บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองโดยใช้หัวย่อยของช่อทับทิม พบว่าอิทธิพลของทั้งสองปัจจัยการทดลองคือ ความเข้มข้นและระยะเวลาที่ให้สารละลายโคลชิซีนมีผลต่อจำนวนวันเมื่อเริ่มงอก ซึ่งจะช้าลงเมื่อมีการให้สารละลายโคลชิซีน โดยเฉพาะเมื่อใช้ความเข้มข้นสูง ดังเช่นอิทธิพลของความเข้มข้น ที่ไม่ใช้สารละลายเลยจะใช้เวลางอกน้อยที่สุด และใช้เวลามากที่สุด เมื่อให้ความเข้มข้นสูงสุดโดยงอกช้าลงถึง 4 วัน (ตาราง 3) และในแนวทางเดียวกัน การใช้ระยะเวลาในการแช่หัวย่อย 1 วันจะทำให้จำนวนวันเริ่มงอกน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนวันแช่อื่นๆ (ตาราง 1) ผลที่เห็นได้ชัดเมื่อใช้เวลานาน 4 และ 6 วัน ร่วมกับการใช้ความเข้มข้นสารละลายสูงสุด (ตาราง 5) ผลนี้เป็นไปในทางเดียวกันกับรายงานของ วิมล และ อนันต์ (2526) ซึ่งได้ทำการทดลองกับพริกไร่ (*Capsicum* sp.) และ วิมล (2527) ที่ทำการทดลองกับข้าว จำนวนวันเฉลี่ยเมื่องอกถึงห้าสิบเปอร์เซนต์ ผลที่ได้เป็นไปในทางเดียวกันกับจำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มงอก ซึ่งเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบการที่ไม่ให้สารละลายโคลชิซีนเลย กับเมื่อใช้ความเข้มข้นมากที่สุดคือ 0.24 % พบว่ามีความแตกต่างกันถึง 5 วัน (ตาราง 3) ส่วนระยะเวลาการแช่หัวย่อย พบว่าเมื่อแช่นานถึง 6 วัน ทำให้เวลางอกนานมากที่สุด คือ 37.67 วัน สำหรับการงอกของหัวย่อยทั้งหมดก็พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงสุดคือ 0.24 % มีเปอร์เซนต์การงอกต่ำที่สุด (ตาราง 1) นอกจากผลด้านเวลาการเริ่มงอกดังที่กล่าวมาแล้ว เปอร์เซนต์การงอก เปอร์เซนต์รอดตาย และผลต่อการออกดอก พบว่าผลร่วม (interaction) ระหว่างปัจจัยทดลองทั้งสองก็ไม่แสดงความสัมพันธ์ชัด ในขณะที่จำนวนต้นงอกน้อยที่สุดได้จากการใช้ความเข้มข้นสูงสุดร่วมกับเวลาแช่นานที่สุด

การตรวจหาโครโมโซมจากปลายรากของหัวย่อยช่อทับทิม ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมแบบปกติคือ 2n=3x=48 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมแบบ aneuploid (2n$\pm$x) ในจำนวนต่างๆ จากการที่ให้สารละลายความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งเห็นได้ชัดว่าจำนวนโครโมโซมที่พบไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อไม่ใช้สารละลายโคลชิซีน (ตาราง 8) ส่วนอิทธิพลของเวลาการแช่ 4 และ 6 วัน ก็ให้จำนวนเซลล์ที่มีโครโมโซมแบบ aneuploid มากกว่าเมื่อใช้เวลาแช่น้อยกว่า โดยพบว่าโครโมโซม aneuploid แบบเพิ่มจำนวนโครโมโซม พบในช่วง 49-54 แท่ง และ aneuploid แบบลดจำนวนโครโมโซมลง พบจำนวนโครโมโซมในช่วง 26-47 แท่ง ผลร่วมของปัจจัยทั้งสองที่ทดสอบแสดงผลด้านความสัมพันธ์กันส่งเสริมกันเมื่อใช้ความเข้มข้นมาก และใช้เวลานานขึ้น โดยเฉพาะ 4 และ

