

การชักนำให้เกิดหม่อนเทตราพลอยด์โดยใช้โคลชิซิน ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Tetraploid Mulberry Induction by Colchicine Treatment through Tissue Culture

นิตยศรี แสงเดือน¹ และอำไพ สันพัฒนานนท์²

Nitsri Sangduen and Ampai Sinpatananon

ABSTRACT

Tetraploid induction of three mulberry (*Morus* sp.) varieties Noi, Khunpai and Yai Burirum was obtained from colchicine treatment by soaking aseptic mulberry nodes from tissue culture in 0.02 - 0.10 % colchicine added with 2% dimethyl sulfoxide (DMSO) solution for 2-5 days. Tetraploid plants were characterized by some indices e.g. thick and dark green leaves, increasing stomatal size and quantity of stomatal chloroplast, decreasing frequency of stomatal per unit area. The chromosome number of root tip cell was $2n = 4x = 56$. Tetraploid mulberry attained from this study could be used to cross with diploid plant for further triploid production.

Key words : mulberry (*Morus* sp.), colchicine, tetraploid induction, tissue culture

บทคัดย่อ

การชักนำให้เกิดเทตราพลอยด์ของหม่อนพันธุ์น้อย คุณไผ่ และใหญ่บุรีรัมย์ ที่ได้จากการแช่ข้อหม่อนที่ปลอดเชื้อซึ่งได้มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลงในสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.02-0.10% ที่เติม

DMSO 2% เป็นเวลา 2-5 วัน คัดเลือกต้นเทตราพลอยด์ได้โดยใช้ลักษณะที่เป็นดัชนีบ่งชี้ ได้แก่ ใบหนาและมีสีเขียวเข้ม ขนาดของเซลล์ปากใบและปริมาณคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบจะเพิ่มขึ้น แต่จำนวนเซลล์ปากใบต่อหน่วยพื้นที่น้อยกว่าหม่อนดิพลอยด์ จำนวนโครโมโซมของเซลล์รากหม่อนเทตราพลอยด์

1 ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

2 ศูนย์วิจัยหม่อนไหมนครราชสีมา

Nakhon Ratchasima Sericulture Research Center

เท่ากับ 56 โครโมโซม หม่อนเทพราพลอยด์ที่ได้จากการทดลองนี้ จะนำไปสร้างหม่อนทรูปลอยด์ได้โดยผสมกับหม่อนดิพลอยด์

คำนำ

หม่อนเป็นพืชในตระกูล Moraceae เป็นอาหารที่ดีที่สุดของไทย เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญทำให้การเลี้ยงไหมประสบความสำเร็จ โปรตีนจากใบหม่อนเป็นแหล่งอาหารให้หนอนไหมผลิตเส้นใยสร้างรังไหม เส้นไหมที่สาวได้ ใช้เป็นวัตถุดิบในการทอผ้าไหม

ไหมไทยถือได้ว่าเป็นเอกลักษณ์หนึ่งของประเทศไทย เป็นที่รู้จักและอยู่ในความนิยมของประชาชนทั้งในและต่างประเทศมาเป็นเวลาช้านาน ปัจจุบันได้กลายเป็นสินค้าออกที่สำคัญและมีการส่งออกเพิ่มสูงขึ้นทุกปี แต่ประเทศไทยยังต้องนำเข้าเส้นไหมจากต่างประเทศ การเพิ่มปริมาณการผลิตเส้นไหมจำเป็นต้องเพิ่มประสิทธิภาพการปลูกหม่อนเพื่อเลี้ยงไหม พื้นที่ปลูกหม่อนส่วนใหญ่อยู่ในเขตที่ต้องอาศัยน้ำฝนและมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ รวมทั้งยังประสบปัญหาในเรื่องศัตรูพืช การปรับปรุงพันธุ์หม่อนให้เหมาะสมกับสภาพของแหล่งที่ปลูก น่าจะเป็นแนวทางที่ช่วยแก้ปัญหาได้บ้าง

