THE LIBRARY
COLLEGE OF EDUCATION
BANGKOK. THAILAND

การกระตุ้นให้เกิด tetraploid ในผักบุ้งจีน
(Ipomoea reptans Poir)

ปริญญานิพนธ์
ของ
อรุพีร์ ปัญจะ

14 ส.ค. 18

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต
2 ธันวาคม 2517

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิตของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

.....ประธาน

.....กรรมการ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาของอาจารย์ สุมณฑา รหมบุญ และ Dr. Edward S. Kos ผู้วิจัยขอขอบพระคุณไว้ ณ. ที่นี้ด้วย

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์สาคร ตรีมัยหวัน อาจารย์เสริมสิน ศิริวัฒนา ที่กรุณาแนะนำและจัดหาหนังสือต้นฉบับในการวิจัย เรื่องทั้งขอขอบคุณ กุณฑลินี งศ์ เล็กศิริรัตน์ ที่ช่วยวาดภาพประกอบการวิจัยนี้

อุรุพีร์ ปัจจะ

สารบัญ

หน้า

บทนำ 1

สารเคมีและอุปกรณ์ในการทดลอง 5

วิธีดำเนินการทดลอง 8

ผลการทดลอง.. 11

การอภิปรายผลการทดลอง.. 27

บรรณานุกรม.. 29

บัญชีภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	แผนภาพสรุปวิธีดำเนินการทดลอง	9
2	ลักษณะโครโมโซมของผักบุ้งจีนปรกติ	12
3	แสดงเซล tetraploid ซึ่งได้จากรากต้นกล้าที่แช่เมล็ดในสารละลาย colchicine 0.1 % เวลา 2 ชั่วโมง	14
4	แสดงเซลที่มีโครโมโซมนับจำนวนไม่ได้ซึ่งได้จากรากต้นกล้าที่แช่เมล็ดในสารละลาย colchicine 0.6 % เวลา 12 ชั่วโมง	15
5	แสดงลักษณะเปรียบเทียบของต้นกล้าผักบุ้งจีนอายุ 1 สัปดาห์	17
6	แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้าผักบุ้งจีนอายุ 1 สัปดาห์	21
7	แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผักบุ้งจีนอายุ 8 สัปดาห์	22
8	แสดงการเปรียบเทียบขนาดของใบผักบุ้งจีนอายุ 8 สัปดาห์.	23
9	แสดงการเปรียบเทียบรากของผักบุ้งจีนอายุ 8 สัปดาห์ ..	24

บัญชีตาราง

ตารางที่ หน้า

1 แสดงสรุปผลการทดลองใช้สารละลาย colchicine กระตุ้นให้เกิด tetraploid ในพืชชนิดต่าง ๆ 3

2 แสดงเปอร์เซนต์และจำนวนเซลในรากผักบุ้งจีนปรกติที่ได้รับการตรวจนับโครโมโซม 11

3 แสดงผลสรุปการตรวจนับจำนวนโครโมโซมและจำนวนเซลจากรากต้นกล้าที่แช่ colchicine 13

4 แสดงเปอร์เซนต์การงอกของผักบุ้งจีนในแปลงทดลองอายุ 1-4 สัปดาห์ 18

5 แสดงการเปรียบเทียบขนาดของใบผักบุ้งจีนปรกติและผักบุ้งจีนที่เป็น tetraploid อายุ 8 สัปดาห์ 25

6 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักของผักบุ้งจีนปรกติกับผักบุ้งจีนที่เป็น tetraploid อายุ 8 สัปดาห์ 26

บทนำ

เซลร่างกาย (somatic cells) ของพืชหรือสัตว์ชั้นสูงทั่ว ๆ ไปจะมีโครโมโซม 2 ชุด ชุดหนึ่งได้จากเซลสืบพันธุ์เพศผู้และอีกชุดหนึ่งได้จากเซลสืบพันธุ์เพศเมีย จำนวนโครโมโซม 2 ชุดนี้เรียกว่า diploid number และเขียนย่อว่า 2n ซึ่งถือว่าเป็นจำนวนปรกติ ในบางโอกาสเมื่อเซล 2n แบ่งตัวแบบไมโตซิส (mitosis) เพื่อให้ได้เซลใหม่สองเซลโดยที่เซลใหม่นั้นควรจะมีโครโมโซมเป็น 2n เกิดปรากฏการณ์ผิดปรกติขึ้น กล่าวคือ ไม่มีการแบ่งขอบเขตของเซลทำให้ได้เซลใหม่ที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นเท่าตัว คือ มีโครโมโซม 4 ชุด หรือ 4n เพียงเซลเดียว เซลเหล่านี้เรียกว่าเซล tetraploid ปรากฏการณ์อาจเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ เป็นต้นว่า เซลที่ปมรากพืชตระกูลถั่วมักพบเสมอ ๆ ว่าเป็นเซล tetraploid นักชีววิทยาเองก็ยังไม่เข้าใจอย่างถ่องแท้ถึงสาเหตุของการเกิด tetraploid ตามธรรมชาติ

จากการศึกษาต่อมาพบว่า สารเคมีบางชนิดเช่น colchicine, acenapthene, nitrous oxide เป็นต้น หรืออุณหภูมิต่ำ ๆ ระหว่าง 0 °C ถึง +6 °C สามารถกระตุ้นให้เซล diploid ที่กำลังแบ่งตัวกลายเป็นเซล tetraploid และอาจกระตุ้นเซล tetraploid ให้กลายเป็นเซล octaploid ได้ (C.D. Darlington & L.F. la Cour, 1970.) เซลที่มีจำนวนชุดของโครโมโซมเกินกว่า 2 ชุดนั้นเรียกว่าเซล polyploid

การค้นคว้าเกี่ยวกับ polyploid ในพืชนับว่ามีความสำคัญมากในวงการเกษตร ทั้งนี้เพราะพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของโลกในปัจจุบัน เช่น ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ฝ้าย ยาสูบ กาแฟ มันฝรั่ง องุ่น แอปเปิล ฯลฯ ล้วนแล้วแต่เป็นพันธุ์ที่เป็น polyploid ตามธรรมชาติหรือโดยน้ำมือของนักวิชาการเกษตรทั้งสิ้น พืชที่เป็น polyploid นั้น มักมีขนาดใหญ่ไม่ว่าจะเป็นขนาดของลำต้น ใบ ดอก ผล หรือเมล็ด (ศรีพรรณ ไชยวงศ์, มีนาคม 2507.) สรุปได้ว่า พืช polyploid มักจะเป็นพืชที่

ให้ผลผลิตสูง อย่างไรก็ตาม polyploid จะมีลักษณะดีมากหรือน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับชนิดของยีนบนโครโมโซมด้วย (เอมอร ศิริวรรณ,มีนาคม 2509.)

ในบรรดาสารเคมีที่ใช้กระตุ้นให้เกิดเซล tetraploid ในพืช ที่นิยมใช้แพร่หลายที่สุดก็อ colchicine เนื่องจากได้ผลเต็มที่ สะดวกในการใช้ หาซื้อได้ง่าย และไม่เป็นอันตรายต่อเซลในด้านอื่น ๆ colchicine เป็นสารประเภท alkaloid ชนิดหนึ่งที่สะกัดได้จากส่วนของเมล็ด ดอก แห้ง ใบและหัวของพืชที่ชื่อว่า autumn crocus (Colchicum antumnale F. Liliaceae) สารนี้มีอยู่ประมาณ 0.4 % โดยน้ำหนัก (ศรีพรรณ ไชยวงศ์,มีนาคม 2507.) คุณสมบัติที่สำคัญของ colchicine ก็อ เป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี มีผลไประงับการสร้างใย spindle ในเซลที่กำลังแบ่งตัว ทำให้โครมาติด (chromatids) ที่แยกออกจากกันไม่สามารถเคลื่อนที่ไปอยู่ที่ขั้วของเซลได้ ผลก็ก็อ ได้เซลใหม่หลังจากการแบ่งตัวเพียงเซลเดียว เซลใหม่นี้มีโครโมโซมเพิ่มจากเดิม 2 เท่า (2n) 4 เท่า (4n) หรือ 8 เท่า (8n) ตามลำดับแล้วแต่ระยะเวลาที่เซลได้รับสารนี้ อย่างไรก็ตามยิ่งจำนวนโครโมโซมเพิ่มมากขึ้นเท่าใดโอกาสที่เซลจะอยู่รอดก็ยิ่งมีน้อยลง ดังนั้นการแช่เซลในสารนี้นาน ๆ หรือในสารนี้ที่มีความเข้มข้นมาก ๆ ก็อาจทำให้เซลตายได้

การใช้ colchicine กับพืชนี้เขานิยมใช้ในรูปของสารละลาย ซึ่งอาจละลายในน้ำ ในวุ้น หรือใน lanolin วิธีใช้อาจใช้ป้าย พ่น หรือหยดสารละลายนี้ลงบนเนื้อเยื่อเจริญของพืชหรือแช่พืชที่กำลังเจริญลงในสารละลายโดยตรงก็ได้ นิยมใช้กับปลายรากหรือปลายยอดซึ่งเป็นบริเวณเนื้อเยื่อเจริญที่มีการแบ่งเซลตลอดชีวิตของพืช หรือใช้กับ embryo หรือต้นกล้าที่กำลังเจริญเติบโต (O.J. Eigsti& D. Pierre, 1955.) วิธีใช้สารละลายcolchicine ให้ได้ผลดีที่สุดก็อ การแช่ส่วนที่มีการแบ่งเซลในสารละลาย (R.L. Lower & K.W. Johnson,1970.)

การใช้สารละลาย colchicine กระตุ้นให้เกิด tetraploid ในพืชชนิดต่าง ๆ นั้น ได้มีผู้ทำการทดลองกันค้วามามากมาย ดังได้สรุปการ

ทดลองบางอันไว้ในตาราง 1.

ตาราง 1. แสดงสรุปผลการทดลองการใช้สารละลายcolchicine กระตุ้นให้เกิด tetraploid ในพืชชนิดต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ colchicine (%)	ระยะเวลา (ช.ม.)	ส่วนของพืช	ชื่อพืช	ผู้ทำการทดลอง
0.02,	-	ปลาย	Trifolium sp.	J. Jaranowski&
0.1,0.3,		ยอด	Melilotus sp.	Kalasa,1970.
0.5			Medicago sp.	
			Trigonella sp.	
1.0	48	ต้นกล้า	Capsicum annuum	B.S. Murthy&
			L.	other,1970.
0.05,	2-3	ปลายราก	Vicia faba	D.Davidson,1970
0.025,		แก้วและ		
0.0125		รากแขนง		
0.25	18	ต้นกล้า	ถั่วเขียวชนิด desi	M.S, Sohoo&
	1	ต้นกล้า	ถั่วเขียวชนิด kabuli	other,1971.
	2	ต้นกล้า	Cicer arietinum	
-	-	ปลายราก	Mentha piperital	D. Stanev,1971.
0.05,	6,12,	ปลายยอด	ข้าวพันธุ์สะพานตวาย	ศรีพรรณ ไชยวงศ์,
0.1,0.5	36,48		เบอร์ 6	2507.

จะเห็นได้ว่า สารละลาย colchicine ที่ใช้ในการทดลองต่าง ๆ เหล่านั้นมีความเข้มข้นน้อยมาก เป็นส่วนใหญ่และใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาของการแช่แตกต่างกันไปตามชนิดของพืช

การศึกษาต่อไปนี้เป็นการทดลองแช่เมล็ดผักบุ้งจีน (Ipomoea

reptans Poir , พระยาวินิจวนันดร, 2503) ในสารละลาย – colchicine ที่มีความเข้มข้นและแช่ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน เพื่อหาว่า

1. ความเข้มข้นของสารละลาย colchicine เท่าใด และช่วงเวลาเท่าใดจึงจะเหมาะสมที่สุดที่จะกระตุ้น embryo ในเมล็กที่กำลังงอกของผักบุ้งจีนให้เกิดเซล tetraploid

2. ผักบุ้งจีนที่มีเซล tetraploidมาก ๆ เหล่านั้นมีลักษณะแตกต่างไปจากผักบุ้งจีนปรกติ (diploid) อย่างไรบ้าง

สารเคมีและอุปกรณ์ในการทดลอง

อุปกรณ์ในการทดลอง

1. เมล็ดพันธุ์ผักบุ้งจีน (Ipomoea reptans Poir)
2. กล้องจุลทรรศน์ binocular (Hertel & Reuss; CN-fl,H-R 65)
3. กล้องถ่ายภาพไมโครสไลด์ (Olympus;Passed A, JCII 31)
4. สไลด์และกระจกปิดสไลด์
5. บีกเกอร์
6. จานแก้ว
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์
8. เข็มเขี่ย
9. ปากคีบ

สารเคมี

1. colchicine
2. p-dichlorobenzene
3. chloroform
4. 95% ethyl alcohol
5. hydrochloric acid
6. glacial acetic acid
8. ferric acetate
9. glycerin
10. chloral hydrate
11. gum acacia
12. carmine
13. น้ำกลั่น

การเตรียมน้ำยา

- สารละลาย colchicine

colchicine + น้ำกลั่น

ชั่ง colchicine 0.025,0.05,0.1,0.2,0.3,0.4, 0.5 และ 0.6 gm ผสมน้ำกลั่น100 ml. ใน colchicineแต่ละ-น้ำหนัก จะได้สารละลาย colchicine ที่มีความเข้มข้น0.025,0.05,0.1, 0.2,0.3,0.4,0.5 และ0.6 % ตามลำดับ ใส่ขวดสีชาเก็บในตู้เย็น (เตรียมพอดีใช้แต่ละครั้ง)

สำหรับcolchicine 0.01% ซึ่งใช้ในการ pre-treatmentได้จากการนำ colchicine0.1%1ml มาผสมน้ำกลั่น9 ml.

- สารละลายอิ่มตัวของ p-dichlorobenzene

p-dichlorobenzene	10	gm.
น้ำกลั่น	500	ml.

ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 °C 1 คืน นำมาใช้ที่อุณภูมิห้อง

- Carnoy's fluid (L. Smith,1947.)

95 % ethyl alcohol	60	ml.
chloroform	30	ml.
glacial acetic acid	10	ml.

ผสม 95 %ethyl alcohol กับ chloroform เก็บเป็น stock solution เมื่อจะใช้ผสมglacial acetic ในอัตราส่วน 9:1 ใช้ทันที

- Hydrochloric acid 10 %

hydrochloric acid	10	ml.
น้ำกลั่น	90	ml.

- Acetocarmine 1 % (J.E. Sass,1958.)

carmine	1	gm.
45 % acetic acid	100	ml.

สารละลายอิ่มตัวของ ferric acetate 2 หยด

ผสม carmine ลงใน 45 % acetic acid ร้อน จัดกนให้ละลาย ทิ้งให้เย็น กรอง หยดสารละลายอิ่มตัวของ ferric acetate 2 หยด ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมงใส่ขวดสีชาเก็บในตู้เย็น กรองก่อนใช้ทุกครั้ง (กรองเฉพาะเท่าที่ใช้แต่ละครั้ง)

- น้ำยาผนึกขอบกระจกปิดสไลด์ (L. Smith,1947.)

glycerin	8	ml.
gum acacia	25	gm.
chloral hydrate	50	gm.
น้ำกลั่น	45	ml.

วิธีดำเนินการทดลอง

คัดเลือกเมล็ดผักบุ้งจีนที่มีขนาดและความอวบของเมล็ดสม่ำเสมอกัน ล้างน้ำฝนเพื่อให้เศษดินและกรวดทรายที่ปนมากับเมล็ดหมดไป นำขึ้นมาแยกใส่จานแก้ว 9 จานต่อ 1 ชุด (ภาพที่ 1) แต่ละชุดประกอบด้วยจานกวยกุยใส่น้ำกลั่น 1 จานและอีก 8 จานใส่สารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.025,0.05,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5และ 0.6 % ตามลำดับ ใช้สารละลาย colchicineหรือน้ำกลั่นจานละ 10 C.C ต่อเมล็ดผักบุ้งจีน 50 เมล็ด ทดลองทั้งหมด 4 ชุด ระยะเวลาแช่เมล็ดในสารละลาย 2,6,12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ

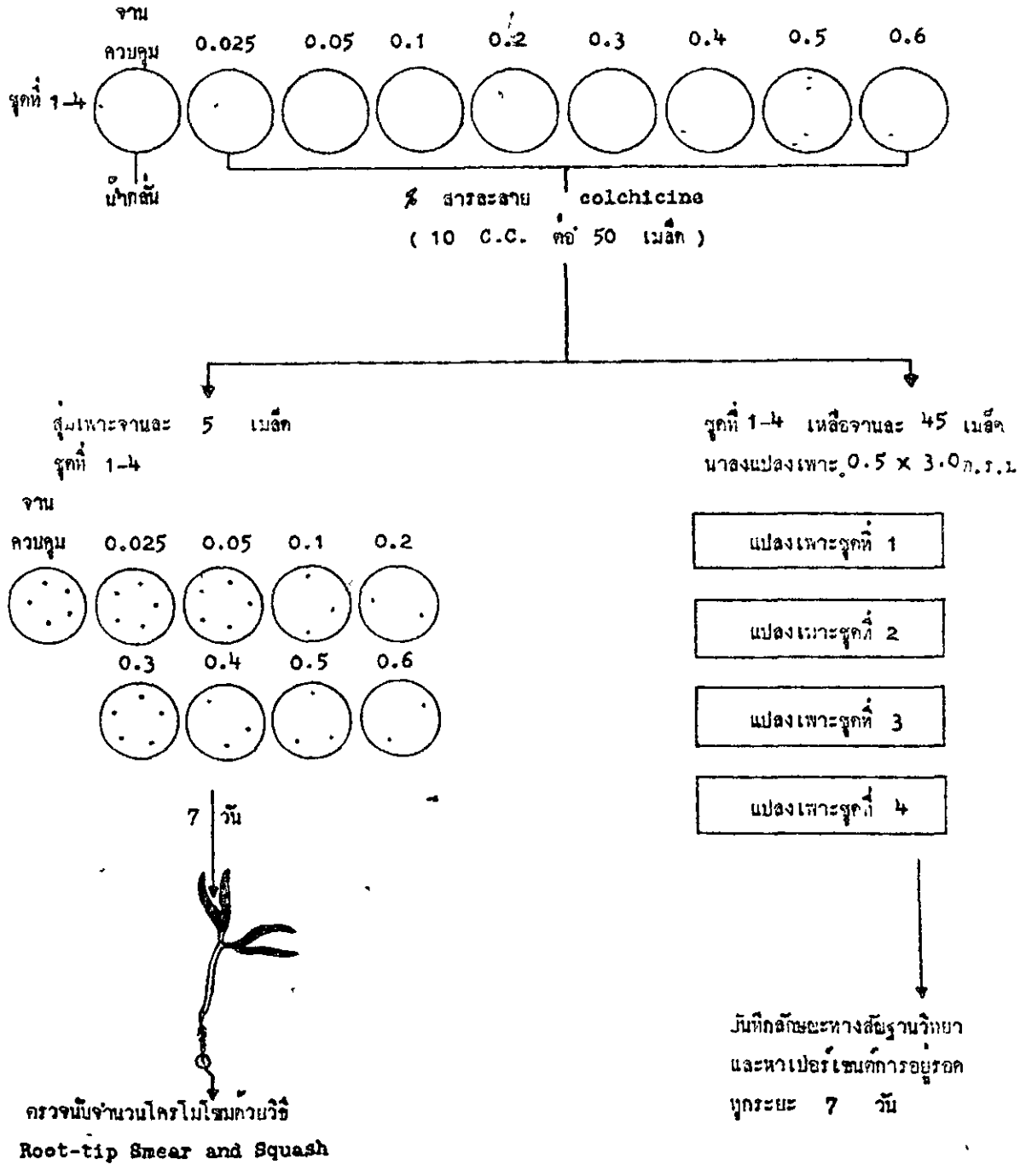
เมื่อแช่เมล็ดครบตามเวลาที่กำหนดแล้วเลือกสุ่มเมล็ดจากทุก ๆ จาน ๆ ละ 5 เมล็ด เพาะในจานเพาะซึ่งปูด้วยกระดาษเยื่อชุ่มน้ำ ทิ้งไว้จนรากงอกพอประมาณ (ประมาณ 36 - 48 ชั่วโมง) นำมาตรวจนับจำนวนโครโมโซมโดยเตรียมรากของต้นกล้าด้วยวิธี Root - tip Smear and Squash ส่วนเมล็ดที่เหลือนอกนั้นนำลงปลูกในแปลงทดลองซึ่งมีเนื้อที่ประมาณ 0.5 × 3.0 ตารางเมตรโดยวิธีหยอดเมล็ดหลุมละ 2-3 เมล็ด ระยะห่างระหว่างหลุมประมาณ 5 เซนติเมตร รดด้วยน้ำบ่อวันละ 2 ครั้ง เวลาเช้าประมาณ 7.00 น.และเวลาเย็นประมาณ 18.00 น.

บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผักบุ้งจีนและหาเปอร์เซนต์การอยู่รอดทุกระยะ 7 วัน พร้อมทั้งถ่ายภาพประกอบ

วิธีทำ Root-tip Smear and Squash(C.D. Darlington,1970)

- Pre-treatment เพื่อให้โครโมโซมหดสั้นมากขึ้นจะได้สะดวกแก่การนับจำนวน โดยแช่รากต้นกล้าในสารละลายอิ่มตัวของ p-dichlorobenzene 1 ชั่วโมง (11.00 น.-12.00น.)หรือแช่ในสารละลาย colchicine 0.01 % 1 ชั่วโมง (11.00 น. -12.00 น.;18.30 น. -19.30น.)

- Fixation เพื่อให้เซลตายในลักษณะที่ใกล้เคียงกับ



ภาพที่ 1 แผนภาพสรุปวิธีการดำเนินการทดลอง

สภาพที่มีชีวิตมากที่สุด ตัดปลายรากที่ผ่าน pre-treatment แล้วยาวประมาณ 3-5 มิลลิเมตร แช่ใน Carnoy's fluid อย่างน้อย 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

- Hydrolysis เพื่อให้เนื้อเยื่ออ่อนนุ่มสะดวกแก่การแยกเซลให้กระจายออกจากกัน นำรากที่ fix แล้วแช่ในกรดเกลือเข้มข้น 10% ที่อุณหภูมิประมาณ 60° C เป็นเวลา 15 นาที - 1 ชั่วโมง

- Smear and Squash เพื่อให้เซลกระจายและแบนราบ ล้างกรดเกลือออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที นำรากวางบนสไลด์ซับให้แห้งด้วยกระดาษเยื่อ ใช้เข็มเขี่ย ๆ หมวกรากออก (อาจดูหมวกรากด้วยกล้องสเตอริโอหรือสังเกตุส่วนหมวกรากที่ก่อนข้างใสตรงปลายสุดของรากด้วยตาเปล่าก็ได้) ตัดเฉพาะส่วนปลายรากความยาวประมาณ 1-2 มิลิเมตรจากปลายสุดซึ่งเป็นบริเวณที่จะพบเซลที่กำลังแบ่งตัว ใช้เข็มเขี่ย ๆ ให้เซลกระจายออก หยดสี acetocarmine ลงบนกลุ่มเซลประมาณ 2 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที แล้วจึงปิดด้วยกระจกปิดสไลด์กดด้วยหัวแม่มือทั้งสองข้าง ลนไฟพออุ่นเพื่อให้สีติดดีขึ้นแล้วนำมากดซ้ำอีกครั้งหนึ่งอย่างแรงโดยใช้กระดาษเยื่อวางบนกระจกปิดสไลด์ทับด้วยสไลด์อีกแผ่นหนึ่ง ใช้ฝ่ามือทั้งสองข้างกดย ๆ เพื่มน้ำหนักกดเพื่อไล่ฟองอากาศ ซับสีส่วนเกินและทำให้เซลแบนราบยิ่งขึ้น ตรวจนับจำนวนโครโมโซมของเซลที่แบ่งตัวในระยะ prophase และ metaphase ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ผนึกขอบกระจกปิดสไลด์ด้วยน้ำยาผนึกเพื่อเก็บไว้ศึกษาซ้ำและบันทึกภาพอีกภายหลัง

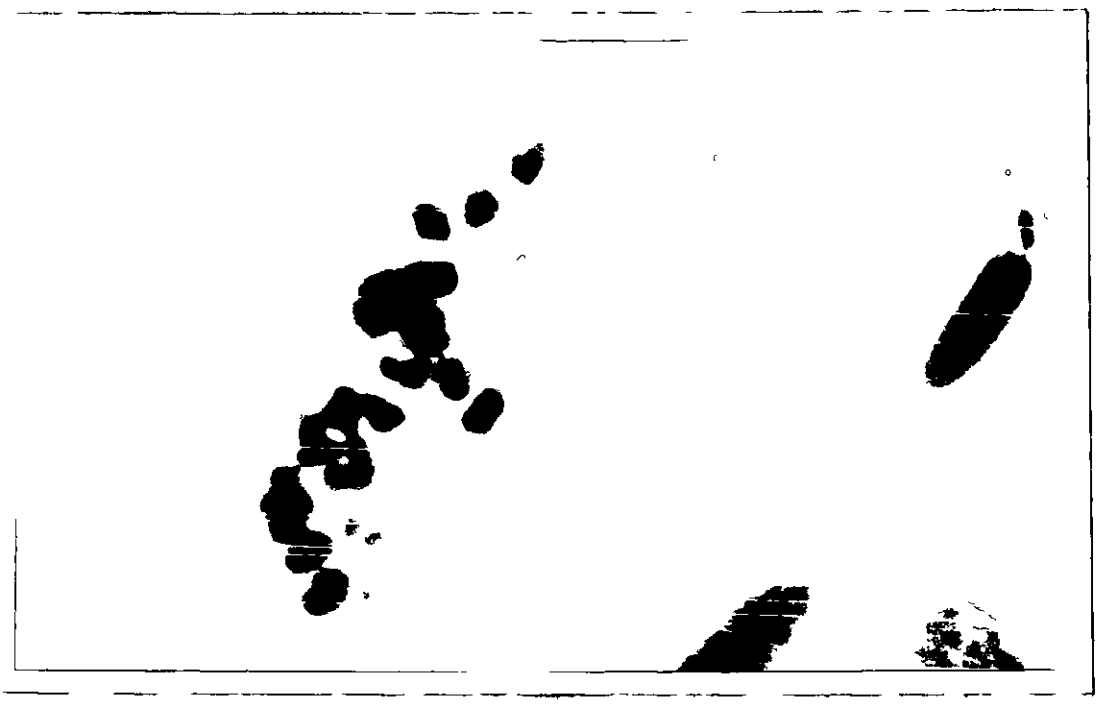
ผลการทดลอง

การศึกษาเซลวิทยา

โครโมโซมของผักบุ้งจีนนี้มีขนาดเล็กมากทำให้การนับจำนวนโครโมโซมค่อนข้างลำบาก อย่างไรก็ตามจากการนับจำนวนโครโมโซมของเซลปรกติหลายเซล พบว่า ส่วนใหญ่มีโครโมโซมเท่ากับ 16 เส้น (ตาราง 2) และจากการศึกษาเซลหลายเซลที่มีโครโมโซมกระจายออกจากกันทำให้นับได้อย่างสะดวกนั้น พบว่า มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 16 เส้นด้วย (ภาพที่ 2) จึงสรุปได้ว่า จำนวนโครโมโซมปรกติหรือ 2n ของผักบุ้งจีนเท่ากับ 16 ส่วนพวกที่มีโครโมโซมแตกต่างไปจากนี้คงเนื่องมาจากโครโมโซมซ้อนกันบ้าง หลุดหายไปบ้างหรือเกินมาจากเซลข้างเคียงโดยบังเอิญบ้าง

ตาราง 2 แสดงเปอร์เซนต์และจำนวนเซลในรากผักบุ้งจีนปรกติที่ได้รับการตรวจนับโครโมโซม

จำนวนโครโมโซม (เส้น)		จำนวนเซลที่ตรวจนับโครโมโซม	
		จำนวนจริง	คิดเป็นเปอร์เซนต์
ต่ำกว่า	14	8	15.69
	14	3	5.88
	15	15	29.41
	16	**19**	**37.25**
	17	5	9.80
มากกว่า	17	1	1.96
		51	100.00



ภาพที่ 2 ลักษณะโครโมโซมของผักบุ้งจีนปรกติ

(700 x)

ผลการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในเซลรากของต้นกล้าที่ผ่านการแช่ colchicine สรุปได้ดังตาราง 3

ตาราง 3 แสดงผลสรุปการตรวจนับจำนวนโครโมโซมและจำนวนเซลจากรากต้นกล้าที่แช่ colchicine

สัญญลักษณ์แทนความเข้มข้นของ colchicine	% ความเข้มข้นของ colchicine	จำนวนเซลที่มีโครโมโซมต่าง ๆ															
		ชุดที่ 1 (2 ช.ม)				ชุดที่ 2 (6 ช.ม)				ชุดที่ 3 (12ช.ม)				ชุดที่ 4 (24 ช.ม)			
		2n	4n	8n	<8n	2n	4n	8n	<8n	2n	4n	8n	<8n	2n	4n	8n	<8n
B	0 025	2	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	2	0	0	0	3
C	0.05	10	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	6	0	0	0	6
D	0.1	0	27	0	0	3	0	0	5	0	0	6	3	0	0	0	5
E	0.2	11	9	0	0	0	0	0	7	0	0	0	4	0	0	0	4
F	0.3	8	9	0	0	0	0	0	2	0	0	0	10	0	0	0	7
G	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	9	0	0	0	5
H	0.5	-	-	-	-	0	0	0	4	-	-	-	-	0	0	0	9
I	0.6	0	0	0	7	-	-	-	-	0	0	0	12	0	0	0	11

0 ไม่พบเซลที่มีจำนวนโครโมโซมเช่นนั้น

- ไม่พบเซลที่นับจำนวนโครโมโซมได้

ผลจากตาราง 3 จะเห็นได้ว่า จำนวนเซลที่เป็น tetraploid (4n = 32) พบในรากต้นกล้าที่แช่เมล็ดในสารละลาย colchicine 0.1,0.2 และ 0.3 % เวลา 2 ชั่วโมง แต่เซลรากต้นกล้าที่แช่ใน สารละลาย colchicine 0.1 % ทุกเซลที่ตรวจนับโครโมโซมได้เป็นเซล tetraploid (ภาพที่ 3)

ภาพที่ 3 แสดงเซล tetraploid ซึ่งได้จากรากต้นกล้าที่แช่เมล็ดในสารละลาย colchicine 0.1 % เวลา 2 ชั่วโมง (700 ×)

ภาพที่ 4 แสดงเซลล์ที่มีโครโมโซมนับจำนวนไม่ได้ซึ่งได้จากราก
ต้นกล้าที่แช่เมล็ดในสารละลาย colchicine
0.6 % เวลา 12 ชั่วโมง (700 ×)

การศึกษาสัณฐานวิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผักบุ้งจีนที่ได้จากการตรวจบันทึกทุกระยะ 7 วัน มีดังนี้

อายุ 1...สัปดาห์ (บันทึกลักษณะจากต้นกล้าในจานเพาะ)

ผักบุ้งจีนในระยะนี้มีลักษณะดังภาพที่ 5 จะเห็นได้ว่าต้น A ของทุกชุดมีความสูงและจำนวนรากแขนงมากที่สุดในแต่ละชุด ยกเว้นชุดที่ 1 ต้น A และต้น B สูงไร่เรี่ยกัน ปลายรากแก้วในต้นที่แตกรากแขนงมีลักษณะเรียวแหลม และต้น A ของทุกชุดรากแก้วจะมีความยาวมากที่สุด ส่วนในต้นที่ไม่แตกรากแขนงมีรากแก้วสั้นปลายเรียวกลมมน

เปอร์เซนต์การงอกโดยทั่วไปของชุดที่ 1 และ 2 มีสูงกว่าชุดที่ 3 และ 4 (ตาราง 4)

อายุ ..2 สัปดาห์

ผักบุ้งจีนทั้งหมดแตกใบแท้

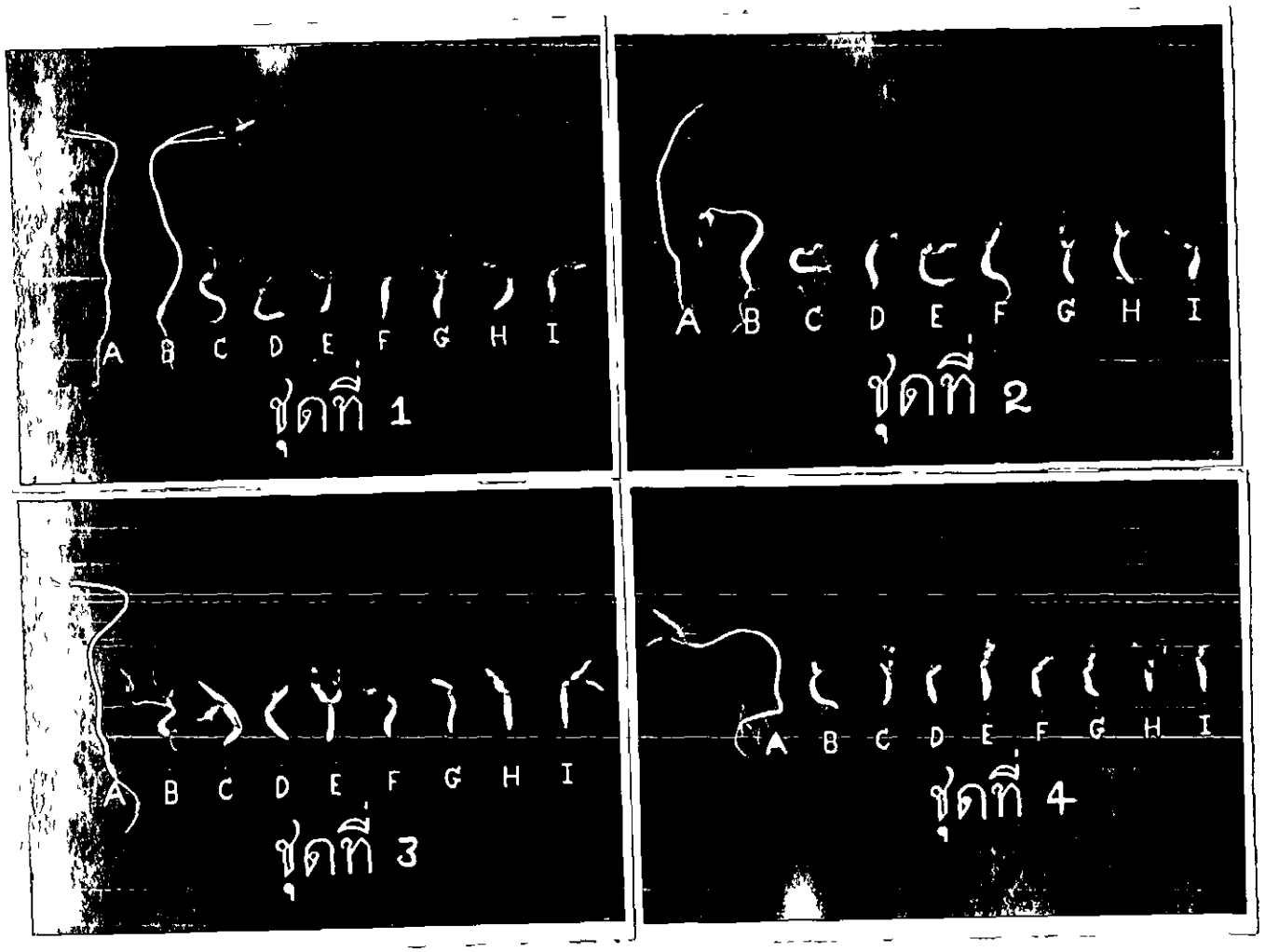
กลุ่ม A ของทุกชุดมีใบแท้เล็กยาวเรียว จำนวนรากแขนงเพิ่มขึ้น ลำต้นสูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ ความสมบูรณ์ของต้นซึ่งดูจากความอวบของลำต้น ขนาดของใบและความสูงนั้นเรียงเป็นลำดับจากชุดที่ 1 ซึ่งมีความสมบูรณ์มากที่สุด ถึงชุดที่ 4 ซึ่งสมบูรณ์น้อยที่สุด

กลุ่ม B-I ของทุกชุดมีใบแท้กว้างและสั้นกว่ากลุ่ม A จำนวนรากแขนงเพิ่มขึ้น ในชุดที่ 1-4 ต้นที่ยังไม่มีรากแขนงเริ่มแตกรากแขนง ลำต้นอ้วนเตี้ยกว่ากลุ่ม A โดยทั่วไป

ชุดที่ 1-3 เกือบทุกกลุ่มมีเปอร์เซนต์การงอกเพิ่มขึ้น ส่วนในชุดที่ 4 เปอร์เซนต์การงอกลดลงจากสัปดาห์ที่ 1 มาก (ยกเว้นกลุ่ม C) และกลุ่ม A ของทุกชุดพบว่ามีเปอร์เซนต์การงอกสูงที่สุดในแต่ละชุด (ตาราง 4)

อายุ ..3...สัปดาห์

กลุ่ม A-I มีความสูงไร่เรี่ยกัน ลักษณะของลำต้น ใบ และรากเหมือนในสัปดาห์ที่ 2 แต่จำนวนใบและรากแขนงเพิ่มขึ้น ความสมบูรณ์ของต้นใน



ภาพที่ 5 แสดงลักษณะเปรียบเทียบของต้นกล้าผักบุ้งจีน

อายุ 1 สัปดาห์

ชุดที่ 1-4 แช่เมล็ดในสารละลายเป็นเวลา 2,6,12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ

A- ต้นควบคุม

B-I- ต้นที่ได้รับการแช่สารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.025,0.05,0.1,0.2, 0.3,0.4,0.5 และ 0.6 % ตามลำดับ

ตาราง 4 แสดงเปอร์เซนต์การงอกของผักบุ้งจีนในแปลงทดลอง

อายุ 1-4 สัปดาห์

สัญญลักษณ์แสดงความเข้มข้นของ colchicine	% ความเข้มข้นของ colchicine	เปอร์เซนต์การงอก															
		ชุดที่ 1 (2 ช.ม)				ชุดที่ 2 (6 ช.ม)				ชุดที่ 3 (12 ช.ม)				ชุดที่ 4 (24 ช.ม)			
		สัปดาห์ที่				สัปดาห์ที่				สัปดาห์ที่				สัปดาห์ที่			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
A	ควบคุม	20.0	31.1	33.3	33.3	17.8	24.4	35.6	35.6	14.4	26.7	31.1	31.1	8.9	17.8	17.8	17.8
B	0.025	24.4	24.4	28.9	26.7	35.6	26.7	26.7	26.7	14.4	14.4	20 0	20.0	2.2	2.2	4.4	4.4
C	0.05	20.0	26.7	35 6	35 6	24.4	33.3	35.6	40.0	8.9	8.9	11.1	6.7	17.8	22.2	24.4	22.2
D	0.1	20.0	33 3	35 6	33 3	26.7	20.0	24.4	24.4	6 7	11.1	8.9	8.9	14.4	2.2	2.2	4.4
E	0 2	26.7	28.9	33.3	33.3	14.4	24.4	24.4	26.7	6.7	11.1	13.3	11.1	20.0	6.7	6.7	8.9
F	0.3	28.9	46.7	44 4	44.4	13.3	17.8	22.2	24.4	4.4	14.4	13.3	8.9	17.8	17.8	8.9	6.7
G	0.4	11.1	24.4	26.7	24 4	14.4	24.4	26.7	20.0	11.4	11.1	13.3	11.1	22.2	13,3	14.4	13.3
H	0.5	26.7	22.2	22.2	22.2	20.0	22.2	22.2	17.8	11 4	6.7	6.7	6.7	20.0	8.9	6.7	4.4
I	0 6	14.4	22.2	26.7	26.7	4.4	11.1	8.9	11.1	14.4	14.4	13.3	14.4	24.4	17.8	11.1	13.3

ชุดที่ 1 และ 2 เหมือนในสัปดาห์ที่ 2 แต่ในชุดที่ 3 และ 4 กลุ่ม A มีความสมบูรณ์น้อยกว่ากลุ่ม B-I ในแต่ละชุด

เปอร์เซนต์การงอกในแต่ละชุดเหมือนในสัปดาห์ที่ 2 (ตาราง 4)

อายุ 4 สัปดาห์

กลุ่ม A-I ของทุกชุดลักษณะเหมือนสัปดาห์ที่ 3 แต่ในชุดที่ 1 กลุ่ม B-I ชุดที่ 2 กลุ่ม B,C, F และ H ชุดที่ 3 กลุ่ม G-I และชุดที่ 4 กลุ่ม E-I บางต้นแตกกิ่งแขนง ในของกิ่งแขนงมีขนาดใหญ่กว่าใบที่แตกจากต้น

จากการบันทึกเปอร์เซนต์การงอกของต้นผักบุ้งจีนทุก ๆ สัปดาห์พบว่า หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ไปแล้วไม่มีการงอกเพิ่มขึ้น จึงสรุปได้ว่า โดยทั่วไปแล้วเมล็ดผักบุ้งจีนที่ใช้ในการทดลองนี้มีเปอร์เซนต์การงอกสูงที่สุดในชุดที่ 1 และ 2 ส่วนชุดที่ 3 และ 4 นั้นมีเปอร์เซนต์การงอกต่ำลงไปตามลำดับ

จากตาราง 4 แสดงให้เห็นว่า เปอร์เซนต์การงอกของผักบุ้งจีนมีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อใช้ colchicine ความเข้มข้นสูงกว่า 0.3 % และแช่เมล็ดนานกว่า 6 ชั่วโมง

อายุ 5 สัปดาห์

กลุ่ม A-I มีลักษณะและขนาดของใบกิ่งเดิม ความสูงของชุดที่ 1 และ 2 เท่ากันในแต่ละชุด ชุดที่ 3 และ 4 กลุ่ม A เตี้ยกว่าทุกต้นในกลุ่ม B-I จำนวนรากแขนงและความสมบูรณ์ของต้นในกลุ่ม A ของทุกชุดมีน้อยกว่าทุกต้นในกลุ่ม B-I นอกจากนี้ในชุดที่ 3 และ 4 กลุ่ม A ยังมีลักษณะแกรนด์ด้วย

อายุ 6-8 สัปดาห์

กลุ่ม A-I มีลักษณะใบและรากกิ่งเดิม แต่ความสูง จำนวนใบ กิ่งแขนงและรากแขนงเพิ่มขึ้น ในแต่ละชุดพบว่า กลุ่ม B-I มีความสูงและความสมบูรณ์ของลำต้น ใบและรากแตกต่างจากกลุ่ม A อย่างชัดเจน

ได้กล่าวมาแล้วว่าผลการศึกษาโครโมโซมปรากฏว่า colchicine

0.1 % เวลา 2 ชั่วโมงให้ผลดีที่สุดในการกระตุ้นให้เกิดเซล tetraploid ดังนั้นการบันทึกลักษณะและขนาดทางสัณฐานวิทยาของต้นผักบุ้งจีนกลุ่มนี้จึงกระทำโดยละเอียด เพื่อเปรียบเทียบระหว่างผักบุ้งจีนปรกติกับผักบุ้งจีนที่ผ่านการแช่สารละลาย colchicine 0.1 % เวลา 2 ชั่วโมง ผลปรากฏว่า มีความแตกต่างกันในด้านปริมาณรากแขนง กิ่งแขนง ขนาดลำต้น ขนาดของใบและน้ำหนักของต้นอย่างเห็นได้ชัด ดังปรากฏในภาพที่ 6-9 และตาราง 5-6

ความแตกต่างของผักบุ้งจีนทั้งสองกลุ่มพอสรุปได้ดังนี้

1 จำนวนรากแขนง ในต้นกล้าอายุ 1 สัปดาห์ ต้นปรกติมีจำนวนมากกว่าต้น tetraploid (ภาพที่ 6) เช่นเดียวกับต้นอายุ 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 9)

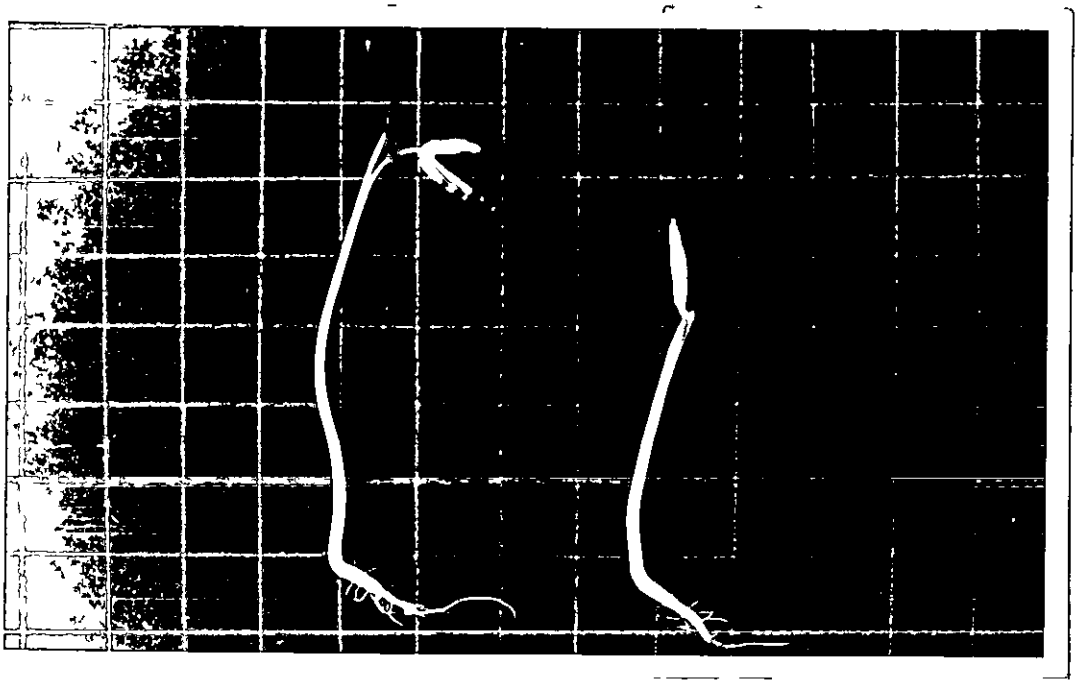
2 จำนวนกิ่งแขนง โดยทั่วไปต้น tetraploid มีจำนวนกิ่งแขนงมากกว่า 1 กิ่ง ส่วนต้นปรกติที่ใช้เวลาปลูกเท่า ๆ กันจะมีกิ่งแขนงเพียง 1 กิ่ง หรือไม่แตกกิ่งแขนงเลย (ภาพที่ 7)

3 ขนาดของใบ ในต้นปรกติมีขนาดของใบโดยเฉลี่ยเล็กกว่าต้น tetraploid (ภาพที่ 8 และตาราง 5)

4 ความสูงของต้น ในต้นปรกติสูงกว่าต้น tetraploid ช่วง 1-3 สัปดาห์แรก สัปดาห์ต่อมาจะมีความสูงไร่เรี่ยหรือเท่ากัน

5 น้ำหนักของต้น ในต้นปรกติและต้น tetraploid อายุ 8 สัปดาห์ เมื่อนำมาชั่งเปรียบเทียบระหว่างต้นสดและต้นแห้งแล้ว จะเห็นได้ว่าต้นปรกติมีน้ำหนักเฉลี่ยน้อยกว่าต้น tetraploid (ตาราง 6)

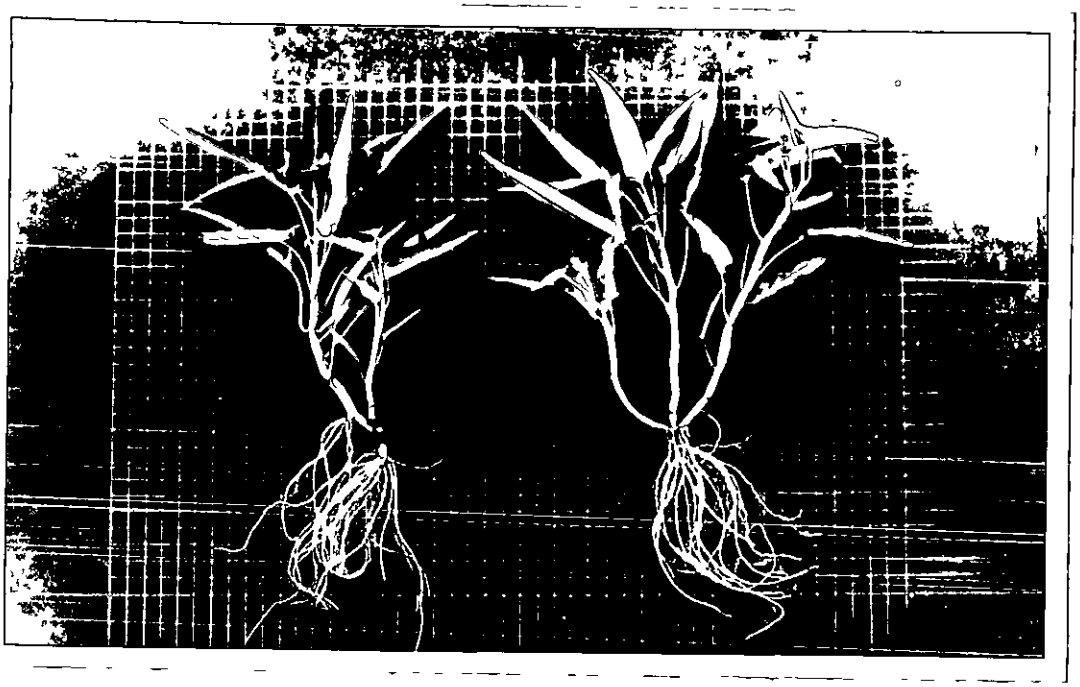
THE LIBRARY
COLLEGE OF EDUCATION
BANGKOK. THAILAND



1 ช่อง = 1 ต.ร.น.

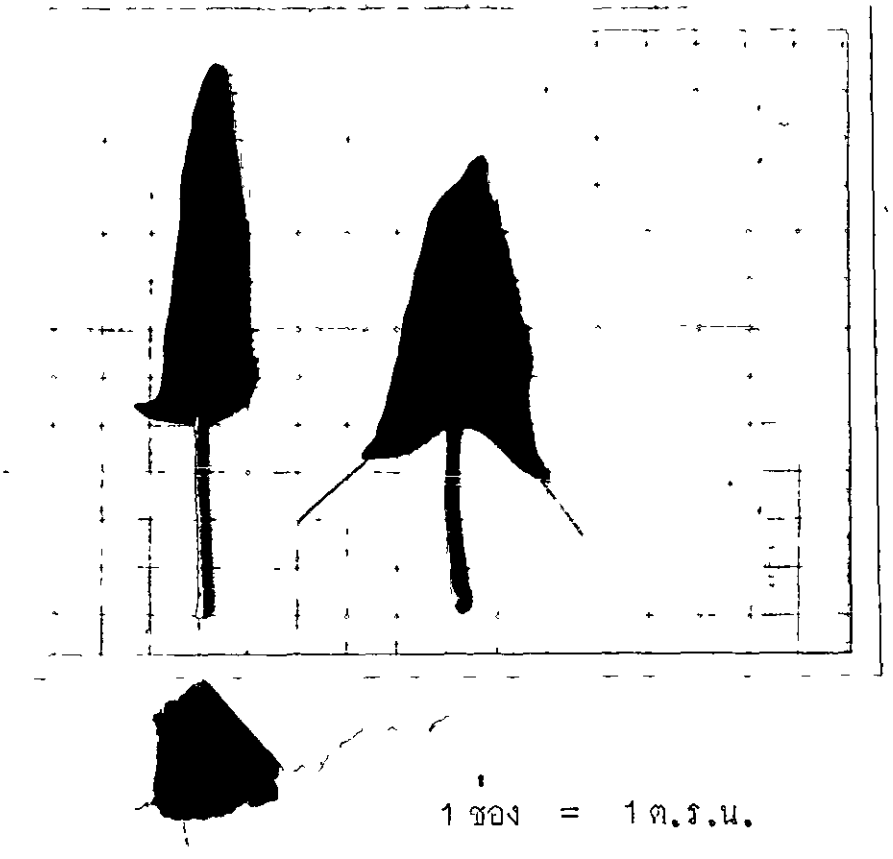
ภาพที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้าผักบุ้งจีนอายุ 1 สัปดาห์
ซ้าย ต้นควบคุม
ขวา ต้น tetraploid

52605

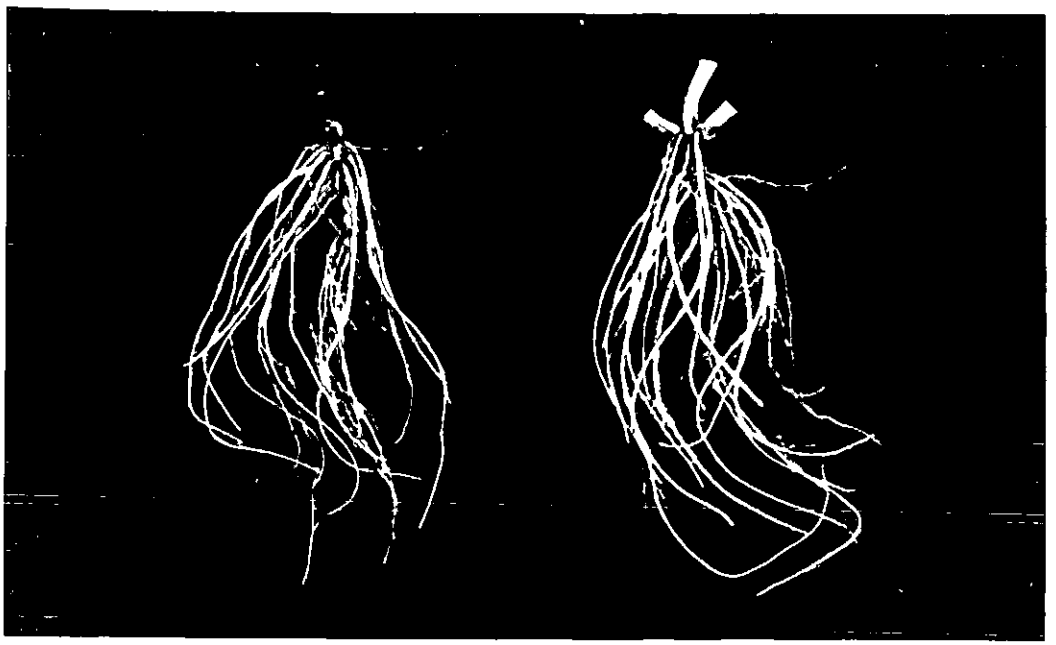


1 ช่อง = 1 ต.ร.น.

ภาพที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผักบุ้งจีนอายุ 8 สัปดาห์
ซ้าย ต้นกวบคุม
ขวา ต้น tetraploid



ภาพที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบขนาดของใบของผักบุ้งจีน
อายุ 8 สัปดาห์
ซ้าย ใบของต้นปรกติ
ขวา ใบของต้น tetraploid

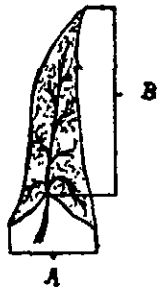


1 ช่อง = 1 ต.ร.น.

ภาพที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบรากของผักบุ้งจีน
อายุ 8 สัปดาห์
ซ้าย รากของต้นกวบกุม
ขวา รากของต้น tetraploid

ตาราง 5 แสดงการเปรียบเทียบขนาดของใบผักบุ้งจีนปรกติและ
ผักบุ้งจีนที่เป็น tetraploid อายุ 8 สัปดาห์

ใบที่	ต้นควบคุม		ต้น tetraploid		ใบที่	ต้นควบคุม		ต้น tetraploid	
	ความกว้างของฐานใบ (นิ้ว)	ความยาวของใบ (นิ้ว)	ความกว้างของฐานใบ (นิ้ว)	ความยาวของใบ (นิ้ว)		ความกว้างของฐานใบ (นิ้ว)	ความยาวของใบ (นิ้ว)	ความกว้างของฐานใบ (นิ้ว)	ความยาวของใบ (นิ้ว)
1	1.2	3.5	1.2	3.8	10*	1.1	2 2	1.4	2.1
2	1.2	3.3	1 3	3.6	11*	0.9	1.8	1.0	2 4
3*	0.8	1.5	1 4	2.1	12	1.1	3.05	1.4	3 8
4	2.1	4.8	1.1	3.3	13	0.45	2.5	1.4	4.1
5	2.0	5.0	0 6	3 7	14	0.4	1.9	0 9	2.0
6	1.0	3.0	1.4	3.5	15	0.3	2 05	0.6	2 9
7*	0.9	1 6	1.2	2.4					
8	0.3	3.3	1.4	3 0	รวม	14.35	41.0	18 2	45.7
9*	0.6	1.5	1.9	3.0	เฉลี่ย	0.95	2.73	1 21	3.0



A – ความกว้างของฐานใบ
B – ความยาวของใบ

* – ใบจากกิ่งแขนง

ตาราง 6 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักของผักบุ้งจีนปรกติกับผักบุ้งจีนที่เป็น tetraploid อายุ 8 สัปดาห์

ต้นที่	ต้นกวบคุม		ต้น tetraploid	
	น.น.สด (gm)	น.น.แห้ง (gm)	น.น.สด (gm)	น.น.แห้ง (gm)
1	24.10	3.11	61.60	8.18
2	19.90	2.95	33.40	4.68
3	17.10	2.59	33.40	5.53
4	13.10	1.53	27.70	3.46
5	11.70	1.36	26.50	3.43
6	10.30	1.29	18.40	3.16
7	8.10	1.14	17.40	2.51
8	5.70	0.56	17.20	2.03
9	4.10	0.51	16.40	2.39
10	2.30	0.37	11.10	1.40
รวม	114.40	15.41	263.40	36.77
เฉลี่ย	11.44	1.54	26.34	3.67

การอภิปรายผลการทดลอง

ผักบุ้งจีนเป็นพืชพื้นบ้านที่พบทั่ว ๆ ไปในประเทศไทย ที่สำคัญก็คือเป็นพืชที่นิยมใช้ลำต้นและใบปรุงเป็นอาหารอย่างแพร่หลาย เนื่องจากหาได้ง่าย ทั้งราคาก็ถูกกว่าพืชผักชนิดอื่น ๆ เมื่อคำนึงถึงคุณค่าและราคาของผักบุ้งจีนแล้วก็นับว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอย่างหนึ่ง

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เมล็ดผักบุ้งจีนมีปฏิกริยาตอบสนองต่อการกระตุ้นของ colchicine เป็นอย่างดี ผลการทดลองทั้งทางด้านเซลวิทยาและสัณฐานวิทยาปรากฏอย่างชัดเจนว่า ผักบุ้งจีนที่ได้รับการกระตุ้นจาก colchicine ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ และในช่วงเวลาต่าง ๆ กันนั้น มีลักษณะแตกต่างไปจากพันธุ์ปรกติ และ colchicine ที่เหมาะสมในการกระตุ้นควรมีความเข้มข้นระหว่าง 0.1 - 0.3 % (พบว่า 0.1 % ดีที่สุด)และแช่ในเวลา 2 ชั่วโมง ต้นที่ได้รับการกระตุ้นมีแนวโน้มที่จะให้ผลผลิตสูงขึ้นกว่าพันธุ์ปรกติในช่วงเวลาการปลูกเท่า ๆ กัน ช่วงดังกล่าวทำให้พืชที่ได้รับการกระตุ้นมีขนาดโตขึ้นและที่สำคัญก็คือ มีเปอร์เซนต์การงอกสูงเท่าเทียมกับต้นควบคุม ดังนั้นในด้านเศรษฐกิจ ถ้า colchicine จะมีบทบาทต่อการสร้างสรรพันธุ์ผักบุ้งจีนพันธุ์ใหม่ที่จะให้ผลผลิตสูงขึ้น ปลูกง่าย และมีความสามารถอยู่รอดได้ดีเท่าเทียมพันธุ์ทั่ว ๆ ไปแล้ว ช่วงความเข้มข้นของ colchicine และช่วงเวลาดังกล่าวนาจะเป็นประโยชน์แก่การพิจารณาผลิตผักบุ้งจีนพันธุ์ tetraploid จากพันธุ์ diploid

นอกจากนี้ในการทดลองครั้งนี้ยังพบว่า colchicine ที่มีความเข้มข้นมากกว่าช่วงดังกล่าวและใช้เวลาแช่นานกว่า 6 ชั่วโมงนั้นไม่พบว่ามีเซล tetraploid เลยพบแต่เซลที่มีจำนวนโครโมโซมมากกว่า 4n และมีเปอร์เซนต์การอยู่รอดน้อยมากด้วย ผลการทดลองดังกล่าวนี้จึงสนับสนุนข้อเท็จจริงที่ว่า ยิ่งเซล polyploid มีจำนวนโครโมโซมเกินกว่า 4n มากเท่าใดก็ยิ่งเป็นอันตรายต่อเซลมากขึ้นเท่านั้น

จากการตรวจบันทึกทางสัณฐานวิทยาของต้นผักบุ้งจีนพบว่า นอกจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมมาก ๆ ของเซลจะเป็นอันตรายต่อเซลแล้ว สาเหตุอีก

ประการหนึ่งของการตายคงเนื่องมาจากปริมาณรากแขนงน้อยเกินไปทำให้การดูดซึมน้ำและสารอื่น ๆ จากดินไม่เพียงพอกับความต้องการของต้น

ปัญหาอีกประการหนึ่งที่ควรแก่การพิจารณา ก็อ การศึกษาเปรียบเทียบคุณค่าทางอาหารระหว่างผักบุ้งจีนพันธุ์ปรกติและพันธุ์ tetraploid จากการทดลองในพืชอื่น ๆ เช่น มะเขือเทศพันธุ์ tetraploid จะให้วิตามินซีสูงขึ้น เป็นต้น ถ้าได้มีการทดสอบคุณค่าทางอาหารว่า ผักบุ้งจีนพันธุ์ tetraploid นอกจากจะให้ผลิตผลสูงกว่าพันธุ์ปรกติแล้วยังมีคุณค่าทางอาหารสูงขึ้นอีกด้วย ผลการทดลองนี้ก็จะเป็นประโยชน์กว้างขวางยิ่งขึ้น ประการสุดท้ายที่ควรกำนึงถึงก็อ ความนิยมของผู้บริโภค จากตัวอย่างที่มีมาแล้วเกี่ยวกับการผลิตข้าวจ้าวพันธุ์มหัศจรรย์ที่ให้ผลผลิตอย่างงดงาม แต่ปรากฏว่าไม่เป็นที่นิยมของผู้บริโภคเท่าที่ควร เนื่องจากรสชาดด้อยลงไปจากเดิม ดังนั้นปัญหาเกี่ยวกับคุณสมบัติทางเกมีของเซลและปัญหาด้านอื่น ๆ ของผักบุ้งจีนพันธุ์ tetraploid จึงเป็นเรื่องที่จะต้องค้นคว้าต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

วินิจวนันกร,พระยา ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับชื่อพื้นเมือง ชื่อพฤกษศาสตร์ กรมป่าไม้ 2503 หน้า 452.

ศรีพรรณ ไชยวงศ์ การใช้สาร colchicineเพื่อเพิ่มจำนวนโครโมโซมของข้าว (Oryza sativa)วิทยานิพนธ์ กสบ. คณะกสิกรรมและสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มีนาคม 2507.

เอมอร ศิริวรรณ การศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ไทยบางชนิด วิทยานิพนธ์ กสบ. คณะกสิกรรมและสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มีนาคม 2509.

Darlington,C.D. and L.F. La Cour,The Handling of Chromosome,Hafnar Publishing Co.Inc,Darien, Conn,1970,272 pp.

Davidson,D. "The differential response of meristems of Vicia faba to colchicine " in Biological Abstract Vol. 51,1 April-1May,1970.

Eigsti,O.J. and D. Pierre Chemical studies of pure substance colchicine,The Iowa State College Press,Ames,Iowa U.S.A,1955,14p.

Jaranowski,J. and M. Kalasa " Induction of polyploid in several Trifolium,Melilotus,Medicago and Trigonella sp."in Biological Abstract,Vol.51, 1 April-1 May,1970.

Lower,R.L. and K.W. Johnson " Observation on sterility of induced autotetraploid watermelon " in Biological Abstract,Vol.51,1April-1 May,1970.

Murthy,B.S,L.V.S. Rao and M.V. K. Rao " Colchicine induced autotetraploid in G_3 Chilli(Capsicum

annuum L.)" in Biological Abstract,Vol.51, 1 April-1 May,1970.

Sass,J.E. " Acetocarmine or Aceto-orcein Smear" in Botanical Microtechnique,3rd edition,The Iowa State College Press,Ames,Iowa U.S.A 1958.

Smith,L." The Acetocarmine Smear Technic " in Stain Technology,Vol. 22,No. 1,January 1947, 17-30 pp.

Sohoo,M.S.,D.S. Athwal and S. Chandra " Colchicine induced polyploidy in chickpea (Cicer arietinum L.) in Biological Abstract, Vol. 52,No. 3,1 February 1971.

Stanev,D " Induced mutation in Mentha piperital with the aid of colchicine " in Biological Abstract,Vol. 52,No. 3,1 February 1971.