6 วัน จากการทดลองนี้จะเห็นว่าช่อทับทิมมีจำนวนโครโมโซมตามธรรมชาติเป็นทริพพลอยด์ ซึ่งถูกชักนำให้เพิ่ม หรือลดจำนวนได้ แต่ไม่เกิดเป็นพลอยด์ดีที่เพิ่มจำนวนเท่าของ basic number เลย อาจเป็นเพราะความเข้มข้นหรือเวลายังไม่เหมาะสม จากอิทธิพลของสารละลายโคลชิซีน ความเข้มข้นที่ใช้ จากการทดลองครั้งนี้ แม้ว่าจำนวนต้นเมื่องอกทั้งหมดจะลดลง และงอกช้าลงบ้าง เมื่อใช้เวลานานที่สุดร่วมกับความเข้มข้นของสารละลายสูงสุด แต่ก็พบว่า เมื่อต้นงอกแล้วสามารถเจริญต่อไปได้ โดยมีเปอร์เซนต์รอดตายทั้งหมด ดังนั้นน่าจะมีความเป็นไปได้ที่จะทดสอบระยะเวลาและ/หรือ ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเพื่อชักนำให้เกิดจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น

การทดลองของต้อยติ่ง พบว่าการแช่เมล็ด 1 หรือ 2 วัน มีจำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มงอกเท่ากัน แต่เมื่อแช่ 2 วัน ใช้เวลาน้อยกว่าเพื่อให้เมล็ดงอกสูงสุด ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะเมล็ดต้อยติ่งเมื่อแช่น้ำมีเมือกเก็บน้ำให้ชื้นตลอดเวลาจึงเร่งการงอกในระยะหลังของการงอกดีกว่า ซึ่งการรอดตายจากผลของโคลชิซีนความเข้มข้น 0.20 % มีความแตกต่างจากความเข้มข้นอื่นโดยมีค่าเฉลี่ยเพียง 25.00 % แสดงว่าความเข้มข้นระดับนี้สูงเกินไปจนเป็นอันตราย ส่วนคุณภาพของยอดต้อยติ่งเมื่อทำการตัดเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ดัดแปลง เพื่อดูความคงตัว และการขยายต้นต่อไป แสดงผลไปในทำนองเดียวกับในแง่การเกิดราก หรือเกิดต้น คือ ในการย้ายครั้งแรกใช้เวลานานกว่าการเกิดราก หรือเกิดต้นจากการย้ายครั้งที่สอง (ตาราง 19) ที่เป็นเช่นนี้น่าจะมาจากผลของโคลชิซีนที่มีอิทธิพลในต้นลดลงไปแล้วในการย้ายครั้งที่สอง โดยผลที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกับกับการทดลองของ Bragdo (1955) ที่รายงานถึงการยับยั้งการเจริญ และพัฒนาของราก ต้น red clover ภายหลังการใช้สารละลายโคลชิซีนแก่เมล็ด ผลนี้สามารถใช้ผลของความเข้มข้น 0.025 % และไม่ให้โคลชิซีนซึ่งใช้จำนวนวันเกิดรากเพียง 8 วันเท่ากัน มาสนับสนุนได้

การนับจำนวนโครโมโซมพบว่ามีความแตกต่างกันน้อยมากระหว่างการแช่เมล็ดในสารละลาย 1 หรือ 2 วัน โดยพบเปอร์เซนต์การเกิดโครโมโซมแบบ aneuploid ไม่ถึง 20 % (ตาราง 11) และในการตัดยอดเพื่อหาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของต้นการย้ายปลูกครั้งที่สอง พบต้นที่ยังคงลักษณะของ aneuploid จากการแช่สารละลาย 2 วัน เพียงต้นเดียวจากทั้งหมด หรือ 4.55 % โดยมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 32 แท่งซึ่งเป็น aneuploid แบบลดลง (2n-2) (ตาราง 12) แต่ก็ไม่พบเมื่อทำการตัดย้ายอาหารครั้งต่อมา

การชักนำให้จำนวนโครโมโซมเปลี่ยนไปด้วยสารละลายโคลชิซีน ทำได้ยากในพืชต้อยติ่ง เพราะหากใช้ความเข้มข้นสูงก็จะทำให้ต้นตาย ซึ่ง สอดคล้องกับการทดลองของบุษรา (2536) ที่ได้ทำการทดลองกับว่านหางจระเข้ (*Aloe barbadensis*) และหากต้องการต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเหมือนเดิม หลังการถูกชักนำแล้ว น่าจะหาวิธีชักนำให้ต้นพืช regenerate โดยผ่านเซลล์เดียว (ผ่านกระบวน

การเกิด embryoid แล้วจึงตัดขยายเพิ่มปริมาณในภายหลัง ซึ่งในการทดลองครั้งต่อไปน่าจะยืดเวลาการแช่นานขึ้น โดยไม่เพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย

จากผลการทดลองในดอกดาว แม้ว่าผลของระยะเวลาการเริ่มงอกจะไม่ต่างกัน แต่ให้ผลชัดว่าการแช่เมล็ดนานทำให้ใช้เวลาน้อยในการงอกทั้งหมด เพราะน้ำและสารละลายช่วยให้เมล็ดงอกได้พร้อมกันเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังให้ผลชัดเจนต่อเปอร์เซนต์การรอดตาย (ตาราง 25) แสดงว่าเมื่อใช้เวลา 2 วัน แช่เมล็ดจะนานเกินไปจนเมล็ดส่วนหนึ่งได้รับอันตราย ซึ่งเปอร์เซนต์การรอดตายต่ำพบได้ในทำนองเดียวกับเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายสูงสุด และผลร่วมระหว่างเวลานาน 2 วัน และความเข้มข้นนี้ส่งเสริมกัน เมื่อใช้พร้อมกันโดย พบว่าไม่มีเปอร์เซนต์รอดตายเลย (ตาราง 35) อย่างไรก็ตามที่ระดับของปัจจัยร่วมคือใช้โคลชิซีนความเข้มข้น 0.15 และ 0.20 % กับระยะเวลาการแช่เมล็ดนาน 2 วันนี้ แม้ว่าจะเป็นอันตรายต่อการรอดตายดอกดาวนี้ แต่มีผลให้สามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมแบบเพิ่ม และลดจำนวนรวมกันได้มากกว่า เมื่อใช้ปัจจัยร่วมระดับอื่น แม้ว่าจำนวนโครโมโซมที่พบจะสูงถึง 50 แท่ง แต่ก็ไม่พบต้นที่มีโครโมโซมเพิ่มแบบครบชุดเลย ผลการทดลองนี้ชี้แนะว่าการทดลองต่อไปน่าจะใช้จำนวนประชากรจำนวนมาก เพื่อชักนำต้นที่รอดตายให้เพิ่มจำนวนโครโมโซมให้ได้ตามที่ต้องการ ได้แก่ 3 ชุด และ 4 ชุด ซึ่งโดยทั่วไปมักจะให้ดอกที่มีขนาดใหญ่กว่าปกติ

ต้นที่พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเปลี่ยนไป มักไม่แสดงผลนี้ต่อเนื่องในการตัดย้ายครั้งที่ 2 แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมจากเซลล์รากเป็นเฉพาะเซลล์ และเซลล์นั้นไม่มีโอกาสเกิด (regenerate) เป็นรากใหม่ได้ และยังชี้ให้เห็นว่าหากปลายยอดมีจำนวนโครโมโซมเปลี่ยนไปจริง (ซึ่งไม่ได้นำมาหาจำนวนโครโมโซม) รากที่เกิดที่มีจำนวนโครโมโซมไม่คงที่ในการตัดย้ายครั้งที่ 2 นี้ก็ไม่ได้เกิดจากยอดนั้น เพราะหากรากเกิดจากยอดนั้นจริง จำนวนโครโมโซมน่าจะคงที่

ผลการทดลองในแง่ของการเกิดข้อใหม่แสดงให้เห็นว่าทั้งเวลาการแช่นาน และความเข้มข้นของสารละลายที่สูงมีแนวโน้มทำให้ต้องใช้เวลาการเกิดยอดใหม่นานขึ้น ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของโคลชิซีนที่ใช้ มีผลกระบวนการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อที่เลี้ยง และยังพบว่าการเกิดยอดใหม่จากต้นที่พบจำนวนโครโมโซมเพิ่มมากถึง 50 แท่ง ไม่สามารถทำการตัดย้ายได้สำเร็จ เนื่องจากต้นนั้นหยุดการเจริญ และเกิดอาการเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายไประหว่างการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในทุกการทดลองกับทุกพืชนี้ พบจำนวนโครโมโซมที่ต่างไปจากปกติ โดยพบแบบ aneuploid เท่านั้นไม่พบจำนวนโพลีพลอยด์ในลักษณะอื่นเลย ซึ่งแตกต่างไปจากการทดลองอื่นที่มักพบจำนวนโครโมโซมแบบโพลีพลอยด์ ในลักษณะที่เพิ่มจำนวนโครโมโซมทั้งชุด เช่นในการทดลองของ Sangowawa (1994) ซึ่งทำการแช่เมล็ดมันฝรั่ง (*Solanum melongena* cv.Giwa) ในสาร

ละลายโคลชิซีนความเข้มข้น 0.4 % ในระยะเวลา 2 , 4 , 6 และ 8 วัน ซึ่งพบเซลล์ที่เป็น tetraploid 1.26 % และรายงานเพิ่มเติมถึงการเกิด chromosome aberration เช่นการเกิด translocation , anaphase bridge และการเคลื่อนที่ที่ช้าลงของโครโมโซมที่จับคู่กันแบบ bivalant ในกระบวนการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ซึ่งความผิดปกติของโครโมโซมในลักษณะที่กล่าวมานี้พบในกรรมวิธีที่ใช้เวลาการแช่เมล็ดในสารละลายโคลชิซีน 4 และ 6 วัน การเกิด chromosome aberration จนส่งผลให้โครโมโซมเปลี่ยนแปลงไปในลักษณะของ anueploid นี้ เป็นลักษณะปกติที่มักจะเกิดขึ้นจากการชักนำด้วยสารละลายโคลชิซีน โดยเกิดจากการแบ่งเซลล์แบบหลายขั้ว (multipolar division) ในนิวคลีอายของพืชที่เป็น polyploid นั้นๆ (Dermen, 1940 อ้างถึง Nebel and Ruttle, 1938) ซึ่งสามารถพบได้ใน *Dutara* เป็นต้น (Dermen, 1940 อ้างถึง Blakeslee and Avery, 1938)

ส่วนในการทดลองอื่นที่มีรายงานถึงการเกิด aneuploid เช่นการทดลองของ วุฒิพงษ์ (2539) ซึ่งทดลองแช่ส่วนยอด (shoot-tip meristem) ของกระเทียมพันธุ์ศรีสะเกษ (2n=16) ด้วยสารโคลชิซีนเข้มข้น 100 สตล และ 200 สตล พร้อมกับเติมสาร dimethy sulfoxide (DSMO) 3% ใช้เวลาการแช่นาน 1 , 3 , 7 และ 10 วัน แล้วนำไปเลี้ยงต่อในสูตรอาหารดัดแปลงของ MS (1962) ที่เติม BAP 0.4 สตล และ NAA 0.5 สตล พบต้นที่มีจำนวนโครโมโซม แบบ aneuploid เพียง 1 ต้น คือ ต้นที่ใช้สารละลายโคลชิซีนเข้มข้น 100 สตล ที่ระยะเวลา 7 วันโดยนับจำนวนโครโมโซมได้ 44-46 แท่ง

จากผลการทดลอง ที่ต้นช่อทับทิมพบจำนวนโครโมโซมแบบ aneuploid เพียงอย่างเดียว และพบในอัตราที่สูงถึง 11.25 % (เฉพาะกรรมวิธีที่ให้สารละลายโคลชิซีน) โดยไม่พบการเพิ่มจำนวนโครโมโซมแบบ euploidy อาจสันนิษฐานได้ว่าผลที่เกิดขึ้นได้จากการที่ต้นช่อทับทิม ซึ่งเดิมแล้วเป็นต้นไม้ที่เป็นทริพพลอยด์อยู่แล้ว ซึ่งจากการที่พืชเป็นโพลีพลอยด์อยู่แล้ว การเพิ่มชุดโครโมโซมอีกอาจทำให้เซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมมากชุดเกินไปไม่สามารถเจริญต่อไปได้ (วิมล, 2527) และเซลล์อื่นซึ่งเป็นเซลล์ปกติที่ไม่ถูกสารละลาย หรืออยู่ในเข้าไปในเนื้อเยื่อจนได้รับผลน้อยหรือไม่มีผลต่อสารละลายที่ให้ สามารถเจริญเบียดแทรกจนพัฒนากลายส่วนเจริญแทนส่วนเจริญ (ยอดจากหัวย่อย) ที่ต้องการได้ จนเป็นผลให้พบเซลล์ปกติในอัตราส่วนที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับที่ Dermen (1940) ได้กล่าวถึงการชักนำด้วยสารโคลชิซีนแล้วไม่ได้ผล โดยมักเป็นผลมาจากการที่สารโคลชิซีนเองไม่สามารถผ่าน หรือซึมเข้าไปยังกลุ่มเนื้อเยื่อเป้าหมายได้ หรือการที่เนื้อเยื่อนั้นๆ มีความต้านทานต่อสารชนิดนี้สูง