รายงานการวิจัย

เรื่อง

การปรับปรุงพันธุ์หน้าวัวเพื่อการตัดดอก

Anthurium Breeding for Cut Flower

โดย

วัชรินทร์ ซุ้นสุวรรณ

เสมอใจ ชื่นจิตต์

จำเริญ ยืนยงสวัสดิ์

สมปอง เตชะโต

อรพรรณ พูนทอง

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

สงขลา

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	4
บทที่ 1	
บทนำ	5
บทที่ 2 การปรับปรุงพันธุ์หน้าวัวเพื่อการตัดดอก	24
การปรับปรุงพันธุ์หน้าวัวโดยวิธีการผสม	26
การรวบรวมพันธุ์	26
การผสมพันธุ์	26
การเลี้ยงอนุบาล	26
การดูแลรักษา	27
การบันทึกข้อมูล และเกณฑ์ในการคัดเลือกหน้าวัวพันธุ์ดี	28
ผล	
การผสมพันธุ์หน้าวัว	29
การเพาะเมล็ดหน้าวัวลูกผสม	32
การเจริญเติบโตของหน้าวัวลูกผสม	34
บทที่ 3 การทดสอบความต้านทานโรคใบไหม้	38
ตอนที่ 1 การทดสอบความต้านทานโรคใบไหม้	39
ตอนที่ 2 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช	40
ตอนที่ 3 การศึกษาระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในหน้าวัว 6 สายพันธุ์ ที่ใช้เป็นพ่อและแม่พันธุ์ในการผสมเกสร	42
ผล	
ตอนที่ 1 การทดสอบความต้านทานโรคใบไหม้	43
ตอนที่ 2 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคที่เรียสาเหตุโรคพืช	46
ตอนที่ 3 การศึกษาระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในหน้าวัว 6 สายพันธุ์ ที่ใช้เป็นพ่อและแม่พันธุ์ในการผสมเกสร	50

บทที่ 4 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้โคลชิซินและเอทธิลมีเทนซัลโฟเนต 56
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ
การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้โคลชิซิน 57
การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) 59
ผล
การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้โคลชิซิน 60
การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) 68
บทที่ 5 วิจารณ์ 76
บทที่ 6 เอกสารอ้างอิง 83
ภาคผนวก 90

บทคัดย่อ

จากการรวบรวมพันธุ์หน้าวัวจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งพันธุ์ต่างประเทศ พันธุ์พื้นเมืองของไทย และพันธุ์ลูกผสมในประเทศไทย จำนวน 27 พันธุ์ คัดเลือกพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคใบไหม้สูงทำการผสมเกสรระหว่างในช่วงเวลา 8.00-11.00 น. ในระหว่างปี พ.ศ. 2546-2550 พบว่า การผสมพันธุ์ในช่วง 2 ปีแรก (2546-2547) ให้การผสมติดในแต่ละคู่ผสมอยู่ในช่วง 40-100% ในช่วงปีถัดมาการผสมติดในแต่ละคู่ผสมเพิ่มสูงมากขึ้นเกือบ 100% ในทุกคู่ผสม แม้ว่าสามารถที่จะสร้างลูกผสมในแต่ละพันธุ์เมื่อทำการเพาะเมล็ดคู่ผสม พบว่า บางคู่ผสมไม่งอกเลย เช่น Spirit x Sonate Acropolis x Acropolis Acropolis x Amingo เป็นต้น คู่ผสม Florentino x Lady Jane Florentino x Mumuhara Rabido x Figo และ Figo x Mumuhara ให้ดอกหลังปลูก 2 ปี 7-9 เดือน สีของจาน และปลีดอกมีการกระจายตั้งแต่สีแดง ชมพู จนถึงสีเขียว จากการศึกษาระดับความรุนแรงของการเกิดโรคใบไหม้จากเชื้อสาเหตุ *Xanthomonas axonopodis pv. dieffenbachiae* ในหน้าวัว 9 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ Calipso มีความรุนแรงของการเกิดโรคต่ำสุด 3.73% ส่วนสายพันธุ์ Alexis มีความรุนแรงของการเกิดโรคมากกว่าหน้าวัวสายพันธุ์อื่น ๆ ถึงร้อยละ 18.02 เมื่อตรวจสอบการต้านทานโรคของคู่ผสมต่าง ๆ ที่ได้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีความต้านทานสูง ปานกลาง และต่ำ พันธุ์พื้นเมืองไทยที่ต้านทานต่อโรคในระดับสูงคือ พันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต ดังนั้นคู่ผสมที่เกิดจากพ่อแม่พันธุ์ที่เป็น Rabido Calipso และเปลวเทียนภูเก็ตให้ลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้จากเชื้อสาเหตุข้างต้นด้วย

การชักนำการกลายพันธุ์ในหน้าวัวเพื่อปรับปรุงพันธุ์หน้าวัวตัดดอกใช้สารเคมี 2 ชนิดคือ โคลชิซิน และเอทธิลมีเทนซัลโฟเนต สำหรับโคลชิซินใช้ชิ้นส่วนข้อของยอดรวมที่ชักนำในหลอดทดลองมาจุ่มแช่ ส่วนเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตใช้โนดูลาแคลลัส จากการศึกษา พบว่า ความเข้มข้นของโคลชิซินที่ส่งผลให้ชิ้นส่วนข้อหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ที่เป็นตัวแทน ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 0.078-0.088 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นที่ใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) เมื่อตรวจสอบจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก พบว่า พันธุ์ Amingoให้การเพิ่มชุดโครโมโซมสูงสุด 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพันธุ์สปิริต และพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต ให้เปอร์เซ็นต์การเพิ่มชุดโครโมโซมเป็นสองชุดเท่ากัน 10 เปอร์เซ็นต์ คาดว่าต้นที่มีการเพิ่มชุดโครโมโซมอาจมีดอกที่มีขนาดใหญ่กว่าเดิม ซึ่งขณะนี้กำลังปลูกทดสอบในแปลงปลูก เมื่อพิจารณาความเข้มข้นเอทธิลมีเทนซัลโฟเนต ที่ให้การรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง พบว่า หน้าวัวพันธุ์ Spirit มีค่า LD50 ต่ำสุด 0.68% รองลงมาคือ หน้าวัวพันธุ์ Amingo (1.02%) และพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต

(1.08%) ตามลำดับ หลังจากย้ายต้นกล้าที่ได้จากการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยเอทธิลมีเทนซัลโฟเนต ไปปลูกและดูแลรักษาในเรือนซาแลนเป็นเวลา 1 ปี พบว่า พันธุ์Amingoที่ผ่านกระบวนการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ออกดอกจำนวน 3 ต้น จาก 5 ต้น ในจำนวนนี้พบดอกที่มีลักษณะผิดปกติ 2 ดอก คือ ดอกมีลักษณะบิดเบี้ยว ดอกมีสีซีด อีกดอกมีสีดอกปกติแต่ไม่มีปลีดอก

Abstract

Twenty seven cultivars of anthurium were collected from indigenous and exogenous Thailand in order to produce hybrid for disease resistance. Crossing among those cultivars was carried out at 8:00-11:00 a.m. during 2003 to 2007. In the first two year percentage of seed setting was ranging from 40 to 100 while th latter year the percentage reached 100 in all crosses. The seeds of some crosses, Spirit x Sonate, Acropolis x Acropolis and Acropolis x Amingo, could not be germinated. Florentino x Lady Jane, Florentino x Mumuhara, Rabido x Figo and Figo x Mumuhara bloomed after 2 year and 7-9 months. The color of flowers (spathe and apadix) scattered from red, pink to green. In case of disease resistance, Calipso was attacked by *Xanthomonas axonopodis pv. Dieffenbachiae* at the lowest rate of 3.73% whereas Alexis showed the highest virulent at 18.02%. Verification of disease resistance from various crosses resulted in 3 categories; high, medium and low resistance. Indigenous cultivars; Plewthien Phuket, showed highly resistant to the disease leaded to the hybrid between Rabido or Calipso and Plewthien Phuket had highly resistant to the disease as well.

In vitro mutagenesis using colchicines and ethylmethane sulfonate (EMS) were evaluated. The results revealed that colchicines at concentration of 0.048-0.088% (0.1% for 24 h) caused the decrement of survival rate of explant to 50%. Twenty and 10% of treated plants (for cv. Spirit and Plewthien Phuket, respectively) showed the duplication of chromosomes. Those plants are growing in the field for evaluation of morphological characters. For EMS, concentration at 0.068, 1.02 and 1.08% gave LD50 in Spirit, Amingo and Plewthien Phuket, respectively. After transfer EMS-treated plants to field for 1 year three out of five plants of Amingo started blooming. Abnormalities in terms of twisted and pale color of spathe and flower without spadix were found.

บทที่ 1
บทนำ

หน้าวัว (*Anthurium* spp.) อยู่ในสกุล *Anthurium* วงค์ Araceae มีชื่อสามัญ Famingo flower (วชิรพงค์, 2545) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ลำต้นตรงค่อนไปทางไม้เลื้อย ลำต้นมียอดเดียวและแตกหน่อได้ เมื่อโตขึ้นเรื่อยๆ จะเกิดรากบริเวณลำต้น ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ (วิเชษฐ, 2540) มีหลายลักษณะได้แก่ เปลวเทียนหรือทิวลิป (Tulip) โดยจานรองดอกและปลีมีลักษณะตั้งขึ้นในแนวเดียวกับก้านดอกไม่มีร่องน้ำตา เช่น พันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต (สีชมพู ปลีชมพูอ่อน) เป็นต้น โอบาเกะ (Obake) มีขนาดดอก สี และรูปร่างหลากหลาย จานรองดอกมีตั้งแต่สองสีในดอกเดียวกัน เช่น พันธุ์ Amingo (สีแดง ขอบเขียว ปลี เหลืองปลายเขียว) เป็นต้น และ มีลักษณะดอกปกติเหมือนทั่วไป(Standard) จานรองดอกมักมีสีเดียว เช่น พันธุ์สปิริต (ชมพู ปลีเหลือง) เป็นต้น (โอฬาร และเศรษฐพงศ์, 2544) หน้าวัวที่ปลูกมีทั้งชนิดไม้ตัดดอกและไม้กระถาง (วชิรพงศ์, 2545) หน้าวัวจัดเป็นไม้ตัดดอกที่มีราคาค่อนข้างแพง จึงมีการปลูกเลี้ยงหน้าวัวเพิ่มขึ้น มูลค่าตลาดของหน้าวัวมีประมาณ 500 ล้านบาทเป็นอันดับสองรองจากกล้วยไม้ พันธุ์ที่ใช้ปลูกมีทั้งนำเข้าจากต่างประเทศ และพันธุ์ในประเทศ จากการศึกษาโครโมโซมในการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของหน้าวัว 11 สายพันธุ์ พบว่าทั้ง 11 สายพันธุ์มีโครโมโซม $2n = 2x = 30$ จึงอาจคาดได้ว่าหน้าวัวสายพันธุ์อื่นๆ น่าจะมีโครโมโซมเท่ากัน จึงสามารถผสมระหว่างพันธุ์ต่าง ๆ ได้ (ปรานอม, 2517) ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์หน้าวัวให้ได้สายพันธุ์ที่เหมาะสมกับสภาพการปลูกของไทยอาจทำให้ประเทศไทยสามารถส่งออกพันธุ์ใหม่ ๆ ไปยังต่างประเทศได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังเป็นการทดแทนการนำเข้า (กาญจนา และสุภาภรณ์, 2546) หน้าวัวสามารถปลูกได้ทุกภาค แต่ต้องเลือกพันธุ์ที่เหมาะสมสามารถทนทานต่อสภาพพื้นที่นั้น ๆ ได้ สภาพอุณหภูมิต้องไม่ต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส และต้องไม่เกิน 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่างกันมีผลทำให้ขนาดดอกและสีสันของดอกแตกต่างกันได้ ราคาดอกหน้าวัวในไทยยังไม่แน่นอน แต่จัดเป็นไม้ดอกที่มีราคาสูงตลอดปีชนิดหนึ่ง ราคามักขึ้นอยู่กับขนาดดอก ดอกขนาดใหญ่จานรองดอกกว้างประมาณ 7-9 เซนติเมตร ราคาอยู่ที่ 50 บาทต่อดอก ขนาดรองลงมา 5-6 เซนติเมตร ราคาประมาณ 30-35 บาทต่อดอก และขนาดดอก 4-5 เซนติเมตร ราคาประมาณ 20-25 บาทต่อดอก ดอกขนาดเล็กราคาประมาณ 10-15 บาท (พีระพงษ์, 2545)

โรคและแมลงที่สำคัญในหน้าวัว

หน้าวัวเป็นพืชที่มีปัญหาทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย และแมลงหลายชนิดแมลงที่เข้าทำลายส่วนใหญ่เป็นแมลงปากดูดซึ่งมีลำตัวเล็กมาก การสังเกตตัวแมลงทำได้ยากจึงควรสังเกตรอยดำแทน เนื่องจากแมลงปากดูดขับถ่ายน้ำหวานออกมาเป็นอาหารให้ราดำใช้เพื่อการเจริญเติบโตจึงมองเห็นสีดำปรากฏบนส่วนต่าง ๆ ของต้นหน้าวัว

ชนิดของโรค แมลง และสัตว์ศัตรูพืชที่สำคัญในการผลิตหน้าวัวและคำแนะนำในการป้องกันกำจัด

1. โรคของหน้าวัว

1.1 โรคเน่าดำ หรือโรคใบแห้ง (Black rot หรือ Leaf blight)

สาเหตุ เกิดจากเชื้อรา *Phytopthora parasitica* และ *P. palmivora*

ลักษณะการทำลาย แรกเริ่มที่ใบจะปรากฏเป็นแผลฉ่ำน้ำเล็กๆ สีเขียวหม่น เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 ม.ม.ต่อมาลุกลามกลายเป็นแผลเน่าสีน้ำตาลหรือแผลเน่าแห้ง ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ ถ้าในฤดูฝน ประกอบกับเครื่องปลูกที่ค่อนข้างชื้นแฉะ แผลที่เกิดจะเน่าลุกลามอย่างรวดเร็ว ถ้าในฤดูหนาวอากาศค่อนข้างแห้ง แผลจะแห้งสีน้ำตาล และกรอบยุบตัวบุ๋มลึกลงไปจากผิวใบ ขอบแผลรูปร่างไม่แน่นอน แผลขยายได้ช้ากว่าส่วนของก้านใบ จานรองดอก ปลี ก้านดอก หน่ออ่อน หรือต้นกล้า และส่วนของต้นที่ย้ายปลูกใหม่ เชื้อสามารถเข้าทำลายได้ง่าย เกิดอาการเช่นเดียวกับที่เกิดบนส่วนใบ

สภาพที่เหมาะสมในการระบาด วัสดุปลูก และภายในโรงเรือนชื้นแฉะ การระบายน้ำและอากาศไม่ดี ความชื้นในโรงเรือนสูง โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝน

การป้องกันกำจัด

1.ปรับสภาพโรงเรือนอย่าให้ชื้นแฉะ ให้อากาศถ่ายเทได้สะดวก ไม่อบอ้าว

2.ควรตัดแต่งใบ ไม่ให้ซ้อนทับกันทำให้แสงแดดส่องไม่ทั่วถึง เกิดความชื้นสูงบริเวณต้นได้ง่าย เหมาะต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ

3.แยกกระถาง หรือถอนแยกต้นที่เป็นโรคออกจากโรงเรือน เพื่อรักษา หรือเผาทำลาย

4.เมื่อโรคเริ่มเข้าทำลาย ควรงดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนชั่วคราว เพราะจะทำให้ต้นพืชอ่อนแอมากขึ้น ควรเพิ่มปุ๋ยที่มีธาตุฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมจะช่วยทำให้เนื้อเยื่อพืชแข็งแรง เพิ่มความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ

5.ใช้สารป้องกันและกำจัดเชื้อรา โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝน เช่น เมตตาแล็กซิล ฟอสเอทธิล อลูมิเนียม ฟอสฟอรัสแอซิด อ๊อกซาไดซิล แมนโคเซป อิทริไดอะโซล คาร์เบนดาซิม

1.2 โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose)

สาเหตุ เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Sacc.*

ลักษณะการทำลาย อาการเริ่มแรกจะเห็นจุดสีน้ำตาลเล็กๆ บนปลีดอกภายใต้ความชื้นสูง จุดจะขยายใหญ่ขึ้นตามรูปทรงเหลี่ยมของดอกย่อย และอาจลุกลามทำให้ปลีดอกเน่า อาการที่ใบขอบแผลค่อนข้างกลมรูปร่างแน่นอน ขอบแผลสีน้ำตาลและรอบแผลเห็นสีเหลืองชัดเจน เนื้อเยื่อตรงกลางแผลแห้งเป็นสีน้ำตาล มีเชื้อราเป็นจุดดำเล็กๆ ฝังเรียงเป็นวงซ้อนกัน ถ้าอากาศชื้นอาจพบกลุ่มเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราเป็นหยดสีส้มอ่อนๆ บนจุดดำเหล่านั้น (ภาพที่ 1)

สภาพที่เหมาะสมในการระบาด อุณหภูมิสูง ความชื้นสูง และหากพรางแสงไม่เหมาะสม ใบหน้าวัวถูกแดดจัดจนเกิดอาการไหม้ (sun burn) จะทำให้ใบหน้าวัวอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุได้ดียิ่งขึ้น

การป้องกันกำจัด

1. แยกต้นที่เป็นโรคออกไปจากโรงเรือนเพื่อรักษา หรือ เผาทำลาย

2.ในช่วงฤดูฝนฉีดพ่นด้วยสารป้องกันและกำจัดเชื้อราเป็นระยะ ๆ (ยกเว้นสารจำพวกกำมะถัน ซึ่งไม่ได้ผลในการป้องกัน) เช่น ไซโปรโคนาโซล (อัลโต) แมนโคเซ็บ คาร์เบนดาซิม คลอโรทาโลนิล โดยฉีดพ่นทุก 15 วันอย่างสม่ำเสมอจะช่วยควบคุมโรคนี้ได้ อย่างไรก็ตามการใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีป้องกันที่ดีที่สุด

ภาพที่ 1 ลักษณะของโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อราเข้าทำลายที่ดอก

1.3 โรครากเน่า (Root rot) แบ่งออกเป็น

1.3.1 โรครากเน่า สาเหตุเกิดจากเชื้อเห็ด *Marasmiellus sp.*

ลักษณะการทำลาย ใบล่างเหลือง และขอบใบแห้งเล็กน้อย และลุกลามขึ้นไปสู่ใบแก่หรือใบอ่อน ใบหลุดร่วงเร็วกว่าปกติ ต้นไม่สมบูรณ์ออกดอกน้อยบริเวณโคนต้นหรือรากเน่าผุเปื่อยเป็นสีน้ำตาล จะสังเกตเห็นเส้นใยหยาบๆ สีขาวของเชื้อราเกาะเป็นกลุ่มบนวัสดุปลูก เมื่อความชื้นสูงเส้นใยดังกล่าวจะรวมกันกลายเป็นดอกเห็ดขนาดเล็ก มีสีขาวอมเทา เส้นผ่าศูนย์กลางของดอกเห็ดประมาณ 0.5-2 ซ.ม.

สภาพที่เหมาะสมในการระบาด สภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูง ภายในโรงเรือนชื้นแฉะ

การป้องกันกำจัด

1. แยกต้นที่เป็นโรคออกไปไว้นอกโรงเรือน ตัดเอาเส้นใยสีขาวออกให้มากที่สุดหรือเฉือนรากเน่าทิ้งเสีย แล้วจุ่มน้ำยาป้องกันกำจัดเชื้อราประมาณ 5 นาที หรือแช่น้ำยาคลอรอกซ์ 1: 10 ส่วน เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วนำไปปลูกใหม่

2. หากเป็นมากไม่สามารถปฏิบัติดังกล่าวได้ ให้ใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดเชื้อรา ราดลงไปที่วัสดุปลูก ติดต่อกัน 4-5 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 5-7 วัน เพื่อฆ่าเชื้อให้หมดสิ้นไป หากปลูกในกระถาง ก้นกระถางหรือพื้นที่วางกระถางให้ใช้น้ำยาฟอร์มาลีน 1 : 40 ส่วน รดให้ทั่วกระถางถ้าจะใช้ใหม่ให้แช่น้ำยาฟอร์มาลีนประมาณ 1 ชั่วโมง

1.3.2 โรครากเน่า สาเหตุเกิดจากเชื้อรา เช่น *Phythium splenden, Calonectria crotalariae, Rhizoctonia* sp. และ *Fusarium* sp. ซึ่งเชื้อเหล่านี้ไม่ใช่สาเหตุหลัก แต่เกิดเมื่อมีปัจจัยภายนอกหนึ่งหรือมากกว่าที่เป็นสาเหตุหลัก

ลักษณะการทำลาย ต้นมีความสูงลดลง ใบและดอกเล็ก ใบและดอกไม่มีความมันวาว และไม่แข็งแรง ระดับความเสียหายของรากมีหลายระดับ ในบางกรณีรากทั้งหมดที่อยู่ในเครื่องปลูกจะเน่า และส่งกลิ่นเหม็น ซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายระยะที่สองของเชื้อแบคทีเรีย

สภาพที่เหมาะสมในการระบาด การระบายน้ำไม่ดี สาเหตุหลักจากการที่วัสดุปลูกผุเปื่อยและยุบตัวลง วัสดุปลูกที่อุ้มน้ำมากเกินไป วัสดุปลูกตื้น วัสดุปลูกเดิมอาจติดมากับรากต้นกล้าซึ่งอุ้มความชื้นได้มากกว่าวัสดุปลูกใหม่ ทำให้ความชื้นในบริเวณนั้นมากเกินไป และทำให้รากเน่าได้ในที่สุด รากอาจเสียหายจากปุ๋ย หรือสารเคมีที่ให้ หรือจากไส้เดือนฝอย

การป้องกันกำจัด

1.จัดการให้วัสดุปลูกมีการระบายน้ำได้ดีหลีกเลี่ยงการใช้ปุ๋ยสลายตัวช้าแต่เพียงอย่างเดียวโดยเฉพาะในฤดูแล้งจะมีปุ๋ยสะสมมากเกินไปเป็นอันตรายต่อราก ปรับความเป็นกรด ด่างของวัสดุปลูกให้เหมาะสม (5.5-6.5)

2.การใช้สารป้องกันและกำจัดโรครากเน่า ได้แก่ เมตตาแล็กซิล ฟอสเอ็ทธิล อลูมิเนียม คาร์เบน-ดาซิม

1.4 โรคใบไหม้ (Anthurium blight)

สาเหตุ เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. Dieffenbachiae (ภาพที่2)

ลักษณะการทำลาย เชื้อจะเริ่มเข้าบริเวณขอบ และใต้ใบ (บริเวณที่มีปากใบเป็นจำนวนมาก) ทำให้เกิดจุดฉ่ำน้ำเล็ก ๆ ไม่มีรูปร่างที่แน่นอน กระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งอาการจะเด่นชัดด้านหลังใบ บริเวณรอบรอยแผลจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและตายในที่สุด มักจะเห็นแถบสีเหลืองสดกั้นระหว่างเนื้อเยื่อที่ตายสีน้ำตาลและเนื้อใบปกติ หากใบที่เป็นโรคไม่ถูกตัดทิ้งในระยะเริ่มต้น เชื้อแบคทีเรียจะแพร่กระจายไปทั้งต้นพืชโดยผ่านทางท่อน้ำและอาหาร อาการต่อมาที่พบคือใบแก่จะเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองด้านๆ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียไปอุดท่อน้ำและอาหาร เมื่อผ่าตามขวางจะเห็นท่อน้ำท่ออาหารเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล และทำให้ก้านใบ และก้านดอกหลุดร่วงได้ง่าย (ภาพที่ 2)

สภาพที่เหมาะสมในการระบาด: ความชื้น และอุณหภูมิสูง ฝนหรือการให้น้ำถูกใบอาจทำให้ใบเป็นแผลและเป็นทางให้แบคทีเรียเข้าทำลายได้ง่าย

การป้องกันกำจัด โรคใบไหม้นี้เป็นโรคที่กำจัดได้ยากเพราะเชื้อจะกระจายอยู่ในต้นพืช (systemic) และระบาดได้รวดเร็ว หนทางที่ดีที่สุดคือการป้องกันไม่ให้เกิดเชื้อนี้ ซึ่งทำได้โดย

1.ใช้ต้นพันธุ์ที่ปลอดโรค

2. ฆ่าเชื้อบนใบมีดที่ใช้ตัดดอกและใบ โดยจุ่มในยาฆ่าเชื้อ ประมาณ 5 วินาที ให้บ่อยที่สุดเท่าที่จะทำได้ ตัวอย่างน้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น น้ำยาฟอกขาว (sodium hypochlorite : เช่น คลอรอกซ์ หรือไฮเตอร์) ความเข้มข้น 50% เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรค ในการตัดดอกควรใช้มีด 2 เล่มสลับกันตัดดอก วิธีนี้ทำให้มีโอกาสฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้นานกว่า

3.ไม่ควรปลูกพืชในสกุลใกล้เคียง เช่น อโกรนีมา ดิฟเฟนบาเกีย ฟิโลเดนดรอนบอน และ เดหลี เป็นต้น ในบริเวณใกล้กับหน้าวัว

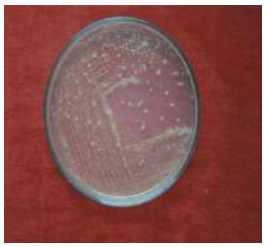
4. ตัดแต่งใบเป็นประจำเพื่อให้ต้นโปร่งและมีอากาศถ่ายเทได้สะดวก

5.หากมีเชื้อนี้ในแปลงแล้วจะต้องมีมาตรการกำจัดและป้องกันไม่ให้โรคระบาดไปยังแปลงอื่นอย่างเคร่งครัด โดยตัดใบที่แสดงอาการเริ่มแรกของโรค กำจัดต้นที่เป็นโรคและมีโรคซึมอยู่ในระบบ แล้วนำต้นที่เป็นโรคใส่ถุงพลาสติก นำออกจากแปลง และเผาไฟ หรือฝัง เพื่อกำจัดแหล่งแพร่เชื้อ เชื้อนี้จะอยู่นอกต้นพืชได้ไม่นาน ดังนั้นหลังจากนำต้นไปทำลายแล้ว 2 เดือน แปลงนั้นควรปลอดจากเชื้อแล้ว การปลูกใหม่ควรปลูกใหม่ทั้งแปลง ไม่ใช่ปลูกแซมต้นที่เป็นโรคเท่านั้น

6. เมื่อพบโรคเข้าทำลาย ควรลดปริมาณการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนลงชั่วคราว

7. การป้องกันกำจัดโดยใช้สารเคมีควรฉีดพ่นด้วย ฟอสเอ็ทธิล อลูมิเนียม เพื่อการป้องกันโรคใบไหม้ ไม่ควรใช้สารพวกสเตรปโตมัยซินซัลเฟต และสารประกอบทองแดงกับหน้าวัวจะช่วยให้เชื้อเข้าทำลายได้ยากขึ้น

โรคใบไหม้ของหน้าวัว เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากในแหล่งปลูกหน้าวัว โดยเฉพาะกับพันธุ์ที่อ่อนแอ ผลผลิตเสียหายถึง 95% ปัจจุบันยังไม่สามารถใช้สารเคมีในการควบคุมโรคนี้ในแปลงได้ (Norman *et al.,* 1999) แม้ในการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่าสารเคมีกำจัดโรคพืชที่มีทองแดง เป็นองค์ประกอบยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดี แต่ก็พบว่าสารนี้เป็นพิษ (phytotoxic) กับหน้าวัว ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว (บริษัท SPF, ม.ป.ป.) การใช้สารปฏิชีวนะอาจลดความรุนแรงของโรคได้ระดับหนึ่ง คำแนะนำอีกประการหนึ่งคือ การปลูกพันธุ์ที่ทนทาน ซึ่งก็มักเป็นพันธุ์ที่ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด (Fukui *et al.*, 1999)



Xanthomonas axonopodis s pv. *Dieffenbachiae*

เชื้อเข้าทำลายที่ใบ

เชื้อเข้าทำลายที่ดอก

ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อสาเหตุแสดงการเกิดโรคใบไหม้ และอาการบนใบและดอก

2. แมลงและสัตว์ศัตรูหน้าวัว

2.1 กลุ่มแมลงปากดูด ที่สำคัญได้แก่

เพลี้ยไฟ (Thrips) เพลี้ยไฟทำความเสียหายให้แก่ดอกหน้าวัวเป็นอย่างมาก ทำให้ดอกมีตำหนิ ส่งตลาดไม่ได้ ในกรณีที่ระบาดรุนแรงจะทำความเสียหายแก่ดอกทุกดอกในโรงเรือน

ลักษณะการทำลาย ใช้ปากเจาะดูดน้ำเลี้ยงดอกที่ยังไม่คลี่ เริ่มตั้งแต่เมื่อดอกเริ่มโผล่จากโคนใบประดับ ทำให้ดอกเมื่อบานจะบิดงอผิดส่วน รอยแผลจะเป็นทางสีขาว หรือน้ำตาล ด้านบนหรือใต้ใบประดับ หากต้องการสำรวจเพลี้ยไฟด้วยตาควรสำรวจช่วงเช้า เพราะช่วงกลางวันที่มีอุณหภูมิสูงเพลี้ยไฟจะหลบซ่อนในวัสดุปลูก ทำให้ไม่เห็นตัว (ภาพที่ 3)

สภาพที่เหมาะสมในการระบาด อุณหภูมิสูง และความชื้นต่ำ

การป้องกันและกำจัด ใช้สารป้องกันและกำจัดแมลง ได้แก่ อะบาเม็คติน อิมิดาโคลพริด ฟิโปรนิล อะเซทามิพริด ไซเปอร์เมทริน/ฟอสซาโลน โดยใช้ติดต่อกันไม่เกิน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 5-7 วัน

เพลี้ยไฟ

ทำลายที่ใบ

ทำลายที่ดอก

ภาพที่ 3 เพลี้ยไฟและลักษณะการทำลายทั้งที่ใบ และดอก

2.2 แมลงกลุ่มผีเสื้อ ได้แก่ หนอนกระทู้ หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้ผัก และหนอนกินใบอื่น ๆ กลุ่มหนอนพวกนี้ตัวเต็มวัยจะเป็นผีเสื้อกลางคืน ไข่ตามใบพืช จะทำลายหน้าวัวในระยะตัวหนอน โดยกัดกินที่ใบและดอก ทำให้เป็นรูขนาดใหญ่ หรือกัดกินตามขอบใบ

การป้องกันและกำจัด

1. วิธีกล โดยเก็บกลุ่มไข่และหนอนไปทำลาย

2. การใช้เชื้อจุลินทรีย์ ที่แนะนำให้ใช้ในการป้องกันและกำจัด มี 2 ชนิด คือ

1) ไวรัส เอ็นพีวี ของหนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้ผัก ขึ้นกับชนิดหนอนที่ระบาด ผสมสารจับใบ ฉีดในช่วงเวลาเย็น ทุก 5 วัน

2) เชื้อแบคทีเรีย (Bt) เช่น เดลฟิน เซนทารี พ่นในช่วงเวลาเย็น ทุก 5 วัน เมื่อพบหนอนระบาด

2.3 ไส้เดือนฝอย (nematode) สาเหตุ ไส้เดือนฝอย *Radopholus similis*

ลักษณะการทำลาย ต้นหน้าวัวแคระแกรน ใบและดอกเล็กลง ใบเหลืองก่อนเวลาอันควร และโดย ทั่วไปต้นมีลักษณะไม่สมบูรณ์ บริเวณรากจะพบรอยแผลสีเข้มจากเนื้อเยื่อที่ตาย หากเป็นมากรากทั้งรากจะเน่าเนื่องจากต่อมาถูกจุลินทรีย์อื่นๆ เข้าทำลาย

สภาพที่เหมาะสมในการระบาด โดยทั่วไปไส้เดือนฝอยจะแพร่กระจายโดยต้นพันธุ์ที่มีไส้เดือนฝอยอยู่ เครื่องมือและอุปกรณ์ การปฏิบัติงาน รองเท้าที่มีเครื่องปลูกที่มีไส้เดือนฝอยติดอยู่

การป้องกันกำจัด

1.ใช้ต้นพันธุ์ที่ปราศจากไส้เดือนฝอย

2. หากพบไส้เดือนฝอยให้ใช้สารเคมี เช่น อัลดิคาร์บหว่านบนเครื่องปลูก หรือราดด้วยออกซามิล

2.4 ไรแดง และไรขาว (spider mite, mite)

ลักษณะการทำลาย ใช้ปากดูดน้ำเลี้ยง ไรแดงทำให้ใบเป็นจุดสีขาวบนใบและดอก และจะชักใยอยู่ใต้ใบ ส่วนไรขาวทำให้ใบและดอกสีจาง และยังทำให้ผิวใบและจานรองดอกด้าน

การป้องกันกำจัด

1. หลีกเลี่ยงการปลูกพืชอาศัยไว้ในโรงเรือน โดยเฉพาะไม้ใบจำพวกเฟิร์น

2. กรณีไรไม่ระบาดมาก ให้พ่นด้วยกำมะถันผงให้ทั่วทั้งใต้ใบและบนใบ ทุก 4-5 วัน ไม่ควรพ่นในขณะที่มีแสงแดดหรืออากาศร้อน จะทำให้ดอกและใบไหม้

3. ถ้าระบาดมากใช้สาเคมีไดโคโฟล หรือ อะบาเม็คติน ฉีดพ่นทุก 5-7 วัน

2.5 ทากและหอยทาก (Snails)

ลักษณะการทำลาย ดอกและใบถูกกัดกิน ในที่มีหอยทากระบาดเราจะพบรอยทางเดินเป็นทาง เมือกสีเทาเงินสะท้อนแสงเมื่อแห้งสนิทให้เป็นที่สังเกต

สภาพที่เหมาะสมในการระบาด บริเวณที่ร่ม เย็น มีความชื้นสูง ระบาดมากในฤดูฝน

การป้องกันกำจัด

1. ใช้ปูนขาวโรยก้นกระถางและรอบๆ ใช้น้ำยาแคลเซียมคลอไรด์อัตราส่วน 80 กรัม/น้ำ 20 ลิตร รดหน้าวัวที่มีหอยทากระบาด หอยทากจะหนีออกมาจากที่หลบซ่อนจึงจับทำลาย

2. กรณีที่หอยทากระบาดมากทั่วทั้งสวน ให้ใช้สารกำจัดหอย เช่น เมทัลดีไฮด์(แองโกลสลัก) นิโคลซาไมด์ (ไบลุสไซด์) โดยพ่นสารในเวลาเช้า ซึ่งในอากาศยังมีความชื้นหลงเหลืออยู่ โดยพ่นน้ำเปล่าก่อนพ่นสาร ประมาณ 10 นาที เพื่อให้ความชื้นในอากาศสูงขึ้น ซึ่งจะช่วยชักนำให้หอยทากออกจากที่หลบซ่อน และสามารถสัมผัสสารฆ่าหอยได้เต็มที่ นอกจากนี้ควรหลีกเลี่ยงการพ่นสารบริเวณส่วนดอก โดยให้พ่นสารตรงลำต้นส่วนล่าง และเนื่องจากหอยทากมักหลบอาศัยในที่ร่มและชุ่มชื้น ดังนั้นควรพ่นสารบริเวณเครื่องปลูกรวมทั้งพื้นทางเดินระหว่างแปลงด้วย

การใช้สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืช ทุกครั้งต้องอ่านฉลากก่อนใช้ ถ้าไม่มั่นใจให้ปรึกษาผู้ชำนาญการด้านนี้ก่อน หรือถ้าเป็นสารป้องกันและกำจัดศัตรูพืช ที่ไม่เคยใช้มาก่อน ควรทดลองใช้กับพืชจำนวนน้อย ให้มั่นใจวาไม่แสดงอาการเป็นพิษ จึงนำมาใช้ต่อไป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัว

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวโดยใช้ชิ้นส่วนต่างๆ เช่น ใบ ก้านใบ จานรองดอก ก้านช่อดอก และคัพภะ อาหารที่ใช้คือ สูตรModified Murashige and Skoog (MMS) ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่งจากปกติเติม N^6-Benzylaminopurine (BAP) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่มืด 12-46 สัปดาห์ ก็สามารถชักนำแคลลัสได้ เมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเติม BAP เข้มข้น 0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ก็สามารถชักนำเป็นต้นได้ (Pierik *et al*., 1974) Teng (1997) รายงานว่าปัจจัยที่สำคัญในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีในหน้าวัวคือ แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) หากใช้ระดับความเข้มข้นสูง 825 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำการเกิดแคลัสได้ดี แต่หากใช้ความเข้มข้นระดับต่ำ 206 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นโดยตรง Pierik และคณะ (1979) รายงานการใช้ใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ของหน้าวัวว่าเป็นส่วนที่ดีที่สุดในการเพาะเลี้ยง และเนื้อเยื่อจากบริเวณเส้นกลางใบสร้างแคลลัสได้ดีกว่าบริเวณ ขอบใบ เนื้อเยื่อจากปลายยอดของใบสร้างแคลลัสได้ดีกว่าฐานใบ สมปอง และคณะ (2545) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนต่างๆ คือ ก้านใบ ใบ จานรองดอก และปลีดอกหน้าวัว 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ทรอปฟิกานา พันธุ์แชมเปญ และพันธุ์ดวงสมร บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MMS เติม BAP ร่วมกับ Thidiazuron (TDZ) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ชักนำแคลลัสในทุกชิ้นส่วนของสายพันธุ์ทรอปฟิกานาได้ดี

ที่สุด เฉลี่ย 82 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตยังมีผลต่อลักษณะแคลลัสด้วยเช่นกัน อรพิน และกิตติภัฏ (2543) ศึกษาการเพาะเลี้ยงใบของหน้าวัวบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้ดี

การกลายพันธุ์ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การกลายพันธุ์ (mutation) คือ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในโครงสร้างทางพันธุกรรม ซึ่งทำให้สิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ มีลักษณะใดลักษณะหนึ่งต่างไปจากเดิม การกลายพันธุ์อาจเกี่ยวกับการสูญหายไปของส่วนของยีน หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในยีน เรียก การกลายพันธุ์ระดับยีน ส่วนการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวกับการแลกเปลี่ยนส่วนของโครโมโซม การสูญหายไปหรือการเพิ่มขึ้นมาของส่วนของโครโมโซมที่ครอบคลุมมากกว่าหนึ่งยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของวิวัฒนาการ การกลายพันธุ์อาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติเรียกว่า spontaneous mutation การกลายพันธุ์โดยธรรมชาติที่สำคัญเกิดเนื่องจากระบบทางสรีรวิทยาและระบบทางพันธุกรรมของพืช (อดิศร, 2539) หรืออาจเกิดจากการก่อการกลายพันธุ์ (induced mutation) ชนิดของสิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) ที่นิยมใช้มี 2 ชนิด

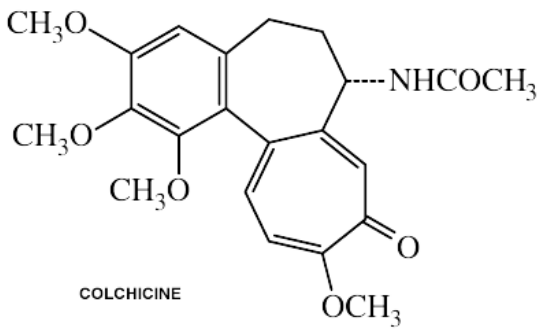
1. สิ่งก่อกลายพันทางกายภาพ (physical mutagens) ได้แก่ รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา รังสียูวี เป็นต้น
2. สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagens) ได้แก่ โซเดียมเอไซด์ (NaN_3) โคลชิซิน เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) เป็นต้น

การชักนำให้พืชมีการกลายพันธุ์โดยการใช้สารเคมีเป็นอีกวิธีการหนึ่งเพื่อให้ได้ต้นที่การเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม มักจะได้ลักษณะใหม่ ๆ ที่น่าสนใจ แม้ว่าส่วนใหญ่แล้วจะได้ลักษณะที่ไม่พึงต้องการ อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ก็มีประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชทำให้มีมีคุณค่าทางเศรษฐกิจเพิ่มมากขึ้น

2.1 โคลชิซิน

โคลชิซินเป็นสารเคมีชนิดหนึ่งที่สามารถทำให้มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม ในพืช เป็นสารอัลคาลอยด์ที่พบในโครคัส (*Colchicum autumnale* L.) และดองดึง (*Gloriosa superba* L.) มีสูตรโครงสร้าง $C_{22}H_{25}NO_6$ (ภาพที่ 4) มีชื่อทางเคมีคือ (S) – N – (5, 6, 7, 9 – tetrahydro – 1, 2, 3, 10 – tetramethoxy – 9 – oxobenzo[a]heptalen – 7 – yl) acetamide มีบทบาทในการเพิ่มชุดโครโมโซม โดย

ไปยับยั้งการสร้างสายใยสปินเดิล ดังนั้นจึงไม่มีการดึงโครโมโซมที่มาจัดเรียงในระยะเมตาเฟสไปยังขั้วทั้งสองได้ กลไกการทำงานของโคลชิซินคือ โมเลกุลจะเข้าเกาะกับ 6S โปรตีนทูบูลิน ที่เป็นส่วนประกอบในไมโครทูบูล ทำให้ไม่มีการสร้างสายใยสปินเดิล (Borisy and Taylor, 1967) ซึ่งคุณสมบัตินี้ได้นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ดังนั้นการใช้โคลชิซินเพื่อชักนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของโคลชิซิน
ที่มา: http:// www.caregroup.org/Images/Drugs/colchici.gif

การตรวจสอบลักษณะพืชที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยสารโคลชิซิน สำหรับเกณฑ์แรก ๆ ที่ใช้คือการสังเกตลักษณะต่าง ๆ ที่อาจเปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ รูปร่างและขนาดของส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ใบ ดอก ผล และ เมล็ด (วิมล, 2527) ลักษณะโดยทั่วไปของพืชที่ได้รับสารโคลชิซินและมีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม ส่วนใหญ่พืชที่เป็นโพลีพลอยด์จะมีลำต้นใหญ่ ใบกว้าง หนา มีสีเขียวเข้ม ดอก ผล และเมล็ดใหญ่ขึ้น แต่จะมีการเจริญเติบโตช้า เนื่องจากมีการแบ่งเซลล์ที่ช้ากว่าปกติ การติดเมล็ดลดลง ทิวา (2533) ศึกษาผลของโคลชิซินที่มีต่อการกลายพันธุ์ในแกลดิโอลัส โดยใช้ความเข้มข้นที่ ระดับ 0-200 ppm ใช้ระยะเวลาในการแช่ 6-36 ชั่วโมง พบว่า โคลชิซินทำให้น้ำหนัก ขนาด ของแคลลัส และความสูงของต้นมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของโคลชิซินสูงขึ้น วิชชุตา (2537) ศึกษาผลของสารโคลชิซินต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์แคนแคน โดยใช้ข้อและแคลลัสจุ่มแช่โคลชิซินเข้มข้น 0 0.01 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าโคลชิซินเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มทำให้เกิดลักษณะผิดปกติคือ ใบหนาและใบด่างเหลือง Takayuki และคณะ (1998) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเอ็มบริโอลูกผสมระหว่าง *Alstroemeria ligtu*

L. และ *A. pelegrina L.* var. rosea ร่วมกับสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน พบว่า ดอกมีขนาดใหญ่แข็งแรง และมีการเจริญเป็นปกติ ราตรี (2540) รายงานว่าการแช่ตายอดมังคุดด้วยโคลชิซินเข้มข้น 500 750 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ความยาวรากเพิ่มขึ้น จำนวนใบลดลง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มียอดรอดชีวิตเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ใบร่วงและยับยั้งการเจริญเติบโต วิมล และคณะ (2542) ศึกษาผลของสารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของชวนชม (*Adenium obesum*) สายพันธุ์ฮอลแลนด์ โดยให้สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับลาโนลินป้ายที่ตาข้างของต้นกล้าเป็นเวลา 1 และ 3 ชั่วโมง พบว่า กิ่งที่เจริญจากตาข้างที่ได้รับสารที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า ดอกมีขนาดใหญ่กว่ากลุ่มควบคุม บางดอกมีลักษณะผิดปกติคือ โคนดอกบิดงอ กลีบดอกมีลักษณะเป็นเส้นยาวขนาดเล็ก Mishiba และ Mii (2000) ศึกษาพืชดิพลอยด์และ เตตระพลอยด์ใน *Portulaca grandiflora* โดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบลักษณะผิดปกติคือ ขนาดดอกและใบของต้นเตตระพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ รัชนีวรรณ (2546) ศึกษาความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยาและเซลล์วิทยาในตำลึงที่เกิดจากการใช้สารโคลชิซิน โดยการหยดสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 8 10 และ 12 ครั้ง ที่ปลายยอดของต้นกล้าตำลึง คัดเลือกต้นที่มีลักษณะใบหนา ย้ายปลูกในแปลงพบว่า ต้นตำลึงมีใบหนาแตกต่างจากต้นปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีอัตราการเจริญเติบโตช้า ความยาวข้อปล้องสั้น แต่มีน้ำหนักยอดและดอกมากกว่า ผลมีลักษณะกลมมากขึ้นแต่มีขนาดเล็กลง ทิวา และณัฐา (2547) ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในงาเพื่อใช้เป็นไม้ประดับ โดยให้สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0 0.25 0.50 และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ โดยหยอดลงบนต้นกล้าอายุ 1 สัปดาห์ ในต้นงา 3 พันธุ์คือ สายพันธุ์อำเภอปาย อำเภอพร้าว และ มข. 3 พบว่า ระยะเวลาในการออกดอกแรกนานกว่าเดิม และขนาดดอกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น แต่สารละลายโคลชิซินไม่มีผลต่อสีดอก และกลีบดอกของงาทั้ง 3 สายพันธุ์ Escandon และคณะ (2005) ศึกษาใน *Scoparia montevidiensis* โดยใช้ข้อจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0 0.001 0.01 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบความแตกต่างระหว่างต้นดิพลอยด์และต้นเตตระพลอยด์คือ ต้นเตตระพลอยด์มีใบ และดอกขนาดใหญ่กว่าต้นปกติ Gu และคณะ (2005) ชักนำให้เกิดเตตระพลอยด์ในพุทรา (*Zizyphus jujube* Mill. cv. Zhanha) โดยใช้ปลายยอดวางเลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0 0.01 0.03 0.05 0.1 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืดเป็นเวลา 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า ต้นเตตระพลอยด์มีขนาดใบใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์คือ 2.29 และ 1.72 เซนติเมตรตามลำดับ Escandon และคณะ (2006) ศึกษาการใช้โคลชิซิน

ในการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของ *Bacopa monnieri* โดยจุ่มแช่ข้อในโคลชิซินเข้มข้น 0 0.001 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าต้นเตตระพลอยด์ขนาดของใบหนา และดอกมีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์

วิธีการที่ง่ายและสะดวกรวดเร็วในการตรวจสอบโพลีพลอยด์ของพืชโดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบว่า ปากใบพืชที่เป็นโพลีพลอยด์ซึ่งได้จากการทรีตด้วยโคลชิซินมีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์และที่สำคัญคือจำนวนโครโมโซมจะเพิ่มเป็นทวีคูณ Pryor (1972) ใช้สารละลายโคลชิซิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ แช่เมล็ดเยอบีร่านาน 1-2 ชั่วโมง เพื่อชักนำการเกิดโพลีพลอยด์ พบว่า เซลล์ปากใบ ของต้นที่ได้รับสารมีขนาดเป็น 2 เท่าของต้นควบคุม Kato (1989) ศึกษาการชักนำคามีเลีย (*Camellia japonica* L.) ให้เกิดเป็นต้นโพลีพลอยด์ โดยนำเอ็มบริโอไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเกิดต้นเตตระพลอยด์ที่มีปากใบขนาดใหญ่ จำนวนปากใบเฉลี่ยต่อพื้นที่น้อยลง วิชชุตา (2537) ศึกษาผลของโคลชิซินที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์ Double Spathe ที่ความเข้มข้น 0 0.01 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง กับข้อและแคลลัส พบว่า ข้อที่จุ่มแช่โคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวของปากใบเฉลี่ยสูงที่สุดเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน Chakraborti และคณะ (1998) ชักนำให้เกิดเตตระพลอยด์ใน Mulberry (*Morus alba* L.) โดยใช้ ตาข้างจุ่มแช่โคลชิซินเข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ต้นดิพลอยด์มีขนาดปากใบกว้าง 20.8 ไมโครเมตร ขณะที่ต้นเตตระพลอยด์มี ขนาดปากใบกว้าง 41.4 ไมโครเมตร ภาสันต์ (2540) ศึกษาการชักนำต้นอ่อนกล้วยไข่ให้กลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ โดยจุ่มแช่ที่สารโคลชิซินเข้มข้น 0 0.5 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2.5 5 และ 7.5 ชั่วโมง พบว่าการใช้สารละลายโคลชิซินเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7.5 ชั่วโมง สามารถคัดเลือกได้ต้นเตตระพลอยด์ และพบว่าขนาดของต้นดังกล่าวขนาดใหญ่แต่จำนวนปากใบต่อพื้นที่น้อยลง นิตย์ศรี และอำไพ (2541) ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นเตตระพลอยด์ของหม่อนพันธุ์น้อย คุณไพ และใหญ่บุรีรัมย์ โดยการแช่ข้อในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0 0.02 0.06 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 3 4 และ 5 วัน พบว่า ขนาดเซลล์ปากใบและปริมาณคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบเพิ่มขึ้น แต่จำนวนเซลล์ปากใบต่อหน่วยพื้นที่ลดลง Herrera และคณะ (2002) รายงานผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเอ็มบริโอกาแฟบนอาหารสูตร MS ร่วมกับสารละลายโคลชิซิน โดยใช้สารละลาย โคลชิซินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น แต่จำนวนใบและปากใบลดลง สุชาดา (2544) ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ว่านสี่ทิศไทยโดยการชักนำให้หัวย่อยรางนาก รางเงิน และ รางทองเป็นต้นเตตระพลอยด์ โดยวางเลี้ยงหัวย่อยบนอาหารร่วมสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0 0.3 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า มีแนวโน้มที่หัวย่อยจะเป็น

ต้นเตตระพลอยด์ได้ โดยมีจำนวนปากใบลดลง ขนาดปากใบใหญ่ขึ้น และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์มากขึ้นจากต้นดิพลอยด์ Gu และคณะ (2005) ชักนำให้เกิดเตตระพลอยด์ในพุทรา โดยใช้ปลายยอดวางเลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0 0.01 0.03 0.05 0.1 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืดเป็นเวลา 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า ขนาดของปากใบต้นเตตระพลอยด์ (28.3 x 22.2 ไมโครเมตร) มีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ (20.25 x 16.70 ไมโครเมตร) และเม็ดคลอโรพลาสต์ต้นเตระพลอยด์มีขนาดใหญ่ขึ้น Yang และคณะ (2006) ศึกษาการใช้โคลชิซินชักนำให้เกิดเตตระพลอยด์จากโซมาติกเอ็มบริโออุ่น (*Vitis vinifera* L.) โดยใช้โซมาติกเอ็มบริโอแช่สารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 2 และ 3 วัน พบว่า ขนาดของปากใบต้นเตตระพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่า (36.6 x 26.6 ไมโครเมตร) ปากใบของต้นดิพลอยด์ (26.2 x 18.4 ไมโครเมตร)

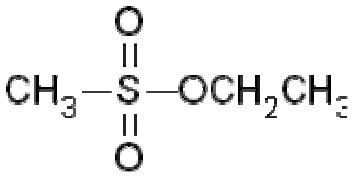
การนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ร่างกายโดยเฉพาะเซลล์ปลายรากพืชในระยะกำลังการแบ่งเซลล์แบบไมโทซีส ระยะที่เหมาะสมคือระยะเมตาเฟสเพราะเป็นช่วงที่โครโมโซมขดสั้นที่สุด การนับโครโมโซมปลายรากเป็นวิธีการที่ค่อนข้างยากต้องใช้เทคนิคที่เหมาะสมจึงจะทำให้มองเห็นจำนวนโครโมโซมในระยะที่ต้องการ ใช้ระยะเวลานานและเทคนิคในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน Griesbach และ Bhat (1990) ศึกษาการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ใน *Eustoma grandiflorum* โดยหยดโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ บนเนื้อเยื่อเจริญของต้นที่มีความสูง 2-3 เซนติเมตร เป็นเวลา 0 3 และ 5 วัน เมื่อตรวจสอบโครโมโซมปลายราก พบว่า มีความแตกต่างระหว่างต้นดิพลอยด์ (2n = 2x = 18) และเตตระพลอยด์ (2n = 4x = 36) Rose และคณะ (2000) ชักนำให้เกิดเตตระพลอยด์ใน Buddleia โดยใช้ข้อทรีตโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.01 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วัน พบว่าโคลชิซิน 0.01 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดต้นเตตระพลอยด์ได้ โดยเมื่อนับจำนวนโครโมโซม พบว่า 2n = 4x = 76 รัชนีวรรณ (2546) ศึกษาความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยา และ เซลล์วิทยาในตำลึงที่เกิดจากการใช้สารโคลชิซิน โดยการหยดสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 8 10 และ12 ครั้ง ที่ปลายยอดของต้นกล้า พบต้นตำลึงมีใบหนาเมื่อนำมาตรวจนับโครโมโซมที่ปลายรากพบว่า มีการเพิ่มของจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่า (2n = 4x =48) ตามลำดับ Yang และคณะ (2006) ศึกษาการใช้โคลชิซินชักนำให้เกิดเตตระพลอยด์จากโซมาติกเอ็มบริโออุ่น (*Vitis vinifera* L.) โดยใช้โซมาติกเอ็มบริโอทรีตโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 2 และ 3 วัน เมื่อนำต้นมาตรวจสอบโครโมโซมปลายรากพบว่า มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นจาก 38 เป็น 76 ศิรินทิพย์ (2546) ปรับปรุงพันธุ์โดยใช้โคลชิซินชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในบุกเนื้อทราย (*Amorphophallus* sp.) ที่มีโครโมโซม 2n = 2x = 26 โดยใช้โคลชิซินที่ความเข้มข้น 0 50 100

150 200 250 300 350 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร กับแคลลัสบุก พบว่า มีเพียงแคลลัสเดียวเท่านั้นที่ให้ต้นที่เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมเป็นสองเท่า (2n = 4x) ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

flow cytometry เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้วิเคราะห์เซลล์ด้วยการฉายแสงเลเซอร์ลงสู่เซลล์แล้ววัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้น ตามหลักการทางฟิสิกส์ ชีวเคมี เพื่อใช้ในการคัดแยกเซลล์ ใช้ในการวัดปริมาณของเซลล์ และ DNA (ศิรินันท์, 2548) โดยหลักการ คือ ทำการแยกเซลล์ออกมาโดยการหั่นส่วนใบพืชเป็นชิ้นบาง ๆ ด้วยมีดในสารละลายสกัดดีเอ็นเอกรองเอาเฉพาะส่วนของเหลว นำมาย้อมด้วยสารให้สีเรืองแสง เช่น PI (propidium iodide) หรือ DAPI (4,6-bis[2-imidazxoliyl-4H,5H]-2-phenylindol) วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง flow cytometry โดยจะมีการฉีดพ่นสารละลายของนิวเคลียสผ่านช่องแคบๆในเครื่องให้นิวเคลียสผ่านทีละเซลล์ผ่านลำแสง ซึ่งเมื่อกระทบกับนิวเคลียสที่ย้อมสี เครื่องตรวจจะแปลงค่าการดูดกลืนแสงเป็นกราฟหรือที่เรียกว่า ดีเอ็นเอฮีสโตแกรม โดยเทียบกับเซลล์มาตรฐานที่ทราบปริมาณดีเอ็นเอแล้ว (จรัสศรี, 2548) ข้อมูลที่ได้สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพืชโดยอาศัยความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอ สามารถแยกความแตกต่างของพืชที่มีระดับชุดของจีโนมต่างกัน รวมทั้งบอกถึงความผิดปกติของเซลล์ได้

2.2 เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต

สารเคมีอีกที่นิยมใช้ในการชักนำการกลายพันธุ์คือ เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต (นพพร, 2543) มีสูตรทางเคมีคือ $CH_3SO_2OC_2H_5$ (ภาพที่ 5) เป็นของเหลวไม่มีสีละลายน้ำได้ 8 เปอร์เซ็นต์ มีความหนาแน่น 1.203 ก./มล. จุดเดือดเท่ากับ 85-86 องศาเซลเซียส ความดัน 10 มิลลิเมตรปรอท น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 124 เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตมีหมู่เอทิลคือ C_2H_5 ซึ่งจะถูกถ่ายให้กับโมเลกุลของดีเอ็นเอในปฏิกิริยาแอลคิเลชันจะเกิดมากสุดในตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนิน (G) หลังทำปฏิกิริยาแล้วกลายเป็น 7-เอทิลกัวนิน หรือเรียกว่า แอลคิเลตกัวนิน (สิรนุช, 2540)



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของเอทธิลมีเทนซัลโฟเนต

ที่มา: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/TablePage/16253605

การใช้สารดังกล่าวนี้จะต้องอยู่ในรูปสารละลายก่อน โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย Singh และคณะ (2000) ใช้เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตในการสร้างความหลากหลายของสีดอกคาร์เนชั่น

โดยใช้ความเข้มข้น 0.025 0.05 0.075 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เติมในอาหารแข็งเพาะเลี้ยงนาน 12 ชั่วโมง และใช้ความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เติมในอาหารเหลว เขย่าเลี้ยงนาน 3 ชั่วโมง พบว่า ระดับความเข้มข้น 0.025 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารแข็ง และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวสามารถชักนำให้เกิดยอด และดอกมากที่สุด โดยดอกมีลักษณะสีขาวสลับสีแดง และ สีชมพูสลับขาว ธัญญาพร (2547) จุ่มแช่โนดูลาแคลลัสหน้าวัวพันธุ์โซเนตในสารละลายเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตเข้มข้น 0.72 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อนำมาตรวจสอบทางสัณฐานพบว่าต้นหน้าวัวรุ่นที่ M_1R_2 มีใบผิดปกติ เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ใบด่างบางส่วน ด่างกระจัดกระจาย และด่างทั้งใบ เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ทำให้รูปร่างใบผิดปกติคือ ใบติดกันเป็นจีบ และใบปิดเบี้ยว วิทยา (2541) รายงานว่าเมื่อนำแคลลัสมังคุดมาจุ่มแช่เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้ลำต้นเตี้ยลง มีลำต้นอวบอ้วน เกิดกิ่งแขนง และมีการจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ Koh และ Davies (2001) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของ *Tillandsia fasciculate* ที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต พบอาการด่างทั้งชนิดด่างเป็นบางส่วน และด่างกระจายทั่วใบ Latado และคณะ (2004) พบว่า ภายหลังการนำชิ้นส่วนก้านดอกเบญจมาศจุ่มแช่ในสารละลายเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตเข้มข้น 0.77 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 ชั่วโมง ไปเพาะเลี้ยง พบว่า สีของดอกเบญจมาศที่ได้มีอาการด่างและบางดอกมีสีที่เปลี่ยนแปลง

การตรวจสอบการกลายพันธุ์

การตรวจสอบการกลายพันธุ์มีหลายวิธี เช่น การตรวจสอบจำนวนโครโมโซม การดูปริมาณ DNA ด้วย flow cytometer และการตรวจสอบด้วยไอโซไซม์ (isozyme)

เทคนิคไอโซไซม์สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการระบุความผันแปรทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ การตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ และการวินิจฉัยโรคพืชต่างๆ วิวัฒนาการ และกระบวนการเมแทบอลิซึม (พรรณี, 2543) ไอโซไซม์ คือเอนไซม์ (enzyme) ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้น (substrate) ตัวเดียวกันจึงเร่งปฏิกิริยาเดียวกัน ในสิ่งมีชีวิตเดียวกันแต่มีรูปแบบของโมเลกุลและสมบัติบางประการที่ต่างกันโดยมีสาเหตุสำคัญมาจากพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (วิไลวรรณและอมรรัตน์, 2533) เพื่อจำแนกความแตกต่างของพันธุกรรมของพืชที่เปลี่ยนแปลงไปภายหลัง การสร้างความแปรปรวนในพืช ความแตกต่างของโมเลกุลในเอนไซม์นี้มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไอโซไซม์หรือเอนไซม์ด้วย (Freeling, 1983) ในการตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมโดยเทคนิคไอโซไซม์

ต้องอาศัยการทำอิเลคโตรโฟริซิส ซึ่งอาศัยหลักการที่สำคัญคือ ไอโซไซม์เป็นโพลีเพพไทด์ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เรียงลำดับ โดยลำดับกรดอะมิโนนี้ถูกแปลรหัสมาจากหน่วยพันธุกรรมในสายนิวคลีโอไทด์ที่ถูกชักนำให้เกิดความแปรผันจากการชักนำการกลายพันธุ์ เป็นผลให้ไอโซไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนแตกต่างกัน เช่น ขนาดประจุสุทธิ และรูปร่างของโมเลกุล ดังนั้นเมื่อนำไอโซไซม์มาแยกบนตัวกลางที่เหมาะสมภายในสนามไฟฟ้า โมเลกุลของไอโซไซม์จึงเคลื่อนที่ในอัตราที่ต่างกัน ไอโซไซม์ที่มีประจุสุทธิมากกว่าเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าไอโซไซม์ที่มีประจุสุทธิน้อยกว่า (Doehlert and Duke, 1983) หลังจากนั้นจึงย้อมสีด้วยปฏิกิริยาจำเพาะสำหรับไอโซม์แต่ละชนิด ปรากฏแถบสีของเอนไซม์รูปแบบต่าง ๆ แถบสีที่ปรากฏนี้เรียกว่า รูปแบบของไอโซไซม์ (isozyme patterns) สามารถนำมาเขียนเป็นแผนภาพที่เรียกว่า แถบเอนไซม์ (zymogram) เพื่อแยกความแตกต่างของพืชได้ (เพิ่มพงษ์ , 2530)

การศึกษาไอโซไซม์ในพืชสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกพืชที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน และสามารถใช้รูปแบบไอโซไซม์ช่วยในการพิจารณาความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ชัดเจนขึ้น ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคทางด้าน polyacryamide gel electrophoresis มาใช้ในการตรวจสอบไอโซไซม์เพื่อใช้จำแนกพันธุ์พืช เป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชได้ดี โดยเอนไซม์ดังกล่าวสามารถสกัดได้จากส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น เมล็ด ใบ หรือใบอ่อนในระยะต้นกล้า เป็นต้น ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการคัดเลือก (ธีระและวัชรินทร์, 2543) การศึกษาไอโซไซม์โดยใช้เทคนิคอิเล็คโตรโฟริซีสเป็นวิธีการที่มีค่าใช้จ่ายไม่ค่อยสูง ทั้งยังสามารถทดสอบกับพืชได้จำนวนมากอย่างรวดเร็ว โดยการใช้ชิ้นส่วนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Moore and Collins, 1983 อ้างโดยสุทัศนีย์, 2548) ธัญญาพร (2547) รายงานการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์โซเนตที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตพบว่า การย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ esterase จากใบหน้าวัวในรุ่นที่1 ถึงรุ่นที่ 5 พบว่าแถบเอนไซม์ที่ได้แตกต่างกันระหว่างการจุ่มแช่และไม่จุ่มแช่เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต ราตรี (2540) ศึกษาระบบเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ในมังคุดโดยใช้ไอโซไซม์ 4 ระบบ พบว่า เอนไซม์ peroxidase มีแถบสีปรากฏแต่ไม่ชัดเจน ส่วนเอนไซม์ esterase แถบสีที่ได้เป็นปื้น การใช้บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.25 0.5 และ 0.75 โมลาร์ ให้แถบเอนไซม์ที่ไม่แตกต่างกัน การแยกเอนไซม์โดยใช้วุ้น acrylamide ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ให้แถบสีคมชัดกว่าความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ กัญจนา (2538) จำแนกกลุ่มพันธุ์ปทุมมาจากแบบแผนไอโซไซม์ โดยศึกษาไอโซไซม์ 7 ชนิดได้แก่ esterase, glutamate oxaloacetate tranaminase, leucine aminopeptidase, shikimic dehydrogenase, malate dehydrogenase และ glutamate dehydrogenase พบว่า esterase สามารถแยก

ความแตกต่างของปทุมมาได้ถึง 35 รูปแบบ ปราโมทย์ และเกศิณี (2543) ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ leucine aminopeptidase, esterase และ shikimic dehydrogenase ในการจำแนกพันธุ์ลูกผสมสตรอเบอรี่ พบว่า การใช้รูปแบบไอโซไซม์ esterase ร่วมกับ leucine aminopeptidase สามารถจำแนกได้ 4 พันธุ์ กับ 3 กลุ่ม โดย esterase พบ 7 รูปแบบ มีแถบเอนไซม์ 9 แถบ และ leucine aminopeptidase พบ 2 รูปแบบ มี 4 แถบ การใช้เอนไซม์ esterase ร่วมกับ leucine aminopeptidase สามารถจำแนกลูกผสมบางเบอร์ออกจากพันธุ์แม่หรือพันธุ์พ่อ หรือระหว่างลูกผสมด้วยกันเองออกจากกันได้ แต่ไม่ทั้งหมด ส่วนเอนไซม์ shikimic dehydrogenase แสดงออก 1 แถบ สุทัศนีย์ (2548) ทดสอบความตรงตามพันธุ์ของข้าวโพดลูกผสมโดยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็คโตรโฟริซิสโดยนำเอาเอ็นไซม์ esterase, peroxidase และ glutamate oxaloacetate tranaminase มาจำแนกข้าวโพดลูกผสมพันธุ์2029S ออกจากพันธุ์พ่อ แม่พบว่า รูปแบบเอนไซม์ esterase เพียงชนิดเดียวที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างข้าวโพดลูกผสมกับพันธุ์พ่อ แม่ได้ Ramalakshmi และคณะ (2003) ทำการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกล้วย 6 สายพันธุ์ คือ Giant Govenor, Dwarf Cavendish, Robusta, Champa, Kachakel และ Chatim ซึ่งเป็นกล้วยที่เกิดความแปรปรวนจากจำนวนการย้ายเลี้ยงที่ต่างกัน ด้วยเทคนิคไอโซไซม์ พบว่า ไอโซไซม์ระบบ esterase สามารถจำแนกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน กล้วย 4 สายพันธุ์ นอกจากจะมีความแตกต่างของไอโซไซม์แล้วยังให้ผลผลิตแตกต่างกันด้วย

ในปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) เพื่อชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม ร่วมกับการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เพราะเป็นวิธีหนึ่งที่จะได้มาซึ่งลักษณะใหม่ที่ยังไม่มีในธรรมชาติ หรือมีแต่พบได้น้อย รังสีและสารเคมีต่างๆ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ยีน และโครโมโซม ส่วนเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถเพิ่มปริมาณต้นกลายพันธุ์ได้จำนวนมากในเวลาอันสั้น และลดโอกาสการเกิดการกลายพันธุ์แบบไคเมรา (chimera) และเพิ่มโอกาสการเกิดการกลายพันธุ์ทั้งต้น (solid mutation) เนื่องจากต้นที่ได้จากวิธีนี้เกิดจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว หรือจากเซลล์จำนวนน้อยกว่าต้นพืชที่ได้จากการเพาะเมล็ดหรือจากท่อนพันธุ์หรือจากหัว (วิชชุตา, 2537) การใช้โคลชิชินต้องใช้กับเซลล์ที่มีการแบ่งตัว เช่น เนื้อเยื่อเจริญของเมล็ด ต้นกล้าพืช หรือส่วนเจริญอื่นของพืช ละอองเกสร คัพภะอ่อน เซลล์เพาะเลี้ยง เป็นต้น วิธีการอาจทำโดยการแช่เมล็ดและต้นอ่อน หรือชุบสำลีวางตามจุดเจริญต่างๆ ของพืชความเข้มข้นที่ใช้กันทั่วไปคือ 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเอทธิลมีเทนซัลโฟเนต เป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยเป้าหมายที่สำคัญคือ ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสในสายดีเอ็นเอที่เรียกว่า point mutation

เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตจัดอยู่ในกลุ่มของพวก alkylating agent ใช้ได้ดีกับพืชทุกชนิด (สิรนุช, 2540) ความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการใช้โคลชิซินและเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหลอดทดลองจึงเป็นวิธีการที่เพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ด้วย

บทที่ 2
การปรับปรุงพันธุ์หน้าวัวเพื่อการตัดดอก

1. การปรับปรุงพันธุ์หน้าวัวโดยวิธีการผสมพันธุ์

การรวบรวมพันธุ์

โครงการได้ดำเนินการรวบรวมพันธุ์หน้าวัวจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งพันธุ์ต่างประเทศ, พันธุ์พื้นเมืองของไทย และพันธุ์ลูกผสมในประเทศไทย จำนวน 27 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์ต่างประเทศ 22 พันธุ์คือ Figo, Rapido, Simba, Sonate, Florentino, Amingo, Terra, Acropolis, Alexis, Fantasia, Tropical (แหล่งกำเนิดเนเธอร์แลนด์) Red Hot, Dusty Rose, Florida, Carre, Lady Bath, Leigh, Prety Ann, Merenge, Alisona , Lady jane, Momohara พันธุ์ไทยพื้นเมือง 4 พันธ์คือ จักรพรรดิ์, ขาวนายหวาน, เปลวเทียนภูเก็ต (หน้าควาย) พลายชุมพล และพันธุ์ลูกผสมเปิดแม่ Midori (แหล่งกำเนิดศูนย์บริการด้านพืชและปัจจัยการผลิต ลำปาง กรมวิชาการเกษตร) 1 พันธุ์ รายละเอียด ของลักษณะประจำพันธุ์ในแต่ละพันธุ์แสดงรายละเอียดในภาคผนวกที่ 1

การผสมพันธุ์

ทำการผสมเกสรในช่วงเวลา 8.00-11.00 น. เพราะเกสรตัวเมียบานเต็มที่เหมาะแก่การผสมและมีโอกาสติดเมล็ดมากที่สุด สังเกตจากเมื่อมองย้อนแสงจะเห็นเป็นหยดน้ำเกาะอยู่ หรือสัมผัสที่ปลีดอกจะรู้สึกเหนียว ๆ ส่วนเกสรตัวผู้ที่สามารถนำมาผสมได้จะสังเกตเห็นเป็นผงสีขาวเกาะอยู่ที่ปลีดอก หลังจากนั้นนำพู่กันจุ่มน้ำมาแตะที่ละอองเกสรตัวผู้นำไปป้ายที่ดอกตัวเมีย เสร็จแล้วคลุมด้วยถุงพลาสติกขนาด 6-12 นิ้ว ที่ตัดปลายทั้งสองข้าง เพื่อป้องกันการผสมข้าม ทำการผสมประมาณ 2-3 วัน เพราะดอกตัวเมียจะทยอยบานจากโคนถึงปลาย ติดป้ายชื่อคู่ผสมด้วยลวดขนาดเล็กไว้ที่ก้านดอก

การเลี้ยงอนุบาล

นำเมล็ดที่แก่และสุกเต็มที่ ล้างน้ำให้เมือกที่เมล็ดหลุดออกให้หมด นำเมล็ดจุ่มแช่สารป้องกันเชื้อราประมาณ 3 นาที เพาะเมล็ดในขุยมะพร้าวชนิดบดละเอียด จากนั้นสเปรย์น้ำลงบนวัสดุเพาะเล็กน้อย นำกระถางที่เพาะเมล็ดหน้าวัวมาใส่ในถุงพลาสติกที่หล่อน้ำไว้มัดปากถุงให้สนิทเพื่อรักษาความชื้นให้กับวัสดุเพาะ วางถุงไว้ในที่มีแสงส่องรำไร จากนั้นคอยสเปรย์น้ำให้กับวัสดุเพาะเมื่อเห็นว่าขุยมะพร้าวแห้ง ไม่ควรสเปรย์น้ำให้มากจนเกินไปเนื่องจากขุยมะพร้าวจะอุ้มน้ำไว้มากทำให้เมล็ดหน้าวัวที่เพาะเน่าเสียได้ง่าย จากนั้นประมาณ 20 วันจะพบว่าหน้าวัวจะงอกเป็นต้นอ่อนเล็กๆ ให้เปิดปากถุงออก แล้วนำต้นกล้าไปวางในที่ที่แสงส่องถึงได้มากขึ้น เริ่มให้ปุ๋ยทางใบได้เมื่อต้นกล้าอายุได้ประมาณ 2 เดือน โดยวิธีการสเปรย์เหมือนกับวิธีการให้น้ำ เมื่อต้นโต (ประมาณ 4 เดือน) จึง

