การเพิ่มจำนวนยอดและการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมในปทุมมาลูกผสม (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*) โดยโคลชิซินในสภาพหลอดแก้ว

ดวงจันทร์ เกษบุตร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
พ.ศ. 2549

ISBN 974-523-116-9

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

SHOOT MULTIPLICATION AND POLYPLOIDIZATION OF *CURCUMA* HYBRID (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*) USING COLCHICINE *IN VITRO*

DUANGJUN KATEBUTR

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

MAJOR IN AGRICULTURE FACULTY OF AGRICULTURE

UBON RAJATHANEE UNIVERSITY

YEAR 2006

ISBN 974-523-116-9

COPYRIGHT OF UBON RAJATHANEE UNIVERSITY

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์

เรื่อง การเพิ่มจำนวนยอดและการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมในปทุมมาลูกผสม (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*) โดยโคลชิซินในสภาพหลอดแก้ว

ผู้วิจัย นางสาวดวงจันทร์ เกษบุตร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล สุริยภัทร)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุวัฒน์ ธีระพงษ์ธนากร)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วรพงษ์ สุริยภัทร)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุมนทิพย์ บุนนาค)

..... คณบดี

(รองศาสตราจารย์ ดร.วัชรพงษ์ วัฒนกูล)

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี รับรองแล้ว

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ประกอบ วิโรจนกูฏ)

อธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2549

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วัชรพงษ์ วัฒนกูล คณบดีคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่กรุณาอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำวิจัยด้วยดีจนงานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล สุริยภัทร ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งเป็นทั้งอาจารย์ที่ปรึกษา และอาจารย์ประจำวิชาหลายวิชา ที่กรุณาให้ความรู้ทางวิชาการ วิธีดำเนินการวิจัย และการเป็นนักวิจัยที่ดี ตลอดจนให้คำปรึกษาและคำชี้แนะในการแก้ไขปัญหาตลอดระยะเวลาของการทำวิจัยด้วยความเอาใจใส่ และเสียสละอย่างมากจนงานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุวัฒน์ ธีระพงษ์ธนากร กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ให้ความรู้ด้านการเจริญและพัฒนาของพืช ตลอดจนให้คำปรึกษาในการทำวิจัย และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรพงษ์ สุริยภัทร กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ให้ความรู้ด้านการใช้สถิติในการวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาในการทำวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุมนทิพย์ บุนนาค กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ซึ่งเป็นอาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความรู้ในการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของปทุมมาลูกผสมด้วยไมตรีจิตอันดียิ่ง ตลอดจนให้คำชี้แนะในการทำวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณวิภาดา ทองทักษิณ เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ที่กรุณามอบต้นปทุมมาลูกผสมปลอดเชื้อให้ใช้เป็นวัสดุตั้งต้นในการทดลอง และให้คำปรึกษาในการทำวิจัยเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้ในด้านต่างๆ ด้วยความเมตตา จนข้าพเจ้ามีความรู้ความสามารถในการทำงานและมีการดำเนินชีวิตที่ดี

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วสุ อมฤตสุทธิ์ หัวหน้าสำนักงานไร่ฝึกทดลองและห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทุกท่านที่สนับสนุนการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณพี่ๆ บุคลากรคณะเกษตรศาสตร์ทุกท่านที่กรุณาให้ความสะดวกในการเรียน และการทำวิจัย ตลอดจนเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอแสดงความขอบคุณเป็นพิเศษแก่ นางสาวมะลิวรรณ จุรุฑา น้องนักศึกษาปริญญาโท ที่ทุ่มเทช่วยงานการศึกษาจำนวนโครโมโซมปทุมมาลูกผสมจนสำเร็จ และเป็นกำลังใจในการทำงานด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก และผู้มีพระคุณต่อแผ่นดินทุกท่านที่ทุ่มเททำงานเพื่อประโยชน์สุขของมนุษยชาติ ทำให้ข้าพเจ้าซึ่งเป็นคนรุ่นหลังได้มีโอกาสศึกษาเรียนรู้และเข้าใจสิ่งที่อยู่รอบตัวมากขึ้น ซึ่งข้าพเจ้าขอถือเอาท่านทั้งหลายเหล่านี้เป็นครูและเป็นแบบอย่างในการใช้ชีวิตเพื่อตอบแทนบุญคุณของแผ่นดินตามสติกำลัง

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ สมเด็จพระบรมศาสดาสัมมาสัมพุทธเจ้า และครูบาอาจารย์ทุกท่านที่กรุณาชี้ทางเดินชีวิตที่สงบเย็น ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่กรุณาอบรมเลี้ยงดูด้วยความรักและสนับสนุนให้ได้รับการศึกษาเป็นอย่างดี ตลอดจนเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งจนประสบความสำเร็จในวันนี้ ขอขอบคุณญาติ พี่ น้อง ทุกท่าน และเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้คำปรึกษาและเป็นกำลังใจด้วยดีเสมอมา

(นางสาวดวงจันทร์ เกษบุตร)
ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : การเพิ่มจำนวนยอดและการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมในปทุมมาลูกผสม (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*) โดยโคลชิซินในสภาพหลอดแก้ว

โดย : ดวงจันทร์ เกษบุตร

ชื่อปริญญา : ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา : เกษตรศาสตร์ [ISBN 974-523-116-9]

ประธานกรรมการที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล สุริยภัทร

ศัพท์สำคัญ : ปทุมมาลูกผสม การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พอลิพลอยด์ โคลชิซิน Thidiazuron

การผสมข้ามชนิดระหว่างปทุมมา (*Curcuma alismatifolia*; 2n=32) กับบัวโกเมน (*C. rhabdota*; 2n=24) ได้ปทุมมาลูกผสม (*C. alismatifolia* x *C. rhabdota*; 2n=28) ที่เป็นหมันจึงไม่สามารถนำไปใช้สร้างลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ได้ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อฟื้นฟูความสมบูรณ์พันธุ์ให้แก่ปทุมมาลูกผสม โดยใช้โคลชิซินชักนำลูกผสมดิพลอยด์ให้เป็นเททระพลอยด์ในสภาพหลอดแก้ว การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ตอน คือ ตอนที่ 1 เป็นการศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดอย่างรวดเร็ว และตอนที่ 2 เป็นการศึกษาความเข้มข้นของโคลชิซินเพื่อเพิ่มชุดโครโมโซม การศึกษาในตอนที่ 1 นั้นได้ศึกษาอิทธิพลของชนิดชิ้นส่วน ความเข้มข้น และระยะเวลาการให้ thidiazuron (TDZ) ต่อการเพิ่มจำนวนยอดของปทุมมาลูกผสมในสภาพหลอดแก้ว ผลการศึกษาพบว่าการใช้ชิ้นส่วนหน่ออ่อนหรือชิ้นส่วนโคนต้นผ่าครึ่งที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) ที่มี TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 3 วัน แล้วย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 10 สัปดาห์ เป็นวิธีที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดในปทุมมาลูกผสมโดยให้จำนวนยอดเฉลี่ย 17-19 ยอดต่อชิ้นส่วน การศึกษาอิทธิพลของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของปทุมมาลูกผสมในสภาพหลอดแก้ว โดยการเลี้ยงชิ้นส่วนหน่ออ่อนในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 4 วัน แล้วย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซินความเข้มข้น 0, 800, 1,000 และ 1,200 มก/ล ร่วมกับ dimetylsulfoxide 2% เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นจึงย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตจนครบ 28 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่าโคลชิซินที่ระดับ 800 มก/ล เป็นความเข้มข้นที่ให้จำนวนต้นเททระพลอยด์มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 26 นอกจากนี้โคลชิซินที่ระดับ 1,200 มก/ล ยังให้ต้นออกทะพลอยด์ร้อยละ 7 และพบว่าต้นปทุมมาลูกผสมออกทะพลอยด์

และเททระพลอยด์มีความหนาของใบ และความยาวเซลล์คุมปากใบมากกว่าต้นดิพลอยด์ แต่มีความสูงของต้นและจำนวนปากใบต่อพื้นที่น้อยกว่าต้นดิพลอยด์

ABSTRACT

TITLE : SHOOT MULTIPLICATION AND POLYPLOIDIZATION OF *CURCUMA* HYBRID (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*) USING COLCHICINE *IN VITRO*

BY : DUANGJUN KATEBUTR

DEGREE : MASTER OF SCIENCE (AGRICULTURE)

MAJOR : PLANT SCIENCE [ISBN 974-523-116-9]

CHAIR : ASSOC. PROF. POONPIMON SURIYAPAT, Ph.D.

KEYWORDS : CURCUMA HYBRID / PLANT TISSUE CULTURE / POLYPLOID / COLCHICINE / THIDIAZURON

Interspecific hybridization between *Curcuma alismatifolia* (2n=32) and *C. rhabdota* (2n=24) resulted in an infertile F_1 hybrid (*C. alismatifolia* x *C. rhabdota*; 2n=28) that was unable to be employed in further breeding programs. This study aimed at restoring fertility of this hybrid by using colchicine to double chromosome numbers *in vitro*. The study was divided into 2 parts. The first part developed a suitable method for rapid shoot multiplication and the second part studied the appropriate colchicine concentration for tetraploid induction. It was found that, the best method for shoot multiplication was by culturing young shootlet explants or half-cut piece of decapitated stems on liquid Murashige and Skoog (1962) (MS) medium, supplemented with 1 mg/l Thidiazuron (TDZ) for 3 days. This treatment produced 17-19 shoots per explant after transferring the treated explants to the basal MS medium for 10 weeks. The efficiency of tetraploid induction was assessed by application of 0, 800, 1,000 and 1,200 mg/l colchicine in the liquid MS medium, with 2% dimetylsulfoxide to the treated young shootlets for 4 days. After 28 weeks in cultures, 800 mg/l colchicine gave the maximum number of tetraploid induction (26%). In addition, 1,200 mg/l colchicine produced octaploid plants (7%). Octaploid and

tetraploid plants had thicker leaves, with longer guard cell lengths, but with reduced plant height and fewer stomata numbers per leaf area than the diploid plants.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	**ก**
บทคัดย่อภาษาไทย	**ค**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**จ**
สารบัญ	**ช**
สารบัญตาราง	**ฎ**
สารบัญภาพ	**ฑ**
อักษรย่อ	**ค**
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญในการทำวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 สมมติฐานการวิจัย	2
1.4 ขอบเขตการวิจัย	3
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
2 การตรวจเอกสาร	
2.1 ลักษณะพฤษศาสตร์ของพืชสกุลขมิ้น	4
2.2 ลักษณะพฤษศาสตร์ของปทุมมาลูกผสม	5
2.3 การขยายพันธุ์พืชสกุลขมิ้นโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	5
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดพืชสกุลขมิ้น	6
2.4.1 สูตรอาหาร	6
2.4.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต	7
2.4.3 ขนาด และอายุของชิ้นส่วน	13
2.4.4 สภาวะของอาหาร	13
2.5 การชักนำพืชเททระพลอยด์โดยใช้โคลชิซินร่วมกับการเพาะเลี้ยงเยื้อเยื่อ	14
2.5.1 หลักการชักนำเททระพลอยด์โดยใช้โคลชิซิน	14
2.5.2 ข้อดีของการชักนำพืชเททระพลอยด์โดยใช้โคลชิซินร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	16

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.3 การนำเททระพลอยด์ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช 17

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดเททระพลอยด์ในหลอดแก้ว 18

2.6.1 พันธุกรรมของพืช 18

2.6.2 ชนิดชิ้นส่วนพืช 18

2.6.3 ความเข้มข้นและระยะเวลาในการให้โคลชิซิน 19

2.7 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสมบูรณ์พันธุ์ของพืชเททระพลอยด์ 27

2.7.1 อัลโลเททระพลอยด์ 27

2.7.2 ออโตเททระพลอยด์ 29

3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมต้นพืชทดลอง ชิ้นส่วนพืช และสภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ 31

3.1.1 การเตรียมต้นพืชทดลอง 31

3.1.2 การเตรียมชิ้นส่วนหน่ออ่อน และชิ้นส่วนโคนต้น 31

3.1.3 สภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ 32

3.2 วิธีการศึกษา แผนการทดลอง และการบันทึกผล 34

3.2.1 การศึกษาอิทธิพลของ TDZ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดในชิ้นส่วนหน่ออ่อนและชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาลูกผสม 34

3.2.1.1 ชิ้นส่วนหน่ออ่อน 34

1) การศึกษาช่วงความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสม 34

2) การศึกษาระดับความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม 35

3) การศึกษาระยะเวลาการให้ TDZ ที่เหมาะสม 36

3.2.1.2 ชิ้นส่วนโคนต้น 37

1) การศึกษาช่วงความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสม 37

2) การศึกษาระดับความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม 38

3) การศึกษาระยะเวลาการให้ TDZ ที่เหมาะสม 38

4) การศึกษาผลร่วมของการผ่าชิ้นส่วน ความเข้มข้นและระยะเวลาการให้ TDZ 39

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.2 การศึกษาอิทธิพลของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของปทุมมาลูกผสม	40
3.2.2.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นของโคลชิซินต่อการเพิ่มโครโมโซม	40
3.2.2.2 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาต้นดิพลอยด์กับต้นพอลิพลอยด์	42
3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	43
3.4 ระยะเวลาทำการวิจัย	43
3.5 สถานที่ทำการวิจัย	43
4 ผลการศึกษา	
4.1 การศึกษาอิทธิพลของ TDZ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดในชิ้นส่วนหน่ออ่อน และชิ้นส่วนโคนต้น	45
4.1.1 ชิ้นส่วนหน่ออ่อน	45
4.1.1.1 การศึกษาช่วงความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม	45
4.1.1.2 การศึกษาระดับความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม	47
4.1.1.3 การศึกษาระยะเวลาการให้ TDZ ที่เหมาะสม	50
4.1.2 ชิ้นส่วนโคนต้น	52
4.1.2.1 การศึกษาช่วงความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม	52
4.1.2.2 การศึกษาระดับความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม	54
4.1.2.3 การศึกษาระยะเวลาการให้ TDZ ที่เหมาะสม	56
4.1.2.4 การศึกษาผลร่วมของการผ่าชิ้นส่วน ความเข้มข้นและระยะเวลาการให้ TDZ	58
4.2 การศึกษาอิทธิพลของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของปทุมมาลูกผสม	64
4.2.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซม	64
4.2.2 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์	68

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5 อภิปรายผลการทดลอง	
5.1 การศึกษาอิทธิพลของ TDZ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดในชิ้นส่วนหน่ออ่อน และชิ้นส่วนโคนต้น	72
5.1.1 ชิ้นส่วนหน่ออ่อน	72
5.1.1.1 การศึกษาช่วงความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม	72
5.1.1.2 การศึกษาระดับความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม	73
5.1.1.3 การศึกษาระยะเวลาการให้ TDZ ที่เหมาะสม	74
5.1.2 ชิ้นส่วนโคนต้น	76
5.1.2.1 การศึกษาช่วงความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม	76
5.1.2.2 การศึกษาระดับความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม	77
5.1.2.3 การศึกษาระยะเวลาการให้ TDZ ที่เหมาะสม	77
5.1.2.4 การศึกษาผลร่วมของการผ่าชิ้นส่วน ความเข้มข้น และระยะเวลาการให้ TDZ	78
5.2 การศึกษาอิทธิพลของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของปทุมมาลูกผสม	79
5.2.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซม	79
5.2.2 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์	83
6 สรุป	**86**
เอกสารอ้างอิง	**87**
ภาคผนวก	
ก วิธีการเตรียมอาหาร สารเคมี และการคำนวณ	102
ข ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance)	110
ประวัติผู้วิจัย	**116**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 8 และ 10 สัปดาห์	46
2	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 6 และ 10 สัปดาห์	48
3	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 6 และ 10 สัปดาห์	50
4	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 8 และ 10 สัปดาห์	53
5	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 6 และ 10 สัปดาห์	55
6	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นระยะเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 6 และ 10 สัปดาห์	57
7	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นไม่ผ่าและชิ้นส่วนโคนต้นผ่าครึ่ง หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 6 และ 10 สัปดาห์	59
8	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 6 และ 10 สัปดาห์	59
9	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ เป็นระยะเวลาต่างๆ หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 6 และ 10 สัปดาห์	59

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	การเจริญของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนโคนต้นไม่ผ่าและโคนต้นผ่าครึ่งที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 10 สัปดาห์	61
11	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซิน หลังเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์	65
12	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซิน หลังเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม 1 มก/ล BAP และ 0.05 มก/ล NAA เป็นเวลา 15 สัปดาห์	65
13	ความยาวเซลล์คุมปากใบของต้นปทุมมาลูกผสม	67
14	จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของปทุมมาลูกผสม	68
15	ค่าเฉลี่ยความสูงของต้น ความหนาของใบ จำนวนปากใบต่อพื้นที่ และความยาวเซลล์คุมปากใบของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์	69
ก.1	สูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962)	105
ข.1	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 0, 5, 10 15 และ 20 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน ที่เวลา 8 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.1.1)	111
ข.2	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน ที่เวลา 6 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.1.2)	111
ข.3	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน ที่เวลา 10 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.1.2)	111
ข.4	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ที่เวลา 6 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.1.3)	112
ข.5	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ที่เวลา 10 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.1.3)	112

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่

ข.6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน ที่เวลา 6 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.2.2) 112

ข.7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน ที่เวลา 10 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.2.2) 113

ข.8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ที่เวลา 6 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.2.3) 113

ข.9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ที่เวลา 10 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.2.3) 113

ข.10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นไม่ผ่าและโคนต้นผ่าครึ่งที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ ที่เวลา 6 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.2.4) 114

ข.11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นไม่ผ่าและโคนต้นผ่าครึ่งที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ ที่เวลา 10 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.2.4) 114

ข.12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซิน ที่เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.2.1) 115

ข.13 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซิน ที่เป็นเวลา 15 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.2.1) 115

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของ BAP, Kin, 2iP, TDZ และ CPPU	8
2	สูตรโครงสร้างของโคลชิซิน	15
3	การผสมข้ามชนิดระหว่างดิพลอยด์ A กับ ดิพลอยด์ B ได้ลูกผสมดิพลอยด์ชั่วที่ 1 เป็นหมันเนื่องจากโครโมโซมจากพ่อแม่ไม่เข้าคู่กัน การเพิ่มชุดโครโมโซมทำให้มีโครโมโซมคู่เหมือนจึงสามารถเข้าคู่กันได้ส่งผลให้อัลโลเททระพลอยด์มีความสมบูรณ์พันธุ์	16
4	ลักษณะต้นและช่อดอกปทุมมาลูกผสม (*Curcuma alismatifolia x C. rhabdota*; 2n=28) ที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	32
5	ต้นอ่อนของปทุมมาลูกผสมในหลอดแก้วที่มีอายุ 3 เดือน ชิ้นส่วนโคนต้นที่ใช้ในการเตรียมหน่ออ่อน และหน่ออายุเยาว์ที่ใช้เป็นวัสดุทดลอง	33
6	ชิ้นส่วนหน่ออ่อน และชิ้นส่วนโคนต้นปทุมมาลูกผสมที่ใช้เป็นวัสดุทดลอง	33
7	กลุ่มยอดที่เจริญจากชิ้นส่วนที่ได้รับ TDZ หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 10 สัปดาห์ และการแบ่งกลุ่มยอดตามความสูงเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1. สูงกว่า 4 ซม กลุ่มที่ 2. 2-4 ซม และกลุ่มที่ 3. ต่ำกว่า 2 ซม	35
8	ใบที่เจริญเต็มที่ ตำแหน่งใบที่ลอกเนื้อเยื่อผิวใต้ใบมาวัดความยาวเซลล์คุมปากใบและการวัดความยาวเซลล์คุมปากใบ	44
9	การวัดความสูงต้น ตำแหน่งของใบที่ใช้ในการนับจำนวนปากใบต่อพื้นที่ ตำแหน่งของใบที่ใช้ในการวัดความหนาใบ และการวัดความหนาจากใบที่ตัดตามขวาง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า	44
10	การเจริญของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 10 สัปดาห์	46
11	ลักษณะหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์ การแตกยอดของหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 0-20 มก/ล และอาการเนื้อเยื่อตายที่พบใน TDZ ความเข้มข้นสูงกว่า 5 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 10 สัปดาห์	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	การเจริญของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 10 สัปดาห์	49
13	หน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์	49
14	การเจริญของยอดจากชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 10 สัปดาห์	51
15	หน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์	51
16	ยอดอ่อนปทุมมาลูกผสมที่เจริญจากหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 3 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 และ 10 สัปดาห์	52
17	การเจริญของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 10 สัปดาห์	53
18	ลักษณะโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์	54
19	การเจริญของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 10 สัปดาห์	55
20	ลักษณะโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์	56
21	การเจริญของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 10 สัปดาห์	57
22	ลักษณะโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	ลักษณะโคนต้นไม่ผ่าที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์	62
24	ลักษณะโคนต้นผ่าครึ่งที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์	63
25	ลักษณะต้นอ่อนปทุมมาลูกผสมที่เจริญจากโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 3 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 และ 10 สัปดาห์	64
26	หน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 6 สัปดาห์	66
27	การเจริญของยอดจากชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซิน และต้นปทุมมาลูกผสมที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลง หลังจากตัดแบ่งและย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 24 สัปดาห์	66
28	ต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์	69
29	ความหนาใบของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์	70
30	เซลล์คุมปากใบของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์	70
31	ขนาดเซลล์คุมปากใบของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์	70
32	เซลล์ปลายรากของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์	71

อักษรย่อ

ชม	ชั่วโมง
ซม	เซนติเมตร
$ซม^2$	ตารางเซนติเมตร
มก/ล	มิลลิกรัมต่อลิตร
มม	มิลลิเมตร
มล	มิลลิลิตร
BAP	6-benzylamino purine
°C	องศาเซลเซียส
CPPU	N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'phynylurea
CRD	Completely Randomized Design
CV	Coefficient Variation
DMSO	dimethylsulfoxide
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
2iP	6-γ,γ-dimethylallylaminopurine
IAA	indol-3-acetic acid
IBA	3-indolebutyric acid
Kin	kinetin
LD_{50}	lethal dose 50
LSD	least significant difference
µm	ไมครอน
µM	ไมโครโมล
µmol $m^{-2}s^{-1}$	ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที
MS	Murashige and Skoog (1962)
NAA	α-naphthaleneacetic acid
PDB	paradichlorobenzene
TDZ	thidiazuron

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญในการทำวิจัย

ปทุมมาและกระเจียวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวประเภทไม้หัวล้มลุกอายุหลายปี จัดอยู่ในสกุลขมิ้น (*Curcuma*) ของวงศ์ขิง (Zingiberaceae) มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของทวีปเอเชีย ออสเตรเลีย และ แอฟริกา ในประเทศไทยพบพืชสกุลขมิ้นมากกว่า 30 ชนิด จากทั้งหมด 65 ชนิด ที่สำรวจพบทั่วโลก (สุรวิช, 2539) ได้แก่ ปทุมมา บัวโกเมน เทพรำลึก กระเจียวส้ม กระเจียวพลอยทักษิณ ขมิ้นชัน ว่านชักมดลูก และว่านมหาเมฆ เป็นต้น (พิมพ์ใจ และคณะ, 2539) ปทุมมาและกระเจียวที่เป็นไม้ดอกมีลักษณะดีเด่น คือ มีสีสันสวยงาม แปลกตา และดอกมีอายุการใช้งานได้นาน จึงได้รับความนิยมในต่างประเทศโดยเฉพาะปทุมมา ซึ่งนิยมปลูกเป็นไม้ตัดดอกและไม้กระถางในประเทศเนเธอแลนด์ ญี่ปุ่น อเมริกา และนิวซีแลนด์ ทำให้ประเทศไทยผลิตและส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาอย่างต่อเนื่องมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 มีมูลค่าประมาณ 10-30 ล้านบาทต่อปี (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2545) จากความได้เปรียบด้านแหล่งพันธุกรรม และสภาพการผลิตที่เหมาะสม ปทุมมาจึงจัดอยู่ในกลุ่มไม้ดอกที่เน้นการผลิตเพื่อการส่งออก (กรมวิชาการเกษตร, 2544)

ปัจจุบันพันธุ์ปทุมมาที่ผลิต และส่งออกเป็นการค้ายังมีจำกัด ได้แก่ เชียงใหม่พิงค์ เชียงใหม่เรด และสโนว์ไวท์ เป็นต้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2545) เพื่อเพิ่มศักยภาพการแข่งขันในตลาดไม้ดอกโลกจึงมีการพัฒนาพันธุ์ปทุมมาอย่างต่อเนื่อง โดยการคัดเลือกปทุมมาพันธุ์ดีในสภาพธรรมชาติ และการสร้างลูกผสมพันธุ์ใหม่โดยการผสมข้ามสายพันธุ์ ข้ามชนิด และข้ามสกุลย่อย (กรมวิชาการเกษตร, 2544) ทำให้ได้ลูกผสมพันธุ์ใหม่หลายชนิดแต่ก็พบอุปสรรคสำคัญคือลูกผสมที่ได้เป็นหมัน เช่น การผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปทุมมากับบัวโกเมนทำให้ได้ปทุมมาลูกผสม (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*) ที่มีลักษณะดีแต่เป็นหมันจึงไม่สามารถนำไปผสมต่อเพื่อผลิตลูกผสม 3 สายพันธุ์ได้

จากรายงานการชักนำลูกผสมดิพลอยด์ที่เป็นหมันให้เป็นเททระพลอยด์ สามารถเพิ่มการติดเมล็ดได้ในพืชหลายชนิด เช่น กล้วยไม้ (สาริณี, 2538) ลิลี่ (Rhee *et al.*, 2005) ข้าว (สุพรรณญิกา, 2539) มันสำปะหลัง (Nassar, 2004) มะเขือ (Ali *et al.*, 1992) และขิง (Adaniya and Shirai, 2001) เป็นต้น จึงคาดว่าในการชักนำให้ปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ให้เป็นเททระพลอยด์จะสามารถเพิ่มการติดเมล็ดได้ โดยเลือกใช้วิธีการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยโคลชิซินร่วมกับการเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นวิธีการผลิตเททระพลอยด์ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าการชักนำนอกหลอดแก้วมาก (Ali *et al.*, 1992; Gao *et al.*, 1996; Petersen *et al.*, 2003; Takamura and Miyajima, 1996) และใช้ได้ผลดีในพืชสกุลขมิ้นและพืชวงศ์ขิง เช่น ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย ขิง และเปราะหอม (วัชรินทร์ และอรดี, 2543; อมรรัตน์ และอรดี, 2543; Adaniya and Shirai, 2001; Smith *et al.*, 2004) อย่างไรก็ดีเนื่องจากยังไม่พบรายงานการเพิ่มจำนวนยอดโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในปทุมมาลูกผสมพันธุ์นี้มาก่อน จึงทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอด เพื่อนำผลการทดลองมาใช้ในการเพิ่มจำนวนยอดปทุมมาลูกผสม สำหรับใช้เป็นวัสดุทดลองในการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยโคลชิซินร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงแบ่งเป็น 2 ตอน คือ ตอนที่ 1 ศึกษาอิทธิพลของชนิดของชิ้นส่วน ความเข้มข้น และระยะเวลาการให้ TDZ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดของปทุมมาลูกผสมโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และตอนที่ 2 ศึกษาอิทธิพลของระดับความเข้มข้นโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของต้นปทุมมาลูกผสมโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นแนวทางในการสร้างปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์และนำไปใช้ประโยชน์ในงานปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาอิทธิพลของชนิดของชิ้นส่วน ความเข้มข้นและระยะเวลาการให้ TDZ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดของปทุมมาลูกผสมโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.2 เพื่อศึกษาอิทธิพลของระดับความเข้มข้นโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของต้นปทุมมาลูกผสมโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.3 เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมพอลิพลอยด์เปรียบเทียบกับต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1.3.1 ชนิดของชิ้นส่วน ความเข้มข้น และระยะเวลาการให้ TDZ มีผลต่อจำนวนยอดและคุณภาพยอดของปทุมมาลูกผสมในหลอดแก้ว

1.3.2 ระดับความเข้มข้นของโคลชิซินมีผลต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของต้นปทุมมาลูกผสมในหลอดแก้ว

1.3.3 ระดับพลอยดีที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปทุมมาลูกผสมในหลอดแก้ว

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ทำการศึกษาในปทุมมาลูกผสม (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*) เพียง 1 ชนิด

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดปทุมมาลูกผสมโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและนำไปใช้ในการขยายพันธุ์ปทุมมาลูกผสมได้

1.5.2 ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมต้นปทุมมาลูกผสมร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และนำไปใช้สำหรับศึกษาการปรับปรุงความสมบูรณ์พันธุ์ของปทุมมาลูกผสมต่อไป

1.5.3 ทราบอิทธิพลของระดับพลอยดีต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสม และสามารถนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกระดับพลอยดีของต้นปทุมมาลูกผสมในสภาพหลอดแก้วได้

1.5.4 ได้ต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ที่จะนำไปใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในระยะออกดอกและทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ต่อไป

1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

จากการวิจัยครั้งนี้เพื่อทำการศึกษาผลกระทบของสัดส่วนสารอินทรีย์ธรรมชาติและผลกระทบของค่าความแรงประจุของสารอินทรีย์ธรรมชาติต่อกระบวนการกรองแบบนาโน-ฟิลเตรชัน ซึ่งสารอินทรีย์ธรรมชาติถือเป็นอีกส่วนหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อกระบวนการกรองแบบนาโนฟิลเตรชันดังนั้นประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยครั้งนี้มีดังต่อไปนี้

1.6.1 เพื่อเป็นองค์ความรู้หนึ่งเพื่อใช้ในการศึกษาและพัฒนาเมมเบรนในกระบวนการนาโนฟิลเตรชันได้ต่อไป

1.6.2 เพื่อหาแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพของการแยกสารอินทรีย์ธรรมชาติออกจากน้ำธรรมชาติ เพื่อป้องกันการเกิดสารก่อมะเร็งที่จะส่งผลต่อสุขภาพของมนุษย์

1.6.3 เพื่อเป็นองค์ความรู้หนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติของสารละลายให้เหมาะสมกับกระบวนการกรองแบบนาโนฟิลเตรชัน

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

2.1 ลักษณะพฤษศาสตร์ของพืชสกุลขมิ้น

พืชสกุลขมิ้น (*Curcuma*) จัดอยู่ในวงศ์ขิงข่า (Zingiberaceae) ในประเทศไทยมีพืชสกุลขมิ้นกระจายพันธุ์อยู่มากกว่า 30 ชนิด โดยมีการนำไปใช้ประโยชน์เป็นสมุนไพร เช่น ขมิ้นชัน ว่านนางคำและว่านชักมดลูก เป็นต้น และใช้เป็นไม้ดอกไม้ประดับ เช่น ปทุมมา บัวโกเมน และเทพอัปสร เป็นต้น นักพฤษศาสตร์แบ่งพืชสกุลขมิ้น (*Curcuma*) ออกเป็น 2 สกุลย่อย คือ กลุ่มกระเจียว (Eucurcuma) และกลุ่มปทุมมา (Paracurcuma) ตามลักษณะดอก อับเรณู ใบประดับ และช่อดอก โดยลักษณะเด่นของพืชกลุ่มกระเจียวคือ กลีบปากมักมีสีขาวหรือเหลือง ได้แก่ ฉัตรทิพย์ ฉัตรทอง และอุษา เป็นต้น ส่วนพืชกลุ่มปทุมมาจะมีลักษณะเด่นคือ ปากกลีบสเตมิโนด (staminode) มีสีม่วงน้ำเงิน ได้แก่ ปทุมมา บัวโกเมน และเทพอัปสร เป็นต้น พืชสกุลขมิ้นมีลำต้นใต้ดินทำหน้าที่สะสมน้ำและอาหาร เรียกว่า เหง้า (rhizome) ตาข้างของเหง้าจะเจริญเติบโตเป็นลำต้นเทียม (pseudostem) ซึ่งประกอบด้วยกาบใบที่ห่อตัวกันแน่นอยู่เหนือดิน โดยลำต้นเทียมของพืชสกุลนี้เกือบทั้งหมดจะมีก้านใบแยกออกจากลำต้นเทียมในลักษณะคล้ายต้นกล้วย มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่ลำต้นเทียมมีลักษณะคล้ายต้นพุทธรักษา ใบเป็นใบเดี่ยวมีเส้นใบขนานแบบเฉียงขึ้น ช่อดอกเป็นแบบช่อแน่น (compact spike) โดยกลีบใบประดับส่วนล่าง (bract) จะเวียนซ้อนกันเกิดเป็นช่อทรงกระบอก โคนใบประดับจะเชื่อมกันเกิดเป็นถ้วยมีช่อดอกย่อยบรรจุอยู่ ใบประดับส่วนบน (coma bract) มีรูปร่างหรือสีสันแตกต่างจากใบประดับส่วนล่าง ดอกย่อยแต่ละช่อมีดอก 2-7 ดอก ดอกมีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ มีกลีบสเตมิโนด 3 กลีบ โดยมี 1 กลีบเปลี่ยนเป็นกลีบปาก ยอดเกสรตัวเมียอยู่สูงกว่าปลายอับละอองเกสรเล็กน้อย ดอกบานเวลาประมาณ 7.30-8.00 น. และการถ่ายละอองเรณูเกิดได้ดีในช่วงเวลาไม่เกิน 10.00 น. ภายหลังการปฏิสนธิผลจะพัฒนาเต็มที่เมื่อมีอายุประมาณ 1-2 เดือน เมล็ดมีขนาดและรูปร่างคล้ายเมล็ดองุ่น ที่ปลายของเมล็ดมีเยื่อบางสีขาวรูปแฉกช่วยให้เมล็ดลอยน้ำเหมาะต่อการกระจายพันธุ์ในช่วงฤดูฝน รากเป็นระบบรากฝอย ปลายรากส่วนหนึ่งบวมพองมีลักษณะคล้ายตุ้มทำหน้าที่สะสมอาหาร (สุรวิช, 2539)

2.2 ลักษณะพฤษศาสตร์ของปทุมมาลูกผสม

ต้นปทุมมาลูกผสม (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*; 2n=28) ในหลอดแก้วที่ใช้เป็นวัสดุทดลองในทุกการทดลอง เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปทุมมา (*C. alismatifolia*; 2n=32) กับบัวโกเมน (*C. rhabdota*; 2n=24) โดยคุณวิภาดา ทองทักษิณ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ลักษณะเด่นของปทุมมาลูกผสมพันธุ์นี้คือ มีใบประดับส่วนล่างสีเขียวมีลายสีน้ำตาลและแต้มสีชมพู 2 แต้มที่คล้ายบัวโกเมน และมีใบประดับส่วนบนสีขาวขนาดใหญ่คล้ายปทุมมา ใบมีรูปรียาวปลายใบแหลม แผ่นใบเรียบ เส้นกลางใบมีสีน้ำตาล ต้นปทุมมาลูกผสมจากหลอดแก้วสามารถออกดอกได้ในฤดูแรกของการปลูก โดยต้นที่เจริญเติบโตเต็มที่จะมีความสูงประมาณ 50-55 ซม มีใบ 7-8 ใบ ช่อดอกยาวประมาณ 11-12 ซม มีใบประดับส่วนล่าง (bract) 8-9 กลีบ และมีใบประดับส่วนบน (coma bract) 10 กลีบ ปทุมมาลูกผสมชนิดนี้เป็นหมันไม่สามารถผลิตเมล็ดได้

2.3 การขยายพันธุ์พืชสกุลขมิ้นโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมี 5 ขั้นตอน คือ 1) การเตรียมต้นแม่ 2) การเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ปลอดเชื้อและตั้งตัวได้ 3) การเพิ่มจำนวนยอด 4) การทำให้เกิดรากและเตรียมพร้อมสำหรับการย้ายปลูก และ 5) การย้ายต้นออกปลูกนอกหลอดแก้ว (พรพิมล, 2547) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลขมิ้นเริ่มต้นจากการนำตาข้างจากเหง้ามาฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้เอทานอล และโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (สุรวิช, 2535; Mukhri and Yamaguchi, 1986; Prathanturarug *et al.*, 2003) หรือ $HgCl_2$ (Islam *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2004; Salvi *et al.*, 2002) นำชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่มี 6-benzylaminopurine (BAP) 1-3 มก/ล เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ และคัดเลือกชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อไปใช้ในการขยายพันธุ์ (Islam *et al.*, 2004; Prathanturarug *et al.*, 2003; Rahman *et al.*, 2004) แต่เนื่องจากตาข้างจากเหง้าเป็นชิ้นส่วนที่ทำให้ปลอดเชื้อได้ยากจึงมีการนำช่อดอกอ่อนซึ่งสะอาดกว่ามาใช้กันมากขึ้น โดยนำช่อดอกอ่อนที่ยังมีใบปิดหุ้มอยู่มาฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้เอทานอลและโซเดียมไฮโปคลอไรด์ และตัดเป็นท่อนราว 1 ซม เลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP 5-10 มก/ล ร่วมกับ indol-3-acetic acid (IAA) 0.1 มก/ล (นพมณี และคณะ, 2543; สุรวิช, 2535) จากนั้นราว 1-2 เดือน จะเกิดกลุ่มยอดซึ่งเป็นยอดที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการผันกลับของส่วนที่เป็น floral primodia โดยไม่ผ่านแคลลัส (นพมณี และคณะ, 2543) นำยอดที่เจริญจากตาข้างหรือช่อดอกอ่อนมาเพิ่มจำนวนยอดในอาหารสูตร MS ที่มี BAP 3-5 มก/ล จะได้จำนวนยอดเพิ่มขึ้น 2-4 ยอดต่อชิ้นส่วน ในระยะเวลา 4-6 สัปดาห์ (ทิพย์สุดา, 2540; สุมนา และคณะ, 2542; สุรวิช, 2535) ส่วนการทำให้เกิดรากนั้นพบว่าขมิ้นชัน (*C. longa* Linn.) เกิดรากได้ดีในอาหารสูตร MS ที่มี

α-naphthaleneacetic acid (NAA) 1 มก/ล ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ (สุมนา และคณะ, 2542) และในอาหารสูตร MS ที่ลดปริมาณเกลือลงครึ่งหนึ่ง และเติม NAA, 3-indolebutyric acid (IBA) หรือ IAA 0.1-1.0 มก/ล เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (Rahman *et al.*, 2004) หรือสามารถเกิดรากได้เองในสูตรอาหารที่ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนยอด (สุมนา และคณะ, 2542; Salvi *et al.*, 2002) หลังจากนั้นจึงย้ายต้นอ่อนที่มีความสูงประมาณ 6-8 ซม มีใบ 2-3 ใบ และมีราก 2-3 ราก จากหลอดแก้วไปเลี้ยงในวัสดุปลูกและอนุบาลในเรือนเพาะชำประมาณ 1 เดือน (Prathanturarug *et al.*, 2003) และย้ายต้นกล้าไปปลูกในแปลงซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1-2 ปี จึงผลิตดอกหรือหัวพันธุ์ได้ (สุรวิช, 2539)

โดยที่การเพิ่มจำนวนยอดเป็นขั้นตอนสำคัญที่กำหนดปริมาณของต้นอ่อนที่จะได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่จากรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลขมิ้น ได้แก่ ขมิ้นชัน (*C. longa* Linn.) (วัชรินทร์ และอรดี, 2543; สุมนา และคณะ, 2542; Rahman, 2004; Salvi *et al.*, 2002) ขมิ้นอ้อย (*C. zedoaria* Rosc.) (วัชรินทร์ และอรดี, 2543; Loc *et al.*, 2005; Mello *et al.*, 2000) กระเจียวส้ม (*C. roscoeana* Wall.) (Sotthikul and Apavatjrut, 1997) กระเจียวพลอยทักษิณ (*C. aurantiaca* van Zijp.) (ทิพย์สุดา, 2540) และปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagn.) (สุรวิช, 2539; Udomdee *et al.*, 2003) พบว่าการเพิ่มจำนวนยอดเกิดได้ไม่มากนักคือราว 2-6 ยอดต่อชิ้นส่วนเท่านั้น จากการตรวจเอกสารพบว่ามีปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการเพิ่มจำนวนยอดมีหลายประการด้วยกัน คือ ชนิดของสูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ขนาดและอายุของชิ้นส่วนตั้งต้น และสภาวะของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ดังจะได้อธิบายปัจจัยต่างๆ ต่อไปนี้

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดพืชสกุลขมิ้น

2.4.1 สูตรอาหาร

จากการตรวจเอกสารพบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลขมิ้น และพืชวงศ์ขิงข่าส่วนใหญ่จะใช้อาหารสูตร MS โดยมีรายงานว่าพืชสกุลขมิ้น ได้แก่ ขมิ้นชัน (สุมนา และคณะ, 2542; Islam *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2004; Salvi *et al.*, 2002) ขมิ้นอ้อย (Loc *et al.*, 2005; Mello *et al.*, 2000; Miachir *et al.*, 2004) กระเจียวส้ม (Sotthikul and Apavatijrut, 1997) ว่านนางคำ (*C. aromatica* Salisb.) (Nayak, 2000) กระเจียวพลอยทักษิณ (ทิพย์สุดา, 2540) และปทุมมา (สุรวิช, 2535; Topoonyanont *et al.*, 2005; Udomdee *et al.*, 2003) สามารถเกิดยอดและเจริญเติบโตได้ดีในสูตรอาหาร MS เช่นเดียวกับพืชวงศ์ขิงอื่นๆ ได้แก่ ขิง (*Zingber officinale* Rose.) (Khatun *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 1997; Sharma and Singh,1997) ไพล (*Z. cassumunar* Roxb.) (Chirangini and Sharma, 2005) *Z. petiolatum* Holttum. (Prathanturarug *et al.*, 2004) กระทือ (*Z. zerumbet* Smith.) (Nalawade *et al.*, 2003) และเปราะหอม (*Kaempferia galanga* Linn.) (อมรรัตน์ และอรดี, 2543;

Chirangini *et al.*, 2005; Swapna *et al.*, 2004) นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนยอดของกระวาน 2 ชนิด คือ กระวานไทย (*Amomum krervanh* Pierre ex. Gagnep.) และกระวานอัฟริกัน (*Aframomum corrorima* Braun Jansen.) พบว่าสูตรอาหาร MS ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนยอดและจำนวนใบมากกว่าอาหารสูตร Schenk and Hildebrandt (SH) อย่างมีนัยสำคัญ (Tefera and Wannakrairoj, 2004a; Tefera and Wannakrairoj, 2004b) จึงอาจกล่าวได้ว่าสูตรอาหาร MS เป็นสูตรที่นิยมใช้เพิ่มจำนวนยอดของพืชสกุลขมิ้นได้ดี

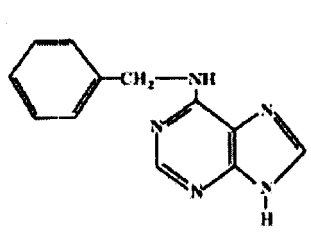
2.4.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนิน (cytokinin) และออกซิน (auxin) มีบทบาทสำคัญยิ่งต่อการเพิ่มจำนวนยอด การสร้างแคลลัส และการสร้างรากในหลอดแก้ว Skoog และ Miller (1957) เป็นผู้แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนระหว่างไซโตไคนินและออกซินในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นปัจจัยที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์และการเกิดยอดหรือราก โดยทำการศึกษาในเนื้อเยื่อแกนลำต้น (pith) ของยาสูบ กล่าวคือเมื่ออัตราส่วนไซโตไคนินต่อออกซินสูงมีผลชักนำให้เกิดยอด ในขณะที่อัตราส่วนไซโตไคนินต่อออกซินต่ำมีผลชักนำให้เกิดราก และหากอัตราส่วนนี้เท่ากันมีผลชักนำให้เกิดแคลลัส (Skoog and Miller, 1957 อ้างโดย George, 1993)

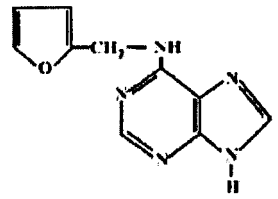
จากรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลขมิ้นพบว่าพืชสกุลขมิ้นบางชนิดสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ดีในอาหารที่เติมทั้งไซโตไคนินและออกซิน เช่น ขมิ้นชัน และขมิ้นอ้อย (Islam *et al.*, 2004; Loc *et al.*, 2005; Salvi *et al.*, 2002) และพืชสกุลขมิ้นหลายชนิดสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ดีในอาหารที่เติมไซโตไคนินเพียงอย่างเดียวโดยไม่เติมออกซิน เช่น ว่านนางคำ กระเจียวส้ม กระเจียวพลอยทักษิณ และปทุมมา (ทิพย์สุดา, 2540; สุรวิช, 2535; Nayak, 2000; Sotthikul and Aparatjrut, 1997; Udomdee *et al.*, 2003) สำหรับขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยนั้นสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ดีทั้งในกรณีที่มีและไม่มีออกซิน (วัชรินทร์ และอรดี, 2543; สุมนา และคณะ, 2542; Mello *et al.*, 2000; Miachir *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมออกซิน (NAA) ร่วมกับ ไซโตไคนินในการเพาะเลี้ยงปลายยอดขมิ้นชัน และไพลมีผลส่งเสริมการเจริญของยอดแต่ทำให้จำนวนยอดลดลง (Poonsapaya and Kraisinta, 1993; Prathaturarug *et al.*, 2003; Prathanturarug *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2004)

ไซโตไคนินแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มพิวรีน และกลุ่มฟีนิลยูเรีย ไซโตไคนินกลุ่มพิวรีนที่รู้จักกันดี ได้แก่ 6-benzylaminopurine (BAP), kinetin (Kin) และ 6-γ,γ-dimethylallylaminopurine (2iP) (พรพิมล, 2547) ส่วนไซโตไคนินกลุ่มฟีนิลยูเรียที่รู้จักกันดี ได้แก่ N-phenyl-N'1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron; TDZ) และ N-(2-chloro-4-pyridyl)-

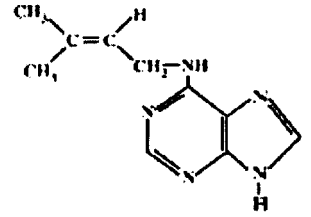
N'phynylurea (CPPU) (Fellman *et al*, 1987) (ภาพที่ 1) จากรายงานการเพิ่มจำนวนยอดของพืชสกุลขมิ้นและพืชวงศ์ขิงโดยใช้ไซโตไคนินกลุ่มพิวรีน และกลุ่มฟีนิลยูเรีย พบว่าชนิดและความเข้มข้นของไซโตไคนินมีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดและคุณภาพของยอดเป็นอย่างมาก



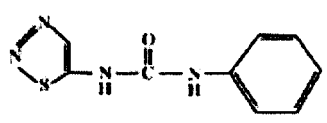
6-benzylamino purine (BA)



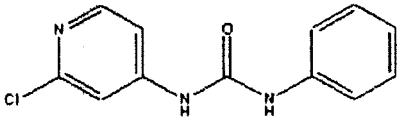
kinetin



N^6-(^{2}-isopentyl) adenine (2iP)



thidiazuron



CPPU

ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของ BAP, Kin, 2iP, TDZ (Kieber, 2002) และ CPPU (Wuzhou International Co., Ltd., 2006)

2.4.2.1 ไซโตไคนินกลุ่มพิวรีน

1) ชนิดของไซโตไคนินในกลุ่มพิวรีน

ไซโตไคนินในกลุ่มพิวรีนแต่ละชนิดสามารถกระตุ้นการเกิดยอดได้แตกต่างกัน ซึ่งพบว่า BAP สามารถกระตุ้นการเกิดยอดได้มากกว่า Kin และ 2iP โดยการเลี้ยงปลายยอดขมิ้นชันความสูง 1 ซม ที่ผ่าเป็น 4 ส่วนเท่าๆกันในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP Kin หรือ 2iP ความเข้มข้น 8 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และย้ายไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตอีก 2 สัปดาห์ พบว่า BAP ให้จำนวนยอดเฉลี่ย (4.8 ยอดต่อชิ้นส่วน) มากกว่า Kin และ 2iP อย่างมีนัยสำคัญ (2.4 และ 2.2 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ) (Prathanturarug *et al.*, 2003) และการเลี้ยงตาข้างขมิ้นชันที่งอกจากเหง้าในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มก/ล เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 7.8, 8.2, 14.5, 12, 11.2 และ 10.3 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่การเลี้ยงใน Kin ความเข้มข้นเดียวกันให้จำนวนยอดเฉลี่ยเพียง 4.4, 5.0, 7.5, 7.0, 6.2 และ 5.5 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ (Rahman *et al.*, 2004) BAP จึงเป็นไซโตไคนินที่ใช้กันทั่วไปในการเพิ่มจำนวนยอดพืชสกุลขมิ้น เช่น ขมิ้นชัน (วัชรินทร์, 2544; สุมนา, 2542; Balachandran *et al.*,

1990; Islam *et al.*, 2004), ขมิ้นอ้อย (วัชรินทร์, 2544; Loc *et al.*, 2005; Mello *et al.*, 2000), กระเจียว พลอยทักษิณ (ทิพย์สุดา, 2540) และปทุมมา (สุรวิช, 2535; Udomdee *et al.*, 2003;) และพืชวงศ์ขิงชนิดอื่นๆ เช่น ขิง (Adaniya and Shirai, 2001; Balachandran *et al.*, 1990), ไพล (Chirangini and Sharma, 2005) หงส์เหินดอกขาว (*Globba winitii* Wright.) (ธิดา, 2544) และเปราะหอม (อมรรัตน์ และอรดี, 2543) เป็นต้น

2) ความเข้มข้นของ BAP ต่อการเพิ่มจำนวนยอดในพืชสกุลขมิ้นและพืชวงศ์ขิง

ความเข้มข้นของ BAP มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดในพืชสกุลขมิ้นและพืชวงศ์ขิง โดยพบว่า BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 1 มก/ล (0.1-0.5 มก/ล) มีผลกระตุ้นการเกิดยอดใหม่ได้ไม่มากนักแต่ส่งเสริมการเจริญของยอดได้ดี ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดและรากอยู่ในช่วง 1-3 มก/ล ส่วนความเข้มข้นที่สูงกว่า 3 มก/ล อาจมีผลทำให้จำนวนยอดเฉลี่ยลดลง หรือกระตุ้นให้เกิดยอดมากขึ้นแต่ยอดที่ได้ถูกยับยั้งความสูงและการเกิดราก

การเลี้ยงปลายยอดหงส์เหินดอกขาวในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP 0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะได้จำนวนยอดเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยจำนวนยอดที่ได้จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ BAP ที่เพิ่มขึ้นคือ 1.0, 1.7, 2.6, 3.8 และ 5.6 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ แต่ความเข้มข้น BAP ที่เพิ่มขึ้นมีผลให้ความสูงของยอด จำนวนใบ จำนวนราก และความยาวราก ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน โดยการใช้ BAP ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 มก/ล ให้ความสูงของยอดเฉลี่ย 2.3, 4.9, 3.5, 1.9 และ 1.8 ซม, จำนวนใบเฉลี่ย 2.1, 3.0, 3.0, 1.2 และ 1.0 ใบ, จำนวนรากเฉลี่ย 2.0, 7.9, 7.7, 2.0 และ 1.3 ราก และความยาวรากเฉลี่ย 0.7, 2.0, 2.4, 1.1 และ 0.3 ซม ตามลำดับ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสรุปว่า BAP ความเข้มข้น 0.5 มก/ล เหมาะสำหรับการเจริญเติบโต ส่วน BAP ความเข้มข้น 5 มก/ล เหมาะสำหรับการชักนำให้เกิดยอด นอกจากนี้ยังพบว่ายอดใหม่ที่ได้รับ BAP 0.5 และ 1.0 มก/ล มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่ายอดที่ไม่ได้รับ BAP อีกด้วย (ธิดา, 2544)

ในขมิ้นชันพบว่าชิ้นส่วนตาข้างที่งอกจากเหง้ามีแนวโน้มให้จำนวนยอด และความสูงของยอดลดลงเมื่อได้รับ BAP ความเข้มข้นสูง (3-5 มก/ล) โดยตาข้างที่เลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มก/ล เป็นเวลา 6 สัปดาห์ มีจำนวนยอดเฉลี่ย 7.8, 8.2, 14.5, 12, 11.2 และ 10.3 ยอดต่อชิ้นส่วน และมีความสูงของยอดเฉลี่ย 4.0, 5.5, 6.2, 4.0, 3.3 และ 3.8 ซม ตามลำดับ ผู้วิจัยสรุปว่า BAP ความเข้มข้น 2 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยและความสูงยอดสูงที่สุดจึงเหมาะจะใช้ในการเพิ่มจำนวนยอด (Rahman *et al.*, 2004) นอกจากนี้ BAP ความเข้มข้นสูงกว่า 3 มก/ล มีแนวโน้มจะทำให้จำนวนยอดและจำนวนรากลดลง โดยปลายยอดขมิ้นชันที่เลี้ยงใน

อาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP ความเข้มข้น 0, 1, 3, 6 และ 9 มก/ล เป็นเวลา 2 เดือน มีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.1, 2.3, 2.7, 2.0 และ 2.0 ยอดต่อชิ้นส่วน และมีจำนวนรากเฉลี่ย 4.5, 5.5, 5.7, 3.3 และ 2.3 ราก ตามลำดับ ซึ่ง BAP ความเข้มข้น 6 และ 9 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยและจำนวนรากเฉลี่ยน้อยกว่า BAP ความเข้มข้น 3 มก/ล อย่างมีนัยสำคัญ (วัชรินทร์, 2544) เช่นเดียวกับในขมิ้นอ้อยที่การเลี้ยงปลายยอดในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP ความเข้มข้น 0, 1, 3, 6 และ 9 มก/ล เป็นเวลา 2 เดือน ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 1.0, 1.6, 2.4, 2.1 และ 2.1 ยอดต่อชิ้นส่วน และมีจำนวนรากเฉลี่ย 3.4, 3.9, 5.7, 3.8 และ 3.5 ราก โดย BAP ความเข้มข้น 6 และ 9 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยและจำนวนรากเฉลี่ยน้อยกว่า BAP ความเข้มข้น 3 มก/ล อย่างมีนัยสำคัญ (วัชรินทร์, 2544)

ในพืชสกุลขมิ้นและพืชวงศ์ขิงชนิดต่างๆ ที่พบว่า BAP ความเข้มข้น 1-3 มก/ล เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอด ได้แก่ ขิง (Adaniya and Shirai, 2001; Balachandran *et al.*, 1990), เปราะหอม (อมรรัตน์ และอรดี, 2543), ขมิ้นชัน (Balachandran *et al.*, 1990; Islam *et al.*, 2004; Salvi *et al.*, 2002), ขมิ้นอ้อย (Loc *et al.*, 2005; Mello *et al.*, 2000) กระเจียวพลอยทักษิณ (ทิพย์สุดา, 2540) และปทุมมา (สุรวิช, 2535; Udomdee *et al.*, 2003) โดยจะให้จำนวนยอดใหม่ 2-6 ยอดต่อชิ้นส่วน ภายใน 6-8 สัปดาห์

2.4.2.2 ไซโตไคนินกลุ่มฟีนิลยูเรีย

1) ความเข้มข้นของ TDZ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดในพืชสกุลขมิ้นและพืชวงศ์ขิง

ไซโตไคนินกลุ่มฟีนิลยูเรียที่เป็นรู้จักกันดีและใช้กันมากคือ TDZ ส่วน CPPU ยังใช้กันไม่มากนัก TDZ มีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นให้เกิดกลุ่มยอดจำนวนมาก การให้ TDZ แก่ชิ้นส่วนพืชอาจแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ การให้ TDZ ความเข้มข้นต่ำ (0.1-0.5 มก/ล) เป็นระยะเวลาหลายสัปดาห์ และการให้ TDZ ความเข้มข้นสูง (4-16 มก/ล) ในระยะเวลาสั้นๆ โดยพบว่าการให้ TDZ ความเข้มข้นต่ำเป็นระยะเวลาหลายสัปดาห์สามารถกระตุ้นการเกิดยอดได้ดี เช่น การเลี้ยงปลายยอดปทุมมาในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี TDZ 0, 0.1 และ 0.5 มก/ล เป็นเวลา 6 สัปดาห์ มีจำนวนยอดเฉลี่ย 0, 4.5 และ 9.3 ยอดต่อชิ้นส่วน และยอดใหม่ที่เจริญจากชิ้นส่วนที่ได้รับ TDZ มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากยอดปกติคือ ยอดสั้น ใบสั้นและแคบ (Topoonyanont *et al.*, 2005)

การเลี้ยงปลายยอดกระวานไทยในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี TDZ 0, 0.1 และ 0.5 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 มก/ล ให้จำนวนยอดและความสูงยอดไม่แตกต่างกัน แต่ให้จำนวนรากน้อยกว่าการไม่เติม TDZ อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 3.4, 6.6 และ 7.9 ยอดต่อชิ้นส่วน, มีความสูงของยอดเฉลี่ย 7.8, 5.4 และ 4.3 ซม และมีจำนวนรากเฉลี่ย 5.26, 2.95 และ 1.8 ราก ตามลำดับ (Tefera and Wannakrairoj,

2004b) และการเลี้ยงปลายยอดกระวานอัฟริกันในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี TDZ 0, 0.1 และ 0.5 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 มก/ล ให้จำนวนยอดและความสูงยอดไม่แตกต่างกัน แต่ให้ความสูงของยอดและจำนวนรากน้อยกว่าการไม่เติม TDZ อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.3, 10.3 และ 15.5 ยอดต่อชิ้นส่วน, มีความสูงของยอดเฉลี่ย 6.7, 2.6 และ 1.8 ซม และมีจำนวนรากเฉลี่ย 10.5, 0.2 และ 0.3 ราก ตามลำดับ (Tefera and Wannakrairoj, 2004a) แสดงให้เห็นว่าปทุมมา, กระวานไทย และกระวานอัฟริกันมีแนวโน้มให้จำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้น TDZ จาก 0.1 เป็น 0.5 มก/ล แต่การเพิ่มความเข้มข้น TDZ มีผลทำให้ยอดใหม่มีความสูงและการเกิดรากลดลง

ส่วนการให้ TDZ ความเข้มข้นสูงในระยะเวลาสั้นเป็นวิธีที่ใช้ได้ผลดีในกระตุ้นการสร้างตายอด (Fellman *et al.*, 1987; Visser *et al.*, 1992) และกระตุ้นการแตกตาข้างได้ในพืชหลายชนิด (Cao *et al.*, 2002; Caramori *et al.*, 2001; Goldfarb *et al.*, 1991; Pelletier *et al.*, 2004; Singh and Syamal, 2001) เช่น การให้ TDZ ความเข้มข้น 10^2-10^4 µM แก่แผ่นใบพิทูเนีย (*Petunia x hybrida* Hort. Vilm.-Andr.) เป็นเวลา 30 วินาที แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตอีก 8 สัปดาห์ สามารถชักนำการสร้างตายอดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Fellman *et al.*, 1987) ส่วนการกระตุ้นการแตกตาข้างจากยอดเดิมพบว่าการให้ TDZ ความเข้มข้น 22 มก/ล แก่ยอดกุหลาบ (*Rosa hybrida* L.) ในหลอดแก้วเป็นเวลา 15 นาที สามารถกระตุ้นการเกิดยอดได้เป็นจำนวนมาก (Singh and Syamal, 2001) เช่นเดียวกับการให้ TDZ ความเข้มข้น 0.004-1.1 มก/ล แก่ meristem ของฝ้าย (*Gossypium hirsutum*L.) เป็นเวลา 3 วัน (Caramori *et al.*, 2001) และการให้ TDZ ความเข้มข้น 0.002-0.22 มก/ล แก่ meristem ของสน (*Pinus banksiana* Lamb.) เป็นเวลา 3 วัน ซึ่งสามารถกระตุ้นการแตกยอดได้เป็นจำนวนมาก (Pelletier *et al.*, 2004)

ในพืชสกุลขมิ้นและพืชวงศ์ขิงพบว่าการให้ TDZ ความเข้มข้นสูงในระยะเวลาสั้นแล้วย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถกระตุ้นการเกิดยอดได้ดีเช่นเดียวกับการให้ TDZ ความเข้มข้นต่ำเป็นระยะเวลาหลายสัปดาห์ เช่น การเลี้ยงปลายยอดขมิ้นชันในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0, 4, 8, 12 และ 16 มก/ล เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตอีก 8 สัปดาห์ มีแนวโน้มที่จำนวนยอดเฉลี่ยจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ TDZ ที่สูงขึ้น คือ 2, 6, 9, 10 และ 11 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับของความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก (Prathanturarug *et al.*, 2005) ซึ่งเป็นจำนวนยอดที่ใกล้เคียงกับการเลี้ยงปลายยอดขมิ้นชันในอาหารสูตร MS ที่มี TDZ 1, 2 และ 4 มก/ล นาน 8 สัปดาห์ และย้ายไปเลี้ยงในอาหารปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตอีก 4 สัปดาห์ โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ย 11.5, 12.5 และ 13.3 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ (Prathanturarug *et al.*,

2003) การเลี้ยงปลายยอดขมิ้นชันในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 4 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตอีก 8 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดเฉลี่ย (18.2 ยอดต่อชิ้นส่วน) ใกล้เคียงกับการเลี้ยงปลายยอดขมิ้นชันในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 16 มก/ล เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตอีก 8 สัปดาห์ (14.5 ยอดต่อชิ้นส่วน) (นพมาศ และคณะ, 2546) แสดงให้เห็นว่าการให้ TDZ ความเข้มข้น 4 มก/ล จะต้องใช้ระยะเวลานานถึง 4 สัปดาห์ ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนยอด แต่การให้ TDZ ความเข้มข้นสูง 16 มก/ล เพียง 1 สัปดาห์ เป็นระยะเวลาที่เพียงพอต่อการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนยอดในขมิ้นชัน อย่างไรก็ดีการให้ TDZ ความเข้มข้นสูงเป็นเวลานานจะส่งผลในทางลบกับพืช เช่น ยอดสั้น เกิดรากน้อย เนื้อเยื่อกลายเป็นสีน้ำตาล และตายได้ (Lu, 1993; Pelletier *et al.*, 2004; West and Preece, 2004) ซึ่งส่วนหนึ่งอาจเกิดจาก TDZ ความเข้มข้นสูงมีผลกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนเอทธิลีนซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (Murthy *et al.*, 1998)

(2) การเปรียบเทียบการใช้ BAP และ TDZ

จากรายงานการใช้ TDZ ในพืชสกุลขมิ้นและพืชวงศ์ขิงอื่นๆ พบว่า TDZ สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนยอดได้มากกว่า BAP เช่น การเลี้ยงปลายยอดปทุมมาในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี TDZ 0.1 และ 0.5 มก/ล เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 4.5 และ 9.3 ยอดต่อชิ้นส่วน ซึ่งเป็นจำนวนยอดที่มากกว่าการใช้ BAP ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากันอย่างมีนัยสำคัญ (1.0 และ 1.5 ยอดต่อชิ้นส่วน) ส่วนการเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ หรือ BAP ไม่พบการเกิดยอด (Topoonyanont *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับการเลี้ยงปลายยอดขมิ้นชันในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี TDZ หรือ BAP ความเข้มข้น 0, 4, 8, 12 และ 16 มก/ล เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตอีก 8 สัปดาห์ พบว่าการใช้ TDZ ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 2, 6, 9, 10 และ 11 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่การเลี้ยงใน BAP ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากันให้จำนวนยอดเพียง 2-3 ยอดต่อชิ้นส่วน (Prathanturarug *et al.*, 2005)

การเลี้ยงปลายยอดกระวาน 2 ชนิด คือ กระวานไทย และกระวานอัฟริกันในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี TDZ หรือ BAP ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากระวานไทยที่ได้รับ TDZ ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3.4, 6.6 และ 7.9 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ ซึ่งเป็นจำนวนยอดที่มากกว่าการให้ BAP ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากันคือ 3.8, 4.3 และ 4.7 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ (Tefera and Wannakrairoj, 2004b) ซึ่งสอดคล้องกับการเลี้ยงกระวานอัฟริกันที่พบว่าการได้รับ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะให้จำนวนยอดเฉลี่ย 2.3, 10.3 และ 15.5 ยอดต่อชิ้นส่วน ซึ่งเป็นจำนวนยอดที่มากกว่าการให้ BAP ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากันคือ 2.6, 4.7 และ 3.8 ยอดต่อชิ้นส่วน (Tefera and Wannakrairoj, 2004a)

แสดงให้เห็นว่าที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน TDZ สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนยอดของพืชสกุลขมิ้นและพืชวงศ์ขิงได้มากกว่า BAP ประมาณ 2-6 เท่า แต่ในขณะเดียวกันก็พบว่า TDZ มีผลยับยั้งความสูงของยอดและยับยั้งการเกิดรากของปทุมมา, กระวานไทย และกระวานอัฟริกันมากกว่า BAP (Tefera and Wannakrairoj, 2004a; Tefera and Wannakrairoj, 2004b; Topoonyanout *et al.*, 2005) อย่างไรก็ดีพบว่าการย้ายกลุ่มยอดขมิ้นชัน, ปทุมมา และกระวานที่ได้รับ TDZ ไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4-8 สัปดาห์ ช่วยให้การยืดยาวของยอดและการเกิดรากเป็นปกติได้ (Prathanturarug *et al.*, 2003; Prathanturarug *et al.*, 2005; Tefera and Wannakrairoj, 2004a; Tefera and Wannakrairoj, 2004b; Topoonyanout *et al.*, 2005)

2.4.3 ขนาด และอายุของชิ้นส่วน

การเพาะเลี้ยงปลายยอดกระเจียวพลอยทักษิณที่ได้จากต้นอ่อนที่ตัดใบ และรากให้ชิ้นส่วนมีความสูงจากโคนต้น 0.3-1.5 ซม ในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP 3 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 0.3 ซม มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากกว่าชิ้นส่วนขนาด 0.5, 1.0 และ 1.5 ซม อย่างมีนัยสำคัญ แต่ยอดใหม่ที่เจริญจากชิ้นส่วนขนาด 0.3 ซม. มีความสูงน้อยกว่ายอดที่เจริญจากชิ้นส่วนขนาด 1.0 และ 1.5 ซม อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าการเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดกระเจียวพลอยทักษิณขนาด 1 ซม ที่ผ่าครึ่งและไม่ผ่าในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP 3 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนไม่แตกต่างกัน แต่ชิ้นส่วนที่ผ่าครึ่งให้ความสูงยอดใหม่และจำนวนรากน้อยกว่าชิ้นส่วนที่ไม่ผ่าอย่างมีนัยสำคัญ (ทิพย์สุดา, 2540) การเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดขมิ้นชันที่ผ่าเป็น 4 ชิ้นส่วนเท่าๆ กันและไม่ผ่า ในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี TDZ 4 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตอีก 4 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนใกล้เคียงกัน (Prathanturarug *et al.*, 2003) และการเลี้ยงปลายยอดของกระเจียวส้มที่ได้จากต้นอ่อนอายุ 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ ที่ตัดใบและรากให้ชิ้นส่วนมีความสูงจากโคนต้น 1 ซม และผ่าครึ่งตามยาว ในอาหารสูตร MS ที่มี Kin 0.25 มก/ล พบว่าชิ้นส่วนโคนต้นผ่าครึ่งที่มีอายุ 4, 6 และ 8 สัปดาห์ ให้ยอดใหม่ที่มีคุณภาพดีกว่าชิ้นส่วนที่มีอายุ 2 เดือน (Sotthikul and Apavatjrut, 1996)

2.4.4 สภาวะของอาหาร

สภาวะของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอด และการเจริญพัฒนาของยอด โดยพบว่าการเลี้ยงปลายยอดขมิ้นชันในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี BAP 1 มก/ล และ NAA 0.2 มก/ล จะส่งเสริมการเพิ่มจำนวนยอด ความสูงของยอด จำนวนราก และความยาวรากมากกว่าการเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตรเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Salvi *et al.*, 2002) และการเลี้ยงปลายยอดกระทือในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี BAP 4 มก/ล มีอัตราการเพิ่มจำนวนยอด

สูงกว่าการเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตรเดียวกัน (Nalawade *et al.*, 2003) ส่วนการเลี้ยงปลายยอดขิงในอาหารเหลวและอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP 2 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน แต่ยอดใหม่ที่ได้จากการเลี้ยงอาหารเหลวมีคุณภาพยอดที่ดีกว่าโดยได้ยอดใหม่ที่มีน้ำหนักสด และความสูงมากกว่าการเลี้ยงในอาหารวุ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Adeniya and Shirai, 2001) อย่างไรก็ดีการเลี้ยงปลายยอดกระเจียวพลอยทักษิณในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี BAP 3 มก/ล มีจำนวนต้นเฉลี่ยน้อยกว่าการเลี้ยงในอาหารวุ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ยอดใหม่ที่เจริญจากปลายยอดที่เลี้ยงในอาหารเหลวมีความสูงยอดเฉลี่ย และจำนวนใบเฉลี่ยมากกว่าปลายยอดที่เลี้ยงในอาหารวุ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ทิพย์สุดา, 2540) และการเลี้ยงปลายยอดขิงในอาหารเหลวมีอัตราการเพิ่มจำนวนยอดน้อยกว่าการเลี้ยงในอาหารวุ้น แต่ยอดใหม่ที่การเจริญจากปลายยอดที่เลี้ยงในอาหารเหลวมีพัฒนาการที่ดีกว่าปลายยอดที่เลี้ยงในอาหารวุ้น (Bhagyalakshimi and Singh, 1988)

Salvi และคณะ (2002) รายงานว่าการเลี้ยงขมิ้นชันในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP 1 มก/ล และ NAA 0.2 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยมีความเข้มข้นของวุ้นในอาหารแตกต่างกัน คือ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 และ 2.0% พบว่าความเข้มข้นของวุ้นในอาหารที่ใช้เลี้ยงมีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอด ความสูงของยอด, จำนวนราก และความยาวรากอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาหารที่มีวุ้นความเข้มข้น 0.4-0.6% ส่งเสริมจำนวนยอดเฉลี่ย (3 ยอดต่อชิ้นส่วน) และความสูงยอดเฉลี่ย (5-7 ซม) ดีกว่าความเข้มข้นอื่นๆ อาหารที่มีวุ้นความเข้มข้นสูง 1.0-2.0% ทำให้จำนวนยอดเฉลี่ย (1-2 ยอดต่อชิ้นส่วน) และความสูงของยอดเฉลี่ยลดลง (2-3 ซม)

การเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดขมิ้นชัน กระเจียวพลอยทักษิณ และขิงในอาหารเหลวนั้นระบุว่าเป็นการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ใช้ความเร็วรอบในการเขย่า 60-90 รอบต่อนาที (Adeniya and Shirai, 2001; Salvi *et al.*, 2002) และจากการทดลองของทิพย์สุดา (2540) พบว่าการเลี้ยงปลายยอดกระเจียวพลอยทักษิณในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี BAP 3 มก/ล บนเครื่องเขย่าและการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวโดยไม่มีการเขย่านั้นไม่มีผลต่อจำนวนต้นใหม่ แต่ปลายยอดที่เลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่ามีความสูงต้นเฉลี่ย และจำนวนใบเฉลี่ยสูงกว่าการเลี้ยงปลายยอดในอาหารเหลวที่ไม่มีการเขย่าอย่างมีนัยสำคัญ

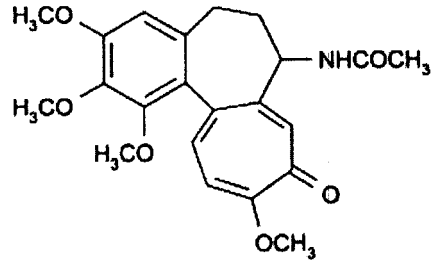
2.5 การชักนำพืชเททระพลอยด์โดยใช้โคลชิซินร่วมกับการเพาะเลี้ยงเยื่อเยื่อ

2.5.1 หลักการชักนำเททระพลอยด์โดยใช้โคลชิซิน

พืชเททระพลอยด์ คือพืชที่มีจำนวนโครโมโซม 4 ชุดเขียนแทนด้วยสัญลักษณ์ 2n=4x สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในสภาพธรรมชาติและการชักนำโดยใช้สารเคมี การเกิดเททระพลอยด์ตามธรรมชาติอาจเกิดจากความผิดปกติของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ทำให้เซลล์มีจำนวน

โครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ หรืออาจเกิดจากความผิดปกติของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสระหว่างการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ทำให้เซลล์สืบพันธุ์ที่ได้มีจำนวนโครโมโซมเป็น n=2x (unreduced gamete) เมื่อเกิดการปฏิสนธิระหว่าง unreduced gamete (n=2x) จึงทำให้ได้ต้นพืชเททระพลอยด์ (Ranney, 2004) โดยเททระพลอยด์แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ ออโตเททระพลอยด์ (autotetraploid) และอัลโลเททระพลอยด์ (allotetraploid) ออโตเททระพลอยด์หมายถึงพืชที่มีโครโมโซมเหมือนกันทั้ง 4 ชุด อาจเกิดจากการผสมกันระหว่าง unreduced gamete ของพืชชนิด (species) เดียวกัน และอัลโลเททระพลอยด์หมายถึงพืชที่มีโครโมโซม 4 ชุด ที่ไม่เหมือนกันทั้งหมด อาจเกิดจากการผสมกันระหว่าง unreduced gamete ของพืชต่างชนิดกัน (ประดิษฐ์, 2543)

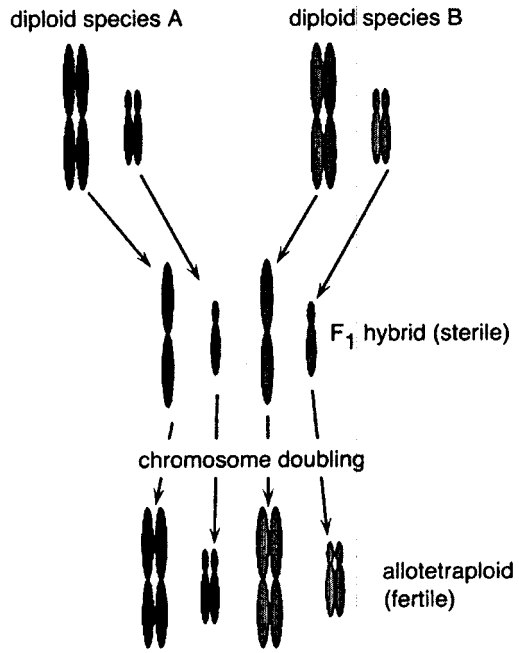
สารเคมีที่ใช้ในการชักนำเททระพลอยด์ ได้แก่ โคลชิซิน และสารกำจัดวัชพืช oryzalin ซึ่งสารที่ใช้กันมากที่สุดคือ โคลชิซิน (Ranney, 2004) โคลชิซิน (Acetyltrimethyl colchicinic acid) ที่มีชื่อทางเคมีว่า (S)-N-(5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzo(a)heptalen-7-yl) acetamide ($C_{22}H_{25}NO_6$, M.W. 399.43) (ภาพที่ 2) โคลชิซินบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นเกล็ดหรือผงสีเหลือง มีคุณสมบัติเป็นสารอัลคาลอยด์ละลายได้ดีในน้ำ และแอลกอฮอล์ สกัดได้จากเมล็ดหรือหัวของพืชวงศ์ลิลี่ชื่อ *Colchicum autumnae* หรือเป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้น (Muzaffar and Brossi, 1991)



ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างของโคลชิซิน (Platform, 2005)

โคลชิซินยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิลโดยเข้าจับกับโปรตีนทูบูลลินขณะที่เซลล์กำลังแบ่งตัวในช่วงปลายของระยะโพรเฟส ซึ่งเซลล์กำลังมีการสร้างเส้นใยสปินเดิลจากการเชื่อมต่อโปรตีนทูบูลลินเข้าด้วยกัน การที่โคลชิซินขัดขวางการสร้างเส้นใยสปินเดิลส่งผลให้โครโมโซมไม่แยกไปที่ขั้วเซลล์ และไม่เกิดการสร้างเซลล์เพลทเซลล์จึงมีจำนวนชุดโครโมโซมที่เหมือนกันเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (Ranney, 2004) เมื่อเซลล์เททระพลอยด์มีการแบ่งเซลล์อีกครั้งโดยไม่ได้รับโคลชิซินจะได้เซลล์ลูกเป็นเททระพลอยด์และเจริญพัฒนาเป็นต้นเททระพลอยด์ต่อไป แต่กรณีที่เซลล์ได้รับ โคลชิซินขณะเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์อีกครั้งเซลล์จะมีโอกาสเพิ่มชุดโครโมโซมได้

อีก และกลายเป็นเซลล์ออกทะพลอยด์ (2n=8x) การผสมพันธุ์พืชข้ามชนิดมักได้ลูกผสมเป็นหมัน เนื่องจากโครโมโซมของพ่อและแม่ไม่เข้าคู่กันในขั้นตอนการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ การเพิ่มชุดโครโมโซมทำให้เซลล์มีโครโมโซมคู่เหมือนเพิ่มขึ้นอีก 1 ชุด โครโมโซมจึงเข้าคู่กันได้ ส่งผลให้พืชอัลโลเททระพลอยด์สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์และติดเมล็ดได้ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การผสมข้ามชนิดระหว่างดิพลอยด์ A กับ ดิพลอยด์ B ได้ลูกผสมดิพลอยด์ชั่วที่ 1 เป็นหมัน เนื่องจากโครโมโซมจากพ่อและแม่ไม่เข้าคู่กัน การเพิ่มชุดโครโมโซมทำให้มีโครโมโซมคู่เหมือนจึงสามารถเข้าคู่กันได้ส่งผลให้อัลโลเททระพลอยด์มีความสมบูรณ์พันธุ์ (Kellogg, 2003)

2.5.2 ข้อดีของการชักนำพืชเททระพลอยด์โดยใช้โคลชิซินร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การให้โคลชิซินแก่พืชนอกหลอดแก้วเพื่อชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การหยดสารละลายโคลชิซินลงบนบริเวณยอดหรือตาข้างของต้นอ่อน เช่น ฝ้าย แตงโม และ lisianthus (Griesbach and Bhat, 1990; McCuistion and Wehner, 2005; Mehetre *et al.*, 2003; Wongpiyasatid *et al.*, 2003) การแช่เมล็ดในสารละลายโคลชิซิน เช่น *Stevia rebaudiana* ฝ้าย ต้อยติ่ง และดอกดาว (พนิต, 2543; Oliveira *et al.*, 2004; Wongpiyasatid *et al.*, 2003) หรือการแช่หัวพันธุ์ในสารละลายโคลชิซิน เช่น ช่อทับทิม (*Globba rosea* Gagnep.) (พนิต, 2543) ซึ่งจากการตรวจเอกสารพบว่าการชักนำต้นเททระพลอยด์โดยใช้โคลชิซินร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เป็นวิธีการที่รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากกว่าการชักนำเททระพลอยด์นอกหลอดแก้ว (Ali *et al.*, 1992; Gao *et al.*, 1996; Petersen *et al.*, 2003; Takamura and Miyajima, 1996) เนื่องจากในสภาพหลอดแก้วสามารถชักนำให้พืชสร้างเนื้อเยื่อเจริญได้เป็นจำนวนมากในการชักนำแต่ละครั้งจึงมีโอกาสเกิดต้นเททระพลอยด์ได้มากขึ้น ประกอบกับการคัดเลือกและการเพิ่มจำนวนต้นเททระพลอยด์ในหลอดแก้วสามารถทำได้สะดวกและรวดเร็วกว่านอกหลอดแก้วมาก จึงพบว่าการชักนำเททระพลอยด์ในหลอดแก้วมีเปอร์เซ็นต์การเกิดเททระพลอยด์สูงกว่าการชักนำเททระพลอยด์นอกหลอดแก้ว นอกจากนี้ยังพบว่ากรณีที่ได้ต้นมิกโซพลอยด์แต่ไม่ได้ต้นเททระพลอยด์เลยนั้น การเพิ่มจำนวนยอดในหลอดแก้วอย่างรวดเร็วหลังจากที่พืชได้รับโคลชิซินเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการแยกต้นเททระพลอยด์ออกจากต้นมิกโซพลอยด์ (Cohen and Yao, 1996; Kadata and Niimi, 2002)

2.5.3 การนำเททระพลอยด์ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

พืชเททระพลอยด์ใช้ประโยชน์ในงานปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างน้อย 4 ประการ คือ ประการแรก ใช้เพิ่มการติดเมล็ดให้แก่ลูกผสมที่เป็นหมันในกรณีที่ความเป็นหมันของลูกผสมเกิดจากโครโมโซมของพ่อแม่ไม่เข้าคู่กัน พบว่าการชักนำลูกผสมดิพลอยด์ที่เป็นหมันให้เป็นเททระพลอยด์สามารถเพิ่มการติดเมล็ดได้ในพืชหลายชนิด เช่น กล้วยไม้ (สาริณี, 2538) ลิลี่ (Rhee *et al.*, 2005) ข้าว (สุพรรณญิกา, 2539) มันสำปะหลัง (Nassar, 2004) มะเขือ (Ali *et al.*, 1992) และขิง (Adaniya and Shirai, 2001) เป็นต้น ประการที่สอง ใช้เพิ่มโอกาสการผสมติดในคู่ผสมที่มีจำนวนชุดโครโมโซมแตกต่างกัน กรณีที่การผสมข้ามพันธุ์ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากคู่ผสมมีจำนวนชุดโครโมโซมที่แตกต่างกันเช่น 2n=2x ผสมกับ 2n=4x พบว่าการชักนำต้น 2n=2x ให้เป็นเททระพลอยด์ก่อนจะนำไปผสมกับต้น 2n=4x ทำให้สร้างลูกผสมได้สำเร็จ ดังเช่นในการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างถั่วเขียวพันธุ์ป่า (2n=4x=44) กับพันธุ์ปลูก (2n=2x=22) ที่ไม่ติดเมล็ด การชักนำถั่วเขียวพันธุ์ปลูกดิพลอยด์ให้เป็นเททระพลอยด์ ก่อนจะนำไปผสมกับถั่วเขียวพันธุ์ป่าสามารถสร้างลูกผสมได้สำเร็จ (ปาริชาติ และคณะ, 2546) เช่นเดียวกับการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างฝ้ายพันธุ์ป่า (2n=2x=26) กับพันธุ์ปลูก (2n=4x=52) ที่ประสบความสำเร็จหลังจากชักนำฝ้ายพันธุ์ป่าให้เป็นเททระพลอยด์ก่อนจะนำไปผสมกับฝ้ายพันธุ์ปลูก (Mehetre *et al.*, 2003) ประการที่สาม ใช้เพิ่มขนาดดอก เช่น กล้วยไม้ (สาริณี, 2538) *Scoparia montevidiensis* (Escandón *et al.*, 2005) และ *Cyclamen persicum* Mill. (Takamura and Miyajima, 1996) ขนาดผลและเมล็ด เช่น มะเขือ (Ali *et al.*, 1992) และ *Triticum monococcum* (Kuspira *et al.*, 1985) ขนาดเหง้าและรากพืชสมุนไพร เช่น ขิง (Smith *et al.*, 2004) *Salvia miltiorrhiza* Bge. (Gao *et al.*, 1996) *Scutellaria baicalensis* (Gao *et al.*, 2002) และ *Vetiveria zizanioides* L. Nash. (Lavania, 1988) และประการที่สี่ใช้สร้างพืชไร้เมล็ดโดยการนำเททระพลอยด์

มาผสมกับดิพลอยด์จะได้ลูกเป็นทริพลอยด์ (2n=3x) ซึ่งเป็นหมันและไม่มีเมล็ด เช่น แตงโมไร้เมล็ด (McCuistion and Wehner, 2005) และมะนาวไร้เมล็ด (อริยา, 2543)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดเททระพลอยด์ในหลอดแก้ว

2.6.1 พันธุกรรมของพืช

พันธุกรรมของพืชมีผลต่อการรอดชีวิตและการเจริญพัฒนาของชิ้นส่วน จึงส่งผลโดยตรงต่อการเกิดเททระพลอยด์เป็นอย่างมากโดยเฉพาะในกรณีการให้โคลชิซินแก่แคลลัส โดยใน *Miscanthus sinensis* ซึ่งเป็นหญ้าอายุหลายปีจากแถบเอเชียตะวันออกที่ใช้สำหรับเป็นเชื้อเพลิงและพืชเส้นใย Petersen และคณะ (2003) รายงานว่าการให้โคลชิซินแก่ embryogenic callus ของ *M. sinensis* สายพันธ์ต่างๆ มีการเกิดเททระพลอยด์ได้แตกต่างกัน เนื่องจากความสามารถในการเกิดต้นพืชในแต่ละพันธุ์นั้นแตกต่างกัน เช่นเดียวกับลูกผสมส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulate* Blanco. x *C. sinensis* (L.) Osb.) ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ 'Umatilla' มีการรอดชีวิตเพียงร้อยละ 7.4 ของชิ้นส่วน embryogenic callus ทั้งหมด ในขณะที่สายพันธุ์ 'Dweet' รอดชีวิตได้ดี นอกจากนี้ความสามารถในการเกิดต้นพืชในสายพันธุ์ 'Umatilla' ยังด้อยกว่า 'Dweet' จึงส่งผลให้ได้จำนวนต้นเททระพลอยด์เพียงร้อยละ 7 ของพันธุ์ 'Dweet' (Wu and Mooney, 2002) ส่วนการให้โคลชิซินแก่ชิ้นส่วนตายอดหรือตาข้างก็พบว่าพันธุกรรมมีผลต่อการรอดชีวิต และการเกิดเททระพลอยด์เช่นเดียวกัน Ma และคณะ (1997) รายงานว่าการให้โคลชิซินแก่ตายอดกุหลาบลูกผสม (*Rosa* spp.) จำนวน 5 สายพันธุ์ มีการรอดชีวิต และอัตราการเจริญแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการเกิดต้นเททระพลอยด์นั้นพบว่ากุหลาบลูกผสมสายพันธุ์ต่างๆ มีปริมาณต้นเททระพลอยด์ที่ใกล้เคียงกัน แต่ลูกผสมสายพันธุ์ต่างๆ เกิดเททระพลอยด์ได้ในโคลชิซินความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับงานของนิตย์ศรีและอำไพ (2541) ที่พบว่าตาข้างหม่อน (*Morus sp.*) จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ น้อย คุณไพ และใหญ่บุรีรัมย์ ที่ได้รับโคลชิซินมีอัตราการเกิดเททระพลอยด์ที่แตกต่างกัน โดยพันธุ์น้อยเกิดต้นเททระพลอยด์ได้มากที่สุด (40%) ส่วนพันธุ์คุณไพ และใหญ่บุรีรัมย์เกิดต้นเททระพลอยด์ได้ใกล้เคียงกัน (30%)

2.6.2 ชนิดชิ้นส่วนพืช

ชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ในการชักนำเททระพลอยด์ส่วนใหญ่เป็นเนื้อเยื่อเจริญที่มีเซลล์กำลังแบ่งตัวจำนวนมาก และสามารถชักนำให้พัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ เช่น แคลลัส ปลายยอด ตาข้าง และกลุ่มยอด ในการชักนำเททระพลอยด์พบว่าชิ้นส่วนเหล่านี้ต่างมีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันออกไปดังนี้

แคลลัสมีข้อดีคือ เป็นกลุ่มเซลล์ที่ประกอบไปด้วยเซลล์พาเรงคิมาที่พร้อมจะเกิดเป็นต้นพืชได้เป็นจำนวนมาก จึงพบว่าแคลลัสต้องการโคลชิซินในความเข้มข้นที่ต่ำกว่าการใช้ในชิ้นส่วนอื่นๆ ของพืช และเกิดต้นเททระพลอยด์ได้สูงร้อยละ 40-70 (Chen and Goeden-Kallemeyn, 1979; Gao *et al.*, 2002; Song *et al.*, 1997) ส่วนข้อด้อยของแคลลัสคือ การรอดชีวิตต่ำ และความสามารถเกิดเป็นต้นพืชลดลงเมื่อได้รับโคลชิซิน (Wu and Mooney, 2002) นอกจากนี้หากแคลลัสอยู่ในอาหารเป็นเวลานานเมื่ออายุมาก อาจมีผลให้เกิดโครโมโซมผิดปกติแม้จะไม่ได้รับโคลชิซินเลยก็ตาม (Sijun, 1992) ดังเช่นในลูกผสมหัวใหญ่ระหว่าง Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.) กับ bulb onion (*A. cepa* L.) แคลลัสที่เลี้ยงไว้นาน 5 ปี มีความผิดปกติของโครโมโซม โดยจากการวิเคราะห์โครโมโซมเซลล์ปลายรากพบโครโมโซม bridges ที่ระยะแอนาเฟสถึงระยะเทโลเฟสจากจากต้นดิพลอยด์ 2 ต้น ใน 22 ต้น หรือร้อยละ 9 ทั้งที่เป็นต้นที่พัฒนาจากแคลลัสที่ไม่ได้รับโคลชิซิน (Song *et al.*, 1997)

ปลายยอดและตาข้างมีข้อดีคือ เป็นชิ้นส่วนที่มีจุดกำเนิดยอดอยู่เดิมพร้อมที่จะพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ ประกอบกับปลายยอดและตาข้างเป็นชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่จึงทนทานต่อโคลชิซินได้ดี ทำให้อัตราการรอดชีวิตค่อนข้างสูงและการเกิดยอดใหม่ได้เร็ว ส่วนข้อด้อยของการใช้ชิ้นส่วนนี้คือ มักเกิดต้นเททระพลอยด์จำนวนน้อยเพียงร้อยละ 1-5 เช่น กุหลาบ Alocasia Winter jujube และ ขิง (Gu *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2004; Thao *et al.*, 2003) หรือเกิดต้นมิกโซพลอยด์จำนวนมากร้อยละ 22-53 เช่น lilac ลูกผสม หอมหัวใหญ่ลูกผสม และกล้วย (Geoffriau *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 2000a; Van Duren *et al.*, 1996)

กลุ่มยอดหมายถึงยอดอ่อนที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มประมาณกลุ่มละ 2-3 ยอด กลุ่มยอดมีข้อดีคล้ายกับปลายยอดและตาข้างเนื่องจากมีจุดกำเนิดยอดอยู่เดิม และข้อดีที่เพิ่มขึ้นคือเมื่อเทียบกับปลายยอดและตาข้างกลุ่มยอดเป็นยอดขนาดเล็กเนื้อเยื่ออ่อนกว่ามาก และมีใบอ่อนห่อหุ้มอยู่น้อยกว่าช่วยให้การแทรกซึมของโคลชิซินเป็นไปได้ดีทำให้มีโอกาสเกิดเททระพลอยด์ได้สูง โดยพบว่ากลุ่มยอดลิลี่ลูกผสมที่ได้รับโคลชิซินเกิดต้นเททระพลอยด์ร้อยละ 41 (Lu and Brigen, 1997)

2.6.3 ความเข้มข้นและระยะเวลาในการให้โคลชิซิน

Roberts และคณะ (1990) รายงานว่าความเข้มข้นของโคลชิซินมีผลต่อการยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิลของเซลล์ปลายรากกุหลาบ (*Rosa wichuraiana*) ในหลอดแก้ว โดยความเข้มข้นโคลชิซินต่ำไม่สามารถยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิลได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้เซลล์บางส่วนไม่เปลี่ยนเป็นเททระพลอยด์ ในขณะที่ความเข้มข้นโคลชิซินที่เพียงพอสำหรับการยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล ทำให้เซลล์รากดิพลอยด์เปลี่ยนเป็นเซลล์เททระพลอยด์ได้มากที่สุดโดยไม่ทำให้เซลล์ตาย ส่วนโคลชิซินความเข้มข้นสูงเกินพอสำหรับการยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิลมีผลชักนำ

ให้เกิดเซลล์เททระพลอยด์เช่นกันแต่มีผลในทางลบกับพืชด้วย โดยทำให้พืชโตช้าและมีรูปร่างผิดปกติ (สมปอง และราตรี, 2543) หรือเนื้อเยื่อเปลี่ยนสีกลายเป็นสีน้ำตาลและตาย (ดิเรก และคณะ, 2538; Rose *et al.*, 2000a; Rose *et al.*, 2000b) ในการชักนำเททระพลอยด์จึงต้องศึกษาหาความเข้มข้น และระยะเวลาการให้โคลชิซินที่เหมาะสม เนื่องจากความเข้มข้นที่ต่ำเกินไปอาจไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ได้ หรืออาจเกิดต้นเททระพลอยด์จำนวนน้อย ส่วนความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจทำให้เนื้อเยื่อเกิดอาการเป็นพิษ ทำให้ชิ้นส่วนไม่เกิดยอดใหม่หรือตายทั้งหมดทำให้ไม่เกิดต้นเททระพลอยด์เช่นเดียวกัน จากการตรวจเอกสารพบว่าความเข้มข้น และระยะเวลาการให้โคลชิซินที่เหมาะสมต่อการชักนำต้นพืชเททระพลอยด์นั้น มีปัจจัยที่เข้ามาเกี่ยวข้องหลายประการ ได้แก่ วิธีการให้โคลชิซิน ชนิดของชิ้นส่วน และชนิดของพืช ซึ่งอธิบายได้ดังนี้

2.6.3.1 วิธีการให้โคลชิซิน

การชักนำเททระพลอยด์โดยใช้โคลชิซินร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อาจแบ่งการให้โคลชิซินเป็น 2 วิธี คือ การให้โคลชิซินความเข้มข้นต่ำเป็นระยะเวลานาน และการให้โคลชิซิน ความเข้มข้นสูงในระยะเวลาสั้น การให้โคลชิซินความเข้มข้นต่ำเป็นระยะเวลานานเป็นการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารวุ้นที่มีโคลชิซินความเข้มข้น 0.001-0.05% เป็นระยะเวลา 14-60 วัน ก่อนจะย้ายชิ้นส่วนพืชไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดโคลชิซินเพื่อให้มีการเจริญพัฒนาเป็นต้นพืชต่อไป โดยวิธีการนี้สามารถชักนำเททระพลอยด์ได้ในพืชหลายชนิด เช่น *Scutellaria baicalensis* (Gao *et al.*, 2002) พืชตระกูลส้ม ได้แก่ tangors clementine และ grapefruit (Wu and Mooney, 2002) มังคุด (สมปอง และราตรี, 2543) และขิง (Adeniya and Shirai, 2001) ส่วนการให้โคลชิซินความเข้มข้นสูงในระยะเวลาสั้นส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารเหลวที่มีโคลชิซิน 0.05-0.1% และ DMSO 1-2% เป็นเวลา 1-4 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารวุ้นที่ปลอดโคลชิซินซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการชักนำเททระพลอยด์ในกุหลาบ (Ma *et al.*, 1997) Calla lily (Cohen and Yao, 1996) แกลดิโอลัส (Suzuki *et al.*, 2004) *Scoparia monteridiensis* (Escandón *et al.*, 2005) lilac (Rose *et al.*, 2000a) กล้วย (Ven Duren *et al.*, 1996) หอมหัวใหญ่ (Geoffriau *et al.*, 1997) หม่อน (นิตย์ศรี และอำไพ, 2541) ขมิ้นชัน และขมิ้นอ้อย (วัชรินทร์ และอรดี, 2543) นอกจากนี้การให้โคลชิซินความเข้มข้นที่สูงมาก 0.2-0.5% ในระยะเวลาเพียง 2-24 ชั่วโมง แก่ชิ้นส่วนพืชยังสามารถชักนำเททระพลอยด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในพืชหลายชนิด ได้แก่ Inca lily (Lu and Bridgen, 1997) lily (Rhee *et al.*, 2005) หญ้า *Miscanthus sinensis* (Petersen *et al.*, 2003) *Scutellaria baicalensis* (Gao *et al.*, 2002) และขิง (Smith *et al.*, 2004)

2.6.3.2 ชนิดของชิ้นส่วน

จากการตรวจเอกสารพบว่าความเข้มข้น และระยะเวลาการให้โคลชิซิน ที่เหมาะสมในการชักนำต้นเททระพลอยด์ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืช และชนิดของเนื้อเยื่อพืชที่ใช้ โดยมีแนวโน้มว่าชิ้นส่วนปลายยอด ตาข้าง และกลุ่มยอดจะต้องการโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นสูง กว่าแคลลัส เนื่องจากชิ้นส่วนเหล่านี้เป็นชิ้นส่วนขนาดใหญ่และมักจะมีกาบใบห่อหุ้มหรือมีไข เคลือบอยู่ ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการซึมผ่านของโคลชิซินโดยความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำ เททระพลอยด์จากแคลลัส ปลายยอดหรือตาข้าง และกลุ่มยอดของพืชชนิดต่างๆ มีรายละเอียดดังนี้

1) แคลลัส

แคลลัสของพืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อโคลชิซินที่ระดับความ เข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างออกไป ซึ่งการชักนำเททระพลอยด์ส่วนใหญ่จะใช้วิธีการเพาะเลี้ยง แคลลัสในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซินผสมอยู่เป็นระยะเวลาสั้นๆ ก่อนจะย้ายแคลลัสไปเลี้ยง บนอาหารวุ้นที่ปลอดโคลชิซินเพื่อให้เกิดการสร้างยอดใหม่ต่อไป โดยความเข้มข้นและระยะเวลาที่ เหมาะสมในการชักนำเททระพลอยด์จากแคลลัสของพืชแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไปดังนี้

แคลลัสของหอมหัวใหญ่ลูกผสม (*Allium fistulosum* x *A. cepa*) ที่ เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1 และ 0.2% เป็นเวลา 36, 48 และ 72 ชม แล้วย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารปลอดโคลชิซิน พบว่าแคลลัสที่ได้รับโคลชิซินจะโตช้าและ เริ่มตายหลังจากได้รับโคลชิซินเป็นเวลา 2 สัปดาห์ อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส และการสร้างยอด ของแคลลัสมีแนวโน้มลดลงตามความเข้มข้นโคลชิซินที่เพิ่มขึ้น โดยแคลลัสที่ได้รับโคลชิซินในทุก ระยะเวลา (36-72 ชม) ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1 และ 0.2% มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 100, 87, 84 และ 76 และมีการสร้างยอดร้อยละ 72, 31, 28 และ 22 ตามลำดับ ซึ่งภายในระดับความเข้มข้น เดียวกันพบว่าอัตราการรอดชีวิตของแคลลัส และการสร้างยอดของแคลลัสมีแนวโน้มลดลงตาม ระยะเวลาที่ได้รับโคลชิซินนานขึ้น โดยการเพิ่มระยะเวลาการให้โคลชิซินจาก 36 ถึง 72 ชม ส่งผล ให้การสร้างยอดจากแคลลัสลดลง 17-36% และการสร้างยอดช้ากว่าแคลลัสที่ไม่ได้รับโคลชิซิน ประมาณ 1-3 สัปดาห์ และพบจำนวนต้นเททระพลอยด์จากแคลลัสที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.1% มากที่สุด โดยเป็นต้นเททระพลอยด์ที่ได้จากระยะเวลา 36, 48 และ 72 ชม คิดเป็นร้อยละ 3.1, 31.3 และ 25 ของจำนวนต้นเททระพลอยด์ทั้งหมด รองลงมาคือโคลชิซินความเข้มข้น 0.2% ที่ ระยะเวลา 36, 48 และ 72 ชม คิดเป็นร้อยละ 3.1, 6.3 และ 25 ตามลำดับ และโคลชิซินความเข้มข้น 0.05% ที่ระยะเวลา 36, 48 และ 72 ชม คิดเป็นร้อยละ 0.0, 3.1 และ 3.1 ตามลำดับ ผู้วิจัยสรุปว่าการ ให้โคลชิซินความเข้มข้น 0.1 และ 0.2% เป็นเวลา 48 และ 72 ชม ตามลำดับให้จำนวนต้น เททระพลอยด์มากที่สุด (Song *et al.*, 1997)

แคลลัสของ *Scutellaria baicalensis* ที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.2% เป็นเวลา 0, 3, 5, 8, 12, 16 และ 24 ชม มีอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับโคลชิซินเพิ่มขึ้น โดยมีแคลลัสที่รอดชีวิตร้อยละ 100, 100, 93, 77, 67, 43 และ 30 ตามลำดับ และมีแนวโน้มพบจำนวนต้นเททระพลอยด์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นโคลชิซินที่เพิ่มขึ้นโดยแคลลัสที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2% เป็นระยะเวลาต่าง กัน (0-24 ชม) พบต้นเททระพลอยด์คิดเป็นร้อยละ 0, 13, 21, 30, 60, 77 และ 67 ของชิ้นส่วนที่รอดชีวิตตามลำดับของระยะเวลาจากน้อยไปหามาก ซึ่งจะเห็นว่าต้นอ่อนที่เจริญจากแคลลัสที่มีอัตราการรอดชีวิตต่ำจะพบต้นเททระพลอยด์ได้มากขึ้น โดยผู้วิจัยสรุปว่าการให้โคลชิซินความเข้มข้น 0.2% เวลา 12 ชม เหมาะสมต่อการชักนำเททระพลอยด์ เนื่องจากมีอัตราการเกิดต้นเททระพลอยด์สูงที่สุด (40%) เมื่อคิดจากจำนวนแคลลัสทั้งหมดที่ใช้ในทดลอง (Gao *et al.*, 2002)

นอกจากนี้ยังพบว่าแคลลัสของ white mulberry (*Morus alba* var. S54) ที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.025-0.2% เป็นเวลา 3-7 วัน พบต้นเททระพลอยด์จากโคลชิซินความเข้มข้น 0.1% เป็นเวลา 3 วัน มากที่สุด (47%) ส่วนความเข้มข้นและระยะเวลาอื่นๆ พบต้นเททระพลอยด์ได้น้อยและมีเปอร์เซ็นต์ต้นมิกโซพลอยด์สูง (Satrabhandhu, 1990) แคลลัส daylily ที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 มก/ล เวลา 3 วัน พบต้นเททระพลอยด์จากโคลชิซินความเข้มข้น 20 มก/ล มากที่สุด (Chen and Goeden-Kallemeyn, 1979) และแคลลัสของแกลดิโอลัส 3 ชนิด ได้แก่ *Gladiolus priorii*, *G. tristis* และ *G. virescens* พบต้นเททระพลอยด์จากการให้โคลชิซินความเข้มข้น 0.05% เวลา 3 วัน มากที่สุด (Suzuki *et al.*, 2004)

2) ปลายยอดหรือตาข้าง

การชักนำเททระพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงปลายยอด หรือชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างร่วมกับโคลชิซินส่วนใหญ่จะใช้วิธีการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซินความเข้มข้นสูงเป็นระยะเวลาสั้นๆ และย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดโคลชิซินเพื่อเพิ่มจำนวนยอด ซึ่งพบว่าพืชแต่ละชนิดเกิดต้นเททระพลอยด์ได้ดีที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกันดังนี้

การเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้าง lilac ลูกผสมในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.002, 0.004, 0.006 และ 0.008% เป็นเวลา 1 และ 2 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารปลอดโคลชิซินเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับโคลชิซินมีขนาดใหญ่พอสำหรับการตัดแบ่งไปเลี้ยงในอาหารใหม่ แต่ชิ้นส่วนที่ได้รับโคลชิซินเริ่มตายและส่วนชิ้นส่วนที่รอดชีวิตมีการเจริญของยอดช้าต้องย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารใหม่เป็นเวลา 12-16 สัปดาห์ จึงมีขนาดชิ้นส่วนใหญ่พอสำหรับการตัดแบ่ง และยังมีการเกิดยอดน้อยมาก แม้เวลาผ่านไปถึง 22 สัปดาห์ โดยมีอัตรา

การรอดชีวิตของชิ้นส่วนและการเกิดยอดใหม่ลดลงตามความเข้มข้นโคลชิซินที่เพิ่มขึ้น พบต้นเททระพลอยด์จากโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.002, 0.004, 0.006 และ 0.008% เวลา 1 วัน คิดเป็นร้อยละ 0.0, 9.1, 18.2, 9.1 และ 0.0 ของจำนวนต้นเททระพลอยด์ทั้งหมด และโคลชิซินความเข้มข้นเดียวกัน เวลา 2 วัน พบต้นเททระพลอยด์คิดเป็นร้อยละ 0.0, 45.5, 18.2, 0.0 และ 0.0 ของจำนวนต้นเททระพลอยด์ทั้งหมด จึงสรุปได้ว่าการให้โคลชิซินความเข้มข้น 0.002-0.004% เวลา 1-2 วัน เป็นวิธีการที่สามารถชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ได้ดี ส่วนการให้โคลชิซินความเข้มข้น 0.006% เป็นเวลา 2 วัน หรือ 0.006-0.008% เวลา 1-2 วัน ทำให้ชิ้นส่วนตายเกือบหมดจึงไม่พบต้นเททระพลอยด์ (Rose *et al.*, 2000a)

การเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้าง *Scoparia monteridiensis* ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.001, 0.01, 0.05 และ 0.1% เป็นเวลา 1 และ 2 วัน พบว่าชิ้นส่วนที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.1% เป็นเวลา 1 และ 2 วัน มีจำนวนยอดเฉลี่ยน้อยกว่าความเข้มข้นอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ พบต้นเททระพลอยด์จากโคลชิซินความเข้มข้น 0.001% เวลา 1 วัน มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 50 ของจำนวนต้นเททระพลอยด์ทั้งหมด รองลงมาคือความเข้มข้น 0.001% เวลา 2 วัน (25%) และความเข้มข้น 0.05% เวลา 1 วัน (25%) ส่วนความเข้มข้น 0.01 และ 0.1% ไม่พบต้นเททระพลอยด์แต่พบต้นมิกโซพลอยด์จำนวนหนึ่ง จึงพอสรุปได้ว่าการให้โคลชิซินความเข้มข้น 0.001-0.05% เวลา 1 วัน เป็นวิธีการที่ดีในการชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ (Escandón *et al.*, 2005)

การเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้าง *Buddleia globosa* ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1% เป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารปลอดโคลชิซิน พบว่าการเกิดเป็นต้นมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับโคลชิซินนานขึ้น โดยการให้โคลชิซินในทุกความเข้มข้นเป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน มีจำนวนต้นเฉลี่ย 27, 24 และ 17 ต้น และพบต้นเททระพลอยด์จากโคลชิซินความเข้มข้น 0.1% เวลา 3 วัน มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 31.6 ของจำนวนต้นเททระพลอยด์ทั้งหมด รองลงมาคือความเข้มข้น 0.05% เวลา 2 วัน (21.1%) โดยชิ้นส่วนที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.01% เวลา 1, 2 และ 3 วัน คิดเป็นร้อยละ 0, 10.5 และ 10.5 ของจำนวนต้นเททระพลอยด์ทั้งหมด ความเข้มข้น 0.05% เวลา 1, 2 และ 3 วัน คิดเป็นร้อยละ 5.3, 21.1 และ 5.3 และความเข้มข้น 0.1% เวลา 1, 2 และ 3 วัน คิดเป็นร้อยละ 0, 15.8 และ 31.6 จึงพอสรุปได้ว่าการให้โคลชิซินความเข้มข้น 0.01-0.1% เป็นเวลา 2-3 วัน เป็นวิธีการที่ดีในการชักนำต้นเททระพลอยด์ (Rose *et al.*, 2000b)

การเลี้ยงปลายยอด Alocasia พันธุ์ 'Green Velve' ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1% เป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหาร

ปลอดโคลชิซินเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าชิ้นส่วนมีอัตราการรอดชีวิตและอัตราการเพิ่มจำนวนยอดลดลงตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับโคลชิซินเพิ่มขึ้น โดยการให้โคลชิซินความเข้มข้น 0.1% เป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน จะทำให้ชิ้นส่วนตายทั้งหมดภายในเวลา 3 เดือน หลังจากได้รับโคลชิซิน การให้โคลชิซิน 0.01% เป็นเวลา 1 หรือ 2 วัน ทำให้ชิ้นส่วนมีอัตราการเพิ่มจำนวนยอดไม่แตกต่างจากชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับโคลชิซิน ส่วนการให้โคลชิซิน 0.01% เวลา 3 วัน และ 0.05-0.1% เวลา 1, 2 และ 3 วัน ทำให้อัตราการเพิ่มจำนวนยอดต่ำกว่าชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับโคลชิซิน จากการตรวจสอบระดับพลอยดี้พบต้นเททระพลอยด์จากโคลชิซิน 0.01% เวลา 1 วัน มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 57.1 ของจำนวนต้นเททระพลอยด์ทั้งหมด รองลงมาคือโคลชิซิน 0.01% เวลา 2 วัน (28.6%) และ 0.05% เวลา 1 วัน (14.3%) ส่วนโคลชิซิน 0.01 และ 0.05% เวลา 3 วัน ไม่พบต้นเททระพลอยด์ จึงพอสรุปได้ว่าการให้โคลชิซินความเข้มข้น 0.01% เป็นเวลา 1-2 วัน เป็นวิธีการที่ดีในการชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ (Thao *et al.*, 2003)

การเลี้ยงปลายยอดมะเขือลูกผสม (*Solanum integrifolium* x *S. melongena*) ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซินความเข้มข้น 0.05% เป็นเวลา 2, 4 และ 6 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารปลอดโคลชิซินเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าชิ้นส่วนมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือร้อยละ 67, 43 และ 64 ตามลำดับ และพบต้นเททระพลอยด์ที่ระยะเวลา 2 วัน มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 75 ของจำนวนเททระพลอยด์ทั้งหมด รองลงมาคือระยะเวลา 6 วัน (25%) ส่วนระยะเวลา 4 วัน ไม่พบต้นเททระพลอยด์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการให้โคลชิซินความเข้มข้น 0.05% เวลา 2 วัน เป็นวิธีการชักนำต้นเททระพลอยด์ได้ดีที่สุด (Ali *et al.*, 1992)

การเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างของหม่อน (*Morus* sp.) พันธุ์น้อยในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.02, 0.06 และ 0.1% เป็นเวลา 2, 3, 4 และ 5 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารปลอดโคลชิซินเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนและความสูงของยอดใหม่ลดลงตามความเข้มข้นและระยะเวลาได้รับโคลชิซินเพิ่มขึ้น พบต้นเททระพลอยด์โคลชิซินความเข้มข้น 0.02% เวลา 5 วัน และความเข้มข้น 0.06% เวลา 2 วัน มากที่สุด โดยพบต้นเททระพลอยด์คิดเป็นร้อยละ 40 ของจำนวนชิ้นส่วนที่ใช้ทั้งหมด ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าการให้โคลชิซินความเข้มข้นต่ำคือ 0.02% มีแนวโน้มจะได้ต้นเททระพลอยด์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับโคลชิซินนานขึ้น แต่การให้โคลชิซินความเข้มข้นสูงคือ 0.06-0.1% มีแนวโน้มจะได้ต้นเททระพลอยด์ลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับโคลชิซินนานขึ้น โดยพบต้นเททระพลอยด์จากโคลชิซินความเข้มข้น 0.02% เวลา 2, 3, 4 และ 5 วัน คิดเป็นร้อยละ 10, 10, 20 และ 40 ของชิ้นส่วนที่ใช้ทั้งหมด ความเข้มข้น 0.06% เวลา 2, 3, 4 และ 5 วัน คิดเป็นร้อยละ 40, 30, 30 และ 20 และความเข้มข้น 0.1% เวลา 2, 3, 4 และ 5 วัน คิดเป็นร้อยละ 30, 30, 20 และ 10 ตามลำดับ ผู้วิจัยสรุปว่าการ

ให้โคลชิซินความเข้มข้น 0.02-0.1% เป็นเวลา 2-5 วัน เป็นวิธีการที่ดีในการชักนำต้นเททระพลอยด์ (นิตย์ศรี และอำไพ, 2541)

การเลี้ยงปลายยอดกล้วยในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2 และ 0.4% เป็นเวลา 2 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารวุ้นปลอดโคลชิซินเป็นเวลา 14 วัน พบว่าอัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วน และการเจริญของยอดใหม่ลดลงตามความเข้มข้นโคลชิซินที่เพิ่มขึ้น โดยชิ้นส่วนที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นดังกล่าว เป็นเวลา 2 วัน มีการรอดชีวิตร้อยละ 93, 73, 67 และ 0 และมีจำนวนยอดเฉลี่ยคิดเป็นร้อยละ 100, 85, 13 และ 0 ของจำนวนยอดที่ได้จากชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับโคลชิซิน และพบเททระพลอยด์จากโคลชิซินความเข้มข้น 0.2% มากที่สุด (18%) ส่วนความเข้มข้น 0.1% ไม่พบต้นเททระพลอยด์ และความเข้มข้น 0.4% ทำให้ชิ้นส่วนตายทั้งหมดจึงไม่พบต้นเททระพลอยด์เช่นเดียวกัน ผู้วิจัยสรุปว่าการให้โคลชิซินความเข้มข้น 0.2% เป็นเวลา 2 วัน เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการชักนำต้นเททระพลอยด์ (Van Duren *et al.*, 1996)

3) กลุ่มยอด

การเลี้ยงกลุ่มยอด Inca lily ลูกผสมในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซินความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 0.6% เป็นเวลา 6, 12, 18 และ 24 ชม แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารปลอดโคลชิซินเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการให้โคลชิซินในทุกระดับความเข้มข้นและทุกระยะเวลาส่งผลให้การเกิดยอดใหม่ลดลง โดยชิ้นส่วนที่ได้รับโคลชิซินมีการเกิดยอดเพียง 55.8% ที่เหลือเป็นชิ้นส่วนที่ไม่ผลิตยอดหรือตาย และพบว่าการให้โคลชิซินที่ระดับความเข้มและระยะเวลาต่างๆ ให้จำนวนต้นเททระพลอยด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบต้นเททระพลอยด์สูงถึง 41% ของจำนวนต้นที่ใช้ตรวจสอบ ผู้วิจัยสรุปว่าการให้โคลชิซินความเข้มข้น 0.2-0.6% เป็นเวลา 6-24 ชม เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการชักนำต้นเททระพลอยด์ (Lu and Bridgen, 1997)

การเลี้ยงกลุ่มยอด *Salvia miltiorrhiza* Bge. ในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี โคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 0.0005, 0.001, 0.005 และ 0.01% เป็นเวลา 30 วัน พบว่าชิ้นส่วนมีอัตราการรอดชีวิตลดลงตามความเข้มข้นที่ได้รับโคลชิซินเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 100, 100, 70, 40 และ 20 และทุกระดับความเข้มข้นของโคลชิซินมีผลยับยั้งการเจริญของยอดใหม่ พบต้นเททระพลอยด์จากโคลชิซินความเข้มข้น 0.001% มากที่สุดคิดเป็น 54.5% ของจำนวนต้นเททระพลอยด์ทั้งหมด รองลงมาคือความเข้มข้น 0.005% (27.3%) ส่วนที่ความเข้มข้น 0.0005 และ 0.01% ให้จำนวนต้นเททระพลอยด์เท่ากัน (9.1%) ผู้วิจัยสรุปว่าการให้โคลชิซินความเข้มข้น 0.001% เป็นเวลา 30 วัน เป็นวิธีการที่สามารถชักนำต้นเททระพลอยด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Gao *et al.*, 1996)

2.6.3.3 ความเข้มข้นและระยะเวลาการให้โคลชิซินแก่พืชสกุลขมิ้นและพืชวงศ์ขิง

ความเข้มข้น และระยะเวลาการให้โคลชิซินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ของพืชสกุลขมิ้นและพืชวงศ์ขิงโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีรายละเอียดดังนี้

การเลี้ยงปลายยอดขมิ้นชันขนาดยาว 1 ซม ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.25% เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP 3 มก/ล เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าชิ้นส่วนมีอัตราการรอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับโคลชิซินที่เพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 100, 30, 17, 10 และ 3 ตามลำดับ และพบต้นพอลิพลอยด์จากชิ้นส่วนที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน 0.25% เป็นเวลา 3 วัน มากที่สุด (วัชรินทร์, 2544)

การเลี้ยงปลายยอดขมิ้นอ้อยขนาดยาว 1 ซม ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.25% เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP 3 มก/ล เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าชิ้นส่วนมีอัตราการรอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับโคลชิซินที่เพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 100, 47, 33, 17 และ 7 ตามลำดับ และพบต้นพอลิพลอยด์จากชิ้นส่วนที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน 0.25% เป็นเวลา 2 วัน มากที่สุด (วัชรินทร์, 2544)

การเลี้ยงปลายยอดขิงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีโคลชิซินความเข้มข้น 0.2% เป็นเวลา 0, 4, 8, 12 และ 14 วัน ทำให้ชิ้นส่วนมีการรอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับโคลชิซินเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 97, 93, 83, 53 และ 17 ตามลำดับ และพบต้นเททระพลอยด์จากการให้โคลชิซินที่เวลา 0, 4, 8, 12 และ 14 วัน คิดเป็นร้อยละ 0.0, 5.6, 50.0, 33.3 และ 11.1 ของจำนวนต้นเททระพลอยด์ทั้งหมด ผู้วิจัยสรุปว่าการให้โคลชิซินความเข้มข้น 0.2% เป็นเวลา 8 วัน เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการชักนำเททระพลอยด์ของขิง (Adaniya and Shirai, 2001)

นอกจากนี้ยังพบว่าการเลี้ยงปลายยอดขิงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซิน 0.5% เป็นเวลา 2 ชม ทำให้ได้ต้นเททระพลอยด์ 2% จากชิ้นส่วนที่ใช้ทั้งหมด 500 ชิ้นส่วน (Smith *et al.*, 2004) และการเลี้ยงปลายยอดเปราะหอมในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.3% เป็นเวลา 0, 6, 12 และ 18 ชม ทำให้อัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนลดลงเมื่อระยะเวลาที่ได้รับโคลชิซินที่เพิ่มขึ้น และพบว่าต้นอ่อนที่มีสัณฐานแตกต่างจากต้นปกติคือมีความหนาของใบ และขนาดเซลล์คุมปากใบมากกว่าต้นปกติ ผู้วิจัยสรุปว่าการแช่ชิ้นส่วนในสารละลายโคลชิซิน 0.3% เป็นเวลา 18 ชม ทำให้ได้ต้นที่มีสัณฐานเปลี่ยนแปลงมากที่สุด (อมรรัตน์ และอรดี, 2543)

2.7 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสมบูรณ์พันธุ์ของพืชเททระพลอยด์

ต้นพืชเททระพลอยด์อาจแบ่งตามลักษณะทางพันธุกรรมได้เป็น 2 แบบ คืออัลโลเททระพลอยด์ (allotetraploid) หมายถึงพืชที่มีโครโมโซม 4 ชุด ที่ไม่เหมือนกันทั้งหมด และออโตเททระพลอยด์ (autotetraploid) หมายถึงพืชที่มีโครโมโซมเหมือนกันทั้ง 4 ชุด (ประดิษฐ์, 2543)

อัลโลเททระพลอยด์มักใช้แก้ปัญหาความเป็นหมันของลูกผสมดิพลอยด์ ซึ่งมีสาเหตุความเป็นหมันมาจากการไม่เข้าคู่กันของโครโมโซมที่มาจากต้นพ่อและแม่ โดยการเพิ่มชุดโครโมโซมทำให้ลูกผสมมีโครโมโซมที่เหมือนกันเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งชุด จึงมีโอกาสที่โครโมโซมคู่เหมือนจะเข้าคู่กันเอง ทำให้สามารถฟื้นฟูความสมบูรณ์พันธุ์ให้แก่ลูกผสมที่เป็นหมันได้ (Ranney, 2004)

ออโตเททระพลอยด์มักใช้เพิ่มขนาดให้แก่ต้นดิพลอยด์ เช่น เพิ่มขนาดลำต้น ใบ ราก ดอก ผล และเมล็ด เป็นต้น แต่ในขณะเดียวกันออโตเททระพลอยด์มักจะเป็นหมันหรือติดเมล็ดน้อยลง เนื่องจากออโตเททระพลอยด์อาจมีโครโมโซมคู่เหมือนมากกว่า 1 คู่ ทำให้การเข้าคู่กันของโครโมโซมในการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์เป็นแบบผิดปกติ เช่น โครโมโซมคู่เหมือนเข้าคู่กันมากกว่า 2 แท่ง (multiple paired chromosome) หรือ โครโมโซมบางแท่งขาดคู่ (unpaired chromosome) (Ranney, 2004) การสร้างออโตเททระพลอยด์จึงใช้ประโยชน์ในการเพิ่มขนาดให้แก่ไม้ดอก ไม้ผล และพืชสมุนไพร ที่ไม่ได้ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด

2.7.1 อัลโลเททระพลอยด์

การชักนำต้นลูกผสมดิพลอยด์ให้เป็นเททระพลอยด์ส่งผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นพืช และความสมบูรณ์พันธุ์ของพืชดังต่อไปนี้

Dendrobium superbiens เป็นกล้วยไม้หวายลูกผสมที่เป็นหมัน เกิดจากการผสมข้ามชนิดระหว่าง *D. phalaenopsis* กับ *D. undulatum* การชักนำให้ต้นกล้วยไม้ลูกผสมดิพลอยด์เป็นต้น เททระพลอยด์ส่งผลให้ลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงคือ มีขนาดดอกใหญ่ขึ้น กลีบดอกหนาขึ้นก้านดอกตั้งตรงและมีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ และอายุการบานของดอกนานขึ้นถึง 8 วัน แต่ต้นเททระพลอยด์ให้จำนวนดอกต่อช่อน้อยกว่าต้นดิพลอยด์คือ ช่อดอกเททระพลอยด์ที่เป็นช่อใหญ่จะมีจำนวนดอกประมาณ 13-15 ดอก ในขณะที่ช่อดอกดิพลอยด์ที่เป็นช่อใหญ่จะมีจำนวนดอกประมาณ 18-20 ดอก ส่วนช่อดอกเล็กจะมีจำนวนดอกใกล้เคียงกันคือ 7-10 ดอก นอกจากนี้ยังพบว่าต้นลูกผสมเททระพลอยด์มีเปอร์เซ็นต์การติดฝักสูงขึ้น โดยการผสมที่ใช้ต้นลูกผสมดิพลอยด์เป็นต้นแม่และใช้ต้นเททระพลอยด์เป็นต้นพ่อจะมีการติดฝักเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 62 (สาริณี, 2538)

มะเขือลูกผสม (*Solanum integrifolium* Poir. x *S. melongena* L.) เป็นการสร้างลูกผสมข้ามชนิดเพื่อถ่ายทอดยีนต้านทานต่อเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith จาก

S. integrifolium Poir. และยีนต้านทานต่อเชื้อ *Fusarium* sp. จาก *S. melongena* L. ไปยังลูกผสมแต่ลูกผสมที่ได้เป็นหมัน การนำต้นลูกผสมดิพลอยด์มาเพิ่มชุดโครโมโซมให้เป็นต้นเททระพลอยด์ส่งผลให้ลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงคือ มีความยาวเซลล์คุมปากใบ ขนาดอับละอองเกสร ขนาดละอองเกสรตัวผู้ จำนวนเมล็ดต่อผล และน้ำหนักเมล็ด (100 เมล็ด) เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มชุดโครโมโซมยังสามารถฟื้นฟูความสมบูรณ์พันธุ์ให้กับลูกผสมได้ โดยต้นลูกผสมดิพลอยด์มีละอองเกสรตัวผู้ที่มีชีวิตเพียงร้อยละ 9 มีการติดผลน้อยมากและแทบไม่มีเมล็ดเลย ส่วนต้นเททระพลอยด์มีเปอร์เซ็นต์ละอองเกสรตัวผู้ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 72 ส่งผลให้ต้นเททระพลอยด์มีการติดผลเพิ่มขึ้นและมีเมล็ดจำนวนมากและยังพบว่าเมื่อนำเมล็ดจากต้นเททระพลอยด์ไปปลูกในแปลงจะได้ต้นกล้าที่มีความต้านทานต่อเชื้อ *P. solanacearum* ได้ดีอีกด้วย (Ali *et al.*, 1992)

ข้าวลูกผสม (*Oryza sativa* x *O. minuta*) เกิดจากการผสมข้ามชนิดระหว่างข้าวพันธุ์ กข7 (*O. sativa*) กับข้าวพันธุ์ป่า (*O. minuta*) เพื่อถ่ายทอดลักษณะต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากข้าวพันธุ์ป่าไปสู่ข้าวพันธุ์ปลูกทำให้ได้ต้นลูกผสมที่เป็นหมัน การเพิ่มชุดโครโมโซมให้ต้นลูกผสมดิพลอยด์เป็นต้นเททระพลอยด์ทำให้อัตราการติดเมล็ดสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าต้นลูกผสมเททระพลอยด์ชั่วที่ 3 แสดงลักษณะต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลอีกด้วย (สุพรรณญิกา, 2539)

Inca lily ลูกผสม (*Alstroemeria aurea* x *A. caryophyllaea*) เป็นไม้ดอกในวงศ์ Alstroemeriaceae เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่าง *A. aurea* ซึ่งเป็นพันธุ์การค้าที่มีดอกขนาดใหญ่สีส้ม กับ *A. caryophyllaea* ซึ่งมีดอกขนาดเล็กสีขาวได้ลูกผสมที่เป็นหมัน การเพิ่มชุดโครโมโซมให้ต้นลูกผสมดิพลอยด์เป็นเททระพลอยด์ส่งผลให้ลักษณะสัณฐานวิทยาในระยะออกดอกเปลี่ยนแปลงคือ มีจำนวนปากใบต่อพื้นที่ลดลง แต่มีความยาวเซลล์คุมปากใบ ความสูงของต้น ขนาดของใบ และน้ำหนักแห้งใบต่อพื้นที่มากกว่าต้นดิพลอยด์ อย่างไรก็ตามพบว่าต้นลูกผสมเททระพลอยด์ไม่ติดเมล็ด จากการศึกษาพันธุศาสตร์ของเซลล์ในระยะไมโอซิสของ pollen mother cells (PMCs) พบว่า PMCs ในต้นลูกผสมดิพลอยด์มีพฤติกรรมการแบ่งเซลล์ในระยะไมโอซิสที่ผิดปกติคือ โครโมโซมไม่เข้าคู่กัน เกิดโครโมโซม bridges และโครโมโซม lagging ส่วน PMCs ของต้นลูกผสมเททระพลอยด์มีการเข้าคู่กันของโครโมโซมได้เป็นปกติ และพบการเกิด bridges ของโครโมโซมลดลง ส่งผลให้ต้นลูกผสมเททระพลอยด์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสรตัวผู้เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 12 แต่การผสมตัวเองและการผสมข้ามของลูกผสมเททระพลอยด์ยังคงไม่ติดเมล็ด ผู้วิจัยจึงสรุปว่าความเป็นหมันของลูกผสมอาจมาจากสาเหตุอื่น (Lu and Bridgen, 1997)

2.7.2 ออโตเททระพลอยด์

การชักนำต้นดิพลอยด์ให้เป็นเททระพลอยด์ส่งผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นพืช และความสมบูรณ์พันธุ์ของพืชดังต่อไปนี้

เยอบีร่าพันธุ์ยุโรป (*Gerbera jamesonii* Hort.) จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เทอร์รานีวาลิส (terra nivalis) ให้ดอกสีขาว เทอร์รามอนซา (terra monxa) ให้ดอกสีแดง และเทอร์ราพาเรด (terra parade) ให้ดอกสีชมพู การชักนำต้นเยอบีร่าดิพลอยด์สายพันธุ์ต่างๆ ให้เป็นต้นเททระพลอยด์ส่งผลลักษณะสัณฐานวิทยาในระยะออกดอกเปลี่ยนแปลงคือ มีความยาวเซลล์คุมปากใบ ความหนาใบ ความกว้างและความยาวของกลีบดอก ความหนาของกลีบดอก และเส้นผ่าศูนย์กลางดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น ก้านช่อดอกสั้นลงแต่มีขนาดใหญ่ขึ้น มีสีของดอก และสีของใบเข้มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าต้นเททระพลอยด์มีการเจริญเติบโตช้า มีการแตกกอ และให้จำนวนดอกน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ (ดิเรกและคณะ, 2538)

Salvia miltiorrihiza Bge. เป็นพืชที่ปลูกในประเทศจีนเพื่อใช้รากในการผลิตสาร tanshinone และ cryptotanshinone ใช้เป็นตัวยาในการรักษาโรคหัวใจ การชักนำให้ต้นดิพลอยด์เป็นต้นเททระพลอยด์ส่งผลให้ลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่าหลังจากการปลูกในแปลงเป็นเวลา 2 ปี ต้นเททระพลอยด์มีจำนวนปากใบต่อพื้นที่ลดลง แต่มีความยาวเซลล์คุมปากใบ ความหนาของใบ ความสูงของต้น จำนวนราก เส้นผ่าศูนย์กลางราก และความยาวรากมากกว่าต้นดิพลอยด์เป็นผลให้ต้นเททระพลอยด์มีน้ำหนักสดของรากมากกกว่าต้นดิพลอยด์ 1.54-2.79 เท่า และจากการตรวจวัดปริมาณสารสำคัญในรากโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบต้นเททระพลอยด์ที่มีเปอร์เซ็นต์สารสำคัญในรากสูงกว่าต้นดิพลอยด์ เมื่อนำต้นเททระพลอยด์ทั้งหมดมาทำการคัดเลือกจึงได้ต้นเททระพลอยด์ที่มีทั้งเปอร์เซ็นต์สารสำคัญสูง และมีผลผลิตรากสูงกว่าต้นดิพลอยด์ (Gao *et al.*, 1996)

Scutellaria baicalensis เป็นพืชที่ใช้รากเป็นยาสมุนไพรจีนที่มีสรรพคุณในการบรรเทาอาการไอ ห้ามเลือด และป้องกันการแท้ง การชักนำต้นดิพลอยด์เป็นต้นเททระพลอยด์ส่งผลให้ลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไปคือ มีจำนวนปากใบต่อพื้นที่ลดลง แต่มีความยาวเซลล์คุมปากใบ ขนาดของใบ ความหนาใบ ขนาดของลำต้น และขนาดของรากใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ เป็นผลให้ต้นเททระพลอยด์มีน้ำหนักสดของราก และผลผลิตรากสูงกว่าต้นดิพลอยด์ และจากการตรวจวัดปริมาณสาร baicalin ภายในรากจากต้นที่ปลูกในแปลงเป็นเวลา 8 เดือน โดยวิธี HPLC พบต้น เททระพลอยด์ที่มีเปอร์เซ็นต์สาร baicalin สูงกว่าต้นดิพลอยด์ ประกอบกับต้นเททระพลอยด์มีผลผลิตรากสูงกว่าต้นดิพลอยด์ จึงคาดว่าจะสามารถคัดเลือกต้นเททระพลอยด์ที่มีทั้งเปอร์เซ็นต์สาร baicalin สูง และมีผลผลิตรากสูงกว่าต้นดิพลอยด์ได้ ส่วนความสมบูรณ์พันธุ์นั้นพบว่าต้น

เททระพลอยด์มีความสมบูรณ์พันธุ์ลงลง จากต้นดิพลอยด์ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ปกติเปลี่ยนเป็นต้นเททระพลอยด์ที่กึ่งเป็นหมัน (semi-sterile) (Gao *et al.*, 2002)

Hyoscyamus niger L. เป็นพืชในวงศ์ Solanaceae ที่ผลิตสารสำคัญที่มีสรรพคุณเป็นยาชื่อ tropane การเพิ่มชุดโครโมโซมต้นดิพลอยด์ให้เป็นต้นเททระพลอยด์ทำให้ต้นพืชแข็งแรงขึ้นและมีปริมาณสาร tropane มากขึ้น จากการปลูกและคัดเลือกต้นเททระพลอยด์โดยเทคนิคการผสมเปิดพบว่าต้นเททระพลอยด์ที่เพาะจากเมล็ดที่ได้จากการผสมเปิดรุ่นที่ 2 มีจำนวนปากใบต่อพื้นที่น้อยกว่าต้นดิพลอยด์ แต่มีความยาวเซลล์คุมปากใบ ขนาดละอองเกสรตัวผู้ ขนาดของใบ น้ำหนักสดใบต่อพื้นที่ จำนวนเมล็ด และน้ำหนัก 1,000 เมล็ดมากกว่าต้นดิพลอยด์ จากการวัดปริมาณสารสำคัญของต้นที่ปลูกในแปลงจนมีอายุ 100 วัน พบว่าต้นเททระพลอยด์มีผลผลิตน้ำหนักสดต่อแปลงน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ แต่มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งสูงกว่าต้นดิพลอยด์ร้อยละ 4.8 ด้วยผลผลิตน้ำหนักแห้งที่สูงกว่า จึงส่งผลให้ต้นเททระพลอยด์มีปริมาณสารสำคัญมากกว่าต้นดิพลอยด์ถึงร้อยละ 22.5 ส่วนความสมบูรณ์พันธุ์นั้นพบว่าต้นเททระพลอยด์ในรุ่นที่ 2 มีอัตราการติดเมล็ดใกล้เคียงกับต้นดิพลอยด์ จากการผสมตัวเองของต้นเททระพลอยด์ในรุ่นแรกมีอัตราการติดเมล็ดเฉลี่ยร้อยละ 75 และเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 92 ในรุ่นที่ 2 ซึ่งใกล้เคียงกับมีอัตราการติดเมล็ดต้นดิพลอยด์คือร้อยละ 98 (Lavania and Srivastava, 1991)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมต้นพืชทดลอง ชิ้นส่วนพืช และสภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1.1 การเตรียมต้นพืชทดลอง

ต้นปทุมมาลูกผสม (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*; 2n=28) (ภาพที่ 4 ก, ข) เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปทุมมา (*C. alismatifolia*; 2n=32) กับบัวโกเมน (*C. rhabdota*; 2n=24) โดยคุณวิภาดา ทองทักษิณ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย เป็นผู้สร้างลูกผสมดังกล่าวขึ้นและได้มอบต้นปทุมมาลูกผสมในหลอดแก้วมาเพื่อใช้เป็นวัสดุทดลอง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปทุมมาลูกผสมโดยศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย เริ่มจากนำใช้ช่อดอกอ่อนที่ยังไม่โผล่พ้นลำต้นเทียมมาเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP 10 มก/ล ร่วมกับ IAA 0.1 มก/ล น้ำตาลซูโครส 30 ก/ล และวุ้น 6.5 ก/ล ที่ pH 5.8 เป็นเวลา 1-2 เดือน จนกระทั่งเกิดกลุ่มยอด จากนั้นจึงย้ายกลุ่มยอดมาเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี Imazalil 4 มก/ล ร่วมกับ TDZ 0.5 มก/ล น้ำตาลซูโครส 30 ก/ล และวุ้น 6.5 ก/ล ที่ pH 5.8 ตัดแบ่งโดยการนำต้นอ่อนมาตัดใบและรากให้ชิ้นส่วนโคนต้นมีความสูงประมาณ 1 ซม และย้ายไปเลี้ยงในอาหารขวดใหม่ทุก 4 สัปดาห์

เมื่อได้รับต้นปทุมมาลูกผสมในหลอดแก้วจากศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จึงได้นำต้นปทุมมาลูกผสมดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงให้เพิ่มจำนวนต้น ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยนำต้นอ่อนปทุมมาลูกผสมมาตัดใบและรากให้ชิ้นส่วนโคนต้นที่มีความสูง 0.5-1 ซม เลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP 2 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.25 มก/ล น้ำตาลซูโครส 30 ก/ล และวุ้น 6.5 ก/ล ที่ pH 5.8 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งพบว่าได้จำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 3-4 ยอดต่อชิ้นส่วน ทำการตัดแบ่งต้นอ่อนไปเลี้ยงในอาหารขวดใหม่ทุก 4 สัปดาห์ จนกว่าจะได้จำนวนยอดเพียงพอสำหรับใช้เป็นวัสดุในการทดลอง

3.1.2 การเตรียมชิ้นส่วนหน่ออ่อน และชิ้นส่วนโคนต้น

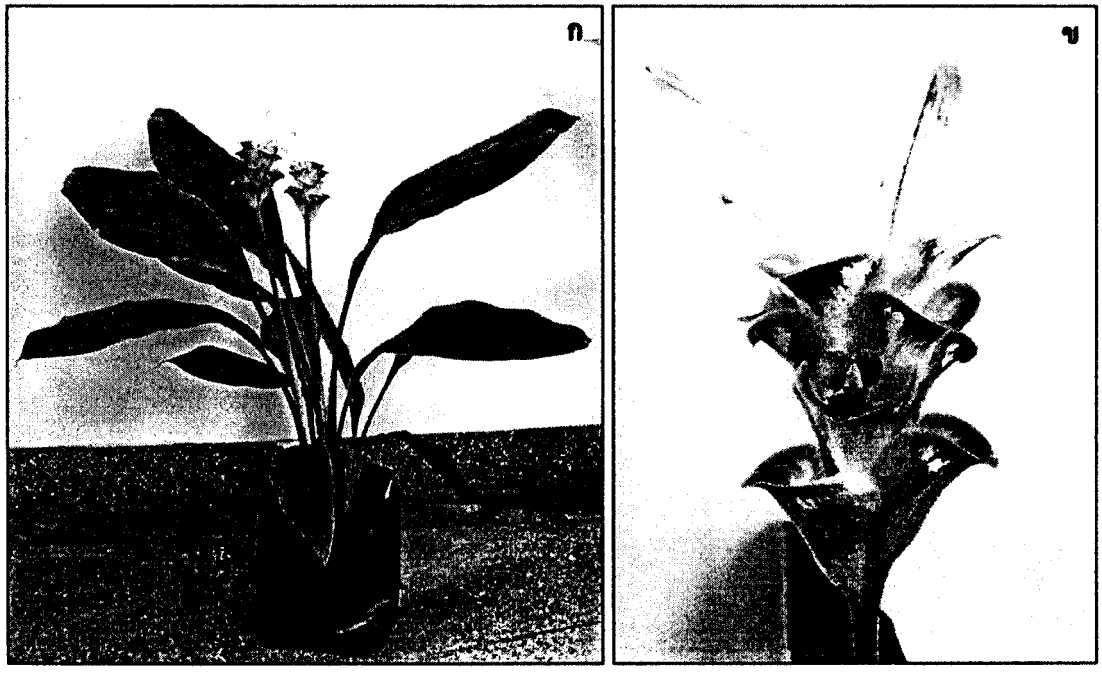
3.1.2.1 ชิ้นส่วนหน่ออ่อน หมายถึง หน่ออ่อนในสภาพหลอดแก้วที่มีความสูงประมาณ 0.5 ซม เตรียมจากต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตจนมีอายุ 3 เดือน (ภาพที่ 5 ก, ข) นำมาตัดใบและรากให้ชิ้นส่วนโคนต้นมีความสูง 0.5 ซม (ภาพที่ 5 ค) แล้วเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 10-14 วัน (ภาพที่ 5 ง) คัดเลือกหน่ออ่อนสีขาวอมเขียวที่มีกาบใบห่อหุ้มอยู่ขนาด 0.5 ซม มาใช้

ในการทดลอง (ภาพที่ 6 ก)

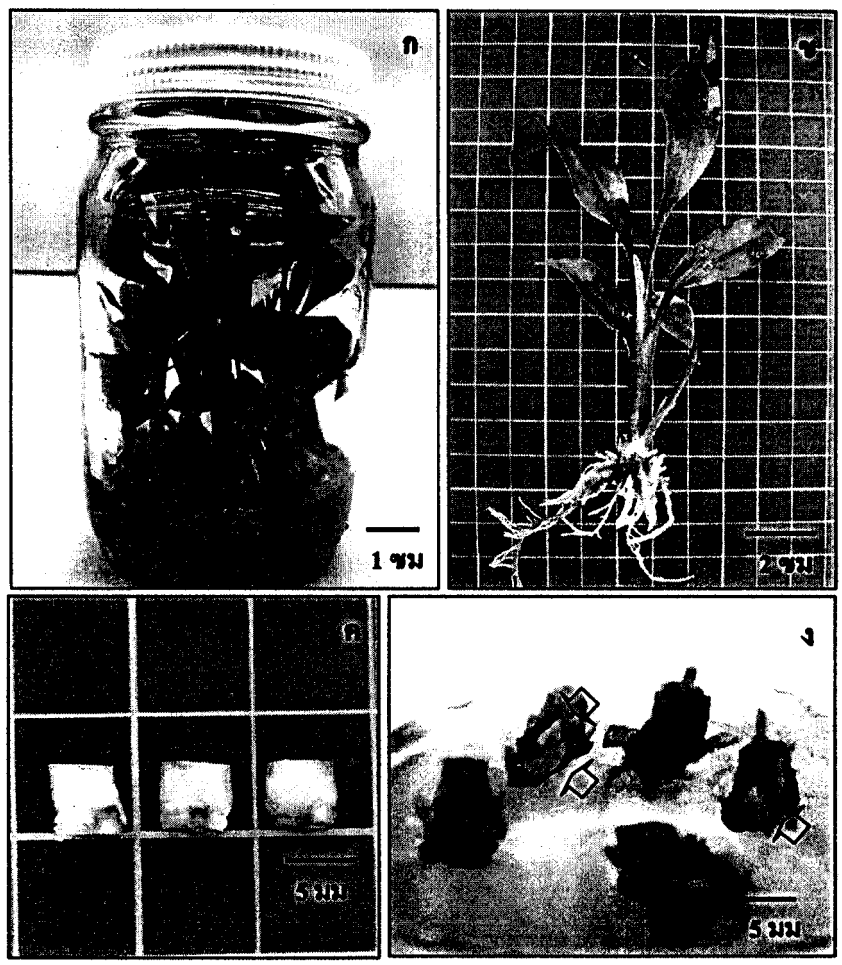
3.1.2.2 ชิ้นส่วนโคนต้น หมายถึง โคนต้นในสภาพหลอดแก้วที่มีความสูงประมาณ 0.5 ซม (ซึ่งเป็นปลายยอดที่มีก้านใบห่อหุ้มอยู่) เตรียมจากต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตจนมีอายุ 3 เดือน (ภาพที่ 5 ก, ข) นำมาตัดใบและรากให้ชิ้นส่วนโคนต้นมีความสูง 0.5 ซม มาใช้ในการทดลอง (ภาพที่ 5 ค และ ภาพที่ 6 ข)

3.1.3 สภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

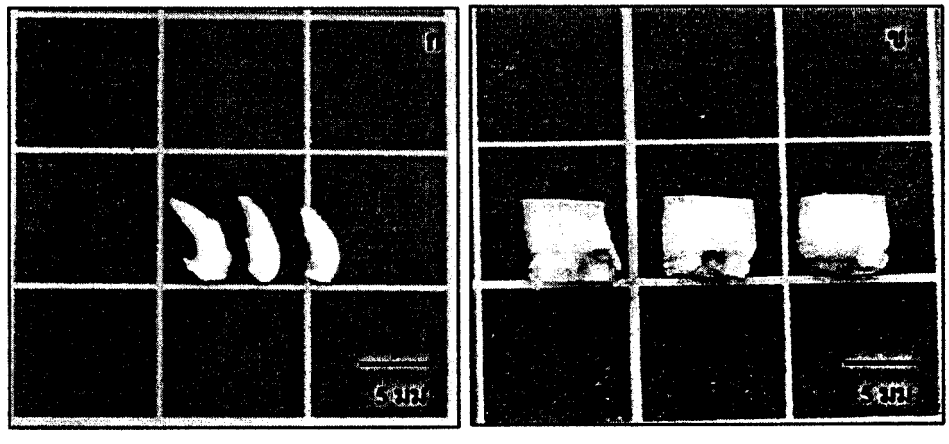
ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความเข้มแสง (Photosynthetically Available Radiation; PAR) 25-28 μmol $m^{-2}s^{-1}$ (วัดโดยใช้เครื่อง Sunfleck PAR Ceptometer Model SF-80; Decagon Devices, Inc. USA) ได้รับแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ตั้งแต่เวลา 6.00-20.00 น. มีอุณหภูมิเฉลี่ย 26±2 °C



ภาพที่ 4 ลักษณะต้น (ก) และช่อดอกปทุมมาลูกผสม (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*; 2n=28) (ข) ที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



ภาพที่ 5 ต้นอ่อนของปทุมมาลูกผสมในหลอดแก้วที่มีอายุ 3 เดือน (ก, ข) ชิ้นส่วนโคนต้นที่ใช้ในการเตรียมหน่ออายุเยาว์ (ค) และหน่ออ่อนที่ใช้เป็นวัสดุทดลอง (ง)



ภาพที่ 6 ชิ้นส่วนหน่ออ่อน (ก) และชิ้นส่วนโคนต้น (ข) ปทุมมาลูกผสมที่ใช้เป็นวัสดุทดลอง

3.2 วิธีการศึกษา แผนการทดลอง และการบันทึกผล

3.2.1 การศึกษาอิทธิพลของ TDZ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดในชิ้นส่วนหน่ออ่อน และชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาลูกผสม

3.2.1.1 ชิ้นส่วนหน่ออ่อน

1) การศึกษาช่วงความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม

พืชที่ใช้ทดลอง

ชิ้นส่วนหน่ออ่อน ที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 3.1.2 (1)

วิธีการทดลอง

เลี้ยงหน่ออ่อนในอาหารเหลวสูตร MS (ภาคผนวกที่ ก.1.1.2) ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มก/ล ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล ปริมาตรอาหาร 5 มล/ขวด (วิธีการเตรียมดูภาคผนวกที่ ก.1.4.1) ขวดละ 5 ชิ้นส่วน บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที ในที่มีแสง 14 ชม/วัน เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำชิ้นส่วนมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 100 มล นาน 3 นาที และย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จึงทำการตัดแบ่งกลุ่มยอดแล้วเปลี่ยนขวดย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม อีก 2 สัปดาห์

การวางแผนการทดลอง

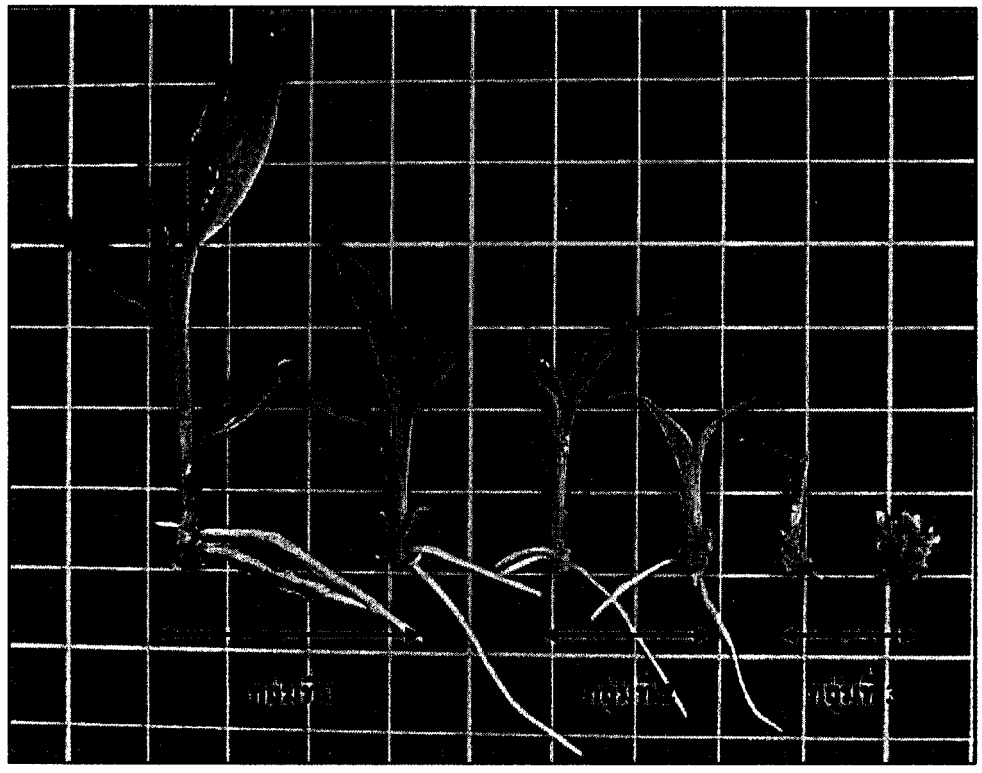
วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยมีระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 มก/ล เป็นสิ่งทดลอง มีจำนวน 10 ซ้ำ (ขวด) ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วน

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลา 8 และ 10 สัปดาห์ และเมื่อครบ 10 สัปดาห์ ทำการวัดคุณภาพของยอดที่ได้โดยจัดกลุ่มการเจริญยอดตามความสูงเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ยอดมีความสูงมากกว่า 4 ซม, กลุ่มที่ 2 ยอดมีความสูง 2-4 ซม และกลุ่มที่ 3 ยอดมีความสูงน้อยกว่า 2 ซม (ภาพที่ 7)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติใช้วิธี Analysis of Variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์



ภาพที่ 7 กลุ่มยอดที่เจริญจากชิ้นส่วนที่ได้รับ TDZ หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 10 สัปดาห์ (ก และ ข) และการแบ่งกลุ่มยอดตามความสูงเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1. สูงกว่า 4 ซม กลุ่มที่ 2. 2-4 ซม และกลุ่มที่ 3. ต่ำกว่า 2 ซม (ค)

2) การศึกษาระดับความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม

พืชที่ใช้ทดลอง

ชิ้นส่วนหน่ออ่อน ที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 3.1.2 (1)

วิธีการทดลอง

เลี้ยงหน่ออ่อนในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มก/ล ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล ปริมาตรอาหาร 5 มล/ขวด ขวดละ 5 ชิ้นส่วน บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที ในที่มีแสง 14 ชม/วัน เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำชิ้นส่วนมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 100 มล นาน 3 นาที และย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 6 สัปดาห์ จึงทำการตัดแบ่งกลุ่มยอดแล้วเปลี่ยนขวดย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมอีก 4 สัปดาห์

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มก/ล เป็นสิ่งทดลอง มีจำนวน 10 ซ้ำ (ขวด) ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วน

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลา 6 และ 10 สัปดาห์ และเมื่อครบ 10 สัปดาห์ ทำการวัดคุณภาพของยอดที่ได้โดยจัดกลุ่มการเจริญยอดตามความสูงเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ยอดมีความสูงมากกว่า 4 ซม, กลุ่มที่ 2 ยอดมีความสูง 2-4 ซม และกลุ่มที่ 3 ยอดมีความสูงน้อยกว่า 2 ซม (ภาพที่ 7)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติใช้วิธี Analysis of Variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

3) การศึกษาระยะเวลาการให้ TDZ ที่เหมาะสม

พืชที่ใช้ทดลอง

ชิ้นส่วนหน่ออ่อน ที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 3.1.2 (1)

วิธีการทดลอง

เลี้ยงหน่ออ่อนในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล ปริมาตรอาหาร 5 มล/ขวด ขวดละ 5 ชิ้นส่วน บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที ในที่มีแสง 14 ชม/วัน เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน จากนั้นนำชิ้นมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 100 มล นาน 3 นาที และย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 6 สัปดาห์ จึงทำการตัดแบ่งกลุ่มยอดแล้วเปลี่ยนขวดย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร เดิมอีก 4 สัปดาห์

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีระยะเวลาการให้ TDZ ที่แตกต่างกัน 5 ระดับ เป็นสิ่งทดลอง คือ 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน มีจำนวน 10 ซ้ำ (ขวด) ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วน

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลา 6 และ 10 สัปดาห์ และเมื่อครบ 10 สัปดาห์ ทำการวัดคุณภาพของยอดที่ได้โดยจัดกลุ่มการเจริญยอดตามความสูงเป็น

3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ยอดมีความสูงมากกว่า 4 ซม, กลุ่มที่ 2 ยอดมีความสูง 2-4 ซม และกลุ่มที่ 3 ยอดมีความสูงน้อยกว่า 2 ซม (ภาพที่ 7)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติใช้วิธี Analysis of Variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

3.1.1.2 ชิ้นส่วนโคนต้น

1) การศึกษาช่วงความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม

พืชที่ใช้ทดลอง

ชิ้นส่วนโคนต้นอายุ 3 เดือน ที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 3.1.2 (2)

วิธีการทดลอง

เลี้ยงโคนต้นในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มก/ล ต่อขวด ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล ปริมาตรอาหาร 10 มล/ขวด ขวดละ 5 ชิ้นส่วนบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที ในที่มีแสง 14 ชม/วัน เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำชิ้นส่วนมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 100 มล นาน 3 นาที และย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จึงตัดแบ่งกลุ่มยอดแล้วเปลี่ยนขวดย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมอีก 2 สัปดาห์

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 มก/ล เป็นสิ่งทดลอง มีจำนวน 10 ซ้ำ (ขวด) ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วน

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลา 8 และ 10 สัปดาห์ และเมื่อครบ 10 สัปดาห์ ทำการวัดคุณภาพของยอดที่ได้โดยจัดกลุ่มการเจริญยอดตามความสูงเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ยอดมีความสูงมากกว่า 4 ซม, กลุ่มที่ 2 ยอดมีความสูง 2-4 ซม และกลุ่มที่ 3 ยอดมีความสูงน้อยกว่า 2 ซม (ภาพที่ 7)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติใช้วิธี Analysis of Variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

2) การศึกษาระดับความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม

พืชที่ใช้ทดลอง

ชิ้นส่วนโคนต้นอายุ 3 เดือน ที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 3.1.2 (2)

วิธีการทดลอง

เลี้ยงโคนต้นในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มก/ล ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล ปริมาตรอาหาร 10 มล/ขวด ขวดละ 5 ชิ้นส่วน บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที ในที่มีแสง 14 ชม/วัน เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำชิ้นส่วนมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 100 มล นาน 3 นาที และย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 6 สัปดาห์ จึงตัดแบ่งกลุ่มยอดแล้วเปลี่ยนขวดย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมอีก 4 สัปดาห์

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มก/ล เป็นสิ่งทดลอง มีจำนวน 10 ซ้ำ (ขวด) ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วน

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลา 6 และ 10 สัปดาห์ และเมื่อครบ 10 สัปดาห์ ทำการวัดคุณภาพของยอดที่ได้โดยจัดกลุ่มการเจริญยอดตามความสูงเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ยอดมีความสูงมากกว่า 4 ซม, กลุ่มที่ 2 ยอดมีความสูง 2-4 ซม และกลุ่มที่ 3 ยอดมีความสูงน้อยกว่า 2 ซม (ภาพที่ 7)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติใช้วิธี Analysis of Variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3) การศึกษาระยะเวลาการให้ TDZ ที่เหมาะสม

พืชที่ใช้ทดลอง

ชิ้นส่วนโคนต้นอายุ 3 เดือน ที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 3.1.2 (2)

วิธีการทดลอง

เลี้ยงโคนต้นในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล ปริมาตรอาหาร 10 มล/ขวด ขวดละ 5 ชิ้นส่วน บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที ในที่มีแสง 14 ชม/วัน เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน จากนั้นนำชิ้นส่วนมาล้าง

ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 100 มล นาน 3 นาที และย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 6 สัปดาห์ จึงตัดแบ่งกลุ่มยอดแล้วเปลี่ยนขวดย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมอีก 4 สัปดาห์

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีระยะเวลาการให้ TDZ ที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน เป็นสิ่งทดลอง มีจำนวน 10 ซ้ำ (ขวด) ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วน

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลา 6 และ 10 สัปดาห์ และเมื่อครบ 10 สัปดาห์ ทำการวัดคุณภาพของยอดที่ได้โดยจัดกลุ่มการเจริญยอดตามความสูงเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ยอดมีความสูงมากกว่า 4 ซม, กลุ่มที่ 2 ยอดมีความสูง 2-4 ซม และกลุ่มที่ 3 ยอดมีความสูงน้อยกว่า 2 ซม (ภาพที่ 7)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติใช้วิธี Analysis of Variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4) การศึกษาผลร่วมของการผ่าชิ้นส่วน ความเข้มข้นและระยะเวลาการให้ TDZ

พืชที่ใช้ทดลอง

ใช้ชิ้นส่วน 2 ชนิด คือ ชิ้นส่วนโคนต้นไม่ผ่า และชิ้นส่วนโคนต้นผ่าครึ่ง โดยโคนต้นไม่ผ่าเตรียมตามวิธีการในข้อ 3.1.2 (2) ส่วนชิ้นส่วนโคนต้นผ่าครึ่งเตรียมได้จากการนำชิ้นส่วนโคนต้นจากข้อ 3.1.2 (2) มาผ่าครึ่งตามยาวให้ได้ชิ้นส่วน 2 ชิ้น ที่มีขนาดเท่ากัน โดยใช้ 1 ชิ้น เป็น 1 ชิ้นส่วน

วิธีการทดลอง

เลี้ยงโคนต้นไม่ผ่าและโคนต้นผ่าครึ่งในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มก/ล ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล ปริมาตร 10 มล/ขวด ขวดละ 5 ชิ้นส่วน บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที ในที่มีแสง 14 ชม/วัน เป็นเวลา 1, 3 และ 5 วัน จากนั้นนำชิ้นส่วนมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 100 มล นาน 3 นาที และย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 6 สัปดาห์ จึงตัดแบ่งกลุ่มยอดแล้วเปลี่ยนขวดย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมอีก 4 สัปดาห์

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) โดยมี3 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 ชนิดชิ้นส่วนที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ ชิ้นส่วนโคนต้นไม่ผ่าและโคนต้นผ่าครึ่ง, ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของ TDZ ที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 0, 1, 3 และ 5 มก/ล และปัจจัยที่ 3 ระยะเวลาการให้ TDZ ที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 1, 3 และ 5 วัน รวมเป็น 24 สิ่งทดลอง มีจำนวน 4 ซ้ำ (ขวด) ซ้ำละ 4 ชิ้นส่วน

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลา 6 และ 10 สัปดาห์ และเมื่อครบ 10 สัปดาห์ ทำการวัดคุณภาพของยอดที่ได้โดยจัดกลุ่มการเจริญยอดตามความสูงเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ยอดมีความสูงมากกว่า 4 ซม, กลุ่มที่ 2 ยอดมีความสูง 2-4 ซม และกลุ่มที่ 3 ยอดมีความสูงน้อยกว่า 2 ซม (ภาพที่ 7)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติใช้วิธี Analysis of Variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least Significant Difference (LSD)

3.2.2 การศึกษาอิทธิพลของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของปทุมมาลูกผสม

3.2.2.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซม

พืชที่ใช้ทดลอง

ชิ้นส่วนหน่ออ่อน ที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 3.1.2 (1)

วิธีการทดลอง

เลี้ยงหน่ออ่อนในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี TDZ 1 มก/ล ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล ปริมาตรอาหาร 5 มล/ขวด จำนวน 20 ขวด ขวดละ 5 ชิ้นส่วน เป็นเวลา 4 วัน บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 80 รอบต่อนาที ในที่มีแสง 14 ชม/วัน จากนั้นนำชิ้นส่วนในแต่ละขวดมาล้างในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 100 มล เป็นเวลา 3 นาที แล้วย้ายชิ้นส่วนในสิ่งทดลองควบคุมจำนวน 4 ขวด ไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต และย้ายชิ้นส่วนที่เหลืออีก 4 สิ่งทดลอง จำนวน 16 ขวด ไปเลี้ยงในอาหารที่มีโคลชิซินความเข้มข้น 0, 800, 1,000 และ 1,200 มก/ล ที่มี dimethylsulfoxide (DMSO) 2% ในขวดรูปชมพูขนาดบรรจุ 125 มล ปริมาตรอาหาร 5 มล/ขวด (วิธีการเตรียมดูภาคผนวกที่ ก.1.4.2) โดยมีจำนวน 4 ขวดในแต่ละความเข้มข้น ขวดละ 5 ชิ้นส่วน วางขวดบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 80 รอบต่อนาที ในที่มีแสง 14 ชม/วัน เป็นเวลา 4 วัน แล้วนำชิ้นส่วนในแต่ละขวดมาล้างในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาณ 100 มล เป็นเวลา 3 นาที และย้ายไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 6 สัปดาห์ และทำ

การตัดแบ่งกลุ่มยอดไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม 1 มก/ล BAP และ 0.05 มก/ล NAA ทุก 4 สัปดาห์ จนครบ 28 สัปดาห์

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีระดับความเข้มข้นของ โคลชิซินที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 0, 800, 1,000 และ 1,200 มก/ล และสิ่งทดลองควบคุมอีก 1 สิ่งทดลอง คือ ไม่ได้รับโคลชิซินและไม่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี 2% DMSO เป็นเวลา 4 วัน รวมเป็น 5 สิ่งทดลอง มีจำนวน 4 ซ้ำ (ขวด) ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วน

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกจำนวนชิ้นส่วนที่รอดชีวิตและจำนวนยอดใหม่ที่ระยะเวลา 6, 15, 24 และ 28 สัปดาห์ เมื่อครบ 28 สัปดาห์ นำต้นปทุมมาลูกผสมที่เจริญจากชิ้นส่วนที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ มาตรวจวัดระดับพลอยดีโดย ตรวจวัดความยาวเซลล์คุมปากใบจากนั้นจึงนำต้นที่มีความยาวเซลล์คุมปากใบมากกว่าต้นปกติ (38-44 ไมครอน) ไปตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

การวัดความยาวเซลล์คุมปากใบ

1) เก็บตัวอย่างใบที่เจริญเต็มที่จากหลอดแก้ว (ภาพที่ 8 ก) ใส่ในขวดที่มีน้ำอยู่เล็กน้อยปิดฝาแล้วและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้ปากใบปิด

2) ลอกเนื้อเยื่อผิวจากด้านใต้ใบบริเวณกึ่งกลางของใบด้านซ้าย และขวา (ภาพที่ 8 ข) วางบนแผ่นสไลด์ที่มีน้ำอยู่ 1-2 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ และทาปิดขอบกระจกสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บ

3) วัดความยาวเซลล์คุมปากใบที่ปิด (ภาพที่ 8 ค) จำนวน 10 เซลล์ จาก 2 ตำแหน่ง รวมเป็น 20 เซลล์ต่อต้น ด้วยไมโครมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

การตรวจนับจำนวนโครโมโซม

ใช้วิธีที่ปรับปรุงจากวิธีการของ พรพิมลและอรัญญา (2548) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1) นำต้นปทุมมาลูกผสมมาตัดใบ และรากให้เหลือชิ้นส่วนโคนต้นความสูง 0.5 ซม เลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม 1 มก/ล BAP และ 0.05 มก/ล NAA เป็นเวลา 7-10 วัน ตัดรากที่งอกใหม่ความยาวประมาณ 2-3 มม ในช่วงเวลา 9.30-10.30 น. ซึ่งเป็นเวลาที่เซลล์มีการแบ่งตัวอยู่ในระยะเมทาเฟส

2) หยุดวงชีพของเซลล์ (pretreatment) โดยแช่ปลายรากในสารละลาย paradichlorobenzene (PDB) ที่อิ่มตัวในน้ำ เก็บรากไว้ที่ 8°C ในที่มืดเป็นเวลา 6 ชม ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ทำให้โครโมโซมหดสั้นและสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ชัดเจน

3) หยุดการทำงานของเซลล์ (fixation) โดยแช่ปลายรากในสารละลายที่ประกอบด้วย absolute alcohol 3 ส่วน ต่อ glacial acetic acid 1 ส่วน ที่ 8°C ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชม

4) แยกเซลล์โดยการแช่รากใน 1 N HCl นาน 15 นาที ที่ 60°C แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

5) ย้อมปลายรากด้วยสี aceto-orcein โดยแช่รากในสีนาน 10 นาที ที่ 60°C

6) ปิดปลายรากที่ย้อมสีแล้วด้วยกระจกปิดสไลด์ เคาะเนื้อเยื่อด้วยยางลบดินสอที่นิ่ม เพื่อให้เซลล์มีการกระจายตัวและทาขอบกระจกสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บ

7) ถ่ายรูปเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายตัวดีและติดสีชัดเจน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ด้วยกล้องดิจิตอลกำลังขยาย 6 เท่า (ขนาดภาพ 1,600x1,200 pixel)

8) ถ่ายโอนภาพจากกล้องดิจิตอลลงในเครื่องคอมพิวเตอร์ และนับจำนวนโครโมโซมจากภาพบนจอคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรม ACDSee version 5.0 ที่กำลังขยาย 3-5 เท่า จำนวน 5-10 เซลล์ต่อต้น

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติใช้วิธี Analysis of Variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

3.2.2.2 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาต้นดิพลอยด์กับต้นพอลิพลอยด์

เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์ที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.2.1 ที่เพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนต้นในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP 1 มก/ล และ NAA 0.05 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยการวัดความสูงของต้น วัดความหนาใบ นับจำนวนปากใบต่อพื้นที่ และวัดความยาวเซลล์คุมปากใบจากต้นดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์ จำนวนอย่างละ 10 ต้น โดยวัดความยาวเซลล์คุมปากใบละ 4 ตำแหน่ง (ภาพที่ 9 ข) ใบตามวิธีการในข้อ (4.1) และวัดความสูงต้น วัดความหนาใบ และนับจำนวนปากใบต่อพื้นที่ตามวิธีการดังต่อไปนี้

การวัดความสูงของต้น

วัดความสูงของต้นจากโคนต้นถึงปลายใบที่สูงที่สุด (ภาพที่ 9 ก)

การวัดความหนาของใบ

1) เก็บตัวอย่างใบที่เจริญเต็มที่จากหลอดแก้ว (ภาพที่ 8 ก) วัดความยาวใบและตัดเนื้อเยื่อตามขวางบริเวณกึ่งกลางความยาวของใบ (ภาพที่ 9 ค)

2) วางเนื้อเยื่อใบบนแผ่นสไลด์ที่มีน้ำ 1-2 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

3) วัดความหนาใบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ด้วยไมโครมิเตอร์ โดยวัดความหนาใบ 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งด้านซ้ายและขวาที่อยู่ห่างจากเส้นกลางใบ 1 มม (100 ช่องไมโครมิเตอร์) (ภาพที่ 9 ง)

การนับจำนวนปากใบต่อพื้นที่

1) เก็บตัวอย่างใบที่เจริญเต็มที่จากหลอดแก้ว (ภาพที่ 8 ก)

2) ลอกเนื้อเยื่อผิวด้านใต้ใบ 4 ตำแหน่งคือ บน ล่าง ซ้าย และขวา (ภาพที่ 9 ข) ขนาดประมาณ 1 ซม^2 วางบนแผ่นสไลด์ที่มีน้ำอยู่ 1-2 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์และทาปิดขอบกระจกสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บ

3) นับจำนวนปากใบที่มองเห็นในพื้นที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า นำจำนวนปากใบที่นับได้จาก 4 ตำแหน่งของใบ มาหาค่าเฉลี่ย และคูณด้วย 625 จะได้จำนวนปากใบต่อพื้นที่ 1 ซม^2 ของแต่ละต้น (ดูวิธีคำนวณในภาคผนวกที่ ก.2.2)

3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

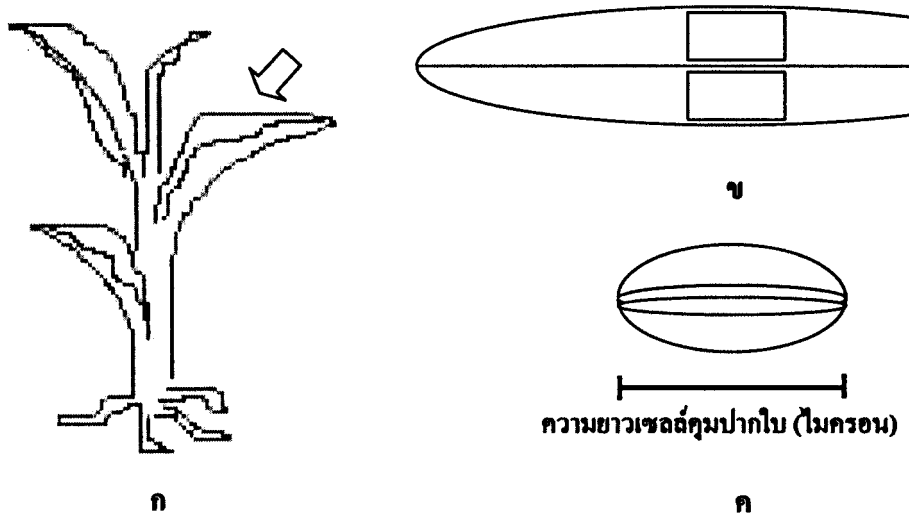
วิเคราะห์ผลทางสถิติในทุกการทดลองใช้วิธี Analysis of Variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least Significant Difference (LSD) โดยใช้โปรแกรม IRRISTAT for Win version 4.03

3.4 ระยะเวลาทำการวิจัย

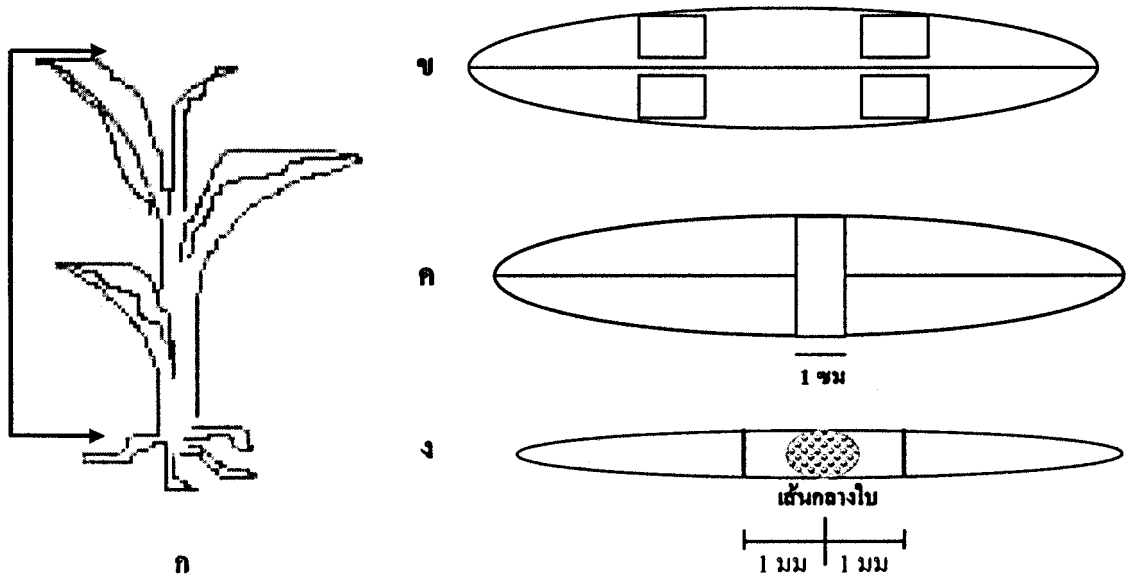
พฤษภาคม 2546 ถึง กันยายน 2548

3.5 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



ภาพที่ 8 ใบที่เจริญเต็มที่ (ก) ตำแหน่งใบที่ลอกเนื้อเยื่อผิวใต้ใบมาวัดความยาวเซลล์คุมปากใบ (ข) และการวัดความยาวเซลล์คุมปากใบ (ค)



ภาพที่ 9 การวัดความสูงต้น (ก) ตำแหน่งของใบที่ใช้ในการนับจำนวนปากใบต่อพื้นที่ (ข) ตำแหน่งของใบที่ใช้ในการวัดความหนาใบ (ค) และการวัดความหนาจากใบที่ตัดตามขวางภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ตำแหน่งห่างจากเส้นกลางใบไปทางซ้าย และขวา 1 มม (ง)

บทที่ 4
ผลการศึกษา

4.1 การศึกษาอิทธิพลของ TDZ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดในชิ้นส่วนหน่ออ่อน และชิ้นส่วนโคนต้น

4.1.1 ชิ้นส่วนหน่ออ่อน

4.1.1.1 การศึกษาช่วงความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม

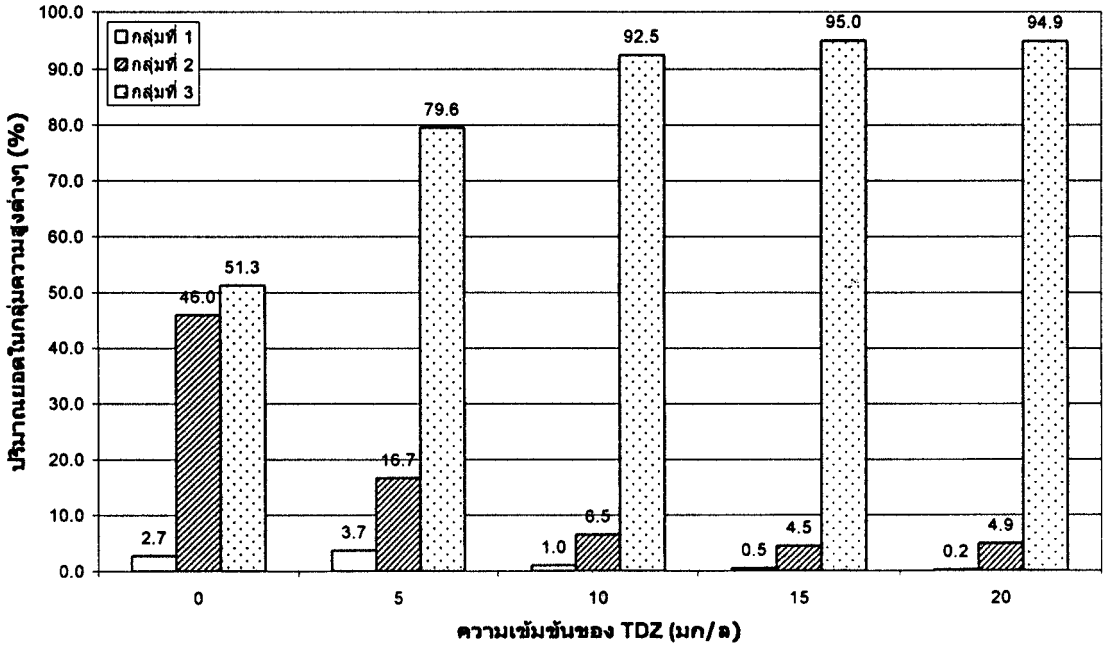
การให้ TDZ ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มก/ล แก่ชิ้นส่วนหน่ออ่อนเป็นเวลา 5 วัน แล้วย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 5-20 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าหน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ อย่างมีนัยสำคัญ หลังจากตัดแบ่งกลุ่มยอด และย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมอีก 2 สัปดาห์ ดังนั้นรวมเป็นเวลาที่เลี้ยงทั้งสิ้น 10 สัปดาห์ พบว่าหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 5-20 มก/ล มีจำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 14-19 ยอดต่อชิ้นส่วน และมีจำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าหน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ อย่างมีนัยสำคัญ โดยหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 20 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 5 และ 15 มก/ล อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1)

หลังจากหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ และเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS จนครบ 10 สัปดาห์ มีการเจริญของยอดใหม่โดยแบ่งตามความสูงออกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 มีความสูงมากกว่า 4 ซม, กลุ่มที่ 2 มีความสูง 2-4 ซม และ กลุ่มที่ 3 มีความสูงน้อยกว่า 2 ซม ดังนี้ หน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ มีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่ม 1, 2 และ 3 คิดเป็นร้อยละ 2.7, 46.0 และ 51.3 ตามลำดับ ส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 5, 10, 15 และ 20 มก/ล ความสูงของยอดใหม่มีแนวโน้มลดลงตามความเข้มข้น TDZ ที่เพิ่มขึ้น คือมีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 1 เพียงร้อยละ 3.7, 1.0, 0.5 และ 0.2 ตามลำดับ มีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 2 คิดเป็นร้อยละ 16.7, 6.5, 4.5 และ 4.9 ตามลำดับ และส่วนใหญ่มีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 3 คิดเป็นร้อยละ 79.6, 92.5, 95.0 และ 94.9 ตามลำดับ (ภาพที่ 10) โดยหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 5-20 มก/ล มีความสูงน้อยกว่าหน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ อย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 11 ก) และการเกิดยอดใหม่จากหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 5-20 มก/ล มีลักษณะเป็นกระจุกยอดขนาดเล็กจำนวนมากโดยไม่พบการเกิดแคลลัส (ภาพที่ 11 ข) แต่พบอาการเนื้อตายในหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 10-20 มก/ล (ภาพที่ 11 ค) จึงพบว่าความเข้มข้น TDZ ที่สูงกว่า 5 มก/ล เป็นช่วงความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมจึงควรศึกษาความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้

ตารางที่ 1 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 8 และ 10 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ TDZ (มก/ล)	ระยะเวลาที่เลี้ยงในอาหาร (สัปดาห์)	
	8	10
0	0.47 b[1/]	2.26 c
5	7.31 a	14.22 b
10	7.62 a	16.10 ab
15	7.55 a	15.12 b
20	8.56 a	18.52 a
$LSD_{p \leq 0.05}$	1.34	3.09

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



ภาพที่ 10 การเจริญของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 10 สัปดาห์ (แบ่งกลุ่มการเจริญของยอดตามความสูง คือ กลุ่มที่ 1. >4 ซม กลุ่มที่ 2. 2-4 ซม และ กลุ่มที่ 3. < 2 ซม)

ภาพที่ 11 ลักษณะหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (ก) ลักษณะการแตกยอดของหน่ออายุเยาว์ที่ได้รับ TDZ 0-20 มก/ล (ข) และอาการเนื้อเยื่อตายที่พบในหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นสูงกว่า 5 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 10 สัปดาห์ (ค)

4.1.1.2 การศึกษาระดับความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม

การให้ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5 มก/ล แก่ชิ้นส่วนหน่ออ่อนเป็นเวลา 5 วัน แล้วย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อครบ 6 สัปดาห์ พบว่าหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 0.5-5.0 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยอยู่ในช่วง 5-6 ยอดต่อชิ้นส่วน ซึ่งเป็นจำนวนยอดเฉลี่ยที่มากกว่าหน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ (0.42 ยอดต่อชิ้นส่วน) อย่างมีนัยสำคัญ โดย TDZ ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มล/ล ให้จำนวนยอดไม่

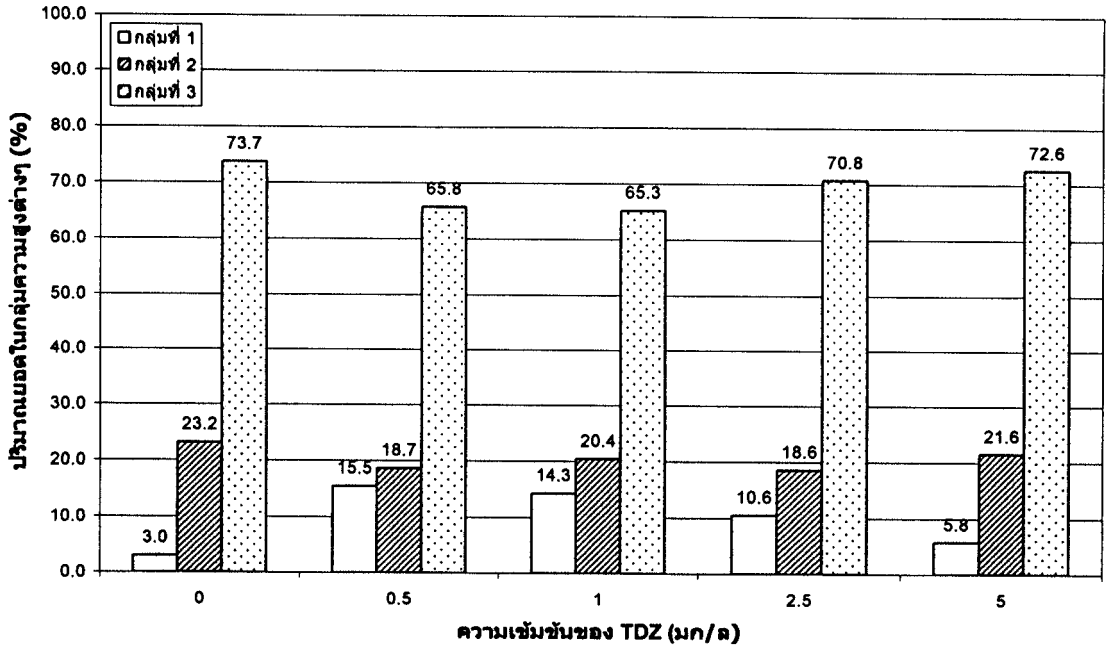
แตกต่างกันทางสถิติ แต่ที่ 1.0 มก/ล ให้จำนวนยอดมากกว่าที่ 2.5 และ 5.0 มก/ล อย่างมีนัยสำคัญ หลังจากตัดแบ่งกลุ่มยอด และย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมอีก 4 สัปดาห์ ดังนั้นรวมเวลาที่เลี้ยงเป็น 10 สัปดาห์ พบว่าหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 0.5-5.0 มก/ล มีจำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 19-25 ยอดต่อชิ้นส่วน โดยจำนวนยอดเฉลี่ยดังกล่าวไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าหน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ (1.98 ยอดต่อชิ้นส่วน) อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2)

หลังจากหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ และเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS จนครบ 10 สัปดาห์ มีการเจริญของยอดใหม่แบ่งตามความสูงออกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 มีความสูงมากกว่า 4 ซม กลุ่มที่ 2 มีความสูง 2-4 ซม และ กลุ่มที่ 3 มีความสูงน้อยกว่า 2 ซม ดังนี้ ยอดใหม่ที่เจริญจากหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 0.5-5 มก/ล และหน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ มีการเจริญของยอดใกล้เคียงกัน คือหน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ มีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 คิดเป็นร้อยละ 3.0, 23.2 และ 73.7 ตามลำดับ ส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มก/ล มีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 15.5, 14.3, 10.6 และ 5.8 ตามลำดับ มีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 2 คิดเป็นร้อยละ 18.7, 20.4, 18.6 และ 21.6 ตามลำดับ และส่วนใหญ่มีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 3 คิดเป็นร้อยละ 65.8, 65.3, 70.8 และ 72.6 ตามลำดับ (ภาพที่ 12) โดยหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 0.5-5.0 มก/ล มีความของสูงน้อยกว่าหน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ (ภาพที่ 13) ซึ่งพบว่า TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล ให้จำนวนยอดและคุณภาพยอดดีที่สุด จึงควรนำความเข้มข้นดังกล่าวไปใช้ในการศึกษาระยะเวลาการให้ TDZ ที่เหมาะสมต่อไป

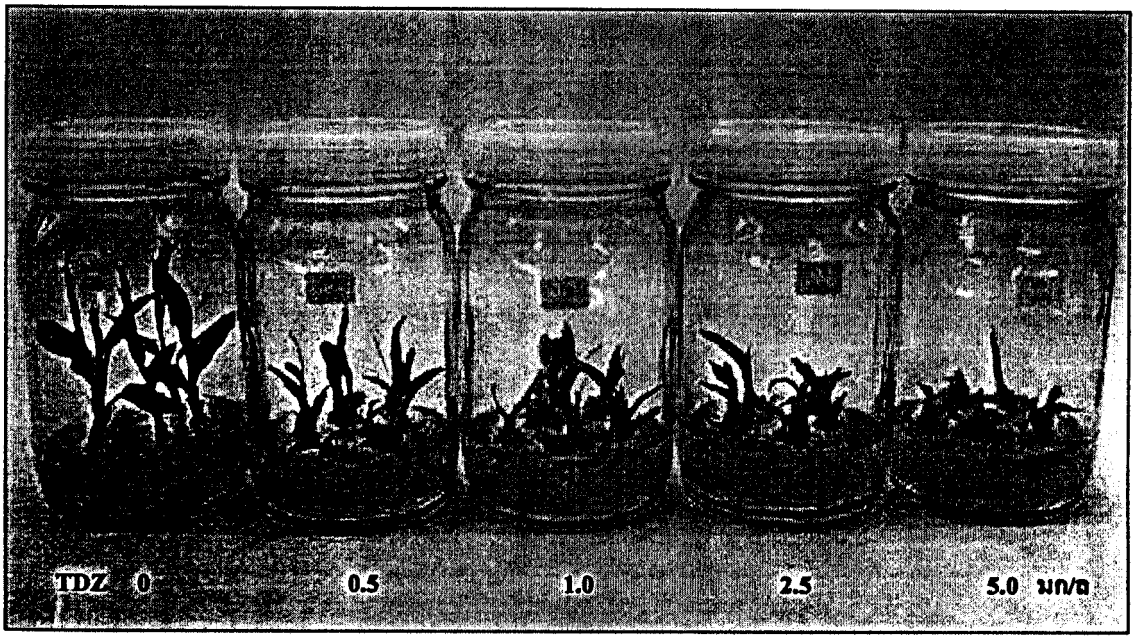
ตารางที่ 2 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 6 และ 10 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ TDZ (มก/ล)	ระยะเวลาที่เลี้ยงในอาหาร (สัปดาห์)	
	6	10
0	0.42 c[1/]	1.98 b
0.5	5.20 ab	19.36 a
1.0	6.44 a	24.86 a
2.5	4.70 b	21.36 a
5.0	4.50 b	24.30 a
$LSD_{p \leq 0.05}$	1.46	5.60

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



ภาพที่ 12 การเจริญของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 10 สัปดาห์ (แบ่งกลุ่มการเจริญของยอดตามความสูง คือ กลุ่มที่ 1. >4 ซม กลุ่มที่ 2. 2-4 ซม และ กลุ่มที่ 3. < 2 ซม)



ภาพที่ 13 หน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์

4.1.1.3 การศึกษาระยะเวลาการให้ TDZ ที่เหมาะสม

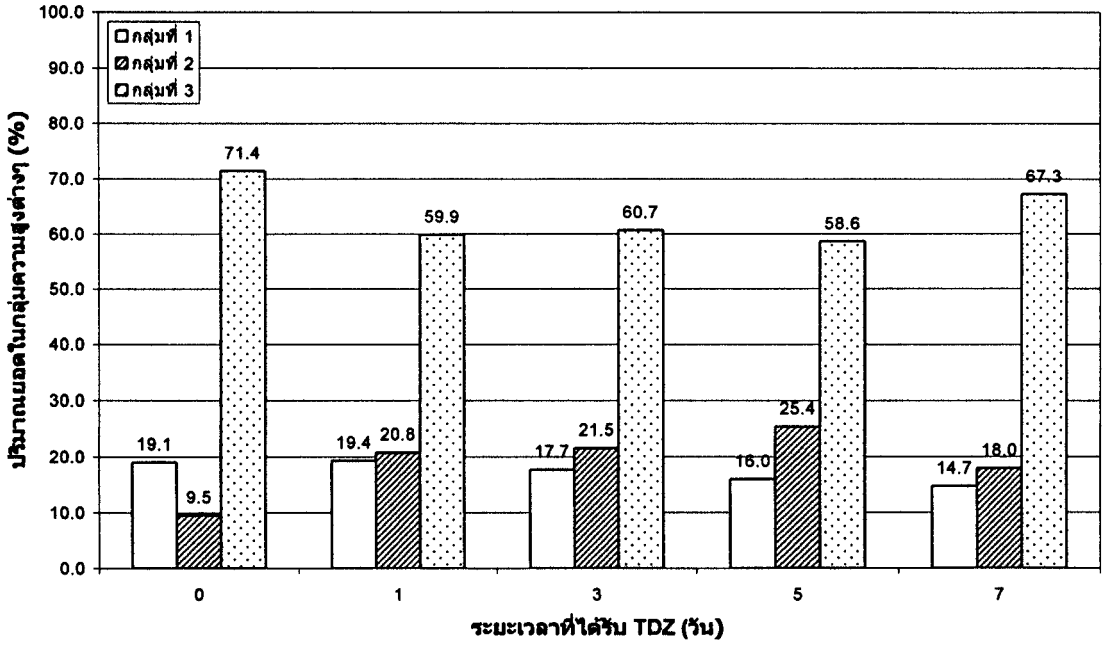
การให้ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล แก่ชิ้นส่วนหน่ออ่อนเป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน แล้วย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 3 และ 5 วัน ให้จำนวนยอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ให้จำนวนยอดมากกว่าที่ 1 และ 7 วัน และหน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ อย่างมีนัยสำคัญ หลังจากตัดแบ่งกลุ่มยอด และย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมจนครบ 10 สัปดาห์ พบว่าหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 3 และ 5 วัน ให้จำนวนยอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ที่เวลา 5 วัน ให้จำนวนยอดมากกว่าที่ 1 และ 7 วัน และหน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3)

เมื่อครบ 10 สัปดาห์ การเจริญของยอดใหม่แบ่งตามความสูงออกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 มีความสูงมากกว่า 4 ซม กลุ่มที่ 2 มีความสูง 2-4 ซม และ กลุ่มที่ 3 มีความสูงน้อยกว่า 2 ซม ดังนี้ หน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ มีความของสูงยอดอยู่ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ร้อยละ 19.1, 9.5 และ 71.4 ตามลำดับ ส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 1, 3, 5 และ 7 วัน มีความสูงของยอดในกลุ่มที่ 1 ร้อยละ 19.4, 17.7, 16.0 และ 14.7 ตามลำดับ มีความสูงของยอดในกลุ่มที่ 2 ร้อยละ 20.8, 21.5, 25.4 และ18.0 ตามลำดับ และมีความสูงของยอดในกลุ่มที่ 3 ร้อยละ 59.9, 60.7, 58.6 และ 67.3 ตามลำดับ (ภาพที่ 14) โดยหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 1, 3 และ 5 วัน มีความของสูงยอดใกล้เคียงกับหน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ ที่ 6 สัปดาห์ (ภาพที่ 15) จึงพบว่าการให้ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 3 วัน เป็นวิธีการให้ TDZ ที่ให้จำนวนยอดและคุณภาพยอดได้ดีที่สุด (ภาพที่ 16 ก, ข)

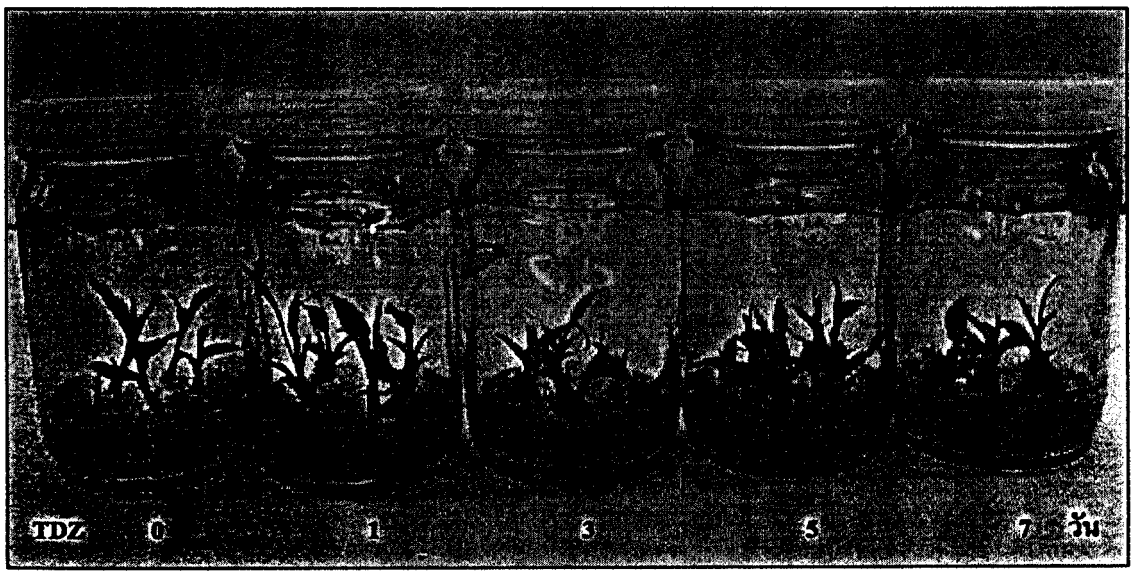
ตารางที่ 3 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารเป็นวุ้นสูตร MS เวลา 6 และ 10 สัปดาห์

ระยะเวลาที่ได้รับ TDZ (วัน)	ระยะเวลาที่เลี้ยงในอาหาร (สัปดาห์)	
	6	10
0	0.02 c[1/]	0.42 c
1	1.06 b	5.58 c
3	3.88 a	17.36 ab
5	4.04 a	18.36 a
7	2.52 b	12.48 b
$LSD_{p \leq 0.05}$	1.27	5.51

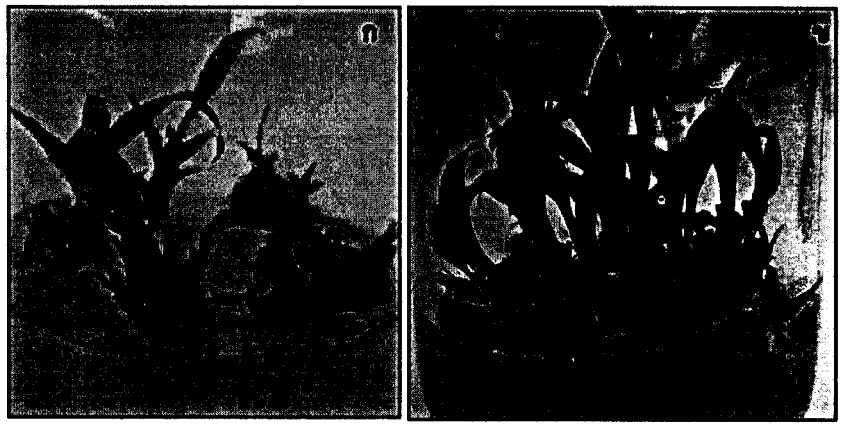
[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



ภาพที่ 14 การเจริญของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 10 สัปดาห์ (แบ่งกลุ่มการเจริญของยอดตามความสูง คือ กลุ่มที่ 1. >4 ซม กลุ่มที่ 2. 2-4 ซม และ กลุ่มที่ 3. < 2 ซม)



ภาพที่ 15 หน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์



ภาพที่ 16 ยอดอ่อนปทุมมาลูกผสมที่เจริญจากหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 3 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรวุ้น MS เป็นเวลา 6 (ก) และ 10 สัปดาห์ (ข)

4.1.2 ชิ้นส่วนโคนต้น

4.1.2.1 การศึกษาช่วงความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม

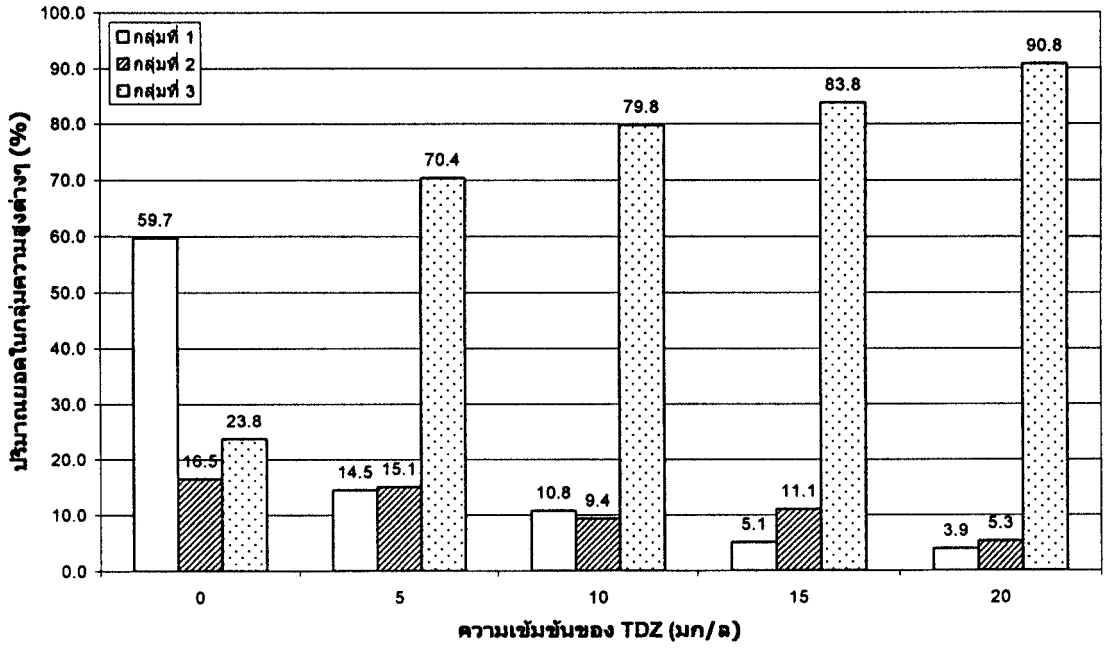
การให้ TDZ แก่ชิ้นส่วนโคนต้นที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน แล้วย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าโคนต้นที่ได้รับ TDZ 5-20 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าโคนต้นที่ไม่ได้รับ TDZ อย่างมีนัยสำคัญ หลังจากตัดแบ่งกลุ่มยอด และย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมอีก 2 สัปดาห์ รวมเวลาการเลี้ยงเป็น 10 สัปดาห์ พบว่าโคนต้นที่ได้รับ TDZ 5 และ 10 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยใกล้เคียงกัน แต่ TDZ 5 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าโคนต้นที่ได้รับ TDZ 15 และ 20 มก/ล และโคนต้นที่ไม่ได้รับ TDZ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้การที่โคนต้นที่ได้รับ TDZ 20 มก/ล มีจำนวนยอดเฉลี่ยลดลงเนื่องจากมียอดใหม่บางส่วนตายไป (ตารางที่ 4)

หลังจากเลี้ยงชิ้นส่วนโคนต้นในอาหารวุ้นสูตร MS จนครบ 10 สัปดาห์ มีการเจริญของยอดใหม่แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 มีความสูงมากกว่า 4 ซม กลุ่มที่ 2 มีความสูง 2-4 ซม และ กลุ่มที่ 3 มีความสูงน้อยกว่า 2 ซม ดังนี้ โคนต้นที่ไม่ได้รับ TDZ มีความสูงอยู่ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ร้อยละ 59.7, 16.5 และ 23.8 ตามลำดับ โคนต้นที่ได้รับ TDZ 5, 10, 15 และ 20 มก/ล ความสูงของยอดใหม่มีแนวโน้มลดลงเมื่อได้รับ TDZ ความเข้มข้นสูงขึ้น คือมีความสูงยอดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ร้อยละ 14.5, 10.8, 5.1 และ 3.9 ตามลำดับ กลุ่มที่ 2 ร้อยละ 15.1, 9.4, 5.1 และ 5.3 ตามลำดับ และกลุ่มที่ 3 ร้อยละ 70.4, 79.8, 83.8 และ 90.8 ตามลำดับ (ภาพที่ 17) โดยโคนต้นที่ได้รับ TDZ มีความของสูงน้อยกว่าโคนต้นที่ไม่ได้รับ TDZ อย่างชัดเจน (ภาพที่ 18) ซึ่งว่าความเข้มข้น TDZ ที่สูงกว่า 5 มก/ล เป็นช่วงความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมจึงควรศึกษาความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้

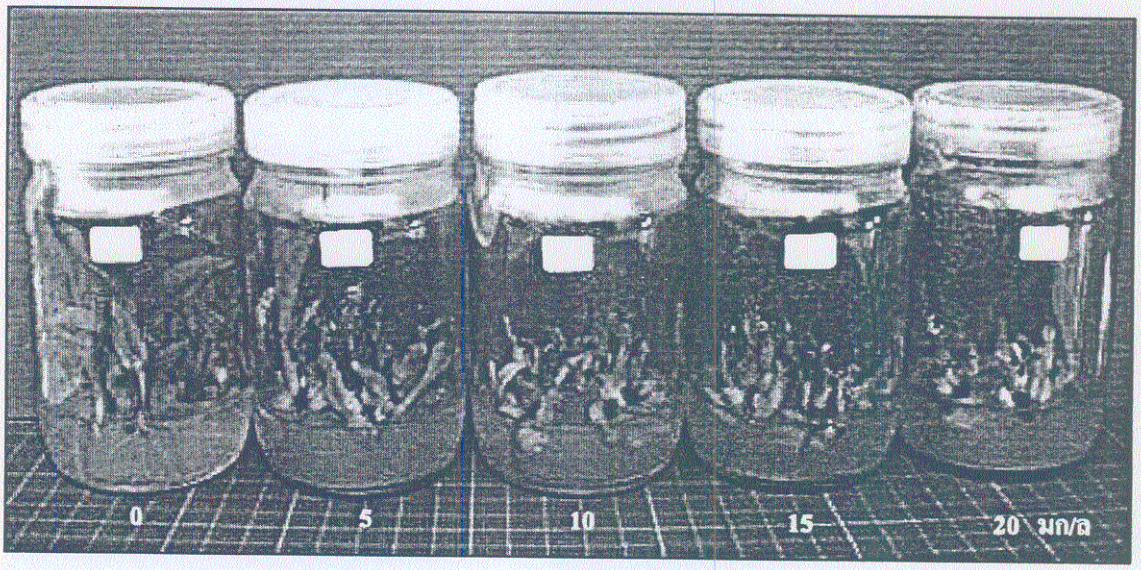
ตารางที่ 4 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 8 และ 10 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ TDZ (มก/ล)	ระยะเวลาที่เลี้ยงในอาหาร (สัปดาห์)	
	8	10
0	5.16 b[1/]	7.42 b
5	6.30 a	9.94 a
10	6.78 a	9.40 ab
15	6.10 a	7.14 b
20	6.18 a	5.66 b
$LSD_{p \leq 0.05}$	0.70	2.47

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



ภาพที่ 17 การเจริญของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 10 สัปดาห์ (แบ่งกลุ่มการเจริญของยอดตามความสูง คือ กลุ่มที่ 1. >4 ซม, กลุ่มที่ 2. 2-4 ซม และ กลุ่มที่ 3. < 2 ซม)



ภาพที่ 18 ลักษณะโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.1.2.2 การศึกษาระดับความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม

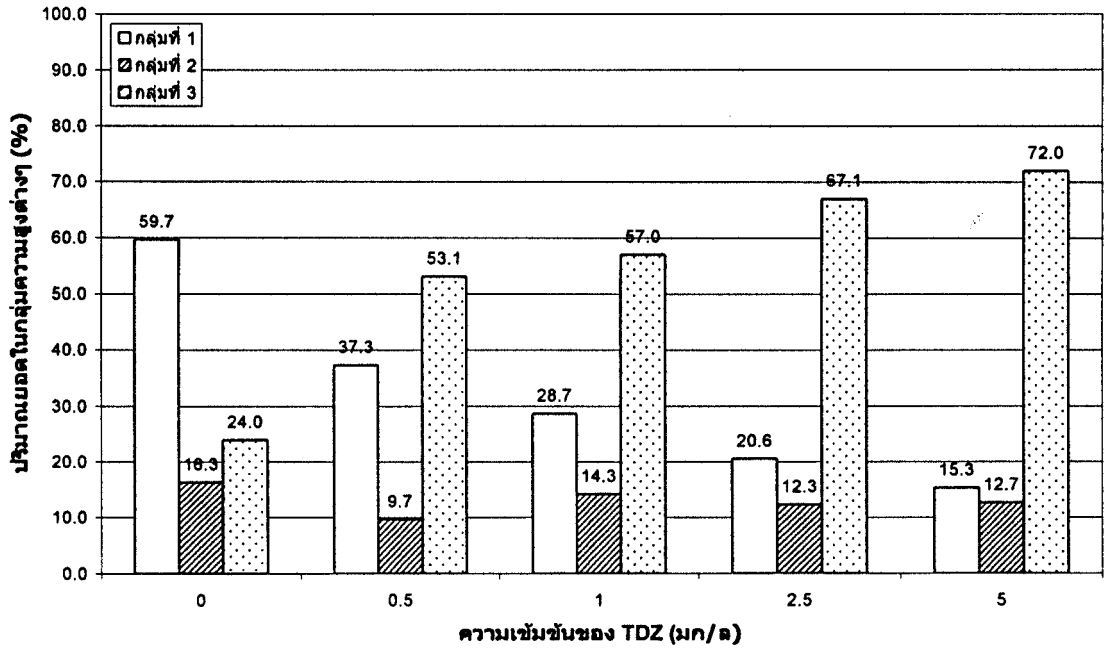
การให้ TDZ แก่ชิ้นส่วนโคนต้นที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าโคนต้นที่ได้รับ TDZ 0.5-5.0 มก/ล ให้จำนวนยอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ให้จำนวนยอดมากกว่าโคนต้นที่ไม่ได้รับ TDZ อย่างมีนัยสำคัญ หลังจากตัดแบ่งกลุ่มยอด และย้ายไปเลี้ยงในอาหารขวดใหม่ครบ 10 สัปดาห์ พบว่าโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 0.5-5 มก/ล มีจำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าโคนต้นที่ไม่ได้รับ TDZ อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5)

หลังจากเลี้ยงโคนต้นในอาหารวุ้นสูตร MS จนครบ 10 สัปดาห์ มีการเจริญของยอดใหม่แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 มีความสูงมากกว่า 4 ซม กลุ่มที่ 2 มีความสูง 2-4 ซม และ กลุ่มที่ 3 มีความสูงน้อยกว่า 2 ซม ดังนี้ โคนต้นที่ไม่ได้รับ TDZ มีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 คิดเป็นร้อยละ 59.7, 16.3 และ 24.00 ตามลำดับ ส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มก/ล ความสูงของยอดใหม่มีแนวโน้มลดลงเมื่อได้รับ TDZ ความเข้มข้นสูงขึ้น คือมีความของสูงยอดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ร้อยละ 37.3, 28.7, 20.6 และ 15.3 ตามลำดับ กลุ่มที่ 2 ร้อยละ 9.7, 14.3, 12.3 และ 12.7 ตามลำดับ และกลุ่มที่ 3 ร้อยละ 53.1, 57.0, 67.1 และ 72.0 ตามลำดับ (ภาพที่ 19) โดยโคนต้นที่ได้รับ TDZ มีความของสูงน้อยกว่าโคนต้นที่ไม่ได้รับ TDZ ที่ระยะ 6 สัปดาห์ (ภาพที่ 20) ซึ่งพบว่า TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นความเข้มข้นที่ให้จำนวนยอดและคุณภาพยอดดีที่สุด จึงควรนำความเข้มข้นดังกล่าวไปศึกษาระยะเวลาการให้ TDZ ที่เหมาะสมต่อไป

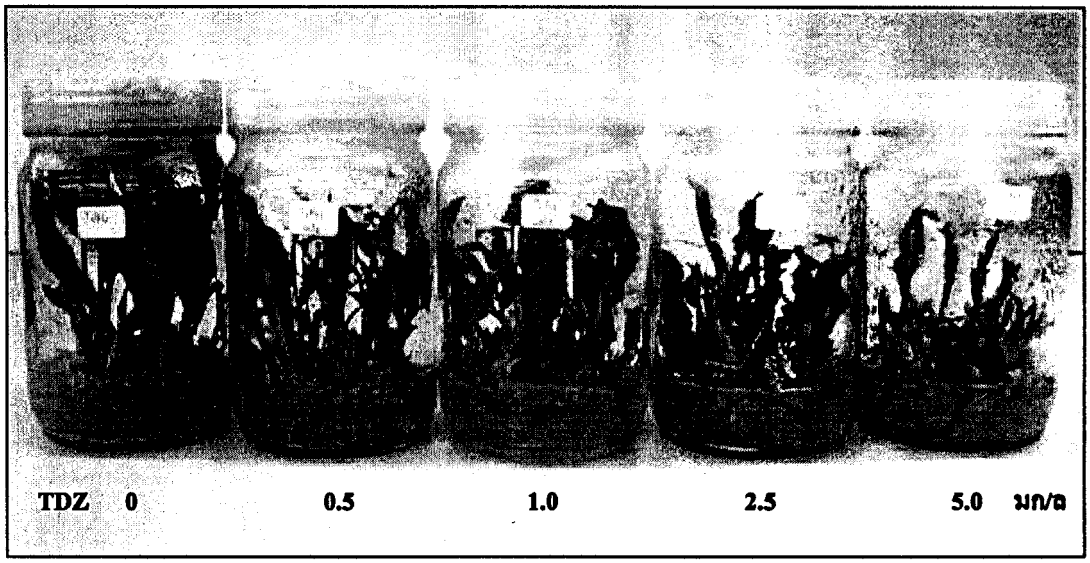
ตารางที่ 5 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 6 และ 10 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ TDZ (มก/ล)	ระยะเวลาที่เลี้ยงในอาหาร (สัปดาห์)	
	6	10
0	4.30 b[1/]	8.08 b
0.5	7.72 a	18.24 a
1.0	8.12 a	23.14 a
2.5	8.50 a	24.34 a
5.0	8.66 a	23.16 a
$LSD_{p \leq 0.05}$	1.27	6.66

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



ภาพที่ 19 การเจริญของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 10 สัปดาห์ (แบ่งกลุ่มการเจริญของยอดตามความสูง คือ กลุ่มที่ 1. >4 ซม, กลุ่มที่ 2. 2-4 ซม และกลุ่มที่ 3. < 2 ซม)



ภาพที่ 20 ลักษณะโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์

4.1.2.3 การศึกษาระยะเวลาการให้ TDZ ที่เหมาะสม

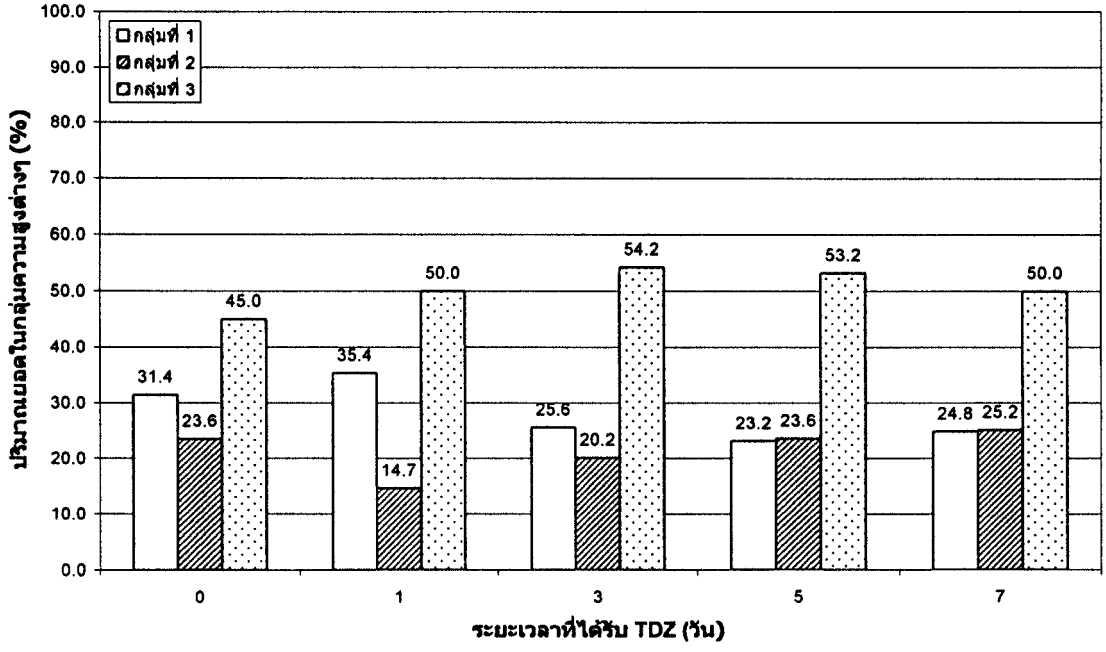
การให้ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล แก่ชิ้นส่วนโคนต้นเป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าโคนต้นที่ได้รับ TDZ 1-7 วัน และโคนต้นที่ไม่ได้รับ TDZ ให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ หลังจากตัดแบ่งกลุ่มยอด และย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมอีก 4 สัปดาห์ ดังนั้นรวมเวลาที่เลี้ยงเป็น 10 สัปดาห์ พบว่าโคนต้นที่ได้รับ TDZ 1-7 วัน และโคนต้นที่ไม่ได้รับ TDZ ให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 6)

หลังจากเลี้ยงโคนต้นในอาหารวุ้นสูตร MS จนครบ 10 สัปดาห์ มีการเจริญของยอดใหม่แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 มีความสูงมากกว่า 4 ซม กลุ่มที่ 2 มีความสูง 2-4 ซม และ กลุ่มที่ 3 มีความสูงน้อยกว่า 2 ซม ดังนี้ โคนต้นที่ไม่ได้รับ TDZ มีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ร้อยละ 31.4, 23.6 และ 45.0 ตามลำดับ ส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ 1, 3, 5 และ 7 วัน มีความสูงของยอดในกลุ่มที่ 1 ร้อยละ 35.4, 25.6, 23.2 และ 24.8 ตามลำดับ มีความสูงของยอดในกลุ่มที่ 2 ร้อยละ 14.7, 20.2, 23.6 และ 25.2 ตามลำดับ และมีความสูงของยอดในกลุ่มที่ 3 ร้อยละ 50.0, 54.2, 53.2 และ 50.0 ตามลำดับ (ภาพที่ 21) โดยโคนต้นที่ได้รับ TDZ มีความสูงของยอดใกล้เคียงกับโคนต้นที่ไม่ได้รับ TDZ ที่ระยะ 6 สัปดาห์ (ภาพที่ 22) จึงพบว่าการให้ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 3 วัน เป็นวิธีการให้ TDZ ที่ให้จำนวนยอดและคุณภาพยอดได้ดีที่สุดในชิ้นส่วนโคนต้น

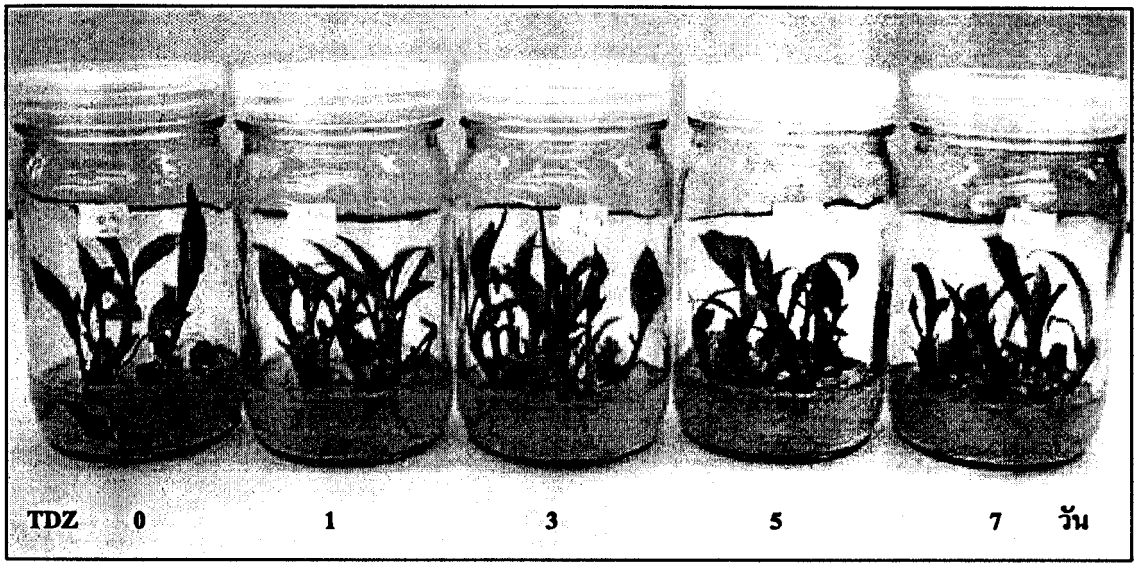
ตารางที่ 6 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นระยะเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 6 และ 10 สัปดาห์

ระยะเวลาที่ได้รับ TDZ (วัน)	ระยะเวลาที่เลี้ยงในอาหาร (สัปดาห์)	
	6	**10**
0	4.86	10.18
1	5.92	10.92
3	6.86	14.98
5	7.10	13.80
7	6.22	15.34
$LSD_{p \leq 0.05}$	ns	ns

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



ภาพที่ 21 การเจริญของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 10 สัปดาห์ (แบ่งกลุ่มการเจริญของยอดตามความสูง คือ กลุ่มที่ 1. >4 ซม, กลุ่มที่ 2. 2-4 ซม และกลุ่มที่ 3. < 2 ซม)



ภาพที่ 22 ลักษณะโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์

4.1.2.4 การศึกษาผลร่วมของการผ่าชิ้นส่วน ความเข้มข้นและระยะเวลาการให้ TDZ

การเลี้ยงชิ้นส่วนโคนต้นผ่าครึ่งและไม่ผ่า ในอาหารเหลวที่มี TDZ ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มก/ล เป็นเวลา 1, 3 และ 5 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 6 และ 10 สัปดาห์ ไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างการผ่าชิ้นส่วน ความเข้มข้นของ TDZ และระยะการให้ TDZ แต่พบว่าชิ้นส่วนโคนต้นไม่ผ่าให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าโคนต้นผ่าครึ่งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 7) ชิ้นส่วนโคนต้นผ่าครึ่งและไม่ผ่าที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับ TDZ อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 8) และชิ้นส่วนโคนต้นผ่าครึ่งและไม่ผ่าที่ได้รับ TDZ เป็นเวลา 3 และ 5 วัน ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าชิ้นส่วนที่ได้รับ TDZ 1 วัน อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9)

หลังจากตัดแบ่งกลุ่มยอด และย้ายไปเลี้ยงในอาหารขวดใหม่ 4 สัปดาห์ ดังนั้นรวมเวลาการเลี้ยงเป็น 10 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนโคนต้นผ่าครึ่งและไม่ผ่าให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 7) ชิ้นส่วนโคนต้นผ่าครึ่งและไม่ผ่าที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับ TDZ อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 8) และชิ้นส่วนโคนต้นผ่าครึ่งและไม่ผ่าที่ได้รับ TDZ เป็นเวลา 3 และ 5 วัน ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าชิ้นส่วนที่ได้รับ TDZ 1 วัน อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 7 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นไม่ผ่าและชิ้นส่วนโคนต้นผ่าครึ่ง หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 6 และ 10 สัปดาห์

ชนิดชิ้นส่วน	ระยะเวลาที่เลี้ยงในอาหาร (สัปดาห์)	
	6	10
โคนต้นไม่ผ่า	7.07 a[1/]	18.49
โคนต้นผ่าครึ่ง	5.64 b	16.86
$LSD_{p \leq 0.05}$	1.17	ns

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ตารางที่ 8 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 6 และ 10 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ TDZ (มก/ล)	ระยะเวลาที่เลี้ยงในอาหาร (สัปดาห์)	
	6	10
0	3.68 b[1/]	8.00 b
1	6.71a	18.52 a
3	8.16 a	24.36 a
5	6.89 a	19.81 a
$LSD_{p \leq 0.05}$	1.66	7.55

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ตารางที่ 9 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ เป็นระยะเวลาต่างๆ หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 6 และ 10 สัปดาห์

ระยะเวลาที่ได้รับ TDZ (วัน)	ระยะเวลาที่เลี้ยงในอาหาร (สัปดาห์)	
	6	10
1	5.03 b[1/]	11.43 b
3	6.66 a	18.75 a
5	7.38 a	22.84 a
$LSD_{p \leq 0.05}$	1.44	6.54

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

หลังจากโคนต้นที่ได้รับ TDZ และเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS จนครบ 10 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญของยอดใหม่แบ่งตามความสูงออกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 มีความสูงมากกว่า 4 ซม กลุ่มที่ 2 มีความสูง 2-4 ซม และ กลุ่มที่ 3 มีความสูงน้อยกว่า 2 ซม ดังนี้ โคนต้นที่ผ่าครึ่งมีแนวโน้มจะให้ยอดใหม่ที่มีความสูงน้อยกว่าโคนต้นที่ไม่ผ่า และยอดใหม่มีแนวโน้มจะมีความสูงของยอดลดลงตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับ TDZ เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 23, 24)

โดยพบว่ายอดใหม่จากโคนต้นไม่ผ่าและโคนต้นผ่าครึ่งที่ไม่ได้รับ TDZ มีความสูงของยอดเฉลี่ยอยู่ในกลุ่มที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 60 และ 42 ตามลำดับ มีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 2 คิดเป็นร้อยละ 11 และ 7 ตามลำดับ และมีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 3 คิดเป็นร้อยละ 30 และ 52 ตามลำดับ ส่วนยอดใหม่จากโคนต้นไม่ผ่าและโคนต้นผ่าครึ่งที่ได้รับ TDZ ในทุกความเข้มข้นและทุกระยะเวลามีความสูงของยอดเฉลี่ยอยู่ในกลุ่มที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 29 และ 24 ตามลำดับ มีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 2 คิดเป็นร้อยละ 13 และ 17 ตามลำดับ และมีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 3 คิดเป็นร้อยละ 58 และ 59 ตามลำดับ

