บทที่ 4

ผลการทดลอง

การศึกษาการชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้และการเพิ่มชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ *Phalaenopsis amabilis* และ *P. parishii* จากใบอ่อน ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง มีผลการศึกษาการทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 การชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้โดยสูตรอาหารที่เหมาะสม

การทดลองที่ 1.1 สูตรอาหารพื้นฐานและระดับน้ำตาลที่เหมาะสมต่อชิ้นส่วนใบอ่อนของ กล้วยไม้ *P. amabilis* และ *P. parishii*

จากการศึกษา ชิ้นส่วนใบอ่อนของกล้วยไม้ *P. amabilis* และ *P. parishii* ที่นำมาเลี้ยงบนอาหารทุกสูตรเป็นเวลา 24 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนพืชสามารถอยู่รอดได้บนอาหารทุกสูตร ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาด แต่มีการเปลี่ยนแปลงของสี กรรมวิธีที่ 2-4 และ 6-8 มีสีเข้มขึ้น กรรมวิธีที่ 17-24 มีสีเข้มเกือบดำ (ตารางที่ 7 และ 8) และเกิดเงาสีดำคล้ำที่เป็นสารประกอบฟีโนลิค (phenolic compound) บนอาหารเลี้ยง (ภาพที่ 3) มีเพียงกรรมวิธีที่ 10- 16 ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีพืชทดลองและอาหารเลี้ยง (ภาพที่ 4 และ 5)

ภาพที่ 3 การเกิดสารประกอบฟีโนลิค (phenolic compound) บนอาหารเลี้ยง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ก

ข ค ง

ภาพที่ 4 ชิ้นส่วนใบก่อนการทดลองของกล้วยไม้ *P. amabilis* (ก) ชิ้นส่วนของใบขณะทำการทดลอง (ข) ความเข้มของสีใบ = 1 (ค) ความเข้มของสีใบ = 2 (ง) ความเข้มของสีใบ = 3 โดยใช้แผ่นเทียบสี RHS Colour Chart

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ก

ข ค ง

ภาพที่ 5 ชิ้นส่วนใบก่อนการทดลองของกล้วยไม้ *P. parishii* (ก) ชิ้นส่วนของใบขณะทำการทดลอง (ข) ความเข้มของสีใบ = 1 (ค) ความเข้มของสีใบ = 2 (ง) ความเข้มของสีใบ = 3 โดยใช้แผ่นเทียบสี RHS Colour Chart

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 7 ขนาดและสีของชิ้นส่วน *P. amabilis* เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงที่มีธาตุอาหารหลักและความเข้มข้นของน้ำตาลต่างกัน เมื่ออายุ 24 สัปดาห์

กรรมวิธี	MS(เท่า)	CMU1(เท่า)	SH (เท่า)	น้ำตาล (%)	ขนาด(มม^2)	ความเข้มของสี
1	0.5	0	0	0	25	1
2	0.5	0	0	1	25	2
3	0.5	0	0	2	25	2
4	0.5	0	0	3	25	2
5	1	0	0	0	25	1
6	1	0	0	1	25	2
7	1	0	0	2	25	2
8	1	0	0	3	25	2
9	0	0.5	0	0	25	1
10	0	0.5	0	1	25	1
11	0	0.5	0	2	25	1
12	0	0.5	0	3	25	1
13	0	1	0	0	25	1
14	0	1	0	1	25	1
15	0	1	0	2	25	1
16	0	1	0	3	25	1
17	0	0	0.5	0	25	3
18	0	0	0.5	1	25	3
19	0	0	0.5	2	25	3
20	0	0	0.5	3	25	3
21	0	0	1	0	25	3
22	0	0	1	1	25	3
23	0	0	1	2	25	3
24	0	0	1	3	25	3
				LSD	-	NS

NS = ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 8 ขนาดและสีของชิ้นส่วน *P. parishii* เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงที่มีธาตุอาหารหลักและความเข้มข้น ของน้ำตาลต่างกันเมื่ออายุ 24 สัปดาห์

กรรมวิธี	MS(เท่า)	CMU1(เท่า)	SH (เท่า)	น้ำตาล (%)	ขนาด(มม^2)	ความเข้มของสี
1	0.5	0	0	0	25	1
2	0.5	0	0	1	25	2
3	0.5	0	0	2	25	2
4	0.5	0	0	3	25	2
5	1	0	0	0	25	1
6	1	0	0	1	25	2
7	1	0	0	2	25	2
8	1	0	0	3	25	2
9	0	0.5	0	0	25	1
10	0	0.5	0	1	25	1
11	0	0.5	0	2	25	1
12	0	0.5	0	3	25	1
13	0	1	0	0	25	1
14	0	1	0	1	25	1
15	0	1	0	2	25	1
16	0	1	0	3	25	1
17	0	0	0.5	0	25	3
18	0	0	0.5	1	25	3
19	0	0	0.5	2	25	3
20	0	0	0.5	3	25	3
21	0	0	1	0	25	3
22	0	0	1	1	25	3
23	0	0	1	2	25	3
24	0	0	1	3	25	3
				LSD	-	NS

NS = ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาการชักนำการเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้

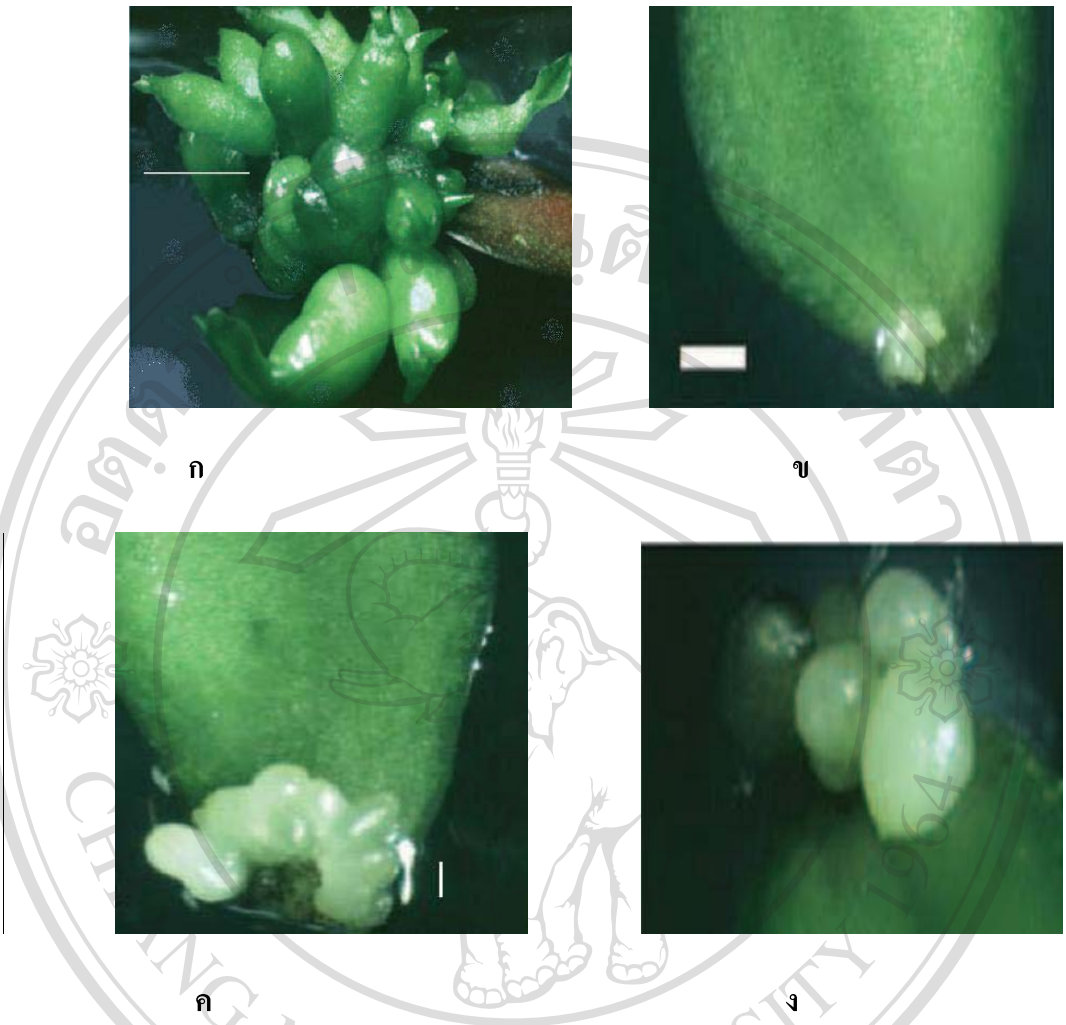
จากการศึกษาชิ้นส่วนใบอ่อนของกล้วยไม้ *P. amabilis* และ *P. parishii* ที่นำมาเลี้ยงบนอาหารทุกสูตรเป็นเวลา 24 สัปดาห์ จาก 4 การทดลอง พบว่า ชิ้นส่วนพืชทดลองสามารถอยู่รอดได้บนอาหารทุกการทดลอง แต่มีเพียงชิ้นส่วนใบของ *P. amabilis* จากการทดลองที่ 1.2.1 เท่านั้น ที่สามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ สูตรอาหารหลัก NAA และ TDZ มีผลร่วมกันต่อขนาดของชิ้นส่วนใบอย่างมีนัยสำคัญ โดยกรรมวิธีที่ให้อาหารหลักสูตร 1/2 CMU1 ที่เติม NAA 0.1 มก./ล.และ TDZ 0.1 มก./ล. มีขนาดใบมากที่สุดคือ 29 มม^2 แต่สูตรอาหารหลัก NAA และ TDZ ไม่มีผลร่วมกันต่อจำนวนชิ้นส่วนใบที่เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ จำนวน โปรโตคอร์มไลค์บอดี้เฉลี่ยที่เกิดขึ้นต่อชิ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9) บริเวณที่เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้นั้นเกิดบริเวณที่โคนหรือปลายใบที่ติดกับเส้นกลางใบเท่านั้น (ภาพที่ 6) แต่ชิ้นส่วนของ *P. parishii* ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเลย (ภาพที่ 7)

