



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้โคลชิซินเพื่อชักนำการกลายพันธุ์ในดาหลา

Use of Colchicine to Induce Mutation in Torch Ginger

อรุณี ม่วงแก้วงาม

ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินพิเศษประจำปี 2553

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

การวิจัยเรื่อง การใช้โคลชิซินเพื่อชักนำการกลายพันธุ์ในดาหลา

ผู้วิจัย อรุณี ม่วงแก้วงาม

คณะ วิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร

มหาวิทยาลัย ราชภัฏยะลา

บทคัดย่อ

การชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางกายภาพของดาหลาด้วยสารโคลชิซินในหลอดทดลองเพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ดาหลา ทำโดยการนำส่วนยอดของดาหลาที่ปลอดเชื้อมาตัดแยกให้เป็นยอดเดี่ยว ๆ และวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรมูราซิกและสกุค (MS) เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Benzyl adenine (BA) ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารละลายโคลชิซิน 5 ระดับความเข้มข้นคือ 0, 250, 500, 750 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำส่วนยอดดาหลามาล้างสารละลายโคลชิซินออกด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำส่วนยอดดาหลาที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินทุกระดับความเข้มข้นมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ายอดดาหลาที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินทุกระดับความเข้มข้นให้ร้อยละของการเกิดยอดรวมไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยยอดดาหลาที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 500 และ 750 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดยอดรวมได้สูงสุดร้อยละ 100 ส่วนจำนวนยอดพบว่าสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 3.80 ยอดต่อหนึ่งชิ้นส่วนที่วางเลี้ยง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ส่วนลักษณะภายนอกของยอดดาหลาพบว่าการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเฉพาะยอดใหม่ที่เกิดจากยอดที่ผ่านการแช่สารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้น โดยยอดใหม่มีลักษณะแคระแกร็น อวบน้ำ ใบแคบเรียว นอกจากนี้ได้ทำการวัดความกว้าง และความยาวของปากใบ พบว่าความกว้างของปากใบไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่ทำการทดลอง โดยสารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความ

กว้างของปากใบสูงสุดเท่ากับ 0.024 มิลลิเมตร ในกรณีของความยาวปากใบพบว่าส่วนยอด
ใหม่ที่เกิดจากยอดซึ่งผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 750 มิลลิกรัมต่อลิตร
ให้ความยาวของปากใบสูงสุดเท่ากับ 0.030 มิลลิเมตร แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับ
ระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

Research Use of Colchicine to Induce Mutation in Torch Ginger
Researcher Arunee Muangkaewngam
Faculty Science Technology and Agriculture
University Yala Rajabhat University

Abstract

Colchicine solution was used to induce morphological variation in Torch Ginger (*Etlingera elatior*) for seed development purpose. Sterile shoots of Torch Ginger in vitro were isolated individually and cultured on *Murashige and Skoog* (MS) medium supplemented with 3 mg/l concentration of Benzyl adenine (BA), together with different 5 concentration levels; 0, 250, 500, 750, and 1,000 mg/l, of colchicine solution. The containers were then placed on the shaker for one hour. On due time, colchicine solution on the shoots was cleansed 3 times by sterile steamed distilled water. Again, the shoots that had been through immersion in every given concentration levels of colchicine solution were raised on MS medium added with BA of 3 mg/l concentration. After one month's time, it was found that the overall percentages of total new shoots generated from the shoots that had been through immersion in each given concentrations of colchicine solution were not statistically different. That is, the shoots of Torch Ginger that had been through immersion in 500 and 750 mg/l concentrations of colchicine solution gave the highest total new shoots of 100 %. About number of new shoots generated, it was found that 250 mg/l concentration of colchicine solution induced the most new shoots, that is average 3.80 shoots per piece of cultured explant which was significantly different from other else concentrations of colchicine solution. For outer appearance of the Torch Ginger shoots, it was found that some variation occurred with the new shoots generated from explants

that had been through immersion in 1,000 mg/l concentration of colchicine solution only. The new shoots mentioned were somewhat dwarfed, with narrow and tapering leaves. When the width and length of stomata were measured, it was found that the width of stomata were not statistically different for every concentration level of colchicine solution in this study. The colchicine solution

(๓)

concentration of 1,000 mg/l gave the highest width of stoma, 0.024 mm. In case of length, it was found that the new shoots generated from explants that had been through immersion in 750 mg/l concentration of colchicine solution gave the maximum stoma length of 0.030 mm. which was highly significantly difference, from those of other else concentration levels of colchicine solution in this study.

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลาที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัยด้วยดีมาตลอด โดยการให้งบประมาณแผ่นดินพิเศษสนับสนุนโครงการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2553 เรื่องการใช้โคลชิซินเพื่อชักนำการกลายพันธุ์ในตาปลา ขอแสดงความขอบคุณต่อผู้ช่วยศาสตราจารย์ไกรสร ศรีไตรรัตน์ อธิการบดีมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลาที่กรุณาอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือสำหรับงานวิจัย

ขอแสดงความขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต อาจารย์ประจำภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และวิชาความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพพืชปลูก จนผู้วิจัยสามารถทำงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วง

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวสายฝน อักษรถึง ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือในการเตรียมชิ้นส่วนพืช การเก็บรวบรวมวัตถุดิบ ตลอดจนจัดทำเอกสารเพื่อใช้ในการเก็บรวบรวมข้อมูล และช่วยเหลือในเรื่องการพิสูจน์อักษร

คุณค่าและประโยชน์ใด ๆ ที่เกิดจากการใช้รายงานการวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูตาแต่บิดามารดา ครูอาจารย์ บุคคล คณะบุคคล หน่วยงานที่ผู้วิจัยนำมาใช้อ้างอิงในการเขียนรายงานฉบับนี้ทุกท่าน และเหนือสิ่งอื่นใดประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัยขอมอบเพื่อแทนคุณแผ่นดิน

อรุณี ม่วงแก้วงาม

คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

สิงหาคม 2554

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
บทที่ 1 บทนำ	
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
- ขอบเขตของการวิจัย	3
- สมมติฐานการวิจัย	3
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
- สถานที่ทำการทดลอง	4
- ระยะเวลาทำการวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
- อนุกรมวิธาน	5
- ลักษณะพฤกษศาสตร์	5
- การขยายพันธุ์ดาหลา	7
- การปรับปรุงพันธุ์ดาหลา	9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	

- วัสดุการทดลอง	13
- อุปกรณ์การทดลอง	14
- สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	15
- อาหารสังเคราะห์และวิธีการเตรียม	16
- ขั้นตอนการวางเลี้ยงและบันทึกผล	16

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

สารบัญ(ต่อ)

เนื้อหา	หน้า
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	19
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผล	30
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก	35
ประวัติผู้วิจัย	37

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ความสามารถในการเกิดยอดรวมของดาหลาที่ผ่านการแช่สารโคลชิซิน ความเข้มข้นต่าง ๆ	20
4.2 ความกว้างและความยาวของปากใบดาหลาจากยอดที่ผ่านการแช่ใน สารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	24

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ลักษณะเมล็ดดาหลา	7
2.2 ลักษณะหน่อดาหลา	8
3.1 ลักษณะยอดดาหลาที่ชักนำได้หลอดทดลอง	13
3.2 ลักษณะยอดดาหลาที่ใช้ในการทดลอง	18
3.3 ลักษณะการแช่ยอดดาหลาในสารละลายโคลชิซิน	18
4.1 จำนวนยอดดาหลาที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ผ่านการแช่สารโคลชิซิน ระดับความเข้มข้น 500 และ 750 มิลลิกรัมต่อลิตร	21
4.2 ยอดดาหลาที่เกิดขึ้นจากยอดที่ผ่านการแช่ในสารโคลชิซิน ระดับความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร	22
4.3 ลักษณะปากใบจากยอดดาหลาที่ไม่ผ่านการแช่ในสารโคลชิซิน (กำลังขยาย 10X)	25
4.4 ลักษณะปากใบจากยอดดาหลาที่ผ่านการแช่ในสารโคลชิซินความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร (กำลังขยาย 10X)	26
4.5 ลักษณะปากใบจากยอดดาหลาที่ผ่านการแช่ในสารโคลชิซินความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (กำลังขยาย 10X)	27
4.6 ลักษณะปากใบจากยอดดาหลาที่ผ่านการแช่ในสารโคลชิซินความเข้มข้น 750 มิลลิกรัมต่อลิตร (กำลังขยาย 10X)	28
4.7 ลักษณะปากใบจากยอดดาหลาที่ผ่านการแช่ในสารโคลชิซินความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (กำลังขยาย 10X)	29

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ดาหลา หรือกาหลา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Etlingera elatior* อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae (ราตรี ไกรสิทธิ์, 2546) ดาหลาเป็นไม้ดอกจำพวกขิง ข่า มีลำต้นเป็นเหง้าอยู่ใต้ดิน ชอบขึ้นเป็นกลุ่มกอ มีกลีบซ้อนทับกันหลายชั้น กลีบชั้นนอกมีขนาดใหญ่และค่อยลดขนาดลงเป็นลำดับในวงชั้นใน กลีบดอกชั้นในสุดจะเปลี่ยนสภาพเป็นเกสรเกาะติดกันเป็นกระปุกยอดแหลม กลีบดอกเรียบเป็นมัน ไม่มีกลิ่น มีขนาดของดอกกว้างตั้งแต่ 4 นิ้วขึ้นไป สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพพื้นที่ร่มเงา ชอบอากาศร้อนชื้น พื้นที่สามจังหวัดชายแดนภาคใต้ได้แก่จังหวัดยะลา ปัตตานี และนราธิวาส จึงเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะปลูกดาหลา เพราะนอกจากสภาพภูมิอากาศจะเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตแล้ว ประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพทำสวนยางพารา ดังนั้นการปลูกดาหลาเป็นพืชร่วมยางจึงมีความเหมาะสมเป็นอย่างมาก เนื่องจากดาหลาได้อาศัยร่มเงาจากยางพารา และทำประโยชน์ให้แก่ชาวสวนยางพาราคือช่วยรักษาความชื้นในดินทำให้ระบบนิเวศในสวนยางพาราดีขึ้น แต่ถ้าเกษตรกรปลูกดาหลาเป็นพืชเชิงเดี่ยวจะต้องเสียค่าใช้จ่ายเรื่องของร่มเงาค่อนข้างสูง ดังนั้นการปลูกดาหลาเป็นพืชร่วมยางจะใช้ต้นทุนน้อยกว่า จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มรายได้ให้กับเจ้าของสวนยางพารา นอกจากนี้เกษตรกรในสามจังหวัดชายแดนภาคใต้ต้องประสบกับปัญหาสถานการณ์ความไม่สงบต่อเนื่องมาอย่างยาวนาน ทำให้การประกอบอาชีพทำสวนยางพารา ซึ่งต้องทำในช่วงเวลาที่เสี่ยงต่อความไม่ปลอดภัย มีผลให้เกษตรกรต้องเปลี่ยนแปลงระยะเวลาการประกอบอาชีพส่งผลให้ปริมาณผลผลิตที่ได้ไม่ดีเท่าที่ควร ทำให้รายได้ไม่แน่นอน แต่ค่าใช้จ่ายในสถานการณ์ปัจจุบันกลับเพิ่มขึ้น เกษตรกรจึงหันมาป้องกันความเสี่ยงเรื่องรายได้ด้วยการปลูกพืชชนิดอื่นในระหว่างแถวยางพารา ดาหลาเป็นไม้ดอกที่มีการปลูกมาเป็นระยะเวลานานแล้วทางภาคใต้ของไทย ซึ่งเดิมได้มีการนำหน่ออ่อนและดอกมาใช้เป็นผักประกอบอาหารบางประเภท การใช้ประโยชน์จากดาหลาอยู่ในวงจำกัด แต่ในปัจจุบันมีการนำดาหลามาใช้ประโยชน์ในรูปแบบที่หลากหลายขึ้น เช่น ใช้เป็นไม้ตัดดอก (Lekawatana and Pituck, 1998) หรือใช้เป็นพืชสมุนไพร (ชะลอ ดวงดารา, 2542) เป็นต้น ความนิยมใช้ดอกดาหลาเริ่มมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เป็นเหตุให้มีเกษตรกรจำนวนหนึ่งเริ่มหันมาปลูกดาหลาเป็นการค้าอย่างจริงจัง ดาหลาเป็นไม้ดอกพื้นเมืองที่ปลูกง่าย การดูแลรักษาง่าย ไม่ค่อยมีโรคหรือแมลงเข้าทำลาย การใช้สารเคมี

