ผลของโคลชิซีนที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาและโครโมโซมของแตงโม *(Citrullus lanatus* Mat & Nakai) พันธุ์ปลูกตอปิโดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

พรทิพย์ เทิดบารมี

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม กรุงเทพมหานคร
Corresponding author email: p_therdbaramee@hotmail.com

ได้รับบทความ: 19 กุมภาพันธ์ 2562
ได้รับบทความแก้ไข: 8 มีนาคม 2562
ยอมรับตีพิมพ์: 11 มีนาคม 2562

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาผลของ 6-BAP ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดแตงโมในสภาพปลอดเชื้อ 2) ศึกษาผลของโคลชิซีนที่เหมาะสมต่อการกลายของแตงโม และ 3) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมแตงโมที่ได้รับสารโคลชิซีน ผลการวิจัย พบว่า 1) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 6.65 ยอด จำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด (14.25 ใบ) โดยมีความสูงและเกิดรากเฉลี่ย 3.64 เซนติเมตร และ 1.63 ราก ตามลำดับ 2) การศึกษาผลของโคลชิซีนที่เหมาะสมต่อการเกิดการกลายเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโด พบว่ามีค่า LD_{50} = ความเข้มข้นโคลชิซีนที่ร้อยละ 0.088 - 0.095 จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาต้นแตงโมที่ได้รับโคลชิซีน พบว่าสารโคลชิซีนความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.03 ชักนำให้เมล็ดแตงโมเพิ่มจำนวนยอดสูงสุด (1.18 ยอด) มีจำนวนใบและความสูงของต้นเฉลี่ย 3.00 ใบ และ 3.75 เซนติเมตร ตามลำดับ และเกิดรากคิดเป็นร้อยละ 100 และ 3) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดแตงโมที่ได้รับการแช่สารโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 40 ชั่วโมง พบว่าสารโคลชิซีนความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.00 ไม่พบความผิดปกติของโครโมโซมแตงโม คือ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 22 แท่ง ส่วนเมล็ดแตงโมที่ได้รับสารโคลชิซีนที่ร้อยละ 0.01 0.02 และ 0.03 พบว่าเกิดความผิดปกติของจำนวนโครโมโซม

คำสำคัญ: แตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโด / 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน / สารโคลชิซีน / การกลาย / โครโมโซม

Effect of Colchicine on Morphological and Chromosomal Aberrations on *In Vitro* Culture of Watermelon *(Citrullus lanatus* Mat & Nakai) cv. Torpedo

Phonthip Terdbaramee

Faculty of Science, Chandrakasem Rajabhat University, Bangkok
Corresponding author email: p_therdbaramee@hotmail.com

Received: 19 February 2019
Revised: 8 March 2019
Accepted: 11 March 2019

Abstract

The effect of colchicine on morphological and chromosomal variation of watermelon (*Citrullus lanatus* Mat & Nakai) cultured on tissue culture was studied. Inoculation of watermelon was performed at 0, 2, 3, and 4 mg/L in MS medium and the appropriate colchicine effect on watermelon mutagenicity. Concentration of 0.00, 0.01, 0.02, and 0.03%, in addition, the chromosome number of the watermelon from colchicine was studied by Feulgen squash technique. The highest concentration of leaf shoots (6.65 shoots) was found in MS medium supplemented with 6-BAP at 3 mg/L. The average root height was 3.64 cm and 1.63 roots respectively. The effect of colchicine on the mutation of watermelon seed, it was found that the percentage of germination and survival of watermelon seeds by immersion of colchicine solution at concentrations of 0.01, 0.02, and 0.03 percent for 40 hours could be found in LD_{50} 0.088 - 0.095. Morphology of watermelon stem was studied on colchicine. It was found that watermelon seeds with 0.03 percent of colchicine were able to induce the highest number of shoots (1.18 shoots), number of shoots and average height of plants, 3.00 and 3.75 cm, respectively. Root was 100%. Watermelon seeds

were immersed in 40-hour postharvest cultures of colchicine. Diploid chromosome number of watermelon was 22, while the watermelon seeds (immersion of colchicine solution at concentrations of 0.01, 0.02, and 0.03 %) were abnormal.

Keywords: Watermelon (*Citrullus lanatus* Mat & Nakai) cv. Torpedo / 6-Benzylaminopurine / Colchicine / Mutation / Chromosome

บทนำ

แตงโมเป็นไม้ล้มลุกมีชื่อสามัญว่า Watermelon ชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Citrullus lanatus* Mat & Nakai ซึ่งจัดเป็นพืชในวงศ์แตง (Cucurbitaceae) มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ (2n=2x) เท่ากับ 22 แท่ง [1] โดยแตงโมจัดว่าเป็นพืชเศรษฐกิจ เนื่องจากคนไทยนิยมรับประทาน อีกทั้งเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกที่ง่ายและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว รวมทั้งให้ผลผลิตต่อไร่ค่อนข้างสูงจึงทำรายได้ดีให้เกษตรกร แตงโมมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระและสามารถทำให้เกิดการผลิตไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide) เพิ่มขึ้นในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์จะมีผลดีต่อหลอดเลือดทำให้เกิดการไหลเวียนของเลือดเป็นปกติ เนื่องจากสามารถยับยั้งการเกาะตัวของเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาวบริเวณผนังหลอดเลือด รวมทั้งทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด โดยพบว่าแตงโม *(Citrullus lanatus* Mat & Nakai) พันธุ์ปลูกตอปิโด (Torpedo) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ ไนตริกออกไซด์สูงสุด [2] ดังนั้นจึงเป็นแนวทางในการบริโภคแตงโมเพื่อสุขภาพ โดยเฉพาะผู้ป่วยและผู้ที่เสี่ยงต่อภาวะการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ เช่น ผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน ความดันโลหิตและคลอเรสเตอรอล (Cholesterol) ในเลือดสูง เป็นต้น [3] แต่ถึงอย่างแตงโมก็ยังมีลักษณะบางอย่างที่ไม่เป็นที่ต้องการ เช่น มีความเสี่ยงต่อโรคและแมลง โดยเฉพาะฤดูฝนมักทำให้แตงโมไม่ติดผล ผลเน่า และโรคเถาเหี่ยว เป็นต้น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม (Chromosome) น่าจะเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์แตงโมให้ได้ลักษณะที่ดีขึ้นตามวัตถุประสงค์ได้ ซึ่งสารโคลชิซีน (Cholchicine) มีคุณสมบัติในการยับยั้งเส้นใยสปินเดิล (Spindle fiber) ไม่ให้สามารถดึงโครโมโซมไปยังขั้วเซลล์ทั้งสองด้าน ทำให้สามารถชักนำให้พืชเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมแบบต่าง ๆ ได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมสามารถทำให้พืชมีลักษณะการแสดงออก (Phenotype) ที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม และหากเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมจนเกิดเป็นแตงโมชนิดพอลิพลอยด์ (Polyploidy) ซึ่งมีจำนวนโครโมโซม 2n=4x=44 แท่ง โดยทั่วไปมีลักษณะที่แข็งแรงและให้ผลผลิตที่สูงกว่าแตงโมที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ (2n=2x=22) ดังนั้นการศึกษาความเข้มข้นของโคลชิซีนที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายจึงมีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์แตงโม นอกจากนี้การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีต่ออัตราการรอดชีวิตและการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของพืชในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเทคนิคที่ทำให้เกิดการขยายพันธุ์แตงโมที่เกิดจากชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมและได้ลักษณะสัณฐานวิทยาของแตงโมตามต้องการ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดในระยะเวลาอันสั้นน่าจะเป็นแนวทางที่ทำให้การปรับปรุงพันธุ์แตงโมให้ได้ลักษณะตามที่ต้องการประสบความสำเร็จต่อไป งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ 1. เพื่อศึกษาผลของ 6-BAP ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิด

ยอดของแตงโมในสภาพปลอดเชื้อ 2. เพื่อศึกษาผลของโคลชิซีนที่เหมาะสมต่อการเกิดการกลายของแตงโม 3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของแตงโมจากการได้รับสารโคลชิซีน

วัสดุและวิธีการ

1. ศึกษาผลของ 6-BAP ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดของแตงโมในสภาพปลอดเชื้อ

การชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดแตงโมในสภาพปลอดเชื้อด้วย 6-BAP โดยทดลองเพาะเลี้ยงเมล็ดแตงโมบนสูตรอาหารของ MS ที่เติม 6-BAP 0 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีการเติมน้ำตาลซูโครส (Sucrose) ความเข้มข้นร้อยละ 3 แล้วนำไปปรับ pH เท่ากับ 5.7 และเติมวุ้น 7 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยหม้อหนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยเพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารวุ้น เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตทางด้านต่าง ๆ เป็นเวลา 16 สัปดาห์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD) โดยแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลองจำนวน 20 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ การทดลองแบ่งออกเป็นทั้งหมด 4 สิ่งทดลอง โดยแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลอง 10 ซ้ำ ดังนี้ สิ่งทดลองที่ 1 สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (กลุ่มควบคุม) สิ่งทดลองที่ 2 สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สิ่งทดลองที่ 3 สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสิ่งทดลองที่ 4 สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการสังเกตการเกิดจำนวนยอด

2. ศึกษาผลของโคลชิซีนที่เหมาะสมต่อการเกิดมิวเตชันของเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโด

2.1 นำเมล็ดแตงโมมาทำการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเอทานอลร้อยละ 70 เป็นระยะเวลา 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

2.2 นำเมล็ดแตงโมมาแช่สารโคลชิซีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 0.02 และ 0.03 เป็นระยะเวลา 0 20 และ 40 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั้นที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว

2.3 เพาะเลี้ยงเมล็ดแตงโมในสูตรอาหาร MS แล้วศึกษา 1) ค่า LD_{50} 2) ลักษณะสัณฐานวิทยา 3) เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 4) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของแตงโมจากการได้รับสารโคลชิซีน

ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของรากแตงโมโดยเทคนิคการเตรียมเซลล์แบบ Feulgen squash

ผลการศึกษา

1. ศึกษาผลของ 6-BAP ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดของแตงโมในสภาพปลอดเชื้อ

การศึกษาสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโด โดยศึกษาการเพิ่มจำนวนยอด จำนวนใบ ความสูง และการเกิดราก ดังนี้

จากการศึกษาจำนวนยอด พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 6.65 ± 1.04 ยอด รองลงมา คือ สูตรอาหารอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 4.80 ± 0.77 ยอด ในขณะที่สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 2 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 3.11 ± 0.94 และ 2.95 ± 0.85 ยอด ตามลำดับ สำหรับสูตรอาหารอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดต่ำสุด คือ 1.29 ± 0.69 ยอด จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<.05$) (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

จากการศึกษาจำนวนใบ พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 14.25 ± 3.37 ใบ รองลงมา คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 10.67 ± 3.22 ใบ สำหรับสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 2 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 5.74 ± 1.73 และ 5.05 ± 2.44 ใบ ตามลำดับ ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนใบต่ำสุด คือ 3.82 ± 1.47 ใบ จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนใบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<.05$) (ดังตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

จากการศึกษาความสูงของต้น พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดความสูงของต้นเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 4.03 ± 0.76 เซนติเมตร รองลงมา คือ สูตรอาหารอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดความสูงของต้นเฉลี่ยเท่ากับ 3.64 ± 1.25 และ 3.46 ± 1.13 เซนติเมตร ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดความสูงของต้นเฉลี่ยเท่ากับ 2.76 ± 0.82 และ 2.34 ± 0.83

เซนติเมตร ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ สามารถชักนำให้เกิดความสูงของต้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<.05$) (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนยอดเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ย และความสูงเฉลี่ยของต้นแตงโมที่งอกจากเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้นแต่ละระดับเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

6-BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดเฉลี่ย * (ยอด)	จำนวนใบเฉลี่ย * (ใบ)	ความสูงของต้นเฉลี่ย * (เซนติเมตร)
0	1.29 ± 0.69 ก	3.82 ± 1.47 ก	4.03 ± 0.76 ก
1	2.95 ± 0.85 ข	5.05 ± 2.44 กข	2.76 ± 0.82 ข
2	3.11 ± 0.94 ข	5.74 ± 1.73 ข	2.34 ± 0.83 ข
3	6.65 ±1.04 ค	14.25 ± 3.37 ค	3.64 ± 1.25 ก
4	4.80 ± 0.77 ง	10.67 ± 3.22 ง	3.46 ± 1.13 ก

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<.05$)
ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ยกกำลังตัวอักษรที่แตกต่างกันแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<.05$)

ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของต้นแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดที่งอกจากเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP แต่ละระดับความเข้มข้นเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

จากการศึกษาความเข้มข้น 6-BAP ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดที่เติมลงสูตร MS ที่มีต่อการเกิดราก พบว่าสูตร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดรากเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 3.82 ± 2.72 ราก

รองลงมา คือ สูตร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 2 1 4 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดรากเฉลี่ย 2.16 ± 1.57 2.05 ± 1.22 1.93 ± 1.44 และ 1.63 ± 1.16 ราก ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์สถิติ พบว่าเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดที่เพาะเลี้ยงในสูตร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ มีผลต่อการเกิดรากเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<.05$) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความเข้มข้น 6-BAP แต่ละระดับที่มีต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโด ที่มีต่อการเกิดรากเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

6-BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนรากเฉลี่ย * (ราก)
0	3.82 ± 2.72 ก
1	2.05 ± 1.22 ข
2	2.16 ± 1.57 ข
3	1.63 ±1.16 ข
4	1.93 ± 1.44 ข

ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ยกกำลังตัวอักษรที่แตกต่างกันแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<.05$)

2. ศึกษาผลของโคลชิซีนที่เหมาะสมต่อการเกิดมิวเตชันเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโด

จากการศึกษาผลของโคลชิซีนที่เหมาะสมต่อการเกิดมิวเตชันของเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโด พบว่าเมล็ดแตงโมที่แช่โคลชิซีนความเข้มข้นร้อยละ 0.01 0.02 และ 0.03 เป็นระยะเวลา 0 20 และ 40 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วเพาะเลี้ยงเมล็ดแตงโมในสูตรอาหาร MS และศึกษาร้อยละของการงอกและรอดชีวิต ค่า LD_{50} และลักษณะสัณฐานวิทยา ดังนี้

1) ร้อยละของการงอกและรอดชีวิตของเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดจากการแช่โคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และที่ระยะเวลาต่าง ๆ

จากการศึกษาร้อยละของการงอกและรอดชีวิตของเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดจากการแช่โคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.01 0.02 และ 0.03 เป็นระยะเวลา 0 20 และ 40 ชั่วโมง พบว่าเมล็ดแตงโมที่แช่สารโคลชิซีนเข้มข้นร้อยละ 0.01 0.02 และ 0.03

เป็นระยะเวลา 0 และ 20 ชั่วโมง มีการงอกและรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ 100 โดยเมล็ดแตงโมที่แช่สารโคลชิซีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 เป็นเวลา 40 ชั่วโมง มีการงอกและรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ 100 เช่นกัน สำหรับร้อยละการงอกและรอดชีวิตที่รองลงมา คือ ความเข้มข้นโคลชิซีนที่แช่เมล็ดแตงโมที่ระยะเวลา 40 ชั่วโมง ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 มีการงอกและรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ 90 ส่วนโคลชิซีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 และ 0.03 พบว่ามีร้อยละการงอกและรอดชีวิตต่ำสุด คือ ร้อยละ 85 เท่ากัน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ร้อยละของการรอดชีวิตของเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดจากการแช่โคลชิซีนที่แต่ละระดับความเข้มข้น และที่ระยะเวลาต่าง ๆ

โคลชิซีน (ร้อยละ)	ร้อยละของการงอกและรอดชีวิต		
	เวลา 0 (ชั่วโมง)	เวลา 20 (ชั่วโมง)	เวลา 40 (ชั่วโมง)
0.00	100	100	100
0.01	100	100	90
0.02	100	100	85
0.03	100	100	85

2) ค่า LD_{50} ที่มีต่อการงอกและรอดชีวิตของแตงโม

จากการศึกษาร้อยละของการงอกและรอดชีวิตเมล็ดแตงโมจากตารางที่ 3 เพื่อนำมาหาค่าร้อยละ 50 ของการตาย (ค่า LD_{50}) ของเมล็ดแตงโมที่แช่สารโคลชิซีนความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.00 0.01 0.02 และ 0.03 ที่ระยะเวลา 0 20 และ 40 ชั่วโมง พบว่าการแช่เมล็ดแตงโมในสารโคลชิซีนทุกความเข้มข้นที่ระยะเวลา 0 และ 20 ชั่วโมง มีการตายร้อยละ 0 จึงทำให้ไม่สามารถนำมาหาค่า LD_{50} ส่วนการแช่สารโคลชิซีนที่ระยะเวลา 40 ชั่วโมง พบว่าสามารถนำมาหาค่า LD_{50} ได้ ทั้งด้วยวิธี Typical sigmoid mortality และวิธีคำนวณจากสูตร Regression

2.1) การหาค่า LD_{50} โดยวิธี Typical sigmoid mortality

จากการหาค่า LD_{50} โดยวิธี Typical sigmoid mortality ซึ่งทำได้โดยการลากเส้นกราฟ พบว่าค่า LD_{50} ของเมล็ดแตงโมที่แช่โคลชิซีนเป็นระยะเวลา 40 ชั่วโมง คือ ความเข้มข้นโคลชิซีนที่ร้อยละ 0.088

2.2) การหาค่า LD_{50} โดยวิธีคำนวณจากสูตร Regression

จากการหาค่า LD_{50} ความเข้มข้นของโคลชิซีนที่แช่เมล็ดแตงโมเป็นเวลา 40 ชั่วโมง โดยวิธีคำนวณจากสูตร Regression $Y = y + b (x_{50}-x)$ พบว่า มีความเข้มข้นของโคลชิซีนที่ร้อยละ 0.095

3) ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นแตงโมเมื่อได้รับโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละต่าง ๆ

จากการศึกษาจำนวนยอดเฉลี่ยที่เกิดขึ้นเมื่อแช่เมล็ดแตงโมในสารโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.00 0.01 0.02 และ 0.03 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าเมื่อเมล็ดแตงโมแช่โคลชิซีนร้อยละ 0.03 สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 1.18 ± 0.73 ยอด รองลงมา คือ การแช่เมล็ดแตงโมด้วยสารโคลชิซีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.00 0.01 และ 0.02 พบว่าสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากัน คือ 1.00 ± 0.00 ยอด จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าเมล็ดแตงโมที่แช่สารโคลชิซีนที่ความเข้มข้นร้อยละต่าง ๆ สามารถทำให้เกิดการชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 2)

จากการศึกษาจำนวนใบเฉลี่ยเมื่อแช่เมล็ดแตงโมในสารโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.00 0.01 0.02 และ 0.03 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าเมื่อเมล็ดแตงโมแช่สารโคลชิซีนร้อยละ 0.02 ทำให้เกิดจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 3.12 ± 1.36 ใบ รองลงมา คือ แช่เมล็ดแตงโมในสารโคลชิซีนร้อยละ 0.03 และ 0.00 ทำให้เกิดจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 3.00 ± 1.37 และ 2.80 ± 1.11 ใบ ตามลำดับ ส่วนการแช่เมล็ดแตงโมแช่ในสารโคลชิซีนร้อยละ 0.01 พบว่าทำให้เกิดจำนวนใบเฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 2.56 ± 1.10 ใบ เมื่อวิเคราะห์สถิติ พบว่าเมล็ดแตงโมที่แช่ในสารโคลชิซีนความเข้มข้นระดับต่าง ๆ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำให้เกิดจำนวนใบมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 4 และภาพที่ 2)

จากการศึกษาความสูงของต้นเฉลี่ยเมื่อแช่เมล็ดแตงโมในสารโคลชิซีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.00 0.01 0.02 และ 0.03 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าเมื่อเมล็ดแตงโมแช่สารโคลชิซีนร้อยละ 0.02 ทำให้เกิดความสูงเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 7.20 ± 3.44 เซนติเมตร รองลงมา คือ แช่เมล็ดแตงโมในสารโคลชิซีนร้อยละ 0.01 และ 0.00 เกิดความสูงต้นเฉลี่ยเท่ากับ 6.68 ± 4.13 และ 5.19 ± 4.06 เซนติเมตรตามลำดับ ส่วนการแช่เมล็ดแตงโมในสารโคลชิซีนร้อยละ 0.03 เกิดความสูงของต้นเฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 3.75 ± 1.18 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์สถิติ พบว่าเมล็ดแตงโมที่เพาะเลี้ยงจากการแช่สารโคลชิซีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำให้เกิดความสูงของต้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<.05$) (ตารางที่ 4 และภาพที่ 2)