สูตรอาหารหลักและ NAA มีผลร่วมกันต่อขนาดของชิ้นส่วนใบอย่างมีนัยสำคัญ โดยกรรมวิธีที่ให้อาหารหลักสูตร 1/2 CMU1 ที่เติม NAA 0.1 หรือ 1.0 มก./ล. มีขนาดใบมากที่สุดคือ 26.125 และ 25.262 มม ^{2} ตามลำดับ แต่สูตรอาหารหลัก NAA และ TDZ ไม่มีผลร่วมกันต่อจำนวนชิ้นส่วนใบที่เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ จำนวนโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เฉลี่ยที่เกิดขึ้นต่อชิ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 10)

สูตรอาหารหลักและ TDZ มีผลร่วมกันต่อขนาดของชิ้นส่วนใบอย่างมีนัยสำคัญโดยกรรมวิธีที่ให้อาหารหลักสูตร 1/2CMU1 ที่เติม TDZ 0.1 มก./ล. มีขนาดใบมากที่สุดคือ 26.677 มม^2 แต่สูตรอาหารหลัก NAA และ TDZ ไม่มีผลร่วมกันต่อจำนวนชิ้นส่วนใบที่เกิดโปรโตคอร์มไลค์-บอดี้ จำนวนโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เฉลี่ยที่เกิดขึ้นต่อชิ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 11)

NAA และ TDZ มีผลร่วมกันต่อขนาดของชิ้นส่วนใบอย่างมีนัยสำคัญ โดยกรรมวิธีที่ให้ ที่เติม NAA 0.1 หรือ 1.0 มก./ล.และ TDZ 0.1 มก./ล. มีขนาดใบมากที่สุดคือ 27และ 25.5 มม^2 ตามลำดับ แต่ NAA และ TDZ ไม่มีผลร่วมกันต่อจำนวนชิ้นส่วนใบที่เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ จำนวนโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เฉลี่ยที่เกิดขึ้นต่อชิ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 12)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 6 ลักษณะการเกิด PLB ของ *P. amabilis* ของกรรมวิธีต่างๆ

ก. กรรมวิธีที่ 6 NAA 0.1 TDZ 0.1 มก./ล. **ข.** กรรมวิธีที่ 7 NAA 0.1 TDZ 1.0 มก./ล.

ค. กรรมวิธีที่ 10 NAA 1.0 TDZ 0.1 มก./ล. **ง.** กรรมวิธีที่ 11 NAA 1.0 TDZ 1.0 มก./ล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 9 ผลของสูตรอาหารหลัก ปริมาณของ NAA และ TDZ ต่อจำนวนชิ้นที่เกิด PLB ขนาดและจำนวนเฉลี่ยการเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้จากชิ้นส่วนของ *P. amabilis* ในการทดลองที่ 1.2.1

