

การชักนำมะหาดที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์เกิดขึ้นในสภาพปลอดเชื้อ[†]

ปิยนันท์ ชมนาวัง^{1,*}, ชาญณรงค์ ชมนาวัง², ลิขิต ศิริสันติเมธาคม¹ และ ภาวิณี ไชยรักษ์³

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ อำเภอมือ จังหวัดกาฬสินธุ์ 46000

²สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ อำเภอมือ จังหวัดกาฬสินธุ์ 46000

³สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ อำเภอมือ จังหวัดกาฬสินธุ์ 46000

*อีเมล: piyanan.ch@ksu.ac.th

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์มะหาดปัจจุบันยังมีน้อย เนื่องจากปัญหาที่เกิดจากธรรมชาติของมะหาดเอง มีรายงานว่ามะหาดมีจำนวนน้อยลงเนื่องจากเมล็ดมะหาดไม่สมบูรณ์ มีอัตราการรอดชีวิตและงอกเป็นต้นในอัตราที่ต่ำ เป็นไม้โตช้าจึงไม่เป็นที่นิยมปลูกเป็นสวนป่า แต่มะหาดเป็นไม้ที่มีประโยชน์มาก การศึกษานี้เป็นการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ได้จากการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย Colchicine เพื่อชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ และนำแคลลัสที่เพาะเลี้ยงได้ดังกล่าวมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นและรากเพื่อการขยายพันธุ์ต่อไป ทำได้โดยการคัดเลือกชิ้นส่วนแคลลัสที่ผ่านการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย Colchicine มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Woody plant medium (WPM) ดัดแปลง ที่มีน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร วัน 7 กรัมต่อลิตร casein hydrolyzate 0.5 กรัมต่อลิตร (ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), Naphthalene acetic acid (NAA) หรือ N₆-Benzyladenine phosphate (BA) เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง 1,500 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุกเดือน นาน 2 - 3 เดือน จากนั้นนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสมะหาดที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี แปรผันชนิดและสารควบคุมการเจริญเติบโต 8 ชุดทดลอง ผลการทดลองพบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร WPM ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุด (2.06 เซนติเมตร) การชักนำให้แคลลัสของมะหาดที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีเกิดเป็นยอดและรากด้วยอาหาร WPM แปรผันชนิดและสารควบคุม พบว่า จำนวนยอดเฉลี่ยมีสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร WPM ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ อาหาร WPM ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (3.2 ยอด) เมื่อติดตามความยาวยอดที่เกิดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ พบว่า ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับจำนวนยอดเฉลี่ย ผลการติดตามจำนวนรากเฉลี่ยลักษณะของรากเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ พบว่าการเกิดรากได้ไม่แตกต่างกันมากนัก และรากมีลักษณะกลม สั้นๆ บางสูตรอาหารพบว่ารากมีลักษณะเล็ก ยาว แหวม มีสีตั้งแต่สีขาวไปจนถึงสีน้ำตาลอ่อน พบว่า จำนวนรากที่เกิดเฉลี่ยสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร WPM ที่มี NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

คำสำคัญ: มะหาด, การปรับปรุงพันธุ์พืช, การกลายพันธุ์ของพืช, Colchicine

Abstract

The current Mahad propagation is still few. Due to problems caused by the nature of Mahad itself. It was reported that Mahad had a smaller number. Because Mahad seeds are incomplete have a low survival rate and germination rate. It is a slow growing tree, so it is not popular to be planted as a forest plantation, but Mahad is a very useful tree. This study investigated the factors affecting the culture of mutagenic callus with Colchicine for polyploid induction. The aforementioned cultured calluses were used to study the optimum conditions for inducing plants and roots for further propagation. This was achieved by selectively selecting colchicine-mutated callus fragments and cultured on modified Woody plant medium (WPM) containing 20 g/L sucrose, 7 g/L agar, 0.5 g casein hydrolyzate. per L (mix plant growth regulator 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), Naphthalene acetic acid (NAA) or N₆-Benzyladenine phosphate (BA) were cultured under 1500 lux light for 16 h per day, at 25 °C, transplanted monthly. for 2 - 3 months, then to study the optimum conditions for culturing the mutant Mahad callus with chemicals. The results showed that callus cultured in WPM medium containing 2,4-D 2 mg/L in combination with BA 1 mg/L. The highest mean callus size (2.06 cm) was

[†]การประชุมวิชาการและการนำเสนอผลงาน ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ครั้งที่ 10 (ระหว่างวันที่ 20 - 22 กันยายน 2565 ณ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์)

obtained by chemically inducing shoots and roots of chemically mutated Mahad callus with WPM medium and control medium. The highest was when cultured in WPM medium containing 2,4-D 2 mg/L plus BA 1 mg/L and WPM medium containing 1 mg/L NAA plus BA 1 mg/L (3.2 peaks). The length of shoots formed when cultured in different formulations showed that the experimental results were consistent with the average number of shoots. The results of the follow-up on mean number of roots and root characteristics when cultured in various mediums. found that the root formation was not much different. The roots were round and short. Some recipes showed that the roots were small, long, pointed, and the color ranged from white to light brown. The mean number of roots was highest when cultured in WPM medium containing 2 mg/L NAA. with BA 1 mg/L.

Keywords: Mahad, Plant breeding, Plant mutation, Colchicine

บทนำ

มะหาดเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ มะหาดมี 2 พันธุ์ คือ มะหาดใบเล็กและมะหาดใบใหญ่ โดยดูจากขนาดของใบ ลำต้นสูงใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางกว่า 1 เมตร สูงได้ถึง 20 - 25 เมตร เปลือกขรุขระ สีน้ำตาลดำหรือแดงอมน้ำตาล มียางสีขาวทั่ว ใบเดี่ยวเรียงสลับ รูปไข่หรือยาวรี ขนาด 10 - 30 เซนติเมตร ยาว 5 - 15 เซนติเมตร เส้นใบ 15 - 20 คู่ ใบอ่อนและกิ่งอ่อนมีขน หูใบเรียวแหลม เส้นใบชัดเจน โคนใบสอบ แคนรูปลิ้น หรือมน ดอก ออกตามง่ามใบเป็นช่อเล็กๆ ลักษณะดอกจะมีสีขาวอมเหลืองมีขนาดเล็ก ผลเป็นผลรวมมีสีเขียว เมื่อสุกจะมีสีเหลือง รัศมีจากจุดศูนย์กลางยาว 2.5 - 5 เซนติเมตร รูปร่างกลมแป้นใหญ่ มีทรงบิดเบี้ยวเป็นบางลูก เปลือกนอกผิวขรุขระ เนื้อผลค่อนข้างนุ่ม เนื้อบางล้อมรอบด้วยชั้นเยื่อหนา รสเปรี้ยว แต่ละผลย่อยมีเมล็ด 1 เมล็ด ก้านผลสั้นจมอยู่ในผล ติดผลประมาณเดือนมีนาคม ดอกจะออกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน และกลายเป็นผลในเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม เป็นพันธุ์ไม่มดคลพระราชทานประจำจังหวัด กาฬสินธุ์ เป็นพันธุ์ไม้ที่สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ ได้พระราชทานให้กับผู้ว่าราชการจังหวัดของจังหวัดกาฬสินธุ์ เพื่อให้นำไปปลูกเป็นสิริมงคลแก่จังหวัด และเป็นการรณรงค์ให้ประชาชนปลูกต้นมะหาดในโครงการปลูกป่าถาวรเฉลิมพระเกียรติ มะหาดมีต้นสูงใหญ่ แต่ละต้นจะมีรสชาติไม่เหมือนกัน บางต้นอมเปรี้ยว บางต้นหวาน พบได้ตามป่ากรังทั่วไป ไม้มะหาดสามารถนำไปทำโปงลาง แก่นเป็นยาขับพยาธิตัวดี พยาธิไส้เดือน แก้อังคตเพื่อ ขับโลหิต ขับปัสสาวะกระปริดกระปรอย และแก้ผื่นคัน สำหรับเปลือกลำต้นของมะหาดใบเล็กใช้รับประทานแทนหมากได้ คล้าย ๆ กับต้นสีเลือด

การขยายพันธุ์มะหาดปัจจุบันยังมีน้อย เนื่องจากปัญหาที่เกิดจากธรรมชาติของมะหาดเอง โดยมีรายงานว่ามะหาดมีประชากรน้อยลงเนื่องจากเมล็ดมะหาดไม่สมบูรณ์ มีอัตราการรอดชีวิตและงอกเป็นต้นในอัตราที่ต่ำ เป็นไม้โตช้าจึงยังไม่เป็นที่นิยมปลูกเป็นสวนป่า แต่มะหาดเป็นไม้ที่มีประโยชน์มาก ดังนั้นในการส่งเสริมการปลูก ควรมีข้อมูลพื้นฐานและการศึกษาพัฒนาในด้านต่าง ๆ ของมะหาด ซึ่งจะเป็พื้นฐานในการสืบหาข้อมูลทางด้านพันธุกรรมต่อไปเพื่อการพัฒนาสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตที่มีคุณภาพ และในการขยายพันธุ์โดยวิธีการอาศัยเพศด้วยเมล็ดพันธุ์ที่ต้นนั้นการได้มาของเมล็ดพันธุ์ดีต้องมีวิธีการและความรู้ ความเข้าใจถึงโครงสร้างของดอก กระบวนการผสมพันธุ์ ตลอดจนระยะเวลาของปรากฏการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการขยายพันธุ์โดยการสืบพันธุ์และพันธุกรรมที่ดีของมะหาด ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะพัฒนาพันธุ์มะหาด เพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์มะหาด และผลิตต้นพันธุ์มะหาด

โดยทั่วไปนักปรับปรุงพันธุ์พืชจะใช้ความแปรปรวนทางพันธุกรรม ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้โดยคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ จากพันธุ์ที่มีการรวบรวมมาจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งในท้องถิ่นและจากต่างประเทศ นำมาปลูกและคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะดีตามต้องการไว้ โดยนำมาใช้เป็นพันธุ์ปลูกโดยตรง หรือนำมาผสมพันธุ์ กับพันธุ์ที่มีอยู่เดิมเพื่อเพิ่มลักษณะดีที่ต้องการเข้าไป โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรวมลักษณะดีที่มีอยู่ในแต่ละพันธุ์มาไว้ในพันธุ์เดียวกัน เช่น ผลผลิตสูง ต้านทานโรคและแมลง ทนทานต่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เป็นต้น วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชดังกล่าวข้างต้น ซึ่งประกอบด้วยการนำเข้าพันธุ์พืช การคัดเลือกและการผสมพันธุ์ เรียกว่า เป็นการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีมาตรฐาน ซึ่งอาศัยความแปรปรวนทางพันธุกรรมในธรรมชาติ ซึ่งส่วนหนึ่งมาจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) โดยพืชทุกชนิดมีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ได้ทุกระยะการเจริญเติบโต

ส่วนการปรับปรุงพันธุ์โดยการเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ นักปรับปรุงพันธุ์ไม่ได้อาศัยความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่มีอยู่ในธรรมชาติ แต่ใช้รังสีหรือสารเคมีเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์ จากนั้นก็คัดเลือกลักษณะที่ต้องการ นำมาขยายพันธุ์ทดสอบลักษณะที่ต้องการและขยายพันธุ์ เผยแพร่ เป็นพันธุ์ใหม่ต่อไป จะเห็นได้ว่าการปรับปรุงพันธุ์โดยการกลายพันธุ์ มีความแตกต่างจากการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีมาตรฐานเพียงขั้นตอนแรกเท่านั้น ในขั้นตอนต่อไปซึ่งประกอบด้วย การคัดเลือก การทดสอบพันธุ์ การขยายพันธุ์ และบางครั้งอาจใช้วิธีการผสมพันธุ์ด้วย ซึ่งไม่แตกต่างจากวิธีการการกลายพันธุ์ คือ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของเซลล์ที่เกิดขึ้นกับโมเลกุลของ DNA ซึ่งไม่ได้เกิดจากการรวมตัว หรือการแยกตัว ของสารพันธุกรรมตามปกติ และสามารถถ่ายทอดลักษณะการเปลี่ยนแปลงนั้นจากเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปยังเซลล์ลูกได้ด้วยกระบวนการแบ่งเซลล์ การกลายพันธุ์แบ่งได้เป็น 2 ระดับคือ

1) การกลายพันธุ์ระดับยีน เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในยีน เกี่ยวข้องกับการสูญหายไปหรือเพิ่มเข้ามาของส่วนของยีน หรือ การเปลี่ยนแปลง โครงสร้างภายในยีน

2) การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม การกลายพันธุ์ของ โครโมโซม เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดในโครงสร้าง หรือจำนวนโครโมโซม ซึ่ง เกี่ยวข้องกับหลาย ยีน

การกลายพันธุ์เกิดขึ้นในระดับยีนหรือโครโมโซมซึ่งเป็นโครงสร้างของสิ่งมีชีวิตที่เล็กมาก การที่จะทราบว่า มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นนั้น ทราบได้โดยมีการเปลี่ยนแปลงทาง Phenotype การเปลี่ยนแปลงทาง Phenotype ในบางลักษณะอาจชัดเจน สามารถแยกได้ด้วยตาเปล่า เช่น มีการเปลี่ยนแปลงในรูปทรงของต้น เปลี่ยนแปลงในสีดอก จำนวนหรือขนาดของผล มีอายุการเก็บเกี่ยวเร็วขึ้นหรือช้าลง เป็นต้น ซึ่งการ กลายพันธุ์ชนิดนี้สามารถคัดเลือกนำมาใช้ประโยชน์ได้ง่าย แต่การกลายพันธุ์บางชนิดก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทาง Phenotype เล็กน้อย ไม่ ปรากฏให้เห็นชัดเจนต้องใช้วิธีการเฉพาะในการแยกพันธุ์กลาย และคัดเลือกนำพันธุ์กลายที่ต้องการมาใช้ประโยชน์ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงใน ลักษณะเชิงปริมาณ เช่น องค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ ของพืช ปริมาณโปรตีน ไขมัน น้ำตาล กรดอะมิโน ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสง การเก็บสะสมอาหารของพืช ผลผลิต เป็นต้น การแยกพันธุ์กลายมาใช้ประโยชน์จะต้องอาศัยเครื่องมือวิเคราะห์และวิธีการวิเคราะห์โดยเฉพาะ บางลักษณะต้องอาศัยหลักสถิติเข้าช่วยในการวิเคราะห์และต้องใช้จำนวนต้นพืชหลายต้นในการตรวจสอบ ตัวอย่างเช่น ผลผลิต และในปัจจุบัน ยังมีการนำเทคนิคทางโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือกและตรวจสอบพันธุ์กลายอีกด้วย

การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำ มีคุณสมบัติ หรือคุณลักษณะที่ไม่ต่างจากที่เกิดเองตามธรรมชาติ เพียงแต่มีอัตราการ กลายพันธุ์สูงกว่าที่เกิดเองตามธรรมชาติ นอกจากนี้การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำอาจได้ลักษณะแปลกใหม่ที่พบในธรรมชาติ เนื่องจากการกลายพันธุ์ในลักษณะดังกล่าว อาจเคยเกิดขึ้นแล้วในธรรมชาติ แต่ถูกคัดทิ้งไป โดยไม่ผ่านการคัดเลือกคัดของธรรมชาติ พวก Genotype ที่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมเท่านั้นจึงจะมีชีวิตรอดได้ นอกจากนี้อาจถูกคัดทิ้งไปโดยมนุษย์ โดยมนุษย์จะเลือกพืช ที่มีลักษณะที่พึงประสงค์ไว้ และกำจัดพวกที่ไม่ต้องการออกไป บางครั้งพืชที่กลายพันธุ์แล้วจะได้ผ่านการคัดเลือกตามธรรมชาติแล้ว ก็อาจจะถูก ทำให้อายุสั้นไป โดยน้ำมือของมนุษย์

Colchicine เป็นสารประกอบอะโรมาติกในกลุ่ม alkaloids พบในพืชบางชนิด เช่น *Colchicum autumnale* L. มีสมบัติในการเพิ่ม ขูดของ โครโมโซม โดยสารเคมีนี้จะจับกับโมเลกุล Tubulin ของ spindle ทำให้โมเลกุลไม่ทำหน้าที่ ไม่สามารถรวมตัวสร้าง microtubules ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสร้าง spindle fiber จึงไม่สามารถแยกโครโมโซมไปที่ขั้วเซลล์ได้ ทำให้เพิ่มจำนวนโครโมโซมจาก ดิพลอยด์ เป็น โพลีพลอยด์ การใช้ Colchicine เพื่อเพิ่มขูด โครโมโซม ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อและอวัยวะนั้น อาจเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และล้างออก หลังจากเพาะเลี้ยงไปช่วงระยะเวลาหนึ่ง มักใช้กับเมล็ดที่กำลังงอกหรือส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ ความเข้มข้นที่ใช้ทั่วไปคือ ร้อยละ 0.1 - 0.5 แต่ที่ นิยมและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ใช้ประโยชน์คือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 สาร Colchicine นี้มีผู้นำมาใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน พืชอย่างกว้างขวางเนื่องจากไม่เป็นอันตรายต่อต้นพืชแม้จะใช้ในอัตราสูงเพราะเป็นสารที่สกัดจากพืช เคลื่อนย้ายไปตามส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยยังคงรักษารูปเดิมและทำหน้าที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เป็นเวลานาน อีกทั้งไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ ยีน เนื่องจาก Colchicine สลายตัวเมื่อได้รับความร้อนขึ้น ส่งผลให้การเพิ่มขูด โครโมโซม ลดลงหรือหายไป ดังนั้นจึงต้องกรองด้วยกระดาษกรองพอลิเมอร์ทำ ให้สะดวกในการชักนำให้เกิดการเพิ่มขูดโครโมโซมภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ อย่างไรก็ตาม ในพืชบางชนิด Colchicine ส่งผลให้พืชเป็นหมัน การเจริญเติบโตผิดปกติและเกิดการขาดของ โครโมโซม ได้ วิธีการให้สาร Colchicine มี 2 วิธีคือ การหยดสารละลายโดยตรงกับต้นพืชบริเวณ ปลายยอด และการนำเมล็ดหรือชิ้นส่วนพืชแช่สารละลายดังกล่าวซึ่งสามารถศึกษาในพืชที่เจริญเติบโตในแปลงปลูกและในหลอดทดลองภายใต้ สภาวะปลอดเชื้อ การให้สาร Colchicine แก่พืชต้องพยายามให้สารแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อเจริญหรือเซลล์ ที่กำลังเจริญเติบโตและสมบูรณ์ ระยะเวลาและความยาวนานของการให้สารแก่เนื้อเยื่อพืชขึ้นอยู่กับวัฏจักรของการแบ่งเซลล์พืช หากระยะเวลาที่ให้นั้นอาจไม่แสดงผล ถ้านาน เกินไปอาจแสดงผลมากคือพืชที่ได้จะมี โครโมโซม มากเกินระดับที่ต้องการ วิธีการตรวจสอบ การกลายพันธุ์ของพืชที่ได้จากการชักนำให้เกิด การกลายพันธุ์โดยใช้สาร Colchicine สามารถตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยาและการตรวจสอบลักษณะทางเซลล์ วิทยา

การชักนำต้นพอลิพลอยด์เป็นวิธีการหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการพัฒนาสายพันธุ์ที่ให้ประสิทธิภาพสูง ซึ่งอาจจะทำให้ ส่วนของ ใบ ลำต้น ราก และดอกของต้นที่เป็น โพลีพลอยด์ มีขนาดใหญ่กว่าต้น ดิพลอยด์ ดังนั้นต้น โพลีพลอยด์ อาจจะให้ผลผลิตสูงขึ้น การชักนำต้น โพลีพลอยด์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลอง ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อเป็นที่นิยม เนื่องจากให้ประสิทธิภาพสูง เหมาะสมในการผลิตเพื่อการค้า

การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้สารเคมีเพื่อก่อให้เกิดการกลายพันธุ์นั้นทำให้เกิดการกลายและสามารถ คัดพันธุ์กลายออกมาได้หลายชนิด เพราะเทคนิคดังกล่าวสามารถช่วยในการแยกส่วนกลาย (mutated sector) ออกจากส่วนปกติในกรณีที่เกิด chimera แล้วนำไปขยายพันธุ์ต่อไปได้ ดังนั้น จึงเป็นวิธีการ ที่ช่วยรักษาส่วนกลายไว้ไม่ให้สูญหายไป เพราะการคัดเลือกพันธุ์กลายหรือ ลักษณะกลายจะเป็นการ คัดเลือกในระดับ ดิพลอยด์ ซึ่งมีเซลล์กลายและเซลล์ปกติเจริญอยู่ด้วยกัน เซลล์กลายมักมีการแข่งขันสู่เซลล์ปกติ ไม่ได้ จึงมีโอกาสเจริญไปเป็นส่วนยอดและเป็นต้นพืชได้น้อยกว่าเซลล์ปกติ ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะสามารถแยกลักษณะกลาย

ออกมาเลี้ยงได้ เซลล์กลายจึงมีโอกาสเจริญเป็นต้นพืชที่กลายพันธุ์ต่อไป โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาได้ปรับปรุงพันธุ์มะหาดด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับสารเคมีก่อการกลายพันธุ์คือ Colchicine เพื่อชักนำให้เกิด โพลีพลอยด์ โดยใช้ชิ้นส่วนแคลลัสมะหาดเนื่องจากสามารถชักนำเป็นต้นพืชใหม่ได้ในปริมาณมาก ดังนั้นการศึกษานี้เป็นการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ได้จากการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ และนำแคลลัสที่เพาะเลี้ยงได้ดังกล่าวนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นและรากเพื่อการขยายพันธุ์ต่อไป โดยคาดว่าจะผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นแนวทางหนึ่งในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์มะหาดต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1) การเตรียมแคลลัสมะหาดที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี

การคัดเลือกชิ้นส่วนแคลลัสที่ผ่านการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี โดยนำชิ้นส่วนแคลลัสเริ่มต้นมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เพื่อเพิ่มปริมาณของแคลลัส ให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับการศึกษาขั้นตอนต่อไป ดูแลแคลลัสโดยย้ายเลี้ยงทุกเดือนบนอาหารแข็งสูตร WPM ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร วุ้น 7 กรัมต่อลิตร casein hydrolyzate 0.5 กรัมต่อลิตร (ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 2,4-D, NAA หรือ BA) ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7 ใส่ถุงที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง 1,500 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุกเดือน นาน 2 - 3 เดือน จนมีปริมาณแคลลัสมากเพียงพอสำหรับการทดลองต่อไป

2) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสมะหาดที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี

นำแคลลัสของมะหาดที่เพาะเลี้ยงได้จากข้อ 1 ที่มีขนาดเท่ากัน ย้ายลงในอาหาร WPM ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ และมีการแปรผันชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตดังนี้

ก. WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ. WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฉ. WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ช. WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฌ. WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง 1,500 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เทียบกับการเพาะเลี้ยงในที่มืดที่สภาวะเดียวกัน บันทึกข้อมูล การปลอดเชื้อ การปนเปื้อน การพัฒนาการของชิ้นส่วนแคลลัส โดยวัดขนาดของแคลลัส และสังเกตลักษณะแคลลัส

3) การศึกษาผลการชักนำให้แคลลัสของมะหาดที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีเกิดเป็นยอดและราก

ทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้แคลลัสมะหาดเกิดยอด และราก โดยนำแคลลัสของมะหาดที่เพาะเลี้ยงได้ไปเลี้ยงในอาหาร WPM ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ และมีการแปรผันชนิดและปริมาณของสารควบคุม การเจริญเติบโตดังนี้

ก. WPM + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. WPM + NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. WPM + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. WPM + NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ. WPM + 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฉ. WPM + 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ช. WPM + 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฌ. WPM + 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง 1,500 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เทียบกับ การเพาะเลี้ยงในที่มืดที่สภาวะเดียวกัน บันทึกข้อมูลการชักนำการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนแคลลัส และการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชที่ได้ โดยนับจำนวนชิ้นส่วนพืชเกิดยอดเฉลี่ย จำนวนยอดที่เกิดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย ยอดที่เกิดต่อแคลลัสหนึ่งชิ้น สังเกตลักษณะของยอดที่ได้ และบันทึกข้อมูลการชักนำการสร้างราก จำนวนราก ลักษณะของราก

4) การติดตาม และประเมินผล

การติดตามผลโดยการติดตาม การปลอดเชื้อ การปนเปื้อน การพัฒนาการของชิ้นส่วนแคลลัส โดยวัดขนาดของแคลลัส และสังเกตลักษณะแคลลัส ข้อมูลการชักนำการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนแคลลัส และการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชที่ได้ โดยนับจำนวนชิ้นส่วนพืชเกิดยอดเฉลี่ย จำนวนยอดที่เกิดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย ยอดที่เกิดต่อแคลลัสหนึ่งชิ้น สังเกตลักษณะของยอดที่ได้ และบันทึกข้อมูลการชักนำการสร้างราก จำนวนราก ลักษณะของราก เมื่อทำการเก็บข้อมูลทั้งหมดแล้ว จะนำข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ข้อมูล โดยนำเสนอข้อมูลในรูปของตาราง กราฟ แผนภูมิ และทำการวิเคราะห์ผลการทดลองแต่ละปัจจัย โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูล

ผลและอภิปรายผล

นำแคลลัสของมะหาดที่เพาะเลี้ยงได้ที่มีขนาดเท่ากัน ย้ายลงในอาหาร WPM ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร วัน 0.7 เปอร์เซ็นต์ และมีการแปรผันชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง 1,500 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เทียบกับการเพาะเลี้ยงในที่มืดที่สภาวะเดียวกัน บันทึกข้อมูล การปลอดเชื้อ การปนเปื้อน การพัฒนาการของชิ้นส่วนแคลลัส โดยวัดขนาดของแคลลัส และสังเกตลักษณะแคลลัส เมื่อทำการเก็บข้อมูลทั้งหมดแล้ว จะนำข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ข้อมูล โดยนำเสนอข้อมูล ในรูปของตาราง กราฟ แผนภูมิ ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองแต่ละปัจจัย โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูล

ตารางที่ 1 พัฒนาการชิ้นส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เปรียบเทียบสภาวะในที่สว่าง นาน 30 วัน

สูตรอาหาร เพาะเลี้ยง	ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	SD	CV เปอร์เซ็นต์	ลักษณะของแคลลัส
ก	0.81	0.115	14.28	แคลลัสแน่น
ข	1.15	0.098	8.57	แคลลัสแน่น
ค	0.88	0.109	12.43	แคลลัสแน่น
ง	0.87	0.124	14.28	แคลลัสแน่น
จ	1.04	0.117	11.28	แคลลัสหลวม
ฉ	1.38	0.127	9.21	แคลลัสหลวม
ช	1.33	0.161	12.07	แคลลัสหลวม
ณ	1.39	0.162	11.64	แคลลัสหลวม
เฉลี่ย	1.11	0.130	11.72	

ตารางที่ 2 พัฒนาการชิ้นส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เปรียบเทียบสภาวะในที่มืด นาน 30 วัน

สูตรอาหาร เพาะเลี้ยง	ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	SD	CV เปอร์เซ็นต์	ลักษณะของแคลลัส
ก	1.11	0.113	10.18	แคลลัสแน่น
ข	1.66	0.240	14.46	แคลลัสแน่น
ค	1.75	0.199	11.38	แคลลัสแน่น
ง	1.50	0.240	16.00	แคลลัสแน่น
จ	1.80	0.253	14.00	แคลลัสหลวม
ฉ	1.85	0.305	16.49	แคลลัสหลวม
ช	1.71	0.194	11.39	แคลลัสหลวม
ณ	2.06	0.240	11.63	แคลลัสหลวม
เฉลี่ย	1.68	0.220	13.19	

เมื่อติดตามพัฒนาการของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ สภาวะที่สว่างนาน 30 วัน พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุด รองลงมาคือเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหาร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่แคลลัสที่เพาะเลี้ยงใน WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าต่ำที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเลี้ยงในที่มืด และยังพบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืดมีขนาดของแคลลัสเฉลี่ยสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในที่สว่าง และอาหารที่มีฮอร์โมนผสมกัน 2 ชนิดจะให้ค่าการเจริญของแคลลัสดีกว่าฮอร์โมนเพียงชนิดเดียว

มีการรายงานของ รุ่งนภา ช่างเจรจา และคณะ (2556) วิจัยการพัฒนาพันธุ์สับปะรดเพื่อการแปรรูป (การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ) โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี gamma ray และสาร Colchicine ในต้นลูกผสมจากพ่อแม่พันธุ์ที่คัดเลือกเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ใหม่และเพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของสับปะรดเพื่อให้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาพันธุ์ต่อไป โดยการแช่ต้นอ่อนในสารละลาย Colchicine ที่ระดับต่าง ๆ (ร้อยละ 0, 0.25, 0.50 และ 1.00) นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงหลังให้สาร 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่า ต้นกล้ามีการรอดตายหมดทุกต้น มีอัตราการเจริญค่อนข้างต่ำไม่แตกต่างกัน

สารเคมีหลายชนิดมีคุณสมบัติในการก่อการกลาย เนื่องจากสามารถทำให้เกิดอัตราการกลายสูง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นแบบ Point Mutation สารเคมีก่อการกลายที่ใช้กันส่วนมากจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ Alkylating Agent เช่น Ethyl Methanesulphonate (EMS) Ethyl Nitroso Urea (ENH) Methyl Nitroso Urea (MNH) และกลุ่มของ Azide เช่น Sodium Azide (NaN₃) (Singh et al., 2005)

สารเคมีก่อการกลายสามารถชักนำให้เกิดการกลาย ของพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้หลายประการ ตัวอย่างได้แก่ การเพาะเลี้ยงแคลลัสของผักกาดก้านขาว (*Brassica napus*) บนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) ซึ่งเติม EMS 0.15 เปอร์เซ็นต์ ช่วยให้ต้นพืช ซึ่งเกิดจากการออกใหม่มีความต้านทานต่อโรคลำต้นเน่า (Stem Rot) ที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotinia sclerotiorum* ได้ (Liu et al., 2005) ลักษณะบางประการ เช่น การสร้าง Chlorophyll ขนาดใบ และอัตราการเติบโตของยอดและรากของสับปะรด ซึ่งเกิดจากการออกใหม่จากแคลลัส มีการกลายเมื่อแคลลัสได้รับ Colchicine 0.01 เปอร์เซ็นต์ (Mujib, 2005) และ เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสของชิงเฮา (*Artemisia annua*) โดยให้ Sodium azide 1 - 5 มิลลิโมลาร์ พบว่าแคลลัสที่เกิดการ กลายมีปริมาณการสร้างสารต้านมาลาเรีย Artemisinin เพิ่มขึ้น (Fahad & Salim, 2010)

ในอดีตมีความเชื่อกันว่าพืชที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อนั้นจะมีลักษณะที่ตรงกับพันธุ์เดิมทุกประการ จึงทำให้ผู้ประกอบการนำเทคโนโลยีนี้ไปขยายพันธุ์พืชเชิง การค้ามากมายหลายชนิด อาทิเช่น กล้วยไม้ หน้าวัว และแอฟริกันไวโอเล็ต เป็นต้น ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของพืชอย่างรวดเร็วและสร้างรายได้ให้กับผู้ลงทุนเป็นอย่างมาก จวบจน Larkin and Scowcroft (1981) เปิดเผยให้เห็นว่าความจริงแล้วมีการแปรผัน (Variation) เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ ซึ่งทำให้เราสามารถได้รับพืชสายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะบางประการตามต้องการด้วยเทคโนโลยีนี้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าถ้าให้สิ่งก่อการกลาย (Mutagen) ในขณะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะทำให้เราได้รับพืชสายพันธุ์ใหม่และ ช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้อีกด้วย (Novak & Brunner, 1992)

ปัจจุบันได้มีการชักนำให้เกิดการแปรผันและการกลายของพืชหลายๆ ชนิด เพื่อใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ทำให้ได้รับพืชสายพันธุ์ใหม่ๆ มากมาย นักปรับปรุงพันธุ์พืชก็อาจต้องการลักษณะใหม่ๆ ซึ่งไม่เคยมีมาก่อนหรือลักษณะเด่นเป็นที่นิยมของคนทั่วไป ในแง่การแปรผันและการกลายของพืชจากการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อดูเหมือนจะเป็นสิ่งจำเป็นต่อการพัฒนาสายพันธุ์พืชอย่างยิ่ง (กิตติโพธิ์ปัทมะ และคณะ, 2555)

ตารางที่ 3 จำนวนยอดที่เกิดเฉลี่ย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ

สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	จำนวนยอดที่เกิดเฉลี่ย (ยอด)	SD	CV เปอร์เซ็นต์
ก	1.80	0.84	46.48
ข	2.40	0.55	22.82
ค	3.20	0.84	26.15
ง	3.00	0.71	23.57
จ	1.60	0.55	34.23
ฉ	1.80	0.54	46.48
ช	3.00	0.71	23.57
ฌ	3.20	0.84	26.15
เฉลี่ย	2.50	0.73	31.18

ตารางที่ 4 ความยาวยอดที่เกิดเฉลี่ย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ

สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	ความยาวยอดที่เกิดเฉลี่ย (เซนติเมตร)	SD	CV เปอร์เซนต์
ก	2.32	0.46	19.85
ข	2.46	0.34	13.66
ค	4.88	0.93	19.03
ง	4.68	0.48	10.29
จ	2.82	0.46	16.33
ฉ	2.54	0.58	22.72
ช	5.88	0.91	15.51
ฉ	5.36	0.71	13.17
เฉลี่ย	3.87	0.61	16.32

ผลการศึกษาดังตารางที่ 3 พบว่า จำนวนยอดเฉลี่ยมีสูงที่สุดเพื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัม ต่อลิตร ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ อาหาร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ อาหาร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อติดตามความยาวยอดที่เกิดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ พบว่า ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับจำนวนยอดเฉลี่ย นั่นคือมีความ ยาวมากที่สุดในการ WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA มิลลิกรัมต่อลิตร และ WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4)

เมื่อติดตามจำนวนรากเฉลี่ยลักษณะของรากเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ พบว่าการเกิดรากได้ไม่แตกต่างกันมากนัก และราก มีลักษณะกลม สั้นๆ บางสูตรอาหารพบว่ารากมีลักษณะเล็ก ยาวแหลม มีสีตั้งแต่สีขาวไปจนถึงสีน้ำตาลอ่อน พบว่า จำนวนรากที่เกิดเฉลี่ย สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายชิ้นที่สนับสนุนว่า NAA สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างรากได้ดี รองลงมาจำนวนรากที่เกิดเฉลี่ยสูงในอาหารสูตร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าอาหารที่มี 2,4-D ส่วนใหญ่กระตุ้น การสร้างแคลลัส แต่ในการศึกษานี้พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างรากได้เช่นเดียวกัน ซึ่งทั้ง 2 ฮอรโมนพืชในกลุ่ม auxin จัดว่าเป็นสาร ที่มีผลการต่อเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช แต่การศึกษานี้ยังไม่ครอบคลุมผลการศึกษาในส่วนการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมฮอรโมนใดๆ ซึ่งจะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ตารางที่ 5 จำนวนรากเฉลี่ยและลักษณะของราก เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ

สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	จำนวนรากที่เกิด เฉลี่ย	SD	CV เปอร์เซนต์
ก	2.00	0.71	35.36
ข	2.40	0.55	22.82
ค	3.00	0.71	23.57
ง	3.40	0.55	16.11
จ	2.20	0.45	20.33
ฉ	3.20	0.45	13.98
ช	2.80	0.84	29.88
ฉ	3.00	0.71	23.57
เฉลี่ย	2.75	0.62	23.20

เห็นได้ว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Murashige, 1974) มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของมะหาด เพราะค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดที่ได้มีความแตกต่างกัน จากการสังเกตการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมะหาดที่เพาะเลี้ยงมีความแปรปรวนสูง การเจริญของชิ้นส่วน ให้ผลแตกต่างกัน แม้ว่าจะเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรใกล้เคียงกัน หรือตัดแบ่งเนื้อเยื่อมาจากแหล่งเดียวกัน ความแปรปรวนที่พบ ได้แก่ บางชิ้นส่วนไม่มีการเจริญเติบโตแต่ไม่ตาย บางชิ้นส่วนเกิดต้นติดกันแน่นเป็นกระจุกและเติบโตเป็นยอด จำนวนยอดที่พบมีตั้งแต่ 2 - 3 ยอด เป็นต้น มะหาดสามารถเกิดยอดและรากบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรเดียวกัน ในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกระตุ้นให้เกิดราก มะหาด ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร WMM ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีการเกิดยอดและราก (Skoog & Miller, 1957)

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นกล้ามะหาดที่ได้รับสารละลาย Colchicine ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าชิ้นส่วนพืชที่ได้รับสารละลาย Colchicine ความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้นมีผลทำให้ จำนวนรากเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ย และความหนาแน่นรากเฉลี่ยลดลง อาจเป็นผลมาจากพืชที่ได้รับสารละลาย Colchicine นั้นเกิดการเพิ่มจำนวนชุด โครโมโซม ขึ้น ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นที่ไม่ได้รับสาร Colchicine เพราะวุ้นที่เป็น โพลีพลอยด์ นั้น จะมีปริมาณฮอร์โมน auxin ต่ำกว่าต้น ดิพลอยด์ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และ ปิยะดา ทิพย์ผ่อง, 2550) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Sarathum et al. (2010) ที่ศึกษา Protocorm ของกล้วยไม้เอื้องแซะพบว่าต้น โพลีพลอยด์ มีลักษณะต่างจากต้น ดิพลอยด์ คือมีลำต้นและใบขนาดใหญ่กว่าแต่มีความสูงของต้น และความยาวของใบน้อยกว่าต้น dalloid เช่นเดียวกับ Chaicharoen and Saejew (1981) ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ พบว่า การเจริญของต้น tetraploid ช้ากว่าของดิพลอยด์ ใบของ ต้น tetraploid หนากว่า ดิพลอยด์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Kim et al. (1997) ที่ศึกษาใน *Cymbidium* sp. Silky พบว่า ใบของ ต้น tetraploid เกิดความแตกต่างจากต้น ดิพลอยด์ ในด้านรูปร่างของใบและความยาวของใบ และยังมีรายงานของ Chinachit and Sreemaung (2008) ที่ได้ศึกษาในกล้วยไม้ดินหมูกิ่ง *Eulophia andamanensis* Reichb.f. พบว่า ต้น tetraploid จะมีสัณฐานวิทยาต่างไปจากต้นปกติคือ ต้นเตี้ย ใบหนา ลำต้นกว้าง แต่ขัดแย้งกับผลการทดลองของ มลวิภา โสมานันท์ (2521) ที่ศึกษาในกล้วยไม้ลูกผสม *Aranda* พบว่า ลักษณะทั่วไปของต้น ดิพลอยด์ และ tetraploid ไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างได้ชัดเจน

สรุปผล

1) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสมะหาดที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี โดยนำแคลลัสที่ได้มาตัดแต่งให้มีขนาดเท่ากัน ย้ายลงในอาหาร 8 สูตรอาหารเพาะเลี้ยง นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง 1,500 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงในที่มืดที่สภาวะเดียวกัน การติดตามขนาดแคลลัสเฉลี่ยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ในสภาวะที่สว่างนาน 30 วัน พบว่าขนาดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสในสูตรอาหาร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.39 มิลลิเมตร) รองลงมาคือ WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.38 มิลลิเมตร) และมีค่าต่ำที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.81 มิลลิเมตร) เมื่อติดตามขนาดแคลลัสเฉลี่ยที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีต้นนาน 30 วัน พบว่ามีค่ามากที่สุดในการอาหารสูตร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (2.06 มิลลิเมตร) รองลงมาคือสูตรอาหาร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.85 มิลลิเมตร) และสูตรอาหารที่ให้ค่าต่ำที่สุดคือ WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.11 มิลลิเมตร)

2) การชักนำให้แคลลัสของมะหาดที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีเกิดเป็นยอดและรากโดยนำแคลลัสที่ได้มาตัดแต่งให้มีขนาดเท่ากัน ย้ายลงในอาหาร 8 สูตรอาหารเพาะเลี้ยง นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง 1,500 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงในที่มืดที่สภาวะเดียวกัน จากการติดตามจำนวนยอดเกิดเฉลี่ยสูงที่สุดในอาหารสูตร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (3.20) สูตรอาหารที่ให้จำนวนยอดเกิดเฉลี่ยน้อยที่สุดในสูตร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.60) และความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุดในอาหาร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (5.88 เซนติเมตร) และ WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (5.36 เซนติเมตร) สูตรอาหารที่ให้ความยาวยอดเฉลี่ยน้อยที่สุดในอาหารสูตร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (2.32 เซนติเมตร)

เมื่อติดตามจำนวนรากเฉลี่ยลักษณะของรากเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ พบว่าการเกิดรากได้ไม่แตกต่างกันมากนัก และรากมีลักษณะกลม สั้นๆ บางสูตรอาหารพบว่ารากมีลักษณะเล็ก ยาวแหลมมีสีตั้งแต่สีขาวไปจนถึงสีน้ำตาลอ่อน จำนวนรากที่เกิดเฉลี่ยสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (3.40) รองลงมาคือเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (3.20) และสูตรที่ให้

จำนวนรากเฉลี่ยน้อยที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร WPM + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (2.00)

ข้อเสนอแนะ

- 1) ควรเพิ่มเติมการศึกษาสูตรอาหารที่เป็นหน่วยควบคุม (ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช)
- 2) งานนี้ยังไม่สำเร็จ ยังขาดข้อมูลการย้ายออกปลูก และติดตามการเจริญเติบโตจนมะหาดออกลูก ซึ่งทางคณะผู้วิจัยจะตั้งเป้าเป็นแนวทางการศึกษาต่อไป
- 3) ควรศึกษาเพิ่มเติมเพื่อผลิตต้นกล้ามะหาดให้ได้ปริมาณมากและสะดวกในการนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป รวมทั้งการศึกษารเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะหาดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับที่ได้จากการเพาะเมล็ดทั้งในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติและที่ได้จากการกลายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

บรรณานุกรม

- กิตติ โพธิ์พิมะ, สุริยา ฤทธาทิพย์, และ กรวิศุทธิ์ ณ ถลาง. (2555). การแปรผันและการกลายของพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*, 22(1), 225-231.
- ไพศาล เหล่าสุวรรณ และ ปิยะดา ทิพย์ผ่อง. (2550). *หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช* (พิมพ์ครั้งที่ 8). นครราชสีมา: สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 372 หน้า.
- มลวิภา โสมานันท์. (2521). *การชักนำให้เกิดโพลีพลอยดีในกล้วยไม้แฉะแรนดาโดยใช้โคลชิซิน* [วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย]. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 81 หน้า.
- รุ่งนภา ช่างเจรจา, พงศยุทธ นวลบุญเรือง, และ สันติ ช่างเจรจา. (2556). รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์การพัฒนาพันธุ์สับปะรดเพื่อการแปรรูป (การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ). มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.
- Chaicharoen, S., & Saejew, K. (1981). Autopolyploidy in *Dendrobium phalaenopsis*. *Journal of the Science Society of Thailand*, 7, 25-32.
- Chinachit, W., & Sreemaung, S. (2008). Colchicine affecting the alteration of ploidy level in plantlets of *Eulophia andamanensis* Reichb.f. *Agricultural Science Journal*, 39(3), 275-277.
- Fahad, A. Q., & Salim, K. (2010). Mutational approach for enhancement of artemisinin in *Artemisia annual*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(17), 1714-1726.
- Kim, M. S., Kim, J. Y., & Eun, J. S. (1997). Chromosome doubling of Cymbidium hybrid with colchicines treatment in meristem culture. *American Orchid Society Bulletin*, 32, 885-887.
- Larkin, P. J., & Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for protoplast improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60, 197-214.
- Liu, S., Wang, H., Zhang, J., Fitt, B. D., Xu, Z., Evans, N., Liu, Y., Yang, W., & Guo, X. (2005). In vitro mutation and selection of doubled-haploid *Brassica napus* lines with improved resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell Reports*, 24, 133-144.
- Mujib, A. (2005). Colchicine induced morphological variants in pineapple. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 15, 27-133.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*, 25, 135-166.
- Novak, F. J., & Brunner, H. (1992). Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement. *IAEA Bulletin*, 4, 25-33.
- Sarathum, S., Hegele, M., & Nanakorn, M. (2010). Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. *European Journal of Horticultural Science*, 75(3), 123-127.

- Singh, T., Chatterjee, U., Wu, J. H., Chatterjee, B. P., & Wu, A. M. (2005). Carbohydrate recognition factors of a T_{α} (Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc α 1 $\rightarrow$ Ser/Thr) and Tn (GalNAc α 1 $\rightarrow$ Ser/Thr) specific lectin isolated from the seeds of *Artocarpus lakoocha*. *Glycobiology*, 15(1), 67-78.
- Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11, 118-131.