ยอดใหม่จากโคนต้นไม่ผ่าที่ได้รับ TDZ 0, 1, 3 และ 5 มก/ล ในทุกระยะเวลาเฉลี่ยมีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 60, 37, 25 และ 27 ตามลำดับ มีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 2 คิดเป็นร้อยละ 11, 14, 13 และ 12 ตามลำดับ และมีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 3 คิดเป็นร้อยละ 30, 50, 62 และ 61 ตามลำดับ ส่วนยอดใหม่จากโคนต้นผ่าครึ่งที่ได้รับ TDZ 0, 1, 3 และ 5 มก/ล ในทุกระยะเวลาเฉลี่ยมีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 42, 31, 24 และ 16 ตามลำดับ มีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 2 คิดเป็นร้อยละ 7, 14, 18 และ 20 ตามลำดับ และมีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 3 คิดเป็นร้อยละ 52, 55, 58 และ 64 ตามลำดับ

ยอดใหม่จากโคนต้นไม่ผ่าที่ได้รับ TDZ เป็นเวลา 1, 3 และ 5 วัน ในทุกความเข้มข้นเฉลี่ยมีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 34, 27 และ 26 ตามลำดับ มีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 2 คิดเป็นร้อยละ 11, 13 และ 15 ตามลำดับ และมีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 3 คิดเป็นร้อยละ 55, 60 และ 58 ตามลำดับ ส่วนยอดใหม่จากโคนต้นผ่าครึ่งที่ได้รับ TDZ เป็นเวลา 1, 3 และ 5 วัน ในทุกความเข้มข้นเฉลี่ยมีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 27, 26 และ 18 ตามลำดับ มีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 2 คิดเป็นร้อยละ 16, 18 และ 17 ตามลำดับ และมีความสูงของยอดอยู่ในกลุ่มที่ 3 คิดเป็นร้อยละ 57, 56 และ 65 ตามลำดับ โดยแสดงความสูงของยอดที่ได้จากโคนต้นผ่าครึ่งและไม่ผ่าที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆกันในตารางที่ 10 ซึ่งพบว่าการเลี้ยงชิ้นส่วนโคนต้นผ่าครึ่งในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 3 วัน ทำให้ได้จำนวนยอดและคุณภาพยอดดีที่สุด (ภาพที่ 25)

ตารางที่ 10 การเจริญของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนโคนต้นไม่ผ่าและโคนต้นผ่าครึ่งที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 10 สัปดาห์ (แบ่งกลุ่มการเจริญของยอดตามความสูง คือ กลุ่มที่ 1. >4 ซม, กลุ่มที่ 2. 2-4 ซม และกลุ่มที่ 3. < 2 ซม)

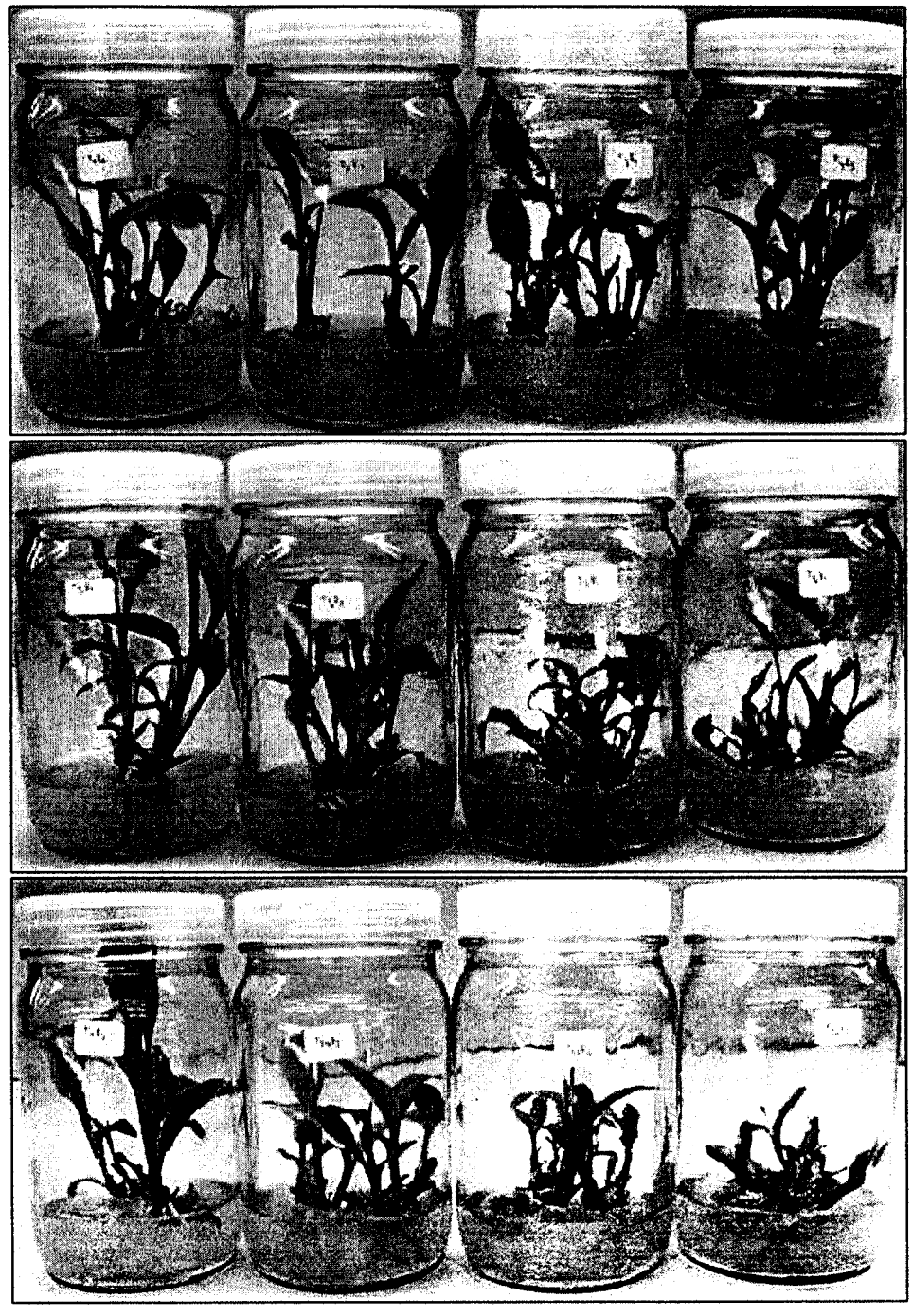
ชนิดชิ้นส่วน	ความเข้มข้นของ TDZ (มก/ล)	ระยะเวลาที่ได้รับ TDZ (วัน)	ยอดในกลุ่มความสูงต่างๆ (%)		
			กลุ่ม 1	กลุ่ม 2	กลุ่ม 3
โคนต้นที่ไม่ผ่า	0	1	60.00	8.00	32.00
		3	50.77	13.85	35.38
		5	67.80	10.17	22.03
	1	1	39.82	12.39	47.79
		3	35.44	12.66	51.90
		5	34.50	15.72	49.78
	3	1	32.17	10.43	57.39
		3	23.36	16.06	60.58
		5	18.44	13.52	68.03
	5	1	31.25	9.38	59.38
		3	23.27	10.69	66.04
		5	26.53	16.73	56.73
โคนต้นผ่าครึ่ง	0	1	47.62	4.76	47.62
		3	42.62	4.92	52.46
		5	34.58	10.75	54.67
	1	1	37.90	11.29	50.81
		3	30.63	12.55	56.83
		5	24.28	17.23	58.49
	3	1	22.84	14.21	62.95
		3	27.42	20.65	51.94
		5	21.53	19.31	59.16
	5	1	20.75	23.11	56.13
		3	18.96	21.04	60.00
		5	7.59	15.45	76.96

ระยะเวลาให้ TDZ

1 วัน

3 วัน

5 วัน



ความเข้มข้น TDZ **0** **1** **3** **5** **มก/ล**

ภาพที่ 23 ลักษณะโคนต้นที่ไม่ผ่าที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ระยะเวลาให้ TDZ

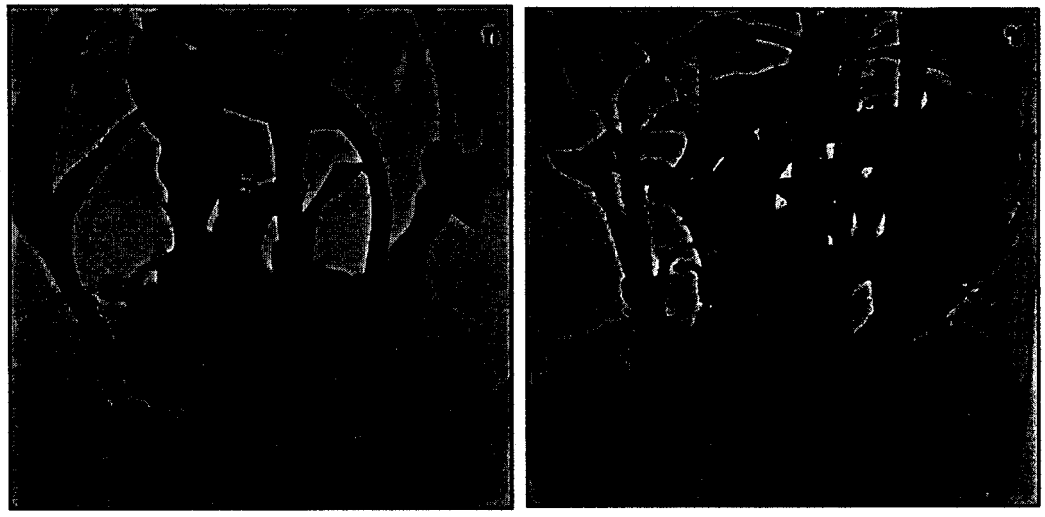
1 วัน

3 วัน

5 วัน

ความเข้มข้น TDZ **0** **1** **3** **5** **มก/ล**

ภาพที่ 24 ลักษณะโคนต้นผ่าครึ่งที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์



ภาพที่ 25 ต้นอ่อนปทุมมาลูกผสมที่เจริญจากโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 3 วัน หลังจาก ย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 (ก) และ 10 สัปดาห์ (ข)

4.2 การศึกษาอิทธิพลของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของปทุมมาลูกผสม

4.2.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซม

การให้โคลชิซินความเข้มข้น 0, 800, 1,000 และ 1,200 มก/ล แก่หน่ออ่อนเป็นเวลา 4 วัน แล้วย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซินมีการรอดชีวิตลดลง (30-45%) และมีจำนวนยอดเฉลี่ยน้อยมากเพียง 0.1-0.25 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่หน่ออ่อนที่ไม่ได้รับโคลชิซินมีการรอดชีวิตทั้งหมดจึงมีจำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซินอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 11) และพบว่าหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซินในทุกความเข้มข้นเริ่มมีกาบใบเปลี่ยนสีกลายเป็นสีน้ำตาลในสัปดาห์ที่ 3 หลังจากได้รับโคลชิซิน และเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 6 กาบใบจึงกลายเป็นสีดำในที่สุด (ภาพที่ 26)

หลังจากตัดแบ่งและย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารขวดใหม่อีก 9 สัปดาห์ (รวมเป็น 15 สัปดาห์) พบว่าหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซินมีการรอดชีวิตลดลง (20-40%) และมีจำนวนยอดเฉลี่ยเพียง 0.7-1.7 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่หน่ออ่อนที่ไม่ได้รับโคลชิซินมีการรอดชีวิตทั้งหมดและมีจำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซินอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 12) ในระยะ 15 สัปดาห์แรกหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซินให้จำนวนยอดใหม่น้อยมาก แต่อัตราการเกิดยอดจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนใกล้เคียงกับหน่ออ่อนที่ไม่ได้รับโคลชิซินเมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนไปได้เป็นเวลา 20-24 สัปดาห์ (ภาพที่ 27 ก) ซึ่งเป็นระยะเวลาเดียวกันที่เริ่มพบต้นปทุมมาลูกผสมที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไปจากต้นปกติ (ภาพที่ 27 ข)

ตารางที่ 11 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซิน หลังเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์

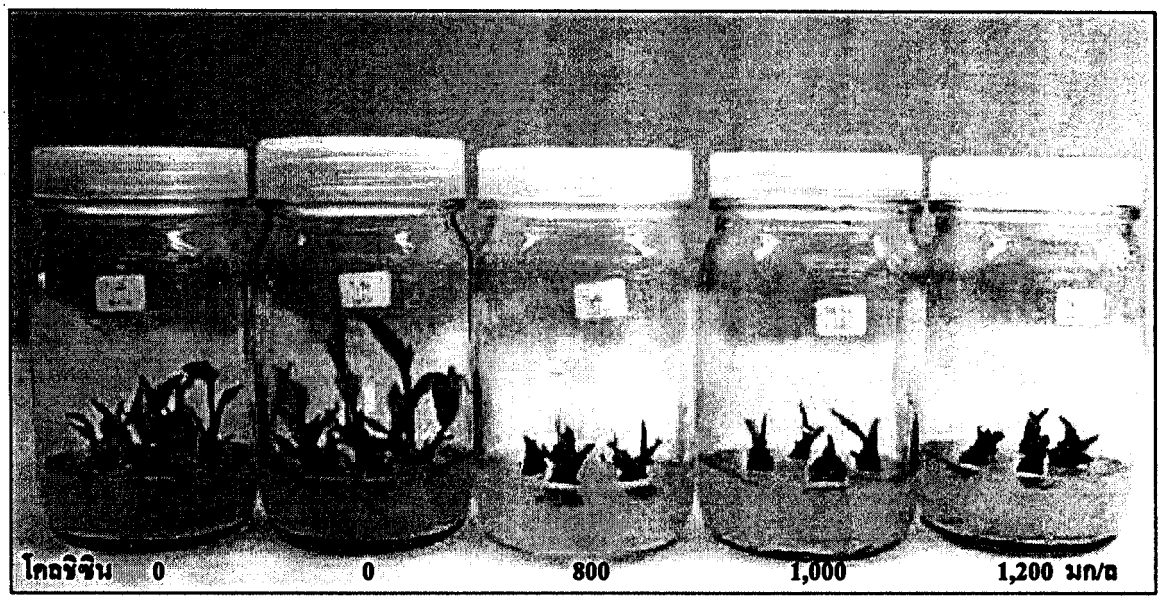
โคลชิซิน (มก/ล)	ระยะเวลา (วัน)	จำนวนต้นรอดชีวิตเฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์ต้นรอดชีวิตเฉลี่ย	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน
0	0	5.00	100.00	13.70 a[1/]
0	4	5.00	100.00	8.25 b
800	4	1.50	30.00	0.15 c
1,000	4	2.25	45.00	0.25 c
1,200	4	1.50	30.00	0.10 c
$LSD_{p\leq 0.05}$	-	-	-	1.83

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p\leq 0.05$

ตารางที่ 12 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซิน หลังเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BAP 1 มก/ล และ NAA 0.05 มก/ล เป็นเวลา 15 สัปดาห์

โคลชิซิน (มก/ล)	ระยะเวลา (วัน)	จำนวนต้นรอดชีวิตเฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์ต้นรอดชีวิตเฉลี่ย	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน
0	0	5.00	100.00	42.12 a[1/]
0	4	5.00	100.00	18.75 b
800	4	1.00	20.00	1.73 c
1,000	4	2.00	40.00	1.67 c
1,200	4	1.00	20.00	0.66 c
$LSD_{p\leq 0.05}$	-	-	-	10.11

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p\leq 0.05$



ภาพที่ 26 หน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 วัน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ภาพที่ 27 การเจริญของยอดจากชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซิน (ก) และต้นปทุมมาลูกผสมที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลง (ข) หลังจากตัดแบ่งและย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 24 สัปดาห์

ผลของความเข้มข้นโคลชิซินต่อความยาวเซลล์คุมปากใบ และจำนวนชุดโครโมโซม

การตรวจวัดความยาวเซลล์คุมปากใบของต้นปทุมมาลูกผสมจำนวน 130 ต้น จาก 5 สิ่งทดลอง พบว่าต้นที่เจริญจากหน่ออ่อนที่ไม่ได้รับโคลชิซินจำนวน 20 ต้น มีความยาวเซลล์คุมปากใบเฉลี่ย 41.33±1.34 ไมครอน (38-44 ไมครอน) ส่วนต้นที่เจริญจากหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 800-1,200 มก/ล จำนวน 110 ต้น มีความยาวเซลล์คุมปากใบเฉลี่ย 56.65±7.79 (35-68 ไมครอน) (ตารางที่ 13) จึงคัดเลือกเฉพาะต้นที่มีความยาวเซลล์คุมปากใบมากกว่าปกติ คือ มากกว่า 44 ไมครอน ไปตรวจนับจำนวนโครโมโซม

การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของต้นปทุมมาลูกผสมจำนวน 71 ต้น พบว่าต้นที่เจริญจากหน่ออายุเยาว์ที่ไม่ได้รับโคลชิซินจำนวน 20 ต้น มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ทั้งหมด (2n=2x=28) ส่วนต้นที่เจริญจากหน่ออายุเยาว์ที่ได้รับโคลชิซินจำนวน 51 ต้น ที่ความเข้มข้น 800 มก/ล จำนวน 23 ต้น เป็นต้นดิพลอยด์ 2 ต้น (9%) ต้นเททระพลอยด์ 6 ต้น (26%) และต้นมิกโซพลอยด์ 15 ต้น (65) ที่ความเข้มข้น 1,000 มก/ล จำนวน 13 ต้น เป็นต้นออกทะพลอยด์ 1 ต้น (8%) และเป็นต้นมิกโซพลอยด์ 12 ต้น (92%) และที่ 1,200 มก/ล จำนวน 15 ต้น เป็นต้นเททระพลอยด์ 2 ต้น (13%) ต้นออกทะพลอยด์ 1 ต้น (7%) และต้นมิกโซพลอยด์ 12 ต้น (80%) (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 13 ความยาวเซลล์คุมปากใบของต้นปทุมมาลูกผสม

โคลชิซิน	ระยะเวลา	จำนวน	ความยาวเซลล์คุมปากใบ (ไมครอน)											
(มก/ล)	(วัน)	ต้นที่วัด	35	38	41	44	47	50	53	56	59	62	65	68
0	0	10	-	-	7	3	-	-	-	-	-	-	-	-
0	4	10	-	1	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
800	4	53	2	3	2	-	-	5	6	8	13	6	6	2
1,000	4	31	-	1	-	-	1	2	2	5	10	2	3	5
1,200	4	26	1	1	-	-	-	2	5	3	7	4	2	1

ตารางที่ 14 จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของปทุมมาลูกผสม

ความเข้มข้นโคลชิซิน (มก/ล)	ระยะเวลาที่ได้รับโคลชิซิน (วัน)	จำนวนต้นที่ตรวจนับจำนวนโครโมโซม	ระดับของพลอยดี					
			ดิพลอยด์ (2x)	เททระพลอยด์ (4x)	ออกทะพลอยด์ (8x)	มิกโซพลอยด์		
						2x,4x	2x,4x 8x	4x,8x
0	0	10	10	-	-	-	-	-
0	4	10	10	-	-	-	-	-
800	4	23	2	6	-	10	4	1
1,000	4	13	-	-	1	8	3	1
1,200	4	15	-	2	1	5	5	2

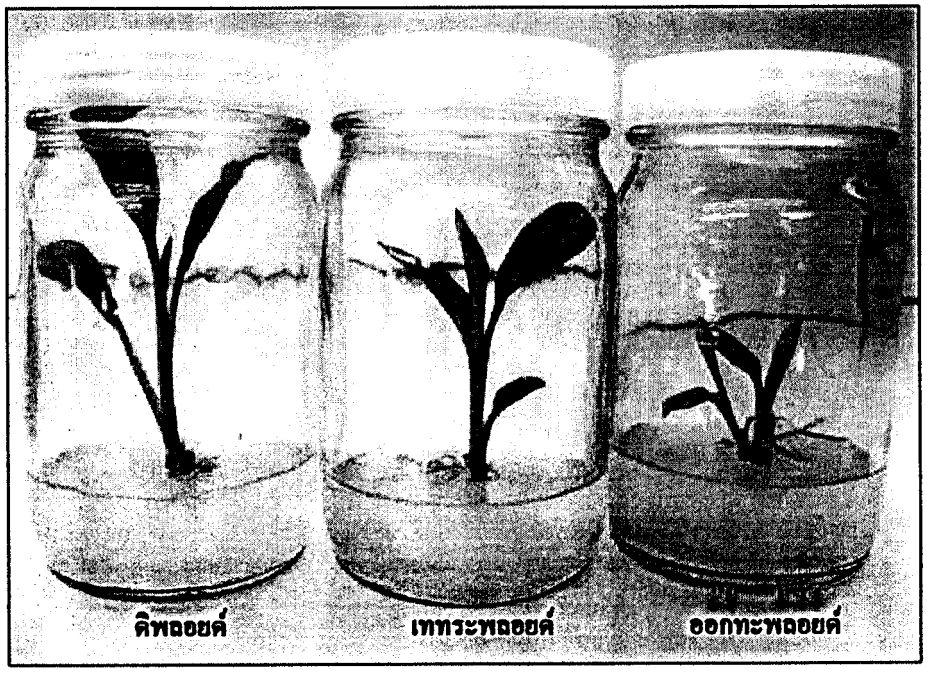
4.2.2 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์

จากการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์ที่ได้จากหลอดแก้ว ซึ่งเป็นต้นปทุมมาลูกผสมระดับพลอยดีต่างๆ ที่มีอายุ 2 เดือน และมีใบ 3-4 ใบ โดยวัดความสูงของต้น วัดความหนาของใบ นับจำนวนปากใบต่อพื้นที่ และวัดความยาวเซลล์คุมปากใบ พบว่าต้นดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์ มีความสูงของต้นที่มีแนวโน้มลดลงตามระดับพลอยดีที่เพิ่มขึ้น คือมีความสูงของต้นเฉลี่ย 11, 8 และ 4 ซม ตามลำดับ (ภาพที่ 27) ความหนาของใบมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระดับพลอยดีที่เพิ่มขึ้น คือมีความหนาของใบเฉลี่ย 181, 214 และ 273 ไมครอน ตามลำดับ (ภาพที่ 28) จำนวนปากใบต่อพื้นที่มีแนวโน้มลดลงตามระดับพลอยดีที่เพิ่มขึ้น คือมีจำนวนปากใบต่อพื้นที่เฉลี่ย 5,078, 3,359 และ 2,875 เซลล์ต่อซม^2 ตามลำดับ (ภาพที่ 29) และความยาวเซลล์คุมปากใบมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระดับพลอยดีที่เพิ่มขึ้น คือมีความยาวเซลล์คุมปากใบเฉลี่ย 40, 52 และ 55 ไมครอน ตามลำดับ (ภาพที่ 30) (ตารางที่ 15)

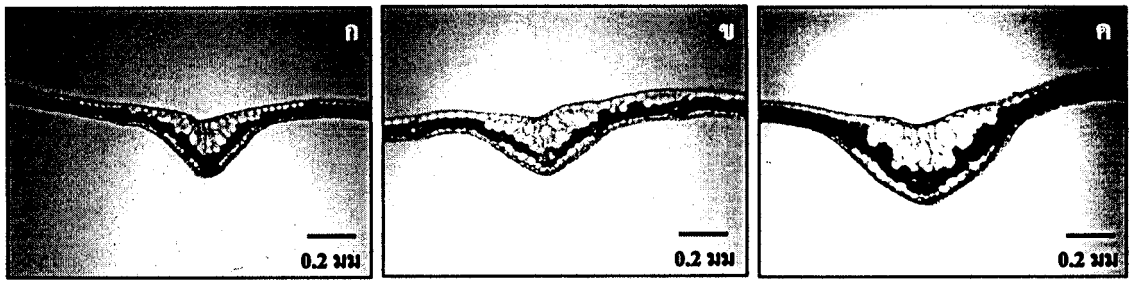
นอกจากนี้ยังพบว่าต้นเททระพลอยด์มีใบสั้น กว้าง และสีใบเขียวเข้มกว่าต้นดิพลอยด์ ส่วนต้นออกทะพลอยด์มีใบและลำต้นหนา สีเขียวเข้ม ต้นเตี้ย และรากสั้น ซึ่งเป็นลักษณะที่สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน

ตารางที่ 15 ค่าเฉลี่ยความสูงของต้น ความหนาของใบ จำนวนปากใบต่อพื้นที่ และความยาวเซลล์คุมปากใบของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์

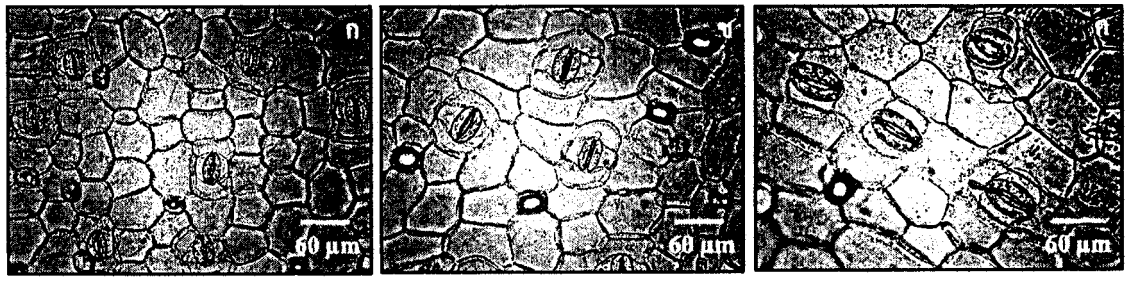
ระดับพลอยดี	ความสูงของต้น (ซม)	ความหนาของใบ (ไมครอน)	จำนวนปากใบต่อพื้นที่ (เซลล์/ซม^2)	ความยาวเซลล์คุมปากใบ (ไมครอน)
ดิพลอยด์	10.81±1.34	180.63±11.78	5,078.13±334.08	40.30±0.95
เททระพลอยด์	7.96±1.23	213.50±18.27	3,359.38±557.32	51.75±2.87
ออกทะพลอยด์	4.38±1.03	273.00±36.67	2,875.00±178.15	55.40±1.82



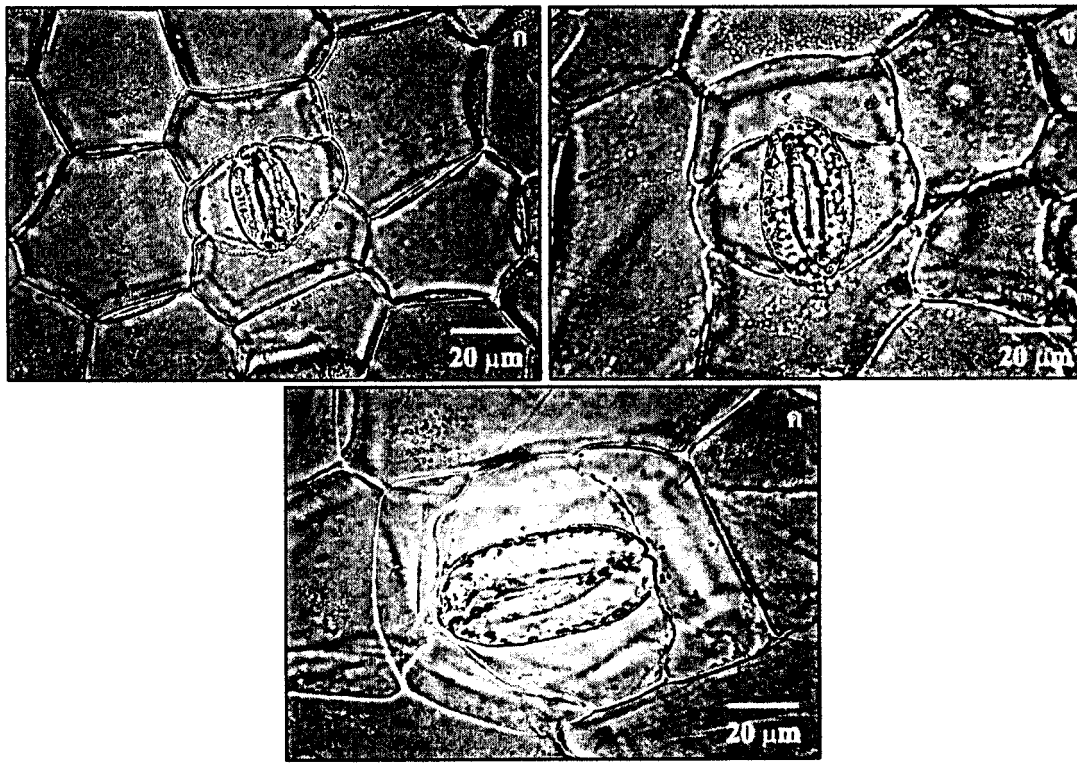
ภาพที่ 28 ต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์



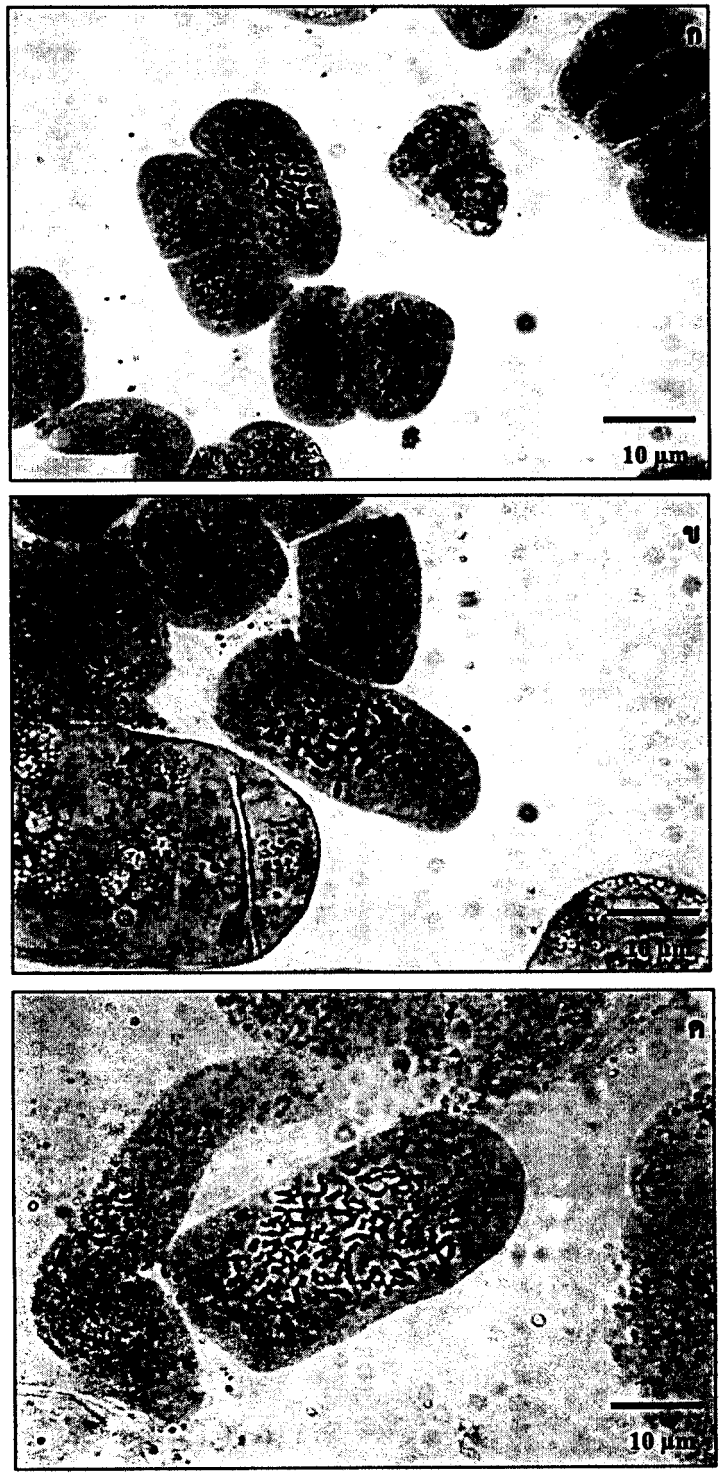
ภาพที่ 29 ความหนาใบของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์



ภาพที่ 30 เซลล์คุมปากใบของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์



ภาพที่ 31 ขนาดเซลล์คุมปากใบของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ (ก) เททระพลอยด์ (ข) และออกทะพลอยด์ (ค)



ภาพที่ 32 เซลล์ปลายรากของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ (ก) เททระพลอยด์ (ข) และออกทะพลอยด์ (ค)

บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การศึกษาอิทธิพลของ TDZ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดในชิ้นส่วนหน่ออ่อน และชิ้นส่วนโคนต้น

5.1.1 ชิ้นส่วนหน่ออ่อน

5.1.1.1 การศึกษาช่วงความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม

การศึกษาช่วงความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของชิ้นส่วนหน่ออ่อน พบว่า TDZ มีอิทธิพลต่อการเพิ่มจำนวนยอดโดยหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 5-20 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน จะให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าหน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ 6-8 เท่า และการเพิ่มระดับความเข้มข้น TDZ ไปจนถึง 20 มก/ล ยังไม่ทำให้จำนวนยอดลดลง แสดงให้เห็นว่าหน่ออ่อนของปทุมมาลูกผสมสามารถเกิดยอดใหม่ได้ดีเมื่อได้รับ TDZ ความเข้มข้นสูงในระยะเวลาสั้น และการเกิดยอดมีการตอบสนองต่อความเข้มข้นของ TDZ ในช่วงกว้าง (5-20 มก/ล)

การทดลองนี้ได้นำชิ้นส่วนหน่ออ่อน (หน่ออ่อนอายุ 14 วัน ความสูง 0.5 ซม) มาใช้ในการเพิ่มจำนวนยอดในปทุมมาลูกผสมเป็นครั้งแรก ทำให้ทราบว่าหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 5-20 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน จะให้ยอดเฉลี่ย 14-19 ยอดต่อชิ้นส่วน ภายในระยะเวลา 10 สัปดาห์ ซึ่งเป็นจำนวนยอดที่มากกว่าการใช้ชิ้นส่วนโคนต้นซึ่งเป็นเหง้าที่มีปลายยอดอยู่ด้วย (ต้นอ่อนอายุ 1-3 เดือน ที่ตัดใบและรากให้มีความสูง 0.5-1 ซม) ที่ใช้กันทั่วไปในการเพิ่มจำนวนยอดของพืชวงศ์ขิงและในระดับความเข้มข้น TDZ ที่ใกล้เคียงกันชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาลูกผสมที่ได้รับ TDZ 5-20 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน ให้จำนวนยอดเพียง 6-10 ยอดต่อชิ้นส่วน ภายในเวลา 10 สัปดาห์ (พรพิมล และดวงจันทร์, 2547) และโคนต้นของขมิ้นชันที่ได้รับ TDZ 4-16 มก/ล เป็นเวลา 7 วัน จะให้จำนวนยอด 6-11 ยอดต่อชิ้นส่วน ภายในเวลา 9 สัปดาห์ (Prathanturarug *et al.*, 2005)

อย่างไรก็ตามพบว่าหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ (5-20 มก/ล) ให้ยอดใหม่ที่มีความสูงลดลงเป็นอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับหน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ และเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ TDZ ก็ยิ่งส่งผลให้ความสูงของยอดลดลงมากขึ้น โดยยอดใหม่ที่เกิดจากหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 10-20 มก/ล ร้อยละ 93-95 เป็นยอดในกลุ่มที่มีความสูงน้อยกว่า 2 ซม ในขณะที่หน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ มียอดกลุ่มนี้เพียงร้อยละ 51 ซึ่งพบรายงานว่าการเลี้ยงชิ้นส่วนโคนต้นที่มีปลายยอดของขมิ้นชันที่ผ่าเป็นสี่ส่วน (ต้นอ่อนอายุ 1-3 เดือน) (Prathanturarug *et al.*, 2003) ในอาหารที่มี TDZ จะเกิดกลุ่มยอดที่มีขนาดเล็ก เมื่อทำการตัดแบ่งและเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปลอด

TDZ เป็นเวลา 6-8 สัปดาห์ พบว่ายอดเหล่านี้สามารถเจริญและเกิดรากได้เป็นปกติ ดังนั้นการเลี้ยงหน่ออ่อนใน TDZ ความเข้มข้นสูง 10-20 มก/ล นี้แม้จะให้ยอดจำนวนเป็นมาก แต่ก็เป็นยอดที่มีขนาดเล็กจึงจำเป็นต้องทำการตัดแบ่งกลุ่มยอดไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตอีกระยะหนึ่ง จึงจะสามารถทำให้ยอดขนาดเล็กเจริญและเกิดรากได้เป็นปกติได้

นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ TDZ ความเข้มข้นสูงแก่ชิ้นส่วนหน่ออ่อน (10-20 มก/ล) ยังทำให้เกิดอาการเป็นพิษ โดยหน่อใหม่บางส่วนมีกาบใบกลายเป็นสีน้ำตาลและตายในเวลาต่อมา ซึ่งเป็นอาการที่ไม่เกิดกับหน่ออ่อนที่ไม่ได้รับ TDZ อาการเป็นพิษนี้คล้ายกับที่พบใน meristematic nodules ของสน และ meristem ที่มี 2 leaf primodia ของ *Hibiscus moscheutos* L. ที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นสูงเกินไปจะมีเนื้อเยื่อกลายเป็นสีน้ำตาลและตาย (Pelletier *et al.*, 2004; West and Preece, 2004) ซึ่งอาจเกิดจาก TDZ ความเข้มข้นสูงกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชสร้างเอทธิลีน (Mundhara and Rashid, 2006; Suttle, 1985; Yip and Yang, 1986) ดังนั้น TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 10-20 มก/ล เป็นความเข้มข้นที่สูงเกินไปสำหรับการเพาะเลี้ยงหน่ออ่อนปทุมมาลูกผสม จึงควรศึกษาระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมในช่วงความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้

การเกิดยอดจากชิ้นส่วนหน่ออ่อนของปทุมมาลูกผสมที่ได้รับ TDZ มีลักษณะเป็นกระจุกยอดขนาดเล็กจำนวนมากโดยไม่พบการเกิดแคลลัส เช่นเดียวกับการเลี้ยงปลายยอดขมิ้นชันในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.05-16 มก/ล ที่การเกิดยอดไม่การเกิดแคลลัส (Prathanturarug *et al.*, 2003; Prathanturarug *et al.*, 2005) ซึ่งจากการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาโดย Topoonyanont และคณะ (2005) พบว่ากระจุกยอดของปทุมมาที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี TDZ 0.5 มก/ล เป็นการเกิดยอดใหม่จากตาข้างที่อยู่บริเวณซอกของ leaf primodia โดยตรงไม่ได้เกิดผ่านแคลลัส นอกจากนี้จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของ Srivatanakul และคณะ (2000) พบว่า TDZ สามารถกระตุ้นให้เกิดตายอดพิเศษ (adventitious shoots) จากชิ้นส่วน meristem ที่มี 2 leaf primodia ของ *Hibiscus cannabinus* L. ได้

5.1.1.2 การศึกษาระดับความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม

การศึกษาระดับความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดในชิ้นส่วนหน่ออ่อน พบว่าช่วงความเข้มข้น 0.5-5.0 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ถึงแม้ TDZ ที่ 0.5 มก/ล จะมีจำนวนยอดที่มีแนวโน้มน้อยกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วนหน่ออ่อนตอบสนองต่อ TDZ ได้ดีในช่วงความเข้มข้น 0.5-5.0 มก/ล โดยที่ยังไม่พบการยับยั้งการเกิดยอดแต่อย่างใด ดังนั้นการเลือกระดับความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสมจึงพิจารณาจากการเจริญของยอดเหล่านี้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 0.5-1.0 มก/ล จะให้จำนวนยอด

ขนาดเล็กในกลุ่มความสูงน้อยกว่า 2 ซม ในปริมาณที่น้อยกว่าที่ความเข้มข้น 2.5-5.0 มก/ล ร้อยละ 6 โดยเฉลี่ย ดังนั้น TDZ ที่ 1 มก/ล จึงเป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจากมีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดและการเจริญของยอดได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ

หน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ จะมีความสูงของยอดลดลง และระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ยอดใหม่ของปทุมมาลูกผสมมีความสูงลดลงมากขึ้น เช่นเดียวกับในพืชวงศ์ขิงอื่นๆ เช่น กระวานไทย (Tefera and Wannakrairoj, 2004b) กระวานอัฟริกัน (Tefera and Wannakrairoj, 2004a) และปทุมมา (Topoonyanont *et al.*, 2005) และพืชชนิดอื่นๆ เช่น *Limonium perigrinum* Bergius. คาร์เนชั่น แอปเปิล (Van Nieuwkerk *et al.*, 1986) และ *Hibiscus moscheutos* L. (West and Preece, 2004) ที่พบว่ายอดใหม่ที่เจริญจากปลายยอดที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 0.1-5.0 มก/ล มีความสูงของยอดลดลงกว่าปลายยอดที่ไม่ได้รับ TDZ อย่างมีนัยสำคัญ

เป็นที่น่าสังเกตว่าการให้ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เท่ากัน แต่มีการตัดแบ่งที่ระยะเวลาแตกต่างกันอาจส่งผลต่อจำนวนยอดเฉลี่ย โดยพบว่าการตัดแบ่งที่เวลา 6 สัปดาห์ ในการทดลองที่ 5.1.1.2 มีแนวโน้มจะได้จำนวนยอดมากกว่าการตัดแบ่งที่เวลา 8 สัปดาห์ ในการทดลองที่ 5.1.1.1 แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการตัดแบ่งอาจมีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอด โดยยอดใหม่ของปทุมมาลูกผสมที่เกิดจากหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ จะมีลักษณะเป็นกลุ่มยอดขนาดเล็ก การตัดแบ่งกลุ่มยอดไปเลี้ยงในอาหารใหม่เร็วขึ้นจึงช่วยลดการแก่งแย่งอาหาร และอาจช่วยลดการข่มตาข้างของตายอดเดิมที่มีต่อยอดใหม่จึงส่งผลให้ยอดใหม่มีการเจริญเติบโตได้เร็วขึ้น สังเกตได้จากที่เวลา 6 และ 8 สัปดาห์ ก่อนการตัดแบ่งจะพบจำนวนยอดเพียง 5-8 ยอดเท่านั้น แต่เมื่อตัดแบ่งหน่ออ่อนระยะ 8 สัปดาห์ ไปเลี้ยงในอาหารใหม่เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จะมีจำนวนยอดใหม่เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ของจำนวนยอดเดิม แต่เมื่อตัดแบ่งหน่ออ่อนที่ระยะ 6 สัปดาห์ ไปเลี้ยงในอาหารใหม่เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะมีจำนวนยอดใหม่เพิ่มขึ้นเป็น 4-5 เท่า ของจำนวนยอดเดิม

ดังนั้น TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มก/ล จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดของหน่ออ่อนของปทุมมาลูกผสม เนื่องจากให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด (25 ยอดต่อชิ้นส่วน) และให้ยอดที่มีคุณภาพดี ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมนี้จะนำไปใช้ในการศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาการให้ TDZ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดในชิ้นส่วนหน่ออ่อนต่อไป

5.1.1.3 การศึกษาระยะเวลาการให้ TDZ ที่เหมาะสม

การให้ TDZ 1 มก/ล เป็นระยะเวลา 3 และ 5 วัน ส่งผลให้ชิ้นส่วนหน่ออ่อนของปทุมมาลูกผสมมีจำนวนยอดเพิ่มขึ้นได้มากกว่าที่ระยะอื่นๆ ส่วนการให้ TDZ แก่หน่ออ่อนเป็นเวลา 1 วัน ทำให้จำนวนยอดน้อยกว่าที่ระยะอื่นๆ อาจเนื่องจากระยะเวลา เพียง 1 วัน ทำให้ชิ้นส่วนหน่ออ่อนได้รับ TDZ ในปริมาณที่ไม่เพียงพอ แต่การให้ TDZ ที่ระยะเวลา 7 วัน กลับทำให้