สูตรอาหาร	NAA มก./ล.	TDZ มก./ล.	จำนวนชิ้นที่เกิด PLB (%)	ขนาด(มม^2)	จำนวนเฉลี่ย PLB ที่เกิด/ชิ้น	สี
	0	0	-	25 [b]	-	2
		0.1	-	25 [b]	-	2
		1.0	-	25 [b]	-	2
		2.0	-	25 [b]	-	2
	0.1	0	-	25 [b]	-	2
1/2		0.1	10	29 [a]	1.2	2
CMU1		1.0	10	25.05 [b]	0.1	2
		2.0	-	25 [b]	-	2
	1.0	0	-	25 [b]	-	2
		0.1	10	26.1 [b]	0.6	2
		1.0	10	25.5 [b]	0.5	2
		2.0	-	25 [b]	-	2
	0	0	-	25 [b]	-	2
		0.1	-	25 [b]	-	2
		1.0	-	25 [b]	-	2
		2.0	-	25 [b]	-	2
	0.1	0	-	25 [b]	-	2
CMU1		0.1	-	25 [b]	-	2
		1.0	-	25 [b]	-	2
		2.0	-	25 [b]	-	2
	1.0	0	-	25 [b]	-	2
		0.1	-	25 [b]	-	2
		1.0	-	25 [b]	-	2
		2.0	-	25 [b]	-	2
		LSD	NS	2.363	NS	

1/ อักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% NS = ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 10 ผลของสูตรอาหารหลัก และปริมาณของ NAA ต่อจำนวนชิ้นที่เกิด PLB ขนาดและจำนวนเฉลี่ยการเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ จากชิ้นส่วนของ *P. amabilis* ในการทดลองที่ 1.2.1

สูตรอาหาร	NAA มก./ล.	จำนวนชิ้นที่เกิด PLB (%)	ขนาด(มม^2)	จำนวนเฉลี่ย PLB ที่เกิด/ชิ้น	สี
1/2	0	-	25^{b}	-	2
CMU1	0.1	5	26.125^{a}	0.425	2
	1.0	5	25.262^{ab}	0.175	2
	0	-	25^{b}	-	2
CMU1	0.1	-	25^{b}	-	2
	1.0	-	25^{b}	-	2
	LSD	NS	0.5977	NS	

1/ อักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

NS = ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 11 ผลของสูตรอาหารหลัก และปริมาณของ TDZ ต่อจำนวนชิ้นที่เกิด PLB ขนาดและจำนวนเฉลี่ยการเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ จากชิ้นส่วนของ *P. amabilis* ในการทดลองที่ 1.2.1

สูตรอาหาร	TDZ มก./ล.	จำนวนชิ้นที่เกิด PLB (%)	ขนาด(มม^2)	จำนวนเฉลี่ย PLB ที่เกิด/ชิ้น	สี
1/2	0	-	25^{b}	-	2
CMU1	0.1	5	26.677^{a}	0.45	2
	1.0	5	25.183^{b}	0.15	2
	2.0	-	25^{b}	-	2
	0	-	25^{b}	-	2
CMU1	0.1	-	25^{b}	-	2
	1.0	-	25^{b}	-	2
	2.0	-	25^{b}	-	2
	LSD	NS	1.352	NS	

1/ อักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

NS = ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 12 ผลของ NAAและ TDZ ต่อจำนวนชิ้นที่เกิด PLB ขนาดและจำนวนเฉลี่ยการเกิดโปร-โตคอร์มไลค์บอดี้ จากชิ้นส่วนของ *P. amabilis* ในการทดลองที่ 1.2.1

NAAมก./ล.	TDZ มก./ล.	จำนวนชิ้นที่เกิด PLB (%)	ขนาด(มม^2)	จำนวนเฉลี่ย PLB ที่เกิด/ชิ้น	สี
0	0	-	25^b	-	2
	0.1	-	25^b	-	2
	1.0	-	25^b	-	2
	2.0	-	25^b	-	2
0.1	0	-	25^b	-	2
	0.1	5	27^a	0.6	2
	1.0	5	25.025^b	0.05	2
	2.0	-	25^b	-	2
1.0	0	-	25^b	-	2
	0.1	5	25.5^{ab}	0.3	2
	1.0	5	25.25^b	0.25	2
	2.0	-	25^b	-	2
	LSD	NS	1.67	NS	NS

1/ อักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

NS = ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภาพที่ 7 ชิ้นส่วนใบของ *P. parishili* เมื่ออายุ 24 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 การกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

การศึกษาวิธีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ *P. amabilis* และ *P. parishili* จากโปรโตคอร์มที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยคัดโปรโตคอร์มที่มีขนาดเท่ากันนำมาเลี้ยงลงในอาหารเหลวสังเคราะห์ร่วมกับสารละลายโคลชิซินเป็นระยะเวลา 1, 5 และ10 วัน โดยทดสอบกับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 5 ระดับ คือ 0 0.01 0.025 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สารละลายโคลชิซิน มีผลต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมและอัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์ม ดังนี้

โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *P. amabilis* ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน มีอัตราการรอดลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินเพิ่มมากขึ้น โปรโตคอร์มที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอด 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน โปรโตคอร์มที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ที่ความเข้มข้น 0.01 0.025 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 1 วัน มีชีวิตรอด 95, 90, 81และ 72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โปรโต - คอร์มที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.01 0.025 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 วัน มีชีวิตรอด 70, 65, 49 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และโปรโตคอร์มที่ได้รับสารละลายโคลชิซินเป็นระยะเวลา 10 วันทุกระดับความเข้มข้นไม่มีชีวิตรอด (ตารางที่ 13, 14 และ15)แต่โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *P. parishili* ไม่มีชีวิตรอดเลยในทุกกรรมวิธีที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (ตารางที่ 16)

เมื่อนำโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *P. amabilis* มาเลี้ยงบนอาหารแข็งเป็นเวลา 24 สัปดาห์พบว่าสารละลายโคลชิซินมีผลต่อการเจริญเติบโตของเมื่อโปรโตคอร์มพัฒนาเป็นต้นอ่อน ต้นกล้าที่เจริญ จากโปรโตคอร์มที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าต้นที่เจริญมาจาก โปรโตคอร์มที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินลักษณะแคระแกร็น ใบหนาแข็ง สีเขียวเข้ม รูปทรงบิดเบี้ยว (ภาพที่ 8)

ก ข

ภาพที่ 8 ลักษณะของต้นที่พัฒนาจากโปรโตคอร์มที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (ก) และที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่13 ผลร่วมของความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินและจำนวนวันที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของโปรโตคอร์มของ *P. amabilis* หลังจากย้ายลงอาหารแข็งเป็นเวลา 24 สัปดาห์

จำนวนวันที่ให้สาร	ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน(%)	อัตราการรอดชีวิต (%)
1 วัน	0	100[a]
	0.01	95[ab]
	0.025	90[abc]
	0.05	81[bc]
	0.1	72[c]
5 วัน	0	100[a]
	0.01	70[c]
	0.025	65[c]
	0.05	49[d]
	0.1	0[e]
10 วัน	0	100[a]
	0.01	0[e]
	0.025	0[e]
	0.05	0[e]
	0.1	0[e]
	LSD	12.33

1/ อักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 14 ผลของจำนวนวันต่ออัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของโปรโตคอร์มของ *P. amabilis* หลังจากย้ายลงอาหารแข็งเป็นเวลา 24 สัปดาห์

จำนวนวันที่ให้สาร (วัน)	อัตราการรอดชีวิต (%)
1	87.6[a]
5 วัน	56.8[b]
10 วัน	20[c]
LSD	19.87

1/ อักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 15 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของโปร-โตคอร์มของ *P. amabilis* หลังจากย้ายลงอาหารแข็งเป็นเวลา 24 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน (%)	อัตราการรอดชีวิต (%)
0	100[a]
0.01	55[b]
0.025	52[b]
0.05	43.33[bc]
0.1	24[c]
LSD	16.941

1/ อักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

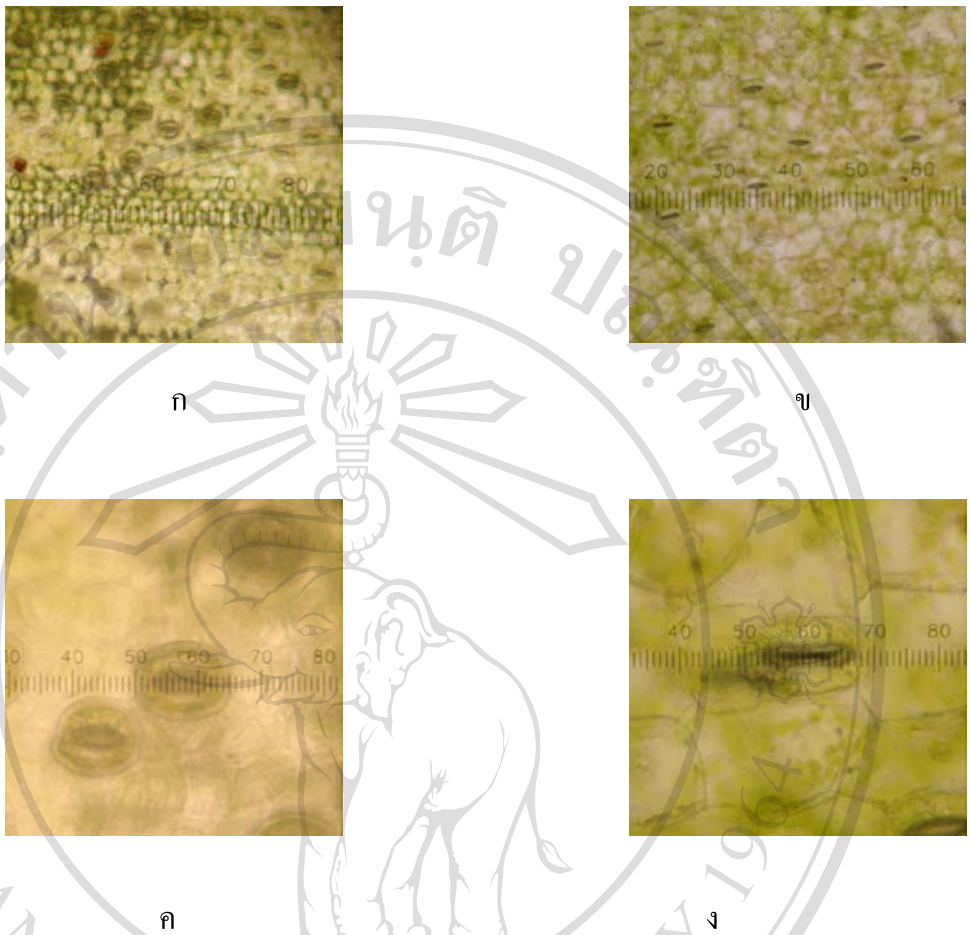
ตารางที่ 16 ผลร่วมของความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินและจำนวนวันที่มีผลอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของโปรโตคอร์มของ *P. parishili* หลังจากย้ายลงอาหารแข็งเป็นเวลา 24 สัปดาห์

	ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน				
จำนวนวันที่ให้สาร	0 %	0.01 %	0.025 %	0.05 %	0.1 %
1 วัน	100	0	0	0	0
5 วัน	100	0	0	0	0
10 วัน	100	0	0	0	0

NS = ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้ยังพบว่า สารละลายโคลชิซิน มีผลต่อขนาดและจำนวนปากใบ ของกล้วยไม้ *P. amabilis* เมื่อนำใบของต้นปกติและต้นที่ ได้รับสารละลายโคลชิซิน มาวัดขนาดของปากใบจำนวน 20 ปากใบ พบว่า ขนาดของปากใบของต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีขนาด 18 ± 5 ไมโครเมตร ซึ่งใหญ่กว่าปากใบของต้นปกติ ที่มีขนาด 15 ± 3 ไมโครเมตร และนับจำนวนปากใบต่อพื้นที่ 0.04 มม.^{2} ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีจำนวนปากใบ 40 ปากใบ ซึ่งลดลงกว่าต้นปกติที่มี 65 ปากใบ (ภาพที่ 9)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 9 จำนวนปากใบของ *P. amabilis* ที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (ก) และที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (ข) ขนาดปากใบของ *P. amabilis* ที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (ค) และที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (ง)

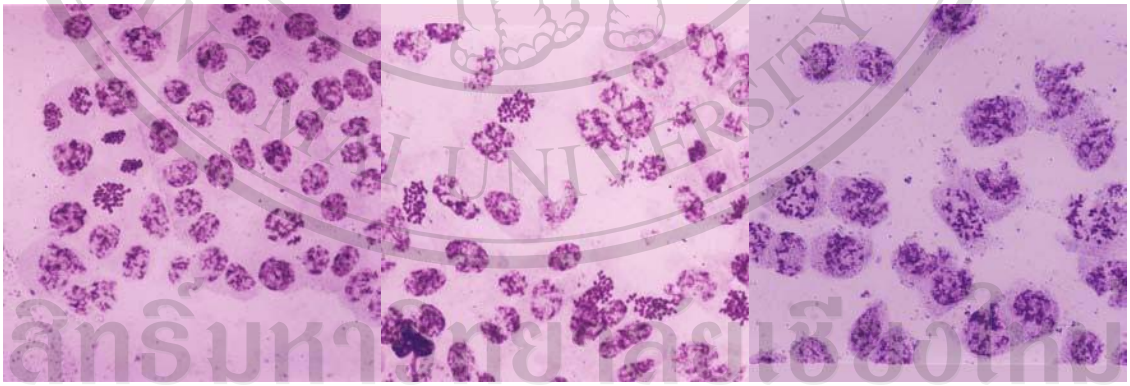
การทดลองที่ 3 การศึกษาวิธีการหาจำนวนโครโมโซมปลายรากของต้น *Phalaenopsis*