เพื่อป้องกันและกำจัดศัตรูพืชที่อาจจะส่งผลให้เกิดอันตรายทั้งต่อผู้ผลิต ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อมจึงมีน้อย ประกอบกับในปัจจุบันผู้บริโภคมีความต้องการใช้สินค้าเกษตรที่ปลอดจากสารเคมีเพิ่มขึ้น ดาหลาจึงเป็นพืชที่มีศักยภาพสูงในการผลิตเป็นไม้ดอกอินทรีย์ หรือ ไม้ดอกที่ปลอดภัย ดังนั้นควรส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาสนใจปลูกดาหลาเป็นการค้าเพิ่มขึ้น และกระตุ้นให้ผู้บริโภคหันมาใช้ไม้ดอกที่ปลูกภายในประเทศทดแทนไม้ดอกนำเข้าจากต่างประเทศ เมื่อพิจารณาดาหลาที่ปลูกกันทั่วไปในปัจจุบันดาหลาพันธุ์ที่มีดอกสีขาวมีศักยภาพมากที่สุด เพราะมีความสวยงามที่เป็นเอกลักษณ์ และมีจำนวนน้อย สำหรับราคาดอกดาหลานั้นประมาณ 8-50 บาท ขึ้นอยู่กับความต้องการของผู้ใช้และฤดูกาล ในช่วงฤดูที่มีปริมาณของดอกน้อยราคาจำหน่ายจะสูง ส่วนราคาหน่อพันธุ์นั้นมีตั้งแต่ 50-300 บาท (ชะลอ ดวงดารา, 2542) แตกต่างกันไปตามชนิดของดาหลา การขยายพันธุ์ดาหลาสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเพาะเมล็ด การแยกหน่อ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพสูง เป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมให้เกษตรกรมีต้นพันธุ์ดาหลาปลูกมากขึ้น หากต้องการส่งเสริมให้ผู้บริโภคหันมาใช้ดอกดาหลาแทนไม้ดอกชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไม้ดอกที่นำเข้าจากต่างประเทศ ต้องมีการพัฒนาสายพันธุ์ดาหลาให้มีความหลากหลายเพื่อเป็นทางเลือกให้แก่ผู้บริโภค และหากได้มีการพัฒนาคุณภาพของดอกพร้อมกับการพัฒนาสายพันธุ์ไปด้วย จะทำให้ดาหลามีโอกาสเป็นไม้ตัดดอกส่งออกได้ในอนาคต การปรับปรุงพันธุ์ดาหลาสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้สารก่อกลายพันธุ์ การใช้รังสีรังสีที่ใช้ได้แก่ รังสีเอกซ์ และรังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่วิธีการที่มีประสิทธิภาพและสร้างความหลากหลายให้เกิดขึ้นกับพืช ได้แก่ การใช้สารก่อกลายพันธุ์เพราะสารก่อกลายพันธุ์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้มากกว่าการใช้รังสี และโอกาสการรวมตัวของโครโมโซมที่แตกหักน้อยกว่าการใช้รังสี (อรุณี วงศ์ปิยะสกลิตย์, 2550) สารก่อกลายพันธุ์ชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในไม้ดอกคือสารโคลชิซิน เพราะสารโคลชิซินมีคุณสมบัติในการเพิ่มชุดของโครโมโซม และชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชอย่างกว้างขวางเนื่องจากสารนี้ไม่ทำอันตรายต่อต้นพืช แม้จะใช้ในอัตราสูงเพราะเป็นสารที่สกัดมาจากพืช และสามารถเคลื่อนย้ายไปตามส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยยังคงรักษารูปเดิมและทำหน้าที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เป็นเวลานานและไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับโครงสร้างของยีน จากการนำไปทดลองกับพืชหลายชนิดเช่น กล้วยไม้ (Sahagun, 2005) เอื้องใบหมาก (วีรภัทร ทิพย์วาริ และณัฐา โพธารณณ์, 2553) หน้าวัวพันธุ์ Micky Mouse (อัญญาณี จันทร์ภักดี และสมปอง เตชะโต, 2553) พบว่าสารนี้มีประสิทธิภาพสูง (นพพร สายัมพล, 2543) ผู้วิจัยจึงได้นำมาใช้

ทดลองกับดาหลาเพื่อศึกษาผลของโคลชิซินต่อการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ และนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ดาหลาในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่สำคัญ 2 ประการ ดังนี้

1. เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของดาหลา
2. เพื่อเปรียบเทียบต้นดาหลาที่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะในหลอดทดลองด้วยการตรวจนับจำนวน และวัดขนาดของปากใบ

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยเรื่องการใช้โคลชิซินเพื่อชักนำการกลายพันธุ์ในดาหลา เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วยขั้นตอนต่อไปนี้

1. การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เหมาะสม ในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของดาหลาในหลอดทดลอง
2. การทดสอบต้นกล้าดาหลาที่ได้จากชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะในหลอดทดลองด้วยการตรวจนับจำนวนและวัดขนาดปากใบ
3. การเผยแพร่ผลงานในรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ การลงตีพิมพ์ในวารสาร การสัมมนาทางวิชาการ การจัดทำเอกสารเผยแพร่

สมมติฐานของการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึงการนำชิ้นส่วนพืชมาผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อและวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เพื่อชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่จำนวนมาก ในระยะเวลาอันสั้น โดยทั่วไปพืชเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวที่มีคุณสมบัติโททิโพเทนซี ซึ่งหมายถึงความสามารถของพืชที่จะพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ การนำชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชมาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลานาน จะทำให้เกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อพืชได้ และ หากมีการนำสารก่อกลายพันธุ์มาใช้ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โอกาสที่จะได้พืชต้นใหม่ที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมจะมีแนวโน้มมากขึ้น สมมติฐานที่ว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดาหลาร่วมกับการใช้สารก่อกลายพันธุ์ มีโอกาสได้ต้นดาหลาที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมจึงมีแนวโน้มเป็นไปได้สูง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. อนาคตเกษตรกรจะมีดาหลาที่มีความหลากหลายปลูกในพื้นที่ระหว่างสวนยาง เป็นการช่วยเพิ่มรายได้อีกหนึ่งทางหนึ่ง ซึ่งนั่นหมายถึงการลดความเสี่ยงหากรายได้จากยางพารามีการเปลี่ยนแปลงตามสถานการณ์โลก เป็นการนำหลักการดำรงชีวิตแบบเศรษฐกิจพอเพียงมาใช้อย่างแท้จริง
2. อนาคตหากมีการนำผลงานวิจัยที่ได้ไปต่อยอดจนสามารถพัฒนาเป็นดาหลาสายพันธุ์ใหม่จะนำไปสู่การปลูกดาหลาเชิงพาณิชย์เพื่อการส่งออก และลดการนำเข้าไม้ตัดดอกจากต่างประเทศได้
3. ข้อมูลที่ได้จากการทดลองสามารถนำไปใช้ต่อยอดงานวิจัย เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ดาหลาได้
4. ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีการสร้าง ความหลากหลาย ทางกายภาพของดาหลาไปยังสถาบันการศึกษา หน่วยงานทางด้านการเกษตรทั้งภาครัฐ และเอกชน หรือหน่วยงานอื่น ๆ ที่ดำเนินการวิจัยในลักษณะเดียวกัน เพื่อเป็นศูนย์กลางให้กับผู้ที่สนใจต่อไปในอนาคต
5. สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการวิจัยไปบูรณาการกับการเรียนการสอน และการบริการวิชาการสำหรับถ่ายทอดให้ผู้สนใจ

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

ระยะเวลาทำการทดลอง

ตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2553 ถึง เดือนมิถุนายน พ.ศ.2554 รวม 1 ปี 3 เดือน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยเกี่ยวข้อง

ดาหลามีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Etlingera elatior* อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae (ราตรี ไกรสิทธิ์, 2546) ดาหลาเป็นพืชตระกูลเดียวกับขิง ข่า ขมิ้น กระชาย เป็นต้น มีลำต้นเป็นเหง้าอยู่ในดิน ขอบขึ้นเป็นกลุ่มกอ ให้ดอกสีแดง สีชมพู หรือสีขาว มีกลีบซ้อนทับกันหลายชั้น กลีบชั้นนอกมีขนาดใหญ่ และค่อยลดขนาดเล็กลงเป็นลำดับในวงชั้นใน ดอกดาหลาสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น ใช้รับประทานกับน้ำพริก หรือข้าวต้ม มีสรรพคุณทางสมุนไพรในการขับลม แก้ลมพิษ แก้โรคผิวหนัง หรือนำมาใช้ประดับตกแต่งในเทศกาลต่าง ๆ (ชะลอ ดวงดารา, 2542) เนื่องจากดาหลามีดอกที่สวยงามและมีอายุการปักแจกันนานเฉลี่ยไม่น้อยกว่า 1 สัปดาห์ จึงเป็นที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้พื้นที่ปลูกดาหลาเพิ่มขึ้นตามไปด้วย

อนุกรมวิธาน

ชื่อวิทยาศาสตร์	: <i>Etlingera elatior</i> (Jack) R.M. Smith
ชื่อพ้อง	: <i>Phaeomeria magnifica</i> , <i>Nicolaia elatior</i>
ชื่อสามัญ	: ดาหลา
วงศ์	: Zingiberales
ชื่ออื่น ๆ	: กาหลา, กะลา
ถิ่นกำเนิด	: เอเชียตะวันออกเฉียงใต้

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ชะลอ ดวงดารา (2542) ได้สรุปลักษณะทางพฤกษศาสตร์ดาหลาไว้ดังนี้
ราก ดาหลามีระบบรากเป็นรากฝอย รากจะแตกออกมาจากส่วนใต้ของเหง้า และจะมีจำนวนมากตรงบริเวณหัวและท้าย รากเมื่อแตกออกมาครั้งแรกจะมีลักษณะอวบอ้วน ไม่มีแขนง แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะแตกแขนงเล็ก ๆ ทั่วไป รากที่เจริญเต็มที่จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ยาว 20-30 เซนติเมตร ทำหน้าที่ช่วยยึดลำต้น รากที่มีอยู่จำนวนมาก จะผ่อและค่อย ๆ สลายตัวไปและเกิดรากใหม่มาแทน

