บทความวิจัย

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในถั่วเขียวผิวมัน พันธุ์อู่ทอง 1 โดยใช้สารโคลชิซิน

Colchicine Induced Polyploidy in *Vigna radiata* (L.) Wilczek var. U-Thong 1

มยุรี แก้วภู่ วท.ม.(ชีววิทยา)
Mayuree Kaewpoo B.Ed. (Biological Sciences)
นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ
Master Student of Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Songkhla, 90000

อรุณรัศมิ์ วณิชชานนท์ ปร.ด. (พันธุศาสตร์พืช)
Arunrut Vanichanon Ph.D. (Plant Genetics)
อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ
Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Songkhla, 90000

ประดิษฐ์ ตั้งสกุล ปร.ด. (ชีววิทยา)
Pradit Tungskul Ph.D.(Biological Sciences)
อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ
Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Songkhla, 90000

Key Words : *Vigna radiata* (L.) Wilczek var. U-Thong 1, Colchicine, Polyploidy

Abstract

The Colchicine induced polyploidy in *Vigna radiata*(L.) Wilczek var. U-Thong 1 was conducted with various concentrations and duration of time. The results show that the concentration of 0.25% colcicines lasted for 6 days gave the higher frequency (30%) of polyploid while the 0.5% colchicines for 2 days yielded the lowest frequency (5%). The other treatments show positive induction.

The ploypoid plant show several distinct morphology such as thicker and largerleaves with dark green color, bigger size in seeds, flowers, pollen grain and guard cells of stomata, delaying in flowering

and fruiting. The chromoxome count of polyploid plant show higher number compand to the diploid plant.

บทคัดย่อ

ในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในถั่วเขียวผิวมันพันธุ์อู่ทอง 1 โดยใช้สารโคลชิซินที่มีความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ กัน พบว่าที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 6 วัน ให้ต้นโพลีพลอยด์สูงสุด คือ 30% ส่วนที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 4 วัน 0.5% นาน 2 วัน 0.5% นาน 4 วัน 1.0% นาน 1 วัน 1.0% นาน 2 วัน สามารถชักนำให้เกิดต้นโพลีพลอยด์ ได้ 25 15 5 15 และ 10% ตามลำดับ เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นโพลีพลอยด์ พบว่า ใบหนา อวบ ผิวใบไม่เรียบ ขอบใบหยัก ขนาดใบใหญ่ มีสีเขียวเข้ม เมล็ดใหญ่แต่การติดเมล็ดลดลง ดอกมีขนาดใหญ่ ลำต้นอวบ สูง การติดดอกออกผลช้า ขนาดเซลล์ปากใบ และละอองเรณูมีขนาดใหญ่จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น

คำนำ

ถั่วเขียวผิวมัน (*Vigna radiata*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมีการปลูกและใช้ประโยชน์กันแพร่หลายทั่วโลก ตลาดส่วนใหญ่นำไปใช้ในการทำถั่วงอก อุตสาหกรรมทำวุ้นเส้น ทำถั่วซีกและแป้งถั่วเขียว(วันชัย, 2542) ในประเทศไทยถั่วเขียวผิวมันพันธุ์อู่ทอง 1 เป็นพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงและขึ้นทะเบียนเมื่อ พ.ศ.2519 ทำให้มีพื้นที่ปลูกถั่วเขียวผิวมันเพิ่มขึ้นมากมาย(นันทวรรณ, 2540) เกษตรกรส่วนใหญ่ปลูกถั่วเขียวมันเป็นพืชเสริมรายได้ และมักเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้ใช้เอง ซึ่งเมล็ดพันธุ์ส่วนใหญ่ไม่มีการจัดการที่ดี เมล็ดพันธุ์ที่ได้มีคุณภาพต่ำและมีขนาดเล็ก เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตเฉลี่ยต่ำ สำหรับการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์(polyploid) เป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชวิธีหนึ่งที่ประสบผลสำเร็จในพืชหลายชนิด เนื่องจากพืชที่เป็นโพลีพลอยด์จะมีเซลล์ขนาดใหญ่ ทำให้ส่วนต่างๆ ของพืชมีขนาดใหญ่ขึ้น เป็นการปรับปรุงทั้งคุณภาพและปริมาณของผลผลิต ถั่วเขียวที่เป็นโพลีพลอยด์คาดว่าจะมีเมล็ดขนาดใหญ่ขึ้นและมีองค์ประกอบของสารต่างๆ ในเมล็ดสูงขึ้น Zhao Gang และคณะ(1995) รายงานการใช้สารละลายโคลชิซินหยดที่ยอดอ่อนข้าวบัคฮวีท สามารถให้ต้นออโตเตตระพลอยด์ที่มี ก้านใบแข็งแรง เมล็ดใหญ่ ลำต้นสูง สุพรรณญิกา(2539) รายงานการเพาะเลี้ยงหน่ออ่อนข้าวลูกผสมบนอาหาร MS ร่วมกับสารละลายโคลชิซิน พบว่าสามารถชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมและติดเมล็ดได้ จากการศึกษาของจักรกฤษณ์ และคณะ(2545) โดยการแช่เมล็ดผักคะน้าในสารละลายโคลชิซิน พบว่าให้ต้นโพลีพลอยด์ มีขนาดลำต้นและใบใหญ่สีเขียวเข้มขึ้น และจากรายงานของ Rey และคณะ (2002) โดยการนำเอมบริโอของ *Ilex paraguariesis* St. แช่ในสารละลายโคลชิซินและนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นเตตระลอยด์

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโคลชินที่มีต่อการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในถั่วเขียวโดยใช้สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ กัน เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางพฤกษศาสตร์และเซลล์วิทยาบางอย่างของถั่วเขียวที่เป็นดิพลอยด์และถั่วเขียวที่เป็นโพลีพลอยด์ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพของถั่วเขียวผิวมันพันธุ์อู่ทอง 1 เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีเมล็ดใหญ่ขึ้น เพื่อสร้างแนวทางวิจัยการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในพืชอื่นๆ ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวผิวมันพันธุ์อู่ทอง 1 (ได้รับจากเกษตรอำเภอ อ.บางปลาม้า จ.สุพรรณบุรี)
2. วัสดุสำหรับปลูกถั่วเขียว

3. สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.25 0.5 และ 1.0%
4. ยาฆ่าแมลง
5. สีอะซีโตคาร์มีน
6. ปุ๋ยคอกและปุ๋ยวิทยาศาสตร์สูตร 16-16-16 และ 12-24-12
7. สไลด์และกระจกปิดสไลด์
8. กล้องจุลทรรศน์และกล้องถ่ายภาพ

วิธีการ

ก. การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์

เตรียมดินสำหรับปลูกถั่วเขียวโดยคลุกเคล้าดินกับปุ๋ยคอกให้เข้ากัน ชั่งดินใส่ถุงๆ ละ 3 กิโลกรัม แบ่งเป็น 7 กลุ่มๆ ละ 10 ถุงๆ ละ 2 ต้น ดังนี้

1. กลุ่มที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน
2. กลุ่มที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 4 วัน
3. กลุ่มที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 6 วัน
4. กลุ่มที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.5% นาน 2 วัน
5. กลุ่มที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.5% นาน 4 วัน
6. กลุ่มที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 1.0% นาน 1 วัน
7. กลุ่มที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 1.0% นาน 2 วัน

เมื่อต้นถั่วเขียวงอกตุ่มใบที่ 3 ออกมา ใช้สำลีหุ้มส่วนตุ่มใบที่ 3 ของกลุ่มที่ 2-7 ไว้ แล้วหยดสารละลายโคลชิซิน 1 หยด ลงบนสำลี ตามความเข้มและระยะเวลาที่กำหนด โดยหยดในเวลาเช้า 1 หยด เที่ยง 1 หยด และเย็น 1 หยด เมื่อต้นถั่วเขียวอายุได้ 10 วันให้ใส่ปุ๋ยวิทยาศาสตร์สูตร 16-16-16 ถุงละ 1 ช้อนชา หลังจากนั้นอีก 10 วัน ใส่ปุ๋ยวิทยาศาสตร์สูตร 12-24-12 ถุงละ 1 ช้อนชา

บันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วเขียวที่ไม่ได้รับและได้รับสารโคลชิซิน และทำการถ่ายภาพ

ข. การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

นำเมล็ดถั่วเขียวจากกลุ่มที่ 1-7 ไปแช่น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเพาะในกระบะทรายผสมแกลบหรือขี้เถ้า อายุต้นถั่ว 4 วัน จึงตัดปลายรากยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ที่เวลา 10.00-14.00 น. (เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่สามารถเห็นจำนวนโครโมโซมได้ชัดเจนกว่าช่วงเวลาอื่น) แช่ในสารละลาย p- Paradich lorobenzene เป็นเวลา 9 ชั่วโมง เพื่อให้โครโมโซมหดสั้น หรืออยู่ในระยะเมตาเฟส (Metaphase) เพื่อที่จะนับและศึกษารูปร่างของโครโมโซม แล้วจึงเปลี่ยนมาแช่ในสารละลาย Acetic alcohol fixative (เอทธานอลความเข้มข้น 95% 3 ส่วน ผสมกับ กรดกลาเซียลแอซิติก 1 ส่วน) ที่เตรียมเสร็จใหม่ๆ ทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำไปแช่ในเอทธานอลความเข้มข้น 70% เก็บไว้ในตู้เย็น แล้วจึงนำไปศึกษาจำนวนโครโมโซมโดยการเตรียมสไลด์ แบบ Squash บันทึกผลโดยถ่ายภาพไว้

