การสร้างหม่อน Tetraploid จากหม่อนที่มีความต้านทานโรครากเน่า

Mulberry Polyploid Breeding from the Root Rot Disease Resistant Variety

ประชาชาติ นพพวง[1] สำเริง วิชานา[1]
Prachachart Noppavong[1] Somrong Vichana[1]

ABSTRACT

The experiment was carried out during 1993-1995 at Sakon Nakhon Sericultural Experiment Station with an objective to design mulberry polyploid (tetraploid) from the root rot disease resistant variety for triploid mulberry breeding by using Kunpai variety. By taking 300 cuttings and divided into 6 group, 50 cuttings per group, planted in sampling bags (one cutting per bag), treated with 0.4% colcichine solution by dropping the solution at the upmost bud of each cutting 2 times a day (early morinng and late evening). The first group was treated by 0.4% colcichine solution for 1 day, the second group for 2 days, the third group for 3 days, the forth group for 4 days, the fifth group for 5 days and the sixth group was dropped by distilled water for 5 days, the result showed that one month after colcichine treatment, there were 97 saplings showed tetraploid characters.. However after 97 samplings transplanted into the field and the seletion was done by morphological characters and chromosome counting by using leaftip. There were only three plants (two shoots per plants) showing tetraploid characters.

บทคัดย่อ

การทดลองนี้ดำเนินการที่สถานีทดลองหม่อนไหมสกลนคร ระหว่างปี พ.ศ. 2536-2538 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างหม่อน tetraploid จากหม่อนที่มีความต้านทานโรครากเน่าสำหรับการปรับปรุงพันธุ์หม่อน triploid ต่อไป โดยใช้หม่อนคุณไพจำนวน 300 ท่อน แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 50 ท่อน ปลูกในถุงชำ ถุงละ 1 ท่อน ทำการหยอดสารละลายโคลซิซิน 0.4% ที่ตาหม่อนวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น หม่อนกลุ่มที่ 1 หยอดสารละลายโคลซิซิน 0.4% นาน 1 วัน กลุ่มที่ 2 หยอดสารละลาย 2 วัน กลุ่มที่ 3 หยอดสารละลาย 3 วัน กลุ่มที่ 4 หยอดสารละลาย 4 วัน กลุ่มที่ 5 หยอดสารละลาย 5 วัน และกลุ่มที่ 6 หยอดด้วยน้ำกลั่น 5 วัน ผลการทดลองปรากฏว่าหลังการหยอดสารละลายโคลซิซิน 0.4% 1 เดือน มีต้นหม่อนที่มีลักษณะหม่อน tetraploid จำนวน 97 ต้น จาก 5 กลุ่ม และเมื่อนำไปปลูกในแปลงแล้ว ทำการคัดเลือกด้วยลักษณะภายนอก และการศึกษาจำนวนโครโมโซมโดยใช้ใบที่ปลายยอด พบว่าเหลืองหม่อนเพียง 3 ต้นๆ ละ 2 กิ่ง ที่ยังคงลักษณะหม่อน tetraploid

คำนำ

พันธุ์หม่อนในธรรมชาติจะเป็นหม่อน diploid (2n=28) แต่ก็มีบาง species เช่น *Morus tiliafolia* (2n=84) หรือ *Morus nigra* (2n=308) ฯลฯ (Tojyo 1985) หม่อนพันธุ์พื้นเมืองของไทยเกือบทุกพันธุ์

(1) สถานีทดลองหม่อนไหมสกลนคร อ. เมือง จ. สกลนคร 47000
Sakon Nakhon Sericultural Experiment Station, Amphoe Maung, Sakon Nakhon, 47000

เป็นหม่อน diploid ยกเว้น หม่อนเชียงคำ ซึ่งเป็นหม่อน triploid (Katagiri 1982) ประเทศญี่ปุ่นมีหม่อน triploid 2 พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและใบมีคุณภาพดี ได้แก่ Shin Kemmochi รับรองพันธุ์ในปี 1981 และ Aobanezumi รับรองพันธุ์ในปี 1982 (Katagiri 1987) หม่อน polyploid จะดีกว่าหม่อน diploid ในหลายๆ ด้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณค่าทางอาหารจะดีกว่า (Siki and Oshikawa 1987) หม่อน triploid เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างหม่อน tetraploid กับ diploid ดังนั้นจึงต้องมีการสร้างหม่อน tetraploid ขึ้นมาก่อน Tojyo (1985) ใช้สารละลายโคลซิซิน 0.01-0.40% กับเมล็ดหม่อน ยอดหม่อน และท่อนพันธุ์ในเวลาต่างๆ กัน Dwivedi และคณะ (1989) ใช้สารละลายโคลซิซินความเข้มข้น 0.2-0.4% กับเมล็ด ยอดกิ่ง ท่อนพันธุ์ และช่อดอกตัวเมียหม่อน tetraploid ที่ได้เนื่องจากมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นถึง 2 เท่า ทำให้ cell มีขนาดใหญ่ขึ้นเป็นผลให้ลักษณะของหม่อน tetraploid จะมีใบใหญ่ขึ้นผิวใบหยาบ ใบมีสีเขียวเข้ม ก้านใบจะใหญ่ขึ้น

งานทดลองนี้ใช้หม่อนพันธุ์คุณไพ เนื่องจากมีการเจริญเติบโตได้เร็ว และมีความต้านทานโรครากเน่า (สถานีทดลองหม่อนไหมอุบลราชธานี 2539) เพื่อสร้างหม่อน tetraploid จากหม่อนที่มีความต้านทานโรครากเน่า สำหรับการปรับปรุงพันธุ์หม่อน triploid ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองทำที่สถานีทดลองหม่อนไหมสกลนครในระหว่างปี 2536-2538 โดยการตัดท่อนพันธุ์หม่อนคุณไพ จำนวน 300 ท่อน มีความยาวท่อนละ 20 เซนติเมตร ใช้มีดตัดตาส่วนล่างออกให้หมด เหลือไว้เพียงตาบนตาเดียวเท่านั้น ใช้มีดตัดส่วนปลายของตาที่เหลืออยู่หนึ่งตาออกเล็กน้อย แล้วหุ้มด้วยสำลีแบ่งท่อนพันธุ์จำนวน 300 ท่อน ออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 50 ท่อน แล้วปลูกในถุงชำขนาด 5x7 นิ้ว ที่ใส่วัสดุสำหรับเพาะชำไว้เรียบร้อยแล้ว

การเตรียมสารละลายโคลซิซิน 0.4% โดยการชั่งสารโคลซิซิน 2 กรัม ใส่ในบิกเกอร์ ละลายด้วย ethyl alcohol ประมาณ 5 มิลลิลิตร ในการหยอดสารละลายโคลซิซิน 0.4% ที่ตาหม่อนจะทำวันละ 1 ครั้ง เช้ามืด และตอนเย็นหลังพระอาทิตย์ตกดินแล้ว โดยที่หม่อนกลุ่มที่ 1 หยอดสารละลายโคลซิซิน 0.4% จำนวน 1 วัน กลุ่มที่ 2 หยอดสารละลาย 2 วัน กลุ่มที่ 3 หยอดสารละลาย 3 วัน กลุ่มที่ 4 หยอดสารละลาย 4 วัน กลุ่มที่ 5 หยอดสารละลาย 5 วันกลุ่มที่ 6 หยอดด้วยน้ำกลั่น 5 วัน

หลังการหยอดสารละลายทำการสังเกตุการเจริญเติบโตของตาหม่อน 1 เดือน และคัดเลือกต้นหม่อนที่มีลักษณะ tetraploid จากหม่อนทั้ง 6 กลุ่ม นำหม่อนที่คัดเลือกได้ไปปลูกในแปลงเพื่อทำการศึกษาหม่อน tetraploid อีกครั้งโดยอาศัยการตัดแต่งเมื่อปลูกในแปลงนาน 6 เดือนทำการตัดต่ำและหลังตัดต่ำ 6 เดือนทำการตัดกลางเพื่อศึกษาว่ากิ่งหม่อนที่เจริญเติบโตขึ้นมาใหม่จะยังคงลักษณะหม่อน tetraploid โดยการศึกษาจากลักษณะภายนอกเช่น สีของใบ ขนาดของใบ ผิวใบ ขนาดของก้านใบ และการศึกษาจำนวนโครโมโซมของหม่อนที่คัดเลือกได้โดยใช้ใบที่ปลายยอด (leaf-tip)

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของหม่อน โดยใช้ใบที่ปลายยอดสารละลายต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยสารละลาย Schiff's reagent จำนวน 200 มิลลิลิตร 1N-HCl จำนวน 200 มิลลิลิตร Iron-acetocarmine 1% จำนวน 100 มิลลิลิตร สารละลาย acetic acid : ethyl alcohol ในอัตราส่วน 1:3 จำนวน 100 มิลลิลิตร ขั้นตอนในการศึกษาจำนวนโครโมโซมมีดังนี้ (Diagram 1)

1. Fixation โดยการดัดใบที่ปลายยอดใส่ในสารละลาย acetic acid : alcohol (1:3) นาน 24 ชั่วโมง ปลายยอดจะเปลี่ยนเป็นสีขาว

2. Hydrolysis หลังจาก fixation นำปลายใบมาทำ hydrolysis ใน 1N-HCl ที่ 60°C นาน 12 นาที

3. Staining นำปลายใบที่ทำ hydrolysis แล้วแช่ในสารละลาย Schiff's reagent นานอย่างน้อย 30 นาทีปลายใบจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงแก่

4. Squashing นำปลายใบมาวางบนสไลด์ หยอด

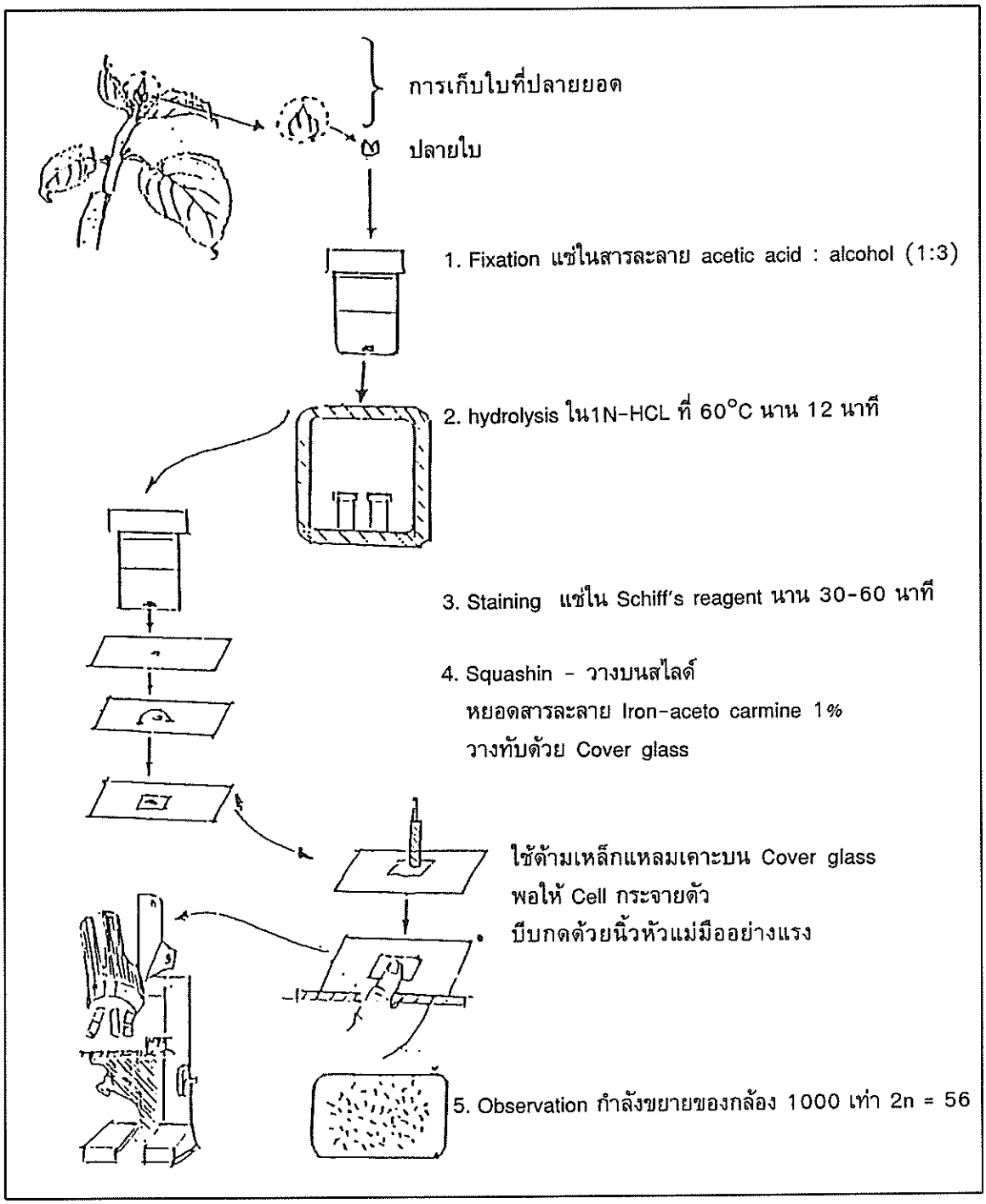

Diagram 1. ขั้นตอนการศึกษาโครโมโซมของหม่อนโดยใช้ใบที่ปลายยอด

สารละลาย iron-aceto-carine 1% 1 หยด ลงบนปลายใบ วาง cover glass บนปลายใบแล้วบีบกดด้วยนิ้วหัวแม่มืออย่างแรง ก่อนบีบกดควรใช้กระดาษ tissue วางบน cover glass เพื่อช่วยดูดซับสารละลายส่วนเกิน

5. Observation นำตัวอย่างบนสไลด์ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 400 เท่า เพื่อหาตัวอย่าง cell ที่ดีคือ มองเห็นโครโมโซมได้ชัดเจน แล้วใช้หัวน้ำมันที่มีกำลังขยาย 1,000 เท่า เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซม

การบันทึกข้อมูลหลังการหยอดสารละลายโคลชิซิน 0.4% 1 เดือน ทำการคัดเลือกและนับจำนวนหม่อนที่มีลักษณะหม่อน tetraploid และจำนวนต้นหม่อนที่ตายเพราะหยอดสารนานเกินไป บันทึกลักษณะของหม่อน tetraploid และจำนวนโครโมโซมของกิ่งหม่อนที่ทำการศึกษา

ผลการทดลองและวิจารณ์

หลังการหยอดสารละลายโคลชิซิน 0.4% ได้ทำการสังเกตุการเจริญเติบโตของตาหม่อนตลอดเวลา พบว่าตาหม่อนชะงักการเจริญเติบโตเมื่อเปรียบเทียบกับหม่อนที่ไม่ได้หยอดสาร เมื่อตาหม่อนเริ่มเจริญแตกออกมาจะมีขนาดใหญ่ และเมื่อมีใบ ใบจะใหญ่ และมีสีเขียวเข้ม (Fig. 1) ซ้ายมือเป็นใบหม่อน tetraploid ใบมีสีเขียวเข้ม ขวามือเป็นใบหม่อน diploid ใบมีสีเขียวอ่อน หลังการหยอดสารละลาย 1 เดือน ทำการคัดเลือกหม่อนจาก 5 กลุ่มที่หยอดสารละลาย และ 1 กลุ่มที่หยอดด้วยน้ำกลั่นได้ผลดังนี้

กลุ่มที่ 1 หยอดสารละลายโคลชิซิน 0.4 จำนวน 1 วัน คัดเลือกต้นหม่อนที่มีลักษณะ tetraploid ได้จำนวน 6 ต้น

กลุ่มที่ 2 หยอดสารละลาย จำนวน 2 วัน คัดเลือกได้ 21 ต้น

กลุ่มที่ 3 หยอดสารละลาย จำนวน 3 วัน คัดเลือกได้ 25 ต้น

กลุ่มที่ 4 หยอดสารละลาย จำนวน 4 วัน คัดเลือกได้ 24 ต้น

กลุ่มที่ 5 หยอดสารละลาย จำนวน 5 วัน คัดเลือกได้ 21 ต้น

Fig. 1. Left-Leaf of tetraploid; deep green color
Right-Leaf of diploid; light green color

กลุ่มที่ 6 หยอดด้วยน้ำกลั่น จำนวน 5 วัน คัดเลือกได้ 0 ต้น (Table 1)

จาก Table 1 จะเห็นได้ว่า เมื่อหยอดสารละลายนานวันจะทำให้ท่อนพันธุ์หม่อนตายได้ เช่น หยอดนาน 4 วัน ตายไป 4 ท่อน หยอดนาน 5 วัน ตาย 7 ท่อน

เมื่อนำต้นหม่อนที่ได้คัดเลือกจำนวน 97 ต้นไปปลูกในแปลงเพื่อศึกษาโดยการตัดแต่ง พบว่ามีหม่อนเพียง 3 ต้นๆ ละ 2 กิ่งเท่านั้นที่ยังคงลักษณะของหม่อน tetraploid สองต้นได้จากหม่อนในกลุ่มที่ 3 ซึ่งทำการหยอดสารละลายโคลชิซิน 3 วัน อีกหนึ่งต้นได้จากหม่อนในกลุ่มที่ 4 ซึ่งหยอดสารละลายนาน 4 วัน และเมื่อทำการศึกษาลักษณะภายนอก เช่น สีของใบ ความหยาบของผิวใบ ขนาดของใบ ขนาดของก้านใบ เปรียบเทียบกับหม่อนคุณไพ พบว่าหม่อนทั้ง 6 กิ่ง จะมีใบสีเขียวเข้ม ผิวใบหยาบ ขนาดใบใหญ่ และขนาดก้านใบใหญ่กว่าหม่อนคุณไพ และเมื่อทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมของหม่อน 3 ต้น จำนวน 6 กิ่งพบว่าหม่อนทั้ง 6 กิ่ง มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 56 ดังแสดงใน Table 2

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลอง พบว่าการสร้างหม่อน tetraploid จากหม่อนที่มีความต้านทานโรครากเน่า (คุณไพ) สามารถทำได้จากวิธีการที่ใช้ในการทดลองนี้ โดยมีโอกาสสำเร็จ 1.2% (3 ต้นจาก 250 ท่อน) โดยการใช้สารละลายโคลชิซิน 0.4% หยอดตาหม่อนเป็นเวลานาน 3-4 วัน ติดต่อกันทำให้ได้สายพันธุ์หม่อน tetraploid สำหรับการปรับปรุงพันธุ์หม่อน triploid ต่อไป และยังได้ข้อมูลพื้นฐานในการตรวจนับจำนวนโครโมโซมโดยการใช้ใบที่ปลายยอด (leaf-tip)

Table 1. Effect of 0.4% colcichine solution, dropped on mulberry buds 1-5 days respectively.

Days for colcichine Treatment	Number of tetraploid Occurance	Number of dried cuttings	Number of normal plants
1	6	-	44
2	21	-	29
3	25	-	25
4	24	4	22
5	21	7	22
Total	97	11	142

Table 2. Some morphological characters and chromosome number of 6 tetraploid shoots and Kunpai variety

Shoot	Leaf color	Leaf surface	Leaf size width x Length (cm)	Petiole size (mm)	Chromosome number
1	deep green	rough	6.32 x 9.04	4.14	56
2	deep green	rough	5.67 x 7.25	4.24	56
3	deep green	rough	6.51 x 9.13	4.10	56
4	deep green	rough	6.11 x 8.87	4.00	56
5	deep green	rough	5.63 x 7.31	3.80	56
6	deep green	rough	5.60 x 7.20	3.70	56
Kunpai	green	smooth	5.20 x 7.40	2.93	28

เอกสารอ้างอิง

สถานีทดลองหม่อนไหมอุบลราชธานี. 2539. เอกสารแนะนำการปลูกหม่อนเลี้ยงไหม 44 หน้า.

Dwivedi, N.K. Suryanaryana N. Sikdar A.K. Susheelamma B.N. Jolly M.S. 1989. Cytomorphological Studies in Triploid Muberry Evolved by Diploidization of Female Gamete Cells. Cytologia 1989, 54 (1): 13-19.

Katagiri, K. 1982. The triploidy in Mulberry Varieties from Thailand. Sericultrual Experiment Station. Yatabe Ibraki 305 Japan.

Katagiri, K. 1987. Genetic Resources and their Utilization in Mulberry Breeding. Sericultural Experiment Station, M.A.F., Japan.

Seki, H. and Oshikawa, K. 1957. Studies in Polyploid Mulberry Trees, III The evaluation of Breeded polypliod mulberry leaves and the results of silkworms on them. Shinsho University, Udio, Japan.

Tojyo, I, 1985. Research of Polyploidy and its Application in *Morus*. Tropical Agriculture Research Center, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. Japan.