พันธุ์หม่อนที่ปลูกกันโดยทั่วไปเป็นดิพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซม $2n=2x=28$ พบหม่อนที่เป็นพอลิพลอยด์ได้บ้างในธรรมชาติ แต่ไม่นิยมนำมาเพาะปลูกเพื่อเลี้ยงไหม เนื่องจากมีการเจริญเติบโตช้าและคุณภาพใบไม่ดี มีนักวิจัยหลายท่านได้รายงานถึงการใช้โคลชิซินชักนำให้หม่อนเกิดเป็นเทพราพลอยด์ (Kedarnath and Lakshmikanthan, 1965; Tojyo, 1966; Das *et al.*, 1970; Dwivedi *et al.*, 1986) ซึ่งมีใบขนาดใหญ่ หนา ด้านทานต่อโรคหลายชนิด และมีความแข็งแรง เมื่อนำมาเลี้ยงไหมทำให้หนอนไหมมี

การเจริญเติบโตดีและแข็งแรง มีเปอร์เซ็นต์รังดีและจำนวนการวางไข่สูงขึ้น อย่างไรก็ตามต้นเทพราพลอยด์ไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะปลูกเชิงพาณิชย์ เนื่องจากมีการเจริญเติบโตช้า ถ้าผสมต้นเทพราพลอยด์ที่ชักนำได้กับต้นดิพลอยด์ ต้นทรูปลอยด์ที่ได้มีการเจริญเติบโต ผลผลิตและคุณภาพอาหารของใบสูงกว่าทั้งดิพลอยด์และเทพราพลอยด์ (Sarkar *et al.*, 1983; Tojyo *et al.*, 1986) พันธุ์หม่อนพื้นเมืองของไทย ไม่ค่อยพบต้นทรูปลอยด์ ดังนั้นในการปรับปรุงพันธุ์หม่อนพื้นเมืองโดยการสร้างต้นทรูปลอยด์ แนวทางที่ง่ายคือการชักนำให้หม่อนเกิดเป็นต้นเทพราพลอยด์นำไปผสมกับดิพลอยด์

การใช้โคลชิซินชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ทั้งต้นเกิดได้ยากในพวกไม้ยืนต้นหรือกึ่งยืนต้น แต่ประสบความสำเร็จได้โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วย (Gupton 1989; Satrabhandhu, 1991) การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะชักนำให้หม่อนเป็นเทพราพลอยด์โดยใช้สารโคลชิซินร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเป็นแนวทางสร้างสายพันธุ์ทรูปลอยด์และนำไปเลี้ยงไหมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพิ่มปริมาณยอดและต้น

หม่อนที่ใช้มี 3 พันธุ์ ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ใช้ปลูกกันทั่วไปเป็นดิพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซม $2n=2x=28$ คือ พันธุ์น้อย คุณไผ และใหญ่บุรีรัมย์

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม่อนทั้งสามพันธุ์ โดยแช่ชิ้นส่วนตาข้างฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาคลอริกซ์ 10% ที่เดิมทวิน 20 ปริมาณ 1-2 หยด เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ดัดแปลงที่เดิม BA (benzyladenine) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 3 % วุ้น 0.6 % ตัดข้อเพาะ

เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง ที่เติมวัน 0.8% เปลี่ยนอาหารใหม่ ทุก 4 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มปริมาณดิน และนำไปเพาะเลี้ยงต่อไป

ตัดต้นหม่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นท่อน ๆ ละ 1 ข้อ แต่ละข้อมีตา 1 ตา จำนวน 10 ท่อนในแต่ละการทดลองย่อย แช่วุ้นในขวดสารละลายโคลชิซินที่เข้มข้น 0, 0.02, 0.06 และ 0.1% (ผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองที่มีขนาด 0.45 ไมครอน) เติมน้ำ DMSO (dimethyl sulfoxide) 2% วางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที คลุมด้วยผ้าดำไม่ให้ได้รับแสงเป็นเวลา 2, 3, 4 และ 5 วัน ล้างท่อนหม่อนด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS สูตรดัดแปลง ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรืออาหารสังเคราะห์ MS ที่ปราศจากฮอร์โมน เพื่อชักนำให้เกิดราก หม่อนที่เพิ่มปริมาณยอดและต้นที่ได้ นำไปใช้ในการคัดเลือกต้นเทพราพลอยด์ต่อไป

การคัดเลือกต้นเทพราพลอยด์

นับจำนวนท่อนพันธุ์ที่ได้รับสารโคลชิซินแล้วมีชีวิตรอดได้ หลังจากที่ได้เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโต โดยวัดความสูงของยอด ศึกษาลักษณะที่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากลักษณะเดิม

ลักษณะที่ใช้ในการคัดแยกต้นเทพราพลอยด์

เลี้ยงต้นหม่อนที่เจริญเติบโตจากข้อหม่อนที่ผ่านการแช่สารละลายโคลชิซินในอาหารสังเคราะห์ที่เตรียมใหม่ ตัดแบ่งข้อ ขยายจำนวน คัดเลือกหม่อนที่คาดว่าจะเกิดเป็นเทพราพลอยด์ โดยดูจากลักษณะใบหนา สีเขียวเข้ม คัดเลือกลักษณะดังกล่าวจนมีความคงตัว นำมาตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ ซึ่งใช้บ่งชี้และยืนยันความเป็นเทพราพลอยด์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่

การวัดความหนาของใบ เลือกใบหม่อนที่มีใบหนา สีเขียวเข้ม จากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตัดตามขวางเพื่อวัดความหนาของใบ โดยใช้ไมโครมิเตอร์

การวัดขนาดและนับจำนวนเซลล์ปากใบ

เลือกเซลล์ปากใบจากบริเวณฐานใบที่อยู่ระหว่างเส้นใบที่หนึ่งและเส้นใบที่สอง โดยลอกผิวใบด้านล่างของใบที่แก่เต็มที่ วางบนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ วัดขนาดปากใบ โดยใช้ไมโครมิเตอร์ หาค่าเฉลี่ยจาก 20 เซลล์ ต่อสไลด์ นับจำนวนเซลล์ปากใบต่อพื้นที่ (0.16 mm^2) โดยนับจำนวนเซลล์ปากใบในแต่ละ field หาค่าเฉลี่ยจาก 5 field ในแต่ละสไลด์

การนับจำนวนโครโมโซม

แช่ท่อนพันธุ์หม่อนที่มีรากในขวดน้ำ วางบนเครื่องเขย่า 24 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้เซลล์รากเกิดการแบ่งตัวมากขึ้น ตัดปลายรากยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร แช่ปลายราก (pretreat) ใน 8 hydroxyquinoline ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ในตู้เย็น แล้วตรึงเซลล์ (fixation) ด้วยสารละลายที่มีเอทิลแอลกอฮอล์ 3 ส่วน กรดแอซิดิกเข้มข้น 1 ส่วน แชนนาล 24 ชั่วโมง ทำให้เซลล์อ่อนนุ่มด้วยกรดเกลือเข้มข้น 1 N เป็นเวลา 5 นาที ย้อมโครโมโซมด้วยสี acetocarmine 1% และตรึงนับโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลและวิจารณ์

การรอดชีวิตของหม่อนทั้งสามพันธุ์ คือ พันธุ์น้อย คุณไผ และใหญ่บุรีรัมย์ มีแนวโน้มลดลง เมื่อแช่ข้อหม่อนในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นสูง และระยะเวลานานขึ้น ใช้ความสูงเป็นดัชนีบ่งชี้ลักษณะการเจริญเติบโต สารละลายโคลชิซินที่ทุกความเข้มข้นมีผลทำให้ความสูงของต้นหม่อนลดลง โดยเฉพาะเมื่อเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาที่แช่ต้นหม่อนในสารละลายโคลชิซิน ทำให้ความสูงลดลงเห็นได้ชัดเจน ในหม่อนทั้งสามพันธุ์ (Figure 1) นอกจากนี้พบลักษณะผิดปกติของต้นและใบ เช่น ต้นเตี้ย การแตกของใบไม่เป็นระเบียบ ใบเป็นแฉก แผ่นใบแยกเป็นสอง (Figure 2) อาจเกิดจากโคลชิซินมี

ความเป็นพิษต่อพืช มีผลทำให้ไซโทพลาสซึม มีความหนืด (viscosity) เปลี่ยนแปลงไป ทำให้กระบวนการต่าง ๆ ภายในพืชทำงานผิดปกติและรุนแรงถึงตาย (Dermen, 1938) ผลที่ได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Tojyo (1966), Das *et al.* (1970) และ Dwidevi *et al.* (1986)

สารละลายโคลชิซินสามารถชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ได้ในหม่อนทั้งสามพันธุ์ นับจำนวนโครโมโซมพบว่ามีความเพิ่มอีกเท่าตัว (Figure 3) เป็นเทตราพลอยด์ ($2n = 4x = 56$) เป็นผลของโคลชิซินไปยับยั้งการสร้างและการทำงานของสปีนเดิลไฟเบอร์ ทำให้โครโมโซมไม่ถูกดึงไปที่แต่ละขั้วของเซลล์ (Dermen, 1938) เทคนิคการนับจำนวนโครโมโซมจะต้องมีการศึกษาและพัฒนาต่อไป เนื่องจากพบเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวอยู่เป็นจำนวนน้อย ต้นหม่อนทั้งสามพันธุ์ที่เป็นเทตราพลอยด์ ใบมีสีเขียวเข้ม ความหนาของใบเพิ่มขึ้น 45.70 - 51.30% เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์หม่อนที่เป็นดิพลอยด์ หม่อน

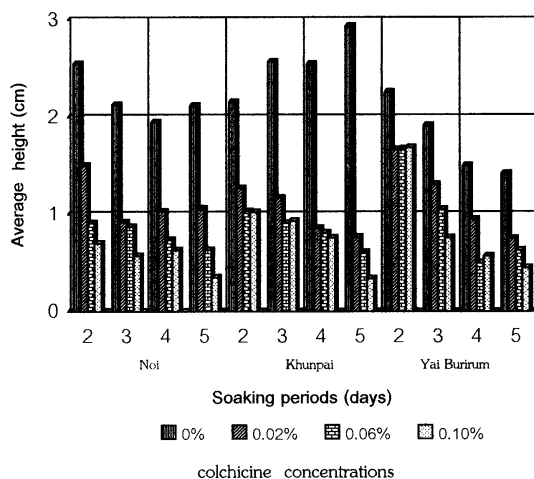


Figure 1 Average height of 3 mulberry varieties (Noi, Khunpai and Yai Burirum) after treated with various percent colchicine concentrations.

ทั้งสามพันธุ์ที่เป็นเทตราพลอยด์ มีขนาดเซลล์ปากใบ จำนวนเซลล์ปากใบและความหนาของใบ แตกต่างจากหม่อนดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 4) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของนักวิจัยหลายท่าน (Kedarnath and Lakshmikanthan, 1965; Das *et al.*, 1970; Dwidevi *et al.*, 1986) จากการศึกษาคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบของหม่อนเทตราพลอยด์พบว่ามีจำนวนมากกว่าหม่อนที่เป็นดิพลอยด์ สอดคล้องกับรายงานของ Dwidevi *et al.* (1986) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาปริมาณคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบของพืชเทตราพลอยด์ ที่ได้จากการใช้สารโคลชิซินในพืชหลายชนิดรวมทั้งหม่อนด้วย (Krishnaswami and Andal, 1978; Mehtre, 1982) ดังนั้น จึงใช้ปริมาณคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบ



Figure 2 Phenotypic aberration in leaf morphology (1-4 rows) resulting from colchicine treated nodes, as compared to typical appearance of normal leaves (bottom row).

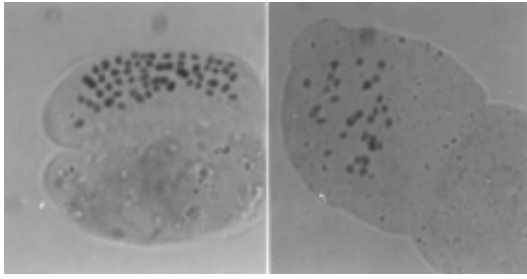
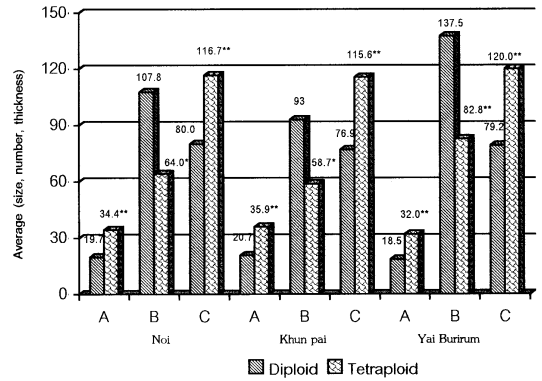


Figure 3 Light micrographs of acetocarmine-stained chromosome in mulberry root tip cells, tetraploid, $2n=4x=56$ (left) and diploid, $2n=2x=28$ (right). x 6,000.

และขนาดของเซลล์ปากใบ (Figure 5) เป็นดัชนีหนึ่งซึ่งใช้บ่งชี้ต้นหม่อนที่เป็นเทตราพลอยด์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์หม่อนโดยชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ได้

จากลักษณะที่ใช้เป็นดัชนีบ่งชี้หม่อนที่เป็นเทตราพลอยด์ พบว่าหม่อนทั้งสามพันธุ์ สามารถชักนำให้เป็นเทตราพลอยด์ได้ทั้งหมดความเข้มข้น (0.02-0.10%) และช่วงเวลาที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (2-5 วัน) หม่อนพันธุ์น้อยเกิดเทตราพลอยด์ได้มากถึง 40% พันธุ์คุณไผ่และใหญ่บุรีรัมย์ เกิดเทตราพลอยด์ได้ 30% (Figure 6)

พืชส่วนมากที่ได้รับสาร โคลชิซินจะเกิดพอลิพลอยด์เฉพาะเซลล์บางกลุ่มเท่านั้น เป็นผลให้ลักษณะที่แสดงออกมีความไม่สม่ำเสมอในต้นเดียวกัน การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะทำให้ได้พืชที่เป็นเทตราพลอยด์ทั้งต้น (Figure 7, 8) รวดเร็วและแน่นอนขึ้น (วิมล, 2527 ; Satrabhandhu, 1991) โดยทั่วไปกิ่งหม่อนที่ปักชำมีตาอยู่เป็นจำนวนหลายตาเจริญเติบโตจนสามารถตัดไปปลูกขยายได้แต่ต้องใช้เวลามากหลายเดือน การคัดเลือกจะคัดแยกลักษณะที่เป็นเทตราพลอยด์ไว้จนกว่าจะได้ต้นเทตราพลอยด์ทั้งต้น อาจต้องใช้เวลานาน ถ้าใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการคัดเลือกตาหม่อนที่ได้รับสารโคลชิ



A = Stomata size (μm) B = stomata number (per $0.16 mm^2$) C = leaf thickness

Note : Numbers followed by * and ** were significantly different at 5% level and 1% level of probability, respectively.

Figure 4 Comparison of tetraploid with diploid plants among 3 mulberry varieties (Noi, khumpai and Yai Burirum) in terms of an average stomatal size (A), stomatal number (B) and leaf thickness (C).

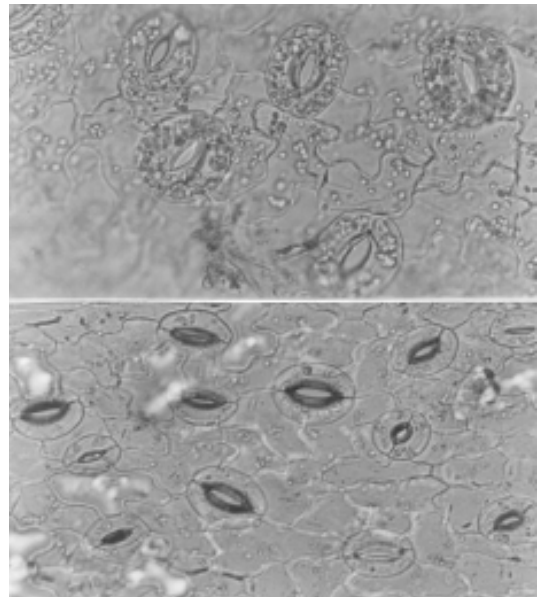


Figure 5 Stomatal size and quantity of chloroplast from mulberry, tetraploid (top) and diploid (bottom). x 1,380.

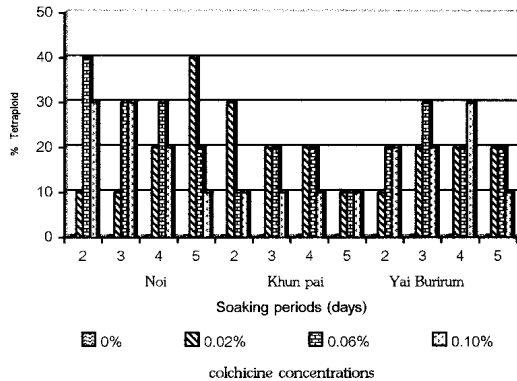


Figure 6 Tetraploid percentage of 3 mulberry varieties (Noi, Khunpai and Yai Burirum) after treated with various percent colchicine concentrations (0.02 – 0.1%) and soaking periods. (2 – 5 days).



Figure 8 Acclimatized mulberry plants, tetraploid (left) and diploid (right), six months after transplanting to soil.

จีน เมื่อตาหมอนมีการเจริญเติบโตจะถูกตัดแบ่งเป็นข้อ ๆ เลี้ยงในอาหารใหม่ทุกเดือน จะคัดเลือกต้นเทตราพลอยด์ได้เร็วกว่าวิธีปกติ อีกทั้งชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ใช้มีขนาดเล็กจึงมีโอกาสดึงสารโคลชิซินถูกซึมซับเข้าไปในเนื้อเยื่ออย่างทั่วถึง มีผลทำให้เกิดต้น



Figure 7 Plantlet formation of mulberry, tetraploid (left) and diploid (right), after one month culture.

เทตราพลอยด์ได้ง่ายที่ทุกความเข้มข้นและทุกช่วงเวลาที่ใช้ในสารโคลชิซิน ซึ่งสอดคล้องกับ Gupton (1989) ที่ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วยให้พืชขึ้นต้น *Rubus* sp. เกิดเทตราพลอยด์ และไม่เป็น chimera ที่ทุกความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ทดสอบ

การชักนำให้เกิดหมอนเทตราพลอยด์ก็เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์หมอน สำหรับใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการสร้างหมอนทรูปลอยด์เนื่องจากหมอนทรูปลอยด์ให้ผลผลิตสูง คุณภาพใบดี มีคุณค่าอาหารสูง ให้ผลดีต่อการเลี้ยงไหมดังที่ได้กล่าวไว้แล้ว หมอนเทตราพลอยด์ที่ได้จากการทดลองนี้จะนำไปใช้ในการผสมกับหมอนดิพลอยด์สร้างหมอนทรูปลอยด์เพื่อศึกษาและวิจัยต่อไป

สรุป

การชักนำให้เกิดเทตราพลอยด์ของหมอนพันธุ์น้อย คุณไผ่และใหญ่บุรีรัมย์ โดยใช้สารโคลชิซินร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าการรอดชีวิตและความสูงของต้นหมอน มีแนวโน้มลดลงเมื่อใช้สารโคลชิซินที่ความเข้มข้นสูงและช่วงเวลาที่ใช้

แซนทาน ทำให้ใบมีลักษณะผิดปกติและจำนวนโครโมโซมเพิ่มอีกเท่าตัวแช่ตาหมอนในสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.02 - 0.10% ที่เติม DMSO 2% เป็นเวลานาน 2-5 วัน สามารถชักนำให้หมอนทั้งสามพันธุ์เกิดเทตราพลอยด์ได้ 10-40% ต้นเทตราพลอยด์ที่ได้มีใบหนาและมีสีเขียวเข้ม ขนาดของเซลล์ปากใบและปริมาณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ปากใบ เพิ่มมากกว่าต้นดิพลอยด์ จำนวนโครโมโซมเพิ่มเป็นสองเท่าคือ $2n = 4x = 56$ แต่จำนวนเซลล์ปากใบต่อพื้นที่ลดลงหมอนเทตราพลอยด์ที่ได้จะนำไปผสมกับหมอนดิพลอยด์ เพื่อสร้างหมอนทริพลอยด์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- วิมล ขวัญเกื้อ. 2527. การใช้สารโคลชิซินกับพืช. วิทยาศาสตร์ 38 : 204 - 215.
- Das, B.C., D.N. Prasad, and A.K. Sikdar. 1970. Colchicine induced tetraploids of mulberry. Cytologia 23 : 283-293.
- Dermen, H. 1938. A cytological analysis of polyploidy induced by colchicine and by extremes of temperature. J. Hered. 29 : 211-229.
- Dwivedi, N.K., A.K. Sikdar, S.B. Dandin, C.R. Sastry, and M.S. Jolly. 1986. Induced tetraploidy in mulberry I. Morphological anatomical and cytological investigations in cultivar RFS-135. Cytologia (Tokyo). 51 : 313-402.
- Gupton, C.L. 1989. Production of non-chimeral colchipooids in *Rubus* species by tissue culture. Euphytica 44 : 133-135.
- Kedarnath, S. and D. Lakshmikanthan. 1965. Induction of polyploidy in mulberry *Morus alba* L. Indian For. 91 : 682-683.
- Krishnaswami, R. and R. Andal. 1978. Stomatal chloroplast number in diploids and polyploids of *Gossypium*. Proc. Indian Acad. Sci. (B) 87 : 109-112.
- Mehtre, S.S. 1982. Observations on stomata and chloroplasts in polyploids and tetraploids of cotton (*Gossypium* sp.). Sci. Cult. 48 : 75-77.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15 : 473-479.
- Sarkar, A.B., B.C. Das, and S.K. Mandal. 1983. Growth, yield and feeding value of initial diploid, triploid and tetraploid mulberry, p.6. In National Seminar on Silk Research and Development, March 10-13, 1983. Bangalore.
- Satrabhandhu, A. 1991. *In vitro* induction of polyploid in white mulberry (*Morus alba* Var S. 54) by colchicine treatment. M.S. thesis, Mahidol University Bangkok.
- Tojyo, I. 1966. Studies on polyploid mulberry tree. (I) Breeding of autotetraploids. Bull. Seric. Exp. Sta. Jap. 20 : 187-207.
- Tojyo, I., Y. Watanabe, and S. Hayasaka. 1986. Breeding of new triploid mulberry cultivars Shinkenmochi and Aobanezumi. Bull. Seric. Exp. Sta. Jap. 30 : 151-250.

วันรับเรื่อง : 19 มี.ค. 41

วันรับตีพิมพ์ : 13 ก.ค. 41