ค. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองทางสถิติแบบ Completely Randomized Desige(CRD) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 7 หน่วยการทดลอง ทำการปลูกถั่วเขียวหน่วยทดลองละ 10 กระถาง (ซ้ำ) ซึ่งไม่ได้รับและได้รับสารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ กัน แล้วนำค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับสารละลายโคลชิซินมาเปรียบเทียบกันโดยวิธี t-test

ผลการทดลอง

หลังจากหยดสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ กันที่ตุ่มใบของถั่วเขียว แล้วศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 6 วัน ให้ต้นโพลีพลอยด์สูงสุด คือ 30% ที่ความเข้มข้น 0.25%

นาน 4 วัน ได้ 25% ที่ความเข้มข้น 0.5% นาน 2 วัน และ 1.0% นาน 1 วัน ได้ 15% ที่ความเข้มข้น 1.0% นาน 2 วัน ได้ 10% และที่ความเข้มข้น 0.5% นาน 4 วัน ได้ 5% (ตารางที่ 1) และได้ทำการเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ของถั่วเขียวที่ไม่ได้รับและได้รับสารละลายโคลชิซิน(ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 1-7) ดังนี้

1. อายุวันออกดอกแรก

ถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 6 วัน มีอายุวันออกดอกแรกนานที่สุด 37.5 วัน เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินมีอายุออกดอกแรกซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (α=0.05) สำหรับต้นที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาอื่น มีอายุวันออกดอกแรกไม่แตกต่างกันทางสถิติกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน

2. อายุวันปลูกถึงวันติดฝักแรก

ถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 6 วัน มีอายุวันติดฝักแรกนานที่สุด 47.66 วัน เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(α=0.05) สำหรับต้นที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาอื่น มีอายุตั้งแต่เริ่มปลูกถึงวันติดฝักแรกไม่แตกต่างกันทางสถิติกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน

3. อายุตั้งแต่เริ่มปลูกถึงวันฝักแก่

ถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 6 วัน 1.0% นาน 1 วัน 1.0% นาน 2 วัน และ 0.25% นาน 4 วัน เมื่อเทียบอายุถึงวันฝักแก่กับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต (α=0.05) สำหรับต้นที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาอื่น มีอายุถึงวันฝักแก่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน

4. ความสูงวันแรกที่ดอกบาน

ถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.5% นาน 4 วัน 0.5% นาน 2 วัน 0.25% นาน 4 วัน และ 1.0% นาน 2 วัน เมื่อเทียบความสูงวันแรกที่ดอกบานกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(α=0.05) สำหรับถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาอื่น เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน มีความสูงวันแรกที่ดอกบานแตกต่างกันทางสถิติ

5. ความสูงวันติดฝัก

ถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 4 วัน 1.0% นาน 2 วัน 0.5% นาน 4 วัน และ 0.5% นาน 2 วัน เมื่อเทียบต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินมีความสูงวันติดฝักไม่แตกต่างกันทางสถิติ ลักษณะต้นเตี้ยสำหรับถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาอื่น มีความสูงวันติดฝักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(α=0.05) กับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน

ตารางที่ 1 การเกิดต้นที่คาดว่าเป็นโพลีพลอยด์(คิดเป็นร้อยละ)ของถั่วที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ กัน

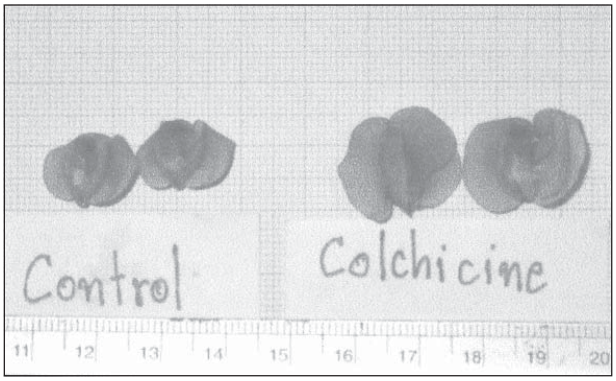
ความเข้มข้นสารโคลชิซิน(%)	ระยะเวลาการให้สาร(วัน)	เปอร์เซ็นต์ที่พบต้นที่คาดว่าเป็นโพลีพลอยด์
0.25	4	25
	6	30
0.5	2	15
	4	5
1.0	1	15
	2	10

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วที่เป็นดิพลอยด์และที่ได้รับสารโคลชิซิน

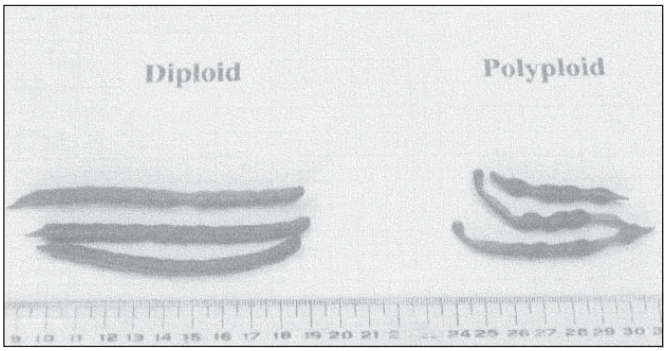
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ค่าเฉลี่ยของลักษณะที่ศึกษาในกลุ่มต่าง ๆ						
	1	2	3	4	5	6	7
1. ช่วงเวลาตั้งแต่วันปลูกถึงวันออกดอกแรก(วัน)	32.31	34.00a	37.50b	34.33a	34.00a	34.00a	32.50a
2. ช่วงเวลาตั้งแต่วันปลูกถึงวันติดฝักแรก(วัน)	42.75	44.40a	47.66b	45.33a	46.00a	45.00a	43.50a
3. ความสูงเมื่อวันแรกที่ดอกบาน(เซนติเมตร)	29.06	32.80a	35.08b	32.66a	27.00a	40.16b	30.25a
4. ความสูงเมื่อถึงวันติดฝักแรก(เซนติเมตร)	31.25	34.40a	36.66b	36.33a	35.50a	43.33b	34.75a
5. ความสูงเมื่อถึงวันฝักแก่(เซนติเมตร)	33.37	37.00a	38.83b	39.16b	45.00b	46.00b	37.25a
6. ขนาดของลำต้น(มิลลิเมตร)	11.62	12.20a	17.16b	14.66b	15.00b	14.00b	13.50b
7. ช่วงเวลาตั้งแต่วันปลูกถึงวันฝักแก่(วัน)	56.31	59.20b	63.66b	58.66a	60.00a	60.66b	60.00b
8. จำนวนกิ่งต่อต้น(กิ่ง)	3.87	3.60a	4.16a	4.33a	4.00a	4.33a	4.50a
9. จำนวนเมล็ดต่อฝัก	11.43	6.80a	6.16a	6.66a	8.00a	7.00a	8.00a
10. จำนวนฝักต่อต้น	15.43	11.80a	10.83a	11.66a	11.00a	12.30a	12.00a
11. ความกว้างของ Pollen grain(ไมโครเมตร)	38.18	44.20b	45.96b	44.00b	45.40b	45.00b	44.20b
12. ความยาวของ Pollen grain(ไมโครเมตร)	40.50	40.80b	49.86b	50.26b	50.40b	49.13b	49.20b
13. ความกว้างของเซลล์ปากใบ(ไมโครเมตร)	14.59	16.34a	17.08b	16.83a	21.80b	23.20b	17.30a
14. ความยาวของเซลล์ปากใบ(ไมโครเมตร)	26.07	29.40b	32.25b	32.73b	49.20b	43.66b	36.35b
15. ความกว้างของใบ(เซนติเมตร)	4.50	5.53b	5.42b	5.70b	6.11b	6.38b	4.91a
16. ความยาวของใบ(เซนติเมตร)	6.88	8.07b	8.58b	9.06b	6.23a	9.71b	8.01b

a แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
b แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

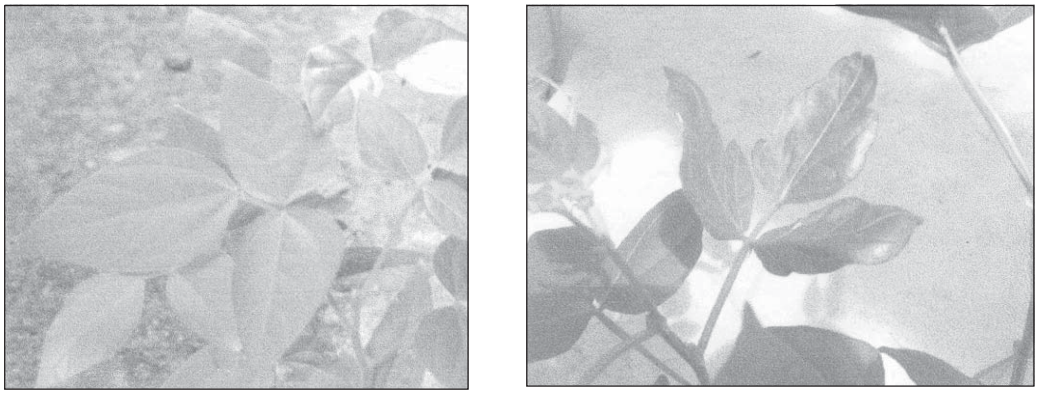
หมายเหตุ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม
กลุ่มที่ 2 ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 4 วัน
กลุ่มที่ 3 ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 6 วัน
กลุ่มที่ 4 ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.5% นาน 2 วัน
กลุ่มที่ 5 ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.5% นาน 4 วัน
กลุ่มที่ 6 ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 1.0% นาน 1 วัน
กลุ่มที่ 7 ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 1.0% นาน 2 วัน



