



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

พืชสวน

พืชสวน

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การชักนำบัควินให้กลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้รังสีแกมมาและสารโคลชิซิน

Induced Mutation of *In vitro* Rain Lily (*Zephyranthes* spp.) using Gamma Ray and Colchicine

นามผู้วิจัย นางสาวรัตนภรณ์ เกิดเจริญ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์เณมมาลย์ วงศ์ชาวจันทน์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ธัญญะ เตชะสีลพิทักษ์, วท.ม.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ไพรัช จอมพุก, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณัฐ พิชกรรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การชักนำบัควินให้กลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้รังสีแกมมาและสารโคลชิซิน

Induced Mutation of *In vitro* Rain Lily (*Zephyranthes* spp.)
using Gamma Ray and Colchicine

โดย

นางสาวรัตนาภรณ์ เกิดเจริญ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รัตนภรณ์ เกิดเจริญ 2555: การชักนำบัวดินให้กลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้รังสีแกมมาและสารโคลชิซิน ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาพืชสวน ภาควิชาพืชสวน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์เอนมาลย์ วงศ์ชาวจันท, Ph.D. 118 หน้า

ชักนำบัวดินสีชมพูดอกใหญ่ให้กลายพันธุ์โดยฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 0 ถึง 35 เกรย์ และแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 0 ถึง 72 ชั่วโมง ให้กับชิ้นส่วนผ่าครึ่งของหัวย่อยบัวดินที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในสภาพปลอดเชื้อพบว่า หลังฉายรังสีแล้ว 60 วัน เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นพืชลดลงเมื่อปริมาณรังสีและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินเพิ่มสูงขึ้น โดยพบว่าปริมาณรังสีและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินที่ทำให้ชิ้นพืชตายเป็นครึ่งหนึ่งของชุดควบคุม ($LD_{50(60d)}$) เท่ากับ 17.8 เกรย์ และ 50 ชั่วโมง ตามลำดับ จำนวนการสร้างหัวย่อยลดลงเมื่อปริมาณรังสีและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินเพิ่มสูงขึ้น เมื่อย้ายออกปลูกในแปลงทดลองแล้ว 2 เดือน ทำการศึกษาลักษณะที่ผิดปกติในใบ ดอกและอวัยวะสืบพันธุ์พบว่า เกิดการกลายของสีใบ 3 สี คือ แดงสีขาว แดงสีเขียวอ่อน และใบสีเงิน และพบลักษณะใบหยาบและหนาในต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินด้วย สำหรับดอกและอวัยวะสืบพันธุ์พบว่า มีจำนวนกลีบดอกและเกสรเพศผู้เปลี่ยนแปลง เกสรเพศผู้เชื่อมติดกับกลีบดอก ยอดเกสรเพศเมียมี 4 แฉก และมีสีขาว ทั้งนี้ ลักษณะผิดปกติต่างๆ เป็นลักษณะที่ไม่คงตัว ยกเว้นลักษณะใบสีเงินในต้นที่ได้รับรังสี 15 เกรย์ ซึ่งสามารถถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมได้ ศึกษาขนาดเซลล์ปากใบและจำนวนโครโมโซมจากปลายรากในต้นที่มีลักษณะใบหยาบและหนาของต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินพบว่า ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 24 ชั่วโมง มีความยาวเซลล์ปากใบเฉลี่ยเท่ากับ 101.58 ไมโครเมตร ซึ่งมากกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินถึง 2 เท่า และศึกษาจำนวนโครโมโซมพบว่า ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง มีจำนวนโครโมโซมเป็น mixoploid ทุกต้น โดยพบจำนวนโครโมโซม 4 แบบ ในต้นเดียวกันคือ $2n = 2x = 48$ $2n = 4x = 96$ $2n = 6x = 144$ และ $2n = 7x + 8$ จากการวิจัยครั้งนี้ พบวิธีการที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในบัวดิน คือ โดยการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 15 เกรย์ ให้กับหัวผ่าครึ่งที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และการแช่หัวผ่าครึ่งในอาหารเหลวที่มีสารโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

Rattanabhorn Ketcharoen 2012: Induced Mutation of *In vitro* Rain Lily (*Zephyranthes* spp.) using Gamma Ray and Colchicine. Master of Science (Agriculture), Major Field: Horticulture, Department of Horticulture. Thesis Advisor: Miss Shermarl Wongchaochant, Ph.D. 118 pages.

Induced mutation of *in vitro* *Zephyranthes* spp. was performed. The explants cultured in MS media were acutely irradiated with gamma ray at 0 to 35 gray and concentration of colchicine (400 ppm) for 0 to 72 hours. Sixty days after irradiation and colchicine treatment, the survival percentage of explants decreased when the irradiation doses and periods in colchicine treatment were increased. The calculated $LD_{50(60d)}$ for the acute irradiation and colchicine treatment was 17.8 Gy and 50 hr, respectively. Two months after transplanting experiment field, the abnormal morphological characteristics of leaves and flowers were observed. The results revealed that irradiated plants produced leaf color mutation to white straps, light green straps and silver leaves. The colchicine treated plants produced light green leaves, rough and thick leaves. The irradiation and colchicine treatments could change number of petals, number of stamens, combine stamen to petal, change number of the stigma lobes and white stigmas. The mutant leaves and flowers were unstable characteristics. However, silver leaves of in plant treated with 15 gray could happend in new leaves. The stomata size and chromosome number form root tips of colchicine treated plants, which showed rough and thick leaves, were observed. The stomata sizes of the plant treated with colchicine for 24 hr had the average stomata length 101.58 μm that larger than normal size for two times. The mixoploid plants were found in colchicine treatment for 6, 12, 24 and 48 hr. The chromosome number of mixoploid plants had 4 patterns e.g. $2n = 2x = 48$, $2n = 4x = 96$, $2n = 6x = 144$ and $2n = 7x + 8$. The results of this research showed that the optimum gamma ray doses for induced mutation of *Zephyranthes* spp. was using 15 gray of gamma ray to *in vitro* bulbs. And conditions of colchicine treatment was soaking bulbs in 400 mg/l colchicine solution for 24 hr.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. เฉลิมลาภ วังษ์ชาวจันทน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ รัชฎะ เดชะสีลพิทักษ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ พิรุณ จอมพุก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาในการเรียนแนะนำแนวทางในการวางแผนและดำเนินการทดลอง ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอกราบพระคุณ รองศาสตราจารย์ จิตราพรณ เทียมปโยธร ผู้ทรงคุณวุฒิซึ่งเป็นผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย และอาจารย์ อัมมัญญา มงคลชัยฤกษ์ ประธานการสอบ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. อรุมา เพี้ยซ้าย ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษา และความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการทดลอง ขอขอบคุณภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำการทดลองตลอดจนเครื่องมือต่างๆ สำหรับใช้ในการทดลอง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ดูแลแปลงทดลอง ภาควิชาพืชสวน ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำงานทดลอง ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ และคุณบุญทริกา นันทา ที่ได้ให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในเรื่องการเรียน การทำงานทดลอง และการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทั้งนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องทุกคนที่ได้อบรม ให้กำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกๆ เรื่องตลอดมา

รัตนภรณ์ เกิดเจริญ

กันยายน 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	19
อุปกรณ์	19
วิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	31
ผล	31
วิจารณ์	93
สรุปและข้อเสนอแนะ	103
สรุป	103
ข้อเสนอแนะ	104
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	105
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	118

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเทียบกับชุดควบคุมของหัวฝักรังของบัวดินหลังได้รับรังสีแกมมาแล้ว 60 วัน ที่ปริมาณรังสี 0 10 15 20 25 30 และ 35 เกรย์ 31
2	จำนวนหัวย่อยรุ่น M_1V_2 ของบัวดินหลังได้รับรังสีแกมมาแล้ว 60 วัน ที่ปริมาณรังสี 0 10 15 20 25 และ 30 เกรย์ 33
3	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ย จำนวนใบต่อหัวเฉลี่ย และความยาวใบต่อหัวเฉลี่ยของบัวดินรุ่น M_1V_2 หลังได้รับรังสีแกมมาแล้ว 60 วัน ที่ปริมาณรังสี 0 10 15 และ 20 เกรย์ 35
4	จำนวนหัวย่อยรุ่น M_1V_2 ฝักรังทั้งหมด จำนวนหัวย่อยรุ่น M_1V_3 เฉลี่ย และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยของบัวดินรุ่น M_1V_3 หลังเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 เดือน 38
5	จำนวนหัวย่อยที่ผิดปกติ เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ และลักษณะที่ผิดปกติของบัวดินรุ่น M_1V_3 หลังเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 เดือน 40
6	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์) และความสูงหัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์) ของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมา หลังออกปลูกแล้ว 2 เดือน 47
7	การเจริญเติบโตของใบและรากของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมา หลังออกปลูกแล้ว 2 เดือน 48
8	การออกดอกของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมาภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูก 50
9	ลักษณะและจำนวนต้นที่มีใบผิดปกติของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมา หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน 52
10	ลักษณะผิดปกติของเกสรเพศเมีย และเกสรเพศผู้ของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมาภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูก 55
11	ลักษณะผิดปกติของดอกบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมา ภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูก 56
12	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเทียบกับชุดควบคุมของหัวฝักรังของบัวดินหลังแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 60 วัน 61

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
13 จำนวนหัวย้อยรุ่น M_1V_2 ของบัวดินหลังแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 60 วัน	63
14 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ย จำนวนใบต่อหัวเฉลี่ย และความยาวใบต่อหัวเฉลี่ย ของบัวดินรุ่น M_1V_2 หลังแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 60 วัน	65
15 จำนวนหัวย้อยรุ่น M_1V_2 ผ่าครึ่งทั้งหมด จำนวนหัวย้อยรุ่น M_1V_3 เฉลี่ย และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยของบัวดินรุ่น M_1V_3 หลังได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 60 วัน	67
16 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์) และความสูงหัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์) ของบัวดินรุ่น M_1V_2 หลังออกปลูกแล้ว 2 เดือน	71
17 การเจริญเติบโตของใบและรากของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน หลังออกปลูกแล้ว 2 เดือน	72
18 การออกดอกของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูก	74
19 ลักษณะและจำนวนต้นที่มีใบผิดปกติของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน	77
20 ลักษณะผิดปกติของเกสรเพศเมียและเกสรเพศผู้ของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง ภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูก	78
21 ลักษณะผิดปกติของดอกบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง ภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูก	79
22 จำนวนใบ ความยาวใบเฉลี่ย ความกว้างใบเฉลี่ย และความหนาใบเฉลี่ย ของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินหลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน	86
23 จำนวนปากใบเฉลี่ยต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร และความยาวเซลล์ปากใบเฉลี่ย ของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินหลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน	88

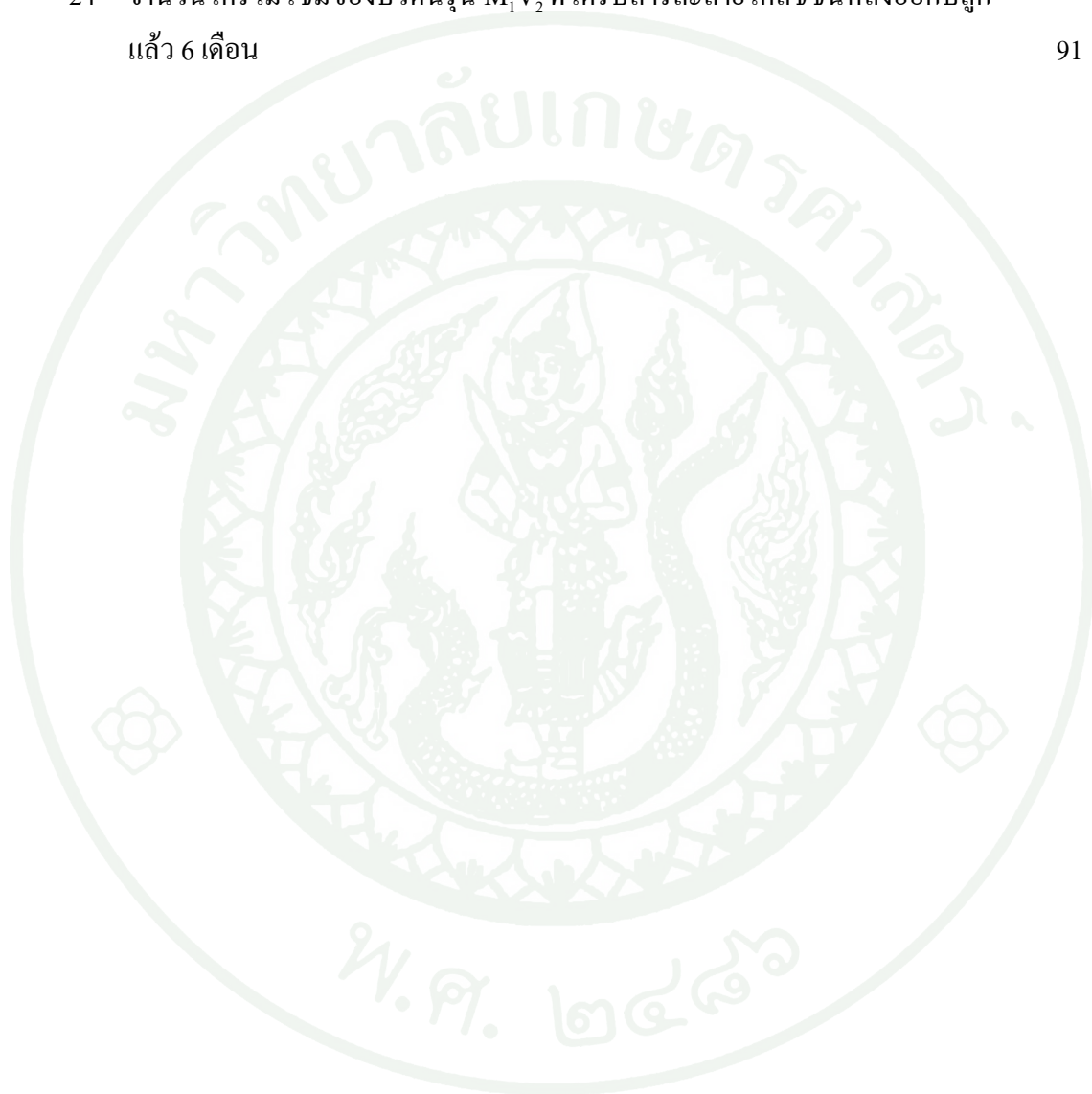
สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่

หน้า

- 24 จำนวนโครโมโซมของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินหลังออกปลูก
แล้ว 6 เดือน

91



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและค่า $LD_{50(60d)}$ ของหัวฝาค้างของบัวดินหลังได้รับรังสีแกมมาแล้ว 60 วัน ที่ปริมาณรังสี 0 10 15 20 25 30 และ 35 เกรย์	32
2 เปอร์เซ็นต์การสร้างหัวย่อยและค่า $GR_{50(60d)}$ ของหัวฝาค้างของบัวดินหลังได้รับรังสีแกมมาแล้ว 60 วัน ที่ปริมาณ 0 10 15 20 25 และ 30 เกรย์	33
3 เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตต่างๆ ของบัวดินรุ่น M_1V_2 หลังได้รับรังสีแกมมาแล้ว 60 วัน ในปริมาณรังสี 0 10 15 20 25 และ 30 เกรย์	36
4 ลักษณะผิดปกติของขนาดกอในบัวดินรุ่น M_1V_3 ที่ได้รับรังสีแกมมาในสภาพปลอดเชื้อ	41
5 ลักษณะผิดปกติของบัวดินรุ่น M_1V_3 ที่ได้รับรังสีแกมมาในสภาพปลอดเชื้อ	42
6 ลักษณะผิดปกติของโคนกาบใบและแผ่นใบของบัวดินรุ่น M_1V_3 ที่ได้รับรังสีแกมมาในสภาพปลอดเชื้อ	43
7 ลักษณะผิดปกติของแผ่นใบของบัวดินรุ่น M_1V_3 ที่ได้รับรังสีแกมมาในสภาพปลอดเชื้อ	44
8 ลักษณะการกลายของสีใบของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมาหลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน	53
9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนไปของยอดเกสรเพศเมียในบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมา	57
10 จำนวนเกสรเพศผู้ที่เปลี่ยนไปของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมา	58
11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปของดอกบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณ 10 เกรย์	59
12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปของดอกบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณ 20 และ 25 เกรย์	60
13 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและค่า $LD_{50(60d)}$ ของหัวฝาค้างหลังได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง หลังเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว 60 วัน	62
14 เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตต่างๆ ของบัวดินรุ่น M_1V_2 หลังแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 60 วัน	65

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	ลักษณะหัวและใบของบัวดินรุ่น M_1V_3 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพปลอดเชื้อ	67
16	ลักษณะการกลายของใบของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน	80
17	ลักษณะการกลายของใบของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน	81
18	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนไปของยอดเกสรเพศเมียในบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน	82
19	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนไปของเกสรเพศผู้ในบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน	83
20	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปของดอกบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน	84
21	เซลล์ปากใบของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน	89
22	โครโมโซมจากปลายรากของบัวดินรุ่น M_1V_2 หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน	92
23	ภาพจำลองภาพตัดขวางของชั้นเซลล์กลายและชั้นเซลล์ปกติในใบของต้นบัวดิน	97

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

$LD_{(50)}$	=	50% Lethal Dose
$GR_{(50)}$	=	50% Growth Reduction
CRD	=	Completely Randomized Design
ppm	=	Parts per million
$LD_{50(60d)}$	=	ปริมาณรังสีแกมมาและระยะเวลาในการแผ่สารละลายโคลชิซินที่ทำให้หัวฝักร้างตาย เป็นครึ่งหนึ่งของชุดควบคุมหลังเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อแล้ว 60 วัน
BA	=	Benzyladine
NAA	=	Naphthaleneacetic acid
IBA	=	Indole - 3 - butyric acid
2, 4 - D	=	2, 4 - Dichlorophenoxyacetic acid
MS	=	Murashige and Skoog medium
M_1V_1	=	ส่วนหัวบัวดินฝักร้างที่ได้รับรังสีแกมมาและสารละลายโคลชิซิน
M_1V_2	=	หัวย่อยของบัวดินที่เกิดจากส่วนหัวฝักร้าง (M_1V_1) ที่ได้รับรังสีแกมมาและสารละลาย โคลชิซิน
M_1V_3	=	หัวย่อยของบัวดินที่เกิดจากหัวย่อยรุ่น M_1V_2

การชักนำบัวดินให้กลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้รังสีแกมมาและสารโคลชิซิน

Induced Mutation of *In vitro* Rain Lily (*Zephyranthes* spp.) using Gamma Ray and Colchicine

คำนำ

บัวดินเป็นไม้ดอกประเภทหัวที่มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้ง ปลูกเลี้ยงง่าย และมีดอกสวยงาม ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการนำบัวดินมาใช้ประโยชน์ในด้านการจัดสวนโดยใช้เป็นไม้คลุมดิน ในปัจจุบันมีบัวดินขายเป็นไม้กระถางประดับ แต่เนื่องจากบัวดินเป็นพืชที่ขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ บัวดินจึงมีสีดอกและลักษณะใบที่ไม่หลากหลาย ดังนั้นควรมีการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์บัวดินเพื่อให้มีลักษณะดอกและใบต่างไปจากที่มีอยู่เดิม เพื่อเพิ่มทางเลือกให้แก่ผู้ซื้อและเพื่อผลักดันให้บัวดินเป็นไม้ดอกกระถางที่ได้รับความนิยม การปรับปรุงพันธุ์บัวดินที่ผ่านมาเป็นการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมข้าม ลูกผสมที่ได้มีลักษณะของสีดอกจัดอยู่ในโทนสีชมพูและสีเหลือง มีบ้างที่ลูกผสมที่ได้มีสีดอกโดดเด่นต่างจากพ่อแม่ ซึ่งมีโอกาสพบน้อย เช่น *Zephyranthes* 'Paul Niemi' ลูกผสมของ *Z. grandiflora* (ดอกสีชมพู) กับ *Z. citrina* (ดอกสีเหลืองเข้ม) กลีบดอกมีสีคล้ายลูกพีชและบริเวณกลางดอกมีสีเหลือง ซึ่งปรับปรุงพันธุ์โดย Fadjar Marta ประเทศอินโดนีเซีย (Pacific bulb society, 2011) เพื่อให้เกิดลักษณะที่แตกต่างจากการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมข้าม จึงควรใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการอื่น ประกอบกับการติดเมล็ดของบัวดินนั้นค่อนข้างน้อย ประมาณ 10 เมล็ดต่อฝัก และการติดเมล็ดจะลดลงเมื่อเกิดการผสมข้าม การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสีและการใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ประสบความสำเร็จในการนำมาใช้เป็นวิธีการในการปรับปรุงพันธุ์พืชหลายชนิด โดยเฉพาะการใช้เพื่อปรับปรุงพันธุ์ในไม้ดอกประเภทหัวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น แกลดิโอลัส ไฮยาซิน ไอริส นาซีซัส และวานิลีทิส เป็นต้น วิธีการนี้จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะสามารถนำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์บัวดินได้ และด้วยลักษณะนิสัยของบัวดินซึ่งเป็นไม้หัว หัวที่เพาะจากเมล็ดจะพร้อมออกดอกเมื่อหัวมีอายุ 2 - 3 ปี ซึ่งทำให้ต้องใช้ระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ ดังนั้น จึงใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมด้วย เพื่อช่วยร่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้พันธุ์ใหม่เร็วขึ้น โดยบัวดินจะสามารถออกดอกเมื่อหัวมีอายุเพียง 8 - 12 เดือน

วัตถุประสงค์

1. หาวิธีการที่เหมาะสมต่อการชักนำบัวดินให้กลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้รังสีแกมมาและสารโคลชิซิน
2. เพื่อให้ได้ลักษณะใหม่จากการกลายพันธุ์ของต้นบัวดิน



การตรวจเอกสาร

Zephyranthes Herb. (Zeff er an thez) เป็นคำที่มาจากภาษากรีกของคำว่า Zephyros (west wind) รวมกับ anthos (flower) ซึ่งแปลว่าดอกไม้แห่งลมตะวันตก *Zephyranthes* มีมากกว่า 70 ชนิด มีชื่อสามัญหลายชื่อ คือ Raindrops, Rain lily, Zephyr lily, Fairy lily, Atamasco lily, Crocus lily, Flower - of - the - west - wind, Peruvian swamp และ Swamp lily (Bryan, 1989, 2002) และมีชื่อเรียกในภาษาไทยว่า บัวสวรรค์ บัวดิน บัวฝรั่ง และบัวจีน (กันยารัตน์, 2532)

ลักษณะทั่วไปของพืชสกุล *Zephyranthes*

เป็นพืชพื้นเมืองของอเมริกา เม็กซิโก โคลัมเบีย กัวเตมาลา และอยู่ทางทิศตะวันออกเฉียงใต้ของสหรัฐอเมริกา เจริญเติบโตได้ดีในบริเวณที่ชื้นแฉะ (Bryan, 1989, 2002) เป็นพืชล้มลุกที่มีอายุยืน ลำต้นใต้ดินเป็นหัวที่มีเยื่อบางๆ คลุมอยู่และลอกออกได้ (tunicate bulb) บางชนิดเป็นหัวแข็ง (hardy) หรือค่อนข้างแข็ง (half - hardy) ขนาดของหัวแตกต่างกันแล้วแต่ชนิด มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.6 - 4.1 เซนติเมตร (กันยารัตน์, 2532)

หัวเป็นแบบ tunicate bulb (Bailey, 1993) รูปร่างค่อนข้างกลมประกอบด้วยฐานหัวที่มีโคนของก้านใบเปลี่ยนรูปเกาะติดอยู่ โคนก้านใบนี้อยู่ซ้อนกันเป็นชั้นๆ มีลักษณะคล้ายกาบใบชื่อเรียกว่ากาบหัว (bulb scale) กาบหัวมีลักษณะอวบน้ำ เฉพาะกาบหัวที่อยู่ด้านนอกมีลักษณะเป็นแผ่นแห้งสีน้ำตาล (Bryan, 2003) ลำต้นเทียม (pseudostem) เป็นส่วนเหนือดินประกอบด้วยโคนใบห่อซ้อนกันแน่นมีลักษณะคล้ายลำต้น ส่วนลำต้นจริง (true stem) เป็นลำต้นที่เปลี่ยนรูปไปเป็นฐานหัว (basal plate) ประกอบด้วยปล้องที่มีลักษณะสั้นและถี่ซ้อนกันอยู่เป็นชั้นๆ มีลักษณะเบ้าออกทางด้านข้าง ฐานหัวเป็นส่วนที่อยู่ใต้ดิน (Hertogh, 1993) ใบ (leaf) มีรูปร่างเป็นแถบ (strap - shaped) หรือเป็นเส้นแคบๆ (linear) ปลายใบมน (obtus) ขอบใบขนาน และมักจะทิ้งใบไปพร้อมกับดอกที่ตายและงอกขึ้นมาใหม่ในฤดูถัดไป แต่มีบางชนิดที่ใบเขียวตลอดทั้งปีไม่ทิ้งใบ (Bryan, 2002)

ดอกเป็นดอกช่อ (inflorescence) แต่เจริญเพียง 1 ดอกในช่อดอก ก้านช่อดอก (scape) มีลักษณะเรียวยาวและกลวง เจริญขึ้นมาจากหัวในดินโดยไม่มีใบติด กาบหุ้มช่อดอก (spathe) เป็นแผ่นบางโปร่งแสง มีแผ่นเดือยติดอยู่ที่ปลายของก้านดอกย่อย (pedicel) ปลายของกาบหุ้มช่อดอกอาจติดกันเป็นแผ่นหรือแยกเป็นสองแฉก (bifid) (กันยารัตน์, 2532) ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ (bisexual flower) ลักษณะดอกเป็นรูปกรวย (funnel form) โคนกลีบดอกรวมติดกันเป็นวง ซึ่งมี

ขนาดสั้นหรือยาวแล้วแต่ชนิด ส่วนปลายของวงแยกเป็นกลีบๆ เรียกว่า perianth - segment มีจำนวน 6 อัน หรือมากกว่า 6 อัน ดอกมีหลายสี เช่น ขาว เหลือง และชมพู เป็นต้น (กันยารัตน์, 2532; Brickell, 1989; Griffiths, 1992 และ Bryan, 2002) กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีสีเดียวกัน ดอกออกในฤดูฝนบาน 1 - 2 วัน แล้วแต่ชนิด มีเกสรเพศผู้ (stamen) 6 อัน อาจมีลักษณะ 3 อัน ยาวสลับกับ 3 อันสั้น หรือยาวเท่ากันทั้ง 6 อัน (Byran, 2002) ก้านชูเกสรเพศผู้ (filament) ตั้งตรงหรือโค้งไปข้างหน้าเล็กน้อยเชื่อมติดอยู่กับกลีบดอกชั้นในบริเวณคอหลอด (throat) หรือที่โคนของชั้นกลีบดอก ปลายก้านชูอับเรณูติดอยู่กลางอับเรณู (versatile) ทำให้อับเรณูเคลื่อนไหวได้รอบทิศทาง อับเรณูมีรูปร่างยาวเรียว มีเกสรเพศเมีย (pistil) 1 อัน รังไข่อยู่ใต้วงกลีบรวม (inferior ovary) มี 3 คาร์เพล (carpel) ภายในรังไข่มีออวูล (ovule) จำนวนมาก ก้านเกสรเพศเมียเป็นท่อยาว (style) และโค้ง ยอดเกสรเพศเมียมีลักษณะเป็นแฉก 3 แฉก (trifid) หรือเป็นปุ่ม (notch of capitate stigma)

ผล (fruit) เป็นผลแบบผลแห้งแตก (capsule) แบ่งเป็น 3 ช่อง (locule) เปลือก (pericarp) ก่อนข้างเกลี้ยง เมื่อผลแก่เปลือกแห้งและแตกตามแนวกลางของแต่ละห้อง (loculicidal) เมล็ดแบน เมื่อแก่เมล็ดมีสีดำมีจำนวนมากอัดแน่นอยู่ในผล (กันยารัตน์, 2532)

ลักษณะของบัวดินบางชนิด

เนื่องจากบัวดินเป็นพืชที่มีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วไปในแทบทุกทวีป (Byran, 1989) จึงได้มีการศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ของบัวดินบางชนิด ดังนี้

Zephyranthes grandiflora Lindl. มีจำนวนโครโมโซม $2n = 24$ (Felix et al., 2011b) 36 และ 48 (กันยารัตน์, 2532 และ Felix et al., 2011c) เป็นพืชพื้นเมืองของเม็กซิโก กัวเตมาลา และแอฟริกาใต้ (Bryan, 2002) ชื่อไทยเรียกว่า “แสนพันล้อม” หัวเป็นรูปไข่ (ovate) หรือรูปกลม (globose) ฐานหัวมีสีแดง มีเส้นผ่านศูนย์กลางหัว 2.4 - 3.2 เซนติเมตร ใบยาว 29.6 - 35.8 เซนติเมตร กว้าง 0.5 - 0.7 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาวเกือบเท่ากับใบ ใบหุ้มช่อดอกยาว 2.7 - 4.5 เซนติเมตร (กันยารัตน์, 2532 และ Bryan, 2002) ปลายใบหุ้มช่อดอกแยกเป็น 2 แฉก กลีบดอกรวมยาว 5.5 - 6.7 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางดอกเมื่อบานเต็มที่ 6.2 - 7.4 เซนติเมตร ปลายกลีบดอกมนหรือกลม (obtus) การเรียงตัวของกลีบดอกดูจะเกยซ้อนกันโดยกลีบในสุดจะถูกเกยทับทั้งสองด้าน และกลีบนอกสุดจะเกยซ้อนทับกลีบข้างเคียงทั้งสองข้าง (imbricate) กลีบดอกมีสีชมพู ยอดเกสรเพศเมียแยกเป็น 3 แฉกลึกชัดเจน (กันยารัตน์, 2532) ก้านชูเกสรเพศเมียยาวกว่าก้านชูอับเรณู (Bryan, 2002)

Z. rosea Lindl. มีจำนวนโครโมโซม $2n = 24$ (กันยารัตน์, 2532 และ Felix *et al.*, 2011b, c) เป็นพืชพื้นเมืองของกัวเตมาลาและคิวบา (Bryan, 2002) มีเส้นผ่านศูนย์กลางหัว 1.6 - 2.3 เซนติเมตร แรกหน่อง่าย ใบหุ้มช่อดอกสั้นกว่าก้านดอกย่อยประมาณ 1.6 - 2.1 เซนติเมตร ปลายใบหุ้มช่อดอกแยกเป็น 2 แฉก ดอกสีชมพู เส้นผ่านศูนย์กลางดอกบานเมื่อบานเต็มที่ 2.9 - 4.5 เซนติเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า *Z. grandiflora* ยอดเกสรเพศเมียมีสีชมพูหรือสีขาว แยกเป็น 3 แฉกลึก ก้านชูเกสรเพศผู้มีความยาวเท่ากันทั้ง 6 อัน (กันยารัตน์, 2532) ก้านชูเกสรเพศเมียยาวกว่าก้านชูอับเรณู (Bryan, 2002)

Z. candida Herb. มีจำนวนโครโมโซม $2n = 38$ (Felix *et al.*, 2011c) และ 42 เป็นพืชพื้นเมืองของอาร์เจนตินาและเอกวาดอร์ มีชื่อสามัญว่า fairy lily, rian lily ชื่อภาษาไทยเรียกว่า “หอมคำ” มีเส้นผ่านศูนย์กลางหัว 2 - 3 เซนติเมตร (กันยารัตน์, 2532) ใบ มีลักษณะแคบเล็ก เรียว ยาว 24 - 30 เซนติเมตร ดอกมีสีขาว บางครั้งโคนดอกมีสีชมพูหรือสีเขียวยาว (Bryan, 1989) ปลายกลีบดอกมนหรือค่อนข้างแหลม เมื่อดอกบานเต็มที่ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 - 4 เซนติเมตร กลีบดอกยาว 4 - 5 เซนติเมตร กว้าง 1.0 - 1.4 เซนติเมตร โคนก้านช่อดอกมีสีเขียวอ่อน ยาว 20 - 25 เซนติเมตร กว้าง 0.3 - 0.4 เซนติเมตร ใบหุ้มช่อดอกยาว 2 - 2.5 เซนติเมตร มีเกสรเพศผู้ 6 อัน ยาว 3 อัน สั้น 3 อัน ยอดเกสรเพศเมียมีลักษณะแยกเป็น 3 แฉกตื้นๆ ก้านชูเกสรเพศเมียยาวกว่าก้านชูอับเรณู (กันยารัตน์, 2532)

Z. citrina Baker มีจำนวนโครโมโซม $2n = 48$ (กันยารัตน์, 2532) เป็นพื้นเมืองของคิวบาและปานามา (Carnivali *et al.*, 2010) ชื่อภาษาไทยเรียกว่า “พระยาหัวเดียว” หัวมีขนาดใหญ่ แรกหน่อง่าย (กันยารัตน์, 2532) หัวค่อนข้างกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 - 3 เซนติเมตร และมีความสูงหัว 2 - 3.5 เซนติเมตร กาบหัวชั้นนอกสุด (tunics) มีสีน้ำตาลเข้ม ใบสีเขียวมีลักษณะกลมเป็นเส้น ยาว 10 - 30 เซนติเมตร กว้าง 0.2-0.5 เซนติเมตร ปลายใบมน (กันยารัตน์, 2532 และ Carnivali *et al.*, 2010) ดอกสีเหลืองเข้ม เส้นผ่านศูนย์กลางดอกเมื่อดอกบานเต็มที่ 2.4 - 3.2 เซนติเมตร ใบหุ้มช่อดอกเป็นแผ่นเดียว ปลายใบแหลมและสั้นกว่าก้านดอกย่อย (กันยารัตน์, 2532) ก้านช่อดอกยาว 30 เซนติเมตร ก้านดอกกลวง ก้านชูเกสรเพศเมียสั้นกว่าก้านชูอับเรณู (Bryan, 2002) ผล มีรูปร่างกลม แบ่งออกเป็น 3 ช่อง ยาว 0.6 - 1.2 เซนติเมตร เมล็ด ลีบแบนเป็นรูปครึ่งวงกลมหรือพระจันทร์เสี้ยว สีดำนสนิท ยาว 0.3 - 0.5 เซนติเมตร (Carnivali *et al.*, 2010)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ดอกประเภทหัวในวงศ์ Amaryllidaceae และวงศ์ใกล้เคียง

จิตาภา (2538) ศึกษาการเพิ่มปริมาณหัวย่อยของว่านแสงอาทิตย์ (*Haemanthus multiflorus*) ออনিโธกาลัม (*Ornithogalum thyrsoides*) ไลคอรিস (*Lycoris hybrid*) บัวดิน (*Zephyranthes*

grandiflora) ว่านมหาลาภ (*Eucrosia bicolor*) และว่านนางคุ้ม (*Eurycle amboinensis*) โดยเฉพาะเลี้ยงฐานหัวในสภาพปลอดเชื้อพบว่า BA สามารถชักนำให้เกิดหัวย่อยได้ดีกว่าการเติมไคนนิน โดยในว่านแสงอาทิตย์ สามารถเกิดหัวย่อยได้ดีที่สุดเมื่อเติม BA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร อนิโซกาลัม และไคคอรินเกิดหัวย่อยได้ดีที่สุดเมื่อเติม BA 9 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อนำหัวย่อยที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA IBA และ 2, 4 - D ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี IBA (ทุกระดับความเข้มข้น) อย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดรากได้หลังจากเลี้ยงหัวย่อยเป็นเวลา 1 เดือน

นิรันดร์ และคณะ (2543) เปรียบเทียบการเจริญและเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนฐานต้นและกลีบหัวของหอมหัวใหญ่พันธุ์ Granex 33 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ พบว่าสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนฐานต้นเกิด compact callus ได้เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม 2, 4 - dichlorophenoxy acetic acid (2, 4 - D) ความเข้มข้นระหว่าง 1.0 - 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่ดัดแปลงโดยเติม 3, 6 - dichloro - o - anisic acid (Dicamba) ความเข้มข้น 3.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในเวลา 6 สัปดาห์ และสามารถชักนำให้เกิดเอมบริอยด์จากแคลลัสซึ่งเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4 - D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายลงอาหารสูตร MS ที่มี indole - 3 - acetic acid (IAA) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 6 - benzylamino - purine (BAP) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในเวลา 15 สัปดาห์ และเจริญเติบโตเป็นต้นหลังจากย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในเวลา 8 สัปดาห์ ส่วนเนื้อเยื่อกลีบหัวนั้นสามารถชักนำให้เกิดเพียง friable callus ซึ่งไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ด้วยสูตรอาหารดังกล่าว

Smith *et al.* (1999) ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในการขยายพันธุ์ลูกผสม *Hippesatrum* spp. cv. San Antonio Rose และ *Zephyranthes* sp. ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเติม Plant Preservative Mixture (PPM, Plant Cell Technology, Inc., Washington, DC) ที่ปริมาณต่างกันในการเหลวสูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962) ดัดแปลง เลี้ยงส่วนของใบ ราก กาบใบชั้นในของ San Antonio Rose พบว่าในทุกทริตเมนต์สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยในทริตเมนต์ที่เติมสารละลาย PPM 15 มิลลิตร และเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 6 24 และ 36 ชั่วโมง และในทริตเมนต์ที่เติมสารละลาย PPM 30 มิลลิตร และเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 36 ชั่วโมง สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดของ *Zephyranthes* sp. ในสภาพปลอดเชื้อพบว่า เมื่อดำเมล็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น

ที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และเมล็ดสามารถงอกได้เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

Ulrich *et al.* (1999) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณหัวปลีปลิง (*Crinum* 'Ellen Bosanquet') ในสภาพปลอดเชื้อ เตรียมชิ้นส่วนพืชโดยฟอกหัวที่ผาครึ่งและมีส่วนฐานติดอยู่ด้วย hypochlorite ความเข้มข้น 0.525 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และตัดชิ้นพืชให้เหลือกาบใบ 3 กาบ ซึ่งยังติดอยู่กับส่วนฐาน (tri - scales) เพื่อใช้ในการทดลอง แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 2 ชนิด คือ benzyladenine (BA) 4 ความเข้มข้นร่วมกับ naphthaleneacetic acid (NAA) 4 ความเข้มข้น พบว่าอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 22.2 μM เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 2.1 ยอดต่อชิ้นพืช การทดลองที่ 2 ชักนำให้เกิดการสร้างหัวในสภาพมีดินอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช พบว่าหัวที่ได้มีลักษณะลีบเล็กติดอยู่กับส่วนฐาน การทดลองที่ 3 เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารที่เติม BA 4 ความเข้มข้น เป็นเวลา 4 เดือน จากนั้นย้ายลงบนอาหารกึ่งแข็งที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 35.5 μM สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 8.4 ยอด และพัฒนาไปเป็นหัวใหม่ได้มากที่สุดเฉลี่ย 2.8 หัว

Morán *et al.* (2003) ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ *Cyrtanthus clavatus* และ *C. spiralis* ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าเมื่อเลี้ยง twin - scales ของพืชทั้ง 2 ชนิดในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด และเมื่อย้ายลงอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 60 และ 90 กรัมต่อลิตร พบว่ายอดและหัวสามารถพัฒนาได้ดี และรากมีการพัฒนาได้ดีในอาหารที่เติมน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร

การกลายพันธุ์ของพืช

การกลายหรือการกลายพันธุ์ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงทุกชนิดที่เกิดขึ้นกับสารพันธุกรรม (genetic material) หรือดีเอ็นเอ (DNA: deoxy nucleic acid) ในเซลล์ ซึ่งไม่ได้เกิดจากการรวมตัว (recombination) หรือการแยกตัว (segregation) ของสารพันธุกรรมตามปกติ และสามารถถ่ายทอดลักษณะการเปลี่ยนแปลงนั้นๆ จากเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปยังเซลล์ลูกได้ด้วยกระบวนการแบ่งเซลล์ (อรุณี, 2550)

สาเหตุของการกลายพันธุ์ของพืช

แบ่งการกลายตามสาเหตุของการเกิดได้เป็น 2 ประเภท คือ การกลายตามธรรมชาติ และการกลายจากการเหนี่ยวนำ

1. การกลายตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) หมายถึง การกลายที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยที่มนุษย์ไม่ได้เข้าไปมีบทบาทใดๆ ตามปกติไม่สามารถบอกได้ว่าการกลายตามธรรมชาติเกิดจากสาเหตุใด แต่ต่อมาในระยะหลัง มีสิ่งตีพิมพ์มากมายที่กล่าวถึงการกลายตามธรรมชาติว่า น่าจะเป็นผลมาจากกิจกรรมของ “transposon” หรือ “transposable genetic element” ซึ่งหมายถึงชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีคุณสมบัติในการจำลองตัวเองและแยกตัว ตลอดจนสามารถเคลื่อนย้ายไปยังตำแหน่งอื่นๆ บนจีโนมได้ ผลของการที่ transposable genetic element ไปสอดแทรกตรงตำแหน่งอื่นของจีโนม ทำให้ยีนที่อยู่ใกล้กับ transposable genetic element ที่มาสอดแทรกทำหน้าที่ผิดปกติไปจากเดิม เช่น ทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า variegation คือลักษณะการเกิดจุดด่าง เป็นลายสลับสีหรือลักษณะกระบนกลีบดอก ใบ และเมล็ด เช่น การเกิดแต้มสีบนเมล็ดข้าวโพด ใบลายหรือใบด่างในถั่วเหลือง ฝ้าย จุดกระหรือด่างบนกลีบดอกกรักรเ่ (อรุณี, 2550)

2. การกลายจากการเหนี่ยวนำ (induced mutation หรือ man - made mutation) หมายถึง การกลายที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์ โดยจะได้อัตราการกลายเพิ่มขึ้นจากที่เกิดเองตามธรรมชาติอีกหลายเท่า สิ่งื่อนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย เรียกว่า สิ่งก่อการกลาย (mutagen) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

2.1 สิ่งก่อการกลายประเภทกายภาพ ได้แก่ รังสีก่อไอออนประเภทต่างๆ รังสีที่นิยมนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชเป็นรังสีประเภท ionizing radiation ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา และรังสีนิวตรอน ส่วนรังสีอัลตราไวโอเลตมีการใช้ในพืชน้อย เนื่องจากมีอำนาจในการทะลุทะลวงต่ำ มีพลังงานไม่สูงพอที่จะทำให้เกิด ionization แต่อย่างไรก็ตามรังสีอัลตราไวโอเลตในช่วงคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร (nm) เป็นช่วงคลื่นที่กรดนิวคลีอิกดูดกลืนพลังงานได้ดี จึงทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีนได้ (อรุณี, 2539)

รังสีแกมมา (gamma rays) เป็นรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่สูง ไม่มีมวล ไม่มีประจุ มีอำนาจทะลุทะลวงสูง เกิดจากการปล่อยพลังงานของนิวไคลด์กัมมันตรังสี (radionuclide หรือ radioactive nuclide) ที่สลายตัวให้รังสีชนิดอื่นแล้วยังมีพลังงานเหลืออยู่จึงปล่อยพลังงาน

ออกมาในรูปของรังสีแกมมา รังสีแกมมาจัดเป็นรังสีนิวเคลียร์ เนื่องจากเกิดจากนิวเคลียสของนิวไคลด์กัมมันตรังสี ตัวอย่างของนิวไคลด์กัมมันตรังสี คือ โคบอลต์ - 60 (Cobalt - 60, ^{60}Co) และ ซีเซียม - 137 (Cesium - 137, ^{137}Cs) ซึ่งนิยมนำมาใช้เป็นต้นกำเนิดรังสีแกมมาในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายในพืช รังสีแกมมามีพลังงานอยู่ในช่วง keV - MeV สำหรับความสามารถในการทะลุทะลวงผ่านตัวกลางใดๆ ขึ้นอยู่กับพลังงานและชนิดของตัวกลาง (อรุณี, 2550)

2.2 สิ่งก่อการกลายประเภทสารเคมี สารเคมีหลายชนิดมีสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายในสิ่งมีชีวิตเช่นเดียวกับรังสี แต่สารเคมีที่นำมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายในพืชมีไม่กี่ชนิด และส่วนใหญ่จะเป็นสารเคมีก่อการกลาย (chemical mutagen) ที่จัดอยู่ในกลุ่ม alkylating agent สารเคมีก่อการกลายหลายชนิดช่วยเพิ่มอัตราการกลายของยีน แต่ก็มี ความยุ่งยากในการใช้ รวมทั้งสมบัติในการซึมผ่านไปยังเซลล์เป้าหมายค่อนข้างจำกัด สารเคมีทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนภายในโครโมโซมเดียวกัน (intrachromosomal changes) มากกว่าการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนระหว่างโครโมโซม (interchromosomal changes) (อรุณี, 2539)

โคลชิซิน เป็นสารประเภทอัลคาลอยด์ มีผลึกเป็นรูปเข็ม ไม่มีสี มีสูตรทางเคมี คือ $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{N}$ มีจุดหลอมเหลวที่ 155 องศาเซลเซียส ละลายได้น้อยในน้ำอุ่น น้ำร้อน และเบนซีน แต่ละลายได้ดีในอีเทอร์ โคลชิซินเป็นสารที่สามารถสกัดได้จากส่วนหัวและเมล็ดของ *Autumn crocus* (*Colchicum autumnale* Linn.) และใน *Colchicum* ชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น *C. luteum* Baker และใน Liliaceae อื่นๆ และพบในส่วนหัวของดอกตี่ง (*Gloriosa* spp.) สารนี้มีประโยชน์ในทางการเกษตรคือสามารถชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนของโครโมโซม โดยโคลชิซินจะเป็นตัวไปอุดตามปลายท่อต่างๆ ของ microtubule ภายในเซลล์ ทำให้ microtubule ไม่สามารถต่อกันเป็น spindle fiber ที่ทำหน้าที่ในการช่วยดึงโครโมโซมระยะเมทาเฟสได้ (อมรฯ, 2546) โครโมโซมไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังขั้วเซลล์ทั้งสองและหยุดอยู่ระหว่างขั้วเซลล์ทั้งสอง มีการแบ่งโครโมโซมแต่ไม่มีการแบ่งนิวเคลียส ลักษณะเช่นนี้เรียกว่า colchicine-mitosis (C - mitosis) จากนั้นก็มีการสร้างผนังนิวเคลียสขึ้นมาใหม่อีกครั้งหนึ่งในเซลล์เดิม เมื่อเป็นเช่นนี้จึงทำให้เซลล์นั้นมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นอีกเท่าตัว โดยไม่ทำให้โครงสร้างของโครโมโซมมีการเปลี่ยนแปลงไป เซลล์ที่ได้นี้จะมีลักษณะเป็นโพลีพลอยด์ (polyploid) สำหรับเซลล์ที่อยู่ในระยะ interphase จะไม่มีการตอบสนองต่อสารโคลชิซิน เมื่อเสร็จสิ้นการได้รับสารนั้นๆ แล้ว จะมีการสร้าง spindle fiber ขึ้นตามปกติ และมีการแบ่งเซลล์แบบ mitosis ตามปกติ ถ้าหากว่าบริเวณเหล่านั้นมีเซลล์ที่เป็นโพลีพลอยด์มากพอ เนื้อเยื่อเหล่านั้นก็จะกลายเป็นโพลีพลอยด์ทั้งหมด แต่โดยทั่วไปแล้วอาจจะเป็นโพลีพลอยด์เพียงไม่กี่เซลล์ เซลล์ส่วนใหญ่ยังคงเป็นดิพลอยด์ (2x) ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เป็น 2x จะเร็วกว่า

เซลล์ที่เป็นโพลีพลอยด์ เมื่อเป็นเช่นนี้จะพบว่าเซลล์ที่เป็นโพลีพลอยด์จะหายไปเหลือแต่เซลล์ที่เป็นดิพลอยด์ธรรมดา (ยรรยงค์, 2523)

การเปลี่ยนแปลงของพืชหลังถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

1. ผลที่เกิดขึ้นกับส่วนต่างๆ ของพืชหลังได้รับรังสี

การให้รังสีกับพืชที่กำลังเจริญเติบโตอยู่นั้นจะทำให้เกิดผลได้หลายอย่าง คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา (morphological abnormalities) ทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมผิดปกติหรือเปลี่ยนแปลงไป ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช หรือเกิดการตาย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอัตรารังสีและปริมาณรังสีที่ได้รับ ชนิดของรังสี ชนิดของพืช และอายุพืช เป็นต้น หรือ เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) (อรุณี, 2530) การเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทป์เป็นสิ่งบ่งชี้ว่า สิ่งมีชีวิตนั้นเกิดการกลายพันธุ์เกิดขึ้น ตัวอย่างเช่น เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของต้น ความผิดปกติที่เกิดขึ้นจะเห็นได้ชัดเจน คือ ต้นแคระแกรน เพราะรังสีไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ในบริเวณยอด ยับยั้งการยืดตัวของเซลล์บริเวณปล้อง เนื่องจากรังสีไปทำลายออกซิน (auxin) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโต ทำให้พืชที่ได้รับรังสีมีปริมาณของฮอร์โมนออกซินลดลง รูปร่างใบผิดปกติ ความผิดปกติของใบที่พบได้บ่อยได้แก่ ใบเล็ก ใบหนา ใบหยاب รูปร่างและลักษณะเนื้อใบเปลี่ยนไป ใบเป็นคลื่นหรือรอยย่น ขอบใบม้วน เส้นกลางใบผิดปกติ ใบรวมกันเป็นกลุ่มหรือใบค่าง เนื่องจากคลอโรฟิลล์บางส่วนถูกทำลายเกิดไคเมอรา (chimera) และมีอายุการเก็บเกี่ยวเร็วขึ้นหรือช้าลง (สิรินุช, 2537 และ อรุณี, 2550)

2. ผลที่เกิดขึ้นกับส่วนต่างๆ ของพืชหลังได้รับสารโคลชิซิน

autopolyploid หมายถึง การเพิ่มชุดของโครโมโซม (basic chromosome number) จากจีโนมเดียวกันทั้งหมด สามารถเกิดขึ้นเองได้ตามธรรมชาติและเกิดจากการเหนี่ยวนำ ผลของโพลีพลอยด์มักทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยนิวเคลียสจะขยายขนาดตามสัดส่วนของจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น (อมรา, 2546) เช่น ในมะเขือเทศที่เป็นโพลีพลอยด์นั้นมีขนาดของเซลล์กลุ่มปากใบเพิ่มขึ้น ใบและกลีบดอกใหญ่และหนากว่าต้นปกติ (Jones, 2009) ซึ่งการทำให้เกิด autopolyploid นั้น เพื่อประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยส่วนใหญ่มักทำในไม้ดอกและไม่ประดับ ลักษณะที่ได้นอกจากจะทำให้ดอกใหญ่ขึ้นแล้ว ยังทำให้คุณภาพด้านอื่นดีขึ้นด้วย เช่น สามารถปักแจกันได้นานขึ้น หรือบานทน เป็นต้น (สุทัศน์, 2552) แต่ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นทำให้วัฏจักรของเซลล์ช้าลงทำให้มีการออกดอกและติดผลผลิตช้ากว่าและเจริญเติบโตช้ากว่า

พลอยด์ และในต้นที่เป็นเตตตระพลอยด์จะมีความยุ่งยากในการแยก (segregation) ของ homologous chromosome ในไมโอซิส จึงทำให้ต้นพืชมีอัตราการติดเมล็ดลดลง (อมรา, 2546)

3. การเกิดไคเมอราเนื่องจากการชักนำให้เกิดการกลายโดยรังสีและสารโคลชิซิน

โดยปกติเนื้อเยื่อบริเวณปลายยอด (Shoot Apical Meristem, SAM) จะประกอบด้วยชั้นของเซลล์ (histogens layer) อย่างน้อย 3 ชั้น ได้แก่ ชั้น dermatogens (L_1) เป็นเซลล์ชั้นนอกสุด ชั้น periblem (L_2) เป็นเซลล์ชั้นที่ 2 (tunica คือเซลล์ชั้น L_1 และ L_2) และชั้น plerome (L_3) เป็นเซลล์ชั้นในสุด (corpus คือเซลล์ชั้น L_3) (Wegner, 2000; Evert, 2006; Tax and Durbak, 2006) ซึ่งเมื่อมีการเจริญไปเป็นยอดใหม่เซลล์ในแต่ละชั้นจะเจริญไปเป็นส่วนต่างๆ โดยเซลล์ชั้น L_1 เจริญไปเป็นเซลล์ชั้นนอกสุดหรือเซลล์ผิว (epidermis) ของอวัยวะต่างๆ เช่น ลำต้น ใบ ดอก และผล เซลล์ชั้น L_2 เจริญไปเป็นเซลล์ชั้น mesophyll ของใบ กลีบดอก และกลีบเลี้ยง รวมไปถึงเนื้อเยื่อส่วนในของเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย และเป็นขอบของใบในพืชใบเลี้ยงคู่ และเจริญไปเป็นเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ของรากและลำต้น (Lineberger, 2012) เซลล์ชั้น L_3 เจริญไปเป็นกลุ่มของเซลล์ท่อลำเลียงในราก ลำต้น ใบ (Hake and Char, 1997; Atwell *et al.*, 1999; Evert, 2006 และ Podwyszynska *et al.*, 2011) เมื่อเกิดการแบ่งเซลล์ของเซลล์กลายที่อยู่บริเวณปลายยอดซึ่งอาจจะเป็นเซลล์ชั้นใดก็ได้ เซลล์ที่เกิดใหม่จากการแบ่งตัวของเซลล์กลายก็จะเป็นเซลล์กลายด้วยและในขณะเดียวกันเซลล์ที่ไม่เกิดการกลายก็เกิดการแบ่งเซลล์ด้วยเช่นกัน ทำให้เนื้อเยื่อของพืชบริเวณนั้นมีเซลล์ที่มีจีโนไทป์ต่างกันอยู่ใกล้กันและเรียกลักษณะดังกล่าวนี้ว่า ไคเมอร่า (chimera) และถ้าพืชถูกชักนำด้วยสารโคลชิซินก็จะทำให้เกิด cytochimera (Harten, 1998; Stewart, 2001 และ Schlegel, 2010) ซึ่งสามารถแบ่งชนิดของไคเมอร่าตามตำแหน่งชั้นของเซลล์ที่กลายและโครงสร้างของเนื้อเยื่อที่กลายได้ 3 ชนิด คือ 1. periclinal chimera เป็นการกลายที่เกิดขึ้นทั้งชั้นของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด โดยเซลล์กลายจะคลุมส่วนยอดทั้งหมด ซึ่งอาจจะเกิดที่ชั้นใดชั้นหนึ่งหรือเกิด 2 ชั้น หรือเกิดพร้อมกันทั้งสามชั้นก็ได้ และถ้าหากเกิดพร้อมกันทั้งสามชั้นก็จะเรียกการกลายนี้ว่า solid mutant คือกลายทั้งหมด เป็นการกลายที่คงตัว 2. mericlinal chimera เป็นการกลายที่เกิดเพียงบางส่วนของชั้น เกิดเพียง 1 - 2 ชั้น เป็นการกลายที่ไม่คงตัว และ 3. sectorial chimera เป็นการกลายที่เกิดขึ้นในทุกชั้นแต่เกิดเพียงบางส่วนของชั้น เป็นการกลายที่เกิดยากและไม่คงตัว (Tilney-Bassett, 1986 และ Marcotrigiano and Gradziel, 1997) การกลายของสีใบในแต่ละชั้นของเซลล์สามารถเขียนโดยใช้สัญลักษณ์เป็นอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่แทนในชั้นทั้ง 3 โดยชั้นที่มีจีโนไทป์ปกติและมีสีเขียวเขียนแทนด้วยสัญลักษณ์ G (Green) และเซลล์กลายที่มีสีขาวเขียนแทนด้วยสัญลักษณ์ W (White) (Marcotrigiano, 1997 และ Schlegel, 2010)

การตรวจสอบลักษณะของพืชที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

1. โครโมโซมในโซมาติกเซลล์

การให้ทริตเมนต์ด้วยสิ่งก่อการกลาย อาจตรวจพบความเสียหายทางเซลล์วิทยาได้ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม โดยสามารถตรวจการเปลี่ยนแปลงจากการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสหรือไมโอซิส (อรุณี, 2550) เนื่องจากโครโมโซมเป็นตำแหน่งที่อยู่ของยีนซึ่งเป็นตัวควบคุมพฤติกรรมต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต การเจริญเติบโตอย่างปกติย่อมเกิดจากการควบคุมของยีนในสภาพสมดุล ถ้าสิ่งมีชีวิตใดมีจำนวนหรือลักษณะของโครโมโซมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมย่อมก่อให้เกิดผลต่างๆ ตามมา (กันยารัตน์, 2532; อมรา, 2546; Wu *et al.*, 2007 และ Felix *et al.*, 2011a) การศึกษาจำนวนและลักษณะของโครโมโซมจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อตรวจหาการกลายของพืชที่ถูกชักนำด้วยสิ่งก่อการกลาย เนื้อเยื่อที่นิยมใช้คือปลายราก มีขั้นตอนการเตรียมโครโมโซมจากรากพืช ดังนี้

1.1 เตรียมรากพืช โดยใช้รากสดที่มีลักษณะโปร่งสีขาว และปลายราก (root tip) มีสีขาวอมครีมหรือสีขาวขุ่น เลือกเก็บรากพืชในระยะเวลาที่รากพืชมีอัตราการแบ่งเซลล์สูง เพื่อให้ได้โครโมโซมที่อยู่ในระยะเมทาเฟสมากที่สุด

1.2 Pretreatment การทำ pretreatment ให้กับรากพืชจะทำให้เซลล์พืชหยุดการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟส ซึ่งระยะนี้โครโมโซมมีขนาดสั้นที่สุดทำให้สามารถนับจำนวนและศึกษารูปร่างของโครโมโซมได้ชัดเจน สารที่ใช้ทำ pretreatment มีหลายชนิด เช่น colchicine 8-hydroxyquinoline และ paradichlorobenzene เป็นต้น แต่ละชนิดมีผลทำให้ spindle fiber ของเซลล์ไม่สามารถสร้างขึ้นได้

1.3 Fixation คือ การแช่รากในน้ำยาคงสภาพ โดยนำรากที่ผ่านการทำ pretreatment แล้ว แช่ในน้ำยาคงสภาพอย่างน้อย 15 นาที (ขึ้นกับชนิดพืช) แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด น้ำยาคงสภาพที่ใช้ คือ สูตร Carnoy's fluid จำเป็นต้องใช้ทันทีหลังเตรียมเสร็จ เตรียมได้โดยใช้ absolute ethanol หรือ methanol 3 ส่วน ผสมกับ glacial acetic acid 1 ส่วน

1.4 Stain คือ การย้อมสีเซลล์ ย้อมโดยวิธี Feulgen technique โดยนำปลายรากที่แช่ในน้ำยาคงสภาพแล้ว มาแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็น คอยจนรากจมจึงย้ายมาแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 25

นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แช่วลายรากใน fuchsin solution นาน 20 - 30 นาที เมื่อต้องการตรวจดูโครโมโซมให้เตรียมรากบนสไลด์ หยดกรดอะซีติกความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ แล้วใช้วิธี squash technique คือ ขยี้เซลล์รากให้แบนด้วยเข็มเย็บปลายแบน ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นวางบนกระดาษซับบริเวณส่วนเหนือและใต้ของสไลด์ใช้นิ้วหัวแม่มือกดแรงพอประมาณเพื่อให้เซลล์กระจายออก ตรวจดูเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. ลักษณะของใบ

การเปลี่ยนแปลงลักษณะของใบ เป็นความเสียหายทางสรีรลักษณะหนึ่งที่ปรากฏอย่างชัดเจน เมื่อพืชถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสิ่งก่อการกลายชนิดต่างๆ เนื่องจากระบบการเมแทบอลิซึมถูกขัดขวาง ทำให้กิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ไม่สามารถดำเนินไปได้ตามปกติ ทำให้ใบมีรูปร่างหงิกหรือบิดเบี้ยว เกิดลักษณะใบด่างหรือจุด หรืออาจทำให้มีความหนาใบเพิ่มขึ้น การฉายรังสีเนื้อเยื่อพืชที่ประกอบไปด้วยเซลล์หลายเซลล์ เช่น เนื้อเยื่อบริเวณปลายยอดหรือตาข้าง มักทำให้เกิดไคเมอร่า พืชที่เจริญมาจากตาส่วนยอด (apical bud) หรือเป็นแบบ apical dominance เมื่อมีการเติบโตตรงส่วนยอดขึ้นไปเรื่อยๆ ส่วนกลายที่เกิดอยู่บริเวณฐานจะถูกจำกัดบริเวณให้อยู่ตรงส่วนฐานเท่านั้น ลักษณะการกลายจึงสูญหายไป ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตัดยอดของต้นเดิมออกเพื่อให้ตาที่อยู่บริเวณฐานเจริญเป็นต้นได้ ทำให้ลักษณะกลายปรากฏออกมาให้เห็นและสามารถคัดเลือกได้ ไคเมอร่าเกิดจากการกลายของเซลล์ ซึ่งอาจเป็นการกลายตามธรรมชาติหรือเกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยสิ่งก่อการกลาย ถ้าเซลล์กลายอยู่บริเวณปลายยอดซึ่งจะต้องมีการแบ่งเซลล์ต่อไป เซลล์ที่เกิดใหม่จากการแบ่งตัวของเซลล์กลายก็จะเป็นเซลล์กลายทั้งหมด ผลคือในเนื้อเยื่อพืชนั้นๆ จะมีเซลล์ที่มีจีโนไทป์ต่างกันอยู่ใกล้ๆ กัน เรียกลักษณะดังกล่าวนี้ว่าไคเมอร่า (อรุณี, 2550) ซึ่งมีวิธีการศึกษา ดังนี้

วิธีการวัดความหนาใบ ทำได้โดยเลือกใบที่โตเต็มที่ของต้นที่ต้องศึกษา ตัดใบตามขวางผ่านบริเวณกึ่งกลางใบให้เป็นชิ้นบางๆ จากนั้นเลือกชิ้นที่เนื้อเยื่อสมบูรณ์ นำวางบนกระจกสไลด์ หยดน้ำ 1 - 2 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า ทำการวัดความหนาของใบในตำแหน่งที่ห่างจากเส้นกลางใบ 1 มิลลิเมตร โดยใช้ออกคิวลาร์ไมโครมิเตอร์ทาบบนใบที่ตัดตามขวางแล้วบันทึกผล หรือโดยใช้โปรแกรม ZEISS AxioVision 3.1 ที่เชื่อมต่อกับกล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ (วัชรินทร์, 2544; นิยมศรี และคณะ, 2552 และ รัชณี, 2553)

3. ปากใบและเซลล์คุมปากใบ

สำหรับพืชที่ถูกชักนำให้มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นนั้น นอกจากลักษณะของอวัยวะต่างๆ ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นแล้ว จำนวนและความยาวของเซลล์คุมปากใบก็มีการเปลี่ยนแปลงเช่นกันซึ่งมีวิธีการศึกษา ดังนี้

การวัดความยาวและความกว้างของปากใบทำได้โดย เลือกใบที่โตเต็มที่ของต้นที่ต้องการศึกษา เช็ดทำความสะอาด เมื่อแห้งทาด้วยน้ำยาทาเล็บสีใสหรือน้ำยาเคลือบเล็บลงบนผิวใบด้านบนหรือผิวใบด้านล่าง เมื่อน้ำยาแห้งจึงลอกเอาน้ำยาทาเล็บออกจากผิวใบ (สุรศักดิ์, 2539) นำวางบนกระจกปิดสไลด์ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ และนำส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า ศึกษาจำนวนปากใบต่อพื้นที่ 1.0 ตารางมิลลิเมตร ขนาดของปากใบหรือเซลล์คุม และจำนวนเมื่อดกลอโรพลาสต์ต่อจำนวนเซลล์คุมปากใบ โดยใช้ออกคิวลาร์ไมโครมิเตอร์ หรือใช้โปรแกรม ZEISS AxioVision 3.1 ที่เชื่อมต่อกับกล้องจุลทรรศน์ (ZEISS, เยอรมัน) และบันทึกภาพ (รัชนิวรรณ, 2546; นิยมศรี และคณะ, 2552; Ye *et al.*, 2010 และ Liu *et al.*, 2011)

4. ดอกและละอองเกสร

สิ่งก่อกการกลายมีผลทำให้พืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดลดความสามารถในการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศลง คือ ทำให้พืชเป็นหมัน การเป็นหมันของพืชเกิดจากปรากฏการณ์อย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายๆ อย่างรวมกัน เช่น ต้นพืชแคระแกรนหรือชะงักการเจริญเติบโตจนไม่สามารถมีดอกได้ มีการสร้างดอกแต่ดอกขาดโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ ดอกมีโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์แต่ละอองเกสรเป็นหมัน มีการปฏิสนธิแต่เอ็มบริโอไม่สามารถเติบโตต่อไปได้ มีการสร้างเมล็ดแต่เมล็ดไม่สามารถงอกเป็นต้นกล้าได้หรือออกเป็นต้นกล้าได้แต่ตายภายหลัง ซึ่งการเป็นหมันที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยสิ่งก่อกการกลาย ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการกลายของโครโมโซม (อรุณี, 2550)

วิธีการตรวจสอบความเป็นหมันของละอองเกสร ใช้วิธีทางเซลล์วิทยาอย่างง่าย คือ เก็บเอาละอองเกสรจากต้นที่ต้องการตรวจสอบวางบนสไลด์ หยดสีย้อม 1 - 2 หยด และใช้เข็มเขี่ยเกลี่ยให้ละอองเกสรกระจายทั่วสีย้อม ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์และนำส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 20 หรือ 40 เท่า โดยสีที่ย้อมเป็นสีที่มีส่วนผสมของไอโอดีน (I_2) ผสมกับโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) (Ye *et al.*, 2010) ละอองเกสรที่ติดสีน้ำตาลแก่หรือน้ำตาลอ่อนจัดเป็นละอองเกสรที่สมบูรณ์ หรือใช้สี aceto-carmin (Adaniya and Shirai, 2001) หรือ Feulgen's reagent ละอองเกสร

ที่ดัดสีแดงจัดเป็นละอองเกสรที่สมบูรณ์หรือไม่เป็นหมัน ส่วนละอองเกสรที่ดัดสีจางหรือไม่ดัดสี และมีขนาดเล็กกว่าปกติเป็นละอองเกสรที่เป็นหมัน บันทึกจำนวนละอองเกสรที่ตรวจนับทั้งหมด และจำนวนละอองเกสรที่เป็นหมันในแต่ละบริเวณที่ตรวจนับ ควรนับละอองเกสรให้ได้อย่างน้อย 300 เพื่อนำไป คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความเป็นหมันของละอองเกสร ตามสูตร (อรุณี, 2550)

$$\% \text{ ความเป็นหมันของละอองเกสร} = \frac{\text{จำนวนละอองเกสรที่เป็นหมัน}}{\text{จำนวนละอองเกสรที่ตรวจนับทั้งหมด}} \times 100$$

ความสามารถในการงอกของละอองเกสรเป็นอีกลักษณะหนึ่งที่สามารถบอกได้ถึง ความเป็นหมันของละอองเกสร โดยที่ถ้าละอองเกสรมีเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเกสรต่ำ ก็ส่งผลให้ละอองเกสรนั้นเป็นหมันด้วย วิธีการทดสอบทำได้โดยเก็บละอองเกสรมาเพาะเลี้ยงใน อาหารสังเคราะห์ที่เติมวุ้น 10 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 80 กรัมต่อลิตร และกรดบอริก 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วางทิ้งไว้ 2 นาที แล้วจึงนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (Adaniya and Shirai, 2001) หรือเพาะเลี้ยงละอองเกสรในอาหารสูตร ME₃ (Leduc *et al.*, 1990) ที่ เติมน้ำตาลซูโครส 12 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ PEG₄₀₀₀ ความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Ye *et al.*, 2010) จากนั้นวัดความยาวของหลอดละอองเกสรที่งอก แล้วนำ ค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการงอกของหลอดละอองเกสร

นอกจากความเป็นหมันของละอองเกสรแล้ว ขนาดของละอองเกสรก็เป็นผลที่เกิดจาก สิ่งก่อการกลายได้เช่นกัน โดยละอองเกสรจะมีขนาดเล็กลงหรือรูปทรงไม่สมบูรณ์ในกรณีที่ได้รับ รังสี หรือมีขนาดใหญ่ขึ้นในกรณีที่ได้รับการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซม ดังนั้นในการ บันทึกผลที่เกิดขึ้นจึงมีการวัดขนาดของละอองเกสรด้วย มีวิธีการคือ ย้อมละอองเกสรด้วยสี aceto - carmine ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่มี ocular - micrometer และ ทำการวัดขนาดของละอองเกสร (Glowacka *et al.*, 2010)

5. การเจริญเติบโตทางลำต้น

ความเสียหายทางสรีระนอกจากลักษณะใบที่ปรากฏให้เห็นแล้ว ลักษณะความสูงและ การเจริญเติบโตทางลำต้น ก็เป็นลักษณะที่สามารถตรวจสอบการกลายของพืชที่ถูกชักนำด้วยสิ่งก่อ การกลายได้เช่นกัน เนื่องจากรังสีทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมผิดปกติหรือเปลี่ยนแปลงไป ยับยั้ง การเจริญเติบโตของพืช ทำให้ต้นเกิดอาการแคระแกรน ซึ่งมีวิธีการศึกษาโดยวัดความสูง (จากโคน

ต้นปลายยอด) และความกว้างต้น (Escandón *et al.*, 2007 และ Sarathum *et al.*, 2010) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต้น (Liu *et al.*, 2011) ความยาวยอด จำนวนข้อย้อยยอด (Nonaka *et al.*, 2011) นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับความแตกต่างกับต้นที่ไม่ได้ชักนำให้เกิดการกลาย

ตัวอย่างการปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกประเภทหัว (bulb) โดยใช้รังสีแกมมาและสารโคลชิซิน

กันยรัตน์ (2532) ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายในบัวจีน (*Zephyranthes* spp.) โดยฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 2,000 4,000 6,000 8,000 10,000 และ 12,000 แรด (rad) ให้กับหัวของบัวจีนเหลืองเข้ม (*Z. citrina*) บัวจีนหอมคำ (*Z. candida*) บัวจีนดอกชมพูเล็ก (*Z. rosea*) และบัวจีนดอกชมพูใหญ่ (*Z. grandiflora*) พบว่า บัวจีนเหลืองเข้มที่ได้รับรังสี 4,000 แรด (rad) บัวจีนหอมคำที่ได้รับรังสี 8,000 แรด (rad) และบัวจีนดอกชมพูเล็กที่ได้รับรังสี 2,000 แรด (rad) มีดอกแฟดเกิดขึ้น โดยมี 2 ดอกบนก้านช่อดอกเดียวกันซึ่งสามารถเจริญไปเป็นผลได้ผลแฟด บางดอกกลีบดอกไม่บาน บางดอกกลีบรวมเป็นใบ ซึ่งดอกที่มีลักษณะฟิโนไทป์ต่างไปจากดอกปกติมักจะมีดอกที่บานได้นานกว่าดอกที่ไม่ได้รับรังสี (ดอกปกติบาน 24 ชั่วโมง) และนอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของสีดอกบัวจีน ได้แก่ บัวจีนดอกชมพูเล็กมีสีดอกเข้มขึ้นเป็นม่วงแดงหรือมีสีชมพูจางลง บัวจีนดอกเหลืองเข้มมีสีดอกจางลงเหมือนดอกของบัวจีนดอกเหลืองอ่อนหรือมีสีเกือบขาวคล้ายบัวจีนหอมคำ บัวจีนหอมคำมีสีเข้มขึ้นเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลืองอ่อนและเหลืองเข้ม

กฤษณา (2545) ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายของ *Ornithogalum dubium* Houtt. โดยการฉายรังสีแกมมาพบว่า เมื่อนำยอดอายุ 8 สัปดาห์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปฉายรังสีที่ปริมาณ 2 KRad มีผลทำให้ต้นแคระ ใบสั้น และปลายใบลาย และเมื่อนำเซลล์จากปลายรากมาวิเคราะห์โครโมโซมพบว่า มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 12 และ 24 และศึกษาคาร์ิโอไทป์และคาร์ิโอแกรมจากการย้อมโครโมโซมด้วยสี giemsa และ AgNO₃ ทำให้ทราบว่าต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 24 เป็น autotetraploid ของต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 12 และต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 12 ที่ได้รับการฉายรังสีปริมาณ 1 หรือ 2 กิโลแรด (krad) บางต้นมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมโดยเกิดการแตกหักของโครโมโซมบริเวณส่วนปลายของแท่งโครโมโซม (satellite)

Lu *et al.* (2007) ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการพัฒนาของ Chinese narcissus ในสภาพปลอดเชื้อ และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยวิธี RAPD และ AFLP พบว่า ต้นที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณ 10 เกรย์ มีลักษณะของแถบดีเอ็นเอแตกต่างจากแถบดีเอ็นเอของต้นที่ไม่ได้รับรังสี แสดงว่าเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม ซึ่งอาจมีผลต่อลักษณะใดลักษณะหนึ่งของต้นพืชได้

ทิวา (2533) ศึกษาผลของโคลชิซินต่อการกลายพันธุ์ของแกลดิโอลัสในสภาพปลอดเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 0 50 100 และ 200 ppm โดยใช้ระยะเวลาในการแช่สารนาน 6 12 24 และ 36 ชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้นของสารในระดับต่างๆ มีผลต่อน้ำหนักและขนาดของแคลลัส ความสูงของต้น และความหนาของใบ ส่วนระยะเวลาในการแช่สารมีผลต่อน้ำหนักของแคลลัส และจากการศึกษาจำนวนโครโมโซม พบว่า จำนวนโครโมโซมไม่มีการเปลี่ยนแปลง คือ $2n = 46$

รัศมี (2536) ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในลิลลี่ โดยนำกลีบหุ้มลิลลี่ (Asiatic hybrid) พันธุ์ต่างๆ ในสภาพปลอดเชื้อแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ แช่เป็นเวลา 0.5 และ 10 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า การพัฒนาของกลีบหุ้มของลิลลี่พันธุ์ต่างๆ บางส่วนมีการเจริญเติบโตผิดปกติไม่เกิดห้วย่อยตามปกติ แต่เกิดการเจริญเป็นกลีบหุ้มขนาดเล็กๆ เป็นกระจุกบริเวณฐานของกลีบหุ้มเป็นจำนวนมาก และบางส่วนมีลักษณะคล้ายกลีบหุ้มที่ยืดยาวไม่มีการเจริญของใบหรือราก ลักษณะใบของลิลลี่แต่ละพันธุ์ที่ได้รับสารโคลชิซิน มีความหนาใบเพิ่มขึ้นโดยเพิ่มจากปกติ 0.278 มิลลิเมตร เป็น 0.398 และ 0.422 มิลลิเมตร เมื่อได้รับสารเป็นเวลา 5 และ 10 ชั่วโมง มีความยาวของเซลล์ปากใบเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าหลายพันธุ์โดยเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 1.44 เท่า คือ จากความยาวของเซลล์ปากใบปกติ 0.079 มิลลิเมตร เป็น 0.114 มิลลิเมตร และเมื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากรากของต้นลิลลี่ที่มีกลีบหุ้มหนาและใบหนา พบว่า มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2 เท่า คือ $2n = 4x = 48$

สุชาดา (2545) ศึกษาการใช้สารโคลชิซินกับว่านสี่ทิศลูกผสมจำนวน 3 พันธุ์ คือ ว่านสี่ทิศ 72 ว่านสี่ทิศ 85 และว่านสี่ทิศ 86 โดยใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ผสมในอาหารเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) และใช้เพาะเลี้ยงห้วย่อยที่ขยายหัวในสภาพปลอดเชื้อ และผ่านห้วย่อยเป็น 4 ส่วนผ่านตาเยื่อ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้ว่านสี่ทิศลูกผสมเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้ และมีจำนวนปากใบต่อพื้นที่ใบลดลง ขนาดปากใบใหญ่ขึ้น จำนวนเมื่อดกลอโรพลาสต์ต่อจำนวนปากใบเพิ่มขึ้น และเมื่อดกลอโรพลาสต์มีขนาดใหญ่ขึ้น และเมื่อทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมของลูกผสม ว่านสี่ทิศ 72 และ ว่านสี่ทิศ 85 ในห้วย่อยรุ่น VM_2 พบว่า มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นจาก $2n = 2x = 22$ เป็น $2n = 4x = 44$

Geoffriau *et al.* (1997) ใช้สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่างๆ กับฐานหัวและห้วย่อยของหัวหอม (*Allium cepa* L.) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.625 มิลลิโมลาร์ (mM) สามารถชักนำให้ฐาน

หัวของหัวหอมมีจำนวนของโครโมโซมเพิ่มเป็น 2 เท่า ได้มากถึง 64 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ (mM) สามารถชักนำให้หัวย่อยของหัวหอมมีจำนวนของโครโมโซมเพิ่มเป็น 2 เท่า ได้มากถึง 65.7 เปอร์เซ็นต์

Alan *et al.* (2004) ให้สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 100 200 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยผสมสารละลายโคลชิซินลงในอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) และนำส่วนหัวและฐานของหัวหอม (*Allium cepa* L.) เพาะเลี้ยงในอาหารที่เตรียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า ฐานหัวของหัวหอมที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 200 - 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น

Grzebelus and Adela (2004) ศึกษาผลของ anti - biotic ต่อการพัฒนาและการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในเอ็มบริโอของหัวหอม โดยให้สาร trifluralin, oryzalin, amiprofos - methyl (APM) และ colchicine ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง พบว่า สารที่สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมมากที่สุดคือ trifluralin oryzalin และ APM ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (μM) โดยสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ 32.5 34.9 และ 32.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับ colchicine พบว่า เมื่อให้สารที่ความเข้มข้น 25 μM เป็นเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ 23.5 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Alan *et al.* (2007) เตรียมอาหารเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) โดยผสมสารโคลชิซินความเข้มข้น 750 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ (μM) และนำส่วนฐานของหัวหอม (*Allium cepa* L.) เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เตรียมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาพมีแสงอย่างต่อเนื่อง พบว่าสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 750 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ (μM) สามารถชักนำให้หัวหอมมีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น 24.2 และ 32.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Wu *et al.* (2007) ให้สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.02 0.05 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ กับตาดอกของลิลลี่สายพันธุ์ 'Con. Amore' และ 'Acapulco' โดยเลือกตาดอกที่มีขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร พันด้วยสำลีที่ชุบโคลชิซินที่ความเข้มข้น 4 ระดับ เป็นเวลา 3 วัน ปลูกลีงภายใต้โรงเรือนกระจกควบคุมอุณหภูมิและแสง พบว่า ความเข้มข้นของโคลชิซินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ละอองเกสรมีจำนวนชุดโครโมโซมเป็น 2 ชุด ในลิลลี่ทั้งสองสายพันธุ์ คือ 0.1 เปอร์เซ็นต์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. บัวดินที่ใช้ในการทดลองคือ *Zephyranthes grandiflora* L.

2. อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารสังเคราะห์

2.1 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH meter)

2.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ (autoclave)

2.3 เตาอบไมโครเวฟ (microwave)

2.4 เครื่องแก้ว (laboratory glassware) ได้แก่ ปีกเกอร์ แท่งแก้วคนสาร

หลอดหยดสาร

3. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสังเคราะห์

3.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

3.2 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

3.3 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

3.4 เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ความเข้มข้น 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

4. อุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.1 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow cabinet)

4.2 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (test tube rack)

4.3 ปากคีบ (forcep)

4.4 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 11

4.5 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)

4.6 กระดาษสำหรับรองตัดชิ้นพืช

4.7 ขวดแก้ว (glass bottle)

5. อุปกรณ์การฉายรังสีและการแช่ในสารละลายโคลชิซิน

5.1 เครื่องฉายรังสีแกมมา Mark I (Gamma Irradiation Mark I) ศูนย์วิจัยนิวเคลียร์
เทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.2 สารโคลชิซิน

5.3 เครื่องเขย่า

5.4 Water bath

6. อุปกรณ์ในการตรวจนับจำนวนโครโมโซมและวัดขนาดเซลล์ปากใบ

6.1 กล้องจุลทรรศน์

6.2 เข็มเย็บเชื้อ (needle)

6.3 เครื่องแก้ว (laboratory glassware) ได้แก่ กระจกสไลด์ กระจกปิดสไลด์ แท่งแก้ว
คนสาร

6.4 ใช้โปรแกรม ZEISS AxioVision 3.1 ที่เชื่อมต่อกับกล้องจุลทรรศน์ (ZEISS,
เยอรมัน) ในการวัดขนาดเซลล์ปากใบ

6.5 ใช้โปรแกรม DinoCapture 2.0 ในการถ่ายรูปโครโมโซม

7. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการออกปลูก

7.1 ตะกร้าเพาะกล้า

7.2 ถาดหลุม

7.3 กระถางพลาสติกสีดำ ขนาด 4 และ 6 นิ้ว

7.4 ปุ๋ยเม็ดละลายช้า สูตร 16 - 16 - 16

7.5 ปุ๋ยเกร็ดละลายน้ำ สูตร 20 - 20 - 20

วิธีการ

พืชที่ใช้ในงานวิจัย

รวบรวมบัวดินที่มีดอกสีชมพู (*Zephyranthes* spp.) เพื่อจำแนกหาบัวดินสีชมพูเข็มดอกใหญ่ (*Z. grandiflora* Lindl.) ทำการจำแนกโดยปลูกบัวดินดอกสีชมพูที่รวบรวมได้ลงกระถางขนาด 6 นิ้ว ใช้ดิน แกลบ ขุยมะพร้าว และมูลสัตว์ ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 : 1 (นพพร, 2551) เป็นวัสดุปลูก ปลูกเลี้ยงภายใต้หลังคาไม้ระแนงเปิดโล่ง ได้รับแสงครึ่งวันเช้ารดน้ำวันละ 1 ครั้ง เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยากับข้อมูลของกันยรัตน์ (2532) และตรวจนับจำนวนโครโมโซม ซึ่งชนิดของบัวดินสีชมพูเข็มดอกใหญ่ที่ใช้ในงานทดลองมีจำนวนโครโมโซม $2n = 48$ (กันยรัตน์, 2532)

วิธีการเพิ่มปริมาณหัวในสภาพปลอดเชื้อ

1. การทำความสะอาดหัว

นำบัวดินออกจากกระถางและเอาวัสดุปลูกออก เลือกหัวบัวดินที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 - 3 เซนติเมตร ตัดรากและใบทิ้ง ล้างทำความสะอาดเอาดินที่เหลือออก ลอกกาบใบชั้นนอกที่มีสีน้ำตาลออก ล้างด้วยน้ำสะอาด 1 ครั้ง และล้างผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่ด้วย detergent (ทีโพ สูตรเขียว 1 ส่วนต่อน้ำสะอาด 9 ส่วน) 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 แช่นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด ลอกกาบใบออก 1 ชั้นและใช้ใบมีดที่สะอาดเฉือนที่สกรบบริเวณฐานออก แล้วจึงนำแช่ detergent ครั้งที่ 2 นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดอีก 2 - 3 ครั้ง ผึ่งให้เสด็จน้ำ

2. การฟอกฆ่าเชื้อ

นำหัวที่ล้างทำความสะอาดแล้ว ฟอกฆ่าเชื้อในตู้ปลอดเชื้อด้วยคลอโรกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง และฟอกด้วยคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3. การเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3.1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารที่ใช้คืออาหารกึ่งแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยมีส่วนผสมของ Kelco gel ® 2.5 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหารเท่ากับ 5.7 และบรรจุในขวดแก้วใส ขนาด 4 ออนซ์ ขวดละ 20 มิลลิตร นึ่งฆ่าเชื้อภายใต้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

3.2 การเพาะเลี้ยงในอาหาร

นำหัวที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดส่วนบนทั้ง 3 ส่วน 4 ของหัว ลอกกาบใบออก 1 - 2 กาบใบ และฉีกผิวหน้าของส่วนฐานที่สัมผัสกับคลอโรฟิลล์ออก จากนั้นตัดแบ่งส่วนฐานที่มีกาบใบติดอยู่ออกเป็น 4 ส่วน โดยตัดผ่านส่วนของตาออกและดึงเอายอดออก นำชิ้นพืชเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมในข้อ 3.1 ขวดละ 1 ชิ้นพืช โดยกดให้ชิ้นพืชจมลงในอาหาร 3 ส่วน 4 ของชิ้นพืช จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพืชสวน ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เมื่อครบ 8 สัปดาห์ แยกหัวย่อยที่เกิดจากชิ้นพืช โดยเลือกหัวย่อยที่สมบูรณ์และมีเส้นผ่านศูนย์กลางหัว 0.5 - 1.0 เซนติเมตร ตัดใบและรากออก ย้ายเปลี่ยนอาหารใหม่ขวดละ 5 หัวย่อย เพื่อเตรียมไว้ใช้สำหรับงานทดลองต่อไป

การทดลองที่ 1 การชักนำบัวดินในสภาพปลอดเชื้อให้กลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมา

1.1 ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของบัวดินในรุ่น M_1V_2

ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของหัวย่อยบัวดินสีชมพู เข้มดอกใหญ่ในสภาพปลอดเชื้อ ทำการทดลองโดยคัดเลือกหัวย่อยอายุ 10 - 15 สัปดาห์ ที่มีขนาดสม่ำเสมอเส้นผ่านศูนย์กลางหัว 0.5 - 1.0 เซนติเมตร ผ่าครึ่งหัวที่คัดเลือกและดึงเอายอดออก จากนั้นเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ขวดละ 5 ชิ้นพืช เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงนำไปฉายรังสี

แกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 7 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชันพืช ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1	ไม่ได้รับการฉายรังสี (ชุดควบคุม)
ทรีตเมนต์ที่ 2	ปริมาณรังสี 10 เกรย์
ทรีตเมนต์ที่ 3	ปริมาณรังสี 15 เกรย์
ทรีตเมนต์ที่ 4	ปริมาณรังสี 20 เกรย์
ทรีตเมนต์ที่ 5	ปริมาณรังสี 25 เกรย์
ทรีตเมนต์ที่ 6	ปริมาณรังสี 30 เกรย์
ทรีตเมนต์ที่ 7	ปริมาณรังสี 35 เกรย์

หลังจากชันส่วนเพาะเลี้ยงได้รับรังสีแกมมาแล้วนำย้ายเปลี่ยนอาหารภายใน 1 วัน โดยใช้อาหารสูตรเดิม ขวดละ 5 ชันพืช จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ณ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลอง

การบันทึกผลการทดลอง

1. จำนวนชันส่วนเพาะเลี้ยงที่ตายหลังได้รับรังสีแล้ว 60 วัน เพื่อนำมาหาค่าปริมาณรังสีที่ทำให้ชันส่วนเพาะเลี้ยงตายเป็นครึ่งหนึ่งของชุดควบคุม (50% Lethal Dose, $LD_{50(60d)}$)
2. การเจริญเติบโตหลังได้รับรังสีแล้ว 60 วัน เพื่อนำค่าที่ได้มาหาค่าปริมาณรังสีที่ทำให้ชันพืชมีการเจริญเติบโตลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของชุดควบคุม (50% Growth Reduction, $GR_{50(60d)}$)
 - จำนวนหัวย่อยรุ่น M_1V_2
 - ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวย่อยรุ่น M_1V_2
 - จำนวนใบ และความยาวใบของหัวย่อยรุ่น M_1V_2

1.2 ผลของรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันต่อลักษณะการเปลี่ยนแปลงของบัวดินรุ่น M_1V_3 ในสภาพปลอดเชื้อ

คัดเลือกหัวย่อยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว 0.5 - 1.0 เซนติเมตร จากการทดลองที่ 1 ผ่าครึ่งหัวและดึงเอาขอดออก ย้ายเปลี่ยนอาหารใหม่ขวดละ 2 ขัน จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลอง

การบันทึกผลการทดลอง

1. จำนวนหัวย่อยและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวของบัวดินรุ่น M_1V_3 ในสภาพปลอดเชื้อ
2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหัวย่อยรุ่น M_1V_3 ในสภาพปลอดเชื้อ

1.3 ผลของรังสีแกมมาต่อลักษณะการเปลี่ยนแปลงของบัวดินรุ่น M_1V_2 ในแปลงปลูก

คัดเลือกหัวย่อยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว 0.5 - 1.0 เซนติเมตร จากการทดลองที่ 1 นำปรับสภาพก่อนออกปลูกโดยวางไว้ในโรงเรือนให้ได้รับแสงธรรมชาติเป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำหัวย่อยออกจากขวดล้างวันออกด้วยน้ำสะอาด ตัดรากและใบทิ้ง ปลูกใส่ตะกร้าเพาะกล้าใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก รดน้ำวันละครั้ง เมื่ออายุครบ 1 เดือน ย้ายปลูกลงถาดหลุมขนาด 1 นิ้ว โดยใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก เลี้ยงในโรงเรือนปลูกต้นไม้ ณ แปลงทดลอง 1 ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หลังย้ายลงถาดหลุม 2 สัปดาห์ รดปุ๋ยเกล็ดละลายน้ำ สูตร 20 - 20 - 20 เมื่ออายุครบ 2 เดือน ย้ายปลูกลงกระถางขนาด 4 นิ้ว กระถางละ 1 หัว ใช้ดิน แกลบ ขุยมะพร้าว และมูลสัตว์ ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 : 1 (นพพร, 2551) เป็นวัสดุปลูกและใส่ปุ๋ยเม็ดละลายช้า (slow release) สูตร 16 - 16 - 16 ครั้งซ้อนชาต่อกระถาง วางนอกโรงเรือนให้ได้รับแสงแดด 100 เปอร์เซ็นต์ รดน้ำวันละ 1 ครั้ง

การบันทึกผลการทดลอง

1. การเจริญเติบโตของบัวดินหลังออกปลูก 2 เดือน

- ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว
- ความสูง และความกว้างหัว
- จำนวนใบ และความยาวใบ
- จำนวนราก และความยาวราก

2. การออกดอกของบัวดินรุ่น M_1V_2 ภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูก

3. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบและดอกของบัวดินรุ่น M_1V_2 หลังออกปลูก

การทดลองที่ 2 การเพิ่มจำนวนโครโมโซมบัวดินในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้สารละลายโคลชิซิน

2.1 ศึกษาผลของสารละลายโคลชิซินต่อการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของบัวดินรุ่น M_1V_2

2.1.1 การรอดชีวิต

ศึกษาผลของสารละลายโคลชิซินต่อการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของบัวดินดอกสีชมพูเข้มในสภาพปลอดเชื้อ ทำการทดลองโดยคัดเลือกหัวย่อยอายุ 10 - 15 สัปดาห์ ที่มีขนาดสม่ำเสมอเส้นผ่านศูนย์กลางหัว 0.5 - 1.0 เซนติเมตร ผ่าครึ่งหัวที่คัดเลือกและดึงเอายอดดอกจากนั้นเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ขวดละ 5 ชิ้นพืช เป็นเวลา 4 วัน แล้วจึงนำไปแช่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) ในระยะเวลาต่างกัน โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 6 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้นพืช ดังนี้

ทริตเมนต์ที่ 1 แช่ในอาหารเหลวที่ไม่เติมสารละลายโคลชิซิน (ชุดควบคุม)
 ทริตเมนต์ที่ 2 แช่ในอาหารเหลวที่เติมสารละลายโคลชิซิน นาน 6 ชั่วโมง
 ทริตเมนต์ที่ 3 แช่ในอาหารเหลวที่เติมสารละลายโคลชิซิน นาน 12 ชั่วโมง
 ทริตเมนต์ที่ 4 แช่ในอาหารเหลวที่เติมสารละลายโคลชิซิน นาน 24 ชั่วโมง
 ทริตเมนต์ที่ 5 แช่ในอาหารเหลวที่เติมสารละลายโคลชิซิน นาน 48 ชั่วโมง
 ทริตเมนต์ที่ 6 แช่ในอาหารเหลวที่เติมสารละลายโคลชิซิน นาน 72 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนดนำชิ้นพืชล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเช็ดแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
 เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ขวดละ 1 ชิ้นพืช จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงภายในห้องเพาะเลี้ยง
 เนื้อเยื่อ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศา
 เซลเซียส ให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลอง

การบันทึกผลการทดลอง

1. จำนวนชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงที่ตายหลังแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น
 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนาน 60
 วัน เพื่อนำค่าที่ได้มาหารระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินที่ทำให้ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงตายเป็น
 ครึ่งหนึ่งของชุดควบคุม (50% Lethal Dose, $LD_{50(60d)}$)

2. การเจริญเติบโตหลังแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัม
 ต่อลิตร นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนาน 60 วัน เพื่อนำ
 ค่าที่ได้มาหารระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินที่ทำให้ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโต
 ลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของชุดควบคุม (50% Growth Reduction, $GR_{50(60d)}$)

- จำนวนหัวย่อยรุ่น M_1V_2
- ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวย่อยรุ่น M_1V_2
- จำนวนใบ และความยาวใบของหัวย่อยรุ่น M_1V_2

2.1.2 ผลของสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงของบัวดินรุ่น M_1V_3 ในสภาพปลอดเชื้อ

คัดเลือกหัวที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว 0.5 - 1.0 เซนติเมตร จากการทดลองที่ 4 ผ่าครึ่งหัวและดึงเอายอดออก ขยายเปลี่ยนอาหารใหม่ขวดละ 2 ขึ้น จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลอง

การบันทึกผลการทดลอง

1. จำนวนหัวย่อยและเส้นผ่านศูนย์กลางหัวของบัวดินรุ่น M_1V_3
2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหัวย่อยรุ่น M_1V_3 ในสภาพปลอดเชื้อ
 - รูปร่างลักษณะใบและหัวย่อย
 - สีใบและหัวย่อย

2.2 ผลของสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ ต่อลักษณะการเปลี่ยนแปลงของบัวดินรุ่น M_1V_2 ในแปลงปลูก

คัดเลือกหัวที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว 0.5 - 1.0 เซนติเมตร จากการทดลองที่ 4 นำปรับสภาพก่อนออกปลูกโดยวางไว้ในโรงเรือนให้ได้รับแสงธรรมชาติเป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำหัวย่อยออกจากขวดล้างวันออกด้วยน้ำสะอาด ตัดรากและใบทิ้ง ปลูกใส่ตะกร้าเพาะกล้าใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก รดน้ำวันละ 1 ครั้ง เมื่ออายุครบ 1 เดือน ขยายปลูกลงถาดหลุมขนาด 1 นิ้ว โดยใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก เลี้ยงในโรงเรือนปลูกต้นไม้ ณ แปลงทดลอง 1 ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หลังขยายลงถาดหลุม 2 สัปดาห์ รดปุ๋ยเกล็ดละลายน้ำ สูตร 20 - 20 - 20 เมื่ออายุครบ 2 เดือน ขยายปลูกลงกระถางขนาด 4 นิ้ว กระถางละ 1 หัว ใช้ ดิน แกลบ ขุยมะพร้าว และมูลสัตว์ ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 : 1 (นพพร, 2551) เป็นวัสดุปลูกและใส่ปุ๋ยเม็ดละลายช้า (slow release) สูตร 16 - 16 - 16 ครั้งช้อนชาต่อกระถาง วางนอกโรงเรือนให้ได้รับแสงแดด 100 เปอร์เซ็นต์ รดน้ำวันละ 1 ครั้ง

การบันทึกผลการทดลอง

1. การเจริญเติบโตของบัวดินหลังออกปลูก 2 เดือน

- ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว
- ความสูง และความกว้างหัว
- จำนวนใบ และความยาวใบ
- จำนวนราก และความยาวราก

2. การออกดอกของบัวดินรุ่น M_1V_2 ภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูก

3. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบและดอกของบัวดินรุ่น M_1V_2 ภายในระยะเวลา 6 เดือนหลังออกปลูก

4. การคัดเลือกต้นที่เป็นโพลีพลอยด์หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน

หลังจากออกปลูกแล้ว 6 เดือน คัดเลือกต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ คือ ใบหนาและใบหยาบ เมื่อได้ต้นที่มีลักษณะที่คาดว่าจะ เป็นโพลีพลอยด์แล้ว ทำการบันทึกการเจริญเติบโตต่างๆ ดังนี้

- จำนวนใบทั้งหมดต่อต้น
- ความยาวใบของใบที่ยาวที่สุด 3 ใบ
- ความกว้างใบของใบที่ยาวที่สุด 3 ใบ
- ความหนาใบของใบที่ยาวที่สุด 3 ใบ

5. จำนวนปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตรและความเซลล์ปากใบของหัวข่อยรุ่น M_1V_2 หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน

คัดเลือกใบจากต้นที่คาดว่าจะเป็พโพลิพลอยด์จากหัวข่อยรุ่น M_1V_2 โดยเลือกใบที่โตเต็มที่ เช็ดทำความสะอาด จากนั้นใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาบบนผิวใบด้านบน รอนน้ำยาทาเล็บแห้ง แล้วจึงลอกเอาน้ำยาทาเล็บออกจากผิวใบ โดยใช้สก็อตเทปใส นำสก็อตเทปใสที่ลอกติดบนกระจกสไลด์ ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า นับจำนวนปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร จำนวน 3 ตารางมิลลิเมตรต่อต้น และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า วัดความยาวเซลล์ปากใบโดยเลือกเซลล์ที่ปากใบกำลังเปิดจำนวน 30 เซลล์ต่อต้น โดยใช้โปรแกรม ZEISS AxioVision 3.1 ที่เชื่อมต่อกับกล้องจุลทรรศน์ (ZEISS, เยอรมัน) บันทึกผลและถ่ายภาพ

6. ศึกษาจำนวนโครโมโซมของหัวข่อยรุ่น M_1V_2 หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน

6.1 การเตรียมราก

คัดเลือกหัวข่อยที่มีลักษณะใบหนาและหยาบ จากนั้นนำรากมาทำ pretreatment โดยเก็บรากในเวลา 9.30 และแช่ในสารละลาย 8 - hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.002 โมลาร์ เป็นเวลา 21 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายรากแช่ในน้ำยาตรึงเซลล์ (Carnoy's solution) ซึ่งมีส่วนผสมของ glacial acetic acid และ ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 : 3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส

6.2 การย้อมสีโครโมโซม

นำรากที่ผ่านการแช่ในน้ำยาตรึงเซลล์ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง และทำการย่อยผนังเซลล์ (hydrolysis) ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำรากที่ย่อยผนังเซลล์แล้วแช่ใน Feulgen stain ในที่มีเวลานาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดทำแช่รากในน้ำกลั่น และนำปลายรากวางบนกระจกสไลด์ตัดรากให้เหลือเฉพาะส่วนของปลายราก หยดสี aceto - carmine 1 หยด บดปลายรากให้ละเอียดด้วยปากกิบปิดด้วยกระจกปิดสไลด์และใช้นิ้วกดเพื่อให้เซลล์และโครโมโซมแยกกระจายตัวออกจากกัน ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจนับจำนวนโครโมโซมและถ่ายภาพ

สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง

1. ศูนย์วิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
กรุงเทพมหานคร
2. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร
3. แปลงทดลอง 1 ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
กรุงเทพมหานคร
4. ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
กรุงเทพมหานคร

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 สิ้นสุดการทดลองเดือนพฤษภาคม 2555

ผลและวิจารณ์

ผล

การทดลองที่ 1 การชักนำบัวดินในสภาพปลอดเชื้อให้กลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมา

1.1 ผลของรังสีแกมมาต่อการรอดชีวิตของบัวดินรุ่น M_1V_1 และการเจริญเติบโตของบัวดินรุ่น M_1V_2

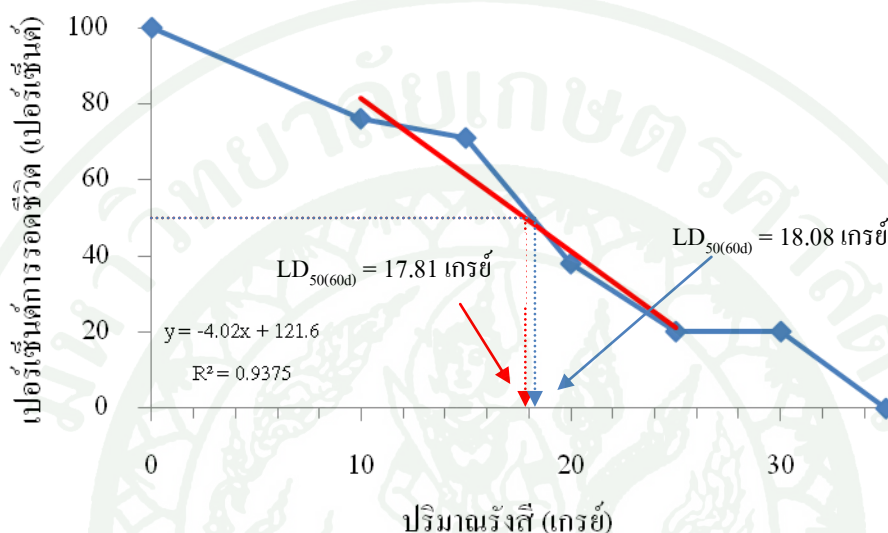
1.1.1 การรอดชีวิต

นำหัวเผ่าครึ่งของบัวดินที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 0 10 15 20 25 30 และ 35 เกรย์ หลังจากฉายรังสีแล้ว 60 วัน พบว่า ที่ปริมาณรังสี 0 เกรย์ (ชุดควบคุม) หัวเผ่าครึ่งรอดชีวิตทั้งหมด (45 ชั่น) และการรอดชีวิตของหัวเผ่าครึ่งมีค่าลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น โดยหัวเผ่าครึ่งที่ได้รับรังสี 10 15 20 25 30 และ 35 เกรย์ มีจำนวนชั่นที่รอดชีวิตเท่ากับ 0 ถึง 34 ชั่น และเมื่อนำจำนวนหัวเผ่าครึ่งที่รอดชีวิต มาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเทียบกับชุดควบคุม (100 เปอร์เซ็นต์) พบว่า ที่ปริมาณรังสี 10 15 20 25 30 และ 35 เกรย์ หัวเผ่าครึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 0 ถึง 76 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเทียบกับชุดควบคุมของหัวเผ่าครึ่งของบัวดินหลังได้รับรังสีแกมมาแล้ว 60 วัน ที่ปริมาณรังสี 0 10 15 20 25 30 และ 35 เกรย์

ปริมาณรังสี (เกรย์)	หัวเผ่าครึ่งทั้งหมด (ชั่น)	หัวเผ่าครึ่งที่รอดชีวิต (ชั่น)	การรอดชีวิตเทียบกับชุด ควบคุม (เปอร์เซ็นต์)
0	45	45	100
10	45	34	76
15	45	32	71
20	45	17	38
25	45	9	20
30	45	9	20
35	45	0	0

จากนั้น นำค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของหัวฝาค้างที่คำนวณได้มาเขียนกราฟและคำนวณหาปริมาณรังสีที่ทำให้หัวฝาค้างตายเป็นครึ่งของชุดควบคุม ($LD_{50(60d)}$) โดยวิธีลากเส้นตรงตัดกราฟพบว่า มีค่าเท่ากับ 18.08 เกรย์ และโดยวิธีแทนค่าในสมการ $y = ax + b$ ของกราฟสมการถดถอยเชิงเส้น (linear regression) ที่จุด 10 15 20 และ 25 เกรย์ พบว่า มีค่าเท่ากับ 17.81 เกรย์ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตและค่า $LD_{50(60d)}$ ของหัวฝาค้างของบัวดินหลังได้รับรังสีแกมมาแล้ว 60 วัน ที่ปริมาณรังสี 0 10 15 20 25 30 และ 35 เกรย์

- กราฟเส้นสีแดง แสดงค่า $LD_{50(60d)}$ ที่คำนวณโดยวิธีแทนค่าในสมการ $y = ax + b$
- กราฟเส้นสีน้ำเงิน แสดงค่า $LD_{50(60d)}$ ที่คำนวณโดยวิธีลากเส้นตัดกราฟ

1.1.2 การเจริญเติบโตหลังได้รับรังสีแกมมาแล้ว 60 วัน

จำนวนห่วยย่อยรุ่น M_1V_2 ที่เกิดจากหัวฝาค้าง (M_1V_1)

นำหัวฝาค้างของบัวดินที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 0 10 15 20 25 30 และ 35 เกรย์ หลังจากฉายรังสีแล้ว 60 วัน พบว่าจำนวนห่วยย่อยที่เกิดจากหัวฝาค้างมีแนวโน้มลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3) โดยหัวฝาค้างที่ได้รับรังสี 0 10 และ 15 เกรย์ มีจำนวนห่วยย่อยเฉลี่ย 1.7 1.4 และ 1.2 หัว ตามลำดับ และมีจำนวนห่วยย่อยเฉลี่ยต่างจากหัวฝาค้างที่ได้รับรังสี 20 25 และ 30 เกรย์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดย

หัวฝาค้างที่ได้รับรังสี 20 เกรย์ มีจำนวนหัวย่อยเฉลี่ย 0.4 หัว และหัวฝาค้างที่ได้รับรังสี 25 และ 30 เกรย์ ไม่มีหัวย่อยเกิดขึ้น (ตารางที่ 2) และที่ปริมาณรังสี 35 เกรย์ หัวฝาค้างไม่รอดชีวิตทั้งหมด

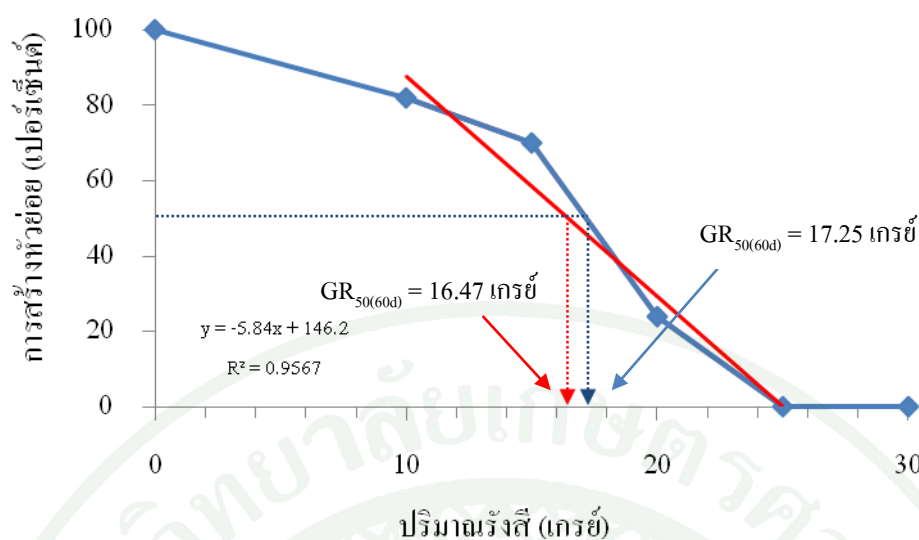
ตารางที่ 2 จำนวนหัวย่อยรุ่น M_1V_2 ของบัวดินหลังได้รับรังสีแกมมาแล้ว 60 วัน ที่ปริมาณรังสี 0 10 15 20 25 และ 30 เกรย์

ปริมาณรังสี (เกรย์)	หัวย่อยรุ่น M_1V_2 เฉลี่ย (หัว)	การสร้างหัวย่อยรุ่น M_1V_2 เทียบกับชุด ควบคุม (เปอร์เซ็นต์)
0 (ชุดควบคุม)	1.7 ^{a1/}	100
10	1.4 ^a	82
15	1.2 ^a	71
20	0.4 ^b	24
25	0 ^b	0
30	0 ^b	0
F - test	*	
C.V. (%)	10.33	

หมายเหตุ * ทริตเมนต์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^{1/} ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากนั้น นำค่าเปอร์เซ็นต์การสร้างหัวย่อยของหัวฝาค้างที่คำนวณได้มาเขียนกราฟ และคำนวณหาปริมาณรังสีที่ทำให้หัวฝาค้างมีจำนวนการสร้างหัวย่อยลดลงเป็นครึ่งของชุดควบคุม ($LD_{50(60d)}$) โดยวิธีลากเส้นตรงตัดกราฟพบว่า มีค่าเท่ากับ 17.25 เกรย์ และโดยวิธีแทนค่าในสมการ $y = ax + b$ ของกราฟสมการถดถอยเชิงเส้น (linear regression) ที่จุด 10 15 20 และ 25 เกรย์ พบว่า มีค่าเท่ากับ 16.47 เกรย์ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 เปอร์เซ็นต์การสร้างห้วยย่อยและค่า $GR_{50(60d)}$ ของหัวฝาคึ่งของบัวดินหลังได้รับรังสีแกมมาแล้ว 60 วัน ที่ปริมาณ 0 10 15 20 25 และ 30 เกรย์

- กราฟเส้นสีแดง แสดงค่า $LD_{50(60d)}$ ที่คำนวณโดยวิธีแทนค่าในสมการ $y = ax + b$
- กราฟเส้นสีน้ำเงิน แสดงค่า $LD_{50(60d)}$ ที่คำนวณโดยวิธีลากเส้นตัดกราฟ

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวจำนวนใบต่อหัวและความยาวใบต่อหัวของบัวดินรุ่น M_1V_2

นำหัวฝาคึ่งของบัวดินที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 0 10 15 20 25 30 และ 35 เกรย์ พบว่า หลังจากฉายรังสีแกมมาแล้ว 60 วัน ห้วยย่อยที่เกิดจากหัวฝาคึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3) โดยที่ปริมาณรังสี 0 10 15 และ 20 เกรย์ ห้วยย่อยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยเท่ากับ 0.36 0.38 0.42 และ 0.48 เซนติเมตร ตามลำดับ และห้วยย่อยที่เกิดจากหัวฝาคึ่งที่ได้รับรังสี 20 เกรย์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยมากที่สุดและต่างจากหัวที่เกิดจากหัวฝาคึ่งที่ได้รับรังสี 0 และ 10 เกรย์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับจำนวนใบต่อหัวและความยาวใบต่อหัว พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในแต่ละปริมาณรังสี โดยมีจำนวนใบต่อหัวเฉลี่ยเท่ากับ 3.5 3.2 3.3 และ 3.2 ใบ ตามลำดับ และมีความยาวใบต่อหัวเฉลี่ยเท่ากับ 4.4 4.7 5.4 และ 5.1 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ที่ปริมาณรังสี 35 เกรย์ หัวฝาคึ่งไม่รอดชีวิตทั้งหมด และที่ปริมาณรังสี 25 และ 30 เกรย์ หัวฝาคึ่งไม่มีการสร้างห้วยย่อย

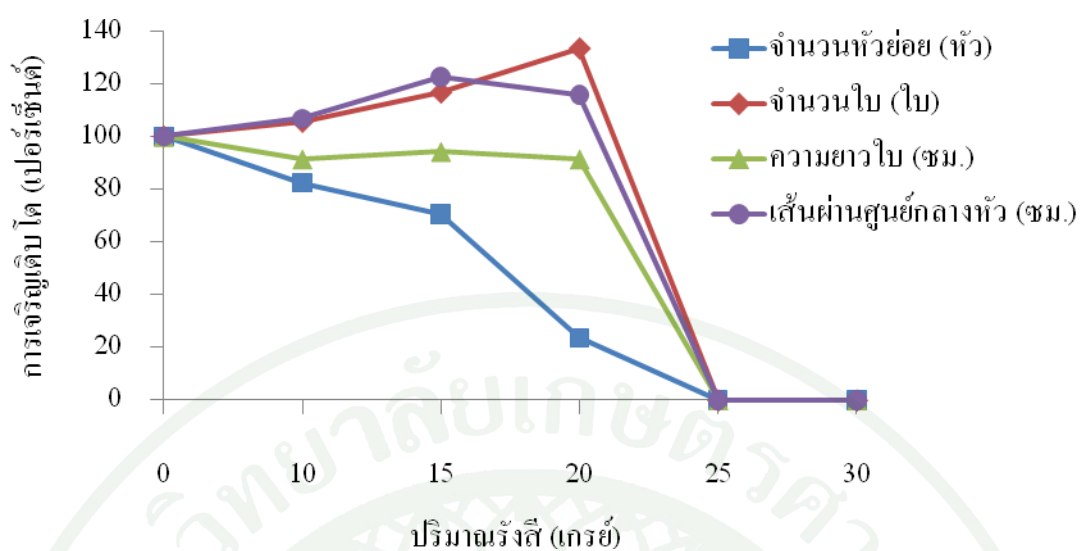
ตารางที่ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ย จำนวนใบต่อหัวเฉลี่ย และความยาวใบต่อหัวเฉลี่ยของ บัวดินรุ่น M_1V_2 หลังได้รับรังสีแกมมาแล้ว 60 วัน ที่ปริมาณรังสี 0 10 15 และ 20 เกรย์

ปริมาณรังสี (เกรย์)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง หัวเฉลี่ย (ซม.)	จำนวนใบต่อหัวเฉลี่ย (ใบ)	ความยาวใบต่อหัวเฉลี่ย (ซม.)
0 (ชุดควบคุม)	0.36 ^{b1/}	3.5	4.4
10	0.38 ^b	3.2	4.7
15	0.42 ^{ab}	3.3	5.4
20	0.48 ^a	3.2	5.1
F - test	*	ns	ns
C.V. (%)	8.9	5.78	17.25

หมายเหตุ ^{ns} ทรีตเมนต์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

* ทรีตเมนต์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^{1/} ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3 เปรี่เซนต์การเจริญเติบโตต่างๆ ของข้าวดินร่วน M_1V_2 หลังได้รับรังสีแกมมาแล้ว 60 วัน
ในปริมาณรังสี 0 10 15 20 25 และ 30 เกรย์

1.2 ผลของรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันต่อการเปลี่ยนแปลงของบัวดินรุ่น M_1V_3 ในสภาพปลอดเชื้อ

หลังจากบัวดินรุ่น M_1V_2 มีอายุได้ 3 เดือน ทำการคัดเลือกหัวที่สมบูรณ์และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว 0.5 - 1 เซนติเมตร จากหัวย่อยที่ได้รับรังสี 0 10 15 และ 20 เกรย์ ได้ปริมาณรังสีละ 20 หัว และจากหัวย่อยที่ได้รับรังสี 25 เกรย์ จำนวน 7 หัว จากนั้นทำการผ่าครึ่งหัวย่อยรุ่น M_1V_2 ดึงเอาขอดออกและเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ศึกษาการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของหัวย่อยรุ่น M_1V_3 ในสภาพปลอดเชื้อ ดังนี้

1.2.1 จำนวนหัวย่อย และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวของบัวดินรุ่น M_1V_3

หลังจากผ่าครึ่งหัวย่อยรุ่น M_1V_2 และเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 5 เดือน พบว่า หัวย่อยรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสี 0 10 15 20 และ 25 เกรย์ มีจำนวนการสร้างหัวย่อยรุ่น M_1V_3 เท่ากับ 61 50 29 114 และ 6 หัว ตามลำดับ และเมื่อคิดเป็นจำนวนหัวย่อยเฉลี่ยพบว่า หัวย่อยรุ่น M_1V_3 ที่ได้รับรังสี 20 เกรย์ มีจำนวนหัวย่อยเฉลี่ยมากที่สุด 6 หัว และมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับหัวย่อยรุ่น M_1V_3 ที่ได้รับรังสี 0 10 15 และ 25 เกรย์ ซึ่งมีจำนวนหัวย่อยเฉลี่ยเท่ากับ 2.2 2.8 2.6 และ 2.0 หัว ตามลำดับ (ตารางที่ 4) สำหรับเส้นผ่านศูนย์กลางหัวของหัวย่อยรุ่น M_1V_3 พบว่า หัวที่ได้รับรังสี 20 เกรย์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยมากที่สุด 0.47 เซนติเมตร และมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับหัวที่ได้รับรังสี 0 และ 10 เกรย์ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยเท่ากับ 0.31 และ 0.32 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับหัวที่ได้รับรังสี 15 และ 25 เกรย์ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยเท่ากับ 0.47 และ 0.38 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 จำนวนหัวย้อยรุ่น M_1V_2 ฝ่ำครั้งทั้งหมด จำนวนหัวย้อยรุ่น M_1V_3 เหล็ย และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเหล็ยของบัวดินรุ่น M_1V_3 หลังเล็ยในสภาพปลอดเช็อนาน 5 เดือน

ปริมาณรังสี (เกรย์)	จำนวนหัวย้อยรุ่น M_1V_2 ฝ่ำครั้ง (ชั้น)	จำนวนหัวย้อยรุ่น M_1V_3 เหล็ย (หัว)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว เหล็ยของหัวย้อยรุ่น M_1V_3 (ซม.)
0 (ชุดควบคุม)	40	2.2 ^{b1/}	0.32 ^{b1/}
10	40	2.8 ^b	0.31 ^b
15	40	2.6 ^b	0.41 ^{ab}
20	40	6.0 ^a	0.47 ^a
25	14	2.0 ^b	0.38 ^{ab}
F - test		*	*
C.V. (%)		23.60	16.30

หมายเหตุ * ทรีตเมนต์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^{1/} ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าค่าเหล็ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ที่ปริมาณรังสี 25 เกรย์ มี 2 ซ้ำ (ซ้ำละ 7 ชั้น)

ที่ปริมาณรังสี 30 เกรย์ หัวย้อยรุ่น M_1V_2 มีปริมาณไม่เพียงพอ (2 หัว) สำหรับทำการทดลองที่ 2

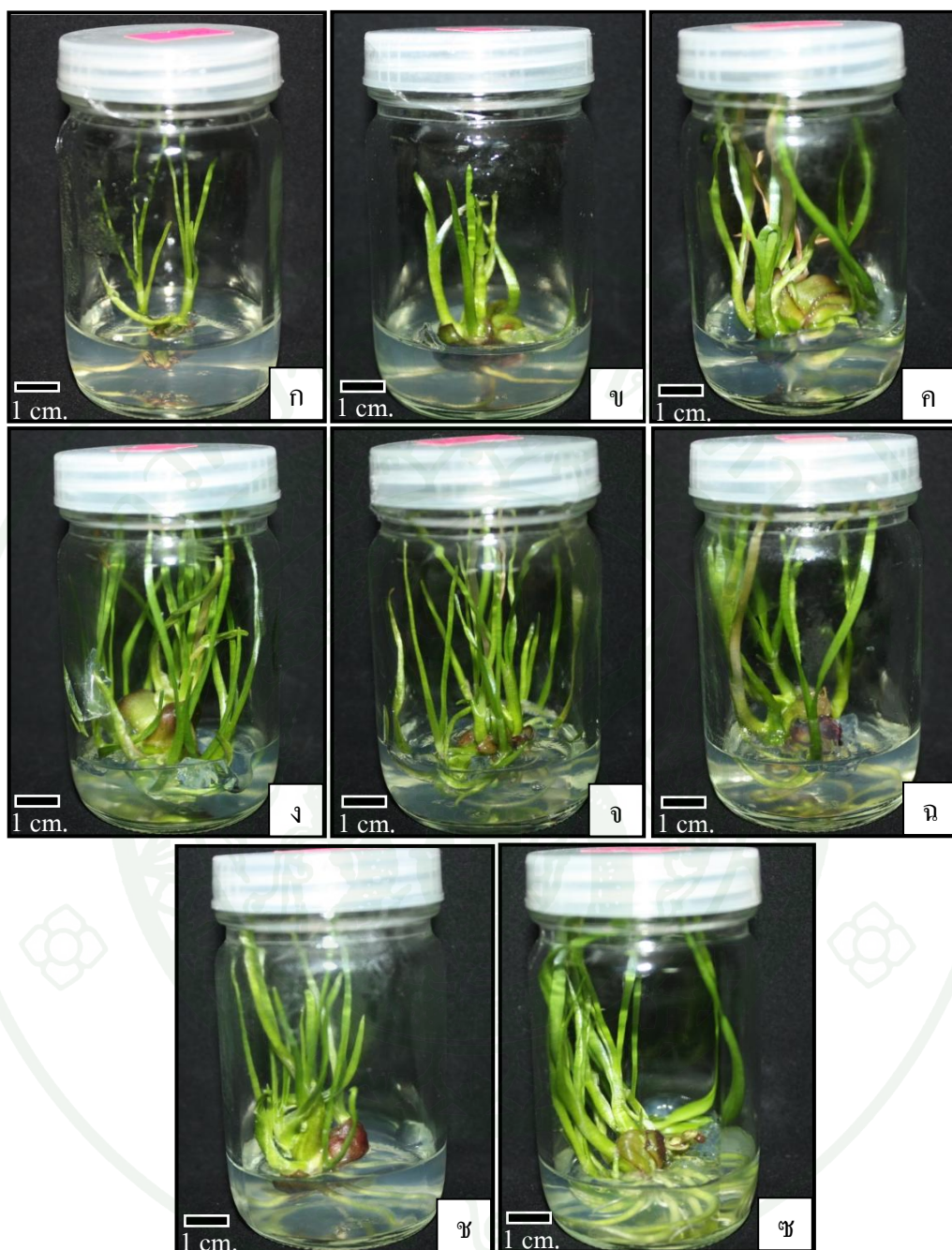
1.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบัวดินรุ่น M_1V_3 ในสภาพปลอดเชื้อ

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของห้วยย่อยรุ่น M_1V_3 ในสภาพปลอดเชื้อหลังได้รับรังสีแกมมาที่ปริมาณต่างๆ พบว่า เกิดลักษณะผิดปกติของใบและหัวในทุกระดับปริมาณรังสี โดยหัวที่ได้รับรังสี 0 10 15 20 และ 25 เกรย์ มีจำนวนหัวที่ผิดปกติทั้งหมด 15 18 20 14 และ 4 หัว ตามลำดับ (ตารางที่ 5) และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของห้วยย่อยรุ่น M_1V_3 ได้เท่ากับ 24 36 67 14 และ 66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) โดยลักษณะผิดปกติที่พบมีทั้งหมด 4 ลักษณะ คือ (1) ลักษณะกอใหญ่ (ภาพที่ 4) พบในห้วยย่อยที่ได้รับรังสี 10 และ 20 เกรย์ โดยห้วยย่อยรุ่น M_1V_3 ที่ผ่านการขยายขนาดใหญ่ขึ้นและห้วยย่อยรุ่น M_1V_3 มีใบขนาดใหญ่และหนากว่าใบของห้วยย่อยรุ่น M_1V_3 ที่ไม่ได้รับรังสี (ภาพที่ 4ก) (2) ห้วยย่อยผิดปกติ (ภาพที่ 5) พบในห้วยย่อยรุ่น M_1V_3 ที่ได้รับรังสี 0 10 15 20 และ 25 เกรย์ โดยหัวไม่พัฒนาและไม่สามารถสร้างฐานหัวเป็นของตัวเองได้ (3) โคนใบมีลักษณะใหญ่ปลายใบบิดโค้ง (ภาพที่ 6) พบในห้วยย่อยรุ่น M_1V_3 ที่ได้รับรังสี 0 10 15 20 และ 25 เกรย์ และ (4) ใบมีลักษณะบิดเป็นเกลียวตั้งแต่โคนใบถึงปลายใบ (ภาพที่ 7) พบในห้วยย่อยรุ่น M_1V_3 ที่ได้รับรังสี 10 20 และ 25 เกรย์

ตารางที่ 5 จำนวนหัวย่อยที่ผิดปกติ เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ และลักษณะที่ผิดปกติของบัวดินรุ่น M_1V_3 หลังเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 เดือน

ปริมาณรังสี (เกรย์)	หัวย่อยรุ่น M_1V_3 ทั้งหมด (หัว)	หัวย่อยรุ่น M_1V_3 ที่ ผิดปกติ (หัว)	ความผิดปกติ (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนหัวย่อยรุ่น M_1V_3 ที่มีลักษณะผิดปกติ (ต้น)			
				ลักษณะที่ 1	ลักษณะที่ 2	ลักษณะที่ 3	ลักษณะที่ 4
0 (ชุดควบคุม)	61	15	24		10	5	
10	50	18	36	1	8	7	2
15	29	20	67		12	7	
20	114	14	14	8	5	5	1
25	6	4	66		2	1	1

หมายเหตุ ที่ปริมาณรังสี 30 เกรย์ หัวย่อยรุ่น M_1V_2 มีปริมาณไม่เพียงพอ (2 หัว) สำหรับทำการทดลองที่ 2
 ลักษณะที่ 1 คือ กอใหญ่โดยหัวย่อยรุ่น M_1V_2 ที่ผ่าครึ่งมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้นและ M_1V_3 มีใบขนาดใหญ่และหนา (ภาพที่ 4)
 ลักษณะที่ 2 คือ หัวย่อยรุ่น M_1V_3 ผิดปกติ โดยหัวไม่พัฒนาและไม่สามารถสร้างฐานหัวเป็นของตัวเองได้ (ภาพที่ 5)
 ลักษณะที่ 3 คือ หัวย่อยรุ่น M_1V_3 มีลักษณะหัวที่มีโคนใบใหญ่ปลายใบบิดโค้ง (ภาพที่ 6)
 ลักษณะที่ 4 คือ หัวย่อยรุ่น M_1V_3 มีลักษณะหัวที่มีใบบิดเป็นเกลียวตั้งแต่โคนใบถึงปลายใบ (ภาพที่ 7)

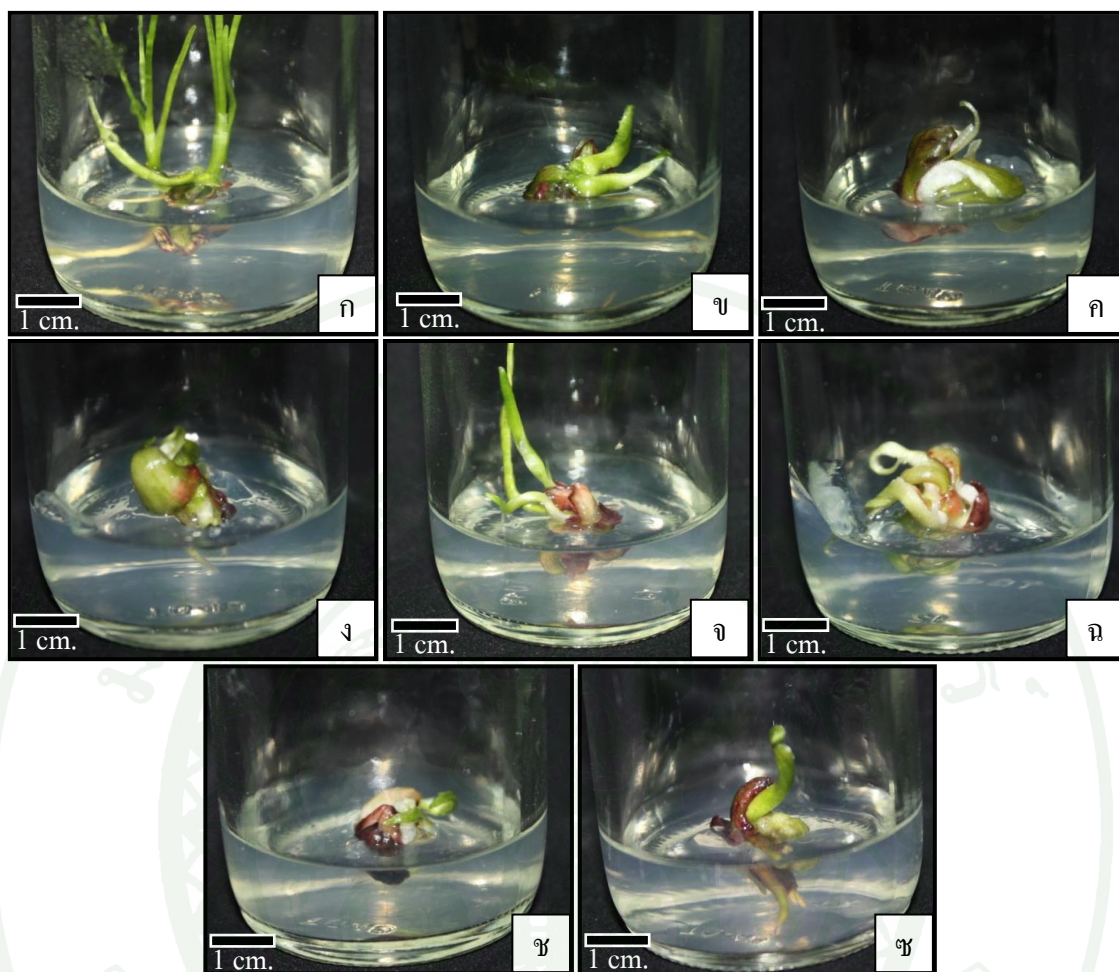


ภาพที่ 4 ลักษณะผิปกติของขนาดกอในบัวดินรุ่น M_1V_3 ที่ได้รับรังสีแกมมาในสภาพปลอดเชื้อ

ก = หัวย่อยมีลักษณะขนาดกอปกติ (ต้นควบคุม)

ข = หัวย่อยรุ่น M_1V_2 ที่ผ่าครึ่งมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้นและหัวย่อยรุ่น M_1V_3 มีใบขนาดใหญ่และหนา หลังได้รับรังสี 10 เกรย์

ค - ฮ = หัวย่อยรุ่น M_1V_2 ที่ผ่าครึ่งมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้นและหัวย่อยรุ่น M_1V_3 มีใบขนาดใหญ่และหนา หลังได้รับรังสี 20 เกรย์



ภาพที่ 5 ลักษณะผิดปกติของบัวดินรุ่น M_1V_3 ที่ได้รับรังสีแกมมาในสภาพปลอดเชื้อ

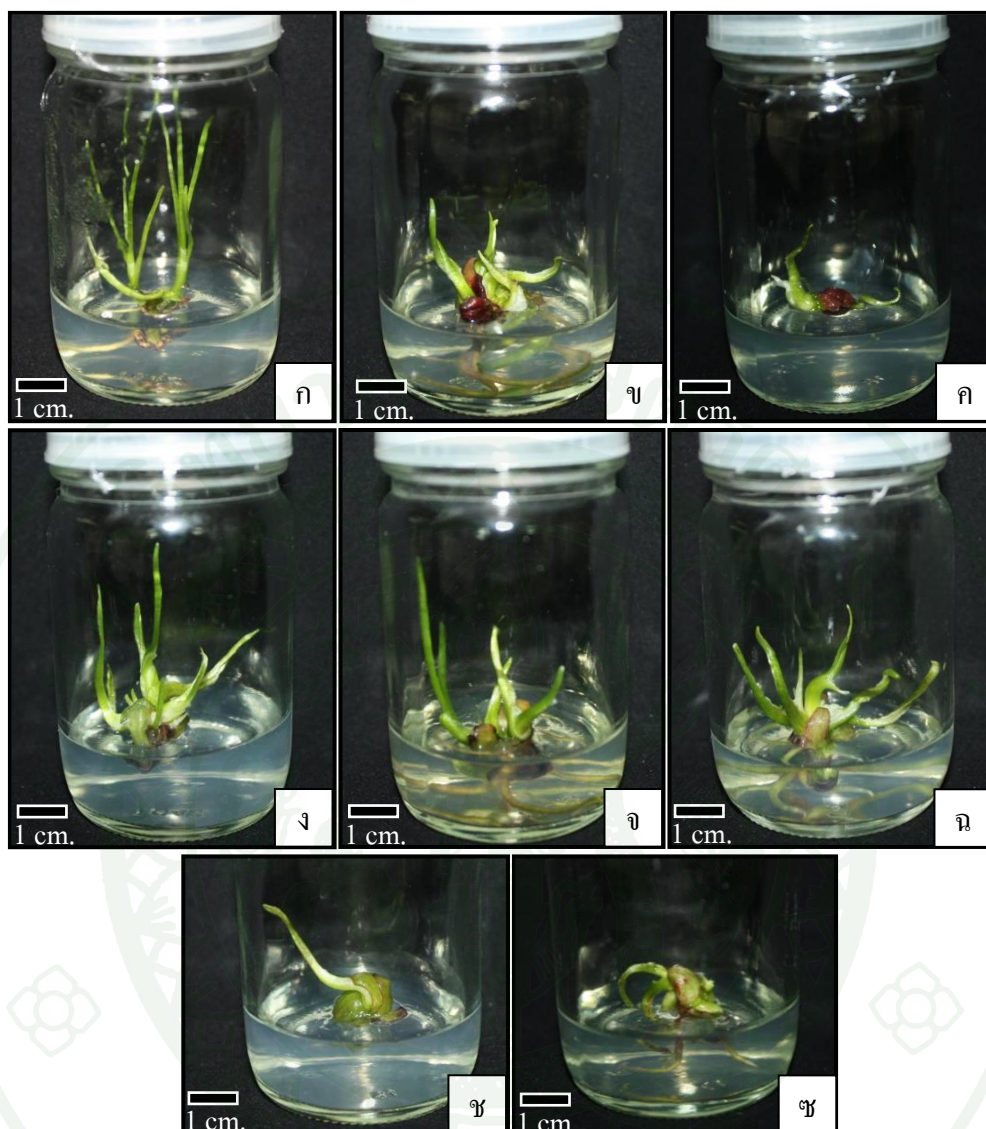
ก = หัวย่อยมีลักษณะปกติ (ต้นควบคุ่ม)

ข = หัวไม่พัฒนาเป็นหัวย่อยที่สมบูรณ์ หลังได้รับรังสี 10 เกรย์

ค, ง = หัวไม่พัฒนาเป็นหัวย่อยที่สมบูรณ์ หลังได้รับรังสี 15 เกรย์

จ - ช = หัวไม่พัฒนาเป็นหัวย่อยที่สมบูรณ์ หลังได้รับรังสี 20 เกรย์

ซ = หัวไม่พัฒนาเป็นหัวย่อยที่สมบูรณ์ หลังได้รับรังสี 25 เกรย์



ภาพที่ 6 ลักษณะผิปกติของโคนกาบใบและแผ่นใบของบัวดินรุ่น M_1V_3 ที่ได้รับรังสีแกมมา ในสภาพปลอดเชื้อ

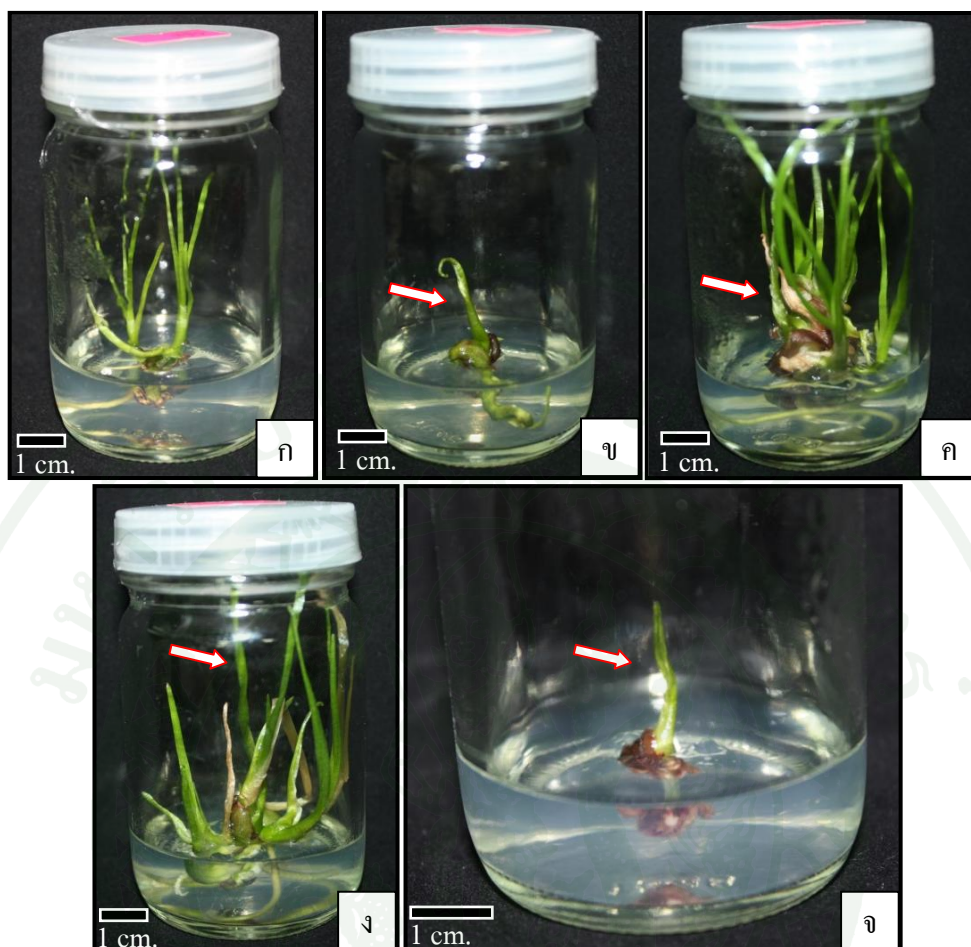
ก = ลักษณะใบปกติ (ต้นควบคุม)

ข, ค = หัวย่อยมีโคนกาบใบใหญ่ปลายใบบิดโค้ง หลังได้รับรังสี 10 เกรย์

ง, จ = หัวย่อยมีโคนกาบใบใหญ่ปลายใบบิดโค้ง หลังได้รับรังสี 15 เกรย์

ฉ, ซ = หัวย่อยมีโคนกาบใบใหญ่ปลายใบบิดโค้ง หลังได้รับรังสี 20 เกรย์

ซช = หัวย่อยมีโคนกาบใบใหญ่ปลายใบบิดโค้ง หลังได้รับรังสี 25 เกรย์



ภาพที่ 7 ลักษณะผิปกติของแผ่นใบของข้าวพันธุ์ M_1V_3 ที่ได้รับรังสีแกมมาในสภาพปลอดเชื้อ

ก = ลักษณะใบปกติ (ต้นควบคุม)

ข = ห่วงมีใบบิดเป็นเกลียวตั้งแต่โคนใบถึงปลายใบ หลังได้รับรังสี 10 เกรย์

ค - ง = ห่วงมีใบบิดเป็นเกลียวตั้งแต่โคนใบถึงปลายใบ หลังได้รับรังสี 20 เกรย์

จ = ห่วงมีใบบิดเป็นเกลียวตั้งแต่โคนใบถึงปลายใบ หลังได้รับรังสี 25 เกรย์

หมายเหตุ ปลายลูกศรชี้ คือ ใบที่ผิดปกติ

1.3 ผลของรังสีแกมมาต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของบัวดินรุ่น M_1V_2 ในสภาพแปลงทดลอง

หลังจากบัวดินรุ่น M_1V_2 มีอายุได้ 3 เดือน ทำการคัดเลือกหัวที่สมบูรณ์และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว 0.5 - 1 เซนติเมตร จากหัวย่อยที่ได้รับรังสี 0 10 15 และ 20 เกรย์ ได้ปริมาณรังสีละ 40 หัว และจากหัวย่อยที่ได้รับรังสี 25 เกรย์ จำนวน 8 หัว จากนั้นนำออกปลูกในแปลงทดลอง ศึกษาการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของหัวย่อยรุ่น M_1V_2 ในแปลงทดลอง ดังนี้

1.3.1 การเจริญเติบโตของบัวดินรุ่น M_1V_2 หลังออกปลูกแล้ว 2 เดือน

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว และความสูงหัว

หลังออกปลูกแล้ว 2 เดือน พบว่า หัวย่อยรุ่น M_1V_2 รอดชีวิตทุกต้นในทุกระดับปริมาณรังสี (0 ถึง 25 เกรย์) และเมื่อวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวพบว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นมีเปอร์เซ็นต์ลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น โดยหัวที่ได้รับรังสี 0 10 15 20 และ 25 เกรย์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 43 40 37 25 และ 16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หัวที่ได้รับรังสี 25 เกรย์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวที่เพิ่มขึ้นน้อยที่สุดและมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับหัวที่ได้รับรังสีน้อยกว่า (ตารางที่ 6) เมื่อวัดความสูงหัวพบว่า ความสูงหัวที่เพิ่มขึ้นมีเปอร์เซ็นต์ลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น โดยหัวที่ได้รับรังสี 0 10 15 20 และ 25 เกรย์ มีความสูงหัวที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 58 64 46 36 และ 16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และหัวที่ได้รับรังสี 25 เกรย์ มีความสูงหัวที่เพิ่มขึ้นน้อยที่สุดและมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับหัวที่ได้รับรังสี 0 10 และ 15 เกรย์ (ตารางที่ 6)

จำนวนใบ ความยาวใบ และความกว้างใบ

สำหรับใบพบว่า จำนวนใบและความยาวใบของหัวย่อยรุ่น M_1V_2 มีค่าลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 25 เกรย์ โดยหัวที่ได้รับรังสี 0 10 และ 15 เกรย์ มีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากันคือ 3.2 ใบ และมีค่าไม่ต่างจากหัวที่ได้รับรังสี 20 เกรย์ (2.9 ใบ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่มีจำนวนใบต่างกับหัวที่ได้รับรังสี 25 เกรย์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งมีจำนวนใบเฉลี่ยน้อยที่สุด 2.6 ใบ (ตารางที่ 7) สำหรับความยาวใบพบว่า ความยาวใบลดลงเมื่อ

ปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น โดยหัวที่ได้รับรังสี 0 10 15 20 และ 25 เกรย์ มีความยาวใบเฉลี่ยเท่ากับ 16.8 15.5 16.0 13.0 และ 12.5 เซนติเมตร ตามลำดับ และหัวที่ไม่ได้รับรังสี (0 เกรย์) มีความยาวใบมากที่สุดและต่างจากหัวที่ได้รับรังสี 20 และ 25 เกรย์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในทางตรงข้ามพบว่า ความกว้างใบนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น โดยหัวที่ได้รับรังสี 0 10 15 20 และ 25 เกรย์ มีความกว้างใบเฉลี่ยเท่ากับ 0.19 0.17 0.23 0.21 และ 0.25 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยหัวที่ได้รับรังสี 25 เกรย์ มีความกว้างใบเฉลี่ยมากที่สุดและมีค่าต่างจากหัวที่ได้รับรังสี 0 และ 10 เกรย์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 7)

จำนวนราก ความยาวราก และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางราก

สำหรับรากพบว่า หัวที่ได้รับรังสี 0 10 15 20 และ 25 เกรย์ มีจำนวนรากเฉลี่ยไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 4.9 4.8 5.2 4.8 และ 5.8 ราก ตามลำดับ (ตารางที่ 7) แต่ความยาวรากเฉลี่ยและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรากเฉลี่ยนั้นมีค่าลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่ม โดยหัวที่ได้รับรังสี 0 10 15 20 และ 25 เกรย์ มีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 7.1 7.4 8.3 4.8 และ 4.3 เซนติเมตร ตามลำดับ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรากเฉลี่ยเท่ากับ 0.18 0.13 0.15 0.13 และ 0.10 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 7) โดยหัวที่ได้รับรังสี 0 10 และ 15 เกรย์ มีความยาวรากเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่มีความยาวรากเฉลี่ยต่างจากหัวที่ได้รับรังสี 20 และ 25 เกรย์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และหัวที่ไม่ได้รับรังสี (0 เกรย์) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรากเฉลี่ยมากกว่าหัวที่ได้รับรังสีในปริมาณที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์) และความสูงหัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์) ของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมา หลังออกปลูกแล้ว 2 เดือน

ปริมาณรังสี (เกรย์)	เส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ย (ชม.)		เส้นผ่านศูนย์กลางหัวที่ เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์)	ความสูงหัวเฉลี่ย (ชม.)		ความสูงหัวที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์)
	ก่อนออกปลูก	หลังออกปลูก		ก่อนออกปลูก	หลังออกปลูก	
0 (ชุดควบคุม)	0.47	0.67	43 ^a	0.74	1.17	58 ^a
10	0.48	0.67	40 ^a	0.72	1.18	64 ^a
15	0.52	0.71	37 ^a	0.90	1.30	46 ^{ab}
20	0.53	0.66	25 ^{ab}	0.89	1.19	36 ^{bc}
25	0.58	0.67	16 ^b	1.15	1.30	16 ^c
F - test			*			*
C.V. (%)			34.60			33.37

หมายเหตุ * ทรีตเมนต์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^{1/} ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์
ที่ปริมาณรังสี 30 เกรย์ หัวย่อยรุ่น M_1V_2 มีปริมาณไม่เพียงพอ (2 หัว) สำหรับทำการทดลองที่ 3

ตารางที่ 7 การเจริญเติบโตของใบและรากของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมา หลังออกปลูกแล้ว 2 เดือน

ปริมาณรังสี (เกรย์)	ใบ			ราก		
	จำนวนใบ (ใบ)	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนราก (ราก)	ความยาวราก (ซม.)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางราก (ซม.)
0 (ชุดควบคุม)	3.2 ^a	16.8 ^a	0.19 ^{bc}	4.9	7.1 ^a	0.18 ^a
10	3.2 ^a	15.5 ^b	0.17 ^c	4.8	7.4 ^a	0.13 ^b
15	3.2 ^a	16.0 ^{ab}	0.23 ^{ab}	5.2	8.3 ^a	0.15 ^b
20	2.9 ^{ab}	13.0 ^c	0.21 ^{abc}	4.8	4.8 ^b	0.13 ^b
25	2.6 ^b	12.5 ^c	0.25 ^a	5.8	4.3 ^b	0.10 ^c
F - test	*	*	*	ns	*	*
C.V. (%)	8.50	4.42	15.60	15.35	13.17	14.03

หมายเหตุ ^{ns} ทรีตเมนต์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

* ทรีตเมนต์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

^{1/} ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวดิ่งแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ที่ปริมาณรังสี 30 เกรย์ ห้วยย่อยรุ่น M_1V_2 มีปริมาณไม่เพียงพอ (2 หัว) สำหรับทำการทดลองที่ 2

1.3.2 การออกดอกของบัวดินรุ่น M_1V_2 ภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูก

เมื่อนำหัวบัวดินที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณ 0 10 15 20 และ 25 เกรย์ ออกปลูกในสภาพแปลงทดลองพบว่า บัวดินที่ได้รับรังสี 15 และ 25 เกรย์ ออกดอกแรกก่อนทรีตเมนต์อื่น โดยออกดอกในระยะเวลาใกล้เคียงกันคือ ออกดอกแรกหลังจากออกปลูกแล้ว 128 และ 139 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 8) หลังจากหัวที่ได้รับรังสี 10 และ 25 เกรย์ ออกดอกแล้ว 1 เดือน หัวที่ได้รับรังสี 0 10 และ 20 เกรย์ จึงออกดอกแรก โดยในต้นที่ไม่ได้รับรังสี (0 เกรย์) ออกดอกแรกหลังออก 157 วัน และในต้นที่ได้รับรังสี 10 และ 20 เกรย์ ออกดอกแรกพร้อมกันหลังจากออกปลูก 153 วัน (ตารางที่ 8)

หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน พบว่า จำนวนต้นที่ออกดอก จำนวนดอกที่ออกทั้งหมด และจำนวนดอกเฉลี่ยต่อต้นมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น โดยในต้นที่ได้รับรังสี 0 10 15 และ 20 เกรย์ มีต้นที่ออกดอกทั้งหมด 8 13 14 และ 22 ต้น ตามลำดับ จากจำนวนต้นที่ออกปลูกทั้งหมด 40 ต้น และต้นที่ได้รับรังสี 25 เกรย์ ออกดอกทุกต้น จากจำนวนต้นที่ออกปลูกมีทั้งหมด 7 ต้น (ตารางที่ 8) สำหรับจำนวนดอกที่ออกทั้งหมดในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูกพบว่า ต้นที่ได้รับรังสี 0 10 15 20 และ 25 เกรย์ มีจำนวนดอกที่ออกทั้งหมด 9 15 16 28 และ 20 ดอก ตามลำดับ และมีจำนวนดอกเฉลี่ยต่อต้นเท่ากับ 1.13 1.15 1.14 1.27 และ 2.86 ดอก ตามลำดับ โดยบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีปริมาณ 25 เกรย์ มีจำนวนดอกเฉลี่ยต่อต้นมากที่สุด (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 การออกดอกของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมาภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูก

ปริมาณรังสี (เกรย์)	ระยะเวลาที่ดอกแรกบาน หลังออกปลูก (วัน)	จำนวนต้นที่ออกปลูก (ต้น)	จำนวนต้นที่ออกดอก (ต้น)	จำนวนดอกที่ออกทั้งหมด (ดอก)	จำนวนดอกต่อต้นเฉลี่ย (ดอก)
0 (ชุดควบคุม)	157	40	8	9	1.13
10	153	40	13	15	1.15
15	128	40	14	16	1.14
20	153	40	22	28	1.27
25	139	7	7	20	2.86

หมายเหตุ บัวดิน 1 หัวสามารถออกดอกได้มากกว่า 1 ดอก

บัวดินที่ได้รับรังสีแกมมา 30 เกรย์ มีลักษณะหัวและใบไม่สมบูรณ์จึงไม่สามารถออกปลูกได้

