บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

1. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแตงโม

จากการนำเนื้อเยื่อหลาย ๆ ส่วนของต้นกล้ามาทดลอง เพื่อหาส่วนของเนื้อเยื่อที่สามารถใช้ในการเพิ่มจำนวนยอดให้ได้มากและสะดวกรวดเร็วที่สุด เพื่อที่จะนำไปใช้ในการศึกษาการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ด้วยสารโคลชิซีนต่อไป โดยการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ 2 ชนิด คือออกซิน ได้แก่ IAA หรือ NAA และไซโตไคนิน ได้แก่ BAP โดยดัดแปลงจากการทดลองของ วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ์ และคณะ (2529) และ Shivastava (1989) ซึ่ง วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ์ และคณะ (2529) รายงานว่าสามารถชักนำปลายยอดแตงโมพันธุ์ซูการ์เบบี้ ให้เกิดรากได้ในอาหารสูตร MS + IAA 5 mg/l และสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนลำต้น เกิดแคลลัสและรากได้ โดยการใช้ IAA และ BAP 0.5 ถึง 4 mg/l ส่วน Shivastava (1989) ได้รายงานการเลี้ยงเนื้อเยื่อใบเลี้ยง และเนื้อเยื่อส่วน hypocotyl โดยใช้ความเข้มข้นของ IAA 0.25-1 μM NAA 0.25-1 μM BAP 2.5-4.5 μM kinetin 3.5-5 μM ซึ่งได้รายงานว่า ในอาหารที่ใส่ kinetin พบแต่การเกิดแคลลัสเพียงอย่างเดียว ขณะที่เนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยงใน อาหาร MS ที่ใส่ IAA NAA และ BAP พบว่ามีการพัฒนาไปเป็นยอดและรากได้ด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลือกใช้ IAA หรือ NAA และ BAP ร่วมกัน โดยใช้ IAA หรือ NAA ความเข้มข้น 0 1 และ 2 mg/l ร่วมกับ BAP 0 0.5 1 และ 10 mg/l รวมเป็น 20 สูตร

1.1 การเลี้ยงเนื้อเยื่อใบเลี้ยงแตงโมในอาหาร 20 สูตร

จากการทดลองนี้ จะเห็นได้ว่าเนื้อเยื่อใบเลี้ยงเป็นส่วนที่มีการตอบสนองต่อจำนวนสูตรอาหารได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อ hypocotyl และปลายยอด คือสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในอาหาร 17 สูตร ซึ่งเป็นสูตรที่เติมสารควบคุมการเจริญ ออกซิน ร่วมกับ

เพียงอย่างเดียว และการเกิดยอดพบได้ในอาหาร 1 สูตร ที่เติม ออกซิน (IAA 1 mg/l) ร่วมกับ ไซโตไคนิน (BAP 10 mg/l)

ในการนำเนื้อเยื่อใบเลี้ยงมาเลี้ยงในอาหารทั้ง 20 สูตร พบว่าแคลลัสที่ได้จะมีลักษณะแตกต่างกัน แคลลัสสีขาวใส พบว่าเจริญมาจากเนื้อเยื่อบริเวณผิวใบ ส่วนแคลลัสสีเหลืองและแคลลัสสีเขียว พบว่าเจริญมาจากเนื้อเยื่อบรเวณรอยตัด ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่อยู่ลึกลงไปจากผิวใบ โดยแคลลัสสีเหลืองจะพบในอาหารสูตรที่เติม NAA ในขณะที่แคลลัสสีเขียวจะพบอาหารสูตรที่เติม IAA แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อคนละตำแหน่งของอวัยวะเดียวกัน อาจตอบสนองต่อสารอาหารและสารควบคุมการเจริญที่ได้รับต่างกัน และยังพบว่าแคลลัสสีเขียวสามารถเกิดการพัฒนาเป็นยอดได้ ซึ่งคงเป็นผลมาจากการใช้ BAP ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญในกลุ่มไซโตไคนินที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์และมีอิทธิพลชักนำให้เกิดยอดได้ และยอดที่เกิดจากแคลลัสสีเขียวนี้สามารถนำไปเลี้ยงเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไป

การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการดัดแปลงปริมาณ BAP ให้มีระดับสูงขึ้นหรือมีสัดส่วนกับ IAA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซินเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าศึกษาเพื่อเร่งการเพิ่มจำนวนยอดที่เกิดจากแคลลัสของใบเลี้ยง ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อไปในการขยายพันธุ์ต้นที่เป็นพอลิพลอยด์ที่ต้องการได้ต่อไป

สำหรับการเกิดราก พบว่า ทั้ง IAA และ NAA สามารถชักนำให้เกิดรากได้ทั้งสองชนิดซึ่งก็เป็นคุณสมบัติของสารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซิน ที่สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์และชักนำให้เกิดรากได้ แต่ลักษณะของรากที่เกิดจากอาหารสูตรที่ใส่สารทั้งสองชนิดพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดไม่ว่าจะเป็นจำนวน ความยาว และสี โดย IAA จะทำให้เกิดรากเป็นจำนวนน้อยกว่า แต่รากจะเจริญได้ยาวกว่า มีการแตกแขนงได้และมีสีขาว ในขณะที่ NAA จะทำให้เกิดรากเป็นจำนวนมาก แต่รากมีการเจริญผิดปกติ ไม่มีการแตกแขนงและไม่เจริญยืดยาวออกไป รากที่เห็นจะมีสีขาวออกเหลือง ดังนั้นสูตรอาหารที่น่าจะเลือกใช้สำหรับการชักนำให้เกิดรากที่ปกติของแตงโมจากการทดลองนี้จึงน่าจะเลือกใช้ IAA มากกว่า NAA

จะเห็นได้ว่าเนื้อเยื่อใบเลี้ยงเป็นส่วนที่น่าสนใจ เพราะหากต้องการขยายพันธุ์จากต้นกล้าของแตงโมที่เป็น ทริปพลอยด์ หรือพอลิพลอยด์ให้ได้ทีละมาก ๆ โดยไม่ต้องผลิตเมล็ดพันธุ์ การเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยงในหลอดทดลองก็เป็นเทคนิคที่น่าจะนำไปใช้ได้และไม่ยากนักเพราะใบเลี้ยงมีการสะสมอาหารอยู่มากและไม่ค่อยมีปัญหาในเรื่องการปนเปื้อน (contamination)

ผลการเลี้ยงเนื้อเยื่อใบเลี้ยงของแตงโมพันธุ์ ชูการ์เบบี้ จากการทดลองนี้ พบว่าได้ผลคล้ายคลึงกับการทดลองของ Shivastava (1989) ที่สามารถชักนำให้เกิดรากและยอดได้จากเนื้อเยื่อใบเลี้ยง ของแตงโมพันธุ์ Metitoposki ซึ่งชักนำให้เกิดยอดโดยใช้อาหารสูตร MS + BAP 9.67 mg/l และชักนำให้เกิดรากจากอาหารสูตร MS + NAA 0.93 mg/l และ MS + 1.86 mg/l ซึ่งเป็นระดับสารควบคุมการเจริญที่ใกล้เคียงกันกับการทดลองครั้งนี้ แต่ลักษณะของรากที่ได้จากการใช้ NAA และ IAA จากการทดลองของ Shivastava ให้ผลที่แตกต่างกันกับการทดลองนี้ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการตอบสนอง ต่อสารควบคุมการเจริญที่แตกต่างกันของพันธุ์แตงโมที่ใช้ โดย Shivastava รายงานว่ารากที่เกิดจาก NAA มีลักษณะสมบูรณ์กว่ารากที่เกิดจาก IAA และ Cade (1990) ยังได้รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิด Somatic Embryos ได้จากเนื้อเยื่อใบเลี้ยงของแตงกวา ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกันกับแตงโม โดยใช้อาหารสูตร MS + 2,4-D 1 mg/l หรือสูตร MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ที่จะชักนำให้เกิด Somatic Embryos จากเนื้อเยื่อใบเลี้ยงของแตงโมก็อาจจะเป็นไปได้ ซึ่งจะเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์ต้นพอลิพลอยด์ โดยการผลิตเป็นเมล็ดเทียม (Artificial seed) ได้ต่อไป

1.2 การเลี้ยงเนื้อเยื่อ hypocotyl ของต้นแตงโมในอาหาร 20 สูตร

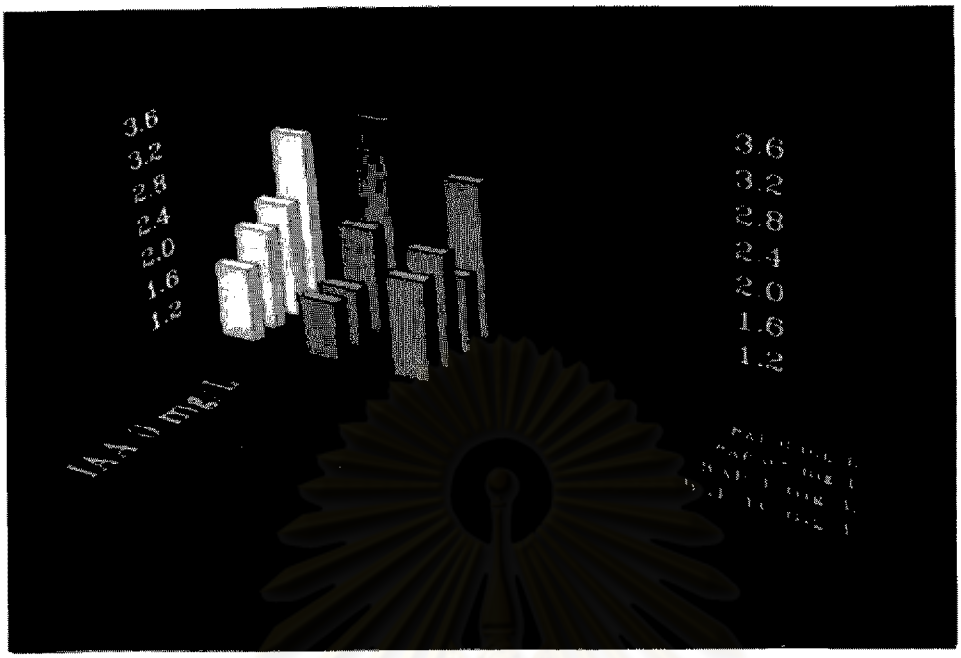
จากการทดลองครั้งนี้ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ hypocotyl แคลลัสที่พบมี 2 ชนิด แคลลัสส่วนใหญ่มีสีเหลืองหรือเหลืองอมเขียว มีลักษณะฟู ค่อนข้างใส ส่วนแคลลัสที่มีสีเขียวมีลักษณะคล้ายคลึงกับแคลลัสสีเขียวจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อใบเลี้ยงแต่ไม่พบการเจริญเป็นยอด คาดว่าเป็นผลมาจากชนิดของเนื้อเยื่อเริ่มต้นและเนื้อเยื่อ hypocotyl อาจจะต้องการปริมาณสารควบคุมการเจริญในปริมาณที่สูงกว่าที่ใช้ในการทดลองนี้ Shivastava (1989) รายงานว่า สามารถชักนำให้เกิดราก และยอดได้จากเนื้อเยื่อ hypocotyl ของแตงโมพันธุ์ Metitoposki อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของสายพันธุ์พืชที่นำมาใช้ ทำให้ได้ผลที่แตกต่างกันออกไป และยังได้รายงานอีกด้วยว่า รากและยอดที่ได้ จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อจะอ่อนแอกว่าที่ได้จากเนื้อเยื่อใบเลี้ยง ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากความแตกต่างกันของเนื้อเยื่อที่ใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นนั่นเอง