ภาพที่ 1 เปรียบเทียบขนาดดอกระหว่างต้นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์

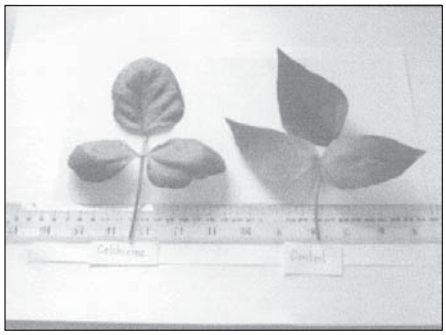


ภาพที่ 2 เปรียบเทียบขนาดฝักระหว่างต้นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์



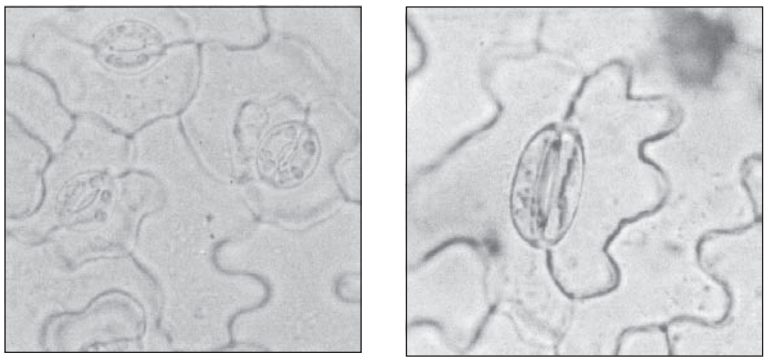
ก.ดิพลอยด์ ข.โพลีพลอยด์

ภาพที่ 3 เปรียบเทียบลักษณะใบระหว่างต้นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์



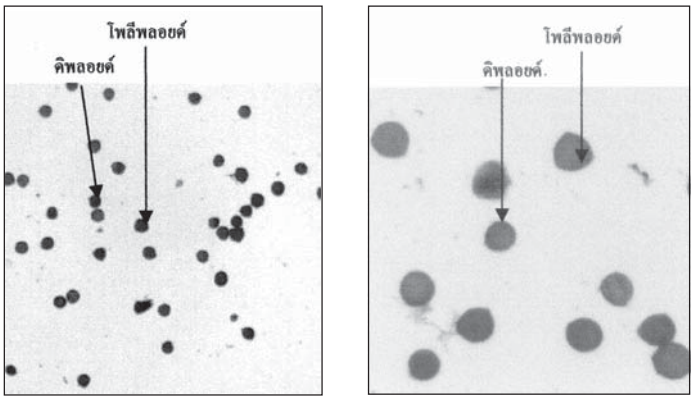
(ซ้าย) โพลีพลอยด์ (ขวา) ดิพลอยด์

ภาพที่ 4 เปรียบเทียบลักษณะใบระหว่างต้นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์



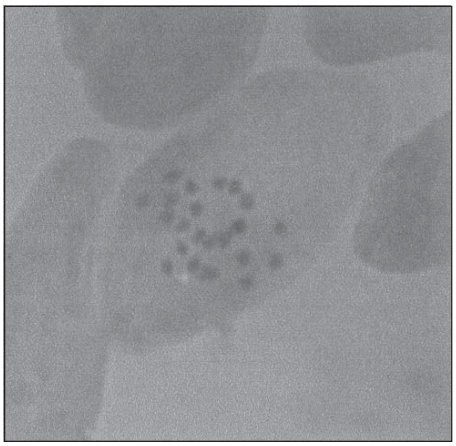
ก.ดิพลอยด์ ข.โพลีพลอยด์

ภาพที่ 5 เปรียบเทียบขนาดเซลล์ปากใบจากต้นดิพลอยด์และโพลีพลอย์ จากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 330x

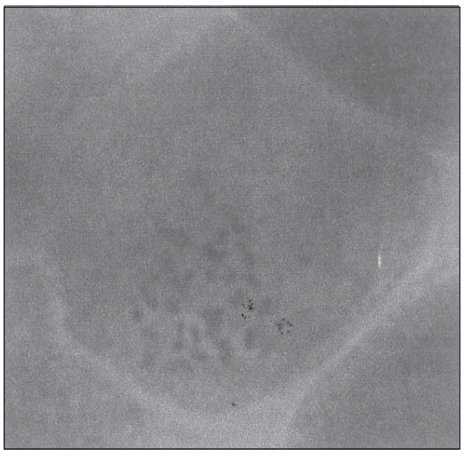


ก. ข.

ภาพที่ 6 เปรียบเทียบขนาด pollen grain ระหว่างต้นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์
จากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย ก. 13.2x ข. 33x



ก.ดิพลอยด์



ข.โพลีพลอยด์

ภาพที่ 7 จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก ก.จำนวนโครโมโซม 2n ข.จำนวนโครโมโซม 4n จากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 330x

6. ความสูงวันฝักแก่

ถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 4 วัน และ 1.0% นาน 2 วัน มีความสูงวันฝักแก่เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินไม่แตกต่างกันทางสถิติ ลักษณะต้นเตี้ย สำหรับถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาอื่น มีความสูงวันฝักแก่เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (α=0.05)

7. ขนาดของลำต้น

ถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 6 วัน 0.5% นาน 4 วัน 0.5% นาน 2 วัน 1.0% นาน 1 วัน และ 1.0 % นาน 2 วัน มีขนาดลำต้นเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (α=0.05)

8. ความกว้างของใบ

ถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 1.0% นาน 1 วัน 0.5% นาน 4 วัน 0.5% นาน 2 วัน 0.25% นาน 4 วัน และ 0.25% นาน 6 วัน มีความกว้างของใบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (α=0.05) กับต้นถั่วเขียวที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน

9. ความยาวของใบ

ถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 1.0% นาน 1 วัน 0.5% นาน 2 วัน 0.25% นาน 6 วัน 0.25% นาน 4 วัน และ 1.0% นาน 2 วัน มีความยาวของใบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (α=0.05) กับต้นถั่วเขียวที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน

10. ความกว้างของเซลล์ปากใบ

ถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิวินที่ความเข้มข้น 1.0% นาน 1 วัน 0.5% นาน 4 วัน และ 0.25% นาน 6 วัน มีความกว้างของเซลล์ปากใบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(α=0.05) กับต้นถั่วเขียวที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน

11. ความยาวของเซลล์ปากใบ

ถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ มีความยากของเซลล์ปากใบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(α=0.05) กับต้นถั่วเขียวที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน

12. จำนวนกิ่งต่อต้น

ถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ มีจำนวนกิ่งต่อต้นไม่แตกต่างกัน

อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (α=0.05) กับต้นถั่วเขียวที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน

13. ความกว้างของ Pollen grain

ถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ มีความกว้างของ Pollen grain แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (α=0.05) กับต้นถั่วเขียวที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน

14. ความยาวของ Pollen grain

ถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ มีความยาวของ Pollen grain แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(α=0.05) กับต้นถั่วเขียวที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน

15. จำนวนเมล็ดต่อฝัก

ถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ มีจำนวนเมล็ดต่อฝักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(α=0.05) กับต้นถั่วเขียวที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน

16. จำนวนฝักต่อต้น

ถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ มีจำนวนฝักต่อต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (α=0.05) กับต้นถั่วเขียวที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน

17. น้ำหนัก 100 เมล็ด

เมล็ดถั่วเขียวที่เป็นดิพลอยด์ น้ำหนัก 8.97 กรัม เมื่อเทียบกับต้นที่เป็นโพลีพลอยด์ น้ำหนัก 9.51 กรัม มีน้ำหนักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (α=0.05)

18. ศึกษาจำนวนโครโมโซม

จากการนำเซลล์ปลายรากถั่วจากต้นดิพลอยด์และต้นที่มีลักษณะเป็นโพลีพลอยด์มาตรวจนับจำนวนโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า ต้นถั่วเขียวที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินมีจำนวนโครโมโซม 2n=22 ส่วนถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซิน จำนวนโครโมโซมมีเปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้นมากกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน แต่เนื่องจากโครโมโซมมีขนาดเล็กและอยู่รวมกันเป็นกลุ่มจึงไม่สามารถนับได้อย่างแม่นยำ จากการนับจำนวนโครโมโซม เท่ากับ 38

วิจารณ์

จากการปลูกถั่วเขียวผิวมันพันธุ์อู่ทอง 1 และได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ กัน พบว่า เมื่อให้สารโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่ำ แต่เวลาที่ได้รับสารนานขึ้น คือ ที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 6 วัน ให้ต้นโพลีพลอยด์สูงกว่ากลุ่มอื่นโดยสามารถใช้อัตราการเกิดต้นโพลีพลอยด์และลักษณะการเจริญเติบโตเป็นดัชนีบ่งชี้ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการให้สารโคลชิซินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดพืชโพลีพลอยด์ได้ ลักษณะเมล็ดมีขนาดใหญ่ขึ้น นอกจากนี้ยังพบลักษณะผิดปกติของต้นและใบ เช่น ต้นถั่วเขียวที่เป็นโพลีพลอยด์ พบว่า ต้นอวบ และเตี้ยกว่าต้นดิพลอยด์ ใบหนา อวบ ใหญ่ ผิวใบหยาบ ขอบใบเป็นแฉก ขนาดเซลล์ปากใบเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3-4) ซึ่งอาจเกิดจากสารโคลชิซินมีความเป็นพิษต่อพืช มีผลทำให้ไซโทพลาสซึมมีความหนืดเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ทำให้กระบวนการต่างๆ ภายในพืชทำงานผิดปกติและรุนแรงถึงตาย(นิตย์ศรี และอำไพ,2541) ผลที่ได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของจักรกฤษณ์และคณะ(2545), นิตย์ศรี และอำไพ (2541), ประชาชาติและสำเริง(2540)และวัชรินทร์ (2544) ได้ทำการแช่เมล็ดผักคะน้า ข้อหม่อน หยดสารที่ตาหม่อนและแช่หน่อขมิ้นอ้อยและขมิ้นชันในสารโคลชิซินตามลำดับ พบว่าได้ลักษณะใบหนา สีเขียวเข้ม ปากใบกว้างและความยาวปากใบมากกว่าต้นปกติ

ผลของโคลชิซินทำให้ต้นที่เป็นโพลีพลอยด์มีช่วงเวลาติดดอกออกผลช้ากว่าต้นดิพลอยด์ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ ยินดี(2528)และจักรกฤษณ์และคณะ(2545) ได้ทำการทดลองกับถั่วเขียวผิวดำพันธุ์อู่ทอง 2 และผักคะน้า ตามลำดับ พบว่า ระยะเวลาการติดดอกออกผลช้ากว่าปกติ แต่สามารถติดเมล็ดได้ แสดงให้เห็นว่าสารโคลชิซินมีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ ทำให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตช้าลง มานี(2543)

นอกจากนี้ยังพบว่า ขนาด Pollen grain เมล็ดและดอกของถั่วเขียวที่ได้รับสารโคลชิซินมีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 1, 2 และ 6) แต่อัตราการติดเมล็ดลดลง ซึ่ง

สอดคล้องกับการทดลองของ Takayuki และคณะ(1998) ได้เพาะเลี้ยงเอมบริโอพืชลูกผสมของ *Alstroemeria ligtu* L. กับ *A.pelegrina L.var.rosea* ร่วมกับสารโคลชิซิน พบว่าดอกมีขนาดใหญ่ และเมล็ดเจริญได้เป็นปกติในมะเขือเทศที่เป็นโพลีพลอยด์ พบว่าดอกและผลมีขนาดใหญ่ เช่นกัน(กัลยา, 2536)

จากการทดลองให้สารโคลชิซินกับพืช พบว่าสารโคลชิซินทำให้จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 7) โดยสารโคลชิซินจะไปยับยั้งการสร้างและการทำงานของสปินเดิลไฟเบอร์ ทำให้โครโมโซมไม่ถูกดึงไปที่แต่ละขั้วของเซลล์ทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะเมทาเฟส (อมรา,2540) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของนักวิจัยหลายท่าน เช่น Kato(1989), วรายุทธ(2535), สุพรรณญิกา(2539) และ Petersen(2003) ได้ทำการทดลองกับ คามีลเลีย กล้วยเล็บมือนาง ข้าวลูกผสม และ *Miscanthus sinensis* ตามลำดับ พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น

ในการใช้สารโคลชิซินเพื่อกระตุ้นให้ได้ต้นพืชมีโครโมโซมเป็นโพลีพลอยด์ ควรให้สารที่ความเข้มข้นและความยาวนานที่เหมาะสม (มานี, 2543) สำหรับถั่วเขียวผิวมันพันธุ์อู่ทอง 1 ความเข้มข้นและระยะเวลาในการให้สารที่เหมาะสม คือ ที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 6 วัน เพราะสามารถชักนำให้เกิดจำนวนต้าที่เป็นโพลีพลอยด์ได้สูงกว่าที่เข้มข้นและระยะเวลาอื่นๆ

ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ วิมล (2527)พบว่าลักษณะพืชที่เป็นโพลีพลอยด์จะมีลำต้นใหญ่ ใบกว้าง หนา สีเขียวเข้ม ดอก ผล และเมล็ดใหญ่ขึ้น ละอองเกสรและเซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ และที่สำคัญคือจำนวนโครโมโซมจะเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ แต่ถ้าศึกษาในด้านการเจริญเติบโตจะพบว่า อัตราการเจริญเติบโต ช้า อ่อนแอ และผลแก่ช้ากว่าต้นดิพลอยด์

พืชที่มีโครโมโซม 4n จะมีความแตกต่างจากพืชที่มี โครโมโซม 2n อย่างชัดเจน ทั้งทางด้านสัณฐานวิทยาของพืช และขนาดของเซลล์ โดยเฉพาะขนาดของใบ เซลล์ปากใบ และขนาด Pollen grain ต้นที่มีโครโมโซม 4n จะมีขนาดของใบ เซลล์ปากใบและขนาด Pollen grain ใหญ่กว่า ดังนั้นในการตรวจสอบพันธุ์พืช นอกจากใช้วิธีนับจำนวนโครโมโซมแล้ว ยังสามารถใช้วิธี สังเกตุลักษณะต่างๆ ได้แก่ รูปร่างและขนาดส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ดอก ผล และเมล็ดการตรวจดูขนาดของเซลล์ปากใบ ขนาด Pollen grain

