

การชักนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในมะนาวฝรั่ง (*Citrus limon* (L.) Burm. f.)
โดยใช้สารโคลชิซิน

Induction of Polyploids in Lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.)
by Colchicine Treatment

นคร สารวัตร^{1/}

Nakon Saravat^{1/}

จรัสศรี นวลศรี^{1/}

Charassri Nualsri^{1/}

ABSTRACT

Studies on the effects of colchicine on seed germination, seedling development and chromosome doubling in lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) to attempt variety improvement by chromosome doubling. The experiment was carried out at the greenhouse of the Plant Science Department, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai campus from June 2005 to January 2007. Colchicine application was divided into 2 separated experiments. The first one was seed application: lemon seeds without their seed coats were soaked in colchicine solution with different concentrations at 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0% for 36 hours and the treated seeds were then germinated. The results showed that germination percentage, seedling height, length and width of leaves and number of leaves per plant of the control treatment were very high, compared to all colchicine-treated plants. The LD₅₀ of colchicine concentration for seed application from this study was 1.88%. However, all colchicine-treated concentrations failed to induce chromosome doubling in lemon seedlings. The another experiment was shoot tip application. The active growing shoot tips of 8-month-old seedlings were coated with cotton wool soaked with different concentrations of colchicines solution at 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0% for 24 hours. Twenty –five shoot tips were used for each concentration and data were recorded as previously described in the first experiment. It was found that growing shoot tips as percentage and their length, leaf width/

^{1/} ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

^{1/} Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai district, Songkhla province 90112

length and number of leaves were all highest in the control treatment. The LD₅₀ of colchicine concentration for shoot tip was 0.94%. For the chromosome count, only 1 individual plant from each of the 1.0 and 2.0% colchicine-treated concentrations showed chromosome changing, however, both were mixoploid. The ploidy levels of the 1.0% colchicine- treated plant were diploid (2n=2x=18), triploid (2n=3x=27) and tetraploid (2n=4x=36), while only diploid and tetraploid cells were observed in the 2.0% colchicines- treated plant.

Key words: colchicine, polyploid, LD₅₀, lemon

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของสารโคลชิซินต่อความงอกของเมล็ด การพัฒนาการของต้นกล้า และการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พร เพื่อปรับปรุงพันธุ์จากการเพิ่มชุดโครโมโซม โดยดำเนินการทดลองที่เรือนกระจก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ในช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2548 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2550 โดยแบ่งเป็น 2 การทดลองคือ การทดลองแรก โดยที่นำเมล็ดที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดมาแช่ในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0% เป็นระยะเวลา 36 ชม. พบว่า

เปอร์เซ็นต์ความงอก ความสูงของต้นกล้า ขนาดใบ และจำนวนใบจากต้นที่ได้รับสารโคลชิซินทุกความเข้มข้นมีค่าน้อยกว่าต้นในชุดควบคุม ค่า LD₅₀ ของสารโคลชิซินในการแช่เมล็ดนาน 36 ชม. มีค่า 1.88% อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก ไม่พบการเพิ่มจำนวนโครโมโซม ส่วนการทดลองที่สองใช้สารละลายโคลชิซินกับปลายยอด โดยทำการหุ้มปลายยอดต้นกล้าอายุ 8 เดือน ด้วยสำลีจุ่มสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่างๆ กันที่ 0 0.5 1.0 และ 2.0% เป็นเวลา 24 ชม. ซึ่งแต่ละความเข้มข้นใช้จำนวน 25 ปลายยอด พบว่าเปอร์เซ็นต์การผลิยอดใหม่ ความยาวยอด ความกว้างและความยาวของใบ และจำนวนใบของปลายยอดที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินมีค่ามากที่สุด ส่วนค่า LD₅₀ ของสารโคลชิซินมีค่า 0.94% เมื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่าการให้สารโคลชิซินที่ปลายยอดที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0% อย่างละหนึ่งต้น ประสบความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนโครโมโซม แต่เป็นแบบมิซอพลอยด์ คือ ที่ความเข้มข้น 1% พบจำนวนโครโมโซม 2 ชุด (2n=2x=18), 3 ชุด (2n=3x=27) และ 4 ชุด (2n=4x=36) ในขณะที่ยังอีก 1 ต้น พบจำนวนโครโมโซม 2 และ 3 ชุด

คำหลัก: โคลชิซิน โพลีพลอยด์ มะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พร

คำนำ

มะนาวฝรั่งหรือเลมอน [*Citrus limon* (L.)

Burm. f.] เป็นไม้ผลยืนต้นขนาดเล็กวงศ์ส้มที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของโลก เพราะมีการนำกรดมะนาวหรือน้ำมะนาวมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ทั้งบริโภคโดยตรง และเป็นวัตถุดิบในวงการอุตสาหกรรม ซึ่งกรดมะนาวเป็นกรดอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ง่าย มีรสเปรี้ยว กลิ่นหอม มีความเป็นพิษต่ำ และย่อยสลายง่าย เป็นสารที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม ยาและเครื่องสำอาง เป็นต้น

มะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พร เป็นพันธุ์ที่เกษตรกรจากจังหวัดนครศรีธรรมราช นำเข้ามาจากประเทศออสเตรเลีย เพื่อทดลองปลูกในประเทศไทย และพบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ค่อนข้างดี ลักษณะเด่นของพันธุ์นี้คือ มีผลขนาดใหญ่ น้ำหนักประมาณ 500 ก./ผล ปริมาณน้ำมะนาวมากและรสชาติดี แต่ปัญหาสำคัญของมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรคือ มีเมล็ดจำนวนมาก ประมาณ 80 - 100 เมล็ด/ผล ซึ่งเป็นอุปสรรคในการที่จะนำไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นการพัฒนามะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรให้มีเมล็ดน้อยลงหรือไม่มีเมล็ดเลยจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในพืชวงศ์ส้ม วิธีการสร้างผลไม่มีเมล็ดสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การผสมข้ามระหว่างพันธุ์หรือระหว่างชนิด การสร้างพืชที่มีโครโมโซม 3 ชุดที่เรียกว่าทริพลอยด์ (triploid) จากการเพาะเลี้ยงเอ็มโบสเปิร์มของเมล็ด หรือการชักนำให้เกิดเตตระพลอยด์ (tetraploid) ตามด้วยการผสมข้ามระหว่างต้นเตตระพลอยด์และต้นดิพลอยด์ (diploid) เพื่อสร้างต้นทริพลอยด์ สำหรับการ

สร้างพืชเตตระพลอยด์นั้น วิธีการที่นิยม คือการใช้สารโคลชิซิน โดยที่สารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการยับยั้ง การสร้างเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) ในระหว่างกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (Cassells and Gahan, 2006) อย่างไรก็ตามมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการใช้สารโคลชิซินเพื่อเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม เช่น 1) ขึ้นส่วนพืช การใช้สารโคลชิซินกับพืชทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีอาจมีความเหมาะสมกับแต่ละชนิดหรือแต่ละส่วนของพืช เนื่องจากโคลชิซินมีผลต่อการแยกตัวของโครโมโซมในขณะมีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นขึ้นส่วนพืชที่ให้ผลดีอาจได้แก่ เมล็ดที่กำลังงอก ยอดและตาข้าง เป็นต้น (วรวิทย์, 2542) 2) วิธีการที่ใช้เช่น การแช่เมล็ดในสารละลายโคลชิซิน การจุ่มยอดของต้นพืชลงในสารละลายโคลชิซินโดยตรง การหยดสารละลายโคลชิซินลงบนยอดอ่อนหลายๆ ครั้ง หรือใช้สำลีชุบสารละลายโคลชิซินวางบนยอดอ่อน การผสมสารโคลชิซินกับวุ้นหรือลาโนลิน (lanolin) แล้วนำไปวางไว้บนยอดอ่อน และฉีดสารละลายโคลชิซินเข้าไปในต้นพืชด้วยเข็มฉีดยา เป็นต้น และ 3) ความเข้มข้นของสารโคลชิซินและระยะเวลา โดยปกติในการชักนำการกลายพันธุ์ไม่ว่าจะเป็น การฉายรังสี หรือการใช้สารเคมีจะต้องมีการศึกษาค่า LD_{50} ซึ่งหมายถึงอัตราการรอดชีวิตของพืช 50% จากการใช้สารเคมี โดยความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและขึ้นส่วนพืชที่ใช้ ประชาชาติและสำเร็จ (2540) หยดสารละลายโคลชิซินบริเวณตาของต้นหม่อนวันละ 2 ครั้ง เข้าเย็นโดย

ใช้ความเข้มข้น 0.4% ที่ระยะเวลาๆ ต่างกันคือ 0 1 2 3 4 5 และ 6 วัน พบว่าสามารถชักนำต้นเตตระพลอยด์จำนวน 2 ต้น จากการหยดสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.4 % นาน 3 วัน และอีก 1 ต้น จากการหยดสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.4 % นาน 4 วัน สมพรและวิบูล (2547) ใช้สารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0 0.01 0.05 0.1 และ 1.0% เป็นเวลา 24 และ 48 ชม. กับแคลลัสและข้อของต้นหน้าวัว พบว่าอัตราการรอดชีวิตมีแนวโน้มลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารโคลชิซินเพิ่มขึ้น และสารโคลชิซินไม่มีผลต่อการเกิดลักษณะผิดปกติในต้นหน้าวัว จักรกฤษณ์และคณะ (2545) ทดลองแช่เมล็ดพืชชนิดต่างๆในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่าพืชแต่ละชนิดตอบสนองต่อการชักนำการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมแตกต่างกันดังนี้ข้าวโพดใช้ความเข้มข้น 0.25% นาน 12 ชม. เมล็ดผักกาดขาวใช้ความเข้มข้น 0.25% นาน 6 ชม. เมล็ดผักคะน้าใช้ความเข้มข้น 0.5% นาน 24 ชม. การชักนำการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมในหอมแดง จะให้ผลดี เมื่อใช้วิธีฉีดบริเวณหัวหอมโดยใช้ความเข้มข้นของโคลชิซิน 0.5% โดยฉีดเป็นจำนวน 1-3 ครั้งเป็นต้น อาริยา(2540) ทำการทดสอบกับปลายยอดของมะนาว 3 พันธุ์ คือ Paan, Khai และ Eman ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0 0.1 และ 0.2 % พบว่าสารโคลชิซินเข้มข้น 0.1% สามารถชักนำให้เกิดเตตระพลอยด์ ได้ 3.45-28.13% จากการแช่สารนาน 2-16 ชม. ส่วนที่

ความเข้มข้น 0.2% แช่นาน 2-8 ชม. ชักนำการเกิดเตตระพลอยด์ 7.84-26.09% ส่วนค่า LD₅₀ จากการใช้สารโคลชิซินมีความแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย เพื่อศึกษาวิธีการ ความเข้มข้นและชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม ในการใช้สารโคลชิซินเพื่อชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซม สำหรับการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์มะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พร

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1

การแช่เมล็ดในสารละลายโคลชิซิน

นำผลมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรที่สุกแก่เต็มที่ ผ่าผลออกและแยกเมล็ดออกจากผล ล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งเมล็ดให้แห้งพอสมควร แล้วลอกเปลือกหุ้มเมล็ดออก หลังจากนั้นแบ่งเมล็ดออกเป็น 5 ชุดๆ ละ 50 เมล็ด แต่ละชุดนำมาแช่สารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 % และแช่น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม ระยะเวลาในการแช่ 36 ชม. โดยการวางแผนการทดลองแบบ CRD แบบ unequal replication เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด จึงทำการเพาะเมล็ดทั้งหมดในกระบะทรายผสมถ่านกลบอัตราส่วน 1 : 2 และทำการบันทึกลักษณะต่างๆ คือ

1.1 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดในแต่ละชุด

1.2 ดัชนีความเร็วในการงอกตามวิธีการของวัลลภ (2540) ดังนี้

$$\text{ดัชนีความเร็วในการงอก} = \frac{\text{จำนวนต้นกล้าปกติ}}{\text{วันที่ตรวจนับครั้งแรก}} + \dots + \frac{\text{จำนวนต้นกล้าปกติ}}{\text{วันที่ตรวจนับครั้งสุดท้าย}}$$

1.3 การเจริญเติบโตโดยวัดความสูง
ขนาดใบโดยวัดความกว้างและความยาวของใบ

1.5 การนับจำนวนโครโมโซมจากปลาย

ราก

1.4 จำนวนต่อมน้ำมันบนใบ ความ
หนาแน่นของปากใบ ขนาดปากใบ และปริมาณ
คลอโรฟิลล์เอและบี โดยสุ่มจากต้นที่รอดชีวิต
จำนวน 3 ใบ

1.6 หาค่า LD_{50} ของสารโคลชิซิน โดย
วิธี Regression (Capella *et al.*, 1967 อ้างโดย
ธีระ, 2525) โดยมีสูตรคำนวณดังนี้

$$y = \bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$$

$$y = \text{เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด}$$

$$x_{50} = \text{อัตราความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ } LD_{50}$$

$$n = \text{จำนวนกรรมวิธี}$$

$$\bar{y} = \sum \frac{y}{n}$$

$$b = \sum xy / \sum x^2$$

$$\sum xy = \sum xy - (\sum x)(\sum y) / n$$

$$\sum x^2 = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

$$\bar{x} = \sum x / n$$

$$\bar{y} = \sum y / n$$

การทดลองที่ 2

การหุ้มปลายยอดต้นกล้าด้วยสารโคลชิซิน

นำต้นกล้ามะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรอายุ
ประมาณ 8 เดือน ตัดยอดเพื่อให้แตกตาข้าง เมื่อ
ยอดของตาข้างอายุได้ 2 เดือน หุ้มปลายยอด
ด้วยสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.5 1.0
1.5 2.0% และใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม แต่ละ
ความเข้มข้นใช้ต้นกล้าจำนวน 25 ต้น เมื่อใช้
สารโคลชิซินแล้วนำไปวางบนปลายยอดอ่อนแล้ว
ทำการครอบด้วยกระดาษอะลูมิเนียมฟอยด์เป็น

เวลา 24 ชม. เอาสำลีออกปล่อยให้ต้นกล้าเจริญ
เติบโต บันทึกลักษณะต่างๆ คือจำนวนยอดที่
สามารถเจริญเติบโตได้ ความยาวยอด และ
ลักษณะอื่นๆ เช่นเกี่ยวกับการตรวจสอบกับต้น
กล้าที่กล่าวมาแล้วข้างต้น หลังจากปลายยอดยื
ยาวประมาณ 5-7.5 ซม. หรืออายุประมาณ 2 เดือน
หลังให้สารโคลชิซิน จึงทำการตัดปลายยอด
บริเวณเหนือรอยจุดที่วางสำลีเพื่อนำไปปักชำ เมื่อ
กิ่งชำเริ่มสร้างรากตัดปลายรากมาตรวจนับจำนวน
โครโมโซม และบันทึกลักษณะต่างๆ เช่นเดียวกับ

การทดลองที่ 1

เปรียบเทียบต้นที่สามารถเพิ่มชุดโครโมโซมกับต้นชุดควบคุม ในลักษณะต่างๆ เช่น ขนาดและความหนาแน่นของปากใบ จำนวนต่อมน้ำมันบนใบ ปริมาณคลอโรฟิลล์ ความกว้างและความยาวของใบ โดยเปรียบเทียบเป็นรายต้น สุ่มวัดจาก 3 ใบในแต่ละต้น และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ยกเว้นลักษณะต่อไปนี้ที่ไม่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติได้เนื่องจากไม่มีจำนวนซ้ำ คือ จำนวนใบและความยาวยอด

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองที่ 1

การแช่เมล็ดในสารละลายโคลชิซิน

ในการแกะเปลือกหุ้มเมล็ดมะนาวออกแล้วตามด้วยการแช่ด้วยสารโคลชิซินความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0% เป็นระยะเวลา 36 ชม. และนำเมล็ดไปเพาะ พบว่าเมล็ดจะเริ่มงอกและทยอยงอกไปเรื่อยๆ จนถึงระหว่าง 15- 50 วันหลังการเพาะ ดัชนีความเร็วในการงอกของเมล็ด

ชุดควบคุมมีค่าดัชนีความเร็วในการงอกสูงที่สุดและให้ผลทำนองเดียวกับเปอร์เซ็นต์ความงอกโดยชุดควบคุมมีความงอก 92% รองลงมาคือ เมล็ดที่แช่สารโคลชิซินความเข้มข้น 1.0 1.5 0.5 และ 2.0% มีความงอก 68 56 46 และ 44% ตามลำดับ (Table 1)

การเจริญเติบโตของต้นกล้า ซึ่งประเมินโดยการวัดความสูงของต้น ขนาดใบ และจำนวนใบหลังเพาะ 150 วัน พบว่าความสูงของต้น ความกว้างความยาวของใบ และจำนวนใบของต้นกล้าที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน มีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าต้นกล้าที่ได้รับสารโคลชิซินทุกความเข้มข้น ลักษณะผิดปกติของต้นกล้าที่พบจากการได้รับสารโคลชิซิน คือ ลักษณะลำต้นอวบอ้วน ลำต้นโค้งงอ ใบเล็ก ต้นเตี้ย ใบรูปร่างผิดปกติไปจากเดิม มีการเจริญเติบโตช้า เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีจากใบของต้นกล้า ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ความหนาแน่นของปากใบ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกความเข้มข้น แต่ขนาดของปากใบมีความแตกต่างทางสถิติ

Table 1. Speed and percentage of germination of lemon seeds (without seed coat) soaked in different colchicine concentrations at 50 days after germination.

Concentration of colchicine (%)	Speed of germination	Germination (%)
0	5.36	92
0.5	2.18	46
1.0	4.10	68
1.5	4.26	56
2.0	2.62	44

อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยพบว่าต้นที่ได้รับสารความเข้มข้น 2.0% มีขนาดปากใบใหญ่ที่สุดคือ 97.6 ไมโครเมตร และต้นชุดควบคุมมีขนาดของปากใบเล็กที่สุด 70.4 ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังพบว่า จำนวนต่อมน้ำมันบนใบของมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพิพรรมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซินมีจำนวนต่อมน้ำมันมากที่สุด 27.0 ต่อม/ 9 ตร.มม. ส่วนต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 1.0% มีจำนวนต่อมน้ำมันต่ำสุดที่ 23.39 ต่อม/ 9 ตร.มม. (Table 2) อย่างไรก็ตาม ต้นกล้าทุกต้นในทุกระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินไม่มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม ($2n=2x=18$) สำหรับระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ทำให้มะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพิพรรอดตาย 50 % หรือ

ค่า LD_{50} คือ ระดับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่ 1.88% เป็นเวลา 36 ชม.

การแช่เมล็ดด้วยสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่างๆ กันไม่สามารถชักนำการเพิ่มชุดของโครโมโซมได้ ทั้งนี้คงเนื่องจากความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ยังไม่เหมาะสม อย่างไรก็ตามหากแช่สารโคลชิซินกับเมล็ดมะนาวหรือพีชวงศ์ส้มควรมีการลอกเปลือกหุ้มเมล็ดออก เพราะจากการทดลองเบื้องต้น (ไม่แสดงผล) พบว่าการแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกและแช่สารละลายโคลชิซินมีผลให้เมล็ดงอกได้ดีกว่าการไม่แกะเปลือกหุ้มเมล็ด แต่การพิจารณาระยะเวลาในการแช่เมล็ดด้วยเช่นกัน เพราะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลกระทบต่อความงอกของเมล็ด การทดลองครั้งนี้ใช้ระยะเวลาแช่เมล็ด 36 ชม. มีรายงานในพืชหลายชนิด

Table 2. Means of chlorophyll content, stomata density, stomata size and number of oil glands of lemon seedling treated with different colchicine concentrations at 150 days after germination.

Concentration of colchicine (%)	Chlorophyll content ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Stomata density /mm ²	Stomata size (μm)	Number of oil glands /9 mm ²
0	2.92	573.43	70.4	7.00 a
0.5	2.85	558.87	75.0	24.39 ab
1.0	3.35	544.36	80.6	23.39 b
1.5	3.07	568.64	79.8	25.32 ab
2.0	3.35	555.82	97.6	25.04 a
CV (%)	22.15	5.90	12.92	17.86

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ที่ประสบความสำเร็จในการชักนำการเพิ่มชุดของโครโมโซมโดยการแช่เมล็ดในสารละลายโคลชิซิน เช่น ผักกาดขาว ข้าวโพด คენา (จักรกฤษณ์ และคณะ, 2545) และหม่อน (ประชาชาติและสำเริง, 2540) เป็นต้น การเลือกชิ้นส่วนพืชเพื่อทดสอบกับสารโคลชิซิน มีผลโดยตรงต่อความสำเร็จในการทำงานของสารโคลชิซิน เนื่องจากสารโคลชิซินจะมีผลยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล ดังนั้นเนื้อเยื่อพืชที่จะทำการทดสอบควรเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ในระยะแบ่งเซลล์ และสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ เช่น ปลายยอด หรือตาข้าง เป็นต้น สำหรับการแช่เมล็ดนั้นเนื้อเยื่อไม่ได้สัมผัสกับสารโดยตรง เพราะเซลล์ต้องดูดสารผ่านส่วนต่างๆ ของเมล็ดเพื่อเข้าไปยังต้นอ่อน ดังนั้นประสิทธิภาพในการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมอาจต่ำกว่าการที่สารสัมผัสกับเนื้อเยื่อเจริญโดยตรง

การทดลองที่ 2

การหุ้มปลายยอดด้วยสารโคลชิซิน

ชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของปลายยอดสูงที่สุดคือ 88% จาก 22 ปลายยอด รองลงมาคือที่ระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซิน 1.5 0.5 1.0 และ 2.0% ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนปลายยอดที่สามารถรอดชีวิตจำนวน 10 8 7 และ 6 ปลายยอดคิดเป็น 40 32 28 และ 25% ตามลำดับ (Table 3) และระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ทำให้ปลายยอดมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรอดตาย 50 % หรือค่า LD_{50} มีค่า 0.94% การให้สารโคลชิซินสัมผัสโดยตรงกับ

Table 3. Percentage of new growing lemon shoot tips at 50 days after treated with colchicine at different concentrations

Concentration of colchicine (%)	New growing shoot tips (%)
0	88
0.5	32
1.0	28
1.5	40
2.0	25

เนื้อเยื่อเจริญของพืชต้องระมัดระวังเรื่องความเข้มข้น เพราะหากความเข้มข้นสูงเกินไป หรือระยะเวลาที่ให้ยอดสัมผัสกับสารโคลชิซินนานเกินไป อาจจะทำให้ยอดตายได้ในมะนาว อาริยา (2540) รายงานการใช้สารโคลชิซินกับปลายยอดด้วยความเข้มข้น 0.1% พบว่ามีค่า LD_{50} อยู่ที่ 4-5 ซม. ส่วนที่ความเข้มข้น 0.5% ค่า LD_{50} อยู่ที่ 2-3 ซม. แต่ผลจากการศึกษาครั้งนี้ ค่า LD_{50} ค่อนข้างแตกต่างกันมาก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ที่ใช้ทดสอบซึ่งมีการตอบสนองที่แตกต่างกัน

การเจริญเติบโตของยอดใหม่หลังให้สารโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ กันที่ 60 วัน พบว่าความยาวยอดใหม่ ความกว้างและความยาวของใบ จำนวนใบจากปลายยอดที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน หรือชุดควบคุมมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าปลายยอดที่ได้รับสารโคลชิซินทุกความเข้มข้น (Table 4) พบลักษณะผิดปกติที่ปลายยอดผลใหม่ ซึ่งเป็นผลโดยตรงจากการได้รับสารโคลชิซินคือ

ใบหยิกผิดปกติ ใบต่าง เป็นต้น เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี ขนาดต่อมน้ำมัน ความหนาแน่นปากใบและขนาดปากใบ พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Table 5)

เมื่อนับจำนวนโครโมโซมของปลายยอด มะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรทั้งหมด ที่ได้รับสารโคลชิซิน พบว่าเกือบทั้งหมดมีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ $2n = 2x = 18$ ยกเว้น 2 ต้น ที่มีลักษณะเป็นมิทไซพลอยด์ คือ 1 ต้นจากการได้รับสาร

Table 4. Length of new growing shoot tips, number of leaves and leaf width/length of lemon shoot tip at 60 days after treated with colchicine at different concentrations

Concentration of colchicine (%)	New growing shoot tip (cm)	Leaf width (cm)	Leaf length (cm)	Number of leaves /plant
0	25.95 a	4.86	11.17	18.50 a
0.5	8.00 c	3.35	7.35	6.62 b
1.0	11.14 bc	3.54	7.45	5.86 b
1.5	11.80 bc	4.69	8.70	6.90 b
2.0	16.00 b	4.08	9.15	9.50 b
CV (%)	34.69	28.99	26.93	47.86

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 5. Means of chlorophyll content, stomata density, stomata size and number of oil glands of lemon shoot tip 60 days after treated with colchicine at different concentrations

Concentration of colchicine (%)	Chlorophyll content ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Stomata density /mm ²	Stomata size (μm)	Number of oil glands /9 mm ²
0	2.20	576.60	67.8	27.00
0.5	1.07	460.17	86.6	27.50
1.0	1.97	459.00	85.0	20.25
1.5	2.01	512.50	76.6	24.50
2.0	1.95	571.00	86.6	25.83
CV (%)	38.19	16.52	20.16	25.71

โคลชิซินเข้มข้น 1.0% และอีก 1 ต้นจากความเข้มข้น 2.0% โดยต้นที่ได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้น 1.0% พบจำนวนโครโมโซม 3 แบบ คือ ดิพลอยด์ ($2n = 2x = 18$) ทริพลอยด์ ($2n = 3x = 27$) และเตตระพลอยด์ ($2n = 4x = 36$) คิดเป็น 22 28 และ 50% ตามลำดับ ส่วนต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน 2.0% พบโครโมโซม 2 แบบคือ ดิพลอยด์ และเตตระพลอยด์คิดเป็น 75 และ 25% ตามลำดับ (Figure 1) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ เฉพาะต้นมิโกโซพลอยด์ทั้งสองต้น กับต้นในชุดควบคุม (อย่างละ 1 ต้น) พบว่าต้นมิโกโซพลอยด์ทั้งสองต้นมีจำนวนต่อมน้ำมัน จำนวนใบ ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี ความหนาแน่นปากใบ และความยาวยอดน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน (Table 6)

การให้สารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ลำสั้ขุบสารและวางบนปลายยอด เป็นวิธีการที่เนื้อเยื่อได้สัมผัสสารโดยตรง พบว่าประสบความสำเร็จในการชักนำการเพิ่มชุดจำนวนโครโมโซมจำนวน 2 ต้น แต่เป็นลักษณะมิโกโซพลอยด์ ซึ่งหมายถึงการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเกิดขึ้นเพียงบางเซลล์ และแต่เซลล์อาจมีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน อธิบายได้ว่าเมื่อสารสัมผัสกับเนื้อเยื่อบริเวณยอดอ่อนของพืชขณะที่ปลายยอดกำลังมีการแบ่งเซลล์ มีเฉพาะบางเซลล์เท่านั้นที่สารโคลชิซินมีผลไปยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล จึงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม ในขณะที่เซลล์อื่นๆ ยังคงปกติ และเมื่อมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสต่อไป จึงทำให้เซลล์แต่ละเซลล์มีจำนวนชุดโครโมโซมไม่เท่ากัน

ซึ่งอาจเรียกลักษณะนี้ว่าเกิดไคเมอรา (chimera) มีผู้รายงานไว้ว่า ลักษณะมิโกโซพลอยด์สามารถเกิดขึ้นได้ในพืชวงศ์ส้ม (อาริยา, 2540; Wu and Mooney, 2002) หรือพืชอื่นๆ เช่น กล้วยซึ่ง Duren และคณะ (1996) รายงานการเกิดมิโกโซพลอยด์จากการใช้สารโคลชิซินกับส่วนปลายยอดกล้วย มีผลให้เกิดการกลายแบบเพอริคลินอลไคเมอรา (periclinal chimera) หรือ Koutoulis และคณะ (2005) พบว่าต้น hop ที่เกิดมิโกโซพลอยด์จากการใช้สารโคลชิซิน 0.05% นาน 48 ชม. เกิดการกลายแบบเพอริคลินอล ไคเมอราตรงชั้น LII จากการทดลองในครั้งนี้พบการเกิดลักษณะมิโกโซพลอยด์ ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์แบบไคเมอราเช่นกัน แต่ไม่สามารถระบุชนิดของไคเมอราได้ การกลายพันธุ์ในลักษณะดังกล่าวนี้อาจจะไม่มีผลเสียขึ้นอยู่กับการแข่งขันของเซลล์แต่ละเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปกับเซลล์ปกติ และเซลล์ที่มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมสามารถเจริญเติบโตเหนือเซลล์ปกติ ปลายยอดที่แตกใหม่ก็จะมีอาการกลายพันธุ์อย่างสมบูรณ์ แต่ถ้าเซลล์ทั้งสองแบบคงอยู่และต่างเซลล์ต่างแบ่งได้เป็นเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นมาจะเกิดลักษณะไคเมอราแบบใดแบบหนึ่ง (จรัสศรี, 2548) ซึ่งจะต้องมีการติดตามการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของต้นที่เป็นมิโกโซพลอยด์ทั้งสองต้นต่อไป

การตรวจสอบการเพิ่มชุดของโครโมโซมสามารถทำได้หลายวิธี วิธีการโดยตรงที่ให้ผลแน่นอนที่สุดคือ การนับจำนวนโครโมโซม แต่ในพืชบางชนิดโครโมโซมมีขนาดเล็กมาก อีกทั้งยังมีจำนวนโครโมโซมมาก อาจทำให้การตรวจสอบ

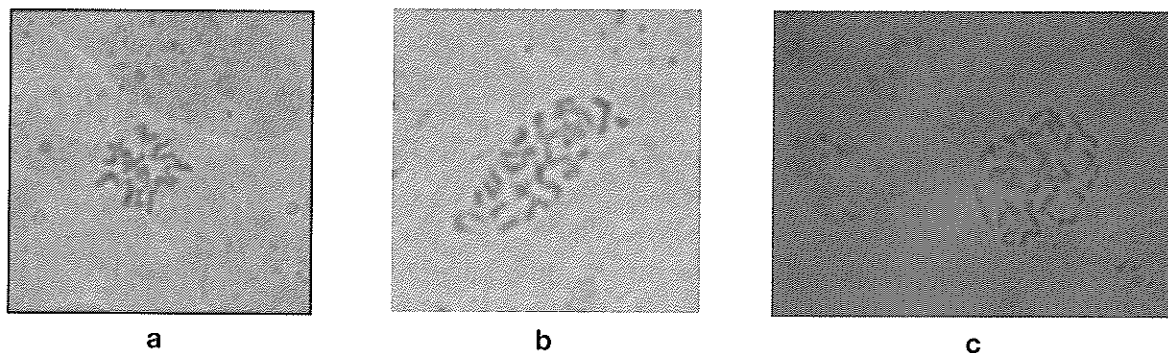


Figure 1. The chromosome number of lemon root tip at metaphase stage

(a) $2n = 2x = 18$, (b) $2n = 3x = 27$ and (c) $2n = 4x = 36$

Table 6. Comparison of some characters of mixoploid lemon and control (diploid)

Characterization	Control	Mixoploid plant	Mixoploid plant	CV (%)
		(1% colchicines)	(2% colchicines)	
Stomata density (stomata number/mm ²)	576.60 a	395.00 b	405.00 b	7.67
Stomata size (μm)	67.80	66.60	67.20	3.13
Number of oil glands (gland/9 mm ²)	27.00 a	10.00 c	20.00 b	14.46
Chlorophyll content (μg)	2.20 a	1.18 b	1.10 b	28.34
Leaf width (cm)	4.95 a	4.67 b	4.00 c	3.22
Leaf length (cm)	11.17 a	11.67 a	9.50 b	4.26
Number of leaves (leaf)	18.50	12.00	5.00	-
New growing shoot tips (cm)	35.90	30.50	11.00	-

Means in the same row followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ทำได้ยาก ดังนั้นจึงอาจใช้วิธีการอื่นๆ ช่วยยืนยันผล เช่น การตรวจสอบลักษณะสัณฐานที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีรายงานในพืชหลายชนิดว่าการเพิ่มขึ้นของจำนวนโครโมโซมมีความสัมพันธ์โดยตรงกับลักษณะสัณฐานบางลักษณะ เช่น ขนาดใบ ดอก ผล มีขนาดใหญ่ขึ้น ใบหนา

เป็นต้น (มยุรี, 2547; Behera *et al.*, 1974; Gaonkar and Torne, 1991) นอกจากนี้ยังพบว่าพืชที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นมักมีขนาดปากใบและเมื่อดคลอโรพลาสต์ใหญ่ หรือปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น ทำให้ใบมีสีเขียวเข้ม (สมปองและราตรี, 2542; มยุรี และคณะ, 2547) เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองในมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พร พบว่าการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมหรือไม่นั้นไม่ได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับลักษณะฐานรากมากนัก เพราะในการแช่เมล็ดในสารโคลชิซินพบว่า ต้นกล้าที่ได้รับสารโคลชิซินทุกความเข้มข้นมีขนาดปากใบใหญ่กว่าชุดควบคุมซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และใบของกลุ่มต้นที่ได้รับสารโคลชิซินทุกความเข้มข้นจะมีตอมน้ำมันขนาดใหญ่ แต่มีจำนวนน้อยกว่าชุดควบคุม แต่เมื่อตรวจสอบจำนวนโครโมโซมแล้วพบว่า จำนวนโครโมโซมของชุดควบคุมและกลุ่มต้นที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่ต้นมิกโซพลอยด์ทั้ง 2 ต้นนั้นพบว่ามีจำนวนปากใบน้อยกว่าชุดควบคุม แต่ขนาดของปากใบมีขนาดใกล้เคียงกัน นอกจากนี้แล้วต้นมิกโซพลอยด์มีการเจริญเติบโตของยอดช้า และมีจำนวนใบใหม่น้อยกว่าต้นชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้น ผลที่เกิดขึ้นอาจเนื่องจากผลของสารโคลชิซินต่อเนื้อเยื่อพืชโดยตรง หรือเป็นผลร่วมกับสภาพแวดล้อม ซึ่งอาจไม่ได้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของจำนวนโครโมโซมโดยตรง

สรุปผลการทดลอง

การใช้สารโคลชิซินเพื่อชักนำ การเพิ่มชุดโครโมโซมของมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พร พบว่าไม่ประสบผลสำเร็จเมื่อแช่เมล็ดในสารละลายโคลชิซิน แต่ประสบความสำเร็จจากการหุ้มปลายยอดด้วยสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0% โดยพบจากการทดลองครั้งนี้เพียง

2 ต้นเท่านั้น ที่มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม แต่การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเป็นแบบมิกโซพลอยด์คือ พบทั้งเซลล์ที่มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมและเซลล์ปกติปะปนกัน ต้นที่ผ่านการหุ้มปลายยอดด้วยสารโคลชิซินความเข้มข้น 1.0% มีจำนวนโครโมโซม 3 แบบ คือ ดิพลอยด์ ทริพลอยด์และเตตระพลอยด์ ส่วนต้นที่ได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้น 2.0% พบมิกโซพลอยด์ที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นแบบดิพลอยด์และเตตระพลอยด์เท่านั้น ดังนั้นหากจะชักนำ การเพิ่มชุดของโครโมโซมมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรหรือพืชวงศ์ส้มอื่นๆ น่าจะใช้วิธีการให้สารโคลชิซินบริเวณปลายยอด แต่ต้องทดสอบความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ เพื่อให้เกิดการชักนำ การกลายพันธุ์โดยสมบูรณ์ในมะนาวฝรั่ง การใช้ลักษณะฐานรากในการประเมินผลของการเพิ่มจำนวนโครโมโซม อาจจะได้ผลเท่ากับการนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากโดยตรง

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ คุณบรรยง นันทโรจนพร เจ้าของสวนนครินทร์ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างเมล็ดมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรในการวิจัย และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่มอบทุนและสนับสนุนในการวิจัย และสุดท้ายภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ สถานที่ วัสดุและอุปกรณ์สำหรับดำเนินการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- จรัสศรี นวลศรี. 2548. การเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซมและการปรับปรุงพันธุ์พืช. หน้า 73-97. ใน : เอกสารคำสอนวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืชสวน. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.
- จักรกฤษณ์ ภารการ สุภาณี บุตติง ยูพิน ไชยโต วาสนา ไวยจำปา และชูเกียรติ ผาโสม. 2545. รายงานการวิจัย เทคนิคการตรวจนับและเพิ่มจำนวนโครโมโซมของพืชด้วยสารโคลชิซินเพื่อการพัฒนาพันธุ์พืช. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 48 หน้า.
- ธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2525. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของถั่วเขียวโดยใช้รังสีแกมมา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 87 หน้า.
- ประชาชาติ นพพวง และสำเริง วิชาณา. 2540. การสร้างหม่อน Tetraploid จากหม่อนที่มีความต้านทานโรครากเน่า. ว. วิชาการเกษตร 3: 179-184.
- มยุรี แก้วภู อรุณศรี วัฒนชานนท์ และประดิษฐ์ ตั้งสกุล. 2547. การชักนำให้เกิดโพลีพลอยดีในถั่วเขียวฝวมันพันธุ์อุทอง 1 โดยใช้สารโคลชิซิน. ว. มหาวิทยาลัยทักษิณ 7: 10-20.
- วรวิทย์ จุฬาลักษณ์นกุล. 2542. การชักนำให้เกิดโพลีพลอยดีในบัวบกโดยใช้สารโคลชิซิน. ว. จุฬาลักษณ์ 25: 151-155.
- วัลลภ สันติประชา. 2540. ความมีชีวิตและการงอกของเมล็ดพันธุ์. หน้า 64-76. ใน : เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.
- สมปอง เตชะโต และ ราตรี สุจารย์. 2542. การชักนำการกลายพันธุ์มั่งคุดโดยใช้โคลชิซินกับใช้ตายอดที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง. ว. สงขลานครินทร์ 21: 155-167.
- สมพร ประเสริฐสงสกุล และวิฑูล ไชยภักดี. 2547. ผลของโคลชิซินต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัวทอปปิคอลโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. รายงานการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี. 75 หน้า.
- อารียา ศาสตรพันธุ์. 2540. การชักนำให้เกิดโพลีพลอยดีในมะนาว (*Citrus aurantifolia* Swingle). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 260 หน้า.
- Barrett, H. C. 1974. Colchicine-induced polyploidy in citrus. *Bot. Gaz.* 135: 29-41.
- Behera, B., A. Tripathy and S.K. Patnaik, 1974. Histological analysis of colchicines-induced deformities and cytochimera in *Amaranthus caudatus* and *dubious*. *J. Heredity* 65: 179-184.
- Cassells, A.C. and P.B. Gahan, 2006. Dictionary of Plant Tissue Culture.

- Haworth Press, Inc. New York. 265 p.
- Duren, M.V., R. Morpurgo, J. Dolezel and R. Afza, 1996. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by in vitro techniques. *Euphytica* 85: 25-34.
- Gaonkar, R.V. and S.G. Torne, 1991. Induced autotetraploidy in *Ageratum conyzoides* L. *Cytologia* 56: 327-331.
- Koutoulis, A., Roy, A.T., A. Price, L. Sherriff and G. Leggett, 2005. DNA ploidy level of colchicine-treated hops (*Humulus lupulus* L.). *Scientia Hort.* 105: 263-268.
- Wu, J.H. and P. Mooney, 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from in vitro citrus somatic embryogenic callus treated with colchicines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 99-104.