บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เลมอนหรือที่ประเทศไทยเรียกว่ามะนาวฝรั่ง [*Citrus limon* (Linn.) Burm. f.] เป็นไม้ผลยืนต้นขนาดเล็กตระกูลเดียวกับส้มที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของโลก เพราะมีการนำกรดมะนาวหรือน้ำมะนาวมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ทั้งในด้านการบริโภคและอุตสาหกรรม มะนาวฝรั่งมีถิ่นกำเนิดทางทิศตะวันตกเฉียงเหนือของอินเดีย และกระจายเข้าสู่ตอนใต้ของประเทศอิตาลีเมื่อปี ค.ศ. 200 ประเทศอิรักและอียิปต์ในปี ค.ศ. 700 ประเทศจีนระหว่างปี ค.ศ. 760 ถึง 1297 และเริ่มมีการเพาะปลูกเพื่อการค้าในรัฐฟลอริด้าและแคลิฟอร์เนียในปี ค.ศ.1870 (Morton, 1987) ส่วนสำคัญของการใช้ประโยชน์จากมะนาวฝรั่งคือ กรดมะนาว ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ง่าย มีรสเปรี้ยว กลิ่นหอม มีความเป็นพิษต่ำ และย่อยสลายง่าย เป็นสารที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม ยา เครื่องสำอางและอุตสาหกรรมอื่น ๆ ปริมาณกรดที่ผลิตและใช้กันทั่วโลกปีละประมาณกว่า 350,000 ตัน จากสัดส่วนการใช้กรดมะนาวพบว่า ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มประมาณ 60% ในอุตสาหกรรมเคมีประมาณ 25% และใช้ในอุตสาหกรรมยาและอุตสาหกรรมอื่นๆ ประมาณ 15% (ทวีรัตน์, 2542)

มะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรเป็นพันธุ์ที่มีการนำเข้ามาจากประเทศออสเตรเลีย และนำมาทดลองปลูกที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งพบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ค่อนข้างดี ลักษณะเด่นของมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรคือ ผลขนาดใหญ่ น้ำหนักประมาณ 500 กรัมต่อผล เส้นผ่านศูนย์กลางผลประมาณ 10.0 - 12.0 เซนติเมตร ความยาวของผลโดยประมาณ 13.0 - 15.0 เซนติเมตร เปลือกหนา เมื่อสุกผิวผลจะมีสีเหลือง ปริมาณน้ำมากและรสชาติดี ปัญหาสำคัญของมะนาวพันธุ์พิมพ์พรคือ มีจำนวนเมล็ดต่อผลมาก ใน 1 ผลจะมีเมล็ดจำนวน 80 - 100 เมล็ด ซึ่งจะเป็นอุปสรรคในการที่จะนำไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นแนวทางการที่จะพัฒนามะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรให้มีเมล็ดน้อยลงหรือไม่มีเมล็ดเลยจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ โดยทั่วไปการชักนำพืชไร้เมล็ดสามารถทำได้โดยการสร้างพืชที่มีโครโมโซม 3 ชุด (triploid) ซึ่งประสบผลสำเร็จกับพืชหลายชนิด เช่น แตงโม กล้วยหอม หรือแม้แต่ในพืชตระกูลส้มเอง (Grange and Leskovar, 2003) ดังนั้นโอกาสที่จะพัฒนามะนาวฝรั่ง

พันธุ์พิมพ์พรให้เป็นมะนาวที่ไม่มีเมล็ดก็สามารถใช้วิธีเดียวกัน ขั้นตอนสำคัญในกระบวนการพัฒนาพืชที่มีโครโมโซม 3 ชุด คือ ขั้นตอนแรกที่ต้องชักนำให้มะนาวมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มจาก 2 ชุด (diploid) เป็น 4 ชุด (tetraploid) ก่อน แล้วจึงทำการผสมข้ามระหว่างต้นที่มีโครโมโซม 4 ชุด กับต้นปกติที่มีโครโมโซม 2 ชุด เพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีจำนวนโครโมโซม 3 ชุด ตามต้องการ การเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมสามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่นิยมคือ การใช้สารโคลชิซิน ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้าง spindle fiber อย่างไรก็ตามพืชแต่ละชนิดจะมีการตอบสนองต่อสารโคลชิซินไม่เหมือนกัน จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาวิธีการและความเข้มข้นของสารโคลชิชินที่เหมาะสมในการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซม

ตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไป

มะนาวเป็นพืชในวงศ์ Rutaceae แบ่งได้เป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่มีชื่อสามัญว่า ไลม์ (lime) หรือมะนาว ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Citrus aurantifolia* และกลุ่มที่มีชื่อสามัญว่า เลมอน (lemon) หรือในประเทศไทยเรียก มะนาวฝรั่ง ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Citrus limon* ซึ่งทั้งสองกลุ่มมีรูปร่างผล และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมะนาวภายในผลคล้ายคลึงกันมาก แต่ในประเทศไทยส่วนใหญ่มะนาวที่ใช้ในการบริโภค คือ กลุ่มไลม์ (จารุวรรณ์, 2543) เลมอนหรือมะนาวฝรั่งเป็นไม้ผลยืนต้นหรือไม้พุ่มขนาดเล็กจัดอยู่ในไม้ผลตระกูลส้ม สูง 3-6 เมตร มีลำต้นแข็งแรง ทรงพุ่มใหญ่ หนาม เรียวสั้นและแหลม ใบสีเขียวอ่อนอมเหลืองเป็นแบบ lanceolate ยอดอ่อนเริ่มแรกจะมีสีค่อนข้างแดง เมื่อโตขึ้นจะกลายเป็นสีเขียว ใบมีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือวงรียาว 6.25-11.25 เซนติเมตร ตรงก้านใบมีปีก (wing) เล็กน้อยหรือไม่มีเลย ดอกมีกลิ่นหอม เป็นดอกสมบูรณ์เพศ กลีบดอกมี 4-5 กลีบต่อดอก ยาว 2 เซนติเมตร กลีบดอกมีสีขาวส่วนปลายดอกมีสีม่วง มีเกสรตัวผู้ 20-40 อันต่อดอก ละอองเกสรมีสีเหลือง ซึ่งบางครั้งพบมะนาวฝรั่งที่มีแต่ดอกเพศผู้ด้วย แต่การเกิดดอกเพศผู้มักขึ้นกับสภาพแวดล้อม ลักษณะผลของมะนาวฝรั่งมีสีเขียวอมเหลือง ผลยาวเรียว ลักษณะประจำพันธุ์ที่เด่นชัดคือ ส่วนปลายผลนูนสูงขึ้น เรียกว่า นิบเปิ้ล หรือ apical mamilla (มงคล, 2536) ผลยาว 7-12 เซนติเมตร ผิวเปลือกมีสีเขียวเมื่อผลยังอ่อนพอสุกเต็มที่จะเป็นสีเหลือง เปลือกหนา 1 เซนติเมตร ตรงผิวเปลือกจะมีกลิ่นหอม มีต่อมน้ำมันอยู่ ต่อมแต่ละต่อมมีขนาด 6-10 มิลลิเมตร เนื้อผลมีสีขาวถึงเหลือง ภายในหนึ่งผลแบ่งออกเป็น 8 ส่วน บางผลไม่มีเมล็ดหรืออาจมีเมล็ดน้อย เมล็ดมีลักษณะเป็นรูปไข่ ปลายแหลม ยาว 9.5 มิลลิเมตร ภายในเมล็ดมีสีขาว (Morton, 1987) ปัจจุบันมะนาวฝรั่งมีความสำคัญในตลาดโลกค่อนข้างมากโดยเฉพาะประเทศสหรัฐอเมริกาผลิตได้ราวครึ่งหนึ่งของผลผลิตทั้งหมด อิตาลีผลิตได้ ร้อยละ 40 และผลผลิตจากประเทศสเปนประมาณร้อยละ 5 (มงคล, 2536)

2. การจำแนกพันธุ์

มะนาวฝรั่งแบ่งออกเป็น 3 พวกใหญ่ ๆ (มงคล, 2536) คือ

1. ชนิดเปรี้ยว มีพันธุ์ที่สำคัญ ๆ 2 พันธุ์ คือ

1.1 ยูรีกา เป็นพันธุ์การค้าที่สำคัญในมลรัฐแคลิฟอร์เนีย มีถิ่นกำเนิดจากประเทศอิตาลี เริ่มปลูกในประเทศสหรัฐอเมริกา ปี ค.ศ. 1877 ออกดอกผลตลอดปี อายุการแก่ของผลสั้น มีทรงพุ่มขนาดกลาง ไม่มีหนาม ไม่ทนต่อสภาพความหนาวเย็น ขนาดผลค่อนข้างเล็กยาวรี มีนิบเปิ้ลค่อนข้างสั้น มีเมล็ดน้อยหรือไม่มีเลย เปลือกผลหนา มี 10 กลีบ แกนผลแข็งและเล็ก

1.2 ลิสบอน เป็นพันธุ์การค้าที่สำคัญอีกพันธุ์หนึ่งของประเทศสหรัฐอเมริกา นิยมปลูกมากกว่าพันธุ์ ยูรีก้า มีถิ่นกำเนิดในประเทศโปรตุเกสแพร่กระจายพันธุ์ไปยังทวีปอเมริกาในปี 1853 พันธุ์ลิสบอนมีความแข็งแรงและให้ผลดกกว่า จึงนิยมปลูกกันมากกว่า มีลักษณะผลขนาดกลาง รูปร่างผลคล้ายพันธุ์ยูรีก้า

2. ชนิดหวาน มีรูปร่างลักษณะคล้ายพันธุ์ชนิดเปรี้ยว รสชาติเนื้อผลหวานกว่าและไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากนัก โดยพันธุ์ดอชาโป (Dorshapo) นิยมปลูกกันบ้างในประเทศโมร๊อกโค และประเทศตุรกี

3. ชนิดที่มีผลคล้ายเลมอน มีรูปร่างลักษณะแตกต่างกัน พันธุ์ที่สำคัญ ได้แก่

- รัฟเลมอน (*C. jambhiri* Lush.)
- เมเออร์เลมอน (*C. meyeri* Y. Tan.)
- อะลีมาวหรือโคโล (*C. macrophylla* Wester)

3. ลักษณะพฤกษศาสตร์ของมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พร

มะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรเป็นไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้นขนาดเล็ก มีทรงพุ่มสูงประมาณ 5 เมตร ลักษณะการเจริญเติบโตแผ่กิ่งก้านสาขากว้าง การแตกออกของกิ่งค่อนข้างไม่เป็นระเบียบ มีช่วงของการแตกใบอ่อนหลายครั้ง ซึ่งเกือบทุกครั้งที่มีการแตกใบอ่อนมักจะมีดอกออกตามมาด้วยเสมอ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของต้นและปัจจัยอื่นๆด้วย

ลำต้น มะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรมีลำต้นที่มีลักษณะโค้งงอแข็งแรง เปลือกสีเทาปนน้ำตาล กิ่งอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่สีจะค่อยๆเข้มขึ้น บนลำต้นและกิ่งก้านจะมีหนามที่แข็ง แหลม ส่วนใหญ่จะเกิดบริเวณซอกใบ

ใบ เป็นใบเดี่ยว รูปร่างค่อนข้างยาวหรือรูปไข่ (ภาพที่ 1) ปลายใบมีลักษณะแหลม ขอบใบมีหยัก แผ่นใบกว้างประมาณ 2-3 เซนติเมตร และยาวประมาณ 6-8 เซนติเมตร เมื่อขยี้ใบจะมีกลิ่นแรง ก้านใบสั้น ไม่มี wing ใบมีสีเขียวเข้ม ใบอ่อนจะมีสีเขียวอมแดง

(ก) (ข)

ภาพที่ 1 ลักษณะใบของมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พร (ก) ใบอ่อน และ (ข) ใบแก่

ดอก จะเกิดที่บริเวณซอกใบ อาจจะเป็นดอกเดี่ยวหรือดอกช่อ ดอกที่ตูมมีขนาดความยาว 1-2 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงมีสีเขียวอ่อน กลีบดอกสีขาวมี 5 กลีบ เกสรตัวผู้มีจำนวน 20-40 อัน (ภาพที่ 2) เกสรตัวเมียมีรังไข่รูปร่างเกือบทรงกระบอกหรือทรงถังเบียร์

(ก) (ข)