สรุป

การใช้สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 6 วัน สามารถชักนำให้เกิดต้นโพลีพลอยด์ได้มากกว่าการใช้สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาอื่น

ต้นถั่วเขียวโพลีพลอยด์มีลักษณะแตกต่างจากพันธุ์เดิม ลักษณะใบหนา อวบ ผิวใบไม่เรียบ ขอบใบหยัก ขนาดใบใหญ่ มีสีเขียวเข้ม เมล็ดใหญ่แต่การติดเมล็ดลดลง ดอกมีขนาดใหญ่ ลำต้นอวบ สูง การติดดอกออกผลช้า ขนาดเซลล์ปากใบ Pollen grain และเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กัลยา ธำรงวิศว. (2536). การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในมะเขือเทศโดยใช้สารโคลชิซินในเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.ปริญญานิพนธ์ วท.ม.กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

จักรกฤษณ์ ภารการ และคณะ. (2545). การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารโคลชิซินในข้าวโพดหวาน ผักกาดขาวปลี คะน้า และหอมแดง.งานวิจัย : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

นิตย์ศรี แสงเดือน และอำไพ สินพัฒนานนท์. (2541).“การชักนำให้เกิดหม่อนเททราพลอยด์โดยใช้สารโคลชิซิน ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ,” เกษตรศาสตร์. 32 : 424-430.

นันทวรรณ สโรบล. (2540). ถั่วเขียว : อดีต ปัจจุบัน และอนาคต. พิษณุโลก : รายงานการประชุมทางวิชาการถั่วเขียวแห่งชาติ ครั้งที่ 7 โรงแรมโกลเดนแรนด์.

ประชาชาติ นพพวง และสำเริง วิชานา.(2540). "การสร้างหม่อน Tetraploid จากหม่อนที่มีความต้านทานโรครากเน่า,"วิชาการเกษตร. 15 : 179-184.

มานี เตื้อสกุล. (2543). อิทธิพลของโคลชิซิน(Colchicine) ต่อการปรับปรุงพันธุ์ผักหวานบ้าน (*Sartopus androgvnus* Linn.Merr.) ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง เพื่อการเรียนการสอนในโรงเรียนมัธยมศึกษา.สงขลา : งานวิจัย คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันราชภัฏสงขลา.

วัชรินทร์ รัตนพันธ์. (2544). การเพิ่มจำนวนโครโมโซมของขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยด้วยสารโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ.วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. (2542). เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์พืชไร่. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 234-235

สุพรรณญิกา เนตรทัศน์. (2539). การปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข7 ให้ต้านทานต่อแมลงเพลี้ยข้าวกระโดดสีน้ำตาล โดยการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนร่วมกับการชักนำด้วยสารโคลชิซิน. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรา คัมภิรานนท์. (2542). พันธุศาสตร์ของเซลล์. กรุงเทพฯ : ภาค วิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 4-5.

Koto, M. (1989). "Ployploids of Camellia trough culture of somatic embryos,"HortScience. 24(6) : 1023-1025.

Petersen, K.K., P.Hagberh, K. Kristiansen. (2003). "Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of Miscanthus sinendid," Plant Cell tissue and Organ Culture. 73 : 137-146.

ยินดี ปานรุ่ง. (2528). การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในถั่วเขียวผิวดำพันธุ์อู่ทอง 2(U-Thong 2) โดยใช้สารโคลชิซิน.ปัญหาพิเศษ สงขลา : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

วรายุทธ ใจดี. (2535). การชักนำให้กล้วยเล็บมือนางเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยใช้สารโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ.ปัญหาพิเศษ กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิมล ขวัญเกื้อ. (2527). "การใช้สารโคลชิซินกับพืช," วิทยาศาสตร์.38(4) : 208-215.

Rey, H.Y., P.A.Sansberro, M.M.Collavino, J.R.Davina and A.M.Gonzalez. (2002). "colchicine,trifluralin and oryzalin pro moted development of somatic embryos in *llesparguarienses(Aquifoliaceae)*," Euphytica. 123 : 49-56.

Takayuki Ishikawa, Tomoko Takayama and Hiroshi Ishizaka. (1999). "Amphidiploids between *Alstroemeria ligtu* L. hybrid and *A.pelegrian* L. var. *rosea* induced through colchicines treatment and their reproduc tive characteristics,"Scientia Horticulturae. 80 : 235-346.

Zhao Gang, Tang Yu and Qiu shifeng. (1995)."Studies on Chromosomes Doubling of Tartary Buckwheat," Current Advances in Buckwheat Research. : 313-321.