การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในครามฝักตรง (*Indigofera tinctoria* L.)

Polyploid Induction in 'kram phak troung' indigo (*Indigofera tinctoria* L.)

สุนทรีย์ สุรศร[1*]

Suntaree Surson[1*]

บทคัดย่อ: ต้นครามฝักตรง เป็นพืชท้องถิ่นของชาวสกลนครที่ให้สีครามจากใบ ด้วยเหตุที่ครามฝักตรงมีลักษณะใบเล็ก และเป็นพืชผสมตัวเอง และมีพันธุ์ที่ใช้ปลูกอยู่ในปัจจุบันเพียง 2 พันธุ์ จึงได้มีความพยายามในการพัฒนาของต้นครามฝักตรง (*Indigofera tinctoria* L.) พันธุ์ใหม่ ด้วยการเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้เป็นต้นโพลีพลอยด์ โดยหวังว่าจะได้ต้นครามที่มีใบ หรือต้นที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อการเพิ่มผลผลิต และเพิ่มปริมาณสารสำคัญใบครามจากการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในครามฝักตรง โดยการแช่เมล็ดครามงอกในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้นของโคลชิซินมีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดตาย ความสูง และจำนวนใบประกอบของต้นกล้าครามฝักตรงอายุ 15 วัน อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) โดยการเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซินทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดตาย ความสูง และจำนวนใบประกอบลดลง สำหรับระยะเวลาการแช่เมล็ดไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดตาย ความสูง และจำนวนใบประกอบ ต้นกล้าครามที่รอดตายหลังจากได้รับสารโคลชิซินแสดงอาการผิดปกติทุกต้น โดยแสดงอาการ ไฮโปคอทิลบวม ส่วนต้นกล้าที่เจริญจากเมล็ดที่ไม่แช่สารโคลชิซินสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าที่ปกติทั้งหมด เมื่อนำต้นกล้าที่มีลักษณะผิดปกติไปตรวจสอบด้วยเทคนิคโฟลไซโตมิตริ (Flow cytometry) พบว่า โคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกิดต้นกล้าชนิดเตตราพลอยด์มากที่สุด 75 และ 66 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่เมล็ดเป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนการแช่เมล็ดด้วยโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีสัดส่วนของต้นดิพพลอยด์ และต้นมิกโซพลอยด์จำนวนมากกว่าโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ที่ 6 ชั่วโมง เป็นโพลีพลอยด์ทั้งหมด (ต้นมิกโซพลอยด์ 33.33 เปอร์เซ็นต์ และเตตราพลอยด์ 66.66 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตามพบว่าทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ 12 ชั่วโมง ส่วนใหญ่จะมีอายุการรอดตายไม่ถึง 1 เดือน ซึ่งตายก่อนที่จะได้รับการตรวจสอบความเป็นโพลีพลอยด์ ต้นที่เหลือรอดมาได้ทั้งหมดเป็นต้นดิพพลอยด์เท่านั้น

คำสำคัญ: คราม, เตตราพลอยด์, การปรับปรุงพันธุ์โดยโพลีพลอยด์, โคลชิซิน, โฟลไซโตมิตริ

ABSTRACT: *Kram Phak Troung* or *Indigofera tinctoria* L. is Sakon Nakhon's indigenous plant. It has small leaves and is categorized as a species of self-pollinated breeding plant. Two species of *Indigofera tinctoria* L. have been grown at present. Thus, there is an attempt to develop the new kind of *Indigofera tinctoria* L. which contains more chromosomes becoming polyploidy indigo plant. This polyploidy indigo is expected to grow taller bearing bigger leaves than the indigenous plant. With higher stem and wider leaves, the polyploidy indigo can produce higher amount of its essence. Polyploid in *Indigofera tinctoria* L. is induced by immersing the germinated seed in colchicines of different concentrations (0.1%, 0.2% and 0.4%) and for a period of 6 and 12 hours. It was found that different concentrations of colchicines resulted differently and significantly in the death, height and leaflet number of the fifteen-days old *Indigofera tinctoria* L. (P<0.01).

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร อ. เมือง จ.สกลนคร 47000
Faculty of Agriculture Technology, Sakon Nakhon Rajabhat University, Sakon Nakhon, 47000 Thailand.

* Corresponding author: sun_dawn990@hotmail.com

That is the more colchicines was concentrated the more *Indigofera tinctoria* L. plants survived while their height and leaflet number decreased. However, the immersion period of the *Indigofera tinctoria* L. seedlings did not affect the survival percentage, height and leaflet number of these *Indigofera tinctoria* L. plants. Furthermore, all plants that survived demonstrated abnormal trait of swollen hypocotyls. In contrast, the seedlings which were not treated by colchicines immersion could grow normally. When using flow cytometry to inspect the abnormal plants whose hypocotyls swelled, it was revealed that 0.2% colchicine solution produced 75% tetraploid *Indigofera tinctoria* L. seedlings when they were immersed for 6 hours; it produced 66% tetraploid *Indigofera tinctoria* L. seedlings if immersed for 12 hours. The seeds immersed in 0.1% colchicine solution obtained more diploids and mixoploids than immersed in 0.2% colchicine solution. With the 0.4% colchicine solution for 6 hours' treatment, all polyploids were gained (33.33 mixoploids and 66.66 tetraploids). Nevertheless, if the seeds were immersed in 0.4% colchicine solution for a period of 12 hours, the seedlings could live less than a month and their polyploidy traits could not be examined; only the diploids of these seedlings survived.
Keywords: indigo, tetraploid, polyploidy breeding, colchicine, Flow Cytrometry

บทนำ

ต้นครามฝักตรง เป็นพืชท้องถิ่นที่ให้สีคราม ต้นคราม (Indigo) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Indigofera tinctoria* L. มีจำนวนโครโมโซม เท่ากับ 16 โดยมีโครโมโซม จากการทำ Meiotic analysis ในช่อดอกอ่อน พบว่ามี n = 8 (Ghosh et al., 2016) เป็นพืชในวงศ์ Leguminosae ต้น เป็นพุ่ม กว้าง 140 ซม. สูง 170 ซม.ใบ เป็นใบประกอบ ใบมน เรียงสลับแบบขนนก ดอก ดอกช่อออกที่ซอกใบ สีชมพู ห่างกัน ฝัก สีเขียว ตรง ไม่มีขน (มองไม่เห็น) 1 ฝัก มี 9-10 เมล็ด เมล็ด สีเหลืองฟาง 100 กรัม มี 12,800 เมล็ด พบเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อน ชอบแสงแดด ทนทานต่ออากาศร้อน ดินเค็ม และฝนหนักได้ ในประเทศไทยมักพบเป็นวัชพืชตามสวน และไหล่ทาง ซึ่งเป็นดอน โล่ง กลางแจ้ง การใช้ประโยชน์ ใช้เป็นสีย้อมผ้า โดยใช้ต้น และใบหมัก และตกตะกอนด้วยด่าง ได้เนื้อครามสีน้ำเงินเข้ม ใช้ย้อมสีผ้าฝ้าย ผ้าย้อมครามเป็นผลิตภัณฑ์ชุมชุน เป็นเอกลักษณะของจังหวัดสกลนคร และเป็นสินค้าที่มีชื่อเสียง ทำรายได้ แก่เกษตรกรผู้ผลิตผ้าย้อมคราม ในอนาคตควรได้มีการพัฒนาพันธุ์ครามที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น เพื่อส่งเสริมให้การผลิตผ้าพื้นเมืองที่เกิดจากการย้อมครามเป็นอุตสาหกรรมที่สร้างชุมชนเข้มแข็งในจังหวัดสกลนครและระดับประเทศต่อไป ปัจจุบันครามที่ใช้ย้อมผ้าในประเทศไทยมาจากต้นคราม 2 ชนิด คือ ครามฝักตรง และครามฝักงอ (*Indigofera suffruticosa*) เนื่องจากครามเป็นพืชเป็นพืชผสมตัวเอง มีดอกขนาดเล็กมาก เป็นอุปสรรคที่สำคัญในการผสมพันธุ์เพื่อสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กับพืชชนิดนี้ ทำให้การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการมาตรฐานทั่วไปเป็นสิ่งที่ทำได้ยาก ในอนาคตเมื่อสภาพแวดล้อม และอุณหภูมิของโลกเปลี่ยนแปลง โรค และแมลงชนิดใหม่เกิดขึ้น พันธุ์ที่ปลูกในปัจจุบันมีน้อยอาจสร้างปัญหาให้แก่พืชชนิดนี้อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ แนวทางหนึ่งที่จะสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรม เพื่อพัฒนาพืชชนิดนี้ คือ การสร้างพืชโพลีพลอยด์ขึ้นในต้นคราม

จากการศึกษาในพืชหลายชนิดพบว่า การสร้างพืชที่เป็นโพลีพลอยด์มีข้อได้เปรียบหลายประการ ในพืชที่เป็นโพลีพลอยด์มีลักษณะต้นใหญ่ขึ้น มีชีวมวล มากขึ้น เช่น เตตราพลอยด์ และทริพพลอยด์ ของลูกผสม Novel Shrub Willow (*Salix*) (Serapiglia et al., 2015) ใน *Centella asiatica* (L.) Urban (Thong-on et al., 2014) ในทริพพลอยด์ ลูกผสม shrub willow

(Serapiglia et al., 2014) อย่างไรก็ตาม พบว่า เตตราพลอยด์ มีขนาดใหญ่กว่าดิพพลอยด์ของมันเอง บางจีโนไทป์ และเป็นต้นเตตราพลอยด์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เช่น ใน *Echinacea purpurea* L. clone code 04 ที่เป็นเตตราพลอยด์มีผลผลิตชีวมวลของส่วนใต้ดินและส่วนที่อยู่เหนือดินสูงกว่าดิพพลอยด์ และเตตราพลอยด์ใน clone code อื่น ๆ (Chen et al., 2016) ใน P28 เตตราพลอยด์ *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen มีชีวมวลเพิ่มขึ้นมากกว่าดิพพลอยด์ทั้งในสภาพปลอดเชื้อ และสภาพนอกหลอดทดลอง ในพืชที่เป็นโพลีพลอยด์หลายชนิดพบว่า มีความต้านทานความเครียดจากสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic stress) เช่น สภาพความหนาวเย็น ความร้อน ความแห้งแล้ง ความเค็ม ความเป็นพิษของธาตุอาหารพืชบางชนิด เช่น Tan et al. (2015) ได้ชักนำให้เกิดเตตราพลอย์ในต้นส้ม (*Citrus junos* cv. Ziyang xiangcheng) เพื่อพัฒนาเป็นต้นตอส้ม (citrus rootstock) ที่มีความต้านทานต่อสภาพเครียด (stress resistance improvement) จากการศึกษาพบว่าต้นส้มเตตราพลอยด์ดังกล่าวมีการสะสมสารปฐมภูมิหลายชนิด เช่น น้ำตาลหลายชนิด (sugars) กรดอินทรีย์หลายชนิด (organic acids) กรดอะมิโนหลายชนิด (amino acids) กรดไขมันหลายชนิด (fatty acids) และสารในกลุ่มแอลกอฮอล์หลายชนิด (alcohols) ที่มีอิทธิพลต่อการต้านทานต่อสภาพเครียดของต้นส้มชนิดนี้ Zhang et al. (2015) พบว่า แอปเปิ้ลที่เป็นเตตราพลอยด์ มีความทนทานต่อความแห้งแล้งมากกว่าดิพพลอย์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Laere et al. (2011) ที่พบว่า *Spathiphyllum wallisii* ที่เป็นเตตราพลอยด์ทุกจีโนไทป์ที่ศึกษาทนทานต่อความแห้งแล้งมากกว่าต้นดิพพลอยด์ของมัน เป็นต้น นอกจากนี้พืชโพลีพลอยด์ยังมีความต้านทานต่อความเครียดที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต (biotic stress) เช่น โรค (Predieri, 2001) และแมลง ในไม้ผลหลายชนิดที่เป็นโพลีพลอยด์มีขนาดผลใหญ่ขึ้น เช่น สตรอเบอรี่ หม่อน องุ่น ไม้ผลที่มีชุดโครโมโซมเป็นทริพพลอยด์มีลักษณะไร้เมล็ด (seedless) เช่น ในส้ม แตงโม องุ่น ข้าวสาลีที่เป็นเฮกซาพลอยด์มีลักษณะเมล็ดใหญ่ขึ้น มีคุณภาพในการทำขนมปังได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า ในพืชบางชนิด ที่เป็นเตตราพลอยด์ยังมีการสะสมสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น เช่น *Tanacetum parthenium* Schulz-Bip. (Majadi et al., 2010) และ *Centella asiatica* (L.) Urban (Thong-on et al., 2014) เป็นต้น

การชักนำให้เกิดเตตราพลอยด์สามารถทำได้ 2 วิธีหลัก คือ การทำในสภาพปลอดเชื้อ และทำในห้องปฏิบัติการหรือเรือนทดลอง ส่วนใหญ่การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์มักทำได้โดยการใช้สารเคมี ซึ่งสารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์มีหลายชนิด เช่น oryzalin, trifluralin, amiprophos-methyl, N_2O gas และ colchicine (Bouvier et al., 1994; Tuyl et al. 1992; Taylor et al., 1976; Blakeslee and Avery, 1937) สำหรับประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใช้นั้นแตกต่างกัน สารที่ได้รับการยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลายและได้ผลมาก คือ โคลชิซิน โคลชิซินเป็นสารอัลคาลอยด์ (alkaloid) ที่สกัดจาก ต้น meadow saffron (*Colchicum autumnale* L.) เป็นสารยับยั้งการแบ่งเซลล์ (antimitotic) ใช้ในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ (polyploidy induction) (Planchiais et al., 2000) ในช่วงปี 1930s ได้มีการทดลองโดยใช้โคลชิซินอย่างแพร่หลาย สำหรับวิธีการในการทรีตโคลชิซิน ระดับความเข้มข้น และเวลาที่ใช้โคลชิซินในพืชนั้นแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับ วิธีการ ชนิด อายุ และชิ้นส่วนพืชที่ทำการทรีต สำหรับชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการทรีตโคลชิซิน ได้แก่ เมล็ดที่ยังไม่งอก (ungerminated seed) (Blasco et al., 2015) เมล็ดที่กำลังงอก (germinated seed) (Pleankong et al., 2010) ต้นกล้า (Majdi et al., 2010) และตาของพืช (Chakraborti et al., 1998; Abdoli et al., 2013) หลังจากการทรีตด้วยโคลชิซินแล้ว พืชจะได้รับการตรวจสอบระดับความเป็นโพลีพลอยด์ โดยตัวบ่งชี้ความเป็นโพลีพลอยด์มีหลายประการ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะปากใบ จำนวนโครโมโซม และการใช้เทคนิคโฟลไซโตมิตริ (Chakraborti et al., 1998; Pleankong et al., 2010 ; Majdi et al., 2010; Abdoli et al., 2013; Blasco et al., 2015)

สุนทรีย์ และคณะ (2559) ได้มีความพยายามในการพัฒนาโพลีพลอยด์ที่เป็นในครามงอ (*Indigofera suffruticosa*) พืชที่มีลักษณะใกล้เคียงกับครามฝักตรง โดยการชักนำด้วยการใช้สารโคลชิซิน เช่นเดียวกัน พบว่า ความเข้มข้นที่พบเป็นเตตราพลอยด์มากที่สุด คือ ทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (48.46 เปอร์เซ็นต์) ต้นครามงอโพลีพลอยด์มีความสูงลดลง แต่มีน้ำหนักใบประกอบ และพื้นที่ใบย่อยเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ต้นครามงอโพลีพลอยด์ยังไม่ได้มีการทดสอบผลผลิตในสภาพแปลงทดลอง หรือทดสอบคุณภาพในการย้อมผ้า

เนื่องจากครามงอมีขนาด และน้ำหนักใบใหญ่ขึ้น ดังนั้นจึงเกิดแนวคิดในการชักนำให้เกิดครามที่เป็นโพลีลอยด์ด้วยโคลชิซินโดยใช้เทคนิค และความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ เพื่อให้เกิดต้นครามฝักตรง (*Indigofera tinctoria* L.) ที่เป็นโพลีพลอยด์ โดยเฉพาะเป็นเตตราพลอยด์ด้วย เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาต้นครามให้มีผลผลิตใบคราม และคุณภาพการย้อมที่ดีขึ้น ต้นครามฝักตรงโพลีพลอยด์สามารถขยายพันธุ์ได้ด้วยเมล็ดต่อไป

วิธีการศึกษา

พันธุ์คราม

พันธุ์ครามที่ใช้เป็นครามฝักตรง (*Indigofera tinctoria* L.) จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพาน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในเมล็ดครามฝักตรง ทำได้โดยล้างเมล็ดครามฝักตรงในน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นฟอกล้างเมล็ดครามฝักตรงในน้ำยาล้างจานซันไลท์ เป็นเวลา 1 นาที ล้างเมล็ดด้วยน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 5 นาที และฟอกฆ่าเชื้อใน Clorox ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 10 นาที เท Clorox ทิ้งล้างด้วยน้ำกรอง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เทน้ำทิ้ง นำเมล็ดครามฝักตรงที่ฟอกล้างแล้ว มาเพาะในกระดาษเพาะ (towel paper) ที่วางบน petri dish โดยใช้เวลาเพาะ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเมล็ดครามฝักตรงงอกมาแช่ในสารละลายโคลชิซิน (colchicine) วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design (Factorial in CRD) โดยมีปัจจัย A เป็นความเข้มข้นของโคลชิซิน มี 4 ระดับ 0.0, 0.1, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ แลปัจจัย B คือ ระยะเวลาที่แช่ มี 2 ระดับ คือ 6 และ 12 ชั่วโมง โดยการทดลองประกอบด้วย 8 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ เมื่อครบเวลาการแช่นำเมล็ดครามฝักตรงงอก ลงเพาะในถาดเพาะขนาด 60 หลุม ที่บรรจุวัสดุปลูกคือพีทมอส (peat moss) จนเต็มถาดแต่ละถาด คือ 1 ซ้ำ (60 เมล็ด) เมื่อต้นกล้าครามฝักตรงอายุ 15 วัน ทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดตาย ความสูง และจำนวนใบประกอบของต้นกล้าจากแต่ละทรีตเมนต์ทุกซ้ำ (ทุกถาดเพาะ) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SAS (version 9.1) และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS version 16 การเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ของแต่ละทรีตเมนต์ใช้วิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้า

หลังจากเพาะเมล็ดครามฝักตรงงอกเป็น เวลา 15 วัน ต้นกล้าโผล่ขึ้นมาจากพีทมอสในถาดเพาะ สังเกต และจัดจำแนกต้นกล้าครามฝักตรง เป็นต้นกล้าปกติ (จาก control ที่ไม่ได้รับโคลชิซิน) กับต้นกล้าผิดปกติ (สุนทรีย์ และคณะ, 2559)

การตรวจสอบเฉพาะต้นกล้าผิดปกติด้วย Flow cytometry analysis

ต้นกล้าที่ได้รับการจำแนกว่าเป็นต้นกล้าผิดปกติ ซึ่งมีลักษณะต้นกล้างอกช้า ต้นเตี้ย ส่วนใหญ่มีเฉพาะส่วนของใบเลี้ยง และใบจริงคู่แรก มีไฮโปคอทิลบวมอ้วนสั้น ส่วนของเอพิคอทิลไม่ยืดตัว หรือมีลักษณะการยืดตัวช้า ใบจริงคู่แรกมีลักษณะหยักไม่กลมมน และมีขนาดเล็กไม่แผ่กาง ซึ่งถูกจัดจำแนกไว้แล้วข้างต้น เมื่ออายุครบ 1 เดือน ต้นกล้าผิดปกติทุกต้นจากแต่ละทรีตเมนต์จะถูกนำไปวิเคราะห์ลักษณะความเป็น

โพลีพลอยด์ด้วย Flow cytometry analysis (Surson et al., 2015

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การศึกษาการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในเมล็ดความฝักตรง โดยการเพาะในกระดาษเพาะเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้เมล็ดครามงอกหลังจากนั้นจึงนำเมล็ดงอกมาทรีตด้วยโคลชิซิน ในความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง จำนวน 8 ทรีตเมนต์ มีผลการศึกษาดังต่อไปนี้

1. เปอร์เซ็นต์การรอดตาย

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นกล้าที่อายุ 15 วัน หลังจาการได้รับโคลชิซินที่ 3 ระดับความเข้มข้น (0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่า ระดับความเข้มข้นของโคลชิซินมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดตาย อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (Table 1) ส่วนระดับเวลาการได้รับโคลชิซินไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดตาย อีกทั้งยังพบว่ามีปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของโคลชิซิน และระดับเวลาที่ได้รับโคลชิซินที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การรอดตาย โดยพบว่า ทรีตเมนต์ที่ไม่ได้รับโคลชิซินที่ระดับเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด ในทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินมีเปอร์เซ็นต์ความงอกลดลงอย่างมากต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ในทุกทรีตเมนต์ เนื่องจากโคลชิซินเป็นสารอัลคาลอยด์ ที่ขัดขวางกระบวนการไมโตซิส ใช้ในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในพืช (Planchais et al., 2000) โคลชิซินจะขัดขวางการทำงานของไมโครทูบูล (microtubule) ระหว่างการแบ่งเซลล์ ขัดขวางการเคลื่อนย้ายของโครโมโซมในระยะแอนาเฟส (anaphase) และระงับกระบวนการไซโตไคเนซิส (cytokinesis) เป็นผลให้เซลล์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มเป็นสองเท่า (Dhooghe et al., 2011)

2. ความสูง และจำนวนใบของต้นกล้า

การศึกษาความสูง และจำนวนใบประกอบของต้นกล้าที่อายุ 15 วัน หลังจาการได้รับโคลชิซินที่ 4 ระดับความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่า ระดับความเข้มข้นของโคลชิซินมีผลต่อ ความสูง และจำนวนใบประกอบอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ในลักษณะความสูง พบว่า ทรีตเมนต์ที่ไม่ได้รับโคลชิซิน (T1 และ T2) มีความสูงเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 3.79-5.27 ซม. ส่วนทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน (T3 -T8) มีความสูงเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.08–1.45 ซม. ในลักษณะจำนวนใบประกอบ พบว่า ทรีตเมนต์ที่ไม่ได้รับโคลชิซิน (T1 และ T2) มีจำนวนใบประกอบเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 3.93 - 4.73 ใบ ส่วนทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน (T3 -T8) มีจำนวนใบประกอบเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.75 – 1.66 ใบ (Table 1)

การศึกษาในครั้งนี้พบว่า ความเข้มข้น และระยะเวลาในการทรีตโคลชิซินให้กับเมล็ดครามงอกมีผลต่อความงอก ความสูง และจำนวนใบประกอบของต้นกล้า โดยทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ความงอก ความสูง และจำนวนใบลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาในหลายรายงาน พบว่า การได้รับโคลชิซินทำให้ความงอกลดลง เช่นการศึกษาของ Surson et al. (2015) พบว่า ระดับความเข้มข้นของโคลชิซินที่เพิ่มขึ้นทำให้ความงอกของส้มเขียวหวาน (Citrus reticulate Blanco) ลดลง ความสูง และจำนวนใบของต้นกล้าอายุ 1 เดือนลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาในรายงานอื่น ๆ เช่น ในเมล็ดฝ้าย (Wongpiyasatid et al., 2003) ในต้นกล้า *Hyoscyamus reticulate* L. อายุ 2 สัปดาห์ (Madani et al., 2015) ในเมล็ดของ Salvia hains (Grouh et al., 2011) ในเมล็ด *Capsicum frutescens* L. (Pleankong et al., 2010) เป็นต้น

3. ความผิดปกติของต้นกล้า

การศึกษาลักษณะของต้นกล้าที่อายุ 15 วัน หลังจากการได้รับโคลชิซินที่ 4 ระดับความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่า สามารถจำแนกลักษณะของต้นกล้าครามงอกได้เป็น 2 ลักษณะ คือ ต้นกล้าที่มีลักษณะเป็นต้นกล้าปกติ และต้นกล้าผิดปกติ โดยต้นกล้าปกติมีส่วนของไฮโปคอทิล และเอพิคอทิล ปกติ ทั้ง 2 ส่วนมีการยืดขยายยาว ลักษณะต้นสูงยาวผอม มีใบเลี้ยง 1 คู่ ใบจริง 1 - 2 คู่ คือใบจริงคู่ที่ 1 ที่เป็นใบเดี่ยว และใบจริงคู่ที่ 2

ที่เป็นใบประกอบ สีใบเขียว ส่วนต้นกล้าผิดปกติมีลักษณะต้นกล้างอกช้า ต้นเตี้ย ส่วนใหญ่มีเฉพาะใบเลี้ยงและใบจริงคู่แรก ส่วนของไฮโปคอทิล บวม อ้วนสั้น ส่วนของเอพิคอทิลไม่ยืดยาว ส่วนที่เป็นเอพิคอทิลยืดได้ช้าใช้เวลานาน ใบจริงคู่แรกมีลักษณะบิดไม่แผ่กางขยายเหมือนพวกต้นปกติ ส่วนของใบเขียวเข้ม ใบจริงคู่แรกยังมีขนาดเล็ก และยังไม่ค่อยแผ่กาง โดยจากการศึกษา พบว่า ในทรีตเมนต์ที่ไม่ได้รับโคลชิซิน (T1 และ T2) มีลักษณะเป็นต้นกล้าปกติทั้งหมด แต่ในทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน (T3-T8) มีลักษณะเป็นต้นกล้าผิดปกติทั้งหมด (**Table 2**) โดยมีลำต้นอวบอ้วน ส่วนที่เป็นเอพิคอทิลยืดได้ช้า ส่วนที่เป็นไฮโปคอทิลบวม บางต้นใบจริงคู่แรกผิดรูป และมีขนาดเล็ก (**Figure 1**) และเมื่อนำต้นกล้าจากทุกทรีตเมนต์ไปตรวจสอบด้วย Flow cytometry technique (**Figure 2**) พบว่า T1 และ T2 ซึ่งไม่ได้รับโคลชิซิน เป็นต้นกล้าที่เป็นดิพพลอยด์ทั้งหมด และต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซิน (T3-T8) ซึ่งมีลักษณะเป็นต้นกล้าผิดปกติสามารถจำแนกได้เป็นดิพพลอยด์ คือ เป็นต้นที่มีชุดโครโมโซมปกติ เป็นมิกโซพลอยด์ คือ เป็นพวกที่มีชุดโครโมโซม ที่เป็นดิพพลอยด์ปนอยู่กับเตตราพลอยด์ เป็นพวกที่เพิ่มโครโมโซมไม่สมบูรณ์ทั้งต้น และพวกสุดท้ายเป็นเตตราพลอยด์ คือ พวกที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าอย่างสมบูรณ์ (**Table 2**) ซึ่งโดยปกติการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในต้นดิพพลอยด์มีโอกาสเกิดต้นที่มีชุดโครโมโซมได้ทั้ง 3 แบบข้างต้น ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของชิ้นส่วนที่นำมาทรีตด้วยโคลชิซิน อายุของชิ้นส่วนที่นำมาทรีต วิธีการที่นำมาทรีต ชนิดของสารเคมี ความเข้มข้น และระยะเวลา จากกการศึกษาวิธีการทรีตโคลชิซินในครามฝักงอ ซึ่งเป็น พืชที่มีลักษณะใกล้เคียงกับครามฝักตรงมากที่สุด พบว่า ชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการทรีต คือ เมล็ดครามงองอกอายุ 1 วัน ความเข้มข้นของโคลชิซินที่เหมาะสม คือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (สุนทรีย์ และคณะ, 2559) ดังนั้นในการชักในให้เกิดโพลีพลอยด์ ในพืชแต่ละชนิด ควรศึกษาถึง ชิ้นส่วนพืช อายุ ตลอดจนวิธีการทรีต ชนิดของสารเคมี ความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดต้นพืชที่เป็นโพลีพลอยด์ได้ตามต้องการ

ในการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมในครามฝักตรงในครั้งนี้พบว่า ทุกทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินเกิดต้นกล้าผิดปกติขึ้นทั้งหมด คือ มีลักษณะไฮโปคอทิลบวม และสามารถงอกเจริญเติบโตได้ไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ในทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน ในทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินสูง 0.4 เปอร์เซ็นต์ มีต้นที่รอดไม่ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจสอบ พบว่า เป็นต้นที่เป็นดิพพลอยด์ อาจเป็นไปได้ว่าเมล็ดครามตรงงอกไม่สามารถทนทานต่อโคลชิซินระดับความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ได้ ส่วนต้นที่เหลือรอดมาได้อาจเป็นต้นครามฝักตรงเพียงบางต้น ซึ่งมีน้อยมากที่ทนทานต่อผลของโคลชิซินและไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม ดังนั้นหากต้องการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ขึ้นในครามฝักตรงไม่ควรใช้โคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ควรชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในครามฝักตรงด้วยระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.1-0.2 เปอร์เซ็นต์ แต่หากต้องการให้ครามฝักตรงมีชุดโครโมโซมเป็นเตตราพลอยด์ ควรใช้โคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นที่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เพราะมีต้นที่มีชุดโครโมโซมเป็นเตตราพลอยด์อยู่ในสัดส่วนที่สูง ส่วนที่เป็นต้นมิกโซพลอยด์มีอยู่น้อย ส่วนเวลาที่ใช้ในการทรีตในเมล็ดครามฝักตรงงอกควรใช้เวลา 6 ชั่วโมง ถือว่าเพียงพอต่อการชักนำให้เกิดเตตราพลอยด์ได้ในสัดส่วนที่สูง

Table 1 Percentage of survival, height of seedlings and number of leaflets of *Indigofera tinctoria* L. seedlings treated colchicine concentration at 0.0, 0.1, 0.2 and 0.4 percent for 0, 6 and 12 hours

Treatments	Percentage of survival (%)	Height of seedlings (cm)	Number of compound leaf/plant
Colchicine concentration (%)			
0.0	60.83[a]	4.53[a]	4.33[a]
0.1	7.71[b]	1.23[b]	1.58[b]
0.2	7.92[b]	1.34[b]	1.02[b]
0.4	3.54[b]	1.11[b]	0.81[b]
P-value	**	**	**
Treatment duration (hr)			
6	18.75	2.24	2.00
12	21.25	1.86	1.87
	ns	ns	ns
Colchicine concentration x Treatment duration			
T1 (0.0,6)	52.08 ± 10.40[1/]	5.27 ± 0.74	4.73 ± 0.25
T2 (0.0,12)	69.58 ± 7.25	3.79 ± 0.26	3.93 ± 0.05
T3 (0.1,6)	9.17 ± 7.99	1.13 ± 0.75	1.50 ± 1.00
T4 (0.1,12)	6.25 ± 4.98	1.34 ± 0.92	1.66 ± 1.27
T5 (0.2,6)	8.75 ± 8.86	1.45 ± 0.52	0.91 ± 0.67
T6 (0.2,12)	7.08 ± 2.85	1.23 ± 0.57	1.14 ± 0.59
T7 (0.4,6)	5.00 ± 2.72	1.13 ± 0.56	0.88 ± 0.83
T8 (0.4,12)	2.09 ± 2.10	1.08 ± 0.72	0.75 ± 1.50
P-value	**	ns	ns
cv (%)	24.55	30.89	47.23

a, b Mean values in the same column followed by different superscripts are statistically different when compared using Duncan's Multiple Range Test

** Statistically significant difference at 99% confidence level.

ns No statistically significant difference [1/] standard error (SE)

Table 2 Abnormal seedling of *Indigofera tinctoria* L. at 15 days after treated with colchicine concentration at 0.0, 0.1, 0.2 and 0.4 percent for 0, 6 and 12 hours

Treatments	Colchicine concentration (%)	Treatment duration (hr)	Abnormal seedling (%)
T1	0.0	6	0.00
T2	0.0	12	0.00
T3	0.1	6	100.00
T4	0.1	12	100.00
T5	0.2	6	100.00
T6	0.2	12	100.00
T7	0.4	6	100.00
T8	0.4	12	100.00

Table 3 Verification of polyploidy level of abnormal *Indigofera tinctoria* L. seedling at 1 month after treated with colchicine concentration at 0.0, 0.1, 0.2 and 0.4 percent for 0, 6 and 12 hours

Treatments	Colchicine concentration (%)	Treatment duration (hr)	Diploid plant (%)	Mixoploid plant (%)	Tetraploid plant (%)
T1	0.0	6	100.00	0.00	0.00
T2	0.0	12	100.00	0.00	0.00
T3	0.1	6	33.33	16.66	50.00
T4	0.1	12	16.66	50.00	33.33
T5	0.2	6	18.75	6.25	75.00
T6	0.2	12	33.33	0.00	66.66
T7	0.4	6	0.00	33.33	66.66
T8	0.4	12	100	0.00	0.00

Figure 1 Characteristic of *Indigofera tinctoria* L. at 15 days, normal seedling (left) and abnormal seedling (right)

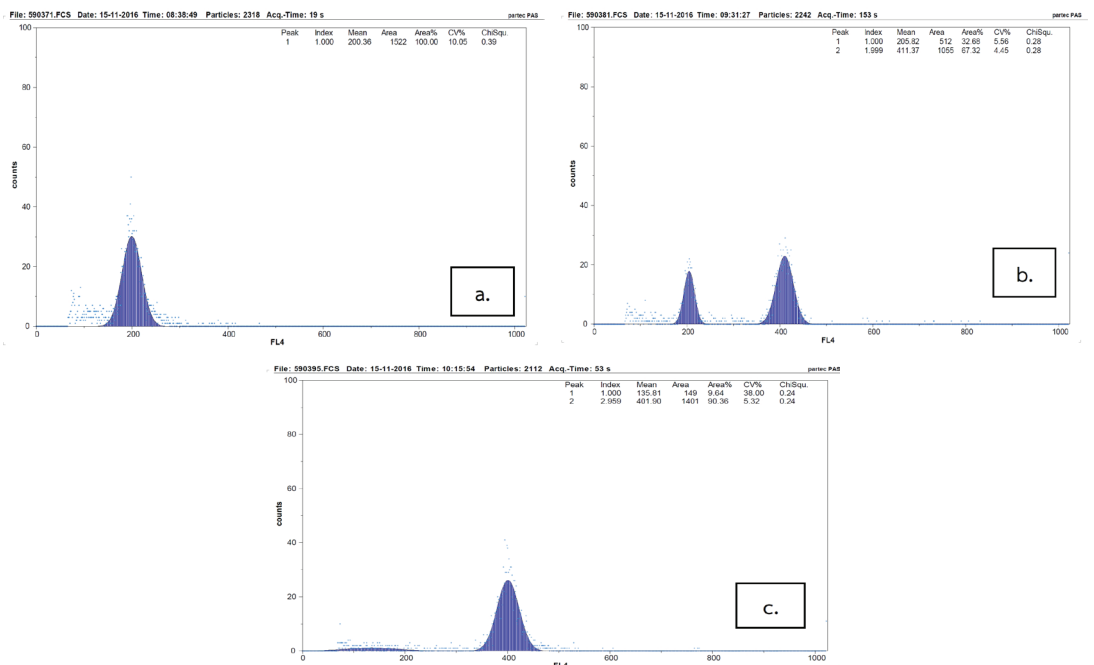

Figure 2 Flow cytometric analysis on DNA contents of “kram phak troung” (*Indigofera tinctoria* L.) diploid (a), mixoploid (b) and tetraploid (c)

สรุป

การศึกษาเพื่อกรรมวิธีที่เหมาะสมที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นครามฝักตรงที่เป็นโพลีพลอยด์ โดยการแช่เมล็ดครามฝักตรงงอกในโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่า ทุกทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ และต้นกล้าที่งอกเป็นต้นกล้าผิดปกติเกิดขึ้น 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบต้นกล้าผิดปกติ พบว่า เป็นต้นดิพพลอยด์เป็นส่วนน้อย โดยส่วนใหญ่เป็นต้นมิกโซพลอยด์และต้นเตตราพลอยด์ เมื่อพิจารณาในแต่ละทรีตเมนต์ พบว่า ทรีตเมนต์ที่ให้ต้นเตตราพลอยด์สูงสุด (75 เปอร์เซ็นต์) มีมิกโซพลอยด์ (6.25 เปอร์เซ็นต์) และดิพพลอยด์ (18.75 เปอร์เซ็นต์) อยู่น้อย คือ ทรีตเมนต์ ที่ได้รับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร และสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนครที่ให้การสนับสนุน และให้ความอนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ เพื่อการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สุนทรีย์ สุรศร, ศุภสิทธิ์ สิทธาพานิช และณัฐพงษ์ วงษ์มา. 2559. รายงานการวิจัยการเพิ่มจำนวนโครโมโซม “ครามงอ” (*Indigofera suffruticosa*) โดยใช้การใช้โคลชิซินเพื่อการสนับสนุนภูมิปัญญาของจังหวัดสกลนคร สกลนคร: คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร.

Abdoli, M., A. Moieni, and H.N. Badi. 2013. Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicines-induced tetraploid plants of *Echinacea purpurea* (L.). Axta Physiol Plant. 35: 2075-2083.

Blakeslee A. F., and A. G. Avery. 1937. Method of inducing doubling of chromosome in plants by treatment with colchicine. J. Herd. 28: 393-411.

Blasco, M., M.L. Badenes, and M.M. Naval. 2015. Colchicine-induced polyploidy in loqouat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). Plant Cell Tiss Organ Cult. 120: 453-461.

Bouvier, L., F.R. Fillon, and Y. Lespinasse. 1994. Oryzalin as efficient and cytological characters of triploid pineapples. Cytologia. 4: 248-256.

Chakraborti, S.P., K. Vijayan, B. N. Roy, and S. M. H. Qadri. 1998. In vitro induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). Plant Cell Reports. 17: 799–803.

Chen, R., W. Jiang, Q. Li X., Li X. Chen, Y. Yang, and H. Wu. 2016. Comparison of seven colchicines-induced tetraploid clones with their original diploid clones in purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). Euphytica. 207: 387-399.

Dhooghe, E., K. V. Laere, T. Eeckhaut, L. Leus, and J. Van Huylenbroeck. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. Plant Cell Tiss Organ Cult. 104: 359–373.

Ghosh, B., A.K. Datta, A. Mandal, D. Das, and D.V. Kumbhakar. 2016. Meiotic Configurations and Secondary Chromosome Associations in *Indigofera tinctoria* L. (Family: Fabaceae). Cytologia. 81: 291–294.

Grouh, M.S.H., H. Meftahizade, N. Lotfi, V. Rahimi, and B. Baniasadi. 2011. Doubling the chromosome number of Salvia hains using colchicines : Evaluation of morphological traits of recovered plants. Journal of Medicinal Plants Research. 5: 4892-4898.

Laere, K.V., S.C. Franca, H. Vansteenkiste, J.V. Huylenbroeck, K. Steppe, and M.V. Labeke. 2011. Influence of ploidy level on morphology, growth and drought susceptibility in *Spathiphyllum wallisii*. Acta Physiol Plant. 33: 1149–1156.

Madani, H., B. Hosseini, E. Dehghan, and E. Rezaei-chiyaneh. 2015. Enhanced production of scopolamine in induced autotetraploid plant of *Hyoscyamus reticulates* L. Acta physiol Plant. 37: 55.

Majdi, M., G. Karimzadeh, M.A. Malboobi, R. Omidbaigi, and G. Mirzaghaderi. 2010. Induction of tetraploidy to Feverfew (*Tanacetum parthenium* Schulz-Bip) : morphological, physiological, cytological, and phytochemical changes. Hortscience. 45: 16-21.

Planchiais S. N. Glab, D. Inze, and C. Bergonioux. 2000. Chemical inhibitors : a tool for plant cell cycle studies. FEBS Lell. 476: 78-83.

Pleankong, P., P. Suksa-Ard, and S. Wannakrairoj. 2010. Induction polyploidy of *Capsicum frutescens* L. by colchicines. Agricultural Sci. J. 41: 181-184.

Predieri. S. 2001. Mutation induced and tissue culture in improving fruits. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 64: 185-210.

Serapiglia, M..J., F.E. Gouker, J.F. Hart, F. Unda, S.D. Mansfield, A.J. Stipanovic, and L.B. Smart. 2015. Ploidy Level Affects Important Biomass Traits of Novel Shrub Willow (*Salix*) Hybrids. Bioenerg. Res. 8: 259–269

Serapiglia, M.J., F.G. Gouker, and L.B. Smart. 2014. Early selection of novel triploid hybrids of shrub willow with improved biomass yield relative to diploids. BMC Plant Biology. 14: 74.

Surson, S., S. Sitthaphanit, and N. Wongma. 2015. In vivo induction of tetraploid in tangerine citrus plant (*Citrus reticulata* Blanco) with the use colchicines. Pakistan Journal of Biological Sciences. 18: 37-41.

Tan, H.T., W. Liang, J. Long, X. Wu, H. Zhang, and W. Guo. 2015. Comparative metabolic and transcriptional analysis of a doubled diploid and its diploid citrus rootstock (*C. junos* cv. Ziyang xiangcheng) suggests its potential value for stress resistance improvement. BMC Plant Biology. 15: 89.

Taylor, N. L., K. H. Anderson, K. H. Wuesenberry, and C. Watson. 1976. Doubling the chromosome number of trifolium species using nitrus oxide. Crop Sci. 16: 516-518.

Thong-on, W., P. Arimatsu, S. Pitiporn, N. Soonthronchareonnon, and S. Prathanturarug. 2014. Field evaluation of in vitro-induced tetraploid and diploid *Centella asiatica* (L.) Urban. J. Nat Med. 68: 267-273.

Tuyl, J.M.V., B. Meijer, and M.P. Van Dien. 1992. The use of oryzalin as alternative for colchicine in *in vitro* chromosome doubling of Liium and Nerine. Acta Hort. 325: 625-629.

Wongpiyasatid, A., P. Hormchan, and N. Rattanadilok. 2003. Preliminary test induction in cotton (*Gossypium arboretum*) using colchicines treatment. Kasetsart J. (Nat. Sci.). 37: 27-32.

Zhang, F., H. Xue, X. Lu, B. Zhang, F. Wang, Y. Ma, and Z. Zhang. 2015. Autotetraploidization enhances drought stress tolerance in two apple cultivars. Trees. 29: 1773–1780.