เหง้า หัวของดาหลาเป็นแบบเหง้าเกิดจากลำต้นที่ทำหน้าที่เก็บสะสมอาหาร มองเห็นเป็นข้อปล้องชัดเจน ขนาดของเหง้าแตกต่างกันไปตามอายุ ส่วนหัวและท้ายของเหง้าซึ่งเป็นที่เกิดของลำต้น จะพองโตมีขนาดใหญ่กว่าส่วนอื่น ๆ และจะมีเหง้าเล็ก ๆ แยกออกจากส่วนนี้ เกิดเป็นลำต้นใหม่เรียกว่าหน่อจะเจริญขึ้นพุ่งสู่อากาศ เมื่อลำต้นใหม่เจริญเติบโตสามารถหาอาหารได้เองจะส่งอาหารที่เหลือไปเก็บสะสมไว้ที่เหง้าทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ ฉะนั้นขนาดของเหง้าจะมีความสำคัญกับขนาดของลำต้น กล่าวคือลำต้นเจริญมากขึ้นเท่าใด เหง้าจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเท่านั้น

ลำต้น เป็นไม้เนื้ออ่อนมีกาบใบห่อหุ้มอยู่จำนวนมาก ลำต้นจะเจริญจากส่วนปลายของเหง้า ส่วนที่โผล่เหนือจากเหนือดินขึ้นมานั้นไม่ใช่ส่วนของลำต้นทั้งหมด จะเป็นส่วนของลำต้นที่แท้จริงประมาณ $1/3 - 1/2$ ของความสูงทั้งหมด ส่วนที่เหลือคือกาบใบซึ่งห่อหุ้มลำต้นส่วนปลายเอาไว้ ลำต้นจะเจริญทางด้านข้างตามทิศทางของเหง้าที่แตกออกมา ลำต้นของดาหลาแต่ละต้นจะอยู่ใกล้ชิดกันมาก ทำให้ส่วนล่างของลำต้นสูงจากผิวดินประมาณ 1-2 ฟุต ไม่มีใบ เรียกลักษณะของลำต้นหลาย ๆ ต้นที่เจริญอยู่ใกล้ชิดกันนี้ว่า “ กอ ” ดาหลาที่เจริญเต็มที่สูง 5-6 เมตร แต่ที่พบทั่วไปจะสูงประมาณ 3-4 เมตร

ใบ ดาหลามีใบลักษณะเป็นใบเดี่ยว เส้นใบขนานกัน ก้านใบสั้นมากติดอยู่กับกาบใบ ซึ่งมีลักษณะเป็นกาบหุ้มลำต้นเอาไว้ กาบใบจะเจริญเลยตำแหน่งตรงที่ก้านใบต่อกับกาบใบ ทำให้มีลักษณะคล้ายรูปสามเหลี่ยมเล็ก ๆ ติดอยู่ที่ปลายกาบใบ ใบที่เจริญอย่างแท้จริงจะเริ่มจากใบที่ 3 หรือ 4 เป็นต้นไป ซึ่งจะอยู่สูงจากโคนต้นไปประมาณ 1-2 ฟุต จำนวนใบแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอายุ อายุมากมีใบมาก ดาหลาที่มีอายุ 2 ปี จะมีจำนวนใบเฉลี่ย 15 – 20 ใบ ขนาดของใบจะกว้างยาวไม่สม่ำเสมอ ใบที่อยู่ตอนล่างจะมีขนาดเล็ก ใบที่อยู่ช่วงกลางจะมีขนาดใหญ่และยาวมาก ส่วนใบที่อยู่สูงขึ้นไปจะค่อย ๆ ลดขนาดลงไปเรื่อย ๆ ตามลำดับจนถึงใบสุดท้ายจะเล็กมากและม้วนตัวคล้ายหลอด

ดอก ดอกดาหลาจะแยกออกจากต้น และก่อนที่ดาหลาออกดอกจะแทงก้านดอกขึ้นมาจากโคนกอ ก้านดอกมีลักษณะเป็นปล้องคล้ายลำไผ่เล็ก ๆ สีเขียว ก้านยาวเป็นเมตร บางครั้งพบดาหลาออกดอกที่ปลายใบแต่ไม่บ่อยนัก ดาหลาออกดอกตลอดปี ลักษณะดอกมีสีแดงสด สีชมพูและสีขาว กลีบซ้อนทับกันหลายชั้น กลีบชั้นนอกมีขนาดใหญ่ และค่อยลด

ขนาดเล็กลงเป็นลำดับ กลีบดอกชั้นในสุดจะเปลี่ยนสภาพเป็นเกสรเกาะติดกันเป็นกระปุก ยอดแหลม กลีบดอกเรียบเป็นมันไม่มีกลิ่น มีขนาดของดอกกว้างตั้งแต่ 4 นิ้วขึ้นไป

ผล ผลเป็นกลุ่ม ผลอ่อนมีสีเขียวอ่อน และเมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมชมพู และสีน้ำตาลอ่อน ตามลำดับ ดาหลาจะติดผลเมื่ออายุ 2 ปี ในช่อดอกหนึ่ง ๆ จะติดผลโดยเฉลี่ย 30-150 ผล แต่ละผลจะมีเมล็ดประมาณ 40-80 เมล็ดตามขนาดของผล เมล็ดมีสีดำ

การขยายพันธุ์ดาหลา

การขยายพันธุ์ดาหลาสามารถทำได้ 2 วิธีหลัก ๆ ได้แก่

1) วิธีการเพาะเมล็ด การปลูกด้วยวิธีการเพาะเมล็ดทำโดยนำเมล็ดมาล้างให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้งแล้วนำไปเพาะในกระบะทราย หรือซีเมนต์ถาด เมื่อเห็นต้นดาหลามีใบได้ 3-4 ใบ ให้นำลงชำถุงอีกครั้ง ดินที่ใช้เพาะชำควรใช้หน้าดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง ระยะเวลาของการชำประมาณ 3 เดือน จึงนำลงปลูกในแปลงได้ การปลูกด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือทำได้ง่าย และทำได้คราวละมาก ๆ ช่อดอกหนึ่งจะได้หลายพันต้น แต่มีข้อเสียคือต้นใหม่ที่ได้มีโอกาสกลายพันธุ์สูง และให้สีดอกแตกต่างไปจากต้นแม่เดิม





ภาพที่ 2.1 ลักษณะเมล็ดดาหลา

2) วิธีการแยกหน่อ การปลูกดาหลาโดยวิธีการแยกหน่อนั้นจะต้องแยกหน่อออกจากต้นแม่ที่ให้ดอกแล้ว และมีลำต้นเทียม 2-3 ต้นติดมาด้วย พร้อมกับแต่งรากด้วยมีดคม นำลงถุงก่อนปลูกหรือนำไปปลูกในแปลงก็ได้ การปลูกด้วยวิธีการแยกหน่อนี้มีข้อดีคือจะทำให้ดอกออกได้เร็วขึ้น และยังให้สีดอกตรงตามต้นแม่พันธุ์ แต่จะมีข้อเสียคือได้จำนวนต้นใหม่น้อย ดาหลาอหนึ่ง ๆ อาจจะได้ต้นใหม่เพียง 10 ต้น



ภาพที่ 2.2 ลักษณะหน่อดาหลา

ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขยายพันธุ์ดาหลา ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการนำอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งที่มีชีวิตของพืชมาผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ และนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชนั้น ๆ ขึ้นส่วนพืชจะมีพัฒนาการเป็นแคลลัสจากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นที่สมบูรณ์ (อรดี สหวัชรินทร์, 2522) ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดาหลา โดยอภิชาติ ชิตบุรี (2542) ศึกษาการขยายพันธุ์ดาหลาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการนำหน่อดาหลามาล้างทำความสะอาด จากนั้นลอกกาบใบทั้ง 2 - 3 ชั้น และนำหน่อดาหลามาผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อโดยการเช็ดหน่อดาหลาด้วยสารละลายแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 โดยนำไปแช่ในสารละลายคลอริกซ์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที เมื่อครบเวลาจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำหน่อดาหลามาตัดโดยลอกกาบใบออกทีละชั้นจนถึงส่วนของปลายยอด ตัดชิ้นส่วนปลายยอดให้มีขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร นำไปวางเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์สูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงประมาณ 60-80 วัน พบว่าส่วนปลายยอดมีการพัฒนาขยายขนาดและมีจำนวนยอดเพิ่มขึ้น

การปรับปรุงพันธุ์ดาหลา

นอกจากการขยายพันธุ์ดาหลาแล้วได้มีการปรับปรุงพันธุ์ดาหลา เพื่อให้มีสีสันหลากหลายด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การฉายรังสี โดยรังสีที่ใช้เป็นรังสีเอกซ์ และรังสีแกมมา วิธีการดังกล่าวสามารถทำได้กับพืชหลายชนิด เช่น ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ (2549) รายงานว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวโดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์บาสมати 370 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงเติม 2,4-D , NAA และไคนิตินระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เมล็ดมีการสร้างแคลลัส และแคลลัสที่มีอายุ 3 สัปดาห์ (ไม่ผ่านการเปลี่ยนอาหาร) และ 6 สัปดาห์ (ผ่านการเปลี่ยนอาหาร 1 ครั้ง) สามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงเติมไคนิติน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และได้มีการนำแคลลัสอายุ 3 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์ ไปอาบรังสีแกมมาในปริมาณต่าง ๆ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรที่ชักนำให้เกิดต้น พบว่าแคลลัสอายุ 3 สัปดาห์สามารถเจริญไปเป็นต้นใหม่ได้ดีกว่าแคลลัสอายุ 6 สัปดาห์ นอกจากนี้รักชนก โคโต และคณะ (2549) ได้กล่าวว่า การชักนำให้เกิดความแปรปรวนในลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผักเป็ดโดยใช้รังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งได้มีการนำเอาส่วนยอดของผักเป็ดอายุ 5 สัปดาห์มาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน โดยใช้ปริมาณรังสีที่ระดับ 0 - 10 กิโลเรด จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไคนิตินระดับความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ระดับความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อวัดการเจริญเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักสดของยอดที่แตกใหม่ พบว่าการเจริญเติบโตของยอดลดลงเมื่อได้รับปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น และที่ปริมาณรังสี 3.7 กิโลเรด ทำให้ยอดตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD₅₀) หลังจากนั้นทำการย้ายยอดของผักเป็ดที่รอดชีวิตไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม NAA ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 2 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดรากแล้วนำออกปลูกภายนอกหลอดทดลอง เพื่อศึกษาความแปรปรวนในลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผักเป็ด พบความแปรปรวนในลักษณะของใบ เช่น ใบต่าง ใบมีขนาดใหญ่ขึ้น ใบแคบเรียวยาวกว่าปกติ และความแปรปรวนในลักษณะของลำต้น เช่น ต้นเตี้ยแคระ และต้นแตกกอมากกว่าปกติ การใช้รังสีเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์พืชทางหนึ่ง แต่มีอีกหลายวิธีที่สามารถปรับปรุงพันธุ์พืชได้ เช่น การใช้สารก่อกลายพันธุ์ ได้แก่ สารโคลชิซิน สารนี้มีประโยชน์ในด้านการศึกษเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ของเซลล์ เนื่องจากมีรายงานเกี่ยวกับการใช้สารโคลชิซินในการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งการใช้สารโคลชิซินกับพืชต้องหาระดับปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสม เช่น มีรายงานการทดลองของ พิรุฑ บัญมืรอด และคณะ (2535) ได้ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของโคลชิซินที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยดีในแตงโมพันธุ์ชูการ์เบบี้ในหลอดทดลอง โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นกล้าแตงโมในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง รวมทั้งสิ้น

20 สูตร ผลการทดลองพบว่าเนื้อเยื่อใบเลี้ยงสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส ราก และยอด ได้ แคลลัสที่พบมี 3 รูปแบบคือแคลลัสสีขาวใส เกิดขึ้นบริเวณผิวของใบเลี้ยงในอาหารเกือบทุกสูตร แคลลัสสีเหลือง เกิดขึ้นบริเวณรอยตัดในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติม IAA ระดับความเข้มข้น 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BAP ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติม IAA ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BAP ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการเกิดรากจากเนื้อเยื่อใบเลี้ยง พบว่าเกิดได้ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติม IAA หรือ NAA ระดับความเข้มข้น 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มี BAP อยู่เลย และรากที่เกิดในอาหารที่ใส่ IAA แม้จะมีจำนวนน้อยกว่า แต่มีความยาวรากและแตกแขนงได้ดีกว่ารากที่เกิดในอาหารที่ใส่ NAA ในกรณีของการวางเลี้ยง ส่วนเนื้อเยื่อไฮโปคอติลพบที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 2 รูปแบบ คือแคลลัสสีเหลืองและ แคลลัสสีเขียว แต่ไม่พบว่าเกิดแคลลัสสีขาวใส ส่วยยอดและรากพบว่าเนื้อเยื่อปลายยอดเจริญ ยึดตัวได้ดีที่สุด และเกิดรากได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS เติม IAA ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ต่อลิตร นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการเกิดโพลีพลอยด์ของแตงโมที่ผ่านการแช่ในอาหารเหลว สูตร MS ที่มีสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.5 , 0.1 , 0.05 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าต้นแตงโมที่แช่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี สารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แช่ในอาหารเหลว สูตร MS ที่มีสารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และในอาหารเหลว สูตร MS ที่มีสารละลายโคลชิซิน 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีขนาดของเซลล์คุม และจำนวนคลอโรพลาสต์แตกต่างทางสถิติกับต้นควบคุม ส่วนความยาวรากไม่มีความแตกต่าง ทางสถิติกับต้นควบคุม และนอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในพริก (อนันต์ พุทธิยาสาธร และ วิมล ขวัญเกื้อ, 2533) โดยใช้สารโคลชิซินกับชิ้นส่วน 2 ชนิด ได้แก่ เมล็ด และยอดของต้นอ่อน กรณีของเมล็ดใช้วิธีแช่เมล็ดในสารละลายโคลชิซินระดับ ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนกรณี ของยอดนั้นใช้ 2 วิธีคือ วิธีที่ 1 ใช้สำลิจับสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ วางบนยอดอ่อน 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งห่างกัน 2 วัน วิธีที่ 2 หยดสารละลายโคลชิซิน ระดับความเข้มข้น 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ผสมวันวางลงบนยอดอ่อน 3 ครั้ง โดยห่างกัน 2 วัน เช่นเดียวกัน ผลปรากฏว่าอัตราการเกิดโพลีพลอยด์ในยอดสูงกว่าเมล็ด ในยอดที่ทดลองใช้ สารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ได้ดีกว่าที่ ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับวิธีการทดลองที่ยอดโดยการใช้นำลิจับหรือใช้ผสม วันหยดนั้นไม่พบว่าสามารถทำให้อัตราการเกิดโพลีพลอยด์แตกต่างกัน ส่วนการทดลองที่เมล็ด

พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 1 เปอร์เซ็นต์ เวลา 48 ชั่วโมง จะทำให้เกิดโพลีพลอยด์ได้ดีกว่าที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เวลา 24 ชั่วโมง นอกจากสารโคลชิซินแล้ว ยังมีสารเคมีอีกหลายชนิดที่สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชชนิดต่าง ๆ ได้ เช่น สมบอง เตชะโต และธัญญาพร สุสานนท์ (2548) ศึกษาเกี่ยวกับการกลายพันธุ์ของหน้าวัวโดยการนำโนดูลาแคลลัสของหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโนมาแช่ในสารละลายเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 90 นาที พบว่าสาร EMS ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสร้อยละ 60 และ 34 ตามลำดับ ($LD_{50} = 0.62\%$) สาร EMS ระดับความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ให้ดอกขนาดเล็กกว่าชุดควบคุม และให้ปลีดอกสีเหลืองร้อยละ 14.2 ส่วนสาร EMS ระดับความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ลักษณะดังกล่าวร้อยละ 60 ในขณะที่ชุดควบคุมมีปลีดอกสีชมพู นอกจากนี้ยังพบว่าปลีดอกสั้นกว่าและทำมุมตั้งกว่าชุดควบคุม (25 องศา) พัฒนาการของเกสรตัวเมียร้อยละ 0 – 50 ในขณะที่ชุดควบคุมมีการสร้างดอกตัวเมียร้อยละ 100 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สาร EMS เพื่อชักนำการกลายพันธุ์ในไม้ดอก เช่น ศิริธัญญา ม่วงสอน และสมบอง เตชะโต (2551) ศึกษากล้วยไม้เหลืองจันทร์พุดโดยการศึกษาค้นคว้าหาสภาวะที่เหมาะสมของการใช้สาร EMS เพื่อชักนำการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้จันทร์พุด โดยนำ PLBs กล้วยไม้เหลืองจันทร์พุด มาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันคือ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 และ 90 นาที จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ผลการศึกษาพบว่าหลังเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน PLBs ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ระดับความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 90 นาที ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง จากนั้นทำการศึกษาลักษณะการเจริญและพัฒนาการของ PLBs ที่รอดชีวิต พบว่าภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน ทริตเมนต์ที่ไม่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS (ชุดควบคุม) ให้ร้อยละของการสร้างยอดสูงสุดร้อยละ 15 ในขณะที่ทริตเมนต์ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ระดับความเข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 90 นาที ให้ร้อยละของการสร้างยอดต่ำสุดเท่ากันคือร้อยละ 2 และเมื่อพิจารณาจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงพบว่าทริตเมนต์ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 90 นาที ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนสูงสุดคือ 12 ยอดต่อชิ้นส่วน เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน พบว่าทริตเมนต์ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 นาที เกิดลักษณะต้นเผือกเป็นจำนวนร้อยละ 10 และที่ EMS ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 90 นาที พบอาการใบต่าง 3 ลักษณะ คือต่างเป็นบางส่วนของใบ ต่างตรงกลางใบ และต่างบริเวณขอบใบ เป็นจำนวนร้อยละ 5, 15 และ 11 ตามลำดับ ซึ่งลักษณะใบต่างที่เกิดขึ้นมีสีต่าง 2 สี คือ

ใบด่างสีเหลือง และใบด่างสีขาว และเมื่อนำมาตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคไอโซไซม์ พบว่าให้แถบเอนไซม์ที่แตกต่างกันระหว่างทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่และไม่จุ่มแช่ EMS นอกจากนี้ สมปอง เตชะโต และราตรี สุจารีย์ (2543) ได้ทำการทดลองเกี่ยวกับผลของสารโคลชิซินที่ให้กับแคลลัสมีงต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการนำแคลลัสมีงมาจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นส่วนแคลลัสที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารชักนำยอด พบว่ายอดที่พัฒนาจากการจุ่มแช่สารโคลชิซินทุกระดับความเข้มข้นมีปริมาณคลอโรฟิลล์ b เพิ่มขึ้น ขนาดของยอด พื้นที่ใบ และจำนวนใบมีแนวโน้มลดลง ในขณะที่จำนวนราก และความยาวรากเพิ่มขึ้น การศึกษาข้างต้นเป็นการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงภายนอกของพืช แต่มีการศึกษาโดยนคร สารวัตร และจรัสศรี นวลศรี (2550) ที่ทำการศึกษถึงการเปลี่ยนแปลงระดับโครโมโซม โดยทดลองในมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พร มีการทดลอง 2 ลักษณะดังนี้ การทดลองที่หนึ่งนำเมล็ดที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกแล้วมาแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าร้อยละของความงอก ความสูงของต้นกล้า ขนาดใบ และจำนวนใบจากต้นที่ได้รับสารโคลชิซินทุกระดับความเข้มข้น มีค่าน้อยกว่าต้นในชุดควบคุม ค่า LD₅₀ ของสารโคลชิซินในการแช่เมล็ดนาน 36 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1.88 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก ไม่พบจำนวนโครโมโซม การทดลองที่สองใช้สารละลายโคลชิซินกับปลายยอด โดยทำการหุ้มปลายยอดต้นกล้าอายุ 8 เดือน ด้วยสำลีจุ่มสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งแต่ละความเข้มข้นใช้จำนวน 25 ยอด พบว่าร้อยละการผลิทยอดใหม่ ความยาวยอด ความกว้าง ความยาวของใบ และจำนวนใบของยอดที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินมีค่ามากที่สุด ส่วนค่า LD₅₀ ของสารโคลชิซินมีค่าเท่ากับ 0.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมพบว่าการใช้สารโคลชิซินที่ปลายยอดระดับความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ อย่างละหนึ่งต้นประสบความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนโครโมโซม เช่นเดียวกับการทดลองของ ณัฐชานันท์ พันธุ์อิม และณัฐา โพธารณ์ (2550) ได้ศึกษาโครโมโซมของงาที่ผ่านการฉายรังสีแล้วนำไปเพิ่มชุดโครโมโซมโดยใช้สารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และได้หาวิธีการนับจำนวนโครโมโซมที่เหมาะสม พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บปลายรากคือ 08.30-09.30 น. ระยะเวลาในการหยุดวงชีพของเซลล์โดยแช่ในสารละลาย para-dichlorobenzene (PDB) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที และระยะความยาวนานที่เหมาะสมของการย้อมสีปลายรากด้วยสารละลาย carbol fuchsin

คือ 24 ชั่วโมง ให้ผลดีมีระยะการแบ่งตัวที่สามารถ นับจำนวนโครโมโซมได้ สารละลายโคลชิซิน
ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของงาทุกสายพันธุ์

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุการทดลอง

1. วัสดุพืช

การทดลองใช้สารโคลชิซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับส่วนยอดตาหลา เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์นี้ ใช้ส่วนยอดตาหลาพันธุ์สีชมพูที่ได้จากการนำยอดมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวภายนอกด้วยการแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ระดับความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) นาน 1 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดเทสารละลายแอลกอฮอล์ทิ้งไป และฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งโดยการแช่ชิ้นส่วนยอดตาหลาในสารละลายคลอริกซ์ระดับความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) นาน 20 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำชิ้นส่วนพืชเข้าสู่เชื้อเชื้อ เทสารละลายคลอริกซ์ทิ้งไป ล้างชิ้นส่วนพืชด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำชิ้นส่วนยอดตาหลามาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เติมผงวุ้นระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปวางบนชั้นวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อชักนำให้เกิดยอดรวมจำนวนมากสำหรับการทดลองต่อไป (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 ลักษณะยอดดาหลาที่ชักนำได้ในหลอดทดลอง

2. อุปกรณ์การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

2.1.1 ตู้อบ ตู้อบที่ใช้สำหรับงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถตั้งเวลาใช้งานได้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ปรับตั้งอุณหภูมิได้ตั้งแต่ 0 - 200 องศาเซลเซียส มีเทอร์มิเตอร์เพื่อแสดงอุณหภูมิภายในตู้ มีช่องเปิดด้านบนสำหรับไล่อากาศออก ใช้เพื่ออบฆ่าเชื้อเครื่องมือ เครื่องใช้ หรือวัสดุที่ทนความร้อนแห้งสูง ๆ ได้ และไม่มีส่วนของยางหรือพลาสติกเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ไปเปต จานเพาะเชื้อ ปากคิบ ด้ามมีดผ่าตัด เป็นต้น อุณหภูมิที่ใช้สำหรับฆ่าเชื้อเครื่องมือต่าง ๆ ประมาณ 200 - 300 องศาเซลเซียส เวลา 2 - 3 ชั่วโมง

2.1.2 เครื่องชั่ง เครื่องชั่งสำหรับงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมี 2 แบบ ได้แก่