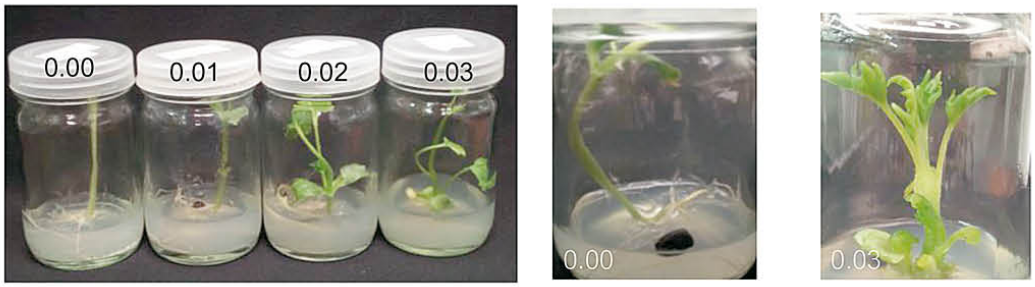
จากการศึกษาการเกิดรากเมื่อแช่เมล็ดแตงโมในสารโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.00 0.01 0.02 และ 0.03 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าทุกความเข้มข้นโคลชิซีนทำให้เกิดรากของแตงโมร้อยละ 100 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ร้อยละความเข้มข้นโคลชิซีนที่มีต่อการเกิดจำนวนยอดเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ย ความสูงเฉลี่ยต้น และการเกิดรากแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์

โคลชิซีน (ร้อยละ)	จำนวนยอดเฉลี่ย ns (ยอด)	จำนวนใบเฉลี่ย ns (ใบ)	ความสูงของต้นเฉลี่ย * (เซนติเมตร)	การเกิดราก (ร้อยละ)
0.00	1.00 ± 0.00	2.80 ± 1.11	5.19 ± 4.06 กข	100
0.01	1.00 ± 0.00	2.56 ± 1.10	6.68 ± 4.13 ก	100
0.02	1.00 ± 0.00	3.12 ± 1.36	7.20 ± 3.44 ก	100
0.03	1.18 ± 0.73	3.00 ± 1.37	3.75 ± 1.18 ข	100

ns มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ยกกำลังตัวอักษรที่แตกต่างกันแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<.05$)



ภาพที่ 2 ลักษณะต้นแตงโมที่งอกจากของเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดที่แช่สารละลายโคลชิซีนเป็นระยะเวลา 40 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

4) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของแตงโมจากการได้รับสารโคลชิซีน

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของรากแตงโม โดยเทคนิคการเตรียมเซลล์แบบ Feulgen squash โดยนำปรายรากจากต้นแตงโมในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อจากต้นควบคุมและต้นที่ได้รับโคลชิซีน พบว่ารากต้นแตงโมที่ได้รับสารโคลชิซีนร้อยละ 0.00 (ต้นควบคุม) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 22 แท่ง นอกจากนี้พบโครโมโซมผิดปกติของแตงโมเมื่อแช่เมล็ดแตงโมที่ระดับความเข้มข้นของสารโครชิซีนร้อยละ 0.01 0.02 และ 0.03 แช่เป็นเวลา 40 ชั่วโมง โดยศึกษาที่ระยะเมทาเฟส

และระยะ แอนาเฟส พบว่าการแช่เมล็ดแตงโมที่ระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซีนร้อยละ 0.01 พบจำนวนโครโมโซมที่ระยะเมทาเฟสเท่ากับ 40 แท่ง (พอลีพลอยด์ 2n=4x) ส่วนระยะแอนาเฟสโครโมโซมแบ่งไปที่ขั้วเซลล์ทั้ง 2 ด้านมีจำนวนไม่เท่ากัน สำหรับการแช่เมล็ดแตงโมที่ระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซีนร้อยละ 0.02 พบจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ที่ระยะเมทาเฟสที่น้อยกว่าหรือมากกว่า 22 แท่ง ส่วนระยะแอนาเฟสพบโครโมโซมเคลื่อนที่ไปขั้วเซลล์ผิดปกติ คือ เกิด lagging chromosome และเมื่อศึกษาความเข้มข้นของสารโคลชิซีนร้อยละ 0.03 ที่แช่เมล็ดแตงโม พบว่าจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ที่ระยะเมทาเฟสที่น้อยกว่าหรือมากกว่า 22 แท่ง ส่วนที่ระยะแอนาเฟสพบโครโมโซมแบ่งไปที่ขั้วเซลล์ทั้ง 2 ด้านมีจำนวนไม่เท่ากัน (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 โครโมโซมผิดปกติจากการแช่เมล็ดแตงโมที่ได้รับสารโคลชิซีนที่แต่ละระดับความเข้มข้นเป็นเวลา 40 ชั่วโมง โดยศึกษาจากปลายรากแตงโม

โคลชิซีน (ร้อยละ)	จำนวนโครโมโซมระยะเมทาเฟส	โครโมโซมระยะแอนาเฟส
0.00	2n (2x) = 22	มีการแบ่งเซลล์ปกติ
0.01	2n (4x) = 40	โครโมโซมแบ่งไปที่ขั้วเซลล์ทั้ง 2 ด้านมีจำนวนไม่เท่ากัน
0.02	2n (2x) < 22 2n (2x) > 22	พบ lagging chromosome
0.03	2n (2x) < 22 2n (2x) > 22	โครโมโซมแบ่งไปที่ขั้วเซลล์ทั้ง 2 ด้านมีจำนวนไม่เท่ากัน

วิจารณ์

1. ศึกษาผลของ 6-BAP ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดของแตงโมในสภาพปลอดเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดบนสูตรอาหาร MS จัดว่ามีความเหมาะสมต่อชนิดพืช เนื่องจากแตงโมจัดว่าเป็นพืชล้มลุก ซึ่งสูตรอาหาร MS จัดว่าเป็นสูตรอาหารที่พัฒนาเพื่อใช้เพาะเลี้ยงพืชล้มลุก [4] และเมื่อเติม 6-BAP ซึ่งจัดว่าเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนินซึ่งมีคุณสมบัติในการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอด ซึ่งจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 6.65 ± 1.04 ยอด ซึ่งสอดคล้องกับ พรทิพย์ [5] รายงานว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอดมะเม่าดง (*Antidesma bunius* (L.) Spreng. var. *bunius*) บนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 2.70

ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ และสอดคล้องกับ Ha Thi และคณะ [6] ศึกษาเรื่องการเจริญพัฒนาของยอดแตงโมที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากใบเลี้ยงของแตงโม (*Citrullus lanatus* Thumb.) ที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น 3 ชุด (triploid) พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแตงโมให้มีการเจริญพัฒนาในหลอดทดลองโดยใช้ส่วนของใบเลี้ยงของแตงโมที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น triploid บนสูตรอาหาร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 6-BAP ที่มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เพื่อใช้ในการศึกษาการเพิ่มจำนวนยอด โดยพบว่าสูตรอาหารที่เติม 6-BAP ระดับความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดโดยตรงจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของใบเลี้ยง นอกจากนี้เมื่อย้ายไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติม GA3 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ จะเกิดการยืดตัวของลำต้น ซึ่งจะเห็นว่าการใช้ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนินในพืชแต่ละชนิดจะมีความต้องการแตกต่างกัน

นอกจากนี้ Gnamien และคณะ [7] รายงานว่าแตงโม (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai ssp. *mucosospermus* (Fursa) oleaginous type) เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหาร 3/2 เท่า เติมน้ำตาล 35 กรัมต่อลิตร เติม 6-BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมวุ้น 6 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 32 สัปดาห์ สามารถชักนำให้ส่วนของ cotyledon proximal เกิดการเพิ่มจำนวนยอดโดยไม่พบการเกิดแคลลัสคิดเป็นร้อยละ 76.7 และเกิดการเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยจำนวน 12.26 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (มีความยาวยอด 17.13 มิลลิเมตร) ในการศึกษาความคงตัวทางพันธุกรรมของต้นแตงโมในหลอดทดลองที่เจริญพัฒนามาจากชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยวิธีที่วิเคราะห์ความคงตัวทางพันธุกรรม คือ การทำ Amplified fragment length polymorphism (AFLP) ซึ่งพบว่าต้นลูกที่เกิดขึ้นใหม่เมื่อเปรียบเทียบกับต้นแม่พบว่ามีพันธุกรรมไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้พบว่าการเกิดรากของแตงโมที่ได้รับ 6-BAP มีจำนวนรากลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดแตงโมที่ไม่ได้รับ 6-BAP ซึ่งสอดคล้องกับ Gaba [8] รายงานว่าสารไซโตไคนินที่บริเวณยอดและลำต้นของพืชจะมีผลต่อการยับยั้งการเกิดราก สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่มีการเติม 6-BAP พบว่าเกิดยอดต่ำสุด คือ เกิดยอดเพียง 1.29 ยอด เนื่องจากไม่มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 6-BAP สำหรับกระตุ้นยอดพืชให้เกิดการเพิ่มจำนวนขึ้น นอกจากนี้การเติม 6-BAP ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่าเกิดการชักนำให้เกิดจำนวนยอดใหม่ลดลง เนื่องจากมีความเข้มข้นของ 6-BAP ที่สูงเกินไปมีผลให้ไปยับยั้งการเกิดยอดใหม่ จากการกระตุ้นการทำงานเอนไซม์บางชนิดให้

ทำงานมากเกินไปจนผิดปกติ จึงก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์พืช ส่งผลต่อการลดลงของการเพิ่มจำนวนยอดและความยาวยอดลดลง [9]

2. ศึกษาผลของโคลชิซีนที่เหมาะสมต่อการเกิดมิวเตชันเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโด

1) ร้อยละของการงอกและรอดชีวิตของเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดจากการแช่โคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และที่ระยะเวลาต่าง ๆ

จากการศึกษาผลของโคลชิซีนที่เหมาะสมต่อการเกิดมิวเตชันของเมล็ดแตงโม โดยทำการศึกษาโดยแช่สารโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้น 0.00 0.01 0.02 และ 0.03 เป็นระยะเวลา 20 และ 40 ชั่วโมง แล้วศึกษาปริมาณสารโคลชิซีนที่ทำให้พืชทดลองตายไปร้อยละ 50 หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าค่า LD_{50} จากผลการศึกษานี้พบว่าเมื่อแช่เมล็ดแตงโมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.00-0.03 เป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าเมล็ดแตงโมทุกเมล็ดเกิดการงอกและรอดชีวิตร้อยละ 100 จึงไม่สามารถหาค่า LD_{50} ได้ ส่วนการแช่เมล็ดแตงโมในสารโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.00 0.01 0.02 และ 0.03 เป็นระยะเวลา 40 ชั่วโมง สามารถหาค่า LD_{50} ได้

2) การหาค่า LD_{50}

การหาค่า LD_{50} สามารถหาได้ 2 วิธี คือ การหาค่า LD_{50} โดยวิธี Typical sigmoid mortality มีค่า LD_{50} เท่ากับความเข้มข้นโคลชิซีนที่ร้อยละ 0.088 ส่วนการหาค่า LD_{50} โดยวิธีคำนวณจากสูตร Regression จากสูตร $Y = y + b (x_{50}-x)$ พบว่า ความเข้มข้นของสารโคลชิซีนที่ร้อยละ 0.095 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการหาค่า LD_{50} ทั้ง 2 วิธีดังกล่าวพบว่า มีค่าใกล้เคียงกันโดยการหาค่า LD_{50} โดยทั่วไปจะใช้ปริมาณสารชักนำการก่อกลายพันธุ์ที่ทำให้พืชตายร้อยละ 50 เนื่องจากเป็นปริมาณสารที่ชักนำให้พืชเกิดการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมเป็นผลให้เกิดการกลายได้โดยที่สิ่งมีชีวิตยังสามารถรอดชีวิตร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์

3) ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นแตงโมเมื่อได้รับโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละต่าง ๆ

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นแตงโมเมื่อได้รับโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละต่าง ๆ เป็นเวลา 40 ชั่วโมง พบว่าเมล็ดแตงโมที่ได้รับสารโคลชิซีนความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.03 สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดสูงสุด คือ 1.18 ± 0.73 ยอด จำนวนใบเฉลี่ย 3.00 ± 1.37 ใบ ความสูงของต้นเฉลี่ย 3.75 ± 1.18 เซนติเมตร และเกิดรากคิดเป็นร้อยละ 100 ซึ่งจากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าเมล็ดแตงโมที่แช่สารโคลชิซีนที่ระดับ 0.00-0.03 มีจำนวนยอดเฉลี่ยและจำนวนใบเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ก็พบว่ามี 1 ต้นที่ได้รับสารโคลชิซีนที่ระดับร้อยละ 0.03 เกิดลักษณะผิดปกติขึ้น ซึ่งการทดลองครั้งนี้ได้ทำการทดลองด้วยสารละลายโคลชิซีนที่ความเข้มข้นเพียงร้อยละ 0.00-

0.03 ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมต่ำกว่าค่า LD_{50} ที่หาได้ จึงมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของลักษณะการแสดงออกของลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นแตงโมโดยทั่วไปที่แสดงออกมีลักษณะส่วนใหญ่เป็นปกติ ดังนั้นหากมีการแช่สารโคลชิซีนที่ระดับค่า LD_{50} จึงน่าจะเกิดแนวโน้มความผิดปกติของพืชเพิ่มขึ้นทั้งลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมและลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นแตงโม

4) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของแตงโมที่ได้รับสารโคลชิซีนที่ระดับต่าง ๆ

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดแตงโมที่ได้รับการแช่สารโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 40 ชั่วโมง แล้วนำปรายรากแตงโมมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม พบว่าเมล็ดแตงโมที่ได้รับสารโคลชิซีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.00 มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 22 แท่ง ส่วนเมล็ดแตงโมที่ได้รับสารโคลชิซีนความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.01 0.02 และ 0.03 พบว่าเกิดความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมโดยเกิดการเพิ่มขึ้นและขาดหายของแท่งโครโมโซมเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนโครโมโซมปกติ ในขณะที่ Wang และคณะ [10] รายงานว่าสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมของแตงโม (*Citrullus lanatus* JKR-2) ให้ได้รับสารโคลชิซีนจึงทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมขึ้นอีก 1 เท่า รวมทำให้มีโครโมโซมในเซลล์ทั้งหมดเป็น 2 เท่าจากเดิม ในการสร้างออโตโพลีพลอยด์ของแตงโม (*C. lanatus*) ซึ่งการแช่เมล็ดแตงโมด้วยสารโคลชิซีนระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมได้ เนื่องจากสารโคลชิซีนจะไปรบกวนการทำงานของเส้นใยสปินเดิลทำให้ไม่สามารถดึงโครโมโซมไปที่ขั้วเซลล์ทั้ง 2 ข้างได้ตามปกติในขณะที่เซลล์มีการแบ่ง จึงอาจมีผลทำให้เกิดการเพิ่มชุดของโครโมโซมขึ้นเป็น 2 เท่า จึงทำให้ประสบความสำเร็จในการเกิดเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นแบบออโตโพลีพลอยด์ ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีชุดโครโมโซมชนิดเดียวกันและมีลักษณะการผันแปรทางพันธุกรรมแตกต่างไปจากเดิม

