ผลของสารสกัดเมล็ดดองดึง *Gloriosa superba* Linn. ที่มีต่อการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ของแตงโม *Citrullus lanatus* Mats & Nakai ในหลอดทดลอง

นางสาวกนิษฐา คุ้มวณิชย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974 – 334 – 910 - 3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19291603X

EFFECT OF CRUDE EXTRACT FROM CLIMBING LILY *Gloriosa superba* Linn. SEEDS ON POLYPLOID INDUCTION OF WATERMELON *Citrullus lanatus* Mats & Nakai *In Vitro*

Miss Kanittha Khumwanich

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Genetics

Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974 – 334 – 910 - 3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดเมล็ดดองดึง *Gloriosa superba* Linn. ที่มีต่อการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ของแตงโม *Citrullus lanatus* Mats & Nakai ในหลอดทดลอง
โดย	นางสาวกนิษฐา คุ้มวณิชย์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์สุมิตรา คงชื่นสิน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์พัชรา ลิมปนะเวช

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์มุกดา คูหิรัญ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์สุมิตรา คงชื่นสิน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พัชรา ลิมปนะเวช)

..... กรรมการ
(อาจารย์วราลักษณ์ ตันติบรรพกุล)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กนิษฐา คุ้มวณิชย์ : ผลของสารสกัดเมล็ดดองดึง *Gloriosa superba* Linn. ที่มีต่อการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ของแตงโม *Citrullus lanatus* Mats & Nakai ในหลอดทดลอง (EFFECT OF CRUDE EXTRACT FROM CLIMBING LILY *Gloriosa supperba* Linn. SEEDS ON POLYPLOID INDUCTION OF WATERMELON *Citullus lannatus* Mats & Nakai *In Vitro*) อ.ที่ปรึกษา : รศ.สุมิตรา คงชื่นสิน , อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.พัชรา ลิมปนะเวช ,91 หน้า. ISBN 974 – 334 – 910 - 3

การศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดดองดึง *Gloriosa supperba* Linn. ที่มีต่อการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ของแตงโมพันธุ์เพชร F1 ในหลอดทดลอง ใช้ปลายยอดของแตงโมที่เพิ่มจำนวนในหลอดทดลองมาแช่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารสกัดเมล็ดดองดึงที่วิเคราะห์ปริมาณสารโคลชิซีนแล้ว ความเข้มข้น 0 0.01 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการใช้สารโคลชิซีนสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นเดียวกันและระยะเวลาในการแช่เท่ากัน จากนั้นย้ายมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลง + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ศึกษาอัตราการรอดชีวิต ค่า LD_{50} การเจริญเติบโต ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ขนาดของเซลล์คุม จำนวนคลอโรพลาสต์ และจำนวนโครโมโซม พบว่า อัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดและระยะเวลาในการแช่ในสารสกัดเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกับการใช้สารโคลชิซีนสังเคราะห์ จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมปลายรากในหลอดทดลอง พบว่า แตงโมพันธุ์เพชร F1 ต้นควบคุมมีจำนวนโครโมโซม 22 แท่ง ส่วนต้นแตงโมที่แช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึง พบว่า มีจำนวนหนึ่งที่มีจำนวนโครโมโซมใกล้ 44 แท่ง ขนาดของเซลล์คุมและจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของต้นที่แช่ในสารสกัดใหญ่กว่า และมากกว่าต้นควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็นการแสดงว่าได้ต้นแตงโมที่น่าจะเป็นต้นพอลิพลอยด์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา พันธุศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

3970010423 : MAJOR GENETICS

KEY WORD : *Gloriosa superba* / COLCHICINE / POLYPLOID / WATERMELON

KANITTHA KHUMWANICH : EFFECT OF CRUDE EXTRACT FROM CLIMBING LILY *Gloriosa superba* Linn. SEEDS ON POLYPLOID INDUCTION OF WATERMELON *Citrullus lanatus* Mats & Nakai *In Vitro*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SUMITRA KONGCHUENSIN. THESIS CO-ADVISOR : ASSIST. PROF. PATCHRA LIPANAVECH. 91 pp. ISBN 974 – 334 – 910 - 3

The study of effect of crude extract from climing lily *Gloriosa supperba* Linn. Seeds on polyploid induction of watermelon cv. Petch F_1 in vitro was experimented on watermelon shoots multiplied *in vitro*. Watermelon shoots were immersed in liquid MS medium containing crude extract from climbing lily seeds which was previously analyzed the colchocine content. The crude extract colchicine concentrations used were 0, 0.01 and 0.05 percent for 12, 24 and 36 hours which were compared with synthetic colchicine of the same concentrations and immersion period. The treated shoot were subcultured to modified semisolid MS medium + 1 mg/l IAA. Survival rate, LD_{50}, growth, morphology, guard cell size, chloroplast number and chromosome number were examined. It was found that survival rate and growth of watermelon shoots significantly decreased when crude extract concentration and immersion period increased which was similar to what happened when synthetic colchicine was used. The chromosome study in *in vitro* root tip cells revealed that the control Petch F_1 watermelon had 22 chromosome while some of the plants treated with climbing lily seed crude extract had nearly 44 chromosome. Statistically bigger size of guard cells and larger number of guard cell chloroplast were found in the plants treated with crude extract which indicated that they probably were polyploid.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา พันธุศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความอนุเคราะห์อย่างสูงจากท่านรองศาสตราจารย์สุมิตรา คงชื่นสิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์พัชรา ลิมปนะเวช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ในการวิจัยมาด้วยดี จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ และกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์มุกดา คูหิรัญ ขอขอบพระคุณ อาจารย์วราลักษณ์ ตันติบรรพกุล ที่ได้กรุณาตรวจแก้ไขตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ ที่ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ หม่อมราชวงศ์ทิพยางค์ กาญจนดุล ท่านผู้จัดการโรงเรียนราชินีบน และราชินีมูลนิธิ ที่เมตตาให้ทุนการศึกษา ขอกราบขอบพระคุณ คุณครูใจรัก ดวงพลอย คุณครูใหญ่ โรงเรียนราชินีบนที่ให้การสนับสนุนและส่งเสริมในการศึกษาต่อ

ขอขอบคุณ ดร.ลือชัย อารยะรังสฤษฏ์ และคุณสุภาพร จันทร์บัวทอง ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ที่เอื้อเฟื้อโปรแกรมคอมพิวเตอร์ IRRI STAT สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ขอขอบคุณ อาจารย์ทรงศักดิ์ สำราญสุข อาจารย์สุวัฒน์ ธีระพงษ์ธนากร คุณชาลินี คงสวัสดิ์ คุณรักชนก โคโต คุณพรทิพย์ เทิดบารมี คุณสหัช จันทนาอรพินท์ คุณอัญชลี ใจดี และคุณอาภรณ์ บัวศรี ที่ช่วยเหลือทางด้านการถ่ายภาพและพิมพ์วิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ช่วยเหลือด้านทุนการศึกษาส่วนหนึ่ง

ประโยชน์และคุณค่าอันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยของน้อมรำลึก และมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณผู้บังเกิดเกล้าทั้งสอง คณาจารย์ และผู้มีพระคุณต่อผู้วิจัยทุกท่าน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญภาพ.....ญ

บทที่

1 บทนำ.....1
2 ตรวจเอกสาร.....4
3 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการศึกษา.....18
4 ผลการศึกษา.....27
5 อภิปรายผลการศึกษา.....50
6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ.....57

รายการอ้างอิง.....59
ภาคผนวก.....69
ประวัติผู้เขียน.....89

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความเข้มข้นของโคลชิซีนจากสารสกัดเมล็ดดองดึง และระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ ปลายยอดแตงโม	23
2	ความเข้มข้นโคลชิซีนสังเคราะห์ และระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ ปลายยอดแตงโม	24
3	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของปลายยอดแตงโมที่เลี้ยงในหลอดทดลอง หลังจากที่แช่ใน อาหารเหลว MS ที่มีสารสกัดเมล็ดดองดึงความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 8 สัปดาห์	29
4	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของปลายยอดแตงโมที่เลี้ยงในหลอดทดลอง หลังจากที่แช่ใน อาหารเหลว MS ที่มีสารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 8 สัปดาห์	29
5	แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของแตงโมที่ได้รับสารสกัดเมล็ดดองดึงในปริมาณต่างๆ ที่ระยะเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง	30
6	แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของแตงโมที่ได้รับสารละลายโคลชิซีนสังเคราะห์ในปริมาณต่างๆ ที่ระยะเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง	32
7	แสดงความสูง (เซนติเมตร) ของปลายยอดแตงโมที่เลี้ยงในหลอดทดลอง หลังจากแช่ในอาหาร MS ที่มีสารสกัดเมล็ดดองดึงความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 8 สัปดาห์	37
8	แสดงความสูงของปลายยอดแตงโมที่เลี้ยงในหลอดทดลอง หลังจากแช่ในอาหาร MS ที่มีสารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 8 สัปดาห์	38
9	ขนาดของเซลล์คุมและจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของแตงโมที่รอดชีวิตหลังจากแช่ในอาหารเหลว MS ที่มีสารสกัดเมล็ดดองดึงความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 8 สัปดาห์	46
10	ขนาดของเซลล์คุมและจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของแตงโมที่รอดชีวิตหลังจากแช่ในอาหารเหลว MS ที่มีสารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 8 สัปดาห์	47
11	ตารางแสดงความแปรปรวนของความสูงของต้นแตงโมที่แช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึง (ค่าเฉลี่ยจาก 360 ต้น)	82
12	ตารางแสดงความแปรปรวนของความสูงของต้นแตงโมที่แช่ในสารละลายโคลชิซีนสังเคราะห์ (ค่าเฉลี่ยจาก 360 ต้น)	83

ตารางสารบัญ (ต่อ)

13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะความสูงของต้นแตงโมที่เลี้ยงในหลอดทดลอง หลังจากแช่ในอาหารที่เติมสารสกัดเมล็ดดองดึงเปรียบเทียบกับสารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้นต่างๆ 84

14 ตารางแสดงความแปรปรวนของความกว้างของเซลล์คุมของต้นแตงโมที่แช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึง.....85

15 ตารางแสดงความแปรปรวนของความยาวของเซลล์คุมของต้นแตงโมที่แช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึง.....86

16 ตารางแสดงความแปรปรวนของเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของต้นแตงโมที่แช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึง.....87

17 ตารางแสดงความแปรปรวนของความกว้างของเซลล์คุมของต้นแตงโมที่แช่ในสารโคลชิซีนสังเคราะห์ 88

18 ตารางแสดงความแปรปรวนของความยาวของเซลล์คุมของต้นแตงโมที่แช่ในสารโคลชิซีนสังเคราะห์.....89

19 ตารางแสดงความแปรปรวนของเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของต้นแตงโมที่แช่ในสารโคลชิซีนสังเคราะห์.....90

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างโคลชิซีน	8
2	กราฟ Typical sigmoid motarity แสดงค่า LD_{50} ของยอดแตงโมที่แช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึงที่ระยะเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง	31
3	กราฟ Typical sigmoid motarity แสดงค่า LD_{50} ของยอดแตงโมที่แช่ในสารโคลชิซีนสังเคราะห์ที่ระยะเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง	33
4	ยอดแตงโม (ต้นควบคุม) ที่แช่ในอาหารเหลวสูตร MS เป็นเวลา 12 , 24 และ 36 ชั่วโมง (ก. ข. และ ค.) แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหาร MS ดัดแปลง + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์	39
5	ยอดแตงโมที่ได้รับสารสกัดเมล็ดดองดึง ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์	40
6	ยอดแตงโมที่แช่ในอาหารเหลวสูตร MS + สารสกัดเมล็ดดองดึง ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 , 24 และ 36 ชั่วโมง (ก. ข. และ ค.) แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหาร MS + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์	41
7	ยอดแตงโมที่ได้รับสารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์	42
8	ยอดแตงโมที่ได้รับสารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์	43
9	จำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากแตงโมในหลอดทดลองที่เป็นดิพลอยด์ 2n = 22 (กำลังขยาย 2,500 เท่า)	44
10	จำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากแตงโมในหลอดทดลองที่คาดว่าเป็นพอลิพลอยด์ หลังจากแช่ยอดในสารสกัดเมล็ดดองดึง 0.01 เปอร์เซ็นต์ 12 และ 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 2,500 เท่า)	45

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ดองดึง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Gloriosa superba* Linn. เป็นไม้ล้มลุกเลื้อย (เต็ม สมิตินันท์, 2523) ในประเทศไทยมักพบเป็นวัชพืชขึ้นตามท้องถิ่นต่างๆ แทบทุกภาคของประเทศ ปัจจุบันดองดึงเป็นพืชสมุนไพรที่น่าสนใจ เนื่องจากพบว่ามีสาร alkaloid ประกอบอยู่หลายชนิด ที่สำคัญและมีปริมาณสูงคือสารโคลชิซีน (colchicine) ซึ่งมีอยู่ในแทบทุกส่วนของต้น สุนิชา เอี่ยมน้อย และคณะ (2521) ได้ศึกษาและสกัดสารโคลชิซีนจากต้นดองดึง พบว่าโคลชิซีนมีมากที่สุดในฝักและเมล็ด เหง้ามีปริมาณรองลงมา ในใบและลำต้นมีน้อย Clewer et al. (1915) พบว่าเหง้าของ *G. superba* Linn. มีปริมาณโคลชิซีนประมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณของสารโคลชิซีนในสารสกัดจากเมล็ดดองดึง พบว่าอยู่ในช่วง 0.635 – 1.56 เปอร์เซ็นต์ (Bunyapraphatsara et al., 1991)

โคลชิซีนเป็นสารที่มีประโยชน์ทางการแพทย์ โดยสามารถนำมาใช้รักษาโรคบางอย่างได้ เช่น ใช้แก้โรคผิวหนัง โรคปวดตามข้อและขับพยาธิ (Chopra et al., 1965) ใช้รักษาโรคไขข้ออักแสบ (พยอม ตันติวัฒน์, 2521) และรักษาโรคมะเร็งได้เนื่องจากสารโคลชิซีนเป็นสารที่มีพิษต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (ยุพา จงสุวัฒน์, 2527) สารนี้ยังเป็นประโยชน์ในการศึกษาเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ของเซลล์ เนื่องจากมีคุณสมบัติยับยั้งการสร้าง spindle fiber ในขณะที่นิวเคลียสกำลังแบ่งตัวทำให้เซลล์หยุดอยู่ที่ระยะเมตาเฟส (Eigsti et al., 1949) ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาโครโมโซมในห้องปฏิบัติการและนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นพอลิพลอยด์ได้ด้วย โดยพืชที่เป็นพอลิพลอยด์จะมีขนาดของเซลล์โตขึ้น ดอกและเมล็ดใหญ่กว่าปกติ ปริมาณสารเคมีสะสมในส่วนต่างๆ มากขึ้น และอาจมีลักษณะที่ดีทางด้านเศรษฐกิจ เช่น แตงโมที่เป็นพอลิพลอยด์จะมีเปอร์เซ็นต์น้ำตาลสูงกว่าดิพลอยด์ (ดำรง สินไชย, 2521) และกล้วยไม้ที่เป็นเตตระพลอยด์จะมีกลีบดอกขนาดใหญ่ ทำให้บานได้นาน (สาริณี ไชยเจริญ, 2538) เป็นต้น แต่ดองดึงจัดอยู่ในกลุ่มพวกพืชที่มีพิษ ดังนั้นในการนำมาใช้ต้องคำนึงถึงปริมาณที่เหมาะสมด้วย (Mendis, 1989; Fernando and Fernando, 1990)

สารโคลชิซีนที่ใช้กันเป็นสารที่สกัดได้จากต้น *Colchicum autumnale* Linn. (Clewer et al., 1915) ซึ่งไม่สามารถปลูกได้ในประเทศไทย หรือใช้ในรูปของสารสังเคราะห์ซึ่งมีราคาสูง การนำสารสกัดจากเมล็ดดองดึงซึ่งมีโคลชิซีนประกอบอยู่ด้วย มาใช้แทนเพื่อชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์จะช่วยลดค่าใช้จ่ายลงได้

งานวิจัยนี้จึงเน้นการศึกษาผลของการใช้สารสกัดที่ได้จากเมล็ดดองดึง ซึ่งเป็นส่วนที่พบปริมาณโคลชิซีนสูง เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของสารนี้ในการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมในพืช โดยเปรียบเทียบกับการใช้สารโคลชิซีนสังเคราะห์ และในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาในสภาพปลอดเชื้อ ใช้แตงโมซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งเป็นพืชทดลอง เนื่องจากเพาะเลี้ยงได้ง่ายและเจริญเติบโตเร็ว (พีรยุทธ บุญมีรอด, 2536) และมีจำนวนโครโมโซมน้อย คือ (2n = 2x = 22) (ดำรง สินไชย, 2521) เพื่อเป็นแนวทางในการใช้กับพืชอื่นๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดดองดึง (*Gloriosa superba* L.) ที่มีต่อการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ของแตงโม เปรียบเทียบกับการใช้สารโคลชิซีนในหลอดทดลอง

2. เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของสารสกัดเมล็ดดองดึงในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงผลของสารสกัดจากเมล็ดดองดึงที่มีต่อการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในพืช ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการชักนำพืชให้เป็นพอลิพลอยด์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์

2. ทราบความเข้มข้นของสารสกัดจากเมล็ดดองดึงและระยะเวลาที่เหมาะสม ในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์

3. สามารถใช้สารสกัดเมล็ดดองดึง ศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ในห้องปฏิบัติการแทนการใช้สารโคลชิซีนบริสุทธิ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง

ขอบเขตของวิทยานิพนธ์

1. หาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยอดแตงโมพันธุ์เพชร F1 ในหลอดทดลอง

2. สกัดสารจากเมล็ดดองดึง นำไปทดสอบหาปริมาณสารโคลชิซีน โดยเปรียบเทียบกับปริมาณสารโคลชิซีนสังเคราะห์

3. ศึกษาการเจริญเติบโต และอัตราการรอดชีวิตของปลายยอดแตงโมที่แช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึงและสารละลายโคลชิซีน ในปริมาณความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ

4. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแตงโมในข้อ 3

5. ศึกษาการเกิดพอลิพลอยด์โดยการตรวจนับจำนวนโครโมโซม ตามวิธีการเตรียมเซลล์แบบ Feulgen squash และเทคนิคการเตรียมเซลล์ของรากธัญพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลอง

6. วัดขนาดเซลล์คุมจากใบของยอดแตงโมที่ผ่านการแช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึง และสารละลายโคลชิซีน ในปริมาณความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ

7. นับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม จากใบที่ศึกษาในข้อ 6

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ดองดึง (*Gloriosa superba* L.) หรือ climbing lily เป็นพืชวงศ์ Liliaceae (เต็ม สมิตินันท์, 2523) มีจำนวนโครโมโซม 2n = 22 (Dalington and Janki, 1945 ; Vijayavalli and Mathew, 1990) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนของทวีปแอฟริกาใต้ และเขตร้อนของทวีปเอเชีย พบมากในอินเดีย ศรีลังกา แอฟริกาและอินโดจีน (Hooker, 1894) โดยเฉพาะในประเทศศรีลังกาจะพบทั่วๆ ไป ตามที่ลุ่มหรือบริเวณใกล้ทะเล (Jayaweera, 1981) ในประเทศไทยมักพบเป็นวัชพืชขึ้นตามท้องถิ่นต่างๆ แทบทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะแถบริมป่าละเมาะที่เป็นดินทรายใกล้ทะเล พบมากทางภาคใต้และภาคตะวันออก พบประปรายทางสระบุรี เชียงใหม่ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (พรพรหม พรหมเมศร์ และคณะ, 2538)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ดองดึงเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีอายุยืน (perennial herb) ลำต้นประกอบด้วยสองส่วนคือ ลำต้นเหนือดินมีอายุสั้นเพียงฤดูเดียว ส่วนลำต้นใต้ดินหรือหัว (tuber) มีลักษณะเป็นเหง้าคล้ายหัวขวานที่ปลายสุดของเหง้าทั้งสองด้านเป็นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญที่งอกเป็นต้นในฤดูต่อไป รากเป็นระบบราก ฝอยจะสลายตัวไปเมื่อลำต้นเหนือดินแห้งตาย ใบยาวเรียวตรงปลายทำหน้าที่เป็นมือเกาะ ดอกเป็นดอกเดี่ยว ขนาดใหญ่มีสีเหลืองที่โคนกลีบ ส่วนปลายกลีบมีสีแดง ขอบเป็นคลื่น ผลมีลักษณะเป็นฝักยาวรี เมื่ออ่อนมีสีเขียวเป็นมัน ผลแก่จะมีสีน้ำตาล เมื่อแห้งจะแตกตามแนวผนังกั้น เมล็ดค่อนข้างกลม เมล็ดอ่อนจะมีสีขาวเมื่อสุกเต็มที่จะมีเปลือกสีส้มแดงลักษณะกลมและแข็ง (Chopra et al., 1965; Backer and Bakhuizen van Brink, 1968) การเจริญเติบโตดองดึงโดยทั่วไปพบว่า เจริญได้ดีในดินร่วนปนทรายที่มีการระบายน้ำดี สามารถขึ้นได้ทั้งในที่ร่มแดดรำไร ในที่แล้งและที่ระดับน้ำทะเลปานกลางไปจนถึงระดับสูงกว่าน้ำทะเล 1,500 ถึง 3,000 เมตร การขยายพันธุ์ใช้เหง้าหรือเมล็ด ต้นดองดึงที่ปลูกจากเมล็ดจะออกดอกเมื่อมีอายุอย่างน้อย 2 ปี (Gibberd and Gibberd, 1977)

คุณสมบัติทางด้านสมุนไพร

ดองดึงเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณดังนี้ ส่วนหัวใช้เป็นยาขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ อาการจุกเสียด ใช้เป็นยาระบาย ยาบำรุงกำลัง ยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ยาขับน้ำดี โรคเรื้อน โรคไขข้ออักเสบ (โรคเก๊าท์) โรคริดสีดวงทวาร ไข้มาเลเรีย เลือดกำเดาไหล โรคม้ามอักเสบและใช้รักษาแผลถลอก แผลเปื่อย แผลพุพอง (เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2522 ; Duke, 1985; Chandra et al., 1988) หัวดองดึง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แห้งถ้านำมาป่นให้แห้งเป็นแป้ง ใช้เป็นยาผงแก้โรคหนองใน แก้กามโรค ขับลมในท้อง แก้คุดทะราด (นันทวัน บุณยประภัศร, 2542) ถ้าเป็นหัวสดสามารถใช้ฝนทาแก้พิษงู พิษตะขาบ พิษแมงป่อง แก้โรคผิวหนัง และโรคไฟลามทุ่ง (เต็ม สมิตินันท์, 2523 ; Duke, 1985) ส่วนรากใช้เป็นยาถ่ายพยาธิสัตว์ แก้โรคท้องมาน (Watt and Breyer – Brandwijk, 1962) น้ำคั้นจากใบดองดึงใช้ฆ่าเหาและหมัดได้ (Duke, 1985)

องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมล็ดดองดึง

ในดองดึงมีสารอัลคาลอยด์หลายชนิด ที่สำคัญและมีปริมาณสูงคือ โคลชิซีน Jayaweera (1981) ; Agarwal and Ghosh (1985) ; Duke (1985) รายงานว่า ในส่วนของใบ ดอก หัว และเมล็ดมีสารประกอบแยกได้ ดังนี้ สารที่พบในใบ คือ 3 – desmethylcolchicine, colchicine ($C_{22}H_{25}O_6N$), colchiceine ($C_{21}H_{23}O_6N$) และ chelidonic acid สารที่พบในดอก คือ β - lumicolchicine, colchicine, N – formyldesacetylcolchicine, colchiceine, 3 – desmethylcolchicine, lumicolchicine, γ - lumicolchicine, glucosides of 3 – emethylcolchicine และ lutecline สารที่พบในหัว คือ colchicine, N – formyldesacetylcolchicine, 2 – desmethyl colchicine, β - lumicolchicine, gloriosine, actiphenol ($C_{15}H_{17}NO_4$), γ - resorcylic acid, gloriosol, choline, benzoic acid, salicylic acid, superbine, cornigerine, glucose, fatty acid, 6 – methylooxysalicylic acid และ monomethyl ether สารที่พบในเมล็ด คือ colchicine, 2 – desmethylcolchicine, lumicolchicine และ N – formyl – n - desacetylcolchicine

Bensen (1989) รายงานว่า ภายในเซลล์ของหัวดองดึงมีสารสะสมของเม็ดแป้งหลายชนิด ได้แก่ inulin triticum และ simple ในหัวที่มีอายุน้อยพบเม็ดแป้งชนิด inulin มาก ส่วนหัวที่มีอายุมากพบเม็ดแป้งชนิด triticum มาก นอกจากนี้ Chaudhuri and Thakur (1993) ได้รายงานเพิ่มเติมว่าพบสารอัลคาลอยด์อีกชนิดหนึ่งในเมล็ด คือ 1,2 – didemethylcolchicine ซึ่งแยกออกมาจาก colchicine , 2 – 3 – didemethylcolchicine , 3 – demethylcolchicine , N – formyl – N – deacetylcolchicine และ colchiside

Clewer et al. (1915) พบว่าหัวของดองดึงมีสารโคลชิซีนประมาณ 0.30 - 0.38 เปอร์เซ็นต์ Quisumbing (1951) รายงานว่า หัวดองดึงมีสารโคลชิซีน 0.30 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าสารโคลชิซีนที่ได้จากดอกดองดึงเป็นสารชนิดเดียวกับที่สกัดได้จาก *Colchicum autumnale* L. ซึ่งมีปริมาณโคลชิซีนที่สกัดได้จากส่วนหัว 0.25 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ด 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Eigsti and Dustin, 1955) ส่วน Watt and Breyer – Brandwijk (1962) พบว่าในหัวดองดึงมีสารโคลชิซีนประมาณ 0.30 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเช่น

กัน Sarin et al. (1974) รายงานว่าปริมาณสารโคลชิซีนพบเป็นจำนวนมากในหัว และมากที่สุดในเมล็ด โดยในหัวดองดึงมีปริมาณอัลคาลอยด์ 0.57 เปอร์เซ็นต์ จะเป็นสารโคลชิซีน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในเมล็ดพบปริมาณสารอัลคาลอยด์ 0.81 เปอร์เซ็นต์ จะเป็นสารโคลชิซีน 0.06 เปอร์เซ็นต์ ในหัวอ่อนจะมีปริมาณโคลชิซีนอยู่ครึ่งหนึ่งของหัวที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว สุนิชา เอี่ยมน้อย และคณะ (2521) ได้ศึกษาสารโคลชิซีนในพืชสมุนไพรไทยที่อยู่ในสกุล Liliaceae พบว่าดองดึงมีปริมาณสารโคลชิซีนมากที่สุดในฝักและเมล็ด ในหัวมีปริมาณรองลงมา ในใบและลำต้นมีน้อย ส่วนในพืชสมุนไพรชนิดอื่นๆ ไม่พบว่ามีสารโคลชิซีน Tongxum (1988) พบว่า ถ้านำหัวที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วมาทำให้แห้งจะมีสารโคลชิซีน 0.358 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณของสารโคลชิซีนในสารสกัดจากเมล็ดดองดึง พบว่า อยู่ในช่วง 0.635 – 1.56 เปอร์เซ็นต์ (Bunyapraphatsra et al., 1991) สมสุข ศรีจักรวาฬ และปราโมทย์ เกิดศิริ (2539) ได้ทำการศึกษาอายุเก็บเกี่ยว ปริมาณผลผลิตของเมล็ดและเหง้า รวมทั้งปริมาณสารโคลชิซีนในส่วนทั้งสอง ซึ่งปลูกทดลองที่สถานีทดลองยางโป่งแรด จังหวัดจันทบุรี พบว่า ค่าเฉลี่ยปริมาณสารโคลชิซีนในเมล็ดเก็บเกี่ยวที่อายุ 5 เดือน และ 6 เดือน เท่ากับ 0.92 และ 0.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

นันทวัน บุญยประภัศร (2542) รายงานว่า ทุกส่วนของดองดึงมีสารต่างๆ ประกอบอยู่หลายชนิด ดังต่อไปนี้

1. aporphine , homo : 1-12-dihydroxy : 2 – 10 – 11 – trimethoxy
2. bezoic acid
3. benzoic acid , 2 – hydroxy - 6 – methoxy
4. chelidonic acid
5. colchicamide
6. colchiceine , 2 – demethyl
7. colchiceine , 3 – demethyl
8. colchicine
9. colchicine , 1 - 2 – didemethyl
10. colchicine , 2 - 3 – didemethyl – N – deacetyl
11. colchicine , 2 - 3 – didemethyl
12. colchicine , 2 – demethyl
13. colchicine , 2 - 3 – demethyl – N – deacetyl : N – formyl
14. colchicine , 3 – demethyl
15. colchicine , deacetyl : N – formyl
16. colchicine , demethyl

17. colchicine , N – deacetyl : 2 – 3 – didemethyl
18. colchicine , N – deacetyl : 3 – didemethyl : N – formyl
19. colchicine , N – deacetyl : N – formyl
20. colchicine , N – deacetyl : O – demethyl : N – formyl
21. colchicine , N – deacetyl : N – formyl
22. colchiside
23. colchifoline , 2 – demethyl
24. colchifoline , 3 – demethyl
25. cornigerine
26. daucosterol
27. (+) – s – floramultine
28. linoleic acid
29. lumicolchicine
30. β - lumicolchicine – 3 – demethyl – N – deacetyl : N – formyl
31. β - lumicolchicine
32. β - lumicolchicine : 3 – demethyl
33. β - lumicolchicine : N – deacetyl : 3 – demethyl: N – formyl
34. β - lumicolchicine : N – deacetyl : N – formyl
35. β - lumicolchicine : N – deacetyl : O – demethyl: N – formyl
36. β - lumicolchicine : O – demethyl
37. γ - lumicolchicine
38. γ - lumicolchicine : 3 – demethyl - N – deacetyl : N – formyl
39. γ - lumicolchicine , 3 – demethyl
40. γ - lumicolchicine , N – deacetyl : N – formyl
41. luteolin
42. oleic acid
43. perolyrine, iso
44. proline
45. γ - resocylate , monomethyl
46. β - sitosterol

47. stigmasterol

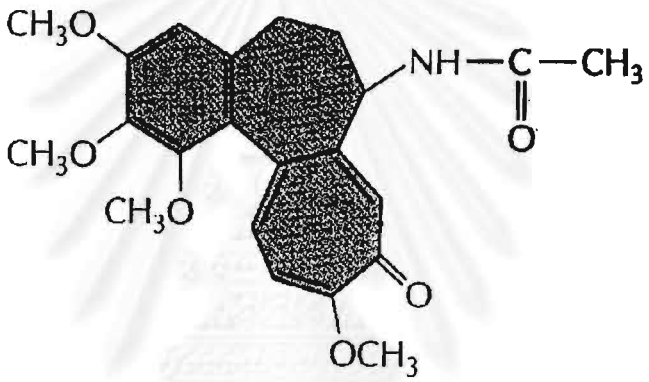
48. stigmasterol – 3 –O - β - D – glucoside

49. superbine

คุณสมบัติของโคลชิซีน

โคลชิซีนเป็นสารประกอบอัลคาลอยด์ (alkaloid) มีผลึกเป็นรูปเข็ม ไม่มีสี แต่จะมีสีเข้มขึ้นเป็นสีเหลืองอ่อน เมื่อถูกแสง น้ำหนักโมเลกุล 399.43 จุดหลอมเหลว 155 – 157 องศาเซลเซียส

สูตรโมเลกุล $C_{22}H_{25}NO_6$



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างโคลชิซีน (Eigsti and Dustin, 1955 ; King and Stansfield, 1990 ; Budavari et al., 1996)

สารโคลชิซีนมีคุณสมบัติเป็นด่างอ่อนๆ หรือเป็นกลาง จึงไม่สามารถทำปฏิกิริยากับกรดเพื่อให้เกิดเกลืออัลคาลอยด์ ซึ่งแตกต่างจากอัลคาลอยด์ชนิดอื่นๆ แต่จัดเป็นอัลคาลอยด์ เพราะสามารถตกตะกอนกับสารที่ใช้ทดสอบอัลคาลอยด์ได้หลายตัว (เอกรินทร์ สายฟ้า, 2525) ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และในน้ำเย็น จะละลายได้น้อยในน้ำอุ่น น้ำร้อน และเบนซิน ในอีเทอร์แทบจะไม่มีการละลายเลย อนุพันธ์ของโคลชิซีนที่สำคัญคือ colchiceine สูตรโมเลกุล $C_{21}H_{23}NO_6$ มักเกิดควบคู่กันในธรรมชาติ หรือเกิดจาก Hydrolysis โคลชิซีนด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่เจือจางแล้ว ให้ความร้อนจะได้เมธิลแอลกอฮอล์ สาร colchiceine มีคุณสมบัติเป็นกรด เมื่อนำสารนี้ทำปฏิกิริยากับสารละลายเฟอริกคลอไรด์จะให้สีเขียวเข้ม (deep olive – green) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่แตกต่างจากโคลชิซีน แต่ถ้านำ colchiceine ทำปฏิกิริยา methylation ด้วยสาร diazomethane จะได้โคลชิซีนและ

isocolchicine (Eigsti and Dustin, 1955; Chaudhuri and Thakur, 1993) สำหรับพืชที่มีสารโคลชิซีน พบว่ามีดังนี้ *Colchicum autumnale* L., *Colchicum montanum* L., *Colchicum arenarium* Waldst and K., *Colchicum neapolitanum* Ten., *Colchicum alpinum* DC., *Colchicum multiflorum* Brot., *Colchicum luteum* Baker., *Merendera bulbocodium* Ram., *Merendera caucasica* Biel., *Merendera persica* Bois and Kotsch., *Merendera sobolifera* Fisch., *Gloriosa superba* L., *Bulbocodium ruthenicum* Bung., *Tofieldia glacilis* Gaud., *Tofieldia calyculata* Whlnd., *Veratrum album* L., *Veratrum nigrum* L., *Anthericum ramosum* L., *Hemerocallis flva* L., *Ornithogalum umbellatum* L., *Ornithogalum comosum* L., *Tulipa silvvestris* L., *Aspodelus albus* Willd., *Fritillaria montana* Hoppe., *Lloydia serotina* Salib. และ *Muscari temiflorium* Tausch. (Eigsti and Dustin, 1955)

การนำสารโคลชิซีนมาใช้ประโยชน์

โคลชิซีนเป็นสารที่มีประโยชน์ในหลายๆ ด้าน ได้แก่

1. ประโยชน์ทางการแพทย์ สามารถนำสารนี้มาใช้รักษาโรคบางอย่างได้ เช่น แก้โรคผิวหนัง โรคปวดตามข้อ และขับพยาธิ (Chopra et al., 1965) ใช้รักษาโรคมะเร็งได้ เนื่องจากสารโคลชิซีนเป็นสารที่มีพิษต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ คือไปยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ โดยจะเกิดขึ้นสูงสุดหลังจากรับประทานสารนี้เข้าไปเป็นเวลา 10 ชั่วโมง (ยุพา จงสุวัฒน์, 2527) การขับถ่ายสารนี้เป็นไปได้ช้า และพิษของสารที่เกิดจากการรับประทานเข้าไปในแต่ละครั้งจะถูกสะสมไว้ พิษจะออกมากับน้ำนมเกิดเป็นพิษกับคนที่ดื่มนมจากสัตว์ที่กินสารนั้นเข้าไป เมื่อรับประทานสารนี้เข้าไปประมาณ 2 ชั่วโมง จะรู้สึกแสบร้อนในปากและลำคอ คอแห้ง กระหายน้ำรุนแรง ลำคอตีบตันกลืนอะไรไม่ลง มีความรู้สึกเหมือนหายใจไม่ออก คลื่นไส้ ปั่นป่วนในท้อง ตามด้วยการอาเจียนอย่างรุนแรง อุจจาระร่วง ปวดท้อง ปวดเบ่งแต่ไม่มีอุจจาระออกมา ลำไส้บิดเกร็งเนื่องจากร่างกายเสียน้ำมาก อาจช็อคหมดสติและตายได้ ก่อนตายอุณหภูมิร่างกายจะลดลงมาก (นิจศิริ เรืองรังษี และ พยอม ตันติวัฒน์, 2532 ; รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล, 2537 ; Chopra et al., 1965 ; Arena, 1978) รายงานเพิ่มเติมว่า สารนี้ใช้รักษาโรคไขข้ออักเสบ หรือโรคเก๊าท์ (gout) ได้ ปริมาณที่ใช้ในการรักษาโรคเก๊าท์โดยการใช้ single dose คือ 1 – 3 มิลลิกรัม ปริมาณต่ำสุดที่ทำให้ตายประมาณ 7 มิลลิกรัม

2. ประโยชน์ทางการเกษตร จะใช้สารโคลชิซีนในการปราบแมลงศัตรูพืชทดแทนสารเคมี (สมสุข ศรีจักรวาฬ และปราโมทย์ เกิดศิริ, 2539)

3. ประโยชน์ทางการศึกษาพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช สารโคลชิซีนเป็นประโยชน์ในการศึกษาเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ของเซลล์ เนื่องจากมีคุณสมบัติยับยั้งการสร้าง spindle fiber ในขณะที่นิวเคลียสมีการแบ่งตัว ทำให้เซลล์หยุดอยู่ที่ระยะเมตาเฟส ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาโครโมโซมในห้องปฏิบัติการ และนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นพอลิพลอยด์ได้ (Eigsti et al., 1949) พอลิพลอยด์มีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์พืช ทำให้ genetic diversity เพิ่มมากขึ้น ช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์สร้างพืชชนิดใหม่ขึ้นมาได้จากการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม ซึ่งมีผลไปถึงการเปลี่ยนแปลงยีน (gene) ภายในเซลล์ ผลที่เกิดจากพอลิพลอยด์จะแตกต่างกันมากมายทั้งที่ดีและไม่ดี (Allard, 1960)

ลักษณะพืชที่เป็นพอลิพลอยด์

โดยทั่วไปพืชที่เป็นพอลิพลอยด์จะมีการเจริญเติบโตช้า และการแก่ของผลช้ากว่าปกติ ส่วนที่ถูกสารโคลชิซีนส่วนแรกที่เจริญมักจะมีอัตราการเจริญไม่เท่ากัน ทำให้เกิดลักษณะที่ผิดปกติ เช่น ขนาดของปากใบและขนาดของละอองเรณูใหญ่ขึ้น (Avery and Johnson, 1947) Kihara (1951) รายงานว่าขนาดของปากใบและขนาดของละอองเรณูใช้เป็นมาตรฐานบอกความเป็นพอลิพลอยด์ได้ และยังรายงานเพิ่มเติมอีกว่า แตงโมที่มีจำนวนโครโมโซมมากกว่าเตตระพลอยด์ ดอกจะมีขนาดเล็กลง เนื่องจากจำนวนโครโมโซม เตตระพลอยด์เหมาะสมที่สุดสำหรับแตงโม เพราะทำให้แตงโมมีลักษณะแข็งแรงขึ้น ขนาดของผลจะไม่เล็กกว่าแตงโมดิพลอยด์ ถ้ามีการดูแลในสภาพที่เหมาะสม แต่มักมีอัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่อปลูกไปนานๆ Ellison and Tiango (1970) และ Srivastava and Tripathi (1990) ได้ให้ข้อมูลเพิ่มเติมอีกว่า ปากใบและละอองเกสรตัวผู้ของต้นเตตระพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ นอกจากนี้อาจพบใบอ่อน มีลักษณะหนา สีเข้มขึ้น ยอดหงิก เนื้อผิวหยาบ เมื่อเทียบกับพืชปกติ นอกจากนี้พบว่าใบพืชอาจสั้น ขอบใบกลมกว่าปกติ ดอกมีขนาดใหญ่ขึ้นตามจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น กล่าวคือ ดอกของพืชที่เป็นเตตระพลอยด์ใหญ่กว่าทริพลอยด์ และทริพลอยด์ใหญ่กว่าดิพลอยด์ หรือเตตระพลอยด์ใหญ่กว่าดิพลอยด์ (Chen and Goeden-Kallemeyn, 1979; Adelberg et al., 1990 ; Compton et al., 1996)

ในพืชบางชนิดพบว่า ผลที่ได้จากเตตระพลอยด์ไม่จำเป็นต้องมีผลขนาดใหญ่ขึ้น แต่อาจแสดงลักษณะที่ผิดปกติอื่นๆ เช่น เนื้อของผลหยาบกว่าเดิม นอกจากนี้ยังพบว่า ต้นพืชพวกเตตระพลอยด์มีความสารมารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมดีขึ้น และมีความต้านทานโรคดีขึ้นด้วย เช่น แตงโมทริพลอยด์และเตตระพลอยด์สามารถทนต่อโรค *Fusarium niveum* ได้ดีกว่าแตงโมดิพลอยด์ หัวผักกาดที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นออโตพลอยด์ สามารถต้านทานต่อโรค club root ได้ (Dermen, 1940) หรือเมล็ดพืชที่เป็นเตตระพลอยด์มีขนาดและน้ำหนักเพิ่มขึ้นกว่าในพืชดิพลอยด์ เช่น

เมล็ดข้าวไรน์ จำนวน 1,000 เมล็ด ของเตตระพลอยด์มีน้ำหนักประมาณ 46.50 กรัม ส่วนในพืชดิพลอยด์ เมล็ดจำนวนเท่ากันนี้ แต่มีน้ำหนักเพียง 30.34 กรัม เป็นต้น (Allard, 1960) Eigsti (1971) รายงานว่า คุณภาพของผลแตงโมไม่มีเมล็ดทั้งในด้านโครงสร้างของเนื้อ ความหวานที่เพิ่มขึ้น การกระจายความหวานทั่วทั้งผล ตลอดจนคุณภาพในการเก็บรักษาจะดีกว่าแตงโมมีเมล็ด ส่วน Henderson (1977) ได้กล่าวถึงลักษณะที่เรียกว่า ไส้กลวง (hollow heart placental separation) จะเกิดขึ้นตามระดับของจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น และในระดับโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นนี้ ความหนาของเปลือก ความต้านทานต่อโรค โรคฝีดาษแดง (anthracnose) จะเพิ่มขึ้น รวมทั้งเมล็ดจะมีขนาดโตขึ้นด้วย

นอกจากนี้ ยังพบว่าส่วนประกอบทางเคมีของพืชที่เป็นเตตระพลอยด์จะสูงกว่าพืชดิพลอยด์ Avery และ Johnson (1947) ยกตัวอย่าง ไว้ดังนี้ ปริมาณน้ำตาลในหัวผักกาด Atropine ปริมาณอัลคาลอยด์ในใบของลำโพง (datura) นิโคตินในยาสูบ วิตามินซีในใบกะหล่ำปลีและมะเขือเทศ คาโรทีนอยด์ในข้าวโพดเหลือง เป็นต้น

การใช้สารโคลชิซีนชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในพืช

เป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชวิธีหนึ่งที่ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น ข้าวสาลี ฝ้าย ยาสูบ ข้าวโอ๊ต กาแฟ แอปเปิ้ล กุหลาบ กล้วย แตงโม เป็นต้น การเกิดพอลิพลอยด์อาจเกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ พืชปลูก (cultivated crop) ในปัจจุบันหลายชนิดเป็นพอลิพลอยด์ ประมาณกันว่า 1 ใน 3 ของ Angiosperm ทั้งหมดเป็นพอลิพลอยด์อยู่ในธรรมชาติ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นอัลโลพอลิพลอยด์ (allopolyploid) (Allard, 1960) พอลิพลอยด์อาจเกิดจากการชักนำโดยการใช้รังสี ความร้อน ความเย็น (environmental shock) สารเคมี หรือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โดยทั่วไปพืชที่เป็นพอลิพลอยด์มักจะมีลักษณะต่างๆ ที่ดีว่าพืชดิพลอยด์ เช่น ลำต้นแข็งแรง ใบหนา ใหญ่ ดอก ผล และเมล็ดใหญ่กว่า นอกจากนี้ส่วนประกอบของสารเคมีบางชนิดที่มีอยู่ในลำต้น ใบหรือผล ยังมีปริมาณที่สูงกว่าในพืชดิพลอยด์ การทำให้เกิดออโตพอลิพลอยด์ สามารถช่วยแก้ปัญหาความเป็นหมันในพืชลูกผสมบางชนิดได้ (Avery and Johnson, 1947; Murthy et al., 1968) หรืออาจมีลักษณะที่ดีทางเศรษฐกิจ ทำให้ได้ต้นที่ให้ผลผลิตสูง ตลอดจนมีคุณภาพของผลผลิตดีอีกด้วย เช่น แตงโมที่เป็นพอลิพลอยด์จะมีเปอร์เซ็นต์น้ำตาลสูงกว่าดิพลอยด์ (ดำรง สินไชย, 2521 ; มงคล พุทธวงศ์; 2539; Kihara, 1951) กล้วยไม้ที่เป็นเตตระพลอยด์จะมีกลีบดอกขนาดใหญ่ ทำให้บานได้นาน (สาริณี ไชยเจริญ, 2538) ดังนั้น นักปรับปรุงพันธุ์จึงใช้วิธีการทำให้เกิดออโตพอลิพลอยด์เป็นเครื่องมือวิธีหนึ่งในการทำให้เกิดพันธุ์ใหม่ๆ และคัดเลือกพันธุ์ที่ดีไว้ใช้ต่อไป

สารเคมีที่ชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในพืช ได้แก่ colchicine, ethylmethane – sulphonate (EMS), N – ethyl – N – nitrosourea (NE), N – methyl – N – nitro – N' – nitrosoquanidine (NG), Benzene paradichlorobenzene, α - bromonapthalene , 8 – oxyquinoline, 5' – agacytidine, nitrogandioxide, acenepthene, chloral hydrate, sulfanilamide และยาฆ่าแมลงบางชนิด เช่น lindane

สารเคมีที่นิยมใช้กันแพร่หลายคือ สารโคลซิซีน ซึ่งเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ดีในพืชหลายชนิด หาซื้อง่ายและไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ในด้านอื่นๆ การใช้สารโคลซิซีนเพื่อเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมนี้ เริ่มนำมาใช้ใน ปี ค.ศ. 1937 โดยมีรายงานไว้ว่า สารโคลซิซีนสามารถชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ได้ ต่อมาในปี ค.ศ.1934 ได้เริ่มต้นใช้สารโคลซิซีนชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในพืช (Dermen, 1938) นอกจากนี้ Dermen (1938) ยังพบอีกว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างกระทันหันมีผลต่อการทำงานของสารโคลซิซีน โดยอุณหภูมิมีผลเฉพาะโครโมโซม เช่น ทำให้เกิด fragmentation หรือ fusion สารนี้จะทำให้โครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายในโครโมโซม แต่จะไปยับยั้งการเจริญของ spindle fiber ในกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสหรือไมโทซีส การแยกตัวของโครมาติกช้าลง ไม่มีการเคลื่อนที่ของโครโมโซมในระยะแอนาเฟส ทำให้โครโมโซมภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (Dermen, 1940 ; Eigsti and Dustin, 1955) สารโคลซิซีนมีผลเฉพาะ cytoplasm และยับยั้งการสร้าง spindle fiber โดยสารโคลซิซีนมีผลมากที่สุดในระยะ G2 ของ cell cycle Hagino et al. (1978) พบว่าสารนี้จะมีผลต่อเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวเท่านั้น จึงมักนิยมใช้สารนี้กับตา ยอดอ่อน ต้นอ่อน และเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การใช้สารโคลซิซีนกับพืช เพื่อชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีอาจเหมาะสมกับแต่ละชนิดหรือแต่ละส่วนของพืช ดังนี้

1. การใช้สารโคลซิซีนกับเมล็ด (seed treatment) ทำโดยการแช่เมล็ดลงในสารละลายโคลซิซีนก่อนนำไปปลูก Dermen (1940) ได้ทำการทดลองโดยนำเมล็ด *Dutara* , *Cosmos* . *Portulaca* และ *Nicotina* แช่สารละลายโคลซิซีนความเข้มข้น 0.2 – 1.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 – 10 วัน พบว่า ได้พืชที่เป็นพอลิพลอยด์ วิธีนี้เหมาะสำหรับเมล็ดพืชที่งอกได้เร็ว ส่วน Pal et al. (1941) นำเมล็ด *Capsicum annuum* แช่ในสารละลายโคลซิซีน 0.05 0.1 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 2 4 6 และ 8 วัน พบว่า เมล็ดที่จุ่มในสารละลายความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 วัน ได้พืชที่เป็นเตตระพลอยด์ 7 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในสารละลาย 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ได้เตตระพลอยด์ 73 และ 60 เปอร์เซ็นต์ และได้ทำการทดลองซ้ำโดยใช้สารละลายความเข้มข้นเดิมหยอดบนยอดอ่อน และใช้รากแช่ในสารละลายโคลซิซีน ปรากฏว่าไม่ได้ผล วิมล ขวัญเกื้อ และ อนันต์

พู่พิทยาสถาพร (2526) รายงานว่า ถ้าใช้สำลีชุบสารละลายโคลชิซีนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ วางบนยอดของพริกจะมีอัตราการเกิดพอลิพลอยด์สูงกว่าพวกที่ได้รับสารโคลชิซีนที่เมล็ด ส่วนการให้สารโคลชิซีนกับเมล็ดที่ความเข้มข้นของสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ เวลา 48 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการเกิดพอลิพลอยด์ดีกว่าที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ ยังพบว่าในความเข้มข้นที่สูงและใช้เวลานาน มีเปอร์เซ็นต์พืชที่ตายเพิ่มขึ้น

2. การใช้สารโคลชิซีนกับต้นกล้า (seedling treatment) หรือจุดเจริญที่ยอดและตา (Treating growing shoot and buds) โดยการจุ่มส่วนของพืชลงในสารละลายโคลชิซีนหรือวางบนกระดาษที่เปียกด้วยสารตลอดเวลา ช่วงเวลาที่ใช้นาน 3 – 24 ชั่วโมง ซึ่งจะแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดและการเจริญของพืช (Dermen, 1940; Avery และ Johnson, 1947) สำหรับ Vakali (1962) ใช้ต้นกล้าของกล้วยดิพลอยด์ในระยะต่างๆ แช่ในสารโคลชิซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เวลา 2 ชั่วโมง จะได้ต้นเตตระพลอยด์เป็นเปอร์เซ็นต์สูง ต่อมาในปี 1967 ได้ใช้วิธีการเดียวกันกับต้นกล้าของกล้วยอีก 2 พันธุ์ โดยใช้ความเข้มข้นเท่าเดิม พบว่าต้นเตตระพลอยด์ที่ได้สูงและแข็งแรงกว่าต้นดิพลอยด์ แต่มีการเจริญช้ากว่าระบบรากก็น้อยกว่า (Vakali, 1967) สำหรับ ชะบา อ่ำรำไพ และ กันยารัตน์ ไชยสุต (2527) หยดสารโคลชิซีน 0.2, 0.6 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ยอดต้นกล้าของแพงพวยฝรั่งสีขาวและสีชมพูในเวลาต่างๆ กัน พบว่าทุกความเข้มข้นชักนำให้เป็นเตตระพลอยด์และออโตพลอยด์ได้

Avery และ Johnson (1947) กล่าวว่า สารโคลชิซีนใช้กับพืชที่มีอายุได้ โดยใช้กับต้นอ่อนหรือกิ่งอ่อนของพืชนั้นๆ แต่ก็ต้องเลือกชนิดของพืชด้วย เช่น การเอากิ่งจุ่มลงในสารโคลชิซีน วิธีนี้จะใช้กับต้นมันฝรั่งไม่ได้ นอกจากวิธีการนี้อาจจะใช้สำลีชุบสารโคลชิซีนแล้วหุ้มที่ใบอ่อนๆ อาจหยดหรือใช้แปรงที่มีสารละลายโคลชิซีนที่ต้นอ่อนก็ได้เช่นเดียวกัน Srivastava และ Raina (1982) ดัดแปลงวิธีการเล็กน้อย โดยใช้สารโคลชิซีน 0.15 เปอร์เซ็นต์ หยดที่ปลายยอดของต้นอัญชัน เมื่อใบแรกของต้นมีขนาด 1 มิลลิเมตร ใช้สำลีหุ้มปลายยอดเพื่อให้สามารถดูดซับสารโคลชิซีนไว้ ทิ้งไว้นาน 10.5 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดออโตเตตระพลอยด์ได้ 5 ต้น จากต้นที่รอดชีวิต 30 ต้น Srivastava และ Tripathi (1990) ใช้สารโคลชิซีน 0.2 เปอร์เซ็นต์ หยดที่ตาอ่อนๆ ของ Atyosia 4 ชนิด ในเวลาต่างๆ กัน แล้วปลูกในแปลงที่เตรียมไว้ พบว่าได้ต้นเตตระพลอยด์ทั้ง 4 ชนิด

3. การใช้สารกับเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลอง ได้มีการทดลองกับพืชหลายชนิดในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในหลอดทดลอง เพราะเกิดได้ง่ายกว่าการใช้สารชักนำชนิดเดียวกันกับต้นพืชที่ปลูกในธรรมชาติ (Murashige, 1974) ดังนั้น จึงมีการทดลองนำสารโคลชิซีนมาใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเพิ่มปริมาณของต้นพอลิพลอยด์โดยใช้ส่วนต่างๆ ของพืช เช่น มลวิภา โสภานันท์

(2521) ใช้สารละลายโคลชิซีนความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ กับแคลลัสและ protocorm – like body ของกล้วยไม้ลูกผสม Aranda 5 สายพันธุ์ แล้วย้ายปลูกในสูตรอาหารที่ดัดแปลง จาก Murashige and Skoog (1962) พบว่า ได้ต้น เตตระพลอยด์ 203 ต้น ใกล้จะเป็นเตตระพลอยด์ (near tetraploid) 135 ต้น มิกโซพลอยด์ (mixoploid) 2 ต้น และดิพลอยด์ 66 ต้น วิชชุตา รุ่งเรือง (2537) แช่ส่วนข้อ และแคลลัสของต้นหน้าวัวพันธุ์ Double Spathe ในสารละลายโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้น 0 0.01 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ทำให้อัตราการเกิดยอดใหม่จากแคลลัสสูงขึ้น ความยาวของปากใบเพิ่มขึ้น แต่จำนวนโครโมโซมไม่เปลี่ยนแปลง มีข้อสังเกตว่าอัตราการรอดชีวิต การเกิดยอดใหม่และความสูงมีแนวโน้มลดลง เมื่อความเข้มข้นของโคลชิซีนเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของเยาวภา จิระเกียรติกุล และอรดี สหวัชรินทร์ (2537) ที่เพาะเลี้ยงตาข้างของหม่อนน้อย และหม่อนคุณไพ ในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วแช่ในสารละลายโคลชิซีนความเข้มข้น 0 - 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 – 3 วัน ได้ผลการทดลองในทำนองเดียวกัน สาริณี ไชยเจริญ (2538) ที่ศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ที่เป็นดิพลอยด์และแอลโลพอลิพลอยด์ ต้นแอลโลพอลิพลอยด์ได้จากการใช้สารโคลชิซีนความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มจำนวนโครโมโซมในแคลลัสที่เป็นดิพลอยด์ ซึ่งมีโครโมโซมเป็น 38 โครโมโซม และต้นแอลโลพอลิพลอยด์มี 76 โครโมโซม และต้นที่ใกล้จะเป็นเตตระพลอยด์มี 74 75 77 และ 78 โครโมโซม การพบต้นที่ใกล้เป็นเตตระพลอยด์ สาเหตุเนื่องจากสารโคลชิซีนที่ใช้มีคุณสมบัติยับยั้งการสร้าง spindle fiber ไม่สมบูรณ์ 100 เปอร์เซ็นต์ จึงมีเซลล์เอนิวพลอยด์เกิดขึ้นได้

Eillison and Tiango (1970) เพาะเมล็ดหน่อไม้ฝรั่ง (asparagus) ในสภาพปลอดเชื้อจนมี radicle ยาวประมาณ 4 – 6 มิลลิเมตร นำไปแช่ในสารละลายโคลชิซีน ความเข้มข้น 1 – 5 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้ภาวะสูญญากาศ 20 นาที และความดันบรรยากาศปกติอีก 10 นาที แล้วย้ายปลูกในอาหารสูตร MS พบว่า สามารถชักนำให้เกิดต้นเตตระพลอยด์ได้ ส่วน Heinz and Mee (1970) ศึกษาโดยใช้อ้อยพันธุ์ H57 – 1627 เลี้ยงให้เกิด cell suspension แล้วย้ายลงในอาหารที่มีสารโคลชิซีนความเข้มข้น 50 และ 500 ppm สามารถชักนำให้เกิดต้นพอลิพลอยด์และมิกโซพลอยด์ ซึ่งต้นที่ได้มีความแข็งแรง

Chen and Coeden – Kallemeyn (1979) รายงานว่า เมื่อนำแคลลัสของ *Hemerocallis flava* ซึ่งเป็นพืชในตระกูลดอกไม้จีน (daylily) มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4 – D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่สารโคลชิซีนในระดับต่างๆ ตั้งแต่ 0 – 4 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่ไม่มี

สารโคลชิซีน ภายใต้สภาพแวดล้อมเดิม 7 วัน เมื่อนำแคลลัสมาชักนำให้เกิดต้น พบว่า ต้นที่ได้กว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้นเตตระพลอยด์ และที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดต้นเตตระพลอยด์ได้ดีที่สุด

ในปี ค.ศ. 1982 Lyrene and Perry (1982) ทดลองเลี้ยงยอดบลูเบอรี่ (blueberry) ในอาหารสูตร Knop ดัดแปลง ที่เติมสารโคลชิซีนความเข้มข้นต่างๆ กันตั้งแต่ 0.001 – 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 – 4 วัน พบว่าอาหารเหลวที่มีสารโคลชิซีน 0.2 เปอร์เซ็นต์ เวลา 24 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดต้นพอลิพลอยด์ได้ ต่อมาได้ทำการทดลองอีกในปี ค.ศ. 1984 โดยใช้ต้นบลูเบอรี่ 5 ชนิด ได้แก่ *Vaccinium darrowi*, *V. elliottii*, *V.atrococcum* Heller, *V. arboreum* Marsh. และ *V.staminium* L. ตัดเป็นท่อนๆ แช่ในอาหารเหลวสูตรเดิม แต่เติมสารโคลชิซีนเข้มข้น 0 0.01 0.05 0.10 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 12 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง ชักนำให้เกิดต้นพอลิพลอยด์ดีที่สุดในทั้ง 5 ชนิด

Gupton (1989) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นดิพลอยด์ของ *Rubus allegheniensis* Porter. และ *R.rustieanus* Merc. แล้วนำปลายยอด 20 ยอด ของ *R. allegheniensis* แช่ในสารโคลชิซีนความเข้มข้น 0.02 0.04 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ และปลายยอดอีก 20 ยอดของ *R.rustieanus* แช่ในสารโคลชิซีนเข้มข้น 0.04 0.06 และ 0.08 เปอร์เซ็นต์ วางบนเครื่องเขย่า 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายปลูกในอาหารแข็ง ทำการ subculture จนได้ต้นที่มีใบ 3 – 4 ใบ จนเจริญเติบโตมีรากดี นับจำนวนโครโมโซมที่ปลายราก พบว่าเกิดเตตระพลอยด์ ทั้ง 2 ชนิด โดย *R. allegheniensis* พบมากที่สุดที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ และ *R.rustieanus* พบมากเท่ากันที่ความเข้มข้น 0.04 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์

ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เทคนิคการเลี้ยงอับเรณู (anther culture) ร่วมกับการใช้โคลชิซีน Alemanno และ Guiderdoni (1994) ได้ทำการทดลองเพิ่มชุดโครโมโซมของต้นข้าวพันธุ์ Miarum ในอาหารที่เติมสารโคลชิซีน 250 และ 550 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บไว้ในห้องมืด อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 สัปดาห์ เกิดกลุ่มแคลลัสและเมื่อเลี้ยงแคลลัสต่อไปอีก ในสารโคลชิซีน 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดต้นดิพลอยด์ 51.4 เปอร์เซ็นต์ ในสารโคลชิซีน 550 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิด 65.5 เปอร์เซ็นต์ และเกิดต้นพอลิพลอยด์น้อยมาก

พืชที่ใช้ในการทดลอง

แตงโม (watermelon) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Citrullus vulgaris* (Schard) หรือ *Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum & Nakai (Robinson et al, 1976) เป็นไม้ล้มลุก (annual crop) มีช่วงอายุประมาณ 90 วัน ผลมีรูปร่างค่อนข้างกลมถึงกลมยาวเป็นทรงกระบอก ผิวของผลมีสีเขียวดำ เขียวอ่อน เขียวสลับเขียวเข้ม สีเหลืองหรือสีขาว เนื้อมีสีแดง ชมพู เหลือง ส้มและขาว (Wall, 1960 ; Robinson, 1976) น้ำหนักผลอยู่ระหว่าง 1 – 5 กิโลกรัม เมล็ดมีสีขาว ดำ แดง เขียว น้ำตาล และสีตกกระ (Kihara, 1951 ; Bates et al, 1990) ลักษณะใบกลมหยักลึกแบบ deeply lobed หรือ deeply pinnative ใบมีสีเขียวเข้มและมีไขมันเคลือบผิวใบเป็นผงสีขาวเป็นมันมาก จึงทำให้แตงโมเป็นพืชที่ค่อนข้างทนต่อการขาดน้ำ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 21 – 30 องศาเซลเซียส แตงโมไม่ไวต่อแสง (day – neutral) ต้องการอากาศร้อนแห้งตลอดเวลา และเจริญเติบโตได้ดีในสภาพดินร่วนปนทราย ที่ระบายน้ำดี pH 5.0 (Bates et al, 1990) แตงโมมีจำนวนโครโมโซม 2n = 22 (Dalington and Wylie, 1946)

การชักนำให้เกิดต้นแตงโมที่เป็นเตตระพลอยด์ (4x) ทำได้โดยให้สารโคลชิซีนกับต้นแตงโมดิพลอยด์ (2x) เพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม เทคนิคและวิธีการทำได้หลายวิธีเริ่มจาก Kihara (1951) ใช้สารโคลชิซีนในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้น 0.2 – 0.4 เปอร์เซ็นต์ หยดลงบนยอดของต้นกล้าแตงโมที่เป็น 2x ในตอนเช้า วันละ 1 หยด ติดต่อกัน 4 วัน ต่อมาได้มีผู้ดัดแปลงวิธีการออกไปอีกแต่ยังคงใช้สารโคลชิซีน เพียงแต่เปลี่ยนแปลงวิธีการ จำนวนครั้ง และเวลาที่ใช้ เช่น Eigsti (1957) ใช้สารโคลชิซีนในรูปสารละลายความเข้มข้น 0.2 – 0.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Lower และ Johnson (1969) ใช้สารละลายโคลชิซีนความเข้มข้น 0.30 เปอร์เซ็นต์ หยดบนสำลีที่วางอยู่บนยอดของต้นกล้าแตงโม จำนวน 8 หยด ในช่วงเวลา 52 และ 80 ชั่วโมง ดำรง สินไชย (2521) ใช้ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ หยดที่ต้นกล้าของแตงโมในระยะที่ใบเลี้ยงคลี่ โดยหยด 6, 8 และ 10 ครั้ง ๆ ละ 1 หยด เช้า – เย็น ติดต่อกัน เป็นต้น พีรยุทธ บุญมีรอด (2536) ได้ทดลองศึกษาปริมาณความเข้มข้นของโคลชิซีนที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในแตงโมพันธุ์ซูการ์เบบี้ในหลอดทดลอง ปรากฏว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงและเพิ่มจำนวนปลายยอดแตงโม ได้แก่ สูตรอาหาร MS + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งปลายยอดที่เกิดขึ้นมีรากได้ในสัปดาห์ที่ 2 เมื่อศึกษาความเข้มข้นของโคลชิซีนและระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ของปลายยอดแตงโมพบว่า ต้นแตงโมที่แช่ในสารละลายโคลชิซีน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เวลา 12 ชั่วโมง อาหารเหลว MS + โคลชิซีน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เวลา 12 ชั่วโมง อาหารเหลว MS + โคลชิซีน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เวลา 24 ชั่วโมง และในอาหารเหลว MS + โคลชิซีน 0.01 เปอร์เซ็นต์ เวลา 12 ชั่วโมง มีขนาดของเซลล์คุมและจำนวนคลอโรพลาสต์แตกต่างทางสถิติกับต้น

ควบคุม จากการตรวจสอบการเกิดพอลิพลอยด์ของแตงโมที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซีน พบว่าอัตราการเกิดพอลิพลอยด์เท่ากับ 20.00 10.00 20.00 และ 10.00 ตามลำดับ

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการทดลองศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดดองดึง ซึ่งเป็นส่วนที่มีสารโคลชิซีนสูงในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในแตงโมในหลอดทดลอง เพื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารโคลชิซีนสังเคราะห์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์

1. พืชทดลอง

เมล็ดแตงโมพันธุ์เพชร F_1 จากศูนย์พัฒนาห้วยทราย จังหวัดเพชรบุรี

เมล็ดดองดึง (*G.superba* Linn.) จากต้นที่ปลูกในแปลงทดลองของภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหารประกอบด้วย

เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด (analytical balance)

เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH meter)

กระบอกตวง

บีกเกอร์

ปิเปต

ขวดแก้วพร้อมฝาปิด

หม้อนึ่งความดัน

ตู้อบ

ตู้ transfer

มีดผ่าตัด และ ปากคีบ

2.2 สารเคมีในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) หรือ MS (ภาคผนวก ก)

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

2.3.1 Indole Acetic Acid (IAA)

2.4 สารเคมีสำหรับการฆ่าเชื้อ

2.4.1 Ethyl Alcohol 70 เปอร์เซ็นต์

2.4.2 Chlorox และ Tween 20

2.5 สารเคมีสำหรับปรับค่า pH

2.5.1 1 N HCl

2.5.2 1N NaOH

3. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์

3.1 millipore holder

3.2 filter membrane ขนาด 0.45 μm

3.3 สารโคลซิซิน (colchicine)

4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้สกัดสารจากเมล็ดดองดึง

4.1 เครื่องเขย่า

4.2 เครื่องบดเมล็ดดองดึง

4.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า

4.4 Methanol (AR grade)

5. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับศึกษาโครโมโซม

5.1 อ่างควบคุมอุณหภูมิ

5.2 micrometer

5.3 กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope

5.4 แผ่นสไลด์และแผ่นแก้วปิด

5.5 หลอด vial

5.6 ดินสอที่มียางลบและเข็มเขี่ย

5.7 ยาทาเล็บ

5.8 สารเคมีที่ใช้ได้แก่

5.8.1 α - bromonapthalene

5.8.2 acetic acid 90 เปอร์เซ็นต์

5.8.3 1 N HCl

5.8.4 ethanol 70 เปอร์เซ็นต์

5.8.5 propionocarmine 2 เปอร์เซ็นต์

5.8.6 aceto – orcein 2 เปอร์เซ็นต์

5.8.7 acetocarmine 2 เปอร์เซ็นต์

5.8.8 สีย้อม Schiff's reagent

6. อุปกรณ์สำหรับบันทึกภาพ

6.1 กล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ (Olympus BH – 2)

6.2 กล้องถ่ายภาพและเลนส์สำหรับถ่ายภาพวัตถุในระยะใกล้

6.3 ฟิล์มสี ฟิล์มขาวดำ และฟิล์มสไลด์

วิธีดำเนินการศึกษา

1. การเพาะเมล็ดแตงโมในหลอดทดลอง

นำเมล็ดแตงโมพันธุ์เพชร F_1 มากระเทาะเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออกโดยใช้กรรไกรขลิบเปลือกหุ้มเมล็ด ฟอกฆ่าเชื้อเอมบริโอโดยการแช่ใน ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ เขย่าตลอดเวลา 3 นาที จากนั้นแช่ในน้ำยาคลอรอกซ์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่หยด tween 20 1 – 2 หยด เขย่าเป็นเวลา 10 – 15 นาที จากนั้นล้างเอาน้ำยาคลอรอกซ์ออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 3 ครั้ง ทำการย้ายเอมบริโอที่ล้างสะอาดแล้วไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ความเข้มข้นครึ่งส่วนหรือ ½ MS นานประมาณ 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิประมาณ 20 – 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 1,000 ลักซ์ โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จนกระทั่งได้ต้นอ่อนที่มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และใบเลี้ยงเริ่มมีสีเขียว

2. การเพิ่มจำนวนปลายยอดแตงโมเพื่อศึกษาการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์

2.1 ตัดแยกปลายยอดแตงโมจากต้นอ่อนที่ได้จากข้อ 1 ในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่ประกอบด้วย KNO_3 1976 มิลลิกรัมต่อลิตร + IAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยนำมาตัดเป็นท่อน ให้แต่ละท่อนมีข้อประมาณ 1 – 2 ข้อ เพื่อให้ตาข้างเจริญขึ้นเป็นยอดใหม่และกระตุ้นให้เกิดราก (พีรยุทธ บุญมีรอด, 2536)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 ตัดแยกยอดอ่อนในลักษณะเดียวกับข้อ 2.1 ย้ายลงในอาหารสูตรเดิมที่เตรียมใหม่ทุก 3 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มปริมาณ ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนกระทั่งได้จำนวนต้นไม่น้อยกว่า 180 ยอด เพื่อจะนำไปใช้ในการทดลองข้อ 4

3. การสกัดสารจากเมล็ดดองดึงและการวิเคราะห์ปริมาณสารโคลชิซีนในสารสกัด

3.1 การสกัดสารจากเมล็ดดองดึง

นำเมล็ดแห้งของดองดึงน้ำหนัก 10 กรัม ที่ได้จากต้นที่ปลูกในแปลงทดลองของภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อบในตู้อบอุณหภูมิ 50 – 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักหลังอบอีกครั้งหนึ่ง ได้น้ำหนัก 9.07 กรัม จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดเป็นผง ใส่ในขวดแก้ว เติม methanol (AR grade) ให้ท่วม ปิดด้วยกระดาษฟอยล์ วางบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จะได้สารสกัดจากเมล็ดดองดึง แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์ (Bunyapraphatsara et al., 1991; Chaudhuri and Thakur, 1993)

3.2 การวิเคราะห์สารโคลชิซีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

นำสารสกัดจากข้อ 3.1 มาวิเคราะห์ปริมาณสารโคลชิซีนด้วยเทคนิค HPLC ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเปรียบเทียบกับสารโคลชิซีนสังเคราะห์ เงื่อนไขการวิเคราะห์สารโคลชิซีนด้วยเทคนิค HPLC ใช้วิธีของสุนันท์ (2538) ดังนี้ คือ

- water Associates Model 6000 HPLC apparatus equipped with a LC spectrophotometer Model 481 และ Model 745 Data module
- columm; μ Bondapak C_{18} ขนาด 3.9 x 300 mm (10 μm)
- mobile phase; 40 % methanol in water (2:3)
- flow rate: 1.5 ml/min
- Detection; detector คือ UV 254 nm

นำผลมาวิเคราะห์ปริมาณสารโคลชิซีนในสารสกัดเมล็ดดองดึง มาคำนวณเพื่อใช้ในการทดลองข้อ 4 ต่อไป

4. การทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดดองดึง และระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ โดยเปรียบเทียบกับสารโคลชิซีนสังเคราะห์

มีขั้นตอนดำเนินการ ดังนี้

1. นำปลายยอดแตงโมที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในขั้นตอนที่ 2 มาตัดให้มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร แช่ลงในอาหารเหลวสูตร MS + สารสกัดเมล็ดดองดึงที่มีความเข้มข้นของโคลชิซีน 0 0.01 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (การคำนวณเปอร์เซ็นต์โคลชิซีนในสารสกัด ดูได้จากภาคผนวก ข) นำมาวางบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 70 รอบต่อนาที เขย่าเป็นเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง และทำการทดลองในลักษณะเดียวกัน โดยเปลี่ยนจากสารสกัดเมล็ดดองดึงเป็นสารโคลชิซีนสังเคราะห์ รวม 18 treatment (ตารางที่ 1 และ 2) แต่ละ treatment ใช้ปลายยอดแตงโม 10 ยอด ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

2. นำปลายยอดแตงโมที่ผ่านการแช่ในอาหารเหลวสูตร MS + สารสกัดเมล็ดดองดึง และในอาหารเหลวสูตร MS + สารละลายโคลชิซีนสังเคราะห์ทั้ง 18 treatments จากข้อ 4.1 มาตัดส่วนโคนทิ้งประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำปลายยอดที่เหลือซึ่งยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร ไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ประมาณ 4 สัปดาห์ จนปลายยอดมีการเจริญเติบโตความสูงประมาณ 3 – 4 เซนติเมตร ตัดโคนทิ้งอีกครั้ง นำปลายยอดยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร ย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่เตรียมขึ้นใหม่ เพื่อชักนำให้เกิดรากสำหรับนำไปศึกษาจำนวนโครโมโซมต่อไปในข้อ 5

3. เก็บผลโดยนับจำนวนยอดแตงโมที่รอดชีวิต คำนวณหาอัตราการรอดชีวิตเป็นเปอร์เซ็นต์ และหาค่า LD_{50} (ความเข้มข้นของสารละลายและระยะเวลาในการแช่ที่ทำให้ยอดแตงโมตาย 50 เปอร์เซ็นต์) โดยวิธี Typical sigmoid mortality และใช้สูตร $Y = \overline{y} + b\ (X_{50} - \overline{X})$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของโคลชิซีนจากสารสกัดเมล็ดดองดึง และระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ปลายยอดแตงโม

Treatment	ส่วนประกอบ	ระยะเวลาในการแช่ (ชั่วโมง)
1	อาหารเหลวสูตร MS	12
2	อาหารเหลวสูตร MS	24
3	อาหารเหลวสูตร MS	36
4	อาหารเหลวสูตร MS + โคลชิซีนจากเมล็ดดองดึง 0.01 %	12
5	อาหารเหลวสูตร MS + โคลชิซีนจากเมล็ดดองดึง 0.01 %	24
6	อาหารเหลวสูตร MS + โคลชิซีนจากเมล็ดดองดึง 0.01 %	36
7	อาหารเหลวสูตร MS + โคลชิซีนจากเมล็ดดองดึง 0.05 %	12
8	อาหารเหลวสูตร MS + โคลชิซีนจากเมล็ดดองดึง 0.05 %	24
9	อาหารเหลวสูตร MS + โคลชิซีนจากเมล็ดดองดึง 0.05 %	36

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของสารโคลชิซีนสังเคราะห์ และระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ปลายยอดแตงโม

Treatment	ส่วนประกอบ	ระยะเวลาในการแช่ (ชั่วโมง)
1	อาหารเหลวสูตร MS	12
2	อาหารเหลวสูตร MS	24
3	อาหารเหลวสูตร MS	36
4	อาหารเหลวสูตร MS + โคลชิซีนสังเคราะห์ 0.01 %	12
5	อาหารเหลวสูตร MS + โคลชิซีนสังเคราะห์ 0.01 %	24
6	อาหารเหลวสูตร MS + โคลชิซีนสังเคราะห์ 0.01 %	36
7	อาหารเหลวสูตร MS + โคลชิซีนสังเคราะห์ 0.05 %	12
8	อาหารเหลวสูตร MS + โคลชิซีนสังเคราะห์ 0.05 %	24
9	อาหารเหลวสูตร MS + โคลชิซีนสังเคราะห์ 0.05 %	36

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ศึกษาการเกิดพอลิพลอยด์ของแตงโมภายหลังการแช่ในอาหารที่มีสารสกัดเมล็ดดองดึงเปรียบเทียบกับสารโคลชิซีนสังเคราะห์

จากต้นแตงโมในข้อ 4 เมื่ออายุครบ 8 สัปดาห์ นำมาศึกษาการเกิดพอลิพลอยด์ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของแต่ละ treatment ดังนี้

5.1 ศึกษาการเจริญเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นแตงโม หลังการแช่ยอดในอาหารเหลวที่เติมสารสกัดเมล็ดดองดึง เปรียบเทียบกับสารโคลชิซีนสังเคราะห์ โดยการวัดความสูงของยอดแตงโมที่รอดชีวิต เมื่ออายุ 8 สัปดาห์ และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา (morphology) หลังจากได้รับสารสกัดจากเมล็ดดองดึงและสารโคลชิซีนสังเคราะห์ แล้วนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และจัดสิ่งทดลองแบบ Factorial มี 10 ซ้ำ ประกอบด้วย 3 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 ได้แก่ ความเข้มข้นของสารสกัดและโคลชิซีนสังเคราะห์ 3 ระดับ คือ 0.00 0.01 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการแช่ 12 24 และ 36 ชั่วโมง ปัจจัยที่ 3 คือ ระยะเวลาในการเก็บข้อมูล 1 3 7 10 14 และ 17 วัน แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทุกการทดลอง โดยใช้ DMRT

5.2 จำนวนโครโมโซม

ตัดปลายรากแตงโมจากต้นที่ทดลองไว้ในขั้นตอนที่ 2 ของข้อ 4 เมื่ออายุครบ 8 สัปดาห์ ใช้เทคนิคการเตรียมเซลล์แบบ Feulgen squash (กันยารัตน์ ไชยสุต, 2532) และเทคนิคการเตรียมเซลล์เพื่อนับจำนวนโครโมโซมของรากธัญพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลอง (Karp, 1991) ดังนี้

เทคนิคการเตรียมเซลล์แบบ Feulgen squash ((กันยารัตน์ ไชยสุต, 2532; Sharma and Sharma, 1980) ตัดปลายรากที่เลี้ยงในหลอดทดลองยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ในช่วงเช้าเวลา 7.00 – 11.00 น. แช่ในสารละลายอิ่มตัวของ α - bromonapthalene เก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส นาน 20 – 22 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการหยุดวงชีพของเซลล์ ต่อไปหยุดการทำงานของเซลล์โดยการนำปลายรากแช่ในสารละลาย acetic acid 90 เปอร์เซ็นต์ เวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาล้าง acetic acid ด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ในที่ๆ อุณหภูมิ 5 – 10 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการศึกษานำรากมาล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง จากนั้น นำรากมา hydrolyze ด้วย 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 8 – 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ ทำการย้อมสีโครโมโซม โดยการนำปลายรากแช่ใน Schiff's reagent ประมาณ 1 ชั่วโมง จนปลายรากติดสีม่วงแดง นำปลายรากแช่ในน้ำสะอาด ตัดเฉพาะส่วนที่ติดสีแดงเข้มวางบนสไลด์หยด propionocamine 2

เปอร์เซ็นต์ 1 – 2 หยด หรือ aceto orcein หรือ acetocarmine ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำสไลด์ไปลนไฟพออุ่น เพื่อให้เซลล์ติดสีย้อมดีขึ้น (Fukui and Nakayama, 1996) ใช้ปลายดินสอด้านที่มียางลบเรียบๆ ค่อยๆ เคาะบริเวณที่มีเนื้อเยื่อสีแดง จนเซลล์กระจายแยกจากกันจนไม่เห็นกลุ่มเซลล์ที่ติดสีแดง (Armstrong, 1995) นำสไลด์ที่ได้มาศึกษาและตรวจนับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายราก

5.3 ขนาดของเซลล์คุม

นำใบที่ 3 นับจากปลายยอดมา ลอกผิวใบด้านล่างวางบนกระจกสไลด์ที่มีน้ำสะอาด 1 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ส่องดูขนาดของเซลล์คุม เพื่อวัดความกว้างและความยาว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีไมโครมิเตอร์ต้นละ 20 เซลล์ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (1microunit = 0.0025 mm)

5.4 จำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม

นับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมจากข้อ 5.3 ต้นละ 20 เซลล์ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

นำค่าที่ได้จากข้อ 5.1 5.2 และ 5.3 มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของต้นที่มีความแตกต่างทางสถิติกับต้นควบคุม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. การเพาะเมล็ดแตงโมในหลอดทดลอง

การเพาะเมล็ดแตงโมในหลอดทดลอง บนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าจากจำนวนเมล็ดที่เพาะ 220 เมล็ด งอก 183 เมล็ด คิดเป็นอัตราการงอกสูง 83.18 เปอร์เซ็นต์ โดยได้ต้นพืช ยอดและรากสมบูรณ์ลำต้นมีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และใบเลี้ยงเริ่มมีสีเขียว เมล็ดไม่งอก 10 เปอร์เซ็นต์ และมีการปนเปื้อน (contamination) 6.82 เปอร์เซ็นต์

2. การเพิ่มจำนวนปลายยอดแตงโมเพื่อศึกษาการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์

จากการนำปลายยอดแตงโมมาเพิ่มจำนวนในอาหารสูตร MS ดัดแปลง พบว่าในเวลา 3 สัปดาห์ สามารถเจริญเป็นยอดใหม่ได้ และจะเกิดรากในสัปดาห์ที่ 2 หลังย้ายลงอาหารกึ่งแข็ง เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่เตรียมใหม่ ทุก 4 สัปดาห์ จะได้จำนวนยอด 366 ยอด และคัดเลือกต้นที่สมบูรณ์สม่ำเสมอ มีลักษณะแข็งแรง ใบสีเขียวเป็นปกติ เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. การสกัดสารจากเมล็ดดองดึงและการวิเคราะห์ปริมาณสารโคลชิซีนในสารสกัด

จากการนำเมล็ดดองดึงบดละเอียดมาสกัดด้วย methanol AR grade ปรากฏว่า ได้สารสกัดมีลักษณะเป็นของเหลว สีน้ำตาลเข้มและเมื่อนำไปวิเคราะห์โดยใช้ HPLC พบว่าเมล็ดดองดึงแห้ง 100 กรัม มีสารโคลชิซีน 0.62 % (w/w) และสารสกัดเมล็ดดองดึง 100 มิลลิลิตร จะมีสารโคลชิซีน 0.174 % (w/v) (ภาคผนวก ข.)

4. การทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดดองดึงและระยะเวลาที่เหมาะสม ในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ โดยเปรียบเทียบกับสารโคลชิซีนสังเคราะห์

จากการนำปลายยอดแตงโมขนาดยาว 2 เซนติเมตร แช่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารสกัดเมล็ดดองดึงให้มีความเข้มข้นของโคลชิซีน 0 0.01 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับการแช่ปลายยอดแตงโมในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้นเดียวกัน เป็นระยะเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง รวม 18 treatment ตามตารางที่ 1 และ 2 แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อก่อนย้ายมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ได้ผลดังนี้

จากตารางที่ 3 และ 4 อัตราการรอดชีวิตของปลายยอดแตงโมที่แช่ในอาหารที่มีสารสกัดเมล็ดดองดึงและสารโคลชิซีนสังเคราะห์ พบว่าอัตราการรอดชีวิตลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดและสารโคลชิซีนสังเคราะห์สูงขึ้น และระยะเวลาในการแช่นานขึ้น สารสกัดเมล็ดดองดึงที่เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ทุกการทดลองทำให้ปลายยอดแตงโมมีอัตราการรอดชีวิตเป็นศูนย์ ในขณะที่เมื่อใช้สารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้นเท่ากัน แช่นาน 12 24 และ 36 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิต 25 20 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เฉลี่ยรอด 16.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดที่มีโคลชิซีนเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ แช่ปลายยอดแตงโมนาน 12 24 และ 36 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 50 35 และ 15 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 33.33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการใช้สารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้นเดียวกัน แล้วพบว่ายอดแตงโมรอดชีวิต 55 45 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ยแล้วรอด 36.67 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้นควบคุมซึ่งแช่ในอาหารเหลว MS 12 24 และ 36 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 90 และ 80 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 90 เปอร์เซ็นต์ ในชุดของการใช้สารสกัด และ 95 90 และ 80 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 88.33 เปอร์เซ็นต์ ในชุดที่ใช้สารโคลชิซีนสังเคราะห์ ตามลำดับ

จากตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การตายของยอดแตงโมที่ได้รับสารสกัดเมล็ดดองดึงในปริมาณต่างๆ ที่ระยะเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับต้นควบคุมให้มีเปอร์เซ็นต์การตายเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายอดแตงโมที่แช่ในสารสกัดที่มีโคลชิซีนเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การตายหลังการแช่เป็นเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง เท่ากับ 50 61.11 และ 81.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนยอดแตงโมที่แช่ในสารสกัดที่มีโคลชิซีนเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากันคือ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาหาค่า LD_{50} ด้วยวิธี Typical sigmoid mortality พบว่า ค่า LD_{50} ของสารสกัดเมล็ดดองดึง เมื่อแช่ยอดแตงโมเป็นเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง เท่ากับ 0.023 0.016 และ 0.015 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 2) และด้วยวิธีคำนวณจากสูตร regression $Y = \overline{y} + b(X_{50} - \overline{X})$ ได้ค่า LD_{50} เท่ากับ 0.020 0.018 และ 0.013 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาคผนวก ข.)

ส่วนการศึกษาเปอร์เซ็นต์ของการตายของยอดแตงโมที่ได้รับสารโคลชิซีนสังเคราะห์ปริมาณต่างๆ ที่ระยะเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง โดยเทียบกับแตงโมต้นควบคุมให้มีเปอร์เซ็นต์การตายเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ ยอดแตงโมที่แช่ในสารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 42.11 50 และ 87.50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยอดแตงโมที่แช่ในสารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตาย 73.68 77.78 และ 93.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำมาหาค่า LD_{50} ด้วยวิธี Typical sigmoid mortality พบว่า LD_{50} โดยประมาณของสารโคลชิซีนสังเคราะห์ที่แช่ยอดแตงโมเป็นเวลา 12

24 และ 36 ชั่วโมง มีค่า 0.022 0.020 และ 0.018 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3) และ อย่างไรก็ดีเมื่อคำนวณจากสูตร $Y = \bar{y} + b(X_{50} - \bar{X})$ ได้ค่า LD_{50} เท่ากับ 0.029 0.026 และ 0.013 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาคผนวก ข.)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของปลายยอดแตงโมที่เลี้ยงในหลอดทดลอง หลังจากที่แช่ในอาหารเหลว MS ที่มีสารสกัดเมล็ดดองดึงความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของโคลชิซีนในสารสกัดเมล็ดดองดึง (เปอร์เซ็นต์)	เวลา (ชั่วโมง)			เฉลี่ย
	12	24	36	
0	100	90	80	90
0.01	50	35	15	33.33
0.05	0	0	0	0

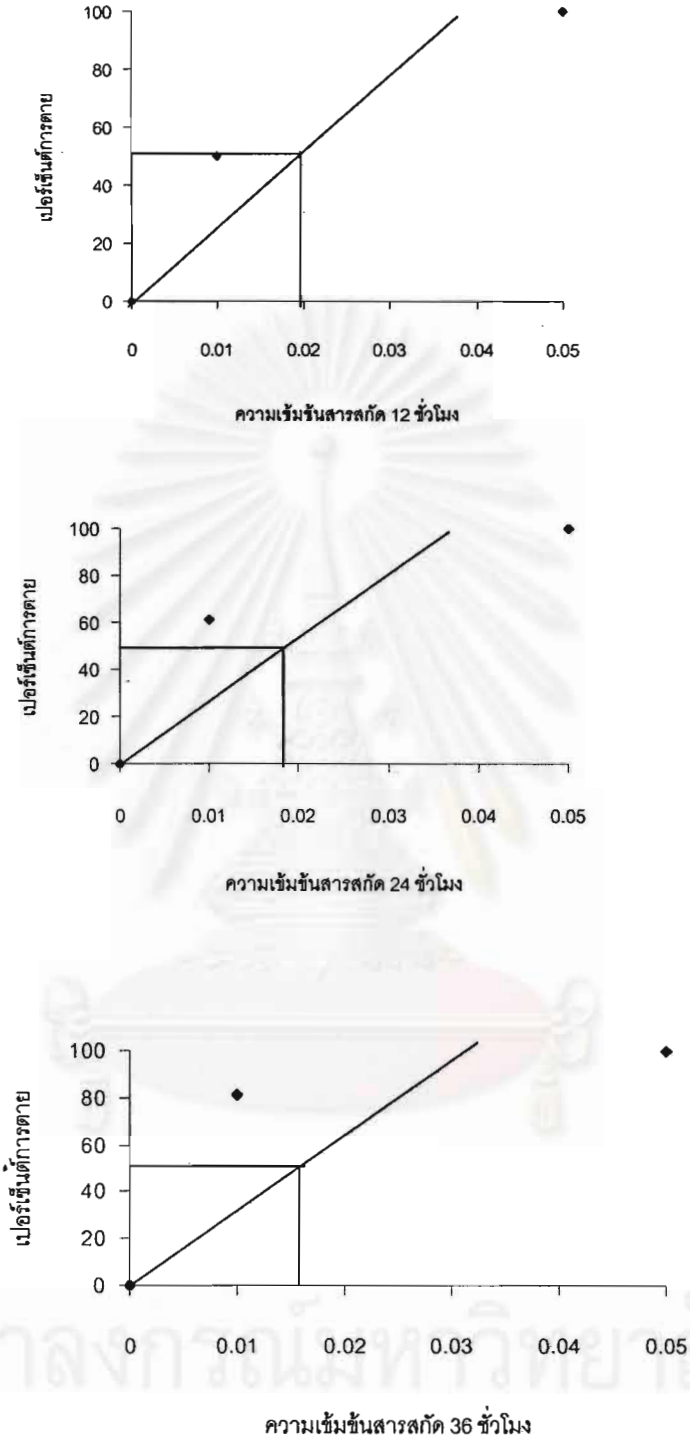
ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของปลายยอดแตงโมที่เลี้ยงในหลอดทดลอง หลังจากที่แช่ในอาหารเหลว MS ที่มีสารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารโคลชิซีนสังเคราะห์ (เปอร์เซ็นต์)	เวลา (ชั่วโมง)			เฉลี่ย
	12	24	36	
0	95	90	80	88.33
0.01	55	45	10	36.67
0.05	25	20	5	16.67

ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของยอดแตงโมที่ได้รับสารสกัดเมล็ดดองดึงในปริมาณต่างๆ ที่ระยะเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง

โคลชิซีนในสารสกัด (เปอร์เซ็นต์)	เปอร์เซ็นต์การตาย		
	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง
0	0	0	0
0.01	50	61.11	81.25
0.05	100	100	100

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

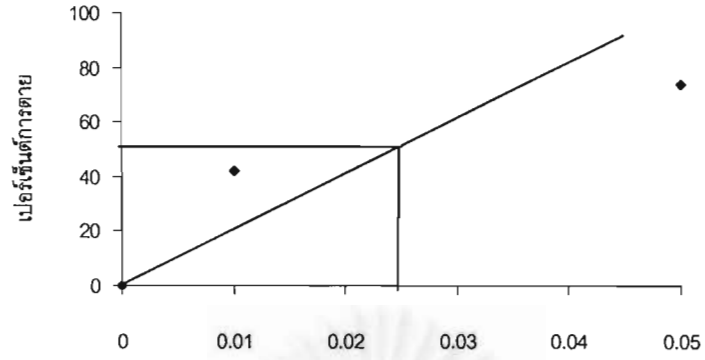


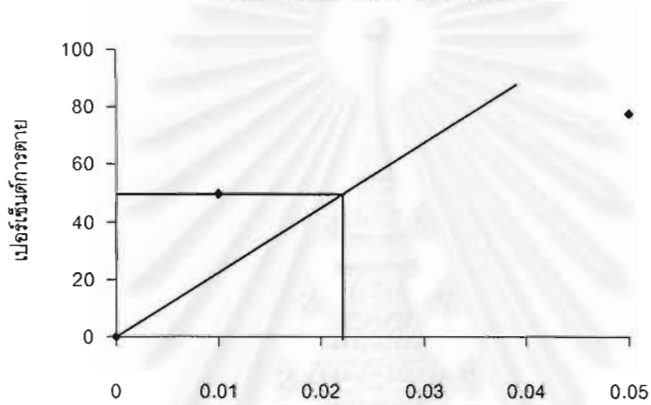
ภาพที่ 2 กราฟ Typical sigmoid mortality แสดงค่า LD_{50} ของโคลชิซีนในสารสกัดเมล็ดดองดึงที่แช่ยอดแตงโมเป็นระยะเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง

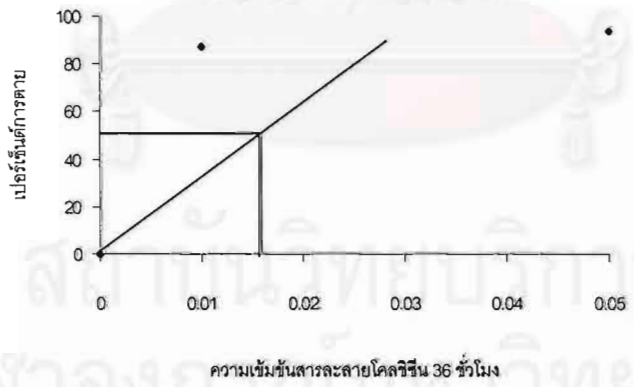
ตารางที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของยอดแตงโมที่ได้รับสารละลายโคลชิซีนสังเคราะห์ปริมาณต่างๆ ที่ระยะเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง

โคลชิซีนสังเคราะห์ (เปอร์เซ็นต์)	เปอร์เซ็นต์การตาย		
	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง
0	0	0	0
0.01	42.11	50	87.50
0.05	73.68	77.78	93.75

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย







ภาพที่ 3 กราฟ Typical sigmoid mortality แสดงค่า LD_{50} ของสารโคลชิซีนสังเคราะห์ ที่แช่ยอดแตงโมเป็นระยะเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง

5. การเกิดพอลิพลอยด์ของต้นแตงโมที่แช่ในอาหารที่มีสารสกัดเมล็ดดองดึงเปรียบเทียบกับสารโคลชิซีนสังเคราะห์

ผลการเกิดพอลิพลอยด์ มีดังนี้

5.1 การเจริญเติบโตทางด้านความสูงของยอดแตงโมที่รอดชีวิต เมื่ออายุ 8 สัปดาห์ และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาหลังจากได้รับสารสกัดเมล็ดดองดึง และสารโคลชิซีนสังเคราะห์

การเจริญเติบโตของปลายยอดแตงโมลดลงเมื่อความเข้มข้นของโคลชิซีนทั้งในสารสกัดจากเมล็ดดองดึงและในสารละลายโคลชิซีนสังเคราะห์สูงขึ้น รวมทั้งเมื่อระยะเวลาในการแช่นานขึ้น (ตารางที่ 7 และ 8) สารสกัดเมล็ดดองดึงและสารละลายโคลชิซีนสังเคราะห์ทั้งสองความเข้มข้นมีผลทำให้การเจริญเติบโตของปลายยอดแตงโมผิดปกติไปจากปลายยอดแตงโมที่เป็นต้นควบคุม

การทดลองที่แช่ปลายยอดแตงโมใน อาหารเหลวสูตร MS + สารสกัดเมล็ดดองดึงที่มีโคลชิซีน 0.01 เปอร์เซ็นต์ เวลา 12 24และ 36 ชั่วโมง แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลง + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 1 มีการเจริญเติบโตช้า สัปดาห์ที่ 2 เริ่มมีการเจริญเติบโตมากขึ้น โดยสังเกตจากความสูงและการแตกราก ลักษณะต่างๆ ของลำต้นเริ่มผิดปกติ ลำต้นใหญ่ เตี้ย อวบน้ำ แต่มีการขยายขนาดของลำต้นไม่สม่ำเสมอ มีของเหลวออกมาจากลำต้นใกล้โคน แต่บริเวณอื่นยังมีสีเขียว ใบหนาและมีสีเขียวเข้ม มีลักษณะเปราะหักง่าย บางต้นปลายยอดหงิก บางต้นโคนเป็นสีน้ำตาลเกือบดำ บางต้นแสดงอาการต้นเตี้ยแคระแกรน และบางต้นมีลักษณะปกติ แต่มีรากสั้นจำนวนมาก ซึ่งลักษณะต่างๆ ดังกล่าวใกล้เคียงกับปลายยอดแตงโมที่ได้รับสารโคลชิซีนสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาเดียวกัน (ตารางที่ 8) สำหรับการทดลองที่แช่ปลายยอดแตงโมในอาหารเหลว MS + สารสกัดเมล็ดดองดึงที่มีสารโคลชิซีน 0.01 เปอร์เซ็นต์ เวลา 36 ชั่วโมง เมื่อนำมาเลี้ยงต่อไปพบว่า ลำต้นส่วนใหญ่แคระแกรนแสดงอาการอวบน้ำ โคนต้นมีของเหลวออกมาจากลำต้น ใบเล็กกว่าปกติมีสีเขียวเข้ม เปราะหักง่าย ส่วนใหญ่ไม่เกิดราก แต่มีบางต้นรากจะออกเป็นกระจุกจำนวนมาก เป็นรากสั้นๆ ยอดไม่มีการพัฒนาของใบอ่อน และเป็นสีน้ำตาล เมื่อเลี้ยงต่อไปในเดือนที่ 2 จะตายเกือบทั้งหมด บางต้นมีการปรับตัวและสามารถเจริญเติบโตเป็นปกติได้ ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับการใช้โคลชิซีนสังเคราะห์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ เวลา 36 ชั่วโมง (ภาพที่ 7) ในขณะที่ต้นควบคุมที่แช่ในอาหารเหลว MS เป็นเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตเป็นปกติ มีการแตกตาข้าง แตกใบใหม่ เริ่มมือเกาะ และเกิดรากได้ดีในสัปดาห์ที่ 2 (ภาพที่ 4)

ส่วนการทดลองที่เติมสารสกัดเมล็ดดองดึงที่มีโคลชิซีน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารที่แช่ปลายยอดแตงโม ทั้ง 12 24 และ 36 ชั่วโมง พบว่า มีผลทำให้ปลายยอดแตงโมมีลักษณะอ่อนนุ่มหมดทุกส่วน ลำต้น และใบเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นน้ำตาล ขอบใบเป็นสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ เมื่อย้ายลงอาหารกึ่ง

แข็งสูตร MS ดัดแปลง + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื้อเยื่อทุกส่วนจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองน้ำตาล และตายในที่สุด โดยไม่พบอัตราการรอดชีวิตเลย (ภาพที่ 6) เมื่อเทียบกับการใช้สารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้นเดียวกันทั้ง 12 24 และ 36 ชั่วโมง พบอาการผิดปกติใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 8) แต่เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลง + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ายังมีรอดชีวิตอยู่บ้างประมาณ 16.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4)

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดดองดึงมีอิทธิพลต่อความสูงของต้นแตงโมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 11 ภาคผนวก ข) โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดดองดึง 0.01 เปอร์เซ็นต์ แช่เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มีความสูงน้อยกว่าต้นควบคุม ส่วนการแช่เป็นเวลา 12 แล 24 ชั่วโมง ไม่ทำให้ความสูงแตกต่างกัน ส่วนสารสกัดเมล็ดดองดึงที่ระดับความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ต้นแตงโมตายทั้งหมด (ตารางที่ 7)

ส่วนการทดลองที่ใช้สารโคลชิซีนสังเคราะห์ พบว่าความเข้มข้นของสารโคลชิซีนสังเคราะห์และระยะเวลาในการแช่มีอิทธิพลต่อความสูงของต้นแตงโมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 12 ภาคผนวก ข) ต้นแตงโมที่เป็นต้นควบคุมมีความสูงมากกว่าต้นที่แช่ในสารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 8) ที่ความเข้มข้นของสารโคลชิซีนสังเคราะห์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มเวลาในการแช่จาก 12 และ 24 ชั่วโมง เป็น 36 ชั่วโมง มีผลทำให้ความสูงของต้นแตงโมลดลงด้วย อย่างไรก็ดี จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะความสูงของต้นแตงโม เปรียบเทียบระหว่างการแช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึง กับสารโคลชิซีนสังเคราะห์ พบว่ามีผลต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 13 ภาคผนวก ข)

5.2 จำนวนโครโมโซม

จากการทดลองพบว่า จำนวนโครโมโซมของแตงโมที่เป็นต้นควบคุมมี 22 แท่ง (2n = 22) (ภาพที่ 9) นอกจากนั้นพบต้นแตงโมที่คาดว่ามีจำนวนโครโมโซมเป็นพอลิพลอยด์คือ ต้นแตงโมที่แช่ในอาหารเหลว MS + สารสกัดเมล็ดดองดึง ที่มีโคลชิซีนเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง โดยมีจำนวนโครโมโซมเป็น 33 34 36 และ 44 แท่ง (ภาพที่ 10)

5.3 ขนาดของเซลล์คุม

ต้นแตงโมที่แช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึงทุกความเข้มข้นและระยะเวลาของการแช่ พบว่าความกว้างของเซลล์คุมแตกต่างจากความกว้างของเซลล์คุมของต้นควบคุม ส่วนสารละลายโคลชิซีนสังเคราะห์ทุกความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่ ไม่แตกต่างไปจากต้นควบคุม โดยค่าเฉลี่ยความ

กว้างของเซลล์คุมอยู่ระหว่าง 0.0182 – 0.0212 มิลลิเมตร และต้นควบคุมมีค่าเฉลี่ยความกว้างของเซลล์คุม 0.017 – 0.018 มิลลิเมตร (ตารางที่ 9 และ 10)

ส่วนความยาวของเซลล์คุมพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ กล่าวคือต้นที่แช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึงที่มีโคลชิซีนเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง กับต้นที่แช่ในสารโคลชิซีนสังเคราะห์ ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวของเซลล์คุมมากกว่าของต้นควบคุม โดยที่สารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ แช่เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำให้เซลล์คุมมีความยาวมากที่สุดคือ 0.026 มิลลิเมตร ในขณะที่ต้นควบคุมมีความยาวเซลล์คุมน้อยที่สุด คือ 0.021 มิลลิเมตร (ตารางที่ 9 และ 10)

5.4 จำนวนคลอโรพลาสต์

ยอดแตงโมที่แช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึงและสารโคลชิซีนสังเคราะห์ มีจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์มากกว่าต้นควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต้นที่แช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึงที่มีโคลชิซีนเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง กับต้นที่แช่ในสารโคลชิซีนสังเคราะห์ ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในเวลาเท่ากัน มีค่าเฉลี่ยของจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมอยู่ระหว่าง 12.4 – 13.50 คลอโรพลาสต์ ต้นควบคุมมีค่าเฉลี่ยของจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมเท่ากับ 9.15 – 12.0 คลอโรพลาสต์ (ตารางที่ 9 และ 10)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงความสูง (เซนติเมตร) ของปลายยอดแตงโมที่เลี้ยงในหลอดทดลอง หลังจากแช่ในอาหาร MS ที่มีสารสกัดเมล็ดดองดึงความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดดองดึง (เปอร์เซ็นต์)	เวลา (ชั่วโมง)			เฉลี่ย
	12	24	36	
0	4.695a	4.425a	5.270a	4.797
0.01	4.135a	3.980a	3.4456b	3.853
0.05	0.000b	0.000b	0.000c	0.000
เฉลี่ย	2.943	12.802	2.905	

CV = 32.20 %

ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ 0.05

CV สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงความสูงของปลายยอดแตงโมที่เลี้ยงในหลอดทดลอง หลังจากแช่ในอาหาร MS ที่มีสารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารโคลชิซีนสังเคราะห์ (เปอร์เซ็นต์)	เวลา (ชั่วโมง)			เฉลี่ย
	12	24	36	
0	3.725a	3.555a	3.640a	3.640
0.01	3.520ab	3.110b	3.090b	3.240
0.05	3.195b	2.870b	2.790c	2.952
เฉลี่ย	3.480	3.178	3.173	

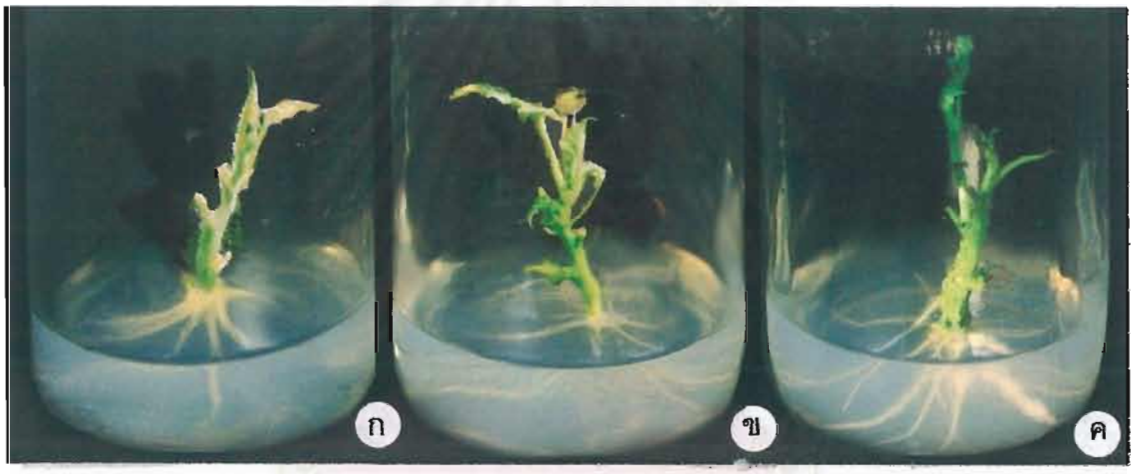
CV = 21.60 %

ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ 0.05

CV สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4 ยอดแตงโม (ต้นควบคุม) ที่แช่ในอาหารเหลวสูตร MS เป็นเวลา 12 , 24 และ 36 ชั่วโมง (ก. ข. และ ค.) แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหาร MS ดัดแปลง + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์



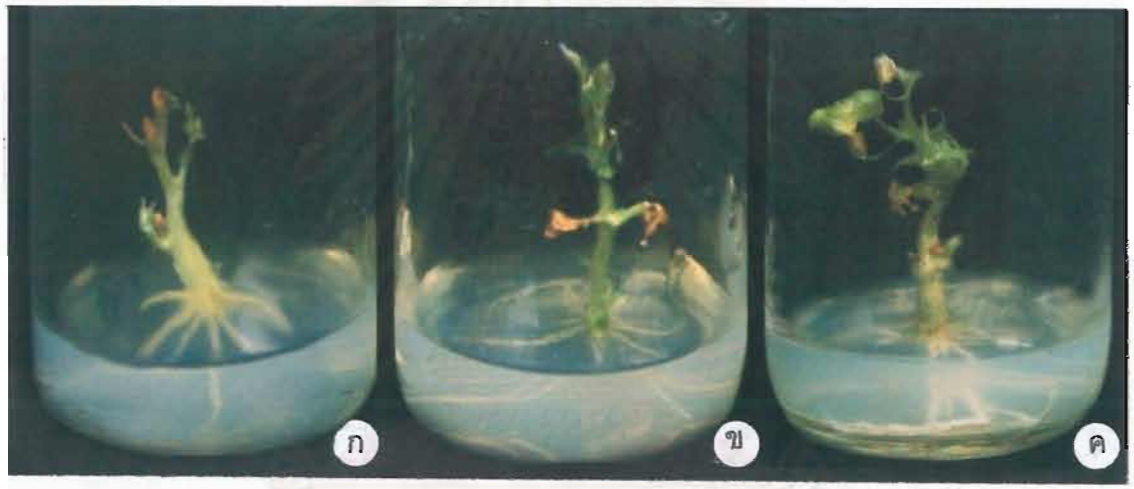
ภาพที่ 5 ยอดแตงโมที่ได้รับสารสกัดเมล็ดดองดึง ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์

ก. เวลา 12 ชั่วโมง

ข. เวลา 24 ชั่วโมง

ค. เวลา 36 ชั่วโมง

ภาพที่ 6 ยอดแตงโมที่แช่ในอาหารเหลวสูตร MS + สารสกัดเมล็ดดองดึง ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 , 24 และ 36 ชั่วโมง (ก. ข. และ ค.) แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหาร MS + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์



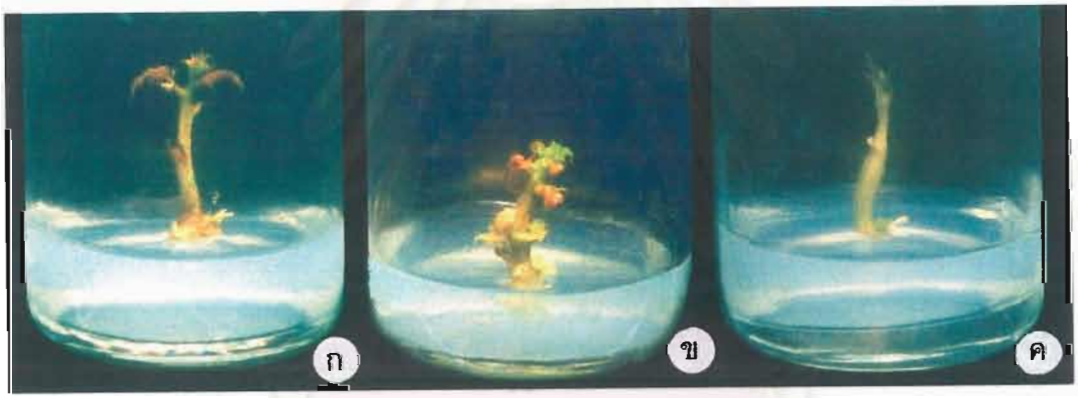
ภาพที่ 7 ยอดแตงโมที่ได้รับสารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์

ก. เวลา 12 ชั่วโมง

ข. เวลา 24 ชั่วโมง

ค. เวลา 36 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

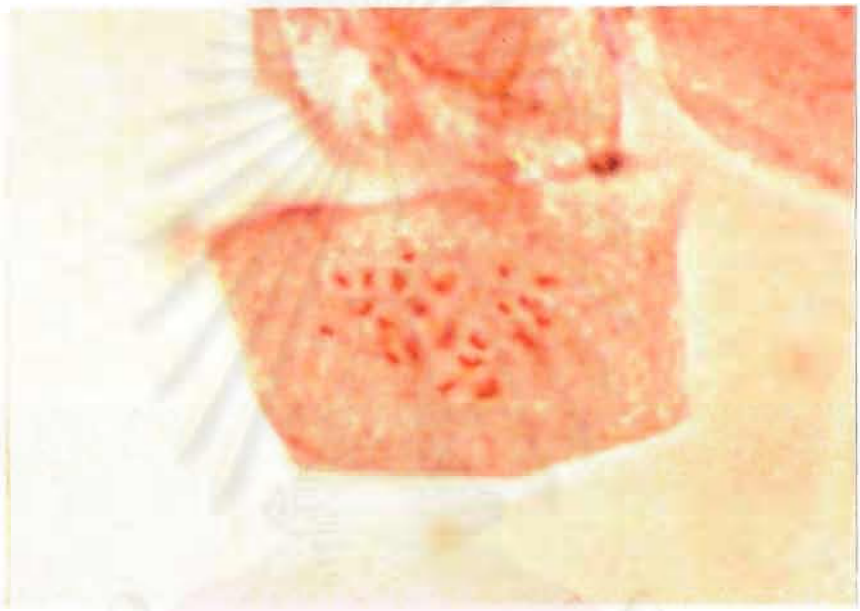


ภาพที่ 8 ยอดแตงโมที่ได้รับสารละลายโคลชิซีนสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์

ก. เวลา 12 ชั่วโมง

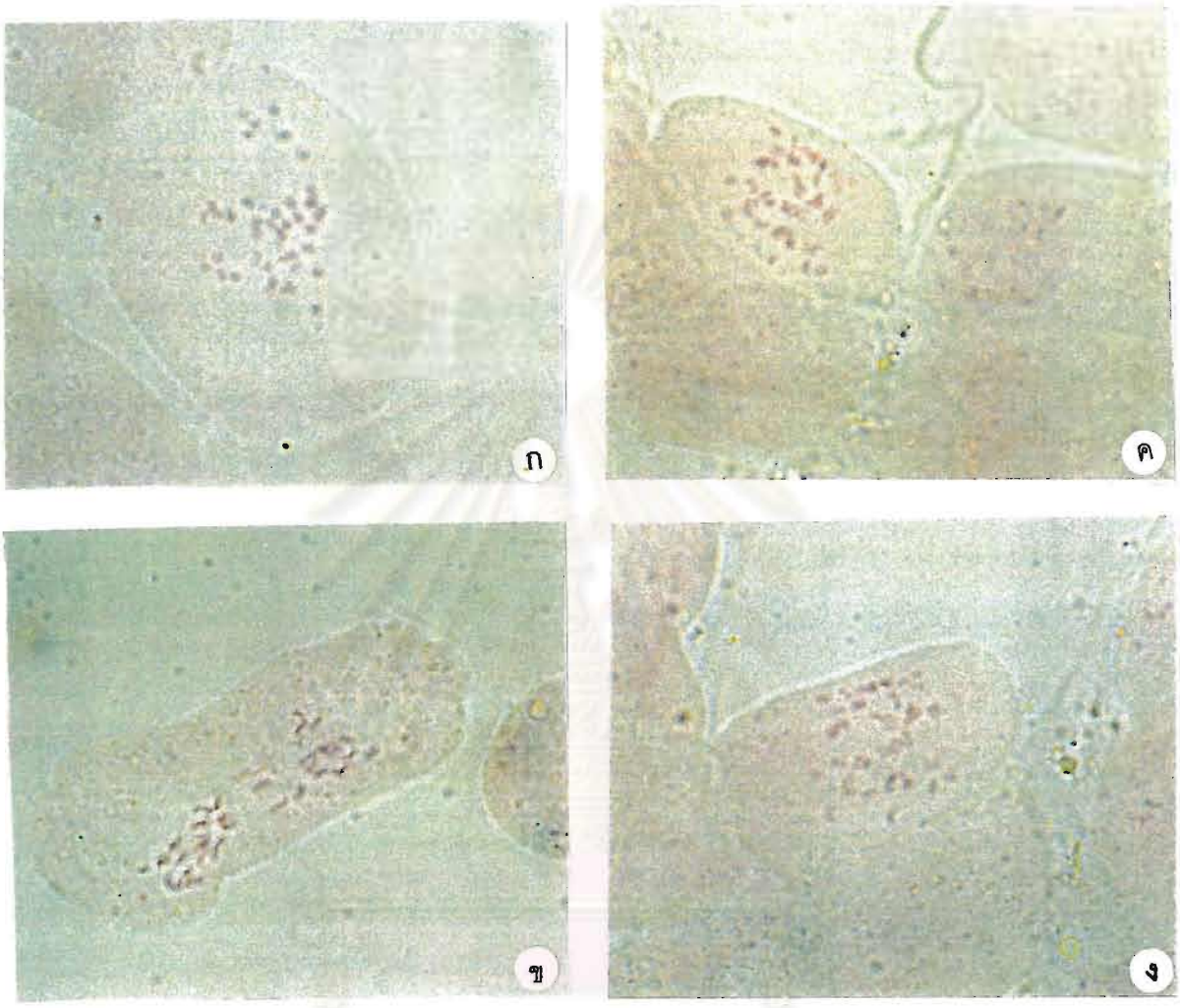
ข. เวลา 24 ชั่วโมง

ค. เวลา 36 ชั่วโมง



ภาพที่ 9 จำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากแตงโมในหลอดทดลอง ที่เป็นดิพลอยด์ 2n = 22 (กำลังขยาย 2,500 เท่า)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 10 จำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากแตงโมในหลอดทดลองที่คาดว่าเป็นพอลิพลอยด์ หลังจากแช่ยอดในสารสกัดเมล็ดดองดึง 0.01 เปอร์เซ็นต์ 12 และ 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 2,500 เท่า)

ก. 33 แท่ง ค. 36 แท่ง

ข. 34 แท่ง ง. 44 แท่ง

ตารางที่ 9 ขนาดของเซลล์คุมและจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของแตงโมที่รอดชีวิตหลังจากแช่ในอาหารเหลว MS ที่มีสารสกัดเมล็ดดองดึงความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารโคลชิซีนในสารสกัด (%)	ความกว้างเซลล์คุม* (mm)			ความยาวเซลล์คุม* (mm)			จำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์*		
	12 ชม.	24 ชม.	36 ชม.	12 ชม.	24 ชม.	36 ชม.	12 ชม.	24 ชม.	36 ชม.
0	0.018c	0.017cd	0.018d	0.021b	0.021b	0.021b	12ab	10.85b	9.15c
0.01	0.022a	0.02b	0.021ab	0.026a	0.025a	0.026a	12.4ab	13.15a	12.95a
% CV	0.48			0.46			0.58		

CV ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation)

* มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเป็นไปได้ 0.05

ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ 0.05

ตารางที่ 10 ขนาดของเซลล์คุมและจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของแตงโมที่รอดชีวิตหลังจากแช่ในอาหารเหลว MS ที่มีสารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารโคลชิซีนในสารสกัด (%)	ความกว้างเซลล์คุม ns (mm)			ความยาวเซลล์คุม* (mm)			จำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์*		
	12 ชม.	24 ชม.	36 ชม.	12 ชม.	24 ชม.	36 ชม.	12 ชม.	24 ชม.	36 ชม.
0	0.018	0.017	0.018	0.021c	0.021c	0.021c	12.0ab	10.85b	9.15b
0.01	0.020	0.020	0.020	0.025a	0.022bc	0.023ab	13.5a	12.4a	13.35a
0.05	0.020	0.020	0.028	0.025a	0.024ab	0.022bc	12.85a	12.90a	13.45a
CV		0.76			0.32			0.53	

CV ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation)

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเป็นไปได้ 0.05

ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ 0.05

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

1. การเพาะเมล็ดแตงโมในหลอดทดลอง

เมล็ดที่สามารถงอกได้เนื่องจากมีการดูดน้ำและออกซิเจนจากภายนอกเข้าไปเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต การงอกของเมล็ดแตงโมเป็นแบบ epigeal germination เช่นเดียวกับการงอกของพืชใบเลี้ยงคู่ส่วนใหญ่ ปัจจัยที่จำเป็นสำหรับการงอกของเมล็ดนอกจากน้ำและออกซิเจน แล้วยังต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสม ส่วนแสงจำเป็นสำหรับเมล็ดพันธุ์บางชนิดเท่านั้น (Brad, 1994) ซึ่งพบว่าในสภาพได้รับแสง 1,000 lux 16 ชั่วโมงต่อวัน และอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในห้องปฏิบัติการเมล็ดแตงโมพันธุ์เพชร F_1 สามารถงอกได้สูง 83.18 เปอร์เซ็นต์

Pierik (1989) พบว่าการพัฒนาของเมล็ดอาศัย 2 ปัจจัยหลัก คือ ปัจจัยภายใน เช่น ยีโนไทป์ ระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในเมล็ด ชนิดของอวัยวะและเนื้อเยื่อเริ่มต้น ปัจจัยภายนอก เช่น องค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยง สภาพแวดล้อม และอุณหภูมิ ในการทดลองนี้เมล็ดแตงโมที่งอกเป็นต้นกล้า สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร ½ MS ต้นและใบมีสีเขียวเข้ม และมีการเจริญดี

ส่วนเมล็ดที่ไม่สามารถงอกได้อาจเนื่องมาจากปัจจัยภายในเมล็ด ได้แก่ อายุ ความสมบูรณ์ของเอมบริโอ และปัจจัยภายนอก ได้แก่ การฟอกฆ่าเชื้อ ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อเอมบริโอ และความสามารถในการงอกได้ สำหรับเมล็ดแตงโมพันธุ์เพชร F_1 ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้ระบุเปอร์เซ็นต์การงอกไว้ที่ถุงบรรจุเมล็ดพันธุ์ว่า มีเปอร์เซ็นต์การงอกประมาณ 87 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าเมล็ดแตงโมพันธุ์เพชร F_1 ที่เพาะในหลอดทดลองมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำกว่าที่ระบุไว้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

2. การเพิ่มจำนวนปลายยอดแตงโม เพื่อศึกษาการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์

Skoog and Miller (1957) เสนอว่า การเกิดเป็นต้น และรากของพืช แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความสมดุลของปริมาณสารควบคุมการเจริญ ออกซิน และไซโตไคนินในอาหาร หากอัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนินมีอยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสมเนื้อเยื่อจะเจริญไปเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์

จากการเพิ่มจำนวนปลายยอดแตงโม โดยวิธีตัดลำต้นให้เป็นท่อน ซึ่งมีตาข้างอยู่ 1 – 2 ตา และนำไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลง + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดที่เจริญจากตาข้างมีการเจริญเติบโตได้ดี จากยอดใหม่ที่ได้ สามารถตัดเป็นท่อนๆ เพื่อเพิ่มจำนวนยอดได้อีก พบว่าใน

เวลา 3 – 4 สัปดาห์ สามารถเพิ่มจำนวนได้ 2 เท่า พีรยุทธ บุญมีรอด (2536) ทดลองใช้อาหารกึ่งแข็งสูตร MS + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กับแตงโมพันธุ์ซูการ์เบบี้ พบว่าทำให้จำนวนยอดเพิ่มมากขึ้น จากการนำอาหารสูตรเดียวกันนี้ ทดลองกับแตงโมพันธุ์เพชร F_1 พบว่าใบล่างเหลืองเร็ว บางต้นขอบใบเริ่มเป็นสีน้ำตาล ลำต้นอ่อนแอ เมื่อทดลองดัดแปลงสูตรอาหารโดยเพิ่มปริมาณ KNO_3 เป็น 1,976 มิลลิกรัมต่อลิตร ต้นแตงโมมีการเจริญเติบโตดีขึ้น ใบเขียวปกติ ลำต้นแข็งแรง แสดงว่า แตงโมพันธุ์เพชร F_1 ต้องการปริมาณธาตุโปแตสเซียมและธาตุไนโตรเจนมากกว่าปริมาณปกติ ที่มีในอาหารสูตร MS อาการของพืชที่ได้รับธาตุโปแตสเซียมไม่เพียงพอ ใบมักมีอาการเหลือง บริเวณขอบใบและปลายใบเป็นสีน้ำตาล ซึ่งจะค่อยๆ ลามไปทั่วทั้งใบ ส่วนอาการของพืชที่ขาดธาตุไนโตรเจน ลำต้นจะไม่แข็งแรง ใบจะซีดเหลืองและร่วงหลุดไป ทั้งธาตุไนโตรเจนและโปแตสเซียมจะมีอาการเริ่มที่ใบแก่ก่อน การเพิ่มปริมาณ KNO_3 จะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้

จากรายงานของ Dong and Jia (1991) ได้ทำการทดลองเพื่อให้เกิด multiple shoot โดยใช้ต้นอ่อนของแตงโม (*Citrullus vulgaris* Schard) 8 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ใส่ BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดยอดเป็นปริมาณมาก โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 60.0 – 92.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้สูตรอาหารเดียวกันนี้เลี้ยงปลายยอดแตงโมพันธุ์เพชร F_1 ปรากฏว่าต้นแตงโมเกิดอาการอวบน้ำ ลำต้นแบน มีสันขึ้นตามลำต้นจนถึงยอด ใบเล็กกว่าปกติ และไม่เกิดยอดจำนวนมากแสดงว่าในพืชแม้จะเป็นชนิดเดียวกัน แต่ละสายพันธุ์อาจมีความแตกต่างในความต้องการปริมาณและชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตได้ และยังทำให้พืชแสดงอาการที่ผิดปกติด้วย (Campton and Gray, 1993) ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนยอดให้ได้ยอดที่เจริญเป็นปกติและแข็งแรง แม้จะสามารถทำให้ปลายยอดเพิ่มจำนวนได้น้อย หากจะมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับทำให้เกิดยอดจำนวนมาก ก็จะเป็นประโยชน์ในการเพิ่มจำนวนและการขยายพันธุ์ของแตงโมต่อไป

3. การสกัดสารจากเมล็ดดองดึงและการวิเคราะห์ปริมาณสารโคลชิซีนในสารสกัด

ในการสกัดสารจากเมล็ดดองดึงโดยใช้ methanol AR grade เป็นตัวทำละลาย เป็นวิธีที่ไม่ยาก หากสามารถหาเมล็ดดองดึงมาใช้ได้ methanol AR grade มีราคาที่ไม่แพง จึงน่าจะเป็นไปได้ในการเตรียมสารสกัดจากเมล็ดดองดึง เพื่อนำมาใช้ทดแทนสารโคลชิซีนสังเคราะห์ที่มีราคาแพง ส่วนการนำสารสกัดเมล็ดดองดึงมาวิเคราะห์โดยวิธี HPLC เพื่อหาปริมาณสารโคลชิซีนโดยเปรียบเทียบกับสารโคลชิซีนสังเคราะห์ ทำให้สามารถทราบได้ว่า ปริมาณสารโคลชิซีนในสารสกัดเมล็ดดองดึงมีอยู่ใกล้เคียงกับสารโคลชิซีนสังเคราะห์ที่ใช้เป็นมาตรฐาน คือ 0.174 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในสารสกัดจาเมล็ดและ

0.62 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ของน้ำหนักแห้งเมล็ด (ภาคผนวก ข) อย่างไรก็ดี ในเมล็ดดองดึงจากแหล่งต่างๆ อาจมีปริมาณสารโคลชิซีนเท่ากันหรือแตกต่างไปจากเมล็ดชุดที่ใช้ในการทดลองอยู่บ้าง เช่น Quisumbing (1951) พบว่า ในเมล็ดดองดึงมีสารโคลชิซีน 0.8 เปอร์เซ็นต์ Sarin และคณะ (1974) พบ 0.81 เปอร์เซ็นต์ Bunyapraphatsra et al. (1991) พบอยู่ในช่วง 0.635 – 1.56 เปอร์เซ็นต์ สมสุข ศรีจักรวาฬ และ ปราโมทย์ เกิดศิริ (2539) พบว่า ค่าเฉลี่ยของสารโคลชิซีนในเมล็ดที่เก็บเมื่ออายุ 5 และ 6 เดือน เท่ากับ 0.92 และ 0.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4. การทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดดองดึง และระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ โดยเปรียบเทียบกับสารโคลชิซีนสังเคราะห์

จากการทดลองพบว่า เมื่อนำปลายยอดแตงโมแช่ในอาหารเหลว MS ที่มีสารสกัดเมล็ดดองดึง โดยให้มีสารโคลชิซีนเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง จะมีอัตราการรอดชีวิต 50 35 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3) โดยผลการทดลองจะแตกต่างไปบ้างจากการแช่ในอาหารเหลว MS ที่มีสารโคลชิซีนสังเคราะห์ ความเข้มข้นและระยะเวลาเดียวกัน ซึ่งพบอัตราการรอดชีวิต 55 45 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ในการทดลองใช้ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ทุกระยะเวลาของการแช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึง อัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 0 ในขณะที่เมื่อใช้สารโคลชิซีนสังเคราะห์ความเข้มข้นและระยะเวลาเดียวกัน พบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 30 20 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าภายหลังการแช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึง อัตราการรอดชีวิตลดลงเมื่อเทียบกับสารโคลชิซีนสังเคราะห์ ยกเว้นที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ แช่เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องจากผลของ methanol ในสารสกัดที่แช่ปลายยอดแตงโม อาจจะมีผลเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อได้ และในการทดลองนี้ สารสกัดเมล็ดดองดึงความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ จึงน่าจะเป็นความเข้มข้นที่สูงมากเกินไปสำหรับปลายยอดแตงโม

ในการทดลองให้พืชได้รับสาร mutagen หากมีอัตราการรอดชีวิตหมด 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วโอกาสที่จะพบพืชที่ตอบสนองต่อสารพิษจะมีน้อย แต่ถ้ามีอัตราการรอดชีวิตลดลงโอกาสที่จะพบพืชที่ตอบสนองต่อสารพิษจะเพิ่มขึ้น (พีรยุทธ บุญมีรอด, 2536) โดยทั่วไปในการทดลองกับพืชนิยมใช้อัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ ที่ LD_{50} (50 % lethal dose) (Allard, 1960) สารสกัดที่มีโคลชิซีนเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เวลาในการแช่ 12 และ 24 ชั่วโมง น่าจะเป็นความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสม ในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ เพราะมีอัตราการรอดชีวิต 50 และ 35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และต้นแตงโมที่ได้มีลักษณะที่ผิดปกติ ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้ได้ว่าเป็นต้นพอลิพลอยด์ (ภาพที่ 5 ,ภาพที่ 10 และตารางที่ 9) อย่างไรก็ดีค่า LD_{50} ของสารสกัดเมล็ดดองดึงที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ คือ ประมาณ 0.020 – 0.023 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการแช่ในเวลา 12 ชั่วโมง 0.016 – 0.018 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการแช่ในเวลา 24 ชั่วโมง และ 0.013 – 0.015 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการแช่ในเวลา 36 ชั่วโมง

ผลของการใช้สารโคลชิซีนสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ พบว่า ได้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของพีรยุทธ บุญมีรอด (2536) คือ อัตราการรอดชีวิตลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารและระยะเวลาในการแช่นานขึ้น ส่วนค่า LD_{50} ของสารโคลชิซีนสังเคราะห์ พบว่าใกล้เคียงกับของสารสกัดคือ 0.022 – 0.029 เปอร์เซ็นต์ , 0.020 – 0.026 เปอร์เซ็นต์ และ 0.013 – 0.018 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการแช่ในเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ แสดงว่า สารสกัดเมล็ดดองดึงมีความเป็นพิษใกล้เคียงกับสารโคลชิซีนสังเคราะห์

นอกจากสารสกัดเมล็ดดองดึงที่ใช้ในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์แล้ว ยังมีสารเคมีอีก 3 ชนิด ที่มีผลทำให้เกิดพอลิพลอยด์ได้โดยจะมีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อต่ำกว่าสารโคลชิซีนถึง 10 เท่า คือ oryzalin (Van Tuyl et al. 1991) trifluralin และ APM (amiprophos methyl) Hansen และ Andersen (1996) ได้ทำการทดลองใช้สารทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวในการเลี้ยง microspore ของ *Brussica napus* พบว่าในสารทั้ง 3 ชนิด สามารถชักนำให้โครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าได้ โดย APM มีผลข้างเคียงเป็นพิษน้อยกว่า oryzalin และ trifluralin ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Duren และคณะ (1996) ที่ศึกษาและตรวจสอบความเป็น autotetraploids ของกล้วยหอม (*Musa acuminata*) ในหลอดทดลอง โดยใช้สารโคลชิซีนและ oryzalin

5. การเกิดพอลิพลอยด์ของต้นแตงโมที่แช่ในอาหารที่มีสารสกัดเมล็ดดองดึงเปรียบเทียบกับสารโคลชิซีนสังเคราะห์

ในการทดลองครั้งนี้ได้ตรวจสอบการเกิดพอลิพลอยด์ของต้นแตงโมที่แช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึงเปรียบเทียบกับการแช่ในสารละลายโคลชิซีนสังเคราะห์ 5 วิธี คือ ศึกษาการเจริญเติบโตและลักษณะที่ผิดปกติ การนับจำนวนโครโมโซมจากต้นที่รอดชีวิต การวัดขนาดเซลล์คุมทั้งความกว้างและความยาว และการนับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม

5.1 ศึกษาการเจริญเติบโตและลักษณะที่ผิดปกติ

การแช่ปลายยอดแตงโมในสภาพปลอดเชื้อในสารสกัดเมล็ดดองดึงกับสารละลายโคลชิซีนสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาในการแช่ต่างกัน พบว่า การเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตลดลง เมื่อความเข้นข้นของสารสูงขึ้นและระยะเวลาในการแช่นานขึ้น (ตารางที่ 7 และ 8) มีลักษณะผิดปกติอย่างเห็นได้ชัดของต้นที่รอดชีวิต ได้แก่ ใบเล็ก หนา สีเขียวเข้ม มีลักษณะอวบน้ำ และเปราะหักง่าย โคนต้นใหญ่ ยอดหงิก (ภาพที่ 5 และ 7) Adelberg et al. (1993) ทดลองกับ Melon (*Cucumis melo* L.) และ Compton et al. (1996) ทดลองกับต้นแตงโม โดยลักษณะดังกล่าวใช้ในการคัดเลือกต้นพอลิพลอยด์ได้ โดยใช้ความสูงเป็นดัชนีบ่งชี้ลักษณะการเจริญเติบโต เนื่องจากต้นพอลิ

พลอยด์มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ ทั้งนี้เนื่องจากส่วนประกอบภายในของต้นพอลิพลอยด์มีการเปลี่ยนแปลงด้วยเช่น ปริมาณน้ำตาลสูงขึ้น หรือมีรงควัตถุบางอย่างเพิ่มขึ้น (Dermen, 1940) แต่ถ้าหากความเข้มข้นของสารโคลชิซีนสูงมากเกินไปทั้งในสารสกัดเมล็ดดองดึง และสารโคลชิซีนสังเคราะห์ ก็อาจเป็นพิษทำให้เป็นอันตรายต่อพืชได้ (ภาพที่ 6 และ 8) ในการทดลองนี้ หลังจากย้ายปลายยอดแตงโมจากสารสกัดเมล็ดดองดึงและสารละลายโคลชิซีนที่มีความเข้มข้น 0.01 กับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ มาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง พบว่าในระยะเวลาประมาณ 1 – 3 สัปดาห์ แรก บางยอดมีอาการอวบน้ำมาก มีสารลักษณะคล้ายเมือกสีขาวใสหุ้มตามความยาวของลำต้น จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจากโคนต้นและค่อยๆ ลามขึ้นมายังยอด ใบ และทำให้ยอดตายในที่สุด (ยกเว้น สารสกัดเมล็ดดองดึงความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลายยอดแตงโมตายหมดซึ่งน่าจะเป็นพิษของ methanol และสารโคลชิซินในสารสกัดดังกล่าวแล้ว) ทั้งนี้เนื่องจากสารโคลชิซีนไม่ว่าจะในสารละลายโคลชิซีนสังเคราะห์หรือในสารสกัดเมล็ดดองดึงมีความเป็นพิษต่อพืช มีผลทำให้ความหนืด (viscosity) เปลี่ยนแปลงไป ทำให้กระบวนการต่างๆ ภายในลำต้นพืชทำงานผิดปกติ และรุ่นแรงถึงตาย (Derman, 1938; Cook และ Loudon, 1952 หรือเกิดจากการที่สารโคลชิซีนชักนำให้เกิดการเพิ่มโครโมโซมเป็น 2 เท่า ทำให้อัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ (Chandrasekhavan and Parthasarathy, 1948) หรือการแช่พืชในสารละลายที่มีโคลชิซีนเป็นเวลานานเกินไป จะทำให้พืชมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มมากจนเซลล์เสียสมดุลและตายได้ (วิทยา, 2527) หรือการที่สารโคลชิซีนไปมีผลต่อระบบเนื้อเยื่อลำเลียงในลำต้น เสริมศิริ เอี่ยมแพง ในปี 2532 รายงานว่า ต้นเก๊กฮวยที่แช่ในสารละลายโคลชิซีนจะเกิด physiological damage ขึ้น ทำให้ลำต้นไม่สามารถลำเลียงอาหารไปยังเนื้อเยื่อปลายยอดหรือตาข้าง จึงได้ต้นเตตราพลอยด์ที่มีลักษณะแคระแกรนไม่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ (อ้างถึงใน พีรยุทธ บุญมีรอด, 2536) ในบางต้นที่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งต้นยกเว้นส่วนตาข้าง เมื่อตัดตาข้างที่ยังมีสีเขียวอยู่ออกมาเลี้ยง พบว่าสามารถมีชีวิตอยู่ได้แต่มีอัตราการเจริญเติบโตช้ามาก และลำต้นมีลักษณะแคระแกรน ไม่มีราก

5.2 <u>การนับจำนวนโครโมโซม</u>

จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมปลายรากของต้นที่ผ่านการแช่ในอาหารที่มีสารสกัดเมล็ดดองดึง พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นคาดว่าเป็นพอลิพลอยด์แบบออโตพอลิพลอยด์ คือ มีจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นเป็นชุดเดียวกันกับของเซลล์เดิม ซึ่งปรากฏว่ามีการเพิ่มขึ้นของจำนวนโครโมโซมทั้งครบชุดเป็นออโตเตตระพลอยด์ 2n = 4X = 44 และไม่ครบชุดเป็นแอนนูพลอยด์ คือ 33 34 และ 36 แท่งด้วย ขณะที่ต้นควบคุมเป็นดิพลอยด์ (2n = 2X = 22) ทั้งนี้เป็นผลมาจากสารโคลชิซีนไปยับยั้งการสร้าง spindle fiber ทำให้โครโมโซมไม่เคลื่อนที่ไปอยู่คนละขั้วของเซลล์ในระยะ anaphase จำนวนโครโมโซมในนิวเคลียสจึงเพิ่มเป็น 2 เท่า (Dermen, 1938) Borisy และ Taylor (1967) เสนอกลไกของสารโคลชิซีน คือจะไปเกาะกับ 6s protein ใน spindle fiber ทำให้ไม่มีการสร้าง

microtubules ดังนั้นการที่เซลล์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่านั้นมีผลทำให้ขนาดของเซลล์ใหญ่ขึ้น และในกรณีที่สารโคลชิซีนมีผลยับยั้งการสร้าง spindle fiber ได้ไม่สมบูรณ์ จึงอาจทำให้พบเซลล์ที่เป็นแอนนูพลอยด์ดังกล่าวได้

จากงานวิจัยของพีรยุทธ บุญมีรอด (2536) ที่ทดลองย้อมสีโครโมโซมของเซลล์ปลายรากแตงโมพันธุ์ซูการ์เบบี้จากในหลอดทดลอง พบว่าเซลล์ไม่ติดสี ทำให้ไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ แต่ในงานวิจัยครั้งนี้ ได้พัฒนาเทคนิคการเตรียมเซลล์ และสามารถทำให้เซลล์รากแตงโมติดสีดี มองเห็นโครโมโซมชัดเจนพอที่จะนับจำนวนโครโมโซมได้ โดยได้พัฒนาเทคนิค ดังนี้คือ

ในการเตรียมเซลล์แบบ Feulgen squash ขั้นตอน pretreatment ได้ทดลองแช่ปลายรากในสารละลาย α - bromonapthalene 4 ช่วงเวลา คือ 18, 20, 22 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นขั้นตอน fixation ใช้ acetic acid 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที ล้างรากด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ 3 – 5 ครั้ง จนหมดกรด นำมา hydrolyze ด้วย 1 N HCl ในเวลาต่างๆ กันคือ 6, 8 และ 10 นาที ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 56, 58 และ 60 องศาเซลเซียส นำปลายรากมาย้อมสีโดยแช่ใน Shiff's reagent ใช้เวลาดังนี้ ½, 1, 2, 3, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าการแช่ปลายรากในสารละลาย α - bromonapthalene เวลาที่เหมาะสมสำหรับปลายรากแตงโมพันธุ์เพชร F_1 คือเวลา 20 ชั่วโมง ในขั้นตอน hydrolyze เวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 10 นาที อุณหภูมิ 56 – 58 องศาเซลเซียส สำหรับการย้อมสีด้วย Shiff's reagent ใช้เวลา 3 ชั่วโมง เซลล์จะติดสีดีทำให้มองเห็นโครโมโซมชัดเจน (ภาพที่ 9 และ 10)

5.3 <u>การวัดขนาดของเซลล์คุม</u>

เมื่อต้นแตงโมในหลอดทดลองที่รอดชีวิตหลังการแช่ในอาหารเหลว ที่มีสารสกัดเมล็ดดองดึงและสารโคลชิซีนสังเคราะห์ ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ กัน เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลง + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เจริญจนมีใบแท้ 2 – 4 ใบ ลอกผิวใบมาวัดขนาดของเซลล์คุม ด้วย micrometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสารสกัดและโคลชิซีนมีผลทำให้ความยาวของเซลล์คุมมากกว่าของต้นควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9 และ 10) ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าเซลล์คุมมีขนาดใหญ่ขึ้นทางด้านความยาว ซึ่งทั้งสารสกัดเมล็ดดองดึงและสารโคลชิซีนสังเคราะห์มีผลทำให้ความยาวของเซลล์คุม มากกว่าของต้นควบคุม ส่วนความกว้างของเซลล์คุมนั้น พบว่า ในสารสกัดเมล็ดดองดึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนในสารโคลชิซีนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ Francis and Bemis (1974) ได้เสนอว่า ความยาวของเซลล์คุมใช้เป็นดัชนีที่ดีในการคัดเลือกต้นพอลิพลอยด์ได้ โดยมีรายงานไว้ในพืชหลายชนิด เช่น ต้นแตงโม (ดำรง สินไชย, 2521) muskmelon (*Cucumis melo*) (Adeberg และคณะ, 1990) "Mitchell" Pitunia (Kamo และ Griesbach, 1993) เป็นต้น จากการ

ทดลองครั้งนี้ พบว่า ใบของแตงโมที่เลี้ยงในหลอดทดลองหลังการแช่โคลชิซีนทั้งในสารสกัดเมล็ดดองดึง และสารโคลชิซีนสังเคราะห์ที่นำมาศึกษามีลักษณะเปราะหักง่ายทำให้มีปัญหาในการลอกผิวใบ เพื่อถ่ายภาพของเซลล์คุม

5.4 <u>การนับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม</u>

ในการศึกษา (ตารางที่ 9 และ 10) พบว่าต้นแตงโมที่แช่ในสารสกัดกับในสารโคลชิซีนมีจำนวนคลอโรพลาสต์มากกว่าต้นควบคุม เช่นเดียวกับการทดลองของพีรยุทธ บุญมีรอด (2536) Fassuliotis and Nelson (1992) รายงานว่า Muskmelons ที่เลี้ยงในหลอดทดลองที่เป็นต้นเตตระพลอยด์จะมีความยาวของเซลล์คุมและจำนวนคลอโรพลาสต์มากกว่าต้นดิพลอยด์ ซึ่งจะสอดคล้องกับการทดลองของ Kamo และ Griesbach (1993) ที่แช่พิทูเนียในสารละลายโคลชิซีน พบว่าต้นเตตราพลอยด์มีขนาดเซลล์คุมใหญ่กว่าและจำนวนคลอโรพลาสต์มากกว่าต้นดิพลอยด์ ดังนั้นจึงใช้ปริมาณคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม และขนาดของเซลล์คุมเป็นดัชนีหนึ่งซึ่งใช้บ่งชี้ต้นที่เป็นพอลิพลอยด์ได้ ซึ่งผิวใบที่ลอกได้จะไม่มีความเรียบสม่ำเสมอ เมื่อถ่ายรูปจะทำให้เห็นเซลล์คุมและเม็ดคลอโรพลาสต์ไม่ชัดเจน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

1. การเพาะเมล็ดแตงโมในหลอดทดลองบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ในการงอกสูงถึง 83.2 เปอร์เซ็นต์ สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเพิ่มปลายยอดแตงโมเพันธุ์เพชร F_1 คือ อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม KNO_3 1,976 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่าต้นแตงโมมีการเจริญเติบโตดี สามารถชักนำให้เกิดรากได้ และสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้อย่างน้อย 2 เท่า ในเวลา 1 เดือน

2. ในการทดลองใช้ methanol AR grade สกัดสารจากเมล็ดดองดึงและนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้โคลชิซีนสังเคราะห์เป็นสารมาตรฐาน พบว่า มีปริมาณโคลชิซีน 0.174 เปอร์เซ็นต์(w/v) ของสารที่สกัดได้ และ 0.62 เปอร์เซ็นต์(w/w) ของน้ำหนักแห้งเมล็ด

3. ในการทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดดองดึงและระยะเวลาที่เหมาะสม ในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์เปรียบเทียบกับการใช้สารโคลชิซีนสังเคราะห์ พบว่า สารสกัดเมล็ดดองดึงความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวสูตร MS เวลาในการแช่ 12 – 24 ชั่วโมง น่าจะเหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในแตงโม ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้สารโคลชิซีนสังเคราะห์ ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่เท่ากัน และ LD_{50} ของสารสกัดเมล็ดดองดึงมีค่าใกล้เคียงกับ LD_{50} ของสารโคลชิซีนสังเคราะห์คือ ประมาณ 0.020 – 0.029 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่นาน 12 ชั่วโมง และ 0.013 – 0.018 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่นาน 24 – 36 ชั่วโมง

4. จากการศึกษาการเกิดพอลิพลอยด์ ต้นแตงโมที่รอดชีวิตจากการแช่ในอาหารเหลวที่มีสารสกัดเมล็ดดองดึง 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MS ดัดแปลง + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตแตกต่างจากต้นควบคุม กล่าวคือ มีลำต้นและใบเขียวเข้ม ลำต้นอวบน้ำ เปราะหักง่าย มีรากสั้นๆ จำนวนมาก ขนาดของเซลล์คุมใหญ่ขึ้น จำนวนคลอโรพลาสต์เพิ่มมากขึ้น และมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากต้นดิพลอยด์ซึ่งเป็นต้นควบคุม

ข้อเสนอแนะ

1. การเปลี่ยนพืชทดลองเป็นพืชชนิดอื่นนอกจากแตงโม ทราบวิธีการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองแล้ว และพืชมีการเจริญเติบโตได้ดีและเร็วในหลอดทดลอง อีกทั้งควรเป็นพืชที่มีโครโมโซมขนาดใหญ่ จำนวนโครโมโซมน้อย และสามารถเตรียมเซลล์ปลายรากเพื่อศึกษาได้ไม่ยาก น่าจะช่วยให้การศึกษาผลการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ง่ายขึ้น

2. การย้ายปลูกต้นแตงโมเพื่อตรวจสอบลักษณะพอลิพลอยด์อาจจะช่วยให้สามารถศึกษาได้ชัดเจนและง่ายกว่าการศึกษาจากต้นที่เลี้ยงในหลอดทดลอง ซึ่งต้นที่ปลูกลงดินจะสามารถสังเกตลักษณะออโตพอลิพลอยด์ได้ เช่น ลำต้นเตี้ย มีขนาดลำต้นใหญ่กว่าปกติ การลอกผิวใบสะดวกขึ้น เนื่องจากใบใหญ่กว่าในหลอดทดลอง นอกจากนั้น เมื่อปลูกจนออกดอกก็ยังสามารถศึกษาจำนวนโครโมโซมจาก pollen mother cell ได้อีกด้วย

3. เทคนิคทาง Flow cytometry เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบการเป็นพอลิพลอยด์ โดยไม่ต้องเตรียมเซลล์ และนับจำนวนโครโมโซม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

<u>ภาษาไทย</u>

กันยารัตน์ ไชยสุต. 2532. **เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล** Zephyranthes. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 260 หน้า.

ชะบา อำรำไพ และกันยารัตน์ ไชยสุต. 2527. **การใช้โคลชิซีนชักนำให้เกิดโพลิพลอยด์ในแพงพวยฝรั่ง**. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดำรง สินไชย. 2521. **การชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในแตงโมพันธุ์ชูการ์เบบี้**. วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เต็ม สมิตินันท์. 2523. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย**. ห้างหุ้นส่วนจำกัด พันนี่พับบลิชชิ่ง กรุงเทพฯ.

นันทวัน บุณยประภัศร. 2542. **สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (2)**. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

นิจศิริ เรืองรังษี และพยอม ตันติวัฒน์. 2532. **พืชสมุนไพร**. คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พยอม ตันติวัฒน์. 2521. **สมุนไพร**. กรุงเทพฯ : สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย.

พรพรหม พรหมเมศร์, ชัยพฤกษ์ สงวนทรัพยากร, ยิ่งยง ไพสุขศานติวัฒนา และนิรันดร์ จันทรวงศ์. 2538. การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของดองดึง. **วารสารสมุนไพร** 2 (2). 27 – 33.

พีรยุทธ บุญมีรอด. 2536. **ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของโคลชิซีนที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในแตงโมพันธุ์ชูการ์เบบี้ในหลอดทดลอง**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มงคล พุทธวงษ์. 2539. ผลผลิตและคุณภาพความหวานของแตงโมไม่มีเมล็ด 18 สายพันธุ์. **รายงานการประชุมสัมมนาทางวิชาการ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 13 สาขาพืชศาสตร์**. 338 – 344.

มลวิภา โสมานันท์. 2521. **การชักนำให้เกิดโพลิพลอยด์ในกล้วยไม้อะแรนดา โดยการใช้โคลชิซีน**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ยุพา จงสุวัฒน์. 2527. พืชสมุนไพรกับโรคมะเร็ง. **วารสารศูนย์การแพทย์ศาสตร์**. 10 (2) : 59 – 62.

เยาวภา จิระเกียรติกุล และอรดี สหวัชรินทร์. 2537. การชักนำให้หม่อนเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยใช้โคลชิซีน. **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่** 32. 639 – 648.

รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล. 2537. พืชพิษและพืชเสพติด. ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 59 หน้า

วิชชุตา รุ่งเรือง. 2537. **ผลของโคลชิซีนและรังสีแกมมาที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าววัพันธุ์** "Double Spathe" **ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิมล ขวัญเกื้อ และอนันต์ พู่พิทยาสถาพร. 2526. การชักนำให้เกิดโพลิพลอยด์ในพริกโดยใช้สารโคลชิซีน. **วารสารวิทยาศาสตร์** 37 (7 – 8). 488 – 492.

สมสุข ศรีจักรวาฬ และปราโมทย์ เกิดศิริ. 2539. ศึกษาอายุเก็บเกี่ยว ปริมาณผลผลิต และคุณภาพของเมล็ดดองดึง. **ว. วิทย. กษ**. 29 ๖4 – 6) หน้า 88 – 99.

สาริณี ไชยเจริญ. 2538. การศึกษาจำนวนโครโมโซม ลักษณะดอกและความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้หวาย. **วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย.)** ปีที่ 29 : 150 – 157.

สุนันท์ รังษีกาญจน์ส่อง. 2538. **คู่มือหลักสูตรเข้มข้นการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง** HPLC. ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 98 หน้า

สุนิชา เอี่ยมน้อย, กิตติ พิทักษ์นิตินันท์, นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และนันทวัน บุณยประภัศร. 2521. **การสำรวจหาโคลชิซีนในสมุนไพรไทย**. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล.

เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. 2522. **ไม้เทศเมืองไทย สรรพคุณยาเทศและยาไทย**. เกษมบรรณกิจ. กรุงเทพฯ. 596 น.

เอกรินทร์ สายฟ้า. 2525. **พฤกษศาสตร์ เล่ม 2 อัลคาลอยด์ (ตอน 1)**. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 88 หน้า.

<u>ภาษาอังกฤษ</u>

Adelberg , J.W , Rhodes, B.B. and Skorupska , H.T. 1990. Generating Tetraploid Melons from Tissue Culture. **Hortscience**. 25 (9) : 1073.

Adelberg, J.W., Rhodes, B.B. and Skorupska, H.T. Generating. 1993. Tetraploid Melons in Tissue Culture. **Acta Horticultrae in vitro Culture**. 336 : 373 – 380.

Agarwal, V.S. and Ghosh, B. 1985. **Drug Plants of India (Root Drugs)**. Kalyani Pubilsher : 122.

Alemanno , L. and Guiderdoni, E. 1994. Increassed doubled haploid plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) anther cultured on colchicine supplemented media. **Plant Cell Reports**. 13: 432 – 436.

Allard, R.W. 1960. **Principle of Plant Breeding**. New York : John Wiley & Sons, Inc. 485 p.

Arena, J.M. 1978. **Poisoning**. Charles C Thomas Publisher. Illinois USA : 412 – 413.

Avery, G.S. and Johnson , E.B. 1947. **Hormones and Horticultures**. McGrew – Hill, New York : 282 – 298.

Backer, C.A. and Bakhuizen van den Brink Jr., R.C. 1968. **Flora of Java. Vol III. Wolters – Noordhoff N.V. – Groningen - The Netherlands** : 84 – 85.

Bates, David M. , Robinson, Richard W. and Jeffrey, Charles. 1990. **Biology and Uillization of the Cucurbitaceae.** by Cornell University. Press. Print in the USA.

Bensen, G. 1989. Effects of several enviromental factors on tuber formation and colchicine content of *Gloriosa superba*. **Yunan Inst .Trop. Bot. Acad. Sin., Mengla, Peop. Rep. China.**

Borisy, G.G. and Taylor , E.W. 1967. The Mechanism of colchicine action. **J. Cell. Biol.** 34 : 535 – 547

Bradber, J.W. 1994. **Seed Dormacy and Germination.** Blackie Academic & Professional. London. 37p.

Budavari, S., O'Neil, Maryadele J., Smith A., Heckelman, Patricia E. and Kinneary, J.F. 1996. **The Merck Index and encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals.** Merck & Co., INC. USA.

Bunyapraphatsara, N., Khongchuensin, S., Sagwansupayakorn, C., Sakulmeerit, C., Tipayasak, T. and Sri – ngen – ngaam, Y. 1991. **Colchicine Content of the *Gloriosa superba* L. Cultivated in Thailand.** In J.M. Pezzuto. A.D. Kinghorn, H.H.S. Frong. And G.A. Cordell (eds.) Progress on terrestial and marine nature products of medicinal and biological interest. American Botanical Council. Chicago : 126 – 134.

Chandra, N. and Tatar, JL. 1988. Effect of mutagens on seed germination *in Gloriosa superba* Linn. **Indian Journal of Botany.** 11 : 1. 11-16.

Chanrasekhavan, S.N. and Parthasarathy, S.V. 1948. **Cytogenetics and Plant Breeding.** P.Varaddachary & Co., Madras. 340 p.

Chaudhuri, Prabir K. and Thakur, Raghunaths. 1993. 1,2 – didemethylcolchicine : a new alkaloid from *Gloriosa superba*. J. of Natural Products. 56 (7) : 1174 – 1176.

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

Chopra, R.N., Badhwar, R.L. and Ghosh, S. 1965. Poisonous plant of India. Indian Council of Agricultural Research. New Delhi. 2 : 880 – 882.

Chopra, R.N., Chopra, I.C. and Varma, B.S. 1965. Supplement to Glossary of Indian Medicinal Plants. Publication & Information Diretorate Hillside Road, New Dehi. 12 : 31.

Clewer, M.W.S., Green, S.J. and Tutin, F. 1915. The constituents of *Gloriosa superba*. J.Chem.Soc. 107 : 835 – 840.

Compton , Michael E., Gray, D.J. and Elmstrom, G.W. 1996. Identification of tetrapliod regenerants from cotyledons of diploid watermelon cultured *in vitro*. Euphytica. 87 : 165 – 172.

Compton, Michael E. and Gray, D.J. 1993. Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Cotyledons of Diploid, Triploid and Tetraploid Watermelon. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 118 (1) : 151 – 157.

Compton, Michael E. and Gray, D.J. 1994. Adventitious Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Cotyledons of Tetraploid Watermelon. Hortscience. 29 (3) : 211 – 213.

Cook, J.W. and Loudon, L.D. 1952. Colchicine. The Alkaloid Chemistry and Physiology. 2 : 261 – 329.

Dalington , C.D. and Janki, E.K. 1945. **Chromosome Atlas of Cultivated Plants.** George Allen and Unwin Ltd. London : 397p.

Dalington , C.D. and Wylie, A.P. 1946. **Chromosome Atlas of flowering plants.** London. George Allen and Unwin Ltd. London : 519 p.

Dermen, H. 1938. A Cytological analysis of polyploidy induced by colchicine and by extremes of temperature. **Hered.** 29 : 211 – 229.

Dermen, H. 1940. Colchicine polyploid and technique. **Bot. Rev.** 6 : 599 – 635.

Dong, J.Z. and Jia, S.R. 1991. High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad). **Plant Cell Reports.** 9 : 559 – 562.

Duke, J.A. 1985. Hand book of Medicinal Herbs. CRC Press, Bocaration, Florida. 677 p.

Duren , M. Van , Morpurgo , R., Dolezel, J. and Afza , R. 1996. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. **Euphytica.** 88 : 25 – 34.

Eigsti, O.J. 1971. The seedless triploid hybrid watermelon. **Hortscience.** 6 (1) : 2.

Eigsti, O.J. and Dustin, Jr.P. 1955. **Colchicine in Agriculture Medicine Biology and Chemistry.** The Lowa State College Press. Ames. Lowa. USA. 479 p.

Eigsti, O.J., Dustin, Jr.P. and Gaty – Winn , N. 1949. On the dicovery of the action of colchicine on mitosis in 1889. **Science.** 110 (2868) : 692.

Ellison, J.H. and Tiango, E.S. 1970. Differentiating diploid from tetraploid seedling of *Asparagus officinalis* L. HortScience. 5(2) : 173 – 174.

Fassuliotis, G. and Nelson, B.V. 1992. Regeneration of Tetraploid Muskmelons from Cotyledons and Their Morphological Differences from Two Diploid Mukmelon Genotypes. **J.Amer. Soc. Hort. Sci.** 117 (5) : 863 – 866.

Fernada,R. and Fernada, D.N. 1990. Poisoning with plants and mushrooms in Sri Lanka : a retrospective hospital based study. **Veterinary and Human Toxicology.** 32 : 579 – 581.

Francis, R.R. and Bermis, W.P. 1974. Stomatal size in induced polyploids in *Cucurbita.* **Hortscience.** 9 (2) : 138.

Fukui, K. and Nakayama, S. 1996. **Plant chromosome : Laboratory methods.** CRC Press, Inc. Tokyo : 1 – 17

Gamborg, O.L. and Phillips, G.C. 1995. **Plants cell, tissue and organ culture.** Springer. Verlag Berlin Heidelberg : 358.

Gibberd, A.V. and Gibberd, V.L. 1977. **A gardening Notebook for the Tropics.** William Clower and Sons. Ltd. London.

Gupton , C.L. 1989. Production of non – chimeral colchiploids in *Rubus* species by tissue culture. **Euphytica.** 44 (1-2) : 133 – 135.

Hagino, K., Murofushi, K. and Ohta, J. 1978. Effect of colchicine on the mitosis of *Physarum polycephalum.* **Plant & Cell Physiol.** 19 (4) : 711 – 715.

Hansen, N.J.P. and Anderson , S.B. 1996. *In vitro* chromosome doubling potential of colchicine , oryzalin , trifuralin and APM in *Brassica mupus* microspore culture. **Euphytica.** 88 : 159 – 164.

Heinz, Don J. and Mee, Grace W.P. 1970. Colchicine – Induced Polyploids from Cell Suspension Culture of Sugarcane. **Crop Science.** 10 : 696 – 699.

Henderson, W.R. 1977. Effect of Cultivar, Polyploid and "Reciprocal" Hybridization on Characters Important in Breeding Triploid Seedless Watermelon Hybrids. **J. Amer. Soc Hort. Sci.** 102 (3) : 293 – 297.

Hooker, J.D. 1894. **Flora of British India.** Vol.6. Kent, England: L. Reeve & Co., Ltd.

Jayaweera, D.M.A. 1981. Medicinal Plants. (Indigenous and Exotic) Part III. **The National Science Council of Sri Lumka** : 266 – 267.

Jirakittikul, Y. and Sahavacharin, O. 1994. Polyploidy Induction in Mulberry by Colchicine Treatment Using Aseptic Technique. **The 32nd Kasetsart University Annusl Conference** : 639 – 648.

Kamo, K. and Griesbach, R. 1993. Ploidy Change in "Mitchell" Pitunia. **Acta Hortscience *In Vitro* Culture.** 336 : 307 – 311

Karp, Angela. 1991. Cytological techniques. **Plant Tissue Culture** Mannual. C4 : 1 – 13.

Kihara , H. 1951. Triploid watermelons. **Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.** 58 : 217 – 230.

King,R.C. and Stansfield, W.D. 1990. **A Dictionary of Genetics.** 4th Edition. Oxford University Press. 406 p.

Lyrene, P.M. and Pery, J.L. 1982. Production and selection of blueberry polyploids *in vitro*. **The Journal of Heredity.** 73 : 377 – 378.

Mendis, S. 1989. Colchicine cardiotoxicity following ingestion of *Gloriosa superba* tubers. **Postgraduate Medical Journal.** 65 : 752 – 755.

Murashige , T. and Skoog. F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum.** 15 : 473 – 497.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 25 : 135 – 166.

Murthy , B.S. , Rao , L.V.S. and Rao, M.V.K. 1968. Colchicine induced autotetraploid in G3 chilli (*Capsicum annuum* L.). **The Andhra agric. J.** XV (3) : 74 – 79.

Naveen Chandra, Tarar, J.L. and Chandra, N. 1988. Studies on callus initiation and growth in *Gloriosa superba* Linn. **Annala of Plant Physiology.** 2 (2). 183 – 186.

Pal, B.P.S. Ramanujam and Joshi, A.B. 1941. Colchicine induced polyploid in Crop Plants II. chilli (*Capsicum annuum* L.). **Indian J. Genetic Plant Breeding.**

Perry, J.L. and Lyrene, P.M. 1984. *In vitro* Induction of Tetraplody in *Vaccinium darrowi*, *V.elliottii* and *V.darrowi* X *V.elliottii* with colchicine treatment. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109 (1) : 4 – 6.

Pierik, R.L.M. 1989. *In Vitro* Culture of Higher Plants. MartinusNijhoff. Natherland. 344p.

Quisumbing, E. 1951. **Medicinal Plants of the Philippines.** Manila : 166 – 167.

Robinson , R.W. , Munger, H.M., Whitaker, T.W. and Bohn, G.W. 1976. Gene of the Cucurbitaceae. **Hortscience.** 11 (6) : 554 – 568.

Sangduen, N. and Sinpatananon, A. 1988. Tetraploid Mulbrrry Induction by Colchicine Treatment trough Tissue Culture. **Kasetsart J. (Nat.Sci.)** 32 : 424 – 430.

Sarin, Y.K., Janwal, P.S., Gupta, B.K. and Atal, C.K. 1974. Colchicine from the seeds of *Gloriosa superba* L. **Curr. Sci.** 43 (3) 87.

Sharma, A.K. and Sharma, A. 1965. **Chromosome Techniques.** 3rd edition. Butterworths press, London. 771 p.

Sharma, A.K. and Sharma, A. 1980. **Chromosome Techniques.** Butterworths press, London, 3rd edition : 26 – 86.

Skoog, F. and Miller, C.O. 1957. Chemical regulation and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Sym. Soc. Exp. Biol.** 11 : 118 – 131.

Srivastava, K. and Tripathi, S.N. 1990. Colchicine Incuced Tetraploid of Four *Atylosia* Species. **Cytologia.** 55 : 493 – 500.

Srivastava, P.K. and Raina, S.N. 1982. Cytogenetics of Clitiria. **Cytologia.** 47 : 99 – 107.

Surinder, K. and Thakur, R.S. 1977. Chemical constituents of the flowers of *Gloriosa superba* L. **Proc. Natl. Acad. Sci. India. Sect. A.** 47(1) 22.

Taiz Z. 1998. **Plant Physiology.** 2nd edition. Sinaner Associates, Inc., Publishers. 792 p.

Tongxum Z.S. 1988. Effect of several enviromental factors on tuber formation and colchicine content of *Gloriosa superba*. **Yunana Inst. Trop. Bot. Acad. Sin. Mengla, Peop. Rep. China.** (6) 25 - 28.

Vakaili, N.G. 1962. Colchicine – Induced Polyploidy in *Musa*. **Nature.** 194 (4827) : 453 – 454.

Vakali, N.G. 1967. The experimental formation of polyploid and its effect in the genus *Musa*. **Amer. J. Bot.** 54 (1) : 24 – 36.

Van Tuyl, Jaap, M. Meijer, B. and Van Die, N.M. 1991. The use of oryzaline as an alternative for colchicine in *in vitro* chromosome doubling of lilium and nerine. **Netherlands. (Mimeograghed).** 1p.

Vijayavalli, B. and Mathew, P.M. 1990. Karyomorphology of four morphotypes of *Gloriosa superba* L. from south India. **Cytologia.** 55 : 4, 531 – 533.

Wall, J.R. 1960. Use of Marker Genes in Producing Triploid Watermelons. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 76 : 577 – 581.

Watt, J.M. and Breyer – Brandwijk, M.G. 1962. **The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and eastern Africa.** Lodon. E & S. Livigstone Ltd.: 700 – 707.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

1. ส่วนประกอบของอาหารสูตร Murashige and Skoog ปริมาณ 1 ลิตร

Inorganic salts			
NH_4NO_3	Ammonium nitrate	1650.0	mg
KNO_3	Potassium nitrate	1900.0	mg
KH_2PO_4	Potassium phosphate dibasic anhydrous	170.0	mg
$MgSO_4 . 7 H_2O$	Magnesium sulfate	370.0	mg
$CaCl_2 . 2 H_2O$	Calcium chloride dihydrate	440.0	mg
$MnSO_4 . 4H_2O$	Manganese sulfate	22.3	mg
$FeSO_4 . 7H_2O$	Ferrous sulfate	27.8	mg
$Na_2 . EDTA$	Disodium ethylenediaminetetraacetate	37.3	mg
$Zn_4 . 7H_2O$	Zinc sulfate	8 .6	mg
H_2BO_3	Boric acid	6.2	mg
KI	Potassium iodide	0.83	mg
$CuSO_4 . 5H_2O$	Cupric sulfate	0.025	mg
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	Sodium molybdate	0.25	mg
$CoCl_2 . 6 H_2O$	Cobalt chloride	0.025	mg
Organic constituents			
Surcrose		30.0	mg
Glycine		2.0	mg
myo – Inositol		100.0	mg
Nicotinic acid		0.5	mg
Pyridoxine		0.5	mg
Thiamine . HCl		0.1	mg
Agar		8.0	gm

2. การเตรียมสารเคมีสำหรับตรวจจำนวนโครโมโซมปลายราก

2.1 สารละลาย pretreatment

2.1.1 สารละลายอิ่มตัว alphabromonapthalene

ส่วนประกอบ

2.1.1.1 alphabromonapthalene	1	หยด
2.1.1.2 น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม

ละลาย alphabromonapthalene 1 หยด ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน จนสารละลายอิ่มตัวโดยสังเกตว่ายังมีหยด alphabromonapthalene ปะปนอยู่บ้าง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ควรเตรียมใหม่ ทุกๆ 1 สัปดาห์)

2.2 สารละลาย fixative

2.2.1 acetic acid 90 %

ส่วนประกอบ

2.2.1.1 glacial acetic acid	900	ml
2.2.1.2 น้ำกลั่น	100	ml

วิธีเตรียม

ผสมสารละลายทั้งสองอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2.2.2 Carnoy's solution

ส่วนประกอบ

2.2.2.1 ethyl alcohol absolute	350	ml
2.2.2.2 chloroform	150	ml
2.2.2.3 glacial acetic acid	50	ml

วิธีเตรียม

ผสมสารละลายทั้งสามอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2.3 สารละลาย hydrolyze

2.3.1 1 normal hydrochloric acid (1N HCl)

ส่วนประกอบ

2.3.1.1 glacial hydrochloric acid	82.5	ml
2.3.1.2 น้ำกลั่น	1000.0	ml

วิธีเตรียม

ผสมสารละลายทั้งสองอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2.4 สีย้อม (Stain)

2.4.1 Schiff's reagent

ส่วนประกอบ

2.4.1.1 basic fuchin	1	g
2.4.1.2 น้ำกลั่น	200	ml
2.4.1.3 1N HCl	30	ml
2.4.1.4 potassium metabisulfite	3	g

วิธีเตรียม

ต้มน้ำกลั่นจนเดือด เติม basic fuchin ลงไปทีละน้อย คนให้ละลายจนหมด เติม 1N HCl และ potassium metabisulfite ตามลำดับ กรองด้วยกระดาษกรอง เก็บในขวดสีชา

2.4.2 Propionocarmine

ส่วนประกอบ

2.4.2.1 carmine	2	g
2.4.2.2 propionic acid	100	ml

วิธีเตรียม

ต้ม propionic acid 45 % จนเดือด เติม carmine ลงไปทีละน้อย คนให้ carmine ละลายจนอิ่มตัว ตั้งทิ้งไว้จนอุ่น กรองด้วยกระดาษกรอง

2.4.3 Aceto acrmine

ส่วนประกอบ

2.4.3.1 carmine	2	g.
2.4.3.2 glacial acetic acid	50	ml

2.4.3.3 น้ำกลั่น 50 ml

2.4.3.4 ferric acetate 1 – 2 หยด

วิธีเตรียม

นำ glacial acetic acid ตั้งไฟให้เดือด แล้วค่อยๆ ใส่ carmine ลงไป คนช้าๆ จนละลายหมด หยด ferric acetate ลงไป 1 – 2 หยด หรือ อาจใช้ตะปูที่เป็นสนิม นำลงไปแกว่งประมาณ 10 นาที เพื่อช่วยให้สีเข้มขึ้น ยกลงจากเตา ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งอุ่น ประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงเติมน้ำกลั่นลงไป คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง

2.4.4 Aceto orecein

ส่วนประกอบ

2.4.4.1 orecein 2.2 g

2.4.4.2 glacial acetic acid 100.0 ml

2.4.4.3 น้ำกลั่น 144.0 ml

วิธีเตรียม

ละลาย orecein 2.2 g ใน glacial acetic acid 100 ml โดยการต้มไฟอ่อนๆ เมื่อ orecein ละลายแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาเติมน้ำกลั่นลงไป 144 ml คนให้เข้ากัน แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การคำนวณหาปริมาณสารโคลชิซีนในสารสกัดเมล็ดดองดึง จาก peak ที่ได้จากเทคนิค HPLC โดยเปรียบเทียบกับสารโคลชิซีนสังเคราะห์

Area ตัวอย่างเฉลี่ย 2 ซ้ำ	=	(1588086 + 1539358) / 2	
	=	1563722	
Area Std. 719636 ใช้ความเข้มข้นโคลชิซีน	=	0.004	g/5ml
	=	0.8	mg/ml
Area Std. 1563722 ใช้ความเข้มข้นโคลชิซีน	=	1.74	mg/ml
แสดงว่า สารสกัด 1 ml มีความปริมาณโคลชิซีน	=	1.74	mg
ดังนั้น สารสกัด 20 ml มีความปริมาณโคลชิซีน	=	34.8	mg
สารสกัด 100 ml มีความเข้มข้นโคลชิซีน	=	0.174	% (w/v)
เมล็ดแห้งนำมาสกัด 5.66 g จะมีสารโคลชิซีน	=	34.8	mg
ถ้าเมล็ดแห้ง 100 g จะมีสารโคลชิซีน	=	0.62	% (w/w)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การหา LD_{50} โดยวิธีคำนวณจากสูตร regression

1. การหา LD_{50} ความเข้มข้นสารสกัดเมล็ดดองดึงที่แช่ยอดแตงโมเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

$$Y = \bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$$

$Y = 50$

X_{50} = ความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดดองดึงที่ LD_{50}

n = จำนวน treatment = 3

สารสกัดเมล็ดดองดึง(%) (x)	ความอยู่รอดเป็นเปอร์เซ็นต์ของ control (y)	xy
0	100	0
0.01	50	0.5
0.05	0	0

$\Sigma x = 0.06$

$\bar{x} = \frac{\Sigma x}{n} = \frac{0.06}{3}$

$\bar{x} = 0.02$

$\Sigma y = 150$

$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{n} = \frac{150}{3}$

$\bar{y} = 50$

$\Sigma xy = 0.5$

$\Sigma x^2 = 0.0026$

$\frac{(\Sigma x)^2}{n} = 0.0012$

$\Sigma X^2 = \Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}$

$= 0.0026 - 0.0012$

$\Sigma X^2 = 0.0014$

$\frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{n} = \frac{0.06 \times 150}{3}$

$= 3$

$\Sigma XY = \Sigma xy - \frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{n}$

$= 0.5 - 3$

$= -2.5$

$b = \frac{\Sigma XY}{\Sigma X^2}$

$= \frac{-2.5}{0.0014} = -1785.71$

จาก

$$Y = \bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$$

$50 = 50 - 1785.71(x_{50} - 0.02)$

$0 = -1785.71(x_{50} - 0.02)$

$0 = -1785.71x_{50} + 35.71$

$\frac{-35.71}{-1785.71} = x_{50}$

$x_{50} = 0.020$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังนั้นค่า LD_{50} ที่เวลา 12 ชั่วโมงมีความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดดองดึงเท่ากับ 0.020 เปอร์เซ็นต์

2. การหา LD_{50} ความเข้มข้นสารสกัดเมล็ดดองดึงที่แช่ยอดแตงโมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

$Y = \bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$

$Y = 50$

X_{50} = ความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดดองดึงที่ LD_{50}

n = จำนวน treatment = 3

สารสกัดเมล็ดดองดึง (%) (x)	ความอยู่รอดเป็นเปอร์เซ็นต์ ของcontrol (y)	xy
0	100	0
0.01	38.89	0.39
0.05	0	0

$\Sigma x = 0.06$ $\Sigma y = 138.89$ $\Sigma xy = 0.39$

$\bar{x} = \frac{\Sigma x}{n} = \frac{0.06}{3}$

$\bar{x} = 0.02$

$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{n} = \frac{138.89}{3}$

$\bar{y} = 46.30$

$\Sigma x^2 = 0.0026$

$\frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{n} = \frac{0.06 \times 138.89}{3} = 2.78$

$\frac{(\Sigma x)^2}{n} = 0.0012$

$\Sigma XY = \Sigma xy - \frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{n}$

$\Sigma X^2 = \Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}$

$= 0.39 - 2.78$

$= 0.0026 - 0.0012$

$= -2.39$

$\Sigma X^2 = 0.0014$

$b = \frac{\Sigma XY}{\Sigma X^2}$

$= \frac{-2.39}{0.0014} = -1707.14$

จาก

$Y = \bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$

$50 = 46.30 - 1707.14(x_{50} - 0.02)$

$50 - 46.30 = -1707.14(x_{50} - 0.02)$

$\frac{3.7}{-1707.14} = x_{50} - 0.02$

$-0.002 = x_{50} - 0.02$

$x_{50} = 0.02-0.002$

$x_{50} = 0.018$

ดังนั้นค่า LD_{50} ที่เวลา 24 ชั่วโมงมีความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดดองดึงเท่ากับ 0.018 เปอร์เซ็นต์

3. การหา LD_{50} ความเข้มข้นสารสกัดเมล็ดดองดึงที่แช่ยอดแตงโมเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

$Y = \bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$

$Y = 50$

X_{50} = ความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดดองดึงที่ LD_{50}

n = จำนวน treatment = 3

สารสกัดเมล็ดดองดึง(%) (x)	ความอยู่รอดเป็นเปอร์เซ็นต์ ของcontrol (y)	xy
0	100	0
0.01	18.75	0.19
0.05	0	0

$\Sigma x = 0.06$ $\Sigma y = 118.75$ $\Sigma xy = 0.19$

$\bar{x} = \frac{\Sigma x}{n} = \frac{0.06}{3}$

$\bar{x} = 0.02$

$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{n} = \frac{118.75}{3}$

$\bar{y} = 39.58$

$\Sigma x^2 = 0.0026$

$\frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{n} = \frac{0.06 \times 118.75}{3} = 2.38$

$\frac{(\Sigma x)^2}{n} = 0.0012$

$\Sigma XY = \Sigma xy - \frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{n}$

$\Sigma X^2 = \Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}$

$= 0.19-2.38$

$= 0.0026-0.0012$

$= - 2.19$

$\Sigma X^2 = 0.0014$

$b = \frac{\Sigma XY}{\Sigma X^2}$

$= \frac{-2.19}{0.0014} = -1564.29$

จาก

$Y = \bar{y} + b (x_{50} - \bar{x})$

$$50 = 39.58 - 1564.29(x_{50} - 0.02)$$

$$50 - 39.58 = -1564.29(x_{50} - 0.02)$$

$$\frac{10.42}{-1564.29} = x_{50} - 0.02$$

$$-0.007 = x_{50} - 0.02$$

$$x_{50} = 0.02 - 0.007$$

$$x_{50} = 0.013$$

ดังนั้นค่า LD_{50} ที่เวลา 36 ชั่วโมงมีความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดดองดึงเท่ากับ 0.013 เปอร์เซ็นต์

4. การหา LD_{50} ความเข้มข้นสารโคลชิซีนสังเคราะห์ที่แช่ยอดแตงโมเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

$$Y = \bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$$

$Y = 50$

X_{50} = ความเข้มข้นของสารโคลชิซีนสังเคราะห์ LD_{50}

n = จำนวน treatment = 3

สารโคลชิซีนสังเคราะห์(%) (x)	ความอยู่รอดเป็นเปอร์เซ็นต์ ของcontrol (y)	xy
0	100	0
0.01	57.89	0.58
0.05	26.32	1.32

$\Sigma x = 0.06$ $\Sigma y = 184.21$ $\Sigma xy = 1.9$

$$\bar{x} = \frac{\Sigma x}{n} = \frac{0.06}{3}$$

$\bar{x} = 0.02$

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{n} = \frac{184.21}{3}$$

$\bar{y} = 61.40$

$\Sigma x^2 = 0.0026$

$$\frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{n} = \frac{0.06 \times 184.21}{3} = 3.68$$

$$\frac{(\Sigma x)^2}{n} = 0.0012$$

$$\Sigma XY = \Sigma xy - \frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{n}$$

$$\Sigma X^2 = \Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}$$

$= 1.9 - 3.68$

$= 0.0026 - 0.0012$

$= -1.78$

$\Sigma X^2 = 0.0014$

$$b = \frac{\Sigma XY}{\Sigma X^2}$$

$= \frac{-1.78}{0.0014} = -1271.43$

จาก

$$Y = \bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$$

$$50 = 61.40 + 1271.43(x_{50} - 0.02)$$

$$-11.40 = -1271.43(x_{50} - 0.02)$$

$$\frac{-11.40}{-1271.43} = x_{50} - 0.02$$

$$0.009 = x_{50} - 0.02$$

$$x_{50} = 0.009 + 0.02$$

$$x_{50} = 0.029$$

ดังนั้นค่า LD_{50} ที่เวลา 12 ชั่วโมงมีความเข้มข้นของสารโคลชิซีนสังเคราะห์เท่ากับ 0.029 เปอร์เซ็นต์

5. การหา LD_{50} ความเข้มข้นสารโคลชิซีนสังเคราะห์ที่แช่ยอดแตงโมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

$$Y = \bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$$

$Y = 50$

X_{50} = ความเข้มข้นของสารโคลชิซีนสังเคราะห์ที่ LD_{50}

n = จำนวน treatment = 3

สารโคลชิซีนสังเคราะห์(%) (x)	ความอยู่รอดเป็นเปอร์เซ็นต์ ของcontrol (y)	xy
0	100	0
0.01	50	0.5
0.05	22.22	1.11

$\sum x = 0.06$ $\quad \sum y = 172.22$ $\quad \sum xy = 1.61$

$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} = \frac{0.06}{3}$

$\bar{x} = 0.02$

$\bar{y} = \frac{\sum y}{n} = \frac{172.22}{3}$

$\bar{y} = 57.41$

$\sum x^2 = 0.0026$

$\frac{(\sum x)^2}{n} = 0.0012$

$\sum X^2 = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$

$= 0.0026 - 0.0012$

$\frac{(\sum x)(\sum y)}{n} = \frac{0.06 \times 172.22}{3}$

$= 3.44$

$\sum XY = \sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}$

$= 1.61 - 3.44$

$= -1.83$

$\Sigma X^2 = 0.0014$ $\quad b = \frac{\Sigma XY}{\Sigma X^2}$

$= \frac{-1.83}{0.0014} = -1307.14$

จาก

$$Y = \bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$$

$$50 = 57.41 - 1307.14(x_{50} - 0.02)$$

$$50 - 57.41 = -1307.14(x_{50} - 0.02)$$

$$\frac{-7.41}{-1307.14} = x_{50} - 0.02$$

$$0.006 = x_{50} - 0.02$$

$$x_{50} = 0.006 + 0.02$$

$$x_{50} = 0.026$$

ดังนั้นค่า LD_{50} ที่เวลา 24 ชั่วโมงมีความเข้มข้นของสารโคลชิซีนสังเคราะห์เท่ากับ 0.026 เปอร์เซ็นต์

6. การหา LD_{50} ความเข้มข้นสารโคลชิซีนสังเคราะห์ที่แช่ยอดแตงโมเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

$$Y = \bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$$

$Y = 50$

X_{50} = ความเข้มข้นของสารโคลชิซีนสังเคราะห์ที่ LD_{50}

n = จำนวน treatment = 3

สารโคลชิซีนสังเคราะห์(%) (x)	ความอยู่รอดเป็นเปอร์เซ็นต์ ของcontrol (y)	xy
0	100	0
0.01	12.50	0.13
0.05	6.25	0.31

$\Sigma x = 0.06$ $\quad \Sigma y = 118.75$ $\quad \Sigma xy = 0.44$

$\bar{x} = \frac{\Sigma x}{n} = \frac{0.06}{3}$

$\bar{x} = 0.02$

$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{n} = \frac{118.75}{3}$

$\bar{y} = 39.58$

$\Sigma x^2 = 0.0026$

$\frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{n} = \frac{0.06 \times 118.75}{3}$

$= 2.38$

$\frac{(\sum x)^2}{n} = 0.0012$

$\sum X^2 = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$

$= 0.0026 - 0.0012$

$\sum X^2 = 0.0014$

$\sum XY = \sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}$

$= 0.44 - 2.38$

$= -1.94$

$b = \frac{\sum XY}{n}$

$= \frac{-1.94}{0.0014} = -13.85.71$

จาก

$$Y = \bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$$

$$50 = 39.58 - 1385.71(x_{50} - 0.02)$$

$$50 - 39.58 = -1385.71(x_{50} - 0.02)$$

$$\frac{-10.42}{-1385.71} = x_{50} - 0.02$$

$$-0.0075 = x_{50} - 0.02$$

$$x_{50} = 0.02 - 0.0075$$

$$x_{50} = 0.013$$

ดังนั้นค่า LD_{50} ที่เวลา 36 ชั่วโมงมีความเข้มข้นของสารโคลชิซีนสังเคราะห์เท่ากับ 0.013 เปอร์เซ็นต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ตารางแสดงความแปรปรวนของความสูงของต้นแตงโมที่แช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึง (ค่าเฉลี่ยจาก 360 ต้น)

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	8	787.614	98.452	114.50**
Time (A)	2	0.644	0.322	<1
Conc. (B)	2	774.921	387.461	450.61**
A x B	4	12.048	3.012	3.50**
Error	171	147.036	0.860	
Total	179	934.650		

CV = 32.2 %

CV ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation)

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 ตารางแสดงความแปรปรวนของความสูงของต้นแตงโมที่แช่ในสารละลายโคลชิซีนสังเคราะห์ (ค่าเฉลี่ย 360 ต้น)

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	8	18.824	2.353	4.71**
Time (A)	2	3.701	1.851	3.71*
Conc. (B)	2	14.339	7.169	14.35**
A x B	4	0.784	0.196	<1
Error	171	85.413	0.499	
Total	179	104.237		

CV = 21.6 %

CV ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation)

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะความสูงของต้นแตงโมที่เลี้ยงในหลอดทดลอง หลังจากแช่ในอาหารที่เติมสารสกัดเมล็ดดองดึงเปรียบเทียบกับสารโคลชิซีน สังเคราะห์ความเข้มข้นต่างๆ

SV	df.	SS	MS	F
Treatment	17	820.4015	3.5294	5.1926*
Col. Vs Crude extract	1	13.9635	13.9635	20.5436*
Within Col. Set	8	18.824	2.353	3.4177*
Time	2	3.701	1.8505	2.7225^{ns}
Conc.	2	14.339	7.1695	10.548*
Time ex Conc.	4	0.784	0.196	0.049^{ns}
Within Crude extract set	8	787.614	98.4518	144.8459*
Time	2	0.644	0.322	0.4737^{ns}
Conc.	2	774.921	387.4605	570.046*
Time ex Conc.	4	12.048	6.024	8.8627*
Error	342	232.4485	0.6797	
Total	359	1052.85		

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

ตารางที่ 14 ตารางแสดงความแปรปรวนของความกว้างของเซลล์คุมของต้นแตงโมที่แช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	5	0.000000082	0.00041	20.184*
TIME (A)	2	0.00027	0.000053	6.775*
Conc. (B)	1	0.0036	0.00036	91.341*
A X B	2	0.000000052	0.0000001	0.013
Error	114	0.0000039	0.00045	
Total	119	0.0000072		

CV = 0.48 %

CV ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation)

* มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 ตารางแสดงความแปรปรวนของความยาวของเซลล์คุมของต้นแตงโมที่แช่ในสารสารสกัดเมล็ดดองดึง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	5	0.00056	0.00011	22.823*
TIME (A)	2	0.00001	0.00051	1.032^{ns}
Conc. (B)	1	0.00053	0.00054	108.582*
A X B	2	0.000017	0.0000085	1.735^{ns}
Error	114	0.00056	0.0000049	
Total	119	0.0019	0.0000094	

CV = 0.46 %

CV ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation)

* มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 ตารางแสดงความแปรปรวนของจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของต้นแตงโมที่แช่ในสารสกัดเมล็ดดองดึง

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	5	229.100	45.820	8.144*
TIME (A)	2	30.26	15.10	2.684^{ns}
Conc. (B)	1	140.833	140.883	25.031*
A X B	2	58.067	29.033	5.160*
Error	114	641.400	5.626	
Total	115	870.500	7.315	

CV = 0.58 %

CV ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation)

* มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

^{ns} ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 ตารางแสดงความแปรปรวนของความกว้างของเซลล์คุมของต้นแตงโมที่แช่ในสารโคลชิซีนสังเคราะห์

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	8	0.0018	0.00023	1.1228^{ns}
TIME (A)	2	0.0003	0.00015	0.819^{ns}
Conc. (B)	2	0.00087	0.00044	2.350^{ns}
A X B	4	0.00064	0.00016	0.867^{ns}
Error	171	0.032	0.00018	
Total	175	0.033	0.00019	

CV = 0.76 %

CV ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation)

* มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

^{ns} ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 ตารางแสดงความแปรปรวนของความยาวของเซลล์คุมของต้นแตงโมที่แช่ในสารสารโคลชิซีนสังเคราะห์

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	8	.00042	0.000053	6.024*
TIME (A)	2	0.000054	0.000027	3.092*
Conc. (B)	2	0.00031	0.00015	17.446*
A X B	4	0.0000634	0.000016	1.779^{ns}
Error	171	0.0015	0.0000088	
Total	179	0.0019	0.000011	

CV = 0.32 %

CV ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation)

* มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 ตารางแสดงความแปรปรวนของจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของต้นแตงโมที่แช่ในสารโคลชิซีนสังเคราะห์

SV	DF	SS	MS	F
Treatment	8	332.911	41.614	7.779*
TIME (A)	2	23.644	11.822	2.210^{ns}
Conc. (B)	2	232.011	116.006	21.686*
A X B	4	332.911	41.614	7.779^{ns}
Error	171	914.750	5.349	
Total	129	1247.661	6.970	

CV = 0.53 %

CV ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation)

* มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

^{ns} ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวกนิษฐา คุ้มวณิชย์ เกิดวันที่ 21 พฤศจิกายน พ.ศ. 2494 ที่อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีการศึกษาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตประสานมิตร ในปีการศึกษา 2519 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2543 ปัจจุบันทำงานที่โรงเรียนราชินีบนกรุงเทพฯ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย