

การชักนำให้เกิด sexual tetraploid ในหญ้ารูซี่โดยใช้สารโคลชิซิน รัตติกาล ปวงแก้ว^{1/} เยาวลักษณ์ แหม่งปิง^{1/} จันทกานต์ อรณันท์^{2/}

บทคัดย่อ

จากการชักนำให้เกิด Sexual tetraploid ของหญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*) จากตายอดและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของหญ้ารูซี่ โดยการเพาะเลี้ยงตายอดในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่เติม 6-benzyl amino purine (BAP) 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 14 20 และ 26 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด นำตายอดไปชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP 6 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่เติมสารละลายโคลชิซิน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นแยกยอดที่ได้จากตายอดที่รอดชีวิตไปชักนำให้เกิดรากจำนวนมาก โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เสร็จแล้วนำออกปลูกในกระถางจนต้นพืชอายุ 4 สัปดาห์ ตรวจสอบระดับพลอยดีด้วยเทคนิคโพลไซโตเมทรี พบว่า ต้นหญ้ารูซี่ที่ได้จากตายอดที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยดีสูงสุด คือ 7.5 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ส่วนระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน และอิทธิพลร่วมระหว่างระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารละลายโคลชิซิน ไม่มีผลต่อการเกิดต้นเตตระพลอยดี ($P > 0.05$)

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของหญ้ารูซี่ในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม Kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 14 20 และ 26 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไปชักนำให้เจริญเป็นยอดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่เติมสารละลายโคลชิซิน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นแยกยอดที่ได้จากแคลลัสที่รอดชีวิตไปชักนำให้เกิดรากจำนวนมาก โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เสร็จแล้วนำออกปลูกในกระถางจนต้นพืชอายุ 4 สัปดาห์ ตรวจสอบระดับพลอยดีด้วยเทคนิคโพลไซโตเมทรี พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน และอิทธิพลร่วมระหว่างระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารละลายโคลชิซิน ไม่มีผลต่อการเกิดต้นเตตระพลอยดี ($P > 0.05$)

คำสำคัญ : หญ้ารูซี่, โคลชิซิน, sexual tetraploid

เลขทะเบียนวิชาการ : 64(2)-0214-183

^{1/} ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์นครราชสีมา ต.ปากช่อง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

^{2/} สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ ต.บางกระดี่ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

Induction of Sexual Tetraploid in Ruzi Grass (*Brachiaria ruziziensis*) by Colchicine

Rattikan Pounkaew^{1/} Yaowalak Mangpung^{1/} Jantakarn Arananant^{2/}

Abstract

Sexual tetraploid of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) have been obtained by colchicine treatment of *in vitro* apical meristems and embryogenic calli. The colchicine treatment consisted of culturing apical meristem on liquid MS basal medium containing 6.0 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP) and 0.05, 0.10, 0.15 and 0.20 % colchicine for 8, 14, 20 and 26 hours. After treated by colchicine, apical meristems were induced multiple shoot on solid MS basal medium containing 6.0 mg L⁻¹ without colchicine for 4 weeks. Separated shoot from surviving apical meristems to induced multiple roots on solid MS basal medium containing 2.0 mg L⁻¹ BAP for 4 weeks. After that planting in the pots for 4 weeks. The ploidy level of plants were determined by flow cytometry. Concentration with 0.05 % (w/v) colchicine provided the highest percentage of tetraploid plants of 7.5 % (P<0.05). The duration to use colchicine and the interaction between concentration of colchicine levels and duration to use colchicine had no influence to induced tetraploid plants (P>0.05).

The colchicine treatment consisted of culturing embryogenic calli on liquid MS basal medium containing 1.0 mg L⁻¹ kinetin, 0.1 mg L⁻¹ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.05, 0.10, 0.15 and 0.20 % colchicine for 8, 14, 20 and 26 hours. After treated by colchicine, embryogenic calli were induced to develop shoot on solid MS basal medium containing 1.0 mg L⁻¹ kinetin, 0.1 mg L⁻¹ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) without colchicine for 4 weeks. Separated Shoots from surviving embryogenic calli to induced multiple roots on solid MS basal medium containing 2.0 mg L⁻¹ BAP for 6 weeks. After that planting in the pots for 4 weeks. The ploidy level of plants were determined by flow cytometry. Concentration of colchicine levels, duration to use colchicine and the interaction between concentration of colchicine levels and duration to use colchicine had no influence to induced tetraploid plants (P>0.05).

Keywords : Ruzi grass (*Brachiaria ruziziensis*), Colchicine, Sexual tetraploid

Registered No. : 64(2)-0214-183

^{1/}Nakhon Ratchasima Animal Nutrition Research and Development Center

^{2/}Bureau of Animal Nutrition Development

คำนำ

ปัจจุบันภาครัฐได้มีการขับเคลื่อนยุทธศาสตร์ด้านโคนมอย่างจริงจัง โดยเห็นได้จากจำนวนโคนมที่เพิ่มขึ้นร้อยละ 3.5 ต่อปี ในช่วงปี 2553-2557 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) ทำให้ความต้องการพืชอาหารสัตว์เพิ่มขึ้นตามไปด้วย อย่างไรก็ตาม พบว่าในประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกพืชอาหารสัตว์เพียง 2 ล้านไร่ หรือ 34.84 เปอร์เซ็นต์ ของความต้องการพืชอาหารสัตว์ทั้งหมด (กังวานและวรพงษ์, 2555) พืชอาหารสัตว์ตระกูลหญ้าที่เกษตรกรนิยมปลูกกันมากที่สุด คือ หญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*) เป็นหญ้าในสกุล *Brachiaria* ขยายพันธุ์ได้ด้วยเมล็ด ผลิตเมล็ดได้ดี สามารถปรับตัวและขึ้นได้ดีในหลายพื้นที่ของประเทศ มีความน่ากิน สัตว์ชอบกิน แต่ในช่วงฤดูแล้งหญ้ารูซี่จะชะงักการเจริญเติบโต ให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก จึงทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ขาดแคลนพืชอาหารสัตว์สำหรับใช้เลี้ยงสัตว์ ดังนั้น หากสามารถพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ให้หญ้ารูซี่ทนแล้ง และให้ผลผลิตในฤดูแล้งเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งฟื้นตัวได้เร็วเมื่อผ่านฤดูแล้ง ก็จะช่วยทำให้เกษตรกรมีพืชอาหารสัตว์คุณภาพดีสำหรับใช้เลี้ยงโคเนื้อ โคนม กระบือ แพะแกะ ในฤดูแล้งเพิ่มมากขึ้น

การปรับปรุงพันธุ์หญ้ารูซี่ ซึ่งเป็นพืชผสมข้ามและดอกมีขนาดเล็ก สามารถดำเนินการได้โดยการปรับปรุงประชากร (population improvement) เพื่อยกระดับความสามารถหรือคุณลักษณะต่างๆ ของหญ้ารูซี่ให้ดียิ่งขึ้นกว่าเดิมซึ่งอาจกระทำได้โดยวิธีการคัดเลือกแบบต่างๆ เพื่อเพิ่มอัตราส่วนหรืออีโนไทป์ที่ต้องการ เช่น ให้ผลผลิตสูงขึ้น คุณภาพดีขึ้น เก็บเกี่ยวได้เร็วขึ้น และมีความต้านทานโรคและแมลงดีขึ้น จะมีผลทำให้ค่าเฉลี่ยของลักษณะดังกล่าวมีค่าสูงขึ้นด้วย เมื่อปรับปรุงแล้วสามารถนำไปใช้ประโยชน์โดยตรง คือ ใช้เป็นพันธุ์การค้าได้เลย เช่น พันธุ์ผสมเปิดหรือพันธุ์ผสมปล่อย (open-pollinated variety) และพันธุ์สังเคราะห์ (synthetic variety) และยังสามารถใช้เป็นแหล่งสำหรับคัดเลือกพันธุ์ใหม่หรือเป็นแหล่งสกัดสายพันธุ์แท้เพื่อสร้างพันธุ์ลูกผสมชั่วแรก (F1-hybrid variety) (กมล, 2536; ไพศาล, 2527) ซึ่งวิธีดังกล่าวต้องใช้งบประมาณ แรงงานและระยะเวลามาก การใช้เทคโนโลยีชีวภาพจึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถถ่ายทอดยีนลักษณะที่ต้องการจากพืชอีกชนิดหนึ่งมายังอีกชนิดหนึ่งที่มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานไม่เท่ากันได้ โดยหญ้าชิกแนลลอน (*B. decumbens*) เป็นหญ้าในสกุล *Brachiaria* ที่เจริญเติบโตได้ดีในดินหลายชนิด ตั้งแต่ดินที่มีการระบายน้ำดี ดินที่เป็นกรด ดินที่มีอะลูมิเนียมสูง ดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ปานกลางถึงต่ำ ทนต่อการทะเลาะอย่างหนัก ทนต่อความแห้งแล้งได้ดีมากและเจริญเติบโตในช่วงฤดูแล้งได้ดี และให้ผลผลิตสูงกว่าหญ้ารูซี่ หากเรานำหญ้ารูซี่มาผสมพันธุ์กับหญ้าชิกแนลลอน ก็อาจจะได้หญ้า *Brachiaria* ลูกผสมพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูง ค่าการย่อยได้สูง ทนแล้ง และติดเมล็ดดี แต่ปัญหาในการใช้หญ้ารูซี่ในการผสมกับหญ้าชิกแนลลอน คือ ความแตกต่างของจำนวนโครโมโซม โดยหญ้ารูซี่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด (ดิพลอยด์; diploid) $2n=2X=18$ หญ้าชิกแนลลอนมีจำนวนโครโมโซม 4 ชุด (เตตระพลอยด์; tetraploid) $2n=4x=36$ ดังนั้น จึงต้องเพิ่มจำนวนโครโมโซมของหญ้ารูซี่ให้เป็น 4 ชุด โดยใช้สารโคลชิซิน ซึ่งเป็นสารก่อกลายพันธุ์ที่มีอำนาจในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ ทำให้จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น การใช้สารโคลชิซินสามารถทำได้ทั้งในสภาพแปลงทดลองและในสภาพปลอดเชื้อ แต่การทำในสภาพแปลงทดลองส่วนใหญ่จะได้ต้นที่เป็นเตตระพลอยด์น้อย และทำให้เกิดต้นที่เป็นไคเมร่า (Chimera; มีความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมในหลายรูปแบบอยู่ในพืชต้นเดียวกัน) จำนวนมาก หากมีการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้สารโคลชิซินพบว่า จะสามารถลดปัญหาเหล่านี้ลงได้ โดยการเลือกชนิดของเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนของพืชที่กำลังเจริญและมีการแบ่งเซลล์อยู่เป็นจำนวนมาก เช่น การใช้แคลลัส กลุ่มเซลล์หรือตายอดที่อยู่ในระยะเพิ่มจำนวน พบว่า สามารถเพิ่มประสิทธิภาพและปริมาณต้นพืชได้ โดยพบต้นเตตระพลอยด์เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 40-50 นอกจากนี้ยังช่วยให้ชิ้นส่วนของพืชที่ได้รับสารโคลชิซินสม่ำเสมอและยังสามารถใช้สารนี้แก๊วชิ้นส่วนพืชได้ครั้งละจำนวนมาก ดังนั้นการเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืชจึงเป็นการเพิ่มโอกาสที่จะได้ต้นพืชที่เป็นพอลิพลอยด์มากขึ้นด้วย (อลงกต และสราวุธ, 2560) มีงานทดลองของหลายประเทศ ได้นำสารโคลชิซินมาใช้ในการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของหญ้าสกุล *Brachiaria* เช่น Ishigaki et al. (2009) ได้ใช้สารโคลชิซินในการชักนำให้เกิดหญ้ารูซี่เตตระพลอยด์จาก multiple-shoot clumps และต้นกล้าที่ออกจากเมล็ด (seedling) Timbo et al.

(2014) เพิ่มจำนวนโครโมโซมจากต้นกล้าที่ออกจากเมล็ดของหญ้ารัฐ และ Simioni and Valle (2009) เพิ่มจำนวนโครโมโซมจากตาข้างของหญ้าชิกแนลลอน เป็นต้น

การใช้สารโคลชิซินในการเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้มีประสิทธิภาพนั้น จำเป็นที่จะต้องทราบระดับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสม ซึ่งโดยทั่วไปการใช้สารที่มีระดับความเข้มข้นสูงจะใช้ระยะเวลาสั้น และระดับความเข้มข้นต่ำจะใช้ระยะเวลานาน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการทนทานของชิ้นส่วนพืชที่นำมาศึกษา การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อหาชิ้นส่วนของหญ้ารัฐ ระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซิน และระยะเวลาในการใช้ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของหญ้ารัฐให้เป็นเตตระพลอยด์ เพื่อสร้างหญ้ารัฐสายพันธุ์ใหม่สำหรับใช้เป็นต้นแม่พันธุ์ในการผสมข้ามกับหญ้าสกุล *Brachiaria* ชนิดอื่นๆ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ดำเนินการทดลองที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์นครราชสีมา อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา ระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2562 แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารละลายโคลชิซินต่อการเพิ่มจำนวนโครโมโซมจากตายอด และเอ็มบริโอเจนิคแคลัสของหญ้ารัฐ

ประกอบด้วย 2 การทดลองย่อย คือ 1) การเพิ่มจำนวนโครโมโซมจากตายอดของหญ้ารัฐ และ 2) การเพิ่มจำนวนโครโมโซมจากเอ็มบริโอเจนิคแคลัสของหญ้ารัฐ ทำการทดลองภายใต้สภาพปลอดเชื้อ และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส แต่ละการทดลองย่อยวางแผนการทดลองแบบ 4×4 Factorial design in CRD ตามวิธีใน Lewis-Back (1993) มี 2 ปัจจัยที่มีต่อการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของหญ้ารัฐ โดยปัจจัยที่ 1 คือ ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 4 ระดับ คือ 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารละลายโคลชิซิน 4 ระยะ คือ 8 14 20 และ 26 ชั่วโมง รวม 16 สิ่งทดลองๆ ละ 30 ซ้ำๆ ละ 1 ซีน

การทดลองย่อยที่ 1.1 การเพิ่มจำนวนโครโมโซมจากตายอดของหญ้ารัฐ

1. ตัดหญ้ารัฐข้อบนสุดให้มีความยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ทำความสะอาดผิวภายนอกด้วยน้ำสบู่ และน้ำให้สะอาด นำมาแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที จากนั้นพอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรอกซ์ (Clorox) ความเข้มข้น 15 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (ผสมสารลดแรงตึงผิว tween 20 จำนวน 1-2 หยด ต่อสารละลายคลอโรอกซ์ 100 มิลลิลิตร) พอกนาน 10 และ 15 นาที ตามลำดับ นำมาแช่เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที เสร็จแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2. นำชิ้นส่วนที่ผ่านการพอกฆ่าเชื้อแล้ว มาลอกม้วนใบนอกสุดออกด้วยวิธีการปลอดเชื้อจนเหลือม้วนใบอ่อนที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.1 เซนติเมตร ตัดชิ้นส่วนข้อที่มีตายอดอยู่ให้มีขนาด 0.5 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพมืด เป็นเวลา 8 14 20 และ 26 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ล้างตายอดด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที และซับด้วยกระดาษที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว จนแห้ง จากนั้นนำตายอดไปชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP 6 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 1 ชิ้นต่อขวด เพาะเลี้ยงในสภาพที่ ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อรอบวัน เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์

3. เมื่อครบ 4 สัปดาห์ บันทึกจำนวนตายอดที่รอดชีวิต และแยกยอดที่เกิดจากตายอดที่รอดชีวิตไปชักนำให้เกิดรากจำนวนมาก โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อรอบวัน เพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์

4. ย้ายปลูกต้นกล้าจากขวดเพาะเลี้ยงลงสู่กระถางในสภาพแวดล้อมภายนอก

การทดลองย่อยที่ 1.2 การเพิ่มจำนวนโครโมโซมจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของหนุ่ยราชูชี

1. คัดเลือกเมล็ดหนุ่ยราชูชีที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่ลีบแบน นำมาแช่ในกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำไหลผ่านจนกรดหมด นำมาแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 20 และ 15 เปอร์เซ็นต์ (ผสมสารลดแรงตึงผิว tween 20 จำนวน 1-2 หยด ต่อสารละลายคลอโรกซ์ 100 มิลลิลิตร) ฟอกนาน 10 และ 15 นาที ตามลำดับ เสร็จแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำเมล็ดที่ฟอกแล้วลงเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์ สูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อรอบวัน เพาะเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์

2. นำตายอดที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Casein hydrolysate 1 กรัมต่อลิตร Kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพมืด นาน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสงนาน 16 ชั่วโมง ต่อรอบวัน นาน 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายแคลลัสไปยังอาหารสูตรเดิมนาน 2 สัปดาห์

3. นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากข้อ 2 มาเพิ่มปริมาณโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมง ต่อรอบวัน เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์

4. นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากข้อ 3 มาตัดให้ได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร และนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม Kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพมืด เป็นเวลา 8 14 20 และ 26 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ล้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที และ ซับด้วยกระดาษที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้ง จากนั้นนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไปชักนำให้เจริญเป็นยอด โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม Kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 1 ชิ้น ต่อขวด เพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อรอบวัน เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์

5. เมื่อครบ 4 สัปดาห์ บันทึกจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่รอดชีวิต และแยกยอดที่ได้จากแคลลัสที่รอดชีวิตไปชักนำให้เกิดรากจำนวนมาก โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์