1.3 การเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดแดงโมในอาหาร 20 สูตร

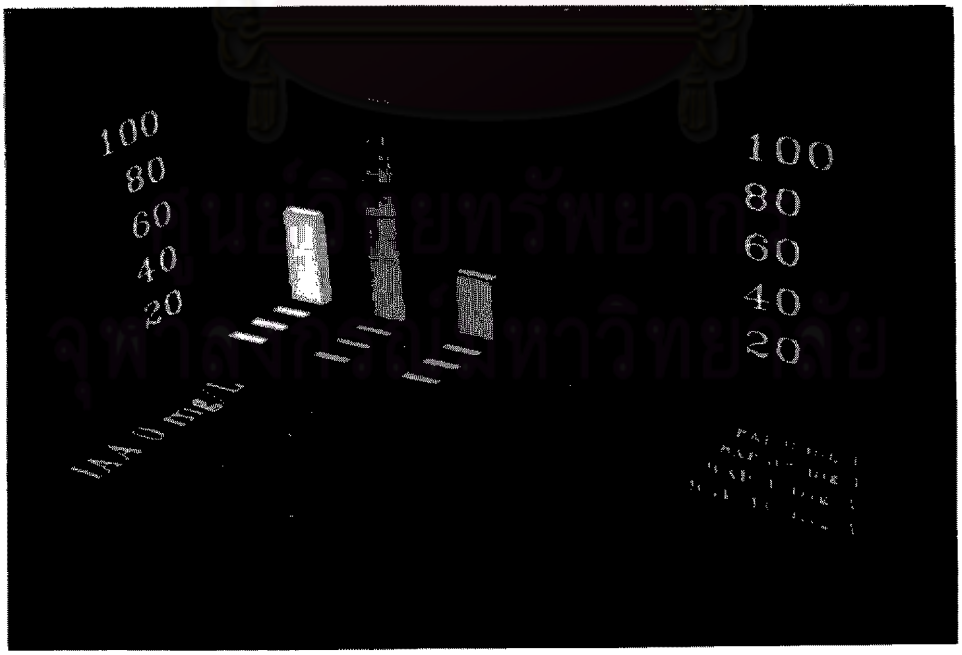
จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดแดงโมในอาหาร 20 สูตร พบว่าปลายยอดแดงโมในอาหารสูตรที่ 2 (MS + IAA 1 mg/l) และ อาหารสูตรที่ 1 (MS) มีการเจริญยืดตัวได้มากที่สุด ในขณะที่สูตรอื่น ๆ มีการเจริญยืดตัวของปลายยอดน้อยกว่า (ภาพที่ 15) ซึ่งน่าจะอธิบายได้ว่า ปลายยอดแดงโมในอาหารทั้ง 2 สูตรดังกล่าว มีการเกิดรากได้ดีกว่าอาหารสูตรอื่น จึงทำให้ปลายยอดได้รับสารอาหารจากรากอย่างเต็มที่มีผลทำให้ปลายยอดแดงโมมีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีกว่าในสูตรที่ไม่มีการเกิดราก

การเกิดรากจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดแดงโม พบว่าปลายยอดแดงโมที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม IAA เพียงอย่างเดียวในปริมาณ 1 mg/l เป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดรากของปลายยอดแดงโมจากการทดลองนี้ โดยปลายยอดแดงโมในอาหารสูตรดังกล่าวสามารถทำให้เกิดรากได้อย่างสม่ำเสมอในทุกต้น แต่ไม่พบการเกิดรากของปลายยอดแดงโมที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ใส่ NAA เพียงอย่างเดียว หรือใส่ NAA ร่วมกับ BAP หรือ ใส่ IAA ร่วมกับ BAP (ภาพที่ 16) แสดงว่า IAA เป็นสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดของแดงโม พันธุ์ซูการ์เบบี้ และปลายยอดในอาหารสูตร MS เติม IAA เพียงอย่างเดียวในปริมาณ 1 mg/l ทำให้เกิดรากมากกว่าในอาหารสูตรอื่น ๆ จำนวนรากที่เกิดมากที่สุดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.57 รากต่อต้น (ภาพที่ 17)ซึ่งปริมาณของ IAA ในอาหารที่ใช้เลี้ยงปลายยอดแดงโมในการทดลองนี้แตกต่างจากรายงานของ วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ์ และคณะ (2529) ที่ชักนำให้ปลายยอดแดงโมพันธุ์ซูการ์เบบี้ที่เป็น ทริปพลอยด์ เกิดรากได้ดีในอาหารที่ใส่ IAA 5 mg/l ซึ่งอาจเป็นผลของระดับของพลอยด์ดีที่สูงขึ้น ทำให้ต้องการสารควบคุมการเจริญในระดับที่สูงกว่าต้นดิพลอยด์

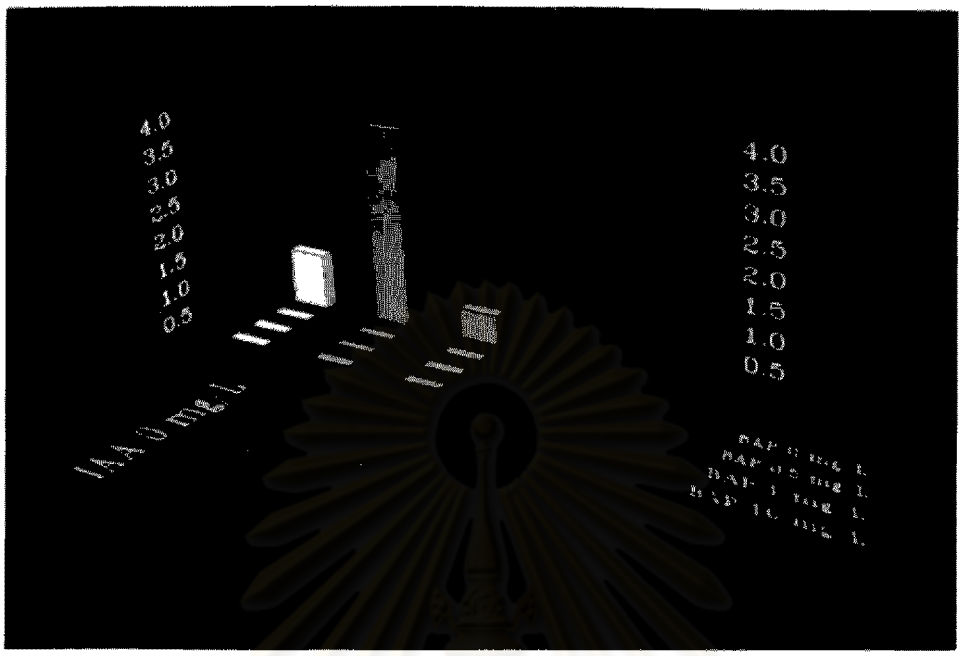
ส่วนผลของไซโตไคนินคือ BAP ที่ใช้เพื่อการชักนำให้เพิ่มจำนวนปลายยอดและการเจริญของตาข้างในหลอดทดลอง พบว่าได้ผลไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจนนัก เมื่อเทียบกับอาหารสูตรควบคุม ด้วยระดับ BAP 0.5-10 mg/l คงจะไม่สูงเพียงพอที่จะลบล้างปรากฏการณ์ apical dominance ของปลายยอดแดงโมในหลอดทดลองได้ โดยจะเห็นได้ว่าจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้น มีค่าเฉลี่ยเป็น 1.5 ยอดต่อต้น (ภาพที่ 18) แต่ความแปรปรวนในจำนวนการเกิดยอดพบเป็นปริมาณที่สูงมากคือพบสูงถึง 58.79 เปอร์เซนต์ ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของ BAP หรือการทดลองใช้สารไซโตไคนินชนิดอื่น เช่น kinetin อาจให้ผลที่แตกต่างออกไปได้ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกต่อไป



ภาพที่ 15 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยความสูงของปลายยอดแตงโม (เซนติเมตร) ในอาหาร 20 สูตร เมื่อเวลา 8 สัปดาห์



ภาพที่ 16 กราฟแสดงเปอร์เซนต์การเกิดรากที่เกิดจากการเลี้ยงปลายยอดแตงโมในอาหาร 20 สูตรเมื่อเวลา 8 สัปดาห์



ภาพที่ 17 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนรากที่เกิดจากการเลี้ยงปลายยอดแตงโม ในอาหาร 20 สูตร เมื่อเวลา 8 สัปดาห์

ภาพที่ 18 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนยอดที่เกิดจากการเลี้ยงปลายยอดแตงโม ในอาหาร 20 สูตร เมื่อเวลา 8 สัปดาห์

เมื่อนำปลายยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 (MS + IAA 1 mg/L) จนมีความสูงประมาณ 2 - 3 เซนติเมตรและเกิดรากอย่างสมบูรณ์ ได้ทดลองนำออกปลูกในภาชนะที่ใช้วัสดุปลูกที่ประกอบด้วย ดิน ทราย และขุยมะพร้าวในอัตราส่วน 1:1:1 พบว่าปลายยอดแตงโมสามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ดังนั้นในการขยายพันธุ์แตงโมในหลอดทดลองอาหารสูตรที่ 2 จึงน่าจะเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนและขยายพันธุ์แตงโมได้โดยการตัดแบ่งลำต้นเป็นท่อน ๆ ให้ได้เป็นจำนวนมากแล้วย้ายลงในอาหารสูตรดังกล่าว จะทำให้มีการเจริญของตาข้างเป็นยอดใหม่และมีรากที่สมบูรณ์ได้

2. <u>การเพิ่มจำนวนปลายยอดแตงโมเพื่อศึกษาการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์</u>

จากการเพิ่มจำนวนปลายยอดโดยวิธีตัดลำต้นให้เป็นท่อนซึ่งมีตาข้างอยู่ด้วย 1 - 2 ตา แล้วนำไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่ใส่ IAA 1 mg/l พบว่ายอดที่เจริญจากตาข้างมีเจริญเติบโตได้ดี จากยอดใหม่ที่ได้ สามารถตัดเป็นท่อน ๆ เพื่อเพิ่มจำนวนยอดได้อีก พบว่าในเวลา 3 - 4 สัปดาห์ จะเพิ่มจำนวนยอดได้เป็น 3 เท่า

เนื่องจากในการทดลองนี้ ยังไม่สามารถทำให้ปลายยอดเกิดการเพิ่มจำนวน หรือเกิด multiple shoot ได้ ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสูตรอาหารที่สามารถทำให้เกิด multiple shoot ได้ก็จะเป็นประโยชน์ในการเพิ่มจำนวน และการขยายพันธุ์ของแตงโมต่อไป

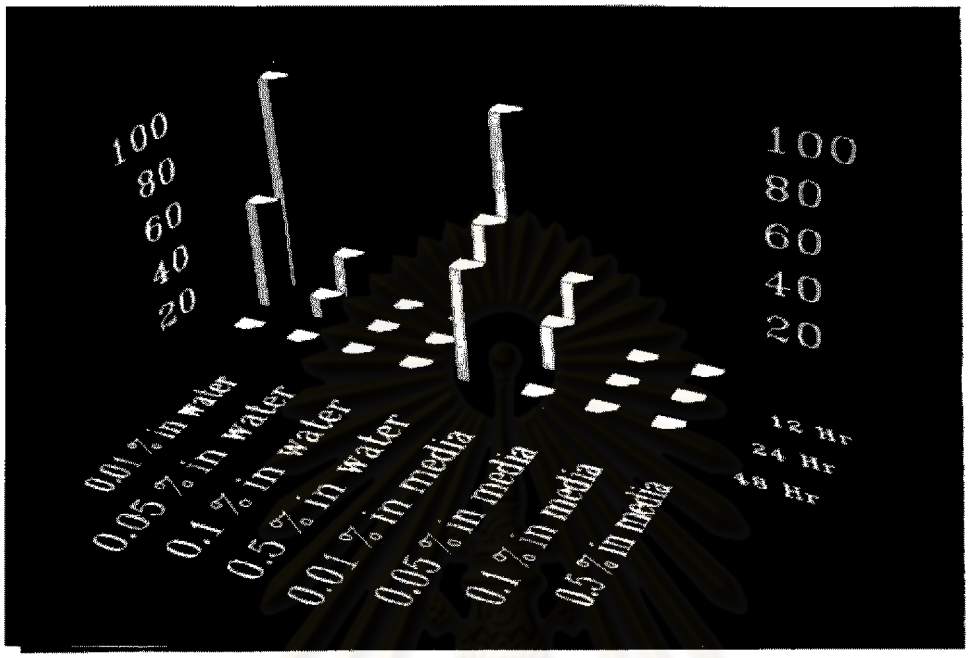
จากรายงานของ Pink และ Walkey (1984) ซึ่งสามารถขยายพันธุ์ต้นฟักทอง (<u>Cucurbita pepo</u> L.) พันธุ์ Cinderella ด้วยการนำเอาส่วนปลายยอดของต้นกล้าที่เพาะในหลอดทดลองมาเพิ่มจำนวนยอดในอาหารสูตร MS + BAP 1 mg/l จนกระทั่งได้ปริมาณมาก ซึ่งจะเห็นได้ว่าใช้ปริมาณของ BAP ต่ำกว่าในการทดลองครั้งนี้ ถึง 10 เท่า แสดงว่าการลบล้างปรากฏการณ์ของ apical dominance ในพืชแต่ละชนิดแม้ว่าจะอยู่ในวงศ์เดียวกันก็ตาม ก็ยังมีความต้องการปริมาณของ สารควบคุมการเจริญในกลุ่มไซโตไคนินที่แตกต่างกัน

3. <u>การทดสอบหาความเข้มข้นของสารโคลชิซีนและระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์</u>

ในการทดลองครั้งนี้พบว่าเมื่อนำปลายยอดแตงโมมาแช่ในสารละลายโคลชิซีนความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 (MS + IAA 1 mg/l) จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด คือ 100 เปอร์เซนต์ ทั้งในน้ำกลั่นและในอาหารเหลว เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซีนหรือระยะเวลาในการแช่ พบว่าอัตราการรอดชีวิตจะลดลง โดยจะไม่พบอัตราการรอดชีวิตเลย เมื่อแช่ในสารละลายโคลชิซีนความเข้มข้นมากกว่า 0.1 เปอร์เซนต์ ในทุกช่วงเวลา (ภาพที่ 19) แสดงให้เห็นว่า โคลชิซีนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์น่าจะเป็นความเข้มข้นที่สูงมากเกินไปสำหรับปลายยอดแตงโม ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงควรอยู่ระหว่าง 0.01 ถึง 0.05 เปอร์เซนต์และเวลาที่ใช้ในการแช่ควรอยู่ระหว่าง 12 - 48 ชั่วโมง โดยจะผกผันกันระหว่างความเข้มข้นของสารโคลชิซีน กับระยะเวลาในการแช่

หลังจากที่ย้ายปลายยอดแตงโม จากสารละลายโคลชิซีน ที่มีความเข้มข้น 0.01 0.05 และ 0.1 เปอร์เซนต์ มาเลี้ยงในอาหารปกติพบว่าในระยะเวลาประมาณ 1 - 3 สัปดาห์แรก บางยอดจะมีการบวมของผิวลำต้นอย่างเห็นได้ชัด มีลักษณะเป็นแถบสีขาวตามความยาวของลำต้น จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และทำให้ยอดที่เกิดอาการลักษณะนี้ตายไปในที่สุด คาดว่าเป็นผลมาจาก การที่สารโคลชิซีนไปมีผล ต่อระบบเนื้อเยื่อลำเลียงในลำต้น ซึ่งมีรายงานว่าในต้นเก็กฮวยที่แช่ในสารละลายโคลชิซีนจะเกิด physiological damage ขึ้น (เสริมศิริ เอียมแฟง และคณะ, 2532) ทำให้ลำต้นไม่สามารถลำเลียงอาหาร ไปยังเนื้อเยื่อปลายยอดหรือตาข้าง ในการทดลองครั้งนี้พบว่า ในบางต้นที่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งต้นยกเว้นส่วนตาข้าง เมื่อตัดเอาตาข้างที่ยังมีสีเขียวออกมาเลี้ยง พบว่าสามารถมีชีวิตอยู่ได้แต่มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ามาก และยังพบต้นที่ถึงแม้จะไม่ได้เปลี่ยนเป็นสีเขียวทั้งต้น แต่ก็มีอัตราการเจริญเติบโตช้ามาก ส่วนที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซนต์ พบว่าเนื้อเยื่อของยอดแตงโมจะถูกทำลาย จนมีลักษณะอ่อนตัวทุกส่วนและเปลี่ยนเป็นสีเหลืองในเวลา 1 - 2 วันหลังจากย้ายลงในอาหารปกติและตายไปในที่สุด

การทดลองให้พืชได้รับสาร mutagen หากมีอัตราการรอดชีวิตหมด 100 เปอร์เซนต์ แล้วโอกาสที่จะพบพืชที่ตอบสนองต่อสารนั้นจะมีน้อย แต่ถ้ามีอัตราการรอดชีวิตลดลง โอกาสที่จะพบพืชที่ตอบสนองต่อสารนั้นจะมีเพิ่มขึ้น โดยทั่วไปในการทดลองกับพืช นิยมใช้อัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 50 เปอร์เซนต์ หรือที่ LD_{50} (Allard, 1960) ในการทดลองนี้ treatment ที่มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซนต์ ได้แก่ treatment ที่ 19 (น้ำกลั่น + โคลชิซีน 0.01 เปอร์-



ภาพที่ 19 กราฟแสดงเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของปลายอดแดงโมที่ผ่านการแช่ใน สารละลายโคลชิซีน 24 treatment แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตร ที่ 2 เมื่อเวลา 8 สัปดาห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เซนต์ เวลา 12 ชั่วโมง) และ treatment ที่ 22 (อาหารเหลว + โคลชิซีน 0.01 เปอร์-เซนต์ เวลา 12 ชั่วโมง) จึงไม่น่าจะนำมาใช้ในการทดลองชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ ในขณะที่ treatment ที่มีอัตราการรอดชีวิตต่ำ คือ 20 เปอร์เซนต์ ได้แก่ treatment ที่ 13 (น้ำกลั่น + โคลชิซีน 0.05 เปอร์เซนต์ เวลา 12 ชั่วโมง) และ treatment ที่ 17 (อาหารเหลว + โคลชิซีน 0.05 เปอร์เซนต์ เวลา 24 ชั่วโมง) และ treatment ที่มีอัตราการรอดชีวิต 30 เปอร์เซนต์ ได้แก่ treatment ที่ 16 (อาหารเหลว + โคลชิซีน 0.05 เปอร์เซนต์ เวลา 12 ชั่วโมง) และ treatment ที่มีอัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซนต์ ได้แก่ treatment ที่ 20 (น้ำกลั่น + โคลชิซีน 0.01 เปอร์เซนต์ เวลา 24 ชั่วโมง) และ treatment ที่ 24 (อาหารเหลว +โคลชิซีน 0.01 เปอร์เซนต์ เวลา 48 ชั่วโมง) จึงน่าจะเป็น treatment ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์

มีรายงานว่ามีสารเคมีอีกชนิดที่มีผลทำให้เกิดพอลิพลอยด์ได้โดยจะมีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อต่ำกว่าสารโคลชิซีน ถึง 10 เท่า คือ oryzalin (Van Tuyl et al., 1992) ซึ่งน่าจะมีการทดลองนำสารนี้มาใช้กับปลายยอดแตงโมในหลอดทดลอง

4. <u>การเกิดพอลิพลอยด์ของต้นแตงโมที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซีน</u>

ในการทดลองครั้งนี้ ได้ศึกษาการเกิดพอลิพลอยด์ของต้นแตงโมที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซีน 4 วิธี คือ การวัดขนาดเซลล์คุมทั้งความยาวและความกว้าง การนับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม การวัดความยาวของรากที่เกิด และการนับจำนวนโครโมโซมจากต้นที่รอดชีวิต

4.1 <u>การวัดขนาดของเซลล์คุม</u>

จากต้นแตงโมที่รอดชีวิตและเจริญจนมีใบ 2-3 ใบ เมื่อนำมาวัดขนาดของเซลล์คุมด้วย micrometer พบว่าต้นแตงโมที่มีความกว้างของเซลล์คุมทุกต้น จะมีความยาวของเซลล์คุมมากกว่าต้นควบคุมด้วย จึงเป็นการแสดงให้เห็นว่า เซลล์คุมมีขนาดใหญ่ขึ้นทุกส่วน ได้แก่ ใน treatment ที่ 19 (น้ำกลั่น + โคลชิซีน 0.05 เปอร์เซนต์ เวลา 12 ชั่วโมง) และ treatment ที่ 22 (อาหารเหลว + โคลชิซีน 0.05 เปอร์เซนต์ เวลา 24 ชั่วโมง) ซึ่งมีเปอร์เซนต์การรอดชีวิต 20 เปอร์เซนต์ และต้นแตงโมทั้งหมดเหล่านี้มีขนาดความกว้างและความยาวของเซลล์คุมแตกต่างทางสถิติกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการแช่สารโคลชิซีนส่วน treatment ที่ 16

(อาหารเหลว + โคลชิซีน 0.05 เปอร์เซนต์ เวลา 12 ชั่วโมง) มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิต 30 เปอร์เซนต์ พบว่า 2 ใน 3 ของต้นที่รอดชีวิต มีขนาดความกว้างและความยาวของเซลล์คุมแตกต่างทางสถิติกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการแช่สารโคลชิซีน และ treatment ที่ 23 (อาหารเหลว + โคลชิซีน 0.01 เปอร์เซนต์ เวลา 24 ชั่วโมง) มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิต 60 เปอร์เซนต์ มีเพียง 10 เปอร์เซนต์ของต้นที่รอดชีวิตเท่านั้น ที่มีขนาดความกว้าง และความยาวของเซลล์คุมแตกต่างทางสถิติกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการแช่สารโคลชิซีน (ความแตกต่างทางสถิติทำที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์) ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่าต้นที่มีขนาดของเซลล์คุมใหญ่กว่าต้นควบคุม เป็นต้นที่มีการตอบสนองต่อสารโคลชิซีน คือมีจำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น พอลิพลอยด์ เนื่องจากพืชที่เป็นพอลิพลอยด์มักจะมีขนาดของเซลล์คุมใหญ่ขึ้นโดยมีรายงานในพืชหลายชนิดได้แก่ ดอกไม้จีน (Chen, 1979) กล้วยไม้พันธุ์เดนโดรบิอุม (กัญญา ไชยเจริญ, 2521) ต้นบลูเบอรรี่ (Lyrene and Perry, 1982) ต้นแพงพวยฝรั่ง (ชะบา อ่ำรำไพ, 2527) ขิง (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และ อรดี สหวัชรินทร์, 2532) รวมทั้งในต้นแตงโม (ดำรง สินไชย, 2521) ที่มีขนาดของเซลล์คุมของต้นพืชที่เป็นพอลิพลอยด์ใหญ่กว่าเซลล์คุมของต้นที่เป็นดิพลอยด์

4.2 <u>การนับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม</u>

ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าต้นที่มีจำนวนคลอโรพลาสต์มากกว่าต้นควบคุม ได้แก่ต้นที่มี treatment ในข้อ 4.1 ซึ่งจะเป็นต้นที่มีขนาดของเซลล์คุมใหญ่กว่าต้นควบคุมทุกต้น จึงเป็นการสนับสนุนว่าต้นแตงโมเหล่านี้เป็นต้นพอลิพลอยด์ ดำรง สินไชย (2521)รายงานว่า ต้นแตงโมพันธุ์ชูการ์เบบี้ที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ จะมีจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมมากกว่าต้นที่เป็นดิพลอยด์

4.3 <u>การวัดความยาวราก</u>

จากการทดลองครั้งนี้ ไม่พบความแตกต่างระหว่างความยาวรากของต้นที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซีนกับต้นควบคุม แม้แต่ต้นที่มีขนาดของเซลล์คุมใหญ่กว่าและมีจำนวนคลอโรพลาสต์มากกว่าต้นควบคุม เพราะภายในขวดที่ใช้เลี้ยงมีขนาดเล็กและมีพื้นที่ให้รากเจริญมีน้อย จึงไม่น่าจะใช้ความยาวรากในการตรวจสอบการตอบสนองต่อสารโคลชิซีนของพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลอง

4.4 <u>การนับจำนวนโครโมโซม</u>

จากการหาเทคนิคในการเตรียมเซลล์ของปลายรากแตงโมในหลอดทดลองเพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซม ของต้นแตงโมที่ผ่านการแช่สารละลายโคลชิซีน และต้นควบคุม ใน

การทดลองนี้ยังไม่สามารถพัฒนาเทคนิคการเตรียมเซลล์เพื่อนับจำนวนโครโมโซมได้ ซึ่งวิธีที่ได้ทดลองทำทั้งหมดแสดงในตารางที่ 9 และ 10 โดยดัดแปลงจาก วิธีของ Karp (1991) และของ พวงผกา อัมพันธ์จันทร์ (2533) นำมาดัดแปลงวิธีการใช้สารเคมีและเวลา ได้เป็น 345 วิธีการก็ยังไม่สามารถทำให้การตรวจนับจำนวนโครโมโซมประสพความสำเร็จ คาดว่าเป็นเพราะ

(ก). สภาวะของปลายรากแดงโม ที่แช่ในสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเป็นเวลานานเป็นผลทำให้เซลล์มีความต้านทานต่อการผ่านของสารเคมีที่เป็นสีที่ใช้ย้อมสูงกว่าปลายรากที่เจริญในสภาพธรรมชาติ ทำให้เซลล์มีการติดสีได้ไม่ดีจึงไม่สามารถตรวจนับจำนวนโครโมโซมได้

(ข). ปลายรากแดงโมที่เลี้ยงในหลอดทดลอง มีนาดเล็กกว่ารากที่ปลูกอยู่ในธรรมชาติมาก ทำให้มีโอกาสน้อย ที่จะพบเซลล์ที่กำลังอยู่ในระยะการแบ่งตัว

(ค). การเลี้ยงต้นแดงโมในหลอดทดลอง เป็นการเลี้ยงในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ จึงทำให้อัตราการแบ่งเซลล์น้อยกว่ารากที่ปลูกอยู่ในธรรมชาติ จึงทำให้มีโอกาสน้อยที่จะพบเซลล์ที่กำลังอยู่ในระยะการแบ่งตัว

ดังนั้นการนำปลายรากแดงโมจากหลอดทดลอง มาตรวจนับจำนวนโครโมโซมอาจจะเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสมสำหรับการทดลองนี้ การนับจำนวนโครโมโซมน่าจะได้รับผลดีกว่า หากนำต้นแดงโมที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซีน ย้ายออกปลูกในกระถาง แล้วนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากหรือรอจนมีดอกแล้วนับจำนวนโครโมโซมจาก microsporocyte น่าจะให้ผลที่ดีกว่าซึ่งเห็นได้จากรายงานที่มีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสารละลาย หรือในอาหารที่ใส่สารโคลชิซีนในหลอดทดลอง ใช้การตรวจสอบการเกิดพอลิพลอยด์ โดยการนับจำนวนโครโมโซมมักทำจากต้นที่ย้ายปลูกในสภาพธรรมชาติ เช่น การทดลองในอ้อย (Heinz and Mee, 1970) แอฟริกัน ไวโอเล็ต (Espino and Vazquel, 1981) ขิง (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และอรดี สหวัชรินทร์, 2532) *R. alleghensis* และ *R. rusticanus* (Gupton, 1989) เป็นต้น

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทดลองนำต้นแดงโม ที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซีน ออกย้ายปลูกในกระถาง เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก หรือ microsporocyte แต่ต้องประสพกับปัญหาหลายด้าน คือ

(ก). การรบกวนของแมลงศัตรูพืช ซึ่งเกิดหลังจากย้ายต้นแตงโมออกปลูกได้ประมาณ 3 - 4 สัปดาห์ จะมีเพลี้ยมารบกวนเป็นจำนวนมากจนทำให้ต้นแตงโมที่ย้ายออกปลูกตายก่อนที่จะได้ทดลองตัดราก หรือนำ microsporocyte มาตรวจนับจำนวนโครโมโซม

(ข). การทดลองปลูกใหม่จะต้องใช้ระยะเวลามาก คือจะต้องเริ่มจากการแช่ในสารละลายโคลชิซีนใหม่ ซึ่งจะต้องใช้เวลาประมาณ 4 เดือน จึงจะได้ต้นที่รอดชีวิตออกมาและต้องใช้เวลาในปรับสภาพทำให้ต้นแตงโมแข็งแรงพอที่จะย้ายปลูกอีกประมาณ 2 เดือน ซึ่งระยะเวลาของการทดลองครั้งนี้ไม่เพียงพอที่จะทำซ้ำ

จากปัญหาดังกล่าวทำให้ในการทดลองนี้ ไม่สามารถตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากต้นแตงโมที่ปลูกในสภาพธรรมชาติได้

อย่างไรก็ตาม ในการตรวจสอบว่าต้นแตงโม ที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซีนจะเป็นพอลิพลอยด์หรือไม่นั้นสามารถศึกษาได้จากขนาดของเซลล์คุม จำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม และขนาดของ pollen ซึ่งเห็นได้จากการศึกษาของ ดำรง สินไชย, (2521) ในการชักนำให้ต้นแตงโมพันธุ์ชูการ์เบบี้ เป็นพอลิพลอยด์โดยการใช้สารโคลชิซีน พบว่าต้นที่เป็นพอลิพลอยด์จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซม จะเป็นต้นที่มีขนาดของเซลล์คุม และขนาดของ pollen ใหญ่กว่าต้นควบคุม และมีจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมมากกว่าต้นควบคุม และในการทดลองของ ธรรยงค์ เหตานุรักษ์ และ ธวัช ลวะเปารยะ, (2522) ในการชักนำให้ต้นแตงโมหลายพันธุ์เป็นพอลิพลอยด์ด้วยวิธีเดียวกัน กับดำรง สินไชย, (2521) ก็ใช้ขนาดของเซลล์คุม จำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม และขนาดของ pollen เป็นตัวบ่งชี้ว่าพืชเป็นพอลิพลอยด์โดยที่ไม่ได้ตรวจนับจำนวนโครโมโซม ซึ่งพบว่าเปอร์เซนต์การเกิดพอลิพลอยด์ในแตงโมพันธุ์ชูการ์เบบี้จากการทดลองทั้งสองนี้ไม่แตกต่างกัน

ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงกล่าวได้ว่า การแช่ปลายยอดแตงโมพันธุ์ชูการ์เบบี้ ในสารละลายโคลชิซีนที่มีความเข้มข้น 0.01 ถึง 0.05 เปอร์เซนต์ เวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมงจะมีผลต่อการชักนำให้ปลายยอดแตงโมมีขนาดของเซลล์คุมใหญ่ขึ้น จำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์มีมากขึ้น จากข้อมูลนี้ น่าจะเป็นตัวบ่งชี้ได้ว่า ปลายยอดแตงโมที่แช่ในสารละลายโคลชิซีนเหล่านี้ได้เกิดพอลิพลอยด์