1) เครื่องชั่งชนิดหยาบ หมายถึงเครื่องชั่งที่สามารถชั่งได้น้ำหนักต่ำสุด 0.01 กรัม ส่วนใหญ่สามารถชั่งได้ตั้งแต่ 0.01 - 200 กรัม หรืออาจมากกว่าถึง 5,500 กรัม ขึ้นกับชนิดของเครื่อง เครื่องชั่งหยาบมีไว้สำหรับชั่งสารที่ไม่ต้องการความละเอียดมากนัก เช่น น้ำตาลทราย และผงวุ้น เป็นต้น

2) เครื่องชั่งชนิดละเอียด หมายถึงเครื่องชั่งที่สามารถชั่งได้น้ำหนักต่ำสุด 0.0001 กรัม ส่วนใหญ่สามารถชั่งได้ตั้งแต่ 0.001 - 160 กรัม หรืออาจ

ละเอียดกว่านี้ ขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่องชั่ง เครื่องชั่งละเอียดมีไว้สำหรับชั่งสารที่ต้องการความละเอียดสูง เช่น สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และเอ็มไซม์ เป็นต้น

2.1.3 หม้อนึ่งความดัน ใช้สำหรับนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเครื่องมือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ไม่ทนต่อความร้อนของตูบความร้อน เช่น อุปกรณ์ที่มีพลาสติกหรือยางเป็นองค์ประกอบ เครื่องแก้วที่ไม่ทนความร้อนสูง โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร) เวลา 15 นาที

2.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง สำหรับงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชใช้เพื่อปรับค่าความเป็นกรด - ด่าง ของอาหารสังเคราะห์ให้ได้ตามที่ต้องการ ซึ่งอาหารสังเคราะห์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด จะถูกกำหนดให้มีค่าความเป็นกรด - ด่างแตกต่างกันไป เช่น สูตรอาหารมูราซิก และสกุค กำหนดให้มีค่าความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 5.7

2.1.5 เครื่องทำน้ำกลั่น ใช้ประโยชน์เพื่อกลั่นน้ำไว้ใช้สำหรับการเตรียมอาหารสังเคราะห์ และเตรียมสารละลายต่าง ๆ ตลอดจนการล้างภาชนะเครื่องแก้วต่าง ๆ

2.1.6 เตาความร้อน ใช้สำหรับการหลอมอาหารเมื่อต้องการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชในรูปของอาหารแข็ง จำเป็นต้องหลอมให้วัสดุละลายจนใสเป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนการแบ่งถ่ายใส่ภาชนะที่ต้องการ

2.1.7 ภาชนะเครื่องแก้ว สำหรับใส่อาหารสำหรับเลี้ยง และย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ พลาสติก หลอดทดสอบ จานเพาะเชื้อ ขวดปรับปริมาตร กระบอกตวง ปีกเกอร์ ขวดขนาดต่าง ๆ วัสดุดังกล่าวต้องทนไฟ และความร้อน สามารถตั้งไฟและนึ่งที่ระดับอุณหภูมิสูง ๆ ได้

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.2.1 ตูย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นตู้กรองอากาศให้บริสุทธิ์ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ภายในตู้เขี่ยเชื้อมีตะเกียงแอลกอฮอล์ เครื่องมือผ่าตัด อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่จำเป็นในการย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.2.2 เครื่องมือขนาดเล็ก เครื่องมือขนาดเล็กที่ใช้สำหรับงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ปากคืบ ใบมีดผ่าตัด ด้ามมีดผ่าตัด ใช้สำหรับจับ และตัดชิ้นส่วนของพืชที่ต้องการวางเลี้ยง ชนิดของปากคืบ และมีดผ่าตัด มีหลากหลายสามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับ

งานและภาชนะที่ใช้เลี้ยง เครื่องมือดังกล่าวจะต้องจุ่มแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ระดับความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อต้องการใช้งานให้ลนไฟ และรอให้แอลกอฮอล์แห้ง ไฟดับ จึงนำมาใช้งานต่อไป

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการวางเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.3.1 ชั้นวางเลี้ยง มีไว้สำหรับวางภาชนะที่เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเพื่อการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนพืช ด้านบนของแต่ละชั้นวางเลี้ยงต้องติดหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ เพื่อให้ชิ้นส่วนพืชสามารถสังเคราะห์แสง และเจริญเติบโตได้เหมือนอยู่ในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ

2.3.2 เครื่องปรับอากาศ เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงที่พืชสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

3. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตรมูราซิก และสคก (MS)
- 3.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต กลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ Benzyladenine (BA)
- 3.3 สารละลายแอลกอฮอล์
- 3.4 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- 3.5 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)
- 3.6 สารโคลชิซิน
- 3.7 น้ำตาลซูโครส
- 3.8 ผงวุ้น

อาหารสังเคราะห์และวิธีการเตรียม

1. สูตรอาหารสังเคราะห์สำหรับชักนำยอดรวม

สูตรอาหารสังเคราะห์สำหรับการชักนำยอดรวมจากส่วนยอดตาหลาเป็นอาหารสังเคราะห์สูตร MS รวมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตระดับความเข้มข้นที่ต้องการ จึงเติมน้ำตาลซูโครสระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.7 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) หรือสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความ

เข้มข้น 0.1 นอร์มอล เติมผงวุ้นระดับความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลอมวุ้นให้ละลายเข้ากันดี ทำการแบ่งถ้ำอาหารใส่ขวด ๆ ละ 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น นำมาทิ้งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที

2. สูตรอาหารสังเคราะห์สำหรับชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของดาหลา

สูตรอาหารสังเคราะห์สำหรับชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของดาหลาได้แก่ อาหารเหลวสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ รวมด้วยสารละลายโคลชิซิน 5 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0, 250, 500, 750 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.7 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) หรือสารละลายโพตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จากนั้นทำการแบ่งถ้ำอาหารใส่ขวด ๆ ละ 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น นำมาทิ้งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที

ขั้นตอนการวางเลี้ยงและบันทึกผล

เมื่อวางเลี้ยงส่วนยอดดาหลาบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนยอดรวม เมื่อสามารถชักนำให้เกิดยอดรวมจำนวนมาก จึงทำการตัดแยกยอดรวมให้ออกมาเป็นยอดเดี่ยว ๆ จากนั้นนำส่วนยอดดังกล่าวมาวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ รวมด้วยสารละลายโคลชิซิน 5 ระดับ ได้แก่ 0, 250, 500, 750 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นำขวดที่วางเลี้ยงเรียบร้อยแล้วไปวางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำยอดดาหลาเข้าสู่เชื้อเชื้อ เทอาหารเหลวทิ้งไป จากนั้นทำการล้างสารละลายโคลชิซินออกจากชิ้นส่วนพืชด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง และนำยอดดาหลาที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินทุกระดับความเข้มข้นมาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และ

ผงวุ้นระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นำขวดที่วางเลี้ยงเรียบร้อยแล้วไปวางบนชั้นวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4, 8 และ 12 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองดังนี้

1. ร้อยละการเกิดยอดรวมของยอดดาหลาที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ
2. จำนวนยอดเฉลี่ยที่เกิดจากการวางเลี้ยงส่วนยอดดาหลาที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ
3. วัดความยาว และความกว้างปากใบของดาหลาที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ
4. นับจำนวนปากใบของดาหลาที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ

การทดลองได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) โดยมีจำนวนทรีตเมนต์เท่ากับ 5 ทรีตเมนต์ ดังนี้

- | | |
|----------------|--|
| ทรีตเมนต์ที่ 1 | แช่ส่วนยอดในน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) |
| ทรีตเมนต์ที่ 2 | แช่ส่วนยอดในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร |
| ทรีตเมนต์ที่ 3 | แช่ส่วนยอดในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร |
| ทรีตเมนต์ที่ 4 | แช่ส่วนยอดในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 750 มิลลิกรัมต่อลิตร |
| ทรีตเมนต์ที่ 5 | แช่ส่วนยอดในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร |

แต่ละทรีตเมนต์ทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 20 ยอด เมื่อทำการเก็บรวบรวมข้อมูลทั้งหมดแล้ว นำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อหาค่าความแตกต่างทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan 's New Multiple Range TEST (DMRT)



ภาพที่ 3.2 ลักษณะยอดดาดาลาที่ใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 3.3 ลักษณะการแช่ยอดดาดาลาในสารละลายโคลชิซิน

บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย

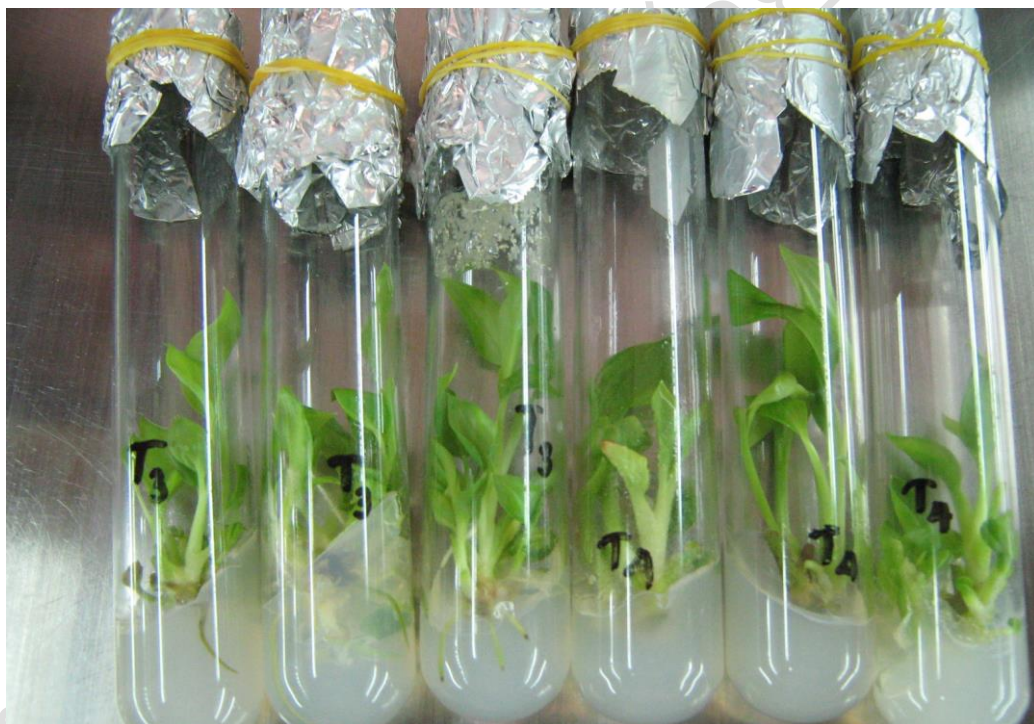
การศึกษาผลของสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของดาหลา โดยการนำยอดดาหลามาแชในอาหารเหลวสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วยสารละลายโคลชิซิน 5 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0, 250, 500, 750 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำยอดดาหลาล้างสารละลายโคลชิซินออกด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำยอดดาหลาที่ผ่านการแชในสารละลายโคลชิซินทุกระดับความเข้มข้นมาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้นระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ได้ทำการบันทึกความสามารถในการเกิดยอดรวมของยอดดาหลาที่ผ่านการแชในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่ายอดดาหลาที่ผ่านการแชในสารละลายโคลชิซินทุกระดับความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ดี และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่ทำการทดลอง เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินพบว่าร้อยละของการเกิดยอดรวมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และสูงสุดที่สารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 500 และ 750 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้ร้อยละของการเกิดยอดรวมเท่ากันคือร้อยละ 100 เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินสูงขึ้นเป็น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าร้อยละของการเกิดยอดรวมเริ่มลดลง (ตารางที่ 4.1)

ในกรณีของจำนวนยอดที่เกิดขึ้น พบว่าการวางเลี้ยงยอดดาหลาที่ไม่ได้ผ่านการแชในสารละลายโคลชิซินให้จำนวนยอดต่ำสุดเฉลี่ย 2.75 ยอดต่อหนึ่งชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงยอดดาหลาที่ผ่านการแชในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ประสิทธิภาพการเกิดยอดรวมสูงสุดโดยให้จำนวนยอดรวมเฉลี่ยเท่ากับ 3.80 ยอดต่อหนึ่งชิ้นส่วนที่วางเลี้ยง รองลงมาคือยอดที่ผ่านการแชในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 500, 1,000 และ 750 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ให้ความสามารถในการเกิดยอดรวมเท่ากับ 3.48, 3.03 และ 2.78 ยอด ผลการทดลองที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการเกิดยอดรวมของดาหลาที่ผ่านการแช่ในสารละลาย
โคลชิซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

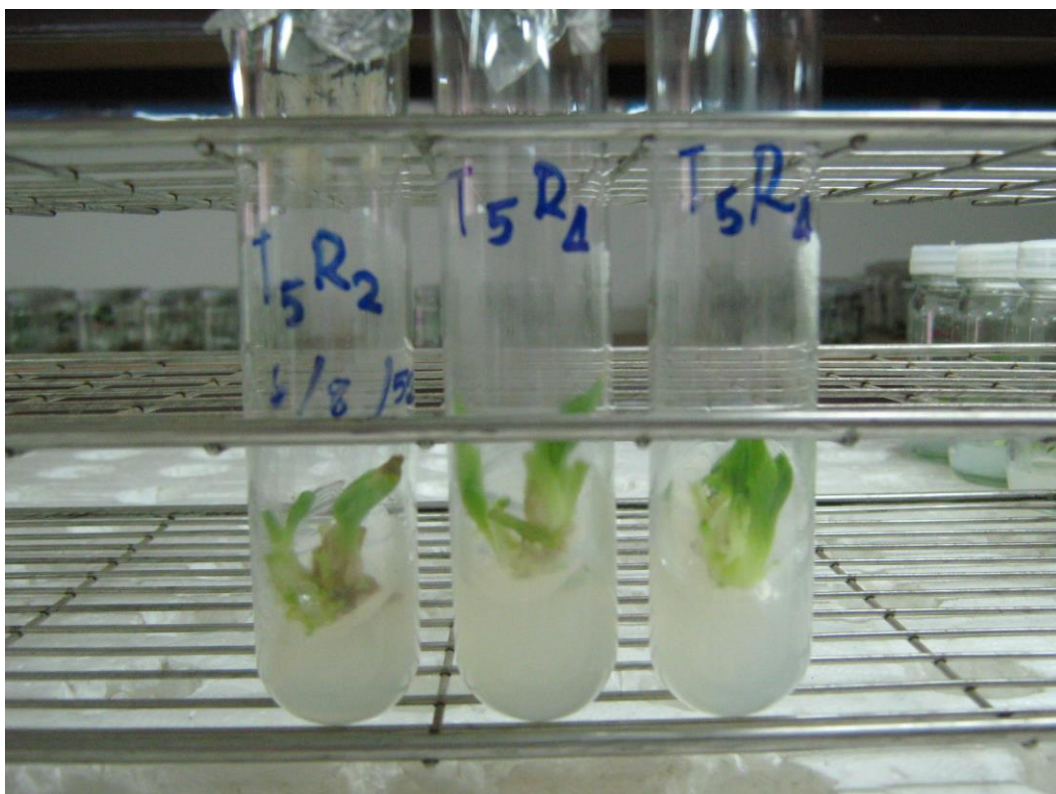
ความเข้มข้นของสารละลาย โคลชิซิน(มก/ล)	ลักษณะที่บันทึก	
	ร้อยละการเกิดยอดรวม	จำนวนยอดเฉลี่ย
0	93.75	2.75 ^b
250	95.00	3.80 ^a
500	100.00	3.48 ^{ab}
750	100.00	2.78 ^b
1,000	95.00	3.03 ^b
CV (%)	8.72	14.66

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's
New Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 4.1 จำนวนยอดรวมของดาหลาที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ผ่านการ
แช่สารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 750 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพของยอดใหม่ที่เกิดขึ้นจากยอดดาดหาลาที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำมาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้นระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายอดใหม่ที่เกิดขึ้นจากยอดดาดหาลาที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงระดับความเข้มข้นเดียวเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพเกิดขึ้น กล่าวคือลำต้นเตี้ย แคระแกร็น อวบวม ส่วนการเปลี่ยนแปลงลักษณะของใบมีขนาดของใบเล็กลง ใบแคบเรียว เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่น ๆ (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 ยอดตาหลาที่เกิดขึ้นจากยอดที่ผ่านการแช่สารละลายโคลชิซิน
ระดับความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อนำใบตาหลาจากยอดใหม่ที่เกิดจากยอดที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินทุกระดับความเข้มข้นมาทำการตรวจวัดขนาดของปากใบ ทำโดยการลอกแผ่นใบให้มีขนาดบางที่สุด จากนั้นทำการตัดส่วนแผ่นใบที่ลอกมาวางบนแผ่นสไลด์หยดด้วยน้ำสะอาดปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ และทำการวัดความกว้างและความยาวของปากใบ จากการทดลองพบว่าใบของยอดใหม่ที่เกิดจากยอดที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความกว้างปากใบมากกว่าระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง แต่ทุกระดับความเข้มข้นให้ผลไม่มีแตกต่างทางสถิติ กล่าวคือที่ระดับความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร วัดความกว้างของปากใบเฉลี่ย 0.024 มิลลิเมตร รองลงมาคือใบของยอดใหม่ที่เกิดจากยอดที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 250, 750 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีความกว้างของปากใบเท่ากับ 0.024,

0.023 และ 0.021 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในกรณีของยอดใหม่ที่เกิดจากยอดดาหลาที่ไม่ได้ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินมีความกว้างของปากใบน้อยที่สุดเท่ากับ 0.021 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.2 ภาพที่ 4.3-4.7)

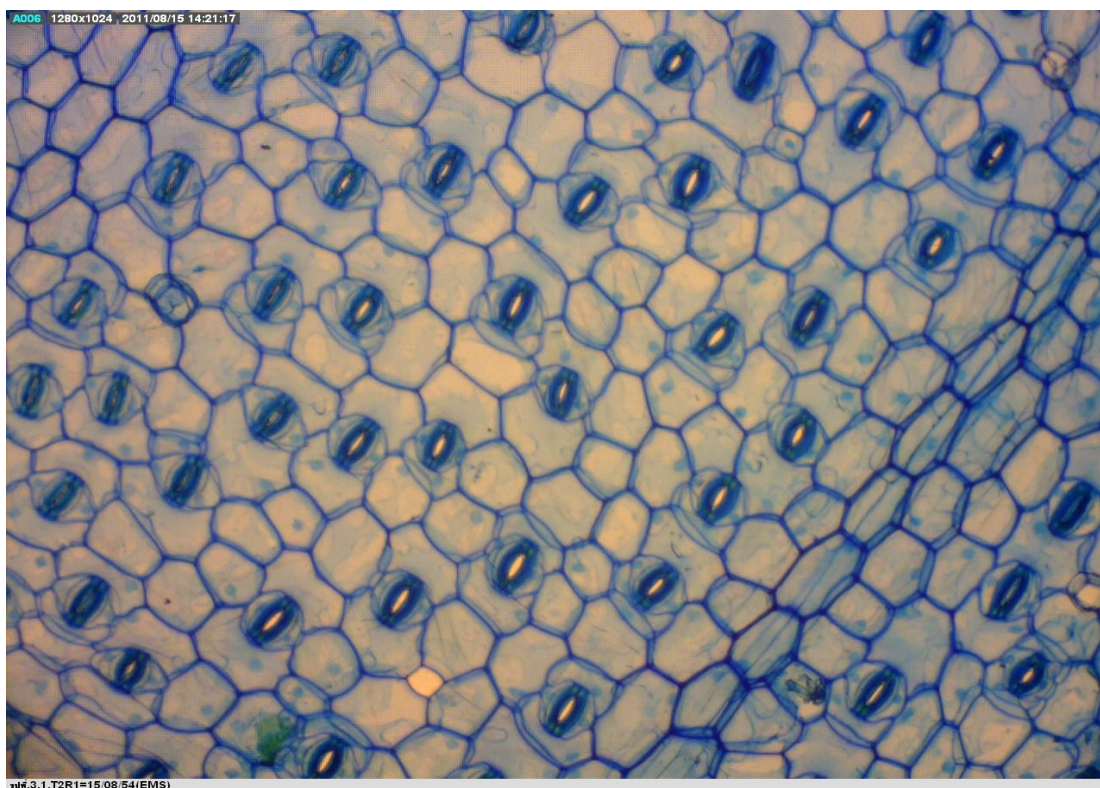
กรณีความยาวของปากใบพบว่ายอดใหม่ที่เกิดจากยอดดาหลาซึ่งผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 750 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวของปากใบมากที่สุดเท่ากับ 0.030 มิลลิเมตร ให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ทดสอบระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์กับระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง กล่าวคือยอดใหม่ที่ชักนำได้จากยอดดาหลาที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 750 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้มีความยาวปากใบมากที่สุดเฉลี่ย 0.030 มิลลิเมตร รองลงมาคือยอดที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 1,000, 500 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีความยาวของปากใบเท่ากับ 0.027, 0.024 และ 0.023 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ขนาดความกว้างและความยาวของปากใบดาหลาจากยอดที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

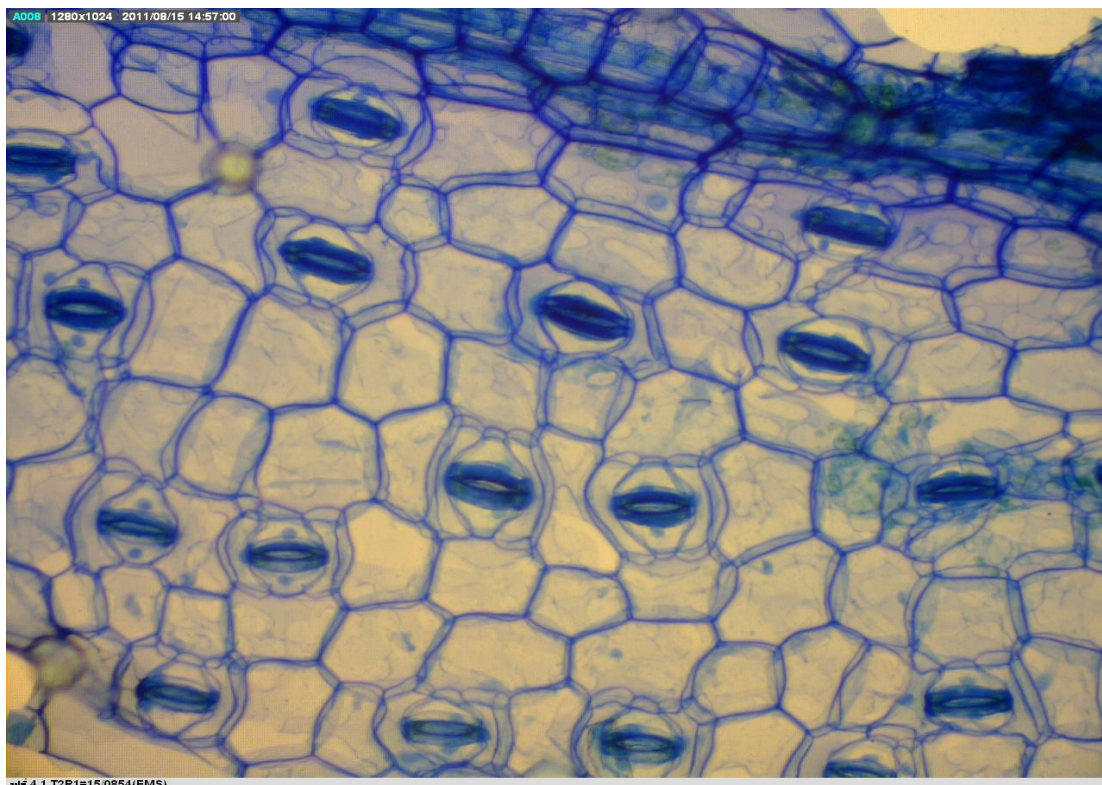
ความเข้มข้นของสารโคลชิซิน (มก./ล.)	ความกว้างของปากใบ	ความยาวของปากใบ
---------------------------------------	-------------------	-----------------