6. ย้ายปลูกต้นกล้าจากขวดเพาะเลี้ยงลงสู่กระถางในสภาพแวดล้อมภายนอก

การตรวจสอบความเป็นพอลิพลอยด์ (polyploidy) ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (flow cytometer)

หลังจากปลูกต้นหนุ่ยราชูชีที่รอดชีวิตจากการทดลองย่อยที่ 1.1 และ 1.2 ในกระถางได้ 4 สัปดาห์ ตรวจสอบความเป็นพอลิพลอยด์ของหนุ่ยราชูชี โดยใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Partec รุ่น PA II ของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยใช้ดีเอ็นเอจากต้นหนุ่ยราชูชีดิพลอยด์ (diploid) ต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินเป็นมาตรฐาน วิธีการตรวจสอบมีดังนี้ (Atichart and Bunnang, 2007)

1. ตัดใบหนุ่ยราชูชีที่อ่อนที่สุด จากหนุ่ยราชูชีที่เป็นต้นดิพลอยด์ ต้นเตตระพลอยด์ และต้นที่อาจเป็น ออกตะพลอยด์ ต้นละประมาณ 0.5 กรัม วางบนจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร

2. เติมสารละลาย CyStain UV Ploidy ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และ PVP (Polyvinyl-Pyrrolidone) ประมาณ 0.1 กรัม แล้วใช้ใบมีดโกนหั่นเนื้อเยื่อใบหนุ่ยราชูชีให้เป็นชิ้นเล็กๆ บางประมาณ 0.5 มิลลิเมตร

3. กรองสารแขวนลอยนิวเคลียสผ่านตัวกรองขนาด 30 ไมครอน

4. เติม CyStain UV Ploidy buffer ลงในหลอดสารแขวนลอยตัวอย่างเพิ่มอีก 500 ไมโครลิตร

5. วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของนิวเคลียสที่กรองได้ด้วยเครื่องโพลไซโตมิเตอร์

6. เปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอของต้นหนักรูฐที่มีระดับพลอยดีต่างกัน

หลังจากตรวจสอบความเป็นพอลิพลอยด์ของหนักรูฐแล้ว คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยด์ของแต่ละสิ่งการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Analysis of variance ของ 4x4 factorial in CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ซึ่งสิ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ จำนวนตายอด และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่รอดชีวิตหลังจากแช่สารละลายโคลชิซิน จำนวนต้นหนักรูฐที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นเตตระพลอยด์ที่ได้จากตายอด และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของหนักรูฐ

การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความสมบูรณ์และควมมีชีวิตของละอองเกสรตัวผู้ และน้ำหมักเมล็ด

2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

หลังจากตรวจสอบความเป็นพอลิพลอยด์ นำต้นหนักรูฐเตตระพลอยด์ (4x) โคลนต่างๆ ที่ได้จากการทดลองที่ 1 และต้นหนักรูฐที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (ดิพลอยด์; 2X) มาขยายพันธุ์ โดยการชำข้อที่มีรากในถุงพลาสติกสีดำ จนต้นกล้าอายุ 30-45 วัน นำไปปลูกในแปลงทดลอง จำนวน 36 ต้นต่อแปลง โดยให้มีระยะห่างระหว่างแถว และระหว่างต้น 1.5 x 1.5 เมตร เมื่อต้นพืชออกดอกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของแปลง ทำการเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในแปลงปลูกโดยวิธีการสุ่มจำนวน 6 ต้นต่อแปลง ดัดแปลงตามวิธีของ International Union for the Protection of New Varieties of Plants (2015) ดังนี้

1. ลำต้น ได้แก่

- ลักษณะทรงของกอ โดยให้คะแนน 1 คือ ตั้งตรง, 2 คือ กึ่งตั้งตรง, 3 คือ กึ่งเอนราบ และ 4 คือ เอนราบ (รูปที่ 1)

- ความสูงของลำต้น (วัดจากโคนต้นถึงข้อที่มีใบที่ 3 จากปลายยอด)

- ความยาวปล้องของลำต้นที่ทอดเลื้อย (stolon)

- ความยาวปล้องของลำต้นที่ตั้งตรง (clum)

- เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น (ปล้องที่ 3 นับจากปลายยอด)

2. ใบธง ได้แก่

- ลักษณะการโค้งของใบธง โดยให้คะแนน 1 คือ น้อย (weak), 2 คือ ปานกลาง (medium) และ 3 คือ มาก (strong) (รูปที่ 2)

- ความกว้างของใบ

- ความหนาแน่นของขนที่กาบใบ โดยให้คะแนน 1 คือ ไม่มีขน, 2 คือ มีขนน้อย, 3 คือ มีขนปานกลาง และ 4 มีขนหนาแน่น

3. แผ่นใบ ได้แก่

- ความยาวของแผ่นใบ

- ความกว้างของแผ่นใบ

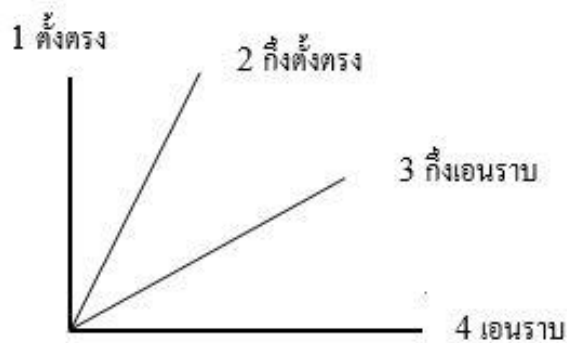
- ขนที่แผ่นใบ โดยให้คะแนน 1 คือ ไม่มีขน และ 2 คือ มีขน

- การกระจายตัวของขน โดยให้คะแนน 1 คือ เฉพาะด้านบนของใบ, 2 คือ เฉพาะด้านล่างของใบ, 3 คือ เฉพาะขอบใบ และ 4 ทั้งด้านบนและด้านล่างของใบ

- ความหนาแน่นของขนที่กาบใบ (ใบที่ 3 นับจากปลายยอด) โดยให้คะแนน 1 คือ ไม่มีขน, 2 คือ มีขนน้อย, 3 คือ มีขนปานกลาง และ 4 มีขนหนาแน่น

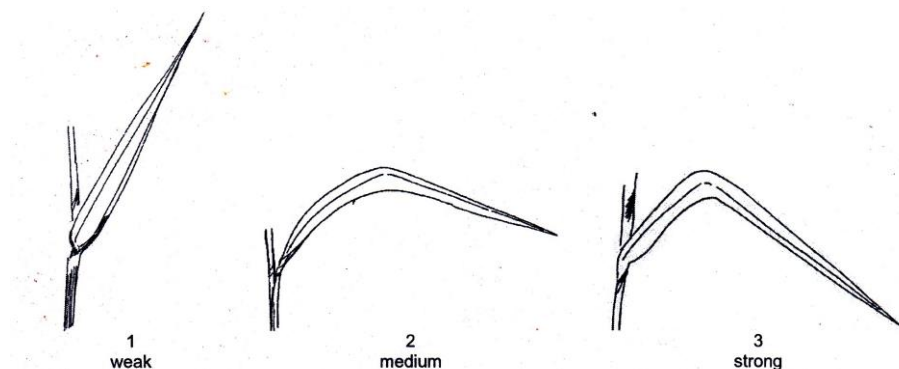
4. ช่อดอก ได้แก่

- ความยาวของก้านช่อดอก (peduncle) (รูปที่ 3)
 - ความยาวของก้านดอกรวม (rachis) (รูปที่ 3)
 - ความยาวของ basal racemes (รูปที่ 3)
 - รูปทรงของ rachis ที่ตัดตามขวาง โดยให้คะแนน 1 คือ triangular, 2 คือ winged และ 3 คือ crecent (รูปที่ 4)
 - สีของยอดเกสรเพศเมีย โดยให้คะแนน 1 คือ สีขาว, 2 คือ สีม่วงอ่อน และ 3 คือ สีม่วงเข้ม
 - ความหนาแน่นของดอกย่อยบน rachis (จำนวนดอกย่อยบน rachis)
 - การปรากฏของแอนโทไซยานินของกาบประดับ (glume) โดยให้คะแนน 1 คือ ไม่มี หรือน้อยมาก, 2 คือ มีน้อย, 3 คือ มีปานกลาง และ 4 คือ มีมาก
- 5.วันที่มีการออกดอกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของแปลง



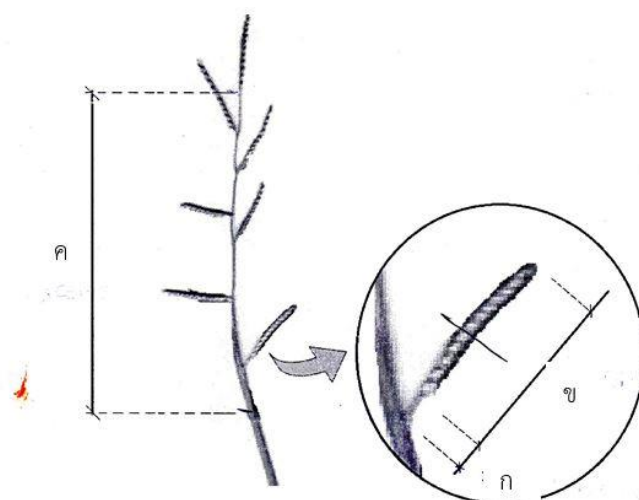
ที่มา : International Union for the Protection of New Varieties of Plants (2015)

รูปที่ 1 ลักษณะทรงของกอ



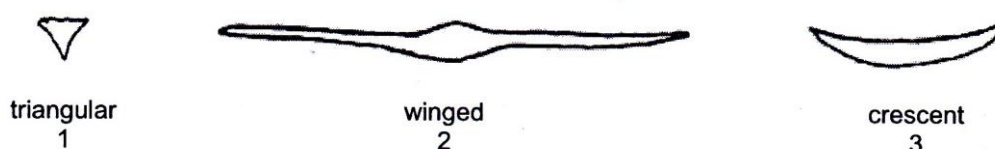
ที่มา : International Union for the Protection of New Varieties of Plants (2015)

รูปที่ 2 ลักษณะการโค้งของใบธง



ที่มา : International Union for the Protection of New Varieties of Plants (2015)

รูปที่ 3 ข้อดอกของหญ้า (ก) ความยาวของ peduncle (ข) ความยาวของ rachis (ค) ความยาวของ basal racemes



ที่มา : International Union for the Protection of New Varieties of Plants (2015)

รูปที่ 4 รูปทรงของ rachis ที่ตัดตามขวาง

2.2 การศึกษาความสมบูรณ์และชีวิตของละอองเกสรตัวผู้

เก็บอับละอองเกสรจากต้นหญ้าชนิดดีพลอยด์ และต้นหญ้าชนิดเตตระพลอยด์ที่ปลูกในแปลงทดลอง ตามการทดลองที่ 2.1 โคลนละ 4 ต้นๆ ละ 4 ดอก นำมาย้อมสี โดยใช้สาร iodine-potassium iodide (IKI) โดยนำอับละอองเกสรของหญ้าที่มีสีสดใสและสด จำนวน 1 อับ มาวางบนแผ่นสไลด์ หยดสี iodine-potassium iodide ใช้เข็มเขี่ยอับละอองเกสรให้แตก เพื่อให้ละอองเกสรออกจากอับ ปิดด้วย cover slide ทิ้งไว้ประมาณ 15-30 นาที แล้วดูการติดสีของละอองเกสรด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยละอองเกสรที่ติดสีดำจะเป็นละอองเกสรที่มีชีวิต ส่วนละอองเกสรที่ไม่ติดสีจะไม่มีชีวิต นับละอองเกสรที่ติดสีและไม่ติดสีรวมกัน ให้ได้ 500 เซลล์ต่อ 1 อับละอองเกสร แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ละอองเกสร นำเปอร์เซ็นต์ที่ไม่ติดสีมาพิจารณาความสมบูรณ์ของละอองเกสร ดังนี้ (สฤดี และกานดา, 2559)

เปอร์เซ็นต์ไม่ติดสี

100
91-99
71-90
31-70
21-31
0-20

ความสมบูรณ์ของละอองเกสร

completely sterile
sterile
partially sterile
partially fertile
fertile
fully fertile

2.3 การทดสอบน้ำหนักเมล็ด (1,000 seed weight) (ISTA, 2011)

1. นำเมล็ดพันธุ์ข้าวสุกดีพลอยด์ และข้าวสุกดีเตตระพลอยด์โคลนต่างๆ ที่ได้จากแปลงทดลอง ตามการทดลองที่ 2.1 มาคัดแยกเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ และน้ำหนักเมล็ดพันธุ์บริสุทธิ์ จำนวน 800 เมล็ด มาทดสอบน้ำหนักเมล็ด โดยการสุ่มนับเมล็ด 8 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด

2. ชั่งน้ำหนักเมล็ดในแต่ละซ้ำ เป็นกรัม โดยชั่งให้มีความละเอียดเป็นตัวเลข 4 ตัว

3. คำนวณหาน้ำหนักเฉลี่ยของเมล็ด 1,000 เมล็ด โดยใช้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก 100 เมล็ด คูณด้วย 10 ถ้าตัวเลขของน้ำหนัก 100 เมล็ด ใน 8 ซ้ำ มีค่า Coefficient of Variation (C.V.) เกินกว่า 6.0 เปอร์เซ็นต์ ต้องทำการนับเมล็ดเพิ่มอีก 8 ซ้ำ และคำนวณค่า Standard deviation สำหรับ 16 ซ้ำ (คำนวณน้ำหนัก 1,000 เมล็ดที่ฐานความชื้น 10 เปอร์เซ็นต์)

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลและการจัดกลุ่มพันธุ์

ทำการหาค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ได้แก่ ความสูงของลำต้น ความยาวปล้องของลำต้นที่ทอดเลื้อย (stolon) ความยาวปล้องของลำต้นที่ตั้งตรง (clum) เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น ความกว้างของใบธง ความยาวของแผ่นใบ ความกว้างของแผ่นใบ ความยาวของ peduncle ความยาวของ rachis ความยาวของ basal racemes จำนวนดอกย่อยบน rachis เปอร์เซ็นต์การไม่ติดสีของละอองเกสร และน้ำหนัก 1,000 เมล็ดของข้าวสุกดีพลอยด์ และข้าวสุกดีเตตระพลอยด์โคลนต่างๆ และนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ จำนวน 21 ลักษณะ รวมทั้งเปอร์เซ็นต์การไม่ติดสีของละอองเกสร และน้ำหนัก 1,000 เมล็ด มาวิเคราะห์จัดกลุ่มพันธุ์ โดยวิธีวิเคราะห์กลุ่ม (cluster analysis)

ผลการทดลองและวิจารณ์

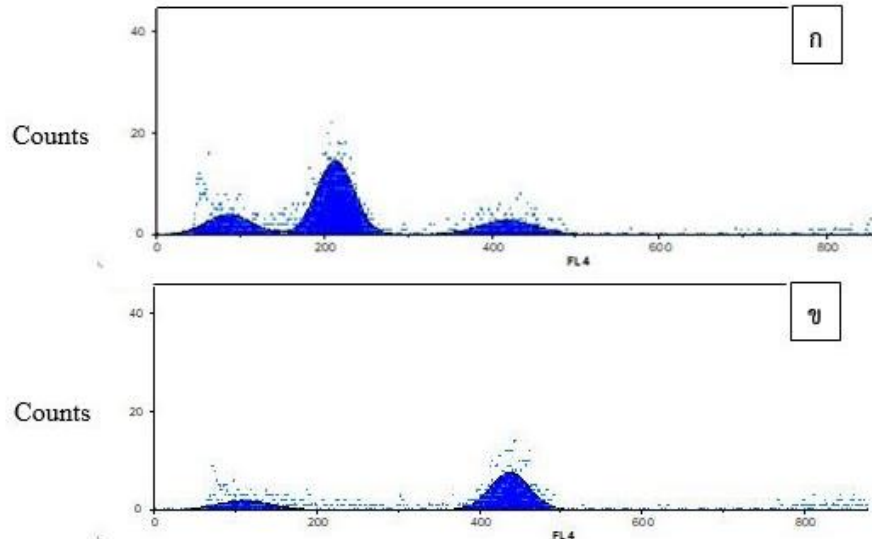
การทดลองที่ 1 ศึกษาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารละลายโคลชิซินต่อการเพิ่มจำนวนโครโมโซมจากตายอด และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของข้าวสุกดี

1.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและการเกิดต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็นเตตระพลอยด์จากตายอดของข้าวสุกดีที่ได้รับการละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ

จากการเพาะเลี้ยงตายอดของข้าวสุกดีในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BAP 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 14 20 และ 26 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ย้ายตายอดไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BAP 6 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่เติมสารละลายโคลชิซิน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ระดับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินมีผลต่อการรอดชีวิตของตายอด โดยตายอดที่ได้รับการละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 16.7 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ส่วนระยะเวลาที่ใช้สารละลายโคลชิซิน และอิทธิพลร่วมระหว่างระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารละลายโคลชิซิน ไม่มีผลต่อการรอดชีวิตของตายอด ($P > 0.05$) (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับรายงานของอลงกต และสราวุธ (2560) ที่พบว่าการใช้สารโคลชิซินในระดับความเข้มข้นที่สูงมากเกินไปจะมีผลทางลบกับพืชโดยอาจส่งผลให้พืชเจริญเติบโตช้า มีรูปร่างที่ผิดปกติหรือเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายได้

การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรีของต้นข้าวสุกดีที่ได้รับการละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ พบว่า ตายอดของข้าวสุกดีที่ได้รับการละลายโคลชิซินมีผลทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม เนื่องจากมีฮิสโทแกรมสูงสุดขึ้นบริเวณช่องที่ 400 แสดงว่ามีระดับพลอยดีเป็นต้นเตตระพลอยด์ ($2n=4X$) ซึ่งแตกต่างกับต้นที่ไม่ได้รับการละลายโคลชิซินที่มีฮิสโทแกรมสูงสุดขึ้นที่บริเวณช่องที่ 200 ซึ่งแสดงว่ามีระดับพลอยดีเป็นต้นดิพลอยด์ ($2n=2X$) (รูปที่ 5) และเมื่อพิจารณาลักษณะฮิสโทแกรมที่วัดจากเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ของต้นข้าวสุกดีที่ได้จากการแช่ตายอดในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่าง

กัน พบว่าความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินมีผลต่อการเกิดต้นเตตระพลอยด์ โดยต้นหน้ารูชี้ที่ได้จากตายอดที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตระพลอยด์สูงสุด คือ 7.5 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ส่วนระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน และอิทธิพลร่วมระหว่างระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารละลายโคลชิซิน ไม่มีผลต่อการเกิดต้นเตตระพลอยด์ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 1)



รูปที่ 5 ฮิสโทแกรมแสดงระดับพลอยดีของหน้ารูชี้ (ก) ระดับพลอยดีของต้นดิพลอยด์ (ข) ระดับพลอยดีของต้นเตตระพลอยด์

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและการเกิดต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็นเตตระพลอยด์จากตายอดของหน้ารูชี้ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ

สิ่งทดลอง	จำนวน ตายอด (ชิ้น)	ตายอดที่รอดชีวิต ชิ้น (%)	ระดับพลอยดี			
			2X	3X	4X (%)	6X
ความเข้มข้นของสารละลาย โคลชิซิน (% w/v)						
0.05	120	20 (16.7) ^a	9	1	9 (7.5) ^a	1
0.10	120	7 (5.8) ^b	3	0	4 (3.3) ^b	0
0.15	120	3 (2.5) ^b	3	0	0 ^b	0
0.20	120	2 (1.7) ^b	1	0	1 (0.8) ^b	0
ระยะเวลาในการแช่สารละลาย โคลชิซิน (ชั่วโมง)						
8	120	13 (10.8)	6	1	6 (5.0)	0
14	120	5 (4.2)	4	0	1 (0.8)	0
20	120	5 (4.2)	2	0	3 (2.5)	0
26	120	9 (7.5)	4	0	4 (3.3)	1
ความเข้มข้น x ระยะเวลาในการใช้ สารละลายโคลชิซิน		NS	-	-	NS	-

หมายเหตุ: ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดย DMRT ที่ระดับ $P < 0.05$

NS แสดงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดย DMRT ที่ระดับ $P > 0.05$

1.2 เพอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและการเกิดต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็นเตตระพลอยด์จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของหน่อกล้วยที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ

จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของหน่อกล้วยในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม Kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 เพอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 14 20 และ 26 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม Kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่เติมสารละลายโคลชิซิน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการรอดชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน และอิทธิพลร่วมระหว่างระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารละลายโคลชิซิน ไม่มีผลต่อการรอดชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ($P>0.05$) (ตารางที่ 2)

จากการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโฟลโซโตเมทรีของต้นหน่อกล้วยที่ได้จากการแช่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบว่าความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน และอิทธิพลร่วมระหว่างระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารละลายโคลชิซิน ไม่มีผลต่อการเกิดต้นเตตระพลอยด์ ($P>0.05$) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เพอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและการเกิดต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็นเตตระพลอยด์จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของหน่อกล้วยที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ

สิ่งทดลอง	จำนวน แคลลัส (ชิ้น)	แคลลัสที่รอด ชีวิต ชิ้น (%)	ระดับพลอยดี			
			2X	3X	4X (%)	6X
ความเข้มข้นของสารละลาย						
โคลชิซิน (% w/v)						
0.05	120	5 (4.2)	5	0	0	0
0.10	120	4 (3.3)	3	0	1 (0.8)	0
0.15	120	2 (1.7)	1	0	1 (0.8)	0
0.20	120	0	0	0	0	0
ระยะเวลาในการแช่สารละลาย						
โคลชิซิน (ชั่วโมง)						
8	120	1 (0.8)	1	0	0	0
14	120	6 (5.0)	5	0	1 (0.8)	0
20	120	2 (1.7)	2	0	0	0
26	120	2 (1.7)	1	0	1 (0.8)	0
ความเข้มข้น x ระยะเวลาในการใช้		NS	-	-	NS	-
สารละลายโคลชิซิน						

หมายเหตุ: NS แสดงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดย DMRT ที่ระดับ $P>0.05$

การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความสมบูรณ์และควมมีชีวิตของละอองเกสรตัวผู้ และ น้ำหนักเมล็ด (1,000 seed weight)

2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนัารูชีที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (ดิพลอยด์) และ หนัารูชีเตตระพลอยด์ (tetraploid; TP) โคลนต่างๆ

จากการเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนัารูชีดิพลอยด์ และหนัารูชีเตตระพลอยด์โคลนต่างๆ ได้ผลดังนี้

ลักษณะทรงกอ จากการบันทึกลักษณะทรงกอของหนัารูชีดิพลอยด์ และหนัารูชีเตตระพลอยด์โคลนต่างๆ พบว่า หนัารูชีดิพลอยด์ และหนัารูชีเตตระพลอยด์ส่วนใหญ่มีลักษณะทรงกอแบบกิ่งเอนราบ ยกเว้นหนัารูชีเตตระพลอยด์โคลน TP7 และ TP15 มีลักษณะกิ่งตั้งตรง (ตารางที่ 3)

ความสูงของลำต้น หนัารูชีเตตระพลอยด์โคลน TP3 มีความสูงของลำต้นเฉลี่ยมากที่สุด คือ 116.17 เซนติเมตร ส่วนหนัารูชีเตตระพลอยด์โคลน TP 8 และ TP15 มีความสูงเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 41.67 และ 39.83 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ความยาวปล้องของลำต้นที่ตั้งตรง (clum) หนัารูชีเตตระพลอยด์โคลน TP6 และ TP11 มีความยาวปล้องของลำต้นที่ตั้งตรงเฉลี่ยมากที่สุด คือ 15.12 และ 15.05 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนหนัารูชีเตตระพลอยด์โคลน TP15 มีความยาวปล้องของลำต้นที่ตั้งตรงเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 6.57 เซนติเมตร (ตารางที่ 3)

ความยาวปล้องของลำต้นที่ทอดเลื้อย (stolon) หนัารูชีเตตระพลอยด์โคลน TP14 มีความยาวปล้องของลำต้นที่ทอดเลื้อยเฉลี่ยมากที่สุด คือ 15.12 เซนติเมตร ส่วนหนัารูชีดิพลอยด์มีความยาวปล้องของลำต้นที่ทอดเลื้อยเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 8.20 เซนติเมตร (ตารางที่ 3)

เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น หนัารูชีเตตระพลอยด์โคลน TP14 และ TP15 มีเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นเฉลี่ยมากที่สุด คือ 0.53 และ 0.52 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนหนัารูชีดิพลอยด์ และหนัารูชีเตตระพลอยด์โคลน TP10 มีเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 0.35 และ 0.33 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ลำต้นของหนัารูชีดิพลอยด์ และหนัารูชีเตตระพลอยด์ (TP) โคลนต่างๆ

โคลน	ลักษณะทรงกอ	ความสูงของลำต้น (cm)	ความยาวปล้องของ clum (cm)	ความยาวปล้องของ stolon (cm)	เส้นผ่านศูนย์กลาง ของลำต้น (cm)
รูชีดิพลอยด์	3	59.50	9.00	8.20	0.35
TP 1	3	84.33	9.48	14.05	0.40
TP 2	3	73.00	13.38	13.50	0.40
TP 3	3	116.17	12.28	12.37	0.35
TP 4	3	68.50	13.27	12.17	0.47
TP 5	3	81.83	13.27	11.90	0.47
TP 6	3	73.50	15.12	12.83	0.50
TP 7	2	85.67	12.38	12.13	0.45
TP 8	3	41.67	12.98	12.58	0.42
TP 9	3	63.83	8.60	11.53	0.38
TP 10	3	59.33	10.27	11.62	0.33
TP 11	3	47.67	15.05	10.98	0.47
TP 12	3	73.17	13.37	12.52	0.47
TP 13	3	65.50	12.72	13.32	0.37
TP 14	3	91.00	13.72	15.12	0.53
TP 15	2	39.83	6.57	10.20	0.52
TP 16	3	66.00	11.87	10.08	0.37

ลักษณะการโค้งงอของใบธง จากการบันทึกลักษณะการโค้งงอของใบธงของหญ้ารูชีดีพลอยด์ และหญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์โคลนต่างๆ พบว่า หญ้ารูชีดีพลอยด์ และหญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์ทุกโคลนมีลักษณะการโค้งงอของใบธงน้อย (ตารางที่ 4)

ความกว้างของใบธง หญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์โคลน TP8 มีความกว้างของใบธงมากที่สุด คือ 1.47 เซนติเมตร และหญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์โคลน TP4 มีความกว้างของใบธงน้อยที่สุด คือ 0.57 เซนติเมตร (ตารางที่ 4)

ความหนาแน่นของขนที่กาบใบธง จากการบันทึกการกระจายของขนที่กาบใบธงของหญ้ารูชีดีพลอยด์ และหญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์โคลนต่างๆ พบว่า หญ้ารูชีดีพลอยด์ และหญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์ส่วนใหญ่มีความหนาแน่นของขนที่กาบใบธง ปานกลาง-มาก ยกเว้น TP7 ที่ไม่มีขน (ตารางที่ 4)

ความยาวของแผ่นใบ หญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์โคลน TP9 มีความยาวของแผ่นใบเฉลี่ยมากที่สุดคือ 37.45 เซนติเมตร ส่วนหญ้ารูชีดีพลอยด์มีความยาวของแผ่นใบเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 18.22 เซนติเมตร (ตารางที่ 4)

ความกว้างของแผ่นใบ หญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์โคลน TP15 มีความกว้างของแผ่นใบเฉลี่ยมากที่สุด คือ 2.88 เซนติเมตร ส่วนหญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์โคลน TP3 และ TP 11 มีความกว้างของแผ่นใบเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 1.77 เซนติเมตร (ตารางที่ 4)

ขนที่แผ่นใบ จากการบันทึกขนที่แผ่นใบของหญ้ารูชีดีพลอยด์ และหญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์โคลนต่างๆ พบว่า หญ้ารูชีดีพลอยด์ และหญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์ทุกโคลนมีขนที่แผ่นใบ (ตารางที่ 4)

การกระจายของตัวขนของแผ่นใบ จากการบันทึกการกระจายของตัวขนของแผ่นใบของหญ้ารูชีดีพลอยด์ และหญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์โคลนต่างๆ พบว่า หญ้ารูชีดีพลอยด์ และหญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์ทุกสายโคลนมีการกระจายตัวของขนทั้งด้านบนและด้านล่างของใบ (ตารางที่ 4)

ความหนาแน่นของขนที่กาบใบ จากการบันทึกความหนาแน่นของขนที่กาบใบของหญ้ารูชีดีพลอยด์ และหญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์โคลนต่างๆ พบว่า หญ้ารูชีดีพลอยด์ และหญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์ส่วนใหญ่มีความหนาแน่นของขนที่กาบใบมาก ยกเว้น TP7 ที่มีความหนาแน่นของขนปานกลาง (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ใบธงและแผ่นใบของหญ้ารูชีดีพลอยด์ และหญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์ (TP) โคลนต่างๆ

โคลน	ใบธง			แผ่นใบ				
	ลักษณะการโค้งงอของใบธง	ความกว้างของใบธง (cm)	ความหนาแน่นของขนที่กาบใบ	ความยาวของแผ่นใบ (cm)	ความกว้างของแผ่นใบ (cm)	ขนที่แผ่นใบ	การกระจายตัวของขน	ความหนาแน่นของขนที่กาบใบ
รูชีดีพลอยด์	1	0.87	4	18.22	2.12	2	4	4
TP 1	1	1.28	4	32.78	2.48	2	4	4
TP 2	1	0.75	3	30.82	2.48	2	4	4
TP 3	1	0.88	3	27.73	1.77	2	4	4
TP 4	1	0.57	3	24.78	1.97	2	4	4
TP 5	1	0.75	2	26.65	2.00	2	4	4
TP 6	1	0.63	2	29.00	2.35	2	4	4
TP 7	1	0.73	1	24.93	2.57	2	4	3
TP 8	1	1.47	3	18.43	2.38	2	4	4
TP 9	1	1.13	4	37.45	2.30	2	4	4
TP 10	1	1.28	4	24.50	1.93	2	4	4
TP 11	1	0.63	4	21.13	1.77	2	4	4
TP 12	1	0.92	3	23.10	1.93	2	4	4
TP 13	1	0.62	2	22.58	1.92	2	4	4

TP 14	1	0.73	2	30.13	2.08	2	4	4
TP 15	1	1.15	2	28.45	2.88	2	4	4
TP 16	1	0.67	3	26.33	2.13	2	4	4

ความยาวของก้านช่อดอก (peduncle) หนักรูชีเตตระพลอยด์โคลน TP15 มีความยาวของ peduncle เฉลี่ยมากที่สุด คือ 0.85 เซนติเมตร ส่วนหนักรูชีเตตระพลอยด์โคลน TP7 และ TP16 มีความยาวของ peduncle เฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 0.20 เซนติเมตร (ตารางที่ 5)

ความยาวของก้านดอกรวม (rachis) หนักรูชีเตตระพลอยด์โคลน TP15 มีความยาวของ rachis เฉลี่ยมากที่สุด คือ 12.88 เซนติเมตร ส่วนหนักรูชีดิพลอยด์และ TP8 มีความยาวของ rachis เฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 5.93 และ 6.02 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ความยาวของ basal racemes หนักรูชีเตตระพลอยด์โคลน TP15 มีความยาวของ basal racemes เฉลี่ยมากที่สุด คือ 15.10 เซนติเมตร ส่วนหนักรูชีเตตระพลอยด์ TP10 มีความยาวของ basal racemes เฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 6.85 เซนติเมตร (ตารางที่ 5)

รูปทรงของ rachis จากการบันทึกรูปทรงของ rachis ของหนักรูชีดิพลอยด์ และหนักรูชีเตตระพลอยด์โคลนต่างๆ พบว่า หนักรูชีดิพลอยด์ และหนักรูชีเตตระพลอยด์ทุกโคลนมีรูปทรงของ rachis เป็นแบบ wings (ตารางที่ 5)

สีของยอดเกสรตัวเมีย จากการบันทึกสีของยอดเกสรตัวเมียของหนักรูชี ดิพลอยด์ และหนักรูชีเตตระพลอยด์โคลนต่างๆ พบว่า หนักรูชีดิพลอยด์ และหนักรูชีเตตระพลอยด์ส่วนใหญ่มีสีของยอดเกสรตัวเมียเป็น สีม่วงเข้ม ยกเว้น TP13 ที่มีสีม่วงอ่อน (ตารางที่ 5)

จำนวนดอกย่อยบน rachis หนักรูชีเตตระพลอยด์โคลน TP15 มีจำนวนดอกย่อยบน rachis เฉลี่ยมากที่สุด คือ 15.10 ดอก ส่วนหนักรูชีเตตระพลอยด์โคลน TP7 และ TP8 มีจำนวนดอกย่อยบน rachis เฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 35 ดอก (ตารางที่ 5)

การปรากฏแอนโทไซยานินของกาบประดับ (glume) จากการบันทึกการปรากฏแอนโทไซยานินของกาบประดับของหนักรูชีดิพลอยด์ และหนักรูชีเตตระพลอยด์โคลนต่างๆ พบว่า หนักรูชีดิพลอยด์ และหนักรูชีเตตระพลอยด์ส่วนใหญ่ไม่มีการปรากฏแอนโทไซยานินของกาบประดับ ยกเว้น TP9 และ TP15 ที่มีการปรากฏแอนโทไซยานินเล็กน้อย (ตารางที่ 5)

วันที่ออกดอก 50 เปอร์เซ็นต์ของแปลง จากการบันทึกวันที่ออกดอก 50 เปอร์เซ็นต์ของแปลงของหนักรูชีดิพลอยด์ และหนักรูชีเตตระพลอยด์โคลนต่างๆ พบว่า หนักรูชีดิพลอยด์ และหนักรูชีเตตระพลอยด์มีการออกดอก 50 เปอร์เซ็นต์ของแปลง ระหว่างวันที่ 8 ตุลาคม – 2 พฤศจิกายน (ตารางที่ 5)

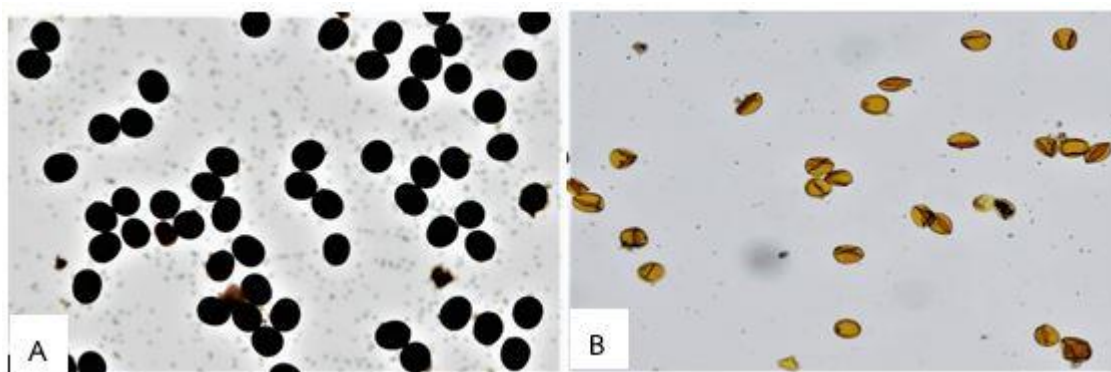
ตารางที่ 5 ช่อดอกและวันที่ออกดอก 50 เปอร์เซ็นต์ของแปลงของหนักรูชีดิพลอยด์ และหนักรูชีเตตระพลอยด์ (TP) โคลนต่างๆ

โคลน	ความยาว ของ peduncle (cm)	ความยาว ของ rachis (cm)	ความยาว ของ basal racemes (cm)	รูปทรง ของ rachis	สีของยอด เกสรตัว เมีย	จำนวนดอก ย่อยบน rachis (ดอก)	การปรากฏแอน โทไซยานินของ กาบประดับ	วันที่ออก ดอก 50% ของแปลง
รูชีดิพลอยด์	0.22	5.93	8.12	2	3	37	1	31 ต.ค
TP 1	0.43	6.83	11.65	2	3	41	1	18 ต.ค
TP 2	0.27	6.98	9.62	2	3	43	1	18 ต.ค
TP 3	0.30	6.58	11.02	2	3	39	1	18 ต.ค
TP 4	0.18	6.08	11.30	2	3	44	1	18 ต.ค
TP 5	0.25	7.30	11.35	2	3	42	1	2 พ.ย

TP 6	0.25	6.52	11.13	2	3	44	1	2 พ.ย
TP 7	0.20	6.25	7.55	2	3	35	1	2 พ.ย
TP 8	0.23	6.02	10.05	2	3	35	1	22 ต.ค
TP 9	0.22	8.65	11.72	2	3	44	2	16 ต.ค
TP 10	0.33	9.18	6.85	2	3	48	1	16 ต.ค
TP 11	0.17	8.12	8.53	2	3	45	1	2 พ.ย
TP 12	0.22	7.77	8.95	2	3	46	1	2 พ.ย
TP 13	0.18	7.50	7.70	2	2	44	1	2 พ.ย
TP 14	0.35	8.65	12.28	2	3	40	1	2 พ.ย
TP 15	0.85	12.88	15.10	2	3	43	2	8 ต.ค
TP 16	0.20	6.42	11.03	2	3	38	1	22 ต.ค

2.2 การศึกษาความสมบูรณ์และควมมีชีวิตของละอองเกสรตัวผู้

จากการศึกษาความสมบูรณ์และควมมีชีวิตของละอองเกสรตัวผู้ของหญ้ารูชีดีพลอยด์ และหญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์ (TP) โคลนต่างๆ โดยดูการติดสีของละอองเกสร เมื่อย้อมด้วยสาร iodine-potassium iodide (IKI) (รูปที่ 6 และตารางที่ 6) พบว่า หญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์โคลน TP4 TP11 และ TP13 มีละอองเกสรตัวผู้สมบูรณ์อย่างเต็มที่ (fully fertile) TP3 และ TP5 มีละอองเกสรตัวผู้สมบูรณ์ (fertile) TP2 TP6 TP7 TP8 TP12 TP16 และหญ้ารูชีดีพลอยด์มีละอองเกสรตัวผู้สมบูรณ์บางส่วน (partially fertile) TP10 TP14 และ TP 15 มีละอองเกสรตัวผู้เป็นหมันบางส่วน (partially sterile) TP1 และ TP 9 มีละอองเกสรตัวผู้เป็นหมัน (sterile) (ตารางที่ 6) ดังนั้นหญ้ารูชีดีเตตระพลอยด์โคลน TP4 TP11 และ TP13 จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์หญ้ารูชีดีโดยการผสมข้ามมากที่สุด และอาจเป็นไปได้ที่จะช่วยเหนี่ยวนำให้พืชที่เป็นอะโพมิซิส (apomixis) เช่น หญ้ามูลาใต้ II เกิดการสร้างเอนโดสเปิร์ม (endosperm) ทำให้สามารถผลิตเมล็ดที่สมบูรณ์ได้ (Mendes-Bonato et al., 2004)



รูปที่ 6 การติดสีของละอองเกสรตัวผู้ (A) มีชีวิต (B) ไม่มีชีวิต

ตารางที่ 6 ความสมบูรณ์และควมมีชีวิตของละอองเกสรตัวผู้ของหญ้ารูซี่ดิลอยด์ และหญ้ารูซี่เตตระพลอยด์ (TP) โคลนต่างๆ

โคลน	เปอร์เซ็นต์ ติดสี	เปอร์เซ็นต์ ไม่ติดสี	ความสมบูรณ์ของละอองเกสร
หญ้ารูซี่ดิลอยด์	58	42	partially fertile
TP 1	6	94	sterile
TP 2	45	55	partially fertile
TP 3	79	21	fertile
TP 4	89	11	fully fertile
TP 5	72	28	fertile
TP 6	56	44	partially fertile
TP 7	63	37	partially fertile
TP 8	50	50	partially fertile
TP 9	6	94	sterile
TP 10	13	87	partially sterile
TP 11	89	11	fully fertile
TP 12	56	44	partially fertile
TP 13	91	9	fully fertile
TP 14	30	70	partially sterile
TP 15	16	84	partially sterile
TP 16	57	43	partially fertile

2.3 การทดสอบน้ำหนักเมล็ด (1,000 seed weight)

จากการทดสอบน้ำหนักเมล็ด (1,000 seed weight) ของหญ้ารูซี่ดิลอยด์ และหญ้ารูซี่เตตระพลอยด์ โคลนต่างๆ พบว่าหญ้ารูซี่เตตระพลอยด์โคลน TP14 มีน้ำหนัก 1,000 เมล็ดเฉลี่ยมากที่สุด คือ 11.17 กรัม ส่วนหญ้ารูซี่เตตระพลอยด์โคลน TP4 TP13 TP16 และหญ้ารูซี่ดิลอยด์มีน้ำหนัก 1,000 เมล็ดเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 6.276 6.201 6.268 และ 6.209 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

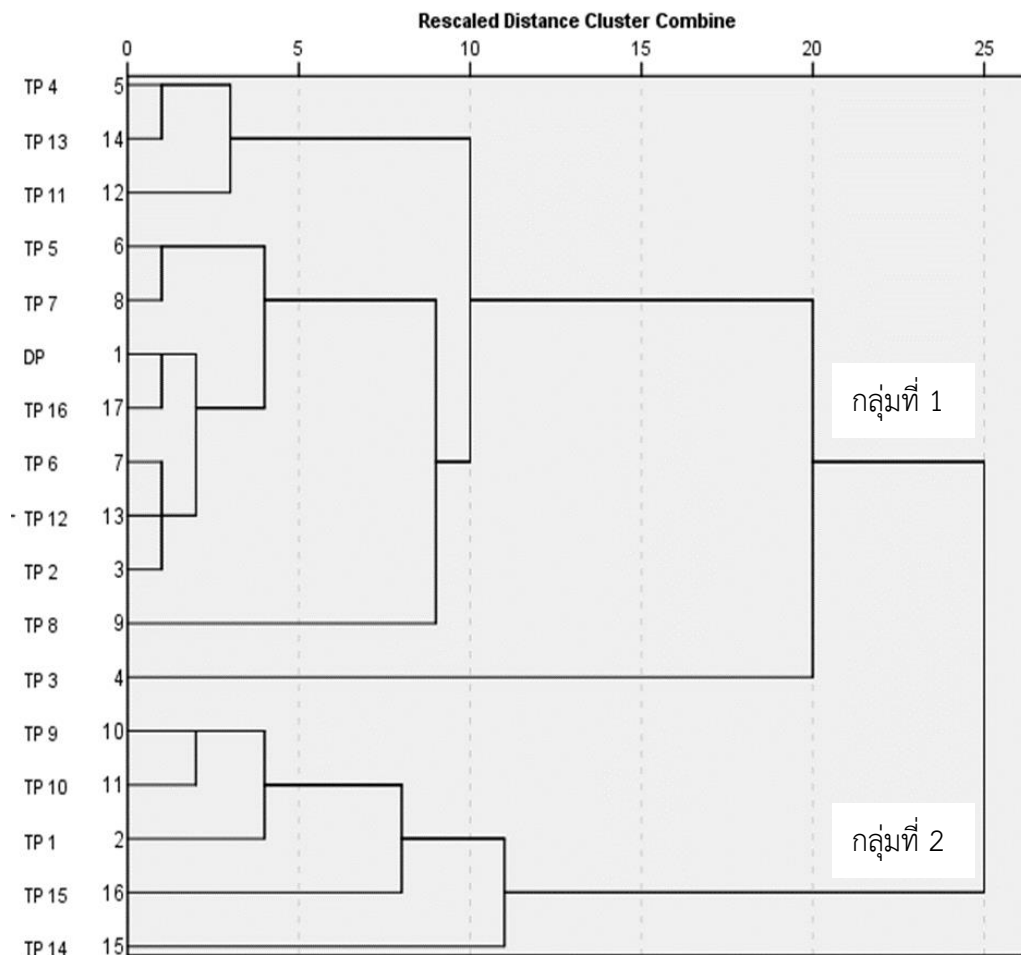
ตารางที่ 7 น้ำหนัก 1,000 เมล็ดของหญ้ารูซี่ที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน (ดิลอยด์) และหญ้ารูซี่เตตระพลอยด์ (TP) สายพันธุ์ต่างๆ (ณ ฐานความชื้น 10 เปอร์เซ็นต์)

สายพันธุ์	น้ำหนัก 1,000 เมล็ด (กรัม)
หญ้ารูซี่ดิลอยด์	6.209
TP 1	8.161
TP 2	8.655
TP 3	8.278
TP 4	6.276
TP 5	9.345
TP 6	9.232
TP 7	9.293
TP 8	8.119
TP 9	8.303

TP 10	8.522
TP 11	8.547
TP 12	8.366
TP 13	6.201
TP 14	11.17
TP 15	7.080
TP 16	6.268

2.4 การวิเคราะห์จัดกลุ่มพันธุ์ โดยวิธีวิเคราะห์กลุ่ม (cluster analysis)

เมื่อนำลักษณะลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ จำนวน 21 ลักษณะ (ตารางที่ 3, 4 และ 5) รวมทั้งเปอร์เซ็นต์การไม่ติดสีของละอองเกสร (ตารางที่ 6) และน้ำหนัก 1,000 เมล็ด (ตารางที่ 7) ของหญ้ารูซี่ดีพลอยด์ และหญ้ารูซี่เตตระพลอยด์โคลนต่างๆ มาวิเคราะห์ด้วยวิธี cluster analysis พบว่า สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 Dendrogram แสดงการแบ่งกลุ่มหญ้ารูซี่ดีพลอยด์ และหญ้ารูซี่เตตระพลอยด์สายพันธุ์ต่างๆ โดยวิธี cluster analysis

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยหญ้ารูซี่ดีพลอยด์ (DP) หญ้ารูซี่เตตระพลอยด์โคลน TP2, TP3, TP4, TP5, TP6, TP7, TP8, TP11, TP12, TP13 และ TP16 ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากกลุ่มที่ 2 คือ มีเปอร์เซ็นต์การไม่ติดสีของ

ละอองเกสรตัวผู้อยู่ในช่วง 9-55 เปอร์เซ็นต์ (ละอองเกสรตัวผู้สมบูรณ์เต็มที่-ละอองเกสรตัวผู้สมบูรณ์บางส่วน) โดยภายในกลุ่มที่ 1 ยังแบ่งด้วยความสูงออกเป็น 2 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อยที่ 1.1 ประกอบด้วย TP2, TP4, TP5, TP6, TP7, TP8, TP11, TP12, TP13 และ TP16 มีความสูงอยู่ในช่วง 41.67 – 85.67 เซนติเมตร และแบ่งย่อยได้อีกเป็น 2 กลุ่มย่อยด้วยลักษณะความสมบูรณ์ของละอองเกสร คือ

1.1.1 ละอองเกสรตัวผู้สมบูรณ์เต็มที่ ประกอบด้วย TP4, TP11 และ TP13

1.1.2 ละอองเกสรตัวผู้สมบูรณ์บางส่วน ประกอบด้วย TP2, TP5, TP6, TP7, TP8, TP12 และ TP16

กลุ่มย่อยที่ 1.2 มีโคลนเดียว คือ TP3 ที่ความสูงเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 116.1 เซนติเมตร

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยหญ้ารัฐซีเตตระพลอยด์โคลน TP1, TP9, TP10, TP14 และ TP15 ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากกลุ่มที่ 1 คือ มีเปอร์เซ็นต์การไม่ติดสีของละอองเกสรอยู่ในช่วง 70-94 เปอร์เซ็นต์ (ละอองเกสรตัวผู้เป็นหมันบางส่วน-ละอองเกสรตัวผู้เป็นหมัน)

สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาชิ้นส่วนของหญ้ารัฐซี ระดับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการใช้ที่เหมาะสม ในการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของหญ้ารัฐซีให้เป็นเตตระพลอยด์ พบว่า

1.1 สารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้ตายอดของหญ้ารัฐซีเกิดเตตระพลอยด์สูงสุดเท่ากับ 7.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระยะเวลาในการใช้สารละลายโคลชิซิน ไม่มีผลต่อการเกิดเตตระพลอยด์

1.2 ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาในการได้รับสารละลายโคลชิซิน ไม่มีผลต่อการเกิดเตตระพลอยด์ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

2. จากการนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ จำนวน 21 ลักษณะ รวมทั้งเปอร์เซ็นต์การไม่ติดสีของละอองเกสร และน้ำหนัก 1,000 เมล็ดของหญ้ารัฐซีดีพลอยด์ และหญ้ารัฐซีเตตระพลอยด์โคลนต่างๆ มาวิเคราะห์ด้วยวิธี cluster analysis พบว่า ลักษณะเบื้องต้นที่สามารถจำแนกระหว่างหญ้ารัฐซีดีพลอยด์ และหญ้ารัฐซีเตตระพลอยด์ ได้แก่ ความยาวของแผ่นใบ ความยาวปล้องของ stolon ความยาวของ basal raceme และน้ำหนัก 1,000 เมล็ด

เอกสารอ้างอิง

- กมล เลิศรัตน์. 2536. การปรับปรุงพันธุ์พืชผสมข้าม. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- กังวาน ธรรมแสง และวรพงษ์ สุริยภัทร. 2555. ศักยภาพการผลิตพืชอาหารสัตว์และเมล็ดพันธุ์ในประเทศไทย. เกษตร 40(2): 37-42.
- ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2527. หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช. โรงพิมพ์ไทรโย. หาดใหญ่.
- ศศิธร ถิ่นนคร. 2531. การศึกษาผลผลิตและส่วนประกอบทางเคมีของหญ้าพืชอาหารสัตว์ 9 ชนิดที่ศูนย์วิจัยอาหารสัตว์ปากช่อง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. ขอนแก่น : ภาควิชาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สดุดี พงษ์เพียจันทร์ และ กานดา นาคมณี. 2559. การปรับปรุงพันธุ์หญ้ารัฐซีเพื่อการทนแล้ง 2.5 ความสมบูรณ์ของละอองเกสรตัวผู้ของหญ้าชิกแนลตังและหญ้าชิกแนลนอน. รายงานผลงานวิจัย สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ ประจำปี 2559 กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 107-116.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2558. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2558. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 226 หน้า.

- อลงกลต แทนอมทอง และสราวุธ แก้วศรี. 2560. การชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในพืชด้วยสารโคลชิซิน. วารสาร วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1(2): 1-12.
- Atichart, P. and S. Bunnang. 2007. Polyploid induction in *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl. By *in vitro* techniques. Thai Journal of Agricultural Science. 40(1-2): 91-95.
- International Union for the Protection of New Varieties of Plants. 2015. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Available source : www.upov.int, July 20, 2017.
- Ishigaki, G., T. Gondo, K. Suenaga and R. Akashi. 2009. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by cochicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. Grassland Science 55:164-170.
- ISTA. 2011. International Rules for Seed Testing Edition 2011. The International Seed Testing Association (ISTA), Zurichstr. 50CH-8303 Bassersdorf, Switzerland.
- Lewis-Back, M.S. 1993. Experimental Design and Methods. International handbook of quantitative application in social sciences, London. 418 pp.
- Mendes-Bonato et.al. (2004). Abnormal pollen mitoses (PMI and PMII) in an interspecific hybrid of *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria decumbens*. J. Genetics. 83: 279-283.
- Simioni, C. and C.B. Valle. 2009. Chromosome duplication in *Brachiaria* (A. Rich.) Stapf allows interspecific crosses. Crop breeding and Applied Biotechnology 9: 328-334.
- Timbo, A.L.O., P.N.C. Souza, R.C. Pereira, J.D. Nunes, J.E.B.P. Pinto, F.S. Sobrinho and L.C. Davide. 2014. Obtaining tetraploid plants of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). R. Braa. Zootec. 43(3): 127-131.