จำนวนยอดลดลงนั้น อาจเนื่องจากหน่ออ่อนของปทุมมาลูกผสมเป็นยอดอ่อนขนาดเล็กและบอบบาง การเลี้ยงหน่อหน่ออ่อนในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าเป็นเวลานานถึง 7 วัน จึงทำให้เกิดอาการฉ่ำน้ำ การให้ TDZ เป็นระยะเวลาสั้นเพียงช่วงหนึ่งเพื่อเพิ่มจำนวนยอดใช้ได้ผลดีกับพืชอื่นๆ เช่นกัน ดังในรายงานของ Onamu และคณะ (2003) ที่พบว่า meristem ที่มี 2 leaf primodia ของคาร์เนชั่นที่ได้รับ TDZ (1 มก/ล) เป็นเวลา 3 วัน สามารถกระตุ้นการเกิดยอดได้ดี แต่การให้ TDZ ติดต่อกันเป็นเวลานานกว่า 10 วัน จะทำให้จำนวนยอดและความสูงของยอดลดลง Caramori และคณะ (2001) พบว่า meristem ของฝ้าย (*Gossypium hirsutum* L.) ที่ได้รับ TDZ (1 มก/ล) เป็นเวลา 3 วัน จะให้จำนวนยอดมากกว่าที่ 5 และ 7 วัน และ Pelletier และคณะ (2001) พบว่า meristem ของสนที่ได้รับ TDZ (0.2 มก/ล) เป็นเวลา 3 วัน จะให้จำนวนยอดมากที่สุด ส่วนที่ระยะเวลา 6 และ 9 วัน จะให้จำนวนยอดลดลงเนื่องจากชิ้นส่วนเกิดอาการเป็นพิษ

อย่างไรก็ตามพบว่าระยะเวลาการให้ TDZ ที่นานขึ้นส่งผลให้ความสูงของยอดใหม่ ลดลง โดยหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ เป็นเวลา 1, 3 และ 5 วัน มียอดใหม่อยู่ในกลุ่มที่มีความสูงน้อยกว่า 2 ซม ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการให้ TDZ เป็น 7 วัน พบว่าปริมาณยอดที่อยู่ในกลุ่มนี้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น การเลี้ยงชิ้นส่วนหน่ออ่อนในอาหารเหลวที่มี TDZ เป็นเวลานานขึ้นจะทำให้ชิ้นส่วนได้รับ TDZ ต่อเนื่องจึงส่งผลให้ความสูงของยอดจะลดลง สอดคล้องกับรายงานของ Onamu และคณะ (2003) ที่พบว่า meristem ที่มี 2 leaf primodia ของคาร์เนชั่นที่ได้รับ TDZ (1.0 มก/ล) เป็นเวลา 3, 10, 24 และมากกว่า 40 วัน ทำให้ความสูงของยอดมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับ TDZ นานขึ้น

การที่หน่ออ่อนสามารถเกิดยอดได้ดีแม้จะได้รับ TDZ ในระยะเวลาสั้นและมีการเจริญพัฒนาของยอดได้ดีแม้จะย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้น อาจเนื่องจาก TDZ เป็นไซโตไคนินในกลุ่มฟีนิลยูเรียซึ่งไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ไซโตไคนินออกซิเดส (cytokinin oxidase) เหมือนกับไซโตไคนินในกลุ่มพิวรีนทั่วไป จึงสามารถออกฤทธิ์ในเนื้อเยื่อพืชได้เป็นเวลานาน (Mok and Mok, 1985) นอกจากนี้ Capelle และคณะ (1983) และ Van Staden (1979) ยังรายงานว่า TDZ กระตุ้นให้เกิดการสะสมปริมาณไซโตไคนินในเนื้อเยื่อพืชโดยอาจกระตุ้นการสังเคราะห์ไซโตไคนินหรือยับยั้งการทำลายไซโตไคนิน

ดังนั้นการเลี้ยงหน่ออ่อนในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 3 วัน และย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 10 สัปดาห์ จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดในชิ้นส่วนหน่ออ่อน

5.1.2 ชิ้นส่วนโคนต้น

5.1.2.1 การศึกษาช่วงความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม

ชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 10 สัปดาห์ มีจำนวนยอดใหม่แตกต่างกันออกไปตามความเข้มข้นของ TDZ โดย TDZ 5-10 มก/ล เป็นความเข้มข้นที่มีแนวโน้มให้จำนวนยอดได้มากกว่าความเข้มข้นอื่นๆ ส่วน TDZ ความเข้มข้น 15 และ 20 มก/ล มีผลให้จำนวนยอดลดลงต่ำกว่าที่ 5 มก/ล เนื่องจากเป็นช่วงความเข้มข้นที่พบอาการเป็นพิษทำให้การเกิดยอดลดลงและมียอดใหม่บางส่วนตายไป ซึ่งอาการเป็นพิษของชิ้นส่วนมีลักษณะคล้ายกับอาการเป็นพิษที่เกิดในชิ้นส่วนหน่ออ่อนของปทุมมาลูกผสมในการทดลองที่ 5.1.1.1

อย่างไรก็ตามพบว่าชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาลูกผสมตอบสนองต่อช่วงความเข้มข้นของ TDZ แตกต่างจากในขมิ้นชันซึ่ง Prathanturarug และคณะ (2005) รายงานว่าการให้ TDZ ความเข้มข้น 4-16 มก/ล แก่โคนต้นของขมิ้นชันเป็นเวลา 7 วัน สามารถกระตุ้นการเกิดยอดใหม่ได้ดี โดย TDZ ที่ความเข้มที่สูงที่สุด (16 มก/ล) ยังไม่มีผลยับยั้งการเกิดยอดแต่อย่างใด และรายงานของ นพมาศ และคณะ (2546) รายงานว่าการให้ TDZ ความเข้มข้น 16 มก/ล แก่โคนต้นของขมิ้นชันเป็นเวลา 7 วัน สามารถกระตุ้นการเกิดยอดใหม่ได้ดีเช่นเดียวกัน การตอบสนองต่อความเข้มข้นที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดจากชนิดของพืชและอายุของชิ้นส่วน (Sotthikul and Apavatjrut, 1996)

ยอดใหม่ที่เจริญจากชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ (5-20 มก/ล) มีความสูงลดลงอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนโคนต้นที่ไม่ได้รับ TDZ ซึ่งมีการเจริญของยอดใหม่อยู่ในกลุ่มที่มีความสูงมากกว่า 4 ซม ถึงร้อยละ 60 แต่การได้รับ TDZ 5-20 มก/ล ทำให้ยอดกลุ่มนี้มีปริมาณลดลงเป็นร้อยละ 4-15 ในทางกลับกันก็พบว่ามียอดใหม่ในกลุ่มความสูงน้อยกว่า 2 ซม เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 70-91 ผลของระดับความเข้มข้น TDZ ที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ความสูงของยอดใหม่ลดลงเช่นเดียวกับชิ้นส่วนหน่ออายุเยาว์ในการทดลองที่ 5.1.1.1 กระวานไทย (Tefera and Wannakrairoj, 2004b) กระวานอัฟริกัน (Tefera and Wannakrairoj, 2004a) และปทุมมา (Topoonyanout *et al.*, 2005) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกัน การย้ายกลุ่มยอดขนาดเล็กเหล่านี้ไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตจะช่วยให้การเจริญของยอด และการเกิดรากเป็นปกติได้เช่นเดียวกับหน่ออายุเยาว์ของปทุมมาลูกผสม (Prathanturarug *et al.*, 2003; Prathanturarug *et al.*, 2005; Topoonyanout *et al.*, 2005; Tefera and Wannakrairoj, 2004a; Tefera and Wannakrairoj, 2004b) โดยยอดใหม่ที่เจริญจากชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาลูกผสมที่ได้รับ TDZ เป็นการเจริญจาก

ตาข้างโดยไม่ผ่านแคลลัสเช่นเดียวกับขมิ้นชัน (Prathanturarug *et al.*, 2003) และ ปทุมมา (Topoonyanont *et al.*, 2005)

ดังนั้น ความเข้มข้นของ TDZ ที่ระดับ 10-20 มก/ล จึงเป็นความเข้มข้นที่สูงเกินไปไม่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดจากชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาลูกผสม จึงสมควรจะทำศึกษาความเข้มข้น TDZ ที่ต่ำกว่านี้โดยให้ TDZ 5 มก/ล เป็นความเข้มข้นสูงสุด เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ให้คุณภาพยอดที่ดีและจำนวนยอดมากกว่าความเข้มข้นอื่นๆ

5.1.2.2 การศึกษาระดับความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสม

การศึกษาระดับความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดในชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาลูกผสม พบว่าช่วงความเข้มข้น 0.5-5.0 มก/ล ให้จำนวยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนไม่แตกต่างกัน ถึงแม้ที่ความเข้มข้น 0.5 มก/ล จะมีจำนวนยอดที่มีแนวโน้มน้อยกว่าความเข้มข้นอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วนโคนต้นตอบสนองต่อ TDZ ได้ดีในช่วงความเข้มข้น 0.5-5.0 มก/ล โดยไม่พบการยับยั้งการเกิดยอดแต่อย่างใด ดังนั้นการเลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงพิจารณาจากการเจริญของยอด ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.5-1.0 มก/ล ให้ยอดขนาดเล็กที่มีความสูงน้อยกว่า 2 ซม ในปริมาณที่น้อยกว่าที่ TDZ 2.5-5.0 มก/ล ถึงร้อยละ 14.5 โดยเฉลี่ย ดังนั้น TDZ ที่ 1 มก/ล จึงเป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจากมีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดและการเจริญของยอดได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ

ยอดใหม่ที่เจริญจากชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาลูกผสมที่ได้รับ TDZ เป็นการเจริญจากตาข้างโดยไม่ผ่านแคลลัส เช่นเดียวกับในชิ้นส่วนหน่ออ่อนในการทดลองที่ 5.1.1.1- 5.1.1.3 ขมิ้นชัน (Prathanturarug *et al.*, 2003) และปทุมมา (Topoonyanont *et al.*, 2005) และจากการสังเกตพบว่าชิ้นส่วนโคนต้นและชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้น 1.0 มก/ล เป็นเวลา 5 วันเท่ากัน เมื่อเลี้ยงในอาหารปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตครบ 10 สัปดาห์ ชิ้นส่วนโคนต้นจะให้ปริมาณยอดที่อยู่ในกลุ่มความสูงมากกว่า 4 ซม มีมากกว่าหน่ออ่อนถึงร้อยละ 14.4 ดังนั้น แม้การใช้โคนต้นและหน่ออ่อนจะให้จำนวนยอดเฉลี่ยใกล้เคียงกัน (23-25 ยอดต่อชิ้นส่วน) แต่การเจริญของยอดในชิ้นส่วนโคนต้นจะเป็นไปได้เร็วกว่าชิ้นส่วนหน่ออ่อน

5.1.2.3 การศึกษาระยะเวลาการให้ TDZ ที่เหมาะสม

การให้ TDZ (1 มก/ล) แก่ชิ้นส่วนโคนต้นในระยะเวลาที่ต่างๆ ให้จำนวนยอดไม่แตกต่างกัน แต่ในช่วงเวลา 3-7 วัน มีแนวโน้มจะให้จำนวนยอดใกล้เคียงกัน (14-15 ยอดต่อชิ้นส่วน) ในขณะที่การให้ TDZ เพียง 1 วัน มีแนวโน้มจะให้จำนวนยอดใกล้เคียงกับชิ้นส่วนโคนต้นที่ไม่ได้รับ TDZ (10-11ยอดต่อชิ้นส่วน) อาจเนื่องจากการเลี้ยงชิ้นส่วนโคนต้นในอาหารเหลวเป็นเวลา 1 วัน ทำให้ชิ้นส่วนโคนต้นได้รับปริมาณ TDZ น้อยกว่าที่ช่วงเวลา 3-7 วัน จึง

ส่งผลให้มีจำนวนยอดเฉลี่ยลดลง โดยชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ เป็นเวลา 7 วัน ไม่แสดงอาการฉ่ำน้ำเหมือนกับที่พบในชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ เป็นเวลา 7 วัน แต่อย่างใด

ยอดใหม่ที่เจริญจากชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ (1 มก/ล) ในช่วงระยะเวลา 3-7 วัน มีปริมาณยอดที่จัดอยู่ในกลุ่มความสูงของต่างๆ ใกล้เคียงกัน การให้ TDZ 3 วัน จึงให้จำนวนยอดได้มากและยอดมีคุณภาพดีในระยะเวลาที่สั้นกว่าช่วงเวลาอื่นๆ ดังนั้นการให้ TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 3 วัน แล้วย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตอีก 10 สัปดาห์ จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของชิ้นส่วนโคนต้นในปทุมมาลูกผสม

5.1.2.4 การศึกษาผลร่วมของการผ่าชิ้นส่วน ความเข้มข้นและระยะเวลาการให้ TDZ

การผ่าชิ้นส่วนโคนต้น ความเข้มข้น และระยะเวลาการให้ TDZ เป็น 3 ปัจจัยที่ไม่มีปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกันในการเพิ่มจำนวนยอดของชิ้นส่วนโคนต้นปทุมมาลูกผสม แต่การผ่าชิ้นส่วนโคนต้น ความเข้มข้น และระยะเวลาการให้ TDZ มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดและคุณภาพของยอด

โคนต้นที่ผ่าครึ่ง และโคนต้นที่ไม่ผ่าของปทุมมาลูกผสมให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนไม่แตกต่างกันทางสถิติ อาจเป็นได้ว่าการผ่าชิ้นส่วนโคนต้นตามยาวเป็นการกระตุ้นให้เกิดการเจริญของตาข้างจากการลดผลของการข่มตาข้างโดยตายอด และพบว่าโคนต้นผ่าครึ่งให้ยอดใหม่ที่มีความสูงน้อยกว่าโคนต้นที่ไม่ผ่า การผ่าชิ้นส่วนโคนต้นอาจทำให้ชิ้นส่วนเกิดยอดใหม่ได้ช้ากว่าโคนต้นที่ไม่ผ่า สังเกตจากที่ระยะ 6 สัปดาห์ โคนต้นผ่าครึ่งจะให้จำนวนยอดน้อยกว่าโคนต้นไม่ผ่าอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อครบ 10 สัปดาห์ จึงพบว่าชิ้นส่วนทั้ง 2 ชนิด ให้จำนวนยอดได้ไม่แตกต่างกัน คล้ายกับรายงานของทิพย์สุดา (2540) ที่พบว่าการเลี้ยงปลายยอดกระเจียวพลอยทักษิณที่ผ่าครึ่งให้จำนวนยอดไม่แตกต่างกัน แต่ยอดใหม่ที่เจริญจากชิ้นส่วนที่ผ่าครึ่งจะมีความสูงของยอดน้อยกว่าชิ้นส่วนที่ไม่ผ่าอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าการผ่าครึ่งชิ้นส่วนโคนต้นเป็นวิธีการที่ดีในการเพิ่มจำนวนยอดเนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนยอดใหม่ได้เป็น 2 เท่า ของการใช้ชิ้นส่วนโคนต้นที่ไม่ผ่า เพียงแต่จะให้ยอดที่มีความสูงลดลง ซึ่งพบรายงานว่าวิธีการผ่าครึ่งชิ้นส่วนโคนต้นเป็นวิธีที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์กระเจียวแดงในหลอดแก้วเช่นกัน (จามจุรี และพิมพ์ใจ, 2533; Sotthikul and Apavatjrut, 1996; Sotthikul and Apavatjrut, 1997)

ชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาลูกผสมที่ได้รับ TDZ ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (1, 3 และ 5 มก/ล) ให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (19-24 ยอดต่อชิ้นส่วน) แสดงว่า TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นระดับที่เพียงพอต่อการกระตุ้นให้เกิดยอดใน

ชิ้นส่วนโคนต้น การเพิ่มความเข้มข้นจึงไม่ทำให้จำนวนยอดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และชิ้นส่วนโคนต้นสามารถเกิดยอดได้ดีเมื่อได้รับ TDZ (1-5 มก/ล) ในช่วงความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับขมิ้นชัน ในรายงานของ Prathanturarug และคณะ (2003) ที่พบว่าการเลี้ยงปลายยอดขมิ้นชันในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 1, 2 และ 4 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยได้ใกล้เคียงกัน (11-13 ยอดต่อชิ้นส่วน) อย่างไรก็ตามพบว่าชิ้นส่วนโคนต้นจะให้ยอดใหม่ที่มีความสูงลดลงตามความเข้มข้น TDZ ที่เพิ่มขึ้น คล้ายกับรายงาน Tefera และ Wannakrairoj (2004a,b) ที่พบว่ายอดใหม่ที่เจริญจากปลายยอดของกระวาน อัฟริกันและกระวานไทยจะมีความสูงลดลงตามความเข้มข้น TDZ ที่เพิ่มขึ้น การย้ายกลุ่มยอดขนาดเล็กของปทุมมาลูกผสมที่ได้รับ TDZ ไปเลี้ยงในอาหารที่ปราศจาก TDZ จะช่วยให้การยืดยาวของยอดและการเกิดรากเป็นปกติ ซึ่งวิธีการนี้ใช้ได้ผลดีในขมิ้นชัน กระวานไทย กระวานอัฟริกัน และปทุมมา (Prathanturarug *et al.*, 2003; Prathanturarug *et al.*, 2005; Topoonyanout *et al.*, 2005; Tefera and Wannakrairoj, 2004a; Tefera and Wannakrairoj, 2004b)

ระยะเวลาการให้ TDZ มีผลต่อจำนวนยอดเฉลี่ย โดยการให้ TDZ เป็นเวลา 3 และ 5 วัน ให้จำนวนยอดที่ไม่แตกต่างกัน แต่การให้ TDZ เพียง 1 วัน จะทำให้ได้จำนวนยอดเฉลี่ยลดลง โดยการให้ TDZ เป็นระยะเวลาเพียง 1 วัน อาจทำให้ชิ้นส่วนได้รับ TDZ ในปริมาณที่น้อยกว่า 3 และ 5 วัน จึงส่งผลให้จำนวนยอดเฉลี่ยลดลง ซึ่งคล้ายกับรายงานในสน (Pelletier *et al.*, 2001) ฝ้าย (Caramori *et al.*, 2001) และมันสำปะหลัง (Bhagwat *et al.*, 1996) ที่พบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารเหลวที่มี TDZ มีผลต่อจำนวนยอด ซึ่งระยะเวลา 3-5 วัน เป็นระยะที่เหมาะสมในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนยอดในพืชเหล่านี้เช่นเดียวกับปทุมมาลูกผสม การให้ TDZ ความเข้มข้นสูงในระยะเวลาสั้นแล้วย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นวิธีที่ใช้ได้ผลดีสำหรับการเพิ่มจำนวนยอดจากชิ้นส่วนโคนต้นของปทุมมาลูกผสม และในพืชหลายชนิด ได้แก่ ขมิ้นชัน (Prathanturarug *et al.*, 2005) พิทูเนีย (Fellman *et al.*, 1987) *Limonium perigrinum* Bergius. (Seelye *et al.*, 1994) *Hibiscus cannabinus* L. (Srivatanakul *et al.*, 2000) และกุหลาบ (Singh and Syamal, 2001)

5.2 การศึกษาอิทธิพลของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของปทุมมาลูกผสม

5.2.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซม ผลของความเข้มข้นโคลชิซินต่อการรอดชีวิต และจำนวนยอดเฉลี่ย

ระดับความเข้มข้นของโคลชิซิน (800-1,200 มก/ล) ส่งผลให้การรอดชีวิตชิ้นส่วนหน่ออ่อนของปทุมมาลูกผสมลดลงอย่างมาก (ร้อยละ 20-40) คล้ายกับพืชวงศ์ขิงหลายชนิด วัชรินทร์ (2544) รายงานว่าปลายยอดขมิ้นชันที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 2,500 มก/ล เป็นเวลา

4 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP 3 มก/ล เป็นเวลา 1 เดือน มีชิ้นส่วนรอดชีวิตเพียงร้อยละ 3 ในขณะที่ชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับโคลชิซินรอดชีวิตทั้งหมด และปลายยอดขมิ้นอ้อยที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 2,500 มก/ล เป็นเวลา 4 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP 3 มก/ล เป็นเวลา 1 เดือน มีชิ้นส่วนรอดชีวิตเพียงร้อยละ 7 ในขณะที่ชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับโคลชิซินรอดชีวิตทั้งหมด และ Adaniya และ Shirai (2001) พบว่าปลายยอดขิงที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 2,000 มก/ล เป็นเวลา 4 วัน มีชิ้นส่วนรอดชีวิตลดลงคิดเป็นร้อยละ 93 ในขณะที่ชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับโคลชิซินรอดชีวิตร้อยละ 97

ระดับความเข้มข้นของโคลชิซินมีผลทำให้จำนวนยอดลดลง เนื่องจากหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซิน (800-1,200 มก/ล) บางส่วนมีกาบใบกลายเป็นสีน้ำตาลและตายในเวลาต่อมา ประกอบกับชิ้นส่วนที่รอดชีวิตมีอัตราการเกิดยอดน้อยมากจึงส่งผลให้จำนวนยอดเฉลี่ยลดลง คล้ายกับรายงานของ Rose และคณะ (2000a) ที่พบว่าตาที่ข้อของ lilac ลูกผสมที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 20-80 มก/ล มีจำนวนยอดใหม่ลดลงเนื่องจากชิ้นส่วนที่รอดชีวิตเกิดยอดได้น้อยมากและมีการเจริญของยอดช้า แม้จะย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดโคลชิซินเป็นเวลา 22 สัปดาห์แล้วก็ตาม เช่นเดียวกับการให้โคลชิซินแก่กลุ่มยอดอ่อนของ *Salvia miltiorrhiza* Bge. (Gao *et al.*, 1996) และ Inca lily ลูกผสม (Lu and Bridgen, 1997) ที่พบว่ากลุ่มยอดอ่อนจะมีการเจริญของยอดลดลง และการให้โคลชิซินแก่ปลายยอดของกล้วย (Van Duren *et al.*, 1996) ทำให้การเจริญของยอดใหม่ลดลงเช่นกัน

ระดับความเข้มข้นของโคลชิซินมีผลทำให้การรอดชีวิต และจำนวนยอดเฉลี่ยของปทุมมาลูกผสมลดลงเป็นการบอกให้ทราบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นภายในเซลล์ สมปอง (2539) รายงานว่าระดับความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ที่เลือกใช้ควรเป็นช่วงความเข้มข้นที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโต หรือทำให้เกิดความเสียหายกับเนื้อเยื่ออย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}: lethal dose 50) เนื่องจากความเสียหายดังกล่าวเป็นการแสดงให้ทราบว่ามีการเปลี่ยนเกิดขึ้นภายในไซโทพลาสซึมหรือเกิดในนิวเคลียส เซลล์ที่รอดชีวิตจึงกลายพันธุ์ไปในลักษณะต่างๆ แต่ระดับความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ที่สูงกว่านี้จะทำให้อัตราการตายของเซลล์สูง และมีการฟื้นตัวช้า ส่วนระดับความเข้มข้นที่ต่ำเกินไปไม่สามารถก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในนิวเคลียสได้หรือเกิดได้จำนวนน้อย เนื่องจากเซลล์ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจะฟื้นตัวได้เร็วกว่าเกิดการแข่งขันกันเจริญเติบโตจนทำให้เซลล์ที่กลายพันธุ์ถูกยับยั้งและตายไปในที่สุด ซึ่งในปทุมมาลูกผสมก็พบว่าระดับความเข้มข้นของโคลชิซินที่ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนลดลงเหลือร้อยละ 20-40 (800 และ 1,200 มก/ล) สามารถชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ได้

ผลของความเข้มข้นโคลชิซินต่อจำนวนชุดโครโมโซม และความยาวเซลล์คุม ปากใบ

ระดับความเข้มข้นของโคลชิซินมีผลต่อจำนวนโครโมโซม และความยาวเซลล์คุมปากใบของต้นปทุมมาลูกผสม โดยการให้โคลชิซินความเข้มข้น 800 และ 1,200 มก/ล แก่หน่ออ่อนเป็นเวลา 4 วัน สามารถชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ได้ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าความเข้มข้นโคลชิซินที่เหมาะสมในการชักนำพอลิพลอยด์ในพืชวงศ์ขิงอื่นๆ เช่น วัชรินทร์ (2543) รายงานว่าการเลี้ยงปลายยอดขมิ้นชันในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 2,500 มก/ล เป็นเวลา 1 วัน พบต้นเททระพลอยด์ร้อยละ 41.7 และการเลี้ยงปลายยอดขมิ้นอ้อยในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 2,500 มก/ล เป็นเวลา 2 วันพบต้นเททระพลอยด์ร้อยละ 25 และ Adaniya และ Shirai (2001) รายงานว่าการเลี้ยงปลายยอดขิงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซิน 2,000 มก/ล เป็นเวลา 8 วัน พบต้นเททระพลอยด์มากที่สุด (ร้อยละ 11.1) ส่วนในพืชอื่นๆ ก็พบว่าการให้โคลชิซินความเข้มข้นสูงในระยะเวลาสั้นสามารถชักนำให้เกิดต้นเททระพลอยด์ได้เช่นเดียวกัน เช่น การเลี้ยงกล้วยในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซินความเข้มข้น 2,000 มก/ล เป็นเวลา 2 วัน พบต้นเททระพลอยด์มากที่สุด (ร้อยละ 18) (Van Duren *et al.*, 1996), การเลี้ยงกลุ่มยอด Inca lily ลูกผสมในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซิน ความเข้มข้น 2,000-6,000 มก/ล เป็นเวลา 6-24 ชม สามารถชักนำต้นเททระพลอยด์ได้ดี (Lu and Bridgen, 1997) แสดงให้เห็นว่าพืชแต่ละชนิดจะมีระดับความเข้มข้นโคลชิซินที่เหมาะในการชักนำเททระพลอยด์แตกต่างกันออกไป

การที่ระดับความเข้มข้นของโคลชิซินมีผลต่อจำนวนโครโมโซมของต้นปทุมมาลูกผสมนั้น อธิบายได้ว่าระดับความเข้มข้นโคลชิซินที่ชิ้นส่วนหน่ออายุเยาว์ได้รับเป็นความเข้มข้นที่สูงเกินพอสำหรับการชักนำพอลิพลอยด์ หรือการยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล สังเกตได้จากอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงต่ำกว่าร้อยละ 50 ซึ่ง Roberts และคณะ (1990) รายงานว่าความเข้มข้นของโคลชิซินมีผลต่อการยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล โดยความเข้มข้นโคลชิซินที่เพียงพอในการยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิลสามารถชักนำให้เกิดเททระพลอยด์ได้โดยไม่ทำให้เซลล์ตาย ส่วนโคลชิซินความเข้มข้นสูงเกินพอสำหรับการยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิลนั้น สามารถชักนำให้เกิดเททระพลอยด์ได้เช่นกันแต่จะมีผลในทางลบกับพืชด้วย การที่โคลชิซินระดับความเข้มข้นสูงมีแนวโน้มจะให้เปอร์เซ็นต์ต้นเททระพลอยด์น้อยกว่าความเข้มข้นระดับต่ำจึงอาจจะเกิดจากโคลชิซินที่ระดับ 1,000 และ 1,200 มก/ล ทำให้เกิดความเป็นพิษแก่ชิ้นส่วนมากกว่าที่ 800 มก/ล ซึ่งสังเกตได้จากแม้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนจะใกล้เคียงกัน แต่ระดับความเข้มข้นของโคลชิซินที่สูงขึ้นส่งผลให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนลดลงจึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้พบต้นเททระพลอยด์ได้น้อยลงด้วย

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับพลอยดีกับขนาดเซลล์ผิว (epidermis cell) ของ *Arabidopsis thaliana* โดย Melaragno และคณะ (1993) พบว่าเซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นตามระดับพลอยดีที่เพิ่มขึ้น โดยเซลล์ดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์ จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางเซลล์ 96, 199 และ 372 ตามลำดับ และ Tambong และคณะ (1998) รายงานว่าระดับพลอยดีและความยาวเซลล์คุมปากใบของต้น cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าการจำแนกระดับพลอยดีของพืชสามารถใช้ความยาวเซลล์คุมปากใบเป็นดรรชนีเบื้องต้นในการชี้วัดได้ ซึ่งพบว่าพืชหลายชนิดสามารถใช้ความยาวเซลล์คุมปากใบเป็นดัชนีเบื้องต้นในการคัดเลือกต้นเททระพลอยด์ได้ เช่น ขิง (Smith *et al.*, 2004) ขมิ้นชัน และขมิ้นอ้อย (วัชรินทร์, 2544) calla lily (Cohen and Yao, 1996) Inca lily (Lu and Bridgen, 1997) กล้วย (Van Duren *et al.*, 1996) และกล้วยไข่ (Saradhuldhat and Silayoi, 2001) เป็นต้น การวัดความยาวเซลล์คุมมีข้อดีคือสามารถทำได้ง่ายและไม่ต้องทำลายต้นพืช ในการคัดเลือกต้นเททระพลอยด์ผู้วิจัยจึงมักใช้วิธีการนี้ในการคัดเลือกเบื้องต้นก่อนทำใช้วิธีตรวจนับจำนวนโครโมโซม ทำให้ช่วยร่นระยะเวลาและลดค่าใช้จ่ายลงไปได้มาก (นิตย์ศรี และอำไพ, 2541; Cohen and Yao, 1996; Gu *et al.*, 2005; Lu and Bridgen, 1997; Smith *et al.*, 2004; Van Duren *et al.*, 1996)

การทดลองนี้ตรวจพบต้นปทุมมาลูกผสมบางต้นที่เจริญจากชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซินมีจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากเป็นดิพลอยด์ (2n=2x=28) แต่มีความยาวเซลล์คุมปากใบเป็นเททระพลอยด์ (50 ไมครอน) คล้ายกับงานของ Lu และ Bridgen (1997) ที่รายงานว่า Inca lily ลูกผสมที่เจริญจากกลุ่มยอดอ่อนที่ได้รับโคลชิซินมีจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากเป็นเททระพลอยด์ (2n=4x=32) แต่มีความยาวเซลล์คุมปากใบเท่ากับต้นดิพลอยด์เช่นเดียวกับ Cohen และ Yao (1996) ที่รายงานว่าในกลุ่มต้น calla lily ลูกผสมที่เจริญจากชิ้นส่วนที่ได้รับโคลชิซินนั้น พบต้นที่มีความยาวเซลล์คุมปากใบมากกว่าต้นปกติร้อยละ 19.5 แต่จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากทำให้ทราบว่าต้น calla lily ลูกผสมดังกล่าวไม่เช่นต้นเททระพลอยด์ทั้งหมด คือเป็นต้นเททระพลอยด์ร้อยละ 86.4 ต้นดิพลอยด์ร้อยละ 9.1 และต้นมิกโซพลอยด์ร้อยละ 4.5 แสดงให้เห็นว่ารากและเนื้อเยื่อผิว (epidermis) ของ Inca lily ลูกผสม และ calla lily ลูกผสมพัฒนามาจากชั้นเนื้อเยื่อที่มีระดับพลอยดีแตกต่างกันจึงมีความเป็นไปได้ว่าปทุมมาลูกผสมอาจมีลักษณะเช่นเดียวกัน

5.2.2 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์

ระดับพลอยดีมีอิทธิพลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชโดยการเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดโครโมโซมมีผลต่อขนาดของนิวเคลียส การแสดงออกของยีนและการผลิตเอนไซม์ และการผลิตสารทุติยภูมิอื่นๆ (Lavania, 1986) ส่งผลให้พืชโพลีพลอยด์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป เช่น ดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น (สาริณี, 2538; Escandón *et al.*, 2005; Takamura and Miyajima, 1996) ผลและเมล็ดมีขนาดใหญ่ขึ้น (Ali *et al.*, 1992; Kuspira and Bhambhani, 1985) เหง้าและรากพืชสมุนไพรมีขนาดใหญ่ขึ้น (Gao *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2002; Lavani, 1988; Smith *et al.*, 2004) การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์ของปทุมมาลูกผสมโดยใช้ต้นที่เจริญอยู่ในหลอดแก้วมีอายุ 2 เดือน และมีใบ 3-4 ใบ ในด้านความสูงของต้น วัดความหนาของใบ นับจำนวนปากใบต่อพื้นที่ และวัดความยาวเซลล์คุมปากใบ

ความสูงของต้น

ต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์มีความสูงลดลงตามระดับพลอยดีที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของวัชรินทร์ (2544) รายงานว่าขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยต้นโพลีพลอยด์มีความสูงของต้นน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ de Oliveira และคณะ (2004) ที่พบว่าต้น *Stevia rebaudiana* Bertoni. เททระพลอยด์มีความสูงเฉลี่ยน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ Rose และคณะ (2000a) รายงานว่าต้น lilac ลูกผสม (*Syringa vulgaris* x *S. pinnatifolia*) เททระพลอยด์มีข้อสั้นและต้นเตี้ยกว่าดิพลอยด์ Rose และคณะ (2000b) รายงานว่าต้น *Buddle globosa* เททระพลอยด์มีข้อสั้นและต้นเตี้ยกว่าดิพลอยด์เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ดี Gao และคณะ (2002) รายงานว่าต้น *Scutellaria baicalensis* เททระพลอยด์มีความสูงต้นเฉลี่ยไม่แตกต่างกับต้นดิพลอยด์

ความหนาของใบ

ต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์มีความหนาใบเพิ่มขึ้นตามระดับพลอยดีที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของวัชรินทร์ (2544) รายงานว่าขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยต้นโพลีพลอยด์มีความหนาใบมากกว่าต้นดิพลอยด์ Saradhuldhat และ Silayoi (2001) รายงานว่าในกล้วยไข่ (*Musa acuminata*) เททระพลอยด์ในหลอดแก้ว และหลังจากย้ายปลูกในโรงเรือนมีความหนามากกว่าต้นดิพลอยด์ นิตย์ศรี และอำไพ (2541) ที่ระบุว่าต้นหม่อน (*Morus* sp.) เททระพลอยด์ในหลอดแก้วจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ น้อย คุณไพ และใหญ่บุรีรัมย์ มีความหนาของใบมากกว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญ โดยต้นเททระพลอยด์มีความหนาใบมากกว่าต้นดิพลอยด์ 46-51% Gao และคณะ (2002) รายงานว่าต้น *Scutellaria baicalensis* เททระพลอยด์ที่ปลูกในแปลงมี

ใบหนากว่าต้นดิพลอยด์ และ Gao และคณะ (1996) รายงานว่าต้น *Salvia miltiorrhiza* Bge. เททระพลอยด์ที่ปลูกในแปลงมีใบหนากว่าต้นดิพลอยด์

จำนวนปากใบต่อพื้นที่

ต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์ มีจำนวนปากใบต่อพื้นที่ลดลงตามระดับพลอยดีที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของวัชรินทร์ (2544) รายงานว่า ขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยต้นพอลิพลอยด์มีจำนวนปากใบต่อพื้นที่น้อยกว่าต้นดิพลอยด์ Saradhuldhat และ Silayoi (2001) รายงานว่าต้นกล้วยไข่ (*Musa acuminata*) เททระพลอยด์ในหลอดแก้ว และหลังจากย้ายปลูกในโรงเรือนมีจำนวนปากใบต่อพื้นที่น้อยกว่าต้นดิพลอยด์ Lu และ Bridgen (1997) ที่พบว่าต้น Inca lily ลูกผสม (*Alstroemeria aurea* x *A. caryophyllaea*) เททระพลอยด์มีจำนวนปากใบต่อพื้นที่เฉลี่ยน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ และ Gao และคณะ (2002) รายงานว่าต้น *Scutellaria baicalensis* เททระพลอยด์มีจำนวนปากใบต่อพื้นที่เฉลี่ยน้อยกว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนโครโมโซมกับลักษณะทางสัณฐานของต้นดิพลอยด์ และต้นพอลิพลอยด์ของ *Stevia rebaudiana* Bertoni. พบว่าเมื่อระดับพลอยดีสูงขึ้นจะทำให้จำนวนปากใบต่อพื้นที่ลดลง (de Oliverira *et al.*, 2004)

ความยาวเซลล์คุมปากใบ

ต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เททระพลอยด์ และออกทะพลอยด์ มีความยาวเซลล์คุมปากใบเพิ่มขึ้นตามระดับพลอยดีที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของวัชรินทร์ (2544) รายงานว่า ขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยต้นพอลิพลอยด์มีความยาวเซลล์คุมปากใบมากกว่าต้นดิพลอยด์ Cohen และ Yao (1996) ที่พบว่าต้น calla lily (*Zantedeschia* sp.) เททระพลอยด์จำนวน 9 สายพันธุ์ ที่ย้ายปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีความยาวเซลล์คุมปากใบเฉลี่ยมากกว่าต้นดิพลอยด์ เช่น พันธุ์ Black Magic, Rose Queen และ Golden Sun ต้นดิพลอยด์มีความยาวเซลล์คุมปากใบเฉลี่ย 46, 45 และ 42 ไมครอน ต้นเททระพลอยด์มีความยาวเซลล์คุมปากใบเฉลี่ย 79, 69 และ 70 ไมครอน ตามลำดับ Van Duren และคณะ (1996) รายงานว่าต้นกล้วย (*Musa acuminata*) เททระพลอยด์ย้ายปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 3-4 เดือน มีขนาดเซลล์คุมปากใบใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ Saradhuldhat และ Silayoi (2001) ระบุว่าต้นกล้วยไข่ (*Musa acuminata*) เททระพลอยด์ในหลอดแก้วและหลังจากย้ายปลูกในโรงเรือนมีขนาดเซลล์คุมปากใบใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ Lu และ Bridgen (1997) รายงานว่าต้น Inca lily ลูกผสม (*Alstroemeria aurea* x *A. caryophyllaea*) เททระพลอยด์ (87 ไมครอน) มีความยาวเซลล์คุมปากใบเฉลี่ยมากกว่าต้นดิพลอยด์ (61ไมครอน) นิตย์ศรี และอำไพ (2541) ที่รายงานว่าต้นหม่อน (*Morus* sp.) เททระพลอยด์ในหลอดแก้วจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ น้อย คุณไพ และใหญ่บุรีรัมย์ มีขนาดเซลล์คุมปากใบมากกว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญ และ Gao และคณะ

(2002) รายงานว่าต้น *Scutellaria baicalensis* เททระพลอยด์มีความยาวเซลล์คุมปากใบเฉลี่ยมากกว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 6
สรุป

6.1 การเพิ่มจำนวนยอดอย่างรวดเร็วในปทุมมาลูกผสม

วิธีเพิ่มจำนวนยอดอย่างรวดเร็วในปทุมมาลูกผสมทำได้โดยการเลี้ยงชิ้นส่วนหน่ออ่อนหรือชิ้นส่วนโคนต้นผ่าครึ่งในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 3 วัน แล้วย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปลอดสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 6 สัปดาห์ จึงตัดแบ่งกลุ่มยอดไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมอีก 4 สัปดาห์ ทำให้ได้จำนวนยอดเฉลี่ย 17-19 ยอดต่อชิ้นส่วน ดังนั้นชิ้นส่วนโคนต้นผ่าครึ่งจะให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อต้นอ่อน 1 ต้น เป็นสองเท่าของชิ้นส่วนโคนต้นที่ไม่ผ่าคือ 34-38 ยอด

6.2 การเพิ่มชุดโครโมโซมโดยโคลชิซินในปทุมมาลูกผสม

6.1.2.1 การเลี้ยงชิ้นส่วนหน่ออ่อนในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 3 วัน แล้วย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซินความเข้มข้น 800 มก/ล เป็นเวลา 4 วัน ทำให้ได้จำนวนต้นเททระพลอยด์มากที่สุด (26%)

6.1.2.2 ต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ และต้นออกทะพลอยด์ มีความหนาของใบและความยาวของเซลล์คุมปากใบมากกว่าต้นดิพลอยด์ แต่มีความสูงของต้นและจำนวนปากใบต่อพื้นที่น้อยกว่าต้นดิพลอยด์

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2545. "การผลิตปทุมมา," ใน เทคโนโลยีพืชสวนและงานแสดงพืชสวนโลก ครั้งที่ 5. น.15-21. กรมส่งเสริมการเกษตร : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมวิชาการเกษตร. 2544. "ปทุมมาและกระเจียว," ใน ผลงานวิชาการประจำปี 2544 (เล่ม 2). กรมวิชาการเกษตร : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

จามจุรี โสตถิกุล และพิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์. 2533. "ผลของขนาดและอายุของชิ้นส่วนพืชที่มีต่อการขยายพันธุ์กระเจียวแดง (*Curcuma roscoeana* Wall.) ในสภาพหลอดแก้ว," ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 16. น.532-533.

ดิเรก ตนพยอม และคณะ. 2538. "ผลของจำนวนโครโมโซมต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเยอบีร่า," ใน รายงานการประชุมวิชาการไม้ดอกไม้ประดับแห่งชาติ ครั้งที่ 1. น.96-107.

ทิพย์สุดา อนันกุล. 2540. การขยายพันธุ์กระเจียวพลอยทักษิณ เบอร์ A033 ในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ธิดา ชยุติมันต์กุล. 2544. การเกิดยอดและแคลลัสของหงส์เหินดอกขาวในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นพมณี โทปุญญานนท์ และคณะ. 2543. "การผันกลับของช่อดอกปทุมมาในสภาพหลอดแก้ว," ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 26. น.379. สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และคณะ. 2546. "การวิจัยและพัฒนาขมิ้นชันเพื่อใช้เป็นยารักษาโรค," ใน การสัมมนา เรื่องการเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านการพัฒนาสมุนไพร. น.101-111. กลุ่มงานเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร กองโครงการและประสานงานวิจัย : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

นิตย์ศรี แสงเดือน และอำไพ สินพัฒนานนท์. 2541. "การชักนำให้เกิดหน่อนเททราพลอยด์โดยใช้โคลชิซินร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ," วิทยาสารเกษตรศาสตร์. 32(4): 424-430.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2543. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1 . กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

ปาริชาติ ไผผักแว่น และคณะ. 2546. "การใช้สารโคลชิซินเพื่อแก้ไขปัญหาการผสมไม่ติดของลูกผสมข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวพันธุ์ปลูกกับถั่วป่า," ใน การสัมมนาวิชาการเกษตรประจำปี 2546. น.343-357. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พนิต รพิพันธุ์. 2544. ผลของความเข้มข้น และระยะเวลาการให้สารโคลชิซินต่อการงอก การเจริญและจำนวนโครโมโซมของพืชที่มีศักยภาพด้านไม้ประดับบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พรพิมล สุริยจันทราทอง และอรัญญา พิมพ์มงคล. 2548. การเพิ่มชุดโครโมโซมลูกผสมระหว่างปทุมมากับบัวโกเมนโดยใช้โคลชิซินในสภาพหลอดแก้ว. อุบลราชธานี : คณะเกษตรศาสตร์ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลับอุบลราชธานี.

พรพิมล สุริยภัทร. 2547. การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช. อุบลราชธานี : ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

พรพิมล สุริยภัทร และดวงจันทร์ เกษบุตร. 2547. "อิทธิพลของ TDZ และชนิดของชิ้นส่วนพืชต่อการเพิ่มจำนวยอดในหลอดแก้วของลูกผสมปทุมมา," วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 35(5-6 พิเศษ): 11-14; สิงหาคม-ธันวาคม.

พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์ และคณะ. 2539. "การศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชกลุ่มกระเจียวไทย 17 ชนิด," ใน รายงานการประชุมวิชาการไม้ดอกไม้ประดับแห่งชาติ ครั้งที่ 2. น.86-99. คณะอนุกรรมการประสานงานวิจัยและพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้ และสมาคมวิทยาศาสตร์การเกษตรแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์.

วัชรินทร์ รัตนพันธ์. 2544. การเพิ่มจำนวนโครโมโซมของขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยด้วยโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัชรินทร์ รัตนพันธ์ และอรดี สหวัชรินทร์. 2543. "การขยายพันธุ์ขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยและการชักนำให้เพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้โคลชิซิน," ใน เอกสารสัมมนา เรื่องแนวทางการพัฒนาสมุนไพรของประเทศไทย. น.19-20.

สมปอง เตชะโต. 2539. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

สมปอง เตชะโต และราตรี สุจารีย์. 2543. "ผลของโคลชิซินที่ให้กับแคลลัสมังคุดต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานของต้นกล้าที่พัฒนา," วารสารสงขลานครินทร์. 22: 279-286.

สาริณี ไชยเจริญ. 2538. "การศึกษาจำนวนโครโมโซม ลักษณะดอก และความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้ *Dendrabium superbiens* ดิพลอยด์ และออลโลเตตราพลอยด์," วิทยาสารเกษตรศาสตร์. 29: 150-157.

สุพรรณญิกา เนตรทัศน์. 2539. การปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข7 ให้ต้านทานต่อแมลงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยการเพาะเลี้ยงคัพพะอ่อนร่วมกับการชักนำด้วยโคลชิซิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมนา นีระ และคณะ. 2542. "ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดที่มีต่อการเจริญพัฒนาของเนื้อเยื่อขมิ้นชัน," แก่นเกษตร. 27(1): 25-29.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2535. รายงานผลการวิจัยเรื่องการรวบรวมเชื้อพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกสกุล *Curcuma* เพื่อการส่งออก. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____. วรรณไกรโรจน์. 2539. ปทุมมาและกระเจียว. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์อัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน).

อมรรัตน์ สระเพ็ชร และอรดี สหวัชรินทร์. 2543. "การศึกษาอัตราการขยายพันธุ์เปราะหอมและชักนำให้เพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้สารโคลชิซิน," ใน เอกสารสัมนา เรื่องแนวทางการพัฒนาสมุนไพรของประเทศไทย. น.7.

อริยา สาตรพันธุ์. 2543. "การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในมะนาว (*Citrus aurantifolia* Swingle)," ใน รางวัลสภาวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2543. น.271-278. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ : กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม.

Adaniya, S. and D. Shirai. 2001. "*In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zinigiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability," Scientia Horticulturae. 88: 277-287.

Ali, M., H. okubo and K. Fujieda. 1992. "Production and characterization of *Solanum* amphidiploids and their resistance to bacterial wilt," Scientia Horticuturae. 49: 181-196.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Balachandran, S.M., S.R. Bhat and K.P.S. Chandel. 1990. "*In vitro* clonal multiplication of Turmeric (*Curcuma* spp.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.)," Plant Cell Reports. 8(9): 521-524; January.

Banerjee, S. and et al. 2004. "Thidiazuron-induced high-frequency shoot proliferation in *Cineraria maritime* Linn.," Current Science. 87(9): 1287-1290; November.

Bhagwat, B., L.G.E. Vieira and L.R. Erickson. 1996. "Stimulation of *in vitro* shoot proliferation from nodal explants of cassava by thidiazuron, benzyladenine and gibberellic acid," Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 46: 1-7.

Bhagyalakshmi, N. and N.S. Singh. 1988. "Meristem culture and micropropagation of a variety of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) with a high yield of Oleoresin," Journal of Horticultural Science. 63: 321-327.

Cao, X., F.A. Hammerschlag and L. Douglas. 2002. "A two-step pretreatment significantly enhance shoot organogenesis from left explants of highbush blueberry cv. Bluecrop," HortScience. 37(5): 819-821.

Capelle, S.C. and et al. 1983. "Effect of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N^6-(Δ^2-isopentenyl)[8-^{14}C]adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L," Plant Physiology. 73: 796-802.

Caramori, L.P., S. Fávaro and L.G.E. Vieira. 2001. "Thidiazuron as a promoter of multiple shoots in cotton explants (*Gossypium hirsutum* L.)," Acta Scientiarum. 23(5): 1195-1197.

Chen, C.H. and Y.C. Goeden-Kallemeyn. 1979. "*In vitro* induction of tetraploid plants from colchicine-treated diploid daylily callus," Euphytica. 28(3): 705-709; November

Chirangini, P. and G.J. Sharma. 2005. "*In vitro* propagation and microrhizome induction in *Zingiber cassumunar* (Roxb.)-an antioxidant-rich medicinal plant," Journal of Food, Agriculture and Environment. 3(1): 139-142; January.

Chirangini, P., S.K. Sinha and G.J. Sharma. 2005. "*In vitro* propagation and microrhizome induction in *Kaempferia galangal* Linn. And *K. rotunda* Linn.," Indian Journal of Biotechnology. 4: 404-408; July.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

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

De Oliveira V.M. and et al. 2004. "Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploidy cytotypes of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae)," Genetics and Molecular Biology. 27(2): 215-222.

Escandón, A.S. and et al. 2005. "*In vitro* colchicine treatment to obtain a new cultivar of *Scoparia montevidiensis*," Journal of Biotechnology. 8(2): 204-211.

Fellman, C.D., P.E. Read and M.A. Hosier. 1987. "Effect of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation," HortScience. 22(6): 1197-1200 ; December.

Gao, S.L., B.J. Chen and D.N. Zhu. 2002. "*In vitro* production and identification of autotetraploid of *Scutellaria baicalensis*," Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 70: 289-293.

Gao, S.L. and et al. 1996. "Autotetraploid plants from colchicines-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza Bge*," Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 47: 73-77.

Genkov, T. and I. Ivanova. 1995. "Effect of cytokinin-active phenylurea derivatives on shoot multiplication, peroxidase and superoxide dismutase activities of *in vitro* cultured carnation," Bulgarian Journal of Plant Physiology. 21(1): 73-83.

George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture, Part 1 The technology. 2 nd ed. England : Exegetics Ltd.

Geoffriau, E. and et al. 1997. "Ploidy stability and *in vitro* chromosome doubling in gynogenic clones of onion (*Allium cepa* L.)," Plant Science. 122: 201-208.

Goldfarb, B. and et al. 1991. "A liquid cytokinin pulse induces adventitious shoot formation from Douglas-fir cotyledons," Plant Cell Reports. 10(3): 156-160 ; June.

Griesbach, R.J. and R.N. Bhat. 1990. "Colchicine-induced polyploidy in *Eustoma grandiflorum*," HortScience. 25(10): 1284-1286 ; October.

Gu, X.F. and et al. 2005. "*In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujube* Mill. Cv. Zhanhua," Plant Cell Reports. 24: 671-676.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Islam, M.A., K. Kloppstech and H. Jacobsen. 2004. "Efficient procedure for *in vitro* microrhizome induction in *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae)-a medicinal plant of Tropical Asia," Plant Tissue Culture. 14(2): 123-134; December.

Kadota, M. And Y. Niimi. 2002. "*In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese Pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. Cv. Hosui)," Plant Cell Reports. 21(3): 282-286.

Kellogg E.A. 2003. "What happens to genes in duplicated genomes," Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 100(8): 4369-4371.

Kieber, J.J. 2002. "Cytokinins," In The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists.

Khatun, A., S. Nasrin and M.T. Hossain. 2003. "Large scale multiplication of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) from shoot-tip culture," Journal of Biologycal Sciences. 3(1): 59-64.

Kuspira, J. and et al. 1986. "Genetic and cytogenetic analysis of the A genome of *Triticum monococcum* II. The mode of inheritance of spring versus winter growth habit," Canadian Journal of Genetics and Cytology. 28: 88-95.

Lavania, U.C. 1988. "Enhanced productivity of the essential oil in the artificial autopolyploid of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash)," Euphytica. 38: 271-276.

Lavania, U.C. and S. Srivastava. 1991. "Enhanced productivity of tropane alkaloids and fertility in artificial autotetraploids of *Hyoscyamus niger* L.," Euphytica. 52: 73-77.

Lu, C.Y. 1993. "The use of thidiazuron in tissue culture," In vitro Cellular Development Biology-Plant. 29: 92-96.

Lu, C. and M.P. Bridgen. 1997. "Chromosome doubling and fertility study of *Alstroemeria aurea* x A. *caryophyllaea*," Euphytica. 94: 75-81.

Loc, N.H. and et al. 2005. "Micropropagation of zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe) a valuable medicinal plant," Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 81(1): 119-122 ; April.

Ma, Y., D.H. Byrne and J. Chen. 1997. "Amphidiploid induction from diploid Rose interspecific hybrids," HortScience. 32(2): 292-295.

McCuistion, F. and T.C. Wehner. "Seedless watermelon breeding," Cucurbit breeding horticultural science. http://cuke.hort.ncsu.edu/cucurbit/wmelon/seedless.html October 5, 2005.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Mehetre, S.S. and et al. 2003. "Induced polyploidy in *Gossypium*: A tool to overcome interspecific incompatibility of cultivated tetraploid and diploid cottons," Current Science. 84(12): 1510-1512 ; June.

Melaragno, J.E., B. Mehrotra and A.W. Coleman. 1993. "Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*," The Plant Cell. 5: 1661-1668 ; November.

Mello, M.O., A.F.C. Amaral and M. Melo. 2000. "Quantifying the micropropagation of *Curcuma zedoaria* Roscoe.," Scientia Agricola. 57(4): 703-707.

Miachir, J.I. and et al. 2004. "Micropropagation and callogenesis of *Curcuma zedoaria* Roscoe," Scientia Agricola. 61(4): 427-432 ; July-August.

Mok, M.C. and D.W.S. Mok. 1985. "The metabolism of [^{14}C] thidiazuron in callus tissues of *Phaseolus lunatus*. Physiol. Plant. 65: 427-432.

Mukhri, Z. and H. Yamaguchi. 1986. "*In vitro* plant multiplication from rhizomes of turmeric (*Curcuma domestica* Val.) and Temoe Lawak (*C. xanthoriza* Roxb.)," Plant Tissue Culture Letters. 3(1): 28-30.

Mundhara, R. and A. Rashid. 2006. "TDZ-induced triple-response and shoot formation on intact seedlings of *Linum*, putative role of ethylene in regeneration," Plant Science. 170: 185-190.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture," Physiol. Plant. 15: 473-497.

Murthy, B.N.S., S.J. Murch and P.K. Saxena. 1998. "Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis," In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 34(4): 267-275 ; October-December.

Muzaffar, A. and A. Brossi. 1991. "Chemistry of colchicine," Pharmacology and therapeutics. 49(1-2): 105-109.

Nalawade, S.M. and et al. 2003. "Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization," Botanical Bulletin of Academia Sinica. 44: 79-98.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Nassar, N.M.A. "Fertility and chimera induction in cassava, *Manihot esculenta* Crantz interspecific hybrids," http://www/geneconserve.pro.br/artigo 16.htm. June 12, 2004.

Nayak, S. 2000. "*In vitro* multiplication and microrhizome induction in *Curcuma aromatica* Salisb," Plant Growth Regulation. 1(32): 41-47.

Onamu, R. and et al. 2003. "Efficacy of thidiazuron in *in vitro* propagation of carnation shoot tip: Influence of dose and duration of exposure," African Crop Science Journal. 11(2): 125-132.

Pandey, Y.R. and et al. 1997. "*In vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe.)," Kasetsart Journal (Natural Science). 31: 81-86.

Pelletier, J., F.C.B.C. Tran and S. Lalibert. "Effects of thidiazuron and hormone starvation on Jack Pine meristematic nodules," In Wood, Breeding, Biotechnology and Industrial Eepectations. p.148. http://www.pierroton.inra.fr/WBB/WBB_proceeding.pdf. December 1, 2004.

Petersen, K.K., P. Hagberg and K. Kristiansen. 2003. "Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*," Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 73(2): 137-146.

Platform. "Colchicine," Platform: connecting scientists to original sources. http://www.axxora.com. Sep 29, 2005.

Poonsapaya, P. and K. Kraisintu. 1993. "Micropropagation of *Zingiber cassumunar* Roxb.," In International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. Palevitch, D. and E. Putievski, eds. pp. 557-564. International Society for Horticultural Science : Acta Horticalturae 344.

Prathanturarug, S. and et al. 2003. "High-frequency shoot multiplication in *Curcuma Longa* L. using thidiazuron," Plant Cell Reports. 21: 1054-1059.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

_____. 2004. "*In vitro* propagation of *Zingiber petiolatum* (Holttum) I. Theilade, a rare Zingiberaceous plant from Thailand," In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 40(3): 317-320; May-June.

_____. 2005. "Rapid micropropagation of *Curcuma longa* L. using bud explants pre-cultured in thidiazuron-supplemented liquid medium," Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 80(3): 347-351.

Preece, J.E. and et al. 1991. "Micro and cutting propagation of silver maple. I. Results with adult and juvenile propagules," Journal American Society of Horticultural Sciences. 116: 142-148.

Rahman M.M. and et al. 2004. "*In vitro* regeneration of plantlets of *Curcuma longa* Linn. a valuable spice plant in Bangladesh," Asian Journal of Plant Sciences. 3(3) : 306-309.

Ranney T.G. "Polyploid: From evolution to landscape plant improvement," North Carolina Cooperative Extension. http://www.ces.ncsu.edu/fletcher/programs/nursery/metria/metria11/ranney/polyploidy.htm. Dec 13, 2004.

Rhee H.K. and et al. 2005. "Comparison of pollen morphology in interspecific hybrid lilies after *in viro* chromosome doubling," In Proceedings of the Ninth International Symposium on Flower Bulbs. Okubo, H., W.B. Miller and G.A. Chastagner, eds. pp. 639-643. International Society for Horticultural Science : Acta Horticulturae 673.

Roberts, A.V., D. Lloyd and K.C. Short. 1990. " *In vitro* procedures for the induction of tetraploidy in a diploid rose," Euphytica. 49: 33-38.

Rose, J.B., J. Kubba and K.R.Tobutt. 2000(a). "Chromosome doubling in sterile *Syringa vulgaris* x *S. pinnatifolia* hybrids by *in vitro* culture of nodal explants," Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 63: 127-132.

_____. 2000(b). "Induction of tetraploidy in *Buddleia globosa*," Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 63(2): 121-125.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Salvi, N.D., L. George and S. Eapen. 2002. "Micropropagation and field evolution of micropropagated plants of turmeric," Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 68: 143-151.

Saradhuldhat, P. and B. Silayoi. 2001. "Some chemical treatment on Kluai Khai Through tissue culture for mutation breeding," Kasetsart Journal (Natural Science). 35: 231-241.

Satrabhandhu, A. 1990. *In vitro* induction of polyploidy in White Mulberry (*Morus alba*var.S54) by colchicine treatment. Master. Science (Environmental Biology) Bangkok : Mahidol University.

Seelye, J.F. and et al. 1994. "Shoot regeneration from leaf dics of *Limonium perigrinum* using thidiazuron," New Zealand Journal of Croup and Horticultural Science. 22 : 23-29.

Sharma, T.R. and B.M. Singh. 1997. "High-frequency *in vitro* multiplication of disease-free *Zingiber officinale* Rosc.," Plant Cell Reports. 17: 68-72.

Sijun, Z. 1992. "Chromosome variation in callus culture of *Gossypium hirsutum* L.," In Conservation of plant genes: DNA banking and *in vitro* biotechnology. R.P. Adams and J.E. Adams, eds. pp. 211-22. San Diego, California : Academic Press, Inc.

Singh, S.K. and M.M. Syamal. 2001. "A short pre-culture soak in thidiazuron or forchlorfenuron Improves axillary shoot proliferation in rose micropropagation," Scientia Horticulturae. 91: 169-177.

Skoog, F. and C.O. Miller. 1957. "Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* (Biological Action of Growth Substance)," Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-131.

Smith M.K. and et al. 2004. "Ginger (*Zingiber officinale*) autotetraploids with improved processing quality produced by an in vitro colchicines treatment," Australian jounal of Experiment Agricultire. 44(10): 1065-1072.

Song, P., W. Kang and E.B. Peffley. 1997. "Chromosome doubling of *Allium fistulosum* x *A. cepa* interspecific F_1 hybrids through colchicine treatment of regenerating callus," Euphytica. 93: 257-262.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Sotthikul, C. and P. Apavatjrut. 1996. "Effect of explant size and age on *in vitro* propagation of *Curcuma roscoeana* Wall.," HortScience. 31(4): 629; August.

_____. 1997. "Effect of different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Curcuma roscoeana* Wall.," HortScience. 32(3): 460; June.

Srivatanakul, M. and et al. 2000. "Multiple shoot regeneration of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) from a shoot apex culture system," Plant Cell Reports. 19: 1165-1170.

Suttle, J.C. 1985. "Involvement of ethylene in the action of the cotton defoliant thidiazuron," Plant Physiology. 78: 272-276.

Suzuki, K. and et al. 2004. "Plant regeneration and chromosome doubling of wild *gladiolus* species," In Proceedings of the Ninth International Symposium on Flower Bulbs. Okubo, H., W.B. Miller and G.A. Chastagner, eds. pp. 175-181. International Society for Horticultural Science : Acta Horticulturae 673.

Swapna, T.S., M. Binitha and T.S. Manju . 2004. " *In vitro* multiplication in *Kaempferia galanga* linn." Applied Biochemistry and Biotechnology. 118(1-3): 233-41; July-Semtember.

Takamura, T. and I. Miyajima. 1996. "Colchicine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their characteristics," Scientia Horticulturae. 65(4): 305-312.

Tambong, J.T., V.T. Sapra and S. Garton. 1998. "*In vitro* induction of tetraploids in colchicine-treated cocoyam plantlets," Euphytica. 104: 191-197.

Tefera, W. and S. Wannakrairoj. 2004(a). "A Micropropagation Method for Korarima (*Aframomum corrorima* (Braun) Jansen)," ScienceAsia. 30: 1-7.

_____. 2004(b). "Micropropagation of Krawan (*Amomum krervanh* Pierre ex Gagnep)," ScienceAsia. 30: 9-15.

Thao, N.T.P. and et al. 2003. "Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments," Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 72: 19-25.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Topoonyanont, N. and et al. 2005. "Micropropagation scheme of *Curcuma alismatifolia* Gagnep," In Proceedings of the Ninth International Symposium on Flower Bulbs. Okubo, H., W.B. Miller and G.A. Chastagner, eds. pp. 705-712. International Society for Horticultural Science : Acta Horticulturae 673.

Udomdee, W. and et al. 2003. "*Curcuma*: Studies on tissue culture, pollen germination and viability, histology and flow cytometry," Propagation of Ornamental Plants. 3(1): 34-41.

Van Duren, M. and et al. 1996. "Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminate*) by *in vitro* techniques," Euphytica. 88: 25-34.

Van Nieuwkerk, J.P., R.H. Zimmerman and I. Fordham. 1986. "Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*," HortScience. 21(3): 516-518; June.

Van Staden, J. 1979. "The effect of adenine and mevalonic acid on the endogenous cytokinins of a cytokinin-dependent strain of soya bean callus," Annals of Botany. 44: 671-675.

West, T. and J.E. Preece. 2004. "Effects of thidiazuron and nutrient salt formulation on micropropagation of Hardy Hibiscus (*Hibiscus moscheutos* L.)," In Nursery Crops; Development, Evaluation, Production and Use : The Proceeding of XXVI International Horticultural Congress. Fernandez, T. and C.G. Davidson, eds. pp. 293-297. International Society for Horticultural Science : Acta Horticulturae 630.

Wongpiyasatid, A., P. Hormchan and N. Rattanadilok. 2003. "Preliminary test of polyploidy induction in cotton (*Gossypium arboretum*) using colchicine treatment. Kasetsart Journal (Natural Science). 37: 27-32.

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

Wuzhou International Co., Ltd. "Forchlorfenuron," http://www.wuzhouchem.com/cataloged/agro/PGR/forchlorfenuron.htm. July 16, 2006.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Yamada, H. and et al. 2001. "The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane," Plant Cell Physiology. 41: 1017-1023.

Yip, W. and S.F. Yang. 1986. "Effect of thidiazuron, a cytokinin-active urea derivative, in cytokinin-dependent ethylene production systems," Plant Physiology. 80: 515-519.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหาร สารเคมี และการคำนวณ

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหาร สารเคมี และการคำนวณ

1. วิธีการเตรียมอาหาร และสารเคมี

1.1 การเตรียมอาหารสูตร MS (1962)

1.1.1 การเตรียมสารละลายเข้มข้น (Stock solution)

1.1.1.1 เตรียมสารละลายเข้มข้นแยกเป็น 6 ขวด ตามตารางที่ ก.1

1.1.1.2 ชั่งสารเคมีแต่ละชนิดตามปริมาณสารต่อลิตรในตารางที่ ก.1 ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.1.1.3 ละลายสารด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงนำสารละลายแต่ละชนิดที่อยู่ในขวดเดียวกันมาเทรวมกัน และปรับปริมาณให้ครบ 1 ลิตร โดยสารละลายเข้มข้นขวดที่ 1-6 มีความเข้มข้นของสารดังนี้ ขวดที่ 1 มีความเข้มข้น 20 เท่า และขวดที่ 2-6 มีความเข้มข้น 100 เท่า

1.1.1.4 การเตรียม $CuSO_4.5H_2O$ ปริมาณ 1.25 มก ให้ใช้วิธีชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ 125 มก ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล แล้วใช้สารละลาย 1 มล ในการเตรียมสารละลายเข้มข้นขวดที่ 2

1.1.1.5 การเตรียม $CoCl_2.6H_2O$ ปริมาณ 1.25 มก ให้ใช้วิธีชั่ง $CoCl_2.6H_2O$ 125 มก ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล แล้วใช้สารละลาย 1 มล ในการเตรียมสารละลายเข้มข้นขวดที่ 3

1.1.1.6 การเตรียมสารละลายเข้มข้นขวดที่ 5 ให้ละลาย $FeSO_4.7H_2O$ ในน้ำกลั่น 400 มล และละลาย $Na_2EDTA.2H_2O$ ในน้ำกลั่น 400 มล นำสารทั้งสองมาผสมกันใน volumetric flask ขนาด 1,000 มล วางบนเตาไฟฟ้าและเครื่องกวนแบบแม่เหล็ก (hot plate stirrer) ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยให้สารละลายเย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องจึงปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร และเก็บสารไว้ในขวดสีชา

1.1.1.7 เก็บสารละลายเข้มข้นขวดที่ 1-5 ไว้ที่อุณหภูมิ 8-10°C (ในตู้เย็น) และเก็บสารละลายเข้มข้นขวดที่ 6 ไว้ที่อุณหภูมิ -5°C (ในช่องแช่แข็งของตู้เย็น)

1.1.2 การเตรียมอาหารสูตร MS

1.1.2.1 การเตรียมอาหารสูตร MS ปริมาตร 1 ลิตร เริ่มจากเติมน้ำกลั่นประมาณ 500 มลลงใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร

1.1.2.2 เติมน้ำตาลและเขย่าให้น้ำตาลละลาย, เติมสารละลายเข้มข้นขวดที่ 1-6 ตามปริมาตรที่ใช้เตรียมอาหาร 1 ลิตร ดังในตารางที่ ก.1 และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต กรณีที่ใช้ BAP และ NAA แล้วปรับปริมาตรอาหารให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.1.2.3 เทสารละลายจาก volumetric flask ลงในบิกเกอร์ขนาด 1 ลิตร และปรับ pH ของสารละลายด้วย HCl และ KOH ความเข้มข้น 0.1 N และ 1 N ให้อาหารมีค่า pH 5.8

1.1.2.4 กรณีการเตรียมอาหารวุ้นให้ละลายวุ้น 6.5 กรัม โดยค่อยๆโรยผงวุ้นลงในบิกเกอร์อาหารที่ตั้งไฟจนร้อนทีละน้อย และใช้แท่งแก้วคนอาหารเป็นระยะๆ จนกว่าวุ้นจะละลายทั้งหมด ซึ่งสังเกตจากอาหารจะใสเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทอาหารวุ้นลงในขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ ปริมาตร 50 มก/ขวด ปิดฝาขวดและนำขวดอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 1.15 กก/ซม^2 เป็นเวลา 15 นาที จึงนำขวดอาหารวุ้นมาวางพักไว้จนวุ้นแข็งตัวและเย็นที่อุณหภูมิห้องและนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

1.1.2.5 กรณีการเตรียมอาหารเหลวที่จะต้องเติมสารเคมีบางอย่างลงไปในอาหารภายหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เนื่องจากสารเหล่านั้นอาจเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเมื่อได้รับความร้อนสูง ต้องมีการปรับปริมาตรของอาหารเหลวเผื่อสำหรับปริมาตรสารที่จะเติมลงไปภายหลังด้วย เช่น การเตรียมอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 1 ลิตร ที่มี TDZ ในขั้นต้นจะปรับปริมาตรอาหารเป็น 500 มล ก่อน แล้วนำอาหารเหลวไปปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 5.8 จากนั้นเทอาหารลงในขวดแก้วขนาด 1 ลิตร ปิดฝาขวดและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 1.15 กก/ซม^2 เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนำอาหารเหลวมาพักไว้ที่อุณหภูมิห้องจนมีอุณหภูมิประมาณ 50°C จึงนำ TDZ ที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองมาเติมในอาหารเหลวและปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ครบ 1 ลิตร และนำอาหารเหลวที่ได้มาแบ่งใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล ปริมาตร 5-10 มล/ขวด เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

1.2.1 การเตรียม BAP

1.2.1.1 การเตรียม BAP เข้มข้น 1,000 มก/ล เริ่มจากการชั่ง BAP 100 มก ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.2.1.2 เท BAP จากกระดาษชั่งสารลงใน volumetric flask ขนาด 100 มล ละลาย BAP ด้วย 1 N KOH ประมาณ 5 มล

1.2.1.3 เติมน้ำกลั่นทีละน้อยและเขย่าสารเบาๆ จนมีปริมาตรครบ 100 มล

1.2.1.4 เก็บ BAP ความเข้มข้น 1,000 มก/ล ไว้ในขวดแก้วที่อุณหภูมิ 8-10°C

ตารางที่ ก.1 สูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962)

Stock solution (ความเข้มข้น)	**ส่วนประกอบ**	**ปริมาณสารต่อลิตร**	**ปริมาณที่ใช้เพื่อเตรียมอาหาร 1 ลิตร**
ขวดที่ 1 Nitrate	NH_4NO_3	16.5 ก	50 มล
(20 เท่า)	KNO_3	19.0 ก	
ขวดที่ 2 Sulfate	$MgSO_4.7H_2O$	18.5 ก	10 มล
(100 เท่า)	$MnSO_4.4H_2O$	1.11 ก	
	$ZnSO_4.7H_2O$	0.43 ก	
	$CuSO_4.5H_2O$	1.25 มก	
ขวดที่ 3 Halide	$CaCl_2.2H_2O$	22.0 ก	10 มล
(100 เท่า)	KI	41.5 มก	
	$CoCl_2.6H_2O$	1.25 มก	
ขวดที่ 4 PBMo	KH_2PO_4	8.5 ก	10 มล
(100 เท่า)	H_3BO_3	310.0 มก	
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	12.5 มก	
ขวดที่ 5 NaFeEDTA	$FeSO_4.7H_2O$	1.39 ก	10 มล
(100 เท่า)	$Na_2EDTA.2H_2O$	1.87 ก	
ขวดที่ 6 Vitamins	Nicotinic acid	50.0 มก	10 มล
และ amino acids	Thiamin HCl	10.0 มก	
(100 เท่า)	Pyridoxine HCl	50.0 มก	
	Glycine	200.0 มก	
	Myo-inositol	10.0 มก	
น้ำตาล (sucrose)		30 ก/ล	
วุ้น (agar)		6.5 ก/ล	
pH		5.8	

1.2.2 การเตรียม NAA

1.2.2.1 การเตรียม NAA เข้มข้น 100 มก/ล เริ่มจากการชั่ง NAA 10 มก ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.2.2.2 เท NAA จากกระดาษชั่งสารลงใน volumetric flask ขนาด 100 มล ละลาย NAA ด้วย 1 N KOH ประมาณ 5 มล

1.2.2.3 เติมน้ำกลั่นทีละน้อยและเขย่าสารเบาๆ จนมีปริมาตรครบ 100 มล

1.2.2.4 เก็บ NAA ความเข้มข้น 100 มก/ล ไว้ในขวดแก้วที่อุณหภูมิ 8-10°C

1.2.3 การเตรียม TDZ

1.2.3.1 การเตรียม TDZ เข้มข้น 100 มก/ล เริ่มจากการชั่ง TDZ 10 มก ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.2.3.2 เท TDZ จากกระดาษชั่งสารลงใน volumetric flask ขนาด 100 มล ละลาย TDZ ด้วย DMSO ประมาณ 5 มล

1.2.3.3 เติมน้ำกลั่นทีละน้อยและเขย่าสารเบาๆ จนมีปริมาตรครบ 100 มล

1.2.3.4 กรอง TDZ ด้วยกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางรูขนาด 0.22 μm

1.2.3.5 เท TDZ ความเข้มข้น 100 มก/ล ลงในขวดแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วปิดฝา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่ไม่มีแสง และควรใช้ให้หมดในแต่ละครั้งที่เตรียม

1.3 การเตรียมสารละลายโคลชิซิน

1.3.1 การเตรียมโคลชิซินเข้มข้น 4,000 มก/ล เริ่มจากการชั่งโคลชิซิน 100 มก ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.3.2 เทโคลชิซินจากกระดาษชั่งสารลงใน volumetric flask ขนาด 25 มล ละลายโคลชิซินและปรับปริมาตรให้ครบ 25 มล ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

1.3.3 กรองโคลชิซินด้วยกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางรูขนาด 0.22 μm

1.3.4 เทโคลชิซินความเข้มข้น 4,000 มก/ล ลงในขวดแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วปิดฝา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่ไม่มีแสง และควรใช้ให้หมดในแต่ละครั้งที่เตรียม

1.4 การเตรียมอาหารเหลวในการทดลอง

1.4.1 การเตรียมอาหารเหลวในการศึกษาอิทธิพลของ TDZ

1.4.1.1 ตัวอย่างการเตรียมอาหารเหลวในการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของ TDZ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดของปทุมมาลูกผสม โดยมีความเข้มข้น TDZ 5 ระดับ คือ 0, 5, 10, 15

และ 20 มก/ล เริ่มจากการเตรียมอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 1,000 มล (แต่ปรับปริมาตรเป็น 500 มล) ตามวิธีการในข้อ ก.1.1.2 และเตรียมสารละลาย TDZ เข้มข้น 100 มก/ล ตามวิธีการในข้อ ก.1.2.3

1.4.1.2 เตรียมอุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วได้แก่ ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล จำนวน 50 ใบ, ขวดรูปชมพู่ฝาเกรียวขนาด 250 มล จำนวน 5 ใบ, กระปอกตวงขนาด 100 มก/ล 2 อัน กระปอกตวงขนาด 50 มล 1 อัน กระปอกตวงขนาด 10 มล 3 อันและแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ขนาด 12x12 ซม จำนวน 50 แผ่น

1.4.1.3 เทอาหารเหลวสูตร MS ลงในขวดรูปชมพู่ฝาเกลียวปริมาตรขวดละ 75 มล จำนวน 5 ใบ

1.4.1.4 เติม TDZ ความเข้มข้น 100 มก/ล ลงในขวดอาหารที่ต้องการความเข้มข้น TDZ สุดท้ายเป็น 0, 5, 10, 15 และ 20 มก/ล ตามลำดับดังนี้ 0, 7.5, 15, 22.5 และ 30 มล และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้แต่ละขวดมีปริมาตรครบ 150 มล เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

1.4.1.5 นำอาหารเหลวที่มี TDZ ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มก/ล มาแบ่งใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล ขวดละ 10 มล จำนวน 10 ใบ ในแต่ละความเข้มข้น รวมเป็น 50 ใบ ปิดปากขวดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

1.4.2 การเตรียมอาหารเหลวในการศึกษาอิทธิพลของโคลชิซิน

1.4.2.1 เตรียมอาหารเหลวในการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมของปทุมมาลูกผสมโดยมีความเข้มข้นโคลชิซิน 4 ระดับ คือ 0, 800, 1,000 และ 1,200 มก/ล เริ่มจากการเตรียมอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 100 มล (แต่ปรับปริมาตรเป็น 50 มล เพื่อให้มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า) ตามวิธีการในข้อ ก.1.1.2 และเตรียมสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 4,000 มก/ล ตามวิธีการในข้อ ก.1.3

1.4.2.2 เตรียมอุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วได้แก่ ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล จำนวน 16 ใบ ขวดรูปชมพู่ฝาเกรียวขนาด 250 มล จำนวน 4 ใบ กระปอกตวงขนาด 25 มล 2 อัน กระปอกตวงขนาด 10 มล 2 อัน ปิเปตขนาด 10 มล 1 อัน ปิเปตขนาด 1 มล 1 อัน พร้อมลูกยาง และแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ขนาด 12x12 ซม จำนวน 16 แผ่น

1.4.2.3 เทอาหารเหลวสูตร MS ลงในขวดรูปชมพู่ฝาเกลียวปริมาตรขวดละ 12.5 มล จำนวน 4 ขวด

1.4.2.4 เติมโคลชิซินความเข้มข้น 4,000 มก/ล ลงในขวดอาหารที่ต้องการความเข้มข้นโคลชิซินสุดท้ายเป็น 0, 800, 1,000 และ 1,200 มก/ล ที่มี DMSO 2% ตามลำดับดังนี้ 0,

5, 6.25 และ 7.5 มล และเติม DMSO 0.5 มล ลงในอาหารทุกขวด จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้แต่ละขวดมีปริมาตรครบ 25 มล เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

1.4.2.5 นำอาหารเหลวที่มีโคลชิซินความเข้มข้น 0, 800, 1,000 และ 1,200 มก/ล มาแบ่งใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล ขวดละ 5 มล จำนวน 4 ใบ ในแต่ละความเข้มข้น รวมเป็น 16 ใบ ปิดปากขวดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ และนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การคำนวณ

2.1 การคำนวณปริมาตรการใช้สารละลายเข้มข้นในการเตรียมอาหาร

2.1.1 ในการเตรียมอาหารเหลวสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 5 มก/ล ปริมาตร 150 มล จากสารละลาย TDZ ความเข้มข้น 100 มก/ล มีการคำนวณดังนี้

ตัวอย่างการคำนวณโดยใช้สูตร $*C_1V_1 = C_2V_2$

$100 \times V_1 = 5 \times 150$

$V_1 = (5 \times 150)/100$

$V_1 = 7.5$ มล

ดังนั้น ในการเตรียมอาหารเหลวสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 5 มก/ล ปริมาตร 150 มล ต้องเติมสารละลาย TDZ ความเข้มข้น 100 มก/ล ปริมาตร 7.5 มล

2.1.2 ในการเตรียมอาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซินความเข้มข้น 800 มก/ล ปริมาตร 25 มล จากสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 4,000 มก/ล มีการคำนวณดังนี้

ตัวอย่างการคำนวณโดยใช้สูตร $*C_1V_1 = C_2V_2$

$4{,}000 \times V_1 = 800 \times 25$

$V_1 = (800 \times 25)/4{,}000$

$V_1 = 5$ มล

ดังนั้น ในการเตรียมอาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซินความเข้มข้น 800 มก/ล ปริมาตร 25 มล ต้องเติมสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 4,000 มก/ล ปริมาตร 5 มล

* C= Concentration, V= Volume

2.2 การคำนวณพื้นที่ในการนับจำนวนปากใบต่อพื้นที่ซม^2

2.2.1 นับจำนวนช่องของไมโครมิเตอร์ที่วางทับเส้นผ่านศูนย์กลางวงกลมที่มองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ได้เส้นผ่านศูนย์กลางวงกลม 43 ช่อง รัศมีของวงกลมจึงมีค่าเท่ากับ 21.5 ช่อง

2.2.2 คำนวณรัศมีของวงกลมในหน่วยซม เมื่อ 1 ช่องของไมโครมิเตอร์เท่ากับ 0.01 มม

21.5 ช่อง x 0.01 มม	=	0.215 มม
0.215 มม x 10	=	0.0215 ซม

2.2.3 คำนวณพื้นที่วงกลมด้วยสูตร πr^2

พื้นที่วงกลมที่กำลังขยาย 400 เท่า	=	$(22/7) \times (0.0215)^2$
	=	$(22/7) \times (0.0005)$
	=	3.1428×0.0005
	=	0.0016 $ซม^2$

ดังนั้น พื้นที่วงกลมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เท่ากับ 0.0016 $ซม^2$

2.2.4 คำนวณพื้นที่ 1 $ซม^2$ เป็นจำนวนกี่เท่าของพื้นที่วงกลมที่กำลังขยาย 400 เท่า

พื้นที่วงกลม	0.0016 $ซม^2$	=	1	เท่า
พื้นที่	1.0000 $ซม^2$	=	(1 x 1)/0.0016	
		=	625	เท่า

ดังนั้น พื้นที่วงกลมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เมื่อคูณด้วย 625 จะได้พื้นที่เท่ากับ 1 $ซม^2$

2.2.5 การคำนวณจำนวนปากใบต่อพื้นที่$ซม^2$ ทำโดยนำจำนวนปากใบในพื้นที่วงกลมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (เป็นค่าที่เฉลี่ยจาก 4 ตำแหน่งของใบ) มาคูณด้วย 625 จะได้จำนวนปากต่อพื้นที่ 1 $ซม^2$

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u> ในต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์มีจำนวนปากใบที่นับได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า จาก 4 ตำแหน่ง คือ 10, 8, 8 และ 9 เซลล์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.75 เซลล์ คูณด้วย 625 เท่ากับ 8.75 x 625 = 5,468.75 เซลล์ต่อ$ซม^2$

ภาคผนวก ข

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance)

ภาคผนวก ข ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance)

ตารางที่ ข.1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 0, 5, 10, 15 และ 20 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน ที่ 8 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.1.1)

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	455.03	113.76	51.46**
Error	45	99.47	2.21	
Total	49	554.50	11.32	

CV. = 22.9%

ตารางที่ ข.2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน ที่ 6 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.1.2)

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	206.33	51.58	19.70**
Error	45	117.82	2.62	
Total	49	324.15	6.62	

CV. = 38.1%

ตารางที่ ข.3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน ที่ 10 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.1.2)

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	3,558.37	889.59	20.05**
Error	45	1,996.99	44.38	
Total	49	5,555.36	113.38	

CV. = 36.3%

ตารางที่ ข.4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ที่ 6 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.1.3)

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	123.08	30.77	15.50**
Error	45	89.34	1.99	
Total	49	212.42	4.34	

CV. = 61.2%

ตารางที่ ข.5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับ TDZ 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ที่ 10 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.1.3)

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	2,379.94	594.99	15.88**
Error	45	1,685.98	37.47	
Total	49	4,065.92	82.98	

CV. = 56.5%

ตารางที่ ข.6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน ที่ 6 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.2.2)

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	130.10	32.53	16.44**
Error	45	89.04	1.98	
Total	49	219.14	4.47	

CV. = 18.9%

ตารางที่ ข.7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน ที่ 10 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.2.2)

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	1,820.16	445.04	8.33**
Error	45	2,457.99	54.62	
Total	49	4,278.16	87.31	

CV. = 38.1%

ตารางที่ ข.8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ที่ 6 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.2.3)

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	31.20	7.80	1.85ns
Error	45	189.84	4.22	
Total	49	221.04	4.51	

CV. = 33.2%

ตารางที่ ข.9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโคนต้นที่ได้รับ TDZ 1 มก/ล เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ที่ 10 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.2.3)

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	223.05	55.76	2.28ns
Error	45	1,102.17	24.49	
Total	49	1,325.22	27.05	

CV. = 37.9%

ตารางที่ ข.10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโดนต้นไม่ผ่าและโดนต้นผ่าครึ่งที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ ที่ 6 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.2.4)

SOV	df	SS	MS	F
Concentrations (A)	3	259.73	86.58	10.41**
Days (B)	2	92.42	46.21	5.56**
Explants (C)	1	49.24	49.24	5.92*
A x B	6	48.16	8.03	0.97ns
A x C	3	4.77	1.59	0.19ns
B x C	2	28.25	14.13	1.70ns
A x B x C	6	78.89	13.15	1.58ns
Error	72	598.52	8.31	
Total	95	1,159.97	12.21	

CV. =42.0%

ตารางที่ ข.11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนโดนต้นไม่ผ่าและโดนต้นผ่าครึ่งที่ได้รับ TDZ ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ ที่ 10 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.1.2.4)

SOV	df	SS	MS	F
Concentrations (A)	3	3,447.37	1,149.12	6.67**
Days (B)	2	2,140.02	1,070.01	6.21**
Explants (C)	1	63.78	63.78	0.37ns
A x B	6	426.35	71.06	0.41ns
A x C	3	177.41	59.14	0.34ns
B x C	2	117.97	58.99	0.34ns
A x B x C	6	688.63	114.77	0.67ns
Error	72	12,410.40	172.37	
Total	95	19,471.90	204.97	

CV. =74.3%

ตารางที่ ข.12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซิน ที่ 6 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.2.1)

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	629.50	157.38	109.95**
Error	13	18.61	1.43	
Total	19	648.11	34.11	

CV. = 33.8%

ตารางที่ ข.13 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ได้รับโคลชิซิน ที่ 15 สัปดาห์ (งานทดลองที่ 4.2.1)

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	5,318.94	1,329.73	55.20**
Error	13	313.17	24.09	
Total	19	5,632.10	296.43	

CV. = 52.3%

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวดวงจันทร์ เกษบุตร

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาพืชสวน จากมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี พ.ศ. 2542

ประวัติการทำงาน เป็นผู้ช่วยวิจัยโครงการวิจัยต่างๆ ด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ของภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
พ.ศ. 2542 โครงการวิจัยกุหลาบหนู
พ.ศ. 2543-2545 โครงการวิจัยกล้วยไม้ดินเหลืองพิสมร
พ.ศ. 2546-2548 โครงการการเพิ่มชุดโครโมโซมลูกผสมระหว่างปทุมมา กับบัวโกเมนโดยใช้โคลชิซินในสภาพหลอดแก้ว
พ.ศ. 2546- 2549 ศึกษาต่อระดับปริญญาโท หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ผลงานทางวิชาการ

1. P. Suriyajantratong, W. Amaritsut, U. Ninpetch and D. Katbooth. 2000. "Effect of reduction in the concentration of MS salt formulation on root formation and transplant survival in miniature rose," In The International Conference Tropical Agriculture Technology for Better Health and Environment. O-25 p. Central Laboratory & Greenhouse Complex, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus. Nakon Pathom,Thailand.
2. พรพิมล สุริยจันทราทอง, ดวงจันทร์ เกษบุตร และวสุ อมฤตสุทธิ์. 2544. "ผลของอายุฝักและชนิดของสูตรอาหารต่อการงอกและการพัฒนาไปเป็นโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ดินเหลืองพิสมร," ใน การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 1. น.55. สมาคมพืชสวนแห่งประเทศไทย สมาคมวิทยาศาสตร์เกษตรแห่งประเทศไทย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

ประวัติผู้วิจัย (ต่อ)

3. P. Suriyajantratong and D. Katebooth. 2002. "Effect of various sucrose levels on seed germination and seedling development of *Spathoglottis affinis* cultured *in vitro*," In International Seidenfaden Orchid symposium orchid Biology and conservation. 39 p. Queen Sirikit botanic Garden, Sanga Sabhasri Research Foundation, Chiang Mai, Thailand.

4. พรพิมล สุริยจันทราทอง และดวงจันทร์ เกษบุตร. 2545. "อิทธิพลของน้ำตาลซูโครสต่อการเกิดรากและการเจริญของต้นกุหลาบหนูในหลอดแก้ว," วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 33(4-5 พิเศษ): 9-12.

5. พรพิมล สุริยจันทราทอง, ดวงจันทร์ เกษบุตร, โสภิตา คำหาญ, อุทัย อันพิมพ์ และรักเกียรติ แสนประเสริฐ. 2546. "ผลของขนาดหัวต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ดินเหลืองพิสมร," ใน การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 3. น.127. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

6. พรพิมล สุริยภัทร และดวงจันทร์ เกษบุตร. 2547. "อิทธิพลของ TDZ และชนิดของชิ้นส่วนพืชต่อการเพิ่มจำนวยอดในหลอดแก้วของลูกผสมปทุมมา," วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 35(5-6 พิเศษ): 11-14.

7. พรพิมล สุริยภัทร และดวงจันทร์ เกษบุตร. 2548. "ผลของอายุต้นอ่อนต่อการเพิ่มจำนวนยอดในหลอดแก้วของปทุมมาลูกผสม," ใน รวมบทคัดย่อการสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2548 น.91. คณะเกษตรศาสตร์ : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

8. พรพิมล สุริยภัทร และดวงจันทร์ เกษบุตร. 2549. "การชักนำให้เพิ่มจำนวนโครโมโซมในปทุมมาลูกผสม (ปทุมมา x บัวโกเมน) โดยโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ," ใน รวมบทคัดย่อการสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2549 น.105. คณะเกษตรศาสตร์ : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

9. พรพิมล สุริยภัทร, มะลิวรรณ จุรุทา และดวงจันทร์ เกษบุตร. 2549. "การขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงโดยการปักชำและการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ," ใน รวมบทคัดย่อการประชุมวิชาการม.อบ.วิจัย ครั้งที่ 1 น.23-26. กองส่งเสริมการวิจัย บริการวิชาการและศิลปวัฒนธรรม : มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.