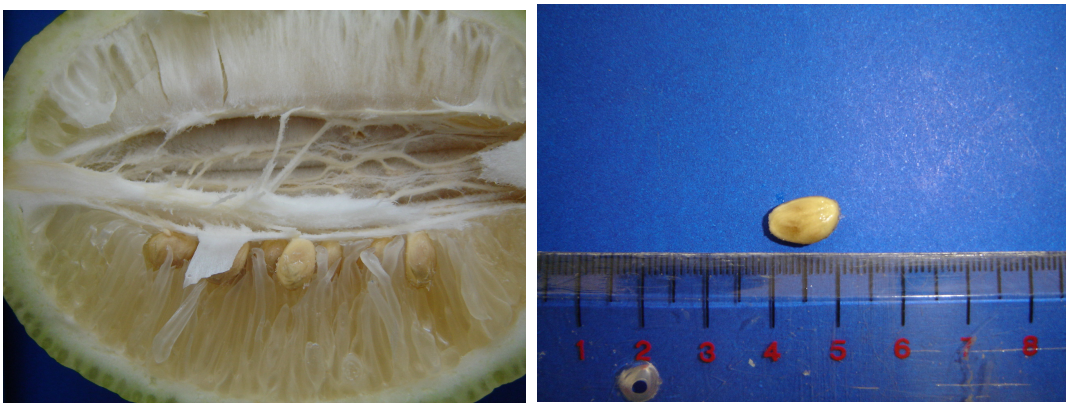
ภาพที่ 2 ลักษณะดอกของมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พร (ก) ดอกตูม และ (ข) ดอกบาน

ผล รูปร่างผลมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรมีลักษณะยาวรีหรือรูปไข่ ผลมีขนาดความยาวประมาณ 13 -15 เซนติเมตร และความกว้างประมาณ 10 -12 เซนติเมตร ส่วนปลายผลมีลักษณะเป็นปุ่มเล็กๆ นูนสูงขึ้น เรียกว่า นิบเปิ้ล ผิวเปลือกมีลักษณะขรุขระและมีต่อมน้ำมันที่ผิวเปลือก เปลือกหนาประมาณ 1 เซนติเมตร ผลอ่อนจะมีสีเขียวเข้ม เมื่อผลสุกผิวจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือสีทอง (ภาพที่ 3) มีต่อมน้ำมันที่ผิวเปลือกเห็นได้ชัด เนื้อสีเหลืองอ่อน รสเปรี้ยว มีกลิ่นหอม

(ก) (ข)

ภาพที่ 3 ลักษณะผลของมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรทั้งผลอ่อน (ก) และผลแก่ (ข)

เมล็ด มีลักษณะขนาดเล็กคล้ายรูปไข่ ด้านปลายแหลม ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร เปลือกเมล็ดเรียบ (ภาพที่ 4)



(ก) (ข)

ภาพที่ 4 ลักษณะภายในผล (ก) และขนาดของเมล็ดมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พร (ข)

ภายในใบส้มจะมีสารประกอบพวก แคลเซียมอ๊อกซาเลต พบมากในชั้นของเซลล์พาลิเสดในรูปของผนึก เฮสเพอริดีน พบมากในใบอ่อน จะตกผลึกรูปเข็ม และต่อมน้ำมัน จะเกิดอยู่ใต้ผิวชั้นนอกของใบส้ม ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของเซลล์ โดยปกติต่อมนี้จะปิดตลอดเวลา เมื่อถูกแรงบีบอัดหรือกระทบกระเทือนจากภายนอกต่อมจะขับน้ำมันออกมา ในส้มบางพันธุ์เช่น เลมอน หรือซิตรอนมีต่อมน้ำมันขนาดใหญ่สามารถสกัดน้ำมันจากต่อมไปใช้ประโยชน์ได้ น้ำมันที่สกัดได้จากต่อมน้ำมันนี้เรียกว่า essential oil เป็นสารประกอบพวกไฮโดรคาร์บอน เทอร์พีนและเซสควิ-เทอร์พีน ซึ่งสารประกอบของน้ำมันที่สกัดได้นั้น แตกต่างกันไปตามพันธุ์ (มงคล, 2536)

4. การใช้ประโยชน์

มะนาวฝรั่งสามารถใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งในด้านอาหาร สมุนไพร และใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆหลายชนิด ซึ่งในน้ำมะนาวสิ่งที่สำคัญที่สุดคือ กรด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดอินทรีย์ประกอบด้วยกรดต่างๆ ดังนี้ กรดซิตริก 91.8% กรดมาลิก 4.9% กรดควินิก 0.3% กรดฟอสฟอริก 0.5% และกรดที่ไม่ได้จำแนกชนิด 2.5% (ทวีรัตน์, 2542) มีการนำมะนาวฝรั่งมาใช้ประโยชน์หลายด้านด้วยกันเช่น ด้านสมุนไพรใช้ในการรักษาอาการต่างๆ เช่น แก้ไข้ แก้ความดันฟอกโลหิต แก้ส้นเท้าแตก แก้คัน แก้วิงเวียน แก้น้ำกัดเท้า บำรุงผิว และขับเสมหะเป็นต้น ส่วนในด้านอุตสาหกรรมเป็นแหล่งผลิตกรดซิตริก มะนาวผง ใช้เป็นเครื่องปรุงแต่งในอุตสาหกรรมน้ำอัดลมและเครื่องดื่ม นำไปใช้ผสมในเครื่องหอมหรือใช้ผสมน้ำอาบหรือใช้ผสมในเครื่องสำอาง สบู่ ยาสีฟัน น้ำมันหอมระเหย และน้ำมันใส่ผม ด้านอาหาร เช่น นำมาทำขนม พาย ลูกกวาดรสมะนาว ซุบ แกงต่างๆ เป็นต้น

5. การเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม

โครโมโซม คือ โครงสร้างทางพันธุกรรม (heredity structure) ที่เป็นที่อยู่ของหน่วยกรรมพันธุ์ โครโมโซมทำหน้าที่เก็บรักษา ถ่ายทอด และแสดงออกของข้อมูลพันธุกรรม ซึ่งจีโนม (genome) หมายถึง จำนวนโครโมโซมหรือปริมาณดีเอ็นเอในหนึ่งชุด ถ่ายทอดจากพ่อแม่ให้กับลูก หรือคือโครโมโซมหรือจีนที่มีในแกมีทของพ่อหรือแม่ ดังนั้น 1x จะหมายถึง 1 จีโนม โดยที่สิ่งมีชีวิตชนิดดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมในเซลล์สืบพันธุ์เป็น 1x และในเซลล์ร่างกายมีเป็น 2x ในสภาพปกติจะพบสิ่งมีชีวิตที่เป็นดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเป็นจำนวน 2n และมีองค์ประกอบของโครโมโซมเป็นจีโนมชุดเดียวกัน 2 ชุด ส่วนโพลีพลอยด์ (polyploid) เป็นสิ่งมีชีวิตที่เซลล์ร่างกายมีจีโนมมากกว่า 2 ชุดขึ้นไป เช่น 3 จีโนม (triploid, 3x) 4 จีโนม (tetraploid,

4x) 5 จีโนม (pentaploid, 5x) เป็นต้น โดยแต่ละชุดของจีโนมอาจเหมือนกันหรือแตกต่างกันก็ได้ สำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานครบเรียกว่า euploid ส่วนสิ่งมีชีวิตที่มีโครโมโซมพื้นฐานไม่ครบแต่ขาดหายไปหรือเพิ่มมาเป็นบางแท่งเรียกว่า aneuploid โพลีพลอยด์อาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous) โดยสาเหตุจากการที่เซลล์มีการจำลองแบบของโครโมโซมแต่กลับไม่มีการแบ่งเซลล์ตามมา จึงทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมของเซลล์ (อมรา, 2540)

โพลีพลอยด์สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ (อมรา, 2540) คือ

1. อัลโลโพลีพลอยด์ (Allopolyploid) หมายถึง การเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมจากพืชต่างชนิดหรือพืชที่มีจีโนมแตกต่างกัน เป็นชนิดที่โครโมโซมที่เพิ่มขึ้นเป็นชุดมีจีโนมต่างกัน แต่มักจะเป็นจีโนมที่มีวิวัฒนาการใกล้ชิดกันเป็นโพลีพลอยด์ที่เกิดจากการผสมระหว่างสปีชีส์ หรือเป็นการผสมข้าม (interspecific hybridization) ซึ่งเป็นชุดของโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นไม่เหมือนกัน เพราะเกิดมาจากพ่อ-แม่ที่มีจีโนมต่างกัน เช่น พ่อแม่ของโพลีพลอยด์ชนิดหนึ่งมีจีโนมเป็น AA และ BB ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) จะเป็น AB ซึ่งลูกผสมที่ได้มักเป็นหมันเพราะขาดคู่โครโมโซมที่เป็นโฮโมโลกัส แต่เมื่อมีการเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมแล้วจะได้โครโมโซมเป็น AABB ลูกผสมที่ได้จะสามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ปกติ การเกิดอัลโลโพลีพลอยด์ ในพืชมักให้ผลผลิตสูงกว่าพืชพวกดิพลอยด์ปกติ ตัวอย่างที่พบเช่น ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ยาสูบ สตรอเบอรี่ และฝ้าย เป็นต้น

2. ออโตโพลีพลอยด์ (Autopolyploid) หมายถึง การเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมจากพืชชนิดเดียวกัน เป็นชนิดที่มีชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้น มีจีโนมเดียวกันกับชุดเดิม การเข้าคู่กันของโฮโมโลกัสโครโมโซม ประกอบด้วยโครโมโซมที่มากกว่า 2 แท่งขึ้นไปเช่น ดิพลอยด์มีจีโนมเป็น AA ซึ่งเมื่อกลายเป็นออโตโพลีพลอยด์จะมีจีโนมเป็น AAAA ตัวอย่างที่เกิดกับพืชเช่น กล้วย ถั่วลิสง และมันเทศ พืชชนิดนี้มักมีผลผลิตสูงกว่าพืชดิพลอยด์ปกติ ออโตโพลีพลอยด์มีประโยชน์ในแง่ของการใช้เป็นสะพานเชื่อมในการผสมข้ามระหว่างพืชชนิดเดียวกันที่มีระดับโครโมโซมแตกต่างกัน หรือแม้กระทั่งการย้ายยีนโดยการผสมข้ามระหว่างพืชคนละชนิด การผสมข้ามระหว่างพืชดิพลอยด์ และเตตระพลอยด์ พบว่า มักจะประสบความสำเร็จเมื่อมีการเพิ่มชุดโครโมโซมของพืชดิพลอยด์ หรือการหาพืชที่สร้างละอองเกสรที่ไม่ลดจำนวนโครโมโซม ซึ่งเหมาะกับพืชเตตระ-พลอยด์

เนื่องจากโพลีพลอยด์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีน้อย มนุษย์จึงหาวิธีในการชักนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเพื่อให้เกิดโพลีพลอยด์ในพืช เพราะว่าพืชที่เป็นโพลีพลอยด์

โดยเฉพาะออโตโพลีพลอยด์จะมีขนาดต้น ใบ ดอกใหญ่ขึ้น แต่ไม่ค่อยมีเมล็ด จึงมีการนำโพลีพลอยด์มาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เพราะพืชที่เป็นโพลีพลอยด์เมื่อนำมาผสมพันธุ์กับต้นอื่นสามารถทำให้เกิดพันธุ์ใหม่ได้ เช่น การปรับปรุงพันธุ์ต้นดิพลอยด์ที่เป็นหมันให้สามารถสืบพันธุ์ได้โดยการชักนำให้เกิดเตตระพลอยด์ หรือ ปรับปรุงพันธุ์ให้พืชไม่มีเมล็ด เป็นต้น ส่วนอวัยวะของพืชที่นิยมนำมาใช้ชักนำให้เป็นโพลีพลอยด์ได้แก่ เมล็ด ดอก ต้นอ่อน กิ่ง ตาข้าง วิธีการที่นำมาใช้ในการชักนำให้พืชเป็นโพลีพลอยด์ (ชะบา, 2527) ได้แก่

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การขยายพันธุ์วิธีนี้ต้นใหม่ที่ได้ควรมีจีโนโทป์เหมือนต้นเดิมทุกประการ เพราะว่าการขยายพันธุ์แบบนี้เป็นผลของการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซีส แต่พบว่าอาจมีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมทำให้ต้นใหม่มีลักษณะต่างไปจากเดิมได้ เพราะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองมีสภาพแวดล้อมที่ต่างไปจากธรรมชาติ อาจทำให้การแบ่งนิวเคลียสผิดปกติ นอกจากนี้การเติมสารเคมีบางอย่างลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ มีโอกาสกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมได้มากขึ้น

2. การผสมพันธุ์

โพลีพลอยด์ระดับทริปพลอยด์อาจได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างต้นดิพลอยด์กับต้นเตตระพลอยด์ เช่น Riley (1967) รายงานว่าเมื่อนำต้น *Papaver somniferum* (2n=2x=22) ผสมกับ *Papaver setigerum* (2n=4x=44) ได้ลูกผสมเป็นทริพลอยด์ (2n=3x=33) เป็นต้น

3. การใช้อุณหภูมิ

มีการทดลองในพืชหลายชนิดโดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิคือ ให้อุณหภูมิสูงขึ้นหรือต่ำลง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ได้ เช่น Burnham (1962) รายงานว่า นำกิ่ง *Rhogo* sp. ไปไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ได้ไมโครสปอร์ที่เป็นโพลีพลอยด์จำนวนมาก เป็นต้น และ Riley (1967) พบว่า พืชที่ได้รับอุณหภูมิสูงสลับกับอุณหภูมิต่ำ โครโมโซมมีความผิดปกติมากกว่าพืชที่ได้รับอุณหภูมิสูงหรืออุณหภูมิต่ำตลอดเวลา

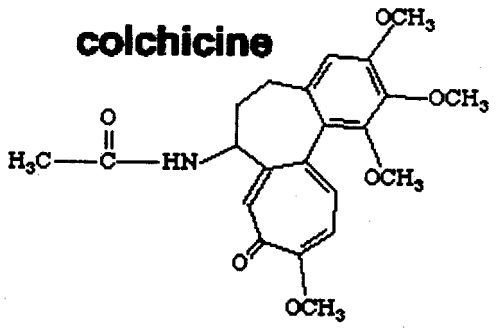
4. การใช้รังสี

รังสีมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมคือ มีการขาดหายหรือเพิ่มของโครโมโซมบางแท่งมีผลทำให้เกิด aneuploid ขึ้น Raghuvanshi และคณะ (1978) นำเมล็ด *Phaseolus aureus* Roxb. ไปอาบรังสีแกมมาที่ได้จากโคบอลล์ 60 แล้วแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2% พบ trisomic เกิดขึ้น แต่ยังไม่มีรายงานว่ารังสีสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่ม

จำนวนชุดของโครโมโซม (euploid) นอกจากนี้รังสีสามารถทำให้เกิด chromosome aberration คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง รูปร่าง และขนาด ของโครโมโซม

5. การใช้สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในพืช เช่น colchicines, oryzalin, ethylmethane-sulphonate (EMS), N-methyl-N-nitro-N′-Nitrosoquanidine (NG), 8-oxyquinoline 5-aqacytidine, N-ethyl-N-nitrosourea (NEU), benzene paradichlorobenzene, nitrogendioxide (NO_2), alpha-bromonaphthalene, ยาฆ่าแมลงบางชนิด เช่น lindane สารเคมีเหล่านี้มีผลต่อโครโมโซมในด้านโครงสร้าง เป็นต้น แต่สารเคมีที่นิยมใช้ชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในพืชคือ การใช้สารโคลชิซิน (colchicine) ซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า Acetyltrimethylcolchicinic acid : (S)-N-(5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzo (a) heptalen-7-yl) acetamine (มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 399.43) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{22}H_{25}NO_6$ (ภาพที่ 5) โคลชิซินมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อนเก็บรักษาในที่มืดอุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส ถึง -25 องศาเซลเซียส โคลชิซินเป็นสารประกอบอัลคาลอยด์ (alkaloid) สกัดได้จากเมล็ดและหัวของพืชพวก autumn crocus (*Colchicum autumnale*) เป็นสารที่เป็นพิษต่อร่างกาย รู้จักกันในฐานะยาที่ใช้รักษาโรคเก๊าต์ โคลชิซินถูกค้นพบโดยนักวิทยาศาสตร์ประมาณปี คศ. 1920 ซึ่งเป็นการค้นพบโดยบังเอิญเมื่อสารละลายโคลชิซินสัมผัสกับเซลล์ที่กำลังแบ่งเซลล์ โคลชิซินมีคุณสมบัติเป็น antimitotic คือไปมีผลต่อการแบ่งเซลล์โดยการยั้บยั้งการสร้างและการพัฒนาเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) ในการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟส กลไกการทำงานของสารโคลชิซิน คือ โมเลกุลของสารโคลชิซินจะเข้าไปเกาะกับ 6S โปรตีน (โปรตีนทูบูลิน)ในเส้นใยสปินเดิลทำให้ไม่มีการสร้าง microtubule (Borisy and Taylor, 1967) ทำให้โครมาทินไม่แยกออกจากกันและเข้าหาขั้วในระยะเมทาเฟส เมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์จึงได้เซลล์ลูกที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้น 2 เท่า โคลชิซินสามารถละลายได้ในน้ำ แล้วละลายได้ในแอลกอฮอล์และคลอโรฟอร์ม และละลายได้เล็กน้อยในเอสเทอร์ โคลชิซินเป็นสารที่ค่อนข้างอันตราย ดังนั้นต้องมีการจัดการที่ดีในการนำมาใช้ และโคลชิซินมักจะใช้กับเมล็ดที่กำลังงอกหรือต้นกล้า ซึ่งในทางปฏิบัติอาจหยดสารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยตรงบริเวณส่วนยอดหรือตาข้าง ซึ่งอยู่ในช่วงที่กำลังแบ่งเซลล์ ทำให้บางส่วนของต้นพืชมีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของสารโคลซิซิน

6. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของสารโคลชิซินในการชักนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม

1. ชิ้นส่วนพืช

วรวุฒิ (2542) รายงานว่า วิธีการใช้สารโคลชิซินกับพืชทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีอาจเหมาะสมกับแต่ละชนิดหรือแต่ละส่วนของพืช เนื่องจากโคลชิซินจะมีผลต่อการแยกตัวของโครโมโซมในขณะมีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นการใช้สารโคลชิซินจึงใช้กับเซลล์บริเวณที่กำลังมีการแบ่งตัวเช่น เมล็ดที่กำลังงอก ยอดและตาข้าง เป็นต้น การใช้สารโคลชิซินกับเมล็ดกระทำได้โดยการแช่เมล็ดลงในสารละลายโคลชิซินก่อนที่นำไปปลูก ด้วยวิธีการนี้จะพบว่าเมล็ดงอกช้าและเปอร์เซ็นต์การงอกลดลง และพืชบางชนิดอาจพบว่าวิธีการนี้ไม่ประสบผลสำเร็จ และการใช้สารโคลชิซินกับต้นอ่อนมักจะให้ผลดีมากกว่าวิธีแช่เมล็ด เนื่องจากรากไม่ถูกทำลายด้วยสารโคลชิซิน ซึ่งวิธีการให้สารโคลชิซินกับยอดของต้นอ่อนอาจทำได้หลายวิธี เช่น จุ่มยอดของต้นพืชลงในสารละลายโคลชิซินโดยตรง หยดสารละลายโคลชิซินลงบนยอดอ่อนหลายๆ ครั้ง ใช้สำลีชุบสารละลายโคลชิซินวางบนยอดอ่อน ผสมสารโคลชิซินกับวุ้นหรือลาโนลิน (lanolin) แล้วนำไปวางไว้บนยอดอ่อน ฉีดสารละลายโคลชิซินเข้าไปในต้นพืชด้วยเข็มฉีดยา หรืออาจใช้วิธีพ่นสารละลายลงไปบนยอดอ่อน

นอกจากนี้ยังมีการทรีตสารโคลชิซินกับตายอดของต้นพืชในหลอดทดลอง เช่น การทดลองในมังคุด (สมปอง และราตรี, 2542) หรือชิ้นส่วนหัวของต้น cyclamen ดอกสีเหลือง (yellow-flowered cyclamen) พบว่า สามารถชักนำให้เกิดต้นโพลีพลอยด์ได้ (Takamura and

Miyajima, 1996) หรือการทรีตปลายรากของ *Butea monosperma* (Raghuvanshi and Kesarwani, 1989) พบว่า ต้นโพลีพลอยด์ที่ได้มีใบขนาดใหญ่ขึ้น ใบมีสีเขียวเข้มขึ้น หรือ Gaonkar และ Torne (1991) ทดลองการชักนำต้นเตตระพลอยด์ใน *Ageratum conyzoides* โดยการป้ายสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.25% บริเวณตายอดของต้นกล้า ผลการทดลองพบว่า ลักษณะที่ปรากฏของต้นเตตระ-พลอยด์ คือ ต้นเตี้ย และอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นดิพลอยด์ ใบหนา

ปิยะดา (2531) ศึกษาผลของสารโคลชิซินที่มีผลต่อขิง ซึ่งเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยแช่ต้นขิงในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0-1% เป็นเวลา 1-4 วัน พบว่า เกิดลักษณะผิดปกติ เช่น ลำต้นอ้วน ใบหนาและกว้าง Srivastav และ Raina (1982) นำสารโคลชิซินมาหยดบนปลายยอดต้นอัญชัน โดยใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0.15% พบว่าสามารถชักนำให้เกิดออโตเตตระ-พลอยด์ได้ 5 ต้น จากจำนวนต้นที่รอดชีวิต 30 ต้น

2. ความเข้มข้นของสารโคลชิซิน

ความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการทรีตสารตัวอย่างเช่น ประชาชาติ และสำเริง (2540) ใช้สารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.01-0.4 % กับเมล็ด ยอด และท่อนพันธุ์หม่อน โดยทำการทรีตในเวลาต่างๆ กันเพื่อชักนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม ส่วน Dwivedi และคณะ (1989) รายงานความสำเร็จของการชักนำเตตระพลอยด์จากการใช้สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 - 0.4 % กับเมล็ด ยอดกิ่ง ท่อนพันธุ์ และช่อดอกตัวเมียของต้นหม่อน เป็นต้น Francis และคณะ (1990) ทดลองทรีตต้นกล้าของข้าวไรน์อายุ 2 สัปดาห์ด้วยสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.2% พบว่า ต้นกล้าที่ได้รับสารโคลชิซินจะกลายเป็นต้นมิกโซ-พลอยด์ มีการทดลองในกุหลาบโดย Robert และคณะ (1990) พบว่า การเติมโคลชิซินความเข้มข้น 0-0.5% ในอาหารเหลวสูตรชักนำรากของกุหลาบ (*Rosa wichuraina*) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถชักนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้ดีที่สุด Chakraborti และคณะ (1998) ศึกษาการชักนำการเกิดเตตระพลอยด์ของต้นหม่อน ในหลอดทดลอง โดยการนำตาข้างมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.2% ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง พบว่า สารโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 และ 0.2% สามารถชักนำต้น เตตระพลอยด์ได้ 39.4% และ 16.7% ตามลำดับ

Kunitake และคณะ (1998) ทำการเพาะเมล็ดหน่อไม้ฝรั่ง เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำรากจากเมล็ดที่งอกไปแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05% เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปเพาะเป็นเวลา 3 เดือน จึงทำการตรวจสอบ พบว่า เกิดต้นเตตระ-พลอยด์ 6% และทริพลอยด์ 6% Roy และคณะ (2001) ศึกษาการชักนำการเกิดเตตระพลอยด์และการเกิดพืชต้นใหม่จากมิกโซพลอยด์ของต้น hop (*Humulus lupulus* L.) ในหลอดทดลอง พบว่า การ

ใช้สารโคลชิซินความเข้มข้น 0.05% นาน 48 ชั่วโมงสามารถชักนำการเกิดเตตระพลอยด์ในต้น hop ได้ 25.6% Wu และ Mooney (2002) ทำการเพิ่มชุดโครโมโซมของพืชตระกูลส้มพันธุ์ 'Umatilla' tangors, 'Dweet' tangors, 'Caffin' Clementine และ 'Wheeny' grapefruit โดยใช้เอ็มบริโอจินิคแคลลัสมาเลี้ยงในห้องทดลองซึ่งอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ เลี้ยงในอาหารสูตร MT ที่เติมสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 และ 0.1% หรือสารโอริซารินความเข้มข้น 0.01 และ 0.05% พบว่า แคลลัสสามารถเจริญเติบโตในสารโคลชิซินได้บางส่วน แต่สามารถพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ ส่วนแคลลัสในสารโอริซารินพบว่า สามารถเจริญเติบได้สมบูรณ์ทุกความเข้มข้น แต่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ และในพันธุ์ 'Umatilla' tangors เกิดต้นออโตเตตระพลอยด์ 3 ต้น จากการทรีตด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0.05% และอีก 1 ต้น จากการใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0.1% และพบต้นมิกโซพลอยด์ 1 ต้นในพันธุ์ 'Dweet' tangors จากการใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0.1%

มยุรี และคณะ (2547) ได้ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในถั่วเขียวผิวมันพันธุ์อู่ทอง 1 โดยใช้สารโคลชิซินที่มีความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ กันที่ตุ่มใบ พบว่า การทรีตด้วยสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 6 วัน ให้ต้นโพลีพลอยด์สูงที่สุด 30% ส่วนที่ความเข้มข้น 0.25% นาน 4 วัน 0.5% นาน 2 วัน 0.5% นาน 4 วัน 1% นาน 1 วัน และ 1% นาน 2 วัน สามารถชักนำให้เกิดต้นโพลีพลอยด์ ได้ 25 15 5 15 และ 10% ตามลำดับ

สมพร และวิทูล (2547) ศึกษาผลของสารโคลชิซินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นหน้าวัวที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้สารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0 0.01 0.05 0.1 และ 1% เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง กับแคลลัสและข้อของต้นหน้าวัว พบว่า อัตราการรอดชีวิตมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารโคลชิซินเพิ่มขึ้น และสารโคลชิซินไม่มีผลต่อการเกิดลักษณะผิดปกติในต้นหน้าวัว

Gu และคณะ (2005) ศึกษาการชักนำการเกิดเตตระพลอยด์จากต้นพุทราพันธุ์ซานหัว (*Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua) ในหลอดทดลอง พบว่าการเลี้ยงปลายยอดของต้นในอาหารเหลวสูตร MS เติมสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.05% เก็บในที่มืด 48 และ 72 ชั่วโมง และความเข้มข้น 0.1% เก็บในที่มืด 24 และ 48 ชั่วโมง สามารถชักนำต้นเตตระพลอยด์ได้ประมาณ 30%

3. วิธีการและระยะเวลา

Griesbach และ Bhat (1990) ศึกษาการชักนำการเกิดโพลีพลอยด์โดยใช้สารโคลชิซินกับต้น *Eustoma grandiflorum* โดยนำสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.5% มาหยดบนยอดต้นกล้า ครั้งละ 1 หยด เป็นเวลา 0 3 และ 5 วัน พบว่า การหยดสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 5 วัน สามารถชักนำต้นโพลีพลอยด์ได้ 3 ต้น จากทั้งหมด 72 ต้น ส่วนที่หยดสารโคลชิซิน 3

วัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงต้นที่ได้เป็นดิพลอยด์เหมือนกับชุดควบคุม และต้นโพลีพลอยด์ที่ได้มีลำต้นแข็งแรงและดอกมีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์

อาริยา (2540) ศึกษาการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในมะนาว โดยทำการเลี้ยงปลายยอดของมะนาว 3 พันธุ์ ในสภาพปลอดเชื้อ คือ Paan, Khai และ Eman มาแช่ในสารละลายโคลชิ-ซินความเข้มข้น 0 0.1 และ 0.2 % นาน 2 4 6 8 12 และ 48 ชั่วโมง เขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ใช้ตัวอย่างละ 25 ต้น/พันธุ์ จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำมะพร้าว 15% BA (benzylaminopurine) 5 mg/l NAA (1-naphthalene acetic acid) 0.5 mg/l และ GA_3 (gibberellic acid) 0.25-1.00 mg/l พบว่า สารโคลชิซินความเข้มข้น 0.1% สามารถชักนำให้เกิดเตตระพลอยด์ได้ 3.45-28.13% จากการแช่สารนาน 2-12 ชั่วโมง ส่วนที่ความเข้มข้น 0.2 ชักนำการเกิดเตตระพลอยด์ได้ 7.84-26.09% จากการแช่สารนาน 2-8 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบการเกิดต้นดิพลอยด์และมิกโซ-พลอยด์เกิดขึ้น จากการใช้สารโคลชิซินความเข้มข้น 0.1% นาน 2-8 ชั่วโมง

ประชาชาติ และสำเริง (2540) ศึกษาการสร้างหม่อนเตตระพลอยด์ โดยใช้หม่อนพันธุ์คุณไพจำนวน 300 ท่อน หยดสารละลายโคลชิซินบริเวณตาของท่อนพันธุ์วันละ 2 ครั้ง เช้าเย็น โดยใช้ความเข้มข้น 0.4% ที่ระยะเวลาๆ ต่างกันคือ 0 1 2 3 4 5 และ 6 วัน พบว่า สามารถชักนำต้นเตตระพลอยด์จำนวน 2 ต้น จากการหยดสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.4 % นาน 3 วัน และอีก 1 ต้น จากการหยดสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.4 % นาน 4 วัน

วรวุฒิ (2542) ทำการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมของต้นบัวบกชนิดดิพลอยด์โดยใช้สำลีชุบสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 1-2% วางลงบนยอดของต้นอ่อน และผสมโคลชิซิน 1-2% กับวุ้น แล้ววางลงบนปลายยอดของต้นอ่อน พบว่า วิธีการแรกสามารถชักนำการเกิดโพลีพลอยด์ได้ดีกว่า

Gao และคณะ (2002) ทำการชักนำการเกิดออโตพลอยด์ของต้น *Scutellaria baicalensis* ในหลอดทดลอง โดยการนำแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร PP_{333} (Paclobutrazol) 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.2% เลี้ยงในระยะเวลา 0 3 5 8 12 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่า ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง สามารถชักนำการเกิดออโตพลอยด์ได้ 40%

Kadota และ Niimi (2002) ศึกษาการชักนำการเกิดเตตระพลอยด์ในต้นแพร์ญี่ปุ่นพันธุ์โคซุย (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui) ที่เป็นดิพลอยด์ในหลอดทดลอง โดยการนำส่วนยอดของต้นมาเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำยอด [shoot proliferation medium (SPM)] เติมสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.1% หรือ 0.01% นำไปอินคูเบท 1 2 4 หรือ 8 วัน หลังจากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร

SPM ที่ไม่เติมสารโคลชิซิน เลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน นำมาตรวจสอบระดับพลอยดีโดยใช้โฟลไซโต-เมทรี พบ 4 ยอด ที่เกิดมิกโซพลอยด์ และอีก 5 ยอด เกิดเตตระพลอยด์

จักรกฤษณ์ และคณะ (2545) ทดลองแช่เมล็ดพืชชนิดต่างๆในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า พืชแต่ละชนิดตอบสนองต่อการชักนำการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมแตกต่างกันดังนี้ ข้าวโพดใช้ความเข้มข้น 0.25% นาน 12 ชั่วโมง เมล็ดผักกาดขาวใช้ความเข้มข้น 0.25% นาน 6 ชั่วโมง เมล็ดผักคะน้าใช้ความเข้มข้น 0.5% นาน 24 ชั่วโมง ส่วนหอมแดงการชักนำการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมจะให้ผลดีเมื่อใช้วิธีฉีดเข้าไปในหัวโดยใช้ความเข้มข้นของโคลชิซิน 0.5% โดยฉีดเป็นจำนวน 1-3 ครั้ง

7. วิธีการในการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม

ความสำเร็จในการชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมจะต้องมีการตรวจสอบ ซึ่งวิธีการตรวจสอบพืชโพลีพลอยด์สามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. ลักษณะสัณฐานวิทยา เมื่อเปรียบเทียบพืชที่เป็นโพลีพลอยด์ มักจะมีลักษณะสัณฐานที่แตกต่างจากพืชดิพลอยด์ ตัวอย่างเช่น ขนาดใบ ดอก หรือผล อาจมีขนาดใหญ่ขึ้น ใบมีสีเขียวเข้มหรือใบหนา (Behera *et al.*, 1974) นอกจากนี้ในพืชบางชนิด เช่น *Ageratum conyzoides* เมื่อชักนำให้เป็นเตตระพลอยด์ลักษณะที่ปรากฏคือ ต้นเตี้ยและอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ (วิมล, 2527; Gaonkar and Torne, 1991) มยุรี และคณะ (2547) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นโพลีพลอยด์ พบว่า ต้นโพลีพลอยด์ที่ได้จะมีลักษณะ ใบหนา อวบ ผิวใบไม่เรียบ ขอบใบหยักขนาดใบใหญ่ มีสีเขียวเข้ม เมล็ดใหญ่แต่การติดเมล็ดลดลง ดอกมีขนาดใหญ่ ลำต้นอวบ สูง จักรกฤษณ์ และคณะ (2545) รายงานว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชด้วยการใช้สารโคล-ชิซินในผักคะน้า ผลที่ได้คือ ต้นคะน้าโพลีพลอยด์ (2n = 4x= 36) ที่ได้มีใบสีเขียวเข้ม ขนาดใบใหญ่ จำนวนใบต่อต้นมากกว่าปกติ และออกดอกช้ากว่าปกติ และในหอมแดงผลการทดลองคือ ต้นโพลี-พลอยด์จะมีใบสีเขียวเข้ม ขนาดหัวสะสมอาหารและใบมีขนาดใหญ่ขึ้น

2. การเปรียบเทียบขนาดและจำนวนปากใบ และการนับจำนวนคลอโรพลาสต์ มีรายงานในพืชหลายชนิดที่พบว่า พืชโพลีพลอยด์จะมีขนาดของปากใบใหญ่กว่าพืชดิพลอยด์ค่อนข้างชัดเจน เช่นการทดลองในมังคุด (สมปอง และราตรี, 2542) หรือในถั่วเขียว (มยุรี และคณะ

, 2547) ใน *Ageratum conyzoides* (Gaonkar and Torne, 1991) ในต้น cyclamen ดอกสีเหลือง (yellow-flowered cyclamen) (Takamura and Miyajima, 1996) พืชตระกูลกะหล่ำ (Eenink, 1980) เป็นต้น สมปอง และราตรี (2542) รายงานว่า ต้นมังคุดที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองและมีการทรีตโดยสารโคลชิซิน เมื่อตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์พบว่า มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอเพิ่มขึ้น Gu และคณะ (2005) ทำการชักนำการเกิดเตตระพลอยด์จากต้นพุทราพันธุ์ซานหัว (*Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua) พบว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะของต้นเตตระพลอยด์กับดิพลอยด์ พบว่า ต้นเตตระพลอยด์มีจำนวนคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้น และขนาดปากใบใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ และผลของสารโคลชิซินที่แสดงออกมาในรูปของลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ เช่น คลอโรฟิลล์ และคลอโร-พลาสต์ ในใบเพิ่มขึ้น และใบมีสีเขียวเข้มขึ้น (Gmitter *et al*., 1991 อ้างโดย สมปอง และราตรี, 2542)

3. ความเป็นหมันของละอองเกสร พบว่า ส่วนใหญ่พืชที่เป็นโพลีพลอยด์มักมีละอองเกสรที่เป็นหมัน เนื่องจากการจับคู่ของโครโมโซมผิดปกติ หรือความมีชีวิตค่อนข้างต่ำกว่าปกติ (Takamura and Miyajima, 1996) ดังนั้นการเปรียบเทียบความมีชีวิตของละอองเกสรอาจเป็นวิธีหนึ่งในการตรวจสอบลักษณะของพืชโพลีพลอยด์

4. ขนาดของต่อมน้ำมัน (พืชตระกูลส้ม) พบว่า ต้นที่เป็นต้นโพลีพลอยด์พื้นที่ใบจะมีสีเขียวเข้ม ต่อมน้ำมันมีขนาดใหญ่ และมีจำนวนน้อย รูปร่างเป็นวงกลม สีเหลืองอ่อน แต่ส้มที่เป็นต้นดิพลอยด์จะพบต่อมน้ำมันจำนวนมาก ขนาดเล็ก รูปร่างเป็นวงกลม สีค่อนข้างเขียว (Barrett, 1974)

5. ขนาดของละอองเกสร ในพืชหลายชนิดเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างพันธุ์ที่มีความแตกต่างของจำนวนชุดโครโมโซมพบว่า พืชโพลีพลอยด์จะมีละอองเกสรขนาดใหญ่กว่าพืชดิพลอยด์หรือพืชแฮพลอยด์ (Takamura and Miyajima, 1996) เช่น ละอองเกสรจากต้นแอปเปิ้ลดิพลอยด์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 43 ไมโครเมตร ส่วนละอองเกสรจากต้นโพลีพลอยด์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 56 ไมโครเมตร (Sanford, 1983 อ้างโดย จรัสศรี, 2548)

6. การนับจำนวนโครโมโซม นับว่าเป็นวิธีการโดยตรงที่แม่นยำและน่าเชื่อถือมาก แต่อย่างไรก็ตาม พืชบางชนิดมีจำนวนโครโมโซมมาก และขนาดของโครโมโซมมีขนาดเล็กมากดังนั้นวิธีนี้จึงมีข้อจำกัดในพืชบางกลุ่ม

7. การใช้โฟลไซโตเมทรี โดยหลักการคือ ทำการแยกเซลล์ออกมาซึ่งทำได้โดยการหั่นส่วนใบพืชเป็นชิ้นบางๆ ด้วยมีดคมในสารละลายสกัดดีเอ็นเอ กรองเอาเฉพาะส่วนของเหลวนำมาย้อมด้วยสารให้สีเรืองแสงเช่น PI (propidium iodide) หรือ DAPI (4,6-bis[2-imidazxolinyl-4H,5H]-2-phenyl indol) วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโตเมทรี โดยจะมีการฉีดพ่น

สารละลายของนิวเคลียสผ่านช่องแคบๆ ในเครื่องให้นิวเคลียสผ่านทีละเซลล์ ผ่านลำแสงซึ่งเมื่อกระทบกับนิวเคลียสที่ย้อมสี เครื่องตรวจสอบจะแปลงค่าการดูดกลืนแสงเป็นกราฟหรือที่เรียกว่าดีเอ็นเอฮีสโตแกรม โดยเทียบกับเซลล์มาตรฐานที่ทราบปริมาณดีเอ็นเอแล้ว (จรัสศรี, 2548) ข้อมูลที่ได้สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพืชโดยอาศัยความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอ สามารถแยกความแตกต่างของพืชที่มีระดับชุดของจีโนมต่างกัน รวมทั้งบอกถึงความผิดปกติของเซลล์ได้ ดังตัวอย่างการทดลองของ Koutoulis และคณะ (2005) ที่รายงานว่าในการตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมที่เกิดจากการเพิ่มชุดจำนวนโครโมโซมโดยใช้สารโคลชิซินกับต้น hop (*Humulus lupulus* L.) นั้นการใช้โฟลไซโตเมทรีในการตรวจสอบการเพิ่มชุดโครโมโซมจะมีประสิทธิภาพมากที่สุด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารโคลชิซินต่อความงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พร
2. เพื่อชักนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรโดยใช้ความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เหมาะสม
3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรหลังได้รับการทรีตโดยสารโคลชิซิน