สรุป

1. ศึกษาผลของ 6-BAP ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดของแตงโมในสภาพปลอดเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 6.65 ± 1.04 ยอด มีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด คือ 14.25 ± 3.37 ใบ ความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 3.64 ± 1.25 เซนติเมตร และเกิดรากเฉลี่ย 1.63 ± 1.16 ราก

2. ศึกษาผลของโคลชิซีนที่เหมาะสมต่อการเกิดมิวเตชันเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโด

1) ร้อยละของการงอกและรอดชีวิตของเมล็ดแตงโมพันธุ์ปลูกตอปิโดจากการแช่สารละลายโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.01 0.02 และ 0.03 เป็นระยะเวลา 40 ชั่วโมง สามารถนำมาหาค่า LD_{50} พบว่าร้อยละของการงอกและรอดชีวิตจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อได้รับร้อยความเข้มข้นของสารโคลชิซีนที่เพิ่มขึ้น

2) การหาค่า LD_{50}

2.1) การหาค่า LD_{50} โดยวิธี Typical sigmoid mortality ของเมล็ดแตงโมที่แช่โคลชิซีนเป็นระยะเวลา 40 ชั่วโมง คือ ความเข้มข้นโคลชิซีนที่ร้อยละ 0.088

2.2) การหาค่า LD_{50} ความเข้มข้นของโคลชิซีนที่แช่เมล็ดแตงโมเป็นเวลา 40 ชั่วโมงโดยวิธีคำนวณจากสูตร Regression คือ ความเข้มข้นของโคลชิซีนที่ร้อยละ 0.095

2.3) จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นแตงโมเมื่อได้รับสารโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละต่าง ๆ เป็นเวลา 40 ชั่วโมง พบว่าเมล็ดแตงโมที่ได้รับสารโคลชิซีนความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.03 สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดสูงสุด คือ 1.18 ± 0.73 ยอด จำนวนใบเฉลี่ย 3.00 ± 1.37 ใบ ความสูงของต้นเฉลี่ย 3.75 ± 1.18 เซนติเมตร และเกิดรากคิดเป็นร้อยละ 100

2.4) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดแตงโมที่ได้รับการแช่สารโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 40 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมปรายรากของแตงโม พบว่าเมล็ดแตงโมที่ได้รับสารโคลชิซีนความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.00 ไม่พบความผิดปกติของโครโมโซม โดยมีโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 22 แท่ง ส่วนเมล็ดแตงโมที่ได้รับสารโคลชิซีนความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.01 0.02 และ 0.03 พบว่าเกิดความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมโดยเกิดการเพิ่มขึ้นและการขาดหายของแท่งโครโมโซม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับความสนับสนุนจากหลายหน่วยงานและขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษมที่ให้ทุนอุดหนุนในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพและสาขาวิชาชีววิทยาที่ให้ความสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์กนิษฐา อ่อนศิริ และดร.ศาศวัต เพ่งแพ ที่คอยให้คำแนะนำและช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Dalington DC, Wylie AP. Chromosome atlas of flowering plants. London: George Allen and Unwin Ltd.; 1946.

2. สุพัตรา ทองทา, เพชรรัตน์ ไสว, กล่าวขวัญ ศรีสุข. การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์เพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ของแตงโมบางสายพันธ์ที่ปลูกในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 22 (ฉบับพิเศษ) การประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้ง ที่ 9” 2560;22:14-22.
3. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J 2012;33:829-37.
4. ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี; 2546.
5. พรทิพย์ เทิดบารมี. ผลของ 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีนและสูตรอาหารที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเม่าดง (*Antidesma bunius* (L.) Spreng. var. *bunius*). วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 2557;42:191-202.
6. Ha Thi TH, Nguyen Thi TH, Le Hong D. Direct adventitious shoot regeneration from triploid watermelon cotyledons. JS: NST 2016;32:242-6.
7. Gnamien YG, Zoro Bi IA, Kouadio YJ, Brostaux Y, Baudoin JP. Medium effects on micropropagation and genetic stability of *Citrullus lanatus* oleaginous type. Agricultural Sciences 2013;4:32-44.
8. Gaba PV. Plant growth regulators in plant tissue culture and development. Plant development and biotechnology. Edited Trigiano NR, Gray JD. Boca Raton, Florida; 2005.
9. Mok DWS, Mok MC. Cytokinins: chemistry, activity and fuction. Florida: CRC Press. Inc.; 1994.
10. Wang CG, Li H, Xue ZY, Chen CB, Gu Y, Sun DL, et al. Marker-based analysis of genome structure and DNA methylation in a watermelon (*Citrullus lanatus*) ploidy series. Bot Stud 2009;50:389-402.