ย้ายกล้าลงปลูกในกระถางโดยใช้กาบมะพร้าวสับที่แช่น้ำไว้ประมาณ 1 คืนเป็นวัสดุเพาะ ดูแลรักษาต้นกล้าเพื่อรอการนำไปทอดสอบผลผลิตต่อไป

การดูแลรักษา

การให้น้ำ

ให้น้ำโดยระบบสปริงเกอร์หรือระบบน้ำเหวี่ยง โดยใช้ระบบที่หัวพ่นน้ำแขวนอยู่บนราวไม้ไผ่ ให้น้ำวันละ 2 ครั้ง โดยในแต่ละครั้ง จะเปิดน้ำให้คราวละ 10 - 15 นาที และแบ่งทยอยเปิดน้ำภายในโรงเรือนเป็นส่วน ๆ ไปเพื่อรักษาความชื้นในโรงเรือน ในช่วงที่มีสภาพอากาศแห้งอาจจะต้องให้น้ำถึงวันละ 3 ครั้ง

การให้ปุ๋ย

ให้ปุ๋ยเม็ดสูตรเสมอ เช่น ปุ๋ยสูตร 15 -15-15 โรยรอบชายพุ่มหรือรอบโคนต้นเดือนละครั้งในอัตราต้นละ 1 ช้อนโต๊ะ (20 กรัม) ปุ๋ยออสโมโคส สูตร 14-14-14 โรยรอบชายพุ่มหรือรอบโคนต้น ทุก ๆ 3 เดือน ใน อัตราต้นละ 1 ช้อนโต๊ะ (20 กรัม) และให้ปุ๋ยเกร็ดละลายน้ำสูตร 15-30-15 หรือ 17-34-17 อัตรา 40 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร (1 ปี๊บ) ฉีดพ่นเสริมให้ทุก 15 วัน เพื่อช่วยให้ต้นเจริญ เติบโตได้ดีและออกดอกดก

การตัดแต่ง

ตัดแต่งใบออกเมื่อพบว่าก้านใบส่วนที่อยู่ด้านล่างมีสีเหลืองหรือเหี่ยว และตัดดอกหน้าวัวที่พบว่าเป็นดอกที่ไม่สมบูรณ์หรือดอกเหี่ยวที่ไม่ได้รับการผสมออก และควรมีการตัดใบหน้าวัวออกในช่วงปลายเดือนพฤษภาคมของทุกปี ให้เหลือเพียงยอดละ 3 - 4 ใบ ทั้งนี้เพื่อให้บริเวณโคนต้นมีการระบายอากาศได้ดีขึ้นในช่วงฤดูฝน อีกทั้งการตัดใบจะช่วยลดการเข้าทำลายของโรคและแมลงโดยไม่ทำให้การเจริญเติบโตหรือจำนวนดอกลดลงแต่อย่างใด

การบันทึกข้อมูล และเกณฑ์ในการคัดเลือกหน้าวัวพันธุ์ดี

(1) การบันทึกข้อมูล ช่วงการผสมพันธุ์ หลังการผสม จำนวนคู่ที่ผสมติด เปอร์เซ็นต์การผสมติด อายุต้นกล้า จำนวนใบ ความกว้างทรงพุ่ม ความสูงของต้น ขนาดของปลีและจานรองดอก รูปทรงของปลีและจานรองดอก เวลาการออกดอก จำนวนดอกต่อปี ความยาวของก้านดอก สีของใบ ลักษณะเด่นพิเศษ ความต้านทานโรค เช่น ใบไหม้ และแอนแทรคโนส และคุณภาพในการเก็บรักษาดอก โดยเก็บเกี่ยวเมื่อสีของปลีเปลี่ยนไป 2/3 ของสีเดิม

(2) เกณฑ์ในการคัดเลือก

- จานรองดอกกว้าง ด้านซ้ายและขวาเท่ากันเป็นรูปหัวใจ ขนาดความกว้างของดอก 12-20 เซนติเมตร
- ปลีสั้นกว่าจานรองดอก และทำมุมประมาณ 45 องศากับแกนของก้านดอก
- ก้านดอกยาวไม่น้อยกว่า 70 เซนติเมตร
- ต้นมีข้อถี่ หรือปล้องสั้น
- ระยะเวลาอายุดอก 15-30 วัน
- ดอกมีสีแดง ขาว ม่วง ชมพู หรือสีผสม
- อื่น ๆ เช่นต้านทานโรคใบไหม้

ผล

การผสมพันธุ์หน้าวัว

การผสมพันธุ์หน้าวัวตั้งแต่ปี 2546 ถึงเดือนมีนาคม 2549 ได้คู่ผสมหน้าวัวทั้งหมด 26 คู่ โดยพันธุ์ที่ได้รับการผสมได้แก่ Fiorentino, Sonate, Rabido, Spirit, Acropolis, Amingo, Figo, Midori, จักรพรรดิ์, Lady Jane, Merenge, Mumuhara และเปลวเทียนภูเก็ต ที่ให้ดอกและสามารถผสมเกสรได้จำนวน 14 พันธุ์ โดยคู่ผสมต่างๆ มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด 40-100 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 1, 2, 3 และ 4 และภาพที่ 6 แสดงการผสมติดของเมล็ด

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การผสมติดของหน้าวัวคู่ผสมต่าง ๆ ประจำปี 2546

คู่ผสม	จำนวนดอกที่ผสม	จำนวนดอกที่ผสมติด	เปอร์เซ็นต์การผสมติด
Florentino x Sonate	6	4	66.66
Rabido x Sonate	5	5	100
Spirit x Sonate	5	4	80
Sonate x Sonate	5	4	80

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การผสมติดของหน้าวัวคู่ผสมต่าง ๆ ประจำปี 2547

คู่ผสม	จำนวนดอกที่ผสม	จำนวนดอกที่ผสมติด	เปอร์เซ็นต์การผสมติด
Acropolis x Acropolis	10	5	50
Acropolis x Amingo	10	5	50
Amingo x Acropolis	10	6	60
Amingo x Amingo	10	6	60
Figo x Acropolis	10	7	70
Figo x Amingo	10	5	50
Midori x จักรพรรดิ	10	4	40
Midori x Amingo	10	4	40
Spirit x Acropolis	10	5	50

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การผสมติดของเกสรหน้าวัวคู่ผสมต่าง ๆ ประจำปี 2548

คู่ผสม	จำนวนดอกที่ผสม	จำนวนดอกที่ผสมติด	เปอร์เซ็นต์การผสมติด
Acropolis x Lady Jane	1	1	100
Figo x Merenge	1	1	100
Figo x Lady Jane	1	1	100
Figo x Mumuhara	1	1	100
Florentino x Lady Jane	2	1	50
Florentino x Mumuhara	2	1	50
Rabido x Figo	2	1	50

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การผสมติดของเกสรหน้าวัวคู่ผสมต่าง ๆ ประจำปี 2549

คู่ผสม	จำนวนดอกที่ผสม	จำนวนดอกที่ผสมติด	เปอร์เซ็นต์การผสมติด
Fantasia x เปลวเทียนภูเก็ต	2	2	100
Figo x Simba	1	1	100
Figo x Sonate	1	1	100
Florentino x Simba	2	2	100
Florentino x เปลวเทียนภูเก็ต	1	1	100
Non2 x Non1	1	1	100
Sonate x Op.	1	1	100
Sonate x เปลวเทียนภูเก็ต	2	1	50
Terra x Lady Jane	2	2	100
Terra x Simba	2	2	100
Tropical x เปลวเทียนภูเก็ต	2	2	100
เปลวเทียนภูเก็ต x Lady Jane	2	2	100

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การผสมติดของเกสรหน้าวัวคู่ผสมต่าง ๆ ประจำปี 2550

คู่ผสม	จำนวนดอกที่ผสม	จำนวนดอกที่ผสมติด	เปอร์เซ็นต์การผสมติด
Figo x OP.	2	2	100
Florentino x Sonate	1	1	100
Florentino x Amingo	1	1	100
Florentino x Simba	2	1	50
Terra x Sonate	1	1	100
Terra x Prety Ann	1	1	100
Terra x Amingo	1	1	100
Mumuhara x OP.	1	1	100
Prety Ann x Amingo	1	1	100
Rabido x Simba	1	1	100
นาไก x เปลวเทียน	1	1	100
Terra x เปลวเทียน	1	1	100
Sonate x OP.	1	1	100
Simba x OP.	1	1	100
Terra x simba	1	1	100

ก

ข

ภาพที่ 6 ลักษณะผลและเมล็ดหน้าวัวหลังจาการผสมเกสร 5 เดือน ของคู่ผสม Rabido x Sonate

ก ผลหน้าวัวที่แก่เต็มที่

ข เมล็ดหน้าวัวที่สุกแก่ อายุ 5 เดือน

การเพาะเมล็ดหน้าวัวลูกผสม

การเพาะเมล็ดหน้าวัวลูกผสมตั้งแต่ปี 2547 ถึงเดือนมีนาคม 2549 ได้เมล็ดหน้าวัวคู่ผสมต่างๆ จำนวน 18 คู่ผสม เมื่อเพาะเมล็ดพบว่ามีจำนวน 7 คู่ผสมที่งอกและเจริญเติบโตเป็นต้นกล้า โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกตั้งแต่ 6.06-100 เปอร์เซ็นต์ คู่ผสมที่ได้ต้นกล้า แสดงในตารางที่ 6-9

ตารางที่ 6 การเพาะเมล็ดหน้าวัวคู่ผสมต่าง ๆ ปี 2547

คู่ผสม	จำนวนเมล็ดที่เพาะ	จำนวนเมล็ดที่งอก	เปอร์เซ็นต์การงอก
Florentino x Sonate	28	8	28.57
Rabido x Sonate	150	10	6.66
Sonate x Sonate	5	1	20
Spirit x Sonate	10	0	0

ตารางที่ 7 การเพาะเมล็ดหน้าวัวคู่ผสมต่าง ๆ ปี 2548

คู่ผสม	จำนวนเมล็ดที่เพาะ	จำนวนเมล็ดที่งอก	เปอร์เซ็นต์การงอก
Acropolis x Acropolis	10	0	0
Acropolis x Amingo	10	0	0
Acropolis x Lady Jane	10	0	0
Amingo x Acropolis	10	0	0
Amingo x Amingo	10	0	0
Figo x Merenge	5	5	100
Figo x Amingo	10	0	0
Figo x Acropolis	10	0	0
Figo x Mumuhara	98	36	36.73
Florentino x Lady Jane	66	47	71.21
Florentino x Mumuhara	40	26	65
Midori x จักรพรรดิ์	5	0	0
Midori x Amingo	10	0	0
Spirit x Acropolis	10	0	0

ตารางที่ 8 การเพาะเมล็ดหน้าวัวคู่ผสมประจำปี 2549

คู่ผสม	จำนวนเมล็ดที่เพาะ	จำนวนเมล็ดที่งอก	เปอร์เซ็นต์การงอก
Figo x Lady Jane	120	110	91.66
Florentino x Lady Jane	30	18	60
Rabido x เปลวเทียนภูเก็ต	30	20	66.66
Rabido x Sonate	40	10	25

ตารางที่ 9 การเพาะเมล็ดหน้าวัวคู่ผสมประจำปี 2550

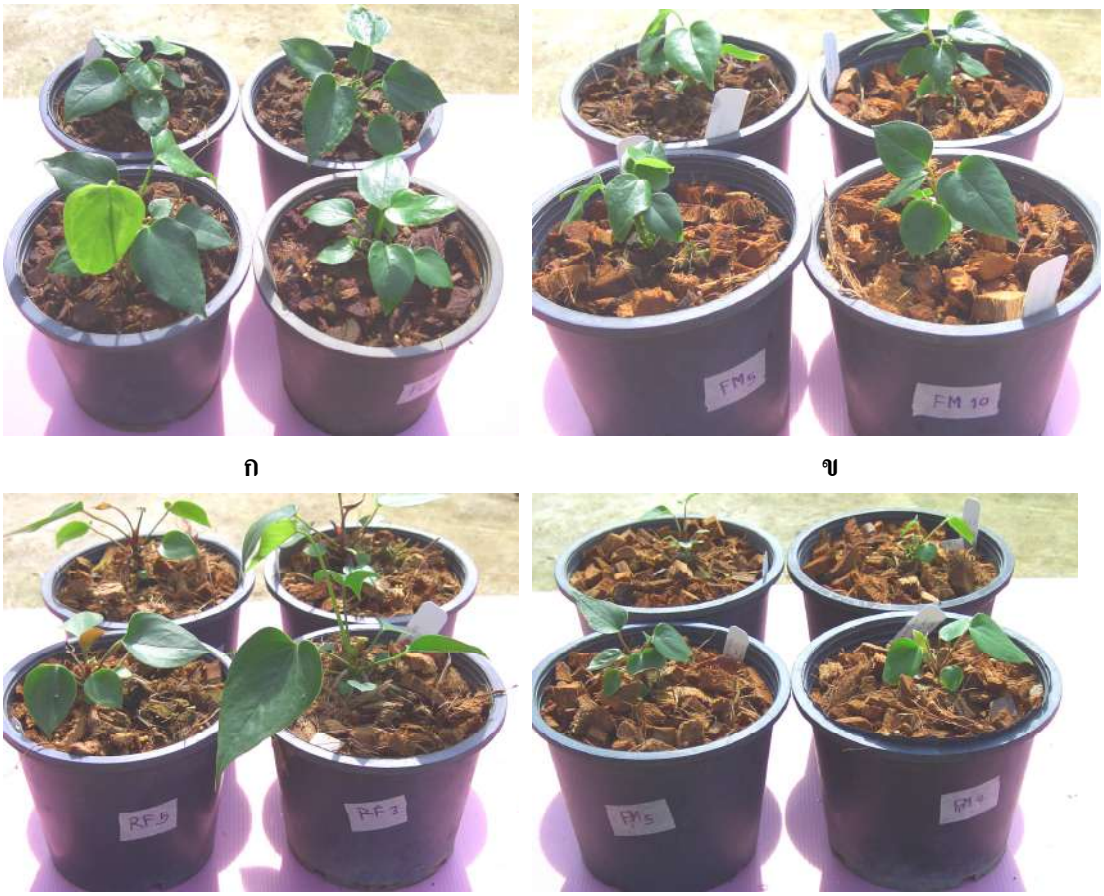
คู่ผสม	จำนวนเมล็ดที่เพาะ	จำนวนเมล็ดที่งอก	เปอร์เซ็นต์การงอก
Terra x Simba	55	13	23.63
Prety Ann x Amigo	13	2	15.38
Sonate x Op.	56	12	21.42
Terra x Amigo	14	2	14.28
Rabido x Simba	25	22	88
นาไก x เปลวเทียน	112	100	89.28

การเจริญเติบโตของหน้าวัวลูกผสม

หลังจากนำต้นกล้าย้ายไปปลูก พบว่า ต้นกล้าเจริญเติบโตได้ 6 คู่ผสม รวมทั้งหมด 121 ต้น โดยมีอายุ 7-9 เดือน จำนวนใบเฉลี่ย 5-9 ใบ ความกว้างของทรงพุ่ม 4-15 เซนติเมตร และความสูง 3-7 เซนติเมตร ดังตารางที่ 10 และภาพที่ 7 (เพิ่มเติมในภาพผนวกที่ 2)

ตารางที่ 10 การเจริญเติบโตของหน้าวัวลูกผสมคู่ต่าง ๆ

คู่ผสม	จำนวนต้น	อายุ (เดือน)	จำนวนใบ	ความกว้างทรงพุ่ม (เซนติเมตร)	ความสูง (เซนติเมตร)
Figo xMumuhara	32	7	8	6	4
Figo x Lady Jane	9	7	5	4	3
Rabido x Figo	9	9	9	15	7
Florentino x Mumuhara	28	9	9	9	6
Florentino x Lady Jane	38	9	8	14	6
ไม่ทราบพ่อแม่	5	7	6	4	3
รวม	**121**	**7-9**	**5-9**	**4-15**	**3-7**



ก **ข**

ค **ง**

ภาพที่ 7 ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานของลูกผสมหน้าวัวคู่ผสมต่าง ๆ ที่มีอายุ 7-9 เดือน

ก Florentino x Lady Jane **ข** Florentino x Mumuhara

ค Rabido x Figo **ง** Figo xMumuhara

การออกดอกของหน้าวัวลูกผสมบางคู่

หลังจากศึกษาการเจริญในเบื้องต้น และเลี้ยงดูหน้าวัวคู่ผสมต่าง ๆ ในสภาพเรือนซาแลน ต่อมาเป็นเวลา 2-3 ปี พบว่าบางคู่ผสมเริ่มสร้างดอกให้เห็น คู่ผสมดังกล่าวคือ Florentino x Lady Jane Florentino x Mumuhara Rabido x Figo และ Figo x Mumuhara (ภาพที่ 8)ในขณะที่บางคู่ผสมไม่มีการสร้างดอกในช่วงระยะเวลาดังกล่าว หรือแม้จะเลี้ยงดูเป็นเวลานานกว่า 3 ปีก็ตาม คู่ผสมดังกล่าวคือ Florentino x Sonate เมื่อพิจารณาสีดอกของลูกผสมที่ได้มีการกระจายตัวในระดับที่แตกต่างกันออกไป

ก

Florentino x Lady Jane อายุ 2 ปี 8 เดือน

ข

Florentino x Mumuhara อายุ 2 ปี 8 เดือน

ค

Figo x Mumuhara อายุ 2 ปี 7 เดือน

ภาพที่ 8 ตัวอย่างคู่ผสมที่ออกดอกหลังจากปลูกในสภาพเรือนซาแลนเป็นเวลา 2-3 ปี

ระหว่าง Florentino x Lady jane ให้สีของจานรองดอกมีการกระจายตัวสูงมากตั้งแต่สีแดง สีขาว จนกระทั่งสีเขียว ในทำนองเดียวกับปลีดอกที่มีสีตั้งแต่ชมพู แดง จนถึงสีเขียว (ภาพที่ 8 ก) ส่วนลูกผสมระหว่าง Florentino x Mumuhara และ Figo x Mumuhara มีการกระจายตัวของสีจานรองดอก และปลีดอกน้อยกว่า โดยทั้งสีของจานรองดอก และปลีดอกมีสีแดงในระดับต่าง ๆ กัน ไม่มีส่วนผสมของสีเขียวออกมาให้เห็นเหมือนคู่ผสมแรก ก่อนที่จะมีการปล่อยพันธุ์ออกไปปลูกต้องรอความคงตัวในลักษณะก่อนที่จะมีการกระจายพันธุ์เพื่อให้เกษตรกรปลูกต่อไป นอกจากนี้ลูกผสมที่ได้ต้องมีการดูแลเป็นอย่างดีเพื่อไว้รอผสมตัวเองผลิตลูกในชั่วที่สอง หรือผสมกลับไปยังพ่อ หรือ แม่ ซึ่งคาดว่าจะได้ลักษณะที่ต้องการจำนวนมากพร้อมที่จะเลือกไว้ใช้เป็นหน้าวัวไม้ตัดดอกในภาคใต้ต่อไป

บทที่ 3
การทดสอบความต้านทานต่อโรคใบไหม้

ตอนที่ 1

การทดสอบความต้านทานต่อโรคใบไหม้

การเตรียมเชื้อ

การเก็บตัวอย่างโรค

ทำการเก็บตัวอย่างหน้าวัวที่เป็นโรค บันทึกข้อมูลสถานที่ พันธุ์หน้าวัว ส่วนของพืชที่เกิดโรค ลักษณะอาการ และระดับการระบาดในสวน โดยเลือกเก็บใบที่แสดงอาการโรครุนแรง จำนวน 3-5 ตัวอย่าง บรรจุตัวอย่างในถุงพลาสติก

การวินิจฉัยเบื้องต้น

ทำการบันทึกข้อมูลก่อนนำไปแยกเชื้อ โดยวาดรูปและถ่ายภาพ จากนั้นทำการตรวจกลุ่มของแบคทีเรีย (bacterial ooze) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound จากนั้นจึงนำไปแยกเชื้อบริสุทธิ์

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

ทุกขั้นตอนในการปฏิบัติ กระทำโดยวิธีการที่ปราศจากเชื้อ (aseptic technique) โดยนำตัวอย่างที่มี bacterial ooze ทำความสะอาดตัวอย่างโดยล้างผ่านน้ำไหล ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 5 x 5 ตารางมิลลิเมตร จากนั้นแช่ในสารละลายคลอร๊อก 10% นาน 10 นาที ล้างในน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง นำมาบดขยี้ในหลอดทดลอง จากนั้นทำการแยกเชื้อโดยวิธี streaking plate บนอาหาร potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±1 ºC เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ลักษณะสีเหลืองเป็นมัน ผิวหน้าโค้งนูน ขอบเรียบ ขนาดประมาณ 1-2 มม. ซึ่งคาดว่าเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรค เก็บในหลอดที่มีอาหาร nutrient agar (NA slant) เพื่อทำการศึกษาต่อไปตามวิธีการของ Schaad และคณะ (2001)

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับหน้าวัว

การเตรียมพืช

เตรียมต้นหน้าวัวสายพันธุ์ Tropical อายุ 1 ปี 6 เดือน ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ใช้ถ่านและกะลาปาล์มน้ำมันเผาเป็นวัสดุปลูก แต่ละต้นคลุมด้วยถุงพลาสติกซึ่งพ่นน้ำไว้ภายในก่อนการปลูกเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. การเลือกใช้หน้าวัวสายพันธุ์

Tropical ทดสอบความสามารถในการเกิดโรคเนื่องจาก จากการสำรวจพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการเกิดโรคชนิดนี้

การปลูกเชื้อ

ทำการย้ายเชื้อที่เก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA slant มาเพิ่มปริมาณเชื้อ 2 ครั้ง ในอาหาร PSA slant แล้วย้ายไปเลี้ยงต่อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA เก็บไว้ในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาทำให้เป็นสารแขวนลอยแบคทีเรียด้วยน้ำกลั่น (bacterial suspension) ปรับให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 cfu/มล. (หน่วยโคโลนีต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร) ที่ 0.5 McFarland ทำการปลูกเชื้อโดยการฉีดพ่นสารแขวนลอยแบคทีเรีย บนใบหน้าวัวที่ใช้ทดสอบทุกใบ ส่วนชุดควบคุมฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น คลุมต้นอีกครั้งด้วยถุงพลาสติกเพื่อเพิ่มความชื้นเป็นเวลา 24 ชม. จึงนำถุงออก หลังจากปลูกเชื้อแล้วทำการให้น้ำตามปกติ บันทึกระยะเวลาที่พืชเริ่มแสดงอาการโรค

การบันทึกข้อมูล

ทำการนับจำนวนแผลและขนาดของแผลบนใบหลังปลูกเชื้อ 7, 8, 10, 13, 17, 22 และ 30 วัน บันทึกขนาดและการขยายตัวของแผล โดยการนำแผ่นใสมาทาบบนใบที่แสดงอาการ และวาดรูปแผลบนใบ หลังจากนั้นนำแผ่นใสที่บันทึกพื้นที่ใบและขนาดของแผลมาลอกใส่กระดาษถ่ายเอกสาร A4 โดยใช้ดินสอที่มีความเข้ม 2B ขึ้นไป นำกระดาษที่ลอกอาการและพื้นที่ใบไปเข้าเครื่อง Scanner เพื่อเก็บบันทึกและวัดพื้นที่ใบและอาการของโรค นำข้อมูลที่ได้ไปหาพื้นที่ใบที่แสดงอาการโรคด้วยโปรแกรม DT-SCAN ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคหลังจากปลูกเชื้อ 30 วัน

ตอนที่ 2

การตรวจสอบการเกิดโรค

วิธีการ

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์อีกครั้ง จากหน้าวัวที่แสดงอาการโรคใบไหม้จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี โดยทำการศึกษาตั้งแต่ระดับสกุล (genus) และชนิด (species) ของเชื้อ ทุกขั้นตอนปฏิบัติตามวิธีการ รวมทั้งเทียบเคียงจากผลการทดลองของ Schaad และคณะ (2001)

การศึกษาระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในหน้าวัวสายพันธุ์ต่าง ๆ

การเตรียมพืช

เตรียมต้นหน้าวัว 5 สายพันธุ์ ๆ ละ 10 ต้น อายุ 1 ปี 6 เดือน ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ สายพันธุ์ Acropolis Alexis Calipso Sweet heart pink และ Tropical ปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ใช้ถ่านและกะลาปาล์มน้ำมันเผาเป็นวัสดุปลูก แต่ละต้นคลุมด้วยถุงพลาสติกซึ่งพ่นน้ำไว้ภายในก่อนการปลูกเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) 10 ซ้ำ ส่วนชุดควบคุมจำนวน 5 สายพันธุ์ ๆ ละ 1 ต้น

การปลูกเชื้อ

นำเชื้อสาเหตุสายโรค 3321-2 ซึ่งก่อให้เกิดโรครุนแรงจากการทดสอบในความสามารถในการทำให้เกิดโรค มาศึกษาระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในหน้าวัวสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยทำการย้ายเชื้อที่เก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA slant มาเพิ่มปริมาณเชื้อ 2 ครั้งในอาหาร PSA slant แล้วย้ายไปเลี้ยงต่อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA เก็บไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาทำให้เป็นสารแขวนลอยแบคทีเรียด้วยน้ำกลั่น ปรับให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 หน่วยโคโลนี/มล. ที่ 0.5 McFarland ทำการปลูกเชื้อโดยการฉีดพ่นสารแขวนลอยแบคทีเรียบนใบหน้าวัวที่ใช้ทดสอบจำนวน 10 ต้น ชุดควบคุมฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น คลุมใบอีกครั้งด้วยถุงพลาสติกเพื่อเพิ่มความชื้นเป็นเวลา 24 ชม. จึงนำถุงออก หลังจากปลูกเชื้อแล้วทำการให้น้ำตามปกติ บันทึกลักษณะแผลและระยะเวลาเมื่อพืชเริ่มแสดงอาการ

การบันทึกข้อมูล

วัดขนาดของแผลบนใบหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน จำนวน 5 ใบนับจากยอด โดยนำกระดาษลอกลายมาทาบบนใบวาดรูปใบและแผลบนใบ หลังจากนั้นนำกระดาษลอกลายที่บันทึกพื้นที่ใบและ

ขนาดของแผลมาลอกใส่กระดาษถ่ายเอกสาร A4 โดยใช้ดินสอที่มีความเข้ม 2B ขึ้นไป นำกระดาษที่ลอกอาการและพื้นที่ใบไปเข้าเครื่อง scanner เพื่อเก็บบันทึกข้อมูล และวิเคราะห์หาพื้นที่ใบที่แสดงอาการโรค ด้วยโปรแกรม DT-SCAN รวมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Reynolds and Cunfer, 1997)

ตอนที่ 3

ศึกษาระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในหน้าวัว 6 สายพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อและแม่พันธุ์ในการผสมเกสร

การเตรียมพืช

เตรียมต้นหน้าวัว 6 พันธุ์ ๆ ละ 10 ต้น อายุ 1 ปี 6 เดือน ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ สายพันธุ์ สุลต่าน Alexis Amingo President Rabido และ Simba ปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ใช้ถ่านและกะลาปาล์มน้ำมันเผาเป็นวัสดุปลูก แต่ละต้นคลุมด้วยถุงพลาสติกซึ่งพ่นน้ำไว้ภายในก่อนการปลูกเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) 10 ซ้ำ ส่วนชุดควบคุมจำนวน 6 สายพันธุ์ ๆ ละ 1 ต้น

การปลูกเชื้อ

นำเชื้อสาเหตุสายโรค 3321-2 ซึ่งก่อให้เกิดโรครุนแรงจากการทดสอบในความสามารถในการทำให้เกิดโรค มาศึกษาระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในหน้าวัวสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยทำการย้ายเชื้อที่เก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA slant มาเพิ่มปริมาณเชื้อ 2 ครั้งในอาหาร PSA slant แล้วย้ายไปเลี้ยงต่อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA เก็บไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาทำให้เป็นสารแขวนลอยแบคทีเรียด้วยน้ำกลั่น ปรับให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 cfu/มล. ที่ 0.5 McFarland ทำการปลูกเชื้อโดยการฉีดพ่นสารแขวนลอยแบคทีเรียบนใบหน้าวัวที่ใช้ทดสอบจำนวน 10 ต้น ชุดควบคุมฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น คลุมใบอีกครั้งด้วยถุงพลาสติกเพื่อเพิ่มความชื้นเป็นเวลา 24 ชม. จึงนำถุงออก หลังจากปลูกเชื้อแล้วทำการให้น้ำตามปกติ บันทึกลักษณะแผลและระยะเวลาเมื่อพืชเริ่มแสดงอาการ

การบันทึกข้อมูล

ทำการวัดขนาดของแผลบนใบหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน โดยวัด 5 ใบนับจากยอด แล้วนำมาบันทึกขนาดและการขยายตัวของแผล โดยการนำกระดาษลอกลายมาทาบบนใบที่แสดงอาการและทำ

การวาดรูปแผลบนใบ หลังจากนั้นนำกระดาษลอกลายที่บันทึกพื้นที่ใบและขนาดของแผลมาลอกใส่กระดาษถ่ายเอกสาร A4 โดยใช้ดินสอที่มีความเข้ม 2B ขึ้นไป นำกระดาษที่ลอกอาการและพื้นที่ใบไปเข้าเครื่อง scanner เพื่อเก็บบันทึกข้อมูล วัดพื้นที่ใบและส่วนที่แสดงอาการโรคด้วยโปรแกรม DT-SCAN และหาร้อยละของพื้นที่ใบที่เกิดโรคในแต่ละใบ รวมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Reynolds and Cunfer, 1997)

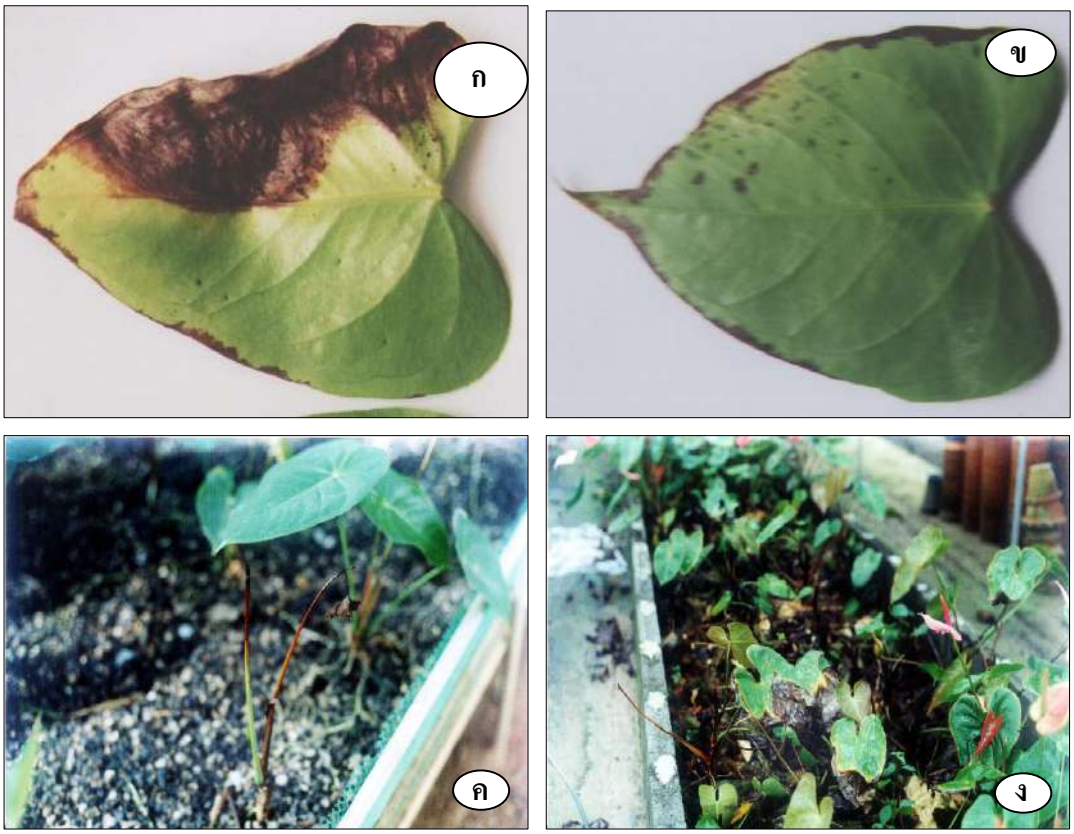
ผล

การทดสอบความต้านทานต่อโรคใบไหม้

ตอนที่ 1

การเก็บตัวอย่างโรคและการแยกเชื้อบริสุทธิ์

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างหน้าวัวที่มีอาการโรคใบไหม้จำนวน 50 ตัวอย่าง ในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช ชุมพร กระบี่ และภูเก็ต พบว่าในเกือบทุกพื้นที่ของการปลูกหน้าวัวมีปัญหาการระบาดของโรคใบไหม้ที่เกิดจากแบคทีเรีย โดยอาการของโรคที่สังเกตได้ในตอนแรกคือ จุดแผลฉ่ำน้ำสีเขียวเข้มบนใบและดอก ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอน รวมทั้งใบไหม้ แห้งและตายทั้งต้น ดังแสดงในภาพที่ 1 ในสภาพอากาศชื้นมี bacterial ooze ที่ใต้ผิวใบ (ภาพที่ 9) จึงนำตัวอย่างที่เก็บได้มาทำการแยกเชื้อโดยวิธี streaking plate บนอาหาร PSA จากนั้นเลือกเก็บโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่มีลักษณะกลมนูนและเป็นมัน สีเหลือง ได้เชื้อบริสุทธิ์จำนวน 20 ไอโซเลต แล้วย้ายไปเลี้ยงต่อในอาหาร NA slant เพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 9 อาการโรคใบไหม้ของหน้าวัวและความเสียหายในระบบะการปลูกในโรงเรือน

ก. อาการที่เชื้อเข้าทำลายทาง hydrathode

ข. อาการที่เชื้อเข้าทำลายทาง stomata

ค. อาการแบบแพร่กระจายทั้งต้น

ง. ความเสียหายที่เกิดขึ้นในแปลงปลูกของเกษตรกร

การทดสอบการเกิดโรค

จากการทดสอบความสามารถในการให้เกิดโรคกับหน้าวัวของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลต กับหน้าวัวสายพันธุ์ Tropical พบว่าเชื้อสาเหตุทั้ง 20 สายโรค สามารถทำให้หน้าวัวแสดงอาการโรคได้ โดยพืชเริ่มแสดงอาการครั้งแรก ลักษณะเป็นแผลฉ่ำน้ำสีเขียวเข้ม จนใบไหม้และแห้งตายในที่สุด หลังการปลูกเชื้อ40-50 วัน ส่วนชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นไม่แสดงอาการของโรค สายพันธุ์เชื้อที่ทำให้หน้าวัวแสดงอาการโรครุนแรงที่สุดคือ สายโรค 3321-2 โดยเฉลี่ยจากจำนวนใบที่เป็นโรคต่อจำนวนใบที่ปกติ (Little and Hills, 1978 อ้างถึงใน Norman and Henny, 1986) ดังแสดงในภาพที่ 10

เมื่อนำหน้าวัวที่แสดงอาการใบไหม้ จากการทดสอบการเกิดโรคมาทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์อีกครั้ง และทำการจำแนกชนิดของเชื้อ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ตามวิธีการของ Schaad และคณะ (2001) พบว่าเชื้อทั้ง 20 สายโรค เป็นเชื้อ *Xanthomonas*

ภาพที่ 10 ความรุนแรงในการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย 4 สายโรคบนใบหน้าวัวสายพันธุ์ Tropical หลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน

ก. อาการโรคจากการปลูกเชื้อ ไอโซเลต 3114-1

ข. อาการโรคจากการปลูกเชื้อ ไอโซเลต 3321-2

ค. อาการโรคจากการปลูกเชื้อ ไอโซเลต 5123-1

ง. อาการโรคจากการปลูกเชื้อ ไอโซเลต 6128-1

ตอนที่ 2

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

จากการแยกเชื้อบริสุทธิ์อีกครั้ง จากหน้าวัวที่แสดงอาการโรคใบไหม้จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี พบว่าเชื้อทั้งหมดเป็น *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*

ศึกษาระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในหน้าวัว 5 สายพันธุ์

การเกิดโรคและระดับความรุนแรงของการเกิดโรคกับหน้าวัวสายพันธุ์ Acropolis

จากการทดสอบการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุสายโรค 3321-2 สามารถทำให้เกิดโรคใบไหม้กับหน้าวัวสายพันธุ์ Acropolis ได้ ดังแสดงในภาพที่ 10-11 โดยแสดงอาการครั้งแรกในวันที่ 8 หลังจากการปลูกเชื้อ อาการที่สังเกตได้ครั้งแรกคือจุดฉ่ำน้ำสีเขียวเข้มบนใบกับใบที่ 1 นับจากยอด ต่อมาแสดงอาการกับใบที่ 2 วันที่ 10 และแสดงอาการกับใบที่ 3- 5 หลังจากวันที่ 15 ตามลำดับ ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอนและเมื่อทำการวัดขนาดของแผลบนใบหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน โดยบันทึกขนาดและการขยายตัวของแผลพบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ใบที่เกิดโรคคือ 7.50

การเกิดโรคและระดับความรุนแรงของการเกิดโรคกับหน้าวัวสายพันธุ์ Alexis

จากการทดสอบการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุสายโรค 3321-2 สามารถทำให้เกิดโรคใบไหม้กับหน้าวัวสายพันธุ์ Alexis ได้ ดังแสดงในภาพที่ 11-12 โดยแสดงอาการครั้งแรกในวันที่ 8 หลังจากการปลูกเชื้อ อาการที่สังเกตได้ครั้งแรกคือจุดฉ่ำน้ำสีเขียวเข้มบนใบกับใบที่ 1 นับจากยอด ต่อมาแสดงอาการกับใบที่ 2 วันที่ 10 และแสดงอาการกับใบที่ 3- 5 หลังจากวันที่ 16 ตามลำดับ ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอนและเมื่อทำการวัดขนาดของแผลบนใบหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน โดยบันทึกขนาดและการขยายตัวของแผลพบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ใบที่เกิดโรคคือ 18.02

การเกิดโรคและระดับความรุนแรงของการเกิดโรคกับหน้าวัวสายพันธุ์ Calipso

จากการทดสอบการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุสายโรค 3321-2 สามารถทำให้เกิดโรคใบไหม้กับหน้าวัวสายพันธุ์ Calipso ได้ ดังแสดงในภาพที่ 11-12 โดยแสดงอาการครั้งแรกในวันที่ 8 หลังจากการปลูกเชื้อ อาการที่สังเกตได้ครั้งแรกคือจุดฉ่ำน้ำสีเขียวเข้มบนใบกับใบที่ 1 นับจากยอด ต่อมาแสดงอาการกับใบที่ 2 วันที่ 8 และแสดงอาการกับใบที่ 3- 5 หลังจากวันที่ 15 ตามลำดับ ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอนและเมื่อทำการวัดขนาดของแผลบนใบหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน โดยบันทึกขนาดและการขยายตัวของแผลพบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ใบที่เกิดโรคคือ 4.18

การเกิดโรคและระดับความรุนแรงของการเกิดโรคกับหน้าวัวสายพันธุ์ Sweet heart pink

จากการทดสอบการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุสายโรค 3321-2 สามารถทำให้เกิดโรคใบไหม้กับหน้าวัวสายพันธุ์ Sweet heart pink ได้ ดังแสดงในภาพที่ 11-12 โดยแสดงอาการครั้งแรกในวันที่ 10 หลังจากการปลูกเชื้อ อาการที่สังเกตได้ครั้งแรกคือจุดฉ่ำน้ำสีเขียวเข้มบนใบกับใบที่ 4 และ 5 นับจากยอด ต่อมาแสดงอาการกับใบที่ 1 2 วันที่ 15 และแสดงอาการกับใบที่ 3 หลังจากวันที่ 18 ตามลำดับ ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอนและเมื่อทำการวัดขนาดของแผลบนใบหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน โดยบันทึกขนาดและการขยายตัวของแผลพบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ใบที่เกิดโรคคือ 3.73

การเกิดโรคและระดับความรุนแรงของการเกิดโรคกับหน้าวัวสายพันธุ์ Tropical

จากการทดสอบการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค isolate 3321-2 สามารถทำให้เกิดโรคใบไหม้กับหน้าวัวสายพันธุ์ Tropical ได้ ดังแสดงในภาพที่ 11-12 โดยพืชเริ่มแสดงอาการครั้งแรกในวันที่ 6 หลังจากการปลูกเชื้อ อาการที่สังเกตได้ครั้งแรกคือจุดฉ่ำน้ำสีเขียวเข้มบนใบกับใบที่ 1 นับจากยอด ต่อมาแสดงอาการกับใบที่ 2 ในวันที่ 8 และแสดงอาการกับใบที่ 3-5 หลังจากวันที่ 15 ตามลำดับ ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอน เมื่อทำการวัดขนาดของแผลบนใบหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน โดยบันทึกขนาดและการขยายตัวของแผลพบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ใบที่เกิดโรคคือ 12.89

จากการศึกษาระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในหน้าวัว 5 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ Alexis มีความรุนแรงของการเกิดโรคมากกว่าหน้าวัวสายพันธุ์อื่น ๆ คือร้อยละ 18.02 รองลงมาคือ Tropical

Acropolis Calipso และ Sweet heart pink โดยมีร้อยละของการเกิดโรค 12.89 7.50 4.18 และ 3.73 ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าในหน้าวัวจำนวน 5 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบนั้น หน้าวัวสายพันธุ์ Sweet heart pink มีความต้านทานต่อโรคนี้ ในขณะที่หน้าวัวสายพันธุ์ Alexis ค่อนข้างอ่อนแอต่อการเกิดโรคนี้

ภาพที่ 11 การเกิดโรคบนใบหน้าวัวสายพันธุ์ต่าง ๆ หลังปลูกเชื้อ *X.. axonopodis.* pv. *dieffenbachiae* 8 วัน

ก. Acropolis ข. Alexis

ค. Calipso ง. Sweet heart pink

จ. Tropical ฉ. Alexis (ชุดควบคุม)

ภาพที่ 12 การเกิดโรคบนใบหน้าวัวสายพันธุ์ต่าง ๆ หลังปลูกเชื้อ *X. axonopodis.* pv. *dieffenbachiae* 20 วัน

ก. Acropolis ข. Alexis

ค. Calipso ง. Sweet heart pink

จ. Tropical ฉ. Acropolis (ชุดควบคุม)

ตอนที่ 3

ศึกษาระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในหน้าวัว 6 สายพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อและแม่ พันธุ์ในการผสมเกสร

การเกิดโรคและระดับความรุนแรงของการเกิดโรคกับหน้าวัวสายพันธุ์ สุลต่าน

จากการทดสอบการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรค พบว่า เชื้อแบคทีเรียสาเหตุสายโรค 3321-2 สามารถทำให้เกิดโรคใบไหม้กับหน้าวัวสายพันธุ์ สุลต่านได้ ดังแสดงในภาพที่ 13 โดยแสดงอาการครั้งแรกในวันที่ 6 หลังจากการปลูกเชื้อ อาการที่สังเกตได้ครั้งแรกคือจุดฉ่ำน้ำสีเขียวเข้มบนใบกับใบที่ 1 นับจากยอด ต่อมาแสดงอาการกับใบที่ 2 วันที่ 8 และแสดงอาการกับใบที่ 3- 5 หลังจากวันที่ 10 ตามลำดับ ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอนและเมื่อทำการวัดขนาดของแผลบนใบหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน โดยบันทึกขนาดและการขยายตัวของแผลพบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ใบที่เกิดโรคคือ 9.69

การเกิดโรคและระดับความรุนแรงของการเกิดโรคกับหน้าวัวสายพันธุ์ Alexis

จากการทดสอบการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุสายโรค 3321-2 สามารถทำให้เกิดโรคใบไหม้กับหน้าวัวสายพันธุ์ Alexis ได้ ดังแสดงในภาพที่ 13 โดยแสดงอาการครั้งแรกในวันที่ 8 หลังจากการปลูกเชื้อ อาการที่สังเกตได้ครั้งแรกคือจุดฉ่ำน้ำสีเขียวเข้มบนใบกับใบที่ 1 นับจากยอด ต่อมาแสดงอาการกับใบที่ 2 วันที่ 10 และแสดงอาการกับใบที่ 3- 5 หลังจากวันที่ 15 ตามลำดับ ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอนและเมื่อทำการวัดขนาดของแผลบนใบหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน โดยบันทึกขนาดและการขยายตัวของแผลพบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ใบที่เกิดโรคคือ 18.42

การเกิดโรคและระดับความรุนแรงของการเกิดโรคกับหน้าวัวสายพันธุ์ Amingo

จากการทดสอบการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุสายโรค 3321-2 สามารถทำให้เกิดโรคใบไหม้กับหน้าวัวสายพันธุ์ Amingo ได้ ดังแสดงในภาพที่ 13 โดยแสดงอาการครั้งแรกในวันที่ 7 หลังจากการปลูกเชื้อ อาการที่สังเกตได้ครั้งแรกคือจุดฉ่ำน้ำสีเขียวเข้มบนใบกับใบที่ 1 นับจากยอด ต่อมาแสดงอาการกับใบที่ 2 วันที่ 8 และแสดงอาการกับใบที่ 3- 5

หลังจากวันที่ 12 ตามลำดับ ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอนและเมื่อทำการวัดขนาดของแผลบนใบหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน โดยบันทึกขนาดและการขยายตัวของแผลพบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ใบที่เกิดโรคคือ 10.23

การเกิดโรคและระดับความรุนแรงของการเกิดโรคกับหน้าวัวสายพันธุ์ President

จากการทดสอบการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุสายโรค 3321-2 สามารถทำให้เกิดโรคใบไหม้กับหน้าวัวสายพันธุ์ President ได้ ดังแสดงในภาพที่ 13 โดยแสดงอาการครั้งแรกในวันที่ 10 หลังจากการปลูกเชื้อ อาการที่สังเกตได้ครั้งแรกคือจุดฉ่ำน้ำสีเขียวเข้มบนใบกับใบที่ 1 นับจากยอด ต่อมาแสดงอาการกับใบที่ 2 และ 3 ในวันที่ 12 และแสดงอาการกับใบที่ 4 และ 5 หลังจากวันที่ 15 ตามลำดับ ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอนและเมื่อทำการวัดขนาดของแผลบนใบหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน โดยบันทึกขนาดและการขยายตัวของแผลพบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ใบที่เกิดโรค คือ 9.36

การเกิดโรคและระดับความรุนแรงของการเกิดโรคกับหน้าวัวสายพันธุ์ Rabido

จากการทดสอบการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุสายโรค 3321-2 สามารถทำให้เกิดโรคใบไหม้กับหน้าวัวสายพันธุ์ Rabido ได้ ดังแสดงในภาพที่ 13 โดยแสดงอาการครั้งแรกในวันที่ 8 หลังจากการปลูกเชื้อ อาการที่สังเกตได้ครั้งแรกคือจุดฉ่ำน้ำสีเขียวเข้มบนใบกับใบที่ 1 นับจากยอด ต่อมาแสดงอาการกับใบที่ 2 วันที่ 12 และแสดงอาการกับใบที่ 3- 5 หลังจากวันที่ 15 ตามลำดับ ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอนและเมื่อทำการวัดขนาดของแผลบนใบหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน โดยบันทึกขนาดและการขยายตัวของแผลพบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ใบที่เกิดโรคคือ 9.82

การเกิดโรคและระดับความรุนแรงของการเกิดโรคกับหน้าวัวสายพันธุ์ Simba

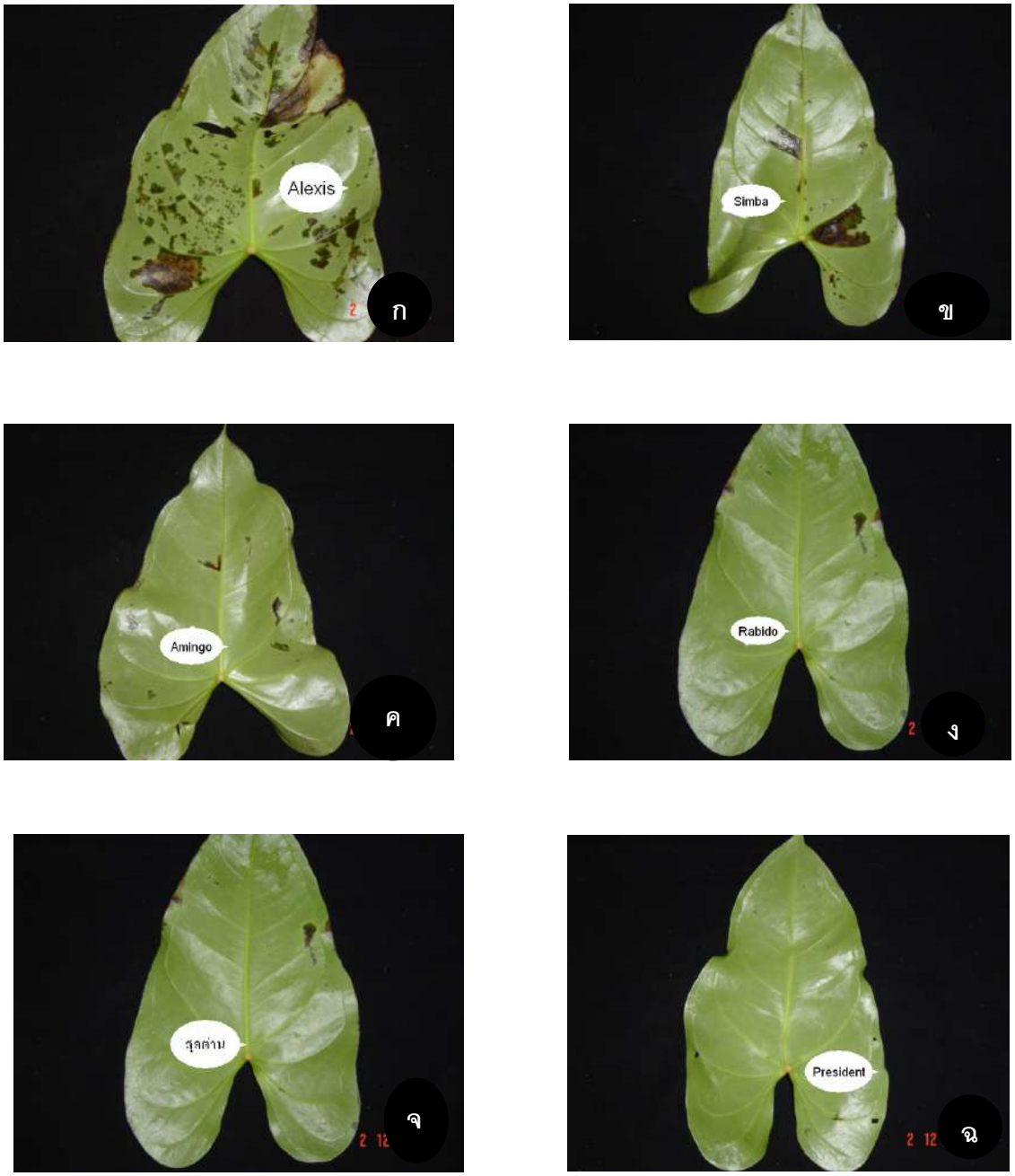
จากการทดสอบการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุสายโรค 3321-2 สามารถทำให้เกิดโรคใบไหม้กับหน้าวัวสายพันธุ์ Simbaได้ ดังแสดงในภาพที่ 13 โดยแสดงอาการครั้งแรกในวันที่ 6 หลังจากการปลูกเชื้อ อาการที่สังเกตได้ครั้งแรกคือจุดฉ่ำน้ำสีเขียวเข้มบนใบกับใบที่ 4 และ 5 นับจากยอด ต่อมาแสดงอาการกับใบที่ 1 2 วันที่ 8 และแสดงอาการกับใบที่ 3

หลังจากวันที่ 12 ตามลำดับ ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอนและเมื่อทำการวัดขนาดของแผลบนใบหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน โดยบันทึกขนาดและการขยายตัวของแผลพบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ใบที่เกิดโรคคือ 12.00

การศึกษาระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในหน้าวัว 6 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ Alexis มีความรุนแรงของการเกิดโรคมากกว่าหน้าวัวสายพันธุ์อื่น ๆ คือร้อยละ 18.42 ซึ่งใกล้เคียงกับการทดสอบระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในครั้งแรกที่มีระดับความรุนแรงร้อยละ 18.02 รองลงมาคือ Tropical Simba ร้อยละ 12.00 ส่วน Amingo Rabido สุลต่าน และ President มีร้อยละของการเกิดโรค 10.23 9.82 9.69 และ 9.36 ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าในหน้าวัวจำนวน 6 สายพันธุ์ที่สามารถผสมเกสรได้ซึ่งนำมาทดสอบนั้น หน้าวัวสายพันธุ์ President มีความต้านทานต่อโรคนี้มากที่สุด ในขณะที่หน้าวัวสายพันธุ์ Alexis ค่อนข้างอ่อนแอต่อการเกิดโรคนี้ ซึ่งจากการทดสอบระดับความรุนแรงของการเกิดโรคใบไหม้ของหน้าวัวสายพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อและแม่พันธุ์จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาระดับความรุนแรงของโรคในหน้าวัวลูกผสมซึ่งจะทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป ความต้านทานต่อโรคที่ทดสอบของหน้าวัวพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อและแม่สำหรับผลิตลูกผสมสรุปในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 สรุปความต้านทานต่อโรคของหน้าวัวพันธุ์พ่อและแม่ที่ใช้ผลิตลูกผสม

พันธุ์/สายพันธุ์	ความเสียหายจากโรค (%)
Sweet heart pink	3.7
Calipso	4.18
Acropolis	7.5
President	9.36
สุลต่าน	9.69
Rabido	9.82
Amigo	10.23
Simba	12.0
Tropical	12.89
Alexis	18.02



ภาพที่ 13 การเกิดโรคบนใบหน้าวัวสายพันธุ์ต่าง ๆ หลังปลูกเชื้อ *Xanthomonas axonopodis pv. dieffenbachiae* เป็นเวลา 30 วัน

ก. Alexis ข. Simba ค. Amingo

ง. Rabido จ. สุลต่าน ฉ. President

เมื่อตรวจสอบการต้านทานโรคของคู่ผสมต่าง ๆ ที่ได้ ในการศึกษานี้ด้วยวิธี artificial inoculation ตามที่อธิบายรายละเอียดข้างต้นแล้วนั้น สามารถแบ่งความต้านทานของคู่ผสมออกเป็น 3 กลุ่ม (ตารางที่ 12) ด้วยกันคือ

1. กลุ่มที่มีความต้านทานสูง มีความเสียหายอันเนื่องมาจากเชื้อสาเหตุโรคพืช 0-15% ลูกผสมในกลุ่มดังกล่าวคือ Florentino x Lady Jane Rabido x เปลวเทียนภูเก็ต เปลวเทียนภูเก็ต x Sonate นาไก x เปลวเทียนภูเก็ต และ Prety Ann x Amigo
2. กลุ่มที่มีความต้านทานปานกลาง มีความเสียหายจากโรค 16-25% ในกลุ่มนี้คือ Rabido x Figo Figo x เปลวเทียนภูเก็ต Sonate x OP. Rabido x Simba และ Terra x Simba
3. กลุ่มที่มีความอ่อนแอ มีความเสียหายจากการทำลายของโรค > 25 % ในกลุ่มนี้คือ Florentino x Sonate Figo xMumuhara Figo x Lady Jane Florentino x Mumuhara Rabido x Sonate Florentino x OP. Florentino x Simba และ Sonate x OP.

เห็นได้ว่าพันธุ์พื้นเมืองของไทยโดยเฉพาะพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ตเป็นพันธุ์ที่มียีนที่มีความต้านทานต่อโรคในระดับสูง เมื่อทำการผสมกับพันธุ์ที่นำมาจากต่างประเทศมีการถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวไปยังลูกผสมได้ในทุกคู่ผสม ส่วนพันธุ์ที่ปล่อยให้มีการผสมเปิดตามธรรมชาติ (open pollinate) ไม่มีแหล่งของยีนที่ต้านทาน ส่งผลให้อ่อนแอต่อโรคใบไหม้ เป็นปัญหาในการปลูกหน้าวัวเป็นการค้าในภาคใต้ของประเทศไทย ดังนั้นข้อควรคำนึงถึงในการปลูกหน้าวัวเป็นการค้าในประเทศไทยคือพันธุ์ที่มีความสามารถในการปรับตัวได้ในบ้านเรา ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มียีนที่เหมาะสมที่จะใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์

ตารางที่ 12 ความสามารถของลูกผสมคู่ต่าง ๆ ในการต้านทานโรคหลังปลูกเชื้อ*Xanthomonas axonopodis pv. dieffenbachiae* เป็นเวลา 30 วัน

คู่ผสม	จำนวนต้นที่รอดชีวิต	จำนวนต้นที่เกิดโรค	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
กลุ่มที่ต้านทานสูง			
Prety Ann x Amigo	2	0	0
นาไก x เปลวเทียนภูเก็ต	98	12	12.24
Rabido x เปลวเทียนภูเก็ต	8	1	12.50
Florentino x Lady Jane	36	5	13.88
เปลวเทียนภูเก็ต x Sonate	7	1	14.28
กลุ่มต้านทานปานกลาง			
Figo x เปลวเทียนภูเก็ต	76	12	15.78
Rabido x Figo	6	1	16.66
Rabido x Simba	22	4	18.18
Sonate x OP.	12	3	25
Terra x Simba	8	2	25
กลุ่มอ่อนแอ			
Florentino x Mumuhara	5	2	40
Florentino x Simba	2	1	50
Terra x Amigo	2	1	50
Florentino x Sonate	2	1	50
Figo x Lady Jane	9	5	55.55
Figo xMumuhara	4	3	75
Rabido x Sonate	1	1	100
Florentino x OP.	1	1	100

บทที่ 4
การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้โคลชิซินและเอทธิลมีเทนซัลโฟเนต

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซินและเอทิธมีเทนซัลโฟเนต (EMS)

1. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

วัสดุ และ อุปกรณ์

วัสดุพืช

ใช้ก้านใบอ่อน และใบอ่อน (อายุ 4 วันเมื่อเริ่มแทงใบอ่อน) ฟอกฆ่าเชื้อทั้ง 2 ชิ้นส่วน โดยแช่เอทธานอลความเข้มข้น 75% นาน 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง แล้วแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20% นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ภายในตู้ย้ายเลี้ยง แล้วชักนำแคลลัสบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มีการเติมอะดีนีนซัลเฟต และลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักและธาตุเหล็กลงครึ่งหนึ่งจากสูตรปกติ เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ BA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก./ล. ชักนำเป็นต้นอ่อนเพื่อใช้ในการศึกษาการทดสอบความต้านทานโรคและการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารละลายโคลชิซินและ EMS

สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงหน้าวัวเป็นอาหารสูตร MMS เติมอะดีนีนซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 มก./ล. และดัดแปลงจากสูตร MS เดิม คือ มีการลดองค์ประกอบของธาตุอาหารหลักบางตัวลงครึ่งหนึ่งจากสูตรเดิมเหลือความเข้มข้นดังนี้คือ NH_4NO_3 825 มก./ล., KNO_3 950 มก./ล. และ KH_2PO_3 85 มก./ล. นอกจากนี้ยังลดความเข้มข้นของ $FeSO_4 7H_2O$ เป็น 13.9 มก./ล. และ Na_2EDTA เป็น 18.65 มก./ล. ปรับ pH 5.7 เมื่อเตรียมอาหารแล้วนำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 1.05 กก./ตร.ซม นาน 15 นาที

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

ในการศึกษานี้ใช้ในหน้าวัวที่เป็นตัวแทนจำนวน 3 พันธุ์ คือพันธุ์ลูกผสมเปิดAmingo พันธุ์สปิริต และพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต ซึ่งเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง ชิ้นส่วนที่ใช้คือ ก้านใบอ่อนและใบอ่อน นำชิ้นส่วนดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เติม BA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 3% และวุ้น 0.75% ระดับ pH 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพมืด อุณหภูมิ 26 $\pm$ 2 °ซ

ภายในขวด 4 ออนซ์ ซึ่งบรรจุอาหาร 15 มล. เพื่อชักนำโนดูลาแคลลัส เพิ่มปริมาณแคลลัสเตรียมใช้ในการทรีตด้วย EMS และเพิ่มปริมาณต้นจากแคลลัสจำนวนมากผ่านกระบวนการออกาโนเจนิซิส ใช้เป็นแหล่งของชิ้นส่วนข้อสำหรับจุ่มแช่โคลชิซินต่อไป

การเตรียมสารโคลชิซิน

เตรียม Stock solution โคลชิซิน ที่ความเข้มข้น 20,000 ppm ปริมาตร 10 มิลลิลิตร การเตรียมทำได้โดยการชั่งโคลชิซิน 200 มิลลิกรัม ละลายน้ำ 10 มิลลิลิตร กรองให้ปราศจากเชื้อด้วยแผ่นกรองมิลลิพอร์ที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 0.45 ไมครอน และเก็บในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง เมื่อต้องการจะใช้ค่อยเจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการ

วิธีการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

ใช้ข้อต้นกล้าในหลอดทดลองอายุ 10 สัปดาห์ ที่ชักนำจากชิ้นส่วนใบของหน้าวัวพันธุ์หน้าวัว 3 สายพันธุ์ข้างต้นนำมาแช่ในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบ/ นาที แล้วกรองสารละลายโคลชิซินออก ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนโคลชิซินหมด และเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ ตรวจสอบลักษณะการเปลี่ยนแปลงดังต่อไปนี้

1. การรอดชีวิตในแต่ละความเข้มข้น และ พันธุ์ของหน้าวัวที่ทดสอบ
2. ลักษณะทางสัณฐานของต้นหน้าวัวที่พัฒนาในหลอดทดลอง
3. ลักษณะทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มชุดโครโมโซมจากต้นกล้าในหลอดทดลอง
4. จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

เปรียบเทียบค่าตัวแปรทั้ง 4 ในแต่ละความเข้มข้น ระยะเวลาการทรีตโคลชิซิน และพันธุ์ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอดใน แฟคทอเรียล เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย DMRT เมื่อต้นหน้าวัวโตย้ายเลี้ยงมาอนุบาลเพื่อปลูกและตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานของดอกและใบต่อไป

การชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้เอทิธมีเทนซัลโฟเนต

ใช้โนดูลาแคลลัส อายุ 10 สัปดาห์ ที่ชักนำจากชิ้นส่วนใบของหน้าวัว 3 สายพันธุ์ข้างต้น มาจุ่มแช่ในสารละลายเอทิธมีเทนซัลโฟเนต เป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ซึ่งเตรียมโดยการดูดตามปริมาตรที่ต้องการแล้วทำให้ปลอดเชื้อ โดยกรองผ่านมิลลิพอร์ขนาดช่อง 0.22 ไมครอน หลังจากนั้นแบ่งถ่าย EMS ที่ต้องการ ปรับความเข้มข้นด้วยอาหารสูตร MS ดัดแปลงปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยนำโนดูลาแคลลัสมาอินคูเบทบนสารละลาย EMS ร่วมกับอาหารเหลว ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาพเขย่าบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 80 รอบ/นาที ความเข้มข้นละ 10 ชิ้น นานเวลา 2 ชั่วโมง แล้วกรองแยกแคลลัสออกจากสารละลาย EMS ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ซับด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อจนแห้ง ย้ายแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำยอด ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 15 วัน ภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ตรวจสอบลักษณะการเปลี่ยนแปลงดังต่อไปนี้

1. การรอดชีวิตในแต่ละความเข้มข้น และ พันธุ์ของหน้าวัวที่ทดสอบ
2. ลักษณะทางสัณฐานของต้นหน้าวัวที่พัฒนาในหลอดทดลอง
3. เครื่องหมายทางชีวเคมีที่แสดงถึงความเปลี่ยนแปลงของยีน
4. ลักษณะทางสัณฐานของหน้าวัวในเรือนซาแลนนอกหลอดทดลอง

เปรียบเทียบค่าตัวแปรทั้ง 4 ในแต่ละความเข้มข้น ระยะเวลาการทรีตโคลชิซิน และพันธุ์โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอดใน แฟคทอเรียล เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย DMRT เมื่อต้นหน้าวัวโตย้ายเลี้ยงมาอนุบาลเพื่อปลูกและตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานของดอกและใบต่อไป

ผล

ผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซินและเอทิธมีเทนซัลโฟเนต (EMS)

ผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

1.1 ผลของพันธุ์และความเข้มข้นของโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิต

การจุ่มแช่ข้อของหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ ที่โคลชิซินความเข้มข้น 0 0.05 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ภายหลังวางเลี้ยงนาน 14 วัน บันทึกอัตราการรอดชีวิต พบว่า การทรีตโคลชิซินที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ส่งผลให้ชิ้นส่วนข้อตายหมด ดังนั้น ในการศึกษานี้และครั้งต่อไปเลือกใช้เวลาการทรีตเพียง 24 ชั่วโมง พบว่า หน้าวัวพันธุ์สปิริตที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (70 เปอร์เซ็นต์) ส่วนความเข้มข้น0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (40 เปอร์เซ็นต์) มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 13) เมื่อวิเคราะห์ด้วยสมการถดถอย (regression analysis) พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.084 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (ภาพที่ 13 ก) หน้าวัวพันธุ์ Amingo ที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (70 เปอร์เซ็นต์) ส่วนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (30 เปอร์เซ็นต์) แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.01) (ตารางที่ 13) เมื่อวิเคราะห์ด้วยสมการถดถอย (regression analysis) พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.078 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (ภาพที่ 14 ข) สำหรับหน้าวัวพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต ที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (80 เปอร์เซ็นต์) ส่วนความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (40 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.01) (ตารางที่ 13) เมื่อวิเคราะห์ด้วยสมการถดถอย พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.088 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (ภาพที่ 14 ค)

เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของโคลชิซิน พบว่า ความเข้มข้นสูงขึ้นทำให้อัตราการรอดชีวิตของข้อหน้าวัวลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.01) โดยเฉพาะความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้การรอดชีวิตของชิ้นส่วนข้อหน้าวัวพันธุ์สปิริต และ พันธุ์ Amingoเหลือ 0 เปอร์เซ็นต์ คงมีเพียงพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ตเท่านั้นที่สามารถทนต่อโคลชิซินที่ความเข้มข้นดังกล่าวได้

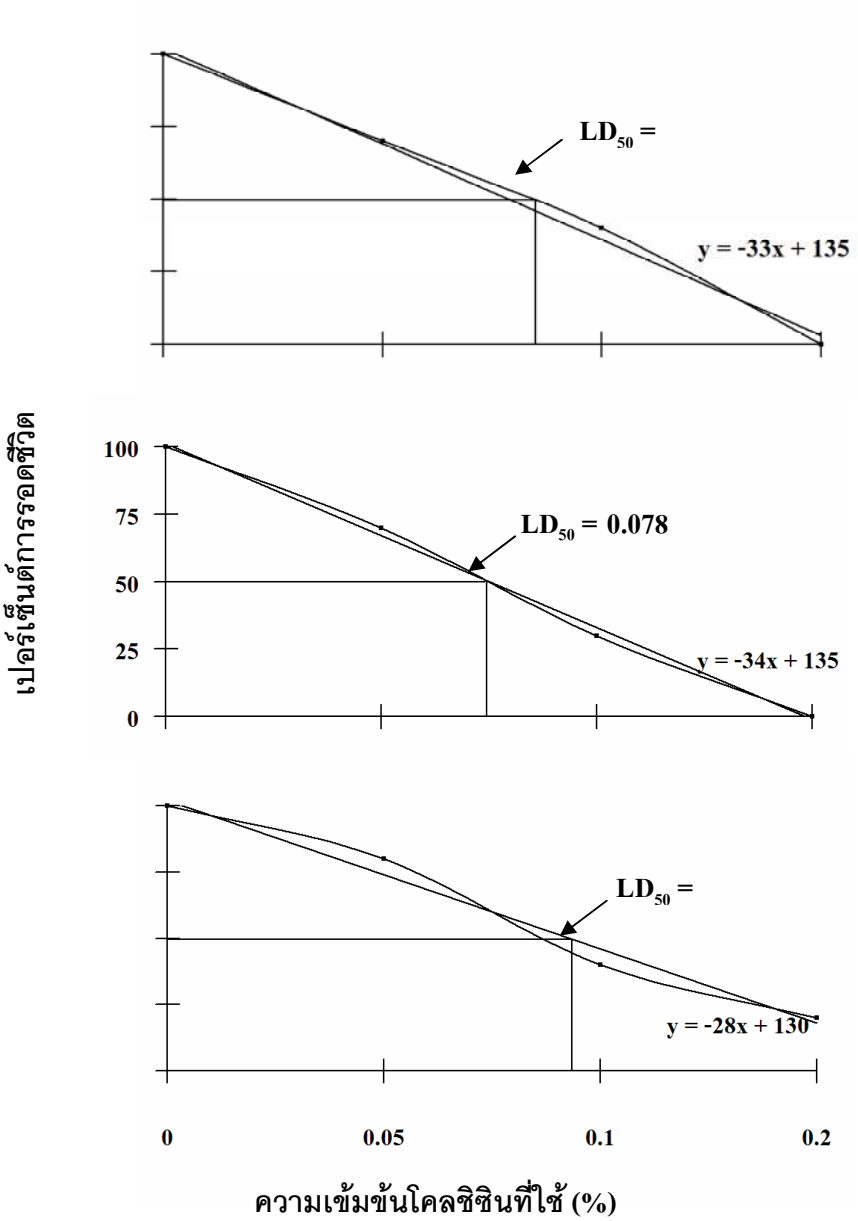
และรอดชีวิต 20 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามข้อหน้าวัวพันธุ์ Amingo มีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุดคือ 43.25 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13) ข้อหน้าวัวที่ได้รับโคลชิซินเมื่อนำไปชักนำให้เกิดยอดและรากบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน ต้นหน้าวัวที่ได้รับสารโคลชิซินจะมีขนาดต้นอวบ ใบและรากมีขนาดใหญ่กว่าต้นควบคุม (ภาพที่ 15) ไม่พบลักษณะของต้นหน้าวัวที่ผิดปกติ เมื่อสังเกตการเจริญเติบโตต้นหน้าวัวที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่ำ ๆ มีการแตกยอดและเจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นหน้าวัวที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นสูง ๆ

ตารางที่ 13 อัตราการรอดชีวิตของข้อหน้าวัวพันธุ์สปิริต Amingo เปลวเทียนภูเก็ตหลังจุ่มแช่โคลชิซินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

พันธุ์	ความเข้มข้นของโคลชิซิน (%)				เฉลี่ยแต่ละพันธุ์
	0	0.05	0.1	0.2	
สปิริต	100a	70b	40cd	0d	52.5A
Amingo	100a	70b	30cd	0d	43.25B
เปลวเทียนภูเก็ต	100a	80b	40cd	20d	60A
เฉลี่ยแต่ละความเข้มข้น	100A	73.33A	36.67B	6.67C	
F-test	Col **				
	พันธุ์ **				
	Col x พันธุ์ **				
C.V. (%)	24.32				

** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p = 0.01)

ค่าเฉลี่ยระหว่างพันธุ์และความเข้มข้นของ EMS ในแต่ละแถวที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ร่วมกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 14 อัตราการรอดชีวิตครึ่งหนึ่งของข้อหน้าวัวพันธุ์ต่าง ๆ หลังจุ่มแช่โคลชิซินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