0	0.021	0.025 ^{bc}
250	0.024	0.023 ^c
500	0.021	0.024 ^{bc}
750	0.023	0.030 ^a
1,000	0.024	0.027 ^b
CV (%)	8.76	7.62

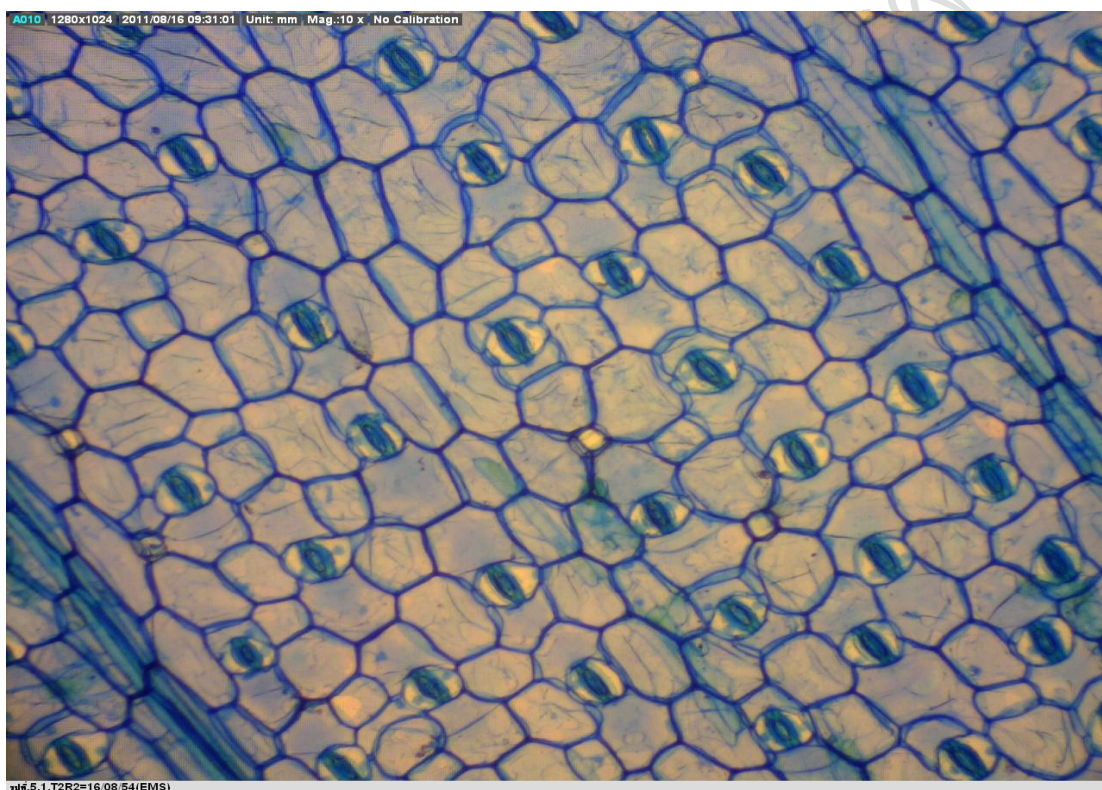
หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's
New Multiple Range Test (DMRT)



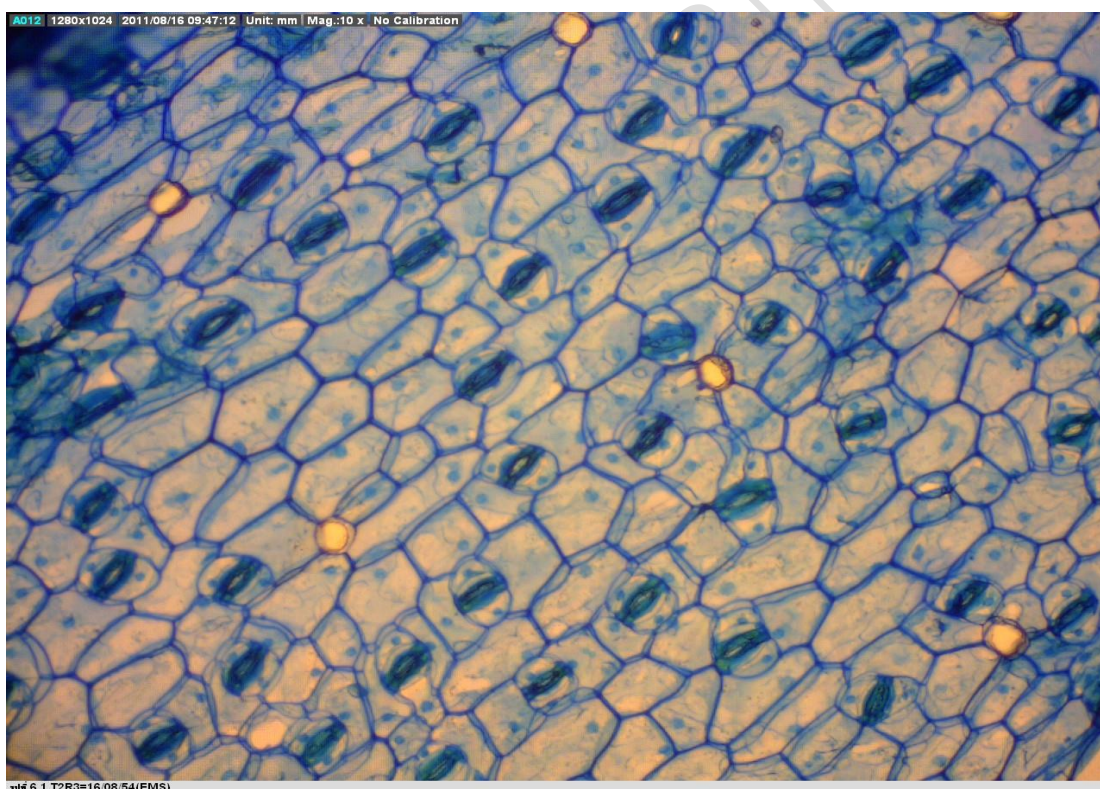
ภาพที่ 4.3 ลักษณะของปากใบจากยอดตากล้าที่ไม่ผ่านการแช่สารโคลชิซิน (กำลังขยาย 10X)



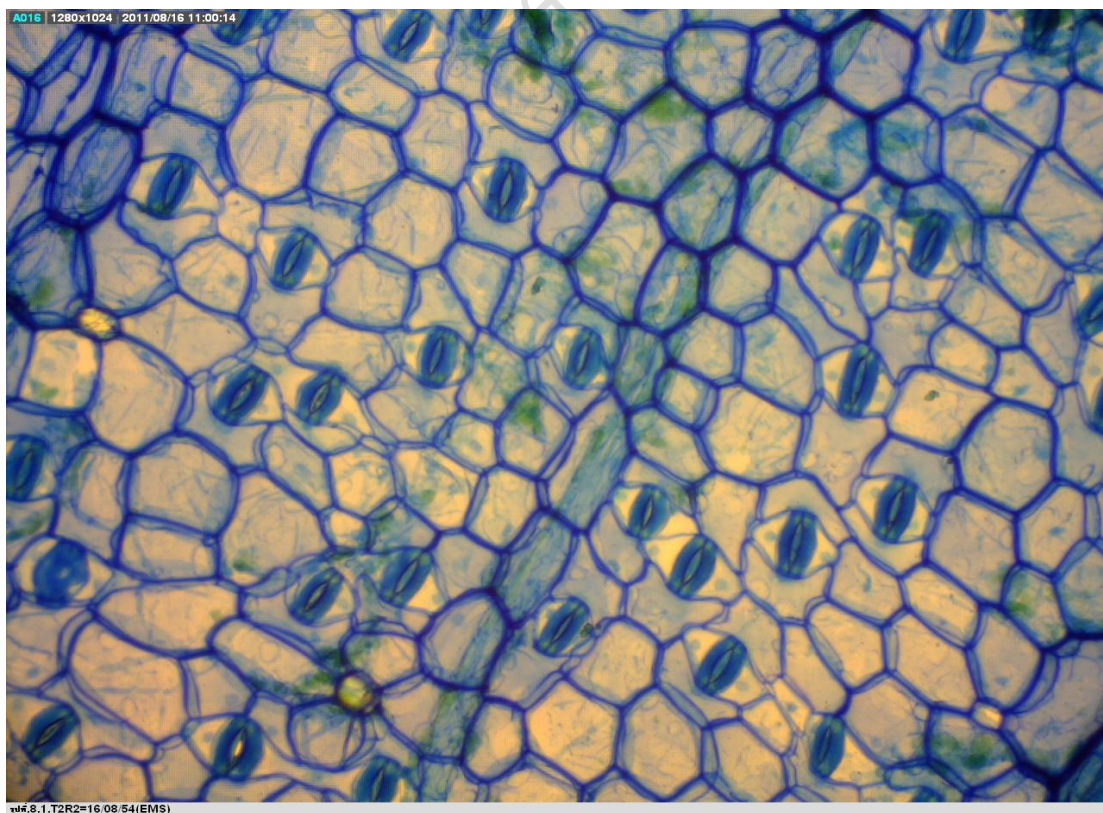
ภาพที่ 4.4 ลักษณะของปากใบจากยอดดาหลาที่ผ่านการแช่สารโคลชิซินความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร (กำลังขยาย 10X)



ภาพที่ 4.5 ลักษณะของปากใบจากยอดดาหลาที่ผ่านการแช่สารโคลชิซินความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (กำลังขยาย 10X)



ภาพที่ 4.6 ลักษณะของปากใบจากยอดดาหลาที่ผ่านการแช่สารโคลชิซินความเข้มข้น 750 มิลลิกรัมต่อลิตร (กำลังขยาย 10X)



ภาพที่ 4.7 ลักษณะของปากใบจากยอดดาหลาที่ผ่านการแช่สารโคลชิซินความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (กำลังขยาย 10X)

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

บทที่ 5

สรุปผลและอภิปรายผล

ดาหลาเป็นไม้ดอกที่มีศักยภาพในการปลูกเพื่อเป็นไม้ตัดดอกของพื้นที่สามจังหวัดชายแดนภาคใต้เนื่องจากพื้นที่ดังกล่าวมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของดาหลา นอกจากนี้พื้นที่ว่างระหว่างแถวยางพาราโดยส่วนใหญ่ของพื้นที่แถบนี้ยังมิได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างเต็มประสิทธิภาพ จึงเหมาะสมอย่างยิ่งที่ภาครัฐจะหันมาให้ความสำคัญกับไม้ดอกพื้นเมืองชนิดนี้ และส่งเสริมให้มีการปลูกดาหลาเป็นการค้าอย่างจริงจัง เพราะนอกจากจะได้ใช้พื้นที่ว่างระหว่างแถวยางพาราให้เกิดประโยชน์สูงสุดแล้ว หากเกษตรกรปลูกดาหลาเป็นพืชร่วมยางจะสามารถประหยัดต้นทุนในการจัดทำวัสดุพรางแสงเพราะดาหลาใช้ร่มเงาของยางพาราทดแทนได้ แต่การจะเปลี่ยนค่านิยมของผู้บริโภคให้หันมาสนใจ และเลือกใช้ดอกดาหลาในงานต่าง ๆ แทนไม้ดอกที่นำเข้าจากต่างประเทศนั้นตลาดต้องมีทางเลือกที่หลากหลายสำหรับผู้บริโภค ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ดาหลาเพื่อให้ความหลากหลายของสี สัน และพัฒนาคุณภาพดอกให้มีความทนทานเพื่อลดการสูญเสียในระหว่างการขนส่งเป็นสิ่งที่จะต้องเร่งกระทำ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการเลือกใช้สารก่อกลายพันธุ์ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาทดลองปรับปรุงพันธุ์ดาหลา สารก่อกลายพันธุ์ที่เลือกใช้คือสารโคลชิซิน โดยทำการศึกษาผลของสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของดาหลา เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ดาหลา การทดลองได้นำยอดดาหลาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาแช่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารละลายโคลชิซิน 5 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0, 250, 500, 750 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแช่ไว้บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำยอดดาหลามาล้างสารละลายโคลชิซินออกด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง และนำยอดดาหลาที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินทุกระดับความเข้มข้นมาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้นระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าสารละลายโคลชิซินไม่มีผลยับยั้งกระบวนการชักนำการสร้างยอดใหม่ เนื่องจากทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินสามารถเกิดยอดใหม่ได้ โดยร้อยละของการเกิดยอดรวมไม่แตกต่างกันทางสถิติ สารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 500 และ 750 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพชักนำการเกิดยอดรวมสูงสุดร้อยละ 100 ในกรณีของจำนวนยอดที่ชักนำได้พบว่าสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถ

ชักนำการเกิดยอรวมเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 3.80 ยอด ซึ่งการทดลองใช้สารละลายโคลชิซินกับดาหลาเพื่อการปรับปรุงพันธุ์มีรายงานในวารสารทางวิชาการจำนวนน้อย แต่มีการใช้สารละลายโคลชิซินกับไม้ผลเช่น มังคุด โดยสมปอง เตชะโต และราตรี สุจรรย์ (2542) ทำการทดลองเพาะเลี้ยงตายอดมังคุดบนอาหารวิทยาศาสตร์สูตร MS ที่มีสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินเป็น 1,000 – 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ร้อยละของการสร้างยอดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองข้างต้นเนื่องจากสารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ร้อยละของการเกิดยอรวมลดลงเช่นเดียวกัน

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของดาหลา ที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ายอดดาหลาที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของยอดใหม่ที่เกิดขึ้นเพียงระดับความเข้มข้นเดียวนั้น โดยเมื่อสังเกตจะเห็นว่ายอดใหม่ที่เกิดขึ้นจะมีความสูงน้อยมาก ยอดแคระแกร็น อวบวม ใบแคบและเรียว ได้มีรายงานของสมปอง เตชะโตและราตรี สุจรรย์ (2543) กล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเนื้อเยื่อแคลลัสมังคุดจากการแช่ในสารละลายโคลชิซินเช่นกัน แต่ระดับความเข้มข้นที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทำให้ขนาดของยอด พื้นที่ใบ และจำนวนใบลดลง คือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าระดับความเข้มข้นของงานทดลองครั้งนี้มาก

นอกจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของยอดดาหลาที่เกิดขึ้นใหม่จากยอดที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แล้ว ได้มีการนำใบดาหลามาทำการตรวจวัดขนาดของปากใบ เปรียบเทียบกันในแต่ละระดับความเข้มข้นที่ทำการทดลองด้วย ผลการตรวจวัดขนาดของปากใบ พบว่าความกว้างและความยาวของปากใบจากยอดที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินระดับความเข้มข้น 1,000 และ 750 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความกว้าง และความยาวของปากใบสูงสุดเฉลี่ย 0.024 และ 0.030 มิลลิเมตรตามลำดับ ส่วนใบจากยอดดาหลาที่ไม่ได้ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินมีความกว้างของปากใบน้อยที่สุดเฉลี่ย 0.021 มิลลิเมตร ผลการทดลองที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้พบว่าสารละลายโคลชิซินสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของดาหลาได้ในระดับหนึ่ง ระดับความเข้มข้นที่ใช้อาจต่ำเกินไปจึงทำให้ผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นไม่ชัดเจน หากมี

การนำข้อมูลที่ได้จากรายงานวิจัยฉบับนี้ไปใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ดาหลาต่อไป ควรเลือกใช้สารละลายโคลชิซินในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นเพื่อประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์ดาหลาต่อไป

สรุปผล 1) สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 500 และ 750 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ส่วนยอดดาหลาเกิดยอดรวมได้สูงสุดร้อยละ 100

2) สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ส่วนยอดดาหลาสร้างยอดใหม่ได้จำนวนสูงสุดเฉลี่ย 3.80 ยอดต่อหนึ่งชิ้นส่วน

3) ชิ้นส่วนยอดที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอดที่มีลักษณะผิดปกติไปจากเดิมคือให้ยอดที่แคระแกร็น อวบวม ใบแคบเรียว

4) สารละลายโคลชิซินทุกระดับความเข้มข้นไม่ทำให้ความกว้างของปากใบมีความแตกต่างกันทางสถิติ

5) สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 750 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ความยาวของปากใบสูงสุด 0.030 มิลลิเมตร แตกต่างทางสถิติกับระดับความเข้มข้นอื่น ๆ

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตรอาหาร MS

ชื่อสารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มก/ล)
แอมโมเนียมไนเตรท($\text{NH}_4 \text{NO}_3$)	1,650.00
แคลเซียมคลอไรด์($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	440.00
แมกนีเซียมซัลเฟต($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370.00
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต($\text{KH}_2 \text{PO}_4$)	170.00
โปตัสเซียมไนเตรท(KNO_3)	1,900.00
กรดบอริก($\text{H}_3 \text{BO}_3$)	6.20
โคบอลคลอไรด์($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.02
คอปเปอร์ซัลเฟต($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.02
แมงกานีสซัลเฟต(MnSO_4)	16.90
โปตัสเซียมไอโอไดร์(KI)	0.83
โซเดียมโมลิบเดต($\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.25
ซิงค์ซัลเฟต($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	6.14
โซเดียมเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซีเตท($\text{Na} - \text{EDTA}$)	37.30
เฟอร์รัสซัลเฟต($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.027
ไกลซีน	27.80
อินโนซิทอล	2.00
กรดนิโคตินิก	100.00
ไพริดอกซีน HCL	0.50
ไรฮามีน HCL	0.50
น้ำตาลซูโครส	30,000.00

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

เอกสารอ้างอิง

- ชะลอ ดวงดารา. (2542). **ไม้ดอกประเภทหัว**. คณะเกษตรและอุตสาหกรรม สถาบันราชภัฏ
รำไพพรรณี จันทบุรี. หน้า 151-159.
- ณัฐชานันท์ พันธุ์อิม และ ณัฐา โพชาธรณ์. (2550). **จำนวนโครโมโซมของงาที่ผ่านการ
ฉายรังสีด้วย วิธีการเพิ่มชุดโครโมโซม โดยใช้โคลชิซิน**. วารสารเกษตร. 23 (3) :
237-241
- นคร สารวัตร และจรัสศรี นวลศรี. (2550). **การชักนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมใน
มะนาวฝรั่งโดยใช้สารโคลชิซิน**. วารสารวิชาการเกษตร. 25(3) : 240-253.
- นพพร สายัมพล. (2543). **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ:
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 121-122.
- ประดิษฐ์ พงทองคำ. (2549). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์พืช**.
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี
พริยuth บุญมีรอด. (2535). **ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของโคลชิซินที่มีผลต่อการชักนำ
ให้เกิดพอลิพลอยดีในแตงโมพันธุ์ชูการ์เบบี้ในหลอดทดลอง**. รวมบทความย่อ
วิทยานิพนธ์. หน้า 494
- รัชนก โคโต, ศิริพร ศรีภิญโญวณิช, สนธิชัย จันท์เปรม และศรีนศิริ จันท์เปรม. (2549).
**การชักนำให้เกิดความแปรปรวนในลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผักเป็ด โดย
การใช้รังสีแกมมามาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. วิทยาสารกำแพงแสน 4 (1) :
34-40
- ราตรี ไกรสิทธิ์. (2546). **ผล-เมล็ดในประเทศไทย**. จ.นครปฐม. สำนักพิมพ์เพชรเกษม
การพิมพ์. สถาบันราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง. หน้า 44-45
- วีรภัทร ทิพย์วารี และณัฐา โพชาธรณ์. (2553). **ผลของโคลชิซินต่อการเติบโตของ
โปรโตคอร์มเอื้องดินใบหมาก**. วารสารเกษตร. 26 (1) : 27-34.
- สมปอง เตชะโต และราตรี สุจารีย์. (2542). **การชักนำการกลายพันธุ์มั่งคุดโดยใช้สาร
โคลชิซินกับใช้ตายอดที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง**. วารสารวิทยาศาสตร์. 21 (2)
: 155-167
- สมปอง เตชะโต และราตรี สุจารีย์. (2543). **ผลของโคลชิซินที่ให้กับแคลล์มั่งคุดต่อการ**

เปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา. วารสารสงขลานครินทร์. 22 (3) :
279-286

สมปอง เตชะโต และธัญญาพร สุสานนท์ . (2548) . การกลายพันธุ์ของดอกหน้าวัว
พันธุ์วาเลนติโนที่ผ่านการชักนำด้วยเอทิลมีเทนซัลโฟเนต.

วารสารสงขลานครินทร์. 27 (พิเศษ 3) : 675-682.

ศิริญา ม่วงสอน และสมปอง เตชะโต. (2551). การใช้ EMS เพื่อชักนำการกลายพันธุ์ใน
กล้วยไม้เหลืองจันทร์. วารสารเกษตร. 24 (2) : 153 – 164

อนันต์ พุทธิยาสถาพร และวิมล ขวัญเกื้อ. (2533). การชักนำให้เกิดโพลีพลอยดีในพริก
โดยใช้สารโคลชิซิน. รวมบทความผลงานวิจัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

หน้า 53 - 54

อภิชาติ ชิตบุรี. (2542). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการปรับปรุงพันธุ์ดาหลา.

รายงานความก้าวหน้างานวิจัย สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง
สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล จังหวัดลำปาง.

อรดี สหวัชรินทร์. (2522). การขยายพันธุ์ไม้ประดับโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.

กรุงเทพมหานคร: นานาสาสน.

อรุณี วงศ์ปิยะสกลิต. (2550). การปรับปรุงพันธุ์: เพื่อการปรับปรุงพันธุ์. กรุงเทพฯ:
หน้า 101-108.

อัญญาณี จันทร์ภักดี และสมปอง เตชะโต. (2553). ผลของสารโคลชิซินต่ออัตราการ
รอดชีวิต ลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของหน้าวัวพันธุ์

Micky Mouse. วารสารเกษตร. 26(1):15-25.

Lekawatana, S. and O. Pituck. (1998). New floricultural crops in Thailand.
Acta Hort. 454:59-64.

Sahagun, J. R. (2005). Chromosome doubling in *Dendrobium anosmum*
using colchicines. Philippine J. of Crop Science. 30:49.