เตรียมเนื้อเยื่อปลายรากเพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมของต้น *Phalaenopsis* จากต้นที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อแล้วนำไปเก็บไว้ภายใต้สภาพโรงเรือนโดยการเก็บตัวอย่างปลายรากในช่วงเวลาแตกต่างกันเพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสม ที่เซลล์ปลายรากมีการแบ่งเซลล์ในระยะเมตาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิส การหาช่วงเวลาในการหยุดวงชีพเซลล์ เพื่อได้เซลล์ที่มีโครโมโซมหดสั้นสามารถตรวจนับได้อย่างชัดเจน การหาช่วงเวลาในการแช่รากในสารละลายสีย้อมโครโมโซมเพื่อได้โครโมโซมที่ติดสีชัดเจน และหาจำนวนโครโมโซมของพืชทดลอง ได้ผลการศึกษาดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเก็บตัวอย่างปลายรากของพืชทดลองในเวลา 07.00 08.00 และ 09.00 น. และนำปลายรากที่เก็บในแต่ละกรรมวิธีมาผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม จากนั้นนำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า กรรมวิธีที่เก็บปลายรากในเวลา 08.00 นั้นมีจำนวนเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในระยะเมตาเฟส และโครโมโซมหดสั้น สามารถตรวจนับได้ง่าย ส่วนกรรมวิธีที่เก็บปลายรากในเวลา 07.00 และ 9.00 น. ไม่พบว่ามีเซลล์ที่แบ่งตัวในระยะเมตาเฟส (ภาพที่ 10)

การศึกษาการหยุดวงชีพของเซลล์ โดยทำการเก็บตัวอย่างปลายรากในเวลาที่เหมาะสม แล้วนำตัวอย่างปลายรากมาแช่ลงในสารละลาย PDB เก็บที่อุณหภูมิประมาณ 15 องศาเซลเซียส นานเป็นช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 4, 8 และ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเนื้อเยื่อปลายรากไปผ่านขั้นตอนต่างๆของกรรมวิธีการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม และนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ากรรมวิธีที่ผ่านการหยุดวงชีพเซลล์ 8 ชั่วโมง ทำให้โครโมโซมหดสั้นและกระจายออกจากกันทั่วทั้งเซลล์จนสามารถเห็นรูปร่างของโครโมโซมชัดเจนสามารถนับจำนวนได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ส่วนกรรมวิธีที่แช่ในสารละลาย PDB นาน 12 ชั่วโมงทำให้โครโมโซมหดสั้นมากเกินไป และเมื่อแช่เพียง 4 ชั่วโมง โครโมโซมยังไม่หดสั้นพอที่ทำให้สามารถนับจำนวนโครโมโซมที่สะดวก (ภาพที่ 11)

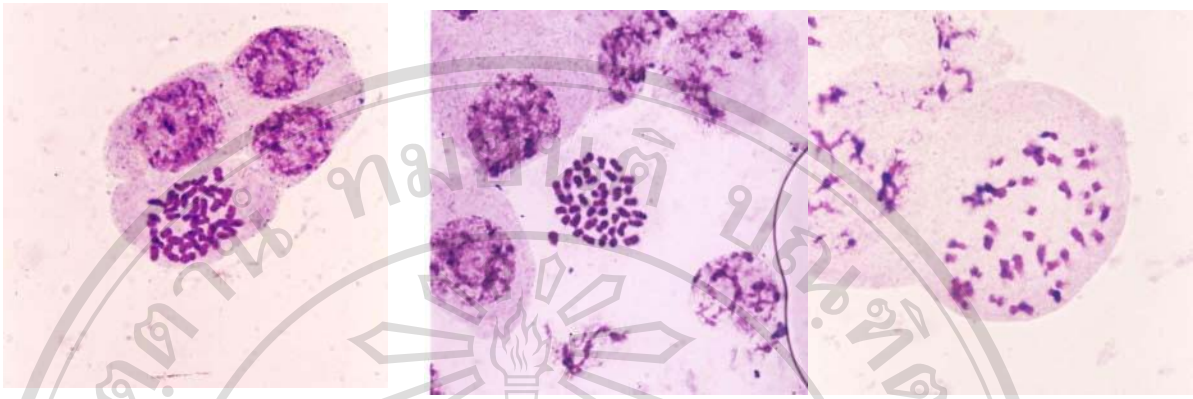


ก ข ค

ภาพที่ 10 โครโมโซมจากเซลล์ปลายรากที่เก็บตัวอย่างในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

ก = 7.00 น. (1228 ×) ข = 8.00 น. (1226 ×) ค = 9.00 น. (1226 ×)

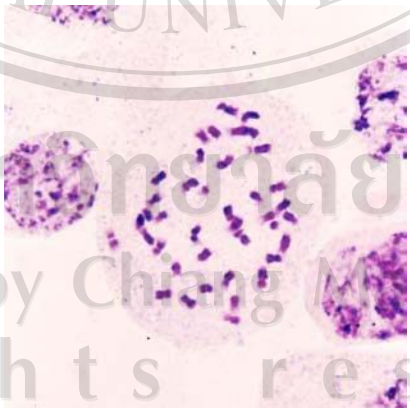
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ก ข ค

ภาพที่ 11 โครโมโซมจากเซลล์ปลายรากที่แช่ในสารละลาย PDB เพื่อหยุดวงชีพเซลล์ในระยะเวลาที่ต่างกัน ก = 4 ชั่วโมง (1285 ×) ข = 8 ชั่วโมง (1197 ×) ค = 12 ชั่วโมง (1285 ×)

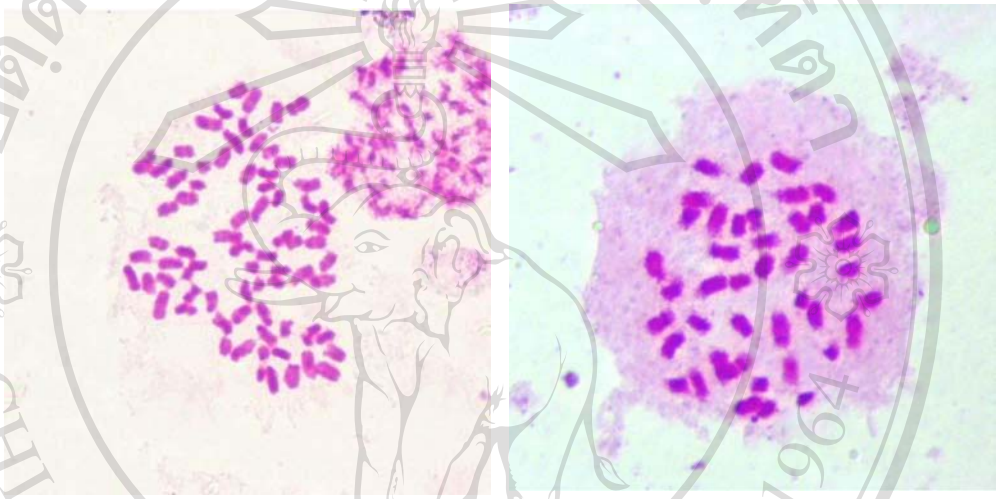
จากการสุ่มตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ที่เห็นโครโมโซมชัดเจนและกระจายตัวเต็มที่จำนวน 10 เซลล์ พบว่า ทุกเซลล์มีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 38 (ภาพที่12)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 12 โครโมโซมเซลล์ปลายรากของ *Phalaenopsis* 2n = 2x =38 (1284 ×)

เมื่อนำเซลล์ปลายรากจากการทดลองที่ 2 มาทำการตรวจนับโครโมโซมโดยนำมาจากกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน เลือกที่ต้นมีลักษณะเมื่อมองด้วยตาเปล่าไม่เหมือนต้นปกติ และมีปากใบใหญ่กว่าต้นปกติ (ภาพที่ 9) โดยนับจากเซลล์จำนวน 10 เซลล์ พบว่าต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีจำนวนโครโมโซมจากปลายราก $2n = 4x = 76 \pm 2$ (ภาพที่ 13)



2n = 4x = 76 2n = 2x = 38

ก ข

ภาพที่ 13 จำนวนโครโมโซมจากปลายรากของ *Phalaenopsis* ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ต้นเตราพลอยด์ (1284 ×) (ก)และ ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินต้นปกติ (1380×) (ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved