ปรับปรุงพันธุ์พืชสกุลเทียน (Genus Impatiens) ของไทยเพื อพัฒนาเป็นไม้ดอกประดับ

Development of ornamental Impatiens from native species

ฐิติมา ธาราวุฒิ* วิภวา เสมแย้ม ปิยเกษตร สุขสถาน และสุญาณี เวสสบุตร
องค์การสวนพฤกษศาสตร์ อ. แม่ริม จ.เชียงใหม่ 50180

บทคัดย่อ

เทียน (*Impatiens*) หลายชนิดถูกนำมาพัฒนาเป็นไม้ดอกประดับ ทำให้เกิดลูกผสมที มีดอกสวยงามใช้ปลูกประดับสวน ประดับแปลงหรือเป็นไม้กระถาง การศึกษาครังนีมีวัตถุประสงค์ เพื อหาความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที เหมาะสม่อการชักนำให้ต้นเทียนได้ลักษณะตามที ต้องการ เช่น ต้นเตีย ดอกดก โดยนำชินส่วนยอดของเทียนดอย เทียนธารา เทียนธารารักษ์ เทียนอุ้มผาง และเทียนกาญจนบุรี ยาว 3 เซนติเมตร มาแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 0.03, 0.05 และ 0.09 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 ชัวโมง แล้วนำมาเลียงบนอาหารแข็งสูตร MS ที ไม่เติมฮอร์โมน นาน 6 สัปดาห์ คัดเลือกต้นเททราพลอยด์ได้โดยใช้ลักษณะที เป็นดัชนีชี ได้แก่ ความหนาของใบ ขนาดของเซลล์คุม และปริมาณเม็ดคลอโลพลาสต์ในเซลล์คุมจะเพิมขึน ซึ งจากการทดลองพบว่าเทียนทุกชนิด จะมีความหนาของใบ ขนาดของเซลล์คุม และจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมจะเพิมขึนเมื อความเข้มข้นของโคลชิซินเพิมขึน อยู่ในช่วง 0.03-0.05 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนียังพบการเกิดดอกของเทียนดอยและเทียนอุ้มผางในสภาพปลอดเชือหลังจากแช่ยอดในสารละลายโคลชิซิน ซึ งพบว่าเมื อความเข้มข้นของโคลชิซินเพิมขึนจำนวนดอกและเปอร์เซ็นต์การเกิดดอกจะลดลง โดยที โคลชิซินความเข้มข้น 0.03 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้เกิดดอกและมีเปอร์เซ็นต์การเกิดดอกมากที สุด โดยเทียนดอยจะเกิดดอก 90 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2.7 ดอก สำหรับเทียนอุ้มผางเกิดดอก 30 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 ดอก และจากการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอของเทียนธาราและเทียนอุ้มผาง ด้วยเทคนิค flow cytometry พบว่าเทียนทัง 2 ชนิด มีปริมาณดีเอ็นเอเพิมขึนเป็น 2 เท่า ของต้นควบคุม โดยจะพบทังต้นที เป็นเททราพลอยด์ (4n) และมิกโซพลอยด์ (2n + 4n)

คำนำ

ปัจจุบัน ความต้องการของตลาดไม้ดอก-ไม้ประดับมีมากขึนทังในประเทศและต่างประเทศ บริษัทผลิตไม้ประดับขนาดใหญ่จึงพากันแข่งขันเสาะหาไม้ป่าที มีศักยภาพเพื อนำมาพัฒนาให้เป็นไม้ประดับประเภทต่างๆ โดยนำพันธุ์จากป่าเขตร้อนของทวีปอเมริกาใต้แอฟริกา และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ งเป็นบริเวณที มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงสำหรับในประเทศไทยหาก่ไมนับรวมกล้วยไม้แล้ว การนำเอาพืชป่ามาพัฒนาเป็นไม้ประดับยังถือว่ามีน้อยและไม่ชัดเจนเท่าที ควร

พืชป่าส่วนใหญ่มักถูกเก็บออกจากป่าและขายให้แก่ผู้ซื้อโดยตรง หลายชนิดตายในที่สุดเนื่องจากไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ได้หลายชนิดถูกส่งออกเป็นจำนวนมาก (ไม้หัวต่างๆ โดยเฉพาะขิงข่าและบุก) เพื่อนำไปขายหรือพัฒนาพันธุ์ในต่างประเทศ ขณะที่เกษตรกรไทยส่วนใหญ่ยังนิยมปรับปรุงพันธุ์พืชต่างถิ่น เช่น โป๊ยเซียน ลีลาวดี และชวนชม

ประเทศไทยมีพืชสกุลเทียน (Impatiens) อยู่กว่า 20 ชนิดพันธุ์ และสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ ได้ทำการสำรวจรวบรวมไว้แล้วกว่า 10 ชนิด พืชสกุลนี้มีดอกที่รูปทรงสีสันสวยงามเหมาะที่จะนำมาพัฒนาเป็นไม้ดอกกระถางหรือตกแต่งพื้นที่ เช่น ปรับปรุงให้มีทรงพุ่มเล็ก ดอกขนาดใหญ่กว่าเดิม หรือพันธุ์ลูกผสมที่มีรูปทรงหรือสีสันใหม่ๆ อันจะเป็นที่นิยมของตลาดทั้งในและต่างประเทศ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์พืชสกุลเทียนให้มีลักษณะตามความต้องการของตลาด เช่น ต้นเตี้ย ดอกดก เพื่อพัฒนาให้เป็นไม้ประดอกไม้ประดับ หรือใช้ในการตกแต่งภูมิทัศน์

วิธีการทดทอง

1. การฟอกฆ่าเชื้อ

นำเมล็ดเทียน 5 ชนิด ได้แก่ เทียนดอย เทียนธารา เทียนธารารักษ์ เทียนอุ้มผาง และเทียนกาญจนบุรี มาฟอกฆ่าเชื้อ ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaClO) 2% นาน 5 นาที แล้วล้างน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดมาเพาะบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ และ NAA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ (ระยะเวลาในการเพาะเมล็ดขึ้นอยู่กับเทียนในแต่ละชนิด)

2. การเพิ่มจำนวน

นำชิ้นส่วนข้อที่ได้จากต้นกล้า อายุประมาณ 2 เดือน ที่งอกจากการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลลาร์ นาน 6 สัปดาห์ เมื่อได้ยอดจำนวนมากแล้ว นำยอดใหม่ที่ได้ย้ายมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 4 สัปดาห์ เพื่อให้ยอดยืดยาวขึ้น

3. การปรับปรุงพันธุ์

โดยนำยอดยาวประมาณ 3 เซนติเมตร ของเทียนทั้ง 5 ชนิด ที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 0.03, 0.05 และ 0.09 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน นาน 6

สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำ 10 ซ้ำๆ ละ 1 ชิ้นส่วน ทำการวัดผลการทดลองโดยวัดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนข้อ และความหนาของใบ จำนวนราก ความยาวราก จำนวนดอก และเปอร์เซ็นต์การเกิดดอก

4. การตรวจสอบพอลีพลอยด์ของเทียน

4.1 วัดความหนาของใบ

นำใบที่เติบโตเต็มที่ของต้นควบคุมและต้นที่ได้รับสารโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อมาตัดตามขวางบริเวณกึ่งกลางใบให้เป็นชิ้นบางๆ นำมาวัดความหนาของใบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในตำแหน่งที่ห่างจากเส้นกลางใบ 0.4 มิลลิเมตร ตัวอย่างละ 10 ใบ ๆ ละ 2 ตำแหน่ง และบันทึกภาพ

4.2 วัดความยาวของเซลล์คุม

ลอกผิวใบด้าน lower epidermis ของเทียนแต่ละชนิดที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ นำมาวัดความยาวของเซลล์คุมจำนวน 10 ซ้ำ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.3 ตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนของต้นเทียนที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ เทียนธาราและเทียนอุ้มผาง ไปวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค flow cytometry โดยประมวลผลจากนิวเคลียสของเทียนธาราและเทียนอุ้มผาง 2600 นิวเคลียส

ผลการทดลอง

จากการทดลองโดยนำชิ้นส่วนยอดของเทียนดอย เทียนธารา เทียนธารารักษ์ เทียนอุ้มผางและเทียนกาญจนบุรี ยาว 3 เซนติเมตร มาแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 0.03, 0.05 และ 0.09 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน นาน 6 สัปดาห์ พบว่าเทียนทั้ง 5 ชนิด มีอัตราการรอดชีวิต100 เปอร์เซ็นต์ และมีความหนาของใบ ขนาดของเซลล์คุม และจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโคลชิซินเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 0.03-0.05 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ยังพบการเกิดดอกของเทียนดอยและเทียนอุ้มผางในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากแช่ยอดในสารละลายโคลชิซินและยังพบว่าดอกที่เกิดขึ้นจากยอดที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน ขนาดของดอกจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของโคลชิซินเพิ่มขึ้น และเมื่อความเข้มข้นของโคลชิซินเพิ่มขึ้นจำนวนดอกและเปอร์เซ็นต์การเกิดดอกจะลดลง โดยที่โคลชิซินความเข้มข้น 0.03 เปอร์เซ็นต์ มีผล

ทำให้เกิดดอกและมีเปอร์เซ็นต์การเกิดดอกมากที่สุด โดยเทียนดอยจะมีดอก 90 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2.7 ดอก สำหรับเทียนอุ้มผางเกิดดอก 30 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 ดอก (ตารางที่ 1)

จากการทดลองการแช่ยอดเทียนดอยในสารละลายโคลชิซิน แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นานประมาณ 7 สัปดาห์ ดอกที่บานจะเริ่มบานโดยที่ทุกความเข้มข้นของโคลชิซิน ระยะเวลาในการบานของดอกจะพร้อมๆ กัน แต่ลักษณะของดอกแตกต่างกัน คือ ยอดที่ไม่ได้แช่สารละลายโคลชิซินขนาดของดอกจะเล็กที่สุด และมีสีชมพูอ่อนกว่าดอกของยอดที่แช่สารละลายโคลชิซิน(ภาพที่ 1) ส่วนรูปทรงของดอก พบว่าดอกของยอดที่แช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.09 เปอร์เซ็นต์ จะมีรูปทรงผิดปกติ ไม่สมมาตรด้านข้าง สำหรับจำนวนกลีบ พบว่าดอกของยอดที่แช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น0, 0.03 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีกลีบจำนวน 5 กลีบ เป็นกลีบบน 1 กลีบ กลีบข้าง 2 กลีบ และกลีบล่างมีขนาดใหญ่ 2 กลีบ แต่ดอกของยอดที่แช่โคลชิซินที่ความเข้มข้น0.09 เปอร์เซ็นต์ มีกลีบ เพียง 4 กลีบ โดยจะมีกลีบข้างเพียงกลีบเดียว (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 จำนวนและเปอร์เซ็นต์การเกิดดอกของเทียนดอยและเทียนอุ้มผาง หลังจากแช่ยอดในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 0.03, 0.05 และ 0.09 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 ชั่วโมง แล้วเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 6 สัปดาห์ ทำ 10 ซ้ำ

ความเข้มข้นของโคชิซิน (เปอร์เซ็นต์)	เทียนดอย		เทียนอุ้มผาง	
	จำนวนดอก[1/]	การเกิดดอก (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนดอก[2/]	การเกิดดอก (เปอร์เซ็นต์)
0	3.7b	100	2.0b	80
0.03	2.7b	90	1.0ab	30
0.05	1.1a	70	0.2a	10
0.09	0.7a	40	0a	0

หมายเหตุ [1/] [2/]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี LSD

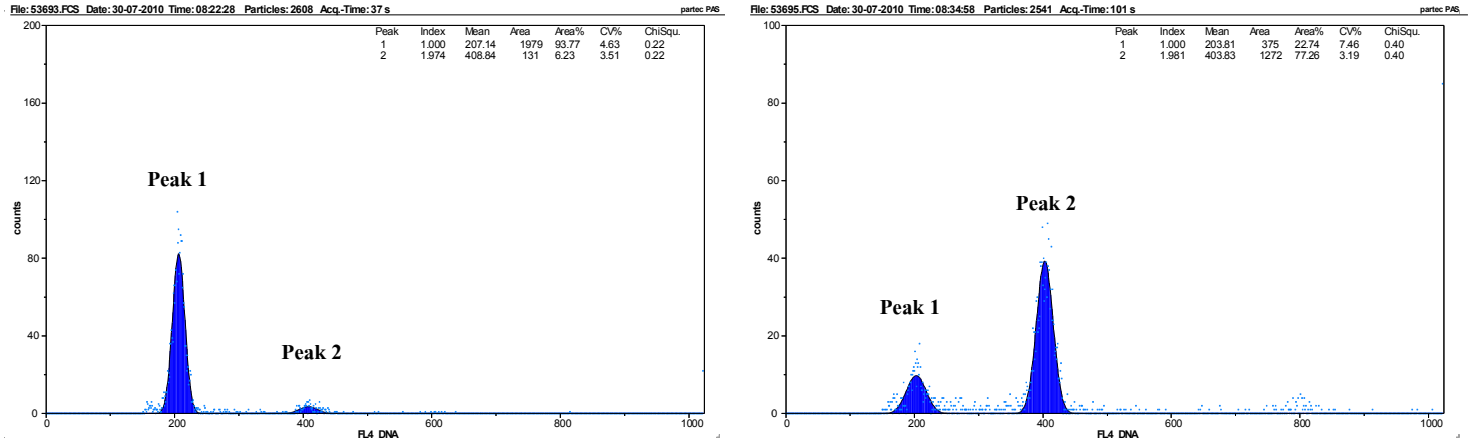
ภาพที่ 1 ลักษณะดอกของเทียนดอยในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากแช่ยอดในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 0.03, 0.05 และ 0.09 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 ชั่วโมง แล้วเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 7 สัปดาห์ (จากภาพ เรียงตามความเข้มข้น 0, 0.03, 0.05 และ 0.09 เปอร์เซ็นต์ จากซ้ายไปขวา)

ภาพที่ 2 ลักษณะรูปทรงและจำนวนกลีบดอกของเทียนดอย ดอกของยอดที่เลี้ยงในสารละลายโคลชิซิน 0.03 เปอร์เซ็นต์ (ซ้าย) โคลชิซิน 0.09 เปอร์เซ็นต์ (ขวา)

จากการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอของเทียนธาราและเทียนอุ้มผาง ด้วยเทคนิค flow cytometry พบว่าเทียนทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ของต้นควบคุม โดยจะพบทั้งต้นที่เป็นเททราพลอยด์ (4n) และมิกโซพลอยด์ (2n + 4n) (ภาพที่ 3 และภาพที่ 4) และยังพบว่าเมื่อความเข้มข้นของโคลชิซินเพิ่มขึ้นจะทำให้ความยาวของเซลล์คุมและจำนวนคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์คุมเพิ่มมากขึ้น แล้วลดลงเมื่อความเข้มข้นของโคลชิซินเพิ่มขึ้นถึง 0.09 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 5)

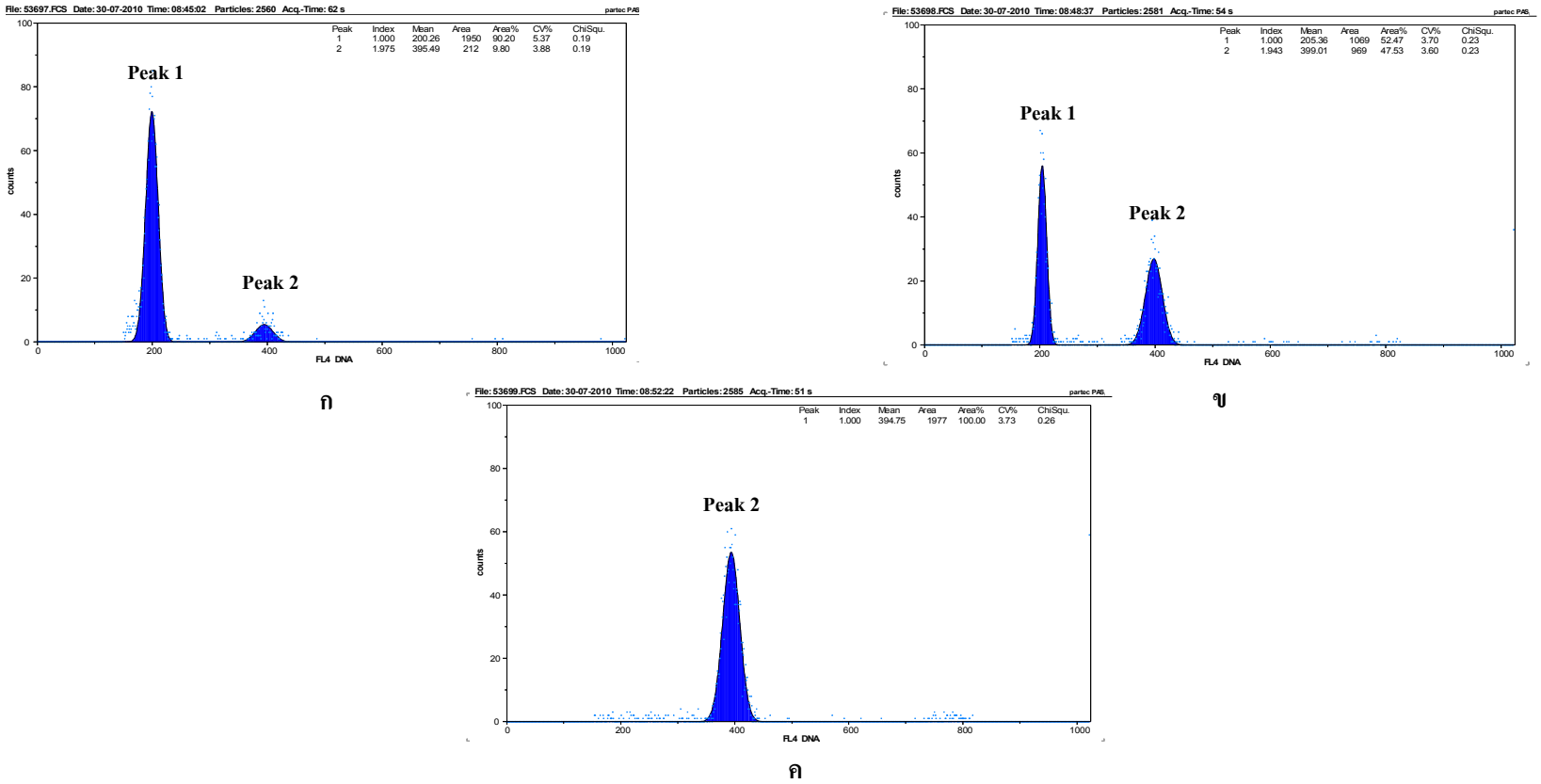
ผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ

หลังจากนำใบอ่อนของต้นเทียนที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ เทียนธาราและเทียนอุ้มผาง ไปวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค flow cytometry โดยประมวลผลจากนิวเคลียสของเทียนธาราและเทียนอุ้มผาง 2600 นิวเคลียส พบว่าเทียนทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ของต้นควบคุม โดย peak 1 เป็นต้นดิพลอยด์ (2n) ชุดควบคุม อยู่ที่ตำแหน่งช่องที่ 200 สำหรับ peak 2 เป็นต้นเททราพลอยด์ อยู่ที่ตำแหน่งช่องที่ 400 (ภาพที่ 1 และ 2)



ก ข

ภาพที่ 3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอนเอจากใบอ่อนของเทียนธาราด้วยเทคนิค flow cytometry ก. ต้นควบคุม (2n) ข. ต้นเททราพลอยด์ (4n) ที่เจริญจากชิ้นส่วนยอดที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง



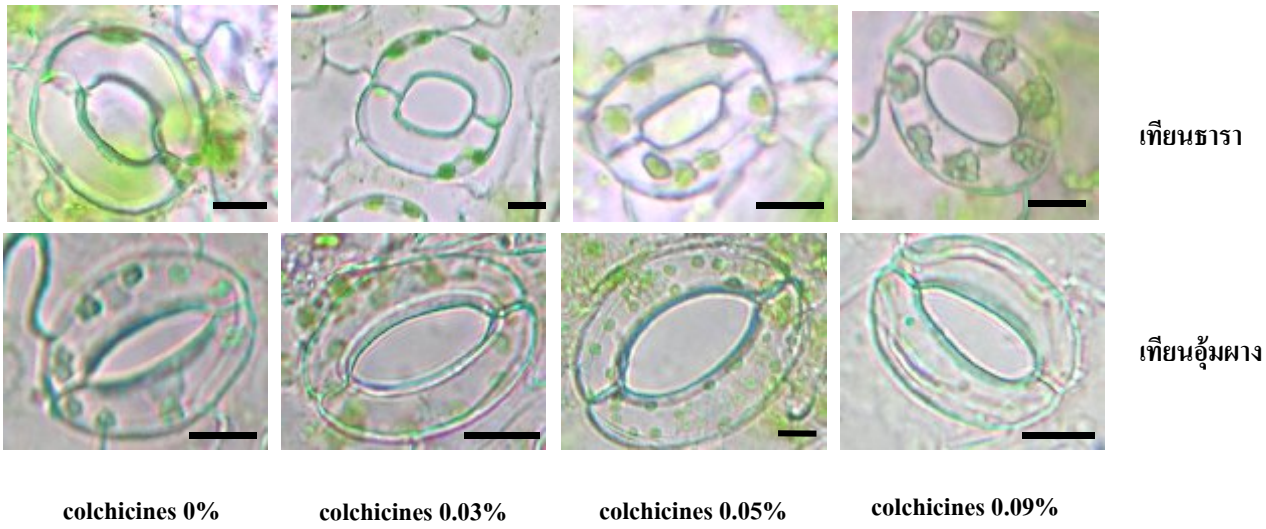
ภาพที่ 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอนเอจากใบอ่อนของเทียนอุ้มผางด้วยเทคนิค flow cytometry ก. ต้นควบคุม (2n) ข. ต้นมิกโซพลอยด์ (2n + 4n) และ ค. ต้นเททราพลอยด์ (4n) ที่เจริญจากชิ้นส่วนยอดที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.03 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 ความยาวเซลล์คุมของเทียนธาราและเทียนอุ้มผาง หลังจากแช่ในสารละลาย โคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 0.03, 0.05 และ 0.09 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 ชั่วโมง แล้วเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของโคชิซิน (เปอร์เซ็นต์)	ความยาวเซลล์คุม (ไมครอน)	
	เทียนธารา[1/]	เทียนอุ้มผาง[2/]
0	34.7a	39.20b
0.03	42.5b	34.50a
0.05	33.5a	68.80c
0.09	37.5a	31.30a
F-test	**	**
cv(%)	13.4	8.7

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

[1/], [2/] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี LSD



ภาพที่ 5 เซลล์คุมของต้นเทียนในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากแช่ยอดในสารละลายโคลชิซิน, bar: 10 µm

สรุป

การปรับปรุงพันธุ์พืชสกุลเทียนโดยการใช้สารโคลชิซินร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดเททราพลอยด์ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินเพิ่มมากขึ้น ทำให้ความยาวยอด จำนวนข้อและจำนวนใบมีแนวโน้มลดลง แต่ความยาวปากใบและจำนวนคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์ปากใบจะเพิ่มขึ้น การแช่ยอดเทียนธาราและเทียนอุ้มผางในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง สามารถชักนำให้ต้นเทียนทั้ง 2 ชนิด เกิดเป็นเททราพลอยด์ได้ ต้นที่เป็นเททราพลอยด์มีปริมาณดีเอ็นเอ 2 เท่า และมีจำนวนคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์ปากใบมากกว่าชุดควบคุม

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ได้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลเทียน สำหรับการปรับปรุงพันธุ์และการขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว

2. ได้วิธีการและปริมาณโคลชิซินที่เหมาะสมในการปรับปรุงพันธุ์เทียน เพื่อนำไปให้เกิดพอลิพลอยด์ สำหรับในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป