



245 10

รายงานวิจัย

246 30

\* การปรับปรุงพันธุ์มังคุดโดยวิธีชักนำการกลายพันธุ์ในหลอดทดลอง

Improvement of Mangosteen by Induction Mutation In Vitro

โดย

สมปอง เตชะโต

มงคล แซ่หลิม

ภาควิชาพืชศาสตร์

คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิทยาเขตหาดใหญ่

Order Key 16800  
BIB Key 140021

เลขหมู่ QK495 G-82 ก43  
เลขทะเบียน 1041 ก.1  
21/ต.ภ. 2541

## วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อสร้างมิ่งคุดพันธุ์ใหม่ที่มีระบบรากดี มีรากแก้ว รากแขนง และรากฝอยจำนวนมากเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของต้นกล้าในระยะแรก ในสภาพดินที่ไม่เหมาะสม
2. เพื่อสร้างมิ่งคุดพันธุ์ใหม่ที่มีลำต้นเตี้ย (bushy type) สะดวกต่อการเก็บเกี่ยว
3. เพื่อสร้างมิ่งคุดพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตได้เร็วขึ้นกว่าเดิม

## สถานที่ทดลอง และ/หรือ เก็บข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก เรือนกระจก และแปลงภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
2. ห้องฉายรังสีแกมมา ภาควิชารังสีวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
3. ห้องปฏิบัติการเซลล์เทคโนโลยี คณะพืชสวน มหาวิทยาลัยชิบะ ประเทศญี่ปุ่น

## ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

เริ่มดำเนินการตั้งแต่เดือนตุลาคม 2538 ถึง กันยายน 2541 รวมเวลา 3 ปี

## ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1. ได้มิ่งคุดพันธุ์ใหม่ที่แตกต่างไปจากพันธุ์ที่ปลูกอยู่ในปัจจุบัน เป็นการสร้างความหลากหลายให้กับพันธุ์มิ่งคุดเพื่อการผลิตมิ่งคุดที่มีคุณภาพ เหมาะสมกับการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ
2. นำความรู้ที่ได้จากการวิจัยไปใช้พัฒนาการสอนในระดับปริญญาตรี และ โท วิชาเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก (510-401) และเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูงของพืชปลูก (510-501)
3. ผลิตบัณฑิตในระดับบัณฑิตศึกษา จำนวน 2 คน โดยทำวิทยานิพนธ์ และนำออกเผยแพร่ จำนวน 5 เรื่อง คือ
  - 3.1 Micropropagation of Mangosteen through Young Leaf Culture.
  - 3.2 Effects of Explant Types on Meristematic Nodular Callus Formation from Young Leaves of Mangosteen
  - 3.3 การปรับปรุงพันธุ์มิ่งคุดโดยใช้รังสีแกมมา
  - 3.4 Recent Potential in Biotechnology of Mangosteen I: Micropropagation
  - 3.5 Recent Potential in Biotechnology of Mangosteen II: Cultivar Improvement

โดยผลงานเรื่องแรก ได้รับรางวัลประกาศเกียรติคุณดีเด่น รางวัลคาวากูชิ ประจำปี 2539 ในการนำเสนอผลงานภาคบรรยาย ในการประชุมวิชาการเรื่อง เทคนิคของวิธีการทางวิทยาศาสตร์

ชีวภาพ ครั้งที่ 13 ประจำปี 2539 จากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และกำลังรอดำเนินการอีกจำนวน 3 เรื่องคือ

- 3.6 การชักนำการกลายพันธุ์มั่งคุด: การตอบสนองของชิ้นส่วนพืชต่อสิ่งก่อกลายพันธุ์
  - 3.7 การชักนำการกลายพันธุ์มั่งคุด: ผลของสิ่งก่อกลายพันธุ์ ต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และเนื้อเยื่อวิทยา
  - 3.8 การชักนำการกลายพันธุ์มั่งคุดโดยใช้โคลชิซินกับตายอด ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง
4. นำข้อมูลที่ได้จากการวิจัยไปใช้บริการวิชาการในรูปการจัดอบรมเชิงปฏิบัติการ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และการใช้ประโยชน์ กับกลุ่มเกษตรกรที่สนใจ นักเรียนระดับมัธยมศึกษา และนักศึกษาวิทยาลัยเกษตรกรรม และเทคโนโลยีราชมงคล เป็นต้น

#### ระเบียบวิธีวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัยในการปรับปรุงพันธุ์มั่งคุดด้วยวิธีการชักนำการกลายพันธุ์ในหลอดทดลอง ประกอบด้วยขั้นตอนและกิจกรรมหลักที่สำคัญ 4 กิจกรรมคือ

1. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนเพื่อชักนำการสร้างกลุ่มดาวรวมโดยตรง หรือผ่านการสร้างแคลลัส
2. การทรีตไบที่ชักนำแคลลัส หรือกลุ่มดาวรวมด้วยสิ่งก่อกลายพันธุ์
3. การชักนำพืชใหม่จากแคลลัส หรือกลุ่มดาวรวม
4. การตรวจสอบแคลลัส และต้นกล้าที่ได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีการทางชีวเคมี/เนื้อเยื่อวิทยาตลอดจนลักษณะทางสัณฐาน

## Micropropagation of Mangosteen Through Young Leaf Culture

Sompong Te-chato and Mongkol Lim

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University

Hat Yai, Songkla 90112, Thailand

### ABSTRACT

A four-step procedure was used for plant regeneration from *in vitro* grown laminae (5-15 mm long) of mangosteen. Step I medium was Murashige and Skoog (MS) with benzyl adenine (BA) at 0.5 mg/l in combination with thidiazuron (TDZ) 0.5 mg/l. Step II medium was woody plant medium (WPM) with BA alone at 0.1 mg/l. Step III medium was step II medium overlaid with half strength liquid MS with 0.06 naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.03 mg/l BA. Step IV medium was WPM with 0.25 mg/l BA, 0.25% activated charcoal (AC) and or 5.6 mg/l phloroglucinol (PG). Lamina explants were cultured in medium I for 3-4 weeks to induce callus and the calluses were subcultured to the medium I for 2-3 times in order to multiplication. Step II medium was designed to induce leaf primordia. Medium III and IV were used to promote elongation of the shoots and induce roots, respectively.

## **Effects of Explant Types on Meristematic Nodular Callus Formation from Young Leaves of Mangosteen**

**Sompong Te-chato<sup>1</sup>**

### **ABSTRACT**

Callus induction from various types of leaf explants were investigated. All the leaf explants were cultured on callus induction medium for 3-4 weeks. Subculture of the callus was carried out 3-4 week intervals. The results showed that whole leaf explants produced meristematic nodular calli which could be multiplied and regenerated into plantlets. The calli arised from proximal end, midrib and lamina in all explants. Segmented leaf explants produced friable calli that were easily dispersed in liquid medium to establish cell suspension cultures. Most of leaf apex both in whole leaf or segmented leaf explants provided fuzzy or lignified callus which can not be multiplied and induced to form meristematic nodules. Stripped leaf explants also provided meristematic nodule callus but growth and multiplication rate were much lower than that of whole leaf explants. In case of clonal propagation of mangosteen through meristematic nodule callus, it is advisable to use whole leaf explant.

key words : explant type, callus, mangosteen, meristematic nodule, young leaf

## การปรับปรุงพันธุ์มังคุดในหลอดทดลองโดยใช้รังสีแกมมา

### Improvement of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) *In Vitro* by Gamma-Ray

วิทยา พรหมมี<sup>1</sup> และ สมปอง เตชะโต<sup>1</sup>

#### ABSTRACT

Callus obtained from culturing young purple leaves of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) were treated with gamma ray in difference doses, 0, 5, 10, 20 and 40 gy. After cultured for 3 weeks, callus recover rate was checked. Significant decrement of recover rate was found in 20 and 40 gy compared to control. At such dosage levels also affected stem growth length and generated some abnomal characters in plants (MIR1) such as two leaves apex, serrate leaves and adventitious branches. Peroxidase enzyme was assayed to confirm genetic variation. Eventhough, no difference of banding pattern was detected at zone 1 but more activity of peroxidase was observed in treated plants, especially 20 gy. However, banding pattern of this enzyme at zone 2 of all treated plants were different from control indicated induce mutation could be generated .

key words : improvement, mangosteen, *in vitro*, gamma-ray

#### บทคัดย่อ

จากการนำแคลลัสซึ่งชักนำจากใบอ่อนสีแดง ฉายรังสีแกมมา เพิ่มขึ้น 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าการฉายรังสีแกมมา 20 และ 40 เกรย์ ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลงแตกต่างจากชุดเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญ หลังจกศึกษาลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้นชั่วที่ 1 (MIR1) พบว่าต้นที่ได้หลังจากฉายรังสีแกมมา 10, 20 และ 40 เกรย์ มีขนาดเตี้ยลง และต้นที่ได้มีอัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกลดน้อยกว่าต้นในชุดเปรียบเทียบ และลักษณะผิดปกติทางสัณฐานที่พบเห็น คือ ปลายใบสองแฉก ขอบใบมีรอยหยัก การจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ เกิดมังคุดสามใบและเกิดกิ่งแขนง จากการศึกษารูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของต้น MIR1 ที่ได้รับรังสีแกมมา พบว่ามีความแตกต่างจากชุดเปรียบเทียบโดยไซโมแกรมที่แยกได้เป็น 2 zone เมื่อพิจารณาใน zone พบว่าต้นที่ได้รับรังสีแกมมาไซโมแกรมได้ไม่แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบ แต่ต้นที่ได้รับรังสีแกมมามีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าซึ่งสังเกตได้จากความเข้มข้นของไซโมแกรมที่ปรากฏ โดยเฉพาะความเข้มข้นรังสี 20 เกรย์ เมื่อพิจารณาไซโมแกรมใน zone 2 พบว่า ต้นที่ได้รับรังสีแกมมาสามารถแยกไซโมแกรมได้แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบ แสดงว่าการฉายรังสีในความเข้มต่างๆ อาจชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้

<sup>1</sup>ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

# Recent potential in the biotechnology of mangosteen I : Micropropagation

Sompong Te-chato

## Abstract

Te-chato, S.

Recent potential in the biotechnology of mangosteen I : Micropropagation

Songklanakarin J. Sci. Technol., 1998, 20(3) : 275-284

Micropropagation of mangosteen *in vitro* could be established by 3 types of cultures; seed, young red leaf and callus culture. Seeds and seed segments provided a maximum number of shoot bud in Murashige and Skoog (MS) or modified MS (MMS) enriched with BA (25  $\mu$ M or 5 mg/l). Young purple leaf cultures provided a wide range of 2 to 40 shoots per leaf. In this case, the leaves or a cluster of shoots must be pre-cultured in the two-phase medium which was modified for a number of tiny shoot bud induction. Callus cultures were established using a four-step culture procedures. First, callus was induced on callus induction medium (CIM), followed by induction of shoot primordia on shoot primordia induction medium (SPIM), elongation of the shoot on shoot elongation medium (SEM) and subsequently induction of root on root induction medium (RIM). Nodular calli could be induced from almost all explant on benzyladenine (BA) and thidiazuron (TDZ) containing MS medium. Callus cultures gave the most advantageous to micropropagation of mangosteen due to its successive proliferation and production of plantlet year round. Moreover, it may be useful to apply *in vitro* technique for mangosteen improvement, especially, induction of somaclonal variations or mutations.

---

**Key words :** mangosteen, biotechnology, micropropagation, callus culture, seed culture, young purple leaf

---

M.Agr.(Crop Biotechnology), Assoc. Prof., Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand.

Received 15 December 1997 Accepted 2 April 1998

## บทคัดย่อ

สมปอง เตชะโต

ศักยภาพของการใช้เทคโนโลยีชีวภาพกับมังคุดในปัจจุบัน I : การขยายพันธุ์

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2541 20(3) : 275-284

การขยายพันธุ์มังคุดในหลอดทดลองสามารถทำได้โดยใช้การเลี้ยง 3 รูปแบบ คือ การเพาะเลี้ยงเมล็ด การเพาะเลี้ยงใบอ่อนสีแดง และการเพาะเลี้ยงแคลลัส การเพาะเลี้ยงเมล็ดและชิ้นส่วนเมล็ด ให้จำนวนยอดสูงสุดในอาหารสูตรมาริชิกและสกุค (MS) หรือสูตรดัดแปลง (MMS) เติมเบนซิลอะดีนีน (BA)  $25 \mu\text{M}$  หรือ 5 มก/ล การเพาะเลี้ยงใบอ่อนสีแดงให้จำนวนยอดในช่วงตั้งแต่ 2 ถึง 40 ยอดต่อใบที่เพาะเลี้ยง การชักนำยอดโดยตรงจากใบต้องเตรียมใบโดยการเลี้ยงในอาหารสองชั้น สำหรับการขยายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยง 4 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการชักนำแคลลัสในอาหารชักนำแคลลัส (CIM) ขั้นตอนที่สองเป็นการชักนำจุดกำเนิดยอดในอาหารชักนำจุดกำเนิดยอด (SPIM) ขั้นตอนที่สามเป็นการชักนำการยึดยาวของยอดในอาหารชักนำการยึดยาวยอด (SEM) และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการชักนำรากในอาหารชักนำราก (RIM) โนดูลาแคลลัสสามารถชักนำได้จากชิ้นส่วนที่เลี้ยงเกือบทั้งหมดบนอาหารสูตร MS เติม BA และไรโคอะซูรอน (TDZ) แคลลัสมังคุดที่ชักนำได้มีข้อได้เปรียบในการขยายพันธุ์ ทั้งนี้เพราะสามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างต่อเนื่องและชักนำพืชต้นใหม่ได้ตลอดทั้งปี นอกจากนี้ยังสามารถใช้แคลลัสดังกล่าวเป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์มังคุดด้วยวิธีการในหลอดทดลอง เช่น การชักนำไซมาโคลนอลวารีเอชัน หรือชักนำการกลายพันธุ์



## Recent potential in the biotechnology of mangosteen II : Cultivar improvement

Sompong Te-chato

### Abstract

Te-chato, S.

Recent potential in the biotechnology of mangosteen II : Cultivar improvement  
Songklanakarin J. Sci. Technol., 1998, 20(3) : 285-293

Somaclonal variation obtained from culturing apomict seed of mangosteen on modified Murashige and Skoog (MMS) medium supplemented with 25  $\mu$ M benzyladenine (BA) for 8 weeks consisted three types of phenotypic variants; chimera, malformed leaves and chlorosis. Phenotypic variation frequency of those variants ranged from  $6 \times 10^{-4}$  (for chimera) to  $3 \times 10^{-2}$  (for chlorosis). In the case of induced mutation, gamma irradiation at 10 grays and 0.5% ethylmethane sulfonate (EMS) caused more than 50% decrement of percent leaf forming callus. DNA analyses of calli induced from treated and non-treated leaves by randomly amplified polymorphic technique (RAPD) revealed difference polymorphisms. This confirms radio- and chemo-sensitivity of the two different types of mutagens. The results of DNA analyses were related with an inhibitory effect on percent leaf forming callus.

---

**Key words :** mangosteen, biotechnology, cultivar improvement, somaclonal variation, RAPD

---

M.Agr.(Crop Biotechnology), Assoc. Prof., Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand.

Received 15 December 1997 Accepted 2 April 1998

## บทคัดย่อ

สมปอง เตชะโต

ศักยภาพของการใช้เทคโนโลยีชีวภาพกับมังคุดในปัจจุบัน II : การปรับปรุงพันธุ์

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2541 20(3) : 285-293

การกลายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมังคุดในอาหารสูตรดัดแปลงมูราซิกและสกุค (MMS) เต็มเบนซิลอะดีนีนเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ประกอบด้วย 3 ลักษณะ คือ อาการใบด่าง (chimeral leaf) อาการใบผิดปกติ (malformed leaf) และอาการใบซีดเหลือง (chlorotic leaf) อัตราการกลายพันธุ์ในลักษณะดังกล่าวอยู่ในช่วงตั้งแต่  $6 \times 10^{-4}$  (อาการใบด่าง) ถึง  $3 \times 10^{-2}$  (อาการใบซีดเหลือง) ในกรณีการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการใช้รังสีและสารเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงใบและแคลลัส พบว่า การฉายรังสีแกมมา 10 เกรย์ และการจุ่มแช่เอทิลมีเทนซัลโฟเนท (EMS) เข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่งผลให้ความสามารถในการสร้างแคลลัสจากใบลดลง 50% และจากการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอด้วยวิธีการ random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) จากแคลลัส และใบที่ชักนำจากการให้สิ่งก่อกลายพันธุ์ พบว่า มีรูปแบบของดีเอ็นเอ (polymorphism) ที่แตกต่างจากหน่วยทดลองเปรียบเทียบ การตรวจสอบดีเอ็นเอเป็นการยืนยันถึงผลของสิ่งก่อกลายพันธุ์ทั้งสองชนิดที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้มีความสัมพันธ์หรือสหสัมพันธ์กับการผลการยับยั้งการสร้างแคลลัสภายหลังการให้สิ่งก่อกลายพันธุ์

การชักนำการกลายพันธุ์มังคุด: การตอบสนองของชิ้นส่วนพืชต่อสิ่งก่อกลายพันธุ์  
**Mutation Induction in Mangosteen: Response of Explants to Mutagens**  
 สมปอง เตชะโต และวิทยา พรหมมี

**บทคัดย่อ**

ตัดแยกใบอ่อนสีม่วงแดงของมังคุดที่เตรียมเลี้ยงในอาหารสองชั้น และรวบรวมโนดูลา แคลลัสที่ชักนำในอาหารสูตรชักนำแคลลัสมาจุ่มเชื้อสารเคมีก่อกลายพันธุ์เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต และฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ นำใบ และแคลลัสที่ผ่านการให้สิ่งก่อกลายพันธุ์ทั้งสองชนิด มาตรวจสอบการสร้างแคลลัสจากใบ และการรอดชีวิตของแคลลัสในแต่ละสัปดาห์ เพื่อตรวจสอบรูปแบบความสามารถในการสร้างแคลลัสจากใบเปรียบเทียบกับรูปแบบการรอดชีวิตของแคลลัสในแต่ละความเข้มของสิ่งก่อกลายพันธุ์ทั้งสองชนิด จากการศึกษาพบว่าการใช้ EMS ความเข้มข้นสูงขึ้นให้อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลง ความเข้มข้นที่ยับยั้งการพัฒนาได้น้อย 50 % ของชุดเปรียบเทียบ คือ ความเข้มข้น 0.50 % สำหรับการสร้างแคลลัส พบว่าเป็นไปทำนองเดียวกัน แต่ความเข้มข้นที่ยับยั้งการสร้างแคลลัสได้ 50 % คือ 0.50-0.75 % ในกรณีของการฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ พบว่ารังสีความเข้ม 20 และ 40 เกรย์ ทำให้การรอดชีวิตของแคลลัส 84.20 และ 80.80 % แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบ ซึ่งให้การรอดชีวิต 100 % อย่างไรก็ตามการรอดชีวิตของแคลลัสหลังจากฉายรังสีไม่มีความรุนแรง ในขณะที่การสร้างแคลลัสจากใบมีความรุนแรงมาก โดยเฉพาะรังสีความเข้ม 20 และ 40 เกรย์ ไม่สามารถชักนำแคลลัสจากใบที่ฉายรังสีได้เลย ในขณะที่ใบที่ได้รับรังสี 5 และ 10 เกรย์ สร้างแคลลัสได้ 50 % และ 10 % ตามลำดับ ความเข้มรังสีที่ยับยั้งการสร้างแคลลัสจากใบได้ 50 % คือ 10 เกรย์

---

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่  
 Department of Plant Science , Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla  
 University, Hat Yai, 90012, Thailand.

## Abstract

Young red leaves of mangosteen raising in two-phase medium and callus were collected and treated with two different sources of mutagens, gamma ray and ethylmethane sulfonate (EMS). After treating with both mutagens leaves and calli were cultured onto callus induction medium for evaluating the effect of mutagens on percent leaf forming callus and survival percentage of callus. The results showed that an increment of EMS caused decreasing in survival rate of calli. The concentration which inhibited 50% growth of the calli was 0.5%. Similar result was also found in the case of leaf forming callus. A 50% inhibition of leaf forming callus was obtained by treating with EMS at concentration of 0.5-0.75%. In case of irradiation, gamma ray at dose of 20 and 40 grays gave survival percentage of 84.20 and 80.80%, significant difference from that of control which gave survival percentage of 100%. Contrary result was obtained when young red leaves were exposed to gamma ray. Drastical decrease in leaf forming callus was found when leaves were irradiated with dose at higher than 10 grays. A 20 and 40 gray irradiation could inhibit callus formation from leaves absolutely while 5 and 10 gray irradiation gave leaf forming callus percentage of 50 and 10%. The dose which inhibited 50% callus formation was 10 grays.

---

**Keywords:** Mangosteen, mutation, leaf, callus, survival rate

---

การชักนำการกลายพันธุ์มั่งคุด: ผลของสิ่งก่อกลายพันธุ์ต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และเนื้อเยื่อวิทยา

Mutation Induction in Mangosteen: Effect of Mutagens on Biochemical and Histological Changes.

สมปอง เตชะโต และวิทยา พรหมมี

### บทคัดย่อ

นำแคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนสีม่วงแดงของมั่งคุดซึ่งดูแลในหลอดทดลองมาฉายรังสีแกมมา และจุ่มเชื้อสารเคมีก่อกลายพันธุ์เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตความเข้มข้นต่างๆ นำแคลลัสที่ผ่านการให้สิ่งก่อกลายพันธุ์ทั้งสองมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา และชีวเคมี เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำการกลายพันธุ์ในมั่งคุด จากการศึกษาพบว่าแคลลัสที่ได้รับรังสีแกมมา 40 เกรย์ 2 ครั้ง มีจำนวนชั้นของเซลล์อีพิเดอมิสที่เกิดความเสียหายมากกว่าความเข้มข้นอื่นๆ ในขณะที่การใช้ EMS 0.50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 และ 60 นาที ส่งผลให้เกิดความเสียหายชั้นของเซลล์อีพิเดอมิสน้อยกว่า แต่เซลล์อีพิเดอมิสชั้นแรกเกิดความเสียหายรุนแรงมากกว่า สำหรับแคลลัสที่ได้รับทั้งการฉายรังสีแกมมา 40 เกรย์ 2 ครั้ง ร่วมกับการจุ่มเชื้อ EMS ความเข้มข้นและเวลาข้างต้น ส่งผลให้จำนวนชั้นของเซลล์อีพิเดอมิสที่เสียหายมากกว่าการให้รังสีแกมมา และ EMS เพียงอย่างเดียว ระบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ของใบจากต้นมั่งคุดชั่วที่ 1 และ แคลลัสที่พัฒนาจากใบของต้นชั่วที่ 1 ทุกระดับความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ ความแตกต่างของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสระหว่างสิ่งก่อกลายพันธุ์ทั้งสองที่ตรวจพบมีทั้งรูปแบบของไซโมแกรม และความเข้มของไซโมแกรมที่บ่งบอกถึงกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว EMS ความเข้มข้น 0.5-1.0% และรังสีแกมมา ความเข้ม 5-10 เกรย์ สามารถชักนำการกลายพันธุ์จากแคลลัสมั่งคุดได้

---

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่  
Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla  
University, Hat Yai, 90112, Thailand.

### Abstract

Nodular calli induced from young red leaves raising *in vitro* was brought to irradiation with various doses of gamma ray and soaking in ethylmethanesulfonate (EMS) at various concentrations. Treated-calli were subjected to examining cytologically and biochemically in order to determine an optimum dose of both the mutagens. The results showed that calli irradiated with gamma ray at 40 grays for 2 times caused damage to epidermal cells more than the other doses and 0.5% EMS. However, double irradiation subsequent to application of EMS at the above concentration and period caused the most severe damage to the cells. Peroxidase was the most effective isozyme system for identification of mutants obtained from first regenerants. Zymogram patterns of the enzyme extracted from both leaf and calli showed the difference in terms of both number and density between treated- and non-treated leaf or calli. It can conclude that 0.5-1% EMS or 5-10 gray gamma ray could induce mutation in mangosteen.

---

Key words: Mutation, mangosteen, biochemical change, histological change, mutagen

---

การชักนำ การกลายพันธุ์ มังคุดโดยใช้ โคลชิซิน กับ ใบช่ ตายอดที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง  
**Induction Mutation of Mangosteen by Colchicin Treatment with Shoot  
 Bud Cultured *In Vitro***

สมปอง เตชะโต<sup>1</sup> และ ราตรี สุจรรย์<sup>2</sup>

บทคัดย่อ

ทำการทรีตตายอดของมังคุดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0-10,000 มก/ล เป็นเวลา 2 ชั่วโมงถึง 30 วัน เพื่อชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมในอันที่จะปรับปรุงพันธุ์มังคุด จากการศึกษาพบว่าจำนวนยอดเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ขนาดยอด จำนวนราก จำนวนใบ และพื้นที่ใบมีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์พบว่า มีปริมาณคลอโรฟิลล์ a เพิ่มขึ้นแตกต่างทางสถิติกับหน่วยการทดลองอื่นๆ เมื่อเพิ่มเวลาในการทรีตเป็น 10 ชั่วโมง และเพิ่มความเข้มข้นเป็น 3,000-10,000 มก/ล พบว่าเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดลดลง แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์ a และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มเวลาในการทรีตเป็น 30 วัน พบว่าจำนวนยอดเฉลี่ย และการรอดชีวิตของตายอดลดลง โคลชิซินความเข้มข้น 500 750 และ 1,000 มก/ล ที่เวลาข้างต้น ส่งผลให้ความยาวรากเพิ่มขึ้น และจำนวนใบลดลง ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซินเป็น 3,000 6,000 และ 10,000 มก/ล ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงโดยเฉพาะความเข้มข้น 10,000 มก/ล มียอดรอดชีวิตเพียง 12 เปอร์เซ็นต์ ใบร่วง และชะงัก การเจริญเติบโต เมื่อตรวจสอบเซลล์ปลายรากพบว่าไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างได้ เนื่องจากโครโมโซมมีขนาดเล็ก นับจำนวนไม่ได้ เมื่อตรวจสอบจำนวนและขนาดของเซลล์ปากใบ พบว่าการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเข้มข้น 750 และ 1,000 มก/ล เป็นเวลา 30 วัน มีเซลล์ปากใบบางเซลล์ใหญ่กว่า และมีสีเข้มกว่าปกติ สำหรับการตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้เอนไซม์ 4 ระบบ พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และเอสเทอเรสสามารถบอกความแตกต่างได้ แม้ว่าแถบสีที่ปรากฏไม่ชัดเจนนัก

<sup>1</sup>M. Agr. (Crop Biotechnology), รองศาสตราจารย์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่, <sup>2</sup>วท.ม. (พืชศาสตร์) นักวิชาการเกษตร บริษัทกรุงเทพเมล็ดพันธุ์จำกัด

## Abstract

A cluster of mangosteen buds was treated with various concentrations of colchicine ranging from 0 to 10,000 mg/l for 2 hours to 30 days in order to induce ploidy level for varietal improvement. The result revealed that concentration of 1,500 mg/l for 2 hours provides a non-significant difference in mean survival of shoots but proved significant in the size of shoot, a number of roots, leaves and leave areas. In addition, application of 500 mg/l colchicine induced chlorophyll a content, significantly higher than other concentrations produced. Increasing dilution treatment duration to 10 hours and concentration to 3,000 to 10,000 mg/l reduced the percentage bud forming shoot whereas chlorophyll a and total chlorophyll content increased. 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. A number root tip chromosomes 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 and color of guard cells. A study on 4 systems of isozyme revealed that peroxidase and esterase can preliminarily distinguish the difference between treated and non-treated plantlets.

---

<sup>1</sup>M.Agr. (Crop Biotechnology), Associate Professor, Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, 90112, Thailand. <sup>2</sup>M.S. (Plant Science), Researcher at Bangkok Seed Company.



## สารบัญ

ลำดับเรื่องที่	ชื่อเรื่อง	หมายเลขเรื่อง
1	Micropropagation of Mangosteen through Young Leaf Culture.	1.1
2	Effects of Explant Types on Meristematic Nodular Callus Formation from Young Leaves of Mangosteen	2.1
3	การปรับปรุงพันธุ์มังคุดโดยใช้รังสีแกมมา	3.1
4	Recent Potential in Biotechnology of Mangosteen I: Micropropagation	4.1
5	Recent Potential in Biotechnology of Mangosteen II: Cultivar Improvement	5.1
6	การชักนำการกลายพันธุ์มังคุด: การตอบสนองของชิ้นส่วนพืชต่อสิ่งก่อกลายพันธุ์	6.1
7	การชักนำการกลายพันธุ์มังคุด: ผลของสิ่งก่อกลายพันธุ์ต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และเนื้อเยื่อวิทยา	7.1
8	การชักนำการกลายพันธุ์มังคุดโดยใช้โคลชิซินกับตายอดที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง	8.1

## Micropropagation of Mangosteen Through Young Leaf Culture

Sompong Te-chato and Mongkol Lim

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University

Hat Yai, Songkla 90112, Thailand

### ABSTRACT

A four-step procedure was used for plant regeneration from *in vitro* grown laminae (5-15 mm long) of mangosteen. Step I medium was Murashige and Skoog (MS) with benzyl adenine (BA) at 0.5 mg/l in combination with thidiazuron (TDZ) 0.5 mg/l. Step II medium was woody plant medium (WPM) with BA alone at 0.1 mg/l. Step III medium was step II medium overlaid with half strength liquid MS with 0.06 naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.03 mg/l BA. Step IV medium was WPM with 0.25 mg/l BA, 0.25% activated charcoal (AC) and or 5.6 mg/l phloroglucinol (PG). Lamina explants were cultured in medium I for 3-4 weeks to induce callus and the calluses were subcultured to the medium I for 2-3 times in order to multiplication. Step II medium was designed to induce leaf primordia. Medium III and IV were used to promote elongation of the shoots and induce roots, respectively.

## INTRODUCTION

*In vitro* culture of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) were established using seeds (1, 10), young leaves from *in vitro* (13) and field grown seedlings and mature trees (2). Most of those reports described plant regeneration directly from cultured explants. Propagation of mangosteen by formerly mentioned protocols is less effective and leading to a failure in mass propagation of the trees. Recently, there are some reports on callus formation from young leaf culture (15). The calluses are classified to be compact nodule one. Histological studies revealed that it is composed of meristematic dome and a pair of leaf primordia. Origin of the nodules are from the two main sources of cells so called epidermis and vascular bundle (13). This success has been achieved by manipulating culture medium with thidiazuron (TDZ) (16).

TDZ at concentration higher than 1  $\mu\text{M}$  was reported to promote callus formation, adventitious shoots or somatic embryos in many fruit crops (5, 7, 8, 9).

So far, there has no report on plant regeneration from meristematic nodule callus induced from any explant of mangosteen tree. This successful might be very helpful for mass propagation in a short term and improvement of this crop by genetic engineering technique in the near future. In this paper, we report clear distinguish steps routinely using in plant regeneration method for clonal propagation of mangosteen.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material:

*In vitro* shoot cultures of mangosteen were maintained using seed and leaf explant subcultured every 3-4 weeks. Seed- and leaf-derived shoots were excised and placed in half-strength liquid Murashige and Skoog (1/2MS). Culture conditions were similar to those reported previously (15, 16). Young purple or red and green leaves were collected from 3-6 week-old shoots and used for culture.

### Meristematic nodule callus induction and multiplication:

The leaves with size approximately 5-15 mm in length were excised and transferred to step I medium. The medium was MS modified by supplemented with 500 mg/l polyvinylpyrrolidone (PVP), 3% sucrose, BA and TDZ at various concentrations showed in Table 1. The medium was solidified with 0.2% Phytigel (Sigma). Multiplication of the callus was carried out by regular subculture at 3 week-intervals to fresh medium of the same composition supplemented with BA and TDZ at an equal concentration of 0.5 mg/l during the initial 4 subcultures, number of nodules was counted at the end of each subculture and multiplication rate was recorded.

### Shoot bud induction:

Shoot bud induction from the callus was performed in step II medium. The medium was woody plant medium (WPM) supplemented with 500 mg/l PVP, 3% sucrose, 0.3% Phytigel and BA at various concentrations. Three pieces of the callus were transferred to 25 ml of the medium containing in medium bottle (40 x 80 mm).

### **Elongation of the shoots:**

The callus with tiny shoot buds which compose of meristematic dome and one pair of leaf was transferred to step III medium. The media used in step III were step II medium with two different quantities, 15 and 25 ml and two phases media. Lower phase medium is 10 ml of step II medium and upper phase medium is 1/2MS liquid medium supplemented with 0.06 mg/l NAA and 0.03 mg/l BA. Each culture bottle was contained one piece of the callus.

### **Root induction:**

Elongated shoots of more than 10 mm (in length) were excised and subjected to various treatments (Table 4). In case of treating, the basal cut end of shoots were wounded. The shoots were then dipped in the solution of 1,000 mg/l IBA which was sterilised by filtering through Millipore membrane with pore size 0.45  $\mu\text{m}$  in the dark for 15 minutes. Each shoot was finally transferred to test tube (20 x 150 mm) containing 10 ml of step IV medium. The medium is WPM supplemented with 0.25 mg/l BA, 0.25% activated charcoal (AC), 5.6 mg/l phloroglucinol (PG), 3% sucrose and 1.0% Agar-Agar.

All the culture were maintained at 28°C under 2,000 lux illumination for 16 hour photoperiod. For callus induction and multiplication, 25 explants were placed in each Petri-dish. A minimum of 5 Petri-dishes were designed to each treatment. In case of shoot bud induction and elongation of the shoots, 3 pieces of the callus were placed in medium cultured bottle containing 25 ml of culture medium. A minimum of 25 vessels were designed to each treatment. Data on percentage of the callus formation, number of nodules and shoot regeneration were recorded. The data were statistically analysed using completely randomized design (CRD) and mean among each treatment was separated by Duncan's Multiple Range Test (DMRT). For root induction in step IV procedure, a hundred shoots were used to each treatment. Initially, the cultures were maintained under darkness for 2 weeks to induce root primordia. To promote elongation of the roots, the cultures were transferred to illuminated condition with 2,000 lux, 16 hour photoperiod at 26°C for further 2-4 weeks. At the end of culture period, percentage of root formation, number of root were scored.

## RESULTS

### Meristematic nodule callus induction and multiplication:

All concentrations of BA and TDZ tested in this experiment could provide meristematic nodule callus (Table 1). A lower (0.1 mg/l) or higher (1.0 mg/l) concentration of TDZ in combination with BA (0.5 mg/l) caused decrement percentage of meristematic nodule callus. An equal concentration of BA and TDZ at 0.5 mg/l gave the best results (Table 1).

Table 1 Effect of various concentrations of BA and TDZ on meristematic nodule callus formation

BA (mg/l)	TDZ (mg/l)	% meristematic nodule callus	avr. no. of nodule
0.5	0.1	15.0 ± 4.4 c	11.3 a
0.5	0.5	68.8 ± 20.1 a	10.3 a
1.0	0.5	66.7 ± 19.5 a	8.6 a
1.0	1.0	25.0 ± 7.3 b	5.6 b

Mean not sharing letter in common within column differ significantly by DMRT (P=0.05).

The result in Table 1 showed that step I medium used for callus induction is basal MS supplemented with 500 mg/l PVP, 3% sucrose, 0.5 mg/l BA, 0.5 mg/l TDZ and 0.2% Phytigel. The medium was also used for multiplication the callus. During four times of subculture, an average number of multiplication rate of the nodules was recorded to be 4 to 5 times within 3-4 weeks of culture (Table 2).

Table 2 Effect of subculture on multiplication of the nodules

no. of subculture	multiplication rate
1	4.7
2	4.8
3	4.2
4	4.1

**Shoot bud induction:**

The calluses induced in induction step I medium ceased to undergo further development. An additive or additional meristematic nodules was obtained when they were kept in the same medium. After transfer to WPM in the absence of TDZ, the nodules developed beyond globular-like stage. Yellow or cream immature nodules turns to mature green one. A great number of shoot bud formation was obtained in the medium supplemented with 0.1-0.5 mg/l BA (Table 3). A high concentration of BA (1.0 mg/l) reduced average number of shoot bud formation. According to the result, step II medium is WPM supplemented with 500 mg/l PVP, 3% sucrose, 0.1 mg/l BA and 0.3% Phytigel.

Table 3 Effect of various concentrations of BA in WPM on average number of shoot bud formation from the nodule

BA (mg/l)	avr. no. of shoot at length		
	0-5	6-10	>10 mm
0.1	9.27 a (2-19)	0.97 (0-7)	0.58 (0-6)
0.5	8.39 a (3-19)	0.94 (0-6)	0.48 (0-5)
1.0	5.90 b (1-13)	0.48 (0-5)	0.22 (0-5)

Mean not sharing letter in common within column differ significantly by DMRT (P=0.05).

Number in parenthesis shows the range of shoots.

### Elongation of the shoots:

Shoots obtained from all concentrations of BA elongated very slowly. Transfer a cluster of tiny shoot buds to a thick layer of step II medium (25 ml) or overlaid thin layer medium with 10–15 ml of liquid 1/2MS containing 0.06 mg/l NAA and 0.03 mg/l BA promoted a rapid elongation of shoots (Figure 1). Step III medium is the medium used for overlaying on step II medium.

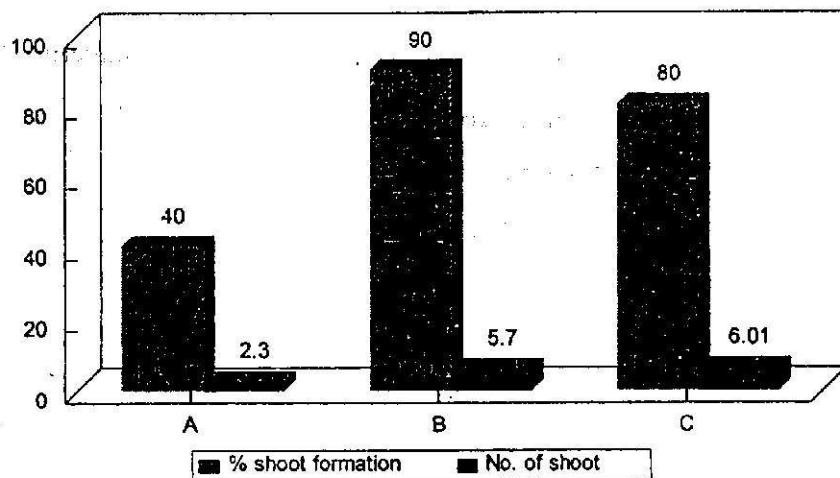


Figure 1 Effect of step III medium on shoot bud formation. A: thin, B: thick layer of step II medium and C: overlay with step III medium.

### Root induction:

The highest percentage of root induction was obtained from micro-shoots which was wounded and treated with IBA solution (Table 4). Addition PG to the medium caused a slightly decrease in percentage of root induction. However, in some experiment addition PG promoted a 100% root induction. Wounds applied to the basal part of the shoots play a significant role on root induction. Without wounding, percentage of root induction was severely decreased. Percentage of root induction in the absence of wound and IBA treatment was 0% (Table 4).



Table 4 Effect of various treatments to micro-shoots on root induction

treatment	wound	IBA	PG	% root	# root
1	+	+	-	68.24 a	0-2
2	+	+	+	50.23 b	0-3
3	+	-	+	38.36 c	0-2
4	-	+	+	4.44 d	0-1
5	-	-	+	0.00 d	0

Mean sharing letter in common within column differ significantly by DMRT (P=0.05).

### DISCUSSION

Generally, cultured young leaves of mangosteen onto WPM or MS supplemented with 5 mg/l BA has been reported to produce 2-50 micro-shoots (3, 13). Addition of TDZ in step I medium provided meristematic nodule callus formation (Table 1). By regular subculture the callus to fresh medium at 4 week-interval, more than one million ( $3^{17}$ ) of plant will be produced a year from one lamina. Contrary to the results obtained by Goh *et al.* (3) they reported that as many as 45 shoot buds were obtained from a single seedling leaf. Each leaf from an *in vitro* shoot could yield up to 8 shoot buds. They calculated that about 1,500 plantlets could be obtained in the first year from one pair of seedling leaves. They also reported that a wound response in the presence of BA was necessary to trigger shoot bud differentiation. The present results demonstrated that those response was not found to trigger callus formation. TDZ has been reported to be the most active cytokinin-like substance for shoot induction in woody plant tissue culture (4). The plant growth regulator in combination with CPPU (N-(2-chloro-4 pyridyl)-N'-phenylurea (forchlor-fenuron) stimulated callus formation in common bean and faba bean (6). From our results it appears that callus formation in mangosteen leaves is controlled by TDZ and BA. However, TDZ produced an inhibitory effect on shoot bud formation so that it is necessary to transfer the callus to shoot bud formation medium or step II medium (Table 3). This evidence has also been reported on proliferation of guava (7). The use of TDZ in proliferation

of guava induce abnormal shoot growth. Shoots were stunted with yellowish leaves, and this effect increased with increasing TDZ. Some of these shoots grew normally upon transfer to the medium with BA.

Goh *et al.* (3) reported that percentage of root induction was obtained about 80% by transferring shoots of 10–15 mm in rooting medium without any treatment. Different results were obtained in our results. Wounding plays the most important role in induction roots followed by IBA treatment (12). Wounding in combination IBA treatment promoted the best results (Table 4). Even PG was reported to promote a 100% root induction (11), but in this evidence we used the young generation shoots. The same concentration of PG which was used in the former experiments might be higher enough to cause a harmful effect on young tissue. Regardingly, percentage of root induction obtained in the presence of PG in the present studies was significant lower than absence of PG. However, time consumed for root induction was the same. Root primordia induction and root elongation took place 2 weeks in the dark and 2 weeks in illumination condition, respectively. Total time consumed for root induction was 4 weeks shorter than that reported by Goh *et al.* (3).

## REFERENCES

- Goh, H. K. L., Rao, A. N. and Loh, C. S. 1988. *In vitro* plantlet formation in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Annals of Botany* 62: 87–93.
- Goh, H. K. L., Rao, A. N. and Loh, C. S. 1990. Direct shoot bud formation from leaf explant of seedlings and mature mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) trees. *Plant Science* 68: 113–121.
- 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.
- 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.
- Matsuta, N. and Hirabayashi, T. 1989. Embryogenic cell lines from somatic embryo of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports* 7: 684–687.

- Mohamed, M. F., Read, P. E. and Coyne, D. P. 1992. Dark preconditioning, CPPU and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common bean and faba bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117: 668-672.
- Mohamed-Yasseen, Y., Barringer, S. A., Schnell, R. J. and Splittstoesser, W. E. 1995. *In vitro* shoot proliferation and propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. *Plant Cell Reports* 14: 525-528.
- Neuman, M. C., Preece, J. E., Gaffney, G. R. and van Sambeek, J. W. 1988. Production of embryoid-like structure from immature cotyledonary tissue of black walnut (*Juglans nigra* L.). *HortScience* 23: 807.
- Singha, S. and Bhatia, S. K. 1988. Shoot proliferation of pear cultures on medium containing thidiazuron and benzylaminopurine. *HortScience* 23: 803.
- Te-chato, S. and Aengyong, W. 1988. Microplant propagation of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 10: 1-7.
- Te-chato, S., Lim, M., Chumroenruk, M. and Suranilpong, P. 1994. Effect of phloroglucinol on root induction of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) *in vitro*. *Khon Kaen Agric.* 22: 127-132.
- Te-chato, S., Lim, M. and Muangkaewngam, A. 1992a. Enhanced efficiency root induction of microplant of mangosteen *in vitro*. *Plant Biotechnology Newsletter* 20: 4-6.
- Te-chato, S., Lim, M. and Muangkaewngam, A. 1992b. Enhanced efficiency micropropagation of mangosteen through young leaf culture. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 14: 1-7.
- Te-chato, S., Lim, M. and Muangkaewngam, A. 1992c. Tissue culture of mangosteen: Root induction and establishment of vitro-plants to soil. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 16: 1-5.
- 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. Type of medium and cytokinin in relation with purple leaf and callus formation in mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17: 121-127.

## **Effects of Explant Types on Meristematic Nodular Callus Formation from Young Leaves of Mangosteen**

**Sompong Te-chato<sup>1</sup>**

### **ABSTRACT**

Callus induction from various types of leaf explants were investigated. All the leaf explants were cultured on callus induction medium for 3-4 weeks. Subculture of the callus was carried out 3-4 week intervals. The results showed that whole leaf explants produced meristematic nodular calli which could be multiplied and regenerated into plantlets. The calli arised from proximal end, midrib and lamina in all explants. Segmented leaf explants produced friable calli that were easily dispersed in liquid medium to establish cell suspension cultures. Most of leaf apex both in whole leaf or segmented leaf explants provided fuzzy or lignified callus which can not be multiplied and induced to form meristematic nodules. Stripped leaf explants also provided meristematic nodule callus but growth and multiplication rate were much lower than that of whole leaf explants. In case of clonal propagation of mangosteen through meristematic nodule callus, it is advisable to use whole leaf explant.

key words : explant type, callus, mangosteen, meristematic nodule, young leaf

## INTRODUCTION

Mangosteen, *Garcinia mangostana* L. is an economically important fruit crop of eastern and southern Thailand. In former time, the tree is usually propagated by apomictic seeds. Recently, tissue culture of the tree can overcome both the low availability of seeds and the inability to propagate vegetatively by conventional methods. In our previous studies, we established a tissue culture protocol for direct shoot bud regeneration from seeds (2) and young leaves (3). In the latter, plant regeneration was achieved through meristematic nodular callus induction (7,8). Root induction from those shoots was also well achieved (4,5,6). As the nodular calli induced from young leaf of mangosteen are able to regenerate plantlets with a high frequency, it may be useful to apply *in vitro* technique for mangosteen improvement. Especially induction of somaclonal variations or mutations to be useful for the breeding of mangosteen which is a crop lacking the normal function of sexual organs.

---

<sup>1</sup>Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand 90112.

e-mail address Tesompon@ratree.psu.ac.th

In this study, we developed a method for high frequency shoot regeneration through meristematic nodular callus derived from young leaves of mangosteen with special emphasis on the role of explant types.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

In this experiment, young leaves of mangosteen raised *in vitro* were used. The leaves were collected from two different sources, seed and leaf-derived shoots, both of which were maintained as described previously (7).

### Culture condition

Nutrient medium used in callus induction was Murashige and Skoog's medium (MS) supplemented with 30 g/l sucrose, 500 mg/l polyvinylpyrrolidone (PVP), 2 g/l Phytigel, 0.5 mg/l benzylaminopurine (BA) and 0.5 mg/l thidiazuron (TDZ) at the same concentration of 0.5 mg/l. Explants were cultured in Petri-dishes (dia. 9 cm) containing 10 ml of the medium, with adaxial surface down. The pH of the medium was adjusted to 5.7 before autoclaving at 1.05 kg/cm<sup>2</sup> for 15 min. All cultures were sealed with single layer of Parafilm. Cultures were maintained at 26±2°C under Gro-lux illumination (2,000 lux) with a 16 hour photoperiod. Subculture of callus together with explants onto fresh medium was carried out at 3-4 week intervals.

### Explant types

Three main different explant types were compared for their ability to form callus. Young leaves were cultured as intact ones (whole leaf explants), those notch at two site on midrib or leaf sections after segmenting each leaf transversely into 2 or 3 parts with ca.10 mm long (Figure 1). To study the effect of explant types on callus formation, 25 explants were cultured in each Petri-dish. A minimum of 5 Petri-dishes were designed for each treatment. Data on percentage of callus formation, proliferation rate and quality of the callus were recorded. The data were statistically analysed using completely randomized design (CRD) and mean among each treatment was separated by Duncan's Multiple Range Test.

## RESULTS

All types of leaf explants produced calli but proliferation rate, quality of the calli and time consumed for callus induction were different among the different explant types. Both whole leaf and

segmented leaf explants cultured on callus induction medium produced meristematic nodular callus directly on proximal end, midrib and on mesophyll tissues (Table 1). The ability to form callus varied greatly from explant to explant. Whole leaf explants showed the highest production of meristematic nodular callus which was significantly different from those of other explants. Quality of the calli was

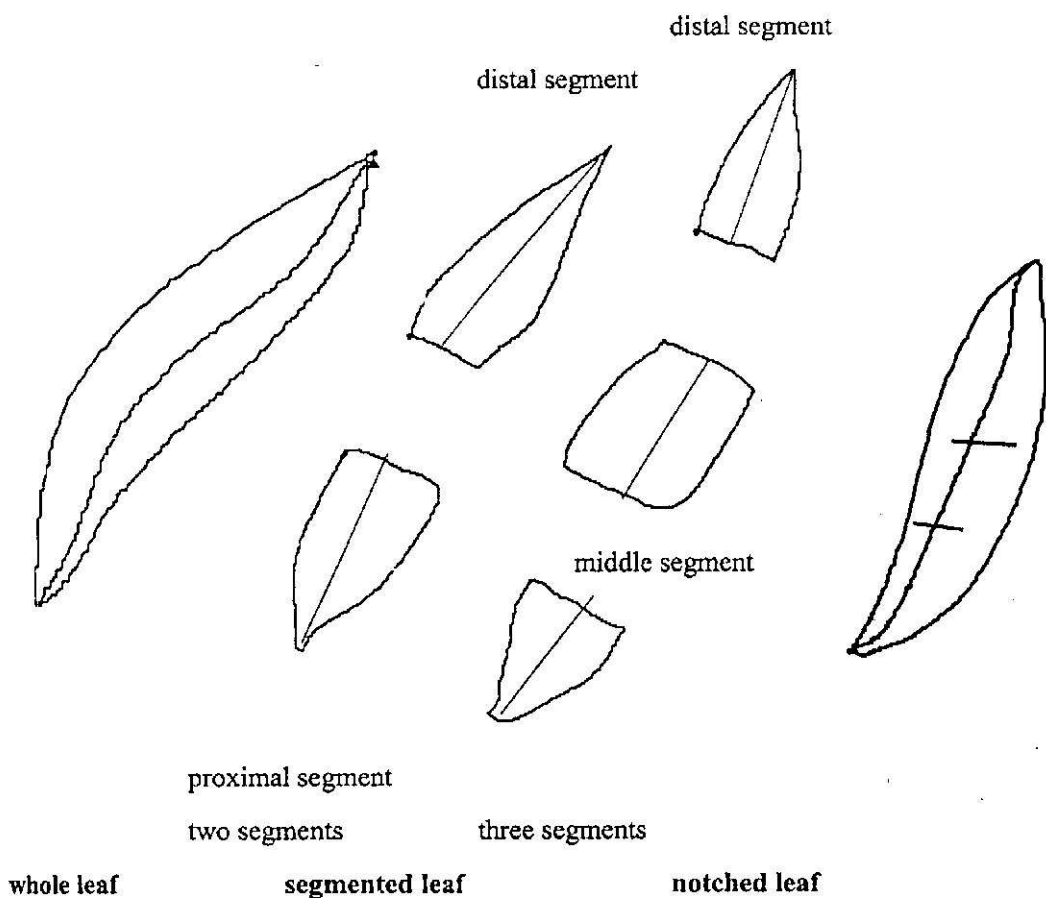


Figure 1 Types of leaf explants used for callus induction.

markedly influenced by the type of explant. In cases of whole and notched leaf cultures, there was no evidence of callus formation at distal end (leaf apex). Similar results were also obtained in the culture of segmented leaf explants. High proliferation rate of the callus was obtained in proximal explants, in which calli were formed at proximal end, midrib and in some cases, from mesophyll tissues (Table 2 and Figure 2). Nodular calli were obtained from midrib at proximal end of the proximal segments or proximal explants. All of the leaf explants produced the callus on the abaxial side of the midrib. Wounding of midrib by notching treatment triggered callus formation in only the wounded area of midrib (both proximal and distal end) (Figure 2).

The quality of the calli was varied greatly in different explants probably due to the difference in origin of the cells (Figure 2). Both whole and notched leaf explants provided the calli mostly at



proximal end and notch sites on midrib. These calli had compact, globular-like structure and classified as meristematic nodular calli. Segmented leaf explants provided three different types of calli. First type was meristematic nodular calli obtained from proximal end of the proximal segments (25%) and some 6-10% which was obtained from distal segments. The calli were induced and originated from the cells similar to those in case of whole leaf explants. In case of the calli produced from distal segments, development of a pair of leaves developed from each nodule was clearly observed (Figure 3). Second type was friable calli which were mostly induced at proximal end, midrib and distal end of the middle segments and at proximal end of distal segments at low frequencies. This type of calli were easily dispersed in liquid medium to form homogeneous cell suspension (Figure 4). However, the cells in suspension were mainly vacuolated cells and failed in proliferation and maintenance. However, the calli could induce the meristematic nodular calli on proliferation medium and further regenerated plantlets. The third type was spongy calli with yellowish-brown to brown color (Figure 5) obtained from the most distal end or leaf apex of distal segments. The cells contained in the spongy tissue were consisted of lignified cells wall and calli can not be multiplied.

## DISCUSSION

Plant regeneration from young leaf culture through meristematic nodular callus formation has previously been reported using whole leaf explant (8,10) in which the calli were routinely come out from proximal cut end, along with midrib and lamina at abaxial side. In the present study division of leaf explants into 2-3 segments did not change the patterns of callus induction but quality of the calli was altered. The calli arised by wounding at cut surface of both proximal and distal end of middle-segmented explants were friable (Table 2). In contrast, meristematic nodular calli had previously reported to arise from a layer of epidermal cells in lamina and vascular cambium of the midrib (3,9). In conclusion, wounding caused by excising leaf explants might trigger friable or spongy callus formation. These calli were not suitable to use for regeneration experiments. In another way, it is interesting that cell suspension of mangosteen could be induced by using friable callus obtained from middle or distal segments because of the potential use for improvement of mangosteen through biotechnological treatments such as protoplast fusion and gene transfer. Appropriate culture medium for proliferation and maintenace of the suspension culture will be needed for this purpose.

Goh *et al.*(1) reported improved production of shoot buds by segmentation of leaf explants. They stated that increase in explant number per leaf would increase the total number of shoot bud production. They speculated that endogeneous auxin in the leaf might probably be transported polarly

within the cut segment leading to induce shoot regeneration at the only distal end of the explant. In case of callus induction in the present study obtained was the similar result in which most of the calli (25-55%) were induced at proximal end (Figure 2). As Goh *et al.* (1) reported that wounding treatment triggered shoot bud formation, wounding also showed significant role on callus induction. However, wounding the leaves caused a mixture of friable and spongy calli leading to low quality of calli and delayed plantlet regeneration.

## REFERENCES

1. 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.
2. Te-chato, S. and Aengyong, W. Microplant propagation of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Songklanakarin J.Sci.Technol.* 10:1-7.
3. Te-chato, S., Lim, M. and Muangkaewngam, A. 1992a. Enhanced efficiency micropropagation of mangosteen through young leaf culture. *Songklanakarin J.Sci. Technol.* 14:1-7.
4. Te-chato, S., Lim, M. and Muangkaewngam, A. 1992b. Enhanced efficiency root induction of microplant of mangosteen *in vitro*. *Plant Biotechnology Newsletter* 20:4-6.
5. Te-chato, S., Lim, M. and Muangkaewngam, A. 1992c. Tissue culture of mangosteen: Root induction and establishment of *in vitro*-plants to soil. *Songklanakarin J.Sci.Technol.* 16:1-5.
6. Te-chato, S., Lim, M., Chumroenruk, M. and Suranilpong, P. 1994. Effect of phloroglucinol on root induction of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) *in vitro*. *Khon Kaen Agric.* 22:127-132.
7. Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995a. Embryogenic callus induction in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Songklanakarin J.Sci.Technol.* 17:115-120.
8. Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995b. Plantlet regeneration from leaf-derived embryogenic callus of mangosteen. *Songklanakarin J.Sci.Technol.* 17:129-136.
9. Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995c. Type of medium and cytokinins in relation with purple leaf and callus formation of mangosteen. *Songklanakarin J.Sci.Technol.* 17:121-128.

Table 1. Effects of wounding on callus induction of mangosteen leaf.

leaf explant	callus formation (%) at				
	proximal end	distal end	both ends	midrib	lamina
whole	51.6a	0c	17.2b	16.0b	14.0±4.3a
segmented					
-proximal	25.0c	2.3b	15.0b	38.0a	6.6±6.2b
-middle	36.0b	0c	26.0a	13.0b	0±0c
-distal	55.0a	4.7a	13.3b	8.3c	10.0±7.1b
notched					
-one <sup>1)</sup>	0d	0c	20b	0d	0±0c
-two	0d	0c	36a	0d	0±0c
-three	0d	0c	17b	0d	0±0c

Mean not sharing letter in common within column differ significantly by DMRT (P=0.05).

<sup>1)</sup> Number of notches made on the explants.

Table 2. Effects of wounding on characteristics of the calli induced and their proliferation.

leaf explant	multiplication	characteristics
whole leaf	++++	meristematic nodular callus
segmented leaf		
-proximal	+++	meristematic nodular callus
-middle	++	friable callus
-distal	+	spongy callus
notched leaf	++	meristematic nodular callus

++++ excellent, ++ fare  
 +++ good + poor



A



B



C



D



E

Figure 2. Callus formation from various explant types of leaves derived from *in vitro* grown plants (arrows show proximal end).

A: whole leaf explant      B: proximal segment      C: middle segment  
D: distal segment      E: leaf explants with notching at 3 sites



Figure 3. Nodular callus with shoot primordia produced at proximal end of distal explant of 2-segmented leaf

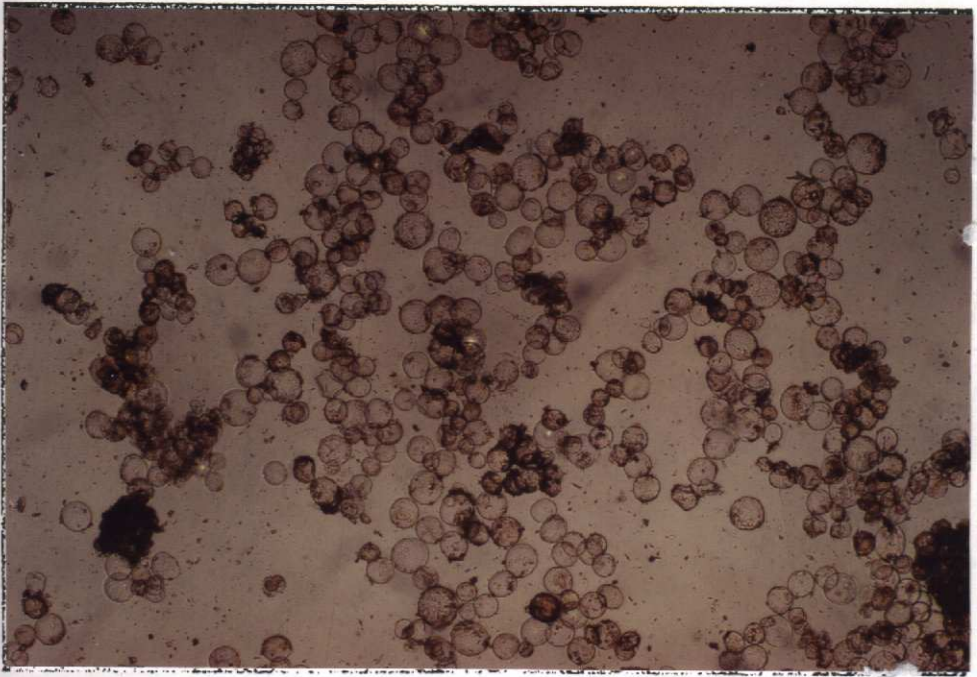


Figure 4. Cell suspension derived from friable callus derived from both proximal and distal end of middle segment of 3-segmented leaf.

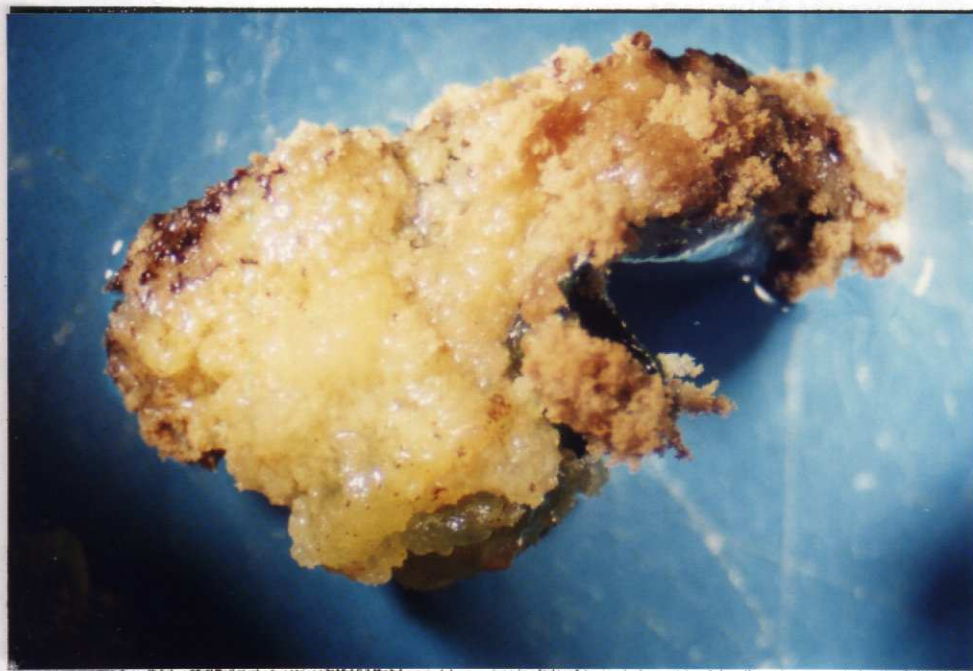


Figure 5. Spongy callus with yellowish-brown to brown color derived from distal end of 2- and 3-segmented leaf.

## การปรับปรุงพันธุ์มังคุดในหลอดทดลองโดยใช้รังสีแกมมา

### Improvement of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) *In Vitro* by Gamma-Ray

วิทยา พรหมมี<sup>1</sup> และ สมปอง เตชะโต<sup>1</sup>

#### ABSTRACT

Callus obtained from culturing young purple leaves of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) were treated with gamma ray in difference doses, 0, 5, 10, 20 and 40 gy. After cultured for 3 weeks, callus recover rate was checked. Significant decrement of recover rate was found in 20 and 40 gy compared to control. At such dosage levels also affected stem growth length and generated some abnomal characters in plants (MIR1) such as two leaves apex, serrate leaves and adventitious branches. Peroxidase enzyme was assayed to confirm genetic variation. Eventhough, no difference of banding pattern was detected at zone 1 but more activity of peroxidase was observed in treated plants, especially 20 gy. However, banding pattern of this enzyme at zone 2 of all treated plants were different from control indicated induce mutation could be generated .

key words : improvement, mangosteen, *in vitro*, gamma-ray

#### บทคัดย่อ

จากการนำแคลลัสซึ่งชักนำจากใบอ่อนสีแดง ฉายรังสีแกมมา เพิ่มขึ้น 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าการฉายรังสีแกมมา 20 และ 40 เกรย์ ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลงแตกต่างจากชุดเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญ หลังจกศึกษาลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้นชั่วที่ 1 (MIR1) พบว่าต้นที่ได้หลังจากฉายรังสีแกมมา 10, 20 และ 40 เกรย์ มีขนาดเตี้ยลง และต้นที่ได้มีอัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกลดน้อยกว่าต้นในชุดเปรียบเทียบ และลักษณะผิดปกติทางสัณฐานที่พบเห็น คือ ปลายใบสองแฉก ขอบใบมีรอยหยัก การจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ เกิดมังคุดสามใบและเกิดกิ่งแขนง จากการศึกษารูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของต้น MIR1 ที่ได้รับรังสีแกมมา พบว่ามีความแตกต่างจากชุดเปรียบเทียบโดยไซโมแกรมที่แยกได้เป็น 2 zone เมื่อพิจารณาใน zone พบว่าต้นที่ได้รับรังสีแกมมาไซโมแกรมได้ไม่แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบ แต่ต้นที่ได้รับรังสีแกมมามีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าซึ่งสังเกตได้จากความเข้มข้นของไซโมแกรมที่ปรากฏ โดยเฉพาะความเข้มข้นรังสี 20 เกรย์ เมื่อพิจารณาไซโมแกรมใน zone 2 พบว่า ต้นที่ได้รับรังสีแกมมาสามารถแยกไซโมแกรมได้แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบ แสดงว่าการฉายรังสีในความเข้มต่างๆ อาจชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้

<sup>1</sup>ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

## วัตถุประสงค์การทดลอง

1. เพื่อประเมินค่าความเข้มของรังสีแกมมาที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน
2. เพื่อนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์มัจฉูด

## สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ. สงขลา

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

#### 1.1 การชักนำแคลลัส

ใช้ใบอ่อนสีแดง อายุ 7-12 วัน จากต้นกล้าที่เลี้ยงอยู่บนอาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารวุ้น สูตร woody plant medium (WPM) เติม polyvinylpyrrolidone (PVP) ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้นเจลไรท์ 0.20 เปอร์เซ็นต์ benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั้นบน เติมหอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง (1/2 MS) เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 2 เดือน ภายใต้ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมง เพื่อเตรียมใบไว้ชักนำโนดูลแคลลัส วางเลี้ยงใบให้ด้านท้องใบสัมผัสกับอาหาร อาหารที่ใช้ชักนำแคลลัสสูตร MS เติม PVP ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้นเจลไรท์ 0.20 เปอร์เซ็นต์ BA และ thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อมีการสร้างแคลลัส จึงย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณเอเอ็มวีโอเจนิคแคลลัสซึ่งเป็นสูตรเดียวกับสูตรข้างต้น

#### 1.2 การชักนำยอด

นำโนดูลแคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนสีแดงวางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม PVP ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้นเจลไรท์ 0.25 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อมีการสร้างยอดขนาดเล็กเติมหอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ PVP ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปเพื่อส่งเสริมการยืดตัวของยอด

#### 1.3 การชักนำรากจากยอดมัจฉูด

ตัดยอดมัจฉูดขนาด 1-2 เซนติเมตร ทำแผลที่โคนจุ่มแช่ใน indole-3-butyric acid (IBA) ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 15 นาที ในที่มืด วางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม PVP



ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.6 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร phloroglucinol (PG) ความเข้มข้น 5.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน 0.25 เปอร์เซ็นต์ เพื่อชักนำการสร้างราก โดยวางเลี้ยงในที่มืด 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายไปวางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมง

## 2. การชักนำการกลายพันธุ์จากโนคลูแคลลัส

นำโนคลูแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณ เป็นเวลา 30 วัน ย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่ สูตรเดิมในงานเพาะเลี้ยงพลาสติก นำไปฉายรังสีแกมมาชนิดโคบอลต์ 60 ความเข้มต่าง ๆ คือ 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายแคลลัสเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอด ที่กล่าวไว้ข้างต้นเพื่อชักนำยอด ภายใต้ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมง

## 3. การตรวจสอบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

### 3.1 การเตรียมเอนไซม์สกัด

นำใบอ่อนมังคุดของต้นชั่วที่ 1 (M1R1) หลังจากฉายรังสีแกมมาความเข้ม 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ ที่วางเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ บดในโกร่งแช่เย็นจนตัวอย่างละเอียดในสารละลายบัฟเฟอร์ อัตราส่วน 1:1 (น้ำหนัก:ปริมาตร) ประกอบด้วย Tris-HCl เข้มข้น 0.75 โมลาร์ pH 7.5, PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และ 2-Mercapthoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร:ปริมาตร) นำสารละลายที่ได้เทใส่หลอด eppendorf ไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนโดยเครื่องไมโครเซ็นทริฟิวก์ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ระยะเวลาการปั่นตกตะกอน 20 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด eppendorf ที่สะอาดเติมกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้

### 3.2 การเตรียมเจลและการแยกโมเลกุลเอนไซม์ (ตามวิธีของ Laemmli, 1970)

เตรียมเจลโดยใช้เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสชนิด slab gel เตรียมเจลแบบไม่ต่อเนื่อง ใช้ตัวกลางเป็นเจลแบบโพลีอะคริลาไมด์ ซึ่งประกอบด้วย stacking gel ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ส่วน separating gel 12 เปอร์เซ็นต์ เตรียมเจลให้มีความหนา 0.75 มิลลิเมตร นำเอนไซม์สกัดใส่ในหลุมของเจลหลุมละ 15 ไมโครลิตร ทำการแยกเอนไซม์ในสารละลายอิเล็กโตรครีบัฟเฟอร์ โดยใช้แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ ภายใต้ อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

### 3.3 การย้อมสีเอนไซม์และแปรผลรูปแบบเอนไซม์

นำเจลที่ได้มาย้อมสีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เพื่อตรวจสอบเอนไซม์บนแผ่นเจล โดยย้อมในที่มืด เมื่อเจลดิจิตีซัดเจนแล้วทำการตรึงเอนไซม์และล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายล้าง จากนั้นนำไปศึกษารูปแบบเอนไซม์ วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างความเข้มของรังสีแต่ละระดับ

## วิธีการศึกษา

### 1. การศึกษาความเข้มของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโนดูลแคลลัส

นำแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส 30 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมง หลังจากวางเลี้ยงนำไปฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ คือ 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ หลังจากนั้นวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดในขวดขนาดใหญ่ (5x10 เซ็นติเมตร) ซึ่งบรรจุอาหาร 30 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน ตรวจสอบอัตราการรอดชีวิต (การสร้างยอด) และลักษณะของแคลลัสที่ฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ ทุก 1 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ขวด ขวดละ 6 ชิ้น

### 2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้น MIR1 หลังจากฉายรังสีแกมมา

ตัดแยกยอดมิ่งคูดจากกลุ่มยอดรวมที่พัฒนามาจากแคลลัสที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ คือ 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ ขนาด 1-2 เซ็นติเมตร มาชักนำรากเพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์การเกิดราก และตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานของต้นบางประการในระยะต่อมา ซึ่งลักษณะทางสัณฐานที่ตรวจสอบ คือ จำนวนรากเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ย จำนวนข้อเฉลี่ย ความสูงเฉลี่ย หลังจากชักนำราก 1 เดือน และอัตราการรอดชีวิตของต้นหลังย้ายปลูก 3 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 8 ต้น

### 3. การศึกษารูปแบบเอนไซม์ของต้น MIR1 หลังจากฉายรังสีแกมมา

นำเอนไซม์สกัดที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สกัด ตามวิธีการที่ 3.1 มาตรวจสอบแถบเอนไซม์ บนแผ่นเจลอะครีลาไมด์ ตามวิธีการที่ 3.2 ใช้ลิข้อมเอนไซม์ ระบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ตามวิธีการที่ 3.3 เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนของแถบเอนไซม์ ซึ่งสกัดจากใบของต้น MIR1 หลังจากฉายรังสีแกมมา 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ เปรียบเทียบกันระหว่างความเข้มของรังสีแกมมา

## ผลการทดลอง

### 1. การศึกษาความเข้มของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโนดูลแคลลัส

หลังจากวางเลี้ยงแคลลัส 3 สัปดาห์ ตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของโนดูลแคลลัส พบว่าการใช้รังสีความเข้มสูงขึ้นมีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลง โดยการใช้รังสีความเข้มต่ำ ๆ คือ 5 และ 10 เกรย์ ให้ผลการรอดชีวิตของโนดูลแคลลัส 96.00 และ 93.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบคือ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความเข้มรังสีสูงขึ้นเป็น 20 เกรย์ อัตราการรอดชีวิตของโนดูลแคลลัสลดลงเหลือ 84.20 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ กับชุดเปรียบเทียบ และ 5 เกรย์ แต่ไม่มีความแตกต่างกับ 10 เกรย์ เมื่อเพิ่มความเข้มรังสีเป็น 40 เกรย์ พบว่าอัตราการรอดชีวิตของ

โนดูลแคตลัส คือ 80.80 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกับ 20 เกรย์ แต่แตกต่างกับรังสีความเข้มอื่น ๆ ทุกความเข้มรังสี หลังจากวางเลี้ยง 4 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดชีวิตของโนดูลแคตลัสจากการฉายรังสีทุกระดับไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 3 เพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การศึกษาความเข้มรังสีแกมมาต่อการรอดชีวิตของโนดูลแคตลัส

ความเข้มรังสี (Gy)	อัตราการรอดชีวิต (%)	
	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
0	100a	100
5	96.60a	97.40
10	93.40ab	94.20
20	84.20bc	87.60
40	80.80c	81.20
F-test	*	ns
C.V. (%)	9.78	12.3

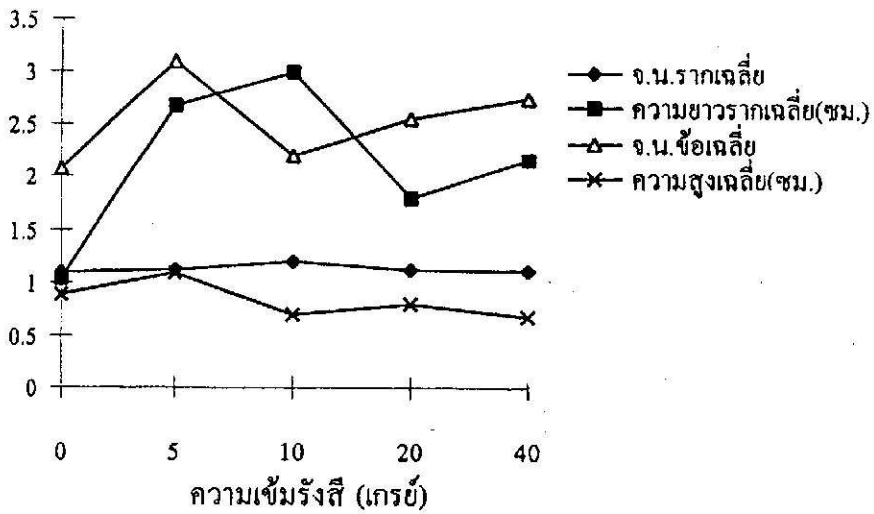
อัตราการรอดชีวิตที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P=0.05) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT

\* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

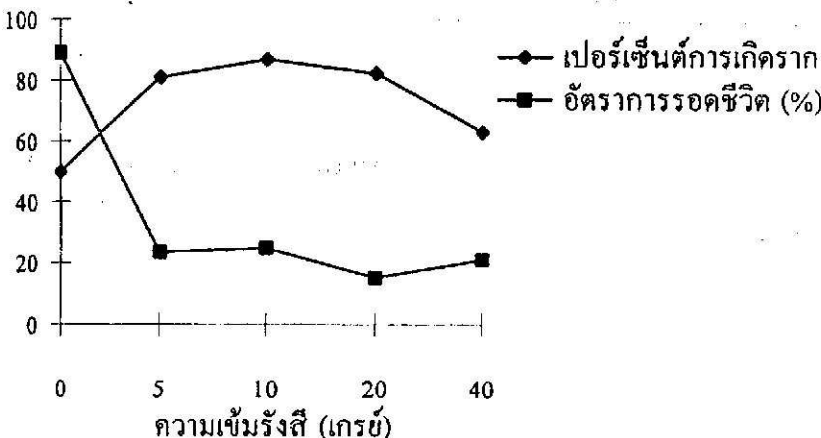
ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

## 2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้น MIR1 หลังจากฉายรังสีแกมมา

นำต้นที่ได้หลังจากชักนำรากเป็นระยะเวลา 1 เดือน มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานของต้น พบว่าต้นที่ได้รับจากการฉายรังสีความเข้มต่าง ๆ คือ 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ มีจำนวนรากเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ย จำนวนข้อเฉลี่ย (รูปที่ 1) และ เปอร์เซ็นต์การเกิดราก (รูปที่ 2) สูงกว่าชุดเปรียบเทียบ แต่ความสูงเฉลี่ยพบว่าการใช้ความเข้มรังสี 5 เกรย์ มีความสูงเฉลี่ยคือ 1.09 เซนติเมตร มากกว่าชุดเปรียบเทียบ คือ 0.89 เซนติเมตร ในขณะที่การใช้รังสีความเข้มสูงขึ้นเป็น 10, 20 และ 40 เกรย์ มีความสูงเฉลี่ยน้อยกว่าชุดเปรียบเทียบ คือ 0.70, 0.80 และ 0.68 เซนติเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 1) หลังจากนำต้นกล้าย้ายปลูก 3 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดชีวิตของชุดเปรียบเทียบสูงสุด คือ 89.29 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 10, 5, 40 และ 20 เกรย์ คือ 25, 23.53, 21.05 และ 15.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 2)



รูปที่ 1. ลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้น M1R1 ที่ได้รับหลังจากฉายรังสีแกมมา



รูปที่ 2. เปอร์เซ็นต์การเกิดรากหลังจากชักนำราก 1 เดือน และอัตราการรอดชีวิตของต้นหลังปลูก 3 สัปดาห์

นอกจากนั้นลักษณะผิดปกติทางสัณฐานที่พบเห็น คือ ลักษณะปลายใบเป็นสองแฉก ขอบใบมีรอยหยัก การจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ เกิดมั่งคูดสามใบ และเกิดกิ่งแขนง

3. การศึกษารูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของต้น M1R1 หลังจากฉายรังสีแกมมา

จากการศึกษารูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของ M1R1 ที่ได้รับรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ พบว่า มีความแตกต่างจากชุดเปรียบเทียบ โดยไซโมแกรมที่แยกได้ เป็น 2 zone สามารถพิจารณาแถบเอนไซม์แต่ละ zone ได้ดังนี้

เมื่อพิจารณาไซโมแกรมใน zone 1 พบว่าต้นที่ได้รับรังสีแกมมา 10, 20 และ 40 เกรย์ สามารถแยกไซโมแกรมได้ 3 แถบ ไม่แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบ และ 5 เกรย์ แต่ต้นที่ได้รับรังสี 10, 20 และ 40 เกรย์ มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าโดยสังเกตจากความเข้มของไซโมแกรมที่ปรากฏ โดยเฉพาะต้นที่ได้รับรังสี 20 เกรย์

เมื่อพิจารณาไซโมแกรมใน zone 2 พบว่าต้นที่ได้รับรังสี 5, 10 และ 20 เกรย์ สามารถแยกไซโมแกรมได้ 2 แถบ ส่วน 40 เกรย์ แยกไซโมแกรมได้เพียงแถบเดียว แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบซึ่งแยกได้ 3 แถบ

### วิจารณ์ผลการทดลอง

การฉายรังสีแกมมามีผลต่อการรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชที่วางเลี้ยง โดยการใช้รังสีแกมมาความเข้มสูงทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้สูงแต่การรอดชีวิตต่ำกว่าความเข้มต่ำ ๆ ในการทดลองนี้พบว่าหลังจากนำแคลลัสฉายรังสีแกมมาทุกความเข้มรังสี มีผลให้ความมีชีวิตรอดและการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ลดลง เมื่อใช้ความรังสีเพิ่มขึ้นกลับทำให้การพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ลดลงมากขึ้น เนื่องจากกรคนิวคลีอิดซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ถูกทำลายและเปลี่ยนแปลงไปทำให้เซลล์ไม่สามารถสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ได้ ทำให้เซลล์ตายส่วนเซลล์ที่รอดชีวิตความสามารถในการแบ่งเซลล์อาจเปลี่ยนไป เช่น เกิดความล่าช้าในการเข้าสู่การแบ่งเซลล์ เกิดการเปลี่ยนแปลงในสารพันธุกรรมที่สามารถส่งต่อไปยังเซลล์ลูกหลานได้ ดังในการทดลองฉายรังสีแกมมากับใบแพร์ พบว่าความเข้มรังสีระหว่าง 20-50 เกรย์ สามารถยับยั้งการพัฒนาได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตกับใบแพร์ ความเข้ม 125 จูลต่อตารางเมตร สามารถยับยั้งการพัฒนาได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (Leblay, et al., 1992) การฉายรังสีเอกซ์ กับใบเชอรี ความเข้ม 20 เกรย์ สามารถยับยั้งการพัฒนาได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (Yang and Schmidt, 1994) การฉายรังสีแกมมากับใบแอปเปิ้ล 10 เกรย์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกับหน่วยทดลองเปรียบเทียบซึ่งไม่ฉายรังสี และความเข้มรังสี 20 เกรย์ สามารถยับยั้งการพัฒนาได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (Predieri and Malavasi, 1989) การฉายรังสีแกมมาความเข้มรังสี 750 เกรย์ กับละอองเกสรแอปเปิ้ล สามารถยับยั้งการพัฒนาได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (Zhang and Lespinasse, 1991) ในขณะที่ Visser and Oost (1981) อ้างโดย Zhang and Lespinasse, 1991) ใช้ความเข้มรังสี 2,200 เกรย์ กับละอองเกสรแอปเปิ้ล สามารถยับยั้งการพัฒนาได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน ระดับความเข้มรังสีดังกล่าวมีผลไปทำให้ดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงทำให้เซลล์ไม่สามารถสร้างโปรตีนได้ ดังนั้นควรเลือกใช้ความเข้มรังสีแกมมาให้เหมาะสมกับชนิด และขนาดของชิ้นส่วนพืช เพื่อก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนหรือระดับดีเอ็นเอได้อย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้นชั่วที่ 1 หลังจากฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ พบว่าต้นที่ได้มีจำนวนข้อเฉลี่ยมากกว่าชุดเปรียบเทียบ แต่เมื่อวัดความสูงของต้นพบว่าต้นที่ได้

หลังจากฉายรังสีแกมมา 10, 20 และ 40 เกรย์ มีความสูงน้อยกว่าชุดเปรียบเทียบ แสดงให้เห็นว่ารังสีแกมมามีผลต่อความสูงของต้น โดยมีผลทำให้ความสูงลดลง ในกรณี Yang, H. และ Schmidt, H. (1994) ทดลองฉายรังสีเอกซ์กับใบเซอร์ความเข้มรังสี 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ พบว่าต้นที่ได้รับการฉายรังสี 20 เกรย์ มีลักษณะเตี้ยมาก ใบมีขนาดเล็กหนา บริเวณขอบใบมีรอยหยัก แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบซึ่งมีขนาดสูงกว่า นอกจากนี้ในการทดลองนี้พบว่าต้นที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาทุกความเข้มรังสี มีจำนวนรากเฉลี่ย จำนวนข้อเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ยและเปอร์เซ็นต์การสร้างรากเฉลี่ยมากกว่าชุดเปรียบเทียบ แต่หลังจากนำต้นกล้าย้ายปลูกเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดชีวิตของต้นชุดเปรียบเทียบสูงกว่าการฉายรังสีอาจเนื่องมาจากต้นที่ได้รับการฉายรังสีมีจำนวนข้อมาก และจำนวนใบมาก ส่งผลให้ต้นที่ได้มีการคายน้ำทางใบสูง ถึงแม้ว่าจำนวนรากเฉลี่ยที่ได้สูงกว่าชุดเปรียบเทียบก็ตาม แต่รากมีงอกไม่มีรากแขนงและรากขนอ่อน จึงทำให้การดูดน้ำไปใช้ไม่เพียงพอต่อความต้องการ

การใช้ลักษณะทางสัณฐานของต้นที่ปลูกตรวจสอบพันธุ์พืช ต้องใช้เวลานานและลักษณะดังกล่าวไม่สามารถใช้จำแนกความแปรปรวนของพันธุ์ที่เกิดขึ้นได้ทั้งหมด เนื่องจากบางลักษณะมีความแปรปรวนไปตามสภาพแวดล้อมที่วางเลี้ยง จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน เช่น สีของต้นกล้า รูปร่างใบ สีขนของลำต้นและฝัก และสีตามเมล็ดของถั่วเหลือง พบว่าสามารถจำแนกถั่วเหลืองทั้ง 18 สายพันธุ์ ได้เพียง 10 กลุ่ม ในขณะที่การตรวจสอบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของเยื่อหุ้มเมล็ดและเอนไซม์ยูคาริโอสในเมล็ด สามารถจำแนกพันธุ์ได้ 13 กลุ่ม (วันชัย และคณะ, 2536) นอกจากการใช้ไอโซไซม์จำแนกพันธุ์แล้วยังสามารถใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างของต้นที่ได้หลังจากฉายรังสี

ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจสอบความแตกต่างของต้นที่ได้รับการฉายรังสีโดยใช้ไอโซไซม์ จากการศึกษารูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของต้น M1R1 ที่ได้รับรังสีแกมมาแสดงให้เห็นว่ารังสีสามารถก่อให้เกิดความแตกต่างได้ระหว่างชุดเปรียบเทียบและฉายรังสี โดยก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ภายในต้นพืช จากการทดลองนี้พบว่า หลังจากฉายรังสีให้กับต้น M1R1 10, 20 และ 40 เกรย์ สามารถก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ นอกจากการให้เอนไซม์แล้วยังสามารถใช้ดีเอ็นเอในการตรวจสอบเพื่อเพิ่มความแม่นยำมากยิ่งขึ้น จากการตรวจสอบความแตกต่างของใบจากต้นเซอร์ พันธุ์ '209/1' ที่ได้รับการฉายรังสีเอกซ์ 20 เกรย์ โดยวิธี Random amplify polymorphic DNA (RAPDs) พบว่าชุดเปรียบเทียบมีแถบดีเอ็นเอ ปรากฏแตกต่างจากต้นที่ได้หลังจากฉายรังสีเอกซ์ 20 เกรย์ อยู่ 1 แถบ ขนาด 2 กิโลเบส ได้เป็นพันธุ์ใหม่ คือ พันธุ์ '209/1-20m' (Yang, H. and Schmidt, H., 1994) แต่ในการศึกษานี้ไม่ได้ใช้ดีเอ็นเอในการตรวจสอบ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจะเป็นการตรวจสอบโดยใช้ดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มความแม่นยำยิ่งขึ้น

## สรุป

1. การใช้รังสีแกมมาความเข้มสูงขึ้นไปมีผลให้อัตราการรอดชีวิตลดลง โดยการฉายรังสีแกมมา 20 และ 40 เกรย์ มีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างจากชุดเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญ

2. ความเข้มรังสีแกมมา 10, 20 และ 40 เกรย์ มีผลให้ลักษณะทางสัณฐานของต้นข้าวที่ 1 (M1R1) เปลี่ยนไป โดยส่งผลให้ต้นมีงอกมีขนาดเตี้ยลง คือ มีจำนวนข้อเฉลี่ยมากแต่ความสูงน้อย แต่ต้นที่ได้จากการฉายรังสีมีอัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกน้อยกว่าต้นในชุดเปรียบเทียบ และพบลักษณะผิดปกติทางสัณฐาน คือ ปลายใบสองแฉก ขอบใบมีรอยหยัก การจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ เกิดมีงอกสามใบ และเกิดกิ่งแขนง

3. รังสีแกมมามีผลให้รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของต้น M1R1 มีความแตกต่างจากชุดเปรียบเทียบโดยไซโมแกรมที่แยกได้เป็น 2 zone ใน zone 1 ต้นที่ได้รับรังสีแกมมาแยกไซโมแกรมได้ไม่แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบแต่ต้นที่ได้รับรังสีแกมมามีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า โดยเฉพาะความเข้มรังสี 20 เกรย์ ส่วนใน zone 2 ต้นที่ได้รับรังสีสามารถแยกไซโมแกรมได้แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบ คือ ต้นที่ได้รับรังสี 5, 10 และ 20 เกรย์ แยกไซโมแกรมได้ 2 แถบ 40 เกรย์ แยกได้ 1 แถบ และ ชุดเปรียบเทียบแยกได้ 3 แถบ

## เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงพาณิชย์. 2536. มังคุด. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเกษตรกรตามโครงการพัฒนาตลาดเพื่อสนับสนุนการกระจายการผลิตในระดับจังหวัด. จังหวัดจันทบุรี.
- วันชัย จันทร์ประเสริฐ เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์ และ วรณฤดี ศรีบุตรโรจน์. 2536. การตรวจสอบเอนไซม์เพอรอกซิเดสที่เชื่อมุ่เมล็ดและยูคาริโอสในเมล็ดเพื่อจำแนกพันธุ์ถั่วเหลือง. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย์) 27: 1-5.
- Degani, C. and El-Batsri, R. 1990. Enzyme polymorphism in mango. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115: 844-847.
- Leblay, P. C. Turpin, F. X. and Chevreau, E. 1992. Effect of gamma and ultraviolet irradiation on adventitious regeneration from *in vitro* cultured pear leaves. Euphytica 62: 225-233.
- Lee, M. L., Ryu, Y. J., Chung, T. V. and Park, Y. H. 1993. Identification of *Citrus spp.* in Chejuusing isozymes, RFLP and RAPD markers. RNA Journal of Agriculture Science, Biotechnology 35: 193-197.
- 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. Ummaly, I. Umboh. S. S. Tjitrosomo and N. M. Noor) pp. 81-86, Borgor: Seameo Biotrop.



- Predieri, S. and Malavasi, F. F. F. 1989. High-frequency shoot regeneration from leaves of the apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill). *Plant Cell, Tissue and Culture* 17: 133-142.
- Yaacob, O. and Tindall, H. D. 1995. *Mangosteen cultivation*. pp: 14-27, Rome; FAO Plant Production and Protection Division.
- Yang, H. and Schmidt, H. 1994. Selection of a mutant from adventitious shoots formed in X-ray treated cherry leaves and differentiation of standard and mutant with RAPDs. *Euphytica* 77: 89-92.
- Zhang, Y. X. and Lespinasse, Y. 1991. Pollination with gamma-irradiated pollen and development of fruits, seed and parthenogenetic plants in apple. *Euphytica* 56: 101-109.

# Recent potential in the biotechnology of mangosteen I : Micropropagation

Sompong Te-chato

## Abstract

Te-chato, S.

Recent potential in the biotechnology of mangosteen I : Micropropagation

Songklanakarin J. Sci. Technol., 1998, 20(3) : 275-284

Micropropagation of mangosteen *in vitro* could be established by 3 types of cultures; seed, young red leaf and callus culture. Seeds and seed segments provided a maximum number of shoot bud in Murashige and Skoog (MS) or modified MS (MMS) enriched with BA (25  $\mu$ M or 5 mg/l). Young purple leaf cultures provided a wide range of 2 to 40 shoots per leaf. In this case, the leaves or a cluster of shoots must be pre-cultured in the two-phase medium which was modified for a number of tiny shoot bud induction. Callus cultures were established using a four-step culture procedures. First, callus was induced on callus induction medium (CIM), followed by induction of shoot primordia on shoot primordia induction medium (SPIM), elongation of the shoot on shoot elongation medium (SEM) and subsequently induction of root on root induction medium (RIM). Nodular calli could be induced from almost all explant on benzyladenine (BA) and thidiazuron (TDZ) containing MS medium. Callus cultures gave the most advantageous to micropropagation of mangosteen due to its successive proliferation and production of plantlet year round. Moreover, it may be useful to apply *in vitro* technique for mangosteen improvement, especially, induction of somaclonal variations or mutations.

---

**Key words :** mangosteen, biotechnology, micropropagation, callus culture, seed culture, young purple leaf

---

M.Agr.(Crop Biotechnology), Assoc. Prof., Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand.

Received 15 December 1997 Accepted 2 April 1998

## บทคัดย่อ

สมปอง เตชะโต

ศักยภาพของการใช้เทคโนโลยีชีวภาพกับมังคุดในปัจจุบัน I : การขยายพันธุ์

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2541 20(3) : 275-284

การขยายพันธุ์มังคุดในหลอดทดลองสามารถทำได้โดยใช้การเลี้ยง 3 รูปแบบ คือ การเพาะเลี้ยงเมล็ด การเพาะเลี้ยงใบอ่อนสีแดง และการเพาะเลี้ยงแคลลัส การเพาะเลี้ยงเมล็ดและชิ้นส่วนเมล็ด ให้จำนวนยอดสูงสุดในอาหารสูตรนูราซิกและสกุค (MS) หรือสูตรดัดแปลง (MMS) เติมเบนซิลอะดีนีน (BA)  $25 \mu\text{M}$  หรือ 5 มก/ล การเพาะเลี้ยงใบอ่อนสีแดงให้จำนวนยอดในช่วงตั้งแต่ 2 ถึง 40 ยอดต่อใบที่เพาะเลี้ยง การชักนำยอดโดยตรงจากใบต้องเตรียมใบโดยการเลี้ยงในอาหารสองชั้น สำหรับการขยายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยง 4 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการชักนำแคลลัสในอาหารชักนำแคลลัส (CIM) ขั้นตอนที่สองเป็นการชักนำจุดกำเนิดยอดในอาหารชักนำจุดกำเนิดยอด (SPIM) ขั้นตอนที่สามเป็นการชักนำการยึดยาวของยอดในอาหารชักนำการยึดยาวยอด (SEM) และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการชักนำรากในอาหารชักนำราก (RIM) โนดูลาแคลลัสสามารถชักนำได้จากชิ้นส่วนที่เลี้ยงเกือบทั้งหมดบนอาหารสูตร MS เติม BA และไรโคอะซูรอน (TDZ) แคลลัสมังคุดที่ชักนำได้มีข้อได้เปรียบในการขยายพันธุ์ ทั้งนี้เพราะสามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างต่อเนื่องและชักนำพืชต้นใหม่ได้ตลอดทั้งปี นอกจากนี้ยังสามารถใช้แคลลัสดังกล่าวเป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์มังคุดด้วยวิธีการในหลอดทดลอง เช่น การชักนำไซมาโคลนอลวารีเอชัน หรือชักนำการกลายพันธุ์

Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) is an indigenous fruit tree of Southeast Asia (Lim, 1984). The fruit tree is cultivated in most areas of Thailand and neighbouring countries primarily as a crop in mixed gardens and secondarily as one in commercial fruit orchards which have recently been developed with specialized production. The production technology for the fruit tree still lacks documented information on rootstock, stock-scion relationship and large scale clonal propagation methods. Especially, traditional vegetative propagation using inarching technique still time-consuming (7-8 months) and the percentage of successful grafting is quite low (Lim, personal communication). Husan (1990) reported a high success on asexual propagation of mangosteen by various methods. Among those methods, side grafting gave 90% success followed by top grafting and chip budding which gave 87 and 77% success, respectively. However, mass propagation of the tree by the techniques for commercial purpose was not reported. Young grafting of mangosteen shoot raised

*in vitro* on rootstock of pawa (*Garcinia speciosa* Wall.) was also reported (Te-chato *et al.*, 1992a), but establishment of grafted plants in soil was quite low.

A number of authors have reported clonal propagation of mangosteen through tissue culture techniques (Goh *et al.*, 1988, 1990, 1994; Te-chato and Aengyong, 1988; Normah, 1992). In addition, critical factors for propagation of mangosteen through seed segment culture (Normah *et al.*, 1995) and young leaf culture (Goh *et al.*, 1994; Goh *et al.*, 1997; Lakshmanan *et al.*, 1997) were elucidated. Nodular calli are one of the most feasible tools which are expected to proliferate with high frequency year round. Induction of the calli from young leaf explants have been reported to produce the best result under optimum culture conditions of the leaves (Te-chato *et al.*, 1995a,b). As the nodular calli induced from young leaf are able to regenerate plantlet with a high frequency, it may not only be useful to apply *in vitro* technique not only for propagation but also for varietal improve-

ment of mangosteen. In this study, micropropagation of mangosteen from various types of cultures are described.

## Materials and Methods

### Establishment of aseptic culture

The seeds of mangosteen were excised from fresh fruit, soaking in a 10% (w/v) solution of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  for 15-30 min. The seeds were cleaned and rinsed many times under tap water and then surface sterilized in 20% sodium hypochlorite for 15 min followed by rinsing with sterile distilled water for five times. The seeds were cultured on basal Murashige and Skoog (MS) medium and modified MS according to Te-chato and Aengyong (1988) containing 5 mg/l benzyladenine (BA) (or 25  $\mu\text{M}$ ) for 3 weeks. The seeds were then sub-cultured to a liquid medium under static condition for 3-6 weeks. The latter medium is half strength MS (1/2MS) supplemented with 0.03 mg/l BA or thidiazuron (TDZ) and 0.06 mg/l 1-naphthaleneacetic acid (NAA) (Te-chato *et al.*, 1995b).

In the case of *ex vitro* leaves, young red leaves were collected from nursery-grown seedlings or field-grown mature tree. The leaves were rinsed with tap water, soaked in a 70% ethanol for 30 sec and then sterilized in a solution of 20% sodium hypochlorite for 15 min. The final sterilant was removed by rinsing with sterile distilled water 3-5 times. Prior to culture, the leaves were either cut transversely or notched at mid rib then cultured on various phytohormone-containing media for further purposes.

### Callus induction and plantlet regeneration

After culture of the seeds for 6-8 weeks, the percentage of seeds forming multi-shoot, growth of seedlings and root and axillary bud development were examined. Main shoot derived from cultured seed was excised and brought to root induction. The remaining seeds were sectioned into pieces and cultured onto basal MS medium supplemented with various concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). In the case of leaf, both

those raised *in vitro* and raised *ex vitro*, and both purple and green leaves, were used as explants for callus induction. Culture medium used for induction of callus was MS supplemented with 3% sucrose, 500 mg/l polyvinylpyrrolidone (PVP), 0.5 mg/l BA and 0.5 mg/l TDZ. After induction of calli they were passed through regeneration medium. Steps or procedures in plant regeneration were investigated.

## Results and Discussion

### Establishment of aseptic culture

#### Seed culture

A single seed produces a single seedling or several identical seedlings depending on the weight of the seed. The weight of seeds is highly variable, ranging from 0.2-2.2g. Although the seed was classified as polyembryony, the production of several identical seedlings occur in about 10% of seeds. In case of sowing seed *in vitro*, a high frequency of polyembryony of more than 40% was obtained (Table 1). Numerous factors have been found to influence the production of polyembryony *in vitro*. Among those factors type of culture medium and type and concentration of phytohormones and some antioxidants such as activated charcoal (AC) or PVP play a significant role on polyembryony formation. Culture media are in common use including formulations derived by Murashige and Skoog (1962) and its modification. Different compositions of the medium resulted in different response as shown in Table 1, especially development of axillary buds. Cytokinin in the presence of BA was the most effective in inducing seeds to form multiple shoots compare with KN and 2-iP. Concentration of cytokinin also plays an important role in determining the number of shoot buds produced. BA at 5mg/l or 25  $\mu\text{M}$  produced optimum shoot bud development. Higher concentrations caused a clustering and stunting of shoot buds. On the other hand, lower concentrations provided only a single shoot. In case of culture of seed segment in woody plant medium (WPM) (McCown and

**Table 1** Effect of medium composition on development of seed on 25 mg/l BA-containing medium.

culture media	seedling length (cm)	% axillary bud development	% shoot or seed forming root	% seed forming multi-shoots
MS	1.91	38.4a	21.4	40.3
MMS	1.81	28.8b	12.8	42.5
lsd.01	ns	*	ns	ns
C.V. (%)	15.8	15.7	53.7	66.4

ns : not significant difference, \*significant difference at  $P = 0.01$

Average not having letters in common differ significantly by DMRT.

MS : Murashige and Skoog medium, MMS : modified Murashige and Skoog medium

Lloyd, 1981), most shoots formed on the segment produced roots. Normah *et al.* (1995) reported that activated charcoal reduced shoot formation in most cases. Culture of seeds in segment required BA at 40  $\mu\text{M}$  alone or in combination with 2.5  $\mu\text{M}$  NAA. When seeds were dissected and cultured a higher concentration of BA was required. Dissecting seed is not a critical factor for multiple shoot formation. After culture of the whole seed on a modified MS medium containing 5 mg/l BA for 3-4 weeks, the seed with numerous of shoot buds was dissected into 4-6 segments and transferred to culture onto MS medium containing a low concentration of BA. Even though WPM was reported to induce both shoot and root simultaneously (Normah *et al.*, 1995) in this investigation that phenomenon was never found. Addition of NAA in initiation medium did not promote the number of shoots. But NAA enhanced production of phenolic compound leading to browning of seed segment and culture medium. Protocol for shoot induction and proliferation from culturing seeds is shown in Figure 1.

#### Leaf culture

Young purple or red leaves of mangosteen were obtained from either field-grown mature trees or cluster of shoot culture (2-4 cm tall) maintained on two-phase medium as mentioned earlier. Leaves collected from field-grown tree need to be sterilised before culturing whereas *in vitro* material need not

to be sterilized. Sterile leaves were notched at midrib and placed by adaxial contact to culture medium. In case of *in vitro* leaves, they were placed directly in the medium in the same way as *ex vitro* leaves but without notching. New shoots from *ex vitro* leaves developed from the notch area at the midrib at both proximal and distal end. Two to five shoots per explant were produced from *ex vitro* explants. For *in vitro* leaf explants a number of tiny shoot buds were initiated in the former medium (two-phase medium). Those buds were dense at leaf apex and leaf margin of the distal end and scattered to the midrib. The number of shoots reached 40 shoots per leaf. In some cases a large shoot with distinct shoot primordia was found and that grew vigorously. Histological study of *in vitro* leaves revealed that the tiny shoot buds developed from two different main sources. One was from the epidermal layer and another from the vascular tissue. Shoot bud obtained from the two sources of leaf explants on culture medium was induced directly without prior callus formation. The ability to form shoot buds was not greatly influenced by the size, but source of the explant played a significant role in both percentage of explants producing shoot buds and the number of shoot buds. Wounding of midrib, without complete severance of *ex vitro* young red leaves triggered shoot bud differentiation in all the leaves cultured on shoot regeneration medium (SRM). All shoot buds arose from the

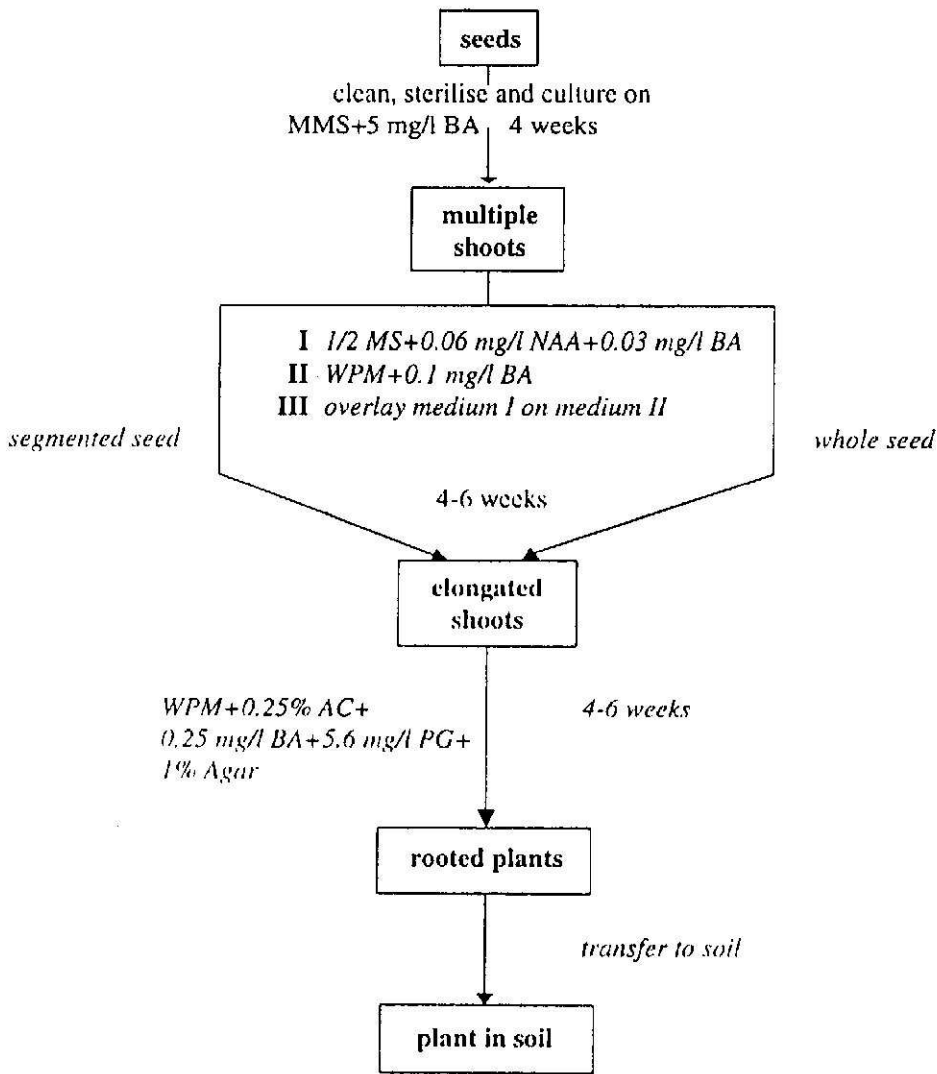


Figure 1 A protocol for plant regeneration from culturing seed of mangosteen.

midrib on mainly abaxial surface near proximal end. A cluster of shoot buds derived from culturing leaves were elongated and proliferated in two-phase medium. Elongate shoots were then rooted in rooting medium and complete plantlets were ready to transfer to soil. Goh *et al.* (1994) reported a high frequency direct shoot bud regeneration from excised leaves of mangosteen. In their investigation they found that explants from field-grown

seedlings had a higher organogenic potential than those obtained from *in vitro* shoots. Unfortunately, we did not do the experiment on segmented leaves. Accordingly, comparison of results between the notched and segmented leaves is not reported. In the case of our investigation, it seems very difficult to induce shoot bud formation from segmented leaves. Steps in direct shoot bud formation from culturing leaf explant are illustrated in Figure 2.

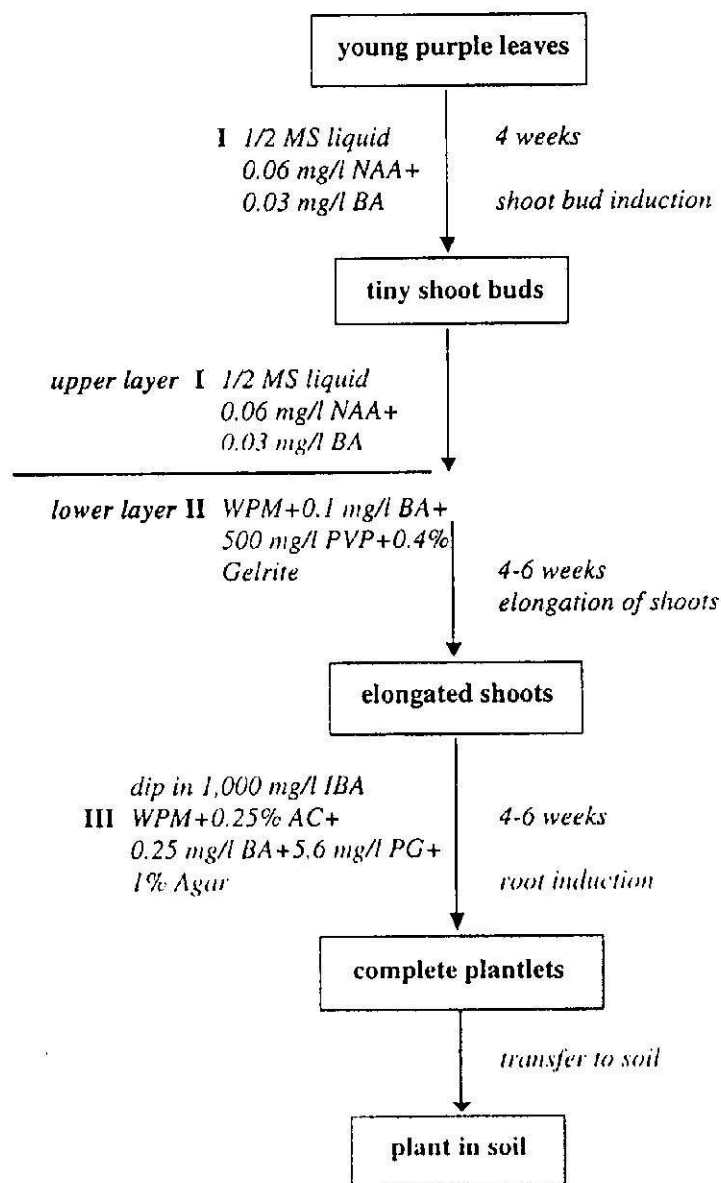


Figure 2 Direct plant regeneration through culturing of young purple leaves.

### Callus induction and plantlet regeneration

Callus cultures of mangosteen have been previously established in auxin containing-medium. 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) was incorporated in MS medium for callus induction from culturing seed segments. A concentration at 0.5 mg/l of the phytohormone provided the best percent

seed forming callus (72%) (Table 2). However, the calli could not be multiplied and regenerated even though various kinds and concentrations of phytohormones were used in combination. Thidiazuron (TDZ) was selected as the cytokinin which was required for callus production. The phytohormone has an auxin-like activity and plays a role in orga-



**Table 2** Effect of various concentrations of 2,4-D on callus induction from culturing seed segments

concentration of 2,4-D (mg/l)	% seed forming callus
0.5	72.2a
1.0	47.6b
2.0	25.0c
F-test	*
C.V. (%)	11.5

\*significant difference at  $P = 0.01$ 

Average not having letters in common differ significantly by DMRT.

nogenesis in many fruit trees (Fiola *et al.*, 1990; Matsuta and Hirabayashi, 1989; Neuman *et al.*, 1988) and woody plant species (Huetteman, 1993). In the case of mangosteen a low concentration of TDZ in combination with BA at the same concentration of 0.5 mg/l produced the best results in callus formation. All explants from seedlings raising *in vitro* including seed segments, before or after inducing shoot buds, gave rise to callus in callus induction medium (CIM). However, those explants must be prepared by proper methods. Cultured seeds or leaves from cluster of shoots in two-phase medium provided the best sources of explants. In the top or upper layer medium TDZ alone or in combination with BA at low concentration supplemented in the medium are recommended. TDZ plays an important role in the formation of anthocyanin in epidermal and parenchymatous cells. Anthocyanin formation has a close relation with callus formation. To prevent browning of the tissue and prolonged culture of the callus, PVP gave the better result than AC (data not shown). The addition of AC to the medium reduced callus proliferation subsequent to shoot proliferation. Although AC has been known to adsorb phenolic compound from explants, however at the same time it does adsorb growth regulators. The main activity of AC was improving shoot growth. Callus obtained from all explants was characterised as meristematic no-

dular callus. Even all the explants provided callus leaf explant gave the highest response both percentage of leaf forming callus and time required for callus induction. Besides source of explant, size of explant also produced a significant role on callus induction. Proliferation of the callus was also carried out in CIM. In this medium 3-4 times proliferation rate was obtained during 4 weeks of culture. It is calculated that at least a million pieces of callus should be proliferated within a year. Calli maintained in this medium seem to multiply without regeneration. Addition of auxin, either NAA or 2,4-D promoted necrosis of the tissue due to enhancing phenolic compound formation. This compound produced by callus and exuded to culture medium leading to a dark brown color of culture medium as well. Fluctuation of temperature 3-7°C retarded formation of meristematic nodule callus whereas consistency temperature at 25°C was superior to proliferation of the callus. Meristematic nodule maintained in CIM ceased to undergo further stage of development. After removing TDZ and transferring the callus to shoot primordia induction medium (SPIM) containing only 0.1 mg/l BA a pair of tiny leaf primordia developed. SPIM was woody plant medium (WPM) supplemented with 3% sucrose, 500 mg/l PVP and 0.1 mg/l BA. Leaf primordia appeared after a month of culture. Culture vessels also play a role in shoot primordia induction. At this stage of development carbon dioxide is required. Accordingly, transferring calli to 9 cm Petri-dish containing 15 ml of SPIM was superior in accelerating development of shoot primordia. BA at higher concentration than 0.1 mg/l inhibited elongation of the shoot. The shoots obtained in SPIM supplemented with 1 mg/l BA were clustered. However, shoots obtained in SPIM elongated very slowly. To promote elongation of the shoot for rooting purpose shoot elongation medium (SEM) was added to SPIM after 2-4 weeks of culture. SEM was half strength liquid MS (1/2MS) medium supplemented with 3% sucrose, 500 mg/l PVP, 0.06 mg/l NAA and 0.03 mg/l BA. In this medium, shoot elongated rapidly. Liquid WPM was also tried to overlay as SEM but adverse effects were

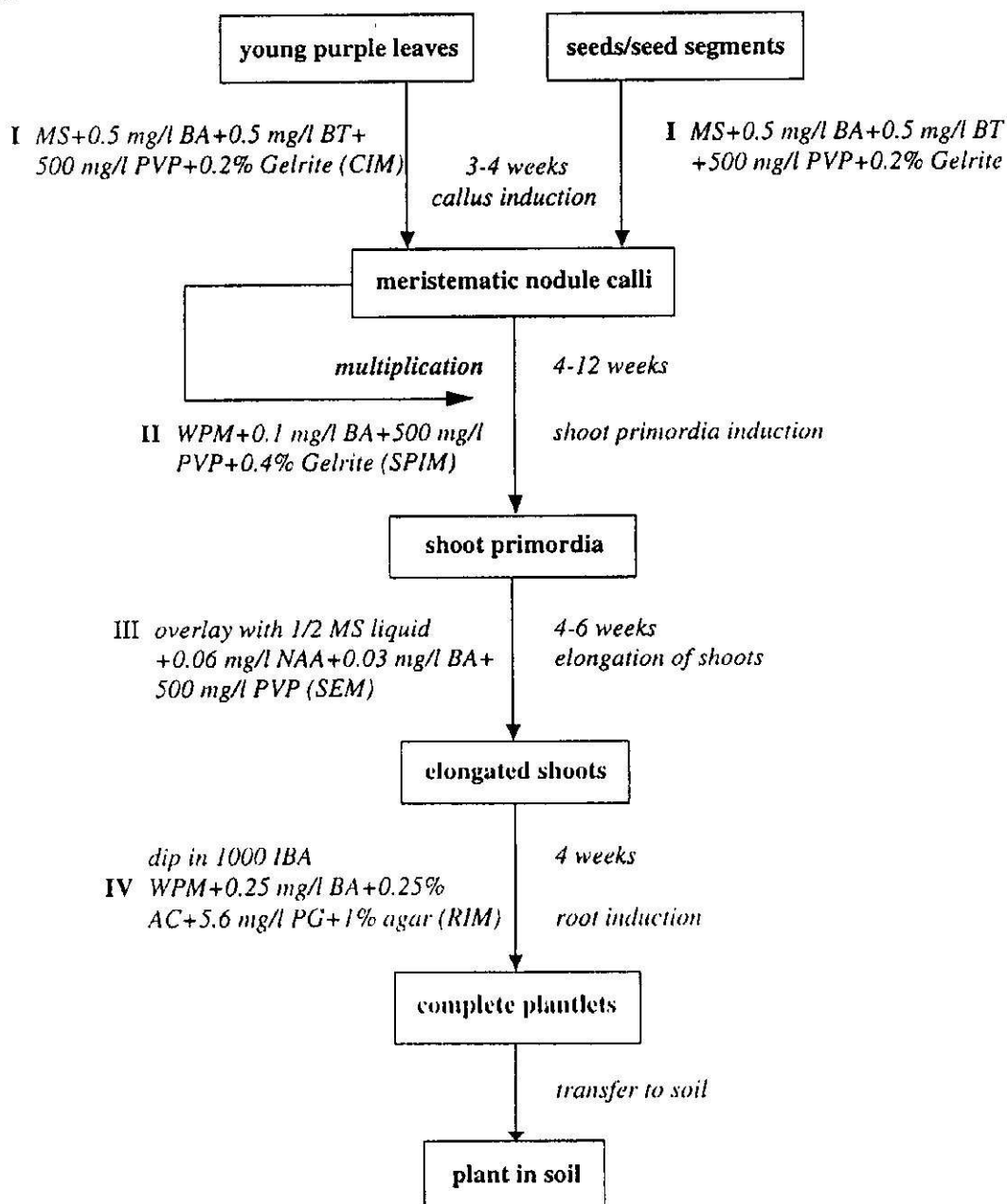


Figure 3 Four steps in plant regeneration through meristematic nodular callus induced from young purple leaves.

obtained. The medium caused a severe browning of the shoots and culture medium. Elongate shoots at this period were ready for rooting. A 100% root induction could be achieved from excised single

shoot in root induction medium (RIM). The medium was WPM containing 0.05% AC, 0.25 mg/l BA and 5.6 mg/l phloroglucinol (PG). Before inserting the shoots in RIM they were wounded at the basal



direct shoot bud from leaf



seed



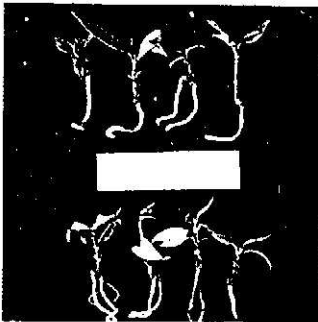
callus from leaf in CIM



elongation of the shoot in SEM



shoot primordia induction in SPIM



root induction in RIM



transfer to soil

**Figure 4** Direct and indirect shoot formation from culturing various plant parts.

part and dipped in 1,000 mg/l filter sterilised IBA in the dark for 15 min. At first 2 weeks the shoots in RIM were kept in the dark. Then they were transferred to culture under light. Addition of AC to RIM for making dark conditions seems not to produce a good result in induction of root. During 2 weeks under dark condition root primordia were already formed. Elongation of the root took place

after transfer to the light. Recently, clonal propagation of mangosteen through callus culture was routinely carried out by four-step culture. First step was callus induction in CIM. Second step was shoot primordia induction in SPIM. Third step was elongation of the shoot in SEM. The final step was root induction in RIM. All the steps are showed in Figure 3 and Figure 4.

## References

- Fiola, J.A., Hanssan, M.A., Swartz, H.J., Bors, R.H. and McNicole, R. 1990. Effect of thidiazuron, light influence rate and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20 : 223-228.
- 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, C.J., Ng, S.K., Lakshmanan, P. and Loh, C.S. 1997. The role of ethylene on direct shoot bud regeneration from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) leaves cultured *in vitro*. *Plant Science* 124 : 193-202.
- Goh, H.K.L., Rao, A.N. and Loh, C.S. 1988. *In vitro* plantlet formation in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Annals of Botany* 62 : 87-93.
- Goh, H.K.L., Rao, A.N. and Loh, C.S. 1990. Direct shoot bud formation from leaf explant of seedlings and mature mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) trees. *Plant Science* 68 : 113-121.
- 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.
- Husan, B.M. 1990. Vegetative propagation studies in mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Japan J. Trop. Agr.* 34 : 78-83.
- Lakshmanan, P., Ng, S.K., Loh, C.S. and Goh, C.J. 1997. Auxin, cytokinin and ethylene differentially regulate specific developmental state associated with shoot bud morphogenesis in leaf tissue of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) cultured *in vitro*. *Plant Cell Physiol.* 38 : 59-64.
- Lim, A.L. 1984. The embryology of *Garcinia mangostana* L. (Clusiaceae). *The Garden's Bulletin, Singapore* 37 : 93-103.
- Matsuta, N. and Hirabayashi, T. 1989. Embryogenic cell lines from somatic embryo of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports* 7 : 684-687.
- McCown, B.H. and Lloyd, G. 1981. Woody Plant Medium (WPM). A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *HortScience* 16 : 453.
- Mohamed, M.F., Read, P.E. and Coyne, D.P. 1992. Dark pre-conditioning, CPPU and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba beans. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117 : 668-672.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15 : 473-497.
- Neuman, M.C., Preece, J.E., Gaffney, G.R. and van Sambeek, J.W. 1988. Production of embryoid-like structures from immature cotyledonary tissue of black walnut (*Juglans nigra* L.). *HortScience* 23 : 807.
- Normah, M.N. 1992. Micropropagation of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) through callus and multiple shoot formation. In *Biotechnology for Forest Tree Improvement* (eds.R.C.Umaly, I. Umboh, S.S. Tjitrosomo and M.N. Normah) pp. 81-85. Indonesia : Seameo Biotrop.
- Normah, M.N., Nor-Azza, A.B. and Aliudin, R. 1995. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* establishment of mangosteen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43 : 291-294.
- Te-chato, S. and Aengyong, W. 1988. Microplant propagation of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 10 : 1-7.
- Te-chato, S. and Lim, M. 1996. Micropropagation of mangosteen through young leaf culture. The 13<sup>th</sup> Conference on Methodological Techniques in Biological Science. 19-20 June , pp. 55-64.
- Te-chato, S., Lim, M. and Kulsiratana, J. 1992a. *In vitro* micrografting of mangosteen. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 14 : 353-359.
- Te-chato, S., Lim, M. and Muangkaewngam, A. 1992b. Enhanced efficiency root induction of microplant of mangosteen *in vitro*. *Plant Biotechnology Newsletter* 20 : 4-6.
- Te-chato, S., Lim, M. and Muangkaewngam, A. 1992c. Enhanced efficiency micropropagation of mangosteen through young leaf culture. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 14 : 1-7.
- Te-chato, S., Lim, M. and Muangkaewngam, A. 1992d. Tissue culture of mangosteen : Root induction and establishment of vitro-plants to soil. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 16 : 1-5.
- 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. Type of medium and cytokinin in relation with purple leaf and callus formation in mangosteen. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 17 : 121-127.

## Recent potential in the biotechnology of mangosteen II : Cultivar improvement

Sompong Te-chato

### Abstract

Te-chato, S.

Recent potential in the biotechnology of mangosteen II : Cultivar improvement

Songklanakar J. Sci. Technol., 1998, 20(3) : 285-293

Somaclonal variation obtained from culturing apomict seed of mangosteen on modified Murashige and Skoog (MMS) medium supplemented with 25  $\mu$ M benzyladenine (BA) for 8 weeks consisted three types of phenotypic variants; chimera, malformed leaves and chlorosis. Phenotypic variation frequency of those variants ranged from  $6 \times 10^{-4}$  (for chimera) to  $3 \times 10^{-2}$  (for chlorosis). In the case of induced mutation, gamma irradiation at 10 grays and 0.5% ethylmethane sulfonate (EMS) caused more than 50% decrement of percent leaf forming callus. DNA analyses of calli induced from treated and non-treated leaves by randomly amplified polymorphic technique (RAPD) revealed difference polymorphisms. This confirms radio- and chemo-sensitivity of the two different types of mutagens. The results of DNA analyses were related with an inhibitory effect on percent leaf forming callus.

---

**Key words :** mangosteen, biotechnology, cultivar improvement, somaclonal variation, RAPD

---

M.Agr.(Crop Biotechnology), Assoc. Prof., Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand.

Received 15 December 1997 Accepted 2 April 1998

## บทคัดย่อ

สมปอง เตชะโต

ศึกษาของการใช้เทคโนโลยีชีวภาพกับมังคุดในปัจจุบัน II : การปรับปรุงพันธุ์

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2541 20(3) : 285-293

การกลายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมังคุดในอาหารสูตรดัดแปลงมูราซึกและสกุค (MMS) เต็มเบนซิลอะดีนีนเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ประกอบด้วย 3 ลักษณะ คือ อาการใบด่าง (chimeral leaf) อาการใบผิดปกติ (malformed leaf) และอาการใบซีดเหลือง (chlorotic leaf) อัตราการกลายพันธุ์ในลักษณะดังกล่าวอยู่ในช่วงตั้งแต่  $6 \times 10^{-4}$  (อาการใบด่าง) ถึง  $3 \times 10^{-2}$  (อาการใบซีดเหลือง) ในกรณีการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการใช้รังสีและสารเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงใบและแคลลัส พบว่า การฉายรังสีแกมมา 10 เกรย์ และการจุ่มแช่เอทิลมีเทนซัลโฟเนท (EMS) เข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่งผลให้ความสามารถในการสร้างแคลลัสจากใบลดลง 50% และจากการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอด้วยวิธีการ random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) จากแคลลัส และใบที่ชักนำจากการให้สิ่งก่อกลายพันธุ์ พบว่า มีรูปแบบของดีเอ็นเอ (polymorphism) ที่แตกต่างจากหน่วยทดลองเปรียบเทียบ การตรวจสอบดีเอ็นเอเป็นการยืนยันถึงผลของสิ่งก่อกลายพันธุ์ทั้งสองชนิดที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้มีความสัมพันธ์หรือสหสัมพันธ์กับการผลการยับยั้งการสร้างแคลลัสภายหลังการให้สิ่งก่อกลายพันธุ์

Micropropagation of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) has been established using whole seeds (Goh, *et al.*, 1986; Te-chato and Aengyong, 1988), seed segments (Normah, 1992; Normah, *et al.*, 1995), young leaves from *in vitro* (Te-chato *et al.*, 1992a; Goh *et al.*, 1994) and field-grown seedling and mature tree and nodular calli from young leaves (Te-cahto *et al.*, 1995). So far, there appear to be no distinct cultivars of mangosteen and there are no records of attempts being made to improve the cultivars. Almost all the attempts have been made in the temperate fruit crops e.g. apple (Predieri and Fasolo Fabbri Malavasi, 1989; Pandey and Phung, 1982), Japanese pear (Sanada, 1986). It is possible that the evolution of mangosteen has ceased, since the members of this species are known to consist of a single genotype which reproduce apomictically by seed. Although tissue culture of the species has been reported, there are still limitations to direct shoot organogenesis. According to the aforementioned limitations, there is an apparent lack of genetic variation in this species. Biotechnology involving modern tissue culture

technique, cell biology and molecular biology offers the opportunity to develop new germplasm that is better adapted to changing demands. Firstly, somaclonal variation arising in the culture of various explants must be provided. Secondly, a mutagenesis *in vitro* might further create more variants. Thirdly, in an alternative approach to classical breeding, attempts are being made to develop transformation systems using agrobacterium-based gene transfer. Moreover, protoplast also offers a wide scope for use as a new tool for somatic cell hybridisation of mangosteen. In this present study, somaclonal and induced variation of mangosteen are discussed.

## **Materials and Methods**

### **Somaclonal variation through tissue culture**

Main shoots of mangosteen obtained from culturing seeds *in vitro* on modified Murashige and Skoog (MMS) medium supplemented with 25  $\mu$ M BA were excised and rooted in rooting medium. The procedures for root induction and establish-

ment of complete plantlets to soil were described previously by Te-chato *et al.* (1992b). A 1,500 to 2,000 plantlets were transferred to nursery under a 50% shading and watering twice a day. During maintenance in nursery stage abnormalities of the plants were screened and frequency of off-type plants was recorded.

#### Induction of variability in tissue culture :

A week after plating, Petri-dishes contained leaves were irradiated with  $\gamma$ -ray at the dose of 5, 10, 20 and 40 grays. Source of  $\gamma$ -ray was  $^{60}\text{Co}$  which was provided by the Department of Radiology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai. Irradiated leaves were cultured in the same dishes until meristematic nodular calli appeared. The calli were then transferred onto shoot primordia induction medium (SPIM), shoot elongation medium (SEM) and finally root induction medium (RIM). The details of each medium were described previously by Te-chato (1998). Ethylmethane sulfonate (EMS) was selected and used as mutagen for inducing mutation in mangosteen. The chemical at concentrations of 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0% were applied. Young leaves were put in a 100 ml Erlenmeyer flask containing 25 ml mixture solution of liquid medium and EMS adjusted to the above concentrations. Incubation was carried out on an orbital shaker with a low speed of 60 rpm for 2 hours. Immediately after the end of treatment, the leaves and calli were washed thoroughly by sterile distilled water to remove excess EMS. The leaves were cultured and plantlet formation induced according to the following four-step media.

#### Determination of variation :

After transferring plantlets of mangosteen to the nursery, morphological characteristics, e.g. leaf (shape, type and arrangement) and stem, were carefully observed. DNA analyses were also employed to determine an optimal dosimetry of mutagens and screen mutants. In this activity, DNA was extracted from small leaves of mutagenised plantlets regenerated on SRM (M1R1) by the following the method. A small piece of leaf sample (ca. 20 mg)

was homogenised in 1.5 ml Eppendorf tube containing 150  $\mu\text{L}$  TE (Tris-EDTA) buffer in the presence of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS). Crude extracts were incubated at 70°C for 30 minutes and cooled immediately after addition of  $\text{NH}_4\text{OAc}$ . DNA was isolated and purified by centrifugation at 4°C and precipitation in isopropanol. It was then dried, dissolved in TE buffer and stored in -20°C to -80°C. DNA concentration was measured using small gel electrophoresis (MUPID) in comparison with standard DNA.

At least 25 arbitrary 10-mer primer (Operon Technology Inc. Alameda, California) belonging to a series of OPA and OPB were used to amplify DNA. Amplification was carried out in 25  $\mu\text{l}$  of PCR mixture solution of 1.25 dNTPs, 20 pmol/l of the primer, 2 unit/ $\mu\text{l}$  of Taq DNA polymerase and approximately 5 ng/ $\mu\text{l}$  of genomic DNA. DNA amplification was performed for 1 cycle of 94°C for 2 min, 51°C for 2 min and 72°C for 2 min. and 32 cycles of 94°C for 30 sec, 41°C for 1 min and 72°C for 2 min followed by final cycle of 94°C for 3 min, 41°C for 1 min and 72°C for 10 min. The amplification products were size separated by 2% agarose gel electrophoresis in 0.5xTBE buffer and stained with 0.01% ethidium bromide. Polymorphisms of DNA from each treatment were compared and analysed.

### Results and Discussion

#### Somaclonal variation through tissue culture

*In vitro* culture of apomict seed of mangosteen in modified Murashige and Skoog (MMS) medium with 25  $\mu\text{M}$  BA produced some phenotypic variations. Those variants were detected among plantlets just after transferring to soil. Only one case of the variant phenotype was heritable due to a mutation in chloroplast. Mitotic abnormalities were not detected. Consequently, somaclonal variation did not appear to be a very frequent event in plantlets regenerated from the culture of apomict seeds in a high concentration of BA. The variants could be classified into 3 types as following;

1. **Chimeral leaf** : In this case, each pair of



new leaves was mosaic with pale green and white color at leaf margin. Leaf color was also slightly lighter green than the normal leaf (Figure 1a). This was due to a low level of chlorophyll content in the chloroplasts or fewer chloroplasts per unit area. However, its growth was not significantly different from that of normal plants.

**2. Malformed leaf :** A pair of leaves being developed at the top whorl was replaced with a single rolled leaf with the appearance closed funnel (Figure 1b). This leaf had a long and thin petiole with dark green to purple color. The size of the leaf varied from plant to plant according to its vigor. Growth of these plants was slower than normal plants and chimeric plant as classified in 1. After flushing new leaves, they were normal and growth of the plant was observed to be the same as in normal plants.

**3. Chlorotic leaf :** Most of these plants had pale yellow leaf due to the lack of chlorophyll. Some had mottled green spots spread out through a pale yellow leaf blade (Figure 1c). This symptom could be cured by sufficient application of fertilizer. However, a few plants died after showing severe symptoms. The remaining plants grew up very slowly in comparison with the other abnormal types, 1 and 2. Frequency of those variants is shown in Table 1.

Table 1 Morphological abnormality of vitro-plants derived from culture seed of mangosteen on MMS medium with 25  $\mu$ M BA.

variation	total number of plants	number of variant(s)	mutation frequency
chimeral leaf	1,500	1	$6 \times 10^{-4}$
malformed leaf	1,500	10	$6 \times 10^{-3}$
chlorotic leaf	1,500	50	$3 \times 10^{-2}$

From Table 1 and characteristics of variants formerly characterized, it was suggested that only the chimeric character was genetically inherited.

This is the first report on somaclonal variation arising in tissue culture of mangosteen. As mentioned earlier, all mangosteen in cultivation belongs to one cultivar because it is an apomictic cultivar, therefore the new variant could be amended by tissue culture technique via somatic mutation. Conventional breeding of this cultivar is impossible due to the lack of sexual reproduction. *In vitro* technique alone or in combination with appropriate mutagens is likely to provide fair chances of obtaining new cultivars for further selection.

#### Induction of variability in tissue culture :

Callus induction rate or percent leaf forming callus from irradiated and chemical-treated leaves were expressed as a percentage of control (non irradiated/treated) samples.

##### Gamma irradiation :

To characterize dosimetry (radiosensitivity) the LD<sub>50</sub> or IC<sub>50</sub> is commonly used to define as the dose corresponding to 50% decrease of callus induction percentage. The percentage of callus-producing explants decreased with increasing dose of irradiation (Figure 2a). In most experiments very few leaf explants produced callus at 40 grays whereas 5 grays irradiation did not affect the percentage of callus formation after culture for 8 weeks. The LD<sub>50</sub> of gamma ray was 10 grays.

##### EMS treatment :

EMS at concentration from 0 to 1.0% was applied in order to evaluate the response of leaves in terms of leaf forming callus (Figure 2b). Similar to the response to gamma rays, the callus formation decreased with increasing concentration of treatment. The decrement was proportional to the concentration at 8 weeks of culture. The LD<sub>50</sub> was about 0.5%.

Mutagens can be used to induce mutation in plant cell, tissue and organ culture. Mutation occurs by alteration of one or a few characters, particularly with the vegetatively propagated cultivars. In fruit trees, spontaneous mutation *in vitro* has been processed through somaclonal variation. This evidence is also reported and proved to play an important role in the improvement of cultivars as somaclonal

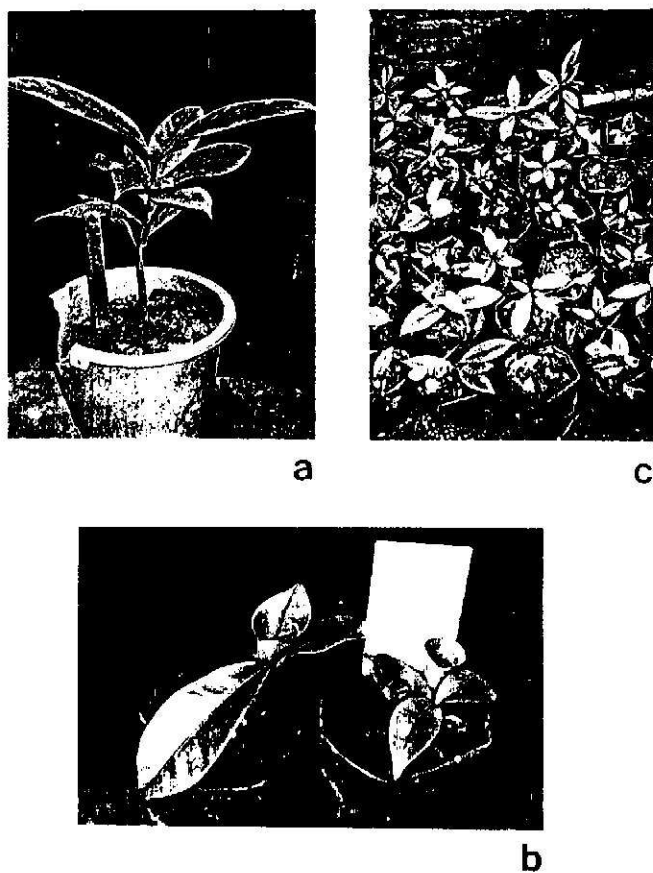


Figure 1 Somaclonal variations obtained from culturing mangosteen seeds on MMS supplement with 25  $\mu$ M BA.

(a) : chimeral leaf (b) : malformed leaf (c) : chlorotic leaf

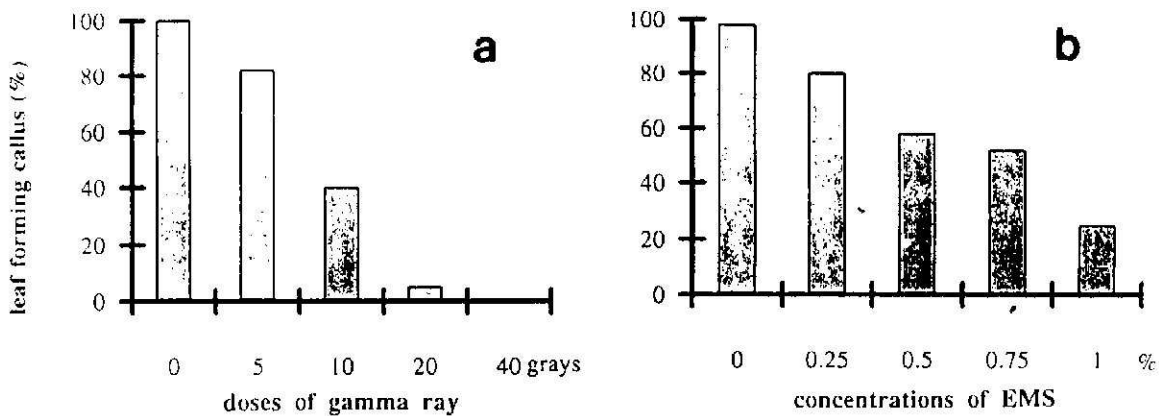


Figure 2 Effects of gamma ray (a) and EMS (b) at various concentrations on percent leaves forming callus of mangosteen.

variation but the frequency of mutants occurring was quite low. Thus, the induction of mutation by introducing mutagens to tissue culture may be of great importance in the improvement of the apomictic plants.

Manipulation of *in vitro* materials to various types of mutagens has also been reported. Adventitious regeneration from irradiated detached leaves has been chosen to develop pear varieties (*Pyrus communis*) less susceptible to fire blight (*Erwinia*

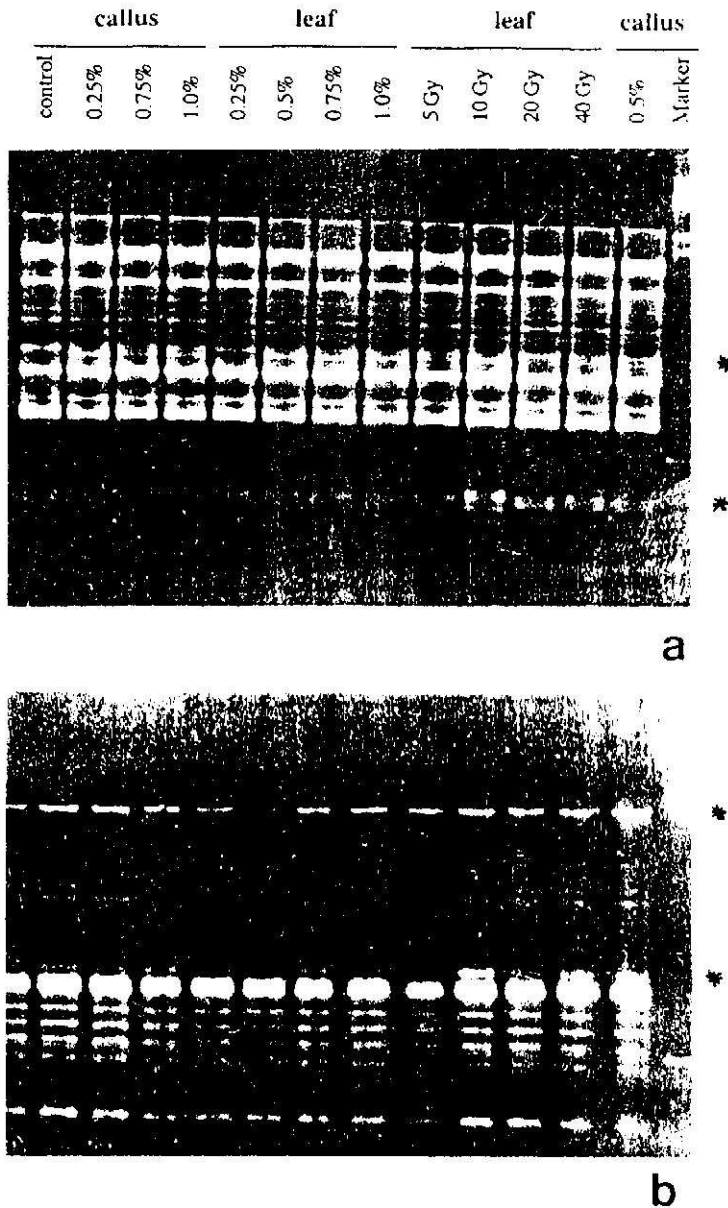


Figure 3 Polymorphisms of DNA amplified by OPB1(a) and OPB3 (b) from mangosteen leaf and callus.

*amylovora*) (Leblay *et al.*, 1991; Chevereau *et al.*, 1989; Predieri *et al.*, 1989; Abu-Qaoud *et al.*, 1990,1991). Recently, plant regeneration has been reported in a number of fruit cultivars but regeneration frequency has been reported to depend on genotypes and explant sources. In the present study, tissue cultures of mangosteen were recently well established from various explants (seed, leaf, stem and petiole). Among those explants young leaves proved to be the best explant that provided shoot regeneration from a single cell of the epidermal layer or small cluster of those cells. The cells divided rapidly to form meristemoid structure. Accordingly, young red leaves of the fruit trees prepared *in vitro* was chosen by our laboratory to improve mangosteen cultivar for resistance to drought and early fruit bearing. However, to the best of our knowledge, no reports related to mutagenesis of mangosteen leaves have been published.

#### Determination of variation :

Of all primers tested for the first trial, OPB1, 3 and 4 produced different polymorphisms among 10 grays irradiation, 0.5% EMS treatment and control (Figure 3). Although OPB2 could amplify genomic DNA, its polymorphisms gave insufficient resolution to determine the variation while OPA could not amplify the DNA. In the second trial using only 10 gray irradiation, 0.5% treatment and control were tested by some series of OPB. The results still confirmed that OPB 11, 12 and 15 can distinguish the difference among polymorphic DNAs (Figure 4). From PCR products, a clear distinction can be made among those treatments and control. Treatment of leaves with 10 gray gamma ray caused a change at the DNA level. Similar results were obtained when the leaves were treated with 0.5% EMS. The results of DNA analyses were correlated with percentage of leaf producing callus in CIM. A 10 gray irradiation or 0.5% EMS treatment produced an approximately 50% inhibitory effect on percent leaf forming callus. DNA analyses using PCR markers are a very important technique for high efficiency in identification dosimetry of irradiation and chemical mutagen *in vitro*.

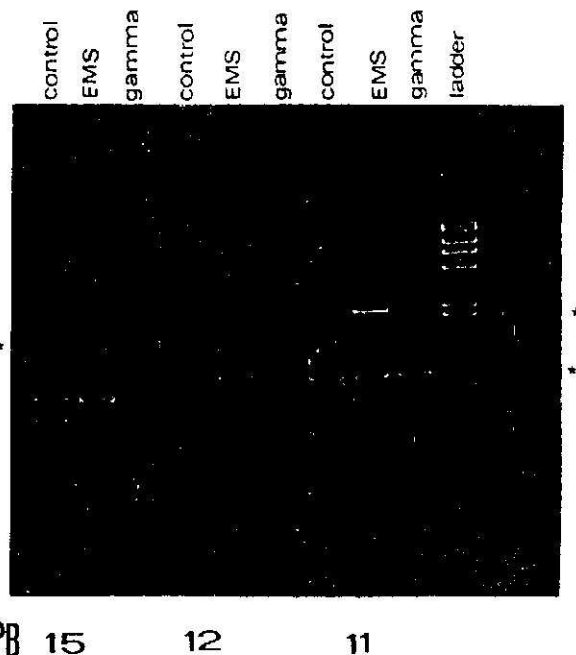


Figure 4 Polymorphisms of DNA obtaining from plantlet of mangosteen treated with two different sources of mutagens.

The radiosensitivity to gamma ray is generally genotype dependent. Low dose irradiation of apple leaves promotes callus formation and totipotency of the explants (Predieri and Fosolo Fabbri, 1988). LD<sub>50</sub> is commonly used to identify radiosensitivity or chemosensitivity. However, LD lower than 50 was also reported for use in citrus protoplasts and banana shoot tip (Lapins, 1983). Optimum dose of gamma in our experiment was 10 grays while banana and pear required higher concentration of 20-40 grays. In those species regeneration is still possible from leaves irradiated with up to 40 grays. In mangosteen, very few meristematic nodule calli were produced. Plantlet regeneration was never found. EMS has been widely used to induced maize resistance to 5-methyltryptophan (5-MT). This resistance to amino acid analogue might be useful not only for studying amino acid biosynthesis but also for improving the nutritional quality

(Kang and Kameya, 1993). Many cereals have been reported to improve many characters, e.g. lodging resistance, dwarf, high yield etc., by incorporation with EMS. In case of soybean, EMS conferred inheritance of oligomycin resistance. The effective concentration ranged from 0.2 to 2%. Higher and lower concentrations were reported to be necessary for seed and tissue culture material, respectively. In our case, 0.5% EMS was the best concentration. In annual crop plants, mutants might be easily isolated or identified by chlorophyll deficiency or survival in the next generation (M1R1, M1R2, ..., M1Rn). In mangosteen, distinct variations with reference to growth habits, leaf size and branching were very difficult to determine.

A large program for the genetic improvement of Mediterranean fruit tree species (apricot, almond, clementine, kiwi and mandarin) is being undertaken in Montpellier, France, using bud irradiation technique. By this technique, a number of mutants have been reported. The examples of those mutants are late flowering in almond, variation in fruit ripening of apricot and a variegated mutant of clementine which is of ornamental interest. Identification of mutants by morphological characters is usually time-consuming. The plants must grow to soil till bearing fruit. DNA marker technique mediated identification of mutants is increasing the efficiency of plant breeding programs. This is because DNA markers are closely linked to a gene. The power of DNA technique is superior for identifying species or the plant which is difficult to screen by phenotypic characters. A procedure for identifying reproducible randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for woody plants including fruit trees DNA has been reported (Levi *et al.*, 1993). In this study, we also proved the use of PCR as markers for identification/confirmation dose of mutagens when morphological characters can not be used.

#### Acknowledgement

The author wishes to thank to Prince of

Songkla University for providing annual budget to carry out this research work. Thanks are also due to the Department of Radiology, Faculty of Medicine, for source of irradiation. I also wish to thank Assoc. Prof. Mongkol Lim for her kind suggestion and close discussion.

#### References

- Abu-Qaoud, H.A., Skirvin, R.M. and Below, F.E. 1991. Influence of nitrogen form and  $\text{NH}_4^+\text{-N} / \text{NO}_3^-$  ratio on adventitious shoot formation from pear (*Pyrus communis*) leaf explants *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27 : 315-319.
- Abu-Qaoud, H.A., Skirvin, R.M. and Chevreau, E. 1990. *In vitro* separation of chimeral pears into their component genotypes. Euphytica 27 : 315-319.
- Chevreau, E., Skirvin, R.M., Abu-Qaoud, H.A., Korban, S.S. and Sullivan, J.G. 1989. Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (*Pyrus* sp) cultivar *in vitro*. Plant Cell Reports 7 : 688-691.
- 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. 1986. *In vitro* plantlet formation in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Annals of Botany 62 : 87-93.
- Kang, K.K. and Kameya, T. 1993. Selection and characterization of a 5-methyltryptophan resistant mutant in *Zea mays* L.. Euphytica 69 : 95-101.
- Lapins. 1983. Mutation breeding. In Methods in Fruit Breeding (eds. J.N.Moore and J.Janick) pp. 74-99, West Lafayette, Indiana : Purdue University Press.
- Leblay, P.C., Turpin, F.X. and Cheureau, E. 1992. Effect of gamma and ultra violet irradiation on adventitious regeneration from *in vitro* cultured pear leaves. Euphytica 62 : 225-233.
- Levi, A., Rowland, L.J. and Hartung, J.S. 1993. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woody plants. HortScience 28 : 1188-1190.
- Normah, M.N. 1992. Micropropagation of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) through callus and multiple shoot formation. In Biotechnology for Forest Tree Improvement (eds.R.C.Umaly, I. Umboh, S.S. Tjitrosomo and M.N. Normah) pp. 81-85. Indonesia : Seameo Biotrop.

- Normah, M.N., Nor-Azza, A.B. and Aliudin, R. 1995. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* establishment of mangosteen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43 : 291-294.
- Pandey, K.K. and Phung, M. 1982. 'Hertwig effect' in plants : induced parthenogenesis through the use of irradiated pollen. *Theor. Appl. Genet.* 62 : 295-300.
- Predieri, S. and Fasolo Fabbri Malavasi, F. 1989. High frequency shoot regeneration from leaves of apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 17 : 133-142.
- Predieri, S., Fasolo Fabbri Malavasi, F., Passey, A.J., Ridout, M.S. and James, D.J. 1989. Regeneration from *in vitro* leaves of 'Conference' and other pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *J. of Horticultural Science* 64 : 553-559.
- Sanada, T. 1986. Induced mutation breeding in fruit trees: resistant mutant to black spot disease of Japanese pear. *Gamma Field Symposia* 25 : 87-108.
- Te-chato, S. 1998. Recent potential in the biotechnology of mangosteen I : Micropropagation. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 20(3) : 275-284
- Te-chato, S. and Aengyong, W. 1988. Microplant propagation of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 10 : 1-7.
- Te-chato, S., Lim, M. and Muangkaewngam, A. 1992a. Enhanced efficiency micropropagation of mangosteen through young leaf culture. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 14 : 1-7.
- Te-chato, S., Lim, M. and Muangkaewngam, A. 1992b. Tissue culture of mangosteen : Root induction and establishment of vitro-plants to soil. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 16:1-5.
- Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995. Embryogenic callus induction in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 17 : 115-120.

การชักนำการกลายพันธุ์มังคุด: การตอบสนองของชิ้นส่วนพืชต่อสิ่งก่อกลายพันธุ์  
 Mutation Induction in Mangosteen: Response of Explants to Mutagens  
 สมปอง เตชะโต และวิทยา พรหมมี

บทคัดย่อ

ตัดแยกใบอ่อนสีม่วงแดงของมังคุดที่เตรียมเลี้ยงในอาหารสองชั้น และรวบรวมโนดูลา แคลลัสที่ชักนำในอาหารสูตรชักนำแคลลัสมาจุ่มเชื้อสารเคมีก่อกลายพันธุ์เอทิลมีเทนซัลโฟเนต และฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ นำใบ และแคลลัสที่ผ่านการให้สิ่งก่อกลายพันธุ์ทั้งสองชนิด มาตรวจสอบการสร้างแคลลัสจากใบ และการรอดชีวิตของแคลลัสในแต่ละสัปดาห์ เพื่อตรวจสอบรูปแบบความสามารถในการสร้างแคลลัสจากใบเปรียบเทียบกับรูปแบบการรอดชีวิตของแคลลัสในแต่ละความเข้มของสิ่งก่อกลายพันธุ์ทั้งสองชนิด จากการศึกษาพบว่าการใช้ EMS ความเข้มข้นสูงขึ้นให้อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลง ความเข้มข้นที่ยับยั้งการพัฒนาได้น้อย 50 % ของชุดเปรียบเทียบ คือ ความเข้มข้น 0.50 % สำหรับการสร้างแคลลัส พบว่าเป็นไปทำนองเดียวกัน แต่ความเข้มข้นที่ยับยั้งการสร้างแคลลัสได้ 50 % คือ 0.50-0.75 % ในกรณีของการฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ พบว่ารังสีความเข้ม 20 และ 40 เกรย์ ทำให้การรอดชีวิตของแคลลัส 84.20 และ 80.80 % แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบ ซึ่งให้การรอดชีวิต 100 % อย่างไรก็ตามการรอดชีวิตของแคลลัสหลังจากฉายรังสีไม่มีความรุนแรง ในขณะที่การสร้างแคลลัสจากใบมีความรุนแรงมาก โดยเฉพาะรังสีความเข้ม 20 และ 40 เกรย์ ไม่สามารถชักนำแคลลัสจากใบที่ฉายรังสีได้เลย ในขณะที่ใบที่ได้รับรังสี 5 และ 10 เกรย์ สร้างแคลลัสได้ 50 % และ 10 % ตามลำดับ ความเข้มรังสีที่ยับยั้งการสร้างแคลลัสจากใบได้ 50 % คือ 10 เกรย์

---

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่  
 Department of Plant Science , Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla  
 University, Hat Yai, 90012, Thailand.

## Abstract

Young red leaves of mangosteen raising in two-phase medium and callus were collected and treated with two different sources of mutagens, gamma ray and ethylmethane sulfonate (EMS). After treating with both mutagens leaves and calli were cultured onto callus induction medium for evaluating the effect of mutagens on percent leaf forming callus and survival percentage of callus. The results showed that an increment of EMS caused decreasing in survival rate of calli. The concentration which inhibited 50% growth of the calli was 0.5%. Similar result was also found in the case of leaf forming callus. A 50% inhibition of leaf forming callus was obtained by treating with EMS at concentration of 0.5-0.75%. In case of irradiation, gamma ray at dose of 20 and 40 grays gave survival percentage of 84.20 and 80.80%, significant difference from that of control which gave survival percentage of 100%. Contrary result was obtained when young red leaves were exposed to gamma ray. Drastical decrease in leaf forming callus was found when leaves were irradiated with dose at higher than 10 grays. A 20 and 40 gray irradiation could inhibit callus formation from leaves absolutely while 5 and 10 gray irradiation gave leaf forming callus percentage of 50 and 10%. The dose which inhibited 50% callus formation was 10 grays.

---

**Keywords:** Mangosteen, mutation, leaf, callus, survival rate

---



## บทนำ

สิ่งก่อกลายพันธุ์ที่นิยมใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชนิยมใช้สารเคมีเอทริลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) และรังสีแกมมา ทั้งนี้เพราะหาได้ง่าย โดยเฉพาะ EMS นอกจากนี้มีการสลายตัวได้เร็ว และมีความปลอดภัยสูง ความสำเร็จในการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์นั้นขึ้นกับปัจจัยหลายประการที่สำคัญคือ ชนิดและความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ พันธุ์พืช ชนิดอายุ และขนาดของชิ้นส่วนพืชที่นำมาศึกษา การเพาะเลี้ยงเซลล์สามารถที่จะตัดแปลงจำนวนเซลล์ให้มีจำนวนน้อยส่งเสริมการกลายพันธุ์กับเซลล์เพียงหนึ่ง หรือจำนวนน้อยทำให้มีประสิทธิภาพสูง Deng และคณะ (1989) ใช้กลุ่มเซลล์ที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงไข่อ่อนของส้ม และโพรโตพลาสต์ที่แยกจากแคลลัส มาชักนำการกลายพันธุ์ร่วมกับรังสี และสารเคมี พบว่ารังสีแกมมา 7 กิโลเรต และ EMS เข้มข้น 0.2-0.5% ทำให้ส้มทนทานต่อเกลือได้ อย่างไรก็ตามขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำการสร้างพืชใหม่ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญ ในกรณีของการเพาะเลี้ยงมิ่งคุดไม่ว่าจะเป็นใบอ่อนหรือแคลลัสพบว่าพัฒนาการของยอดมาจากเซลล์ชั้นเซลล์ผิวเพียงเซลล์เดียว หรือจำนวนน้อย ดังนั้นเมื่อได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่สมบูรณ์เป็นไปได้สูง ปัจจัยที่มีผลมากและควรคำนึงถึงในการชักนำการกลายพันธุ์ในมิ่งคุดคือชนิดและความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ สมปอง เตชะโต (2541) รายงานชนิดและความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่ให้กับใบ และมีผลต่อการชักนำแคลลัสซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพิจารณาเลือกใช้กับการชักนำการกลายพันธุ์ในมิ่งคุด Leblay และคณะ (1992) รายงานผลเสียหายที่เกิดกับใบแพร้ที่ผ่านการให้รังสีที่แตกต่างกัน พบว่ารังสีแกมมาทำให้เกิดความเสียหายกับชั้นของเซลล์มากกว่าหนึ่งชั้น ในขณะที่รังสีอัลตราไวโอเล็ตทำลายเฉพาะเซลล์ในชั้นเซลล์ผิวเท่านั้น เขายังรายงานว่าพันธุ์แพร้ที่ต่างกันตอบสนองต่อความเข้มข้นรังสีแตกต่างกัน Fu และคณะ (1995) รายงานการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้ EMS กับใบ และปลายยอด เซอร์รี่ และแอปเปิ้ลว่าเมื่อนำยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาเสียบบนต้นต่อสามารถชักนำต้นผิดปกติที่มีใบเป็นรูปช่อม (forked leaf) และใบออกแบบตรงข้าม (opposite leaf) อย่างละ 2 ต้น Shen และคณะ (1990) ฉายรังสีแกมมาให้กับตายอด ตาข้าง และก้านใบ chinese gooseberry พบว่าความเข้มข้นรังสีสูงขึ้นทำให้การสร้างแคลลัส การพัฒนาของยอดแขนงลดลง แต่ไม่มีผลกับชิ้นส่วนที่ประกอบด้วยข้อ 2 ข้อ จากที่กล่าวมาข้างต้นเห็นได้ว่าทั้งชนิดของสิ่งก่อกลายพันธุ์ และชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่นำมาใช้ชักนำให้มีการกลายพันธุ์มีผลต่อความสำเร็จต่อการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการกลายพันธุ์ ในการศึกษานี้เป็น การตรวจสอบผลการตอบสนองของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่แตกต่างกันต่อสิ่งก่อกลายพันธุ์ทั้งสองชนิด คือรังสีแกมมา และ EMS เพื่อประโยชน์ในการชักนำความแปรปรวนของมิ่งคุดในอันที่จะปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

## วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

### วัสดุพืช

ในการศึกษานี้ใช้ใบอ่อนสีแดงของมังคุดซึ่งได้จากการเลี้ยงกลุ่มยอดรวมบนอาหารสองชั้นตามที่รายงานโดยสมปอง เตชะโต และคณะ (2535) ตัดแยกใบอ่อนสีแดงมาวางเลี้ยงบนอาหารชั๊กนำแคลล์สปริมาตร 20 มล ซึ่งบรรจุอยู่ในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม แต่ละจานเพาะเลี้ยงใบจำนวน 50 ใบ เพื่อเตรียมฉายรังสี หรือใส่ในพลาสติกที่บรรจุสารละลาย EMS ในกรณีของโนดูลาแคลล์สนั้นชั๊กนำจากการวางเลี้ยงใบอ่อนสีแดงบนอาหารสูตรชั๊กนำแคลล์ส หลังจากชั๊กนำแคลล์สแล้วดูแลรักษาโดยการย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 24 สัปดาห์ นำแคลล์สอายุ 2-3 สัปดาห์หลังการย้ายเลี้ยง มาใช้ชั๊กนำการกลายพันธุ์โดยรังสีและสารเคมีต่อไป

### สิ่งก่อกลายพันธุ์

ในการศึกษานี้ใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ 2 ประเภทคือสารเคมี และรังสี สารเคมีที่ใช้คือ EMS ส่วนรังสีที่ใช้คือ รังสีแกมมาได้จาก  $^{60}\text{Co}$  ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชารังสีวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์

### อาหารที่ใช้เลี้ยง

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมังคุดในการศึกษานี้มี 2 สูตรด้วยกัน คือ สูตร WPM และสูตร MS แต่ละสูตรดัดแปลงโดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ ขึ้นกับวัตถุประสงค์ดังนี้คือ สูตรอาหารชั๊กนำและเพิ่มปริมาณแคลล์สเป็นสูตรอาหาร MS เติม น้ำตาลซูโครส 3% PVP 500 มก/ล BA 0.5 มก/ล และ TDZ 0.5 มก/ล ทำให้แข็งโดยการเติมวุ้นไฟตาเจล 0.15% สูตรอาหารชั๊กนำการสร้างจุดกำเนิดยอดเป็นสูตร WPM เติมน้ำตาลซูโครส 3% PVP 500 มก/ล และ BA 0.1 มก/ล ทำให้แข็งโดยการเติมวุ้นไฟตาเจล 0.25% ปรับความเป็นกรด-ด่างในช่วง 5.7-5.8 ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.07 กก/ตร.ซม อุณหภูมิ 120°ซ เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีการเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงนั้นทำการเทอาหารเหลวขณะที่อุ่น (อุณหภูมิ 40-45°ซ) ลงในจานเพาะเลี้ยงที่อบฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้จนเย็นแล้วจึงย้ายชิ้นส่วนพืชไปเลี้ยง

ผลของสิ่งก่อกลายพันธุ์ต่อการสร้างแคลล์สและการรอดชีวิตของแคลล์ส

### สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS

เตรียมสารละลาย EMS ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ โดยการดูด EMS ซึ่งอยู่ในรูปของสารละลายเข้มข้นตั้งต้นมาผสมกับอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ปรับให้มีความเข้มข้นตามที่กล่าวข้างต้น ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองมิลลิพอร์ขนาดช่อง 0.22 ไมครอน หลังจากนั้นแบ่งถ่าย สารละลาย EMS ที่กรองได้ในแต่ละความเข้มข้นใส่พลาสติกปริมาตร 125 มล พลาสติกละ 30 มล เมื่อเตรียมสารละลาย EMS เสร็จแล้วตัดใบอ่อนสีแดงมังคุดจำนวน 50 ใบ และรวบรวมโนดูลาแคลล์สที่ชั๊ก

นำในอาหารสูตรชั๊กนำแคลล์จำนวน 50 ชิ้น ย้ายใส่ในพลาสติกที่บรรจุสารละ EMS แต่ละความเข้มข้น นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองแยกใบและสารละลาย EMS ออกจากกัน ล้างใบ และแคลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อหลายครั้งเพื่อกำจัด EMS ส่วนเกินออกจนหมด ชับจนแห้งด้วยกระดาษกรองอบฆ่าเชื้อ คีบใบและแคลล์ไปเลี้ยงในอาหารสูตรชั๊กนำแคลล์ซึ่งบรรจุอยู่ในจานเพาะเลี้ยงเพื่อตรวจสอบรูปแบบความสามารถในการสร้างแคลล์จากใบเปรียบเทียบกับรูปแบบการรอดชีวิตของแคลล์ในแต่ละความเข้มข้นของ EMS

### การฉายรังสีแกมมา

ตัดแยกใบอ่อนสีแดงของมังกุดที่เตรียมเลี้ยงในอาหารสองชั้น และรวบรวมโนดูลาแคลล์ที่ชั๊กนำในอาหารสูตรชั๊กนำแคลล์มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชั๊กนำแคลล์ซึ่งบรรจุในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกฆ่าเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม ปริมาตร 20 มล จานละ 50 ใบ ทำนองเดียวกับแคลล์ ใช้ 50 ชิ้นต่อจานเพาะเลี้ยง หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำไปฉายรังสีแกมมาที่ระดับความเข้ม 5 10 20 และ 40 เกรย์ (แหล่งของรังสีได้จาก  $^{60}\text{Co}$  ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชารังสีวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ จังหวัดสงขลา) หลังจากนั้นวางเลี้ยงใบและแคลล์ในจานเพาะเลี้ยงเดิมต่อมาอีกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบการสร้างแคลล์จากใบ และการรอดชีวิตของแคลล์ในแต่ละความเข้มของรังสีในแต่ละสัปดาห์ เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการยับยั้งการสร้างแคลล์ระหว่างใบกับแคลล์ในแต่ละความเข้มของรังสี

## ผลและวิจารณ์

### 1.1 ผล EMS ต่อการสร้างแคลล์ และการรอดชีวิตของแคลล์

#### ความมีชีวิตของแคลล์

หลังจากนำแคลล์จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าแคลล์เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีขาวขิต และหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 วัน สีขิตเพิ่มมากขึ้นแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แคลล์ที่รอดชีวิตเปลี่ยนเป็นสีเขียวและพัฒนาไปเป็นกลุ่มยอดรวมและเป็นต้นใหม่ แคลล์ที่ได้รับ EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ มีผลทำให้การพัฒนาไปเป็นกลุ่มยอดรวมได้ต่ำกว่าชุดเปรียบเทียบ (Table 1) หลังจากวางเลี้ยง 3 สัปดาห์ ตรวจนับการรอดชีวิตของโนดูลาแคลล์ พบว่าการใช้ EMS ความเข้มข้นสูงขึ้นไปมีผลทำให้การรอดชีวิตต่ำ ในขณะที่การใช้ความเข้มข้นต่ำ คือ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการรอดชีวิต 47.44% ไม่แตกต่างกับชุดเปรียบเทียบ เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงขึ้นไปเป็น 0.50, 0.75 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตของแคลล์ลดลงเหลือ 31.55, 26.13 และ 11.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีความแตกต่างกับชุดเปรียบเทียบและความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) ความเข้มข้นของ EMS ที่ยับยั้งการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้น้อย 50% ของชุดเปรียบเทียบ คือ ความเข้มข้น 0.50%

## การสร้างแคลลัส

ทำนองเดียวกับการให้ EMS กับแคลลัส ใบหลังจากได้รับ EMS มีสีซีดจาง และความเข้มของ EMS เพิ่มขึ้นส่งผลให้การสร้างแคลลัสจากใบลดลง ผลดังกล่าวตรวจสอบได้หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (Table 1) และสามารถเห็นผลการยับยั้งการสร้างแคลลัสได้อย่างชัดเจนในช่วงเวลานี้สามารถคัดเลือกความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการชักนำการกลายพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น ความสามารถในการสร้างแคลลัสเพิ่มขึ้นเป็นไปในทำนองเดียวกันทุกระดับความเข้มข้น แต่ความสามารถในการสร้างแคลลัสยังคงต่ำกว่าหน่วยทดลองเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้รับ EMS สัดส่วนการสร้างแคลลัสที่ลดลงใกล้เคียงกับสัปดาห์ที่ 2 ความเข้มข้นที่ยับยั้งการสร้างแคลลัสได้ 50% คือ 0.50-0.75%

เมื่อเปรียบเทียบผลของ EMS ต่อแคลลัส และใบ พบว่ามีผลยับยั้งการสร้างแคลลัสและให้การรอดชีวิตของแคลลัสในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกันทุกระดับความเข้มข้นของ EMS ที่เพิ่มขึ้น (Fig 1) อย่างไรก็ตามแคลลัสมีความอ่อนแอต่อ EMS มากกว่าใบ และมีผลสะสมโดยเฉพาะเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ให้การรอดชีวิตของแคลลัสลดลงต่ำกว่าสัปดาห์ที่ 3 ในขณะที่การสร้างแคลลัสจากใบเพิ่มขึ้น (Table 1, Fig 1)

### 1.2. ผลของความเข้มข้นรังสีแกมมาต่อการสร้างแคลลัสและรอดชีวิตแคลลัส

#### ความมีชีวิตของแคลลัส

หลังจากฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ กับแคลลัส และวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ตรวจสอบการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัส พบว่า การใช้รังสีความเข้มสูงชันมีผลทำให้การรอดชีวิตลดลง การใช้รังสีความเข้มต่ำ ๆ 5 และ 10 เกรย์ ให้การรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัส 96% และ 93.4% ตามลำดับ ไม่แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบซึ่งให้การรอดชีวิต 100% เมื่อเพิ่มความเข้มรังสีสูงชันเป็น 20 และ 40 เกรย์ ส่งผลให้การรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสลดลงเหลือ 84.20 และ 80.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ กับชุดเปรียบเทียบ และ 5 เกรย์ (Table 2) เมื่อวางเลี้ยงต่อมาอีกสัปดาห์ (4 สัปดาห์) พบว่าการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสจากการฉายรังสีทุกระดับไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และมีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 3 เพียงเล็กน้อย (Table 2)

#### การสร้างแคลลัส

เมื่อฉายรังสีแกมมากับใบในสภาพปลอดเชื้อแล้ววางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าการสร้างแคลลัสจากใบมีน้อยมากโดยเฉพาะรังสีความเข้ม 20 และ 40 เกรย์ ไม่สามารถชักนำแคลลัสจากใบที่ฉายรังสีได้เลยในขณะที่ใบที่ได้รับรังสี 5 และ 10 เกรย์ สร้างแคลลัสได้ 50 และ 10% ตามลำดับ (Table 2) เมื่อวางเลี้ยงต่อมาอีก 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 3) ส่งผลให้การสร้างแคลลัสจากใบที่ได้รับรังสีความเข้มต่ำ (5 และ 10 เกรย์) เพิ่มสูงขึ้นโดยเฉพาะใบที่ได้รับรังสี 5 เกรย์ ให้การสร้างแคลลัสใกล้เคียงกับหน่วยทดลองเปรียบเทียบ ในขณะที่ใบที่ได้รับรังสี 20 และ 40 เกรย์ ยังคงไม่มีการสร้างแคลลัส ในสัปดาห์ที่ 4 ความเข้มรังสี 40 เกรย์ ยับยั้งการสร้างแคลลัสจากใบได้อย่างสมบูรณ์ ความเข้มรังสีที่ยับยั้งการสร้างแคลลัสได้ 50% คือ 10 เกรย์ (Fig.2)

ไบอ่อนมั่งคุดมีความอ่อนแอต่อรังสีมากกว่าแคลลัส เมื่อเพิ่มความเข้มรังสีสูงขึ้นทำให้การสร้างแคลลัส และการรอดชีวิตของแคลลัสลดลง แต่อัตราการลดลงมีสัดส่วนที่แตกต่างกันมาก การรอดชีวิตของแคลลัสลดลงเพียงเล็กน้อย (ประมาณ 20%) จากแคลลัสที่ได้รับรังสี 40 เกรย์ ในขณะที่ไบมีการสร้างแคลลัสลดลงอย่างรุนแรงเมื่อได้รับรังสีความเข้มสูงแตกต่างกันชัดเจน และไม่สามารถสร้างแคลลัสได้เมื่อใช้รังสีความเข้ม 40 เกรย์ (Fig. 2)

ชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกันตอบสนองต่อสิ่งก่อกลายพันธุ์ได้แตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่ารังสีก่อให้เกิดความเสียหายมากกว่า EMS เมื่อใช้ชิ้นส่วนไบอ่อน ไบที่ได้รับ EMS ทุกระดับความเข้มยังคงสร้างแคลลัสได้ในขณะที่รังสีแกมมาที่สูงกว่า 20 เกรย์ ยับยั้งการสร้างแคลลัสได้อย่างสมบูรณ์ (Table 1, Fig. 1) เมื่อเปรียบเทียบสิ่งก่อกลายพันธุ์ชนิดเดียวกันที่ให้กับชิ้นส่วนของมั่งคุดที่ต่างกัน พบว่าแคลลัสมีความอ่อนแอต่อ EMS มากกว่าไบ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแคลลัสมีความสามารถในการดูดซึม EMS ได้มากกว่าก่อให้เกิดความเสียหายมากกว่า อย่างไรก็ตามความแตกต่างนี้ไม่รุนแรงมาก ความเสียหายที่ได้รับในแต่ละความเข้มข้นของ EMS ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองเปรียบเทียบเป็นสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาผลของรังสีแกมมาพบว่า เป็นไปในลักษณะตรงกันข้าม ไบได้รับความเสียหายรุนแรงมากกว่าแคลลัส (Table 2, Fig 2) ผลดังกล่าวอาจเป็นเพราะกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญที่เป็นองค์ประกอบในแคลลัสมีสูงกว่า จำนวนชิ้นมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับไบซึ่งมีเพียงเซลล์ในชั้นผิว และเซลล์เนื้อเยื่อเจริญมัดท่อน้ำท่ออาหารเท่านั้น เมื่อใช้รังสีแกมมาความเข้มสูงทำให้เซลล์ดังกล่าวเสียหายจำนวนมาก หรือหมด จึงไม่สามารถสร้างแคลลัสได้ การใช้เซลล์จำนวนมาก หรือชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งหมายถึงองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญมากขึ้นทำให้ผลเสียหายที่ได้รับจากสิ่งก่อกลายพันธุ์น้อยลง ดังที่ Shen และคณะ (1990) รายงานว่าการฉายรังสีให้กับชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ประกอบด้วยข้อจำนวน 2 ข้อไม่ทำให้ความสามารถในการสร้างยอดแขนงลดลง ชิ้นส่วนที่มีองค์ประกอบของเนื้อเจริญมีความอ่อนแอต่อสิ่งก่อกลายพันธุ์มากกว่าชิ้นส่วนที่มีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อถาวร (Lapin, 1983 อ้างโดย Leblay et al., 1992)

## เอกสารอ้างอิง

- Fu, R., Andersen, R.L., Cheng, Z., Liu, Z.R., Fu, R.M., Cheng, Z.M., Liu, Z.R. and Zhu, D.W. 1995. Studies on induced mutation on fruit trees *in vitro*. Acta-Horticulturae 403:111-116.
- Leblay, P.C., Turpin, F.X. and Chevreau, E. 1992. Effect of gamma and ultraviolet irradiation on adventitious regeneration from *in vitro* cultured pear leaves. Euphytica 62:225-233.
- Mak, C., Ho, Y., Tan, Y.P., Ibrahim, R. and Liew, K.W. 1995. Mutation induction by gamma irradiation in triploid banana Pisang Berangan. Malaysian Journal of Science 16:77-81.
- Novak, F.J., Afza, R., Duren, M-van and Omar, M.S. 1990. Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* shoot-tips of banana and plantain (*Musa* cvs.). Tropical Agriculture 67:21-28.

- Predieri, S. and Fasolo Fabbri Malavasi, F. 1989. High frequency shoot regeneration from leaves of apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 17:133-142.
- Shen, X.S., Wan, J.Z., Luo, W.Y. and Ding, X.L. 1990. Preliminary results of using *in vitro* axillary and adventitious buds in mutation breeding of Chinese gooseberry. *Euphytica* 49:77-82.
- Smith, M.K., Hamill, S.D., Langdon, P.W. and Pegg, K.G. 1993. Mutation breeding programme produces a plant with potential Fusarium wilt (race 4) resistant Cavendish variety. *Mutation Breeding Newsletter* 40:4-5.
- Srivastava, A. and Sing, V.P. 1996. Induced high yielding pigeon pea mutants. *Mutation Breeding Newsletter* 42:8-9.
- Te-chato, S., Lim, M. and Muangkaewngam, A. 1992. Enhanced efficiency micro-propagation of mangosteen through young leaf culture. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 14:1-7.
- Tulmann, N.A., Domingues, E.T., Mendez, B.M.J. and Ando, A. 1990. *In vitro* mutation breeding methodology for Fusarium wilt resistance in banana. *Mutation Breeding Newsletter* 36:12-13.
- Yang, H.Y. and Schmidt, H. 1994. Selection of mutant from adventitious shoots formed in X-ray treated cherry leaves and differentiation of standard and mutant with RAPDs. *Euphytica* 77:89-92.

Table 1 Effect of EMS on leaf forming callus and survival callus percentage.

concentration s (%)	leaf forming callus (%)		survival callus (%)	
	week 3	week 4	week 3	week 4
0	98	100	58	50
0.25	80	85	47	43
0.50	58	75	31	24
0.75	52	70	26	22
1.00	25	45	11	10



Table 2. Effect of gamma irradiation on leaf forming callus and survival callus percentage.

doses (Gy)	leaf forming callus (%)		survival callus (%)	
	week 3	week 4	week 3	week 4
0	100	100	100	100
5	80	82	96	97
10	30	40	93	94
20	0	5	84	87
40	0	0	80	81

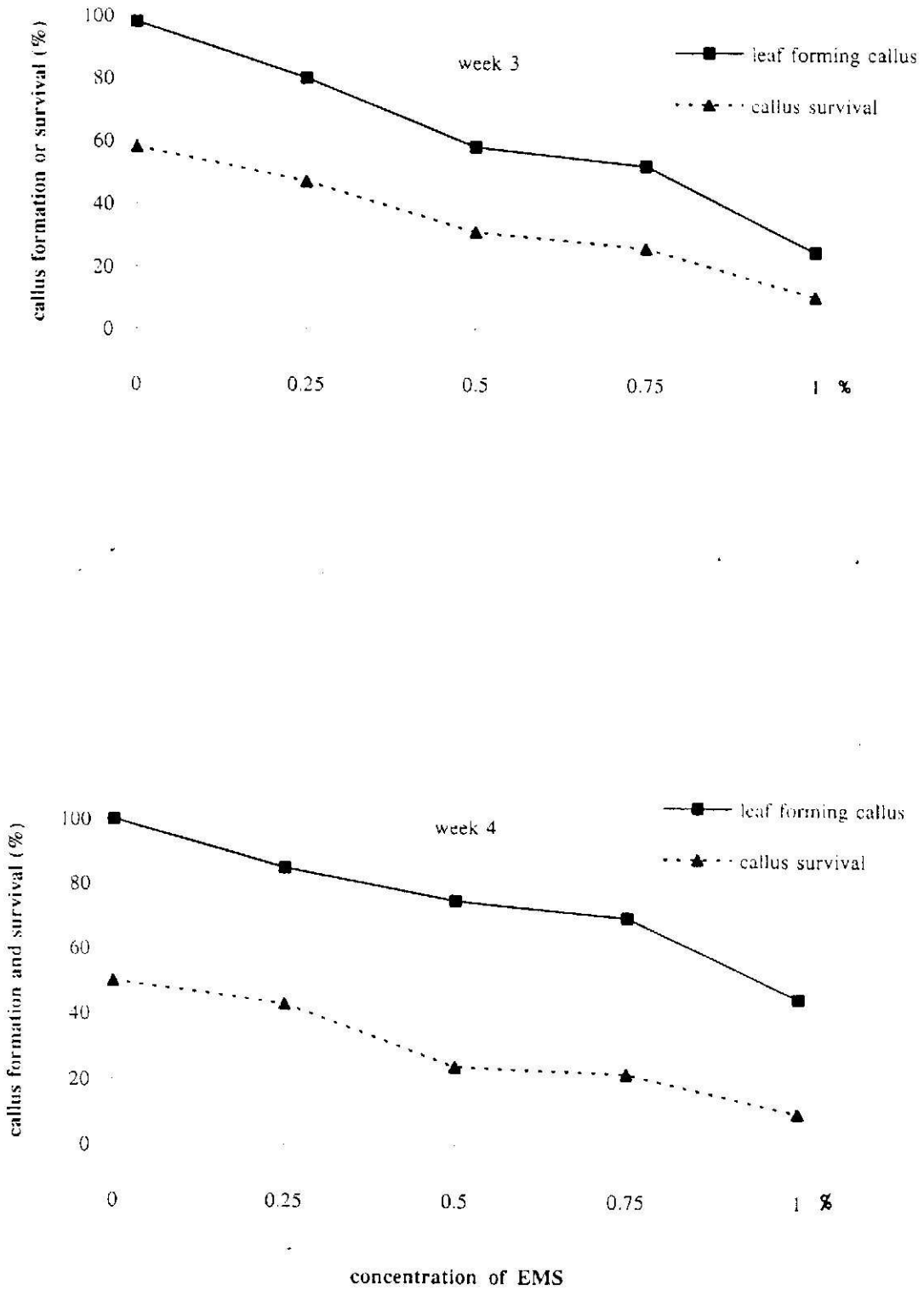


Fig. 1. Effect of EMS on callus formation and survival percentage.

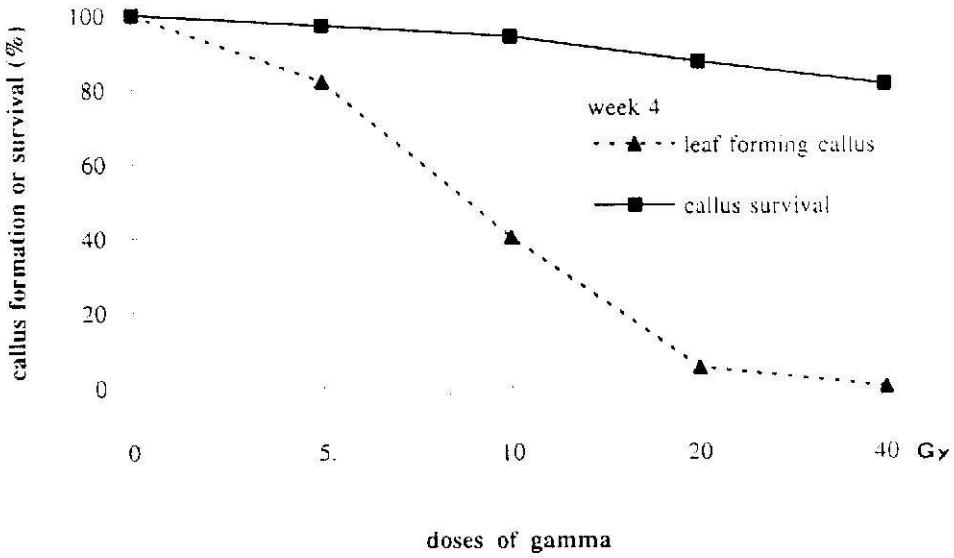
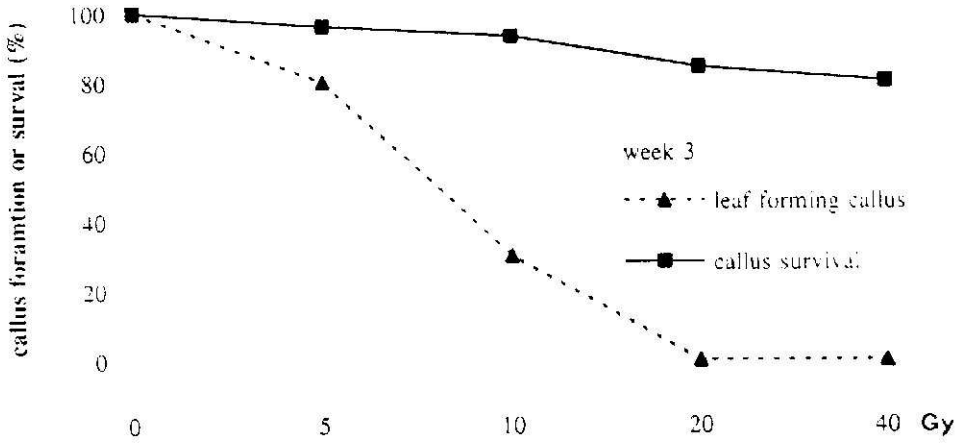


Fig. 2. Effect of gamma irradiation on callus formation or survival percentage.

การชักนำการกลายพันธุ์มั่งคุด: ผลของสิ่งก่อกลายพันธุ์ต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และเนื้อเยื่อวิทยา

Mutation Induction in Mangosteen: Effect of Mutagens on Biochemical and Histological Changes.

สมปอง เตชะโต และวิทยา พรหมมี

### บทคัดย่อ

นำแคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนสีม่วงแดงของมั่งคุดซึ่งดูแลในหลอดทดลองมาฉายรังสีแกมมา และจุ่มเชื้อสารเคมีก่อกลายพันธุ์เอทธิลมีเทนซัลโฟเนตความเข้มข้นต่างๆ นำแคลลัสที่ผ่านการให้สิ่งก่อกลายพันธุ์ทั้งสองมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา และชีวเคมี เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำการกลายพันธุ์ในมั่งคุด จากการศึกษาพบว่าแคลลัสที่ได้รับรังสีแกมมา 40 เกรย์ 2 ครั้ง มีจำนวนชั้นของเซลล์อีพิเดอมิสที่เกิดความเสียหายมากกว่าความเข้มข้นอื่นๆ ในขณะที่การใช้ EMS 0.50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 และ 60 นาที ส่งผลให้เกิดความเสียหายชั้นของเซลล์อีพิเดอมิสน้อยกว่า แต่เซลล์อีพิเดอมิสชั้นแรกเกิดความเสียหายรุนแรงมากกว่า สำหรับแคลลัสที่ได้รับทั้งการฉายรังสีแกมมา 40 เกรย์ 2 ครั้ง ร่วมกับการจุ่มเชื้อ EMS ความเข้มข้นและเวลาข้างต้น ส่งผลให้จำนวนชั้นของเซลล์อีพิเดอมิสที่เสียหายมากกว่าการให้รังสีแกมมา และ EMS เพียงอย่างเดียว ระบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ของใบจากต้นมั่งคุดชั่วที่ 1 และ แคลลัสที่พัฒนาจากใบของต้นชั่วที่ 1 ทุกระดับความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ ความแตกต่างของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสระหว่างสิ่งก่อกลายพันธุ์ทั้งสองที่ตรวจพบมีทั้งรูปแบบของไซโมแกรม และความเข้มของไซโมแกรมที่บ่งบอกถึงกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว EMS ความเข้มข้น 0.5-1.0% และรังสีแกมมา ความเข้ม 5-10 เกรย์ สามารถชักนำการกลายพันธุ์จากแคลลัสมั่งคุดได้

---

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่  
Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla  
University, Hat Yai, 90112, Thailand.

### Abstract

Nodular calli induced from young red leaves raising *in vitro* was brought to irradiation with various doses of gamma ray and soaking in ethylmethanesulfonate (EMS) at various concentrations. Treated-calli were subjected to examining cytologically and biochemically in order to determine an optimum dose of both the mutagens. The results showed that calli irradiated with gamma ray at 40 grays for 2 times caused damage to epidermal cells more than the other doses and 0.5% EMS. However, double irradiation subsequent to application of EMS at the above concentration and period caused the most severe damage to the cells. Peroxidase was the most effective isozyme system for identification of mutants obtained from first regenerants. Zymogram patterns of the enzyme extracted from both leaf and calli showed the difference in terms of both number and density between treated- and non-treated leaf or calli. It can conclude that 0.5-1% EMS or 5-10 gray gamma ray could induce mutation in mangosteen.

---

Key words: Mutation, mangosteen, biochemical change, histological change, mutagen

---

## บทนำ

มีรายงานการชักนำการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนสีม่วงแดงของ มังคุด (Te-chato *et al.*, 1995) และทราบขั้นตอนที่แน่นอนและใช้เป็นแบบในการขยายพันธุ์ มังคุดด้วยวิธีการไม่อาศัยเพศได้ตลอดทั้งปี (Te-chato and Lim, 1995) จากผลความสำเร็จดังกล่าวทำให้การใช้แคลลัสเป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการชักนำการกลายพันธุ์ในหลอดทดลองมีศักยภาพสูงมาก ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ไม้ผลเมืองหนาวมีรายงานการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์โดยมีวัตถุประสงค์ในการปรับปรุงพันธุ์ (Leblay *et al.*, 1992; Yang and Schmidt, 1994; Shen *et al.*, 1990) ในไม้ผลเมืองร้อนนั้นนิยมศึกษาในกลุ่มที่มีอายุสั้น เช่นกล้วย (Mak *et al.*, 1995; Novak *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1993) ทั้งนี้เพราะสามารถติดตามผลได้อย่างรวดเร็ว สำหรับมังคุดนั้นมีการศึกษาการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีเอทริลมีเทนซัลโฟเนต EMS และรังสีแกมมาฉายให้กับเมล็ดพันธุ์โดยคุณวิวิจัยพืชสวนจันทบุรี (2537) อย่างไรก็ตามการใช้เมล็ดพันธุ์มีข้อจำกัดมากเนื่องจากเป็นเมล็ดพันธุ์สด (recalcitrant seed) สูญเสียความงอกเร็ว และไม่สามารถลดความชื้นลงในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดผลเสียหายเมื่อฉายรังสีได้ นอกจากนี้เมล็ดยังประกอบไปด้วยเซลล์จำนวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน วิทยา พรหมมี และสมปอง เตชะโต (2540) รายงานความเข้มของสิ่งก่อกลายพันธุ์สองชนิดคือรังสีแกมมา และ EMS ที่เหมาะสมต่อการชักนำการกลายพันธุ์ในแคลลัส มังคุด ในการศึกษาเป็นการตรวจผลความสามารถของสิ่งก่อกลายพันธุ์ทั้งสองที่มีต่อการยับยั้งการสร้างแคลลัส และการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐาน และชีวเคมีบางประการของต้นที่ชักนำได้ สมปอง เตชะโต (2541) รายงานผลการฉายรังสีชนิดต่าง ๆ และ EMS กับใบอ่อนสีม่วงแดงของมังคุดว่ารังสีแกมมา 10 เกรย์ รังสีเอ็กซ์ 20 เกรย์ รังสีอัลตราไวโอเล็ต 20,000 จูล/ตร.ม./วินาที และ EMS เข้มข้น 0.5% ยับยั้งการสร้างแคลลัสจากใบได้ประมาณ 50% และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ จากการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนและแคลลัสมังคุด พบว่ากลุ่มของเนื้อเยื่อเจริญที่พัฒนาไปเป็นต้นใหม่มาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว หรือเซลล์เพียงจำนวนน้อยจากเซลล์ชั้นผิว (สมปอง เตชะโต และคณะ 2535) ดังนั้นการผสมผสานสิ่งก่อกลายพันธุ์ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วยส่งเสริมการปรับปรุงพันธุ์มังคุดให้มีประสิทธิภาพสูง ในรายงานฉบับนี้เป็นการศึกษาผลของรังสีทั้งสองประเภทต่อการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา และทางชีวเคมีซึ่งใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่เหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ในมังคุด

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

### การชักนำการกลายพันธุ์จากโนดูลาแคลลัส

นำโนดูลาแคลลัส ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัส เป็นเวลา 6 เดือน (ย้ายเลี้ยงเดือนละครั้ง) หลังจากย้ายเลี้ยง 30 วัน นำมาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ วางบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 60 รอบต่อนาที หลังจากจุ่มแช่โดยการเขย่า

เป็นระยะเวลาต่าง ๆ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัดสารละลาย EMS ส่วนเกินออก สำหรับการฉายรังสีแกมมา นำโนดูลาแคลลัสไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสในงานเพาะเลี้ยงพลาสติก (เส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร) เป็นเวลา 1 วัน นำไปฉายรังสีแกมมาซึ่งมีแหล่งกำเนิดจากโคบอลต์ 60 (โดยได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์) หลังจากได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์แล้ว วางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดและเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ อุณหภูมิ  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  ให้แสง 14 ชั่วโมง

### การศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา

นำ  $C_1$ ,  $C_1$  ที่ได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์ ( $M_1C_1$ ) และ แคลลัสที่ได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์ครั้งที่สองไปแช่ในฟิกเซทิฟซึ่งประกอบด้วยฟอร์มาลิน 1 ส่วน กรดอะซิติก 1 ส่วน และ แอลกอฮอล์ 18 ส่วน นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้โปรโตพลาสซึมภายในเซลล์หยุดกระบวนการต่าง ๆ นำชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการฟิกซ์ มาผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยกระบวนการดีไฮเดรชัน ตามวิธีการของ Johansen (1940) จากนั้นฝังชิ้นส่วนพืชลงในพาราฟิน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 14-16 องศาเซลเซียส นำแท่งพาราฟินที่แข็งแล้วมาตัดด้วยเครื่องไมโครทอมให้มีขนาด 7 ไมโครเมตร วางบนแผ่นสไลด์ นำแผ่นสไลด์มาย้อมด้วยสีย้อม 2 ชนิด คือ แซฟรานิน และฟาสท์กรีน จากนั้นใช้ตัวกลางยึดกระจกปิดสไลด์ด้วยคานาดาบาลซัม แล้วปิดเนื้อเยื่อพืชภายหลังการย้อมสีด้วยกระจกปิดสไลด์ วางทิ้งไว้ 2-3 วัน เพื่อให้แห้ง แล้วจึงนำมาเซ็ดทำความสะอาดด้วยโซลิน หรือ โคลบออยด์นำไปศึกษารายละเอียดและบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดอินเวอร์เตด

### การตรวจสอบเอนไซม์

นำใบจากต้นชุดเปรียบเทียบ ( $R_1$ ) แคลลัสที่ชักนำจาก  $R_1$  ( $C_1$ ) ใบจากต้นซึ่งพัฒนาจากแคลลัสที่ได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์ ( $M_1R_1$ ) แคลลัสที่ชักนำจาก  $M_1R_1$  ( $M_1R_1C_1$ ) น้ำหนัก 0.5 กรัม บดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร ในโกร่งแช่เย็น บัฟเฟอร์ที่ใช้ประกอบด้วย tris-hydroxymethyl aminomethane (Tris-HCl) เข้มข้นต่าง ๆ pH 7.5, PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ disodium ethylenediaminetetraacetate ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และ 2-mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) เติสารละลายที่ได้ใส่หลอด Eppendorf นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนโดยเครื่องไมโครเซ็นตริฟิวก์ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที ตูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด Eppendorf ใหม่ที่สะอาด (ในกรณีที่ยังไม่ใช้ทันที เติเมกนีเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในสารละลายเอนไซม์ เก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-10$  องศาเซลเซียส) ตูดสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ 15 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นเจลอะคริลาไมด์ ซึ่งประกอบด้วย ความเข้มข้นเจลตอนบน 3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเจลตอนล่างใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการแยกเอนไซม์ภายใต้แรงเคลื่อน



กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ ภายใต้ อุณหภูมิ  $5 \pm 1$  องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Laemmli (1970) นำเจลที่ได้มาย้อมสีระบบต่าง ๆ เพื่อศึกษารูปแบบเอนไซม์

ผลของ EMS และ รังสีแกมมา ต่อรูปแบบของไอโซไซม์

ระบบเอนไซม์ที่ใช้ศึกษา

สกัดเอนไซม์จาก  $M_1R_1$  และ  $M_1R_1C_1$  ซึ่งผ่านการฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ ด้วย บัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl 0.75 โมลาร์ pH 7.5, PVP,  $Na_2EDTA$  และ 2-mercaptoethanol ตรวจสอบแถบเอนไซม์บนเจลอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แยกภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Laemmli (1970) ย้อมด้วยสีย้อมเอนไซม์ 5 ระบบ คือ PER, EST, ADH, MDG และ PGI ในที่มีจุดจนเจลดัดสีชัดเจน จากนั้นตรึงเอนไซม์ในสารละลายตรึงเอนไซม์ ล้างสีส่วนเกินออก และเก็บในสารละลายเก็บเจล หรือบันทึกภาพไซโมแกรมของเอนไซม์แต่ละระบบที่ปรากฏ เปรียบเทียบกันระหว่างความเข้มของรังสีแกมมา

ผลของ EMS ต่อรูปแบบไอโซไซม์

สกัดเอนไซม์จาก  $M_1R_1$  และ  $M_1R_1C_1$  ซึ่งผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มต่าง ๆ ด้วย บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดจากวิธีการวิจัยที่ 4.2 ตรวจสอบแถบเอนไซม์บนเจลอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แยกภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตามวิธีการในหัวข้อที่ 3 ย้อมด้วยสีย้อมเอนไซม์ เปอร์ออกซิเดสในที่มีจุดจนเจลดัดสีชัดเจน จากนั้นตรึงเอนไซม์ในสารละลายตรึงเอนไซม์ ล้างสีส่วนเกินออก และเก็บในสารละลายเก็บเจล หรือบันทึกภาพไซโมแกรมของเอนไซม์ที่ปรากฏ เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มของ EMS และชุดควบคุมซึ่งไม่ได้รับการจุ่มแช่ EMS

### ผลและวิจารณ์

ผลของ EMS และ รังสีแกมมาต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อของแคลลัสปกติที่ไม่ได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์ พบว่าเซลล์มีรูปร่างคล้ายคลึงและเรียงตัวชิดกัน ภายในเซลล์ประกอบด้วยนิวเคลียสย้อมติดสีฟาสท์กรีนเข้มอยู่ตรงกลางเซลล์ ไซโทพลาสซึมหนาแน่นติดสีฟาสท์กรีนเข้มข้น โดยเฉพาะบริเวณเซลล์ในชั้นอีพิเดอมิส และเซลล์ในชั้นซัพอีพิเดอมิส และเซลล์ตรงบริเวณดังกล่าวมีกิจกรรมการแบ่งตัวสูงมาก จัดเป็นเซลล์เมอริสเต็มเริ่มต้นที่จะพัฒนาต่อไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด (Fig 1a) สำหรับ  $M_1C_1$  ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาความเข้ม 5, 10, 20 และ 40 มีลักษณะเป็นสีต่ำบริเวณเซลล์ชั้นอีพิเดอมิส ไม่พบองค์ประกอบของไซโทพลาสซึมภายในเซลล์ ไซโทพลาสซึมไม่ติดสีฟาสท์กรีน ส่วนเซลล์ที่ไม่เสียหายเนื่องจากรังสีเซลล์มีขนาดใหญ่กว่าชุดเปรียบเทียบ ภายในเซลล์มีไซโทพลาสซึมหนาแน่นน้อยกว่าและย้อมติดสีฟาสท์กรีนเข้มข้นน้อยกว่า  $C_1$  (Fig. 1b) เมื่อนำแคลลัสที่ชักนำจากใบของต้น  $M1R1$  ซึ่งได้รับการฉายรังสีแกมมา 40 เกรย์ วางเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำ

แคลลัสระยะหนึ่ง (2-3 สัปดาห์) มาฉายรังสีแกมมา 40 เกรย์ ซ้ำอีกครั้งแล้วนำมาศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าจำนวนชั้นของเซลล์อีพิเดอมิสเสียหายเนื่องจากได้รับรังสีรุนแรงมากกว่าการฉายรังสีเพียงครั้งเดียวทุกระดับความเข้ม สืบเนื่องจากจำนวนชั้นของเซลล์อีพิเดอมิสที่ย้อมติดสีแซฟรานิน ซึ่งมีถึง 6 ชั้น นิวเคลียสติดสีเข้มชั้นน้อย ความหนาแน่นของไซโทพลาสซึมต่ำ และติดสีเข้มชั้นน้อยกว่าชุดเปรียบเทียบ และ  $M_1C_1$  ที่ได้รับการฉายรังสีทุกระดับความเข้ม นอกจากนั้นเซลล์บางเซลล์มีผนังเซลล์ฉีกขาดและเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น (Fig. 1c) อย่างไรก็ตามเซลล์ที่รอดชีวิตมีการแบ่งเซลล์และพัฒนาไปเป็นยอดได้เช่นเดียวกับชุดเปรียบเทียบ เมื่อนำแคลลัสที่ผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS มาจุ่มแช่ EMS อีกครั้งที่ความเข้มข้น 0.50% นาน 30 นาที และ 60 นาที และนำมาศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าจำนวนชั้นของเซลล์อีพิเดอมิสเกิดความเสียหายเนื่องจากได้รับ EMS น้อยกว่าการได้รับรังสีสองครั้ง (Fig. 1d) สืบเนื่องจากจำนวนชั้นของเซลล์อีพิเดอมิสที่ย้อมติดสีแซฟรานินน้อยกว่าหน่วยทดลองที่ได้รับรังสี คือประมาณ 2 ชั้น แต่บริเวณเซลล์อีพิเดอมิสชั้นแรกของหน่วยทดลองที่ได้รับ EMS มีความเสียหายรุนแรงมากกว่า โดยเซลล์บริเวณดังกล่าวตายมีลักษณะสีดำ ไซโทพลาสซึมและนิวเคลียสถูกทำลาย ทำให้ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้จึงทำให้การรอดชีวิตของแคลลัสหลังจากได้รับ EMS น้อยกว่าการใช้รังสีเป็นไปทำนองเดียวกับการศึกษาผลของ EMS และรังสีแกมมาต่ออัตราการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัส (วิทยา พรหมมี และสมปอง เตชะโต, 2540) อย่างไรก็ตามการให้สิ่งก่อกลายพันธุ์ที่แตกต่างกันซ้ำ 2 ครั้งคือฉายรังสีแกมมา 40 เกรย์ แล้วจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50% นาน 60 นาที ก่อให้เกิดความเสียหายของเซลล์ชั้นอีพิเดอมิสมีรุนแรงมากที่สุด (Fig 1e)

## ผลของ EMS และ รังสีแกมมาต่อรูปแบบของเอนไซม์

### ผลของรังสีต่อรูปแบบของเอนไซม์

จากการศึกษาเอนไซม์ 5 ระบบ ที่สกัดจากใบของ  $M_1R_1$  และ แคลลัส  $M_1R_1C_1$  จากหน่วยทดลองที่ได้รับรังสีแกมมา 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ พบว่า ทุกความเข้มรังสีให้รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ชัดเจนที่สุด เอนไซม์เอสเตอเรสให้ผลไม่ชัดเจนและแถบติดกันเป็นปื้นยาว ส่วนเอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนส สามารถจำแนกความแตกต่างได้แต่ไม่ชัดเจน สำหรับเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส สามารถจำแนกความแตกต่างเฉพาะ  $M_1R_1C_1$  ได้แต่ไม่ชัดเจนในขณะที่การใช้เอนไซม์ดังกล่าวในการตรวจสอบ  $M_1R_1$  ย้อมไม่ติดสี ทุกความเข้มรังสี (Table 1, Fig 2)

เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบไอโซไซม์ ของต้น  $M_1R_1$  และ  $M_1R_1C_1$  สามารถแยกรูปแบบของ ไอโซไซม์ได้ดัง Fig 2

### เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

รูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบ  $M_1R_1$  มีการเคลื่อนที่ของไซโมแกรมเพียงโซนเดียว (PER1) เมื่อพิจารณาไซโมแกรมภายใน โซน ทุกความเข้มรังสีให้รูปแบบไซโมแกรม 3

แถบ เมื่อพิจารณาความเข้มของแถบเอนไซม์ พบว่าต้นที่ได้รับรังสี 10 และ 20 เกรย์ มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าโดยสังเกตจากความเข้มของไซโมแกรมที่ปรากฏ

รูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากแคลลัส  $M_1R_1C_1$  มีการเคลื่อนที่ของไซโมแกรม 2 โซน (PER1 และ PER2) เมื่อพิจารณาไซโมแกรมของ PER1 พบว่าแยกได้ 2 แถบ ทุกความเข้มรังสี แต่ชุดเปรียบเทียบ และ 10 เกรย์ ติดสีไม่ชัดเจน ส่วนความเข้มรังสี 5, 20 และ 40 เกรย์ ให้แถบสีคมชัด เมื่อพิจารณาไซโมแกรมใน PER2 พบว่า รังสีความเข้ม 5 เกรย์ แยกได้ 3 แถบ ในขณะที่ชุดเปรียบเทียบ ความเข้มรังสี 10, 20 และ 40 เกรย์ แยกได้ 2 แถบ (Fig. 2a) รังสี 5 เกรย์ ให้แถบของ PER2 มากกว่า 1 แถบ (ศรชี้)

#### เอสเตอเรส

รูปแบบของเอนไซม์เอสเตอเรสจากใบ  $M_1R_1$  สามารถแยกไซโมแกรมได้ 2 โซน เมื่อพิจารณาภายใน EST1 พบว่าแถบแรกทุกความเข้มรังสีเป็นป็นยาว เมื่อพิจารณา EST2 ชุดเปรียบเทียบ และความเข้มรังสี 5 เกรย์ สามารถแยกได้ 2 แถบ ชัดเจน ส่วน 10, 20 และ 40 เกรย์ แยกได้แถบเดียว (Fig. 2b arrow)

รูปแบบของเอนไซม์เอสเตอเรสจากแคลลัส  $M_1R_1C_1$  สามารถแยกไซโมแกรมได้ 3 โซน เมื่อพิจารณาภายใน EST1 และ EST2 พบว่าชุดเปรียบเทียบ ความเข้มรังสี 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ มีแถบเดียวและแถบติดกันเป็นป็นยาวไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ส่วนใน EST3 ทุกความเข้มรังสีไม่มีความแตกต่างกันและแถบติดสีจางลง (Fig. 2b)

#### มาเลทดีไฮโดรจีเนส

รูปแบบของเอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนสจากใบ  $M_1R_1$  สามารถแยกไซโมแกรมได้เพียง 1 โซนเดียว เมื่อพิจารณาไซโมแกรมพบว่าติดสีจางเป็นป็นยาว ไม่สามารถแบ่งเป็นแถบได้ชัดเจนระหว่างชุดเปรียบเทียบและทุกความเข้มรังสี (Fig. 2c)

รูปแบบของเอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนสจากแคลลัส  $M_1R_1C_1$  สามารถแยกไซโมแกรมได้ 2 โซน (MDH1 และ MDH2) เมื่อพิจารณาไซโมแกรม พบว่าทุกความเข้มรังสีติดสีจางเป็นป็นยาว ทั้ง 2 โซน โดย MDH1 มีความยาวของแถบมากกว่า MDH2 อย่างไรก็ตามไม่สามารถแยกความแตกต่างของแถบได้ชัดเจน (Fig. 2c)

#### แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

ระบบของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากใบ  $M_1R_1$  ย้อมเจลไม่ติดสีทุกความเข้มรังสี (Fig. 2d)

รูปแบบของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากแคลลัส  $M_1R_1C_1$  สามารถแยกไซโมแกรมได้เพียง 1 โซนเดียว เมื่อพิจารณาไซโมแกรมพบว่า ชุดเปรียบเทียบ ความเข้มรังสี 5, 10 และ 40 เกรย์ แยกได้ 2 แถบโดยแถบที่ 2 ย้อมติดสีชัดกว่าแถบแรก ส่วน 20 เกรย์ แยกได้เพียงแถบเดียว และติดสีจาง (Fig. 2d arrow)

## ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส

ระบบเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรสจากใบ  $M_1R_1$  ย้อมเจลไม่ติดสีทุกความเข้มข้นสี  
ในกรณีของเอนไซม์จากแคลลัส  $M_1R_1C_1$  ย้อมเจลติดสี แต่จางมากไม่สามารถแยกรูปแบบของ  
ไซโมแกรมได้ทุกความเข้มข้นสี

### ผลของ EMS ต่อรูปแบบของไอโซไซม์

จากการศึกษารูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของ  $M_1R_1$  และ  $M_1R_1C_1$  จากหน่วยทดลอง  
ที่ผ่านการจุ่มแช่ สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า มีความแตกต่างจากชุดเปรียบเทียบ  
โดยไซโมแกรมที่แยกได้ เป็น 2 โซน สามารถพิจารณาแถบเอนไซม์แต่ละ โซน ได้ดังนี้

รูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของต้น  $M_1R_1$  เมื่อพิจารณาไซโมแกรมใน PER1 พบ  
ว่าชุดเปรียบเทียบและต้นที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งได้รับ EMS ความเข้มข้น 1.00% ให้ไซโมแกรม  
4 แถบ ส่วนความเข้มข้น 0.25 และ 0.50% ให้ไซโมแกรม 3 แถบ (Fig. 3 arrow) แต่ต้นที่  
พัฒนาจากแคลลัสซึ่งได้รับ EMS ทุกความเข้มข้น มีกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวสูงกว่า ชุด  
เปรียบเทียบ โดยสังเกตจากความเข้มของไซโมแกรมที่ปรากฏ (Fig. 3) เมื่อพิจารณาไซโม แกรม  
ใน PER2 พบว่าชุดเปรียบเทียบ และต้นที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งได้รับการจุ่มแช่สารละลาย EMS  
ทุกความเข้มข้นให้ไซโมแกรม 2 แถบ แต่ละแถบติดกันเป็นปื้น แต่ต้นที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งได้  
รับ EMS ทุกความเข้มข้นมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า โดยสังเกตจากความเข้มของไซโมแกรมที่  
ปรากฏ (Fig. 3)

เมื่อพิจารณารูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของ  $M_1R_1C_1$  ใน PER1 พบว่าชุดเปรียบเทียบ  
และต้นที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งได้รับ EMS ทุกความเข้มข้นให้ไซโมแกรม 2 แถบ แต่ความ  
เข้มข้น 0.50% มีกิจกรรมของเอนไซม์ในแถบที่ 2 ต่ำกว่าชุดเปรียบเทียบ และ EMS ความเข้มข้น  
อื่น ๆ (Fig. 3 arrow) เมื่อพิจารณาไซโมแกรมใน PER2 พบว่าชุดเปรียบเทียบ และต้นที่พัฒนา  
จากแคลลัสซึ่งได้รับ EMS ทุกความเข้มข้น ให้ ไซโมแกรม 4 แถบ โดยแถบที่ 1 ติดกันเป็นปื้น  
และแถบที่ 2 และ แถบที่ 3 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าแถบที่ 4 (Fig. 3)

Table 1 Effect of gamma irradiation on isozyme systems from leaf of M1R1 and callus M1R1C1.

treatments-grays	isozyme systems				
	PER	EST	MDH	ADH	PGI
R <sub>1</sub>	+A	+B	+	-	-
M <sub>1</sub> R <sub>1</sub> -5	+A	+B	+	-	-
M <sub>1</sub> R <sub>1</sub> -10	+A	+B	+	-	-
M <sub>1</sub> R <sub>1</sub> -20	+A	+B	+	-	-
M <sub>1</sub> R <sub>1</sub> -40	+A	+B	+	-	-
C <sub>1</sub>	+A	+B	+	+	+
M <sub>1</sub> R <sub>1</sub> C <sub>1</sub> -5	+A	+B	+	+	+
M <sub>1</sub> R <sub>1</sub> C <sub>1</sub> -10	+A	+B	+	+	+
M <sub>1</sub> R <sub>1</sub> C <sub>1</sub> -20	+A	+B	+	+	+
M <sub>1</sub> R <sub>1</sub> C <sub>1</sub> -40	+A	+B	+	+	+

PER :peroxidase      + :present      M<sub>1</sub>R<sub>1</sub> :first regeneration of mutant  
 EST :esterase      - :not present      M<sub>1</sub>R<sub>1</sub>C<sub>1</sub> :callus induced from leaf of M1R1  
 MDH :malatedehydrogenase      A :clearR<sub>1</sub> :control leaf  
 ADH :alcoholdehydrogenase      B :not clear      C<sub>1</sub> :control callus  
 PGI :phosphoglucoisomerase

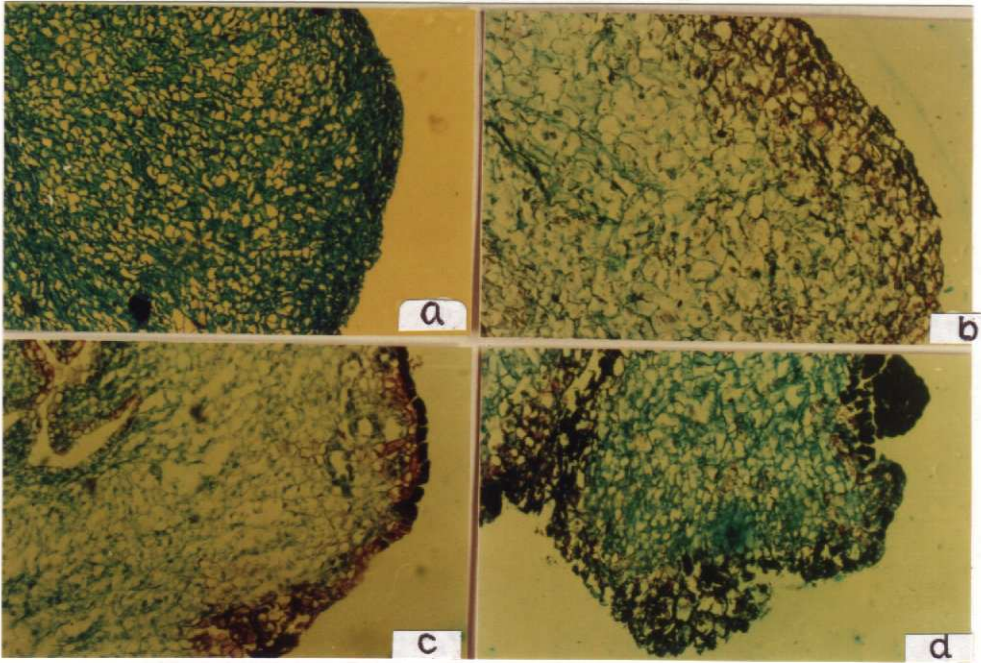


Fig. 1. Histology of callus treated with the two different sources of mutagens.

**a:** non-treated callus

**b:** double irradiation (40 gy  $\gamma$ -ray)

**c:** double treatment (0.5% EMS)

**d:** irradiation (40 gy  $\gamma$ -ray) followed by 0.5% EMS treatment

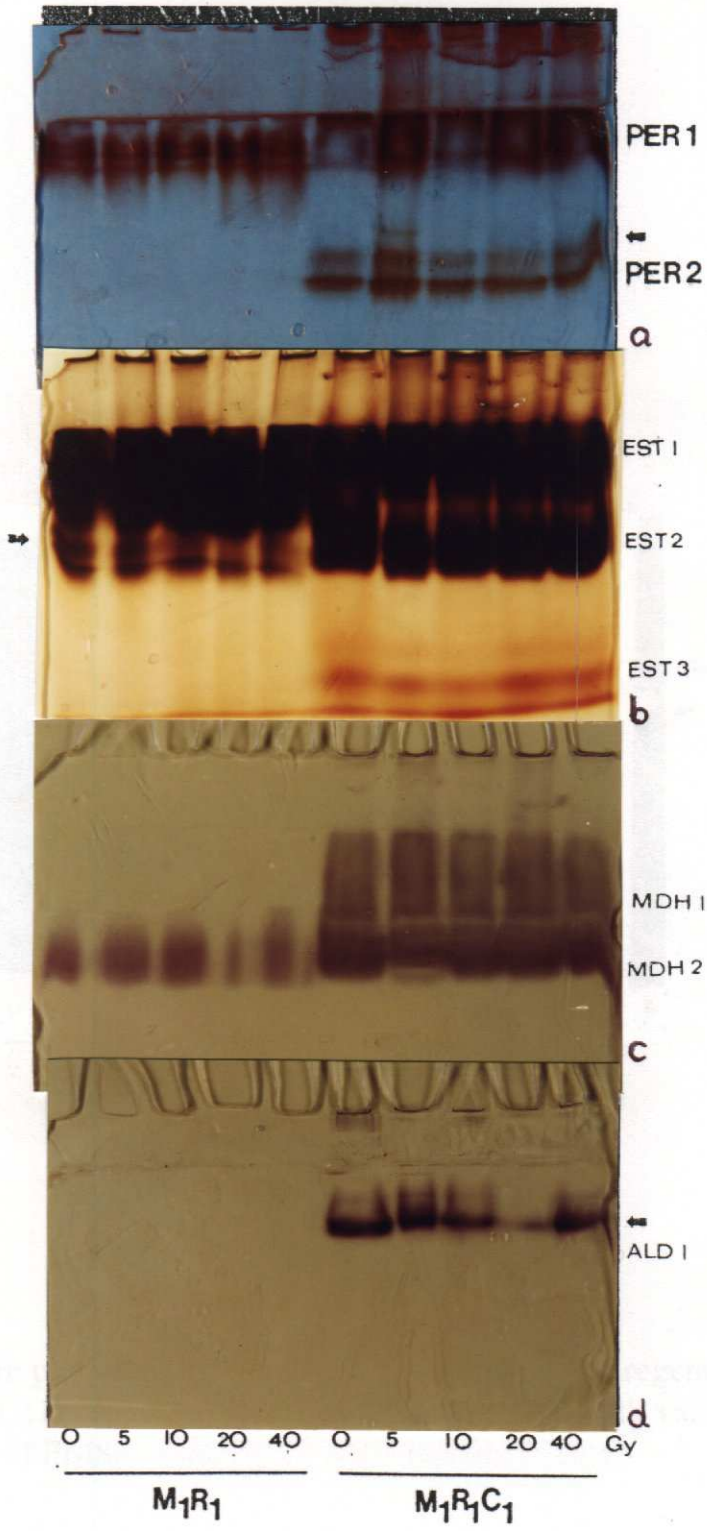


Fig 2. Isozyme patterns of first regenerate-mutant leaf ( $M_1R_1$ ) and callus ( $M_1R_1C_1$ ) after exposing to various doses of gamma ray. (a: peroxidase, b: esterase, c: malate dehydrogenase and d: alcoholdehydrogenase)

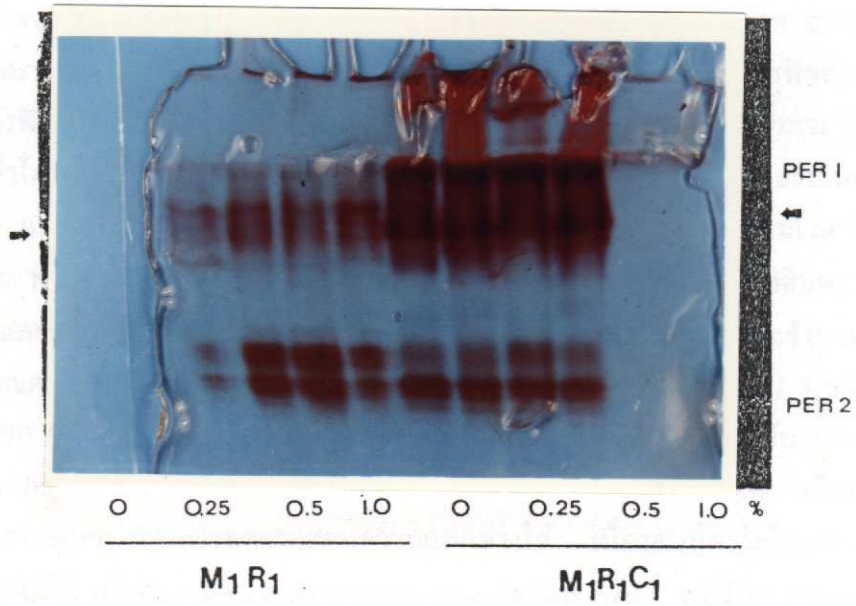


Fig. 3. Zymogram patterns of peroxidase obtained from first regenerate-mutant leaf (M<sub>1</sub>R<sub>1</sub>) and callus (M<sub>1</sub>R<sub>1</sub>C<sub>1</sub>) after treating with various concentrations of EMS.



การชักนำ การกลายพันธุ์ มังคุดโดยใช้ โคลชิซิน กับ ใบช่ ตายอดที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง  
**Induction Mutation of Mangosteen by Colchicin Treatment with Shoot  
 Bud Cultured *In Vitro***

สมปอง เตชะโต<sup>1</sup> และ ราตรี สุจรรย์<sup>2</sup>

บทคัดย่อ

ทำการทรีตตายอดของมังคุดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0-10,000 มก/ล เป็นเวลา 2 ชั่วโมงถึง 30 วัน เพื่อชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมในอันที่จะปรับปรุงพันธุ์มังคุด จากการศึกษาพบว่าจำนวนยอดเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ขนาดยอด จำนวนราก จำนวนใบ และพื้นที่ใบมีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์พบว่า มีปริมาณคลอโรฟิลล์ a เพิ่มขึ้นแตกต่างทางสถิติกับหน่วยการทดลองอื่นๆ เมื่อเพิ่มเวลาในการทรีตเป็น 10 ชั่วโมง และเพิ่มความเข้มข้นเป็น 3,000-10,000 มก/ล พบว่าเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดลดลง แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์ a และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มเวลาในการทรีตเป็น 30 วัน พบว่าจำนวนยอดเฉลี่ย และการรอดชีวิตของตายอดลดลง โคลชิซินความเข้มข้น 500 750 และ 1,000 มก/ล ที่เวลาข้างต้น ส่งผลให้ความยาวรากเพิ่มขึ้น และจำนวนใบลดลง ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซินเป็น 3,000 6,000 และ 10,000 มก/ล ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงโดยเฉพาะความเข้มข้น 10,000 มก/ล มียอดรอดชีวิตเพียง 12 เปอร์เซ็นต์ ใบร่วง และชะงัก การเจริญเติบโต เมื่อตรวจสอบเซลล์ปลายรากพบว่าไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างได้ เนื่องจากโครโมโซมมีขนาดเล็ก นับจำนวนไม่ได้ เมื่อตรวจสอบจำนวนและขนาดของเซลล์ปากใบ พบว่าการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเข้มข้น 750 และ 1,000 มก/ล เป็นเวลา 30 วัน มีเซลล์ปากใบบางเซลล์ใหญ่กว่า และมีสีเข้มกว่าปกติ สำหรับการตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้เอนไซม์ 4 ระบบ พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และเอสเทอเรสสามารถบอกความแตกต่างได้ แม้ว่าแถบสีที่ปรากฏไม่ชัดเจนนัก

<sup>1</sup>M. Agr. (Crop Biotechnology), รองศาสตราจารย์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่, <sup>2</sup>วท.ม. (พืชศาสตร์) นักวิชาการเกษตร บริษัทกรุงเทพเมล็ดพันธุ์จำกัด

## Abstract

A cluster of mangosteen buds was treated with various concentrations of colchicine ranging from 0 to 10,000 mg/l for 2 hours to 30 days in order to induce ploidy level for varietal improvement. The result revealed that concentration of 1,500 mg/l for 2 hours provides a non-significant difference in mean survival of shoots but proved significant in the size of shoot, a number of roots, leaves and leave areas. In addition, application of 500 mg/l colchicine induced chlorophyll a content, significantly higher than other concentrations produced. Increasing dilution treatment duration to 10 hours and concentration to 3,000 to 10,000 mg/l reduced the percentage bud forming shoot whereas chlorophyll a and total chlorophyll content increased. 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. A number root tip chromosomes 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 and color of guard cells. A study on 4 systems of isozyme revealed that peroxidase and esterase can preliminarily distinguish the difference between treated and non-treated plantlets.

---

<sup>1</sup>M.Agr. (Crop Biotechnology), Associate Professor, Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, 90112, Thailand. <sup>2</sup>M.S. (Plant Science), Researcher at Bangkok Seed Company.

## บทนำ

มังคุดเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ทำรายได้ปีละ 40-50 ล้านบาท เทคโนโลยีการผลิต และการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มคุณภาพ และปริมาณการผลิตยังไม่ได้รับการพัฒนาเท่าที่ควร เนื่องจากเป็นพืชที่มียาง ไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ทำให้การขยายพันธุ์จำนวนมากเป็นการค้า และการปรับปรุงพันธุ์มีข้อจำกัด การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาสามารถช่วยแก้ปัญหาทั้งสองที่กล่าวแล้วข้างต้นได้ผลสำเร็จสูง ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ เช่น เมล็ด (สมปอง เตชะโต แลวันทนา เอียงยอง, 2531) ใบอ่อน สีแดง (สมปอง เตชะโต และคณะ, 2535) และแคลลัส (Te-chato and Lim, 1996) เพื่อเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์เป็นการค้า การผสมผสานการเพาะเลี้ยงข้างต้นด้วยสิ่งก่อกลายพันธุ์ ก็มีรายงานว่า มีศักยภาพสูงในการปรับปรุงพันธุ์มังคุด (วิทยา พรหมมี และ สมปอง เตชะโต, 2540) ซึ่งไม่ประสบผลสำเร็จด้วยวิธีการมาตรฐาน

โคลชิซิน (S)-N-(5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzo-7-yl) acetamide เป็นสารอัลคาลอยด์ที่มีผลในการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยการยับยั้งการสร้างสายสปินเดิล (Borisy and Taylor, 1967) มีรายงานการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้สารโคลชิซินเป็นจำนวนมากทั้งในพืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ และไม้ผล พันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงส่วนมากเห็นเป็นลักษณะพลอยดี หรือการเพิ่มชุดโครโมโซมจากเซลล์ร่างกายที่มีโครโมโซมเดิมเป็นสองชุด เช่นการเพิ่มชุดโครโมโซมในกุหลาบเพื่อการต้านทานต่อโคโคใบจุดสีดำ (Ma *et al.*, 1997) หอมหัวใหญ่ (Mar and Polumordvinova, 1989) แอปเปิ้ล (Stanys, 1995) กล้วย (Hamill *et al.*, 1992) การเพิ่มชุดโครโมโซมจากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช เช่น ไซออนของเยอบีรา (Honkanen *et al.*, 1990; Miyoshi and Asakura, 1996) ละอองเกสรของกะหล่ำปลี (Dore and Bouldard, 1988) ละอองเกสรของแตงโม (Sali and Abak, 1996) และมีการใช้สารตัวนี้ช่วยชีวิตลูกผสม หรือสร้างลูกผสมระหว่างพันธุ์ของแตงกวา (Chen and Staub, 1997) กิวีฟรุต (*Actinidia*) (Harvey *et al.*, 1995) ไซคลาเมน (Ishizaka and Uematsu, 1994) นอกจากนี้ยังใช้กับการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อสร้างความแปรปรวนของโครโมโซมในหญ้าหวาน (Handro *et al.*, 1993) ส้ม (Gmitter *et al.*, 1991) ผลของโคลชิซินที่แสดงออกมาในรูปของลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญเช่น คลอโรฟิลล์ และ คลอโรพลาสต์ในใบเพิ่มขึ้น และใบมีสีเขียวเข้มขึ้น (Behera *et al.*, 1974) ความสูงของต้น ความกว้าง ความยาวของใบ ขนาดของเซลล์ปากใบ จำนวน และความยาวราก ตลอดจนขนาดของดอก และผลเปลี่ยนแปลงไปในลักษณะที่เพิ่มขึ้นโดยส่วนใหญ่ นอกจากการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทั้งสองที่สามารถตรวจสอบได้โดยการตรวจสอบจำนวนโครโมโซมและลักษณะทางสัณฐานแล้ว ยังสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ไซโฟไลโซโตเมทรี หรือความแปรปรวนของโปรตีน หรือเอนไซม์ (Chomatova *et al.*, 1990) ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ใช้แตกต่างกันออกไป โดยส่วนใหญ่มักเป็นปลายยอดซึ่งมีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้สูงมากกว่าส่วนอื่นๆ อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนอื่นๆ ที่มีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้สูงเช่นราก ใบ ลำต้น ก็ให้ผลสำเร็จสูงเช่นกัน ปัจจุบันมีรายงานการใช้เซลล์เดี่ยวๆ (โปรโตพลาสต์) เลี้ยงร่วมกับโคลชิซินเพื่อชักนำพลอยดี (Tamura *et al.*, 1996) การใช้โปรโตพ

ลาสต์มีข้อได้เปรียบในลักษณะของการเปลี่ยนแปลงที่สมบูรณ์ ไม่มีอาการต่างหรือเปลี่ยนแปลงเพียงบางส่วน แต่การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้เป็นพืชต้นใหม่นั้นยังคงยากในพืชหลายชนิด ใบที่มีการพัฒนาให้พืชต้นใหม่สูงทั้งโดยตรง และผ่านการสร้างแคลลัสก็เป็นวัสดุเริ่มต้นที่ดีและนิยมใช้กันมาก ในการศึกษาเป็นการตรวจสอบขั้นต้นถึงความเข้มข้นโคลชิซินที่ใช้เลี้ยงร่วมกับกลุ่มยอดรวมขนาดเล็กของมั่งคุดที่ชักนำจากใบต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ การเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ตลอดจนลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้นที่ชักนำได้

## วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

### วัสดุพืช

เก็บรวบรวมใบอ่อนสีแดงของมังคุดจากต้นในแปลงปลูกมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 25 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้ววางเรียงบนอาหารสูตรชักนำยอดโดยวางให้ด้านหลังของใบสัมผัสกับอาหาร หลังจากมีการพัฒนาของพืชต้นใหม่ในหลอดทดลองจึงชักนำโนดูลาแคลลัส โดยใช้ใบจากต้นมังคุดขนาดเล็กในหลอดทดลองมาวางเรียงบนอาหารสูตรชักนำโนดูลาแคลลัสและย้ายเรียงในอาหารใหม่สูตรเดิมเพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสหรือย้ายเรียงในอาหารสูตรชักนำยอด หลังจากวางเรียงชักนำยอดเป็นเวลา 1 เดือน เติมน้ำอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติมน้ำ NAA 0.06 มก/ล และ BA 0.03 มก/ล แล้ววางเรียงต่ออีก 1 เดือน เพื่อชักนำการยึดยาวของยอด และเพิ่มปริมาณยอด สำหรับใช้ในการทรีตด้วยโคลชิซินต่อไป

### อาหารสังเคราะห์และวิธีการเตรียม

สำหรับสูตรอาหารเริ่มแรกเป็นอาหารชักนำยอดโดยตรงจากการเพาะเลี้ยงใบมังคุด ใช้อาหารสูตร WPM เติมน้ำ BA ความเข้มข้น 5 มก/ล ส่วนสูตรอาหารชักนำโนดูลาแคลลัส และชักนำการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงใบมังคุดในแต่ละขั้นตอนนั้นใช้สูตรอาหารที่รายงานโดย Te-chato และ Lim (1995) อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 5.8 ก่อนหนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที

### สภาพแวดล้อมในการเลี้ยง

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

### การทรีตโคลชิซิน

เตรียมโคลชิซินในรูปสารละลายความเข้มข้น 30,000 มก/ล กรองฆ่าเชื้อด้วยกระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาด 0.45 ไมครอน ปรับความเข้มข้นที่ต้องการใช้ด้วยอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติมน้ำ BA 0.03 มก/ล NAA 0.06 มก/ล และ PVP 500 มิลลิกรัม ตอลิตร เมื่อต้องการทรีตตายอดและแคลลัสมังคุดเป็นเวลา 0-10 ชั่วโมง ใช้วิธีเลี้ยงชิ้นส่วนดังกล่าวในอาหาร

เหลวที่มีองค์ประกอบของโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ ส่วนการทรีตเป็นเวลา 10 วัน หรือ 1 เดือน ใช้วิธีเลี้ยงบนอาหารแข็งแล้วจึงเติมอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบของโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปบนอาหารแข็งซึ่งเลี้ยงตายอดอยู่ ในกรณีการทรีตด้วยความเข้มข้นสูง ใช้วิธีการเติมโคลชิซินในอาหารเหลวโดยตรงแล้วจึงกรองฆ่าเชื้อและทรีตด้วยวิธีการเดียวกัน

การศึกษาผลของโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการรอดชีวิตและลักษณะทางสัณฐาน

### 1. การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

นำตายอดขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร ซึ่งวางเลี้ยงในอาหารชักนำตายอดเป็นเวลา 2 เดือน (ย้ายเลี้ยงเดือนละครั้ง) ไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเติม ทรีตด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0, 500, 750, 1,000, 1,250 และ 1,500 มก/ล โดยเติมโคลชิซินในอาหารเหลว 1/2 MS เติม NAA 0.06 มก/ล และ BA 0.03 มก/ล เซย่าเลี้ยงด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายตายอดไปวางบนกรวยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนี้ ฆ่าเชื้อเพื่อล้างโคลชิซินส่วนเกินออก วางเลี้ยงตายอดที่ได้รับการทรีตโคลชิซินในอาหารสูตรชักนำตายอด หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือนแล้วจึงเติมอาหารชักนำการยืดยาวของยอด วางเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 2 เดือน จึงตัดแยกยอดที่พัฒนามีขนาดประมาณ 1.5 เซนติเมตร ไปชักนำรากในอาหารสูตรชักนำราก ตรวจสอบจำนวน และความยาวราก ความสูงของยอด รูปร่างของใบโดยคำนวณจากสัดส่วนของความกว้างต่อความยาว จำนวน และพื้นที่ใบ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้จากแต่ละหน่วยการทดลองโดยใช้ DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ในโปรแกรม SAS (Statistical Analysis System)

### 2. การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 10 ชั่วโมง

นำตายอดที่วางเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 3 ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร ทรีตด้วยอาหารเหลวเติมโคลชิซินความเข้มข้น 3,000 6,000 และ 10,000 มก/ล ด้วยวิธีการ เดียวกับการศึกษาที่ 1 หลังจากเซย่าเลี้ยงเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ย้ายตายอดไปวางเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำตายอด ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของตายอดเช่นเดียวกับการศึกษาที่ 1

### 3. การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 30 วัน

นำตายอดขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร ทรีตด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 0 500 750 และ 1,000 มก/ล ซึ่งเติมในอาหารเหลวสูตรที่ 4 เลี้ยงตายอดต่อไปเป็นเวลา 30 วัน หลังจากนั้นย้ายตายอดมาวางเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 3 หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน เติมอาหารเหลวสูตรที่ 4 ลงไป และวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1 เดือน ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต หลังจากนั้นตัดแยกยอดที่พัฒนามีขนาดประมาณ 1.5 เซนติเมตร มาชักนำราก ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1 หลังจากนั้นทดลองซ้ำโดยเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซินเป็น 3,000 6,000 และ 10,000 มก/ล ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับการศึกษาที่ 1

## การศึกษาจำนวนโครโมโซมเซลล์ปลายราก

หลังจากชักนำรากได้ 4 สัปดาห์ ล้างรากของต้นมั่งคุดในแต่ละระดับความเข้มข้นของโคลชิซินที่ทดสอบจากการทดลองที่ 1 ด้วยน้ำกลั่น ตัดปลายรากขนาด ประมาณ 2 มิลลิเมตร แช่ในสารละลาย HQ (8-hydroxyquinoline) ความเข้มข้น 0.29 กรัมต่อลิตร นาน 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างรากด้วยน้ำกลั่น แล้วตรึงในสารละลายของแอลกอฮอล์กับกรดอะซิติกในอัตราส่วน 3:1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลานำปลายรากมาอินคิวเบทในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที หลังจากนั้นล้างรากด้วยน้ำกลั่นแล้วย้อมสีอะซิโตคาร์มีน นำเซลล์ปลายรากมาติดบนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยโคเวอร์สลิป นำมาตรวจสอบลักษณะ และจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ DMRT ในโปรแกรม SAS แต่ละความเข้มข้นของโคลชิซินใช้ตัวอย่างรากจำนวน 15 ราก จาก 15 ต้น

## การศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์

### 1 การศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด

ใช้ใบจากการทดลองที่ 2 และ 3หนัก 5 กรัม น้ำหนักสดมาบดในสารละลายอะซิโตนเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ละเอียด กรองด้วยกระดาษกรอง นำส่วนที่กรองได้มาบดอีกครั้งในสารละลายเดียวกัน จากนั้นผสมสารที่กรองได้จากครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 เข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรเป็น 300 มิลลิลิตร นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ a และ b โดยใช้สูตรของ Witham และคณะ (1986) แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างปริมาณคลอโรฟิลล์โดยใช้ DMRT ในโปรแกรม SAS

### 2 การศึกษาจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบ ขนาดและจำนวนของเซลล์ปากใบ

ใช้ใบจากหน่วยการทดลองเดียวกับการทดลองที่ 1 ลอกหรือใช้มีดเฉือนผิวใบเป็นแผ่นบางๆ วางบนสไลด์ หยดน้ำกลั่นลงบนชิ้นส่วนผิวใบและปิดด้วยโคเวอร์สลิป แต่ละหน่วยทดลองใช้ตัวอย่างใบจำนวน 10 ใบ แต่ละใบสุ่มตรวจสอบ 3 ตำแหน่ง เปรียบเทียบความแตกต่างจำนวนคลอโรพลาสต์ ขนาด และจำนวนเซลล์ปากใบโดยใช้ DMRT ในโปรแกรม SAS

## การศึกษาระบบเอนไซม์

นำใบจากการศึกษาที่ 3 มาบดในโกร่งเย็นจัดในสารละลายบัฟเฟอร์จนละเอียด ตูตใส่หลอด Eppendorf นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอน ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด Eppendorf ใหม่ที่สะอาด เก็บในตู้แช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส นำไปตรวจสอบแถบเอนไซม์บนวุ้นอะครีลาไมด์ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง นำไปย้อมสีเพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ 4 ระบบคือ เปอร์ออกซิเดส เอสเทอเรส แอซิดฟอสฟาเตส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส ในที่มีดจนเจลติดสีชัดเจน หลัง

จากนั้นตรง เอนไซม์ในสารละลายของกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติก 7 เปอร์เซ็นต์ ล้างสีส่วนเกินออกด้วย สารละลายของเมทานอล 10 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติก 7 เปอร์เซ็นต์ บันทึกภาพไซโมแกรมเอนไซม์ที่ปรากฏ แปรผลการเปลี่ยนแปลงของระบบ เอนไซม์จากแถบ เอนไซม์ที่ได้ เปรียบเทียบกันระหว่างหน่วยการทดลอง

### ผลและวิจารณ์

การศึกษาผลของโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการรอดชีวิตและลักษณะทางสัณฐาน

#### 1. การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0-1,500 มก/ล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิต และอัตราการสร้างยอด ลักษณะทางสัณฐานของยอดที่ทรีต โคลชิซินไม่มีความแตกต่างจากหน่วยทดลองเปรียบเทียบ หลังจากทดลองชักนำรากชุดที่ 1 พบว่าความยาวราก และความสูงของยอดแตกต่างกันทางสถิติ (Table 1) แต่เมื่อทดลองชัก นำรากชุดที่ 2 พบว่าความยาวราก และความสูงยอดไม่มีความแตกต่างกันระหว่างหน่วย ทดลอง แต่จำนวนราก จำนวนใบ และพื้นที่ใบมีความแตกต่างกัน การทรีตตายอดด้วยโคลชิ ซินความเข้มข้น 1,250 มก/ล ส่งผลให้จำนวนรากและจำนวนใบน้อยที่สุดแตกต่างจากหน่วย ทดลองอื่นๆ ส่วนพื้นที่ ใบไม่แตกต่างกับความเข้มข้น 500, 1,000 และ 1,500 มก/ล (Table 2)

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงของลักษณะบางประการมีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นจึงได้ตรวจสอบความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ย จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ พบว่าความสูง และความยาวรากมีความสัมพันธ์กัน เมื่อรากมีความยาวมากขึ้นส่งผล ให้ความสูงของต้นเพิ่มขึ้น (Table 3) ดังนั้นจึงนำความสูง และ ความยาวรากมาวิเคราะห์ โค วาเรียนซ์เพื่อหาข้อสรุป จากการวิเคราะห์โควาเรียนซ์ของความสูง และความยาวรากโดยใช้ ความสูงเป็นฐาน พบว่าเมื่อมีการปรับค่าความสูงแล้วความยาวรากไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (Table 4) นอกจากความสูงมีความสัมพันธ์กับความยาวรากแล้ว ยังพบว่าจำนวนรากมีความสัมพันธ์กับความยาวรากด้วยแต่เนื่องจากจำนวนราก และความยาวรากไม่มีความแตกต่างทาง สถิติในหน่วยการทดลองที่ใช้โคลชิซินความเข้มข้นแตกต่างกัน (Table 4) ดังนั้นจึงไม่นำข้อมูล มาวิเคราะห์โควาเรียนซ์

#### 2 การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 10 ชั่วโมง

การเพิ่มเวลาการทรีต และความเข้มข้นของโคลชิซินมีผลต่อความมีชีวิต และการ พัฒนาของยอดใหม่ การทรีตตายอดเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ด้วยโคลชิซินเข้มข้น 3,000 6,000 และ 10,000 มก/ล พบว่าการรอดชีวิตของตายอดลดลงเหลือ 83.5 65.4 และ 57.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ตายอดในหน่วยการทดลองชุดเปรียบเทียบรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ (Fig. 1)



### 3 การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 30 วัน

การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเป็นเวลา 30 วัน พบว่าที่ความเข้มข้น 500 750 และ 1,000 มก/ล ให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม (Fig. 2) รากที่ชักนำได้จากทุกหน่วยการทดลองที่ทรีตโคลชิซินมีความยาวมากกว่าหน่วยการทดลองชุดควบคุม แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนจำนวนใบ ลดลง (Table 5) เมื่อทดลองทรีตตายอดด้วยโคลชิซินเข้มข้น 3,000 6,000 และ 10,000 มก/ล พบว่าจำนวนยอดที่รอดชีวิตลดลง (Fig. 3) ส่วนยอดที่รอดชีวิตชะงักการเจริญเติบโต ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและร่วง

#### การศึกษาจำนวนโครโมโซมเซลล์ปลายราก

จากการทดลองตรวจนับโครโมโซมโดยใช้วิธีการย้อมสีอะซีโตคาร์มีน พบว่าโครโมโซม ในระยะเมตาเฟสของเซลล์ปลายรากที่ตรวจนับมีจำนวนมาก และมีขนาดเล็กจึงไม่สามารถตรวจนับได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 600 เท่า (Fig. 4) ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้เทคนิคการตรวจสอบในระดับเซลล์ในการจำแนกระดับพลอยดีของมังคุดที่ทรีตโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ ได้

#### การศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์และปริมาณคลอโรพลาสต์

##### 1 การศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด

###### 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 (Table 6)

###### 1.2 การทรีตตายอดเป็นเวลา 10 ชั่วโมง

การทรีตโคลชิซินความเข้มข้น 0-10,000 มก/ล เป็นเวลา 10 ชั่วโมง มีผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ a, b และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลง ตายอดที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 3,000 มก/ล มีปริมาณคลอโรฟิลล์ a และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นแตกต่างทางสถิติกับความเข้มข้น 0 6,000 และ 10,000 มก/ล ส่วนปริมาณ คลอโรฟิลล์ b มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม แต่ไม่แตกต่างกับความเข้มข้น 6,000 และ 10,000 มก/ล (Table 7)

###### 1.3 การทรีตตายอดเป็นเวลา 30 วัน

การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0 500 750 และ 1,000 มก/ล ไม่มีผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ a b และ ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (Table 8) ส่วนการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0 3,000 6,000 และ 10,000 มก/ล มียอดที่รอดชีวิตเพียง 49 22 และ 12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และต้นที่รอดชีวิตมีการเจริญเติบโตผิดปกติ มีการสร้างแคลลัสบริเวณแผ่นใบ ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และร่วง ยอดหยุดการเจริญเติบโต จึงไม่ตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ในการทดลองนี้

## 2 การศึกษาปริมาณคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบ ขนาด และจำนวนของเซลล์ปากใบ

การใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0-1,500 มก/ล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปากใบ การทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 750 มก/ล เป็นเวลา 30 วัน ให้ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น (Fig.5A) ส่วนการทรีตด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 3,000-10,000 มก/ล ให้ปากใบมีสีเข้มขึ้นจนเป็นสีแดง (Fig. 5B) จำนวนของเซลล์ปากใบไม่มีความแตกต่างกันในทุกหน่วยการทดลอง ส่วนปริมาณคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบไม่สามารถตรวจนับได้เนื่องจากมีขนาดเล็ก

### การศึกษาระบบเอนไซม์

จากการศึกษาเอนไซม์ 4 ระบบคือ เปอร์ออกซิเดส เอสเทอร์เลส แอซิดฟอสฟาเตส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส โดยใช้ทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ สกัดเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส และมาเลทดีไฮโดรจีเนสยอมไม่ติดสี เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้แถบจางๆ แต่สามารถแยกความแตกต่างกับชุดควบคุมกับชุดที่ทรีตโคลชิซินได้ (Fig. 6A) ส่วนเอนไซม์เอสเทอร์เลสเป็นปื้น แต่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชุดควบคุมกับชุดที่ทรีตโคลชิซินความเข้มข้น 500 และ 750 มก/ล ได้ (Fig. 6B) แม้จะไม่ชัดเจนนัก ดังนั้นการใช้เอนไซม์ดังกล่าวในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของมังกุดจึงอาจนำมาใช้ได้แต่ยังไม่เหมาะสม เนื่องจากไม่ปรากฏแถบสีที่ชัดเจน

การทรีตโคลชิซินความเข้มข้น 0-1,500 มก/ล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กับตายอด ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการสร้างตายอดและการรอดชีวิต การเพิ่มความเข้มข้นของโคลชิซินเป็น 3,000 6,000 และ 10,000 มก/ล และเพิ่มเวลาทรีตตายอดจาก 2 ชั่วโมงเป็น 10 ชั่วโมง และ 30 วัน ส่งผลให้การพัฒนาของยอด และการรอดชีวิตลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นที่สูงเกินไปของโคลชิซินเป็นพิษต่อพืช มีผลให้ความเข้มข้นหรือความหนืดของไซโทพลาสซึมเปลี่ยนแปลง เซลล์ทำงานผิดปกติ หรืออาจเกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมเป็น 2 เท่า เซลล์ที่มีการเพิ่มชุดโครโมโซมมีการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ การแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นสูงกว่าระดับที่เหมาะสมหรือใช้เวลานานเกินไป ทำให้พืชมีจำนวนโครโมโซมเกินระดับที่ต้องการ ทำให้เซลล์เสียสมดุลและตายได้ (Cook and Loudon, 1952 อ้างโดย ปิยะดา ดันตสวัสดิ์ และอรดี สหวัชรินทร์, 2532) การเจริญเติบโตที่ผิดปกติของพืชที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นมีผลเนื่องมาจากอัตราเมตาบอลิซึมของเซลล์ลดลง (Patil, 1992) ตัวอย่างการทดลองในกุหลาบ (Robert et al., 1990) และกาแฟ (Lashermes et al., 1994) พบว่าต้นที่ได้รับการทรีตโคลชิซินมีอัตราการรอดชีวิตลดลง และการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ ในขณะที่ *Eustoma grandiflorum* ที่มีการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยโคลชิซิน สามารถเจริญเติบโตได้ดีในหลอดทดลอง แต่เมื่อย้ายลงดินปลูก พบว่าการเจริญเติบโตลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่มีชุดโครโมโซมปกติ อัตราการเจริญเติบโตที่ลดลง และการลดลงของความสูงสามารถพบได้ทั่วไปในพืชที่มีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น (Griesbach and Bhat, 1990) Dolezel และ Binarova (1989) รายงานในทำนองเดียวกันว่า การทรีตโคลชิซินมีผลให้เซลล์เจริญเติบโตช้า

มีลักษณะผิดปกติ และสูญเสียการกำหนดขั้ว (polarity) ทำให้ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ หรือพัฒนาได้แต่ช้า นอกจากนี้ยังพบว่าในพืชบางชนิดที่เจริญเติบโตจนมีการสร้างดอกภายในดอกมีละอองเกสรเป็นหมัน ทั้งนี้เนื่องจากความไม่สมดุลของโครโมโซม (Patil, 1992) นอกจากความสำเร็จในการเพิ่มชุดโครโมโซมขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโคลชิซินแล้วยังขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการทรีตด้วย จากตัวอย่างการทรีตเซลล์ชั้นของถั่วอัลฟัลฟาด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีผลให้เซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนแปลง และสูญเสียความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (Hassan, et al., 1991) สำหรับซึ่งนั้นพบว่า การเพิ่มทั้งความเข้มข้น และระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซินทำให้การเจริญเติบโต และอัตราการรอดชีวิตลดลง และทำให้เกิดลักษณะผิดปกติกับต้น VM2 (หน่อที่ 1 จากต้นที่ทรีต โคลชิซิน) และ VM3 (หน่อที่ 2 จากต้นที่ทรีตโคลชิซิน) เช่นบางต้นมีลักษณะลำต้นอ้วน ใบหนา และกว้าง บางต้นมีลักษณะใบต่าง เป็นริ้ว เมื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก พบว่า การแช่สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 วัน และความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 วัน ประสบความสำเร็จในการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมได้ดีที่สุด (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และ อรดี สหวัชรินทร์, 2532) ในการทดลองกับมังคุดในการศึกษานี้ พบว่าการทรีตตายอดเป็นเวลา 10 วัน ด้วยโคลชิซินเข้มข้น 3,000 6,000 และ 10,000 มก/ล มีผลให้การรอดชีวิตของตายอดลดลง และการทรีต ตายอดเป็นเวลา 30 วัน ด้วยโคลชิซินเข้มข้น 500 750 1,000 3,000 6,000 และ 10,000 มก/ล มีผลให้การรอดชีวิตของตายอดลดลงเช่นกัน ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากตายอดมีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นในลักษณะพลอยดี ทำให้เซลล์เสียสมดุล หรือมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ปลายยอด ทำให้ไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานพบว่า ต้นที่ได้จากการทรีตตายอดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 1,250 มก/ล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ความสูงของยอดมีความแตกต่างทางสถิติ โคลชิซินความเข้มข้น 50 มก/ล มีผลให้ยอดมีขนาดเล็กที่สุดแตกต่างจากความเข้มข้นอื่นๆ ส่วนจำนวนราก ความยาวราก จำนวนใบ และพื้นที่ใบมีแนวโน้มลดลงเช่นกัน แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับความเข้มข้นอื่นๆ ส่งผลให้ลักษณะต่างๆ ส่วนการทรีตตายอดด้วยโคลชิซิน ความเข้มข้นสูงขึ้นเป็นเวลา 30 วัน ส่งผลให้ความยาวรากเพิ่มขึ้น แต่พืชต้นใหม่ที่ได้มีการเจริญเติบโตลดลงโดยเฉพาะความสูงลำต้น มีรายงานในพืชหลายชนิดที่มีการเพิ่มชุดโครโมโซมแล้วพบว่ามีการเจริญเติบโตช้า มี ลักษณะใบหนา สีเขียวเข้ม และอัตราการรอดชีวิตลดลง เช่น การทดลองทรีตโคลชิซินกับกุหลาบ (Robert et al., 1990) ยาสูบ (Zeppernick et al., 1994) กาแฟ (Lashermes et al., 1994) และพลับพลึง (Tamura et al., 1996) แม้ว่าการตรวจสอบการกลายพันธุ์จากการทรีตกลุ่มยอดรวมด้วยโคลชิซินในระดับเซลล์ และชีวเคมีในการศึกษานี้ให้ผลที่ไม่ชัดเจน แต่ก็ เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ช่วยบอกถึงผลถึงการเปลี่ยนแปลงได้ในระดับหนึ่ง ในการศึกษาต่อไปมีความจำเป็นต้องหาสภาพที่เหมาะสมต่อการแยก และสกัด เอ็นไซม์ ความเข้มข้นของตัวกลางที่เหมาะสมตลอดจนระบบของเอ็นไซม์ที่นำมาใช้จำแนก นอกจากนี้การใช้เทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอก็น่าจะให้ผลที่แม่นยำกว่า

## เอกสารอ้างอิง

- ปิยะดา ต้นตสวรรค์ และ อรดี สหวัชรินทร์. 2532. การปรับปรุงพันธุ์ขิงโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ร่วมกับสารโคลชิซิน. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 27, 30 ม.ค. - 1 ก.พ. 2532.
- วิทยา พรหมมี และสมปอง เตชะโต. 2540. การปรับปรุงพันธุ์มังคุดในหลอดทดลองโดยใช้รังสีแกมมา. การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 14 เทคนิคของวิธีการทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. 11 ธันวาคม 2540 ณ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม. หน้า 38-48.
- สมปอง เตชะโต และ วันทนา ฝรั่งยอง. 2531. การขยายพันธุ์มังคุดจำนวนมากโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว. สงขลานครินทร์ 10:7-9.
- สมปอง เตชะโต มงคล แซ่หลิม และ อรุณี ม่วงแก้วงาม. 2535. การเพิ่มประสิทธิภาพวิธีการเพาะเลี้ยงใบอ่อนมังคุดในหลอดทดลองเพื่อการขยายพันธุ์. ว. สงขลานครินทร์ 14: 1-7.
- Behera, B., Tripathy, A. and Patnaik, S. K. 1974. Histological analysis of colchicine-induced deformities 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.
- Chen, J.F. and Staub, J.E. 1997. Attempts at colchicine doubling of an interspecific hybrid of *Cucumis sativus* L.x *C. hystrix* Chakr. Report Cucurbit Genetics Cooperative 20:24-26.
- Chomatova, S., Turkova, V. and Klozova, E.1990. Protein complex and esterase isoenzyme patterns of *Allium sativum* L. cultivars and clones-regenerants. Biologia Plantarum 32:321-331.
- 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.
- Dore, C. and Boulidard. 1988. Production of androgenic plants by *in vitro* anther culture of sauerkraut cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata*) and behaviour of double haploid lines (DH) and F1 hybrids. Agronomie 8:851-862.
- Gmitter, F.G.Jr., Ling, X.B., Cai, C.Y. and Grosser, J.W. 1991. Colchicine-induced polyploidy in citrus embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. Plant Science Limerick 74:135-141.
- Griesbach, R. J. and Bhat, R. N. 1990. Colchicine-induced polyploidy in *Eustoma grandiflorum*. HortScience 25:1284-1286.
- Hamill, S.D., Smith, M.K. and Dodd, W.A. 1992. *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. Australian Journal of Botany 40:887-896.

- Handro, W., Ferreira, C.M. and Floh E.I.S. 1993. Chromosome variability and growth rate in cell suspension cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni. *Plant Science Limerick* 93:169-176.
- Harvey, C.F., Fraser, L.G., Kent, J., Steinhagen, S., McNeilage, M.A. and Yan G.J. 1995. Analysis of plants obtained by embryo rescue an interspecific *Actinidia* cross. *Scientia Horticulturae* 60:199-212.
- 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.
- Honkanen, J., Aapola, A., Seppanen, P., Tormala, T., deWit, J.C., Esendam, H.F. and Stravers, L.J.M. 1992. Production of double haploid gerbera clones. *Acta-Horticulturae* 300:341-346.
- Ishizaka, H. and Uematsu, J. 1994. Amphidiploids between *Cyclamen persicum* Mill and *C. hederifolium* Aiton induced through colchicine treatment of ovules *in vitro* and plants. *Breeding Science* 44:161-166.
- Lashermes, P., Couturon, E. and Charrier, A. 1994. Double haploids of *Coffea canephora*: development, fertility and agronomic characteristics. *Euphytica* 74:149-157.
- Ma, Y., Byrne, D.H. and Chen, J. 1997. Amphidiploid induction from diploid rose interspecific hybrids. *HortScience* 32:292-295.
- Miyoshi, K. and Asakura, N. 1996. Callus induction of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera (*Gerbera jamesonii*). *Plant Cell Reports* 16:1-5.
- Patil, B. C. 1992. The induction of tetraploid in *Crotalaria linifolia* L. *Cytologia* 57:247-252.
- 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.
- Sari, N. and Abak, K. 1996. Effect of colchicine treatment with different doses and periods of *in vitro* chromosome doubling in haploid watermelon. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 20:555-559.
- Stanys, V. 1995. Apple polyploids through cotyledon culture. *Biologija* 3-4:108-110.
- Tamura, M., Tao, R. and Sugiura, A. 1996. Production of dodecaploid plants of Japanese persimmon (*Dyospyros kaki* L.) by colchicine treatment of protoplasts. *Plant Cell Reports* 15:470-473.
- Te-chato, S. and Lim, M. 1996. Micropropagation of mangosteen through young leaf culture. The 13<sup>th</sup> Conference on Methodological Techniques in Biological Science. Central Laboratory and Greenhouse Complex. 19-20 June. Kasetsart University, Kamphaengsaen, Nakorn Pathom. pp.55-64
- Witham, F.W., Blaydes, D.F. and Delvin, R.M. 1986. Chlorophyll absorption spectrum and qualitative determinations. *In Exercises in*

Plant Physiology. (ed. J.F. Vilain) p. 128-131. Boston:Prindle, Weber and 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.

Table 1. Some morphological changes of mangosteen plantlets obtained from colchicin-treated shoot buds for 2 hours (repeat 1).

Concentration n (mg/l.)	N	Root No. (average)	Root length (cm)	Leaf No. (average)	Leaf shape (w/l)	Leaf area (mm <sup>2</sup> )	Shoot size (cm)
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
1,000	27	1.1852	2.5741 ab	6.1481	0.4442	10.3874	1.7778 ab
1,250	15	1.000	2.0667 b	5.6000	0.4039	11.4617	2.0333 a
1,500	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

\* : significant difference P=0.05, ns : non significant difference

Mean not sharing letter in common within column differ significantly by DMRT

N : Number of plantlets tested

Table 2. Some morphological changes of mangosteen plantlets obtained from colchicin-treated shoot bud for 2 hours (repeat 2).

Concentration (mg/l)	N	Root No. (average)	Root length (cm)	Leaf No. (average)	Leaf shape (w/l)	Leaf area (mm <sup>2</sup> )	Shoot size (cm)
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

\* : significant difference P=0.05, ns : non significant difference

Mean not sharing letter in common within column differ significantly by DMRT

N : Number of plantlets tested

Table 3 Correlation (R) of some morphological features of mangosteen plantlets after treating shoot buds with colchicine at various concentrations for 2 hours.

treatment	Root No.:Root length	Height:Leaf No	Leaf No:Leaf area	Height: Root length
sh 2 hrs I	0.749	0.636	0.010	0.857*
sh 2 hrs II	0.643	0.302	0.402	0.605

\* significant correlation at P=0.05

sh : shoot; hrs : hours; I : repeat I; II : repeat II

Table 4. Analysis of covariance between root length and shoot height after treating with colchicine at various concentrations for 2 hours.

Concentrations (mg/l)	Root length (cm)*
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

\* : Average ± standard deviation

ns : non significant

Table 5. Some morphological changes of mangosteen plantlets obtained from treating with colchicine for 30 days.

Concentration n (mg/l)	N	Root No. (average)	Root length (cm)	Leaf area (average)	Leaf shape (w/l)	Leaf area mm <sup>2</sup>	Shoot size (cm)
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

\* : significant difference P=0.05, ns : non significant difference

Mean not sharing letter in common within column differ significantly by DMRT

N : Number of plantlets tested



Table 6 Chlorophyll content in leaves of mangosteen plantlets obtained from treating shoot buds with colchicine at various concentrations for 2 hours.

Conc. of colchicine (mg/l)	Chlorophyll content (mg/g fresh weight)		
	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll
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

\* : Significant difference at P=0.05, ns : non significant difference  
Mean not sharing letter in common within column differ significantly by DMRT.

Table 7 Chlorophyll content in leaves of mangosteen plantlets obtained from treating shoot bud with colchicine at various concentrations for 10 hours.

Conc. of colchicine (mg/l)	Chlorophyll content (mg/g fresh weight)		
	chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll
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

\* : Significant difference at P=0.05  
Mean not sharing letter in common within column differ significantly by DMRT.

Table 8 Chlorophyll content in leaves of mangosteen plantlets obtained from treating shoot bud with colchicine at various concentrations for 30 days.

Conc. of colchicine (mg/l)	Chlorophyll content (mg/g fresh weight)		
	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll
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

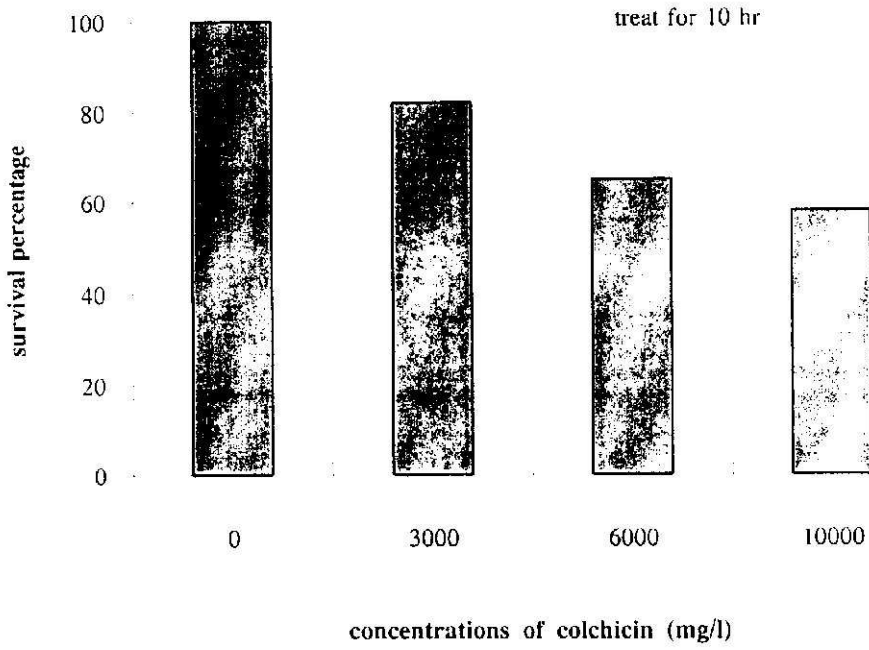


Fig. 1 Effect of various concentrations of colchicine on shoot survival percentage.

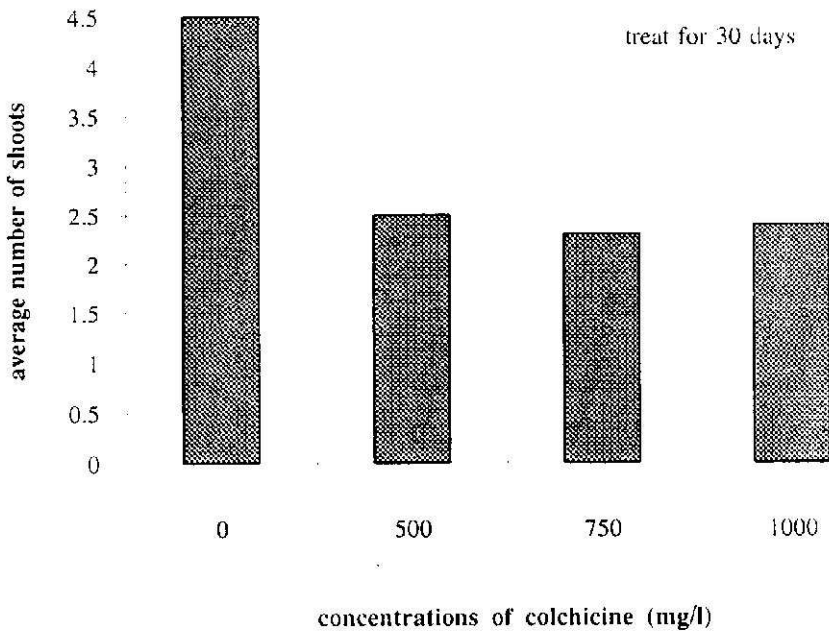


Fig.2 Effect of various concentrations of colchicine on average number of shoots.

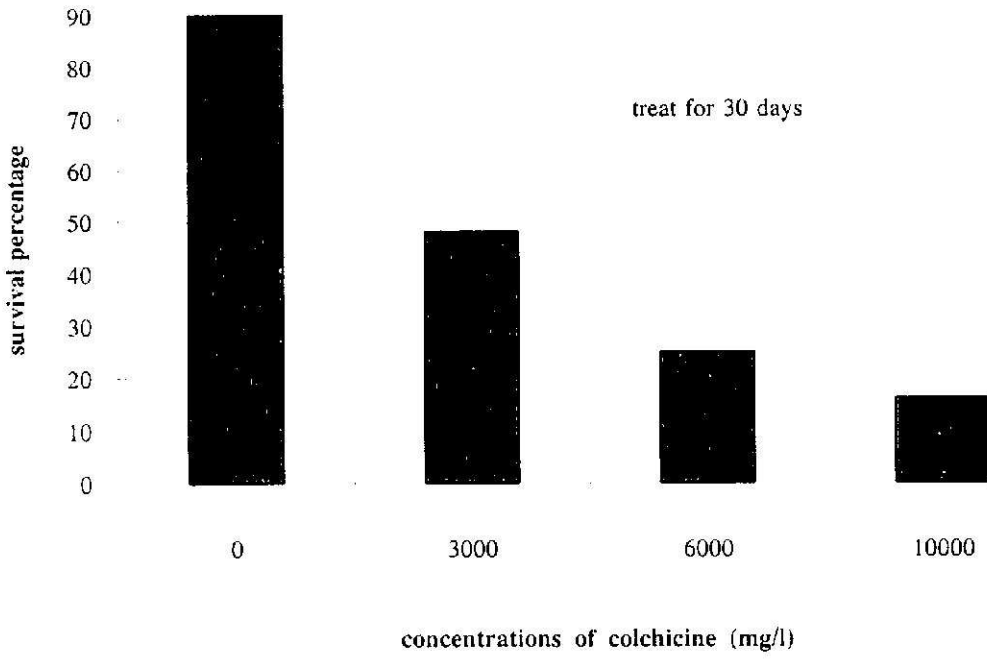


Fig.3 Effect of various concentrations of colchicine on shoot survival percentage.

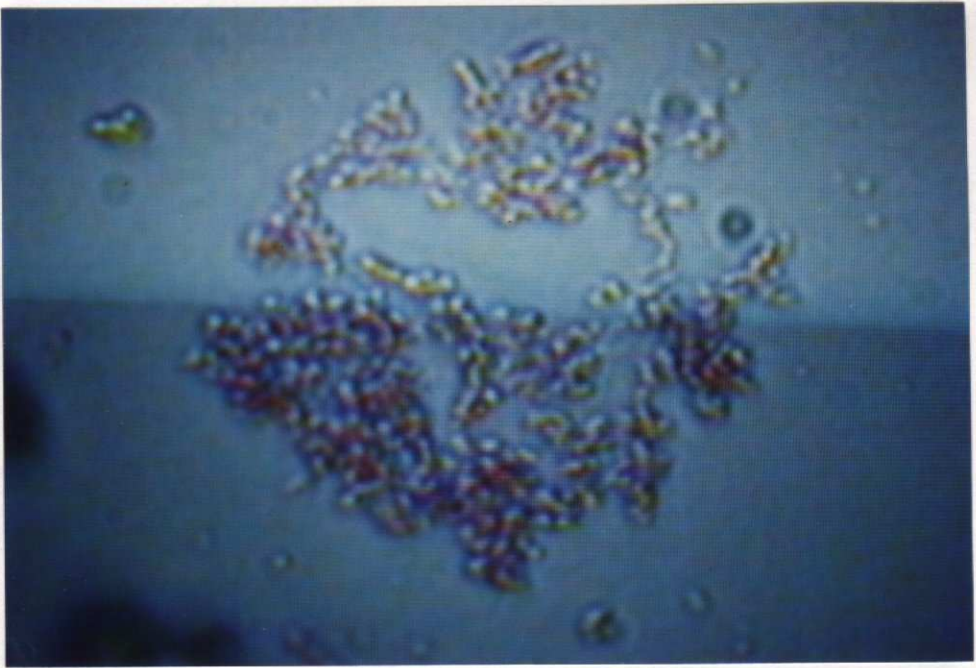
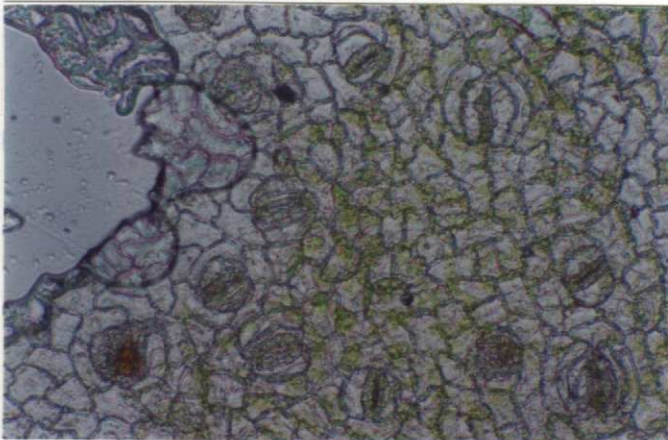
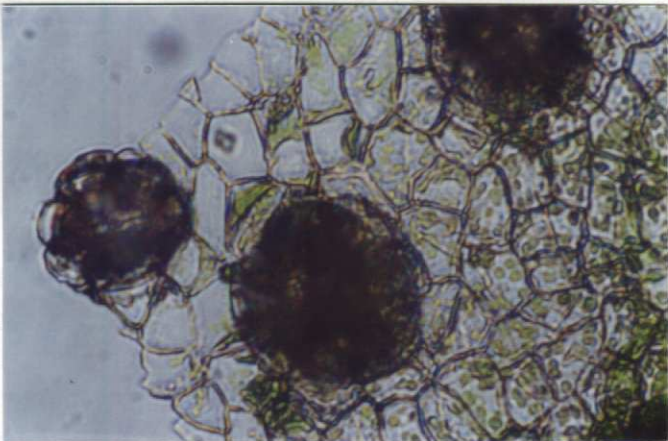


Fig. 4 Chromosomes from root tip of mangosteen plantlet obtained from treating shoot buds with colchicine at 750 mg/l for 30 days (X600).



A



B

Fig. 5 Stomata cells from mangosteen plantlet leaf obtained from treating shoot buds with 750 mg/l (A) and 3,000-10,000 mg/l (B) colchicine for 30 days (X600)

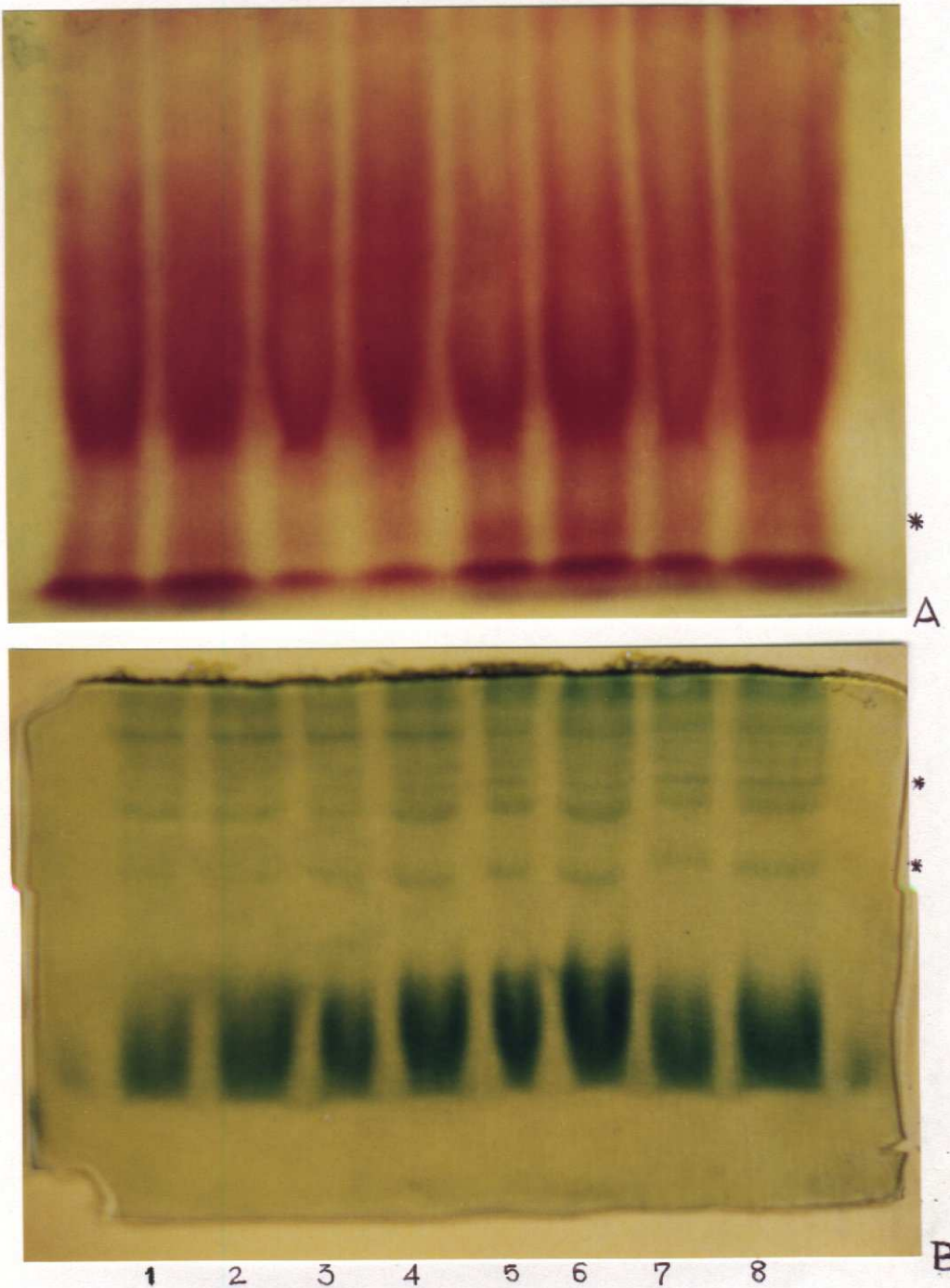


Fig. 6 Zymogram patterns of peroxidase (A) and esterase (B) from mangosteen plantlet leaves obtained from treating and non-treating shoot buds.  
 Lane 1,2 = Non-treating shoot buds, Lane 3,4 = 500 mg/l, Lane 5,6 = 750 mg/l, Lane 7,8 = 1,000 mg/l.