ก หน้าวัวพันธุ์สปิริต

ข หน้าวัวพันธุ์Amingo

ค หน้าวัวพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต

ก ข

ภาพที่ 15 ต้นหน้าวัวที่ได้หลังจากจุ่มแช่โคลชิซินนาน 90 นาที เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์
ก โคลชิซินความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์
ข โคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

1.2 ขนาด จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์และความหนาแน่นของปากใบของต้นหน้าวัวหลังการจุ่มแช่โคลชิซิน

ความเข้มข้นโคลชิซินเพิ่มขึ้นส่งผลให้ขนาดของปากใบหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ คือ พันธุ์สปิริต พันธุ์ Amingo และพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต มีขนาด 40 μm ซึ่งใกล้เคียงกับต้นควบคุมที่ไม่ผ่านการจุ่มแช่โคลชิซิน แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ภาพที่ 16) สำหรับจำนวนของเม็ด คลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ ที่ไม่ผ่านการจุ่มแช่ข้อในสารละลายโคลชิซิน (58-65 ปากใบ) มากกว่าใบที่พัฒนาจากข้อที่จุ่มแช่โคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (26-33 ปากใบ) ประมาณ 2 เท่า แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อพิจารณาความหนาแน่นของปากใบ พบว่า โคลชิซินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ส่งผลให้จำนวนปากใบต่อพื้นที่เพิ่มขึ้นเป็นไปในทำนองเดียวกันกับหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ โดยพันธุ์สปิริตที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีความหนาแน่น ปากใบสูงสุดคือ 50.33 ปากใบต่อพื้นที่ 4

ตารางมิลลิเมตร ส่วนหน้าวัวพันธุ์ Amingo มีความหนาแน่นของปากใบน้อยที่สุด (36.6 ปากใบต่อพื้นที่ 4 ตารางมิลลิเมตร) (ตารางที่ 14)

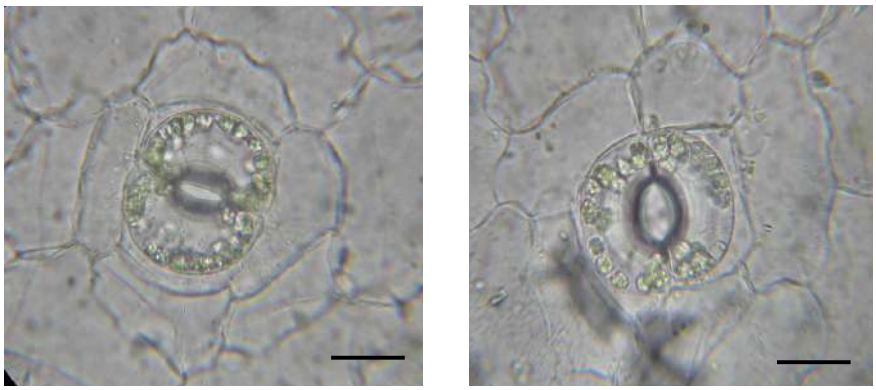
ตารางที่ 14 ขนาด จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์และความหนาแน่นของปากใบของหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ หลังจากจุ่มแช่สารละลายโคลชิซินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

พันธุ์	ความเข้มข้น (%)	ขนาดปากใบ (μm)	จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์	ความหนาแน่นของปากใบ (stomata / 4 mm^2)
Spirit	0	40.03	58.667a	40.000bc
	0.1	40.60	26.667b	50.333a
Amingo	0	40.00	60.000a	27.333e
	0.1	40.06	33.000b	36.667cd
เปลวเทียนภูเก็ต	0	40.00	65.333a	30.000de
	0.1	40.06	33.333b	47.333ab
F-test		ns	**	**
C.V. (%)		1.97	9.62	7.93

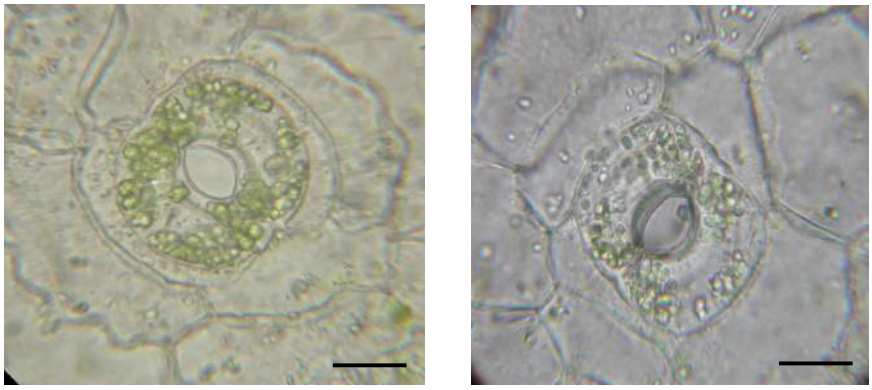
ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p = 0.01)

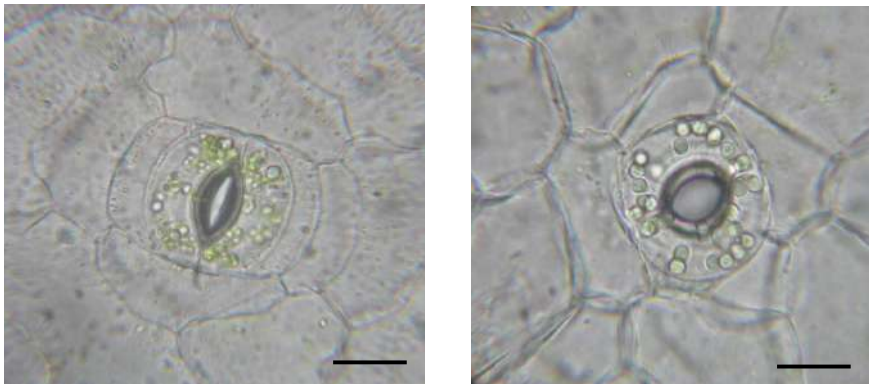
ค่าเฉลี่ยระหว่างพันธุ์และความเข้มข้นของ EMS ในแต่ละแถวที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ร่วมกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT



ก ข



ค ง



จ ฉ

ภาพที่ 16 ลักษณะปากใบของหน้าวัว 3 พันธุ์ จากต้นที่ผ่านการจุ่มแช่ด้วยโคลชิซิน (บาร์ 50 ไมโครเมตร)

ก หน้าวัวพันธุ์สปิริต 0 เปอร์เซ็นต์ ข หน้าวัวพันธุ์สปิริต 0.01 เปอร์เซ็นต์

ค หน้าวัวพันธุ์Amingo 0 เปอร์เซ็นต์ ง หน้าวัวพันธุ์Amingo 0.01 เปอร์เซ็นต์

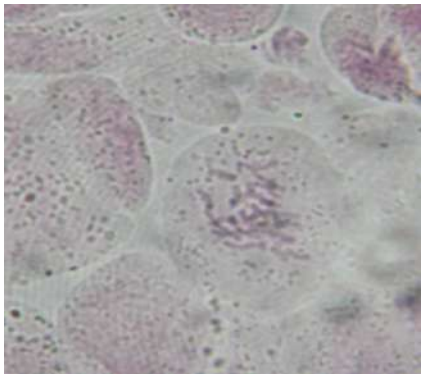
จ หน้าวัวเปลวเทียนภูเก็ต 0 เปอร์เซ็นต์ ฉ หน้าวัวเปลวเทียนภูเก็ต 0.01 เปอร์เซ็นต์

1.3 การศึกษาจำนวนโครโมโซมปลายราก

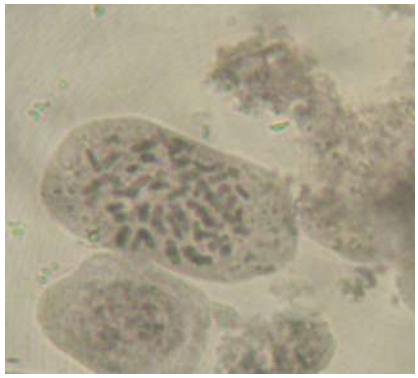
แม้ว่าจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของใบที่ได้จากการจุ่มแช่ข้อในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อตรวจสอบจำนวนโครโมโซมปลายราก พบว่า หน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ คือ พันธุ์สิปิริต พันธุ์Amingo และพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ตที่จุ่มแช่ด้วยโคลชิซินมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าเมื่อเทียบกับต้นควบคุม (0 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 15 และ ภาพที่ 17) ในจำนวนนี้ พบว่า พันธุ์Amingoให้การเพิ่มชุดโครโมโซมสูงสุด 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพันธุ์สปิริต และพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต ให้เปอร์เซ็นต์การเพิ่มชุดโครโมโซมเป็นสองชุดเท่ากัน 10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การเกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมในหน้าวัวที่พัฒนาจากข้อซึ่งผ่านการจุ่มโคลชิซินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

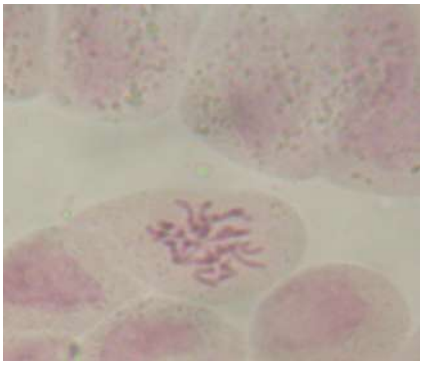
พันธุ์	ความเข้มข้น (%)	จำนวนต้นที่ใช้	จำนวนเปอร์เซ็นต์
สปิริต	0.1	10	10
Amingo	0.1	10	20
เปลวเทียนภูเก็ต	0.1	10	10



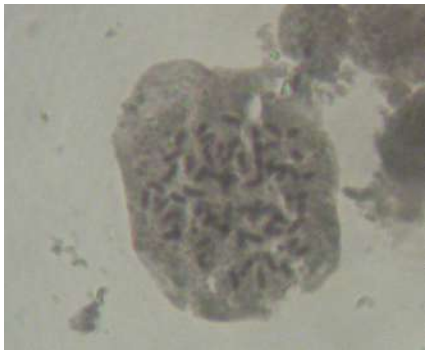
ก



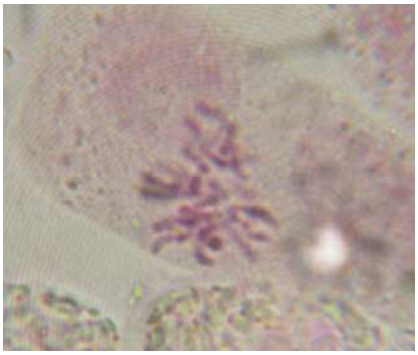
ข



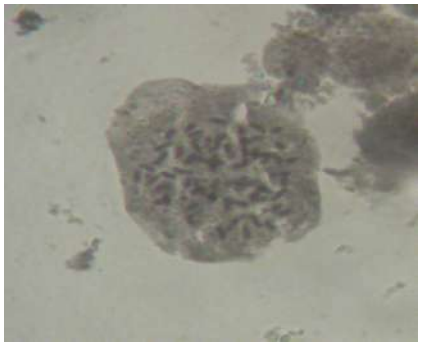
ค



ง



จ



ฉ

ภาพที่ 17 จำนวนโครโมโซมปลายรากหน้าวัวของหน้าวัว 3 พันธุ์ที่ผ่านการจุ่มแช่ด้วยโคลชิซิน (600 เท่า)

ก :หน้าวัวพันธุ์สปิริต 0 เปอร์เซ็นต์ ข :หน้าวัวพันธุ์สปิริต 0.01 เปอร์เซ็นต์

ค :หน้าวัวพันธุ์ Amingo 0 เปอร์เซ็นต์ ง :หน้าวัวพันธุ์ Amingo 0.01 เปอร์เซ็นต์

จ :หน้าวัวเปลวเทียนภูเก็ต 0 เปอร์เซ็นต์ ฉ :หน้าวัวเปลวเทียนภูเก็ต 0.01 เปอร์เซ็นต์

2. ผลของเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตต่อการกลายพันธุ์หน้าวัว

2.1 ผลของพันธุ์และความเข้มข้นของเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตต่ออัตราการรอดชีวิต

การจุ่มแช่แคลลัสหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ ที่ความเข้มข้น 0, 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 90 นาที มีผลทำให้แคลลัสมีสีซีดไปจากเดิมในทุกความเข้มข้น ยกเว้นชุดควบคุม ภายหลังเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน บันทึกอัตราการรอดชีวิต พบว่า หน้าวัวพันธุ์สปิริตที่ได้รับเอทธิลมีเทนซัลโฟเนทเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ส่วนความเข้มข้น 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้การรอดชีวิตต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (20 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน) (ตารางที่ 16) เมื่อวิเคราะห์ด้วยสมการถดถอย พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.677 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (ภาพที่ 18 ก) หน้าวัวพันธุ์ Amingo ที่ได้รับเอทธิลมีเทนซัลเนตเข้มข้น 0.05 และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ มีการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันจากชุดควบคุม ส่วนความเข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์ ให้การรอดชีวิตต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (40 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 16) เมื่อวิเคราะห์ด้วยสมการถดถอย (regression analysis) พบว่า ที่ความเข้มข้น 1.08 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (ภาพที่ 18 ข) สำหรับหน้าวัวพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ตที่ได้รับสารเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตเข้มข้น 0.05 และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ มีการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ส่วนความเข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์ ให้การรอดชีวิตต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (20 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 16) เมื่อวิเคราะห์ด้วยสมการถดถอย พบว่า ที่ความเข้มข้น 1.02 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (ภาพที่ 18 ค)

เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของเอทธิลมีเทนซัลโฟเนต พบว่า ความเข้มข้นสูงขึ้นทำให้อัตราการรอดชีวิตของข้อหน้าวัวลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$) โดยความเข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้การรอดชีวิตของแคลลัสหน้าวัวพันธุ์สปิริตเหลือ 0 เปอร์เซ็นต์ มีพันธุ์ Amingo และพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ตที่สามารถทนต่อเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตที่ความเข้มข้นดังกล่าวได้รอดชีวิต 40 และ 20 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามข้อหน้าวัวพันธุ์สปิริตมีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุดคือ 48 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 16) แคลลัสหน้าวัวที่ได้รับเอทธิลมีเทนซัลโฟเนต เมื่อนำไปชักนำให้เกิดยอดและรากบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน ต้นหน้าวัวที่ได้รับสารเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตไม่พบลักษณะของต้นหน้าวัวที่ผิดปกติ

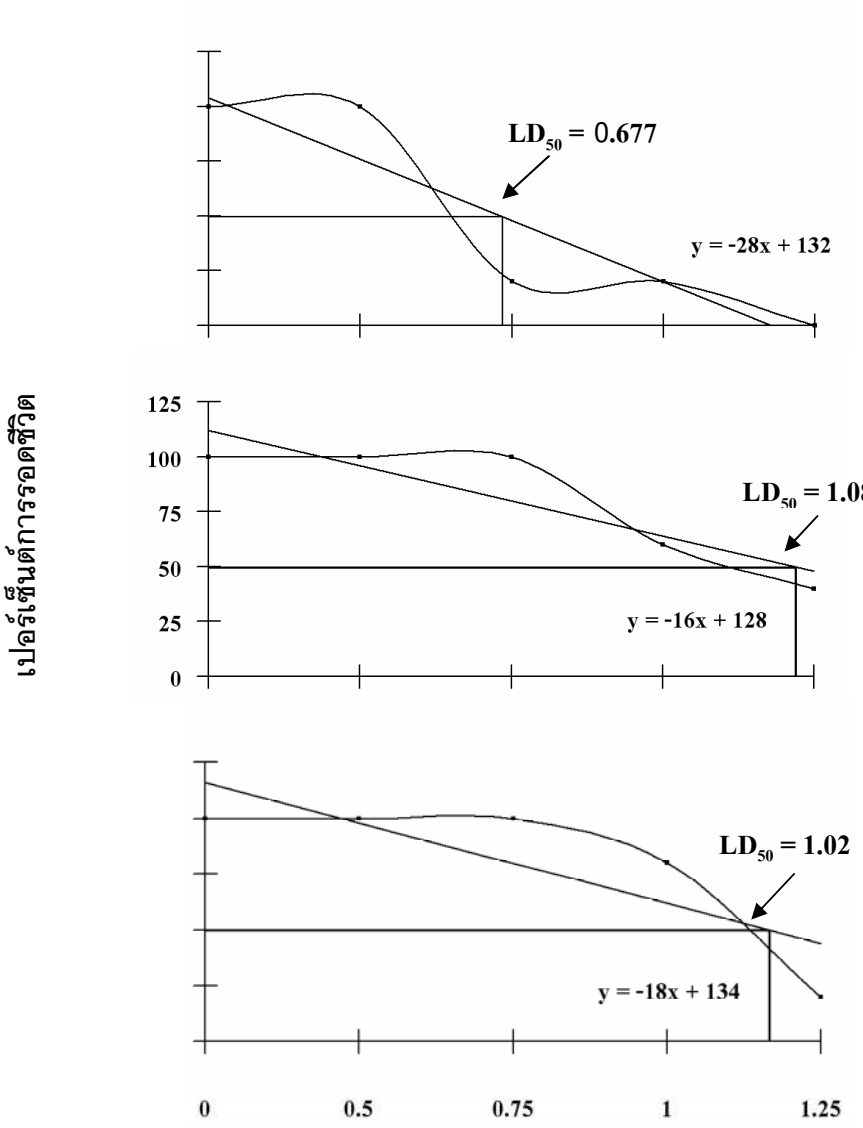
ตารางที่ 16 อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสหน้าวัวพันธุ์สปิริต Amingo และเปลวเทียนภูเก็ตหลังจุ่มแช่เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตเป็นเวลา 90 นาที

พันธุ์	ความเข้มข้นของเอทธิลมีเทนซัลโฟเนต (%)					เฉลี่ยแต่ละพันธุ์
	0	0.50	0.75	1.00	1.25	
สปิริต	100a	100a	20c	20c	0d	48 B
Amingo	100a	100a	100a	60bc	40c	80 A
เปลวเทียนภูเก็ต	100a	100a	100a	80b	20c	80 A
เฉลี่ยแต่ละความเข้มข้น	100 A	100 A	73.33 A	53.33 A	20 B	
F-test	EMS **					
	พันธุ์ **					
	EMS x พันธุ์ *					
C.V. %	46.97					

* มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p = 0.05)

** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p = 0.01)

ค่าเฉลี่ยระหว่างพันธุ์และความเข้มข้นของเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตในแต่ละแถวที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ร่วมกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 18 อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสหน้าวัวพันธุ์ต่าง ๆ หลังจุ่มแช่เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตเป็นเวลา 90 นาที

ก หน้าวัวพันธุ์สปิริต

ข หน้าวัวพันธุ์ Amingo

ค หน้าวัวพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต

2.2 ผลของเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตต่อการเจริญของหน้าวัวในแปลงปลูก

นำต้นหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์คือ พันธุ์สปิริต พันธุ์Amingo และพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ตที่ผ่านการชักนำให้เกิดรากออกมาปลูกในโรงเรืองเรือนซาแลนพรางแสง 70 % ปลูกในวัสดุปลุก คือ กาบมะพร้าวสับ (ตารางที่ 17 ภาพที่ 19) พบว่า หลังปลูก 1 ปี พันธุ์ Amingoที่จุ่มแช่เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตที่ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ออกดอกจำนวน 3 ต้น จาก 5 ต้น พบดอกที่มีลักษณะผิดปกติ 2 ดอก คือ ดอกมีสีดอกปกติแต่ไม่มีปลีดอก อีกดอกมีลักษณะบิดเบี้ยว ดอกมีสีซีด (ภาพที่ 20)

ตารางที่ 17 การเจริญเติบโตของหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ ซึ่งชักนำจากโนดูลาแคลลัสที่ผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 90 นาที ดูแลในเรือซาแลนที่พรางแสง 50-75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 เดือน

พันธุ์	ความเข้มข้นที่ใช้ (%)	จำนวนใบเฉลี่ย (ใบ)	ความกว้างทรงพุ่มเฉลี่ย (ซม.)	ความสูงเฉลี่ย (ซม.)
สปิริต	0	5	3	4
	0.5	6	5	3
	0.75	6	5	3
Amingo	0	3	3	2
	0.5	0	0	0
	0.75	6	3.5	2.3
เปลวเทียนภูเก็ต	0	5	3.5	4
	0.5	5	4	4
	0.75	0	0	0

ก

ข

ค

ภาพที่ 19 ต้นหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์จากการชักนำแคลลัสที่ผ่านการจุ่มแช่เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต นำออกมาปลูกในโรงเรือนซาแลนเป็นเวลา 1-3 เดือน

ก หน้าวัวพันธุ์สปิริตที่ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ (ซ้าย) 0.5 เปอร์เซ็นต์ (กลาง) และ0.75 เปอร์เซ็นต์ (ซ้าย) อายุ 3 เดือน

ข หน้าวัวพันธุ์Amingoที่ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ (ซ้าย) และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ และ(ขวา) อายุ 1 เดือน

ค หน้าวัวพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ตที่ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ (ซ้าย) และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ (ขวา) อายุ 1 เดือน

ก

ข

ค

ภาพที่ 20 ดอกหน้าวัวพันธุ์ Amingoที่ได้จากการจุ่มแช่แคลลัสด้วยเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตที่ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที หลังจากปลูกนาน 1 ปี 6 เดือน

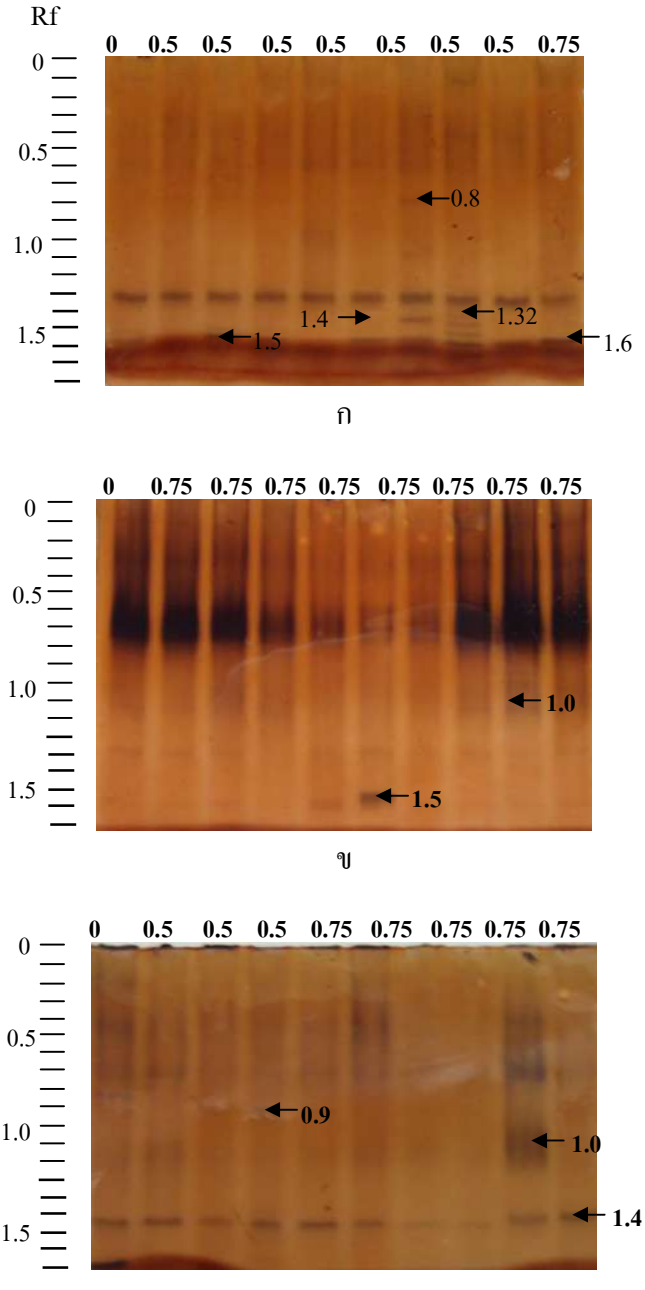
ก ดอกปกติ

ข ดอกไม่มีปลีดอก

ค ดอกบิดเบี้ยว สีซีด

2.3 การตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของต้นที่ได้จากการทรีตด้วยเอทธิลมีเทนซัลโฟเนต

เมื่อย้อมสีเจล polyacrylamide ที่ผ่านการแยกเอนไซม์ด้วยระบบสีย้อม 2 ระบบ คือ esterase และ peroxidase พบว่า ระบบ peroxidase ไม่ติดสี แต่ระบบเอนไซม์ esterase ติดสีและให้รูปแบบไซโมแกรมชัดเจน และใช้แยกความแตกต่างระหว่างต้นควบคุมกับต้นที่ได้รับสารเอทธิลมีเทนซัลโฟเนทได้ ดังนั้นจึงใช้ระบบเอนไซม์ esterase ในการย้อมสีเพื่อตรวจสอบความผันแปรของหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยเอทธิลมีเทนซัลโฟเนต พบว่า ในพันธุ์สปิริตที่จุ่มแช่เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้รูปแบบของเอนไซม์ esterase ที่ระยะทางการเคลื่อนที่ (Rf) 0.8 1.4 1.32 1.21 แตกต่างจากต้นในชุดควบคุม จำนวน 4 ต้นจากจำนวนต้นทั้งหมด 7 ต้น (57 เปอร์เซ็นต์) ส่วนความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ให้รูปแบบของเอนไซม์ esterase ที่ Rf 1.6 แตกต่างจากชุดควบคุม จำนวน 1 ต้นจากจำนวนต้นทั้งหมด 2 ต้น (50 เปอร์เซ็นต์) (ภาพที่ 21 ก) สำหรับพันธุ์ Amingoที่จุ่มแช่เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต 0.75 เปอร์เซ็นต์ มีต้นหน้าวัวที่มีลักษณะผิดปกติไปจากเดิม 2 ลักษณะคือ ดอกมีสีดอกปกติแต่ไม่มีปลีดอก และดอกมีลักษณะบิดเบี้ยว ดอกมีสีซีด ให้รูปแบบของเอนไซม์ esterase ที่ Rf 1.0 และ 1.52 แตกต่างจากต้นในชุดควบคุม จำนวน 2 ต้นจากจำนวนต้นทั้งหมด 9 ต้น (คิดเป็น 22 เปอร์เซ็นต์) (ภาพที่ 21 ข) และในหน้าวัวพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต ที่จุ่มแช่ เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้รูปแบบของเอนไซม์ esterase ที่ Rf 0.9แตกต่างจากต้นในชุดควบคุม จำนวน 1 ต้นจากจำนวนต้นทั้งหมด 3 ต้น (คิดเป็น 33 เปอร์เซ็นต์) ส่วนความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ให้รูปแบบของเอนไซม์ esterase ที่ Rf 1.0 และ 1.4 แตกต่างจากชุดควบคุม จำนวน 2 ต้นจากจำนวนต้นทั้งหมด 6 ต้น (33 เปอร์เซ็นต์) (ภาพที่ 21 ค)



ภาพที่ 21 รูปแบบเอนไซม์ระบบ esterase ในหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์

ก พันธุ์สปิริต

ข พันธุ์Amingo

ค พันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต

วิจารณ์

1. การปรับปรุงพันธุ์หน้าวัวโดยวิธีการผสมพันธุ์

การปรับปรุงพันธุ์หน้าวัวที่ผ่านมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1951 นั้นส่วนใหญ่เป็นการผสมพันธุ์ระหว่างชนิดเพื่อให้ได้ดอกที่มีลักษณะและรูปทรงของปลีดอก และจานรองดอกตามที่ต้องการของตลาด (Shaffer and Kamemoto, 1977) หากลูกผสมในชั่วที่หนึ่งมีลักษณะที่ต้องการก็สามารถนำไปใช้ได้ทันที แต่หากยังไม่มีลักษณะที่ต้องการ จำเป็นที่จะต้องผสมตัวเองของชั่วที่หนึ่งเพื่อให้ได้ลูกในชั่วที่สอง ซึ่งในชั่วดังกล่าวมีการกระจายตัวของยีนจำนวนมาก เพิ่มหน่วยที่ใช้ในการคัดเลือกได้มากยิ่งขึ้น (Kamemoto and Sheffer, 1978) หรือมีความเป็นไปได้ในการผสมกลับลูกชั่วที่หนึ่งไปยังพ่อหรือแม่ฝ่ายใดฝ่ายหนึ่ง จากการผสมระหว่าง *A schezerianum* ซึ่งมีดอกสีม่วงแดง กับชนิด *A. andraeanum* ซึ่งมีดอกขนาดเล็กสีม่วงอมน้ำตาล ให้ลูกผสมชั่วที่หนึ่งที่มีสีของจานรองดอกระหว่างสองชนิด สามารถใช้เป็นพันธุ์การค้าได้โดยตรง Birdey (1951) ได้ผสมหน้าวัว *A. andraeanum* กับ *A. hoffmannii* ซึ่งมีดอกสีเขียว พบว่า ลูกชั่วที่สองที่ได้จากการผสมตัวเองของลูกผสมชั่วที่หนึ่งให้การกระจายตัวของสีมาก สามารถคัดเลือกเป็นพันธุ์การค้าได้ นอกจากนี้ยังพบการกระจายตัวในลักษณะการต้านทานต่อโรคด้วย ในการศึกษานี้ได้ลูกผสมจำนวนมากเช่นเดียวกัน ในขั้นต้นเป็นการศึกษาการเจริญเติบโตในระยะ vegetative อย่างไรก็ตามมีบางคู่ผสมที่เจริญจนเข้าสู่ระยะ reproductive มีการสร้างดอกหลังจากปลูกเป็นเวลา 2-3 ปี ซึ่งลูกผสมชั่วที่หนึ่งจากบางคู่ผสมมีการกระจายตัวของสีให้เห็นชัดเจน เช่นลูกผสมระหว่าง Florentino x Lady jane ให้ดอกมีการกระจายตัวสูงมากตั้งแต่สีแดง สีขาว จนกระทั่งสีเขียว รองลงมาคือลูกผสมระหว่าง Figo x Mumuhara มีการกระจายตัวของสีแดงในระดับต่าง ๆ กัน ก่อนที่จะมีการปล่อยพันธุ์ออกไปปลูกต้องรอความคงตัวในลักษณะก่อนที่จะมีการกระจายพันธุ์เพื่อให้เกษตรกรปลูกต่อไป นอกจากนี้ลูกผสมที่ได้ต้องมีการดูแลเป็นอย่างดีเพื่อไว้รอผสมตัวเองผลิตลูกในชั่วที่สอง หรือผสมกลับไปยังพ่อ หรือ แม่ ซึ่งคาดว่าจะได้ลักษณะที่ต้องการจำนวนมากพร้อมที่จะเลือกไว้ใช้เป็นหน้าวัวไม้ตัดดอกในภาคใต้ต่อไป

Sheffer และ Kamemoto (1977) รายงานว่าการกระจายตัวของสีดอกส่วนใหญ่เป็นผลเนื่องมาจากยีนอย่างน้อย 2 ยีนที่เกี่ยวข้อง ในเวลาต่อมา Iwata และคณะ (1979; 1985) ตรวจผลของยีนในทางชีวเคมีพบยีนที่เกี่ยวกับการสร้างรงควัตถุแอนโธไซยานิน ไซยานิดิน และเพลาโกนิดิน ซึ่งควบคุมการพัฒนาของสีแดง ม่วง เป็นต้น หากมีการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรงควัตถุดังกล่าว หรือไม่มียีนนี้ในลูกผสมส่งผลให้ปรากฏของสีขาวหรือสีเขียวสูงขึ้น ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการศึกษานี้โดยเฉพาะในลูกผสมระหว่าง Florentino x Lady Jane ให้ดอกมีการกระจายตัวสูง

มากตั้งแต่สีแดง สีขาว จนกระทั่งสีเขียว นั่นหมายความว่ายีนที่ควบคุมการสร้างรงควัตถุทั้ง 3 ไม่ทำหน้าที่หรือไม่ปรากฏในลูกผสมส่งผลให้ลูกผสมมีสีขาว หรือสีเขียวอย่างที่เห็น เป็นที่น่าเสียดายที่ไม่ได้มีการศึกษาในระดับชีวเคมี หรือชีวโมเลกุลของลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่ ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันสมมติฐานการถ่ายทอดของยีนที่ควบคุมการสร้างรงควัตถุสีแดง/ม่วง จึงมีความจำเป็นที่จะต้องยืนยันด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

เมื่อพิจารณาโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจของหน้าวัวที่ส่งผลให้การผลิตหน้าวัวเพื่อการค้า และการส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศลดลงตั้งแต่ปี ค.ศ. 1983 คือโรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย สาเหตุของเชื้อก็คือ *Xanthomonas axonopodis pv. dieffenbachiae* Fukui และคณะ (1998) พบว่า โรคนี้ระบาดอย่างรุนแรงและทำให้การผลิตหน้าวัวเพื่อการตัดดอกประสบปัญหามาก เขาได้พบพันธุ์ที่มีความต้านต่อโรคที่เกิดจากเชื้อราในเรือนระแนง และได้ใช้พันธุ์ดังกล่าวในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์เพื่อถ่ายทอดยีนที่ต้านทานนี้ไปยังพันธุ์การค้า พันธุ์ที่ต้านทานส่วนใหญ่เป็นพันธุ์กระถาง แต่ไม่มีในกลุ่มที่ใช้ตัดดอกขาย (Fukui *et al.,* 1998) วิธีการตรวจสอบการเกิดโรคที่ดีที่สุดคือการทำ artificial inoculation (Fukui *et al.,* 1998; Norman *et al.,* 1999) สอดคล้องกับการศึกษานี้ซึ่งพบว่า การใช้วิธีดังกล่าวสามารถที่จะคัดพันธุ์ต้านทานได้ จากพันธุ์ที่รวบรวมมาทั้งหมดมี 5-6 พันธุ์ที่ทนทาน หรือต้านทานต่อโรคดังกล่าว พันธุ์ดังกล่าวคือ พันธุ์ Amingo Rabido สุลต่าน President เปลวเทียนภูเก็ต พันธุ์ดังกล่าวแสดงอาการของโรคเพียงเล็กน้อยบนแผ่นใบหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 30 วันในขณะที่พันธุ์อื่นเกิดความเสียหายรุนแรงหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 8 วันเท่านั้นเอง เป็นที่น่าสังเกตว่าพันธุ์ของไทยเราที่มีอยู่ หรือปลูกจำหน่ายภายในประเทศเรามียีนที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้ ดังนั้นพันธุ์ดั้งเดิมจึงมีคุณค่าทางพันธุกรรมสูงควรที่จะอนุรักษ์ไว้ ถึงแม้ไม่มีความสำคัญทางการตลาดโดยตรง แต่เป็นแหล่งของยีนต้านทานต่อโรค และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม พร้อมที่จะใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์หน้าวัวการค้าในอนาคต และจากการผสมพันธุ์เพื่อผลิตลูกผสมระหว่างพันธุ์ต้านทานดังกล่าว พบว่าให้ลูกผสมที่ต้านทานด้วย ทั้งที่ต้านทานในระดับสูง และปานกลาง โดยกลุ่มที่ต้านทานสูงมีความเสียหายอันเนื่องมาจากเชื้อสาเหตุโรคพืช 0-15% ลูกผสมในกลุ่มดังกล่าวคือ Florentino x Lady Jane Rabido x เปลวเทียนภูเก็ต เปลวเทียนภูเก็ต x Sonate นาไก x เปลวเทียนภูเก็ต และ Prety Ann x Amigo จากผลดังกล่าวสอดคล้องกับ Fukui และคณะ (1998) ซึ่งรายงานว่าพันธุ์ที่ต้านทานมักเป็นพันธุ์กระถาง จากการศึกษานี้ พบว่า พันธุ์ Lady Jane ซึ่งเป็นพันธุ์กระถางเมื่อผสมกับพันธุ์ตัดดอกสามารถที่จะถ่ายทอดลักษณะต้านทานต่อโรคใบไหม้ได้สูงมาก จากผลการตรวจสอบการต้านทานต่อโรคควรที่จะเก็บรักษาพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรคไว้ใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์หน้าวัวให้ต้านทานต่อโรคต่อไป

2. ผลของโคลชิซินต่อการกลายพันธุ์

โดยทั่วไปความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่ยับยั้งการพัฒนาเป็นต้นพืชต้นใหม่ได้จำนวนครึ่งหนึ่งหรือ 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ถือว่าเป็นค่าในการประเมินความเข้มข้นที่เหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ การใช้โคลชิซินเพื่อชักนำการกลายพันธุ์ของข้อหน้า 3 พันธุ์ (พันธุ์ Spirirt พันธุ์ Amingo และพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต) ที่ระยะเวลาต่างกัน พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินเพิ่มสูงขึ้นทำให้อัตราการรอดชีวิตของหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ลดลง โดยความเข้มข้นของโคลชิซินที่ทำให้การรอดชีวิตของหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ ลดลงครึ่งหนึ่งคือ 0.084 0.078 และ 0.088 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ค่าดังกล่าวแตกต่างกันขึ้นกับชนิดพืช Thao และคณะ (2003) พบว่าในพืช *Alocasia* ที่ได้รับการจุ่มแช่โคลชิซิน 0.05% ให้อัตราการรอดชีวิตใกล้เคียง 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ภาสันต์ (2540) รายงานว่าการใช้โคลชิซินความเข้มข้นสูง 0.4 ถึง 0.75 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยทำให้ต้นอ่อนกล้วยมีอัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ ความแตกต่างกันของอัตราการรอดชีวิตอาจเนื่องมาจากพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งอดิศร (2539) รายงานว่า ชนิดพืช (พันธุ์พืช) และชิ้นส่วนที่ใช้ตอบสนองต่อความเข้มข้นและระยะเวลาการให้โคลชิซินแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของโคลชิซินที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้การรอดชีวิตลดลงสอดคล้องกับรายงานของ สมพร และ วิทูล (2547) ที่ใช้ข้อหน้าวัวพันธุ์ Tropical จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0-1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของโคลชิซินเพิ่มขึ้นทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลง ส่วน วิชชุตา (2537) รายงานว่าการใช้โคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้นทำให้อัตราการรอดชีวิตของหน้าวัวพันธุ์ Double Spathe ลดลง ในการศึกษานี้ไม่ได้ทดลองชิ้นส่วนพืช แต่เนื่องจากชิ้นส่วนข้อมีองค์ประกอบของตายอดพร้อมที่จะพัฒนาให้พืชต้นใหม่ได้รวดเร็ว อีกทั้งพัฒนาการไม่ผ่านการสร้างแคลลัสที่อาจทำให้แปรผลผิดจากอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ส่งผลต่อการเพิ่มชุดโครโมโซม จึงคิดว่าชิ้นส่วนข้อมีความเหมาะสมต่อการชักนำการเพิ่มชุดของโครโมโซมในเบื้องต้น

สำหรับการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานของพืช พบว่า โดยทั่วไปที่ทรีตด้วยสารโคลชิซินคือ มีการอัตราเจริญเติบโตช้า ใบมีขนาดใหญ่ และหนา (อดิศร, 2539) นคร (2550) รายงานว่าต้นกล้ามะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรที่ได้รับสารโคลชิซิน มีอัตราการเจิญเติบโตต่ำกว่าต้นที่ไม่ได้รับสาร Gu และคณะ (2005) ชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมในพุทรา (*Zizyphus jujube* Mill. cv. Zhanha) โดยใช้โคลชิซิน พบว่า ต้นเตตระพลอยด์มีใบขนาดใหญ่เป็นสองเท่าของต้นดิพลอยด์ Thao และคณะ (2003)

รายงานในทำนองเดียวกันในพืช *Alocasia* ว่าต้นที่เพิ่มชุดโครโมโซมโดยใช้โคลชิซินส่งผลให้ใบมีขนาดใหญ่เพิ่มขึ้นสองเท่า นอกจากนี้มยุรี (2547) ชักนำโพลีพลอยด์ในถั่วเขียวผิวมันพันธุ์อู่ทอง 1 ต้นที่เป็นโพลีพลอยด์จะมีลำต้นอ้วน ใบหนาและกว้าง อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ต้นที่ได้รับสารโคลชิซินจะมีใบขนาดใหญ่ และหนากว่าต้นควบคุม เช่นเดียวกับปิยะดา (2531) และอดิศร (2539) รายงานผลของโคลชิซินที่มีต่อต้นขิงที่เกิดโพลีพลอยด์ว่ามีใบหนา ขนาดใหญ่และหนา ผลการตอบสนองต่อโคลชิซินที่แตกต่างกันนั้นขึ้นกับพันธุ์พืช จากการศึกษาเบื้องต้นในการใช้โคลชิซินร่วมกับโนดูลาแคลลัสหน้าวัวพันธุ์มิคกี้เมาส์ก็พบความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานเพียงเล็กน้อย ไม่เด่นชัดพอเหมือนพืชอื่น ๆ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าหน้าวัวไม่ตอบสนองต่อโคลชิซินในลักษณะทางสัณฐาน นอกจากนี้ยังพบว่า ต้นหน้าวัวที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นต่ำมีการแตกยอดและเจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นหน้าวัวที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นสูง ทำนองเดียวกับรายงานการจุ่มแช่ชิ้นส่วนข้อของอัญชันในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้นต่ำซึ่งพบว่า ส่งเสริมการสร้างยอดรวมได้สูงกว่า (สมโชค, 2545) อาจเป็นไปได้ว่าโคลชิซินความเข้มข้นต่ำยับยั้งการแบ่งเซลล์ และการเจริญของเซลล์ แต่ส่งเสริมการพัฒนาของเซลล์ไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดแทน โดยเฉพาะยอดแขนง ส่งผลให้จำนวนยอดรวมเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับรายงานของ Pinheiro และคณะ (2000) ในการเพิ่มชุดโครโมโซมให้กับหญ้าขน *(Brachiaria brizanthis* BRA002747)

เมื่อพิจารณาลักษณะทางสรีรวิทยาของใบจากต้นที่พัฒนาจากการทรีตข้อด้วยโคลชิซินโดยการตรวจสอบขนาดปากใบ ความหนาแน่นปากใบ และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบผลของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมในพืช ในการศึกษานี้พบว่า หน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ มีขนาดปากใบเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ ภาสันต์ (2540) ซึ่งรายงานการใช้สารโคลชิซินกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย และ Kato (1989) ชักนำให้คามีเลียเป็นโพลีพลอยด์โดยใช้โคลชิซิน ในขณะที่ Herrera และคณะ (2002) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเอ็มบริโอกาแฟร่วมกับโคลชิซิน พบว่าขนาดของปากใบลดลง ผลของโคลชิซินต่อความแตกต่างของขนาดปากใบนั้นขึ้นกับชนิดของพืช ทำนองเดียวกับความหนาแน่นของปากใบซึ่งตอบสนองต่อโคลชิซินทั้งในทางที่เพิ่มขึ้นและลดลง ซึ่งในการศึกษานี้พบว่า ความหนาแน่นของปากใบเพิ่มขึ้นด้วย ในทำนองเดียวกับการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม่อนร่วมกับโคลชิซิน (เยาวพา, 2536) อย่างไรก็ตามในหม่อนพันธุ์น้อย คุณไพ และใหญ่บุรีรัมย์ พบว่า ความหนาแน่นของปากใบลดลง นอกจากชนิดของพืชแล้วพันธุ์พืชยังตอบสนองต่อโคลชิซินแตกต่างกันอีกด้วย ภาสันต์ (2540) ใช้สารโคลชิซินกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไข่ พบว่าความหนาแน่นของปากใบลดลง อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ความหนาแน่นของปากใบหน้าวัวทุกพันธุ์ที่ศึกษาเพิ่มขึ้น ต่างจากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น สำหรับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ใน

เซลล์คุมซึ่งเป็นตัวแปรหลักที่สำคัญบ่งบอกถึงการเพิ่มชุดโครโมโซมอันเป็นผลมาจากการทรีตด้วยโคลชิซินนั้น โดยทั่วไปแล้วพืชที่มีการเพิ่มชุดโครโมโซมจาก 2 ชุดเป็น 4 ชุด มีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของปากใบเพิ่มขึ้น อาจเป็นสองเท่าทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของพืช เช่น ขิง (ปิยะดา และอรดี, 2532) เยอบีร่า (Mitoshi และAsakura, 1996) หญ้า (Pinheiro และคณะ,2000) *Platanus acerifolia* (Liu และคณะ, 2007) เป็นต้น ในกรณีของหน้าวัวที่ได้จากการศึกษานี้ พบว่า จำนวนของเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของปากใบมีค่าลดลงครึ่งหนึ่ง ที่เป็นเช่นนี้เพราะอาจเป็นผลมาจากความผิดปกติในการทำงานของเซลล์ในการสร้างเม็ดคลอโรพลาสต์ซึ่งไม่ทราบกลไกแน่ชัด คาดว่าอาจเนื่องมาจากกระบวนการในการสังเคราะห์โดยเอนไซม์ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดคลอโรพลาสต์ในไซโตพลาสซึมหรือ proplastid ผิดปกติส่งผลให้ไม่มีการพัฒนาจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ อย่างไรก็ตามเมื่อนำต้นที่มีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมที่ลดลงครึ่งหนึ่งไปตรวจสอบจำนวนโครโมโซมปลายรากก็พบว่า มีการเพิ่มชุดโครโมโซมเป็นสองเท่า ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าโคลชิซินมีผลต่อการเพิ่มชุดของโครโมโซมโดยกระบวนการยับยั้งการสร้างสายสปินเดิลในช่วงการดึงโครโมโซมระยะเมตาเฟสได้ดังที่รายงานโดยอมรา (2540) กล่าวว่า โคลชิซินส่งผลยับยั้งกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์เม็ดคลอโรพลาสต์ ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวยังไม่พบในพืชใดมาก่อน เพื่อความมั่นใจว่าผลดังกล่าวถูกต้องชัดเจนควรมีการทำซ้ำ และเพิ่มจำนวนประชากรของต้นที่ใช้ในการตรวจสอบเพื่อความถูกต้องในการสรุปผลต่อไปในหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ นอกจากนี้อาจใช้วิธีการทางโฟลไซโตเมทรีเพื่อตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอในนิวเคลียสประกอบด้วย

3. ผลของเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตต่อการกลายพันธุ์

ผลของเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตในขั้นต้นคือ อาการซีดของชิ้นส่วนพืชที่จุ่มแช่ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตมีผลต่อการสังเคราะห์เม็ดสี โดยเฉพาะคลอโรพลาสต์ส่งผลให้สีจางลง หากได้รับเป็นเวลานานทำให้เม็ดสีทั้งหมดถูกทำลายเป็นไปในทำนองเดียวกันกับหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ (พันธุ์สปิริต พันธุ์Amingo และพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต) ผลดังกล่าวเป็นไปในทำนองเดียวกับพืชอื่น ๆ เช่น Lee (2002) รายงานว่าแคลลัสข้าวที่จุ่มแช่ในสารละลายเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตมีสีซีด และเผือกมากขึ้นจากเดิมที่มีสีเขียว ผลดังกล่าวมีความรุนแรงมากขึ้นหากมีการจุ่มแช่ทำภายใต้สภาพเขย่าร่วมกับการทำบาดแผลให้ชิ้นส่วนพืช ทั้งนี้เพราะส่งเสริมการดูดซึมสารเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตได้ทั่วถึง เมื่อพิจารณา LD_{50}ของเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตในหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ พบว่า มีค่า LD_{50} 0.677 1.08 และ 1.02 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ค่าดังกล่าวแตกต่างกันออกไปขึ้นกับพันธุ์พืช ชนิดพืช และชิ้นส่วนที่ชักนำ อายุ

ของชิ้นส่วน ระยะเวลา และความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการจุ่มแช่ (สิรนุช, 2540) ธัญญาพร (2547) รายงานค่า LD_{50} ในหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโน ซึ่งเป็นพันธุ์กระถาง มีค่า LD_{50} เท่ากับ 0.62 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการศึกษานี้ใช้หน้าวัวพันธุ์ตัดดอก พันธุ์ดังกล่าวมีขนาดใหญ่ จึงตอบสนองต่อเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตเข้มข้นสูงกว่า เพราะนอกจากความแตกต่างของพันธุ์แล้วยังมีผลของโครงสร้างของเซลล์ภายในที่แตกต่างกัน ซึ่งโดยทั่วไปพืชยืนต้นมีองค์ประกอบของเซลล์ที่ซับซ้อนมากกว่า โดยเฉพาะสารที่สร้างแล้วมาสะสมที่ผนังเซลล์ เช่นลิกนิน ซูเบอร์ลิน ด้วยเหตุผลดังกล่าว ทำให้ต้องใช้ความเข้มข้นของเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตสูงกว่าไม้พุ่มหรือพืชล้มลุก สำหรับพืชชนิดอื่น ๆ ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน เช่น ในอ้อยมีการตอบสนองต่อเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตค่อนข้างต่ำ มีค่า LD_{50} อยู่ที่ 0.02 เปอร์เซ็นต์ (Gahukar and Jambhale, 2000) ส่วนก้านดอกเบญจมาศที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตอบสนองต่อเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตความเข้มข้นสูง มีค่า LD_{50} ที่ 0.77 เปอร์เซ็นต์ (Latado *et al.,* 2004)

เมื่อนำต้นหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ที่ผ่านการชักนำให้เกิดรากออกมาปลูก พบว่าในพันธุ์ Amingoที่จุ่มแช่เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตที่ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ อายุปลูก 1 ปี สร้างดอกที่มีลักษณะผิดปกติ 2 ดอก ใน 2 ลักษณะคือ ดอกมีลักษณะบิดเบี้ยว สีซีด และดอกมีสีดอกปกติแต่ไม่มีปลีดอก สอดคล้องกับ สมปอง และธัญญาพร (2548) รายงานว่า เมื่อใช้โนดูลาแคลลัสหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโนจุ่มแช่เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ พบความผิดปกติทางสัณฐาน คือ ปลีดอกเปลี่ยนจากสีชมพู – แดง เปลี่ยนเป็นสีเหลืองบางส่วน จนถึงสีเหลืองทั้งปลี Latado และคณะ (2004) ก็รายงานผลของเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตว่าความเข้มข้น 0.77 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของดอกเบญจมาศ โดยดอกที่ได้มีอาการด่างและบางดอกมีสีที่เปลี่ยนแปลง แม้ว่ารายงานข้างต้นถึงค่า LD_{50}ในบางพันธุ์ไปแล้วว่ามีค่าสูงก็ตาม แต่ความเข้มข้นที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานโดยเฉพาะของดอกอยู่ในช่วง 0.5-0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้นที่สูงเกินไปมีความเป็นพิษสูงส่งผลให้ต้นไม่สามารถเจริญเติบโตจนให้ดอกได้ ดังนั้นในการใช้เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตเพื่อชักนำการกลายพันธุ์ให้ได้ลักษณะใหม่ในเชิงการค้าควรใช้ความเข้มข้น 0.5-0.75 ก็เพียงพอ

เมื่อตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์ โดยใช้เอนไซม์ระบบสีย้อม 2 ระบบคือ ระบบเอนไซม์ esterase และ peroxidase ในหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์พบว่า เมื่อย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ peroxidase แผ่นเจลไม่ติดสี แต่เมื่อย้อมด้วยะบบเอนไซม์ esterase ติดสีและให้ไซโมแกรมชัดที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับธัญญาพร (2547) รายงานว่า เมื่อตรวจสอบการแปรผันของหน้าวัวพันธุ์โซเนตพบว่า การย้อมสีเจลด้วยระบบเอนไซม์ peroxidase ไม่พบการติดสี แต่เมื่อย้อมด้วยระบบเอนไซม์ esterase มีการติดสีดีที่สุด และสามารถนำมาใช้การแยกความแตกต่างได้ดีที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ของหน้าวัวมีความจำเพาะกับปฏิกิริยาของระบบ esterase ซึ่งพืชแต่ละชนิดมี

ความจำเพาะเจาะจงต่อระบบเอนไซม์แต่ละชนิดแตกต่างกัน (Werner, 1992) ในการศึกษานี้พบว่า เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตที่ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ในหน้าวัวพันธุ์ Amingo มีลักษณะผิดปกติ 2 ลักษณะคือ ดอกมีสีดอกปกติแต่ไม่มีปลีดอก และดอกมีลักษณะบิดเบี้ยว ดอกมีสีซีด ให้แถบเอนไซม์ติดสีและมีความแตกต่างจากต้นปกติ อาจเป็นไปได้ว่าเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตมีผลต่อยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ควบคุมการสร้างรงควัตถุของดอกนั้น ทำให้ดอกที่ได้มีสีซีด และสร้างความเสียหายทางสรีรวิทยาของดอก ราตรี (2540) รายงานว่า กิจกรรมของเอนไซม์เป็นผลมาจากยีน เมื่อยีนมีความแตกต่างกันเนื่องจากกระบวนการชักนำการกลายพันธุ์ จึงทำให้รูปแบบเอนไซม์แตกต่างกันด้วย ส่วนในความเข้มข้นอื่นๆ ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ อาจเนื่องมาจากเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตเข้าไปทำลายในส่วนของเนื้อเยื่อเจริญทำให้ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ แสดงว่า เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตส่งเสริมให้เกิดการกลายพันธุ์ในหน้าวัวพันธุ์ Amingoได้ดีที่สุด

เอกสารอ้างอิง

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2528. ปรับปรุงพันธุ์พืช. โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช. กรุงเทพฯ.

กัญจนา แซ่เตียว. 2538. การจำแนกกลุ่มพันธุ์ปทุมมาจากแบบแผนไอโซไซม์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 96 หน้า.

กาญจนา กิระศักดิ์ และสุภาภรณ์ สาชาติ. 2546. หน้าวัว. *ใน* เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 165 หน้า.

จรัสศรี นวลศรี. 2548. การเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซมและการปรับปรุงพันธุ์พืช. *ใน* เอกสารคำสอนวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืชสวน. หน้า 73-79. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

จารุวรรณ บุญศิริ. 2543. การขยายพันธุ์หน้าวัวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. รายงานการฝึกภาคสนามพืชศาสตร์ (510-391). ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่, สงขลา.

ชะอ้อน หิรัญรันต์. 2531. การขยายพันธุ์หน้าวัวโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ทวีศักดิ์. 2545. การผลิตหน้าวัวที่น้ำหนาวของคุณพนา สวัสดิบุตร. ว. เคหการเกษตร. 26(2) : 136-138.

ทิวา รักนิ่ม. 2533. ผลของโคลชิซินที่มีต่อการกลายพันธุ์ของแกลดิโอลัสที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 75 หน้า.

ทิวา ปาตีคำ และณัฐา ควรประเสริฐ. 2547. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในงาเพื่อใช้เป็นไม้ประดับ. ว. เกษตร 20 : 19-31.

ธัญญาพร สุสานนท์. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหน้าวัว (*Anthurium* spp.). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 57 หน้า.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และวัชรินทร์ ซุ้นสุวรรณ. 2543. เทคโนโลยีชีวภาพ : เครื่องมือเสริมในการปรับปรุงพันธุ์พืช *ใน* หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช หน้า 175- 187. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และ วัชรินทร์ ซุ้นสุวรรณ. 2542. หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

นิตย์ศรี แสงเดือน และอำไพ สินพัฒนานนท์. 2541. การชักนำให้เกิดเตตระพลอยด์โดยใช้สารโคลชิซินร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว. เกษตร 32 : 424-430.

บริษัท SPF. ม.ป.ป. หลักการปลูกหน้าวัวในประเทศเขตร้อน. กรุงเทพฯ.

ปรานอม พฤฒพงษ์. 2517. หน้าวัว. สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย. ไม้ตัดดอก. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. 1 : 91-105.

ปราโมทย์ คำนวณ และเกศิณี ระมิงค์วงศ์. 2543. การจำแนกพันธุ์ลูกผสมสตรอเบอรี่โดยวิธีสัณฐานวิทยาและอิเล็กโทรโฟรีซีส. ว. เกษตร 16: 221-230.

พรรณี อัศวตรีรัตนกุล. 2543. การประยุกต์ใช้เทคนิคไอโซไซม์ในการจำแนกสายพันธุ์กล้วยไม้. รายงานการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 34 หน้า.

พีระพงษ์ สาคริก. 2545. โอกาสของหน้าวัวไทยไปตลาดโลกในสายตาคุณพีระพงษ์ สาคริก. ว. เคหการเกษตร 26: 106-110

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์. 2531. เทคนิคทางอิเล็กโตรโฟริซิสในการจำแนกพันธุ์พืช. เอกสารฝึกอบรมเทคนิคทางอิเล็ดโตรโฟริซิสในการจำแนกพันธุ์พืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน . 33 หน้า.

ภาสันต์ ศารทูลทัต. 2540. การชักนำให้กล้วยไข่กลายพันธุ์ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยcolchicinesและoryzalin. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 70 หน้า.

รัชนีวรรณ จึงสงวนสิทธิ์. 2546. ความแปรปรวนทางสัฐานวิทยาและเซลล์วิทยาในตำลึงที่เกิดจากการใช้สารโคลชิซิน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 65 หน้า.

ราตรี สุจารีย์. 2540. การปรับปรุงพันธุ์มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) โดยใช้โคลชิซินในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 65 หน้า.

วชิรพงศ์ หวลบุตตา. 2545. คู่มือคนรักต้นไม้ “หน้าวัว”. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน. 95 หน้า.

วัชรินทร์ ซุ้นสุวรรณ. 2545. วิธีการวิจัยทางเกษตร. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

วิชชุตา รุ่งเรือง. 2537. ผลของโคลชิซินและรังสีแกรมมาที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์ “Double Spathe” ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 76 หน้า.

วิเชษฐ ค้าสุวรรณ. 2541. การปลูกหน้าวัว. สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม, นนทบุรี.

วิทยา พรหมมี. 2541. การปรับปรุงพันธุ์มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) โดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 88 หน้า.

วิมล ขวัญเกื้อ, สุพรรณญิกา เส็งสาย, สมปอง แก้วขาว และ ปิยวรรณ วงษ์บัณดิษฐ์. 2542. ผลของสารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของชวนชม (*Adenium obesum*) รายงานการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 11 เรื่องพันธุศาสตร์ช่วยชาติแก้วิกฤติ ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 6-8 ตุลาคม 2542 หน้า 67-70.

วิมล ขวัญเกื้อ. 2527. การใช้สารโคลชิซินกับพืช. ว. วิทย. 28 : 208-215.

วิไลวรรณ โชติเกียรติ และ อมรรัตน์ พงศ์ดารา. 2533. การศึกษาโปรตีนและไอโซไซม์ในสารสกัดใบปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนร่า. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 12 : 21-28.

วิวัฒน์ ภานุอำไพ และ บัณฑิต จันทร์งาม. 2543. การปรับปรุงพันธุ์หน้าวัว, น. 85-90. ใน ไม้ตัดดอกเศรษฐกิจและการปรับปรุงพันธุ์. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

วิวัฒน์ ภานุอำไพ, นาตยา ดำอำไพ, ชัชชัย สุนทรสวัสดิ์, และ สมาน ภักดี. 2540. การผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์หน้าวัว, น. 109 – 117. ใน รายงานการประชุมวิชาการไม้ดอกไม้ประดับแห่งชาติครั้งที่ 3 : ไม้ดอกไม้ประดับสู่ระบบการผลิตสากล, 11- 13 ธันวาคม 2540. คณะอนุกรรมการประสานงานวิจัยและพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, สมาคมวิทยาศาสตร์การเกษตรแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์, กรุงเทพฯ.

ศิรินทิพย์ โชคนำชัย. 2546. การศึกษาพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์บุกโดยใช้สารโคลชิซิน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์. 131 หน้า.

ศิรินันท์ สุวรรณโมลี. 2548. เทคนิคการนับแยกเซลล์ด้วยอุปกรณ์ Flow Cytometry ตอนที่ 1. LAB. TODAY. 4 : 34-38.

เศรษฐพงศ์ เลขะวัฒนะ และ ไพศาล โรจน์สราญรมย์. 2540. การศึกษาหน้าวัวพันธุ์ต่างประเทศ, น. 96 – 108. ใน รายงานการประชุมวิชาการไม้ดอกไม้ประดับแห่งชาติครั้งที่ 3 : ไม้ดอกไม้ประดับสู่ระบบการผลิตสากล, 11- 13 ธันวาคม 2540. คณะอนุกรรมการประสานงานวิจัยและพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, สมาคมวิทยาศาสตร์การเกษตรแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ กรุงเทพฯ.

สมปอง เตชะโต, สมัชชา นาคสมบัติ และ จารุวรรณ บุญศิริ. 2545. ผลของพันธุ์และชิ้นส่วนต่อการสร้างแคลลัสและการขยายพันธุ์หน้าวัวด้วยวิธีไมโครพรอพาเกชัน. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 15 : 569-578.

สมัชชา นาคสมบัติ, ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ, ชวนพิศ นิยะกิจ, นิจวรรณ สนิทงาม, ภาณุพงศ์ หนูชุม และ อาสลัน หิเล. 2544. การถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพขยายพันธุ์ไม้ดอกการค้าของภาคใต้โดยการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ ครั้งที่ 2. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

สุชาดา พัฒนกนก. 2544. การปรับปรุงพันธุ์ว่านสี่ทิศไทย. เพชรบุรี. สถาบันราชภัฏเพชรบุรีวิทยาลงกรณ์. 61 หน้า

สุทัศนีย์ วงศ์คุปไทย. 2548. การทดสอบความตรงตามพันธุ์ของข้าวโพดลูกผสมโดยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็คโตรโฟริซิส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 52 หน้า.

สุเนตรา ภาวิจิตร. 2537. โรคใบไหม้ของต้นหน้าวัวพบใหม่ในประเทศไทย. ว.ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา. 4(3)ซ 21

สุรพล แสงอุทัย. 2543. การพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายเพื่อการตัดดอก, น.30-33. ใน รายงานสัมนาวิชาการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชครั้งที่ 13 เทคโนโลยีใหม่-พันธุ์พืชใหม่, 13-14 ธันวาคม 2543. สมาคมปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

อดิศร กระแสชัย .2539. การปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอก. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 271 หน้า.

อรพิน เสลัคร และ กิตติภัฎ เฟื่องเพียร. 2543. ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อและการเกิดหน่อของหน้าวัวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรีมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 10 หน้า.

Birdsey, M.R. 1951. The Cultivated Aroids. The Gillick Press. Berkey, California.

Borisy, G.G. and Taylor, E.W. 1967. The mechanism of colchicines action. J. Cell. Biol. 34 : 535-548.

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

Doehlert, D.C. and Duke, S.H. 1983. Specific determination of α–amylase activity in crude plant extracts containing α –amylase. Plant Physiology 71 : 229-234.

Escandon, A. S., Miyajina, I., Alderete, M., Hagiwara, J. C., Facciuto, G., Nata, D. and Soto, S. 2005. Wild ormental germplasm exploration and domestication based on biotechnological approaches. *In vitro* colchicines treatment to obtain a new cultivar of *Scoparia montevidiensis*. Plant Biotechnology 8 : 1-7.

Escandon, A. S., Hagiwara,.J. C. and Alderete, L. M. 2006. A new variety of *Bacopa monnieri* obtained by *in vitro* polyploidization. Plant Biotechnology 9 : 181-186.

Fukui, R., Alvarez, A.M. and Fukui, H. 1998. Differential susceptibility of *Anthurium* cultivars to bacterial blight in folia and systematic infection phase. Plant Disease 82:800-806.

Fukui, R., Fukui, H. and Alvarez, A.M. 1999. Comparisons of single versus multiple bacterial species on biological control of anthurium blight. Phytopathology 89:366-373.

Freeling, M. 1983. Isozyme system to study gene regulation during development: A Leature. *In* Isozyme in Plant Genetics and Breeding, Part A. (eds. S.D. Tanksley and T.J. Orton). pp. 61-83. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.

Griesbach, R. J. and Bhat, R. N. 1990. Colchicine induced polyploidy in *Eustoma grandiflorum*. HortScience 25 : 1284-1286.

Gu, X. F., Yang, A. F., Meng, H. and Zhang, J. R. 2005. *In vitro* induction of tetraploid plants diploid *Zizyphus jujube* Mill. cv. Zhanha. Plant Cell Report 24 : 671-676.

Griffing, B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing system. Australian J. Biol. Sci. 9 : 463-493.

Herrera, J. C., Moreno, L. G., Acuna, J. R., Pena, M. D. and Osorio, D. 2002. Colchicines induced microspore embryogenesis in coffee. Plant Cell, Tissue and Organ Curture 71 : 89-92.

Iwata, R.Y., Tang, C.S. and Kamemoto, H. 1979. Anthocyanin of *Anthurium andraeanum* Lind.. J. Am. Soc. Hort. Sci. 104:464-466.

Iwata, R.Y., Tang, C.S. and Kamemoto, H. 1985. Concentration of anthocyanin affecting spathe color in anthurium. J. Am. Soc. Hort. Sci. 110:383-385.

Kamemoto, H. and Sheffer, R.D. 1978. A new species hybrid, *Anthurium scherzerianum* x *Anthurium wendlingerii* . HortScience 13:177-179.

Kato, M. 1989. Polyploids of *Camellia* through culture of somatic embryo. Hort Science 24 : 1023-1025.

Koh, Y.C. and Davies, F.T. 2001. Mutagenesis and *in vitro* culture of *Tillandsia fasciculate* Swartz var.fasciculate (Bromeliaceae). Scientia Horticulturae 87 : 225-240.

Kuehnle, A.R., Sugii, N. 1991. Callus induction and plantlet regeneration in tissue culture of Hawaiian Anthurium. HortScience 26 : 919-921.

Latado, R.R., Adames, A.H. and Neto, A.T. 2004. *In vitro* mutation of Chrysanthemun (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with ethylmethanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels. Plant Cell, Tissue and Organ Curture 77 : 103-106.

Mishiba, K. and Mii, M. 2000. Polysomaty analysis in diploid and tetraploid *Portulaca grandiflora*. Plant Science 156 : 213-219.

Norman, D.J., Henry, R.J. and Yuen, J.M.F. 1999. Resistance levels of pot anthurium cultivars to *Xanthomonas compestris* pv. dieffenbachiae. HortScience 34:721-722.

Pierik, R.L.M. 1976. Anthurium andraeanum plantlets produced from callus tissue cultivated *in vitro*. Physiol. Plant. 37 : 80-82.

Pierik, R.L.M., Leeuwen, P.V. and Rigter, G.C.C.M. 1979. Regeneration of leaf explants of *Anthurium andraeanum* Linn. *In vitro*. Neth. J. Agric Sci. 27 : 221-226.

Pinheiro, A.A., Pozzobon, M.T., do Valle, C.B., Penteado, M.I.O. and Carneiro, V.T.C. 2000. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizanthia* plants using colchicines. Plant Cell Rep. 19:274-278.

Pryor, R.L. 1972. A tetraploid Gerbera. HortScienec 7 : 197-198.

Ramalakshmi, D.Y., Gangopadhyay, G., Das, S., Dutta, B.K. and Mukherjee, K.K. 2003. Esterase as a marker to study the genetic fidelity of micropropagated banana. Biol. Plant.47: 421–424.

Rose, J. B., Kubba, J. and Tobutt, K. R. 2000. Iduction of tetraploidy in *Buddieia globosa*. Plant Cell, Tissue and Organ Cuture 63: 121-125.

Sheffer, R.D. and Kamemoto, H. 1977. Interspecific hybridization involving *Anthurium andraeanum* Lind. And related species. Proc. Trop. Am. Soc. Hort. Sci. 19:275-283.

Singh, K.P., Singh, B., Raghava, S. P. S. and Kalia, C. S. 2000. Induced flower colour mutations in carnation though *in vitro* application of chemical mutagen. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 60 : 535-539.

Takayuki, I., Takayama, T. and Ishizaka, H. 1998. Amphidiploids between *Alstroemeria ligtu L.* and *A. pelegrina L.* var. rosea induced through colchicines treatment and their reproductive characteristics. Scienta Horticulturae 80 : 235-346.

Teng, W.L. 1997. Regeneration of anthurium adventitious shoot using liquid or raft culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 49 : 153-156.

Vancin, E.F. and Went, F.W. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110 : 605-613.

Yang, X. M., Cao, Z. Y., Wang, Y. M. and Fang, X. W. 2006. *In vitro* tetraploid induction via colchicines treatment form diploid somatic embryo in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Euphytica 152 : 217-224.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 ลักษณะของหน้าวัวพันธุ์ต่าง ๆ

พันธุ์จักพรรดิ์

แดง ปลีสีชมพู

ข้อดี

- เจริญเติบโตดี
- มีการแตกหน่อมาก

ข้อเสีย

- อ่อนแอต่อโรค

พันธุ์ขาวนายหวาน

ลักษณะดอก

ขาว ปลีสีชมพูปลายเหลือง

ข้อดี

- เจริญเติบโตดี
- ต้านทานโรค

ข้อเสีย

- อายุการออกดอกช้า

พันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต

ลักษณะดอก

ชมพู ปลีชมพูอ่อน

ข้อดี

- เจริญเติบโตดี
- ต้านทานโรคดีมาก
- มีเกสรตัวผู้เยอะ
- ก้านดอกยาวและแข็งแรง

ข้อเสีย

- มีการแตกหน่อน้อย
- เพลี้ยหอยเข้าทำลายง่ายแต่ไม่มีความเสียหาย

พันธุ์นาไก

ลักษณะดอก

ชมพูอมส้ม ปลี เหลืองเมื่อเป็นสีขาว

หน้าวัวพันธุ์ต่างประเทศ

พันธุ์ Acropolis

ลักษณะดอก

ขาว ปลีขาวปลายเหลือง

ข้อดี

- เจริญเติบโตดี
- ให้ดอกสม่ำเสมอ 8 ดอก/ต้น/ปี
- ต้านทานโรค

ข้อเสีย

- ดอกมีการฉีกง่าย
- ลักษณะดอกไม่สะดวกในการบรรจุหีบห่อ

พันธุ์ Alexis

ลักษณะดอก

แดง ปลี สีแดงอ่อน

ข้อดี

- มีการเจริญเติบโตดี
- ให้ดอกเร็ว
- ต้านทานโรค

ข้อเสีย

- มีการแตกหน่อน้อย

พันธุ์ Amigo

ลักษณะดอก

แดง ขอบเขียว ปลี เหลืองปลายเขียว

ข้อดี

- เจริญเติบโตดีสม่ำเสมอ
- ต้านทานโรค
- ให้ดอกสม่ำเสมอ
- ให้ผลผลิตเร็ว
- มีเกสรตัวผู้เยอะ

ข้อเสีย

- ดอกมีความแปรปรวนตามสภาพภูมิอากาศ
- สีดอกไม่มีความสม่ำเสมอ

พันธุ์ Fantasis

ลักษณะดอก

ครีม เส้นจานรองดอกสีชมพู

ข้อดี

- เจริญเติบโตดีสม่ำเสมอ
- ให้ดอกสม่ำเสมอ 7.8 ดอก/ต้น/ปี
- ไม่มีความแปรปรวนต่อสภาพภูมิอากาศ
- ก้านดอกยาวและแข็งแรง
- ต้านทานโรค

ข้อเสีย

-ตลาดมีความต้องการมาก
- ไม่มีการแตกหน่อ

พันธุ์ Figo

ลักษณะดอก

ชมพู ปลี ชมพูเข้มปลายเขียว

ข้อดี

- เจริญเติบโตดี
- ให้ดอกสม่ำเสมอ
- ต้านทานโรค
- ก้านดอกยาวและแข็งแรง

ข้อเสีย

- ไม่มีการแตกหน่อ
- เกสรตัวผู้เกิดยา

พันธุ์ Florentino

ลักษณะดอก

ชมพู ปลีชมพู

ข้อดี

- เจริญเติบโตดี
- ให้ดอกสม่ำเสมอ
- ต้านทานโรค
- แตกหน่อเยอะมาก

ข้อเสีย

- ดอกมีขนาดเล็ก

พันธุ์ Lady Bath

ลักษณะดอก

ชมพูเข้ม ปลีสีชมพูอมแดง

ข้อดี

- เจริญเติบโตดี
- ต้านทานโรค

ข้อเสีย

- ไม่ทนต่อสภาพภูมิอากาศ

พันธุ์ Lady jane

ลักษณะดอก

ชมพูอ่อนปลีชมพู

ข้อดี

- เจริญเติบโตดี
- ให้ดอกสม่ำเสมอ
- ต้านทานโรค
- มีเกสรตัวผู้มาก

ข้อเสีย

- เพลี้ยไฟและแมลงหวี่ขาวเข้าทำลายได้ง่าย
- ไม่มีการแตกหน่อ

พันธุ์ Midori

ลักษณะดอก

เขียว ปลีเหลือง

ข้อดี

- เจริญเติบโตดี
- ให้ดอกสม่ำเสมอ 7 ดอก/ต้น/ปี
- ต้านทานโรค

ข้อเสีย

- ดอกมีความแปรปรวนตามสภาพภูมิอากาศ
- ลักษณะดอกไม่สะดวกในการบรรจุหีบห่อ

พันธุ์ Momohara

ลักษณะดอก

ขาวอมชมพู ปลีสีขาวปลายเหลือง

ข้อดี

- เจริญเติบโตดี สม่ำเสมอ
- แข็งแรงต้านทานโรค
- มีเกสรตัวผู้มาก

ข้อเสีย

- ไม่มีการแตกหน่อ

พันธุ์ Prety Ann

ลักษณะดอก

ชมพู ปลี ชมพูอมเหลืองเล็กน้อย

ข้อดี

- เจริญเติบโตดี
- ต้านทานโรค

ข้อเสีย

- ไม่ทนต่อสภาพภูมิอากาศ

พันธุ์ Rapido

ลักษณะดอก

สีม่วง ปลีสีม่วง

- เจริญเติบโตดี สม่ำเสมอ

ข้อดี

- แข็งแรงต้านทานโรค

- .ให้ดอกสม่ำเสมอ 7.5/ดอก/ต้น/ปี

ข้อเสีย

- สีดอกจางเร็ว

พันธุ์ Red hot

ลักษณะดอก

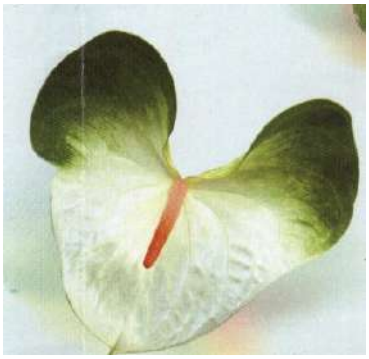
สีชมพู ปลีสีชมพูค่อนข้างเข้มและสั้น

ข้อดี

- เจริญเติบโตดี
- ต้านทานโรค

ข้อเสีย

- ไม่ทนต่อสภาพภูมิอากาศ



พันธุ์ Simba

ลักษณะดอก

สีขาวแกมเขียว ปลี สีแดงอ่อนปลายแดง

ข้อดี

- เจริญเติบโตดี
- จานรองดอกขนาดใหญ่
- ก้านดอกตรง ยาวและแข็งแรง
- ให้ดอกสม่ำเสมอ 7.2/ดอก/ต้น/ปี
- ตลาดมีความต้องการมาก
- มีความต้านทานโรค

ข้อเสีย

- อายุมากปลีเริ่มสั้นลง
- ใบมักเกิดเป็นรอยด่างคล้ายเป็นไวรัส

พันธุ์ Sonate

ลักษณะดอก

ชมพู ปลีสีชมพูเข้ม

ข้อดี

- เจริญเติบโตดีสม่ำเสมอ
- ให้ดอกสม่ำเสมอ 7 ดอก/ต้น/ปี
- เกสรตัวผู้มาก
- อ่อนแอต่อโรคโคนเน่า

ข้อเสีย

- ดอกมีความแปรปรวนตาม

สภาพภูมิอากาศ

พันธุ์ Tropical

ลักษณะดอก

สีแดง ปลีดอกเหลือง

ข้อดี

- เจริญเติบโตดี
- มีความต้านทานโรคดี
- ให้ดอกสม่ำเสมอ 8 ดอก/ต้น/ปี
- ก้านดอกยาวและตรง ให้ผลผลิตเร็ว

ข้อเสีย

- ไม่มีการแตกหน่อ

ภาคผนวกที่ 2 หน้าวัวลูกผสมพันธุ์ต่าง ๆ

Florentino x Sonate

อายุ 3 ปี 2 เดือน

Florentino x Lady Jane

อายุ 2 ปี 8 เดือน

Florentino x Mumuhara

อายุ 2 ปี 8 เดือน

Rabido x Figo

อายุ 2 ปี 9 เดือน

Figo x Mumuhara

อายุ 2 ปี 7 เดือน

Figo x Lady Jane

อายุ 2 ปี 4 เดือน

Rabido x เปลวเทียนภูเก็ต

อายุ 1ปี 10 เดือน

Rabido x Sonate

อายุ 1ปี 10 เดือน

Figo x เปลวเทียนภูเก็ต

อายุ 1ปี 8 เดือน

Florentino x OP.

อายุ 1ปี 8 เดือน

เปลวเทียนภูเก็ต x Sonate

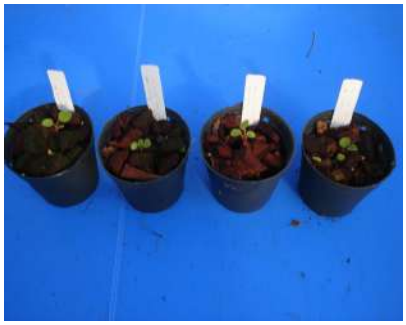
อายุ 1 ปี

Florentino x Simba

อายุ 1ปี

นาไก x เปลวเทียนภูเก็ต

อายุ 4 เดือน



Sonate x OP.

อายุ 8 เดือน

Rapido x Simba

อายุ 7เดือน

Terra x Simba

อายุ 8 เดือน

Prety Ann x Amingo

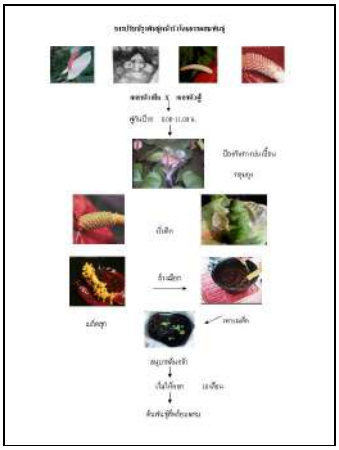
อายุ 8 เดือน

Terra x Amigo

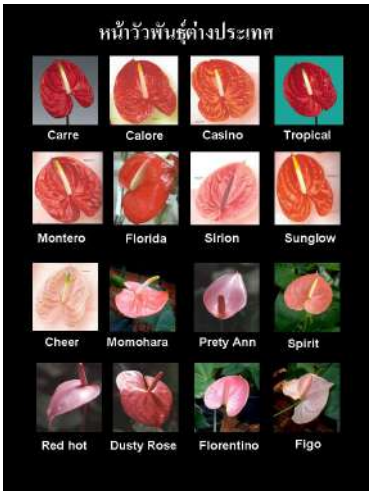
อายุ 7 เดือน

ภาคผนวกที่ 3 เอกสารการเผยแพร่และการนำเสนอในรูปแบบต่างๆ

1. การนำเสนอรูปแบบบอร์ดงานเกษตรปี 2547 และเผยแพร่เป็นเอกสารแผ่นพับ



2. การนำเสนอรูปแบบโปสเตอร์งานเกษตรปี 2549 และเผยแพร่เป็นเอกสารแผ่นพับ



3. การนำเสนอรูปบทความ และแผ่นพับในงานเกษตรภาคใต้ปี 2549

การปลูกหน้าวัวในภาคใต้

ความสำคัญ

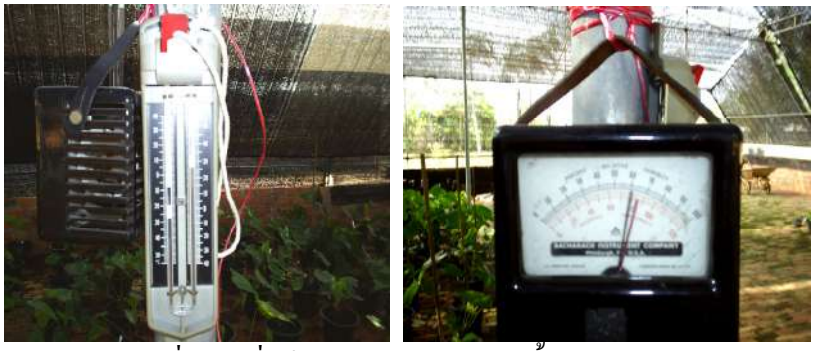
หน้าวัวเป็นไม้ดอกที่มีถิ่นกำเนิดจากอเมริกากลางและอเมริกาใต้แถบร้อนและแพร่กระจายไปทั่วโลกโดยเฉพาะประเทศแถบร้อนที่มีความชื้นสูงรวมทั้งในประเทศไทย

ดอกหน้าวัวมีลักษณะเด่นพิเศษกว่าดอกไม้อื่น ๆ คือดอกออกได้ตลอดปี บานทน มีอายุการปักแจกันนาน สีสรรสวยงาม นับว่าความนิยมการใช้ดอกหน้าวัวประดับในบ้าน ร้านอาหาร ตลอดจนพิธีการต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น เพราะความสวยงามและความคงทนของดอกหน้าวัวในการปักแจกัน ทำให้ดอกหน้าวัวมีราคาสูงกว่าไม้ดอกชนิดอื่น ๆ นับว่าเป็นไม้ดอกสำคัญอีกชนิดหนึ่งที่ทำรายได้แก่ประเทศไทยได้เท่าเทียมกับกล้วยไม้ ในปัจจุบันเกษตรกรผู้ปลูกเลี้ยงหน้าวัวสามารถสร้างรายได้จากการปลูกเลี้ยงหน้าวัวเกือบ 1 ล้านบาท/ไร่/ปี

เริ่มต้นปลูกหน้าวัวอย่างไรดี

หน้าวัวเติบโตได้ดีในสภาพที่มีความชื้นสูง แสงรำไร และมีลมพัดผ่านไม่แรงนัก สิ่งแรกที่ควรคำนึงถึงคือปริมาณแสงแดดที่ต้นได้รับ หากได้รับแสงแดดมากเกินไปจะทำให้ใบเหลือง สีดอกซีดและเป็นรอยไหม้ตาย แต่ถ้าได้รับแสงน้อยเกินไปจะทำให้หน้าวัวเติบโตช้า ใบมีสีเขียวเข้ม แคระแกร็น ดอกมีขนาดเล็ก การให้ดอกลดลง ลำต้นยืดยาวมากแต่ ปริมาณแสงที่เหมาะสมคือประมาณ 20 - 30 % จะทำให้ต้นออกดอกดก คุณภาพดอกดี ขณะเดียวกันต้องระบายน้ำได้ดีด้วย

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการปลูกอยู่ในช่วง 27-30 องศาเซลเซียสในเวลากลางวันและกลางคืน 18-20 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ต่ำเกินไปทำให้จำนวนดอกต่อต้นลดลงแต่ก็ให้ดอกที่ใหญ่และมีสีเข้มทดแทน

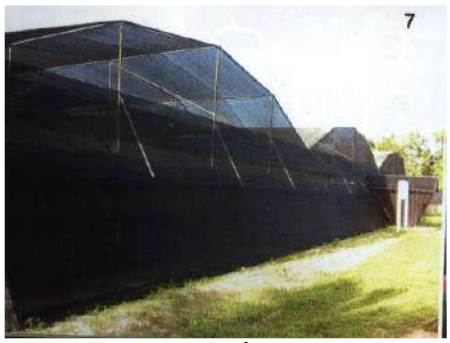


เครื่องมือที่ใช้วัดอุณหภูมิและความชื้นภายในโรงเรือน

การเลือกแบบของโรงเรือน

จากการศึกษาเกี่ยวกับโรงเรือนหน้าวัว เบื้องต้นพบว่า การสร้างโรงเรือนหน้าวัวในเขตภาคใต้เนื่องจากภาคใต้ฝนตกค่อนข้างชุก การเลือกรูปแบบของโรงเรือนให้เหมาะสมจึงเป็นเรื่องสำคัญควรสร้างโรงเรือนที่มีหลังคาต่างระดับเพื่อให้มีช่องว่างระบายอากาศ ลดอุณหภูมิภายในโรงเรือนและควรมุงหลังคาพลาสติกเพื่อลดการกระแทกของเม็ดฝน และลดการแพร่การระบาดของโรคโดยเฉพาะโรคใบไหม้ที่เกิดจากแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามการออกแบบโรงเรือนต้องคำนึงถึงระยะห่างในการมุงพลาสติกด้วย สำหรับโรงเรือนที่มุงหลังคาพลาสติกภายใต้ตาข่ายพรางแสงจะดีกว่าการมุงหลังคาพลาสติกบนตาข่ายพรางแสงเพราะอุณหภูมิภายในโรงเรือนน้อยกว่าและการทำความสะอาดง่ายขึ้นเมื่อเกิดตะไคร่น้ำหรือวิ่งสกปรกอื่น ๆ

โรงเรือนแบบตรง



โรงเรือนแบบกึ่งโค้ง

โรงเรือนแบบประยุกต์

โรงเรือนแบบหน้าจั่ว

วัสดุปลูก

หน้าวัวปลูกได้ทั้งในกระถางและในแปลงวัสดุปลูกมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของหน้าวัว pH ของวัสดุปลูกควรเป็น 6.5 วัสดุปลูกควรมีการระบายอากาศดี แต่ในขณะเดียวกันก็ต้องให้ความชื้นพอเพียงและช่วยพยุงลำต้นได้ด้วย วัสดุปลูกที่นิยมใช้ได้แก่ ถ่านกะลาปาล์ม ถ่านไม้ยาง ถ่านซังข้าวโพด ซึ่งแต่ละชนิดมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไปคือ ถ่านกะลาปาล์มหาง่ายแต่ราคาสูง ถ่านไม้ยางจะมีวัชพืชพวกมอสมากส่วนถ่านซังข้าวโพดจะมีเห็ดราเกิดขึ้น

ถ่านกะลาปาล์ม

ถ่านไม้ยาง

สายพันธุ์หน้าวัว

หน้าวัวสายพันธุ์ของไทยที่นิยมปลูกเพื่อตัดดอกคือพันธุ์ดวงสมร ซึ่งมีจานรองดอกสีแดง ผกามาศซึ่งมีจานรองดอกสีส้ม และพันธุ์ขาวนายหวานซึ่งมีจานรองดอกสีขาว พันธุ์ไทยอื่น ๆ คือพันธุ์จักรพรรดิ์ แดงนุกูล และ กษัตริย์ศึก สำหรับหน้าวัวพันธุ์ต่างประเทศซึ่งนำเข้าจากประเทศเนเธอร์แลนด์ ได้แก่พันธุ์ Rapido Midori Tropical เป็นต้น ในปัจจุบันประเทศไทยต้องสูญเสียเงินตราต่างประเทศเพื่อซื้อต้นพันธุ์จากต่างประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท ซึ่งเป็นต้นทุนการผลิตถึงครึ่งหนึ่งของต้นทุนทั้งหมด หากเราให้ความสำคัญกับการปรับปรุงพันธุ์กันอย่างจริงจังจะสามารถทำให้ลดการสูญเสียไปได้ รวมทั้งจะได้สายพันธุ์หน้าวัวที่เหมาะสมกับสภาพการปลูกของไทยอีกทั้งอาจทำให้ประเทศไทยสามารถส่งออกพันธุ์ใหม่ ๆ ไปยังต่างประเทศได้ในอนาคตพันธุ์จากต่างประเทศสีแปลก หลากลาย ผู้บริโภคนิยมจึงนำเข้าทำให้เสียเงินตราเป็นจำนวนมากคิดเป็น 50 % ของต้นทุน

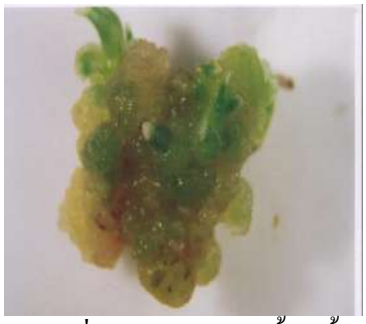
เลี้ยงอย่างไรให้ได้ผลดี

ปริมาณและความถี่ในการให้น้ำต้นหน้าวัวขึ้นอยู่กับวัสดุปลูกที่ใช้ การพรางแสงและสภาพภูมิอากาศ ถ้าอากาศร้อนต้องให้น้ำวันละ 3 เวลา ครั้งละ 15 นาที ถ้าอากาศเย็นก็ลดการให้เป็นวันละ 2 ครั้ง ควรให้วัสดุปลูกมีความชื้นแต่ไม่แฉะ ส่วนการให้ปุ๋ย หน้าวัวเป็นไม้ที่ไม่ค่อยชอบปุ๋ยมากนัก ถ้าให้ปุ๋ยเข้มข้นมากเกินไปจะทำให้ใบไหม้และหงิกงอ ต้นกล้าควรให้ปุ๋ยยูเรียอัตรา 1 ช้อนโต๊ะต่อน้ำหนึ่งแกลลอนใช้ฉีดพ่นตามต้นหรือราดลงบนวัสดุปลูกก็ได้ ในระยะออกดอก ควรให้ปุ๋ยสูตรเสมอ 14-14-14 อัตรา 1 ช้อนโต๊ะ ทุก ๆ 3 เดือน โดยโรยรอบ ๆ โคนต้น ควรมีการตัดแต่งใบบ้างเพื่อให้โคนต้นมีการระบายอากาศได้ดี ไม่ให้ทึบมากจนเกินไปและยังช่วยให้โรคและแมลงลดลงด้วย โดยตัดให้เหลือยอดละ 3-4 ใบ

มีการขยายพันธุ์อย่างไรบ้าง

หน้าวัวขยายพันธุ์ง่าย ทำได้ทั้งวิธีตัดยอดขณะที่เป็นต้นกล้าหรือต้นขนาดใหญ่ หากมีรากติดยอดที่ตัดมาด้วยจะทำให้ต้นตั้งตัวเร็วและเจริญเติบโตเร็ว หรืออาจจะขยายพันธุ์ด้วยวิธีตัดหน่อก็ได้ โดยตัดหน่อที่มีราก 2-3 ราก ไม่ควรตัดหน่อที่ยังมีขนาดเล็กเพราะจะทำให้ตั้งตัวช้าหากต้องการได้ต้นพันธุ์จำนวนมากก็ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยจะใช้ใบอ่อนที่ยังม้วนอยู่หรือใบอ่อนที่คลี่แล้วก็ได้ การขยายพันธุ์แต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน วิธีตัดยอดจะได้ต้นพันธุ์ที่ให้ดอกเร็วที่สุดแต่ได้จำนวนต้นน้อย วิธีตัดหน่อจะได้ต้นขนาดเล็ก ถ้าเป็นต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ต้นจำนวนมากแต่ใช้เวลานานกว่าจะออกดอกแต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์

ใบอ่อนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โรคและแมลง

โดยทั่วไปหน้าวัวมีศัตรูรบกวนน้อย เนื่องจากมีใบที่หนาและมีไขเคลือบใบ อย่างไรก็ตามหากสภาพแวดล้อมเหมาะสมกับศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ ก็ก่อให้เกิดการระบาดได้

- โรคใบไหม้ จากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*
- โรคแอนแทรกโนส จากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*
- โรคใบแห้ง จากเชื้อรา *Phytophthora* sp.
- โรครากเน่า จากเชื้อเห็ด *Marasmius* sp.
- เพลี้ยไฟ
- ไรแดงและไรขาว

โรคที่เกิดจากเพลี้ยไฟที่เข้าทำลายใบและดอก

โรคที่สำคัญที่พบในภาคใต้และก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากจนทำให้บางโรงเรือนต้องปิดกิจการ คือโรคใบไหม้ที่เกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv *diffenbachiae* อาการโดยทั่วไปเป็นแผลไหม้แห้งสีน้ำตาลเนื่องจากความชื้นสัมพันธ์ในอากาศสูง ปากใบเปิดเชื้อเข้าทำลายได้ง่ายทางปากใบ โรคนี้ระบาดรุนแรงในฤดูฝน โดยเฉพาะในโรงเรือนที่ไม่มุงหลังคาพลาสติก น้ำฝนจะชะแบคทีเรียที่เป็นโรคและกระเด็นไปยังใบปกติ การป้องกันกำจัดตัดใบที่เป็น หรือยกกระถางที่เป็นโรคออกจากโรงเรือน เผาทำลาย ต้องฆ่าเชื้อที่มีดหรือเครื่องมือด้วยแอลกอฮอล์ 70 % หรือน้ำยาฆ่าเชื้อทุกครั้ง

โรคใบไหม้จากเชื้อรา *Phytophthora* sp. อาการเป็นแผลช้ำหม่นคล้ายถูกน้ำร้อนลวก แผลขยายลามเป็นแผลใหญ่อย่างรวดเร็วไม่มีขอบเขตจำกัด ต่อมาแผลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือแห้งกรอบ พบระบาดรุนแรงในฤดูฝน เนื่องจากเชื้อชอบความชื้นสูงทั้งสปอร์ถูกชะล้างไปกับน้ำผนได้ง่าย การป้องกันฉีดพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อราพวก Difolatan 80 หรือพวก Metalaxyl

โรคแอนแทรกโนส เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* พบทั้งใบและดอก อาการเป็นแผลสีน้ำตาลรูปกลมหรือรูปไข่มีขอบเขตชัดเจน ขนาด 1-3 เซนติเมตร กลางแผลอาจพบเชื้อราเป็นจุดเล็ก ๆ สีดำ เป็นโรคที่พบทั่วไปไม่รุนแรง กำจัดโดยใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรายกเว้นจำพวกกำมะถันซึ่งไม่สามารถกำจัดเชื้อนี้ได้

โรครากเน่า รากแห้งจากเห็ด *Marasmius* sp. มักพบในแปลงที่ใช้วัสดุปลูกอุ้มน้ำ รากและวัสดุปลูกจะปรากฏเส้นใยของราสีขาวลักษณะหยาบ ๆ เกาะอยู่ ใบล่าง ๆ เหลืองขอบใบแห้งเล็กน้อย ต่อมารากแห้งเป็นสีน้ำตาลและพบดอกเห็นสีขาวประมาณ 0.5-2 เซนติเมตร หากพบต้นที่เป็นโรคให้แยกกระถาง เปลี่ยนเครื่องปลูก ตัดรากที่เน่าทิ้งหรือเฉือนส่วนที่มีราสีขาวออกให้มากที่สุดแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อคลอร็อกซ์ (Clorox) เข้มข้น 1: 10 ส่วนเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงปลูกใหม่ กระถางปลูกต้องฆ่าเชื้อโดยแช่ในฟอร์มาลีน 1 ชั่วโมง หากรุนแรงมากให้เผาทำลายเพื่อลดการกระจายของสปอร์ของเชื้อราไปยัง

ต้นอื่น ๆ หากมีจำนวนมากให้ใช้สารกำจัดเชื้อราประเภท Carbendazim ฉีดพ่นในกระถางทุกสัปดาห์เป็นเวลา 1 เดือน จะช่วยลดโรคได้

หอยทากเป็นศัตรูที่สำคัญ มักพบในโรงเรือนที่ใช้อิฐเป็นวัสดุปลูกและมีความชื้นสูง วางกระถางที่พื้น หอยทากมักออกมากัดกินใบและดอกในเวลากลางคืน กลางวันจึงไม่เห็นตัว แต่ปรากฏทางเดินเป็นสีเทาเงินสะท้องแสง ป้องกันโดยใช้ปูนขาวโรยรอบกระถาง หอยทากจะสามารถจับตัวมาทำลายได้ หรือใช้สารเคมีกำจัดหอยทาก

เพลี้ยไฟเป็นศัตรูที่สำคัญ เข้าทำลายดอกและใบขณะที่ยังไม่บาน เกิดเป็นแผลช้ำเล็ก ๆ ในระยะแรกต่อมาจะมีสีขาวหรือด่าง การป้องกันใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงประเภทดูดซึมพวก

เอกสารอ้างอิง

นิรนาม. 2547 ก. ตระเวนสวนหน้าวัวคุณภาพรายใหญ่ระดับเอเชีย ว.เคหการเกษตร 28 (10) : 65-82.

นิรนาม. 2544 ข. การควบคุมโรคหน้าวัว. ว.เคหการเกษตร 25(1) : 156-160.

นิรนาม. 2547 ค. หน้าวัวไม้ตัดทั้งดอกและใบ. ว.เคหการเกษตร 28(2) : 227-230..

พีระศักดิ์ ฉันท์อุดมโชค. 2538. เนเจอร์ เนอร์สเซอรี่ สวนหน้าวัว-กล้วยไม้ส่งออก.
ว.เคหการเกษตร19(8) : 109-116.

มหาสมพงษ์ ทับพุ่ม. 2545. ปลูกเลี้ยงหน้าวัวตามสไตล์มหาสมพงษ์. ว.เคหการเกษตร
26(4) : 122-126.

3. บทความเผยแพร่ทางวิทยุกระจายเสียงของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

โอกาสการปลูกหน้าวัวเป็นการค้าในภาคใต้

ในสมัยที่ผู้เขียนเป็นเด็กเห็นดอกไม้ชนิดหนึ่งสีแดงสด เมื่อดอกบานแล้วก็ยังบานอยู่บนต้นได้เป็นเดือน การปลูกก็เห็นคุณตาใช้ก้อนอิฐทุบไม่ต้องละเอียดใส่ในกระถางและและวางไว้ได้ต้นจำปี ไม่เคยใส่ปุ๋ยหรือดูแลอะไรเป็นพิเศษ แต่ก็มีดอกให้เราได้ชื่นชมอยู่ตลอดเวลา คุณตาบอกว่าชื่อดอกหน้าวัว ก็รู้สึกแปลก ๆ เพราะไม่เหมือนหน้าวัวเลย และแปลกใจมากขึ้นเมื่อคุณตาบอกว่าสีแดง ๆ ที่เห็นไม่ใช่กลีบดอกแต่เป็นจานรองดอก ส่วนที่เป็นดอกคือส่วนที่เป็นก้านแท่งเหนือจานรองดอกที่เรียกว่าปลี จานรองดอกมีหลายสีแต่ที่เห็นบ่อยๆ คือสีแดงและส้ม ผู้เขียนเข้าใจว่า หน้าวัวเป็นไม้พื้นเมืองของภาคใต้ที่ชอบอากาศร้อนชื้น เมื่อโตขึ้นจึงได้ทราบว่าเข้าใจผิด

หน้าวัวสามารถปลูกได้เกือบทุกพื้นที่ในบ้านเรา แต่ทั้งนี้ต้องเลือกพันธุ์ที่มีความเหมาะสมสามารถทนทานต่อสภาพพื้นที่นั้น ๆ ได้ หน้าวัวเป็นไม้ตัดดอกอีกชนิดหนึ่งที่กำลังเป็นที่นิยมมากขึ้นเรื่อย ๆ ในตลาดโลก แม้ว่าหน้าวัวจะเพิ่งก้าวเข้าสู่วงการไม้ดอกโลกไม่นานแต่ก็ก้าวได้ค่อนข้างเร็ว ในปี 2545 มีการซื้อขายดอกหน้าวัวผ่านตลาดประมูลในเนเธอร์แลนด์ประมาณ 63 ล้านดอก คิดเป็นมูลค่าประมาณ 1,600 ล้านบาท ปัจจุบันหน้าวัวอยู่ในลำดับที่ 12 ของไม้ดอกที่มีการซื้อขายมากที่สุดในตลาดประมูล และมูลค่าการซื้อขายยังคงสูงขึ้นกว่าปีที่ผ่านมา นอกจากหน้าวัวจะผลิตเป็นไม้ตัดดอกแล้วยังสามารถผลิตเป็นไม้กระถางได้อีกด้วย

หน้าวัวนับเป็นไม้เมืองร้อนที่มีความสำคัญอันดับ 2 รองจากกล้วยไม้ ตลาดหน้าวัวที่สำคัญของโลกคือ อเมริกาและยุโรป ช่วงระยะ 3 ปีที่ผ่านมาปริมาณความต้องการหน้าวัวในตลาดยุโรปค่อนข้างคงที่ โดยหน้าวัวคุณภาพดีนำเข้าจากเนเธอร์แลนด์เป็นหลัก ในตลาดยุโรปทั่วไปนิยมดอกหน้าวัวสีแดงมากที่สุด (40%) รองลงมาเป็นสีชมพู (15%) สีขาว (13%) สีส้ม (12%) โอบาเกะ (8%) ที่เหลือเป็นสีอื่น ๆ (ข้อมูลจากตลาดประมูลเนเธอร์แลนด์)

หน้าวัวเป็นไม้ดอกที่มีศักยภาพสูง มีโอกาสขยายสู่ตลาดต่างประเทศในอนาคต หน้าวัวในบ้านเราจึงมีโอกาสพัฒนาอีกมาก ในระยะ 2-3 ปีที่ผ่านมา มีการขยายตัวในประเทศเพิ่มขึ้น ทั้งการผลิตและการตลาด และเชื่อว่าอัตราการบริโภคยังสามารถเพิ่มได้อีก หากมีการส่งเสริมและให้ความสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์มากยิ่งขึ้น ขณะเดียวกันปริมาณการใช้ในตลาดโลกก็มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นและประเทศไทยก็มีโอกาสเช่นกันที่จะผลิตป้อนตลาดต่างประเทศ โดยเฉพาะตลาดประเทศเพื่อนบ้านของเราที่ยังมีการปลูกไม่มากนัก และยังมีการนำเข้าอยู่ ทั้งสิงคโปร์และฮ่องกง ซึ่งนำเข้าหน้าวัวจากประเทศในแถบแคริเบียน อีกประเทศคือญี่ปุ่นซึ่งส่วนใหญ่นำเข้าดอกหน้าวัวจากฮาวายและหมู่เกาะเมอริเซียส ถือเป็นตลาดใหญ่ของหน้าวัวในภูมิภาคเอเชีย หลายประเทศจึงหวังเจาะตลาดญี่ปุ่นรวมทั้งประเทศไทย

ด้วย ขณะนี้การเปิดตลาดหน้าวัวในต่างประเทศได้เริ่มไปบ้างแล้ว โดยผู้ส่งออกกล้วยไม้หลายรายส่งหน้าวัวไปทดลองตลาดพร้อมกับกล้วยไม้ ปัจจุบันตลาดโลกเริ่มรับรู้แล้วว่าประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตหน้าวัวตัดดอก ไทยจึงต้องยกระดับคุณภาพของดอกหน้าวัวให้ได้มาตรฐานตามความต้องการของตลาดเสียก่อนจึงจะเข้าไปแข่งกับเจ้าเดิมที่ครองตลาดอยู่ก่อนแล้ว

สถานการณ์หน้าวัวไทยในปัจจุบัน มีการตื่นตัวและขยายการผลิตอย่างชัดเจนเมื่อไม่กี่ปีมานี้ เนื่องจากช่วงที่ไม้ดอกชนิดนี้กำลังเติบโตในตลาดโลกนั่นเอง ปัจจุบันพื้นที่ปลูกหน้าวัวเป็นการค้ามีอยู่ 100-120 ไร่ หรือประมาณ 1-1.2 ล้านต้น (8,000-10,000 ต้น/ไร่) ให้ผลผลิตประมาณ 3 ล้านดอก/ปี และคาดว่าการขยายพื้นที่ปลูกหน้าวัวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่เป็นไปอย่างช้า ๆ เนื่องจากต้นทุนโรงเรือนและการปลูกค่อนข้างสูง

สำหรับตลาดดอกหน้าวัวในบ้านเรา แบ่งกลุ่มลูกค้าออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ลูกค้าจัดทำพวงหรีดดอกไม้และร้านดอกไม้ต่าง ๆ ปริมาณที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นร้านพวงหรีด ซึ่งเน้นดอกหน้าวัวสีสดใส เช่น สีแดง เขียว ขาว และส้ม ปริมาณการใช้ในส่วนนี้ค่อนข้างคงที่ การขยายตัวไม่สูงมากแต่หากมีการประชาสัมพันธ์การใช้หน้าวัวแทนดอกไม้นำเข้าอื่น ๆ ก็จะทำให้อัตราการขยายตัวของตลาดหน้าวัวเพิ่มขึ้นได้อีก ปัจจุบันดอกหน้าวัวถูกขายเข้าปากคลองตลาดประมาณ 5,000-7,000 ดอก/สัปดาห์ หรือเฉลี่ยปีละ 260,000-364,000 ดอก/ปี นอกจากนั้นผู้ผลิตขายตรงไปยังร้านดอกไม้ โรงแรม ตลาดในท้องถิ่นหรือในพื้นที่ต่างจังหวัด การที่เกษตรกรไม่รวมตัวกันทำให้ยากต่อการรวบรวมดอกหน้าวัวเข้ามายังส่วนกลาง ส่วนการส่งออก ยังมีจำนวนไม่มากนัก คิดเป็นร้อยละ 2.5 ของปริมาณที่ผลิต

แหล่งผลิตหน้าวัวของไทยค่อนข้างกระจัดกระจายพอสมควรอาจเป็นเพราะหน้าวัวสามารถปลูกได้ดีแทบทุกภาคในสภาพแวดล้อมของเมืองไทย เช่น เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง เพชรบูรณ์ เลย หน้าวัวในเขตภาคเหนือค่อนข้างจะได้เปรียบในเรื่องของสภาพอากาศ ที่หนาวเย็นซึ่งทำให้หน้าวัวมีคุณภาพค่อนข้างดี คือดอกมีขนาดใหญ่และสีจัดกว่าที่ปลูกเลี้ยงในภาคอื่น สำหรับการเพาะเลี้ยงในภาคใต้ สวนที่มีพื้นที่ปลูกมากกว่า 3 ไร่ขึ้นไปมีเพียง 2 สวนคือที่จังหวัดนครศรีธรรมราช คือบริษัท สตาร์ฟลอร่า ถนนทุ่งสง-ห้วยยอด อำเภอทุ่งสง และบริษัท วีรา ฟลอรา กิ่งอำเภอช้างกลาง ส่วนจังหวัดอื่น ๆ เช่น ชุมพร กระบี่ พังงา ภูเก็ต สงขลาและ นราธิวาส โดยที่ จังหวัด นราธิวาสนั้นเป็นโครงการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้-หน้าวัวในหมู่บ้านจุฬาภรณ์ 5 เพื่อส่งเสริมอาชีพใน 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้ การที่มีการปลูกอย่างแพร่หลายในภาคใต้นั้นเริ่มมาจากศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร จังหวัดกระบี่ สังกัดกรมส่งเสริมการเกษตร ได้จัดอบรมและส่งเสริมการเพาะเลี้ยงหน้าวัวแก่เกษตรกรและผู้สนใจโดยใช้สายพันธุ์ที่เหมาะสมกับภาคใต้เกษตรกรให้ความสนใจจำนวนมาก ซึ่งผลจากการฝึกอบรมก็ส่งผลให้มีการปลูกเลี้ยงหน้าวัวเพื่อเป็นการค้าในพื้นที่ภาคใต้และได้รับความนิยมแพร่หลาย เนื่องจากมี

ความชื้นพอเหมาะ ไม่แล้งจนเกินไป นอกจากในช่วงที่ฝนตกชุกมาก อาจทำให้มีการระบาดของโรคต่าง ๆ ได้หากมีการจัดการไม่ดี เช่นโรคใบไหม้ที่เกิดจากแบคทีเรีย นอกจากนั้นก็ไม่มีปัญหาอะไร พันธุ์ที่นิยมในตลาดโลกหลายพันธุ์ที่สามารถปลูกได้ดีในภาคใต้ไม่ว่าจะเป็นพันธุ์สีแดง เช่น ทรอปิคอล คาเร พันธุ์สีขาว เช่น อะโครโพลิส Merenge สีชมพู เช่น โซเนท สีครีม เช่นแฟนตาเซีย สีส้ม เช่น คาสิโน แซมบ้า สีม่วงเช่น ราพิโด้ สีเขียวเช่น มิโดริ ฟีตาเซ โอบาเกะ เช่น สุลต่าน เป็นต้น

จึงเห็นได้ว่าโอกาสการเพาะเลี้ยงหน้าวัวพื่อเป็นการค้าในภาคใต้นั้นยังมีโอกาสความเป็นไปได้สูง อยู่ที่การจัดการในหลาย ๆ ด้าน เช่น

ต้นพันธุ์ รัฐควรส่งเสริมการวิจัยและการผลิตต้นกล้าเพื่อให้ได้ต้นกล้าราคาไม่สูงจนเกินไปและเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ รวมทั้งเป็นต้นกล้าที่ปลอดโรค เนื่องจากมีงานวิจัยหลายชิ้นที่กล่าวว่าเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *diffenbachiae* สาเหตุโรคใบไหม้สามารถติดไปในเนื้อเยื่อพืชได้โดยที่พืชไม่แสดงอาการโรค เมื่อนำต้นกลับไปปลูกในโรงเรือนที่ปลอดโรคพืชก็ยังแสดงอาการโรคได้

ด้านการจัดการโรงเรือนให้เหมาะสมกับพืช ส่วนใหญ่เกษตรกรมีความรู้ความชำนาญดีอยู่แล้ว ควรให้ความรู้เรื่องการจักการโรงเรือนให้ปลอดต่อโรค โดยเฉพาะโรคใบไหม้ของหน้าวัวซึ่งระบาดและทำความเสียหายอย่างรุนแรงต่อเกษตรกรผู้ปลูกหน้าวัวสายพันธุ์ที่นำเข้าจากประเทศเนเธอร์แลนด์ ซึ่งนอกเหนือจากการใช้สารเคมีกำจัดแล้ว การนำต้นพืชที่เป็นโรคออกจากโรงเรือนในกรณีที่ปลูกในกระถาง หรือการตัดใบที่เป็นโรคด้วยมีดที่แช่ในแอลกอฮอล์ 70 % หรือน้ำยาฆ่าเชื้อทุกครั้งจะช่วยลดปริมาณเชื้อและลดการระบาดได้ นอกจากนั้นไม่ควรปลูกพืชในวงศ์ Araceae ตัวอื่น ๆ เช่นสาวน้อยประแป้ง ฟิโลเดนดรอน บอนสี เขียวหมื่นปี และเงินไหลมาในโรงเรือนเดียวกันเนื่องจากเชื้อเข้าทำลายพืชเหล่านี้ได้เช่นกัน

ด้านการตลาด ควรศึกษามาตรฐานและความนิยมของผู้บริโภคทั้งตลาดภายในและตลาดต่างประทศเพื่อผลิตให้ได้มาตรฐานของตลาดนั้น ๆ และมีปริมาณเพียงพออย่างต่อเนื่อง จากข้อมูลการส่งออกและนำเข้าของแต่ละประเทศ จะเห็นได้ว่ายังมีช่องว่างสำหรับตลาดการส่งออกหน้าวัวของไทยเพียงแต่ต้องศึกษาตลาดให้ชัดเจน และภาคใต้ก็เป็นอีกแหล่งหนึ่งที่สามารถผลิตหน้าวัวที่มีคุณภาพไม่แพ้ที่อื่น ๆ

เอกสารอ้างอิง

นิรนาม. 2546 . อนาคตหน้าวัวไทยก้าวไกลสู่ธุรกิจการส่งออก. ว. เคหการเกษตร 27 (10) : 154-165.

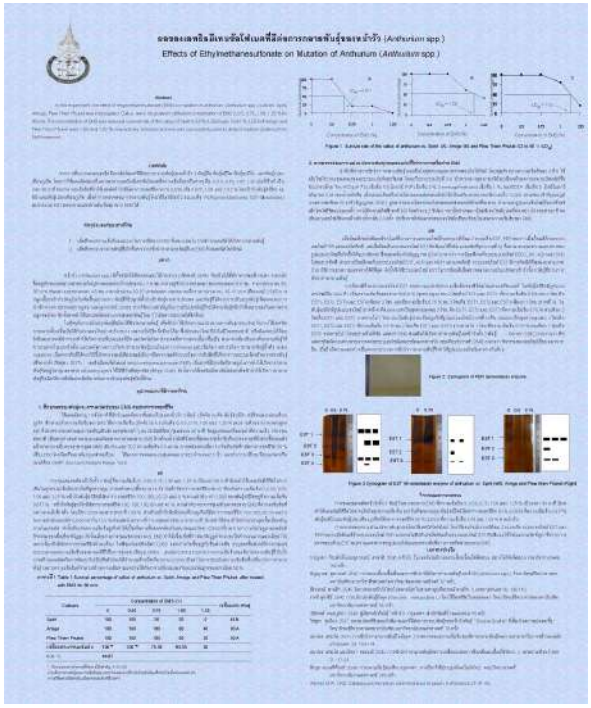
พีระพงษ์ สาคริก. 2543. เยี่ยมสวนหน้าวัวบนดอยสูง ภูเรือฟลาวเวอร์ เซ็นเตอร์. ว. เคหการเกษตร 24(12) : 70-76.

โอฬาร พิทักษ์. 2543. หน้าวัวไม้ดอกอนาคตไกลที่ไทยน่าจะพัฒนาสู่ตลาดโลก. ว. เคหการเกษตร 24(12) : 57-69.

อ. เสมอใจ ชื่นจิตต์

น.ส. โสภิศ ทวนเกรียงไกร

4. การนำเสนอในงานประชุมวิชาการครั้งที่ 7 ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี



Effects of Ethylmethanesulfonate on Mutation of Anthurium (*Anthurium spp.*)

ผลของเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัว (*Anthurium andraeanum* L.)

Orapan Poontong*, Watcharin Sunsuwan, and Sompong Te-chato

Department of Plant science, Faculty of Natural resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla.

ABSTRACT

In this experiment, the effects of ethylmethanesulfonate (EMS) on mutation of anthurium (*Anthurium spp.*) cultivar Spirit, Amigo and Plew Thien Puket was investigated. Callus incubated in different concentrations of EMS (0-1.25 %) for 90 min. The concentration of EMS was which reduced survival rate of the callus of Spirit to 50 % (LD_{50}) was 0.677 %. LD_{50} of Amigo and Plew Thien Puket were 1.08 and 1.02 %,respectively. Esterase enzyme was successfully used to detect mutant obtained form treating with EMS.

KEYWORDS : Anthurium, Spirit, Amigo, Plew Thien Puket, ethylmethanesulfonate, isozyme

* Corresponding author Tel: 0897489796 E-mail: pmeme14@hotmail.com

บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลของเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัว 3 พันธุ์คือ พันธุ์สปิริต พันธุ์อะมิโก และพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต โดยการใช้แคลลัสจุ่มแช่ในสารละลายเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ คือ 0, 0.5, 0.75, 1.00, 1.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 90 นาที พบว่าความเข้มข้นที่ทำให้แคลลัสหน้าวัวมีอัตราการรอดชีวิต 50 % (LD50) คือ 0.677, 1.08 และ 1.02 % ในหน้าวัวพันธุ์สปิริต อะมิโก และพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต เมื่อทำการตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยใช้ไอโซไซม์ 2 ระบบ คือ PER (peroxidase) และ EST (α-esterase) พบว่าระบบ EST บอกความแตกต่างอันเนื่องมาจาก EMS ได้

บทนำ

หน้าวัว (Anthurium spp.) มีทั้งชนิดไม้ตัดดอกและไม้กระถาง (วชิรพงศ์, 2545) จัดเป็นไม้ที่มีราคาค่อนข้างแพง ราคามักขึ้นอยู่กับขนาดดอก ดอกขนาดใหญ่จานรองดอกกว้างประมาณ 7-9 ซม. ราคาอยู่ที่ 50 บาทต่อดอก ขนาดรองลงมา 5-6 ซม. ราคาประมาณ 30-35 บาท ต่อดอก และขนาดดอก 4-5 ซม. ราคาประมาณ 20-25 บาทต่อดอก ดอกขนาดเล็กราคาประมาณ 10-15 บาท (พีระพงษ์,2545) การปลูกเลี้ยงหน้าวัวปัจจุบันกันเพิ่มขึ้นอย่างมาก พันธุ์ที่ใช้ปลูกมีทั้งนำเข้าพันธุ์จากต่างประเทศ และพันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์เพื่อทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ(กาญจนา และสุภาภรณ์, 2546) หากให้ความสำคัญกับการปรับปรุงพันธุ์ก็จะได้สายพันธุ์หน้าวัวที่เหมาะสมกับสภาพการปลูกของไทย อีกทั้งอาจทำให้ประเทศไทยสามารถส่งออกพันธุ์ใหม่ ๆ ไปยังต่างประเทศได้อีกด้วย

ในปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ เพื่อชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม ร่วมกับการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เพราะเป็นวิธีหนึ่งที่จะได้มาซึ่งลักษณะใหม่ที่ยังไม่มีในธรรมชาติ หรือมีแต่พบได้น้อย รังสีและสารเคมีต่าง ๆ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ยีนและโครโมโซม ส่วนเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถเพิ่มปริมาณต้นกลายพันธุ์ได้จำนวนมากในเวลาอันสั้น และลดโอกาสการเกิดการกลายพันธุ์แบบไคเมรา (chimera) และเพิ่มโอกาสการเกิดการกลายพันธุ์ทั้งต้น (solid mutation) เนื่องจากต้นที่ได้จากวิธีนี้เกิดจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว หรือจากเซลล์จำนวนน้อยกว่าต้น พืชที่ได้จากการเพาะเมล็ดหรือจากท่อนพันธุ์หรือจากหัว (วิชชุดา, 2537) เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methanesulphonate: EMS) เป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่มของพวก alkylating agent

ใช้ได้ดีกับพืชทุกชนิด (สิรนุช, 2540) ดังนั้นการใช้เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จึงเป็นวิธีการที่เพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดนี้ด้วย

ระเบียบวิธีวิจัย

1. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเข้มข้นและเวลาในการทรีตสาร EMS ที่เหมาะสมใน การชักนำแคลลัสให้เกิดการกลายพันธุ์

2. เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจากการชักนำการกลายพันธุ์ด้วย EMS ด้วยเทคนิคไอโซไซม์

2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องและเอกสารอ้างอิง

1. การเพาะเลี้ยงหน้าวัว

การเพาะเลี้ยงหน้าวัวโดยใช้ชิ้นส่วนต่างๆ เช่น ใบ ก้านใบ จานรองดอก ก้านช่อดอก และเอ็มบริโอ (embryo) อาหารที่ใช้คือ สูตร MMS (Modified Murashige and Skoog) ที่ใช้ธาตุอาหารหลักเพียงครึ่งหนึ่งจากปกติเติม 6-(benzylamino)-9-(2-tetrahydropyranyl)-9H-pyrine (BAP) 1 มก./ล. เลี้ยงในที่มืด 12-46 สัปดาห์ก็สามารถชำนำแคลลัสได้เมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเติม BAP เข้มข้น 0.1-1 มก./ล.ในสภาพมีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ก็สามารถชักนำเป็นต้นได้ (Pierik et al., 1974) Pierik และคณะ (1979) รายงานการใช้ใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ของหน้าวัวเป็นส่วนที่ดีที่สุดในการเพาะเลี้ยงและเนื้อเยื่อจากบริเวณเส้นกลางใบสร้างแคลลัสได้ดีกว่าบริเวณริมใบ เนื้อเยื่อจากปลายยอดของใบสร้างแคลลัสได้ดีกว่าฐานใบ สมปอง และคณะ (2545) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วน ต่างๆ คือ ก้านใบ ใบ จานรองดอก และปลีดอกหน้าวัว 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ทรอปฟิกานา พันธุ์แชมเปญ และพันธุ์ดวงสมร บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MMS เติม BA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. พบว่า สายพันธุ์ทรอปฟิกานาสามารถชักนำแคลลัสในทุกชิ้นส่วนเฉลี่ยได้ดีที่สุด 82 % นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตยังมีผลต่อลักษณะแคลลัสด้วยเช่นกัน อรพิน และกิตติภัฏ (2543) ศึกษาการเพาะเลี้ยงใบของหน้าวัวบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. สามารถชักนำยอดได้ดี

2. การชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้ EMS

สารเคมีที่นิยมใช้ในการชักนำการกลายพันธุ์คือ EMS (นพพร, 2543) การใช้ EMS ในการสร้างความหลากหลายของสีดอกคาร์เนชั่น โดยใช้ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.075 และ 0.1 % เติมในอาหารแข็งเพาะเลี้ยงนาน 12 ชั่วโมง และใช้ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 % เติมในอาหารเหลวเขย่าเลี้ยงนาน 3 ชั่วโมง พบว่า ระดับความเข้มข้น 0.025 และ 0.05 % ในอาหารแข็ง และ 0.25 % ในอาหารเหลวสามารถชักนำให้เกิดยอด และดอกมากที่สุด โดยดอกมีลักษณะสีขาวสลับสีแดง และ สีชมพูสลับขาว (Singh et al., 2000) การจุ่มแช่ในดูลาแคลลัสในสารละลาย EMS เข้มข้น 0.72 % นาน 90 นาที ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อนำมาตรวจสอบทางสัณฐานพบว่าต้นหน้าวัวรุ่นที่ M1R2 มีใบผิดปกติ EMS เข้มข้น 1.0 % ส่งผลให้ใบด่างบางส่วน ด่างกระจัดกระจาย และด่างทั้งใบ EMS เข้มข้น 0.75 % ทำให้รูปร่างใบผิดปกติคือ ใบติดกันเป็นจีบ และใบปิดเบี้ยว (ธัญญาพร, 2547) วิทยา (2541) รายงานว่าเมื่อนำแคลลัสมังคุดมาจุ่มแช่ EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าความเข้มข้น 0.5 % มีผลทำให้ลำต้นแคระลง มีลำต้นอวบอ้วน เกิดกิ่งแขนง และมีการจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ นอกจากนี้การศึกษาของ Latado และคณะ (2004) พบว่าภายหลังการนำชิ้นส่วนก้านดอกที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 0.77 % นาน 1 ชั่วโมง ไปเพาะเลี้ยง พบว่า สีของดอกเบญจมาศที่ได้มีอาการด่างและบางดอกมีสีที่เปลี่ยนแปลงไป

3. การตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยใช้ไอโซไซม์

ไอโซไซม์ (isozyme หรือ isoenzyme) คือเอนไซม์ชนิดต่างๆในพืชชนิดเดียวกันซึ่งกระตุ้นหรือทำปฏิกิริยาอย่างเดียวกัน แต่มวลต่างกัน (ธีระชัย, 2540) เพื่อจำแนกความแตกต่างของพันธุกรรมของพืชที่เปลี่ยนแปลงไปภายหลังการสร้างความแปรปรวนในพืช ความแตกต่างของโมเลกุลในเอนไซม์ (enzyme) นี้มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไอโซไซม์หรือเอนไซม์ด้วย (Freeling, 1983) ไอโซไซม์เป็นตัวบ่งชี้ตัวหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาทางพันธุกรรม วิวัฒนาการ และกระบวนการเมแทบอลิซึม ในสิ่งมีชีวิตโดยด้านพืชสามารถใช้เทคนิคไอโซไซม์เป็นดัชนีระบุความผันแปรทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ การตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ และการวินิจฉัยโรคพืชต่างๆ (พรรณี, 2543) ราตรี (2540) ศึกษาระบบเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ในมังคุดโดยใช้ไอโซไซม์ 4 ระบบ พบว่า เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีแถบสีปรากฏแต่ไม่ชัดเจน ส่วนเอนไซม์เอสเทอเรสแถบสีที่ได้เป็นปื้น การใช้บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.25, 0.5 และ 0.75 โมลาร์ ให้แถบเอนไซม์ที่ได้ไม่แตกต่างกัน การแยกเอนไซม์โดยใช้วุ้นอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 12 % ให้แถบสีคมชัดกว่าความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ธัญญาพร (2547) รายงานว่าเมื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยระบบเอนไซม์เอสเตอเรส (ETS: α-esterase) ให้การติดสีและการกระจายตัวของแถบเอนไซม์ได้ดีที่สุด เมื่อศึกษาแถบเอนไซม์ที่ได้แตกต่างกันระหว่างการจุ่มแช่และไม่จุ่มแช่ EMS

3. วัสดุ/อุปกรณ์ การทำวิจัย

1. วัสดุพืช

ใช้หน้าวัว 3 พันธุ์คือ พันธุ์อะมิโก, สปิริต และเปลวเทียน

ภูเก็ต เป็นชิ้นส่วนจากใบในหลอดทดลอง ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารแข็งสูตร MMS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก./ล.

2. อาหารที่ใช้เลี้ยง

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวเป็นอาหารสูตร MMS ที่มีการเติมอะดีนีนซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 มก./ล. และดัดแปลงจากสูตร MS เดิม คือมีการลดองค์ประกอบของธาตุอาหารหลักบางตัวลงครึ่งหนึ่งจากสูตรเดิมเหลือความเข้มข้นดังนี้คือ NH_4NO_3 825 มก./ล., KNO_3 950 มก./ล., KH_2PO_3 85 มก./ล., $FeSO_4 7H_2O$ 13.9 มก./ล. และ Na_2EDTA 18.65 มก./ล. และอาหาร ? MS ปรับ pH 5.7 เมื่อเตรียมอาหารแล้วนำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ?ช ความดัน 1.05 กก./ตร.ซม. นาน 15 นาที

3. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สูตร MS, MMS สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น BA และ TDZ เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต

สารเคมีที่ใช้สกัดเอนไซม์และการทำอิเล็คโตรโฟริซีสประกอบด้วย acrylamide gel 30 %, Tris-HCl ค่า pH 8.9 และ 6.8 ความเข้มข้น 1.5 และ 0.5 โมลาร์ ตามลำดับ น้ำกลั่น TEMED, APS 10 %, PVP 2 %, 2-mercapthoethanol 1%, Na_2EDTA 2 mM และ glycine สารเคมีย้อมสีเอ็นไซม์ระบบเอสเตอเรส (EST) ประกอบด้วย Monobasic sodium phosphate (pH 6.0), Dibasic sodium phosphate (pH 6.0), fast blue B salt และ α-Napthyl acetate สารเคมีย้อมสีเอ็นไซม์ระบบเปอร์ออกซิเดส (PER) ประกอบด้วย 3-Amino-9-ethylcarbozole, β-Napthol, Acetone, This-HCL, Acetic acid และ Hydrogen peroxide

4. วิธีการ

1. ศึกษาผลของพันธุ์และความเข้มข้นของ EMS ต่ออัตราการรอดชีวิต

ใช้แคลลัสอายุ 10 สัปดาห์ ที่ชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของหน้าวัว 3 พันธุ์ (ปัจจัย A) คือ พันธุ์อะมิโก, สปิริตและเปลวเทียนภูเก็ต ศึกษาระดับความเข้มข้นของ EMS ใช้ความเข้มข้น (ปัจจัย B) 5 ระดับคือ 0, 0.5, 0.75, 1.00 และ 1.25 % (ละลายด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต บรรจุฟลาสก์ๆ ละ 25 มิลลิลิตร) จุ่มแช่นาน 90 นาที อินคูเบทบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เมื่อครบกำหนดกรองแยกแคลลัสออกจากสารละลาย EMS ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อหลายๆครั้ง ซับด้วยกระดาษที่นึ่งฆ่าเชื้อจนแห้ง แล้วนำมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เติม BA และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ภายหลังเพาะเลี้ยง 14 วันเริ่มบันทึกอัตราการรอดชีวิต 50 % หรือ LD50 โดยจัดทรีตเมนต์แบบแฟกทอเรียล ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) จำนวนละ 5 ซ้ำ และทำการเปรียบเทียบแต่ละทรีตเมนต์ด้วย DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

2. การตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของต้นที่ได้จากการทรีตด้วย EMS ด้วยเทคนิคไอโซไซม์

นำต้นที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ และต้นในชุดควบคุมมาตรวจสอบไอโซไซม์ โดยสุ่มตัวอย่างความเข้มข้นละ 3 ต้น ใช้เอ็นไซม์ระบบเอสเตอเรสและระบบเปอร์ออกซิเดส โดยเก็บรวบรวมใบที่ 3-6 นับจากล่างสุดมาบดให้ละเอียดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl (pH 7.5) เข้มข้น 0.5 โมลาร์, PVP เข้มข้น 2 %, 2-mercapthoethanol เข้มข้น 1 %, Na_2EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 เท่าของน้ำหนักพืช เมื่อบดละเอียดจึงถ่ายใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที (ธัญญาพร, 2547) ดูดสารละลายใสตอนบนใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟใหม่ที่สะอาด นำมาแยกรูปแบบเอ็นไซม์ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟริซิสแบบแนวตั้ง ภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลมาย้อมสีเอนไซม์บนเครื่องเขย่า 80 รอบต่อนาที จนเห็นแถบเอนไซม์ชัดเจนล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง บันทึกภาพไซโมแกรมของเอนไซม์เปรียบเทียบในแต่ละความเข้มข้นของ EMS

5. ผลและวิจารณ์

1. ศึกษาผลของพันธุ์และความเข้มข้นของ EMS ต่ออัตราการรอดชีวิต

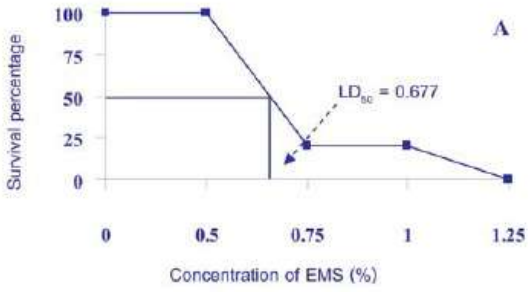
การจุ่มแช่แคลลัสหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ ที่ความเข้มข้น 0, 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.25 % เป็นเวลา 90 นาที มีผลทำให้แคลลัสมีสีซีดไปจากเดิมในทุกความเข้มข้น ยกเว้นที่ชุดควบคุม ภายหลังเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน บันทึกอัตราการรอดชีวิต พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.25 % หน้าวัวพันธุ์สปิริต มีอัตราการรอดชีวิต 100, 100, 20, 20 และ 0% ตามลำดับ ค่า LD50 ของพันธุ์สปิริตอยู่ที่ความเข้มข้น 0.677 % หน้าวัวพันธุ์อะมิโกมีอัตราการรอดชีวิต 100, 100, 100, 60 และ 40 % ตามลำดับ จากการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยมีค่า LD50 ของสาร EMS ที่ 1.08 % สำหรับหน้าวัวพันธ์เปลวเทียนภูเก็ตมีอัตราการรอดชีวิต 100, 100, 20, 20 และ 0 % ตามลำดับและมีค่า LD50 เท่ากับ 1.02% (Table 1 Figure1) การจุ่มแช่ EMS นาน 90 นาที มีผลทำให้

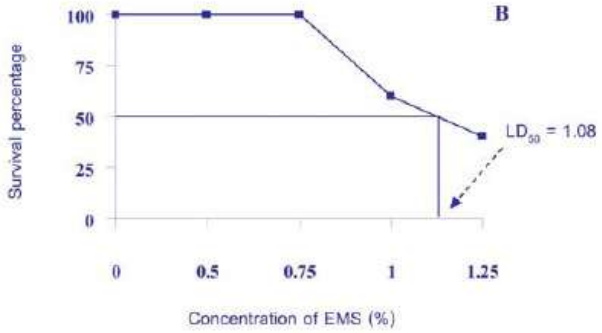
สารเข้าไปทำลายกลุ่มเนื้อเยื่อเจริญภายในแคลลัส ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้นสูงจึงทำให้เนื้อเยื่อตายซึ่งสอดคล้องกับสมปองและวิทยา (2542) ที่รายงานว่า ภายในโนดูลาแคลลัสมีกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญสูง ดังนั้นเมื่อผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ทำให้เนื้อเยื่อที่กำลังเจริญถูกทำลายเป็นจำนวนมากและเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงจึงมีอัตราการรอดชีวิตต่ำลงด้วย ในพืชแต่ละชนิดมีค่า LD50 แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนพืช อายุของชิ้นส่วนที่นำมาจุ่มแช่ ระยะเวลาและความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการจุ่มแช่ (สิรินุช, 2540) สมปอง (2541) รายงานว่า ความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่ยับยั้งการสร้างแคลลัสหรือการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้จำนวนครึ่งหนึ่งหรือ 50% (LD50) เป็นค่าในการประเมินความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ เพราะความเข้มข้นดังกล่าวสร้างความเสียหายและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับหน่วยพันธุกรรมอย่างน้อย 50%

Table 1 Survival percentage of callus of anthurium cv. Spirit, Amigo and Plew Thien Phuket after treating with EMS for 90 min.

cultivars	Concentration of EMS (%)					Average of cultivars
	0	0.50	0.75	1.00	1.25	
Spirit	100[a]	100[a]	20[c]	20[c]	0[d]	48[b]
Amigo	100[a]	100[a]	100[a]	60b[c]	40[c]	80[a]
Plew Thien Phuket	100[a]	100[a]	100[a]	80[b]	20[c]	80[a]
Average of concentration	100[a]	100[a]	73.33[a]	53.33[a]	20[b]	
C.V. %	46.97					

* Significant difference at P 0.05.
Mean not sharing letter in common within column differ significantly by DMRT.





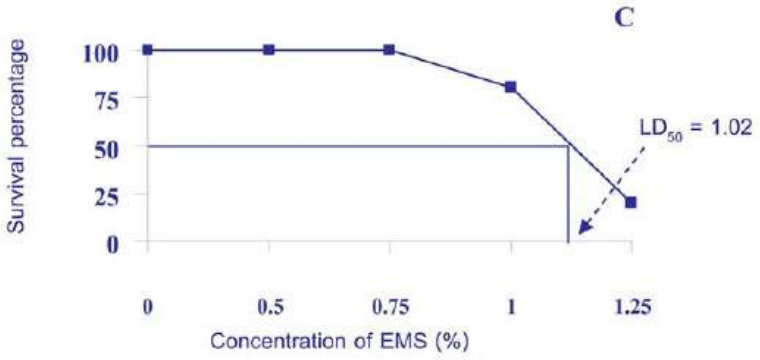


Figure 1 Survival rate of the callus of anthurium cv. Spirit (A), Amigo (B) and Plew Thien Phuket (C) treated by various concentrations of EMS for 90 min.

2. การตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของต้นที่ได้จากการทรีตด้วย EMS

เมื่อย้อมสีเจลโพลีอะคริลาไมด์ที่ผ่านการแยกเอนไซม์ด้วยระบบสีย้อม 2 ระบบคือ EST, PER พบว่า เมื่อย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ PER แผ่นเจลไม่ติดสี แต่เมื่อย้อมด้วยระบบเอนไซม์ EST ติดสีและให้ไซโม แกรมชัดที่สุด (Figure 2) ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบเอนไซม์ที่เกิดขึ้นได้อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับธัญญาพร (2547) กล่าวว่า การย้อมสีเจลด้วยระบบเอนไซม์ PER, LDH, ADH และ SKD ไม่พบการติดสี ส่วนการย้อมสีเจลด้วยระบบเอนไซม์ EST, ACP และ MDH แผ่นเจลติดสี ระบบเอนไซม์ EST มีการติดสีดีที่สุดและสามารถนำมาใช้การแยกความแตกต่างได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงใช้ระบบเอนไซม์ EST ในการย้อมสีเพื่อตรวจสอบความผันแปรของหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์

การย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ EST (Figure 2) พบความแปรผันความเข้มข้นของสีย้อมในแต่ละทรีตเมนต์ในพันธุ์สปิริต มีรูปแบบเอนไซม์คือ lane ที่1 เป็นความเข้มข้นของสาร EMS 0 % (ชุดควบคุม) พบ 2 โซนคือ EST1 และ EST3 lane ที่ 2 เป็นความเข้มข้น 0.5% พบ 4 โซน คือ EST1, EST2, EST3 และ EST4 เพิ่มมา 2 โซน และ laneที่ 3 เป็นความเข้มข้น 0.75 % พบ 3 โซนคือ EST1, EST2 และ EST3 เพิ่มมา 1 โซน ในพันธุ์อะมิโกมีรูปแบบเอนไซม์ คือ lane แรกเป็นชุดควบคุม พบ 3 โซน คือ EST1, EST2 และ EST3 ที่ความเข้มข้น 0.75% พบเพียง 2 โซนคือ EST1 และ EST3 ขาดหายไป 1 โซน และในพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ตมีรูปแบบเอนไซม์ คือ lane ที่1 เป็นความเข้มข้นของสาร EMS 0 % (ชุดควบคุม) พบ 3 โซนคือ EST1, EST2 และ EST3 ที่ความเข้มข้น 0.5 % พบ 2 โซน คือ EST1 และ EST3 ขาดหายไป 1 โซน ที่ความเข้มข้น 0.75% พบเพียง 1 โซนคือ EST3 ขาดหายไป 2 โซนอย่างเห็นได้ชัด แสดงว่า EMS ส่งเสริมให้เกิดการกลายพันธุ์ในหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ Werner (1992) รายงานว่า พืชแต่ละชนิดมีความจำเพาะเจาะจงต่อระบบเอนไซม์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่นเดียวกับราตรี (2540) กล่าวว่า กิจกรรมของเอนไซม์เป็นผลมาจากยีน เมื่อยีนมีความแตกต่างเนื่องจากกระบวนการชักนำการกลายพันธุ์จึงทำให้รูปแบบเอนไซม์แตกต่างกันด้วย ส่วนในความเข้มข้นอื่นๆ ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้อาจเนื่องมาจาก EMS เข้าไปทำลายในส่วนของเนื้อเยื่อเจริญทำให้ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้

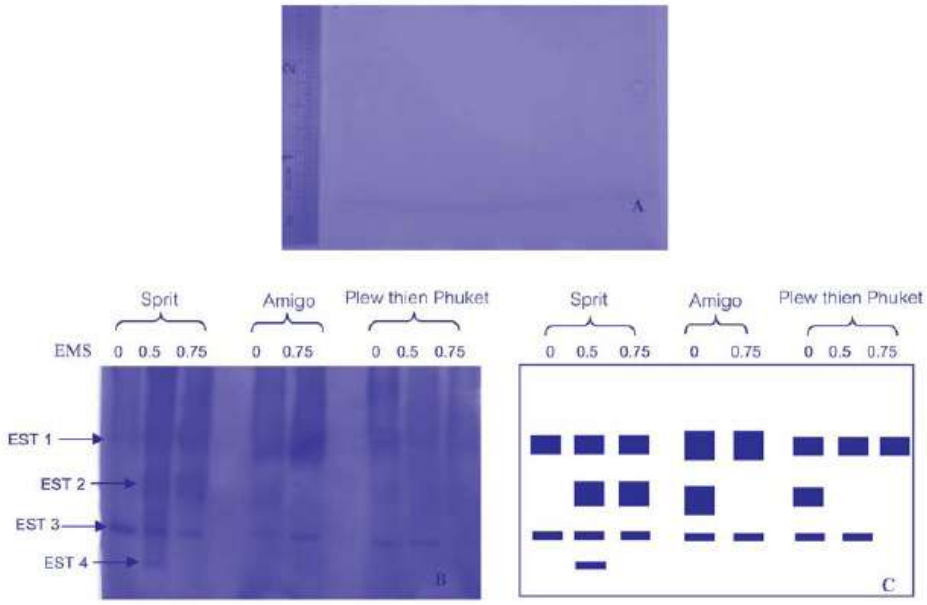


Figure 2 Isozyme patterns of EST (?-esterase) (A) and PER (peroxidase) (B) obtained from treating callus of anthurium cv. Spirit, Amigo and Plew thien Phuket with various concentrations of EMS for 90 min. (C: drawing diagram)

สรุป

การจุ่มแช่แคลลัสหน้าวัวทั้ง 3 พันธุ์ ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0, 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.25 % เป็นเวลา 90 นาที มีผลทำให้แคลลัสมีสีซีดไปจากเดิมในทุกความเข้มข้น ยกเว้นที่ชุดควบคุม พันธุ์สปิริตมีอัตราการรอดชีวิต 50% (LD50) ที่ความเข้มข้น 0.677% พันธุ์อะมิโกและพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ตมีอัตราการรอดชีวิต 50 % (LD50) ที่ความเข้มข้น 1.08 และ 1.02 % ตามลำดับ

การตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์ โดยใช้เอนไซม์ระบบสีย้อม 2 ระบบคือ ระบบเอนไซม์ EST และ PER พบว่าเมื่อย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ PER แผ่นเจลไม่ติดสี แต่เมื่อย้อมด้วยระบบเอนไซม์ EST ติดสีและให้ไซโมแกรมชัดที่สุด ซึ่งจากการตรวจสอบด้วย EST พบความแตกต่างของรูปแบบไซโมแกรมจากต้นที่ผ่านการทรีตสารละลาย EMS

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา กิระศักดิ์ และสุภาภรณ์ สาชาติ. 2546. **หน้าวัว.** ในเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 165 หน้า.

ธีระชัย ธนานันต์. 2540. **การจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล.** ปทุมธานี: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต. 153 หน้า.

ธัญญาพร สุสานนท์. 2547. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหน้าวัว** (*Anthurium spp.*).วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 57 หน้า.

นพพร สายัมพล. 2543. **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 261 หน้า.

พรรณี อัศวตรีรัตนกุล. 2543. **การประยุกต์ใช้เทคนิคไอโซไซม์ในการจำแนกสายพันธุ์กล้วยไม้.** รายงานการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 34 หน้า.

พีระพงษ์ สาคริก. 2545. **โอกาสของหน้าวัวไทยไปตลาดโลก ในสายตาคุณพีระพงษ์ สาคริก.** ว. เคหการเกษตร 26: 106-110.

ราตรี สุจารีย์. 2540. **การปรับปรุงพันธุ์มังคุด** (*Garcinia mangostana L.*) **โดยใช้โคลชิซินในหลอดลอง.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 65 หน้า.

วชิรพงศ์ หวลบุตตา. 2545. **คู่มือคนรักต้นไม้ "หน้าวัว"**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน. 95 หน้า.

วิชชุตา รุ่งเรือง. 2537. **ผลของโคลชิซินและรังสีแกมมาที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์ "Double Spathe" ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 76 หน้า.

วิทยา พรหมมี. 2540. **การปรับปรุงพันธุ์มังคุด** (*Garcinia mangostana L.*) **โดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ในหลอดทดลอง**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 88 หน้า.

สมปอง เตชะโต, สมัชชา นาคสมบัติ และ จารุวรรณ บุญศิริ.2545. **ผลของพันธุ์และชิ้นส่วนต่อการสร้างแคลลัสและการขยายพันธุ์หน้าวัวด้วยวิธีไมโครพรอพาเกชัน**. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 15 : 569-578.

สมปอง เตชะโต. 2541. **การชักนำการกลายพันธุ์ในมังคุด : การตรวจสอบความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ต่อความสามารถในการสร้างแคลลัส**. ว. แก่นเกษตร. 26: 184-194.

สมปอง เตชะโต และวิทยา พรหมมี. 2542. **การชักนำการกลายพันธุ์ต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและเนื้อเยื่อวิทยา**. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 21 : 17-24.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2540. **การกลายพันธุ์ของพืช**. กรุงเทพฯ : ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 205 หน้า.

อรพิน เสลัคร และ กิตติภัฏ เฟื่องเพียร. 2543. **ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อและการเกิดหน่อของหน้าวัวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 10 หน้า.

Freeling, M. 1983. **Isozyme system to study gene regulation during development: A Lecture. In Isozyme in Plant Genetics and Breeding, Part A.** (eds. S.D. Tanksley and T.J. Orton). pp. 61-83. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.

Latado, R.R., Adames, A.H. and Neto, A.T. 2004. **In vitro mutation of Chrysanthemun** (*Dendranthema grandiflora Tzvelev*) **with ethylmethanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels**. Plant Cell, Tissue and Organ Curture 77 : 103-106.

Pierik, R.L.M., Steegmans, H.H.M. and Vander, M.J.A.J. 1974. **Plantlets formation in callus tissue of** *Anthurium andreaeanum Linn.* Scientia Horticulturae 2 : 193-198.

Pierik, R.L.M., Leeuwen P.V. and Rigter, G.C.C.M. 1979. **Regeneration of leaf explants of** *Anthurium andraeanum* **Linn. In vitro. Netherlands** J. Agric Sci. 27 : 221-226.

Singh, K.P., Singh, B., Raghava, S. P. S. and Kalia, C. S. 2000. **Induced flower colour mutations in carnation though in vitro application of chemical mutagen**. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 60 : 535-539.

Werner, D.W. 1992. **Catalase polymorphism and inheritance in peach**. HortScience 27: 41-43.