1.3.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ ดอกและอวัยวะสืบพันธุ์ของบัวดินรุ่น M_1V_2 หลังออกปลูกภายในระยะเวลา 6 เดือน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ

หลังจากนำบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสี 0 ถึง 25 เกรย์ ออกปลูกและศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบพบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีใบใน 3 ลักษณะ ได้แก่ 1. ใบมีแถบสีขาว พบในต้นที่ได้รับรังสี 20 เกรย์ (M_1V_4) จำนวน 1 ต้น จากจำนวนต้นที่ออกปลูกทั้งหมด 40 ต้น (ตารางที่ 9) ลักษณะแถบสีขาวเกิดบริเวณขอบใบทั้งด้านซ้ายและด้านขวาตลอดความยาวของใบ ตั้งแต่โคนใบจรดปลายใบ (ภาพที่ 8ข) โดยที่บริเวณกลางใบยังคงเป็นสีเขียวเหมือนกับใบของต้นที่ไม่ได้รับรังสี (ภาพที่ 8ก) 2. ใบมีแถบสีเขียวอ่อน พบในต้นที่ได้รับรังสี 20 เกรย์ (M_1V_3) จำนวน 1 ต้น จากจำนวนต้นที่ออกปลูกทั้งหมด 40 ต้น (ตารางที่ 9) โดยแถบสีเขียวอ่อนไม่ได้เกิดทั่วทั้งใบ แต่เกิดเป็นแถบเล็กๆ บริเวณขอบใบตลอดความยาวใบตั้งแต่โคนใบจรดปลายใบ (ภาพที่ 8ค) โดยที่บริเวณอื่นของใบยังคงเป็นสีเขียวเหมือนกับใบของต้นที่ไม่ได้รับรังสี (ภาพที่ 8ก) และ 3. ใบสีเงิน พบในต้นที่ได้รับรังสี 15 เกรย์ (M_1V_3) จำนวน 1 ต้น จากจำนวนต้นที่ออกปลูกทั้งหมด 40 ต้น (ตารางที่ 9) และพบว่าทุกใบเป็นสีเงินทั้งหมด โดยลักษณะใบสีเงินปรากฏทั้งผิวใบด้านบนและผิวใบด้านล่างตลอดความยาวของใบ ยกเว้นบริเวณขอบใบซึ่งมีลักษณะเป็นสีขาว (ภาพที่ 8ง) เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การกลายของใบพบว่า ในต้นที่ได้รับรังสี 20 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การกลายของใบ 5 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่ได้รับรังสี 15 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การกลายของใบ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9)

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของใบที่เป็นแถบสีขาวและแถบสีเขียวอ่อนเป็นลักษณะที่ไม่ปรากฏในบัวดินรุ่นถัดไป และใบใหม่ที่เกิดจากต้นที่มีใบแถบสีขาวและแถบสีเขียวอ่อนมีสีใบเป็นสีเขียวเหมือนในต้นที่ไม่ได้รับรังสี แสดงว่าลักษณะสีขาวและสีเขียวอ่อนของใบเป็นลักษณะที่ไม่คงตัวเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ และไม่สามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกรุ่นถัดไปได้ ยกเว้นลักษณะใบสีเงินซึ่งพบว่าเป็นลักษณะที่ปรากฏในบัวดินรุ่นถัดไปและใบใหม่ที่เกิดมีลักษณะใบเป็นสีเงินเหมือนใบเดิม แสดงว่าลักษณะใบสีเงินเป็นลักษณะที่คงตัวและสามารถถ่ายทอดลักษณะไปสู่ลูกรุ่นถัดไปได้

ตารางที่ 9 ลักษณะและจำนวนต้นที่มีใบผิดปกติของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมา หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน

ปริมาณรังสี (เกรย์)	ต้นที่ออกปลูก ทั้งหมด (ต้น)	ลักษณะ จำนวนต้นและเปอร์เซ็นต์การกลายของใบ					
		แถบสีขาว (ต้น)	เปอร์เซ็นต์การกลาย (เปอร์เซ็นต์)	แถบสีเขียวอ่อน (ต้น)	เปอร์เซ็นต์การกลาย (เปอร์เซ็นต์)	ใบสีเงิน (ต้น)	เปอร์เซ็นต์การกลาย (เปอร์เซ็นต์)
0 (ชุดควบคุม)	40	-	-	-	-	-	-
10	40	-	-	-	-	-	-
15	40	-	-	-	-	1	2.5
20	40	1	2.5	1	2.5	-	-
25	7	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ บัวดิน 1 ต้น สามารถมีลักษณะผิดปกติได้มากกว่า 1 ลักษณะ



ภาพที่ 8 ลักษณะการกลายของสีใบของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมาหลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน

ก = ลักษณะใบสีเขียวของบัวดินที่ไม่ได้รับรังสีแกมมา (M_1V_3)

ข = ลักษณะใบที่มีแถบสีขาวของบัวดิน หลังได้รับรังสี 20 เกรย์ (M_1V_4)

ค = ลักษณะใบที่มีแถบสีเขียวอ่อนของบัวดิน หลังได้รับรังสี 20 เกรย์ (M_1V_3)

ง = ลักษณะใบสีเงินของบัวดิน หลังได้รับรังสี 15 เกรย์ (M_1V_3)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกและอวัยวะสืบพันธุ์

เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกพบว่า สามารถจัดลักษณะผิดปกติของดอกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ลักษณะยอดเกสรเพศเมียผิดปกติ ได้แก่ 1. รูปร่างผิดปกติ โดยยอดเกสรเพศเมียมีการกางออกของแฉกในองศาที่ไม่เท่ากัน พบในต้นที่ได้รับรังสี 10 เกรย์ (ภาพที่ 9ข) 15 เกรย์ (ภาพที่ 9ค) 20 เกรย์ (ภาพที่ 9ง) และ 25 เกรย์ (ภาพที่ 9จ) ซึ่งโดยปกติแล้วยอดเกสรเพศเมียจะมี 3 แฉก และกางออกในองศาที่เท่ากัน (ภาพที่ 9ก) 2. ลักษณะยอดเกสรเพศเมียมีจำนวนแฉกเพิ่มขึ้น 1 แฉก ทำให้ยอดเกสรเพศเมียมี 4 แฉก พบในต้นที่ได้รับรังสี 10 เกรย์ (ภาพที่ 9ฉ) 20 เกรย์ (ภาพที่ 9ช) และ 25 เกรย์ (ภาพที่ 9ฉ) 3. สียอดเกสรเพศเมียเปลี่ยนจากสีชมพูอ่อนเป็นสีขาว พบในต้นที่ได้รับรังสี 25 เกรย์ (ภาพที่ 9จ และ ฉ) กลุ่มที่ 2 ลักษณะเกสรเพศผู้ผิดปกติ ได้แก่ 1. มีจำนวนเกสรเพศผู้ขาด 1 อัน ทำให้มีเกสรเพศผู้ 5 อัน พบในต้นที่ได้รับรังสี 10 เกรย์ (ภาพที่ 10ข) และ 25 เกรย์ (ภาพที่ 10ค) 2. มีจำนวนเกสรเพศผู้เพิ่มขึ้น 1 อัน ทำให้มีเกสรเพศผู้ 7 อัน พบในต้นที่ได้รับรังสี 10 เกรย์ (ภาพที่ 10ง) กลุ่มที่ 3 ลักษณะดอกผิดปกติ ได้แก่ 1. กลีบดอกมีรูปร่างผิดปกติ โดยมีกลีบดอกบิดเบี้ยวพบในต้นที่ได้รับรังสี 10 เกรย์ (ภาพที่ 11ข) และ 20 เกรย์ (ภาพที่ 12ข) ลักษณะกลีบดอกชั้นในตั้งตรงพบในต้นที่ได้รับรังสี 20 เกรย์ (ภาพที่ 12ค) 2. กลีบดอกต่างโดยเกิดแถบสีขาวขึ้นที่กลีบดอกพบในต้นที่ได้รับรังสี 10 เกรย์ (ภาพที่ 11ค) 3. มีจำนวนกลีบดอกเพิ่มขึ้นมา 1 และ 2 กลีบดอก พบในต้นที่ได้รับรังสี 10 เกรย์ (ภาพที่ 11ง และ 11จ) 4. ดอกคู่ โดยมีก้านช่อดอกติดกันตั้งแต่โคนก้านช่อดอกไปจนถึงก้านดอกย่อยพบในต้นที่ได้รับรังสี 10 เกรย์ (ภาพที่ 11ฉ) และ 5. ดอกที่มีโคนกลีบดอกแคบปลายกลีบดอกแหลม พบในต้นที่ได้รับรังสี 25 เกรย์ (ภาพที่ 12ง - ฉ)

ไม่พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของดอกที่เกิดกับบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสี 0 10 15 และ 20 เกรย์ ในบัวดินรุ่นถัดไปและเมื่อบัวดินรุ่น M_1V_2 ออกดอกอีกพบว่า ดอกมีลักษณะปกติเหมือนดอกที่เกิดจากต้นที่ไม่ได้รับรังสีเกมมา ยกเว้น ลักษณะโคนกลีบดอกแคบปลายกลีบดอกแหลมและยอดเกสรเพศเมียสีขาวที่พบในบัวดินที่ได้รับรังสี 25 เกรย์ ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถถ่ายทอดไปยังลูกรุ่นถัดไป (M_1V_3) ได้ และดอกที่ 2 และ 3 ในดินรุ่น M_1V_2 ก็มีลักษณะโคนกลีบดอกแคบปลายกลีบดอกแหลมและยอดเกสรเพศเมียสีขาวเช่นเดียวกับดอกแรก โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การกลายของลักษณะโคนกลีบดอกแคบปลายกลีบดอกแหลม และยอดเกสรเพศเมียสีขาวได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในทั้งสองลักษณะ (ตารางที่ 10 และ 11)

ตารางที่ 10 ลักษณะผิดปกติของเกสรเพศเมีย และเกสรเพศผู้ของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมาภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูก

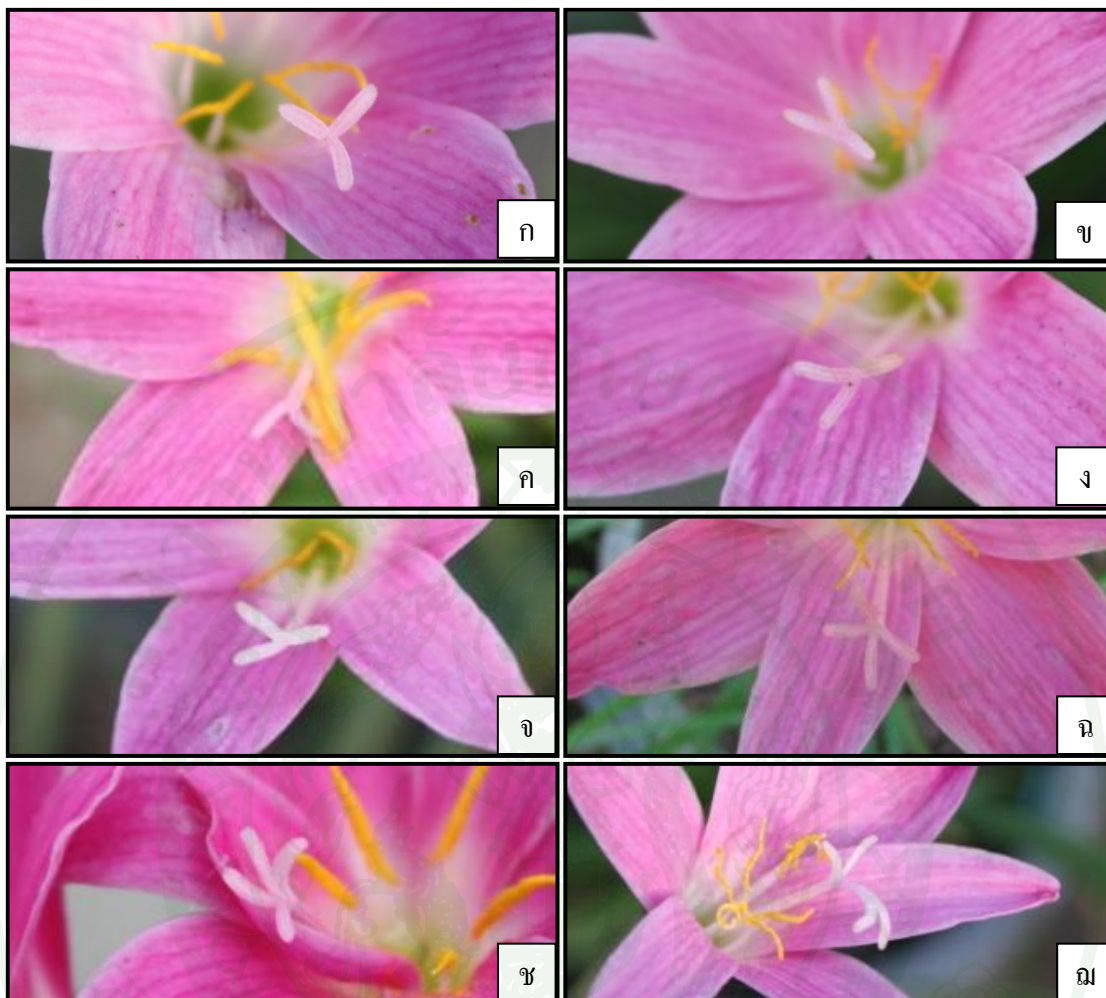
ปริมาณรังสี (เกรย์)	จำนวนดอก ทั้งหมด (ดอก)	จำนวนยอดเกสรเพศเมียที่ผิดปกติ (อัน) และเปอร์เซ็นต์การกลาย (เปอร์เซ็นต์)			จำนวนเกสรเพศผู้ที่ผิดปกติ (อัน) และเปอร์เซ็นต์การกลาย (เปอร์เซ็นต์)	
		รูปร่างผิดปกติ	มี 4 แฉก	สีขาว	มี 5 ตัว	มี 7 ตัว
0 (ชุดควบคุม)	9	-	-	-	-	-
10	15	2 (20%)	1 (7%)	-	1 (7%)	1 (7%)
15	16	1 (6%)	-	-	-	-
20	28	7 (25%)	-	2 (7%)	-	-
25	20	2 (10%)	1 (5%)	20 (100%)	1 (5%)	-

หมายเหตุ บัวดิน 1 ดอก สามารถมีลักษณะผิดปกติได้มากกว่า 1 ลักษณะ

ตารางที่ 11 ลักษณะผิดปกติของดอกบัวดินรุ่น M₁V₂ ที่ได้รับรังสีแกมมา ภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูก

ปริมาณรังสี (เกรย์)	จำนวนดอก ทั้งหมด (ดอก)	จำนวนดอกที่ผิดปกติในลักษณะต่างๆ (ดอก) และเปอร์เซ็นต์การกลาย (เปอร์เซ็นต์)					
		กลีบดอกอยู่ผิดตำแหน่ง	ดอกค้าง	มี 7 กลีบ	มี 8 กลีบ	ดอกคู่	โคนกลีบดอกแคบ
0 (ชุดควบคุม)	9	-	-	-	-	-	-
10	15	1 (7%)	1 (7%)	1 (7%)	1 (7%)	1 (7%)	-
15	16	-	-	-	-	-	-
20	28	2 (7%)	-	-	-	-	-
25	20	-	-	-	-	-	20 (100%)

หมายเหตุ บัวดิน 1 ดอก สามารถมีลักษณะผิดปกติได้มากกว่า 1 ลักษณะ



ภาพที่ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนไปของยอดเกสรเพศเมียในบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมา

ก = ลักษณะยอดเกสรเพศที่เมียปกติ (ชุดควบคุม)

ข = ยอดเกสรเพศเมียกางไม่เท่ากัน หลังได้รับรังสี 10 เกรย์

ค = ยอดเกสรเพศเมียกางไม่เท่ากัน หลังได้รับรังสี 15 เกรย์

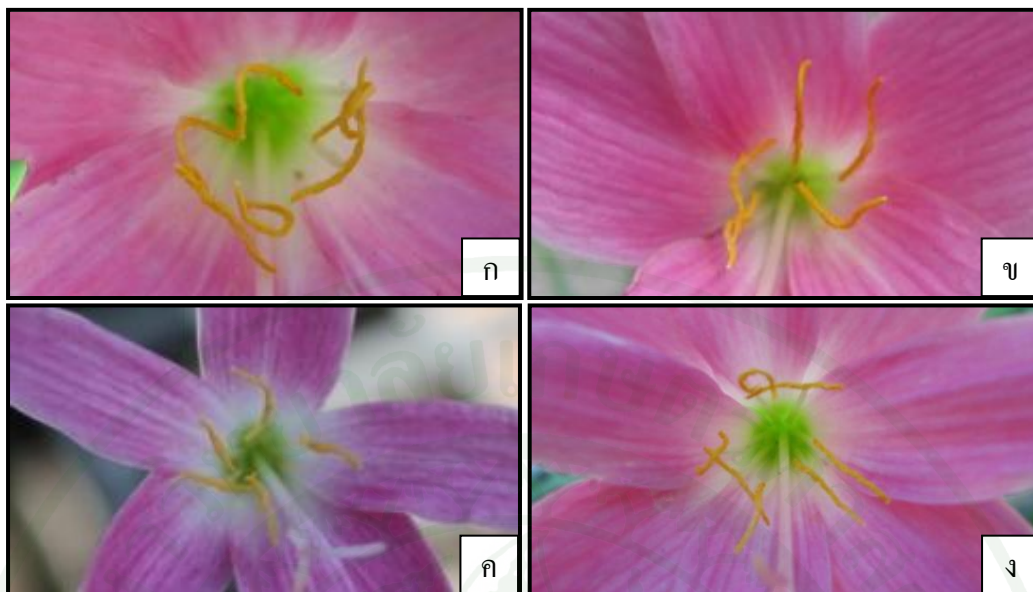
ง = ยอดเกสรเพศเมียกางไม่เท่ากัน หลังได้รับรังสี 20 เกรย์

จ = ยอดเกสรเพศเมียกางไม่เท่ากันและมีสีขาว หลังได้รับรังสี 25 เกรย์

ฉ = ยอดเกสรเพศเมียมี 4 แฉก หลังได้รับรังสี 10 เกรย์

ช = ยอดเกสรเพศเมียมี 4 แฉก หลังได้รับรังสี 20 เกรย์

ณ = ยอดเกสรเพศเมียมี 4 แฉก และมีสีขาว หลังได้รับรังสี 25 เกรย์



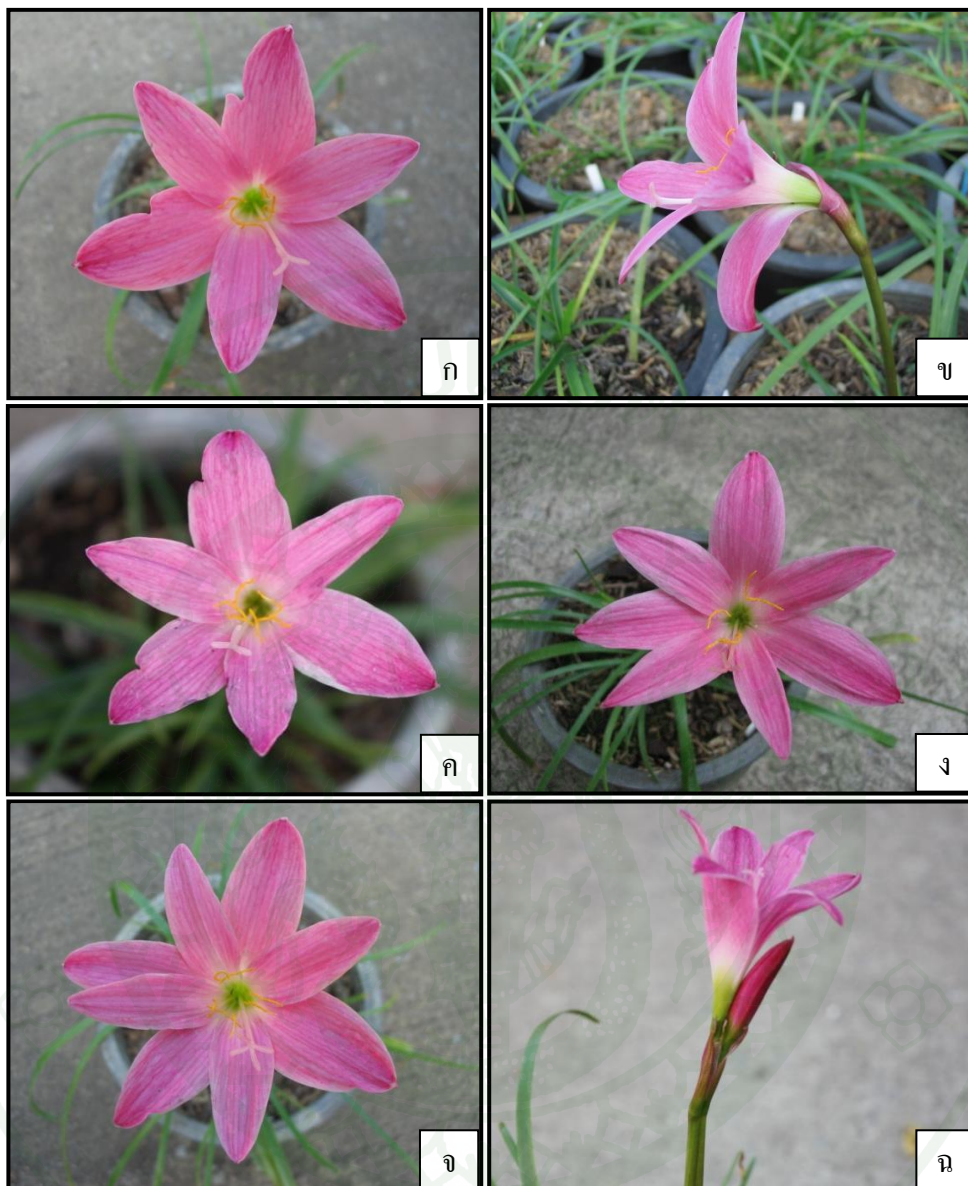
ภาพที่ 10 จำนวนเกสรเพศผู้ที่เปลี่ยนไปของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมา

ก = เกสรเพศผู้ปกติ 6 อัน (ต้นควบคุม)

ข = เกสรเพศผู้ 5 อัน หลังได้รับรังสี 10 เกรย์

ค = เกสรเพศผู้ 5 อัน หลังได้รับรังสี 25 เกรย์

ง = เกสรเพศผู้ 7 อัน หลังได้รับรังสี 10 เกรย์



ภาพที่ 11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปของดอกบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณ 10 เกรย์

ก = ลักษณะดอกปกติ (ต้นควบคุม)

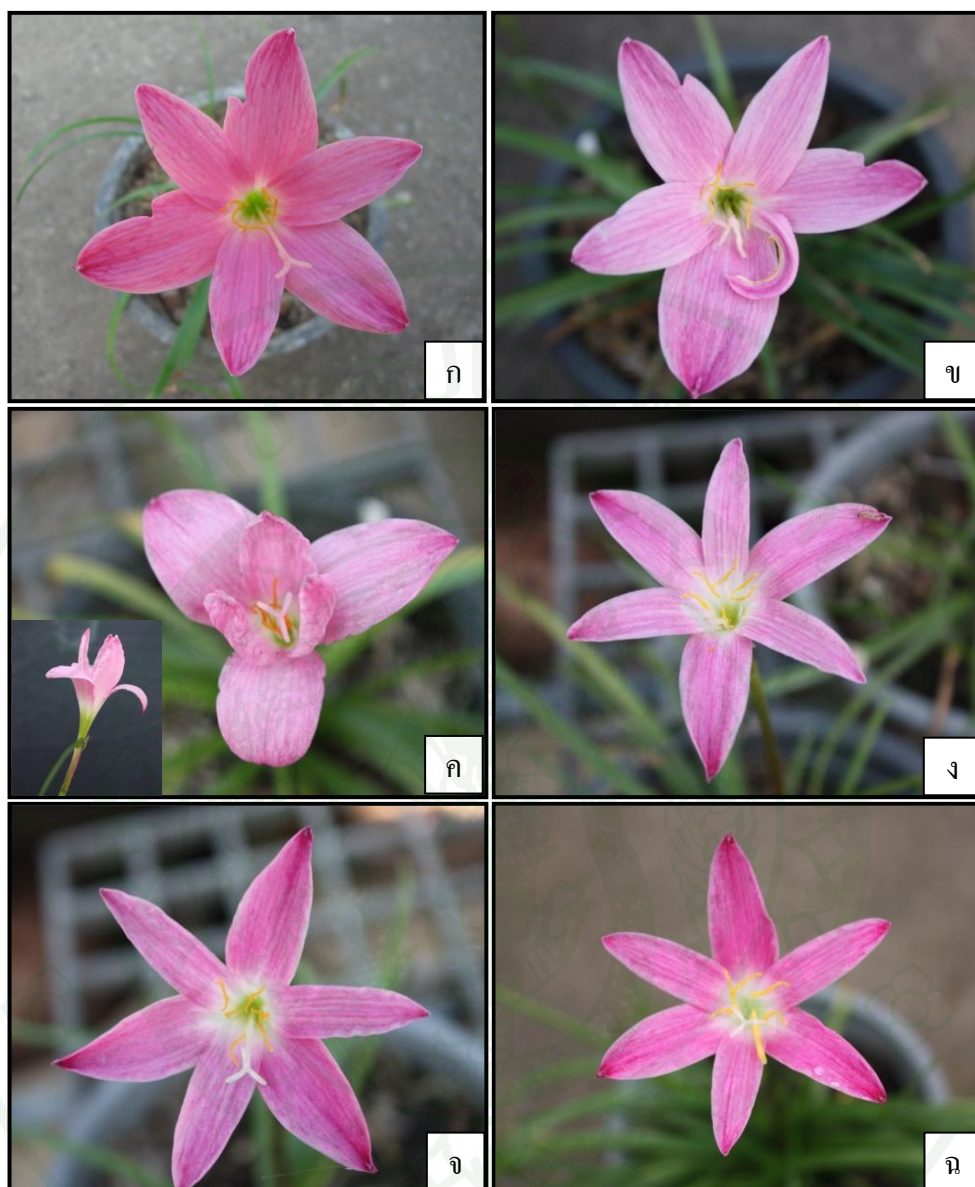
ข = ลักษณะกลีบดอกบิดเบี้ยว

ค = ลักษณะกลีบดอกต่าง

ง = กลีบดอก 7 กลีบ

จ = กลีบดอก 8 กลีบ

ฉ = ดอก 2 ดอก ที่มีส่วนของก้านดอกติดกัน



ภาพที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปของดอกบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณ 20 และ 25 เกรย์

ก = ลักษณะดอกปกติ (ต้นควบคุม)

ข = ลักษณะกลีบดอกบิดเบี้ยว (ได้รับรังสี 20 เกรย์)

ค = ลักษณะกลีบดอกชั้นในตั้ง (ได้รับรังสี 20 เกรย์)

ง - ฉ = ลักษณะกลีบดอกแคบ (ได้รับรังสี 25 เกรย์)

การทดลองที่ 2 การเพิ่มจำนวนโครโมโซมบัวดิน ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้สารละลายโคลชิซิน

2.1 ผลของสารละลายโคลชิซินต่อการรอดชีวิตของบัวดินรุ่น M_1V_1 และการเจริญเติบโตของบัวดินในรุ่น M_1V_2

2.1.1 การรอดชีวิต

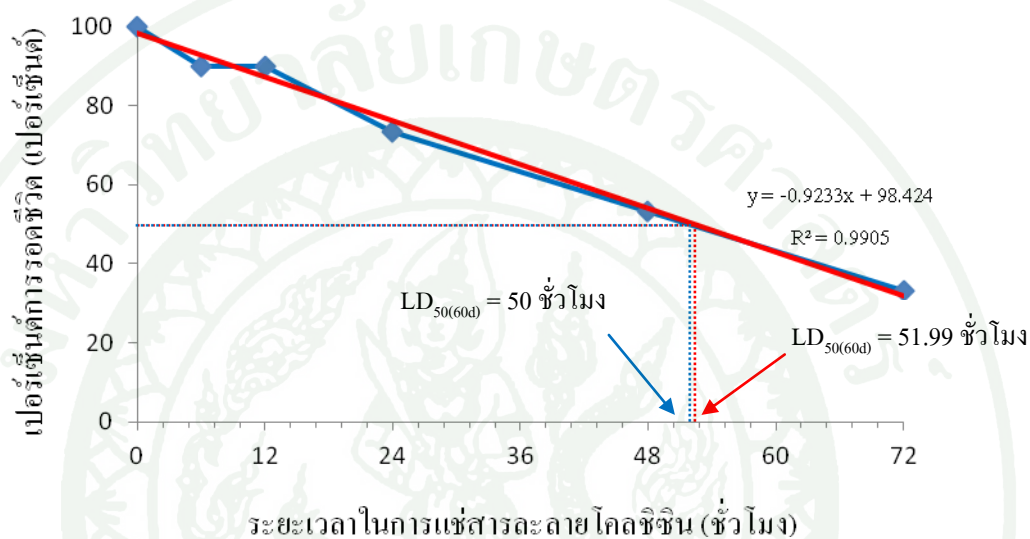
นำหัวฝักรูปร่างของบัวดินที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด นำเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลังจากเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อแล้ว 60 วัน พบว่า หัวฝักรูปร่างที่ไม่ได้แช่ในสารละลายโคลชิซินมีชีวิตรอดทั้งหมด (30 ชิ้น) และการรอดชีวิตของหัวฝักรูปร่างมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินเพิ่มขึ้น โดยหัวฝักรูปร่างที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีจำนวนหัวฝักรูปร่างที่รอดชีวิตเท่ากับ 27 27 22 16 และ 10 ชิ้น ตามลำดับ (ตารางที่ 12) และเมื่อคิดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของหัวฝักรูปร่างที่แช่ในสารละลายโคลชิซินเทียบกับหัวฝักรูปร่างที่ไม่ได้แช่ในสารละลายโคลชิซิน (100 เปอร์เซ็นต์) พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 90 90 73 53 และ 33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเทียบกับชุดควบคุมของหัวฝักรูปร่างของบัวดินหลังแช่ใน

สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 60 วัน

ระยะเวลาในการแช่ (ชั่วโมง)	หัวฝักรูปร่างทั้งหมด (ชิ้น)	หัวฝักรูปร่างที่รอดชีวิต (ชิ้น)	การรอดชีวิตเทียบกับชุด ควบคุม (เปอร์เซ็นต์)
0 (ชุดควบคุม)	30	30	100
6	30	27	90
12	30	27	90
24	30	22	73
48	30	16	53
72	30	10	33

จากนั้น นำเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของหัวฝาค้างมาเขียนกราฟ และคำนวณหาระยะเวลาในการแพร่กระจายโคลิซินที่ทำให้หัวฝาค้างตายเป็นครึ่งของชุดควบคุม ($LD_{50(60d)}$) โดยวิธีลากเส้นตรงตัดกราฟพบว่า มีค่าเท่ากับ 51.99 ชั่วโมง และโดยวิธีแทนค่าในสมการ $y = ax + b$ ของกราฟสมการถดถอยเชิงเส้น (linear regression) ที่จุด 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่ามีค่าเท่ากับ 50 ชั่วโมง (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและค่า $LD_{50(60d)}$ ของหัวฝาค้างหลังได้รับสารละลายโคลิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง หลังเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว 60 วัน

- กราฟเส้นสีแดง แสดงค่า $LD_{50(60d)}$ ที่คำนวณโดยวิธีแทนค่าในสมการ $y = ax + b$
- กราฟเส้นสีน้ำเงิน แสดงค่า $LD_{50(60d)}$ ที่คำนวณโดยวิธีลากเส้นตัดกราฟ

2.1.2 การเจริญเติบโตของฐานหัวเพาะเลี้ยงหลังแช่ในสารละลายโคลิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 60 วัน

จำนวนหัวย่อยรุ่น M_1V_2 ที่เกิดจากหัวฝาค้าง (M_1V_1)

นำหัวฝาค้างของบักดินที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ แช่ในสารละลายโคลิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 60 วัน พบว่า หัวย่อยที่เกิดจากหัวฝาค้างมีจำนวนลดลงเมื่อ

ระยะเวลาในการแพร่สลายโคลิซินเพิ่มขึ้น โดยมีจำนวนหน่วยต่อหัวผ่ำครั้งเฉลี่ยเท่ากับ 2.9 2.1 1.6 1.2 0.6 และ 0.3 หัว ตามลำดับ (ตารางที่ 13) โดยหัวผ่ำครั้งที่แช่ในสารละลายโคลิซินนาน 0 6 และ 12 ชั่วโมง มีจำนวนหน่วยเฉลี่ยมากกว่าหัวผ่ำครั้งที่แช่ในสารละลายโคลิซินนาน 48 และ 72 ชั่วโมง และมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 13 จำนวนหน่วยของ M_1V_2 ของบักดินหลังแช่ในสารละลายโคลิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง เนื้อเชื้อเป็นเป็นเวลา 60 วัน

ระยะเวลาในการแช่ (ชั่วโมง)	หน่วยของ M_1V_2 เฉลี่ย (หัว)	การสร้างหน่วยของ M_1V_2 เทียบกับชุด ควบคุม (เปอร์เซ็นต์)
0 (ชุดควบคุม)	2.9 ^{al/}	100 ^{al/}
6	2.1 ^{ab}	74 ^{cb}
12	1.6 ^b	55 ^b
24	1.2 ^{bc}	40 ^{cb}
48	0.6 ^c	20 ^{cb}
72	0.3 ^c	11 ^c
F - test	*	*
C.V. (%)	37.28	42.75

หมายเหตุ * ทรีตเมนต์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

^{1/} ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวดังแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว จำนวนใบต่อหัว และความยาวใบต่อหัวของหัวย่อย
รุ่น M_1V_2 ในสภาพปลอดเชื้อ

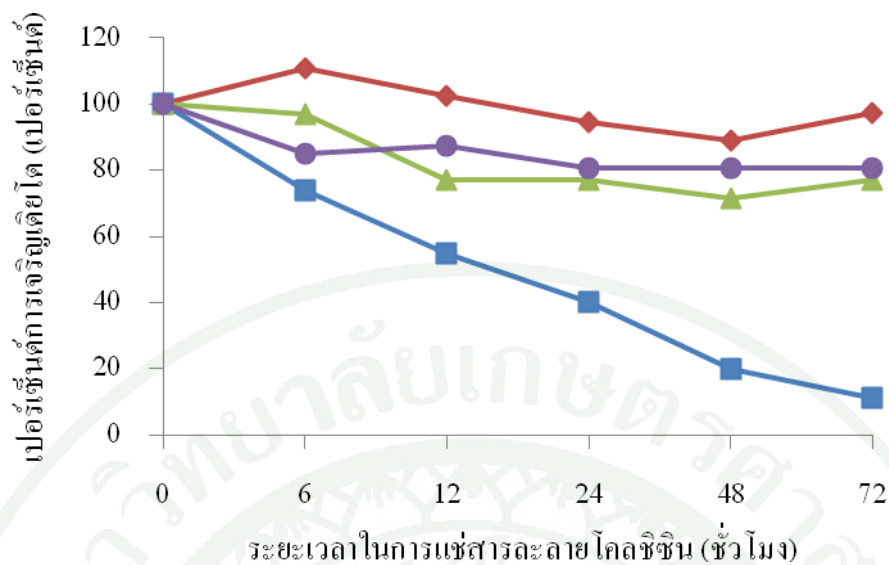
นำหัวผ่าครึ่งของบัวดินที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ แخذใน
สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และเลี้ยง
ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 60 วัน พบว่า หัวย่อยที่เกิดจากหัวผ่าครึ่งมีขนาดเส้นผ่าน
ศูนย์กลางหัวเฉลี่ยเท่ากับ 0.37 0.41 0.38 0.35 0.33 และ 0.36 เซนติเมตร ตามลำดับ จำนวนใบต่อหัว
เฉลี่ยเท่ากับ 3.5 3.4 2.7 2.7 2.5 และ 2.7 ใบ ตามลำดับ และมีความยาวใบต่อหัวเฉลี่ยเท่ากับ 4.7 4.0
4.1 3.8 3.8 และ 3.8 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 ค่ามีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุก
ค่าระยะเวลาที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ย จำนวนใบต่อหัวเฉลี่ย และความยาวใบต่อหัวเฉลี่ย
ของบัวดินรุ่น M_1V_2 หลังแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร
นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 60 วัน

ระยะเวลาในการแช่ (ชั่วโมง)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง หัวเฉลี่ย (ซม.)	จำนวนใบต่อหัวเฉลี่ย (ใบ)	ความยาวใบต่อหัว เฉลี่ย (ซม.)
0 (ชุดควบคุม)	0.37 ^{bc1/}	3.5 ^{a1/}	4.7 ^{a1/}
6	0.41 ^a	3.4 ^a	4.0 ^{ab}
12	0.38 ^{ab}	2.7 ^b	4.1 ^{ab}
24	0.35 ^{cd}	2.7 ^b	3.8 ^b
48	0.33 ^d	2.5 ^b	3.8 ^b
72	0.36 ^{bcd}	2.7 ^b	3.8 ^b
F - test	*	*	*
C.V. (%)	4.94	7.11	10.02

หมายเหตุ * ทริตเมนต์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95
เปอร์เซ็นต์

^{1/} ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวดิ่งแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมี
นัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่
ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 14 เปอร์เซนต์การเจริญเติบโตต่างๆ ของบัวดินรุ่น M_1V_2 หลังเข้านสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 60 วัน

หมายเหตุ

- แทนจำนวนหัวย่อย
- ◆ แทนจำนวนใบ
- ▲ แทนความยาวใบ
- แทนเส้นผ่านศูนย์กลางกลางหัว

2.2 ผลของสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเปลี่ยนแปลงของ บัวดินรุ่น M_1V_3 ในสภาพปลอดเชื้อ

หลังจากบัวดินรุ่น M_1V_2 มีอายุได้ 3 เดือน ทำการคัดเลือกหัวที่สมบูรณ์และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว 0.5 - 1 เซนติเมตร จากหัวย่อยที่แช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 0 6 และ 12 ชั่วโมง ได้จำนวน 9 9 และ 4 หัว ตามลำดับ จากนั้นทำการผ่าครึ่งหัวย่อยรุ่น M_1V_2 ดึงเอาขอดอกและเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ศึกษาการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของหัวย่อยรุ่น M_1V_3 ในสภาพปลอดเชื้อ ดังนี้

2.2.1 จำนวนหัวย่อย และเส้นผ่านศูนย์กลางหัวย่อยรุ่น M_1V_3 ในสภาพปลอดเชื้อ

หลังจากผ่าครึ่งหัวย่อยรุ่น M_1V_2 และเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 5 เดือน พบว่า หัวย่อยรุ่น M_1V_2 ที่แช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 0 6 และ 12 ชั่วโมง มีจำนวนการสร้างหัวย่อยรุ่น M_1V_3 เท่ากับ 53 48 และ 24 หัว ตามลำดับ และเมื่อคำนวณเป็นจำนวนหัวย่อยเฉลี่ยพบว่า มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีจำนวนหัวย่อยเฉลี่ยเท่ากับ 2.9 2.7 และ 3.0 หัว ตามลำดับ สำหรับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยพบว่า มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยเท่ากับ 0.38 0.37 และ 0.30 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

2.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหัวย่อยรุ่น M_1V_3 ในสภาพปลอดเชื้อ

หลังจากผ่าครึ่งหัวย่อยรุ่น M_1V_2 และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเนื้อเป็นเวลา 60 วัน พบว่า หัวย่อยรุ่น M_1V_3 ที่เกิดจากหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 6 และ 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 15ข และ 15ค) มีลักษณะหัวและใบไม่ต่างจากหัวย่อยรุ่น M_1V_3 ที่เกิดจากหัวที่ไม่ได้แช่ในสารละลายโคลชิซิน โดยหัวค่อนข้างกลมและมีสีเขียว ใบยาว แผ่นใบเรียบ ปลายใบแหลม และใบมีสีเขียว (ภาพที่ 15ก)

ตารางที่ 15 จำนวนหัวย้อยรุ่น M_1V_2 ผ่าครึ่งทั้งหมด จำนวนหัวย้อยรุ่น M_1V_3 เฉลี่ย และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยของบัวดินรุ่น M_1V_3 หลังได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 60 วัน

ระยะเวลาในการแช่ (ชั่วโมง)	จำนวนหัวย้อยรุ่น M_1V_2 ผ่าครึ่ง (ชิ้น)	จำนวนหัวย้อยรุ่น M_1V_3 เฉลี่ย (หัว)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว เฉลี่ยของหัวย้อยรุ่น M_1V_3 (ซม.)
0 (ชุดควบคุม)	18	2.9	0.38
6	18	2.7	0.37
12	8	3.0	0.30
F - test		ns	ns
C.V. (%)		10.12	9.69

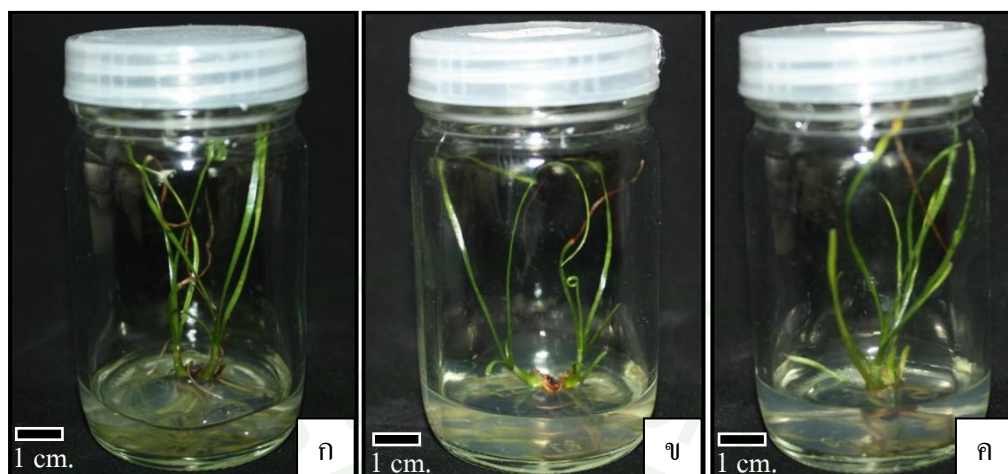
หมายเหตุ * ทรีตเมนต์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^{ns} ทรีตเมนต์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^{1/} ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวดังแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ที่ระยะเวลา 0 และ 6 ชั่วโมง มี 3 ซ้ำ

ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มี 1 ซ้ำที่ระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง หัวย้อยรุ่น M_1V_2 มีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการทดลองที่ 5



ภาพที่ 15 ลักษณะหัวและใบของข้าวพันธุ์ M_1V_3 ที่ได้รับสารละลายโคเลซิคิน ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพปลอดเชื้อ
 ก = ลักษณะหัวและใบปกติ (ต้นควบคุม)
 ข = ลักษณะหัวและใบปกติ (6 ชั่วโมง)
 ค = ลักษณะหัวและใบปกติ (12 ชั่วโมง)

2.3 ผลของสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง ต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของบัวดินรุ่น M_1V_2 ในสภาพแปลงทดลอง

หลังจากบัวดินรุ่น M_1V_2 มีอายุได้ 3 เดือน ทำการคัดเลือกหัวที่สมบูรณ์และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว 0.5 - 1 เซนติเมตร จากหัวย่อยที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลานาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง ได้จำนวน 30 24 23 25 9 และ 6 หัว ตามลำดับ จากนั้นนำออกปลูกในแปลงทดลอง ศึกษาการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของบัวดินรุ่น M_1V_2 ในแปลงทดลอง ดังนี้

2.3.1 การเจริญเติบโตของบัวดินรุ่น M_1V_2 หลังออกปลูกแล้ว 2 เดือน

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว และความสูง

หลังออกปลูกแล้ว 2 เดือน พบว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นในแต่ละระยะเวลาที่แช่ในสารละลายโคลชิซินมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 8 15 16 15 8 และ 14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 17) เมื่อวัดความสูงหัวพบว่า ความสูงหัวที่เพิ่มขึ้นมีเปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินเพิ่มขึ้น โดยหัวที่ได้รับสารละลายโคลชิซินเป็นระยะเวลานาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีความสูงหัวที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 9 15 20 13 13 และ 33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 72 ชั่วโมง มีความสูงหัวที่เพิ่มขึ้นมากที่สุดและต่างจากหัวที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 17)

จำนวนใบ ความยาวใบ และความกว้างใบ

หลังออกปลูกแล้ว 2 เดือน พบว่า จำนวนใบ ความยาวใบ และความกว้างใบ ในแต่ละทริตเมนต์มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากันคือ 2.0 ใบ และหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 6 และ 12 ชั่วโมง มีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 2.2 และ 2.1 ใบ ตามลำดับ (ตารางที่ 18) สำหรับความยาวใบพบว่า หัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 0 และ 12 ชั่วโมง มีความยาวใบเฉลี่ยเท่ากันคือ 14 เซนติเมตร หัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 24 และ 72 ชั่วโมง มีความยาวใบเฉลี่ยเท่ากันคือ 12 เซนติเมตร และหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 6 และ 48 ชั่วโมง มีความยาวใบเฉลี่ยเท่ากับ 15

และ 12 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 18) สำหรับความกว้างใบพบว่า หัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 0 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง มีความกว้างใบเฉลี่ยเท่ากับ 0.2 เซนติเมตร และหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 72 ชั่วโมง มีความกว้างใบเท่ากับ 0.1 เซนติเมตร (ตารางที่ 18)

จำนวนราก ความยาวราก และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางราก

หลังออกปลูกแล้ว 2 เดือน พบว่า หัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 2.7 2.8 3.2 3.1 3.0 และ 2.5 ราก ตามลำดับ (ตารางที่ 18) โดยหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 0 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง มีจำนวนรากไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่มีจำนวนรากแตกต่างกับหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 72 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 18) สำหรับความยาวรากเฉลี่ยและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรากเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในแต่ละทรีตเมนต์ โดยหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 0 และ 6 ชั่วโมง มีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 12 เซนติเมตร หัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 48 และ 72 ชั่วโมง มีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 9 เซนติเมตร และหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 12 และ 24 ชั่วโมง มีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 10 และ 7 เซนติเมตร ตามลำดับ และในทุกทรีตเมนต์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรากเฉลี่ยเท่ากับ 0.1 เซนติเมตร (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 16 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์) และความสูงหัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์) ของบัวดินรุ่น M₁V₂ ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน หลังออกปลูกแล้ว 2 เดือน

ระยะเวลาในการแช่ (ชั่วโมง)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวเฉลี่ย (ซม.)		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว ที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์)	ความสูงหัวเฉลี่ย (ซม.)		ความสูงหัวที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์)
	ก่อนออกปลูก	หลังออกปลูก		ก่อนออกปลูก	หลังออกปลูก	
0 (ชุดควบคุม)	0.48	0.52	8	1.02	1.11	9 ^{b1/}
6	0.45	0.52	15	0.98	1.12	15 ^{ab}
12	0.46	0.53	16	1.00	1.20	20 ^{ab}
24	0.43	0.50	15	1.00	1.13	13 ^{ab}
48	0.50	0.54	8	1.06	1.20	13 ^{ab}
72	0.35	0.40	14	0.75	1.00	33 ^a
F - test	ns					*
C.V. (%)			46.64			51.04

หมายเหตุ * ทรีตเมนต์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^{ns} ทรีตเมนต์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^{1/} ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวดิ่งแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 17 การเจริญเติบโตของใบและรากของบัวดินรุ่น M₁V₂ ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน หลังออกปลูกแล้ว 2 เดือน

ระยะเวลาในการแช่ (ชั่วโมง)	ใบ			ราก		
	จำนวนใบ (ใบ)	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนราก (ราก)	ความยาวราก (ซม.)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางราก (ซม.)
0 (ชุดควบคุม)	2.0	14	0.2	2.7 ^{ab1/}	12	0.1
6	2.2	15	0.2	2.8 ^{ab}	12	0.1
12	2.1	14	0.2	3.2 ^a	10	0.1
24	2.0	12	0.2	3.1 ^{ab}	7	0.1
48	2.0	13	0.2	3.0 ^{ab}	9	0.1
72	2.0	12	0.1	2.5 ^b	9	0.1
F - test	ns	ns	ns	*	ns	ns
C.V. (%)	6.0	8.5	0	7.47	19.56	0

หมายเหตุ * ทริตเมนต์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

^{ns} ทริตเมนต์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

^{1/} ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

2.3.2 การออกดอกของบัวดินรุ่น M_1V_2 ภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูก

หลังจากออกปลูกแล้ว 6 เดือน พบว่า หัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินเป็นเวลา 0 6 12 และ 24 ชั่วโมง ออกดอกแรกพร้อมกันหลังจากออกปลูกแล้ว 4 เดือน 21 วัน และออกดอกแรกก่อนหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 48 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 48 ชั่วโมง ออกดอกแรกหลังจากออกปลูกแล้ว 5 เดือน 10 วัน และหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 72 ชั่วโมง ออกดอกแรกหลังจากออกปลูกแล้ว 6 เดือน 10 วัน (ตารางที่ 19) เมื่อนับจำนวนดอกที่ออกทั้งหมดและจำนวนต้นที่ออกดอกทั้งหมดพบว่า บัวดินมีจำนวนการดอกลดลงเมื่อระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินเพิ่มขึ้น โดยหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีต้นที่ออกดอกทั้งหมด 15 13 12 3 และ 2 ต้น ตามลำดับ เมื่อคิดเป็นจำนวนดอกที่ออกต่อต้นเฉลี่ยพบว่า มีค่าเท่ากันคือ 1 ดอกต่อต้น (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 18 การออกดอกของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูก

ระยะเวลาในการแช่ (ชั่วโมง)	ระยะเวลาที่ดอกแรกบาน หลังออกปลูก (วัน)	จำนวนต้นที่ออกปลูก (ต้น)	จำนวนต้นที่ออกดอก (ต้น)	จำนวนดอกที่ออกทั้งหมด (ดอก)	จำนวนดอกต่อต้นเฉลี่ย (ดอก)
0	141	23	15	17	1.13
6	141	18	13	13	1.00
12	141	23	12	12	1.00
24	141	6	3	2	0.66
48	160	5	4	4	1.00
72	190	3	2	2	1.00

หมายเหตุ บัวดิน 1 หัวสามารถออกดอกได้มากกว่า 1 ดอก

2.3.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ ดอกและอวัยวะสืบพันธุ์ของบัวดินรุ่น M_1V_2 หลังออกปลูกภายในระยะเวลา 6 เดือน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ

หลังจากนำบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลานาน 0 ถึง 72 ชั่วโมง ออกปลูกและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบพบว่า บัวดินที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง มีจำนวนต้นที่มีใบกลาย 3 6 1 และ 1 ต้น ตามลำดับ จากจำนวนต้นที่รอดชีวิตหลังออกปลูกทั้งหมด 18 23 6 และ 5 ต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 20) และสามารถแบ่งการกลายของใบได้ 2 ลักษณะ คือ 1. ลักษณะใบด่าง โดยแผ่นใบเกิดแถบสีเขียวอ่อนตลอดความยาวของใบ (ภาพที่ 16ข - ง และภาพที่ 17ข - ง) พบในต้นที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง จำนวน 2 6 1 และ 1 ต้น ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การกลายของสีใบได้ 11 4 16 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 20) 2. ลักษณะใบหยาบและหนา โดยแผ่นใบมีลักษณะหยาบเป็นคลื่นตามความยาวของใบ เส้นใบโค้งเล็กน้อย (ภาพที่ 16ข - ง และภาพที่ 17ข - ง) พบในหัวที่ผ่านการแช่สารละลายโคลชิซินนาน 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง จำนวน 3 6 1 และ 1 ต้น ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การกลายของลักษณะใบหยาบและหนาได้ 16 21 16 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกและอวัยวะสืบพันธุ์

ศึกษาลักษณะผิดปกติของดอกพบว่า สามารถแบ่งลักษณะดอกที่ผิดปกติที่ได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ (1) ลักษณะยอดเกสรเพศเมียผิดปกติ ได้แก่ 1. รูปร่างผิดปกติ โดยยอดเกสรเพศเมียมีการกางออกของแฉกในองศาที่ไม่เท่ากัน (ภาพที่ 18) พบในหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 6 24 และ 48 2. ยอดเกสรเพศเมียมีจำนวนแฉกเพิ่มขึ้น 1 แฉก ทำให้ยอดเกสรเพศเมียมี 4 แฉก พบในหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 18ค) 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 18จ) และ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 18ฉ) 3. ยอดเกสรเพศเมียมีจำนวนแฉกลดลง 1 แฉก ทำให้ยอดเกสรเพศเมียมี 2 แฉก พบในหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 18ง) และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การกลายของยอดเกสรเพศเมียในต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 46 25 50 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 21) กลุ่มที่ (2) ลักษณะเกสรเพศผู้ผิดปกติ ได้แก่ 1. รูปร่างผิดปกติ โดยมีลักษณะคล้ายกลีบดอก พบในหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 19ข) และ 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 19ค, ง) 2. มีจำนวนเกสรเพศผู้ขาด 1 อัน ทำให้มีเกสร

เพศผู้ 5 อัน พบในหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 6 12 (ภาพที่ 19จ) และ 24 ชั่วโมง และ 3. มีจำนวนเกสรเพศผู้ขาด 3 อัน ทำให้มีเกสรเพศผู้ 3 อัน พบในหัวที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 19ฉ) และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การกลายของเกสรเพศผู้ในต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 6 12 และ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 23 33 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 21) และกลุ่มที่ (3) ลักษณะดอกผิดปกติ ได้แก่ 1. มีจำนวนกลีบดอกเพิ่มขึ้นมา 2 กลีบดอก ทำให้ดอกมี 8 กลีบ พบในหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 6 (ภาพที่ 20ข) และ 12 ชั่วโมง และ 2. กาบหุ้มโคนดอกมีรูปร่างผิดปกติ โดยมีลักษณะคล้ายกลีบดอกพบในหัวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 20ค) และ 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 20 ง) และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การกลายของกาบหุ้มโคนดอกของต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 6 และ 12 ชั่วโมง เท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 22) และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การกลายของกลีบดอกของต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 6 และ 12 ชั่วโมง เท่ากับ 8 และ 17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 22)

ตารางที่ 19 ลักษณะและจำนวนต้นที่มีใบผิปกติของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน

ระยะเวลาในการแช่ (ชั่วโมง)	ต้นที่ออกปลูกทั้งหมด (ต้น)	จำนวนต้นที่กลาย (ต้น)	ลักษณะ จำนวนต้นและเปอร์เซ็นต์การกลายของใบ			
			ใบต่าง (ต้น)	เปอร์เซ็นต์การกลาย (เปอร์เซ็นต์)	ใบหยาบและหนา (ต้น)	เปอร์เซ็นต์การกลาย (เปอร์เซ็นต์)
0	23	0	-	-	-	-
6	18	3	2	11	3	16
12	23	6	6	4	6	21
24	6	1	1	16	1	16
48	5	1	1	20	1	20
72	3	0	-	-	-	-

หมายเหตุ บัวดิน 1 ต้น สามารถมีลักษณะใบผิปกติได้มากกว่า 1 ลักษณะ

ตารางที่ 20 ลักษณะผิดปกติของเกสรเพศเมียและเกสรเพศผู้ของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง
ภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูก

ระยะเวลาในการแช่ (ชั่วโมง)	จำนวนดอกทั้งหมด (ดอก)	ยอดเกสรเพศเมียผิดปกติ			เปอร์เซ็นต์การกลาย (เปอร์เซ็นต์)	เกสรเพศผู้ผิดปกติ			เปอร์เซ็นต์การกลาย (เปอร์เซ็นต์)
		รูปร่างผิดปกติ	มี 4 แฉก	มี 2 แฉก		รูปร่างผิดปกติ	มี 5 อัน	มี 3 อัน	
0	17	-	-	-	-	-	-	-	-
6	13	1	4	1	46	2	1	-	23
12	12	-	3	-	25	1	2	1	33
24	2	1	-	-	50	-	1	-	50
48	4	1	1	-	50	-	-	-	-
72	2	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ บัวดิน 1 ดอก สามารถมีลักษณะผิดปกติได้มากกว่า 1 ลักษณะ

ตารางที่ 21 ลักษณะผิดปกติของดอกบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่แช่ในสารละลายโคลชิซินนาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง ภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูก

ระยะเวลาในการแช่ (ชั่วโมง)	จำนวนดอกทั้งหมด (ดอก)	เปอร์เซ็นต์การกลาย		กาบหุ้มโคนดอกผิดปกติ	เปอร์เซ็นต์การกลาย (เปอร์เซ็นต์)
		กลีบดอก 8 กลีบ	(เปอร์เซ็นต์)		
0	17	-	-	-	-
6	13	1	8	2	15
12	12	1	17	-	-
24	2	-	-	-	-
48	4	-	-	-	-
72	2	-	-	-	-

หมายเหตุ บัวดิน 1 ดอก สามารถมีลักษณะผิดปกติได้มากกว่า 1 ลักษณะ



ภาพที่ 16 ลักษณะการกลายของใบของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน

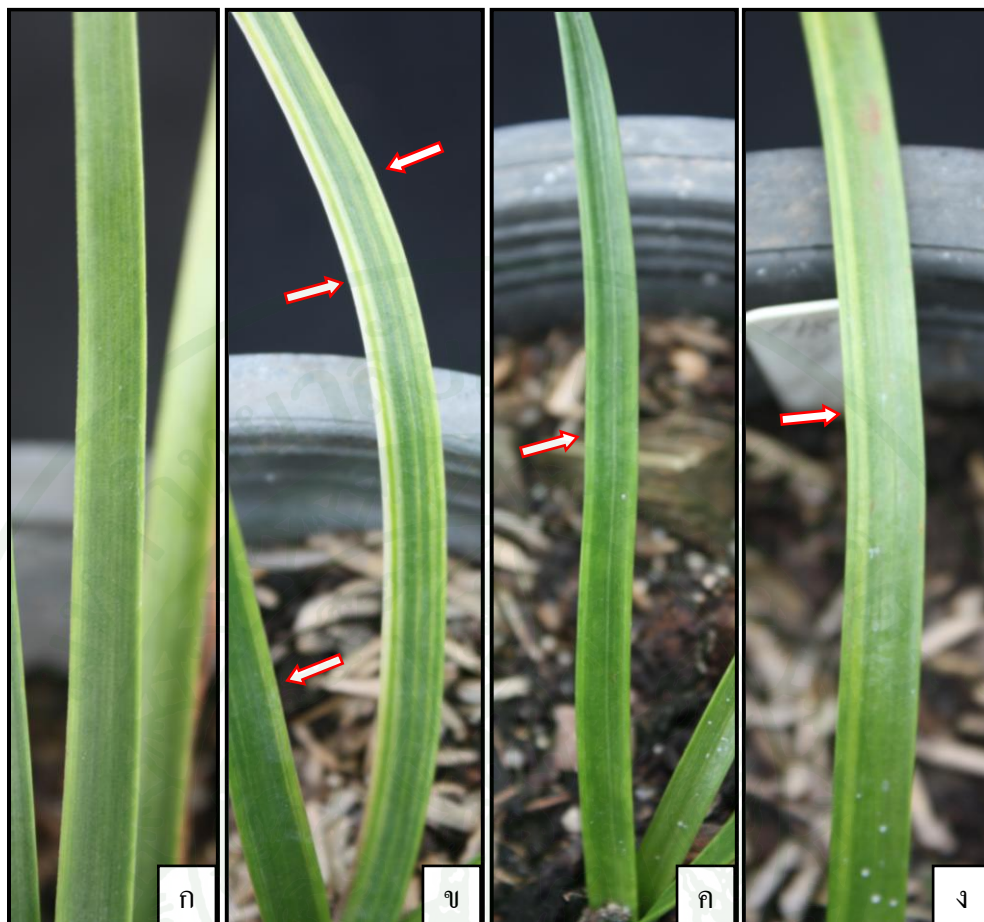
ก = ใบปกติมีสีเขียวแผ่นใบเรียบ (ต้นควบคุม)

ข = ผิวใบหยาบและใบด่างเป็นสีเขียวอ่อนของต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 6 ชั่วโมง

ค = ผิวใบหยาบและใบด่างเป็นสีเขียวอ่อนของต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 6 ชั่วโมง

ง = ผิวใบหยาบและใบด่างเป็นสีเขียวอ่อนของต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 12 ชั่วโมง

หมายเหตุ ปลายลูกศรชี้ คือ ลักษณะที่ผิดปกติ



ภาพที่ 17 ลักษณะการกลายของใบของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลจิซิน หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน

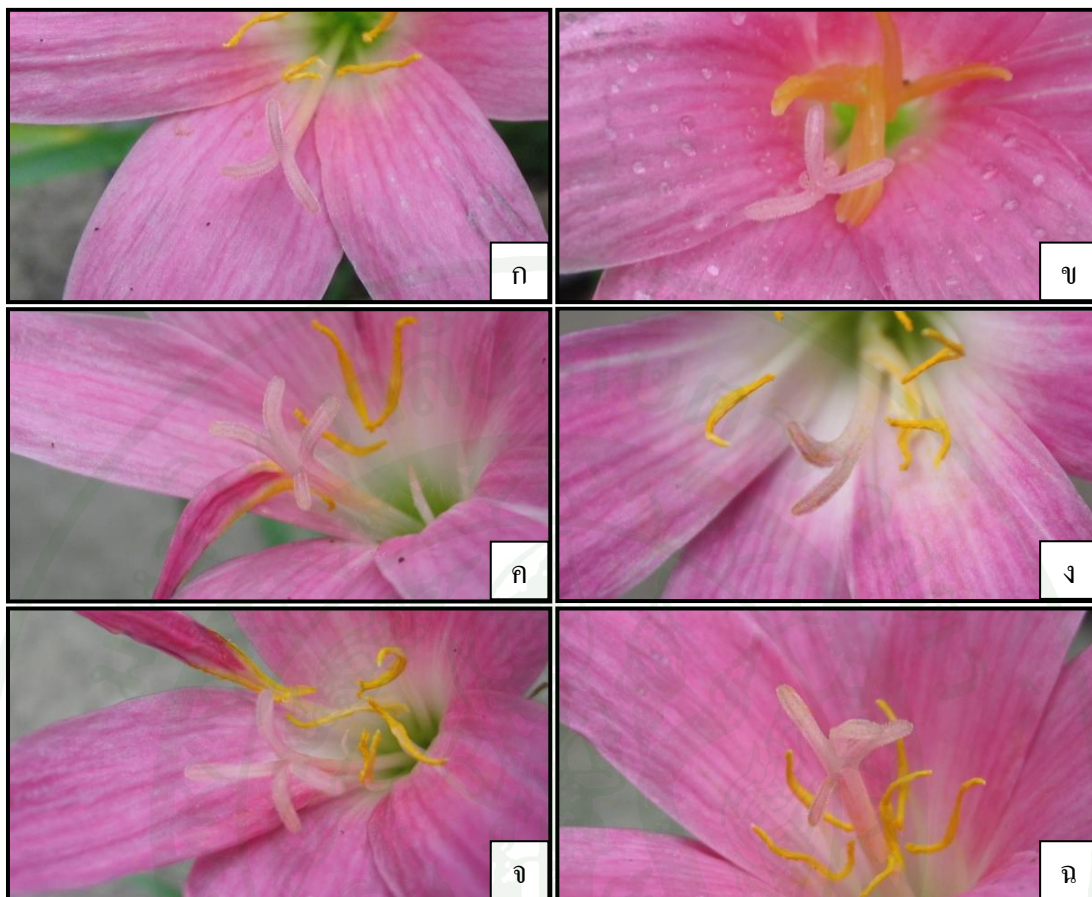
ก = ใบปกติมีสีเขียวแผ่นใบเรียบ (ต้นควบคุม)

ข = ผิวใบหยาบและใบด่างเป็นสีเขียวอ่อนของต้นที่ได้รับสารละลายโคลจิซินนาน 12 ชั่วโมง

ค = ผิวใบหยาบและใบด่างเป็นสีเขียวอ่อนของต้นที่ได้รับสารละลายโคลจิซินนาน 24 ชั่วโมง

ง = ผิวใบหยาบและใบด่างเป็นสีเขียวอ่อนของต้นที่ได้รับสารละลายโคลจิซินนาน 48 ชั่วโมง

หมายเหตุ ปลายลูกศรชี้ คือ ลักษณะที่ผิดปกติ



ภาพที่ 18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนไปของยอดเกสรเพศเมียในบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน

ก = ลักษณะยอดเกสรเพศที่เป็นปกติ (ชุดควบคุม)

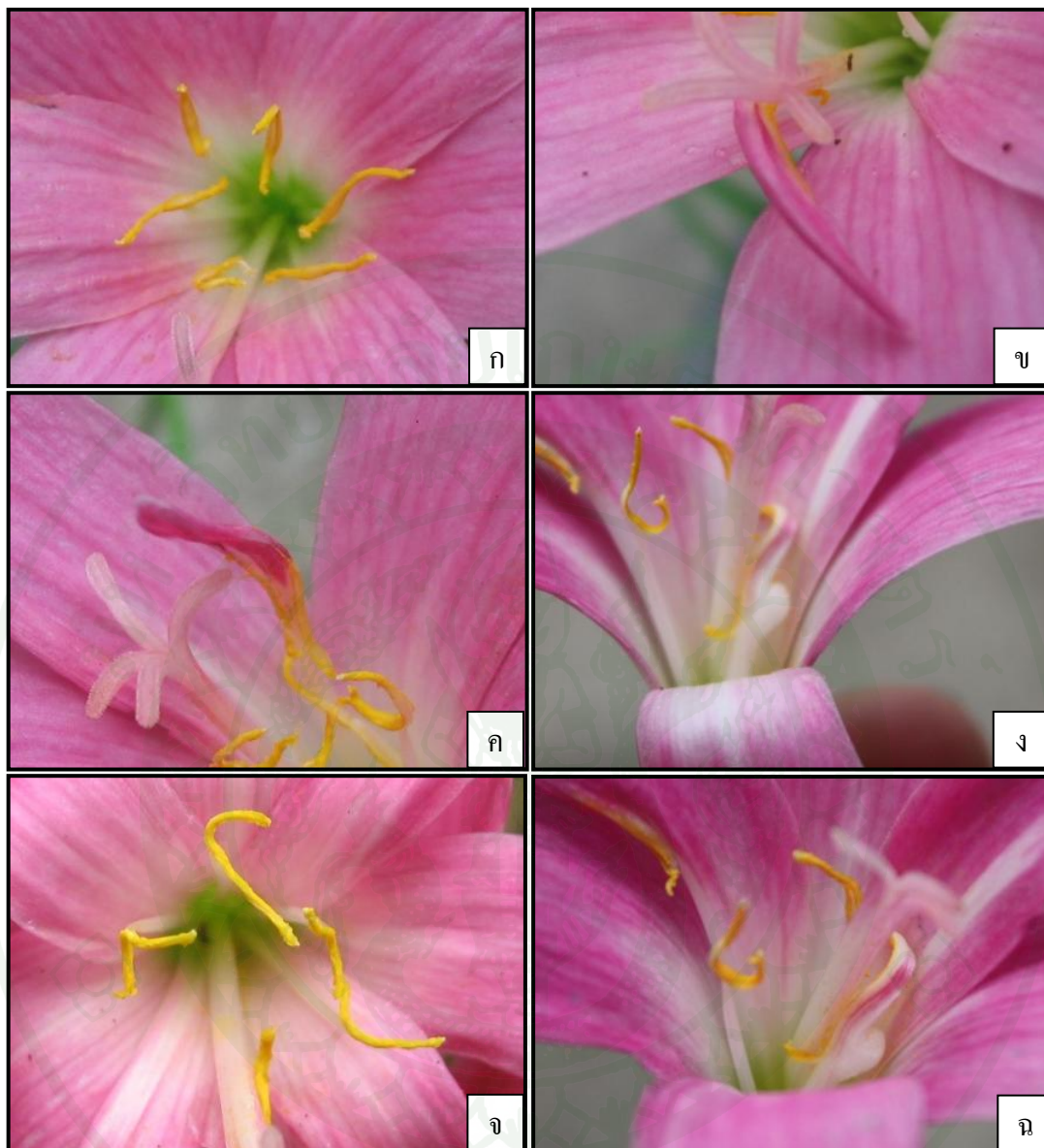
ข = ยอดเกสรเพศเมียงามไม่เท่ากัน (6 ชั่วโมง)

ค = ยอดเกสรเพศเมียมี 4 แฉก (6 ชั่วโมง)

ง = ยอดเกสรเพศเมียมี 2 แฉก (6 ชั่วโมง)

จ = ยอดเกสรเพศเมียมี 4 แฉก (12 ชั่วโมง)

ฉ = ยอดเกสรเพศเมียมี 4 แฉก (48 ชั่วโมง)



ภาพที่ 19 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนไปของเกสรเพศผู้ในบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน

ก = ลักษณะเกสรเพศผู้ที่เป็นปกติ (ต้นควบคุม)

ข = เกสรเพศผู้มีลักษณะคล้ายกลีบดอก (6 ชั่วโมง)

ค, ง = เกสรเพศผู้มีลักษณะคล้ายกลีบดอก (12 ชั่วโมง)

จ = เกสรเพศผู้ 5 อัน (12 ชั่วโมง)

ฉ = เกสรเพศผู้ 3 อัน (12 ชั่วโมง)



ภาพที่ 20 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปของดอกบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน

ก = ลักษณะดอกปกติ (ต้นควบคุม)

ข = กลีบดอก 8 กลีบ (6 ชั่วโมง)

ค = กาบหุ้มโคนดอกมีลักษณะคล้ายกลีบดอก (6 ชั่วโมง)

ง = กาบหุ้มโคนดอกมีลักษณะคล้ายกลีบดอก (12 ชั่วโมง)

หมายเหตุ ปลายลูกศรชี้ คือ ลักษณะที่ผิดปกติ

2.3.4 การคัดเลือกต้นที่เป็นโพลีพลอยด์

หลังจากนำต้นบัวดินรุ่น M_1V_2 ออกปลูกแล้ว 6 เดือน และคัดเลือกต้นที่มีใบหนา และหยาบที่มีการเจริญเติบโตช้าซึ่งคาดว่าจะเป็ต้นโพลีพลอยด์ จากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง สามารถคัดเลือกได้ 2 6 1 และ 1 ต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 23) และไม่พบต้นที่มีลักษณะใบหนาและใบหยาบในต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 72 ชั่วโมง และเมื่อนับจำนวนใบพบว่า ต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 6 ชั่วโมง ต้นที่ 1 และ 2 ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 12 ชั่วโมง ต้นที่ 1 - 6 และต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 24 และ 48 ชั่วโมง มีจำนวนใบทั้งหมดเท่ากับ 9 4 4 5 4 3 6 3 3 และ 7 ใบ ตามลำดับ มีความยาวใบเฉลี่ยเท่ากับ 21.7 21.3 16.3 15.8 14.8 15.2 19.5 19.7 14.0 17.8 และ 21.2 เซนติเมตร ตามลำดับ มีความกว้างใบเฉลี่ยเท่ากับ 0.6 0.5 0.6 0.4 0.5 0.4 0.6 0.5 0.5 0.5 และ 0.6 เซนติเมตร ตามลำดับ และมีความหนาใบเท่ากับ 0.75 1.00 0.99 1.12 1.17 0.91 0.66 1.29 0.94 1.27 และ 1.10 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 22 จำนวนใบ ความยาวใบเฉลี่ย ความกว้างใบเฉลี่ย และความหนาใบเฉลี่ยของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินหลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน

ระยะเวลาในการแช่สาร โคลชิซิน (ชั่วโมง)	ลำดับต้นที่	จำนวนใบ (ใบ)	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	ความหนาใบ (มม.)
0 (ต้นควบคุม)	1	9	21.7 ^a	0.6 ^a	0.75 ^{de1/}
6	1	4	21.3 ^{ab}	0.5 ^b	1.00 ^{bc}
	2	4	16.3 ^{abc}	0.6 ^a	0.99 ^{bc}
12	1	5	15.8 ^{abc}	0.4 ^c	1.12 ^{abc}
	2	4	14.8 ^{bc}	0.5 ^b	1.17 ^{ab}
	3	3	15.2 ^{abc}	0.4 ^c	0.91 ^{cd}
	4	6	19.5 ^{abc}	0.6 ^a	0.66 ^c
	5	3	19.7 ^{abc}	0.5 ^b	1.29 ^a
	6	3	14.0 ^c	0.5 ^b	0.94 ^{bcd}
24	1	3	17.8 ^{abc}	0.5 ^b	1.27 ^a
48	1	7	21.2 ^{ab}	0.6 ^a	1.10 ^{abc}
F - test			*	*	*
C.V. (%)			18.67	5.31	8.99

หมายเหตุ * ทรีตเมนต์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^{1/} ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวดังแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2.3.5 ขนาดเซลล์ปากใบของหัวย้อยรุ่น M_1V_2 หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน

เมื่อคัดเลือกต้นที่คาดว่าจะเป็นต้นโพลีพลอยด์แล้วทำการคัดเลือกใบที่มีอายุใกล้เคียงกันโดยเลือกใบที่ 3 จากใบที่อ่อนที่สุด เช็ดทำความสะอาดจากนั้นใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาลงบนผิวใบด้านบน รอน้ำยาทาเล็บแห้งแล้วจึงลอกเอาน้ำยาทาเล็บออกจากผิวใบโดยใช้สก็อตเทปใส นำสก็อตเทปใสที่ลอกติดบนกระจกสไลด์ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า นับจำนวนปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร และวัดขนาดความยาวเซลล์ปากใบโดยใช้โปรแกรม ZEISS AxioVision 3.1 ที่เชื่อมต่อกับกล้องจุลทรรศน์ (ZEISS, เยอรมัน) พบว่า ต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีจำนวนปากใบเฉลี่ย 11.88 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 6 ชั่วโมง ต้นที่ 1 และ 2 มีจำนวนปากใบเฉลี่ย 7.22 และ 13.78 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 12 ชั่วโมง ต้นที่ 1 - 6 มีจำนวนปากใบเฉลี่ย 7.89 6.89 14.22 16.00 9.67 และ 11.78 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ และต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 24 และ 48 ชั่วโมง มีจำนวนปากใบเฉลี่ย 7.11 และ 6.89 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 24)

เมื่อวัดความยาวเซลล์ปากใบพบว่า ต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีความยาวของเซลล์ปากใบเฉลี่ยเท่ากับ 44.60 ± 0.53 ไมโครเมตร ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ต้นที่ 1 และ 2 มีความยาวเซลล์ปากใบเฉลี่ยเท่ากับ 66.97 ± 1.06 และ 44.09 ± 0.51 ไมโครเมตร ตามลำดับ ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ต้นที่ 1 - 6 มีความยาวเซลล์ปากใบเฉลี่ยเท่ากับ 56.85 ± 0.72 65.83 ± 1.01 47.21 ± 0.65 40.60 ± 0.88 55.83 ± 0.78 และ 41.68 ± 0.75 ไมโครเมตร ตามลำดับ และต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 24 และ 48 ชั่วโมง มีความยาวเซลล์ปากใบเฉลี่ยเท่ากับ 101.58 ± 1.51 และ 48.59 ± 1.25 ไมโครเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 24) และพบว่าความยาวเซลล์ปากใบของต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 24 ชั่วโมง มีความยาวเซลล์ปากใบเฉลี่ยมากกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินถึง 2 เท่า (ภาพที่ 21)

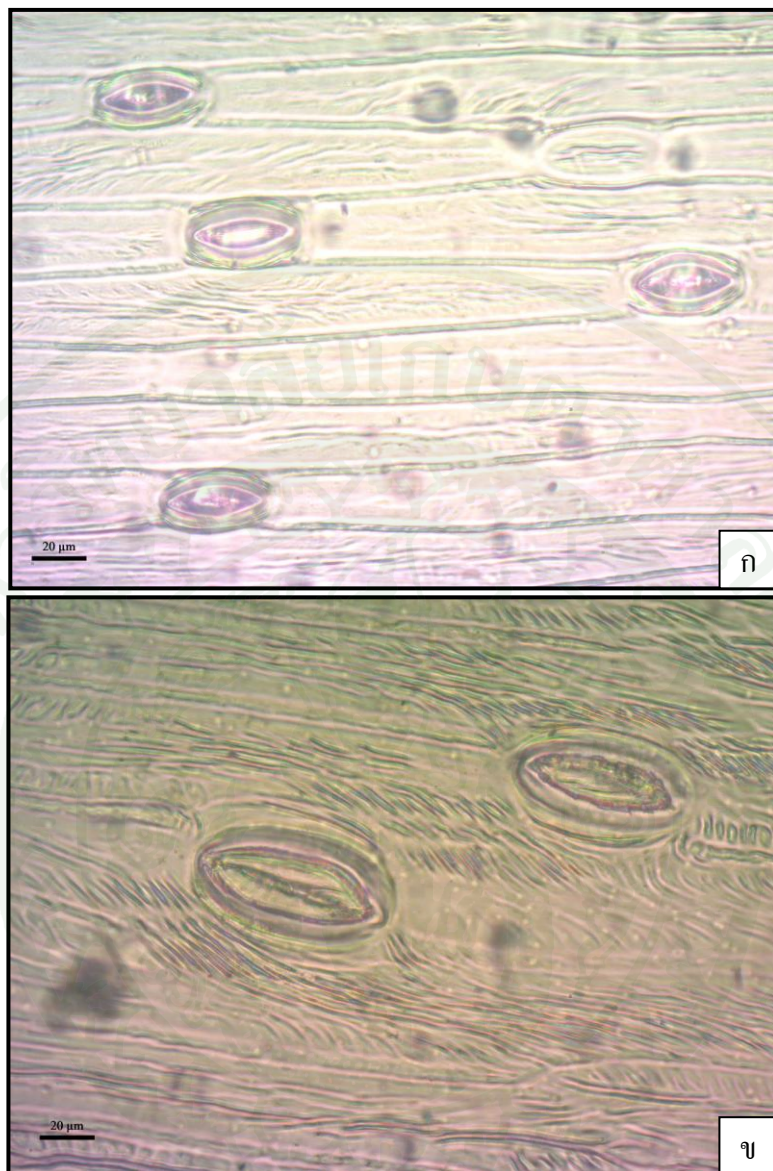
ตารางที่ 23 จำนวนปากใบเฉลี่ยต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร และความยาวเซลล์ปากใบเฉลี่ยของ
 บัควินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินหลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน

ระยะเวลาในการแช่ สารโคลชิซิน (ชั่วโมง)	ลำดับ ต้นที่	จำนวนปากใบเฉลี่ย (ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร)	ความยาวเซลล์ปากใบเฉลี่ย $\pm$ SD (ไมโครเมตร)
0 (ต้นควบคุม)	1	11.88 ^{bcd2/}	44.60 $\pm$ 0.53 ^{1/ed2/}
6	1	7.22 ^f	66.97 $\pm$ 1.06 ^b
	2	13.78 ^{abc}	44.09 $\pm$ 0.51 ^{ef}
12	1	7.89 ^{ef}	56.85 $\pm$ 0.72 ^c
	2	6.89 ^f	65.83 $\pm$ 1.01 ^b
	3	14.22 ^{ab}	47.21 $\pm$ 0.65 ^{ed}
	4	16.00 ^a	40.60 $\pm$ 0.88 ^g
	5	9.67 ^{de}	55.83 $\pm$ 0.78 ^c
	6	11.78 ^{cd}	41.68 $\pm$ 0.75 ^{gf}
24	1	7.11 ^f	101.58 $\pm$ 1.51 ^a
48	1	6.89 ^f	48.59 $\pm$ 1.23 ^d
F - test		*	*
C.V. (%)		11.81	3.59

หมายเหตุ * ทรีตเมนต์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95
 เปอร์เซ็นต์

^{1/} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^{2/} ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมี
 นัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่
 ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 21 เซลล์ปากใบของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน (กำลังขยาย 400 เท่า; bar = 20 ไมโครเมตร (μm))

ก = ปากใบของต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน

ข = ปากใบของต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 24 ชั่วโมง

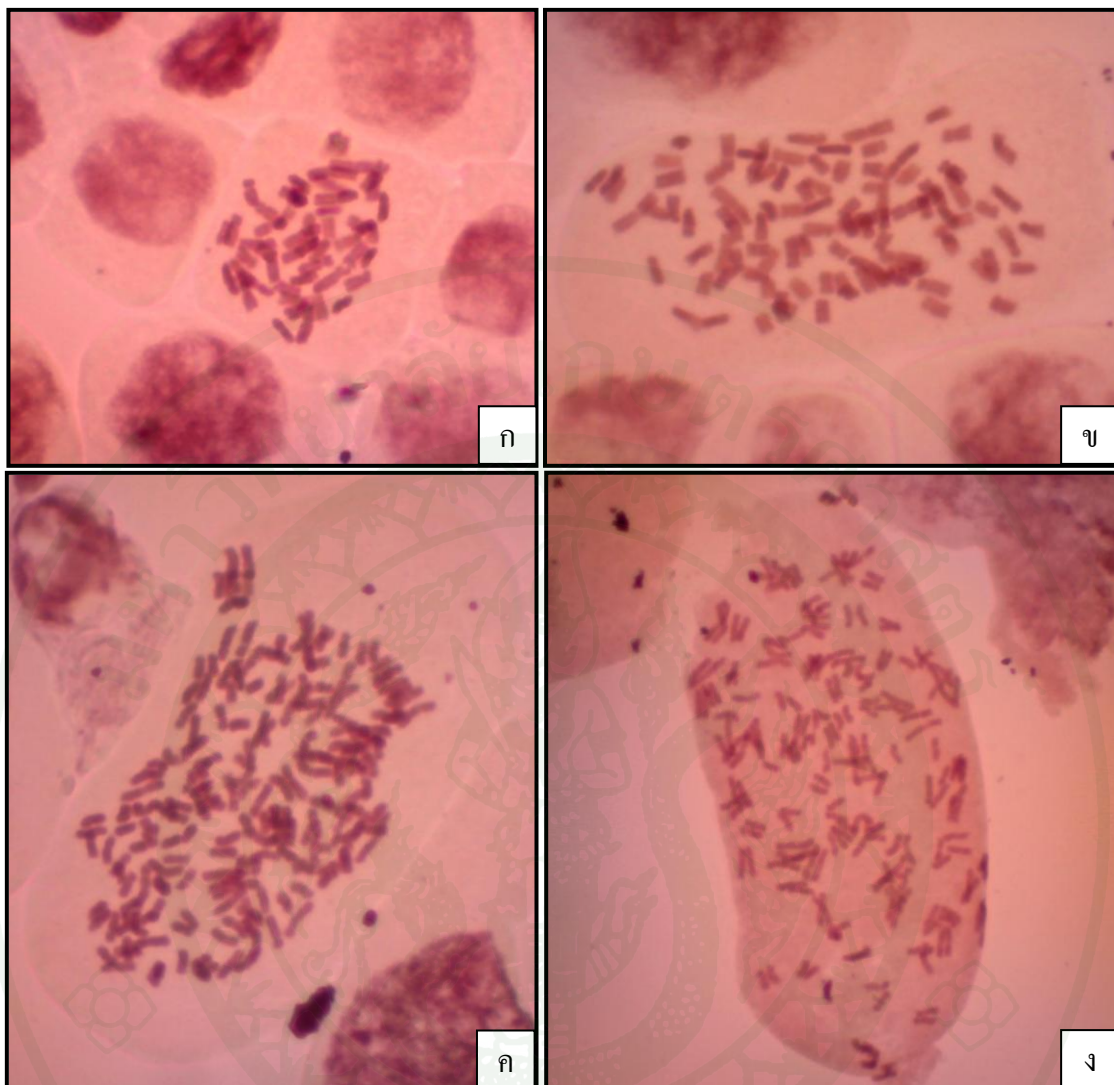
2.3.6 ศึกษาจำนวนโครโมโซมของหัวย้อยรุ่น M_1V_2 หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน

หลังจากนำต้นบัวดินรุ่น M_1V_2 ออกปลูกแล้ว 6 เดือน และคัดเลือกต้นที่มีใบหนา และหยابที่มีการเจริญเติบโตช้าซึ่งคาดว่าจะ เป็นต้น โพลีพลอยด์ ทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมจาก ปลายรากพบว่า ต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีจำนวนโครโมโซมเป็น diploid ($2n = 2x = 48$) และต้นที่มีลักษณะที่คาดว่าจะ เป็นต้น โพลีพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเป็น mixoploid ทุกต้นต้น ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเป็น $2n = 2x = 48$ (ภาพที่ 22ก) $2n = 4x = 96$ (ภาพที่ 22ข) $2n = 6x = 144$ (ภาพที่ 22ค) และ $2n = 7x + 8$ (ภาพที่ 22ง) ภายในต้นเดียวกัน โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การกลายของโครโมโซมของต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 8.33 26.09 6.67 และ 11.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 24)

ตารางที่ 24 จำนวนโครโมโซมของบัวดินรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินหลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน

ระยะเวลาในการแช่สาร โคลชิซิน (ชั่วโมง)	จำนวนต้นที่ออก ปลูก (ต้น)	จำนวนต้นที่นับ โครโมโซม (ต้น)	จำนวนต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซมต่างๆ (ต้น)			การกลายของจำนวนโครโมโซม (เปอร์เซ็นต์)
			Diploid ($2n = 48$)	Mixoploid	Tetraploid ($2n = 192$)	
0 (ต้นควบคุม)	30	10	10	-	-	-
6	24	2	-	2	-	8.33
12	23	6	-	6	-	26.09
24	15	1	-	1	-	6.67
48	9	1	-	1	-	11.11
72	6	-	-	0	-	-

หมายเหตุ ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 6 ถึง 48 ชั่วโมง คัดเลือกต้นที่มีลักษณะใบหยาบและหนาเพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซม



ภาพที่ 22 โครโมโซมจากปลายรากของบัวดินรุ่น M_1V_2 หลังออกปลูกแล้ว 6 เดือน
(กำลังขยาย 400 เท่า)

ก = จำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 48$

ข = จำนวนโครโมโซม $2n = 4x = 96$

ค = จำนวนโครโมโซม $2n = 6x = 144$

ง = จำนวนโครโมโซม $2n = 7x + 8$

วิจารณ์

ผลของรังสีแกมมาและสารละลายโคลชิซินต่อการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของบัวดินในสภาพปลอดเชื้อและหลังออกปลูก

นำชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงของบัวดินชักนำให้เกิดการกลายด้วยวิธีการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 0 10 15 20 25 30 และ 35 เกรย์ และเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 0 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 60 วัน พบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อปริมาณรังสีและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินเพิ่มขึ้น เนื่องจากจากรังสีแกมมามีอำนาจทะลุทะลวงสูงและมีความสามารถทำให้ตัวกลางที่เคลื่อนที่ผ่านเกิดการแตกตัวหรือสลายตัวเป็นอะตอม ซึ่งภายในเซลล์พืชตัวกลางที่รังสีเคลื่อนที่ผ่านส่วนใหญ่เป็นโมเลกุลของน้ำ (H_2O) ดังนั้น เมื่อโมเลกุลของน้ำได้รับรังสีแกมมาจึงเกิดการสลายตัวได้เป็น hydrogen atom และ hydroxyl radical จากนั้น hydroxyl radical เกิดการรวมตัวกันได้เป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) (Hochanadel, 1950 และ Arena, 1971) ซึ่งเป็นสารพิษมีความสามารถในการหยุดการทำงานของเอนไซม์ ทำให้สายโพลีเปปไทด์เกิดการคลายเกลียวเป็นผลให้คุณสมบัติและโครงสร้างของโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ต่างๆ ภายในเซลล์เสียหาย เกิดการรั่วไหลของสารภายในทำให้เซลล์เกิดความเป็นพิษ ส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมได้ตามปกติและตายลงในที่สุด (กันยารัตน์, 2532; Kovács and Keresztes, 2002 และ Wi *et al.*, 2007) ทั้งนี้ ความเสียหายที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณรังสีและระยะเวลาที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ยิ่งปริมาณรังสีสูงและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินนานจะยิ่งก่อให้เกิดความเสียหายได้มาก (อรุณี, 2550) ซึ่งสอดคล้องกับการให้รังสีแกมมาและสารละลายโคลชิซินในไม้หัวหลายชนิด เช่น ลิลลี่ (รัศมี, 2536) Chinese narcissus (Lu, 2007) *Musa acuminata* (Rodrigues *et al.*, 2011) และ *Curcuma Hybrid* (Ketmaro *et al.*, 2012) เป็นต้น

การพัฒนาของส่วนฐานหัวเพาะเลี้ยงที่รอดชีวิตหลังเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 60 วัน พบว่า ฐานหัวเพาะเลี้ยง (M_1V_1) สร้างจำนวนหัวย่อยรุ่น M_1V_2 ลดลงเมื่อปริมาณรังสีและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินเพิ่มขึ้น และเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหัวย่อยรุ่น M_1V_3 โดยการผ่าหัวรุ่น M_1V_2 และเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 60 วัน พบว่า หัวย่อยรุ่น M_1V_3 มีจำนวนหัวที่ผิดปกติมากขึ้นเมื่อได้รับรังสีปริมาณที่สูงขึ้น แต่ในหัวที่เกิดจากชิ้นส่วนที่แช่ในสารละลายโคลชิซินไม่พบหัวย่อยที่ผิดปกติในรุ่น M_1V_3 และลักษณะผิดปกติที่พบ

คือ หัวมีการเจริญเติบโตผิดปกติ ไม่สามารถแยกหัวออกจากหัวแม่ได้เนื่องจากไม่สามารถสร้างฐานหัวขึ้นมาใหม่เองได้จึงมีส่วนกบิบติดอยู่กับฐานหัวของหัวแม่ ซึ่งเป็นผลมาจากความเสียหายทางสรีรวิทยา (physiological damage) อันเนื่องมาจากรังสีทำให้กระบวนการสร้างดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรมและโปรตีนลดลง ทำลายกระบวนการสร้างเอทีพี (ATP) (อรุณี, 2530) มีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญ (Casarett, 1968) และทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการเกิด differentiation เนื้อเยื่อมีการพัฒนาที่ผิดปกติหัวย่อยจึงมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ (Venketeswaras and Partanen, 1996) และสาเหตุที่ไม่พบลักษณะผิดปกติในหัวย่อยรุ่น M_1V_3 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินอาจเนื่องมาจากเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินที่ 6 - 72 ชั่วโมง ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ไม่มากและเซลล์ที่รอดชีวิตจากการแช่ในสารละลายโคลชิซินมีความสามารถในการซ่อมแซมตัวเองและเจริญเติบโตได้เป็นปกติ

หัวย่อยรุ่น M_1V_2 ที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซินมีจำนวนการผลิตหัวย่อยรุ่น M_1V_3 ลดลงเมื่อระยะเวลาในการแช่เพิ่มขึ้น ต่างจากหัวที่ได้รับรังสีแกมมาซึ่งพบว่า หัวย่อยรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีปริมาณ 20 เกรย์ สามารถผลิตหัวย่อยรุ่น M_1V_3 ได้มากที่สุดและมากกว่าหัวที่ไม่ได้รับรังสี อาจเนื่องจากรังสีแกมมาที่ปริมาณ 20 เกรย์ กระตุ้นให้ต้นเกิดการขยายพันธุ์ที่เพิ่มขึ้นเพื่อดำรงพันธุ์ไว้ การสร้างหัวใหม่ที่เพิ่มขึ้นของหัวที่ได้รับรังสี 20 เกรย์ นั้น เพื่อเพิ่มโอกาสในการรอดชีวิตของหัวใหม่ เนื่องจากหัวย่อยที่เกิดขึ้นอาจเป็นหัวที่เกิดจากเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ที่ได้รับความเสียหายในระดับที่ต่างกัน ดังนั้น หากหัวย่อยเกิดจากเซลล์ที่ได้รับความเสียหายมากก็เป็นไปได้ว่าหัวย่อยที่ได้จะมีการเจริญเติบโตไม่สมบูรณ์และอาจตายได้ แต่ถ้าหัวย่อยเกิดจากเซลล์ที่ได้รับความเสียหายน้อยก็จะมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่า แต่อาจมีความสามารถในการขยายพันธุ์ลดลงหรือไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ และหัวย่อยที่เกิดจากเซลล์ที่ไม่ได้รับความเสียหายก็จะมีการเจริญเติบโตที่เป็นปกติ และสามารถขยายพันธุ์ได้ต่อไป ซึ่งลักษณะดังกล่าวอาจเป็นกลไกหนึ่งของพืชสำหรับการคัดเลือกตามธรรมชาติเพื่อความอยู่รอดของลูกหลาน โดยการเพิ่มจำนวนต้นให้ได้มากที่สุดเพื่อให้ได้ต้นที่มีลักษณะปกติและสามารถขยายพันธุ์ต่อไปได้ หัวย่อยรุ่น M_1V_2 ที่ได้รับรังสีปริมาณ 10 15 และ 25 เกรย์ มีจำนวนหัวย่อยรุ่น M_1V_3 น้อยกว่าต้นที่ได้รับรังสี 20 เกรย์ และต้นที่ไม่ได้รับรังสี เนื่องจากที่ปริมาณรังสี 10 และ 15 เกรย์ เป็นปริมาณรังสีที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายกับเซลล์หรือองค์ประกอบของเซลล์มาก เซลล์ยังคงมีความสามารถในการซ่อมแซมตัวเอง ต้นสามารถเจริญเติบโตและสร้างหัวย่อย (M_1V_3) ที่มีลักษณะปกติมากกว่าหัวย่อยที่ผิดปกติ บัวดินที่ได้รับรังสีที่ปริมาณ 10 และ 15 เกรย์ จึงไม่จำเป็นต้องเพิ่มจำนวนเพื่อความอยู่รอดของลูกหลาน เป็นผลให้มีจำนวนหัวย่อยรุ่น M_1V_3 น้อยกว่าหัวที่ได้รับรังสี 20 เกรย์ สำหรับหัวที่ได้รับรังสี 25 เกรย์ พบว่า มี

จำนวนหน่วยยีน M_1V_3 น้อยกว่าหัวที่ได้รับรังสี 20 เกรย์ เช่นกัน แต่ทั้งนี้เนื่องจากที่ปริมาณรังสี 25 เกรย์ เป็นปริมาณที่สูงเกินกว่าเซลล์จะสามารถซ่อมแซมตัวเองและเจริญเติบโตต่อไปได้ ความสามารถในการสร้างหัวรุ่น M_1V_3 จึงลดลงไปด้วย และอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้หน่วยยีนที่ได้รับรังสีปริมาณ 20 เกรย์ มีจำนวนการผลิตหน่วยยีน M_1V_3 เยอะกว่าที่ปริมาณรังสีอื่นอาจเนื่องมาจากการที่รังสีปริมาณ 20 เกรย์ มีผลกระทบทำให้เกิดการทำงานของ auxin เป็นผลให้ต้นมีการเจริญเติบโตได้มากกว่า (Casarett, 1968)

ผลของรังสีแกมมาและสารละลายโคลชิซินต่อการชักนำให้เกิดการกลายในบัวดิน

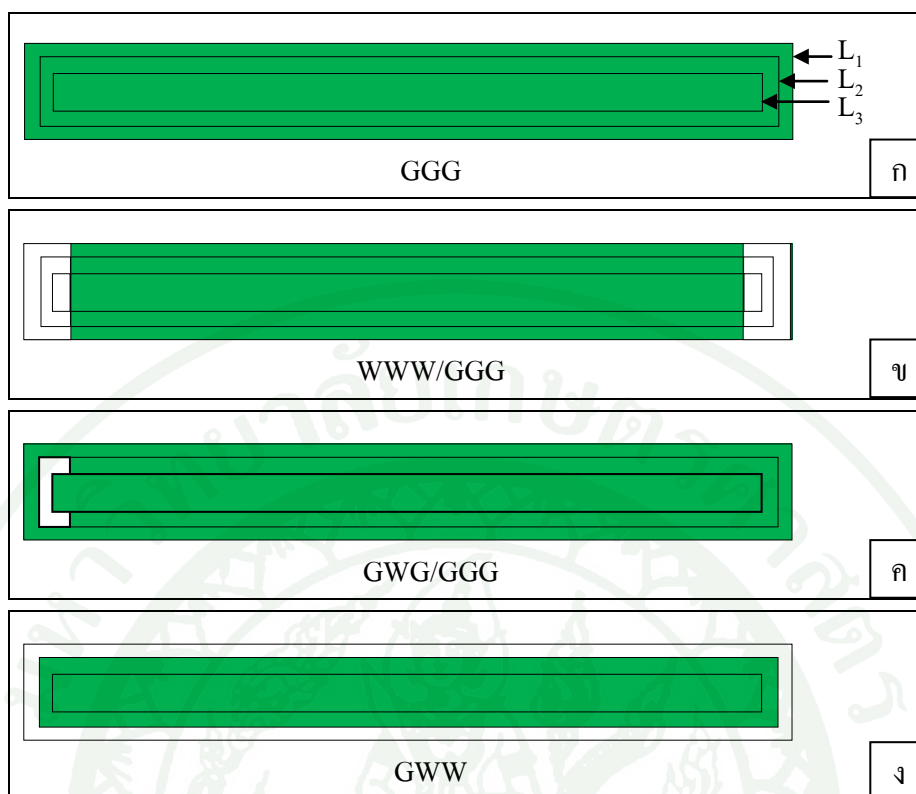
การกลายในลักษณะต่างๆ ของบัวดินที่ได้รับรังสีแกมมาและสารละลายโคลชิซิน มีสาเหตุมาจากรังสีแกมมาและสารละลายโคลชิซินมีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม ชักนำให้เกิดการกลายของจีโนม ได้แก่ aneuploid และ euploid และชักนำให้เกิดการกลายของโครโมโซม ได้แก่ deletion duplication inversion และ translocation ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ส่งผลให้พืชมีลักษณะผิดปกติต่างๆ (อรุณี, 2550; Esnault, 2010; Jimenez, 2011 และ Auger and Sheridan, 2012) โดยรังสีแกมมาและสารละลายโคลชิซินมีผลต่อการกลายของบัวดิน ดังนี้

1. ผลของรังสีแกมมาและสารละลายโคลชิซินต่อการกลายของสีใบ

หลังจากคัดเลือกหัวบัวดินที่สมบูรณ์นำออกปลูก หลังจากออกปลูกแล้ว 60 วัน พบว่าบัวดินมีการกลายของสีใบ 3 แบบ คือ 1. แถบสีขาวสลับแถบสีเขียว (ภาพที่ 8ข) 2. ใบสีเงิน (ภาพที่ 8ง) และ 3. แถบสีเขียวอ่อนสลับแถบสีเขียว (ภาพที่ 8ค และภาพที่ 18ข - ง) สาเหตุที่ทำให้ต้นที่กลายมีสีใบที่ต่างกันเนื่องจากมีตำแหน่งหรือชั้นของเซลล์ที่กลายต่างกัน (อรุณี, 2550) เนื่องจากการซ้อนทับกันของเซลล์กลายและเซลล์ปกติในแต่ละชั้น จากผลการทดลองพบว่า ในต้นที่กลายแบบ sectorial chimera ใบมีแถบสีขาวสลับแถบสีเขียวเนื่องจากส่วนที่เป็นสีขาวเกิดจากการกลายของสีใบในทุกชั้นของเซลล์ (L_1-L_3) และส่วนที่เป็นสีเขียวเป็นส่วนที่ไม่เกิดการกลาย (Marcotrigiano, 1997) ในต้นที่กลายแบบ periclinal chimera มีใบสีเงินเนื่องจากเกิดการกลายของสีใบเฉพาะชั้นของเซลล์ผิว (L_1) เท่านั้น เซลล์ชั้น L_2 และ L_3 ปกติและเป็นสีเขียว เมื่อเกิดการซ้อนทับกันของสีขาวกับสีเขียวสีที่เห็นจึงเป็นสีเทาและต้นที่กลายแบบ mericlinal chimera มีส่วนของใบที่เป็นแถบสีเขียวอ่อนเนื่องจากเกิดการกลายของสีใบที่เซลล์ชั้น mesophyll (L_2) บางส่วน เมื่อเกิดการซ้อนทับกันของสีเขียวกับสีขาวสีที่เห็นจึงเป็นสีเขียวอ่อน (Marcotrigiano, 1997) ในการทดลองนี้ ต้นที่

มีใบเป็น sectorial chimera จะเขียนแทนด้วยสัญลักษณ์ WWW/GGG (ภาพที่ 23ข) ต้นที่มีใบเป็น mericlinal chimera จะแทนสัญลักษณ์ด้วย GWG/GGG (ภาพที่ 23ค) และต้นที่มีใบเป็น periclinal chimera จะเขียนแทนสัญลักษณ์ด้วย WGG (ภาพที่ 23ง) ลักษณะการเกิด chimera นี้สามารถพบได้ในพืชหลายชนิดที่มีการชักนำให้เกิดการกลายโดยใช้รังสีต่างๆ และสารโคลชิซิน เช่น *Ornithogalum dubium* Houtt. (กฤษณา, 2545) *Nicotiana tabacum* L. (Bae et al., 2000) *Dracaena sanderiana* (Palamine et al., 2005) *Vigna radian* L. (Sangsiri et al., 2005) *Petunia hybrida* (Ning et al., 2009) *Pisum sativum* L. (Dhulgande et al., 2010) *Delphinium malabaricum* (Kolar et al., 2011) และ *Hedychium* J. Koenig (Sakhanokho et al., 2012) เป็นต้น

การกลายของสีใบ มีสาเหตุมาจากรังสีแกมมาและสารละลายโคลชิซินทำให้เกิดการกลายของโครโมโซมทั้งโครโมโซมที่อยู่ในนิวเคลียส (nuclear mutations) และโครโมโซมที่อยู่นอกนิวเคลียส ได้แก่ โครโมโซมในคลอโรพลาสต์ (chloroplast mutations หรือ pigment mutations) ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของยีนและกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์หรือสารสี (plastids) อื่นๆ ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการแสดงออกของสีในใบและต้นพืช (Marcotrigiano, 1997) โดยการกลายของนิวเคลียสจะเป็นการกลายของยีนที่เป็นยีนแฝง (recessive gene) ซึ่งจะแสดงออกในต้นลูกรุ่นที่ 2 และ 3 ที่ขยายพันธุ์โดยวิธีอาศัยเพศ ลูกที่ได้จะปรากฏลักษณะกลายทั้งต้น เช่น ใบขาว (albino) ใบเหลือง (xantha) หรือใบเขียวอมเหลือง (viridis) (อรุณี, 2550 และ Marcotrigiano, 1997) การกลายของโครโมโซมที่อยู่ในคลอโรพลาสต์มีผลต่อความผิดปกติของคลอโรฟิลล์ ทำให้คลอโรฟิลล์ไม่มีสีเขียวกลายเป็นสารสีที่เรียกว่าลิวโคพลาสต์ (leucoplast) (Wise, 2007) ทั้งนี้ การกลายของคลอโรพลาสต์อาจเกิดเพียง 1 เซลล์ หรือมากกว่า 1 เซลล์ เมื่อมีการแบ่งเซลล์เพื่อการเจริญเติบโตของต้นพืช คลอโรพลาสต์และลิวโคพลาสต์จะเกิดการกระจายตัว (sorted out) ได้เซลล์ลูกที่มีคลอโรพลาสต์หรือลิวโคพลาสต์เพียงอย่างเดียวทำให้ส่วนของเนื้อเยื่อพืชบริเวณนั้นเป็นสีเขียวหรือสีขาว ตามลำดับ หรือได้เซลล์ลูกที่มีทั้งคลอโรพลาสต์และลิวโคพลาสต์ก็ได้ ซึ่งจะทำให้ส่วนของเนื้อเยื่อพืชบริเวณนั้นมีลักษณะต่าง (Tilney - Bassett, 1978) ในการทดลองนี้พบว่า ต้นที่มีการกลายของสีใบเกิดในลูกรุ่นที่ 3 และ 4 ซึ่งเกิดจากการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการเกิดหัวยอดตามธรรมชาติ ดังนั้น การกลายที่เกิดขึ้นจึงมีสาเหตุมาจากการกลายของโครโมโซมที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ และเซลล์ที่กลายมีลักษณะสีขาวล้วนแสดงว่าภายในเซลล์กลายมีการกระจายตัวของลิวโคพลาสต์อย่างเดียว



ภาพที่ 23 ภาพจำลองภาพตัดขวางของชั้นเซลล์กลายและชั้นเซลล์ปกติในใบของต้นบัวดิน

ก = ลักษณะใบสีเขียวของต้นบัวดินที่ไม่ได้รับรังสีแกมมา

ข = ลักษณะใบสีขาวของบัวดินที่ได้รับรังสี 20 เกรย์

ค = ลักษณะใบสีเขียวอ่อนของบัวดินที่ได้รับรังสีและสารโคลชิซิน

ง = ลักษณะใบสีเงินของบัวดินที่ได้รับรังสี 15 เกรย์

หมายเหตุ L_1 = เซลล์ชั้นเซลล์ผิว

L_2 = เซลล์ชั้น mesophyll

L_3 = เซลล์ท่อลำเลียง

G = Green คือ ชั้นของเซลล์ปกติ (สีเขียว)

W = White คือ ชั้นของเซลล์กลาย (สีขาว)

หลังจากตรวจพบการเกิดไคเมอราของต้นบัวดินในรุ่นที่ 3 และ 4 หลังออกปลูกในแปลงทดลองพบว่า ใบใหม่ของต้นที่เป็น sectorial chimera และ mericlinal chimera นั้น มีลักษณะต่างทดลองจนไม่เกิดการต่าง เนื่องจากการเจริญเติบโตของต้นทำให้ลักษณะการต่างหมดไป โดยการต่างแบบ sectorial chimera และ mericlinal chimera จะเป็นการต่างเพียงบางส่วนของชั้น เมื่อต้นมีการเจริญเติบโตส่วนของชั้นที่กลายจะถูกเลื่อนจากตำแหน่งบนสุดของยอดซึ่งเป็นตำแหน่งใบที่ 1 ไปเป็นตำแหน่งใบที่ 2 และเลื่อนไปเรื่อยๆ จนเป็นตำแหน่งใบที่ 5 หรือ 6 ซึ่งจะเป็นตำแหน่งที่ใบมีอายุมากที่สุด พร้อมทั้งจะหลุดหรือเหี่ยวไปและเมื่อใบเหี่ยวไปลักษณะไคเมอราที่เกิดจึงหมดไปด้วย และในขณะที่เซลล์กลายเลื่อนตำแหน่งไปเรื่อยๆ เซลล์ที่เกิดใหม่ก็จะเป็นเซลล์ที่ปกติ ดังนั้น ลักษณะของการกลายจึงหายไปเมื่อต้นมีอายุมากขึ้น แต่สำหรับต้นที่เป็น periclinal chimera นั้น ซึ่งเป็นการกลายของเซลล์ที่ชั้นเซลล์ผิวทั้งชั้น (L_1) เมื่อต้นมีการเจริญเติบโตเซลล์กลายที่ชั้นเซลล์ผิวจะมีการเจริญและแบ่งตัวเพิ่มขึ้น จากผลการทดลองพบว่า ต้นที่เป็น periclinal chimera นั้น ไม่ได้มีใบสีเงินตั้งแต่ใบแรกที่เกิดแต่พบลักษณะใบสีเงินเกิดขึ้นในใบที่เกิดเป็นใบที่ 5 ของต้น และพบในใบที่เกิดถัดจากใบที่ 5 ทุกใบ และเมื่อต้นมีอายุมากขึ้นพบว่า ทั้งต้นมีใบเป็นสีเงินทั้งหมดเนื่องจากใบแก่ที่มีสีเขียวได้เหี่ยวและตายไป และใบใหม่ที่เกิดขึ้นเป็นใบสีเงินทุกใบ ดังนั้น ลักษณะการกลายจึงยังคงอยู่

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกรุ่น M_1V_4 ที่เกิดจากต้นที่มีใบสีเงินพบว่า ลูกรุ่น M_1V_4 มีลักษณะใบสีเขียวเนื่องจากเกิดจากส่วนของฐานหัวที่มีจีโนไทป์ปกติทั้งหมด (ตาข้างที่อยู่ระหว่างกาบใบที่มีใบสีเขียว) คาดว่าลูกรุ่น M_1V_4 ที่เกิดจากส่วนของฐานหัวที่มีจีโนไทป์กลายที่ชั้น L_1 (ตาข้างที่อยู่ระหว่างกาบใบที่มีใบสีเงิน) จะเป็นต้นที่มีลักษณะใบสีเงินเหมือนต้นแม่และลูกรุ่นถัดไปก็จะมีลักษณะใบสีเงินเช่นเดียวกัน เพราะฉะนั้นการกลายแบบ periclinal chimera ในบัวดินที่ได้รับรังสี 15 เกรย์ จะเริ่มคงที่ตั้งแต่หัวย่อยรุ่น M_1V_3 ในใบที่ 5 และหัวย่อยรุ่น M_1V_4 ในหัวที่ 7 เป็นต้นไป การกลายแบบ periclinal chimera ของบัวดินที่ได้รับรังสี 15 เกรย์ เป็นการกลายที่ชั้นเซลล์ผิว (L_1) ดังนั้น อวัยวะทุกส่วนจะมีชั้นของเซลล์ผิวเป็นสีขาวซึ่งรวมถึงดอกด้วย แต่จากการทดลองนี้ พบว่า ต้นบัวดินใบสีเงินยังไม่ออกดอกจึงไม่สามารถพิสูจน์ข้อสันนิษฐานนี้ได้ สาเหตุที่บัวดินใบสีเงินยังไม่ออกดอกเนื่องจากเป็นบัวดินรุ่นที่ 3 ซึ่งมีอายุหัวประมาณ 4 เดือน ซึ่งเป็นอายุที่ยังไม่พร้อมจะออกดอก ประกอบกับหัวมีขนาดเล็กมีการเจริญเติบโตอย่างช้าเมื่อเทียบกับบัวดินรุ่นเดียวกันที่มีใบสีเขียว เนื่องจากการที่บัวดินใบสีเงินมีส่วนของเซลล์ผิวใบเป็นสีขาวจึงไม่มีคลอโรฟิลล์ทำให้ต้นมีปริมาณการสังเคราะห์แสงลดลง อาหารและพลังงานสำหรับใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ จึงลดลง ต้นจึงโตช้ากว่าปกติ และถ้าหากบัวดินใบสีเงินออกดอก คาดว่าดอกที่ 1 2 3 และ 4 จะยังคงเป็นดอกที่มีสีของชั้นเซลล์ผิวปกติเนื่องจากเป็นดอกที่เกิดจากตา

ดอกที่อยู่ระหว่างกาบใบที่มีใบสีเขียว ดอกที่ 5 และดอกถัดไปจึงจะมีสีของชั้นเซลล์ผิวที่เป็นสีขาว เนื่องจากจะเป็นดอกที่เกิดจากตาดอกที่อยู่ระหว่างกาบใบที่มีใบสีเงิน

2. ผลของรังสีแกมมาและสารละลายโคลชิซินต่อการกลายของดอกและอวัยวะสืบพันธุ์

หลังจากนำบัวดินรุ่น M_1V_2 ออกปลูกในแปลงทดลอง และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกและอวัยวะสืบพันธุ์ของดอกภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังออกปลูกพบว่า ต้นที่ได้รับรังสีและต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนั้น มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ของดอกและอวัยวะสืบพันธุ์ คือ มีจำนวนกลีบดอกเพิ่มขึ้นหรือลดลง ตำแหน่งของกลีบดอกเปลี่ยนไปหรือกลีบดอกผิดปกติ มีจำนวนเกสรเพศผู้เพิ่มขึ้นหรือลดลง เกสรเพศผู้มีรูปร่างผิดปกติ ยอดเกสรเพศเมียมีแฉกเพิ่มขึ้นเป็น 4 แฉก หรือมีรูปร่างผิดปกติ ยอดเกสรเพศเมียเปลี่ยนเป็นสีขาว และดอกมีขนาดเล็ก ทั้งนี้ เกิดจากการกลายของยีนที่ทำหน้าที่ในการกำหนดโครงสร้างของดอก โดยดอกของพืชจะประกอบด้วยโครงสร้างพื้นฐาน 2 ส่วน คือ ส่วนของกลีบ (perianth) ได้แก่ กลีบเลี้ยงและกลีบดอก และส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์ (reproductive organ) ได้แก่ เกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย ซึ่งการกำหนดโครงสร้างของดอกทั้ง 2 ส่วนนี้ เกี่ยวข้องกับ homeotic gene (Bowman *et al.*, 1991; Aeschbacher and Benfey, 1992 และ Liu and Mara, 2010) ที่ควบคุมกระบวนการพัฒนาเนื้อเยื่อไปเป็นอวัยวะต่างๆ ถ้าเกิดการกลายพันธุ์ของยีนในกลุ่มนี้ก็จะเกิดพัฒนาการของอวัยวะที่ผิดรูปแบบไป ตัวอย่างยีนได้กลุ่มนี้ ได้แก่ ยีน MADs box (Airolidi and Davies, 2012) ซึ่งได้มีการศึกษาเกี่ยวกับยีน MADs box และเสนอโมเดล ABCs ที่ใช้อธิบายเกี่ยวกับการพัฒนาส่วนประกอบของดอกซึ่งอยู่บริเวณตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจงบนดอกพืช (Kramer, 2006) โดยแบ่งยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างส่วนประกอบของดอกทั้ง 4 วง ได้แก่ วงกลีบเลี้ยง (calyx) วงกลีบดอก (corolla) วงเกสรเพศผู้ (androecium) และวงเกสรเพศเมีย (gynoecium) ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ยีนกลุ่ม A ทำหน้าที่ควบคุมวงกลีบเลี้ยงและวงกลีบดอก ยีนกลุ่ม B ทำหน้าที่ควบคุมวงกลีบดอกและวงเกสรเพศผู้ และยีนกลุ่ม C ทำหน้าที่ควบคุมวงเกสรเพศผู้และวงเกสรเพศเมีย (Baum and Hileman, 2006; Rijpkema *et al.*, 2010 และ Ito, 2011) จากการศึกษาใน *Arabidopsis* พบว่า ยีนในกลุ่ม A ประกอบด้วย *APETALA1* (*AP1*) *APETALA2* (*AP2*) และ *LEUNIG* (*LUG*) ยีนในกลุ่ม B ประกอบด้วย *APETALA3* (*AP3*) และ *PISTILLATA* (*PI*) และยีนกลุ่ม C ประกอบด้วย *AGAMOUS* (*AG*) (Samipak, 2009; Causier *et al.*, 2010) และทำการศึกษากลายพันธุ์ของยีนในกลุ่มดังกล่าวพบว่า ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดอก โดยเมื่อหยุดการทำงานของยีนในกลุ่ม A พบว่า กลีบเลี้ยงเปลี่ยนไปเป็นเกสรเพศเมียและกลีบดอกเปลี่ยนไปเป็นเกสรเพศผู้ เมื่อหยุดการ

ทำงานของยีนในกลุ่ม B พบว่า กลีบดอกเปลี่ยนไปเป็นกลีบเลี้ยงและเกสรเพศผู้เปลี่ยนไปเป็นเกสรเพศเมียและเมื่อหยุดการทำงานของยีนในกลุ่ม C พบว่า เกสรเพศผู้เปลี่ยนไปเป็นกลีบดอก และเกสรเพศเมียเปลี่ยนไปเป็นกลีบเลี้ยง (Alberts *et al.*, 2002)

นอกจากยีนในกลุ่ม ABCs model ที่ทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของส่วนประกอบของดอกแล้ว ยังมียีนอื่นที่มีหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ ของดอก ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับจำนวนและการจัดเรียงขององค์ประกอบของดอก เช่น ยีน *WUSCHEL* (*WUS*) และยีน *CLAVATA* (*CLV*) ใน *Arabidopsis* ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมขนาดของดอกและจำนวนขององค์ประกอบต่างๆ ภายในดอก ได้แก่ กลีบดอก กลีบเลี้ยง เกสรเพศผู้ และเกสรเพศเมีย (Soltis *et al.*, 2009) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดขนาดของดอกโดยขนาดดอกที่เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากการขยายขนาดของเซลล์ที่มากกว่าปกติซึ่งเกิดได้หลายวิธี เช่น การขยายขนาดของแวคิวโอล (vacuolation) การเพิ่มจำนวนโครโมโซม (ploidy level) หรือมีกระบวนการสังเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์และโครงสร้างของเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *BIGPETALp* (*BPEp*) (Delgado - Benarroch *et al.*, 2009) ดังนั้น หากเกิดการกลายของยีนดังกล่าว ก็อาจจะทำให้องค์ประกอบของดอกและขนาดดอกเปลี่ยนไป นอกจากการขยายขนาดของเซลล์แล้วการแบ่งเซลล์ก็มีผลต่อการเพิ่มหรือลดขนาดของอวัยวะต่างๆ ในพืชเช่นกัน โดยพบว่าเมื่อชักนำให้เกิดการกลายของยีน *ANGUSTIFOLIA 3* ใน *Arabidopsis* ทำให้มีใบแคบลง และในต้น *Antirrhinum* ที่มียีนกลาย *compacta ahnlich* (*coan*) มีขนาดดอกเล็กลงเนื่องจากการแบ่งเซลล์ลดลง (Delgado - Benarroch *et al.*, 2009) จึงเป็นไปได้ว่ารังสีแกมมาและสารละลายโคลชิซินมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของยีนและโครโมโซมที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของโครงสร้างและการพัฒนาของดอกจึงพบลักษณะผิดปกติต่างๆ เกิดขึ้น แต่ทั้งนี้ พบว่าลักษณะผิดปกติต่างๆ ของดอกเป็นลักษณะที่ไม่คงตัว ซึ่งน่าจะเป็นการกลายแบบ mericlinal chimera หรือ sectorial chimera ยกเว้น ลักษณะโคนกลีบดอกแคบและยอดเกสรเพศเมียสีขาวซึ่งเป็นลักษณะที่คงตัว สามารถพบได้ในดอกที่ออกทีหลังและพบในดอกที่เกิดจากต้นรุ่น M_1V_3 ซึ่งอาจจะเป็นการกลายแบบ periclinal chimera หรือเป็นการกลายที่เกิดจากโครโมโซมในนิวเคลียส ซึ่งต้องทำการทดสอบโดยวิธีผสมต่อไปว่าลักษณะดังกล่าวสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมโดยวิธีผสมได้หรือไม่ ถ้าได้ก็แสดงว่าเป็นการกลายที่เกิดกับยีนที่อยู่ในนิวเคลียส

3. ผลของสารละลายโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงของจำนวนปากใบ ความยาวเซลล์ปากใบ และจำนวนโครโมโซมในบัวดิน

หลังจากนำบัวดินรุ่น M_1V_2 ออกปลูกในแปลงทดลองแล้ว 6 เดือน และคัดเลือกต้นที่ คาดว่าเป็นต้นโพลีพลอยด์ที่มีลักษณะใบหนาและหยาบ ศึกษาจำนวนปากใบและความยาวเซลล์ปากใบพบว่า สามารถคัดเลือกต้นที่มีลักษณะดังกล่าวจากต้นที่แช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง ได้จำนวน 2 6 1 และ 1 ต้น ตามลำดับ และเมื่อนับจำนวนปากใบพบว่า ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 6 ชั่วโมง ต้นที่ 1 ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 12 ชั่วโมง ต้นที่ 1 2 และ 5 และต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 24 และ 48 ชั่วโมง มีจำนวนปากใบเฉลี่ยต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร น้อยที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายโคลชิซินมีผลทำให้ขนาดของเซลล์ปากใบเพิ่มขึ้น จำนวนปากใบต่อพื้นที่จึงลดลง (Levin, 2002; Roy, 2009) เช่นเดียวกับต้น *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel (Liu *et al.*, 2011) *Hemerocallis* (Podwyszynska *et al.*, 2011) *Pinellia ternate* (He *et al.*, 2012) และ *Clivia miniata* Regel (Wang and Lei, 2012) เป็นต้น ซึ่งถูกชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยใช้สารละลายโคลชิซิน โดยการกลายของเซลล์ของขนาดเซลล์ปากใบเป็นการกลายของเนื้อเยื่อในชั้น L_1 (Podwyszynska *et al.*, 2011) เมื่อวัดความยาวเซลล์ปากใบกลับพบว่า ต้นที่มีจำนวนปากใบเฉลี่ยต่อพื้นที่ลดลงมีความยาวเซลล์ปากใบใกล้เคียงกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ยกเว้นต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนาน 24 ชั่วโมง ที่มีความยาวเซลล์ปากใบมากกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินถึง 2 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากนอกจากสารโคลชิซินนั้นจะมีผลต่อการเพิ่มขนาดของเซลล์ปากใบแล้ว ยังมีผลทำให้รูปร่างของแผ่นใบเกิดการเปลี่ยนแปลง เป็นผลทำให้การกระจายตัวของปากใบต่อพื้นที่มีจำนวนเปลี่ยนแปลงไปด้วย ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ปากใบมีการกระจายตัวมากขึ้น จำนวนปากใบต่อพื้นที่จึงลดลงต่างๆ ที่ขนาดของเซลล์ปากใบมีค่าใกล้เคียงกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน

หลังจากนำบัวดินรุ่น M_1V_2 ออกปลูกในแปลงทดลองเป็นเวลา 6 เดือน คัดเลือกต้นที่ คาดว่าเป็นต้นโพลีพลอยด์ที่มีลักษณะใบหนาและหยาบ ศึกษาจำนวนโครโมโซมพบว่า การแช่ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง สามารถชักนำให้บัวดินมีจำนวนโครโมโซมเป็น mixoploid โดยในปลายรากที่นำมาศึกษานั้นมีเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมต่างๆ อยู่ในรากเดียวกันหรือในต้นเดียวกัน (Schlegel, 2010) ซึ่งเป็นการกลายของเนื้อเยื่อในชั้น L_3 (Podwyszynska *et al.*, 2011) เนื่องจากสารโคลชิซินมีผลหยุดการทำงานของ

กระบวนการแบ่งเซลล์ โดยสารโคลชิซินจะเข้าไปอุดตันในท่อ microtubules ซึ่งเป็นสายสั้นๆ จึงทำให้ microtubules ไม่สามารถต่อกันเป็นสาย spindle fiber ได้ (Caperta, 2006) ดังนั้น ภายในเซลล์ ขณะที่เกิดการแบ่งตัวจึงไม่มีสาย spindle fiber ที่ทำหน้าที่สำหรับดึงโครโมโซมในระยะเมทาเฟส ออกไปสู่ขั้วเซลล์เพื่อเข้าสู่ระยะอะนาเฟส ภายในเซลล์จึงมีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์และเมื่อเซลล์ดำเนินวงจรการแบ่งเซลล์ต่อไปจนถึงขั้นตอนการตั้งเคราะห์ดีเอ็นเอ โครโมโซมที่ไม่มีการแบ่งตัวจึงเกิดการจำลองตัวและเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า เป็นผลให้ภายในเซลล์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น (Seguí - Simarro and Nuez, 2008; Yemets and Blume, 2008; Lee *et al.*, 2009 และ Ade and Rai, 2010) และสาเหตุที่ทำให้ต้นมีจำนวนโครโมโซมมากกว่า 1 ชุด ในต้นเดียวกัน เนื่องจากการเจริญเติบโตของหัวใหม่นั้น ไม่ได้เกิดจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว แต่เกิดจากกลุ่มเนื้อเยื่อบริเวณปลายยอด (shoot apical meristem) ซึ่งในขณะที่ให้สารละลายโคลชิซินนั้นเซลล์อาจไม่ได้อยู่ในระยะเมทาเฟสทั้งหมด ดังนั้นเซลล์ที่อยู่ในระยะการแบ่งเซลล์อื่นจึงมีการแบ่งเซลล์ไปตามปกติ (Jelenic *et al.*, 2001; Nilanthi *et al.*, 2009 และ Vanzie - Canton and Leonhardt, 2009) และในต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนานมากกว่า 12 ชั่วโมง พบว่า มีเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมมากกว่า 96 แท่ง อาจเนื่องมาจากเซลล์ได้มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสมากกว่า 1 รอบ ในขณะที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน โครโมโซมจึงได้เพิ่มจำนวนมากกว่า 96 แท่ง (Sakhanokho *et al.*, 2009) ซึ่งพบลักษณะเช่นเดียวกันนี้ในพืชหลายชนิดที่ถูกชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมด้วยสารละลายโคลชิซิน เช่น *Allium wakegi* Araki (Adaniya and Ardian, 1997) *Zingiber officinale* (Smith *et al.*, 2004) *Phlox paniculata* L. (Matiska and Vejsadová, 2010) และ *Hemerocallis* (Podwyszynska *et al.*, 2011) เป็นต้น

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. ได้ปริมาณรังสีแกมมาและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำบัวดิน (*Zephyranthes* spp.) ให้กลายพันธุ์จากการทดลองในครั้งนี้ 2 วิธี ได้แก่

วิธีที่ 1 โดยการฉายรังสีแกมมาให้กับหัวเผ้าครึ่งของบัวดินที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยปริมาณรังสีที่สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในบัวดินจากการทดลองนี้ คือ ที่ปริมาณรังสี 15 เกรย์ ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดลักษณะใบด่าง และที่ปริมาณรังสี 25 เกรย์ สามารถชักนำให้เกิดลักษณะดอกเล็ก

วิธีที่ 2 โดยการแช่หัวเผ้าครึ่งของบัวดินที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยระยะเวลาในการแช่ที่สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในบัวดินจากการทดลองนี้ คือ 24 ชั่วโมง ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดการกลายของสีใบและรูปร่างใบ

2. ได้บัวดินที่มีลักษณะกลายถาวร 1 ต้น ได้แก่ ต้นที่มีลักษณะใบสีเงินจากการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 15 เกรย์

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองนี้พบว่า การชักนำบัวดินในสภาพปลอดเชื้อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมานั้นประสบความสำเร็จโดยส่วนที่นำมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ คือ ส่วนของฐานหัว แต่จำนวนของลักษณะที่กลายและจำนวนต้นที่กลายนั้นพบว่ายังเกิดได้ในปริมาณที่น้อย ดังนั้นหากมีการทดลองโดยนำชิ้นส่วนอื่นๆ เช่น ชิ้นส่วนของแคลลัสที่ได้จากการชักนำในอวัยวะที่ต่างกัน เช่น ใบหรือส่วนของช่อกาบใบที่อยู่บริเวณฐานหัว มาใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายด้วยรังสีแกมมา อาจสามารถเพิ่มความถี่ในการเกิดการกลายพันธุ์ให้กับบัวดินในสภาพปลอดเชื้อได้
2. จากการทดลองนี้ได้บัวดินพันธุ์กลายที่มีลักษณะของเซลล์ผิวใบสีขาวหรือใบสีเงิน ซึ่งยังไม่ได้ทำการทดสอบว่าลักษณะดังกล่าวนี้ สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมโดยวิธีการผสมพันธุ์ได้หรือไม่ ดังนั้น จึงควรมีการทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมต่อไป และถ้าหากพบว่า ลักษณะเซลล์ผิวที่มีการกลายของคลอโรพลาสต์นี้ สามารถถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมได้โดยวิธีการผสมพันธุ์ บัวดินต้นดังกล่าวก็จะมีคุณค่าในการเพิ่มความหลากหลายให้กับประชากรบัวดิน และเป็นเชื้อพันธุกรรมที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมข้ามได้ต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กฤษณา ฟินิจ. 2545. การชักนำให้เกิดการกลายใน *Ornithogalum dubium* Houtt. โดยการฉายรังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กันยารัตน์ ไชยสุต. 2532. เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล *Zephyranthes*. ภาควิชาพฤกษศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- จิตภา รุหะโรจน์. 2538. เปรียบเทียบอัตราการขยายพันธุ์ไม้หัวบางชนิดโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ทิวา รักนิม. 2533. ผลของโคลชิซินที่มีต่อการกลายพันธุ์ของแกลดิโอลัสที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นพพร พัฒนพรพันธุ์. 2551. วานลีทิส. สายธุรกิจโรงพิมพ์ บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน), กรุงเทพฯ.
- นิยมศรี ศรีคุณ, มาลี ณ นคร และ สุริยา ตันติวิวัฒน์. 2552. การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในเนื้อเยื่อกระชายแดง (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. (red form)) ในสภาพปลอดทดลองด้วยโคลชิซิน. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย. 1(2): 71-80.
- นิรันดร์ จันทวงศ์, ประศาสตร์ เกื้อมณี, มาลี ณ นคร และ สุริยรัตน์ คิวสก. 2534. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2534 โครงการวิจัยรหัส ท-ช 1.2.34. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 8 หน้า
- ขรรยงค์ เหนานรักษ์. 2523. การชักนำให้เกิดโพลีพลอยของโครโมโซมในแตงโมพันธุ์ต่างๆ ด้วยสารโคลชิซิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รัชนี เพ็ชรช้าง. 2553. ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการให้โคลชิซินต่อการเจริญและจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้เอื้องเงิน. ว วิทย เทคโนโลยี มมส. 29(4): 413-419.

รัชนิวรรณ จีงสงวนสิทธิ์. 2546. ความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยาและเซลล์วิทยาในตำลึงที่เกิดจากการใช้สารโคลชิซิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัศมี ฟักกลัด. 2536. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในลิลลี่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัชรินทร์ รัตนพันธ์. 2544. การเพิ่มจำนวนโครโมโซมของขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยด้วยโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2537. การกลายพันธุ์ของพืช. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟินนี่พับบลิชซิง, กรุงเทพฯ.

สุชาดา พัฒนกกนก. 2545. สถาบันราชภัฏเพชรบุรีวิทยาลัยเกษตรในพระบรมราชูปถัมภ์. รายงานการวิจัย เรื่อง การผลิตว่านสี่ทิศไทยพันธุ์ใหม่. 96 หน้า

สุชาดา ศรีบุญเรือง. 2550. การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในไทรย้อยใบแหลมต่างโดยใช้รังสีแกมมา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2552. การปรับปรุงพันธุ์พืช. ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรศักดิ์ เพิ่มลาภ. 2539. การศึกษาปากใบของพรรณไม้หอมบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรา คัมภีรานนท์. 2546. พันธุศาสตร์ของเซลล์. พิมพ์ครั้งที่ 2 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิต. 2530. รังสีชีววิทยา. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2530. เอกสารคำสอนวิชารังสีชีววิทยา. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

_____. 2539. การใช้รังสีในการปรับปรุงพันธุ์พืช. เอกสารการสอนการใช้รังสีและไอโซโทป ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2550. การกลายพันธุ์: เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Adaniya, S. and Ardian. 1997. Stability of cytochimera of *Allium wakegi* Araki during in vivo and vitro propagation. **Scientia Horticulturae**. 71: 93-102.

_____. and D. Shirai. 2001. In vitro induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. **Scientia Horticulturae**. 88: 277-287.

Aeschbacher, R.A. and P.N. Benfey. 1992. Genes that regulate plant development. **Plant Science**. 83: 115-126.

Airoidi, C.A. and B. Davies. 2012. Gene duplication and the evolution of plant MADS-box transcription factors. **Journal of Genetics and Genomics**. 39: 157-165.

Ade, R. and M.K. Rai. 2010. Review: colchicines, current advances and future prospects. **Bioscience**. 2(2): 90-96.

Alan, A.R., Bratns, A., Cobb, E., Goldschmied, P.A., Mutschler, M.A. and E.D. Earle. 2004. Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials. **Plant Science**. 167: 1055-1066.

- Alan, A.R., Lim, W., Mutschler, M.A. and E.D. Earle. 2007. Complementary strategies for ploidy manipulations in gynogenic onion (*Allium cepa* L.). **Plant Science**. 173: 25-31.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and P. Walter. 2002. Development of multicellular organisms. pp. 1157-1258. *In*. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. Garland Science, a member of the Taylor & Francis Group, New York.
- Arena, V. 1971. **Ionizing radiation and life: An introduction to radiation biology and biological radiotracer methods**. The C.V. Mosby Company, USA.
- Atwell, B., Kriedemann, P.E. and C.G.N. Turnbull. 1999. **Plant in action: adaptation in nature, performance in cultivation**. Macmillan Education Australia Pty Ltd, Australia.
- Auger, D.L. and W.F. Sheridan. 2012. Plant chromosomal deletions, insertions, and rearrangements. pp 3-36. *In*. **Plant cytogenetics: Genome structure and chromosome function**. Springer New York Dordrecht, London.
- Bae, C.H., Abe, T., Nagata, N., Fukunishi, N., Matsuyama, T., Nakano, T. and S. Yoshida. 2000. Characterization of a periclinal chimera variegated tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Plant Science**. 151: 93-101.
- Bailey, L.H. 1993. **The Standard Cyclopedia of Horticulture vol. I A-E**. The Macmillan Co., London.
- Baum, D.A. and L.C. Hileman. 2006. A developmental genetic model for the origin of the flower. pp.3-27. *In*. Ainsworth, C. **Flowering and its manipulation: Annual plant reviews**, vol. 20. Blackwell publishing Ltd., UK.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R. and E.M. Meyerowitz. 1991. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. **Development**. 112: 1-20.

Bryan, J.E. 1989. **Bulbs Volume I, A-H**. Christopher Helm (Publishers) Ltd, Imperial House, Great Britan.

_____. 2002. **Bulbs**. revised edition. Colorcraft Ltd., Hong Kong.

_____ and M. Griffiths. 2003. **Manual of Bulbs**. Timber Press Incorporated, Portland.

Carnevali , G., R. Duno, J.L. Tapia and I. M. Ramírez. 2010. Reassessment of *Zephyranthes* (Amaryllidaceae) in the Yucatán Peninsula including a new species, *Z. orellanae*. **Torrey Botanical Society**. 137(1): 39-48.

Caperta, A.D., Delgado, M., Ressurrelção, F., Melster, A., Jones, R.N., Vlegas, W. and A. Houben. 2660. Colchicine - induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c - metaphase cells. **Protoplasma**. DOI 10.1007/s00709 - 005 - 0127 - z.

Casarett, A.P. 1968. **Radiation biology**. Prentice-Hall, INC. USA.

Causier B., Schwarz-Sommer, Z. and B. Davies. 2010. Floral organ identity: 20 years on ABCs. **Seminar in cell & developmental biology**. 21: 73-79.

Chen, L.L. and S.L. Gao. 2007. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. **Scientia Horticulturae**. 112: 339-344.

Delgado-Benarroch, L., Weiss, J. and M. Egea-Cortines. 2009. Floral organ size control: interplay between organ identity, developmental compartments and compensation mechanisms. **Plant signaling & behavior**. 4(9): 814-817.

Dhulgande, G.S., Ghogare, D.S., Dhale, D.A. and R.A. Satpute. 2005. Mutagenic effects of gamma rays and EMS on frequency and spectrum of chlorophyll mutations in pea (*Pisum sativum* L.). **Journal of Ecobiotechnology**. 2(8): 4-7.

- Escandón, A.S., L.M. Alderete and J.C. Hagiwara. 2007. *In vitro* polyploidization of *Mecardonia tenella*, a native plant from South America. **Scientia Horticulturae**. 115: 56-61.
- Esnault, M.A. 2010. Ionizing radiation: Advanced in plant response. **Environmental and experimental botany**. 68: 231-237.
- Evert, E.F. 2006. **Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development**. 3rd. A John Wiley & Sons Inc., USA.
- Felix, W.J.P., Dutilh, J.H.A., De Melo, N.F., Fernandes, A.A. and L.P. Felix. 2008. Intrapopulational chromosome number variation in *Zephyranthes sylvatica* Baker (Amaryllidaceae: Hippeastreae) from Northeast Brazil. **Revista Brasil. Bot.** 31 (2): 371-375.
- _____, Felix, L.P., Melo, N.F., Oliveira, M.B.M., Dutilh, J.H.A. and R. Carvalho. 2011. Karyotype variability in species of the genus *Zephyranthes* Herb. (Amaryllidaceae-Hippeastreae). **Plant Syst Evol.** 294: 263-271.
- _____, Felix, L., Melo, N., Dutilh, J. and R. Carvalho. 2011. Cytogenetics of Amaryllidaceae species: heterochromatin evolution in different ploidy levels. **Plant Systematics & Evolution**. 292: 215-221.
- Geoffriau, E., Kahane, R., Bellamy, C. and M. Rancillac. 1997. Ploidy stability and *in vitro* chromosome doubling in gynogenic clones of onion (*Allium cepa* L.). **Plant Science**. 122: 201-208.
- Glowacka, K., S. Jezowski and Z. Kaczmarek. 2010. *In vitro* induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterisation of induced polyploids in two *Miscanthus* species. **Industrial Crops and Products**. 32: 88-96.

Goodrich, J. and A. Hodson. 1997. Plant meristems: cell signaling keeps the balance. **Current Biology**. 7(7): 427-429.

Grzebelus, E. and A. Adamus. 2004. Effect of anti-mitotic agents on development and genome doubling of gynogenic onion (*Allium cepa* L.) embryos. **Plant Science**. 167: 569-574.

Hake, S. and B.R. Char. 1997. Cell-cell interactions during plant development. **Genes Dev**. 11: 1087-1097.

Harten, A.M.van. 1998. **Mutation breeding: theory and practical applications**. The press syndicate of the university of Cambridge, UK.

He, L.Y., Ding, Z., Jiang, F., Jin, B., Li, W., Ding, X., Sun, J. and G. Lv. 2012. Induction and identification of hexadecaploidy of *Pinellia ternate*. **Euphytica**. 186: 479-488.

Hertogh, A.D., and M.L. Nard. 1993. **The Physiology of Flower Bulbs**. Elsevier science publishers B.V., Netherlands.

Hochanadel, C.J. 1960. Radiation chemistry of water. pp. 151-189. *In*. Burton, M., Kirby-Smith, J.S. and John, L.M. **Comparative effects of radiation**. John wiley & sons, INC., London.

Ito, T. 2011. Coordination of flower development by homeotic master regulators. **Current Opinion in Plant Biology**. 14: 53-59.

Jelenic, S., Berljak, J., Papes, D. and S. Jelaska. 2001. Mixoploidy and chimeric structures in somaclones of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Bintje. **Food technol. biotechnol**. 39(1): 13-17.

- Jimenez, L., Alarcón, E., Sutton, C.T., Gandhi, N. and Juan C.S. 2011. Effect of gamma radiation on green onion DNA integrity: Role of ascorbic acid and polyphenols against nucleic acid damage. **Food chemistry**. 128: 735-741.
- Jones, G.H., 2009. **Cytogenetics**. Alpha science international Ltd. India.
- Ketmaro, S., Taychasinpitak, T., Mongkolchaiyaphruek and S. Wongchaochant. 2012. Effect of colchicines on increasing pollen viability in a Curcuma hybrid (*Curcuma sparganifolia* × *C. parviflora*). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. 46: 363-370.
- Kolar, F., Pawar, N. and G. Dixit. 2011. Induced chlorophyll mutations in *Delphinium malabaricum* (Huth) Munz. **Journal of Applied Horticulture**. 13(1): 18-24.
- Kovács, E. and Á. Keresztes. 2002. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. **Micron**. 33: 199-210.
- Kramer, K.M. 2006. Floral patterning and control of floral organ formation. pp. 49-70. *In*. Ainsworth, C. **Flowering and its manipulation: Annual plant reviews, vol. 20**. Blackwell publishing Ltd., UK.
- Lamseejan S., P. Jompuk, A. Wongpiyasatid, S. Deeseepan and P. Kwanthammachart. 2000. Gamma-rays Induced Morphological Changes in Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. 34(3): 417-422.
- Lee, H.O., Davidson, J.M. and R.J. Duronio. 2009. Endoreplication: polyploidy with purpose. **Genes & Development**. 23: 2461-2477.
- Leduc, N., M. Monnier and G.C. Douglas, 1990. Germination of trinucleated pollen: formulation of a new medium for *Capsella bursapastoris*. **Sexual Plant Reproduction**. 3: 228-235.

Levin, D.A. 2002. **The role of chromosomal change in plant evolution**. Oxford University Press, New York.

Lineberger, R.D. **Origin, development, and propagation of chimeras**. Available: <http://aggie-horticulture.tamu.edu/tisscult/chimeras/chimeralec/chimeras.html>. July 8, 2012.

Liu, S., Chen, S., Chen, Y., Guan, Z., Yin, D. and F. Chen. 2011. In vitro induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel. shows an improved level of abiotic stress tolerance. **Scientia Horticulturae**. 127: 411-419.

Liu, Z. and C. Mara. 2012. Regulatory mechanisms for floral homeotic gene expression. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. 21: 80-86.

Lu, G., Zhang, X., Zou, Y., Zou, Q., Xing, X. and J. Cao. 2007. Effect of radiation on regeneration of Chinese narcissus and analysis of genetic variation with AFLP and RAPD markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 88(3): 319-327.

Matiska, P. and H. Vejsadová. 2010. Polyploidy induction in *Phlox paniculata* L. under *in vitro* conditions. **Acta University Agriculture et Silviculturae Mendelinanae Brunensis Sborník Mendelovy Univerzity V Brně**. 1: 101-106.

Marcotrigiano, M. 1997. Chimeras and variegation: patterns of deceit. **Hortscience**. 32(5): 773-784.

_____. and T.M. Gradziel. 1997. Genetic mosaics and plant improvement. **Plant breeding reviews**. vol. 15(1997): 43-84.

Morán, G.P., Colque, R., Viladomat, F., Bastida, J. and C. Codina. 2003. Mass propagation of *Cyrtanthus clavatus* and *Cyrtanthus spiralis* using liquid medium culture. **Scientia Horticulturae**. 98: 49-60.

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

Nilanthi, D., Chen, X., Zhao, F., Yang, Y. and H. Wu. 2009. Induction of tetraploids from petiole explants through colchicine treatments in *Echinacea purpurea* L. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. Article ID 343485. 7 p.

Ning, G., Shi, X., Hu, H., Tan, Y. and M. Bao. 2009. Development of a range of polyploidy lines in *Petunia hybrida* and the relationship of ploidy with the single-/double-flower trait. **Hort. Science**. 44(2): 250-255.

Nonaka, T., Oka, E., Asano, M., Kuwayama, S., Tasaki, H., Han, D.S., Godo, T. and M. Nakano. 2011. Chromosome doubling of *Lychnis* spp. by in vitro spindle toxin treatment of nodal Segments. **Scientia Horticulturae**. 129: 832-839.

Pacific bulb society. 2011. **Zephyranthes Hybrids Three**. Available: <http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/ZephyranthesHybridsThree#PaulNiemer>, December 25, 2010.

Palamine, M.T.L., Cureg, R.G.A., Marbella, L.J., Lapade, A.G., Domingo, Z.B. and C.C. Deocar. 2005. Some biophysical change in the chloroplasts of a *Dracaena* radiation-mutant. **Philippine Journal of Science**. 134(2): 121-126.

Podwysznska, M., Gabryszewska, E. and D. Sochacki. 2011. Histogenic identification by cytological analysis of colchicine - induced polyploids of *Hemerocallis*. **Acat Hort**. 886: 247-251.

Rijkema, A.S., Vandenbussche, M., Koes, R., Heijmans, K. and T. Gerats. 2010. Variations on a theme: changes in the floral ABCs in angiosperms. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. 21: 100-107.

- Rodrigues, F.A., Soares, J.D.R., Santos, R.R. dos, Pasqual, M. and S. de O. e Silva. 2011. Colchicine and amiprofos – methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant. **African Journal of Biotechnology**. 10(62): 13476-13481.
- Roy, D. 2009. **Cytogenetic**. Alpha science international Ltd., U.K.
- Sakhanokho, H., Rajasekaran, K., Kelley, R.Y. and N. Islam - Faridi. 2009. Induced polyploidy in diploid ornamental ginger (*Hedychium muluense* R.M. Smith) using colchicine and oryzalin. **HortScience**. 44(7): 1809-1814.
- _____, Rajasekaran, K., Tabanca, N., Sampsom, B.J., Nyochembeng, L.M., Pounders, C.T., Wedge, D.E., Islam - Faridi, N. and J.M. Spiers. 2012. **Acta Hort**. 935: 121-128.
- Samipak, S. 2009. The complex world of flower. **Thai Journal of Genetics**. 2(2): 120-124.
- Sangsiri, C., Sorojjapinun, W. and P. Srinives. 2005. Gamma radiation induced mutations in mungbean. **ScienceAsia**. 31: 251-255.
- Sarathum, S., M. Hegele, S. Tantivivat and M. Nanakorn. 2010. Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. **Europ. J. Hort. Sci.** 75(3): 123-127.
- Scamer, C.S. 1999. Laboratory techniques for determining ploidy in plants. **Hort Technology**. 9(4): 594-596.
- Schlegel, R.H.J. 2010. **Dictionary of plant breeding**. 2 ed. Taylor & Francis Group, USA.
- Seguí - Simarro, J.M. and F. Nuez. 2008. Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. **Cytogenetic and Plant Breeding**. 120: 358-369.

- Smith, R.S., J. Burrows and K. Kurten. 1999. Workshop on micropropagation challenge associated with micropropagation of *Zephyranthes* and *Hippesastrum* sp. (Amaryllidaceae). ***In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant***. 35(4): 281-282.
- Smith, M.K., Hamill, S.D., Gogel, B.J. and A.A. Severn - Ellis. 2004. Ginger (*Zingiber officinale*) autotetraploids with improved processing quality produced by an *in vitro* colchicine treatment. ***Australian Journal of Experimental Agriculture***. 44: 1065-102.
- Soltis, P.S., Brockington, S.F., Yoo, M.J., Piedrahita, A., Latvis, M., Moore, M.J., Chanderbali, A.S. and D.E. Solits. Floral variation and floral genetics in basal angiosperms. ***American Journal of Botany***. 96(1): 110-128.
- Stewart, C.L. 2001. Chimera. ***Encyclopedia of genetics***. vol. 1(2001): 330-333.
- Tax, F.E. and A. Durbak. 2006. Meristems in the movies: live imaging as a tool for decoding intercellular signaling in shoot. ***Plant Cell***. 18: 1331-1337.
- Tilney-Bassett, R.A.E. 1978. The inheritance and genetic behavior of plastids: Chimeras. pp. 329-377. In: Kirk, J.T.O. and R.A.E. Tilney-Bassett. ***The plastids: their chemistry, structure, growth and inheritance***. Elsevier/North-Holand Biomedical Press, Netherlands.
- _____. 1986. ***Plant chimeras***. Edward Arnold (Publishers) Ltd., Great Britain.
- Ulrich, M.R., F.T. Davies, Y.C. Koh, S.A. Duray and J.N. Egilla. 1999. Micropropagation of *Crinum* 'Ellen Bosanquet' by tri-scales. ***Scientia Horticulturae***. 82: 95-102.
- Vanzie-Canton, S.D. and K.W. Leonhardt. 2009. *In vivo* polyploidization of *Zamioculcas zamiifolia*. ***Acta Hort***. 813: 531-538.

- Venkateswars, S. and C.R. Partanen. 1996. A comparative study of the effect of gamma radiation on organized and disorganized growth of tobacco. **Radiation Botany**. 6: 13-20.
- Wang, C. and J. Lei. 2012. *In vitro* induction of tetraploids from immature embryos through colchicine treatments in *Clivia miniata* regel. **African Journal of Agricultural Research**. 7(25): 3712-3718.
- Wegner, J. 2000. A theoretical approach to the genesis of cell layer arrangements in undifferentiated tissues. **Plant Science**. 153: 177-183.
- Wi, S.G., Chung, B.Y., Kim, J.S., Kim, J.H., Baek, M.H., Lee, J.W. and Y.S. Kim. 2007. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. **Elsevier. Micron**. 38: 553-564.
- Wise, R.R. 2007. Plastid origin and development: the diversity of plastid form and function. pp. 3-26. *In*. Wise, R.R. and J.K. Hooper. **The structure and function of plastids**. Springer, Netherlands.
- Wongpiyasatid, A., and P. Hormchan. 2000. New mutants of perennial *Portulaca grandiflora* through gamma radiation. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. 34(3): 408-416.
- Wu, H., Zheng, S., He, Y., Yan, G., Bi, Y. and Y. Zhu. 2007. Diploid female gametes induced by colchicine in Oriental lilies. **Scientia Horticulturae**. 114: 50-53.
- Ye, Y.M., Tong, J., Shi, X.P., Yuan, W. and G.R. Li. 2010. Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). **Scientia Horticulturae**. 124: 95-101.
- Yemets, A.I. and Ya.B. Blume. Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drugs. **The open horticulture journal**. 1: 15-20.

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ นางสาวรัตนภรณ์ เกิดเจริญ
 เกิดวันที่ 7 สิงหาคม 2525
 สถานที่เกิด จังหวัดกรุงเทพมหานคร
 ประวัติการศึกษา วท.บ. วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์เกษตร)
 ตำแหน่งปัจจุบัน -
 สถานที่ทำงานปัจจุบัน -
 ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ รางวัลชมเชย ในการนำเสนอผลงานภาคบรรยาย
 ในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 11
 ทุนการศึกษาที่ได้รับ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