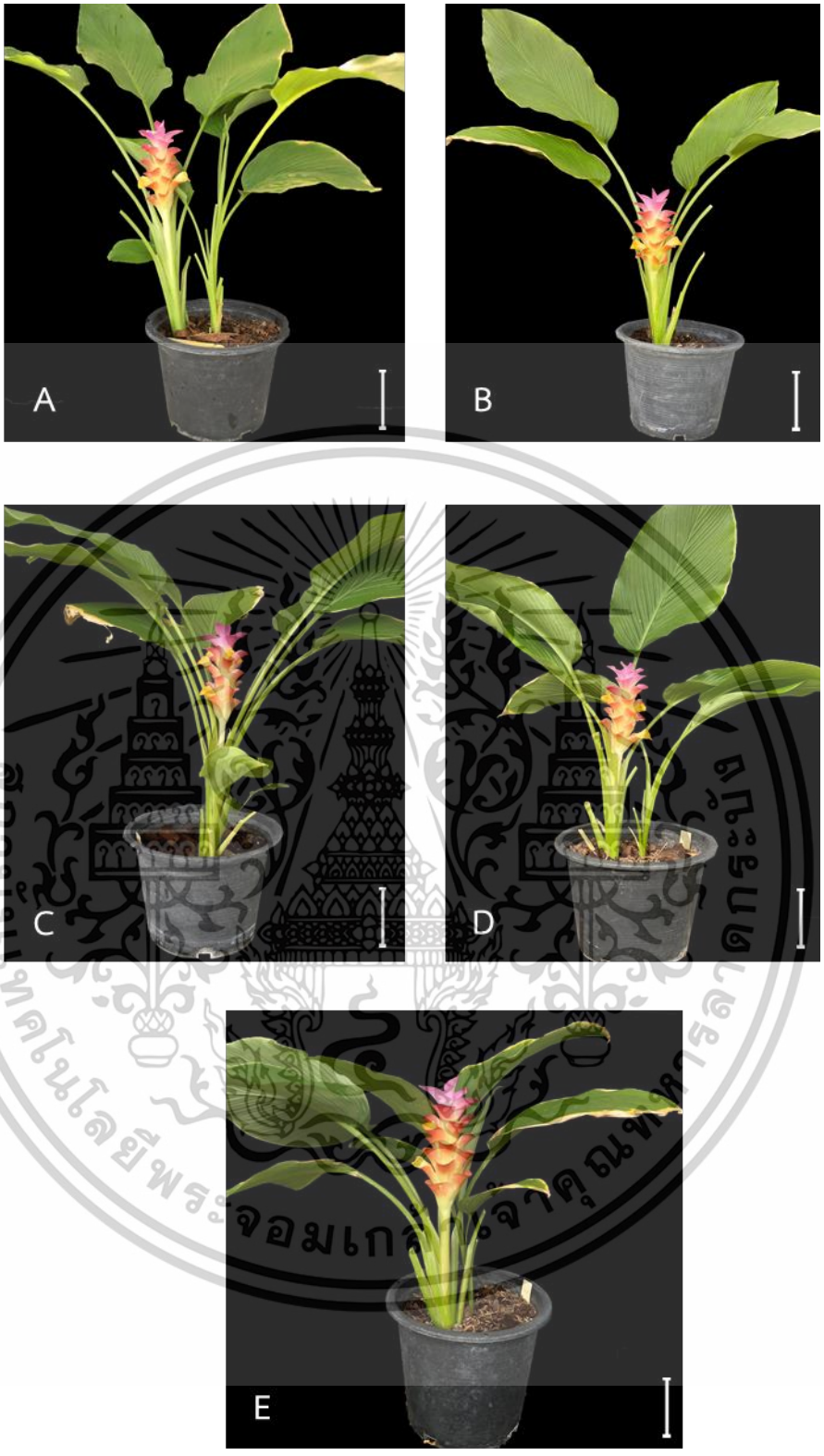
ตารางที่ 4.29 อัตราการรอดชีวิตหลังจากปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เป็นระยะเวลา 50 วัน บนต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)		
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)	ปลูกเชื้อโดยไม่ทำแผลที่ราก	ปลูกเชื้อโดยทำแผลที่ราก
0	12	100	80	50
	24	100	75	77.78
1.0	12	100	100	80
	24	75	75	60
3.0	12	50	60	50
	24	-	-	-

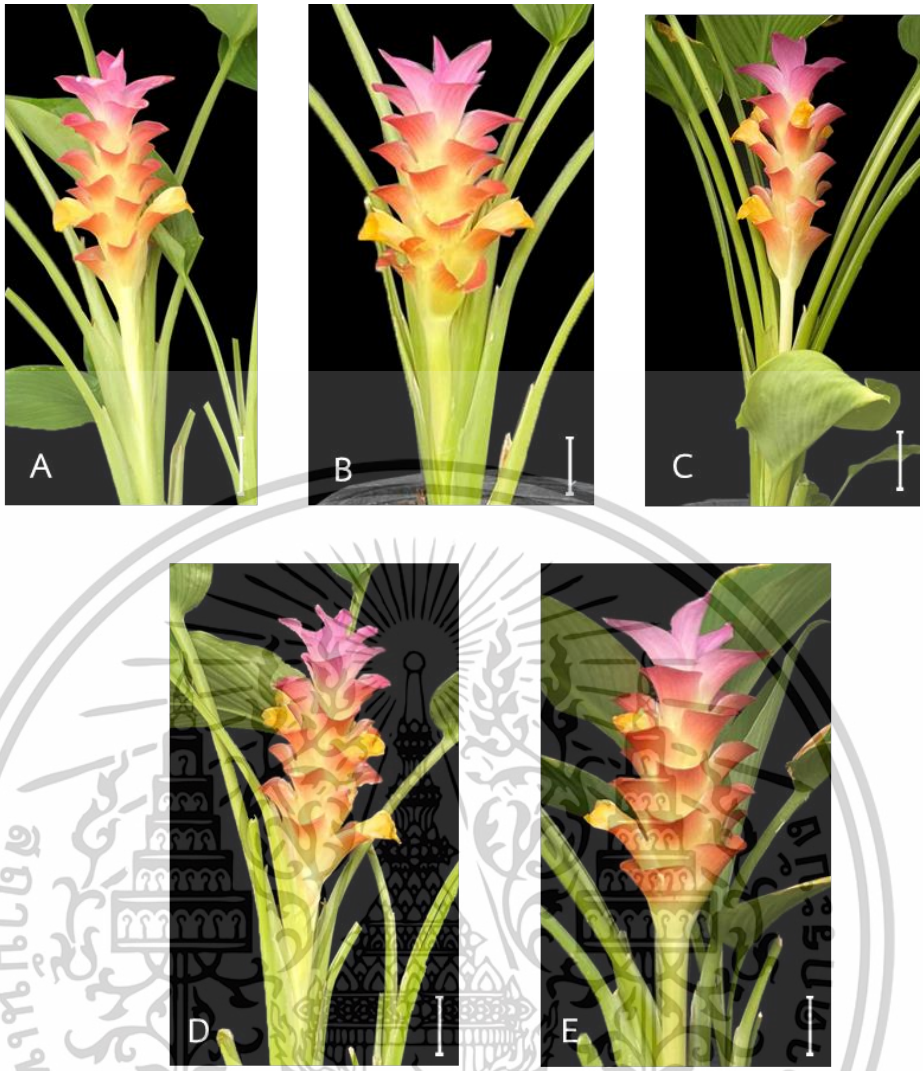
4.5.4 การย้ายปลูกกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory นอกสภาพปลอดเชื้อ

การย้ายปลูกกระเจียวนอกสภาพปลอดเชื้อที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ย้ายออกปลูกจำนวน 20 ต้นต่อ 1 ทรีทเมนต์ ที่รอดชีวิตจากการแช่สารละลายโคลชิซิน รุ่น M4 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มาย้ายออกปลูกจำนวน 20 ต้นต่อ 1 ทรีทเมนต์ ทำได้โดยนำต้นกระเจียวที่มีราก และเจริญเติบโตประมาณ 5-6 สัปดาห์ในสภาพปลอดเชื้อนำมาปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ 2-3 วัน โดยการย้ายมาเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นให้ย้ายต้นกระเจียวออกจากขวด ทำการล้างวุ้นที่ติดกับรากให้สะอาด และนำต้นกระเจียวจุ่มน้ำยากันเชื้อรา ประมาณ 2-3 นาที หลังจากนั้นนำมาปลูกในกล่องพลาสติกที่ใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก รดน้ำให้ชุ่ม และปิดฝากล่องพลาสติก เพื่อให้ต้นกระเจียวค่อย ๆ ปรับตัว นำกล่องพลาสติกที่มีต้นกระเจียววางไว้ในที่มีแสง แต่ไม่ต้องโดนแดดเพราะจะทำให้ต้นกระเจียวที่เพิ่งย้ายมาตาย เมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์ ให้เปิดฝากล่องพลาสติก เพื่อให้ต้นกระเจียวมีอากาศถ่ายเท พอต้นกระเจียวเริ่มตั้งตัวแข็งแรงให้ย้ายปลูกในดินผสมมะพร้าวสับและแกลบ อัตราส่วน 1:1:1 เริ่มใส่ปุ๋ยสูตร 16-16-16 ในสัปดาห์ที่ 3 เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน พบว่าต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงมากกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ส่วนระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซิน พบว่าระยะเวลา 12 ชั่วโมงมีอัตราการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซิน พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 อัตราการรอดชีวิตเริ่มลดลง ต้นกระเจียวที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์ ต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงโดยเฉพาะต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 3 เปอร์เซ็นต์ 12 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุด 43.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.30) ทำการวัดความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก เส้นรอบวงหัวและจำนวนตุ้ม เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน พบว่าต้นกระเจียวที่ได้รับและไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีความสูงต้นแตกต่างกันทางสถิติ แต่ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก เส้นรอบวงหัวและจำนวนตุ้มไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซิน พบว่าความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงหัวและจำนวนตุ้ม ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ความสูงต้น เส้นรอบวงดอกและเส้นรอบวงหัวระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีความสูงต้น เส้นรอบวงดอกและเส้นรอบวงหัวมากกว่าระยะเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซิน พบว่าต้นกระเจียวที่ได้รับและไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินทุกระยะเวลา พบว่าความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก เส้นรอบวงหัวและจำนวนตุ้มมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก เส้นรอบวงหัว และจำนวนตุ้มมากที่สุด

21.55 เซนติเมตร, 16.64 เซนติเมตร, 16.76 เซนติเมตร, 7.67 เซนติเมตร และ 12.57 ตุ้ม ตามลำดับ (ภาพที่ 4.45E, 4.46E และ 4.47E, ตารางที่ 4.31) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ รัชนีย์ เพ็ชร์ช้าง (2553) ศึกษาผลของโคลชิซินต่อกล้วยไม้เอื้องเงิน พบว่ากล้วยไม้ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีลักษณะลำต้นใหญ่ ใบมีสีเขียวกว่าต้นไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และงานวิจัยของศตปพร เกิดสุวรรณ และคณะ (2558) ศึกษาผลของโคลชิซินต่อการชักนำโพลีพลอยด์ในแววมยุราในหลอดทดลอง พบว่าปลายยอดที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง กลีบดอกล่างมีขนาดใหญ่ขึ้น ดอกมีสีม่วงอมชมพู สีดอกเข้มขึ้น อย่างไรก็ตามทุกทรีทเมนต์มีลักษณะของใบที่พบเป็นใบเดี่ยว (simple leaf) มีสีเขียวเข้ม ประกอบด้วยกาบใบที่ห่อรวมตัวกันแน่น เกิดเป็นลำต้นเทียม ก้านใบชูออกจากลำต้นเทียมในมุมที่ต่างกัน แผ่นใบเป็นใบเดี่ยว มีรูปร่างเป็นวงรีโคนใบมน ปลายใบแหลม เส้นใบขนานแบบเฉียงขึ้น ใบมีขนสั้นนุ่ม ลักษณะเด่นของดอก คือดอกจริงปากกลีบดอกสีเหลือง กลีบประดับส่วนบน เรียกว่า coma bract มีสีม่วงอมชมพูอ่อน กลีบประดับส่วนล่าง เรียกว่า main bract มีสีม่วงอมชมพูเข้ม ช่อดอกที่เกิดจะเกิดจากเหง้าโดยตรง มีก้านช่อดอกดอกสั้น และช่อดอกมีขนาดใหญ่ ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบในการทดลองนี้มีลักษณะเหมือนกันกับต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลาย EMS (การทดลองที่ 4.3.4)



ภาพที่ 4.45 ต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 12 ชั่วโมง (B) 1% 12 ชั่วโมง (C) 3% 12 ชั่วโมง (D) ต้นควบคุม 0% 24 ชั่วโมง (E) 1% 24 ชั่วโมง และย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน (bar = 20 เซนติเมตร)



ภาพที่ 4.46 ดอกกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 12 ชั่วโมง (B) 1% 12 ชั่วโมง (C) 3% 12 ชั่วโมง (D) ต้นควบคุม 0% 24 ชั่วโมง (E) 1% 24 ชั่วโมง และย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน (bar = 10 เซนติเมตร)

ภาพที่ 4.47 หัวกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory จากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 12 ชั่วโมง (B) 1% 12 ชั่วโมง (C) 3% 12 ชั่วโมง (D) ต้นควบคุม 0% 24 ชั่วโมง (E) 1% 24 ชั่วโมง และย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 6 เดือน (bar = 2 เซนติเมตร)

ตารางที่ 4.30 อัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) (±SE)[1/]			
		อายุ (สัปดาห์)			
		2	4	6	8
โคลชิซิน (%)	0	90.00±7.74a	78.33±5.16a	57.50±2.58a	50.83±2.04a
	1.0	78.33±4.08b	72.50±8.21a	57.50±10.83ab	52.50±10.36a
	3.0	73.33±2.88b	63.33±2.88b	46.67±12.58b	43.33±10.40b
F-test		**	**	**	**
ระยะเวลา	12	83.33±9.30	73.33±9.01	55.56±11.02	51.67±10.00
(ชั่วโมง)	24	81.11±8.93	72.50±7.58	50.83±4.91	47.50±4.18
F-test		ns	ns	ns	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)				
0	12	90.00±8.66a	78.33±5.77a	53.33±2.88b	51.67±2.88ab
	24	90.00±8.66a	78.33±5.77a	53.33±2.88b	50.00±0.00ab
1.0	12	80.00±5.00ab	78.33±7.63a	66.67±2.88a	60.00±8.66a
	24	76.67±2.88b	66.67±2.88b	48.33±5.77b	45.00±5.00b
3.0	12	73.33±2.88b	63.33±2.88b	46.67±12.58b	43.33±10.40b
	24	-	-	-	-
F-test		**	**	**	**
CV%		7.55	7.29	12.26	13.16

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

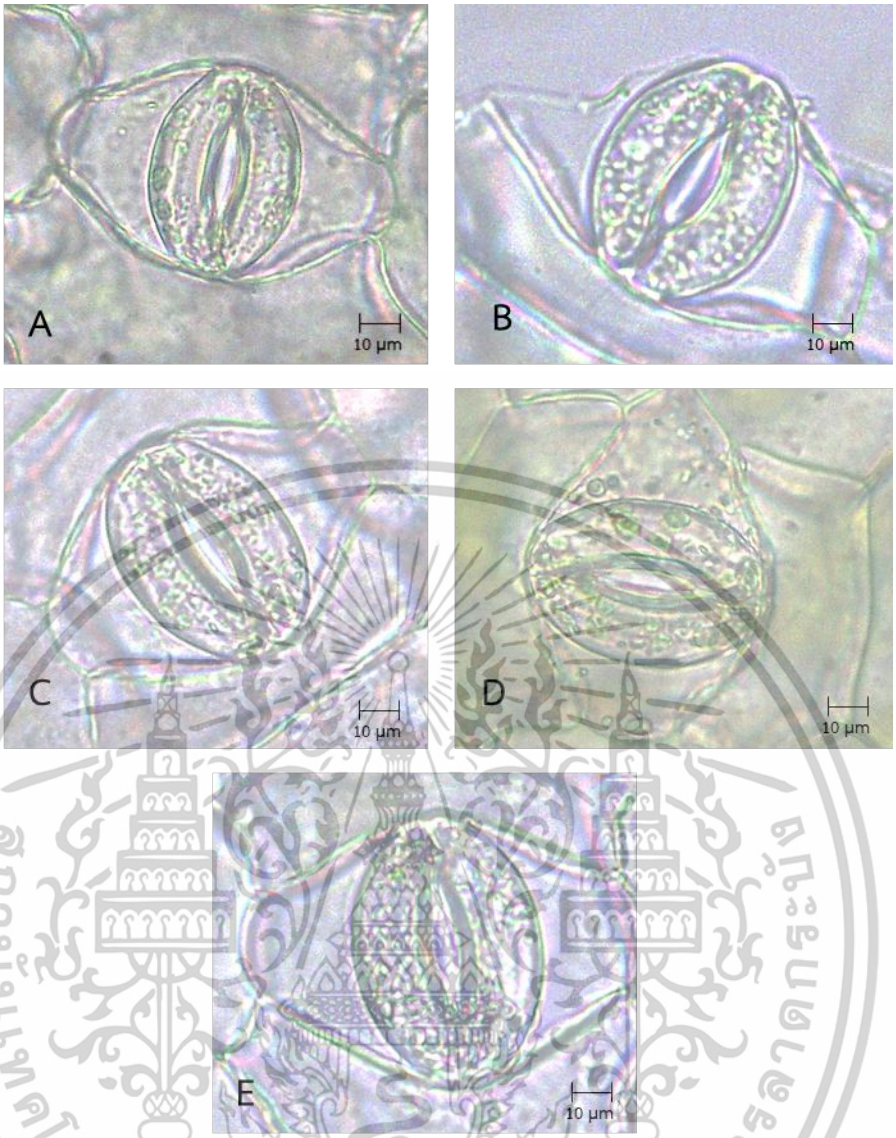
ตารางที่ 4.31 ความสูงต้น ความยาวก้านช่อดอก เส้นรอบวงดอก หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน เส้นรอบวงหัว และจำนวนตุ้ม หลังย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 6 เดือน ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		ความสูงต้น (ซม.) (±SE)[1/]	ความยาวก้านช่อดอก(±SE)[1/]	เส้นรอบวงดอก (±SE)[1/]	เส้นรอบวงหัว (±SE)[1/]	จำนวนตุ้ม (±SE)[1/]
โคลชิซิน	0	21.25±0.29a	53.54±1.33	14.61±1.55	6.49±0.40	10.36±2.20
(%)	1.0	21.05±0.76b	53.51±2.54	15.80±2.46	6.91±0.85	11.44±1.90
	3.0	20.05±0.34b	53.43±0.95	13.12±1.60	6.61±0.34	8.67±1.85
F-test		*	ns	ns	ns	ns
ระยะเวลา	12	20.64±0.73b	53.52±1.83	13.73±2.10b	7.13±0.62a	10.14±1.87
(ชั่วโมง)	24	21.36±0.30a	53.48±10.90	16.37±0.58a	6.38±0.40b	10.91±1.89
F-test		*	ns	*	**	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)					
0	12	21.33±0.33ab	13.55±1.73bc	13.23±0.14b	6.38±0.50b	10.33±1.70ab
	24	21.16±0.28ab	12.67±0.94c	13.12±0.61b	6.16±0.34b	9.27±2.39ab
1.0	12	20.55±0.82bc	15.80±1.84b	14.84±3.51ab	6.61±0.16b	11.43±1.89ab
	24	21.55±0.19a	16.64±3.49a	16.76±0.08a	7.67±0.33a	12.57±1.33a
3.0	12	20.05±0.34c	16.20±0.95ab	15.98±1.60ab	6.61±0.34b	8.67-1.85b
	24	-	-	-	-	-
F-test		*	**	*	**	*
CV%		2.16	2.79	11.83	5.35	17.88

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.5.5 ความกว้าง ความยาว จำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ และปริมาณรงควัตถุของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory

นำใบของต้นกระเจียวอายุ 8 สัปดาห์ที่อยู่นอกสภาพปลอดเชื้อที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มาวัดขนาดของปากใบและจำนวนคลอโรพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน พบว่าต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์มากกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคชิซิน ส่วนระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซิน พบว่าขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์มากกว่าระยะเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินร่วมกันพบว่าขนาดความกว้าง ความยาว และจำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 1 เปอร์เซ็นต์ 24 ชั่วโมง มีความกว้าง ความยาว และจำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบมากสุด 27.02 ไมโครเมตร, 41.82 ไมโครเมตร และ 35.24 เซลล์ต่อปากใบ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.48E, ตารางที่ 4.32) ซึ่งสอดคล้องกับ อัญญาณี จันทร์ภักดี และสมปอง เตชะโต (2553) ศึกษาการชักนำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในหน้าวัวพันธุ์ Micky Mouse โดยการใช้ nordular callus แช่ในสารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น และระยะเวลาในการจุ่มแช่สารละลายโคลชิซินที่นานขึ้น โดยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีความกว้าง ความยาวของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์เฉลี่ยสูงสุด 1.92, 1.91 ไมโครเมตร และ 39.06 เซลล์ต่อปากใบ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม เมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน พบว่าต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ลดลง ส่วนระยะเวลาในการแช่สาร พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีปริมาณปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์มากกว่าระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินร่วมกัน พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยต้นกระเจียวที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์มากสุด 3.41, 1.70 และ 2.15 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ และต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซินทุกทรีทเมนต์มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ลดลง (ตารางที่ 4.33) เป็นผลมาจาก สารละลายโคลชิซินเข้าทำลายเซลล์ปากใบ ส่งผลให้การทำงานของปากใบไม่ปกติ และจำนวนชั้น palisade cell ลดลง ส่งผลให้จำนวนคลอโรพลาสต์ที่อยู่ในชั้นนี้ลดลง และปริมาณรงควัตถุลดลง ส่งผลให้กระบวนการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ลดลง (Franck *et al.*, 2004)



ภาพที่ 4.48 ขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ของต้นกระจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (A) ต้นควบคุม 0% 12 ชั่วโมง (B) 1% 12 ชั่วโมง (C) 3% 12 ชั่วโมง (D) ต้นควบคุม 0% 24 ชั่วโมง (E) 1% 24 ชั่วโมง (bar = 10 µm)

ตารางที่ 4.32 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่อขนาดของปากใบและจำนวนคลอโรพลาสต์ ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ภายหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		ขนาดปากใบ (±SE)[1/]		จำนวนคลอโรพลาสต์/ปากใบ (±SE)[1/]
		ความกว้าง (µM)	ความยาว (µM)	
โคลชิซิน (%)	0	24.42±0.86b	33.14±1.97b	30.12±0.96b
	1.0	26.13±1.47a	37.77±4.93a	32.82±3.21b
	3.0	25.71±0.30ab	34.69±1.46ab	31.09±0.66ab
F-test		*	*	**
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	25.23±1.36	33.92±1.42b	30.55±0.66a
	24	25.55±2.76	37.37±5.52a	32.65±3.46b
F-test		ns	**	**
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)			
0	12	24.75±0.62b	33.36±1.59b	30.17±0.59b
	24	24.08±0.28b	32.92±2.66b	30.07±1.40b
1.0	12	25.23±0.36ab	33.73±1.42b	30.40±0.52b
	24	27.02±0.71a	41.82±3.11a	35.24±2.82a
3.0	12	25.71±0.81ab	34.69±1.46b	31.09±0.66a
	24	-	-	-
F-test		*	**	**
CV%		3.79	6.13	4.72

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.33 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่อปริมาณรงควัตถุของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ภายหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

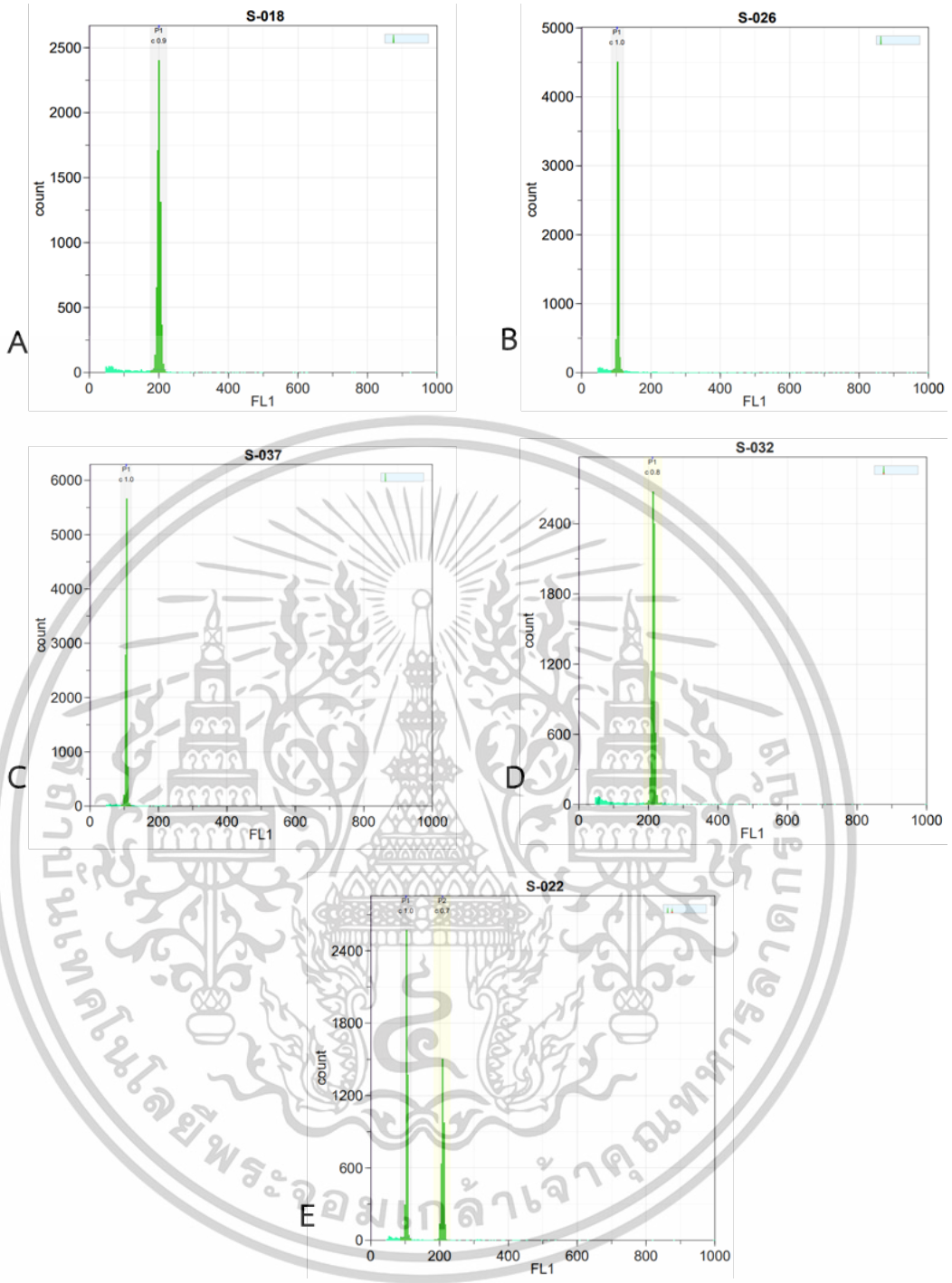
ความเข้มข้นและระยะเวลาแช่สาร		ปริมาณรงควัตถุ (ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร) (±SE)[1/]		
		คลอโรฟิลล์เอ	คลอโรฟิลล์บี	แคโรทีนอยด์
โคลชิซิน (%)	0	3.30±0.53	1.51±0.21a	1.97±0.21
	1.0	2.85±0.33	1.26±0.09b	1.64±0.16
	3.0	2.74±0.18	1.18±0.19b	1.51±0.30
F-test		ns	**	*
ระยะเวลา	12	3.03±0.50	1.39±0.26a	1.78±0.33
(ชั่วโมง)	24	2.97±1.92	1.28±0.71b	1.70±0.18
F-test		ns	**	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)			
0	12	3.41±0.77	1.70±0.05a	2.15±0.14a
	24	3.18±0.26	1.33±0.05b	1.79±0.02b
1.0	12	2.94±0.18	1.28±0.12b	1.68±0.05b
	24	2.76±0.46	1.24±0.06b	1.61±0.24b
3.0	12	2.74±0.18	1.18±0.19b	1.51±0.30b
	24	-	-	-
F-test		ns	**	*
CV%		14.50	8.66	10.78

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

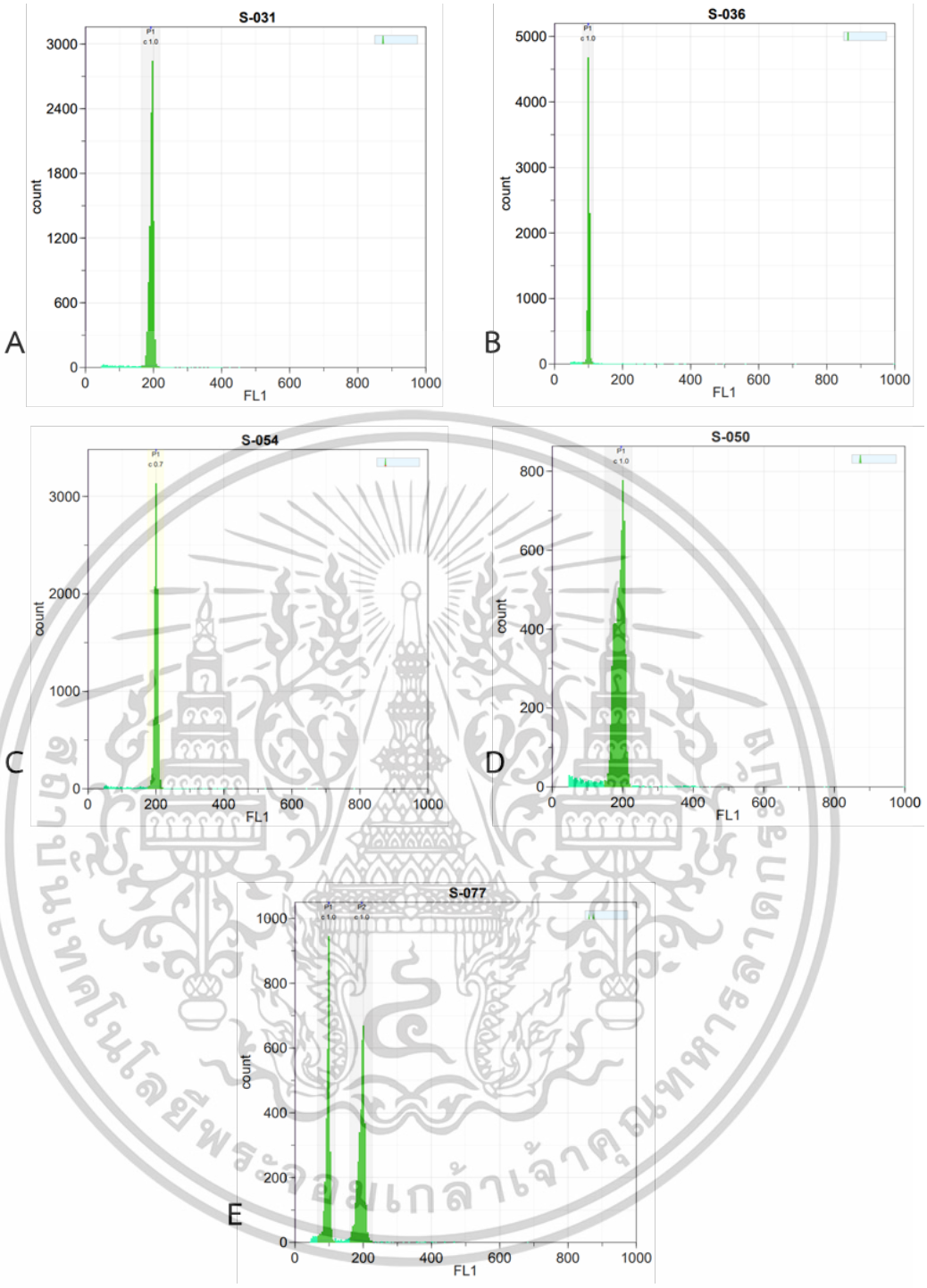
4.5.6 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer ของกระเจียวสายพันธุ์ Sweetmemory

หลังจากย้ายปลูกกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ได้นำใบมาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer ทั้งนี้ได้นำใบต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซินทุกความเข้มข้น และทุกระยะเวลามาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ โดยทำการตรวจสอบ 2 ครั้ง ในครั้งแรกสุ่มเลือกไปตรวจสอบ 5 ต้น พบว่า ต้นกระเจียวที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ต้นควบคุม) จำนวน 1 ต้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอ เป็น diploid (2n) เหมือนเดิม (ภาพที่ 4.49A) ต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง จำนวน 3 ต้น โดยต้นที่ 1 และ 2 มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอจาก diploid (2n) เป็น monoploid (n) (ภาพที่ 4.49B และ 4.49C) ต้นที่ 3 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอ เป็น diploid (2n) เหมือนเดิม (ภาพที่ 4.49D) และต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 1 เปอร์เซ็นต์ 24 ชั่วโมง จำนวน 1 ต้น มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอจาก diploid (2n) เป็น mixoploid (n, 2n) (ภาพที่ 4.49E) และนำไปตรวจครั้งที่ 2 จำนวน 15 ต้น โดยนำ 5 ต้นจากรอบแรกไปตรวจอีกครั้ง พบว่าต้นกระเจียวที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ต้นควบคุม) จำนวน 1 ต้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอ เป็น diploid (2n) เหมือนเดิม (ภาพที่ 4.50A) ต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง จำนวน 3 ต้น โดยต้นที่ 1 มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอจาก diploid (2n) เป็น monoploid (n) (ภาพที่ 4.50B) และอีก 2 ต้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอ เป็น diploid (2n) เหมือนเดิม (ภาพที่ 4.50C และ 4.50D) และต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 1 เปอร์เซ็นต์ 24 ชั่วโมง จำนวน 1 ต้น มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอจาก diploid (2n) เป็น mixoploid (n, 2n) (ภาพที่ 4.50E) และอีก 10 ต้นไปตรวจเพิ่ม โดยต้นกระเจียวที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ต้นควบคุม) จำนวน 1 ต้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอ เป็น diploid (2n) เหมือนเดิม (ภาพที่ 4.51A) ต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง จำนวน 3 ต้น มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอจาก diploid (2n) เป็น monoploid (n) (ภาพที่ 4.51B, 4.51C และ 4.51D) ต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง จำนวน 3 ต้น โดยต้นที่ 1 และ 2 มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอจาก diploid (2n) เป็น monoploid (n) (ภาพที่ 4.51E และ 4.51F) ต้นที่ 3 มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอจาก diploid (2n) เป็น mixoploid (n, 2n) (ภาพที่ 4.51G) ต้นกระเจียวที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ต้นควบคุม) จำนวน 1 ต้น มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอจาก diploid (2n) เป็น

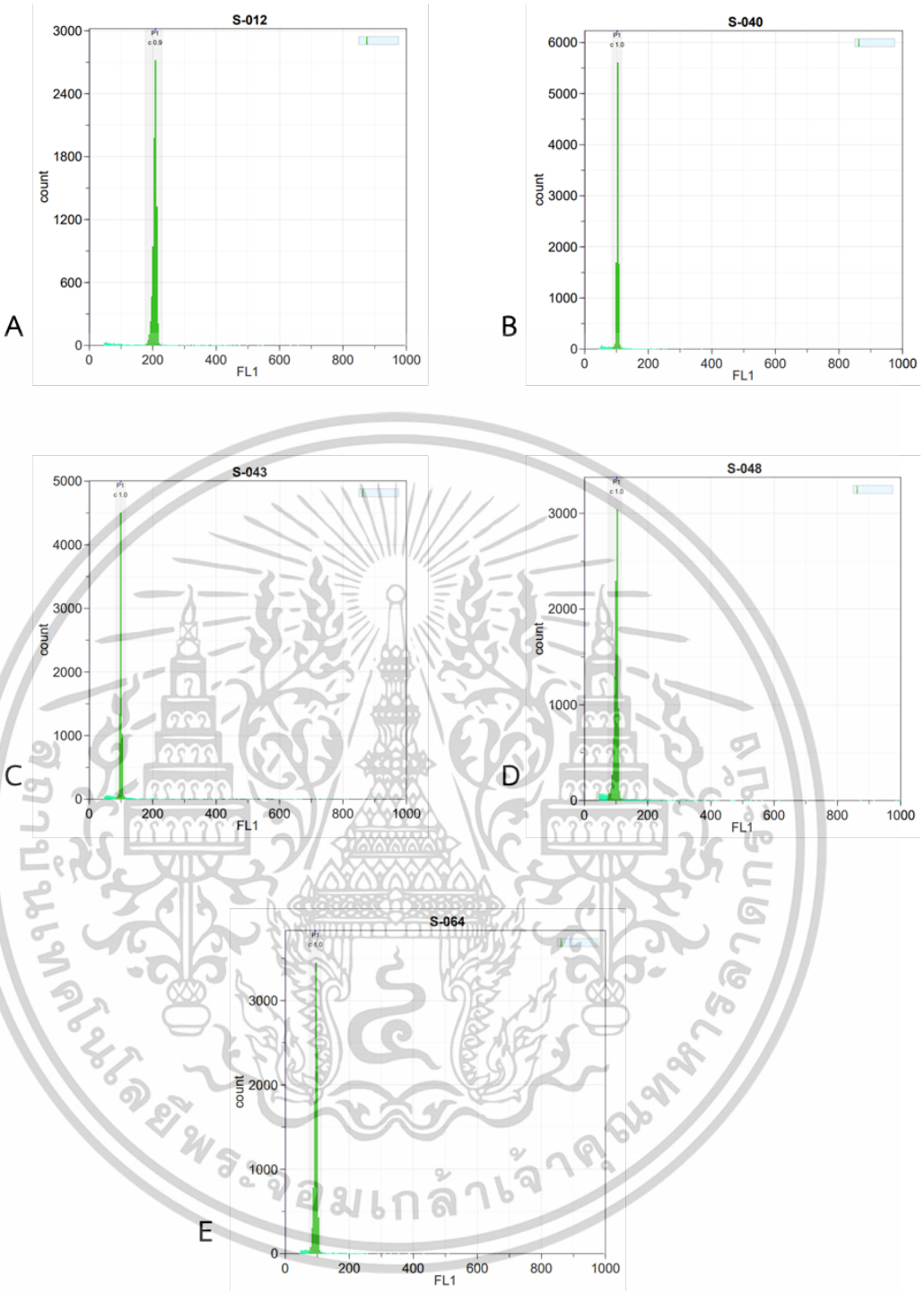
monoploid (n) (ภาพที่ 4.51H) และต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 2 ต้น ต้นที่ 1 และ 2 มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอจาก diploid (2n) เป็น monoploid (n) (ภาพที่ 4.51I และ 4.51J) จากผลการทดลองที่นำต้นกระเจียวไปตรวจสอบปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง Flow cytometer พบว่าต้นกระเจียวที่ได้รับสารละลายโคลชิซินจำนวน 12 ต้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอ เป็น diploid (2n) เหมือนเดิมจำนวน 2 ต้น มีต้นกระเจียวที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอจาก diploid (2n) เป็น monoploid (n) จำนวน 8 ต้น ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายโคลชิซินจะสลายตัวเมื่อโดนความร้อนชื้น ส่งผลให้การเพิ่มชุดโครโมโซมลดลงหรือหายไป (Zhang *et al*., 2007) ดังนั้นจึงต้องกรองด้วยกระดาษกรองมิลลิพอร์ ทำให้สะดวกในการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ แต่ในพืชบางชนิดสารละลายโคลชิซินส่งผลให้พืชเป็นหมัน มีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ และเกิดการขาดหรือแตกหักของโครโมโซมได้ (Luckett, 1989) อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้ไม่สอดคล้องกับที่ Bai *et al*. (2000) รายงานว่าสารละลายโคลชิซินมีคุณสมบัติเป็นสารที่จับกับเบต้าทูบูลิน ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พัฒนาไปเป็นไมโครทูบูล ส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล ทำให้การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสไม่มีการดึงโครโมโซมไปยังขั้วเซลล์ จึงทำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมขึ้นมา (Watson, 1977) และมีต้นกระเจียวที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอจาก diploid (2n) เป็น mixoploid (n, 2n) จำนวน 2 ต้น อาจเกิดจากความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่ที่ไม่เหมาะสม ทำให้มีผลต่อการเพิ่มจำนวนโครโมโซม (Dhooghe *et al*., 2011) นอกจากนี้ต้นกระเจียวที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 1 ต้น มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอจาก diploid (2n) เป็น monoploid (n) เนื่องจากขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้มีการใช้ดอกอ่อนมาชักนำให้เกิดต้น จึงสันนิษฐานว่าเป็นที่ดอกอ่อน เพราะส่วนต่าง ๆ ของดอกมีโครโมโซม 2 ชุด (diploid = 2n) เสมอเมื่อถึงระยะสืบพันธุ์เซลล์บางเซลล์จะแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (miosis) เพื่อลดโครโมโซมลงครึ่งหนึ่งเหลือชุดเดียว (haploid = n) เซลล์ที่ได้จะมีการพัฒนาไปเป็นเซลล์เพศต่อไป (Sundaresan and Alandete-SaeZ, 2010)



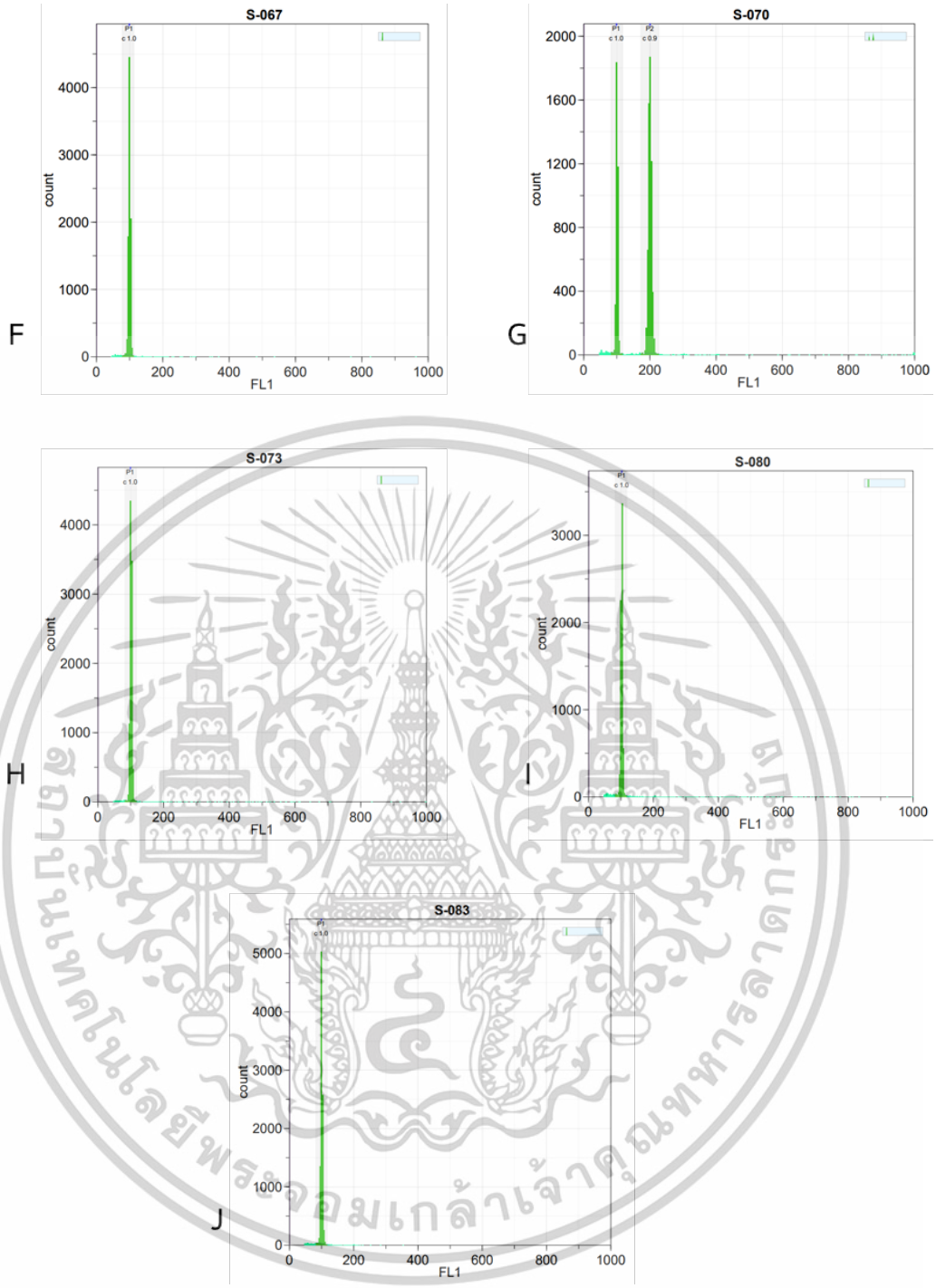
ภาพที่ 4.49 ลักษณะกราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 12 ชั่วโมง (B) 1% 12 ชั่วโมง (C) 1% 12 ชั่วโมง (D) 1% 12 ชั่วโมง (E) 1% 24 ชั่วโมง (Flow cytometer รอบ 1)



ภาพที่ 4.50 ลักษณะกราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 12 ชั่วโมง (B) 1% 12 ชั่วโมง (C) 1% 12 ชั่วโมง (D) 1% 12 ชั่วโมง (E) 1% 24 ชั่วโมง (Flow cytometer รอบ 2)



ภาพที่ 4.51 ลักษณะกราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 12 ชั่วโมง (B) 1% 12 ชั่วโมง (C) 1% 12 ชั่วโมง (D) 1% 12 ชั่วโมง (E) 3% 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.51 ลักษณะกราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่สาร (F) 3% 12 ชั่วโมง (G) 3% 12 ชั่วโมง (H) ต้นควบคุม 0% 0 24 ชั่วโมง (I) 1% 24 ชั่วโมง (J) 1% 24 ชั่วโมง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 ผลของ NAA และ BA ต่อการเจริญเติบโตของดอกอ่อนปทุมมา 3 สายพันธุ์ และดอกอ่อนกระเจียว 2 สายพันธุ์

ดอกอ่อนของปทุมมา สายพันธุ์ยูคิที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ดอกอ่อนของปทุมมา สายพันธุ์เบอร์กันดี้ และพรพิศิษฐ์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดมากที่สุด ดอกอ่อนของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory และบ้านไร่เรด โดยได้นำช่อดอกอ่อนแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือด้านบน และด้านล่าง พบว่าดอกอ่อนด้านล่างมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าด้านบน ดอกอ่อนของกระเจียวสายพันธุ์ Sweetmemory ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดมากที่สุด และดอกอ่อนของกระเจียวสายพันธุ์บ้านไร่เรด ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดมากที่สุด

5.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ โดยใช้สารละลาย EMS

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ โดยการนำโคนต้นปทุมมามาแช่ในสารละลาย EMS ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น 2 ระยะเวลา พบว่าโคนต้นปทุมมาที่แช่ในสารละลาย EMS ระยะเวลา 60 นาที มีค่า LD_{50} เท่ากับ 0.85 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 120 นาที มีค่า LD_{50} เท่ากับ 0.57 เปอร์เซ็นต์ โคนต้นควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุด โคนต้นที่ได้รับสารละลาย EMS มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อลดลง เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยว ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* พบว่าต้นปทุมมาตายทั้งหมด ขนาดของปากใบ จำนวนคลอโรพลาสต์ และปริมาณรงควัตถุไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อนำไปศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม ด้วยเทคนิค RAPD มี 9 ไพรเมอร์ที่สามารถให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ และสามารถจัดกลุ่มปทุมมาตามจีโนไทป์ได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน

5.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory โดยใช้สารละลาย EMS

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory โดยการนำโคนต้นกระเจียวมาแช่ในสารละลาย EMS ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น 2 ระยะเวลา พบว่าโคนต้นกระเจียวที่แช่ในสารละลาย EMS ระยะเวลา 60 นาที มีค่า LD_{50} เท่ากับ 2.61 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 120 นาที มีค่า LD_{50} เท่ากับ 1.87 เปอร์เซ็นต์ โคนต้นควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุด โคนต้นที่ได้รับสารละลาย EMS มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อลดลง เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยว ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เมื่อเปรียบเทียบกับปทุมมา พบว่ากระเจียวมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าปทุมมา แต่ไม่สามารถต้านทานโรคได้ เพราะต้นที่ได้รับสารละลาย EMS บางต้นยังคงแสดงอาการของโรค และเมื่อนำไปศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD มี 5 ไพรเมอร์ที่สามารถให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ และสามารถจัดกลุ่มกระเจียวตามจีโนไทป์ได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน 2 กลุ่ม

5.4 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของปทุมมา สายพันธุ์พรพิศิษฐ์ โดยการนำโคนต้นปทุมมามาแช่ในสารละลายโคลชิซิน ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น 2 ระยะเวลา พบว่าโคนต้นปทุมมาที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีค่า LD_{50} เท่ากับ 1.62 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า LD_{50} เท่ากับ 2.10 เปอร์เซ็นต์ ต้นควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุดสูงสุด โคนต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อลดลง เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยว ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* พบว่าต้นปทุมมาตายทั้งหมด ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์มากที่สุด แต่เมื่อนำไปตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer ไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอเป็น diploid (2n) เหมือนเดิม และทุกทรีทเมนต์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ไม่เปลี่ยนแปลง

5.5 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory โดยการนำโคนต้นกระเจียว มาแช่ในสารละลายโคลชิซิน ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น 2 ระยะเวลา พบว่าโคนต้นกระเจียว

ที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีค่า LD_{50} เท่ากับ 1.80 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า LD_{50} เท่ากับ 1.56 เปอร์เซ็นต์ ต้นควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อสูงสุด โคนต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหน่อลดลง เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยว ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เมื่อเปรียบเทียบกับปทุมมา พบว่ากระเจียวมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าปทุมมา แต่ไม่สามารถต้านทานโรคได้ เพราะต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินบางต้นยังคงแสดงอาการของโรค ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์มากที่สุด และเมื่อนำไปตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer จำนวน 15 ต้น พบต้น diploid (2n) 4 ต้น monoploid (n) 9 ต้น และต้น mixoploid (n, 2n) 2 ต้น แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่เปลี่ยนแปลง

5.6 ข้อเสนอแนะ

5.6.1 การใช้สารละลาย EMS และสารละลายโคลชิซินเพื่อเพิ่มความหลากหลายให้กับปทุมมาและกระเจียว จากผลการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงทางจีโนไทป์ แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่มีการเปลี่ยนแปลง แนะนำให้ลองศึกษาการใช้สารก่อกลายพันธุ์ชนิดอื่น ๆ ในกลุ่มเดียวกันกับที่ใช้ในการทดลองนี้ เช่น Diethyl sulphate (dES), Ethyleneimine (EI), Oryzalin เป็นต้น

5.6.2 จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าต้นกระเจียว สายพันธุ์ Sweetmemory เป็นกระเจียวลูกผสมที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอจาก diploid (2n) เป็น monoploid (n) ซึ่งไม่ทราบแน่ชัดว่าต้นพ่อพันธุ์ แม่พันธุ์ มีปริมาณดีเอ็นเอเป็นอย่างไร ควรศึกษาก่อนทำการปรับปรุงพันธุ์

บรรณานุกรม

กรณ์ กรภัทร์ชัยกุล, ศักดิ์ชัย กรรมารางกูร และจีรนันท์ กล่อมนรา แก้วรักษา. 2560. การเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของขมิ้นชันในหลอดทดลอง. **วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา**. 22(1): หน้า 1-13.

กรมวิชาการเกษตร 2559. หนังสือรับรองพันธุ์พืชจำนวน 14 พันธุ์ ให้เป็นพันธุ์พืชขึ้นทะเบียน. [Online]. Available: https://www.doa.go.th/pvp/wpcontent/uploads/2019/11/AnnoDOA_Public110.pdf.

กาญจนา วิชิตตระกูลถาวร. 2542. **การควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค**. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

กิ่งกาญจน์ คำลือ. 2555. **อาหารอย่างง่ายสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหัวหอมใหญ่.** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการสอนชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จันทบูร. **วารสารเกษตร**. 24(2): หน้า 153-164.

จันทร์เพ็ญ ใจชื่อ. 2563. **การประเมินเสถียรภาพทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes mirabilis)* ที่ขยายพันธุ์ในหลอดทดลองโดยใช้เทคนิคโมเลกุล และสัณฐานวิทยา**. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จีรวัฒน์ ภู่บัวเผื่อน. 2535. **การเจริญเติบโต และการพัฒนาดอกของปทุมมา.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์. 2543. **สถิติพื้นฐาน (ฉบับปรับปรุง ครั้งที่ 5)**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ชานนท์ ลาภจิตร และเมิง-เจียว เจิง. 2560. ประสิทธิภาพในการกลายพันธุ์ และผลของ Ethyl methanesulphonate (EMS) ต่อกล้วยไม้ *Erycina pusilla*. **วารสารแก่นเกษตร**. 45(พิเศษ): 386-391.

ไซนีย๊ะ สะมาลา นูรมา มาสากี และ นอร์รีซา ปอ. 2557. ผลของเอทิลมีเทนซัลโฟเนตต่ออัตราการรอดชีวิตและลักษณะของเซลล์ปากใบ *Chrysanthemum morifolium* ในสภาวะปลอดเชื้อ. **วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์**. 1(4): 16-19.

ไซนีย๊ะ สะมาลา หัสยา จันทร์สีดำ และอรอนงค์ แซ่ฮั้น. 2558. ผลของสารโคลชิซินต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นหยาดน้ำค้างในหลอดทดลอง. **วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์**. 2: 24-28.

ทิพย์สุดา อนันกุล. 2540 **การขยายพันธุ์กระเจียวพลอยทักษิณ เบอร์ A033 ในสภาพปลอดเชื้อ** รายงานผลงานวิจัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ธีรนิติ พวงกฤษ. 2555. **การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาโดยการผสมข้ามชนิดระหว่างพืชในกลุ่ม Eucurcuma และ Paracurcuma**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์. 2546. **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บัณฑิตา วงศ์สุริยะ, ธัญญะ เตชะศีลพิทักษ์, เฌอมาลย์ วงศ์ชาวจันท์ และพัฒนา สุขประเสริฐ. 2560. การชักนำให้เกิดโพลิพลอยด์จากเนื้อเยื่อลินเดอเนียด้วยสารละลายโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร.** 48: 23-35.

บุญหงษ์ จงคิด. 2552. การปรับปรุงพันธุ์ขมิ้นชันเพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. ปีที่ 18 ฉบับที่ 4 ต.ค.-ธ.ค. 53.

เบญจพร ภูกาบหิน, สุรพล แสนสุข และปิยพร แสนสุข. 2559. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมหาอุดมแดง (*Curcuma pierreana* Gagnep.) เพื่อการอนุรักษ์พืชหายากในประเทศไทย. **วารสารวิทยาศาสตร์ มข**. 44(2): 294-306.

ประเทือง สง่าวงศ์. 2538. **โรคพืช**. ภาควิชาอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้. 341-346.

ประภัสสร สูทกวาทิน. 2547**. งานวิจัยอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ**. [Online]. Available: http://www.gpo.or.th/rdi/html/tissue.html.

ประสาทพร สมิตะนาน. 2527. **โรคพืชวิทยา**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 160.

ปวีณา นวมเจริญ. 2541. **ความแปรปรวนที่ได้จากการชักนำด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคำฝอย *Carthamus tinctorius***. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรพิมล สุริยจันทราทอง. 2545. **หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง 2550. **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. พิมพ์ครั้งที่ 8. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

มลิวรรณ บุญเสนอ. 2544. พิษวิทยาสิ่งแวดล้อม. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม: มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์.

ยุพาภรณ์ ศิริโสม และสมปอง เตชะโต. 2551. ผลของเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ต่ออัตราการรอดชีวิตและการสร้างยอดรวมของกล็อกซิเนีย (*Sinningia speciose*) ในหลอดทดลอง. **วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร**. 39(พิเศษ): 223-226.

รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค**. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัชนี เพ็ชร์ช้าง. 2553. ผลของความเข้มข้นและ ระยะเวลาการให้โคลชิซินต่อการเจริญและจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้เอื้องเงิน. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยมหาสารคาม**. 29(4): 413-419.

วรรณภา วีระภักดี และอดิศร กระแสชัย. 2540. การรวบรวมและศึกษาการเจริญของพืชสกุลกระเจียวบางชนิด. **วารสารเกษตร**. 13(2): 127-136.

วารี อยู่สำราญ. 2561. **การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเบญจมาศในสภาพหลอดทดลองด้วยสารเคมี**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี 2025. **โคลชิซิน**. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Colchicine.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี 2025. **เอทิลมีเทนซัลโฟเนต**. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Ethyl_methanesulfonate.

วิชชุตา รุ่งเรือง. 2537. **ผลของโคลชิซินและรังสีแกมมาที่มีต่อการกลาย พันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์ Double Spathe ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิบูลย์ ทองภูคีรีไพร และสันติ ช่างเจรจา. 2557. ผลของโคลชิซินต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณภาพของผลสับปะรด. **วารสารนเรศวรพะเยา**. 7: 91-95.

วิภาดา ทองทักษิณ นิพัฒน์ สุขวิบูลย์และสุปัน ไม้ดัดจันทร์ 2542. การผสมพันธุ์พืชสกุลกระเจียว. **รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2542 ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย**. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 107-113.

วิรัตน์ ภูวิวัฒน์. 2539. การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดคลอโรฟิลล์จากใบพืช. **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า**. 14(3): 3-7.

ศตปพร เกิดสุวรรณ และ สมปอง เตชะโต. 2558. ผลของโคลชิซินต่อการชักนำโพลีพลอยด์ในแววมยุราในหลอดทดลอง. **วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์**. 2(1): 17-23.

ศิริญญา ม่วงสอน และสมปอง เตชะโต. (2551). การใช้ EMS เพื่อชักนำการกลายในกล้วยไม้เหลือง

สมชัย ภัทรธนานันท์. 2539. **12 สารเคมีอันตรายต่อชีวิตและสิ่งแวดล้อม**. กรุงเทพฯ: พิมพ์ดี.

สมปอง เตชะโต และวิทยา พรหมมี. 2542. การชักนำการกลายพันธุ์มังคุด: การตอบสนองของชิ้นส่วนพืชต่อสิ่งก่อกลายพันธุ์. **วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์**. 2(21): 25-31.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2540. **การกลายพันธุ์ของพืช**. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2540. **ปทุมมา และกระเจียวไม้ดอกไม้ประดับ**. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. **วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**. 5(2): 37-58.

เสริมสุข สลักเพ็ชร์. 2563. **สถิติการส่งออกปทุมมา และกระเจียว.** [Online] Available: http://technologychaoban.com/bullet-news-today/article_141745.

แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ. 2547. **คู่มือปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. เชียงใหม่: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.

อนันต์ พิริยะภัทรกิจ พรกมล รูปเลิศ และพัชรี เดชเลย์. 2566. ผลของสารโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตและลักษณะการเปลี่ยนแปลงของพืชสกุลไทร. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 11(4): 14-24.

อรวรรณ วิชัยลักษณ์. 2548. **ปทุมมา**. กลุ่มส่งเสริมการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ ส่วนส่งเสริมการผลิตผักไม้ดอกไม้ประดับ และสมุนไพร สำนักส่งเสริม และจัดการสินค้าเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร.

อรุณี คงศักดิ์ไพศาล, มาลินี ชัยศุภกิจสินธ์ และสินีนารถ สระตันติ์. 2557. **เคมีเกษตร**. พิมพ์ครั้งที่ 3 กรุงเทพฯ: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อรุณี ม่วงแก้วงาม และสมปอง เตชะโต. 2562 ผลของโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิตและลักษณะของเซลล์คุมของดาหลาในสภาวะปลอดเชื้อ. **วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์**. 6(1): 13-18.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2550. **การกลายพันธุ์: เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อังสนา อัครพิศาล. 2533. **การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์และเซลล์สำหรับศึกษาปฏิกิริยาตอบสนองเฉียบพลันของสายพันธุ์ขิงต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยว (*Pseudomonas solanacearum* E.S. Smith)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อัญชลี จาละ. 2557. ผลของสารพาโคลบิวทราโซลร่วมกับ BA ในการขยายพันธุ์ปทุมมา (*Curcuma* sp.) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. **วารสารวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี**. 3(1): 15-22.

อัญญานี จันทร์ภักดี และสมปอง เตชะโต. 2553. ผลของสารโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิต ลักษณะทางสรีรวิทยา และสัณฐานวิทยาของหน้าวัวพันธุ์ Micky Mouse. **วารสารเกษตร**. 26(1): 15-25.

อุทยานหลวงราชพฤกษ์ ข้อมูลพรรณไม้ 2563. **ปทุมมาสายพันธุ์เด่น โทนสีขาว**. [Online]. Available: https://www.royalparkrajapruek.org/Knowledge/view/131.

อุษา เพชรบ้านนา, อนุชิต ชินาจริยวงศ์ และพจมาลย์ สุรนิลพงศ์. 2552. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อของกล้วยไม้ดินใบหมากโดยใช้สารโคลชิซิน. ใน **การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 8**. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 50.

Abu-Qaoud H. and Shtaya M. J. Y. 2014. The effect of colchicine on adventitious shoot regeneration from cultured leaf explants of Petunia hybrida. British **Biotechnology Journal**. 4(5): 531-540.

Adriance G. W. and Brison F. R. 1955. **Propagation of Horticultural Plants.** New York.

Ahmed E. U., Hayashi T. and Yazawa S. 2004. Auxin increase the occurrence of leaf-colour variants in Caladium regenerated from leaf explants. **Scientia Horticulturae**. 100: 153-159.

Angelo G., A. Hunterb and G.C. Douglasa. 2014. Polyploid induction *in vitro* using colchicine and oryzalin on Hebe 'Oratia Beauty': Production and characterization of the vegetative traits. **Scientia Horticulturae**. 179: 59–66.

Bai R., Covell D.G., Pei X.F., Ewell J.B., Nguyen N.Y., Brossi A. and Hamel E. 2000. Mapping the binding site of colchicinoids on β-tubulin. **The Journal of Biological chemistry**. 275(51): 40443-40452.

Benjamin 2000. **การเกิด depurination ของเบสอะดินีน (A)**. [Online]. Available: http://conf.agi.nu.ac.th/webnewasp/ereading/gene/unit7.pdf.

Berenschot A. S., Zuccho M. I., Neto A. T. and Quecini, V. 2008. Mutagenesis in *Petunia x hybrida* Vilm. and isolation of a novel morphological mutant. Brazilian. **Journal of Plant Physiology**. 20: 95-103.

Bharalee R., Das A. and Kalita M. C. 2005. *In vitro* clonal propagation of *Curcuma Ceasia*.

Boonbongkarn S. 2013. **Polyploid Induction in Native Torenia (*Torenia fournieri*) using Colchicine Tablets.** M.Sc. Thesis, Kasetsart University.

Boonsrangsom T. 2020. Genetic diversity of 'Wan Chak Motluk' (*Curcuma comosa* Roxb.) in Thailand using morphological characteristics and random amplification of polymorphic DNA (RAPD) markers. **South African Journal of Botany**. 130: 224-230.

Buchanan B. B., Gruissem W. and Jones R. L. 2000. **Biochemistry and molecular biology of plants**. ASPP press. Rockville.

Bunnag S. 2013. **Plant Tissue Culture and Plant Gene Transfer**. KhonKaen University, Thailand.

Dhooghe E. van, Laere K., and Eeckhaut T. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**. 104: 359–373.

Dolezel J., J. Greihuber and J. Suda. 2007. **Flow Cytometry with Plant Cells**. Darmstadt: Wiley-VCH.

Doyle J.J. and Doyle J.L. 1987. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. Focus. 12: 13–15.

Eigsti O.J. and Dustin P. 1955. **Colchicine in agriculture, medicine, biology and chemistry**. Lowa State College Press.

Fang J.Y. 2011. *In vitro* Mutation Induction of Saintpaulia Using Ethyl methanesulfonate. **Hort Science.** 46(7): 981-984.

Ferdous M.M., Shahinozzaman M., Faruk M.O., Paul S.P., Azad M.A.K. and Amin M.N. 2012. *In vitro* propagation of a medicinal plant-mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.). **International Journal of Biosciences.** 2 (11): 166-172.

Franck ST., Kevers C., Gaspar T., Dommes J., Deby C., Greimers R., Serteyn D. and Deby-Dupont, G. 2004. Hyperhydrictity of *Prunus avium* shoot cultured on gelrite: a controlled stress response. **Plant Physiology and Biochemistry**. 42: 519-527.

Fu L., Zhu Y., Li M., Wang C. and Sun H. 2019. Autopolyploid induction via somatic embryogenesis in *Lilium distichum* Nakai and *Lilium cernuum* Komar. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 139: 237–248.

Gantait S., Mandal N., Bhattacharyya S. and Kanti Das P. 2011. Induction and indentification of tetraploid using *In vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesoii* Bolus cv. Sciella. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 106: 485-493.

Gruszka D., Szarejko I. and Maluszynski M. 2012. Plant Mutation Breeding and Biotechnology. **CABI International Wallingford**. 159-166.

Harten V.A.M. 1998. **Mutation Breeding Theory and Practical Applications**. Cambridge University Press, United Kingdom.

Hawley G. R. 2004. **Methods in Molecular Biology Flow Cytometry Protocols**. Volume 263.

He M., Gao W., Gao Y., Yang X., Jiao H. and Zhou Y. 2016. Polyploidy induced by colchicine in *Dendranthema indicum* var. aromaticum, a scented chrysanthemum. **Journal of Horticultural Science**. 81(4): 219-226.

Holt J.G., Noel K.R., Peter S.H.A., James S.T. and Stanley W.T. 1994. **Bergey's manual of Determinative Bacteriology**, Ninth Edition. Willian and Wikins Baltimore 4: 605-703.

Hongpakdee P., Siritrakulsak P., Ohtake N., Sueyoshi K., Ohyama T., and Ruamrungsri S. 2010. Changes in endogenous abscisic acid, trans-zeatin riboside, indole-3-acetic acid levels and the photosynthetic rate during the growth cycle of *Curcuma alismatifolia* Gagnep. in different production seasons. **European Journal of Horticultural Science**. 75(5): 204-213.

Huang Q. and Allen C. 2000. Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 57: 77-83.

Iaea. 1977. **Manual on mutation breeding. Technical reports species no. 119. 2nd edition, Joint FAO/IAEA division of Atomic Energy in Food and Agriculture**. Vienna, Austria.

Jaccard P. 1908. Nouvelles recherches surla distribution florale. **Bulletin de la Societe des Sciences Naturelles**. 44: 223-270.

Jafari A., Kahrizi D. and Mansouri M. 2016. Effects of plant growth regulators and explant on callus induction in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). **Biharean Biologist**. 10: 134-136.

Jala A. 2012. Effects of NAA BA and Sucrose on Shoot Induction and Rapid. Micropropagation by Trimming Shoot of *Curcuma longa* L. **Thammasat International Journal of Science and Technology**. 17: 54-60.

Jala A. 2014. Effect of Paclobutrazol and BA on Micropropagation in *Curcuma* sp. *In vitro*. **Thai Journal of Science and Technology**. 3: 15-22.

Jayakumar S., Selvaraj R. 2003. Mutagenic effectiveness and efficiency of gamma rays and ethyl methane sulphonate in sunflower. **Madras Agricultural Journal**. 90: 574-576.

Junaid A., Mujib A. and Sharma M.P. 2008. Effect of growth regulators and ethylmethane sulphonate on growth, and chlorophyll, sugar and proline contents in *Dracaena sanderiana* cultured *in vitro*. **Journal Biologia plantarum**. 52(3): 569-572.

Ketmaro S., Taychasinpitak T., Mongkolchaiyaphruek and Wongchaochant, S. 2012. Effect of colchicine on increasing pollen viability in *Curcuma* hybrid (*Curcuma sparganifolia* X *C. parviflora*. **Kasetsart Journal**. 46: 363-370.

Khan S. 2009. EMS induced mutagenesis in *Basmati rice*. Pak. **Journal of Botany**. 41(6): 3103–3110.

Khan S., Al-Qurainy F. and Anwar F. 2009. Sodium azide: A chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants. **Environment and We International Journal of Science and Technology**. 4: 1-21.

Kucharska D., Podwyszynska M., Trzewik A., MarasekCiołakowska A., Pluta S. and Seliga. 2022. *In vitro* induction and primary evaluation of octoploid plants in saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* Nutt.). **Agronomy**. 12(5): 1215.

Kumar G. and Pandey A. 2019. Ethyl methane sulphonate induced changes in cytomorphological and biochemical aspects of *Coriandrum sativum* L. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**. 18(4): 469-475.

Kumar K., Gill M. I. S., Kaur H., Choudhary O.P. and Gosal S.S. 2010. *In vitro* mutagenesis and somaclonal variation assisted salt tolerance in 'Rough Lemon' (*Citrus jambhiri* Lush.). **European Journal of Horticultural Science**. 75: 233-238.

Latado R.R., Adamas A.H. and Neto A.T. 2004. *In vitro* mutation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) with ethyl methanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 77: 103-106.

Lichtenthaler H.K. 1987. **Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes.** Methods in Enzymology.

Luan Y., Zhang J., Gao X. and An L. 2007. Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *In vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 88: 77-81.

Lucas J. B. 1998. **Plant Pathology and Plant Pathogens, Blackwell Science**. Oxford, United Kingdom.

Luckett D. 1989. Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. **Euphytica** 42: 177-182.

Manzoor A., Ahmad T., Bashir M.A., Baig M.A., Baig M.M.Q., Quresh A.A., Shah M.K.N. and Hafiz I.A. 2018. Induction and identification of colchicine induced polyploidy in *Gladiolus grandiflorus* 'White Prosperity'. **Folia Horticulturae**. 30(2): 307-319.

Mujib A., Banerjee S., Fatima S. and Ghosh P. D. 2008. Regenerated plant populations from rhizome-calli showed morphological and chromosomal changes in *Caladium bicolor* (Ait.) Vent. cv. Bleeding heart. **Propagation Ornamental Plants**. 8:138-143.

Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid grow and bioassay with tobacco tissue culture. **Plant Physiology.** 15: 473-497.

Murni D. 2010. Pengaruh Perlakuan Kolki-sin Terhadap Jumlah Kromosom dan Fenotip Tanaman Cabe Keriting (*Capsicum annuum* L.). **Journal Agroekotek**. 1:43-48.

Nasirujjaman K., Uddin S.M., Zaman S. and Reza M. A. 2005. Micropropagation of Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) through In vitro Rhizome Bud Culture. **Journal of Biological Sciences**. 5: 490-492.

Nguyen T.P.T., Kengi U., Ikuo N., Yukio O. and Hiroshi O. 2003. Induction of tetraploid in ornamental Alocasia through colchicine and oryzalin treatments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 72: 19-25.

Nogales E. 2000. Structural insights into microtubule function. **Annu Rev Biochem.** 69: 277–302.

Olson A.H. 2005. *Ralstonia solanacearum*. [Online]. Available: http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Ralstonia/Ralstonia_solanacearum.html.

Otto F.J. 1990. DAPI staining of fixed cells for high – resolution flow cytometry of nuclear DNA. **Method in cell Biology**. 33: 105-110.

Palai S.K. and Rout G.R. 2007. Identification and genetic variation among eight varieties of ginger by using random amplified polymorphic DNA markers. **Plant Biotechnology.** 24: 417–420.

Phuc Huy N., Tam D.T., Luan V.Q., Tung H.T., Hien V.T., Ngan H.T., Duy P.N. and Nhut D.T. 2018. *In vitro* polyploidy induction of *Paphiopedilum villosum* using colchicine. **Scientia Horticulturae**. 252: 283-290.

Pinthong S. 2016. **Polyploid Induction of *In Vitro* Torenia Hybrids (*Torenia fournierixTorenia asiatica*) using Colchicine Tablets.** Special problem of master degree. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University. Bangkok, Thailand.

Podwyszynska M., Trzewik A. and Marasek-ciolakowska A. 2018. *In vitro* polyploidisation of tulip (*Tulipa gesneriana* L.)-Phenotype assessment of tetraploids. **Scientia Horticulturae**. 242: 155-163.

Prathanturarug S., Soonthornchareonnon N., Chuakul W., Phaidee Y. and Saralamp P. 2005. Rapid micropropagation of *Curcuma longa* using bud explants precultured in thidiazuron-supplemented liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 80: 347-351.

Qin H., Wang Y. and Hou C. 2011. Effect of ethylmethane sulfonate (EMS) in *in vitro* mutation on anther-derived embryos in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). **African Journal of Agricultural Research**. 6(11): 2450-2455.

Qosim W.A., Yuwariah Y., Hamdani J.S., Rachmadi M. and Perdani S.M. 2015. Effect of ethyl methane sulphonate mutagent to shoot regeneration on two genotypes derived from Purwakarta and Pandeglang. **The Horticulture Journal**. 25(1): 9-14.

Rahayu S. and Adil W.H. 2012. The effect of BAP and Thidiazuron on *in vitro* growth of Java turmeric (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb). **Journal of Agricultural and Biological Science**. 7(10): 820-824.

Rathore J. S., Rathore M. S., Singh M., Singh R. P. and Shekhawat N. S. 2007. Micropropagation of mature tree of Citrus limon. **Indian Jounal Biotechnol**, 6: 239- 244.

Rinehart T. and Winston X. 1999. **Eukaryotic Cell**. [Online]. Available: https://honorsbiologycellproject.weebly.com/all-cells-have.html.

Rodrigues F.A., Soares D.R., Santos R.R. and Silva S.O. 2011. Colchicine and amiprophos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant. **African Journal of Biotechnology.** 10(62): 13476-13481.

Sahin A. 2024. **องค์ประกอบของใยสปินเดิล**. [Online]. Available: https://gelecekbilimde.net/bitkilerde-ploidi-ve-cekirdeksizlik-iliskisi-karpuz-ornegi/#undefined.

Skoog F. and Miller C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *In vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**. 11: 118-130.

Stadler J., Phillips R. L. and Leonard M. 1989. Mitotic blocking agents for suspension cultures of maize "Black Mexican Sweet" cell lines. **Genome**. 32: 475-478.

Sun H., Fu L., Wang Z., Gai M. and Wang C. 2018. Polyploidy induction and identification of *Lilium pumilum* and *Lilium davidii* var. unicolor based on somatic embryogenesis. **Acta Horticulturae Sinica**. 45(6):1136–46.

Sundaresan V. and Alandete-Saez M. 2010. Pattern formation in miniature: the female gametophyte of flowering plants. **Development.** 137(2): 179-189.

Sungkaew K. 2015. Poliploid induction in *in vitro Lindernia* sp. using colchicine tablets. M.Sc. Thesis, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

Takamura T. and Miyajima I. 1996. Colchicine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their characteristics. **Scientia Horticulturae**. 65: 305-312.

Talebi A. B. and Shahrokhifar B. 2012. Ethyl Methanesulfonate (EMS) induced mutagenesis in Malaysian rice (cv. MR219) for lethal dose determination. **American Journal of Plant Sciences**. 3(12): 1661–1665.

Theanphong O., Thanakijcharoenpath W., Palanuvej C., Ruangrungsi N. and Rungsihirunrat K. 2016. RAPD marker for determination of phylogenetic relationships of 15 Curcuma species from Thailand. **Bulletin of Health, Science and Technology**. 14: 45–56.

Vanijajiva O. 2012. Low genetic variation of *Boesenbergia tenuispicata*, a species endangered and endemic to Thailand, using RAPD markers. **Thai Journal of Genetics**. 5(1): 67-78.

Vanijajiva O., Sirirugsa P. and Suvachittanont W. 2005. Confirmation of relationships among *boesenbergia* (Zingiberaceae) and related genera by RAPD. **Biochemical Systematics and Ecology**. 33: 159–170.

Watson J.D. 1977. **Molecular Biology of gene**. New York.

Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.I., Rafalski J.A. and Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. **Nucleic Acids Research**. 18: 6231-6235.

Wu J.H. and Mooney P. 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro* Citrus somatic embryogenic callus treated with colchicine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 70: 99-104.

Yoosumran V., Ruamrungsri S., Duangkongsan, and Saetiew K. 2018. Induced mutation of *dendranthemum grandiflora* through tissue culture by ethyl methanesulphonate (EMS). International Journal of Agricultural Technology 14(1): 73-82.

Yu J. Z., Fang D. D., Kohel R. J., Ulloa M., Hinze L. L., Percy R. G., and Jones D. C. 2012. Development of a core set of SSR markers for the characterization of *Gossypium* germplasm. **Euphytica**. 187: 203-213.

Zhang J., Zhang M. and Deng X. 2007. Obtaining autotetraploids *in vitro* at hight frequency in *Citrus sinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 89: 211-216.

Zhang K.Y.B., Leung H.W., Yeung H.W. and Wong R.N.S. 2001. Differentiation of *lycium barbarum* from its related lycium species using random amplified polymorphic DNA. **Planta Medica**. 67: 379–381.

Zhou J., Guo F., Fu J. Xiao Y. and Wu J. 2020. *In vitro* polyploidy induction using colchicine for *Zingiber officinale* Roscoe cv. 'Fentou'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 18: 1-8.

Zulkarnain Z., Kartika E. and Lizawati L. 2019. Growth and development of young mail inflorescences of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in tissue culture system: the effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. **Annual conference on environmental science, Society and its application**, IOP Publishing, 1-7.

ภาคผนวก

1.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

1.1.1 การเตรียม stock solution ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเตรียม stock solution ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS โดยเตรียมส่วนของ Macroelements (MS1-MS5) ให้มีความเข้มข้น 10 เท่า ของความเข้มข้นที่ต้องการใช้ และส่วนของ Microelements (MS6-MS8) ให้มีความเข้มข้น 100 เท่า ดังตารางด้านล่าง

MS	สารเคมี	ความเข้มข้น (mg/L)	ความเข้มข้นของ stock solution (g/L)	ปริมาตรของ stock solution
Macroelements			(100 เท่า)	
MS1	NH4NO3	1,650.00	16.50	100 มิลลิลิตร
MS2	KNO3	1,900.00	19.00	100 มิลลิลิตร
MS3	CaCl2·2H2O	450.00	4.50	100 มิลลิลิตร
MS4	MgSO4·7H2O	370.00	3.70	100 มิลลิลิตร
MS5	KH2PO4	170.00	1.70	100 มิลลิลิตร
Microelements			(10 เท่า)	
MS6	ZnSO4·5H2O	86.00	8.60	10 มิลลิลิตร
	MnSO4·4H2O	22.30	2.23	
	H3BO3	6.20	0.62	
	KI	0.83	0.083	
	Na2MoO4·2H2O	0.25	0.025	
	cuSO4·5H2O	0.025	0.0025	
	Cocl2·6H2O	0.025	0.0025	
Microelements			(10 เท่า)	10 มิลลิลิตร
MS7	Na2EDTA·2H2O	37.30	3.73	
	FeSO4·7H2O	27.85	2.785	
Organic			(10 เท่า)	10 มิลลิลิตร
nutrients	Myo-inositol	100.00	10.00	
MS8	Nicotinic acid	0.50	0.05	
	Pyridoxine·HCl	0.50	0.05	
	Thiamine·HCl	0.10	0.01	
	Glycine	2.00	0.20	

1.2 การเตรียมสารละลาย EMS ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

สารละลาย EMS ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หมายถึง สารละลาย EMS 2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เพราะฉะนั้นสารละลาย EMS ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เตรียมดังนี้ ตวงสารละลาย EMS 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนมีปริมาตรครบ 250 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้)

1.3 การเตรียมสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หมายถึง สารละลายโคลชิซิน 3 กรัม เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เพราะฉะนั้นสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เตรียมดังนี้ ชั่งสารละลายโคลชิซิน 9 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและนำมากรองด้วย filter จากนั้นนำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนมีปริมาตรครบ 300 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้)

1.4 การเตรียมบัฟเฟอร์ CTAB ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (Doyle and Doyle, 1987)

1M Tris buffer pH 8.0	100 มิลลิลิตร
5M Nacl	280 มิลลิลิตร
0.5M EDTA	40 มิลลิลิตร
CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)	20 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เมื่อจะนำบัฟเฟอร์ไปใช้สกัด DNA ให้เติมสาร polyvinypyrrolidone มวลโมเลกุล 40,000 (PVP-40) 4 กรัม และสาร β-mercaptoethanol 500 ไมโครลิตร ต่อปริมาตรสารละลายบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้)

1.5 การเตรียมสารละลาย TE (Tris-EDTA) buffer

10mM Tris-HCl pH 8.0	1,000 ไมโครลิตร
1mM EDTA pH 8.0	100 ไมโครลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.6 การเตรียมสารละลาย 0.5x TBE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ตวงสารละลาย 50x TBE buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาววารี อยู่สำราญ
วัน เดือน ปี เกิด	15 กรกฎาคม พ.ศ.2534
ที่อยู่ปัจจุบัน	31/3 หมู่ 3 ตำบลบางกระเบา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม 73120
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2556 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 10520 เกรดเฉลี่ย 3.11 พ.ศ. 2561 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 10520 เกรดเฉลี่ย 3.50
ทุนวิจัยที่ได้รับ	ทุนวิจัยส่งเสริมส่วนงานวิชาการ รหัสทุน 2565-02-04-002 คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)
ผลงานทางวิชาการ	Yoosumran, V., Ruamrungsri, S., Duangkongsan, W. and Saetiew K. Induced Mutation of *Dendranthemum grandiflora* through Tissue Culture by Ethyl Methanesulphonate (EMS). International Journal of Agricultural Technology 2018 Vol. 14(1): 73-82.

Yoosumran, V., Saetiew, K., Ruamrungsri, S., Akarapisarn, A. and Teerarak, M. Micropropagation of young inflorescence Curcuma hybrid *in vitro*. International Journal of Agricultural Technology 2022 Vol. 18(3):1355-1366.

Yoosumran, V., Saetiew, K., Ruamrungsri, S., Akarapisarn, A. and Teerarak, M. Induced mutation of curcuma hybrid cv. sweetmemory through tissue culture by ethyl methanesulphonate (EMS). International Journal of Agricultural Technology 2025 Vol. 21(1):381-396.