การปรับปรุงพันธุ์มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) โดยใช้โคลชิซินในหลอดทดลอง

Improvement of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) by Colchicine Treatment *In Vitro*

ราตรี สุจารีย์

Ratree Sujaree

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Science

Prince of Songkla University

2540

เลขหมู่ QK495.G69 T63 2540 ฉ.2

Bib Key 137183

ชื่อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงพันธุ์มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) โดยใช้โคลชิซินในหลอดทดลอง
ผู้เขียน	นางสาวราตรี สุจารีย์
สาขาวิชา	พืชศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม)

.....กรรมการ
(ดร. จรัสศรี นวลศรี)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงพันธุ์มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) โดยใช้โคลชิซินในหลอดทดลอง
ผู้เขียน	นางสาวราตรี สุจารีย์
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2540

บทคัดย่อ

การทรีตตายอดของมังคุดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0 - 1,500 มก./ล. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติแต่ขนาดยอดมีความแตกต่างกัน เมื่อทดลองชักนำรากครั้งที่ 2 พบว่า จำนวนราก จำนวนใบและพื้นที่ใบมีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์พบว่า ในหน่วยการทดลองที่ทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเข้มข้น 500 มก./ล. มีปริมาณคลอโรฟิลล์ a เพิ่มขึ้นแตกต่างทางสถิติกับหน่วยการทดลองอื่นๆ ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์ b และปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซิน แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเพิ่มเวลาในการทรีตเป็น 10 ชั่วโมง และเพิ่มความเข้มข้นเป็น 3,000 - 10,000 มก./ล. พบว่าเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซิน ปริมาณคลอโรฟิลล์ a และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์ b ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซินและเวลาในการทรีตเป็น 30 วัน พบว่าจำนวนยอดเฉลี่ย และการรอดชีวิตของตายอดลดลง การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 500 750 และ 1,000 มก./ล. มีผลให้ความยาวรากเพิ่มขึ้นและจำนวนใบลดลง ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซินเป็น 3,000, 6,000 และ 10,000 มก./ล. เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงโดยเฉพาะความเข้มข้น 10,000 มก./ล. มียอดรอดชีวิตเพียง 12 เปอร์เซ็นต์ ใบร่วงและชะงักการเจริญเติบโต

การทรีตแคลลัสด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0 - 100 มก./ล. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นจาก 10 เป็น 20 มก./ล. แต่จำนวนยอดไม่แตกต่างกันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นจาก 20 เป็น 50 และ 100 มก./ล. เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐาน พบว่าโคลชิซินความเข้มข้น 50 มก./ล. มีผลให้ยอดมีขนาดเล็กที่สุด การทรีตแคลลัสด้วยโคลชิซินความเข้มข้นดังกล่าวมีผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ b เพิ่มขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุมแต่ไม่แตกต่างกันระหว่างเข้มข้น ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์ a และปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดไม่มีการเปลี่ยนแปลง

การตรวจสอบเซลล์ปลายรากพบว่าไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างได้ เนื่องจากโครโมโซมมีขนาดเล็กนับจำนวนไม่ได้ เมื่อตรวจสอบจำนวนและขนาดของเซลล์ปากใบ พบว่าการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเข้มข้น 750 และ 1,000 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน มีเซลล์ปากใบบางเซลล์ใหญ่กว่าปกติ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซินพบว่าเซลล์ปากใบมีสีเข้มขึ้น การทรีตายอดความเข้มข้นน้อยกว่า 750 มก./ล. และการทรีตแคลลัสไม่พบการปลี่ยนแปลงของเซลล์ปากใบ ส่วนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบไม่สามารถนับได้เนื่องจากมีขนาดเล็ก

การศึกษาไอโซไซม์โดยใช้เอนไซม์ 4 ระบบ พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีแถบสีปรากฏแต่ไม่ชัดเจน ส่วนเอนไซม์เอสเทอเรสแถบสีที่ได้เป็นปื้น การใช้บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.25 0.5 และ 0.75 โมลาร์ แถบเอนไซม์ที่ได้ไม่แตกต่างกัน การแยกเอนไซม์โดยใช้วุ้นอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ให้แถบสีคมชัดกว่าความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

Thesis Title	Improvement of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) by Colchicine Treatment *In Vitro*
Author	Miss Ratree Sujaree
Major Program	Plant Science
Academic Year	1997

Abstract

A cluster of mangosteen buds was treated with various concentrations of colchicine ranging from 0 to 1,500 mg/l for 2 hours for varietal improvement. Each concentration provides a non-significant results in mean survival of shoots but proved significant in the size of shoot. When a second set of shoots were rooted a number of roots, leaves and leave areas showed significant difference between the different concentrations and control. Application of 500 mg/l colchicine to a cluster of shoot buds gave an incremental increase of chlorophyll a, significantly higher than other concentrations produced. Chlorophyll b and total chlorophyll also increased with the increasing concentration of colchicine. Increasing dilution treatment duration to 10 hours and concentration to 3,000 to 10,000 mg/l reduced the percentage bud forming shoot, chlorophyll a and total chlorophyll increased, while chlorophyll b showed no change. In the case of treating buds with colchicine at 500, 750 and 1,500 mg/l for 30 days, it was found that average number of shoots, and the percentage of buds forming shoots, decreased. These concentration promoted elongation of roots but reduced the number of leaves, while producing no significant change in chlorophyll. When concentration of colchicine was increased to 3,000, 6,000 and 10,000 mg/l, the percentage of buds forming shoots fell to 12% and developed shoot were stunted, followed by leaf dropping.

Treating callus with 0 to 100 mg/l colchicine for 2 hours generally showed no significant difference, although within the 10-20 mg/l range there was a reduction in shoot numbers. Morphology observation of plantlets showed that 50 mg/l concentration of colchicine produced a harmful effect on shoots. Chlorophyll b production in all of these concentrations was significantly increased, while chlorophyll a and total chlorophyll was not increased.

Root tip chlomosome numbers could not be distinguished between colchicine treatment and control due to the very small size of it. The numbers and sizes of guard cells varied.

Treating with 750 and 1,000 mg/l colchicine for 30 days caused an increment in the size of guard cell. When concentration was increased above this guard cells were observed to have a darker colour; lower concentrations produced no change. Chloroplasts in guard cells could not be counted due to their very small size.

A study on 4 systems of isozyme revealed that peroxidase provided a less clear zymogram, while esterase gave a dark blot blackground. Zymogram patterns obtained from three concentrations of extraction buffers were not significantly different; however, 12% acrylamide gave better results in the sharpness of the zymogram patterns.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาของรองศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต ซึ่งผู้เขียนขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย และขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม ดร.จรัสศรี นวลศรี และ รองศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะ ตรวจแก้ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์สมบูรณ์ถูกต้องยิ่งขึ้น ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ ติดต่อประสานงาน ขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาพืชศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือในการพิมพ์แบบฟอร์ม และติดต่อประสานงานจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณกำลังใจที่สำคัญจากคุณแม่เกษร สุจารีย์ ที่คอยให้กำลังใจตลอดเวลา ตลอดจนพี่และน้องชายที่คอยให้กำลังใจและคอยสนับสนุน ขอบคุณคุณกรกฎ นิตยเดชพัฒน์ และอาจารย์สุทธิรักษ์ แซ่หลิม ที่ให้ความช่วยเหลือเรื่องคอมพิวเตอร์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์

ราตรี สุจารีย์

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	11
2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	12
วัสดุอุปกรณ์	12
วิธีการ	14
3. ผล	22
4. วิจารณ์	49
5. สรุป	55
เอกสารอ้างอิง	57
ภาคผนวก	62
ประวัติผู้เขียน	65

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ชนิดและส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์จากใบมังคุด	20
2. ความเข้มข้นของวุ้นอะคริลาไมด์ที่ใช้ในการศึกษาระบบเอนไซม์	21
3. การเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้นกล้าที่ทรีตตายอดด้วยโคลชิซิน ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ชักนำรากครั้งที่ 1)	22
4. การเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้นกล้าที่ทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ชักนำรากครั้งที่ 2)	23
5. ดัชนีสหสัมพันธ์ (R) ของลักษณะทางสัณฐานบางประการหลังจากทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	24
6. ผลการวิเคราะห์โควาเรียนซ์ระหว่างความยาวรากกับความสูงของยอดหลังจากทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	24
7. การเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐานบางประการจากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 30 วัน	27
8. การเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐานบางประการจากการทรีตแคลลัสด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	29
9. ดัชนีสหสัมพันธ์ (R) ของลักษณะทางสัณฐานบางประการที่ตรวจสอบ	30
10. จำนวนใบจากการทรีตแคลลัสด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากวิเคราะห์โควาเรียนซ์	31
11. ปริมาณคลอโรฟิลล์จากใบของต้นกล้าที่ผ่านการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	38
12. ปริมาณคลอโรฟิลล์จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง	40
13. ปริมาณคลอโรฟิลล์จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน	41
14. ปริมาณคลอโรฟิลล์จากการทรีตแคลลัสด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	43

รายการรูป

รูปที่	หน้า
1. การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 3,000 6,000 และ 10,000 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน	16
2. รากของมังคุดหลังจากวางเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำรากเป็นเวลา 4 สัปดาห์	17
3. ความยาวรากของต้นมังคุดที่ได้จากการทรีตตายอดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	25
4. เปอร์เซ็นต์ยอดที่รอดชีวิตจากการทรีตด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 10 ชั่วโมง	26
5. จำนวนยอดเฉลี่ยจากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน	27
6. เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของตายอดจากการทรีตกลุ่มตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน	28
7. จำนวนยอดเฉลี่ยจากการทรีตโคลชิซินกับแคลลัสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	29
8. จำนวนใบเฉลี่ยของต้นที่ได้จากการทรีตแคลลัสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	32
9. การสร้างแคลลัสบริเวณแผ่นใบจากยอดมังคุดที่ทรีตโคลชิซินเข้มข้น 750 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน (ศรชี้)	33
10. รากที่ชักนำได้จากยอดมังคุดที่สร้างแคลลัสบริเวณแผ่นใบ	33
11. การสร้างยอดบริเวณแผ่นใบจากยอดมังคุดที่ทรีตโคลชิซินความเข้มข้น 750 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน	34
12. ยอดมังคุดที่มีการสร้างราก 5 ราก	35
13. ยอดมังคุดขนาดเล็กที่สามารถสร้างรากได้	35
14. มังคุด 3 ใบ (ศรชี้) ที่ได้จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 750 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน	36
15. โครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของมังคุดที่ได้จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 750 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน (600X)	37
16. ปริมาณคลอโรฟิลล์จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	39
17. ปริมาณคลอโรฟิลล์จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง	40
18. ปริมาณคลอโรฟิลล์จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง	42

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
19.	ปริมาณคลอโรฟิลล์จากการทรีตแคลลัสด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	43
20.	เซลล์ปากใบที่ได้จากการทรีตตายอดและแคลลัสด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ (ก) กับชุดควบคุม (ข) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (600X)	44
21.	เซลล์ปากใบที่ได้จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเข้มข้น 750 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน (ก) กับชุดควบคุม (ข) (600X)	45
22.	เซลล์ปากใบที่ได้จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเข้มข้น 750 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน (ศรเปิด) กับเซลล์ปกติ (ศรปิด) (300X)	46
23.	เซลล์ปากใบจากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเข้มข้น 3,000 มก./ล. เป็นเวลา 10 ชั่วโมง (600X)	46
24.	รูปแบบไซโมแกรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบของต้นที่ทรีตและไม่ทรีตโคลชิซิน	47
25.	รูปแบบไซโมแกรมของเอนไซม์เอสเทอเรสจากใบของต้นที่ทรีตและไม่ทรีตโคลชิซิน	48

ตัวย่อและสัญลักษณ์

2, 4-D	=	2, 4-dichlorophenoxyacetic acid
B5	=	Gamborg medium
BA	=	benzyladenine
BAP	=	benzylamino purine
DMRT	=	Duncan's multiple range test
DNA	=	deoxynucleic acid
GA_3	=	giberellic acid หรือ giberellin A3
HQ	=	8-hydroxyquinoline
IAA	=	indoleacetic acid
IBA	=	indolebutyric acid
MS	=	Murashige and Skoog
Na_2EDTA	=	disodiumethylene diaminetetraacetate
NAA	=	naphthaleneacetic acid
PG	=	phluroglucinol
PVP	=	polyvinylpyrrolidone
RAPDs	=	random amplified polymorphic DNAs
SAS	=	statistic analysis system
SDS	=	sodium dodezyl sulphate
TDZ	=	thidiazuron
Tris-HCl	=	tris-hydroxymethyl aminomethane
WPM	=	woody plant medium

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ชื่อสามัญของมังคุดคือ mangosteen ซึ่งตั้งโดยนักสำรวจชาวฝรั่งเศส ชื่อ Lauren Garcin มังคุดมีการกระจายอยู่ในแถบพื้นที่ใกล้กับแหล่งกำเนิดเท่านั้น ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากเมล็ดพันธุ์เป็นแบบ recalcitrant ซึ่งสูญเสียความงอกอย่างรวดเร็ว ทำให้มีการกระจายตัวต่ำ ประเทศที่มีการปลูกมังคุด ได้แก่ มาเลเซีย พม่า กัมพูชา ไทย และเวียดนาม เป็นต้น มังคุดเป็นไม้ผลที่เมล็ดพันธุ์เจริญเติบโตโดยไม่ได้รับการผสม ทำให้ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม Richards (1990) รายงานว่ามังคุดน่าจะมีถิ่นกำเนิดอยู่ในคาบสมุทรมาลายูโดยเฉพาะประเทศมาเลเซีย ไทย และ อินโดนีเซีย จากการศึกษาพืชในสกุล *Garcinia* ทำให้มีข้อสัณนิษฐานว่ามังคุดอาจจะเป็นลูกผสมระหว่าง *G. hombroniana* และ *G. malaccensis* และจากการศึกษาโครโมโซมพบว่ามีจำนวน 2n = 2x อยู่ในช่วง 56 - 76, 88 - 90, 96 และ 120 - 130 แต่มีบางรายงานพบว่ามังคุดอาจจะเป็นโพลีพลอยด์ชนิดเทตราพลอยด์

มังคุดเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ทำรายได้ปีละ 40 - 50 ล้านบาท พื้นที่ปลูกทั่วประเทศรวม 150,983 ไร่ ผลผลิต 90,263 ตัน (อารมณ์ อุดมสิน, 2537) การขยายพันธุ์มังคุดโดยทั่วไปเป็นการเพาะเมล็ดพันธุ์ ซึ่งวิธีการดังกล่าวได้ต้นกล้าที่มีการเจริญเติบโตช้าและไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเนื่องจากเมล็ดพันธุ์พัฒนาโดยไม่ได้รับการผสม รวี ภักดีกุลสัมพันธ์ และพีระเดช ทองอำไพ (2522) รายงานการศึกษาอับละอองเกสรของมังคุดในระยะดอกบาน พบว่า อับละอองเกสรมีขนาดเล็กมาก เมื่อส่องดูด้วยแว่นขยายและใช้เข็มเขี่ยดูปรากฏว่าไม่พบละอองเกสรจึงได้ทดลองตัดเนื้อเยื่อของอับละอองเกสรตามขวางดูโดยเก็บตัวอย่างดอก 2 ระยะ คือดอกเริ่มแย้มกับดอกบาน พบว่าขนาดของช่องที่จะเกิดละอองเกสรค่อนข้างเล็กและภายในไม่พบละอองเกส ทั้ง 2 ระยะ จึงเป็นข้อสังเกตว่าการติดผลของมังคุดน่าจะเป็นแบบ parthenocarpic และเมล็ดพันธุ์เป็นแบบ apomict ถึงแม้มีรายงานเกี่ยวกับความแตกต่างหรือความแปรปรวนของลักษณะบางประการของมังคุดเช่น สีผล รูปร่างและขนาดผล แต่ไม่มีข้อยืนยันแน่ชัดว่าความแตกต่างดังกล่าวเกิดจากความแตกต่างทางพันธุกรรม สิ่งแวดล้อมก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้ลักษณะดังกล่าวแตกต่างกันได้

จากข้อจำกัดเกี่ยวกับพัฒนาการของเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวข้างต้น ทำให้มังคุดเป็นพืชที่ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม ดังนั้นการชักนำการกลายพันธุ์ในมังคุดเพื่อสร้างความแปรปรวนและเป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์จึงมีความจำเป็น และเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์มังคุดในอนาคต

การปรับปรุงพันธุ์มังคุดด้วยวิธีการมาตรฐานมีความเป็นไปได้น้อยมาก เนื่องจากข้อจำกัดเกี่ยวกับพันธุกรรมและการเจริญเติบโตที่ช้า ส่วนการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการอื่นๆ เช่น การตอนและการต่อกิ่งก็ไม่ประสบผลสำเร็จ ปัจจุบันการขยายพันธุ์มังคุดเพื่อเพิ่มจำนวนต้นกล้าในหลอดทดลองประสบผลสำเร็จด้วยดีจากวิธีการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่นการชักนำยอดรวมโดยตรงจากเมล็ดและใบ (สมปอง เตชะโต และ วันทนา เอ้งย่อง, 2531; สมปอง เตชะโต และคณะ, 2535ข; Goh *et al.*, 1994) และการชักนำยอดรวมผ่านกระบวนการสร้างโนดูลาแคลลัส (Te-chato *et al.*, 1995a, 1995b, 1995c) เป็นต้น ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์มังคุดด้วยวิธีการในหลอดทดลองจึงมีแนวโน้มประสบความสำเร็จสูง การใช้สารเคมีชักนำการกลายพันธุ์ในพืชเป็นวิธีการที่ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น กุหลาบ (Robert *et al.*, 1990) กาแฟ (Lashermes *et al.*, 1994) และพลับญี่ปุ่น (Tamura *et al.*, 1996) ดังนั้นการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบกับการใช้สารเคมี เช่น โคลชิซิน จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่คาดว่าจะชักนำการกลายพันธุ์ในมังคุดเพื่อเป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์มังคุดในอนาคตได้

การตรวจเอกสาร

1. การศึกษาเกี่ยวกับมังคุด

นพรัตน์ บำรุงรักษ์ (2530) รายงานว่าลักษณะเด่นของพืชในสกุล *Garcinia* คือ มียางสีเหลืองหรือยางสีขาวในส่วนต่างๆ พืชในสกุลนี้พบในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หากนำมังคุดไปปลูกในบริเวณอื่นๆ มักไม่ให้ผลผลิตเนื่องจากมังคุดต้องการสภาพภูมิอากาศที่มีลักษณะเฉพาะ ในสภาพที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 38 องศาเซลเซียส ต้นมังคุดจะตาย เมื่อปลูกในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส ต้นมังคุดจะแคระแกร็น ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมจึงอยู่ในช่วง 25 - 35 องศาเซลเซียสและมีความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ มังคุดที่ปลูกกันในปัจจุบันมี โครโมโซม 2n = 2x = 96 ในขณะที่พืชในสกุล *Garcinia* อื่นๆ มีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 48

2. การขยายพันธุ์มังคุดในหลอดทดลอง

สมปอง เตชะโต และ วันทนา เอ้งย่อง (2531) ได้ศึกษาถึงวิธีการเพิ่มปริมาณต้นกล้ามังคุดในระยะเวลาอันสั้นเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกร พบว่าสามารถทำได้โดยการนำเมล็ดพันธุ์มังคุดมาวางเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง MS (Murashige and Skoog) เติม BA (benzyladenine) เข้มข้น 20 - 50 ไมโครโมลาร์ ได้ต้นกล้าขนาดเล็กสูงประมาณ 5 มิลลิเมตร จำนวน 20 ต้นต่อชิ้นส่วน เมื่อย้ายต้นกล้าไปวางเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมที่ลดความเข้มข้นของ BA ลงเหลือ 1 ไมโครโมลาร์ ทำให้ยอดยืดยาวขึ้น เมื่อวางเลี้ยงจนยอดมีขนาดประมาณ 2 เซนติเมตร ตัดแยกไปเลี้ยงเพื่อชักนำรากในอาหารสูตรดัดแปลง MS เติม IAA (indoleacetic acid) เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ BA เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และผงถ่าน 0.25 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายอดมีการสร้างราก สามารถย้ายลงแปลงปลูกได้

Noor (1992) รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมังคุดเพื่อแก้ปัญหาข้อจำกัดในการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดพันธุ์และวิธีการพื้นฐานอื่นๆ ตลอดจนการปรับปรุงพันธุ์และการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ จากการทดลองพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดพันธุ์ที่ตัดแยกในอาหารสูตร MS เติม 2, 4 - D (2 , 4 - dichlorophenoxyacetic acid) 20 - 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP (benzylaminopurine) 30 - 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการพัฒนาของแคลลัสจากเมล็ดพันธุ์ อย่างไรก็ตามแคลลัสที่ได้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมต่อไปเป็นเวลา 3 สัปดาห์

นอกจากการชักนำยอดจากเมล็ดพันธุ์แล้วยังสามารถชักนำยอดจากชิ้นส่วนอื่นๆ ได้ เช่น การชักนำยอดจากใบ ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำยอดจากใบได้แก่ อายุของชิ้นส่วนใบและลักษณะการวางชิ้นส่วนใบบนอาหารเพาะเลี้ยง Goh และคณะ (1988) สามารถชักนำยอดจากใบอ่อน

สีแดงอายุ 7 - 12 วันบนอาหารสูตร 1/2 MS (MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง), WPM (woody plant medium) และ B_5 (Gamborg medium) พบว่ามีอัตราการสร้างยอด 6, 12 และ 6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อัตราการสร้างยอดมีความแตกต่างกันในแต่ละส่วนของใบ บริเวณใกล้กับก้านใบมีการสร้างยอดมากกว่าบริเวณปลายใบ และบริเวณเส้นกลางใบมีการสร้างยอดมากกว่าบริเวณแผ่นใบ นอกจากนี้ยังพบว่าไม่สามารถชักนำยอดจากใบที่วางเลี้ยงโดยไม่ตัดแบ่ง ส่วนใบที่ตัดแบ่งเป็น 2, 3 และ 4 ส่วน สามารถชักนำการสร้างยอดได้โดยเฉพาะบริเวณโคนใบของใบที่ตัดแบ่งเป็น 2 ส่วน ในขณะที่ใบอ่อนสีเขียวไม่สามารถชักนำการสร้างยอดได้

สมปอง เตชะโต และคณะ (2535ก) รายงานว่าต้นมังคุดที่ได้จากการเพาะเมล็ดพันธุ์ให้ผลผลิตช้าและไม่ทนทานต่อสภาพแห้งแล้ง ดังนั้นการหาพันธุ์พืชสกุลใกล้เคียงกันที่มีความสามารถทนแล้งจะช่วยให้การผลิตมังคุดเป็นไปได้ดีขึ้น และคาดว่าเป็นการร่นเวลาในการให้ผลผลิต การต่อกิ่งมังคุดในสภาพแปลงปลูกมีปัญหาเรื่องยางบริเวณรอยแผล ทำให้เนื้อเยื่อประสานกันไม่ได้ ดังนั้นการต่อกิ่งในหลอดทดลองน่าจะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ จากการทดลองต่อกิ่งมังคุดและมะพูดบนต้นตอพะวาด้วยวิธีการต่างๆ พร้อมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ พบว่าการหุ้มรอยต่อด้วยพาราฟลาสต์ประสบผลสำเร็จในการต่อกิ่ง 100 เปอร์เซ็นต์ วิธีการต่อกิ่งแบบเสียบลิ่มให้ผลสำเร็จสูงสุด การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด GA_3 (gibberellic acid) มีแนวโน้มช่วยให้เปอร์เซ็นต์การต่อกิ่งประสบผลสำเร็จสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ BA และไม่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

สมปอง เตชะโตและคณะ (2535ข) ศึกษาการชักนำยอดรวมจากใบอ่อนสีแดงของมังคุดโดยกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซีส พบว่าการเพาะเลี้ยงใบในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างกลุ่มตารวมสูงสุด 33.33 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดสูงสุดเฉลี่ย 40 ยอดต่อใบ จากการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าตารวมมีพัฒนาการโดยกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซีสซึ่งมีกำเนิดมาจาก 2 แหล่ง คือ เนื้อเยื่อเจริญมัดท่อน้ำท่ออาหาร (vascular cambium) ของเส้นกลางใบและเส้นใบย่อย ส่วนอีกแหล่งพัฒนามาจากเซลล์ผิวใบ (epidermal cell) เซลล์ดังกล่าวมีความเข้มข้นของไซโตพลาสซึมสูง มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ในสภาพที่มีอัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงจึงสามารถพัฒนาเป็นอวัยวะใหม่ได้ดี การพัฒนาของเนื้อเยื่อมีความคล้ายคลึงกับการพัฒนาของโปรแคมเบียมภายในเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS เติม BA ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ เมื่อเลี้ยงตายอดที่ได้บนอาหารเดิมเป็นเวลานานหรือย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิม ตายอดมีการพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ประกอบด้วยปลายยอด ใบจริงคู่แรก และราก

Goh และคณะ (1994) ได้ทดลองชักนำการสร้างยอดโดยตรงจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน

สีแดงของมังคุด จากการทดลองพบว่าใบอ่อนอายุประมาณ 10 วัน ที่ตัดแบ่งเป็นชิ้นส่วนตามขวาง ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร สามารถชักนำการสร้างยอดได้สูงสุดเมื่อวางเลี้ยงในอาหารสูตร WPM เติม BA 20 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และ Phytagel 2.5 กรัมต่อลิตร ได้ยอดเฉลี่ย 45 ยอดต่อใบ ยอดสามารถยืดยาวได้ดีเมื่อตัดแยกไปวางเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเติม BA 5 ไมโครโมลาร์ เมื่อยอดมีความยาวประมาณ 10 - 15 มิลลิเมตร ตัดแยกยอดไปชักนำรากในอาหารเติม IBA สามารถชักนำรากได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากเฉลี่ย 1 รากต่อต้น

Huetteman และ Preece (1993) รายงานว่า TDZ (thidiazuron) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงไม้เนื้อแข็ง TDZ มีผลยับยั้งการยืดยาวของยอด แต่ในบางกรณีพบว่าการใช้ TDZ ความเข้มข้นต่ำเติมในอาหารส่งผลให้ยอดยืดยาวได้ดีขึ้น การใช้ TDZ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่นทำให้ประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูงกว่าการใช้ TDZ เพียงอย่างเดียว

Te-chato และคณะ (1995a) รายงานการวางเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้ามังคุดในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าใบอ่อนสีม่วงมีการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงที่สุด รองลงมาเป็นใบอ่อนสีเขียว ก้านใบและเมล็ดตามลำดับ การใช้ BA กับ TDZ ความเข้มข้นเท่ากันคือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการสร้างแคลลัสได้ดีที่สุด สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเลี้ยงแคลลัสคือ อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส เวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,700 ลักซ์ ภายใต้สภาพแวดล้อมดังกล่าว พบว่าแคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณได้ 2 - 3 เท่า เมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ การเติม NAA ลงในอาหารเลี้ยงแคลลัส ส่งผลให้แคลลัสกลายเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

Te-chato และคณะ (1995b) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงต้นอ่อนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์ ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำการสร้างใบอ่อนสีม่วงได้ดี เมล็ดที่ผ่านการตัดแยกยอดแล้วย้ายไปวางเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม สามารถชักนำการสร้างแคลลัสได้ดีกว่าเมล็ดที่ไม่ผ่านการตัดแยกยอด เมื่อเปรียบเทียบผลของ BA และ TDZ ต่อการสร้างใบอ่อนสีม่วงและการสร้างแคลลัส พบว่า TDZ มีประสิทธิภาพสูงกว่า BA อย่างไรก็ตามการใช้ TDZ และ BA มีผลใกล้เคียงกับการใช้ TDZ เพียงอย่างเดียว

Te-chato และคณะ (1995c) รายงานว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้จากใบอ่อนสีม่วงสามารถเติบโตเพิ่มปริมาณได้ดีเมื่อวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม PVP (polyvinylpyrrolidone) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทดลองย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไปวางเลี้ยงในอาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีการพัฒนาของใบคู่แรกและยอดยืดยาวขึ้น หลังจากย้ายเลี้ยง 2 - 3 ครั้ง สามารถตัดแยกยอด

มังคุดไปชักนำรากโดยการกรีดสร้างบาดแผลบริเวณฐานยอด แล้วจุ่มแช่ในสารละลาย IBA (indolebutyric acid) 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที ย้ายยอดที่เตรียมได้ไปเลี้ยงในอาหารสูตร WPM เติม BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร PG (phluroglucinol) 5.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่านความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงแรกวางเลี้ยงในที่มืด 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายไปวางเลี้ยงในสภาพมีแสง พบว่าสามารถชักนำรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์

3. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโคลชิซิน

โคลชิซิน มีชื่อทางเคมีคือ (S) - N - (5, 6, 7, 9 - tetrahydro - 1, 2, 3, 10 - tetramethoxy - 9 - oxobenzo[a]heptalen - 7 - yl) acetamide เป็นสารอัลคาลอยด์ที่พบมากในโครคัส (*Colchicum autumnale* L.) และดองดึง (*Gloriosa superba* L.) มีบทบาทในการเพิ่มชุดโครโมโซม โดยไปยับยั้งการสร้างสายใยสปินเดิ้ลในการแบ่งเซลล์ระยะเมตาเฟส กลไกการทำงานของโคลชิซินคือโมเลกุลโคลชิซินจะเข้าเกาะกับ 6S โปรตีนในสปินเดิ้ลทำให้ไม่มีการสร้างไมโครทูบูล (Borisy and Taylor, 1967) ดังนั้นเมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์จึงได้เซลล์ลูกที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า มีรายงานการใช้โคลชิซินในการศึกษาทางเซลล์วิทยาและการเพิ่มชุดโครโมโซมในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะพืชที่ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศหรือเมล็ดพันธุ์พัฒนาโดยไม่ได้รับการผสม ทำให้มีฐานพันธุกรรมแคบซึ่งเป็นข้อจำกัดในการปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้นการใช้โคลชิซินเพื่อชักนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ การใช้โคลชิซินในรูปสารละลายในน้ำกับต้นกล้าของพืชด้วยวิธีการต่างๆ เช่น จุ่มรากในสารละลายโคลชิซินซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้กันอยู่ทั่วไป (Lichter *et al.*, 1988) นอกจากนี้ยังมีการใช้เข็มขนาดเล็ก ฉีดสารละลายโคลชิซินเข้าสู่ตายอดและใช้สำลีจุ่มสารละลายโคลชิซินป้ายบริเวณตายอด ความเหมาะสมและความสำเร็จของแต่ละวิธีการขึ้นอยู่กับชนิดของพืช อย่างไรก็ตาม การทดลองส่วนใหญ่พบว่าการใช้โคลชิซินในหลอดทดลองประสบผลสำเร็จสูง

4. ผลของโคลชิซิน

Behera และคณะ (1974) รายงานว่าโคลชิซินมีผลให้คลอโรพลาสต์ในใบเพิ่มขึ้น ทำให้ใบมีสีเขียวเข้มขึ้น Butterfass (1983) รายงานว่าจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบมีความสัมพันธ์โดยตรง กับปริมาณ DNA ในนิวเคลียส และนิวเคลียสมีผลควบคุมการสร้างคลอโรพลาสต์

Raghuvanshi และ Kesarwani (1989) ทดลองทรีตปลายรากของ *Butea monosperma* ด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นตัดปลายรากมาตรวจสอบโครโมโซมโดยทรีตด้วย p-dichlorobenzene เป็นเวลา 90 นาที หลังจากนั้นล้างออกและตรึงในสารละลายของ

แอลกอฮอล์และกรดอะซิติก สัดส่วน 1 : 3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดึงน้ำออกจากปลายราก โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 - 10 นาที ล้างราก แล้วเก็บใน iron alum เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นล้างรากแล้วแช่ใน heamatoxylin 18 - 20 ชั่วโมง บดปลายรากในกรดอะซิติกความเข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ ศึกษาโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากการทดลองพบว่าเมื่อมีการเพิ่มชุดโครโมโซมสูงขึ้นจากปกติ 2 - 3 เท่า ในเซลล์ลูกบางเซลล์มีการกำจัดโครโมโซมชนิด B ทิ้งไป ทั้งนี้อาจจะมีสาเหตุเนื่องมาจากความแปรปรวนของกิจกรรมของสายใยสปินเดิ้ล ทำให้เซลล์ลูกที่ได้มีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน

Francis และคณะ (1990) ทดลองทรีตต้นกล้าของหญ้าไรย์อายุ 2 สัปดาห์ ด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซินแสดงลักษณะเป็นมิกโซพลอยด์ หลังจากต้นมิกโซพลอยด์มีการเติบโตไประยะหนึ่ง แยกหน่อชนิดดิพลอยด์และเทตราพลอยด์ออกจากต้นแม่ เปรียบเทียบลักษณะต่างๆ ของต้นดิพลอยด์ที่ได้รับโคลชิซินกับต้นดิพลอยด์ในชุดควบคุม จากการทดลองพบว่าต้นดิพลอยด์ที่ได้รับโคลชิซินมีขนาดเซลล์มีโซฟิลล์และจำนวนคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์สถิติพบว่าการเพิ่มขึ้นของขนาดเซลล์มีโซฟิลล์และจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์ไม่มีความสัมพันธ์กัน

Robert และคณะ (1990) ทดลองทรีตโคลชิซินกับกุหลาบ (*Rosa wichuraina*) ชนิดดิพลอยด์เพื่อประโยชน์ในการช่วยชีวิตลูกผสมจากพ่อแม่ที่มีพันธุกรรมต่างกัน โดยเติมโคลชิซินความเข้มข้น 0.01 - 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวสูตรชักนำรากของกุหลาบ จากการศึกษาทางเซลล์วิทยาพบว่า การใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ทรีตรากเป็น เวลา 12 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการสร้างสายใยสปินเดิ้ลได้ดีที่สุด ในการทดลองนี้ได้ศึกษาวงจรของการแบ่งเซลล์โดยใช้ ^{3}H-thymidine เป็นตัวติดตาม พบว่าวงจรของการแบ่งเซลล์ในเซลล์ที่ไม่ได้รับโคลชิซิน ใช้เวลา 10 ชั่วโมง และการทรีตโคลชิซินทำให้วงจรของการแบ่งเซลล์ยาวนานขึ้นเป็น 12 ชั่วโมง สาเหตุที่วงจรของการแบ่งเซลล์ใช้เวลายาวนานขึ้นเนื่องมาจากความแปรปรวนในการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีสและการเปลี่ยนแปลงในระยะอินเตอร์เฟส

Gaonkar และ Torne (1991) ทดลองชักนำต้นเทตราพลอยด์ใน *Ageratum conyzoides* โดยการป้ายโคลชิซินความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์บริเวณตายอดของต้นกล้า หลังจากต้นที่ได้รับโคลชิซินโตเต็มที่จึงตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของความสูง ความกว้างต่อความยาวของใบ ขนาดของเซลล์ปากใบ ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์โดยการย้อมสีอะซีโตออร์ซีน ผลการทดลองพบว่า ต้นเทตราพลอยด์มีลักษณะเตี้ยและอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นดิพลอยด์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตมีการเปลี่ยนแปลง ทำให้ต้นเทตราพลอยด์มี

พัฒนาการผิดปกติ ใบของต้นเทตราพลอยด์มีลักษณะหนาขึ้นอาจจะเกิดจากการเพิ่มขึ้นของขนาดเซลล์

Patil (1992) ได้ทดลองชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมของ *Crotalaria linifolia* โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มคุณภาพในการผลิตอาหารสัตว์ ทำการทรีตเมล็ดและต้นกล้าด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ จากการทดลองพบว่าประสบผลสำเร็จเมื่อทรีตโคลชิซินกับต้นกล้า การเปลี่ยนแปลงที่ตรวจพบคือขนาดใบ ดอกและละอองเกสร มีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนความสูงของ ลำต้น ความยาวช่อดอก จำนวนดอกต่อช่อ จำนวนฝัก ขนาดฝักและจำนวนเมล็ดต่อฝักมีการเปลี่ยนแปลงลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าดอกบานช้ากว่าปกติ การเปลี่ยนแปลงที่มีแนวโน้มลดลงอาจจะเนื่องมาจากอัตราเมตาบอลิซึม (metabolism) ลดลง

Zeppernick และคณะ (1994) รายงานการเปรียบเทียบต้นยาสูบชนิดแฮพลอยด์ และดิพลอยด์ พบว่าต้นแฮพลอยด์มีใบแคบและมีความเข้มข้นของ GA_3 ในใบสูงขึ้น ส่วนการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีตัวอื่นๆ เช่น นิโคติน ไม่สามารถสรุปได้ว่าเกิดจากการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซมหรือไม่ จากการทดลองสรุปว่าไม่สามารถใช้ปริมาณสารชีวเคมีเป็นตัวตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของชุดโครโมโซมได้

Lashermes และคณะ (1994) ทดลองทรีตโคลชิซินบริเวณตายอดของกาแฟชนิดแฮพลอยด์แล้วนำต้นแฮพลอยด์ที่เพิ่มชุดโครโมโซมได้มาทดสอบลักษณะในแปลงปลูก จากการทดลองพบว่าต้นแฮพลอยด์ที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นมีอัตรารอดชีวิตเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากการถดถอยทางพันธุกรรมทำให้ความแข็งแรงลดลง ลักษณะที่ศึกษามีหลายลักษณะเช่น รูปร่างใบ ความต้านทานต่อโรคราสนิม ความสมบูรณ์เพศและน้ำหนัก 100 เมล็ดเป็นต้น จากการศึกษาพบว่าลักษณะที่เปลี่ยนแปลง เช่นความแข็งแรงและความสมบูรณ์เพศลดลง การให้ผลผลิตลดลงเป็นลักษณะที่มีแนวโน้มไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แต่อย่างไรก็ตามสามารถใช้ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงเป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์กาแฟในอนาคตได้

Moller และคณะ (1994) ทดลองเติมโคลชิซินความเข้มข้น 10 - 100 พีพีเอ็ม ในอาหารเหลวสูตรเพาะเลี้ยงละอองเกสรของ *Brassica napus* อินคิวเบทเป็นเวลา 6 - 72 ชั่วโมง นำละอองเกสรที่ได้วางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ จนมีการพัฒนาเป็นเอ็มบริออยด์ ทดสอบการเปลี่ยนแปลงของชุดโครโมโซมโดยใช้เทคนิค flow cytometry จากการทดลองพบว่า สามารถเพิ่มชุดโครโซมได้สูงสุด 80 - 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออินคิวเบทละอองเกสรเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในอาหารเหลวเติมโคลชิซินความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม ในขณะที่เวลาอินคิวเบทเท่ากันแต่เพิ่มความเข้มข้นเป็น 100 พีพีเอ็ม สามารถเพิ่มชุดโครโมโซมได้เพียง 76 - 80 เปอร์เซ็นต์ การใช้เวลาอินคิวเบทเพียง 6 ชั่วโมงไม่เพียงพอในการเพิ่มชุดโครโซม อย่างไรก็ตามพบว่าความเข้มข้นที่ใช้มีความสัมพันธ์กับ

เวลา ในกรณีที่มีการใช้ความเข้มข้นต่ำหากเพิ่มระยะเวลาในการอินคิวเบทก็สามารถชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมได้เช่นกัน

Tamura และคณะ (1996) รายงานการเพิ่มชุดโครโมโซมของต้นพลับญี่ปุ่น โดยทดลองใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เติมในอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงแบบ อากาโรสบีดเป็นเวลา 3 - 9 วัน เมื่อโปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นแคลลัสจึงนำไปตรวจสอบปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค flow cytometry จากการทดลองพบว่าประสบความสำเร็จในการเพิ่มชุด โครโมโซมในการทรีตโคลชิซินความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลา 6 วัน พบแคลลัส 9 ชิ้น จากแคลลัสทั้งหมด 31 ชิ้น มีปริมาณ DNA เพิ่มขึ้น เมื่อแคลลัสที่มี DNA เพิ่มขึ้น พัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์จึงตัดปลายรากมาตรวจสอบชุดโครโมโซม พบว่ามีชุดโครโมโซมเพิ่ม เป็น 2 เท่า และเมื่อตรวจสอบเซลล์ปากใบพบว่าเซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น

5. การศึกษาระบบเอนไซม์

เอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกริยาทางเคมี ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ควบคุมการสร้างจากยีน ยีนเริ่มต้นที่แตกต่างกันจะควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน มีคุณสมบัติต่างกันแต่สามารถแสดงกิจกรรมที่จำเพาะกับสารตั้งต้นที่เหมาะสมได้เหมือนกัน เรียกว่า ไอโซไซม์ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไอโซไซม์เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้ ไอโซไซม์มีผลเกี่ยวกับยีนโดยตรงเพราะเอนไซม์คือโปรตีนที่เป็นผลผลิตตัวแรกซึ่งเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน ดังนั้นเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ในยีนย่อมมีผลต่อการสร้างโปรตีน การศึกษาระบบเอนไซม์โดยอาศัยเทคนิคทางอิเลคโตรโฟริซีส สามารถจำแนกเอนไซม์ตามชนิดและปริมาณประจุ ขนาด และรูปร่างของเอนไซม์และย้อมสีที่จำเพาะกับเอนไซม์ชนิดนั้นๆ

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซมในพืชบางชนิดทำได้ยาก เช่นการทดลองในแอปเปิ้ล (Batlle and Alston, 1994) พบว่าโครโมโซมมีขนาดเล็ก ตรวจการเปลี่ยนแปลงได้ยาก การศึกษาระบบไอโซไซม์เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในพืชได้ ไซโมแกรมของโพลีพลอยด์มักจะมีมากกว่าโมโนพลอยด์ จากการทดลองในแอปเปิ้ลพบว่าสามารถใช้เอนไซม์กลูตามิคออกซาโลอะซิติกทรานอะมิเนส ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของชุดโครโมโซมระหว่างพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมได้

Solar และคณะ (1994) รายงานการตรวจสอบความแปรปรวนของประชากร walnut 17 พันธุ์ โดยใช้เอนไซม์ 4 ระบบ คือ มาเลทดีไฮโดรจีเนส 6-ฟอสโฟกลูโคเนทไฮโดรจีเนส เปอร์ออกซิเดสและเอสปาเทสอะมิโนทรานเฟอเรส พบว่าสามารถตรวจสอบความแตกต่าง ของ

ประชากร walnut ได้โดยใช้การตรวจสอบเอ็นไซม์ 6-ฟอสโฟกลูโคเนทไฮโดรจีเนส และเปอร์ออกซิเดส ที่สกัดจากใบอ่อน

วันทนา นวรังสรรค์ (2538) รายงานการจำแนกพันธุ์พืชในสกุล *Lansium* โดยใช้ไอโซไซม์ทั้งหมด 7 ระบบ คือแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส แอซิดฟอสฟาเตส เอสเตอเรส มาเลทดีไฮโดรจีเนส เปอร์ออกซิเดส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรสและฟอสโฟกลูโคมิวเตส พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส แยกความแตกต่างได้ดีที่สุด รองลงมาคือเอสเทอเรส ส่วนเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ไม่สามารถแยกความแตกต่างของพืชในสกุลนี้ได้ ความเร็วในการปั่นตกตะกอนเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ส่วนบัฟเฟอร์ ที่เหมาะสมคือ tris-HCl (tris-hydroxymethyl aminomethane) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ เติม PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ Na_2EDTA (disodiumethylenediaminetetraacetate) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และ 2-mercapthoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ที่เหมาะสมที่สุดคือ 12 เปอร์เซ็นต์

Warren (1994) รายงานการตรวจสอบความแปรปรวนของไอโซไซม์ในประชากรของโกโก้ที่ได้จากแหล่งต่างๆ เพื่อประโยชน์ในการศึกษาแหล่งกำเนิด เอนไซม์ที่ใช้ตรวจสอบมี 4 ระบบคือ แอซิดฟอสฟาเตส มาเลทดีไฮโดรจีเนส ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส และฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ใช้ทริสบัฟเฟอร์เป็นบัฟเฟอร์ของตัวอย่าง จากการทดลองพบว่าสามารถใช้เอนไซม์ทั้ง 4 ระบบร่วมกันในการตรวจสอบความแปรปรวนของประชากรโกโก้ได้ เอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนสและฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส มีเพียงตำแหน่งเดียว ส่วนเอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนสมี 3 ตำแหน่ง ที่สามารถใช้จำแนกความแตกต่างได้

จากรายงานการทดลองที่ผ่านมาทำให้มีแนวคิดว่า การใช้โคลชิซินทรีตมังคุดน่าจะเป็นการชักนำความแปรปรวนที่ดีอีกวิธีการหนึ่ง มังคุดที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นน่าจะมีการเจริญเติบโตดีขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนโครโมโซม ปริมาณคลอโรฟิลล์และรูปแบบของไอโซไซม์ และสามารถใช้ความแปรปรวนที่เกิดขึ้น เป็นฐานพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์มังคุดต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ ยังสามารถใช้ความรู้จากการทดลองในครั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการศึกษาวิธีการชักนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมตลอดจนการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของพืช ทั้งการศึกษาในมังคุดและในไม้ยืนต้นชนิดอื่น

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการปรับปรุงพันธุ์มังคุดในหลอดทดลองโดยใช้โคลชิซิน
   1.1 ศึกษาแหล่งของชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้โคลชิซิน
   1.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการทรีตโคลชิซินกับชิ้นส่วนต่างๆ
   1.3 ศึกษาความเข้มข้นของโคลชิซินที่เหมาะสมในการชักนำการกลายพันธุ์ของมังคุด
2. ศึกษาผลของโคลชิซินที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์และลักษณะทางสัณฐานบางประการ
3. นำความรู้ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ไม้ยืนต้นชนิดอื่นต่อไป

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุพืช

เก็บรวบรวมใบอ่อนสีแดงของมังคุดจากต้นในแปลงปลูกมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 25 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้ววางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดโดยวางให้ด้านหลังของใบสัมผัสกับอาหาร หลังจากมีการพัฒนาของพืชต้นใหม่ในหลอดทดลองจึงชักนำโนดูลาแคลลัส โดยใช้ใบจากต้นมังคุดขนาดเล็กในหลอดทดลองมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำโนดูลาแคลลัส และย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมเพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสหรือย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำยอด หลังจากวางเลี้ยงชักนำยอดเป็นเวลา 1 เดือน เติมอาหารเหลวสูตร 1/2 MS แล้ววางเลี้ยงต่ออีก 1 เดือน หลังจากนั้นจึงย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำยอด เพื่อเตรียมสำหรับใช้ในการทรีตด้วยโคลชิซินต่อไป

2. อาหารสังเคราะห์และวิธีการเตรียม

2.1 สูตรอาหารชักนำยอดจากการเพาะเลี้ยงใบ

ใช้อาหารสูตร WPM เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงใบอ่อนสีแดงของมังคุดเพื่อชักนำยอด

2.2 สูตรอาหารชักนำโนดูลาแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบ

ใช้อาหารสูตร MS เติม PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงใบมังคุดที่ได้จากต้นขนาดเล็กในหลอดทดลอง เมื่อสร้างโนดูลาแคลลัสจึงย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเพื่อเพิ่มปริมาณโนดูลาแคลลัส

2.3 สูตรอาหารชักนำยอดจากการเพาะเลี้ยงโนดูลาแคลลัส

ใช้อาหารสูตร WPM เติม PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการพัฒนาของยอดจากโนดูล เมื่อมีการสร้างยอดขนาดเล็กจึงย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมหรือเติมอาหารเหลวสูตรส่งเสริมการยืดยาวของยอด

2.4 สูตรอาหารส่งเสริมการยืดยาวของยอด

เมื่อมังคุดสร้างยอดขนาดเล็กขนาดประมาณ 2 - 5 มิลลิเมตร เติมอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงบนอาหารแข็งสูตรชักนำยอดเพื่อให้ยอดยืดยาว

2.5 สูตรอาหารชักนำรากจากยอด

ใช้อาหารสูตร WPM เติม BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร PG 6.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ ผงถ่าน 0.25 เปอร์เซ็นต์

สำหรับอาหารแข็งสูตร MS ใช้ผงวุ้นเจลไรท์ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสูตร WPM ใช้ผงวุ้นเจลไรท์ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (องค์ประกอบของสูตรอาหารแสดงในภาคผนวกที่ 1) อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 5.8 ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที

8. สภาพแวดล้อมในการเลี้ยง

เลี้ยงแคลลัสภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เมื่อมีการพัฒนาเป็นยอดจึงย้ายไปวางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เวลาให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส

4. การทรีตโคลชิซิน

เตรียมโคลชิซินในรูปสารละลายความเข้มข้น 30,000 มิลลิกรัมต่อลิตร กรองฆ่าเชื้อด้วยกระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาด 0.45 ไมครอน ปรับความเข้มข้นที่ต้องการใช้ด้วยอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อต้องการทรีตตายอดและแคลลัสมังคุดเป็นเวลา 0 - 10 ชั่วโมง ใช้วิธีเลี้ยงชิ้นส่วนดังกล่าวในอาหารเหลว ส่วนการทรีตเป็นเวลา 10 วัน หรือ 1 เดือน ใช้วิธีเติมอาหารเหลวลงไป 10 มิลลิลิตร บนอาหารแข็งซึ่งเลี้ยงตายอดอยู่ ในกรณีของการทรีตด้วยความเข้มข้นสูงใช้วิธีการเติมโคลชิซินในอาหารเหลวโดยตรง แล้วกรองฆ่าเชื้อและทรีตด้วยวิธีการเดียวกัน

5. การเตรียมเจล

5.1 การเตรียม separating gel 30 % acrylamide solution

ชั่งอะคริลาไมด์น้ำหนัก 30 กรัม และ บิสอะคริลาไมด์ น้ำหนัก 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้นาน 2 สัปดาห์

5.2 การเตรียมทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.9

ชั่ง tris-HCl น้ำหนัก 18.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.9 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 1 เดือน

5.3 การเตรียมทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ใช้วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียม 1.5 โมลาร์ แต่ชั่ง tris-HCl เพียง 6.03 กรัม และปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.8

5.4 การเตรียม SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง SDS น้ำหนัก 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5.5 การเตรียมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 1 สัปดาห์

5.6 การเตรียมอิเลคโตรดบัฟเฟอร์

ชั่ง tris-HCl น้ำหนัก 3.03 กรัม ไกลซีน 14.4 กรัม และ SDS (sodium dodezyl sulphate) 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

วิธีการ

1. การศึกษาผลของโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ ต่อการรอดชีวิตและลักษณะทางสัณฐาน

1.1 การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

นำตายอดที่วางเลี้ยงเพื่อชักนำยอดเป็นเวลา 2 เดือน ในอาหารสูตรที่ 3 ขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร ทรีตโคลชิซินความเข้มข้น 0, 500, 750, 1,000, 1,250 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเติมโคลชิซินในอาหารเหลวสูตรที่ 2.4 เขย่าเลี้ยงด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายตายอดไปวางบนกรวยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อล้างโคลชิซินส่วนเกินออก วางเลี้ยงตายอดที่ได้รับการทรีตโคลชิซินในอาหารสูตรที่ 3 หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม วางเลี้ยงต่ออีก 1 เดือน แล้วจึงเติมอาหารเหลวสูตรที่ 2.4 หลังจากนั้นวางเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 2 เดือน จึงตัดแยกยอดที่พัฒนามีขนาดประมาณ 1.5 เซนติเมตร มาชักนำราก ส่วนยอดขนาดเล็กวางเลี้ยงต่อเพื่อส่งเสริมการพัฒนาของยอด แล้วนำมาชักนำรากชุดที่ 2 หลังจากวางเลี้ยงจนยอดพัฒนามีขนาด 1.5 เซนติเมตร ทำการชักนำรากโดยกรีดฐานยอดด้านข้างความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 รอย แล้วทรีตด้วย IBA ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาวางเลี้ยงในอาหารสูตรที่

2.5 ในช่วงแรกวางเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายไปวางเลี้ยง ในที่มีแสงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตรวจนับจำนวนราก ความยาวราก (ซม.) ความสูงของยอด (ซม.) รูปร่างของใบโดยคำนวณจากสัดส่วนของความกว้างต่อความยาว (ก./ย.) จำนวนใบและพื้นที่ใบ (มม.^{2}) แต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้กลุ่มตายอด 35 กลุ่มตายอด วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completly randomized design; CRD) วิเคราะห์ผลการทดลองเปรียบเทียบกันในแต่ละครั้งของการชักนำรากและแต่ละความเข้มข้นของโคลชิซินที่ใช้ โดยใช้ DMRT (Duncan's multiple range test) ในโปรแกรม SAS (statistical analysis system)

1.2 การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 10 ชั่วโมง

นำตายอดที่วางเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 3 ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร ทรีตด้วยอาหารเหลวเติมโคลชิซินความเข้มข้น 3,000 ,6,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยวิธีการเดียวกับการศึกษาที่ 1.1 แต่ละความเข้มข้นทำการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ตายอด 30 กลุ่มตายอด หลังจากเขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ย้ายตายอดไปวางเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำยอด ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของตายอดในแต่ละความเข้มข้นของโคลชิซิน เปรียบเทียบกันโดยใช้ DMRT ในโปรแกรม SAS

1.3 การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 30 วัน

นำตายอดขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร ทรีตด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 0, 500, 750 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเติมในอาหารเหลวสูตรที่ 4 เลี้ยงตายอดต่อไปเป็นเวลา 30 วัน หลังจากนั้นย้ายตายอดมาวางเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2.3 หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน เติมอาหารเหลวสูตรที่ 2.4 ลงไปและวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1 เดือน ตรวจนับเปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิต หลังจากวางเลี้ยงระยะหนึ่งจึงตัดแยกยอดที่พัฒนามีขนาดประมาณ 1.5 เซนติเมตร มาชักนำราก ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1 หลังจากนั้นทำการทดลองซ้ำโดยเลี้ยงในโคลชิซินเข้มข้น 3,000 6,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 1) แต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้กลุ่ม ตายอด 35 กลุ่มตายอด วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับการศึกษาที่ 1.2 วิเคราะห์ผลการทดลองเปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยการทดลองโดยใช้ DMRT ในโปรแกรม SAS

1.4 การทรีตโนดูลาแคลลัสด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

นำโนดูลาแคลลัสที่วางเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสเป็นเวลา 20 วัน มาจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างชิ้นส่วนแคลลัสที่ทรีตโคลชิซินด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อก่อนวางเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2.3 ตรวจนับเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่มีการสร้างตายอดหลังจาก

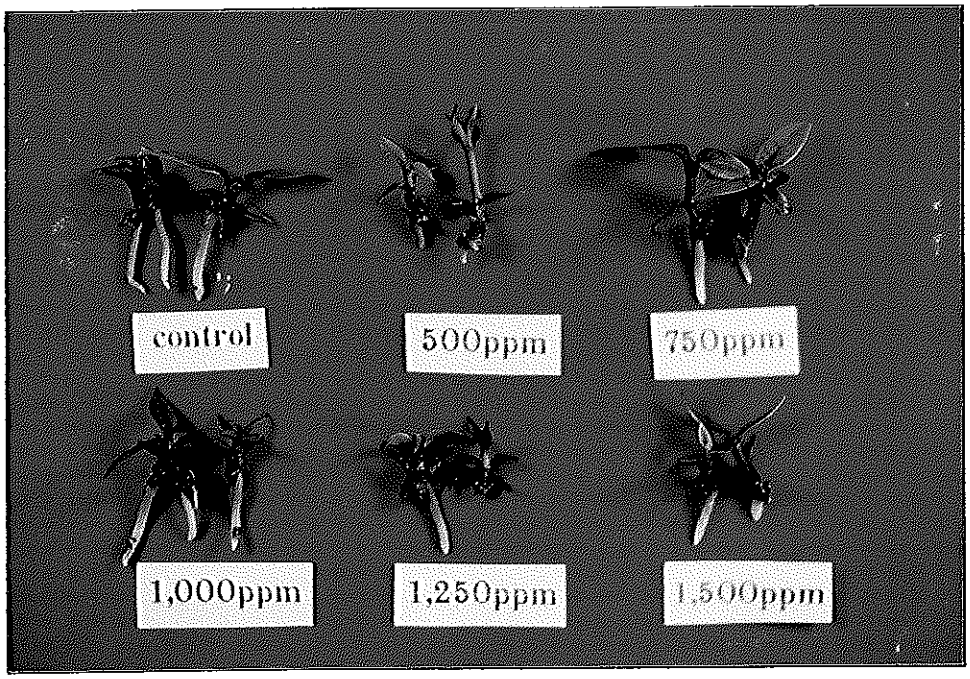
วางเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน หลังจากนั้นย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมและเติมอาหารเหลวสูตรที่ 2.4 หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ตัดแยกยอดที่ยอดพัฒนามีขนาดประมาณ 1.5 เซนติเมตร มาวางเลี้ยงเพื่อชักนำราก บันทึกผลการเปลี่ยนแปลง เช่นเดียวกับการศึกษาที่ 1.1 และ 1.2 แต่ละความเข้มข้นของโคลชิซินทำการทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำ ใช้แคลลัส 60 ก้อน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด วิเคราะห์ผลการทดลองเปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยการทดลอง โดยใช้ DMRT ใน โปรแกรม SAS

รูปที่ 1 การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 3,000 6,000 และ 10,000 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน

2. การศึกษาจำนวนโครโมโซมเซลล์ปลายราก

หลังจากชักนำรากได้ 4 สัปดาห์ (รูปที่ 2) ล้างรากของต้นมังคุดในการทดลองที่ 1 ด้วยน้ำกลั่น ตัดปลายรากขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร แช่ในสารละลาย HQ (8-hydroxyquinoline) ความเข้มข้น 0.29 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นล้างรากด้วยน้ำกลั่น แล้วตรึงในสารละลายของแอลกอฮอล์กับกรดอะซิติกในอัตราส่วน 3:1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา นำปลายรากมาอินคิวเบทในสารละลายกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 - 10 นาที หลังจากนั้นล้างรากด้วยน้ำกลั่นแล้วย้อมสีอะซีโตคาร์มีนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ นำเซลล์ปลาย

รากมาบดบนแผ่นสไลด์ปิดด้วยโคเวอร์สลิป แล้วให้ความร้อนโดยผ่านเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์เพื่อให้ติดสีซัดเจน นำมาเซลล์ที่เตรียมได้ตรวจสอบลักษณะและจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 600 เท่า แต่ละระดับความเข้มข้นของโคลชิซินที่ทดสอบเก็บตัวอย่างรากจำนวน 15 ราก จาก 15 ต้น (คิดเป็น 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น) วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด วิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ DMRT ในโปรแกรม SAS



รูปที่ 2 รากของมังคุดหลังจากวางเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำรากเป็นเวลา 4 สัปดาห์

3. การศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์และคลอโรฟลาสต์

3.1 การศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด

ใช้ใบจากการทดลองที่ 1.2 และ 1.3 หนัก 5 กรัมน้ำหนักสด มาบดในสารละลายอะซีโตนเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ละเอียด กรองสารที่สกัดได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนตะกอนที่เหลือมาบดอีกครั้งในสารละลายเดียวกัน จากนั้นผสมสารที่กรองได้จากครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 เข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรเป็น 300 มิลลิลิตร นำมาวัด การดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ a, b และคลอโรฟิลล์ทั้งหมด โดยใช้สูตรของ Witham และคณะ (1986) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้คือ

$$\text{คลอโรฟิลล์ a} = [12.7(D_{663}) - 2.69(D_{645})] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$\text{คลอโรฟิลล์ b} = [22.9(D_{645}) - 4.68(D_{663})] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$\text{คลอโรฟิลล์ทั้งหมด} = [20.2(D_{645}) + 8.02(D_{645})] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

D_{645} และ D_{663} เป็นการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร ตามลำดับ

V เป็นปริมาตรสุดท้ายของคลอโรฟิลล์ที่สกัดได้

W เป็นน้ำหนักของใบ

คลอโรฟิลล์ที่ตรวจสอบได้มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม

แต่ละหน่วยการทดลองที่ทรีตด้วยโคลชิซิน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด นำค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดที่คำนวนได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณคลอโรฟิลล์โดยใช้ DMRT ในโปรแกรม SAS

3.2 การศึกษาจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบ ขนาดและจำนวนของเซลล์ปากใบ

ใช้ใบจากหน่วยการทดลองเดียวกับการทดลองที่ 3.1 ใช้มีดเฉือนผิวใบเป็นแผ่นบางๆ วางบนสไลด์ หยดน้ำกลั่นลงบนชิ้นส่วนผิวใบและปิดด้วยโคเวอร์สลิป นำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 600 เท่า แต่ละหน่วยการทดลองที่ทรีตด้วยโคลชิซิน ใช้ตัวอย่างใบจำนวน 10 ใบ แต่ละใบตรวจสอบ 3 ตำแหน่ง วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด เปรียบเทียบความแตกต่างของจำนวน คลอโรพลาสต์ ขนาดและจำนวนเซลล์ ปากใบโดยใช้ DMRT ในโปรแกรม SAS

4. การศึกษาระบบเอนไซม์

4.1 การศึกษาระบบเอนไซม์ที่เหมาะสม

นำใบจากการศึกษาที่ทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเข้มข้น 0 - 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน น้ำหนัก 1 กรัม มาบดในทริสบัฟเฟอร์ในโกร่งเย็นจัดจนละเอียด ดูดใส่หลอด Eppendorf แล้วอินคิวเบทในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด Eppendorf ที่สะอาด เก็บในตู้แช่แข็งที่ -30 องศาเซลเซียส นำสารตัวอย่างที่เตรียมได้ไปตรวจสอบแถบเอนไซม์บนวุ้นอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ศึกษาเอนไซม์ 4 ระบบคือ เปอร์ออกซิเดส เอสเทอเรส แอซิดฟอสฟาเตสและมาเลทดีไฮโดรจีเนส ย้อมสีเอนไซม์แต่ละระบบที่ต้องการศึกษา ตามวิธีการของวันทนา นวรังสรรค์ (2536) (องค์ประกอบของสีที่ใช้ย้อมแสดงตามภาคผนวกที่ 2) ในที่มืดจนเจลติดสีชัดเจน หลังจากนั้นตรึงเอนไซม์ในสารละลายของกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติก 7 เปอร์เซ็นต์ ล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายของเมทธานอล 10 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติก 7 เปอร์เซ็นต์ บันทึกภาพไซโมแกรมของเอนไซม์ที่ปรากฏ เปรียบเทียบกันระหว่างความเข้มข้นของโคลชิซิน

4.2 การศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์

สกัดเอนไซม์จากใบอ่อนมังคุด (ดัดแปลงจากวันทนา นวรังสรรค์, 2536) จากหน่วยการทดลองเดียวกับการศึกษาที่ 4.1 ด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วย tris-HCl ความเข้มข้นต่างๆ 2-mercapthoethanol, PVP, SDS และกลีเซอรอล ความเข้มข้นเดียวกันดังตารางที่ 1 นำเอนไซม์ที่สกัดได้ไปแยกบนวุ้นเช่นเดียวกับการศึกษาที่ 4.1 เปรียบเทียบความแตกต่างของแถบเอนไซม์ที่สกัดด้วยทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้นต่างกันโดยใช้สีย้อมที่ชัดเจนที่สุดจากการศึกษาที่ 4.1 เพื่อคัดเลือกชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุด

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

ตารางที่ 1 ชนิดและส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์จากใบมังคุด

ชนิดของบัฟเฟอร์	องค์ประกอบรวม
1	tris-HCl เข้มข้น 0.25 โมลาร์ pH 7.5
	PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์
	SDS เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์
	2-mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์
	กลีเซอรอล เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์
2	tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 7.5
	PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์
	SDS เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์
	2-mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์
	กลีเซอรอล เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์
3	tris-HCl เข้มข้น 0.75 โมลาร์ pH 7.5
	PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์
	SDS เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์
	2-mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์
	กลีเซอรอล เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

4.3 การศึกษาความเข้มข้นของวุ้นอะคริลาไมด์

ในการศึกษานี้ใช้วุ้นอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ การเตรียมวุ้นทำตามวิธีการของ Laemmli (1970) ส่วนประกอบของวุ้นในแต่ละความเข้มข้นแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของวุ้นอะคริลาไมด์ที่ใช้ในการศึกษาระบบเอนไซม์

ส่วนประกอบของวุ้น	separating gel		stacking gel
	10%	12%	3%
30% acrylamide+0.8 bis acrylamide (ml.)	1.00	1.20	0.30
1.5 M tris-HCl pH 8.9 (ml.)	0.75	0.75	-
0.5 M tris-HCl pH 6.8 (ml.)	-	-	0.75
10% SDS (µl.)	60.00	60.00	60.00
1% ammoniumpersulphate (µl.)	75.00	75.00	120.00
distilled water (ml.)	1.065	0.865	1.77
TEMED (µl.)	5.00	5.00	5.00
total volume (ml.)	3.00	3.00	3.00

หลังจากสกัดเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจาก 4.2 แล้ว นำมาแยกบนแผ่นวุ้นอะคริลาไมด์ในแต่ละความเข้มข้น ในสนามไฟฟ้าภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ ย้อมสีเอนไซม์ เปรียบเทียบไซโมแกรมที่ได้ในวุ้นอะคริลาไมด์ความเข้มข้นต่างกันโดยใช้ระบบเอนไซม์ที่ชัดเจนที่สุดจากการทดลองที่ 4.1

บทที่ 3

ผล

1. การศึกษาผลของโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ ต่อการรอดชีวิตและลักษณะทางสัณฐาน

1.1 การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0 - 1,500 มก./ล. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตและอัตราการสร้างยอด ลักษณะทางสัณฐานของยอดที่ทรีตโคลชิซินไม่มีความแตกต่างจากหน่วยทดลองเปรียบเทียบ หลังจากทดลองชักนำรากชุดที่ 1 พบว่าความยาวรากและความสูงของยอดแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3) แต่เมื่อทดลองชักนำรากชุดที่ 2 พบว่าความยาวรากและความสูงยอดไม่มีความแตกต่างกันระหว่างหน่วยการทดลอง แต่จำนวนราก จำนวนใบและพื้นที่ใบมีความแตกต่างกัน การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 1,250 มก./ล. ส่งผลให้จำนวนรากและจำนวนใบน้อยที่สุดแตกต่างจากหน่วยการทดลองอื่นๆ ส่วนพื้นที่ใบไม่แตกต่างกับความเข้มข้น 500, 1,000 และ 1,500 มก./ล. (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3. การเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้นกล้าที่ทรีตตายอดด้วยโคลชิซิน ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ชักนำรากครั้งที่ 1)

ความเข้มข้น (มก./ล.)	N	จำนวนราก (เฉลี่ย)	ความยาวราก (ซม.)	จำนวนใบ (เฉลี่ย)	รูปร่างใบ (ก./ย.)	พื้นที่ใบ (มม.^{2})	ขนาดยอด (ซม.)
0	22	1.0119	2.1577 b	7.1190	0.4092	10.1708	1.7625 ab
500	29	1.1407	2.9704 a	6.5407	0.3546	8.4202	1.5870 b
750	29	1.1778	3.1296 a	6.6222	0.3650	10.9210	1.8071 ab
1000	27	1.1852	2.5741 ab	6.1481	0.4442	10.3874	1.7778 ab
1250	15	1.000	2.0667 b	5.6000	0.4039	11.4617	2.0333 a
1500	23	1.2143	2.3839 ab	6.9524	0.4230	10.3201	2.0060 a
F-test		ns	*	ns	ns	ns	*
C.V.(%)		13.71	16.20	9.13	8.45	10.89	8.55

* : แตกต่างกันทางสถิติ (P=0.05) ns : non significant

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิต

N : จำนวนต้นที่ศึกษา

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้นกล้าที่ทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ชักนำรากครั้งที่ 2)

ความเข้มข้น (มก./ล.)	N	จำนวนราก (เฉลี่ย)	ความยาวราก (ซม.)	จำนวนใบ (เฉลี่ย)	รูปร่างใบ (ก./ย.)	พื้นที่ใบ (มม.^{2})	ขนาดยอด (ซม.)
0	29	0.6889 a	0.7019	5.2926 a	0.3812	9.6012 a	1.0452
500	23	0.6905 a	0.2065	6.0595 a	0.4260	7.1235 ab	0.9065
750	27	0.6667 a	0.5926	5.4074 a	0.4646	9.7827 a	1.1000
1,000	14	1.000 a	0.7400	5.2333 a	0.7494	7.4437 ab	1.0250
1,250	7	0.1667 b	0.1667	3.7778 b	0.4180	6.2965 b	0.7722
1,500	6	0.8333 a	0.8333	6.000 a	0.3051	5.083 b	1.0500
F-test		*	ns	*	ns	*	ns
C.V.(%)		36.32	69.36	11.54	46.00	21.29	16.41

* : แตกต่างกันทางสถิติ(P=0.05) ns : non significant

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ

N : จำนวนต้นที่ศึกษา

จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงของลักษณะบางประการน่าจะมีความสัมพันธ์กันดังนั้นจึงได้ตรวจสอบความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ย จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พบว่าความสูงและความยาวรากมีความสัมพันธ์กัน (ตารางที่ 5) ดังนั้นจึงนำความสูงและความยาวรากมาวิเคราะห์โควาเรียนซ์เพื่อหาข้อสรุป จากการวิเคราะห์โควาเรียนซ์ของความสูงและความยาวรากโดยใช้ความสูงเป็นฐาน พบว่าเมื่อมีการปรับค่าความสูงแล้วความยาวรากไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 6, รูปที่ 3)

ตารางที่ 5 ดัชนีสหสัมพันธ์ (R) ของลักษณะทางสัณฐานบางประการหลังจากทรีตตายอด ด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็น เวลา 2 ชั่วโมง

การทดลอง	จำนวนราก:ความยาว	ความสูง:จำนวนใบ	จำนวนใบ:พท.ใบ	ความสูง:ความยาวราก
sh 2 hrs I	0.749	0.636	0.010	0.857*
sh 2 hrs II	0.643	0.302	0.402	0.605

* มีสหสัมพันธ์กัน (P=0.05)

sh : shoot; hrs : hours; I : เก็บผลครั้งที่ 1; II : เก็บผลครั้งที่ 2

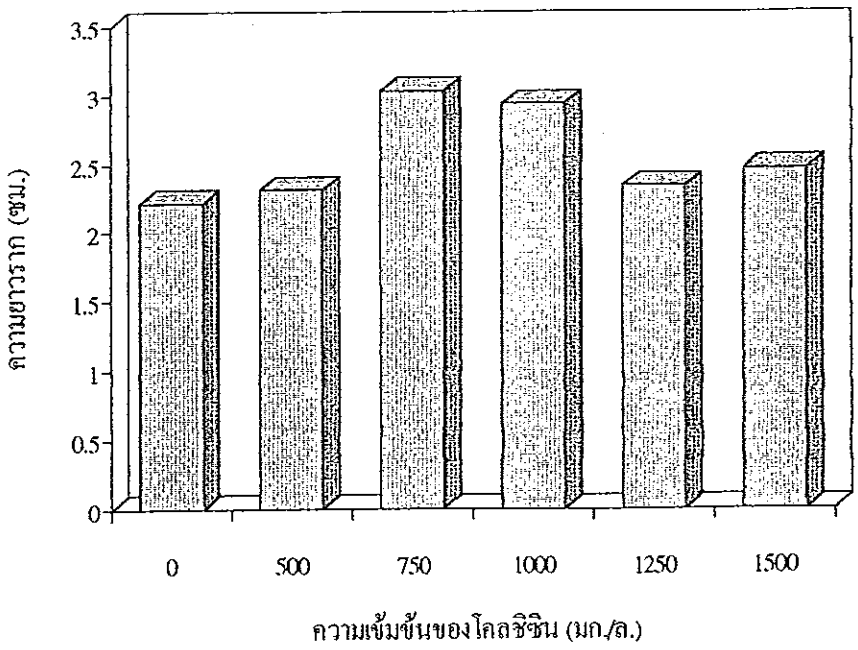
ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์โควาเรียนซ์ระหว่างความยาวรากกับความสูงของยอดหลังจากทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (มก./ล.)	ความยาวราก (ซม.)*
0	2.21 ± 0.28
500	2.31 ± 0.29
750	3.03 ± 0.33
1,000	2.93 ± 0.28
1,250	2.34 ± 0.30
1,500	2.47 ± 0.28
F-test	ns
C.V. (%)	18.82

* : ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ns : non significant

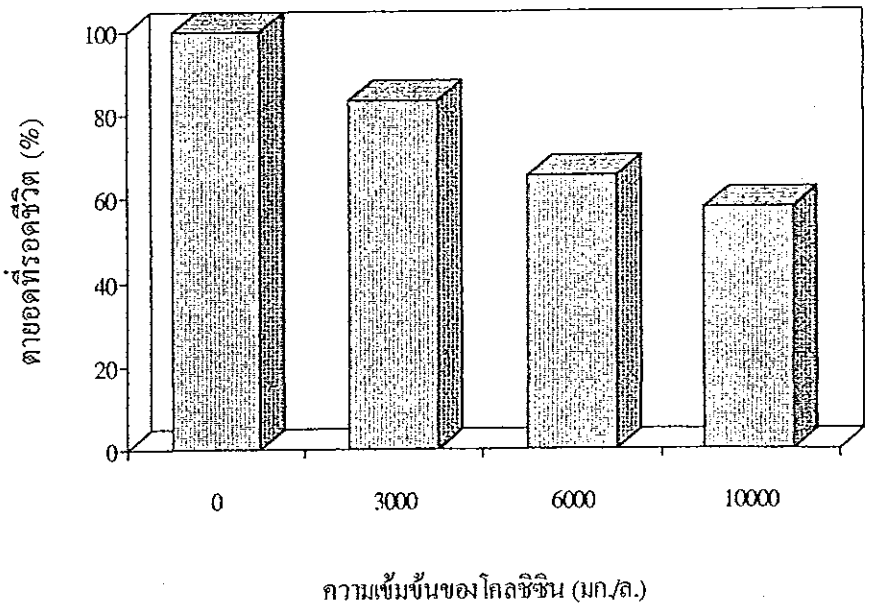
นอกจากความสูงมีความสัมพันธ์กับความยาวรากแล้ว ยังพบว่าจำนวนรากมีความสัมพันธ์กับความยาวรากด้วยแต่เนื่องจากจำนวนรากและความยาวรากไม่มีความแตกต่างทางสถิติในหน่วยการทดลองที่ใช้โคลชิซินความเข้มข้นแตกต่างกัน (ตารางที่ 4) ดังนั้นจึงไม่ต้องนำข้อมูลมาวิเคราะห์โควาเรียนซ์



รูปที่ 3 ความยาวรากของต้นมังคุดที่ได้จากการทรีตตายอดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.2 การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 10 ชั่วโมง

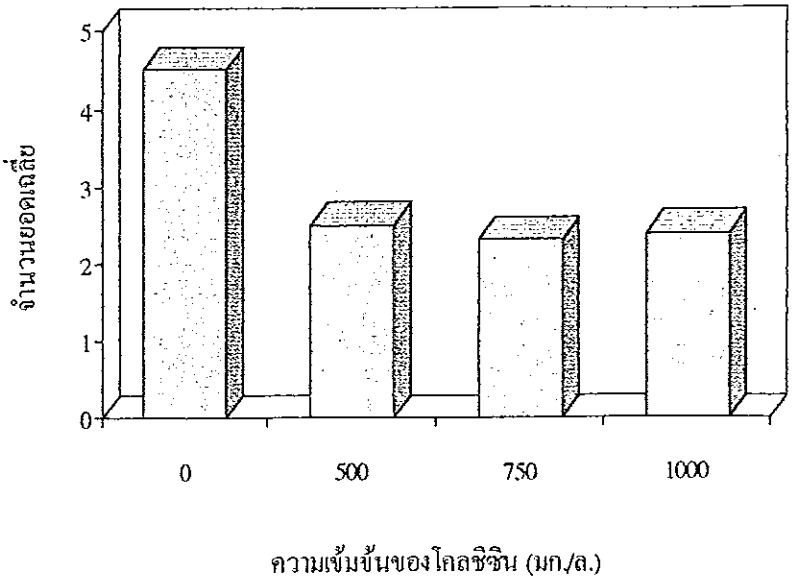
การทรีตตายอดเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ด้วยโคลชิซินเข้มข้น 3,000 6,000 และ 10,000 มก./ล. พบว่าการรอดชีวิตของตายอดลดลงเหลือ 83.5 65.4 และ 57.9 เปอร์เซ็นต์ ในหน่วยการทดลองที่ทรีตโคลชิซินความเข้มข้น 3,000, 6,000 และ 10,000 มก./ล. ตามลำดับ ในขณะที่ตายอดในหน่วยการทดลองชุดเปรียบเทียบรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 เปอร์เซ็นต์ยอดที่รอดชีวิตจากการทรีตด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 10 ชั่วโมง

1.3 การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 30 วัน

การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 30 วัน พบว่าที่ความเข้มข้น 500 750 และ 1,000 มก./ล. ให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม (รูปที่ 5) รากที่ชักนำได้จากทุกหน่วยการทดลองที่ทรีตโคลชิซินมีความยาวมากกว่าหน่วยการทดลองชุดควบคุม แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนจำนวนใบลดลง (ตารางที่ 7) เมื่อทดลองทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเข้มข้น 3,000 6,000 และ 10,000 มก./ล. พบว่าจำนวนยอดที่รอดชีวิตลดลง (รูปที่ 6) ส่วนยอดที่รอดชีวิตชะงักการเจริญเติบโต ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและร่วง



รูปที่ 5 จำนวนยอดเฉลี่ยจากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

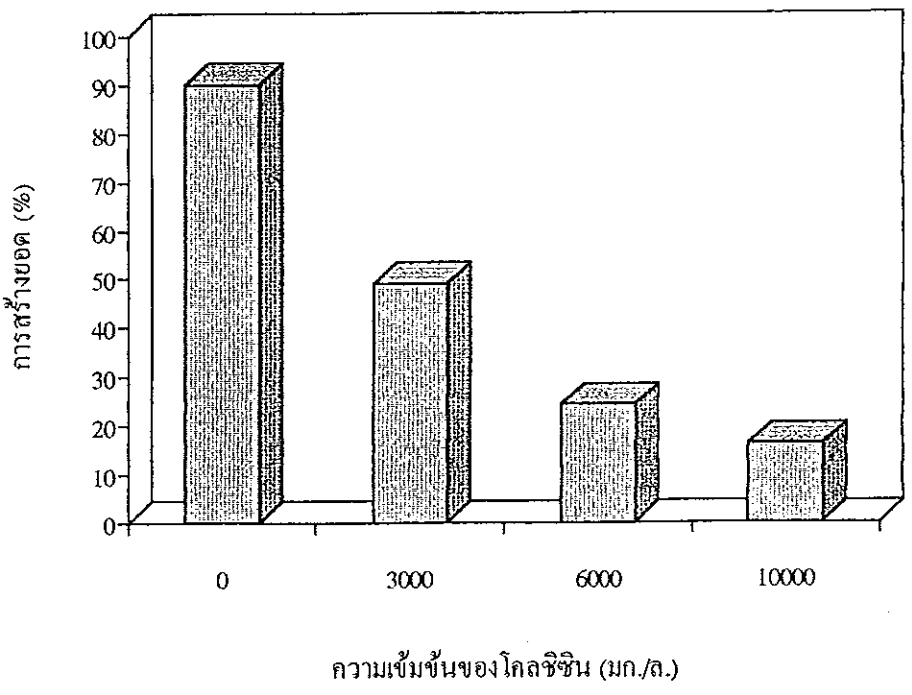
ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐานบางประการจากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซิน เป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้น (มก./ล.)	N	จำนวนราก (เฉลี่ย)	ความยาวราก (ซม.)	จำนวนใบ (เฉลี่ย)	รูปร่างใบ (ก/ย)	พท.ใบ $(มม.)^2$	ขนาดยอด (ซม.)
0	29	0.6889	0.7019 b	5.2926 ab	0.3812	9.6012	1.0452
500	33	0.9394	1.4152 a	5.8182 a	0.4526	8.4406	1.1273
750	24	0.8750	1.3417 a	4.500 b	0.4367	6.9234	1.0208
1,000	29	0.9963	1.5178 a	4.4370 b	0.4593	8.7582	1.2044
F-test		ns	*	*	ns	ns	ns
C.V. (%)		19.78	24.75	10.87	8.78	13.17	13.05

* : แตกต่างกันทางสถิติ (P=0.05) ns : non significant

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ

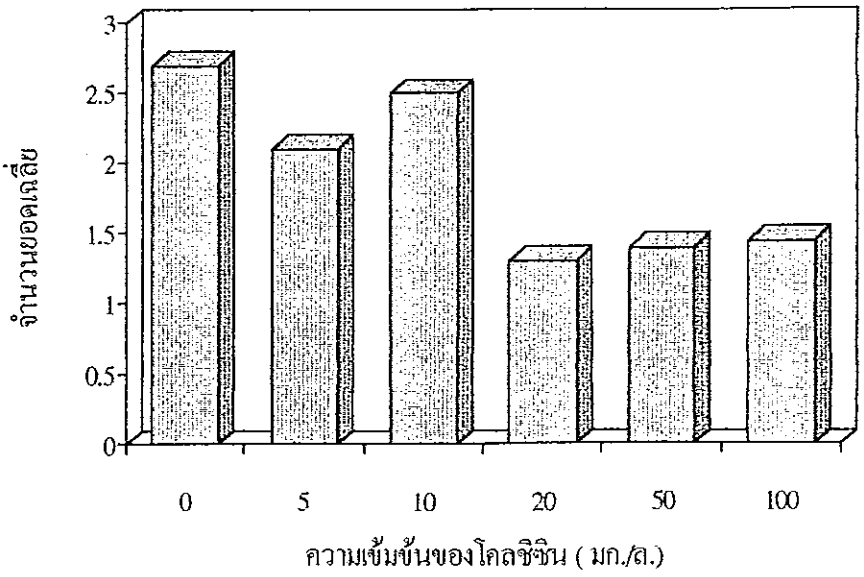
N : จำนวนต้นที่ศึกษา



รูปที่ 6 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของตายอดจากการทรีตกลุ่มตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

1.4 การทรีตโนดูลาแคลลัสด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากการทรีตโนดูลาแคลลัสแคลลัสด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0 - 100 มก./ล. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง - พบว่าการสร้างยอดของชิ้นส่วนลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นจาก 10 เป็น 20 มก./ล. ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นจาก 20 เป็น 50 และ 100 มก./ล. พบว่าจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนไม่แตกต่างกันทางสถิติ (รูปที่ 7) ผลการทรีตโนดูลาแคลลัสด้วยโคลชิซิน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ต่อลักษณะทางสัณฐานพบว่ามีผลให้ความสูงยอดเพียงลักษณะเดียวที่มีการเปลี่ยนแปลง โคลชิซินความเข้มข้น 50 มก./ล. ส่งผลให้ยอดมีขนาดเล็กที่สุด (ตารางที่ 8)



รูปที่ 7 จำนวนยอดเฉลี่ยจากการทรีตโคลชิซินกับแคลลัสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐานบางประการจากการทรีตแคลลัสด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (มก./ล.)	N	จำนวนราก (เฉลี่ย)	ความยาวราก (ซม.)	จำนวนใบ (เฉลี่ย)	รูปร่างใบ (ก./ย.)	พท.ใบ ($มม.^2$)	ขนาดยอด (ซม.)
0	29	0.6889	0.7019	5.2926	0.3812	9.6012	1.0452 a
5	27	1.0444	1.6481	4.5926	0.4256	9.6048	1.0555 a
10	13	0.9333	1.2417	4.7333	0.4113	6.7714	0.9250 a
20	21	1.0476	1.2238	4.4762	0.3993	7.9125	0.8809 a
50	7	0.3333	0.6111	3.3333	0.3735	7.0435	0.6111 b
100	21	1.1429	1.4571	4.0952	0.4127	10.4735	0.9047 a
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	*
C.V. (%)		35.44	46.66	15.22	14.18	17.76	15.88

* : แตกต่างกันทางสถิติ (P=0.05) ns : non significant

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ

N : จำนวนต้นที่ศึกษา

จากการศึกษาความสูง ความยาวราก และลักษณะอื่นๆ ที่ตรวจสอบตามข้อมูลการศึกษาดังตารางที่ 8 เป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของลักษณะบางประการอาจจะมีความสัมพันธ์กัน เช่นความสูงมีผลต่อความยาวราก เป็นต้น ดังนั้นจึงได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะต่างๆ ที่ศึกษา จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะต่างๆ พบว่าจำนวนราก มีความสัมพันธ์กับความยาวรากและความสูงมีความสัมพันธ์กับจำนวนใบ (ตารางที่ 9) ดังนั้นจึงนำผลการทดลองของลักษณะที่มีความแตกต่างกันทางสถิติมาวิเคราะห์โคเวเรียนซ์ เพื่อหาข้อสรุปที่ถูกต้องว่าความแตกต่างที่เกิดขึ้นเป็นผลจากโคลชิซินหรือเกิดจากปัจจัยอื่น

ตารางที่ 9 ดัชนีสหสัมพันธ์ (R) ของลักษณะทางสัณฐานบางประการที่ตรวจสอบ

การทดลอง	จำนวนราก:ความยาว	ความสูง:จำนวนใบ	จำนวนใบ:พท.ใบ	ความสูง:ความยาวราก
callus 2 hr	0.802	0.791*	0.090	0.264

ค่าตัวเลขที่ขีดเส้นใต้แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันของลักษณะที่ตรวจสอบ
* มีความสัมพันธ์ของลักษณะที่ตรวจสอบและลักษณะนั้นๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากการวิเคราะห์โคเวเรียนซ์ในการทดลองทรีตโนดูลาแคลลัสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์โคเวเรียนซ์ของความสูงและจำนวนใบ พบว่าจำนวนใบไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 10, รูปที่ 8)

ตารางที่ 10 จำนวนใบจากการทรีตแคลลัสด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากวิเคราะห์โควาเรียนซ์

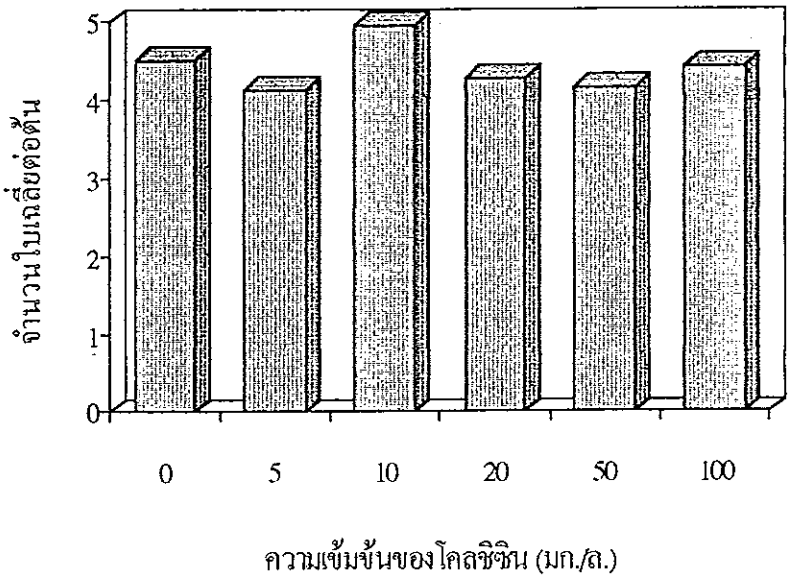
ความเข้มข้น (มก./ล.)	จำนวนใบ*
0	4.5 ± 0.46
5	4.12 ± 0.47
10	4.96 ± 0.46
20	4.27 ± 0.43
50	4.16 ± 0.43
100	4.43 ± 0.42
F-test	ns
C.V. (%)	16.55

* : ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ns : non significant

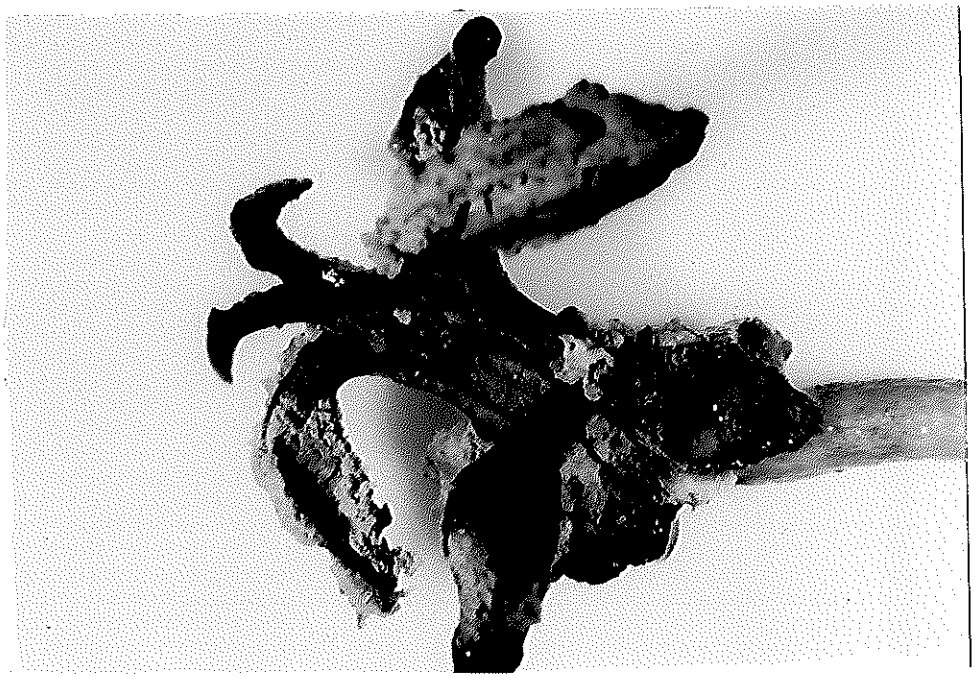
ส่วนจำนวนและความยาวรากไม่นำมาวิเคราะห์โควาเรียนซ์ เนื่องจากข้อมูลของจำนวนรากและความยาวรากไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างหน่วยการทดลอง (ตารางที่ 8) ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องนำข้อมูลมาวิเคราะห์โควาเรียนซ์

นอกจากการเปลี่ยนแปลงดังที่กล่าวมาแล้ว ยังมีความผิดปกติอื่นที่สามารถสังเกตได้ เช่น ตายอดที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้นตั้งแต่ 500 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน คือใบมีลักษณะผิดปกติ มีการสร้างแคลลัสและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลซึ่งยอดดังกล่าวสามารถชักนำรากได้ (รูปที่ 9, 10) นอกจาก นี้ยังมีการสร้างยอดบริเวณแผ่นใบ (รูปที่ 11) ทำให้ตรวจสอบลักษณะต่างๆ ได้ช้า เช่น การตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์และการตรวจสอบเซลล์ปากใบ จากการทดลองชักนำการสร้างรากในการทดลองทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 750 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน พบว่ามีต้นที่สร้างรากจำนวน 5 ราก (รูปที่ 12) ในขณะที่โดยทั่วไปสามารถสร้างรากได้สูงสุดเพียง 3 รากและมียอดขนาดเล็กที่สามารถสร้างรากได้ (รูปที่ 13) แต่ต้นมังคุดที่มีลักษณะดังกล่าวไม่สามารถรอดชีวิตได้เมื่อนำไปอนุบาล นอกจากนี้ยังมีต้นมังคุด 3 ใบ เกิดขึ้นในหน่วยการทดลองนี้ (รูปที่ 14)

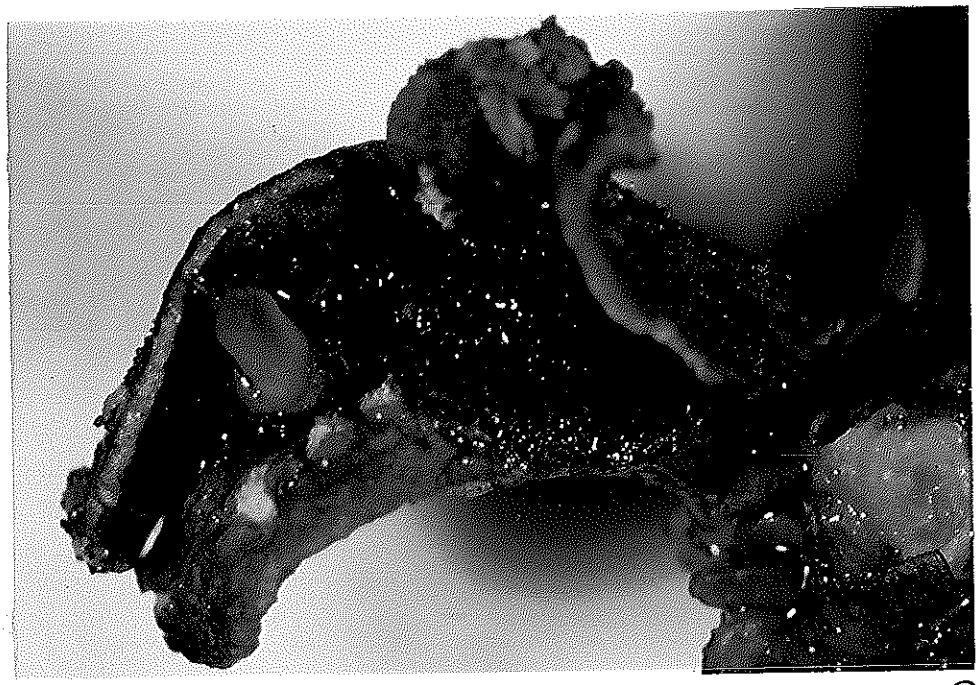


รูปที่ 8 จำนวนใบเฉลี่ยของต้นที่ได้จากการทรีตแคลลัสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

รูปที่ 9 การสร้างแคลลัสบริเวณแผ่นใบจากยอดมังคุดที่ทรีตโคลชิซินเข้มข้น 750 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน (ศรชี้)



รูปที่ 10 รากที่ชักนำได้จากยอดมังคุดที่สร้างแคลลัสบริเวณแผ่นใบ



ก

ข

รูปที่ 11 การสร้างยอดบริเวณแผ่นใบจากยอดมังฤดที่ทรีตโคลชิซินความเข้มข้น 750 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน

ก) ตายอดขนาดเล็กบริเวณเส้นกลางใบ

ข) ยอดที่มีการเจริญเติบโตเป็นยอดที่สมบูรณ์

รูปที่ 12 ยอดมังคุดที่มีการสร้างราก 5 ราก

รูปที่ 13 ยอดมังคุดขนาดเล็กที่สามารถสร้างรากได้

รูปที่ 14 มังคุด 3 ใบ (ศรชี้) ที่ได้จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 750 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน

2. การศึกษาจำนวนโครโมโซมเซลล์ปลายราก

จากการทดลองตรวจนับโครโมโซมโดยใช้วิธีการย้อมสีอะซีโตคาร์มีน พบว่าไม่สามารถใช้ในการจำแนกระดับพลอยดีของมังคุดที่ทรีตโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ ได้ เพราะโครโมโซมในระยะเมตาเฟสของเซลล์ปลายรากที่ตรวจนับมีจำนวนมาก และมีขนาดเล็กจึงไม่สามารถตรวจนับได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 600 เท่า (รูปที่ 15)

รูปที่ 15 โครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของมังคุดที่ได้จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเข้มข้น 750 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน (600X)

3. การศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์และปริมาณคลอโรพลาสต์

3.1 การศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด

3.1.1 การทรีตตายอดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

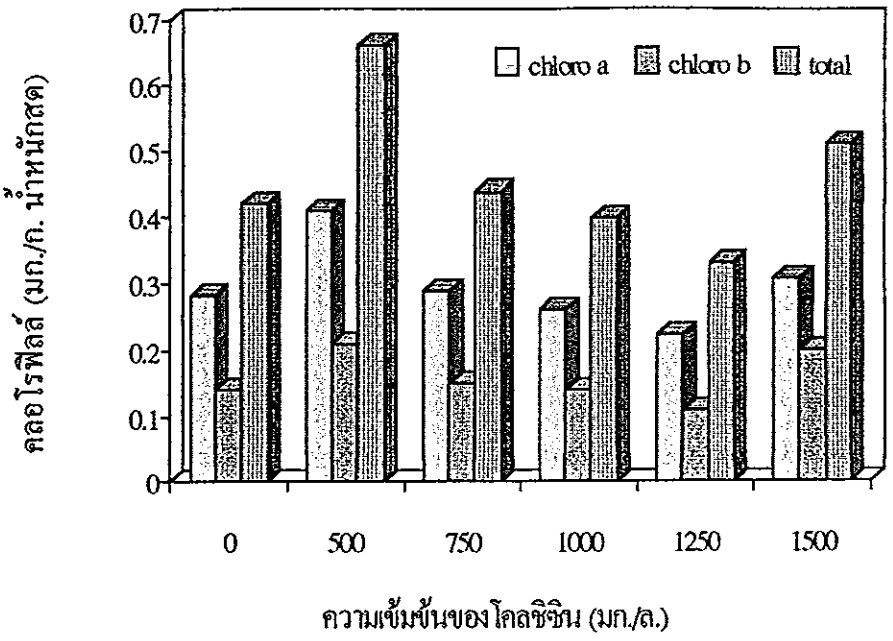
การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 500 มก./ล. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ a เพิ่มขึ้นแตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้น 0, 750, 1,000, 1,250 และ 1,500 มก./ล. ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์ b และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 11, รูปที่ 16)

ตารางที่ 11 ปริมาณคลอโรฟิลล์จากใบของต้นกล้าที่ผ่านการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของโคลชิซิน	ปริมาณคลอโรฟิลล์ (มก./ก. น้ำหนักสด)		
(มก./ล.)	คลอโรฟิลล์ a	คลอโรฟิลล์ b	คลอโรฟิลล์ทั้งหมด
0	0.283 b	0.144	0.427
500	0.410 a	0.212	0.662
750	0.290 b	0.158	0.448
1,000	0.263 b	0.141	0.404
1,250	0.222 b	0.116	0.338
1,500	0.306 b	0.205	0.511
F-test	*	ns	ns
C.V. (%)	11.10	22.21	14.83

* : แตกต่างกันทางสถิติ (P=0.05) ns : non significant

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ



รูปที่ 16 ปริมาณคลอโรฟิลล์จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.1.2 การทรีตตายอดเป็นเวลา 10 ชั่วโมง

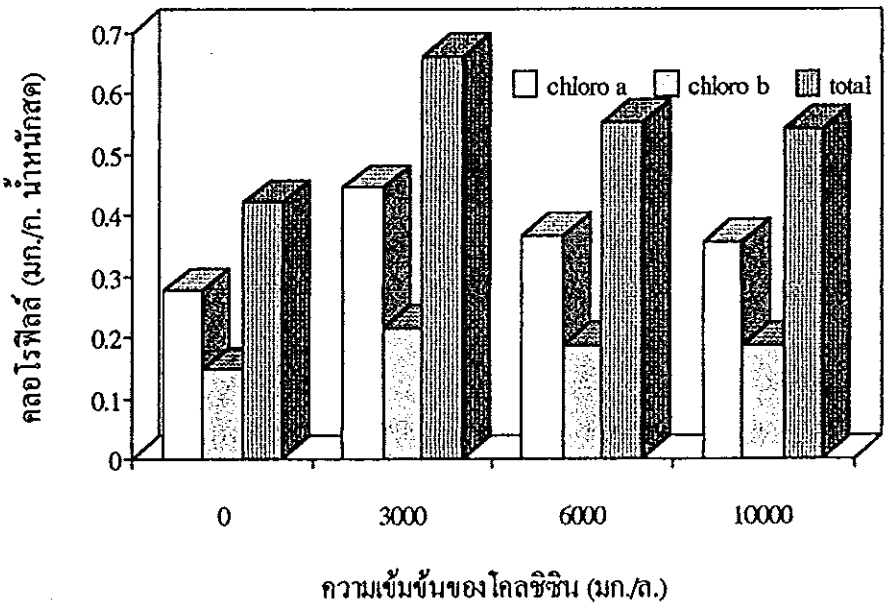
การทรีตโคลชิซินความเข้มข้น 0 - 10,000 มก./ล. เป็นเวลา 10 ชั่วโมง มีผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ a, b และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลง ตายอดที่ได้รับโคลชิซิน เข้มข้น 3,000 มก./ล. มีปริมาณคลอโรฟิลล์ a และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น แตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้น 0, 6,000 และ 10,000 มก./ล. ส่วนปริมาณ คลอโรฟิลล์ b มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม แต่ไม่แตกต่างกับความเข้มข้น 6,000 และ 10,000 มก./ล. (ตารางที่ 12, รูปที่ 17)

ตารางที่ 12 ปริมาณคลอโรฟิลล์จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของโคลชิซิน	ปริมาณคลอโรฟิลล์ (มก./ก. น้ำหนักสด)		
(มก./ล.)	คลอโรฟิลล์ a	คลอโรฟิลล์ b	คลอโรฟิลล์ทั้งหมด
0	0.276 c	0.147 b	0.420 c
3,000	0.445 a	0.215 a	0.660 a
6,000	0.365 b	0.186 a	0.551 b
10,000	0.355 b	0.187 a	0.542 b
F-test	*	*	*
C.V. (%)	5.63	5.88	7.20

* : แตกต่างกันทางสถิติ (P=0.05)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ



รูปที่ 17 ปริมาณคลอโรฟิลล์จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

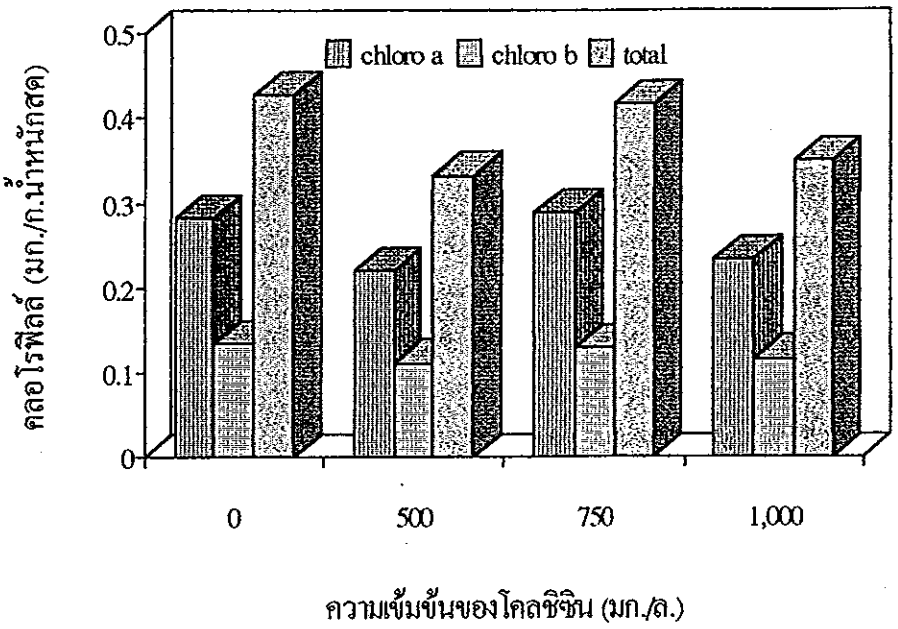
3.1.3 การทรีตตายอดเป็นเวลา 30 วัน

การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0, 500, 750 และ 1,000 มก./ล. ไม่มีผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ a b และ ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (ตารางที่ 13, รูปที่ 18) ส่วนการทรีตตายอด ด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0, 3,000 6,000 และ 10,000 มก./ล. มียอดที่รอดชีวิตเพียง 49, 22 และ 12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และต้นที่รอดชีวิตมีการเจริญเติบโตผิดปกติ มีการสร้างแคลลัสบริเวณแผ่นใบ ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและร่วง ยอดหยุดการเจริญเติบโต จึงไม่ตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ในการทดลองนี้

ตารางที่ 13 ปริมาณคลอโรฟิลล์จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของโคลชิซิน	ปริมาณคลอโรฟิลล์ (มก./ก. น้ำหนักสด)		
(มก./ล.)	คลอโรฟิลล์ a	คลอโรฟิลล์ b	คลอโรฟิลล์ทั้งหมด
0	0.283	0.134	0.427
500	0.220	0.111	0.332
750	0.287	0.128	0.416
1,000	0.233	0.117	0.350
F-test	ns	ns	ns
C.V. (%)	12.39	15.59	10.99

ns : non significant



รูปที่ 18 ปริมาณคลอโรฟิลล์จากการทรีตตายอดด้วยด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

3.1.4 การทรีตแคลลัสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

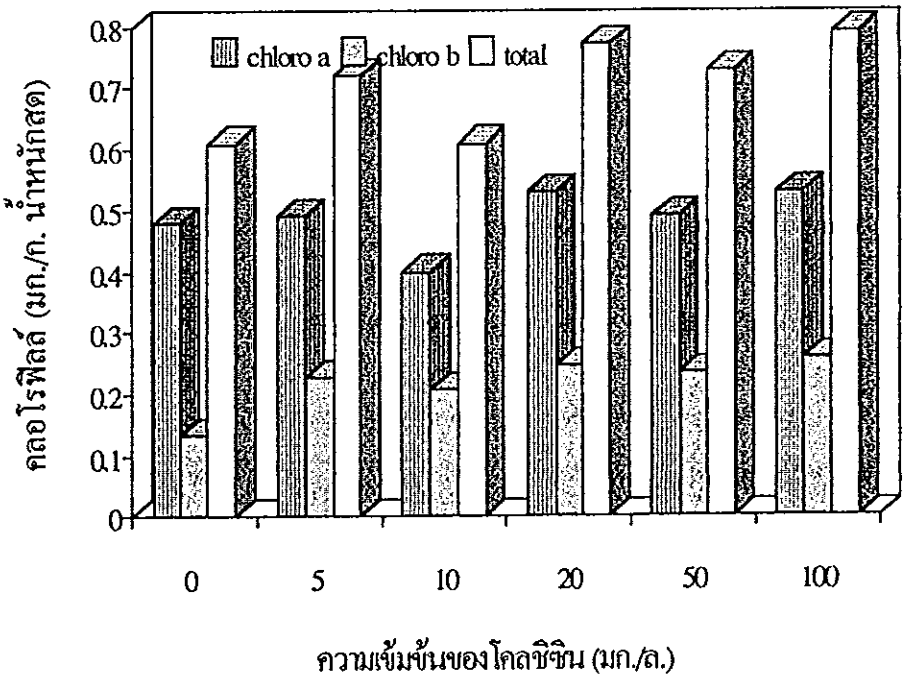
การทรีตแคลลัสด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 5, 10, 20, 50 และ 100 มก./ล. มีผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ b เพิ่มขึ้นทุกความเข้มข้นที่ใช้และมีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของคลอโรฟิลล์ b ระหว่างความเข้มข้น 5 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์ a และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดไม่มีความแตกต่างระหว่างชุดควบคุมกับการทรีตโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ แต่การเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซินมีแนวโน้มให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ a และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 14, รูปที่ 19)

ตารางที่ 14 ปริมาณคลอโรฟิลล์จากการทรีตแคลลัสด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของโคลชิซิน	ปริมาณคลอโรฟิลล์ (มก./ก. น้ำหนักสด)		
(มก./ล.)	คลอโรฟิลล์ a	คลอโรฟิลล์ b	คลอโรฟิลล์ทั้งหมด
0	0.484	0.134 b	0.618
5	0.493	0.228 a	0.721
10	0.405	0.208 a	0.612
20	0.531	0.245 a	0.776
50	0.496	0.236 a	0.731
100	0.539	0.257 a	0.795
F-test	ns	*	ns
C.V. (%)	9.42	10.18	9.56

* : มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P=0.05) ns : non significant

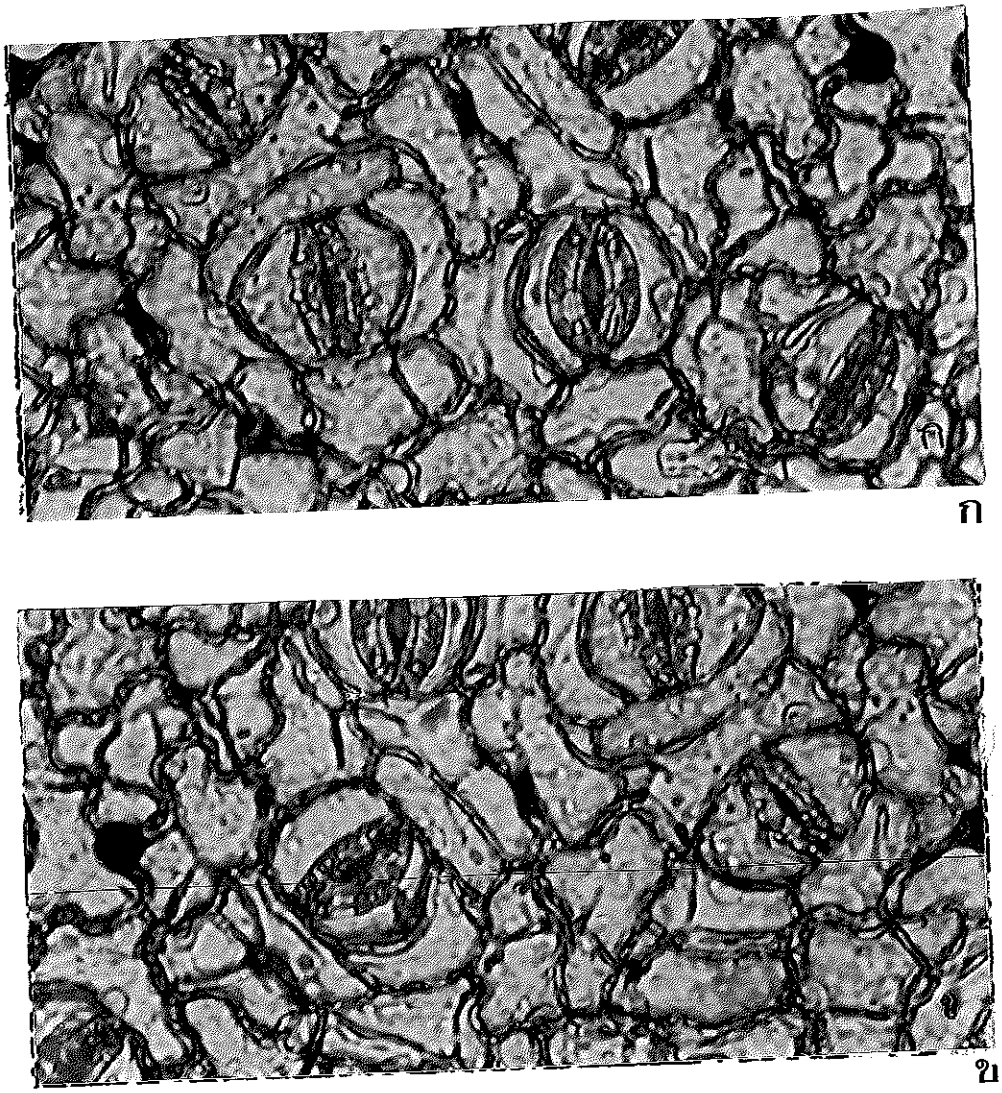
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ



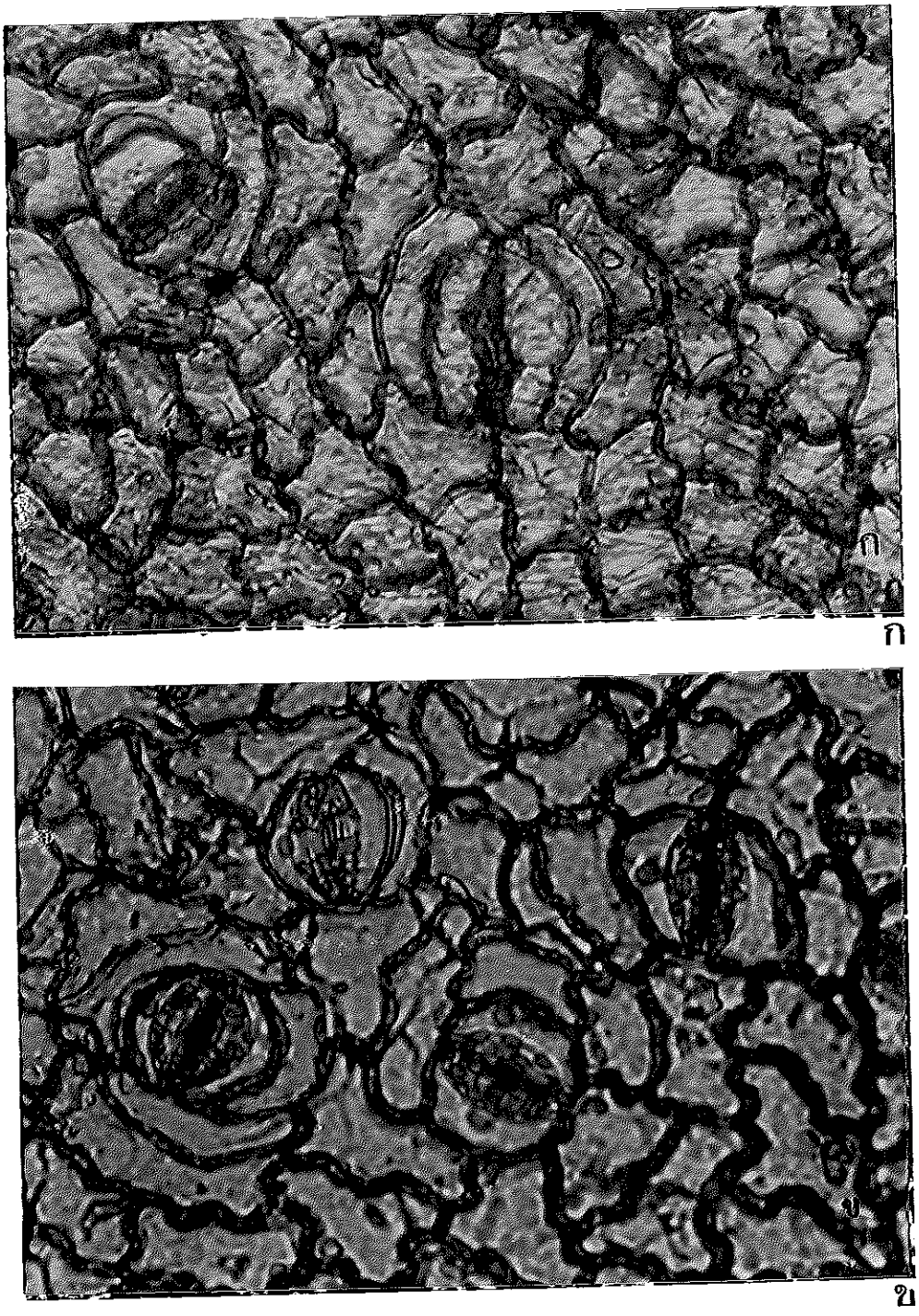
รูปที่ 19 ปริมาณคลอโรฟิลล์จากการทรีตแคลลัสด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.2 การศึกษาปริมาณคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบ ขนาดและจำนวนของเซลล์ปากใบ

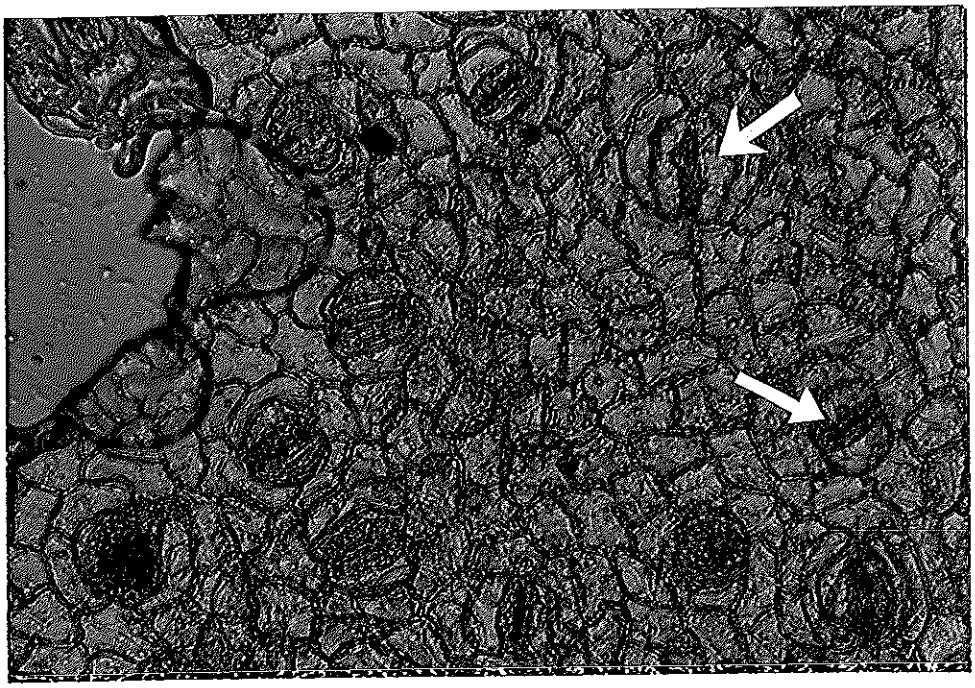
การใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0 - 1,500 มก./ล. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปากใบทั้งในกรณีการทรีตตายอดและการทรีตแคลลัส (รูปที่ 20) การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 750 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน มีผลให้ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น (รูปที่ 21) ส่วนการทรีตด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 3,000 - 10,000 มก./ล. มีผลให้ปากใบมีสีเข้มขึ้นจนเป็นสีแดง (รูปที่ 22) จำนวนของเซลล์ปากใบ ไม่มีความแตกต่างกันในทุกหน่วยการทดลอง ส่วนปริมาณคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบไม่สามารถตรวจนับได้เนื่องจากมีขนาดเล็ก



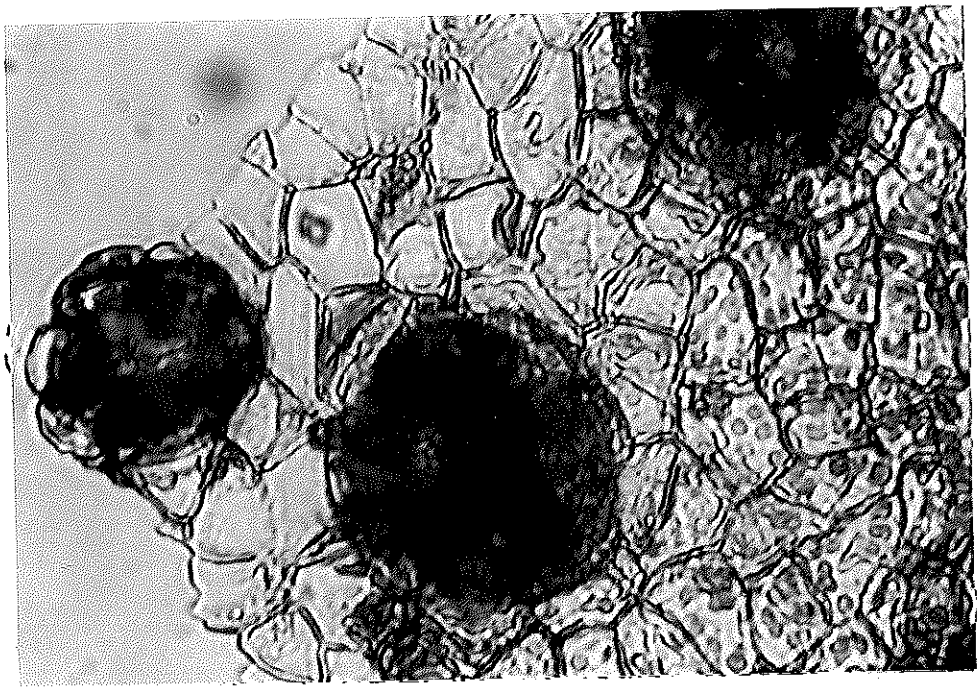
รูปที่ 20 เซลล์ปากใบที่ได้จากการทรีตตายอดและแคลลัสด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ (ก) กับชุดควบคุม (ข) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (600X)



รูปที่ 21 เซลล์ปากใบที่ได้จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเข้มข้น 750 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน (ก) และชุดควบคุม (ข) (600X)



รูปที่ 22 เซลล์ปากใบที่ได้จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 750 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน (ศรเปิด) กับเซลล์ปกติ (ศรปิด) (300X)

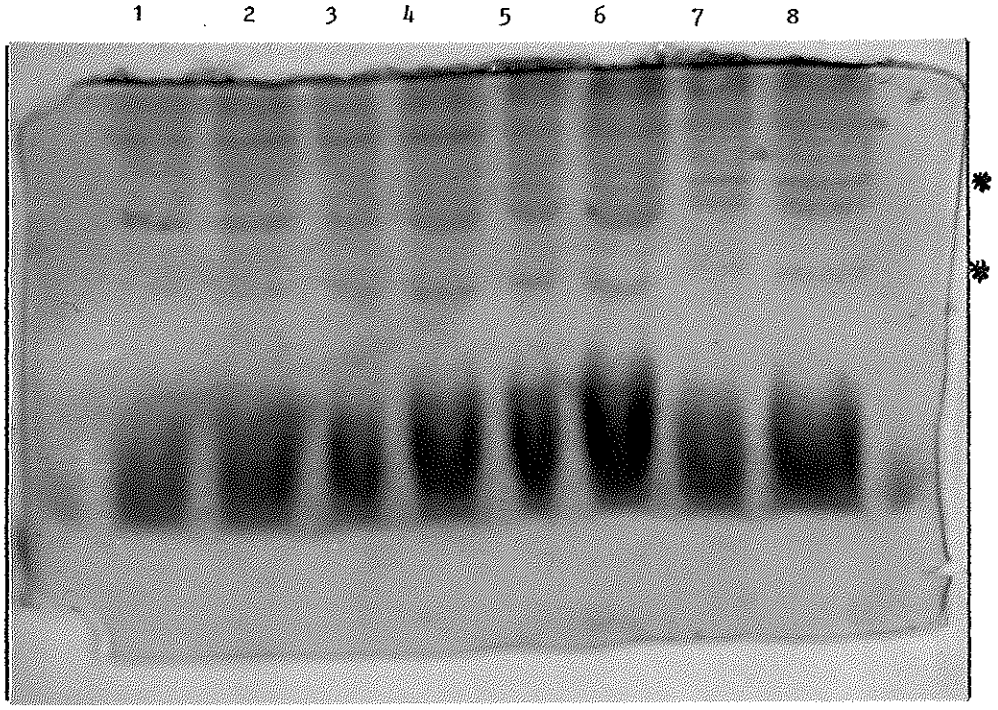


รูปที่ 23 เซลล์ปากใบจากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเข้มข้น 3,000 มก./ล. เป็นเวลา 10 ชั่วโมง (600X)

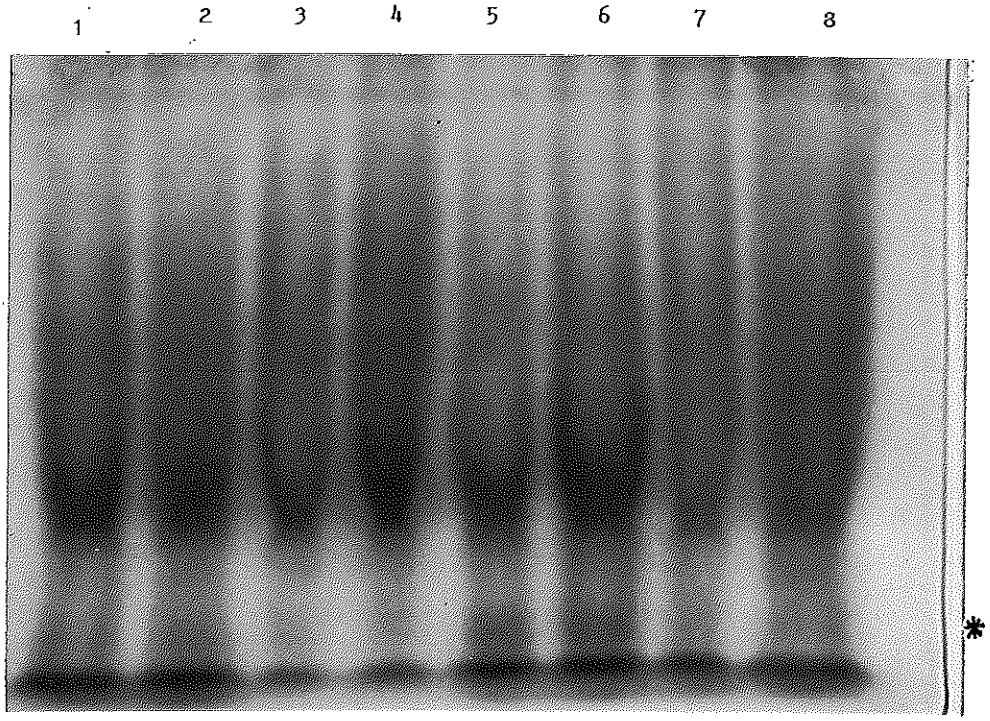
4. การศึกษาระบบเอนไซม์

4.1 การศึกษาระบบเอนไซม์ที่เหมาะสม

จากการศึกษาเอนไซม์ 4 ระบบคือ เปอร์ออกซิเดส เอสเทอเรส แอซิดฟอสฟาเตส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส โดยใช้ทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ สกัดเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตสและมาเลทดีไฮโดรจีเนสย้อมไม่ติดสี เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้แถบจางๆ แต่สามารถแยกความแตกต่างกับชุดควบคุมกับชุดที่ทรีตโคลชิซินได้ (ศรชี้) (รูปที่ 23) ส่วนเอนไซม์เอสเทอเรสเป็นปื้น แต่ในช่วงที่ศรชี้ความเข้มของสีย้อมมีความแตกต่าง สามารถแยกระหว่างชุดควบคุมกับชุดที่ทรีตโคลชิซินความเข้มข้น 500 และ 750 มก./ล. ได้ (รูปที่ 24) แต่ไม่ชัดเจนนัก ดังนั้นการใช้เอนไซม์ดังกล่าวในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของมังคุดจึงไม่เหมาะสม เนื่องจากไม่ปรากฏแถบสีที่ชัดเจน



รูปที่ 24 รูปแบบไซโมแกรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบของต้นที่ทรีตและไม่ทรีตโคลชิซิน
เลนที่ 1,2 = ชุดเปรียบเทียบ เลนที่ 3,4 = 500 มก./ล. เลนที่ 5,6 = 750 มก./ล.
เลนที่ 7,8 = 1,000 มก./ล.
เลนคี่ = ปริมาตร 15 ไมโครลิตร เลนคู่ = ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
(* แสดงความแตกต่างของรูปแบบไซโมแกรม)



รูปที่ 25 รูปแบบไซโมแกรมของเอนไซม์เอสเทอเรสจากใบของต้นที่ทรีตและไม่ทรีตโคลชิซิน
เลนที่ 1,2 = ชุดเปรียบเทียบ เลนที่ 3,4 = 500 มก./ล. เลนที่ 5,6 = 750 มก./ล.
เลนที่ 7,8 = 1,000 มก./ล.
เลนคี่ = ปริมาตร 15 ไมโครลิตร เลนคู่ = ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
(* แสดงความแตกต่างของรูปแบบไซโมแกรม)

4.2 การศึกษาบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์

การใช้ทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0.25 0.5 และ 0.75 โมลาร์ ให้แถบสีในการย้อมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไม่แตกต่างกัน จากการตรวจสอบโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พบว่า แถบสีของเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดสารตัวอย่างด้วยบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด มีสีจางเหมือนกัน

4.3 การศึกษาความเข้มข้นของวุ้นอะคริลาไมด์

เนื่องจากการใช้สีย้อมเอนไซม์ 4 ระบบ ดังกล่าวข้างต้นติดสีไม่ชัดเจน ดังนั้น การศึกษาการใช้วุ้นอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเป็นตัวกลางในการแยกไอโซไซม์ จึงใช้การย้อมสีโปรตีนเป็นตัวศึกษาความเข้มข้นของวุ้น จากการทดลอง พบว่าวุ้น ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ให้แถบคมชัดกว่าความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การศึกษาผลของโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ ต่อการรอดชีวิตและลักษณะทางสัณฐาน

จากผลการทดลองพบว่าการทรีตโคลชิซินความเข้มข้น 0 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กับแคลลัสมีผลให้การสร้างตายอดและการรอดชีวิตลดลง ส่วนการทรีตตายอดที่เวลาเดียวกันแต่เพิ่มความเข้มข้นสูงถึง 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการสร้างตายอดและการรอดชีวิต การเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซินเป็น 3,000 6,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพิ่มเวลาทรีตตายอดจาก 2 ชั่วโมงเป็น 10 ชั่วโมง และ 30 วัน ที่ความเข้มข้นดังกล่าวข้างต้น ส่งผลให้การสร้างยอดและการรอดชีวิตลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นที่สูงเกินไปของโคลชิซินเป็นพิษต่อพืช มีผลให้ความหนืดของไซโทพลาสซึมเปลี่ยนแปลงทำให้เซลล์ทำงานผิดปกติหรือเกิดจากการเพิ่มชุดโครโมโซมเป็น 2 เท่า เซลล์ที่มีการเพิ่มชุดโครโมโซมจะมีการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ การแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นสูงกว่าระดับที่เหมาะสมหรือใช้เวลานานเกินไป ทำให้พืชมีจำนวนโครโมโซมเกินระดับที่ต้องการ ทำให้เซลล์เสียสมดุลและตายได้ (Cook and Loudon, 1952 อ้างโดย ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และอรดี สหวัชรินทร์, 2532) การเจริญเติบโตที่ผิดปกติของพืชที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น มีผลเนื่องมาจากอัตราเมแทบอลิซึมของเซลล์ลดลง (Patil, 1992) ตัวอย่างเช่น การทดลองในกุหลาบ (Robert *et al*, 1990) และกาแฟ (Lashermes *et al*, 1994) พบว่าต้นที่ได้รับการทรีตโคลชิซินมีอัตราการรอดชีวิตลดลงและการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ การทดลองใน *Eustoma grandiflorum* พบว่าต้นที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นสามารถเจริญเติบโตได้ดีในหลอดทดลอง แต่เมื่อย้ายลงดินการเจริญเติบโตกลับลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่มีชุดโครโมโซมปกติ อัตราการเจริญเติบโตที่ลดลงและการลดลงของความสูงสามารถพบได้ทั่วไปในพืชที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น (Griesbach and Bhat, 1990) เช่นเดียวกับรายงานของ Dolezel และ Binarova (1989) ซึ่งรายงานว่า การทรีตโคลชิซินมีผลให้เซลล์เจริญเติบโตช้า มีลักษณะผิดปกติและสูญเสียการกำหนดขั้ว (polarity) ทำให้ไม่มีการพัฒนาหรือพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ช้า นอกจากนี้การทดลองในพืชบางชนิดพบว่าละอองเกสรของต้นที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มแสดงลักษณะเป็นหมัน ทั้งนี้เนื่องจากความไม่สมดุลของโครโมโซม (Patil, 1992) ความสำเร็จในการเพิ่มชุดโครโมโซมขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการทรีตและความเข้มข้น จากตัวอย่างการทรีตเซลล์แขวนลอยของถั่วอัลฟาฟา ด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าโคลชิซินมีผลให้เซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงและสูญเสียความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (Hassan, *et al.*, 1991) การทดลองทรีตต้นขิงด้วยวิธีการแช่ในสาร

ละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75, และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 วัน พบว่าการเพิ่มระดับความเข้มข้นและระยะเวลา ในการแช่สารละลายโคลชิซินทำให้การเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตลดลงและทำให้เกิด ลักษณะผิดปกติกับต้น VM2 (หน่อที่ 1 จากต้นที่ทรีตโคลชิซิน) และ VM3 (หน่อที่ 2 จากต้นที่ทรีตโคลชิซิน) เช่นบางต้นมีลักษณะลำต้นอ้วน ใบหนาและกว้าง บางต้นมีลักษณะใบด่าง เป็นริ้ว การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากพบว่าการแช่สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 วัน และความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 วัน ประสบความสำเร็จในการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมได้ดีที่สุด (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และ อรดี สหวัชรินทร์, 2532) ซึ่งการทดลองในมังคุดพบว่าการทรีตตายอดเป็นเวลา 10 วัน ด้วยโคลชิซิน เข้มข้น 3,000 6,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้การรอดชีวิตของตายอดลดลงและการทรีตตายอดเป็นเวลา 30 วัน ด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 500, 750, 1,000, 3,000 6,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้การรอดชีวิตของตายอดลดลงเช่นกัน ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากตายอดมีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นดิพลอยด์ ทำให้เซลล์เสียสมดุลหรือมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ปลายยอด ทำให้ไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานพบว่า เมื่อทรีตแคลลัสด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 5, 10, 20, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีผลให้ความสูงของยอดมีความแตกต่างกันทางสถิติ โคลชิซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้ยอดมีขนาดเล็กที่สุดแตกต่างจากความเข้มข้นอื่นๆ ส่วนจำนวนราก ความยาวราก จำนวนใบและพื้นที่ใบมีแนวโน้มลดลงเช่นกัน แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับความเข้มข้นอื่นๆ การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 1,250 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่งผลให้ลักษณะต่างๆ มีการเปลี่ยนแปลงลดลงเช่นเดียวกันกับการทรีตแคลลัส ส่วนการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 30 วัน พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซินมีผลให้ความยาวรากเพิ่มขึ้นแต่พืชต้นใหม่ที่ได้มีการเจริญเติบโตลดลงโดยเฉพาะความสูงลำต้น มีรายงานในพืชหลายชนิดที่มีการเพิ่มชุดโครโมโซมแล้วพบว่ามีการเจริญเติบโตช้า มีลักษณะใบหนา สีเขียวเข้มและอัตราการรอดชีวิตลดลง เช่น การทดลองทรีตโคลชิซินกับกุหลาบ (Robert *et al.*, 1990) ยาสูบ (Zeppernick *et al.*, 1994) กาแฟ (Lashermes *et al.*, 1994) และมะพลับญี่ปุ่น (Tamura *et al.*, 1996)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการทรีตแคลลัสและตายอด พบว่าการทรีตตายอดมีแนวโน้มประสบผลสำเร็จในการเพิ่มชุดโครโมโซมได้สูงกว่าการทรีตแคลลัส ทั้งนี้เนื่องจากแคลลัสต้องมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ เมื่อแคลลัสได้รับโคลชิซินมีการเปลี่ยนแปลงทำให้การแบ่งเซลล์ผิดปกติ เซลล์ตายหรือเสียสมดุล ทำให้ไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ จากการทดลองทรีตโปรโตพลาสต์ของพลับญี่ปุ่น พบว่าเซลล์ที่ทรีตด้วยโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 และ 6 วันมีการสร้างโคโลนี 2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเซลล์ที่ทรีตโคลชิซิน

ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลา 9 วัน ไม่มีการสร้างโคโลนี ในขณะที่เซลล์ที่ ไม่ทรีตโคลชิซิน มีการสร้างโคโลนี 10 เปอร์เซ็นต์ (Tamura *et al.*, 1996) ในทำนองเดียวกับการทรีตเซลล์แขวนลอยของอัลฟาฟา พบว่าเซลล์ที่ได้รับโคลชิซินมีรูปร่างผิดปกติและไม่มีการแบ่งเซลล์ (Dolezel and Binarova, 1989)

2. การตรวจสอบเซลล์ปลายราก

การตรวจสอบจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถบอกระดับพลอยดีของพืชต้นใหม่ได้ ในทางปฏิบัติ การตรวจสอบโครโมโซมสามารถทำได้ดีในพืชที่มีจำนวนโครโมโซมไม่มากนัก เช่น *Turnera ulmifolia* มีจำนวน 2n = 2x = 10 (Shore, 1991) ขิง มีจำนวน 2n = 2x = 22 (ปิยะดา ตันสวัสดิ์ และ อรดี สหวัชรินทร์, 2532) *Butea monosperma* มีจำนวน 2n = 2x = 18 (Raghuvanshi and Kesarwani, 1989) *Ageratum conizoides* มีจำนวน 2n = 2x = 20 (Gaonkar and Torne, 1991) *Cichorium intybus* มีจำนวน 2n = 2x = 33 (Rambaud *et al.*, 1992) ในพืชดังกล่าวข้างต้น สามารถตรวจนับจำนวนโครโมโซมได้ถูกต้องทั้งในระดับเทตราพลอยด์และพลอยดีอื่นๆ ส่วนพืชที่มีจำนวนโครโมโซมมากเช่น แอปเปิ้ล มีจำนวน 2n = 2x = 68 (Batlle and Alston, 1994) การตรวจสอบจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากไม่สามารถบอกรายละเอียดเกี่ยวกับยีนที่ต้องการศึกษาได้ จึงใช้การวิเคราะห์ไอโซไซม์เพื่อตรวจสอบยีนที่ต้องการ จากรายงานการศึกษาโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของมังคุด พบว่าจำนวนโครโมโซมมีความแปรปรวนตั้งแต่ 56 - 130 (Richards, 1990) ทั้งนี้ความแปรปรวนดังกล่าวอาจเนื่องมาจากปัญหา ในการตรวจนับจำนวนโครโมโซมหรือความแปรปรวนของจำนวนโครโมโซมที่เกิดขึ้นจริง จากการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถตรวจนับจำนวนโครโมโซมได้เนื่องจากโครโมโซมมีขนาดเล็กและมีจำนวนมาก (รูปที่ 15) ดังนั้นการตรวจนับจำนวนที่ถูกต้องจึงเป็นเรื่องยาก ทำให้ไม่สามารถใช้วิธีการนี้ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของมังคุดที่ทรีตด้วยโคลชิซิน โดยเฉพาะในกรณีที่เซลล์ที่ได้รับการทรีตโคลชิซินมีลักษณะเป็นมิกโซพลอยด์ ดังนั้นการตรวจสอบความแปรปรวนของมังคุดต้นใหม่น่าจะใช้วิธีการอื่นที่เหมาะสม เช่นเทคนิคในระดับชีวโมเลกุล

3. การตรวจสอบคลอโรฟิลล์และคลอโรพลาสต์

พืชต้นใหม่ที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นส่วนใหญ่มีใบหนาและสีเขียวเข้มขึ้น ใบมีขนาดใหญ่ขึ้น ดังนั้นการตรวจสอบพลอยดีในพืชที่ดีอีกวิธีหนึ่งคือการตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์และการวัดขนาดของเซลล์ปากใบ เช่นตัวอย่างการทดลองเพิ่มชุดโครโมโซมของข้าวบาร์เลย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงละอองเกสร (Barino and Powell, 1988; Gupton, 1989) ลักษณะใบที่หนาขึ้น และมีสีเขียวเข้มเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณคลอโรพลาสต์ เช่น การทดลองในหญ้าไรย์อาหาร

สัตว์ (Francis *et al.*, 1990) พบว่าคลอโรพลาสต์ในต้นที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มมีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่การเพิ่มขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และการเพิ่มขึ้นของคลอโรพลาสต์ไม่ได้เกิดจากการเพิ่มขึ้นของขนาดเซลล์ เช่นเดียวกับการทดลองของ Hassan และคณะ (1991) ซึ่งทดลองทรีตหญ้าไรย์อาหารสัตว์ด้วยโคลชิซินและเปรียบเทียบต้นที่ได้รับโคลชิซินกับต้นในชุดควบคุม ในเรื่องความแปรปรวนของขนาดเซลล์มีโซฟิลล์และจำนวนคลอโรพลาสต์ พบว่าเซลล์มีโซฟิลล์และจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์เพิ่มขึ้น ขนาดของเซลล์มีโซฟิลล์และจำนวนคลอโรพลาสต์ไม่มีความสัมพันธ์กันแต่มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ของหญ้าไรย์ ส่วนการทดลองในพลับญี่ปุ่น (Tamura *et al.*, 1996) พบว่าต้นที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นมีเซลล์ปากใบใหญ่ขึ้นประมาณ 1.5 เท่าของเซลล์ปกติแต่จำนวนปากใบต่อพื้นที่ลดลง จากการทดลองวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบของมังคุดที่ทรีตโคลชิซินความเข้มข้นและเวลาต่างๆ พบว่าการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ทำให้คลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้น 6,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นไปได้ว่าในหน่วยการทดลองดังกล่าวเหมาะสมในการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมของมังคุด และเมื่อตรวจสอบเซลล์ปากใบในหน่วยการทดลองนี้พบว่าเซลล์ปากใบมีสีเข้มผิดปกติ มีลักษณะทึบแสงและเซลล์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ที่ไม่ได้ทรีตโคลชิซิน ส่วนในหน่วยการทดลองที่ทรีตโคลชิซินความเข้มข้น 750 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่าเซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปากใบจากต้นที่ไม่ทรีตโคลชิซิน แต่เซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นมีเพียง 3 เซลล์ จากเซลล์ที่ตรวจสอบทั้งหมด 25 เซลล์ ส่วนการทรีตโคลชิซินที่ระยะเวลาเดียวกันแต่เพิ่มความเข้มข้นเป็น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ปากใบมีลักษณะปกติ ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเวลาที่ใช้ทรีตนานเกินไป ทำให้ยอดที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้หรือความเข้มข้นที่ใช้สูงเกินไป จากการตรวจสอบลักษณะของเซลล์ปากใบที่ทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปากใบเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม การทรีตตายอดและแคลลัสด้วยโคลชิซินความเข้มข้นดังกล่าวข้างต้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ไม่มีผลให้เซลล์ปากใบมีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

4. การศึกษาระบบเอนไซม์

การศึกษาระบบเอนไซม์เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชได้ พืชที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นมักจะมีไซโมแกรมเพิ่มขึ้น ระบบเอนไซม์ที่ใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชพืชมีอยู่หลายชนิด ขึ้นอยู่กับชนิดและชิ้นส่วนพืช จากการศึกษาระบบเอนไซม์ที่สกัดได้จากใบอ่อนสีแดงของมังคุดในหลอดทดลองพบว่า

เอนไซม์เอสเทอเรสเกิดปฏิกริยาได้รวดเร็วที่สุด แต่แถบที่ปรากฏมีลักษณะเป็นปื้น แยกความแตกต่างได้ไม่ชัดเจน เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเกิดปฏิกริยาช้า แถบที่ได้มีสีจางแต่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่ได้รับการทรีตโคลชิซินและต้นในชุดควบคุมได้ อย่างไรก็ตามความแตกต่างที่ได้ยังไม่ชัดเจน ซึ่งต่างจากการตรวจสอบพลัม แอปริค็อตและลูกผสมของพืชทั้ง 2 ชนิด พบว่าสามารถตรวจสอบลูกผสมในชั่วแรกได้ดีโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Byrne and Littleton, 1989) เช่นเดียวกับการตรวจสอบประชากรของ walnut ซึ่งพบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ดี (Solar *et al.*, 1994) การจำแนกพืชในสกุล *Lansium* พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้แถบชัดเจนที่สุด (วันทนา นวรังสรรค์, 2538) ส่วนเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส และมาเลทดีไฮโดรจีเนสไม่เกิดปฏิกริยา ซึ่งต่างจากการศึกษาเอนไซม์ของพืชในสกุล *Prunus* เพื่อประโยชน์ในการจำแนกต้นกล้าและศึกษาความแปรปรวนของประชากร จากการตรวจสอบท้อทั้งหมด 290 พันธุ์ โดยใช้เอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนส พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของท้อแต่ละพันธุ์ได้ (Arulsekar *et al.*, 1986a) และในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเชอรี่ พบว่าเอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนสมีพอลีมอร์ฟีซึมเพียงพอในการใช้เป็นตัวตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลูกผสมระหว่างชนิดของพืชในสกุลนี้ได้ (Arulsekar *et al.*, 1986b) การตรวจสอบระบบเอนไซม์ในมังคุดโดยใช้เอนไซม์ 4 ระบบ คือ เปอร์ออกซิเดส เอสเทอเรส แอซิดฟอสฟาเตสและมาเลทดีไฮโดรจีเนส พบว่าไม่มีระบบเอนไซม์ที่ให้แถบสีชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องจากระบบเอนไซม์ดังกล่าวไม่เหมาะสม ดังนั้นการศึกษาครั้งต่อไปน่าจะศึกษาระบบเอนไซม์อื่นๆ เพื่อหาเอนไซม์ที่เหมาะสม ให้แถบสีชัดเจนและสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมังคุด ที่ชักนำการกลายพันธุ์ได้ดีที่สุด การที่เอนไซม์ติดสีไม่ชัดเจนอาจจะเนื่องจากมังคุดเป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตช้า เอนไซม์ที่สกัดได้จึงมีปริมาณน้อยมียางหรือสารประกอบฟีโนลสูง ดังนั้นจึงย้อมติดสีไม่ชัดเจน จากการศึกษาบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3 ระดับ พบว่าแถบเอนโซม์ที่ได้ไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากเอนไซม์มีสีไม่ชัดเจนจึงแยกความแตกต่างของบัฟเฟอร์ไม่ได้ การศึกษาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจะต้องศึกษาสีย้อมเอนไซม์ที่ชัดเจนก่อน เพื่อให้สามารถศึกษาความแตกต่างของบัฟเฟอร์ได้โดยใช้สีย้อมที่ดีที่สุดเป็นตัวตรวจสอบ แต่อย่างไรก็ตามบัฟเฟอร์ที่ไม่เหมาะสมก็มีผลต่อการเกิดปฏิกริยาของเอนไซม์ในการย้อมสีเช่นกัน จากการศึกษาความเข้มข้นของเจลโดยใช้การย้อมสีโปรตีน พบว่าเจลความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ให้แถบสีชัดเจนกว่าความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แต่แถบสีแต่ละแถบอยู่ชิดกัน ดังนั้นถ้าใช้เจลความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ควรจะใช้เจลที่มีความยาวมากกว่านี้หรือใช้เวลาในการแยกเพิ่มขึ้น

นอกจากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยวิธีการดังที่กล่าวมาแล้ว การตรวจสอบความแปรปรวนด้วยวิธีการอื่นๆ เช่นการศึกษาพลอยดีด้วยเทคนิค flow cytometry ก็เป็นวิธีที่มีรายงานการใช้เพื่อตรวจสอบพลอยดีกับพืชหลายชนิด เช่น กุหลาบ (Robert *et al.*, 1990)

กะหล่ำ (Moller *et al.*, 1994) และพลับญี่ปุ่น (Tamura *et al.*, 1996) ซึ่งเป็นวิธีการที่ให้ผลค่อนข้างแน่นอนกว่าวิธีอื่นๆ เนื่องจากเป็นการตรวจสอบปริมาณของ DNA ในนิวเคลียส นอกจากนี้การตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค RAPDs (random amplified polymorphic DNAs) ก็เป็นวิธีการหนึ่ง ซึ่งคาดว่าจะให้ผลที่ถูกต้องที่สุด ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมสำหรับการทดลองในมังคุด Te-chato (unpublished) ได้ทำการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม ด้วยเทคนิค RAPDs โดยใช้ primer 9 ชนิด คือ OPB01, OPB02, OPB03, OPB04, OPA06, OPA07, OPA08, OPA09 และ OPA10 พบว่า primer 3 ชนิด คือ OPB01, OPB03 และ OPB04 สามารถใช้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของมังคุดที่ได้รับการทรีต EMS (ethylmethane sulphonate) และรังสีแกมมาได้ ดังนั้นในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของมังคุดน่าจะตรวจสอบโดยใช้ primer หรือการตรวจสอบในระดับ DNA เนื่องจากการตรวจสอบด้วยวิธีการอื่นๆ ไม่สามารถสรุปผลได้ชัดเจน นอกจากนี้การทรีตโคลชิซินกับเนื้อเยื่อที่เป็นกลุ่มเซลล์มักจะมีปัญหาในการคัดเลือกต้นพืชหรือเซลล์ที่มีชุดโครโมโซมเพิ่ม ในการทดลองทรีตโคลชิซินกับไม้ผลยืนต้น พบว่าประสบความสำเร็จต่ำเนื่องจากตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงได้ยาก (Lashermes *et al.*, 1994) เช่นเดียวกับ การทดลองทรีตโคลชิซิน เพื่อชักนำการกลายพันธุ์ของมังคุด การแสดงออกบางประการเช่น ความยาวรากเพิ่มขึ้น ปริมาณคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้น เซลล์ปากใบมีลักษณะผิดปกติ แต่ไม่สามารถตรวจสอบในระดับโครโมโซมหรือ DNA ได้ ทำให้ไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนว่าหน่วยการทดลองที่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว มีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นเทตราพลอยด์หรือไม่

บทที่ 5

สรุป

1. การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0 - 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการรอดชีวิตของยอด แต่มีผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ a เพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณคลอโรฟิลล์ b และปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปากใบพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเช่นกัน

2. การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0 - 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 ชั่วโมง มีผลให้การรอดชีวิตของตายอดลดลง ปริมาณคลอโรฟิลล์ a, b และคลอโรฟิลล์ทั้งหมด มีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างจากชุดควบคุมโดยโคลชิซินความเข้มข้น 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้คลอโรฟิลล์ a และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดมีปริมาณเพิ่มขึ้นแตกต่างทางสถิติกับความเข้มข้นอื่นๆ ส่วนคลอโรฟิลล์ b ไม่แตกต่างจากความเข้มข้น 6,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงเซลล์ปากใบพบว่าเซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีสีเข้ม

3. การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0 - 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน มีผลให้ การรอดชีวิตของตายอดลดลง หลังจากทดลองชักนำรากพบว่าความยาวรากเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณ คลอโรฟิลล์ a, b และปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปากใบพบว่าเซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้นจำนวน 3 เซลล์ จากการตรวจสอบทั้งหมด 25 เซลล์ จำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบไม่สามารถตรวจนับได้ เนื่องจากมีขนาดเล็กมาก จึงไม่ได้เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้น การเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซินเป็น 3,000 - 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้ความ มีชีวิตลดลงเหลือเพียง 12 เปอร์เซ็นต์ ยอดชะงักการเจริญเติบโต เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปากใบพบว่าเซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่กว่าปกติ และมีสีเข้มขึ้น

4. การทรีตโนดูลาแคลลัสด้วยโคลชิซินเข้มข้น 0 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าการสร้างตายอดและขนาดยอดลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซิน ปริมาณคลอโรฟิลล์ b เพิ่มขึ้น ส่วนคลอโรฟิลล์ a และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปากใบพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง

5. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนโครโมโซมโดยใช้วิธีการนับจำนวนโครโมโซมเซลล์ปลายราก พบว่าไม่สามารถตรวจสอบได้เนื่องจากโครโมโซมมีขนาดเล็กและเรียงตัวกันหนาแน่น

6. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระบบเอนไซม์โดยใช้สีย้อมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และเอสเทอเรส พบว่ามีแถบสีไม่ชัดเจนแต่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชุด ที่ทรีตโคลชิซิน และชุดควบคุมได้ ส่วนเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตสและมาเลทดีไฮโดรจีเนส พบว่า ไม่ติดสี แถบเอนไซม์ที่ได้จากการใช้ทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.25 0.5 และ 0.75 M ไม่มีความแตกต่างกัน วุ้นอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ให้แถบสีคมชัดกว่าความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

การทดลองปรับปรุงพันธุ์มังคุดโดยใช้โคลชิซินในหลอดทดลองครั้งต่อไป ควรใช้โคลชิซินความเข้มข้นมากกว่า 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลาตั้งแต่ 10 ชั่วโมงขึ้นไป แต่ไม่ควรเกิน 30 วัน การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงที่ดีที่สุดควรจะตรวจสอบในระดับ DNA เพื่อเป็นการลดเวลาในการวางเลี้ยงต้นที่ไม่กลายพันธุ์และสามารถระบุต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงได้อย่างชัดเจน เพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

นพรัตน์ บำรุงรักษ์. 2530. มังคุด : ไม้ผลที่ไม่กลายพันธุ์. รูสมิแล 10 : 45-49.

ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และ อรดี สหวัชรินทร์. 2532. การปรับปรุงพันธุ์ขิงโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับสารโคลชิซิน. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 27, 30 ม.ค. - 1 ก.พ. 2532.

รวี ภักดีกุลสัมพันธ์ และ พีระเดช ทองอำไพ. 2522. ข้อสังเกตเกี่ยวกับละอองเกสรของมังคุด. วารสารพืชสวน 64 : 37-38.

วันทนา นวรังสรรค์. 2536. การจำแนกพันธุ์พืชในสกุล *Lansium* โดยใช้ไอโซไซม์และการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต และ วันทนา เอ้งย่อง. 2531. การขยายพันธุ์มังคุดจำนวนมากโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว. สงขลานครินทร์ 10 : 7-9.

สมปอง เตชะโต มงคล แซ่หลิม และ จิราณี กุลศิโรรัตน์. 2535ก. การต่อกิ่งมังคุดในหลอดทดลอง. ว. สงขลานครินทร์ 14 : 353-359.

สมปอง เตชะโต มงคล แซ่หลิม และ อรุณี ม่วงแก้วงาม. 2535ข. การเพิ่มประสิทธิภาพวิธีการเพาะเลี้ยงใบอ่อนมังคุดในหลอดทดสอบเพื่อการขยายพันธุ์. ว. สงขลานครินทร์ 14 : 1 - 7.

อารมณ์ อุดมสิน. 2537. มังคุด. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร. 40 : 35 - 37.

Arulsekar, S., Parfitt, D. E. and Kester, D. E. 1986a. Comparison of isozyme variability in peach and almond cultivars. The Journal of Heredity 77 : 272 - 274.

Arulsekar, S., Parfitt, D. E., Beres, W. and Hansohe, P. E. 1986b. Genetic of malate dehydrogenase isozymes in the peach. The Journal of Heredity 77 : 49 - 51.

Barino, E. M. and Powell, W. 1988. Stomatal guard cell length as an indicator of ploidy in microspore-derived plants of barley. Genome 30 : 158-160.

Batlle, I. and Alston, F. H. 1994. Isoenzyme aided selection in the transfer of mildew (*Podosphaera leucotricha*) resistance from *Malus hupehensis* to the cultivated apple. Euphytica 77 : 11 - 14.

Behera, B., Tripathy, A. and Patnaik, S. K. 1974. Histological analysis of colchicine-induced deformoties and cytochimeras in *Amaranthus caudatus* and *dubious*. The Journal of Heredity 65 : 179-184.

Borisy, G. G. and Taylor, E. W. 1967. The mechanism of colchicine action. J. Cell. Biol. 34 : 535.

Butterfass, Th. 1983. A nucleotypic control of chloroplast reproduction. Protoplasma 118 : 71-74.

Byrne, D. H. and Littleton, T. G. 1989. Interspecific hybrid verification of Plum x Apricot hybrid via isozyme analysis. HortScience 24 : 132 - 134.

Dolezel, J. and Binarova, P. 1989. The effect of colchicine on ploidy level, morphology and embryogenic capacity of alfalfa suspension cultures. Plant Science 64 : 213-219.

Francis, A., Jones, R. N., Parker, J. S. and Posselt, U. K. 1990. Cytokinin-induced heritable variation in cell size and chloroplast numbers in leaf mesophyll cells of diploid ryegrass (*Lolium perenne* L.). Euphytica 49 : 49-55.

Gaonkar, R. V. and Torne, S. G. 1991. Induced autotetraploidy in *Ageratum conyzoides* L. Cytologia 56 : 327-331.

Goh, C. J., Lakshmanan, P. and Loh, C. S. 1994. High frequency direct shoot bud regeneration from excised leaves of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Plant Science 101 : 173-180.

Goh, H. K. L., Rao, A. N. and Loh, C. S. 1988. *In vitro* plantlet formation in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Annals of Bot. 62 : 87 - 93.

Griesbach, R. J. and Bhat, R. N. 1990. Colchicine - induced polyploidy in *Eustoma grandiflorum*. HortScience 25 : 1284 - 1286.

Gupton, C. L. 1989. Production of non-chimeral colchiploids in *Robus* species by tissue culture. Euphytica 44 : 133 - 135.

Hassan, L., Jones, R. N., Parker, J. S. and Posselt, U. K. 1991. Colchicine-induced heritable variation in cell size and chloroplast number in the leave cells of inbred ryegrasses (*Lolium perenne, L. multiflorum*). Euphytica 52 : 39 - 45.

Huetteman, C. A. and Preece, J. E. 1993. Thidiazuron : A potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33 : 105-119.

Laemmli, U. K. 1970. Clevage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 : 680.

Lashermes, P., Couturon, E. and Charrier, A. 1994. Double haploids of *Coffea canephora* : development, fertility and agronomic characteristics. Euphytica 74 : 149-157.

Lichter, R., De Groot, E., Fiebig, D., Schweiger, R. and Gland, A. 1988. Glucosinolates determined by HPLC in the seeds of microspore-derived homologous lines rapeseed (*Brassica napus*). Plant Breeding 100 : 209-221.

Moller, C., Iqbal, M. C. M. and Robbelen, G., 1994. Efficient production of doubled haploid *Brassica napus* plant by colchicine treatment of microspores. Euphytica 75 : 95 - 104.

Noor, N.M. 1992. Micropropagation of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) through callus and multiple shoot formation. *In* Biotechnology for Forest Tree Improvement. (eds. R. C. Umaly, L. Umboh, S. S. Tjtrosomo and N. M. Noor) pp. 81 - 86, Bogor : Seameo Biotrop.

Patil, B. C. 1992. The induction of tetraploid in *Crotalaria linifolia* L. Cytologia 57 : 247 - 252.

Raghuvanshi, S. S. and Kesarwani, R. 1989. Ploidy response of B chromosome in root meristem of *Butea monosperma*. Cytologia 54 : 91-95.

Rambaud, C., Dubois, J. and Vasseur, J. 1992. The induction of tetraploid in chicory (*Cichorium intybus* L. var. Magdebourg) by protoplast fusion. Euphytica 62 : 63 - 67.

Richards, A. J. 1990. Studies in *Garcinia,* dioecious tropical forest tree : the origin of the mangosteen (*G. mangostana* L). Botanical Journal of the Linnean Society 103 : 301-308.

Robert, A. V., Lloyd, D. and Shart, K. C. 1990. *In vitro* procedures for the induction of tetraploidy in diploid rose. Euphytica 49 : 35-38.

Shore, J. S. 1991. Chlomosomal evidence for autotetraploidy in the *Turnera ulmifolia* complex (Turneraceae). Can. J. Bot. 69 : 1302 - 1308.

Solar, A., Smole, J., Slampar, F. and Virscek-Marn, M. 1994. Characterization of isozyme variation in walnut (*Juglans regia* L.). Euphytica 77 : 105 - 112.

Tamura, M., Tao, R. and Sugiura, A. 1996. Production of dodecaploid plants of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.) by colchicine treatment of protoplasts. Plant Cell Reports 15 : 470-473.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995a. Embryogenic callus induction in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Songklanakarin J. Sci. Technol. 17 : 115 - 120.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995b. Plantlet formation from leaf-derived embryogenic callus of mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17 : 129 - 135.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995c. Types of medium and cytokinins in relation with purple leaf and callus formation of mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17 : 121 - 128.

Warren, J. M. 1994. Isozyme variation in a number of populations of *Theobroma cacao* L. obtained through various sampling regimes. Euphytica 72 : 121 - 126.

Witham, F. W., Blaydes, D. F. and Devlin, R. M. 1986. Chlorophyll absorption spectrum and qualitative determinations. *In* Exercises in Plant Physiology. (Ed. J. F. Vilain) pp. 128 - 131. Boston : Prindle, Weber & Schmidt.

Zeppernick, B., Schafer, F., Paasch, K., Arnholdt, B. and Neumann, K. H. 1994. Studies on the relationship between ploidy level, morphology, the concentration of some phytohormones and the nicotine concentration of haploid and double haploid tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and NICA plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 38 : 135 - 141.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงมังคุด

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	MS	WPM
1. ธาตุอาหารหลัก		
NH_4NO_3	1,650.00	400.00
KNO_3	1,900.00	-
KH_2PO_4	170.00	170.00
$CaCl_2H_2O$	-	96.00
$Ca(NO_3)_24H_2O$	-	556.00
$CaCl_22H_2O$	440.00	-
$MgSO_47H_2O$	370.00	-
K_2SO_4	-	990.00
2. ธาตุอาหารรอง		
KI	0.83	-
H_3BO_3	6.20	6.20
$MnSO_4H_2O$	16.90	16.90
$ZnSO_47H_2O$	10.60	8.60
$CuSO_45H_2O$	0.025	6.25
$Na_2MoO_42H_2O$	0.25	0.25
$CoCl_26H_2O$	0.025	-
3. ธาตุเหล็ก		
$FeSO_47H_2O$	27.80	27.80
Na_2EDTA	37.30	37.30
4. สารอินทรีย์		
Myo-inositol	100.00	104.10
Nicotinic acid	0.50	0.50
PyridoxineHCl	0.50	0.50
ThiamineHCl	0.10	6.00

องค์ประกอบ		ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
		MS	WPM
Glycine		2.00	2.00
Sucrose		30,000.00	30,000.00
5. สารควบคุมการเจริญเติบโต			
- ชักนำแคลลัส	BA	0.50	-
	TDZ	0.50	-
	PVP	500.00	
- ชักนำยอด	BA	-	0.10
	PVP		500.00
- ชักนำราก	BA	-	0.25
	PG	-	6.50

ภาคผนวกที่ 2 องค์ประกอบของสีย้อมที่ใช้ในการย้อมเอนไซม์

1. สีย้อมเปอร์ออกซิเดส (E.C. 1.11.1.7)

สารเคมี stock A

1. 3-amino-9-ethylcarbazole	420	มิลลิกรัม
2. β-napthol	290	มิลลิกรัม
3. acetone	200	มิลลิกรัม

วิธีการ ละลายสารในข้อ 1. และข้อ 2. ใน acetone ให้เป็นเนื้อเดียว เก็บไว้ในขวดสีชา

สารเคมี stock B

1. tris-HCl	1.5	มิลลิกรัม
2. acetic acid	1.7	มิลลิกรัม
3. distilled water	1.0	ลิตร

สารเคมี stock C

1. 30% H_2O_2	0.1	มิลลิลิตร
2. distilled water	0.9	มิลลิลิตร

วิธีการ ใช้ stock A : B : C สัดส่วน 20 : 80 : 1 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนย้อมวุ้นอะคริลาไมด์ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องจนติดสีชัดเจน

2. สีย้อมเอสเทอเรส (E.C. 1.1.1.37)

สารเคมี	1. 0.1 M phosphate buffer	100	มิลลิลิตร
	2. fast blue B salt	150	มิลลิกรัม
	3. 1%α-napthal acetate in absolute alcohol	3	มิลลิกรัม

วิธีการ ละลายสารในข้อ 2. ในสารข้อ 1. ให้เข้ากัน เติมสารในข้อ 3. ทันทีที่ย้อม ย้อมสีในที่มืดจนสีชัดเจน

3. สีย้อมแอซิดฟอสฟาเตส (E.C.3.1.3.2)

สารเคมี	1. 50 mM Na acetate pH 5.5	100	มิลลิลิตร
	2. 1 M $MgCl_2.6H_2O$	1	มิลลิลิตร
	3. fast black K salt or		
	fast Garnet GBC salt	100	มิลลิกรัม
	4. 1% α-napthol acid phosphate		
	(in 50% acetone)	3	มิลลิลิตร

วิธีการ ละลายสารในข้อ 3. ในข้อ 1. แล้วเติมสารละลายในข้อ 2 และข้อ 4. ย้อมสีในที่มืดจนติดสีชัดเจน

4. สีย้อมมาเลทดีไฮโดรจีเนส (E.C.1.1.1.37)

สารเคมี	1. 0.1 M tris-HCl pH 7.5	100	มิลลิลิตร
	2. 1 M DL-Malate pH 7.5	3	มิลลิลิตร
	3. NAD^+	30	มิลลิกรัม
	4. MTT	20	มิลลิกรัม
	5. PMS	4	มิลลิกรัม

วิธีการ ละลายสารในข้อ 3 - 5 ในสารข้อ 1 แล้วเติมสารในข้อ 2 ที่เตรียมเก็บไว้ในตู้เย็นเข็งในทันทีที่ย้อม ย้อมสีในที่มืดจนติดสีชัดเจน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวราตรี สุจารีย์

วัน เดือน ปี เกิด 12 เมษายน 2515

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2538
(เกษตรศาสตร์ เกียรตินิยม)	วิทยาเขตหาดใหญ่	