

การศึกษาทางสัณฐานและเซลล์วิทยาของมะนาว (*Citrus aurantifolia* Swingle)
พอลิพลอยด์ที่ถูกชักนำด้วยสารโคลชิซิน
Morphological and Cytological Studies of Colchicine-induced Polyploidy Lime
(*Citrus aurantifolia* Swingle)

นนุช เอื้อวงศ์^{1/} ชลกรานต์ อวยจินดา^{1/} วิไลพร แซ่ลี้ม^{1/} สุพรรณณิภา เส็งสาย^{1/} วิมล ขวัญแก้ว^{1/}
Nongnuch Euawong^{1/} Chonlakran Auychinda^{1/} Wilaiporn Saelim^{1/} Suphanyika Sengsai^{1/} Wimol Kwankua^{1/}

ABSTRACT

Lime (*Citrus aurantifolia*) breeding was conducted by colchicine treatment to produce polyploidy lime. Healthy seeds were soaked in 0.4% colchicine for 6 hours. Polyploidy indicative morphologies, DNA content and chromosome number of putative polyploidy lime plants were verified. Measuring of DNA content by means of flow cytometric method showed 16% of treated plants contained two times of nuclear DNA content compared with the untreated control diploidy plants. Therefore indication of the tetraploidy lime plants were obtained. Consistency with the results of DNA content study, the chromosome number of tetraploidy plants and also the diploidy plants were $2n=4x=36$ and $2n=2x=18$, respectively when confirmed by squash technique and chromosome counting of root tip cells. Tetraploidy lime showed more significant thicker and broader leaves as well as larger guard cell size than diploid progenitor accompanied with significantly decrease of stomata and oil gland densities. Chromosome doubling of tetraploidy lime also increased lime fruit size, thickness of peel, seed size and seed number. Comparison with diploid, polyploidy lime fruit showed higher concentration of organic acid composition.

Key-words: *Citrus aurantifolia*, polyploidy, colchicine, tetraploidy lime, flow cytometry

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Mueang district, Nakhon Pathom province 73000

บทคัดย่อ

การปรับปรุงพันธุ์มะนาว (*Citrus aurantifolia*) โดยการชักนำให้เกิดสภาพพอลิพลอยดีด้วยสารโคลชิซิน ดำเนินการโดยนำเมล็ดแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.4% เป็นเวลา 6 ชม. จากนั้นจึงศึกษาลักษณะทางสัณฐานต่างๆ ที่เป็นตัวชี้วัดสภาพพอลิพลอยดี ปริมาณดีเอ็นเอและจำนวนโครโมโซมของต้นมะนาวที่คาดว่าเป็นต้นพอลิพลอยดี พบว่า 16% ของต้นมะนาวที่ได้รับสารมีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 เท่าของต้นควบคุมที่เป็นดิพลอยด์เมื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี flow cytometry แสดงว่าต้นมะนาวที่ได้เป็นต้นเทตระพลอยดี สอดคล้องกับผลการศึกษาจำนวนโครโมโซมในเซลล์ปลายรากด้วยวิธี squash technique และ chromosome counting ซึ่งพบว่าต้นเทตระพลอยดีและต้นดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ $2n=4x=36$ และ $2n=2x=18$ ตามลำดับ ทั้งนี้ต้นมะนาวเทตระพลอยดีที่ได้มีใบหนาและมีขนาดของใบ ตลอดจนขนาดของเซลล์คุมใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ ส่วนความหนาแน่นของปากใบและต่อมน้ำมันมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น เท่าตัวในต้นเทตระพลอยดีมีผลให้ขนาดผลและขนาดของเมล็ดใหญ่ขึ้น จำนวนเมล็ดและความหนาของเปลือกผลเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าต้นมะนาวพอลิพลอยดีมีความเข้มข้นของปริมาณกรดในน้ำมะนาวมากกว่าต้นดิพลอยดีด้วย

คำหลัก: มะนาว พอลิพลอยดี โคลชิซิน มะนาว เทตระพลอยดี

คำนำ

มะนาว (*Citrus aurantifolia* Swingle) เป็นไม้ผลวงศ์ส้มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่ง เนื่องจากความต้องการในการใช้ ทั้งในด้านอุปโภคและบริโภคมีตลอดทั้งปี ประกอบกับการขยายตัวทางภาคอุตสาหกรรมที่ใช้มะนาวเป็นวัตถุดิบมีมากขึ้น เช่น อุตสาหกรรมการผลิตอาหารสำเร็จรูป อุตสาหกรรมการผลิตยาและเครื่องสำอางค์ และอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ

มะนาวเป็นพืชในสกุลที่ส่วนใหญ่เป็นสปีชีส์ที่เป็นดิพลอยด์ โดยมีจำนวนโครโมโซม $n = 9$ (Krug, 1943; Cameron and Frost, 1968) สามารถผสมตัวเองได้ง่าย และให้รุ่นลูกที่สมบูรณ์พันธุ์พืชประเภทนี้อาจเป็นเทตระพลอยด์ได้เองโดยธรรมชาติประมาณ 1-3% ซึ่งมักเป็นต้นที่เจริญมาจาก polyembryonic seed (Barrett and Hutchinson, 1982) มะนาวสายพันธุ์เทตระพลอยด์มักให้ผลที่ดูเหมือนจะมีคุณค่าน้อย เพราะการติดผลไม่ดก ผิวของผลหนาและขรุขระ (Soost, 1975) แต่หากจะพิจารณานำบางส่วนของใบ หรือผลจากต้นเทตระพลอยด์มาใช้ประโยชน์อื่น ซึ่งจะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่มีความเป็นไปได้ เช่น ในน้ำมะนาวมีความเป็นกรดสูงสามารถนำมาใช้ปรุงอาหาร เครื่องดื่มและสกัดสารบางชนิด เช่น กรดซิตริกและเพคตินเพื่อการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอื่นๆ (Anon, 1986)

สำหรับผลสดของมะนาวยังมีองค์ประกอบที่เป็นสารหอมระเหยหลายชนิด ที่มีมาก

ได้แก่ limonene, α -terpineol, 4-terpineol, 1, 4-cineole, 1-8-cineole, p-cymene, β -bisabolene, citral, geranial และ neral (Shaw, 1979; Ranganna *et al.*, 1983) ซึ่งเป็นแนวทางนำไปปรับใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

นอกจากนี้ในบางประเทศยังใช้เปลือกของผลมะนาวแห้ง ที่ทำให้อยู่ในรูปของผง สำหรับใช้ในการปรุงอาหารได้หลายชนิด รวมถึงมีรายงานสารหอมระเหยที่สกัดจากมะนาว พบว่ามีคุณสมบัติในการกำจัดแมลงด้วย (Ezeonu *et al.*, 2001)

ประเทศไทยมีการปลูกมะนาวได้ดีในหลายพื้นที่โดยมีแหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ จ.เชียงใหม่ นครสวรรค์ นครปฐม สมุทรสาคร กาญจนบุรี เพชรบุรี สุราษฎร์ธานีและ นครศรีธรรมราช แต่อย่างไรก็ตาม ในช่วงของฤดูแล้งมะนาวยังมีความขาดแคลนส่งผลให้ผลมะนาวมีราคาค่อนข้างสูง และนอกจากปัญหาการขาดน้ำในช่วงฤดูแล้งแล้ว การผลิตมะนาวยังอาจมีปัญหาที่เกิดจากโรคและแมลงศัตรู เช่น โรคแคงเกอร์ โรคราดำ โรคกรีนนิ่ง (ใบแก้ว) โรคยางไหล หนอนซอนใบ เพลี้ยไฟและไรแดง เป็นต้น (นิรนาม, 2012)

ด้วยสถานการณ์ความต้องการของมะนาวที่มีมากขึ้นและปัญหาการผลิตดังกล่าวมา ทำให้การพัฒนามะนาวสายพันธุ์ใหม่ๆ เป็นที่ต้องการในปริมาณสูง ทั้งในด้านการเพิ่มลักษณะใหม่ๆ เช่น ผลใหญ่ขึ้น มีความต้านทานต่อโรคและแมลง มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ และที่สำคัญคือทำให้ผลที่

เป็นหมันหรือไม่ติดเมล็ด

การชักนำให้พืชเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นพอลิพลอยด์ (polyploid) อาจถือได้ว่าเป็นนวัตกรรมทางด้านพันธุกรรมที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ เพราะโดยทั่วไปพืชพอลิพลอยด์จะมีใบใหญ่ขึ้น ดอกใหญ่ มีแนวโน้มจะมีความสมบูรณ์พันธุ์น้อยลง และมีความทนทานต่อความเครียดต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าดิพลอยด์ (Hancock, 1997 ; Saleh *et al.*, 2008) กระบวนการชักนำพืชให้เปลี่ยนแปลงเป็นพอลิพลอยด์ดังกล่าว นิยมใช้สารเคมีหลายชนิด โดยเฉพาะสารโคลชิซิน (colchicines) ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสโดยเฉพาะที่ระยะแอนาเฟสซึ่งเป็นสาเหตุให้พืชเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นพอลิพลอยด์ (Kunitake *et al.*, 1998 ; Kermani *et al.*, 2003)

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา มีรายงานจำนวนมากใช้เทคนิคการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ได้สำเร็จในพืชหลายสปีชีส์รวมถึงในมะนาวด้วย (อริยา, 2540 ; สดาพรและคณะ, 2554, Rose *et al.*, 2000, Kermani *et al.*, 2003, Shao *et al.*, 2003, Gu *et al.*, 2005, Stanys *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2007 and Lehrer *et al.*, 2008)

อย่างไรก็ตามด้วยคุณสมบัติของมะนาวเทอร์พลอยด์ที่สามารถทนทานต่อความเครียดในสิ่งแวดล้อมได้หลายรูปแบบ (Li *et al.*, 1996 ; Pustovoitova *et al.*, 1996) ดังนั้นจึงเป็นแนวโน้มที่ดีที่จะนำต้นเทอร์พลอยด์มาใช้เป็น

ต้นตอสำหรับการขยายพันธุ์มะนาวพันธุ์ดีเพื่อให้สามารถปลูกได้ในทุกพื้นที่

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้รายงานถึงความสำเร็จในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยดีในมะนาวแป้นซึ่งเป็นมะนาวสายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกเพราะให้ผลตลอดปี ผลมีขนาดกลางและเปลือกบาง โดยยืนยันระดับของปริมาณดีเอ็นเอโดยการตรวจทางเซลล์พันธุศาสตร์ และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปอีกทั้งให้ข้อเสนอเกี่ยวกับความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้วัตถุติบซึ่งเป็นมะนาวเทพระพลอยด์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง

มะนาวแป้น ที่ใช้ในการศึกษาเกิดจากการนำเมล็ดของต้นแม่ดีพลอยดีมาลอกเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออกและนำไปแช่ในสารละลายโคลชิซิน 0.4% เป็นเวลา 6 ชม. เพาะให้เจริญเป็นต้นอ่อนและนำไปอนุบาล ขั้นตอนนี้ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จ.นครปฐม เมื่อต้นอ่อนแข็งแรงจึงนำไปปลูกในแปลงของเกษตรกรที่บ้านเลขที่ 10 หมู่ 3 ต.ไร่รถ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี จำนวนต้นที่นำไปปลูกและรอดชีวิตมีจำนวน 6 ต้น จากจำนวนเมล็ดที่ทดลอง 48 เมล็ด เมื่อมะนาวมีอายุประมาณ 4 ปี จึงทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

1. การศึกษาทางสัณฐานวิทยาเพื่อคัดกรองพืชพอลิพลอยดีในเบื้องต้น

การศึกษาเบื้องต้นใช้การสังเกตลักษณะต่างๆ และคุณสมบัติของมะนาวแป้นซึ่งเป็นพืชทดลองที่ผ่านการชักนำด้วยสารโคลชิซินจำนวน 6 ต้น เปรียบเทียบกับต้นแม่ดีพลอยดีโดยศึกษาจากอัตราการเจริญเติบโต ลักษณะและสีของใบ ลักษณะและขนาดของผลและจำนวนเมล็ดต่อผล

2. การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอด้วย Flow cytometric analysis และการนับจำนวนโครโมโซม

การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Flow Cytometry (Ye et al., 2010) ทำขึ้นเพื่อยืนยันสถานะของระดับพลอยดี (ploidy) ของมะนาวที่สันนิษฐานว่าเป็นพอลิพลอยดี โดยผ่านการคัดกรองทางสัณฐานวิทยามาแล้ว ได้แก่ ตรวจสอบจากต้นที่มีการเจริญเติบโตช้า ใบและผลมีขนาดใหญ่ขึ้น

การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ ดำเนินการโดยนำใบอ่อนของมะนาวต้นที่สันนิษฐานว่าเป็นพอลิพลอยดี และต้นแม่ดีพลอยดีมาตัดให้มีขนาด 1 ตร.ซม. สกัดนิวเคลียสและย้อมด้วยสารละลายสำเร็จรูป 500I ของ Cystain uv ploidy และ DAPI staining solution ใช้มีดคมๆ สับแผ่นใบให้ละเอียดนำของเหลวที่ได้มารองด้วย partec 30 m cell-trics disposable filter จะได้ของเหลวลักษณะใส นำของเหลวที่ได้บรรจุในหลอดและใส่ในเครื่อง flow cytometer รุ่น partec PA II

การนับจำนวนโครโมโซม (ดัดแปลงจาก Hynniewta *et al.*, 2011) ศึกษาจากเซลล์บริเวณปลายรากของต้นกล้าที่เพาะจากเมล็ดของมะนาวต้นที่สันนิษฐานว่าเป็นพอลิพลอยด์ และต้นแมติพลอยด์ โดยตัดบริเวณปลายรากขนาด 2-3 มม. นำมาหยุดเซลล์ให้อยู่ในระยะเมทาเฟสด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05% เป็นเวลา 2 ชม. ล้างด้วยน้ำกลั่นและตรึงเซลล์ใน Carnoy's solution (alcohol : acetic acid, 3 : 1) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม. และเก็บปลายรากไว้ใน alcohol 70% ที่ 4°C. เมื่อจะตรวจโครโมโซมนำปลายรากที่ผ่านการตรึงเซลล์ดังกล่าวมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง และแช่ลงใน 1 N HCL เป็นเวลา 15 นาทีที่ 60°C. ตามด้วยการล้างปลายรากด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วจึงนำไปย้อมด้วยสี aceto-orcein เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา ตัดเฉพาะส่วนปลายรากขนาดประมาณ 1 มม. วางบนกระจกสไลด์ที่สะอาด หยดสีย้อม 1 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์เคาะเบาๆ และกดให้เซลล์แบน จากนั้นนำไปตรวจนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 15 x 100 เท่า

3. การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ใบ ศึกษาขนาดของใบโดยใช้วิธีวัดความกว้างและยาว ใช้หน่วยเป็น ซม. และคำนวณหาค่าดัชนีใบหรือ leaf index (ความยาว/ความกว้าง)

ความหนาของใบ ศึกษาโดยตัดตามขวางบริเวณแผ่นใบและวัดขนาดด้วย ocular

micrometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 15x10 เท่า ปริมาณใบที่นำมาใช้ศึกษาโดยเฉลี่ย 10 ใบ/ต้น

ขนาดของเซลล์คุม (guard cell) และจำนวนปากใบ (stoma) ศึกษาจาก lower epidermis ของใบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 15 x 40 เท่า วัดขนาดด้วย ocular micrometer (หน่วยเป็นไมโครเมตร) โดยวัดขนาดเซลล์คุม 10 เซลล์/1 ใบ (Jaskani *et al.*, 2002) แต่ละต้นศึกษาจำนวน 10 ใบ สำหรับการศึกษานับปากใบต่อพื้นที่ (field) ใช้วิธีพิมพ์ลาย (Aryavand *et al.*, 2003) ด้วยน้ำยาเคลือบเล็บสีขาวใสที่บริเวณแผ่นใบด้าน lower epidermis และตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 15 x 40 เท่า โดยสุ่มตรวจนับ 4 บริเวณต่อ 1 ใบ และนับจาก 10 ใบ/ต้น

จำนวนต่อมน้ำมันที่ใบ ใช้วิธีนำใบแก่มาตรวจดูจำนวนต่อมน้ำมันภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 8 เท่า โดยการนับจำนวนต่อมน้ำมัน 10 บริเวณต่อ 1 ใบ (Jaskani *et al.*, 2002) และใช้จำนวน 10 ใบ/ต้น คำนวณหาจำนวนต่อมน้ำมันต่อพื้นที่ 1 ตร.ซม.

ผล ศึกษาขนาด/ความสูงของผล และความหนาของเปลือก โดยวิธีการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของผลด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ (สถาพรและคณะ, 2554)

ขนาดและจำนวนเมล็ดต่อผล ใช้วิธีการวัดขนาด กว้าง ยาว และความหนาของเมล็ดด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ และนับจำนวนเมล็ด/ผล

4. การศึกษาคุณภาพทางเคมีของน้ำมะนาว ใช้ การตรวจวัดปริมาณกรดรวมด้วยวิธีไตเทรท (Amador, 2005) ซึ่งใช้น้ำมะนาวที่หยดด้วย สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนมาไตเทรทกับสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นที่ แน่นอน (ทำ standardization กับสารละลาย โพแทสเซียม ไฮโดรพาทเลท, KHP.) บันทึก ปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และนำ มาคำนวณหาปริมาณกรดรวม (Amador, 2005)

$$\text{ปริมาณกรดรวม (ก./มล.)} = \frac{AA}{BB} \times \frac{C}{1000} \times 64.04$$

A = ความเข้มข้นของ NaOH (N)

B = ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ (มล.)

C = ปริมาตร NaOH ที่ใช้ (มล.)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยาเพื่อคัดกรอง พืชพอลิพลอยด์ในเบื้องต้น

การศึกษาทางสัณฐานวิทยาของมะนาว เป็นที่ถูกชักนำด้วยสารโคลชิซินจำนวน 6 ต้น พบว่ามีมะนาว 1 ต้นที่มีลักษณะ\ เปลี่ยนแปลงไปจากต้นแม่ดิพลอยด์อย่างชัดเจน คือมีการเจริญเติบโตช้า ใบมีสีเขียวเข้ม ลักษณะ ใบหนาและกว้างกว่าต้นอื่น ผลมีขนาดใหญ่ ผิวหนาขรุขระและเมล็ดมีจำนวนมากซึ่งลักษณะ ดังกล่าวสันนิษฐานได้ว่าอาจมีการเปลี่ยนแปลง ของสารพันธุกรรมในลักษณะของพอลิพลอยด์ (putative polyploidy) เกิดขึ้น

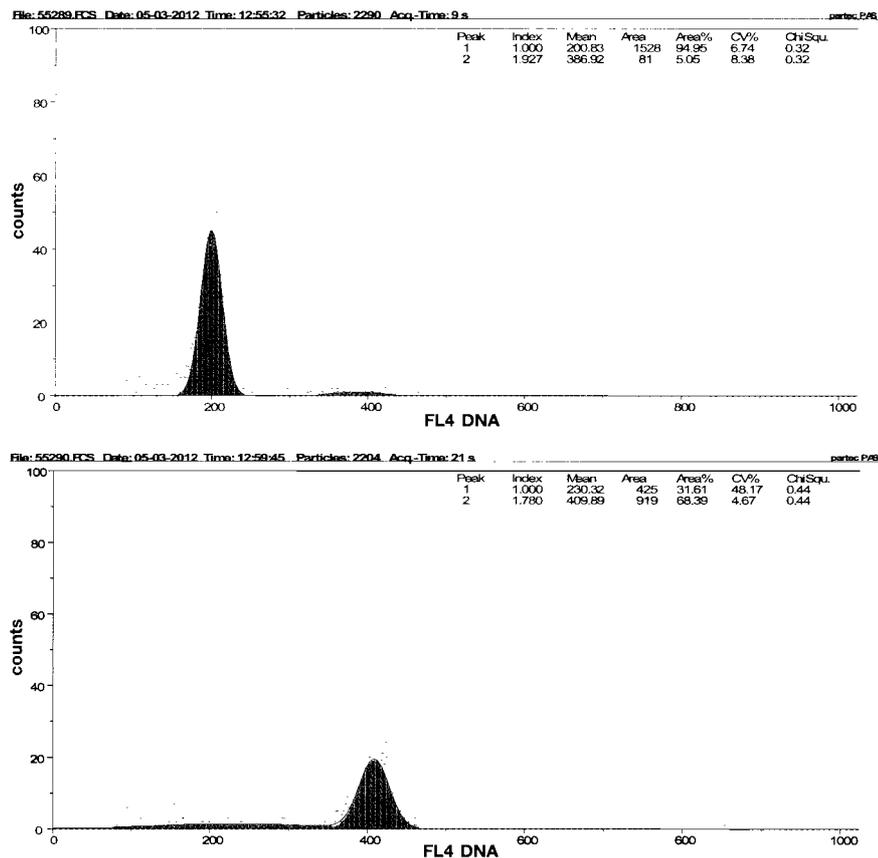


Figure 1. The position DNA quantity : control (diploid) (a) putative polyploid (tetraploid) (b)

3. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบและผล

ใบ ผลการศึกษาความกว้างของใบโดยเฉลี่ยต้นดิพลอยด์มีขนาด 3.46 ซม. ส่วนต้นเททระพลอยด์มีขนาด 5.07 ซม. ส่วนความยาวของใบต้นดิพลอยด์ยาว 5.70 ซม. ต้นเททระพลอยด์ยาว 7.30 ซม. ซึ่งทั้ง 2 ค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับค่าดัชนีใบ พบว่าต้นดิพลอยด์มีค่าเท่ากับ 1.67 และต้นเททระพลอยด์มีค่าเท่ากับ 1.37 ซึ่งแสดงว่าใบของต้นเททระพลอยด์มีลักษณะกลมกว่าต้นดิพลอยด์ (Figure 3 a, Table 2)

ค่าเฉลี่ยความหนาของใบพบว่าต้นเททระพลอยด์มีความหนามากกว่าต้นดิพลอยด์คือต้น ดิพลอยด์มีใบหนา 0.03 มม. และต้น

เททระพลอยด์มีใบหนา 0.41 มม. โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และทำนองเดียวกันกับผลการศึกษาความกว้างและความยาวของเซลล์คุม ซึ่งต้นเททระพลอยด์มีเซลล์คุมขนาด 22.75 และ 26.36 ไมโครเมตร โดยมีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ซึ่งมีขนาด 17.47 และ 20.49 ไมโครเมตร (Figure 3 b, c, Table. 2)

สำหรับการศึกษาจำนวนปากใบต่อพื้นที่และปริมาณต่อมน้ำมัน/ตร.ซม. พบว่าต้นเททระพลอยด์จะมีความหนาแน่นน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ โดยต้นเททระพลอยด์มี 16.75 ปากใบ/พื้นที่ในขณะที่ดิพลอยด์มี 25.77 ปากใบ/พื้นที่ และต้นเททระพลอยด์มีปริมาณต่อมน้ำมัน 168.10 ต่อม/ซม² น้อยกว่าต้นดิพลอยด์ซึ่งมี 509.80 ต่อม/ซม² (Figure 3 d,e Table. 2)

Table 2. Leaf morphological characteristics of diploid and tetraploid

Morphological characteristics of leaf	Diploid (mean ± SD)	Tetraploid (mean ± SD)	t - value
Width of leaf (cm)	3.46 ± 0.46	5.07 ± 0.40*	*
Length of leaf (cm)	5.70 ± 0.61	7.30 ± 0.71*	*
Leaf index (length/width)	1.67 ± 0.12	1.37 ± 0.07*	*
Thickness of leaf (mm)	0.03 ± 0.00	0.41 ± 0.00*	*
Stomata density(number/area)	25.77 ± 3.58	16.75 ± 3.59*	*
Width of guard cells (m)	17.47 ± 1.36	22.75 ± 1.65*	*
Length of guard cells(m)	20.49 ± 1.41	26.36 ± 1.79*	*
Oil glands (number/cm ²)	509.80 ± 19.80	168.10 ± 7.60*	*

*Show significantly different by Student t- test

Means ± standard deviation at the 5% level

ผล โดยภาพรวมมะนาวเทระพลอยด์มีขนาดผลใหญ่กว่าและมีผิวหนาขรุขระกว่าดิพลอยด์โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของผลมากกว่า 1.28 ซม. ขนาดของผลสูงกว่า 1.48 ซม. มีเปลือกหนากว่า 1.75 มม. ขนาดของกลีบโดย

เฉลี่ยกว้างกว่า 2.23 มม. และยาวกว่า 4.98 มม. เฉลี่ยน้ำหนักของกลีบหนักกว่า 1.04 ก. จำนวนเมล็ดต่อผลมีมากกว่า 18 เมล็ด ซึ่งขนาดของเมล็ดมีความกว้าง และความยาวมากกว่าดิพลอยด์ 0.68 มม. และ 0.14 มม.ตามลำดับ (Figure 4, Table 3)

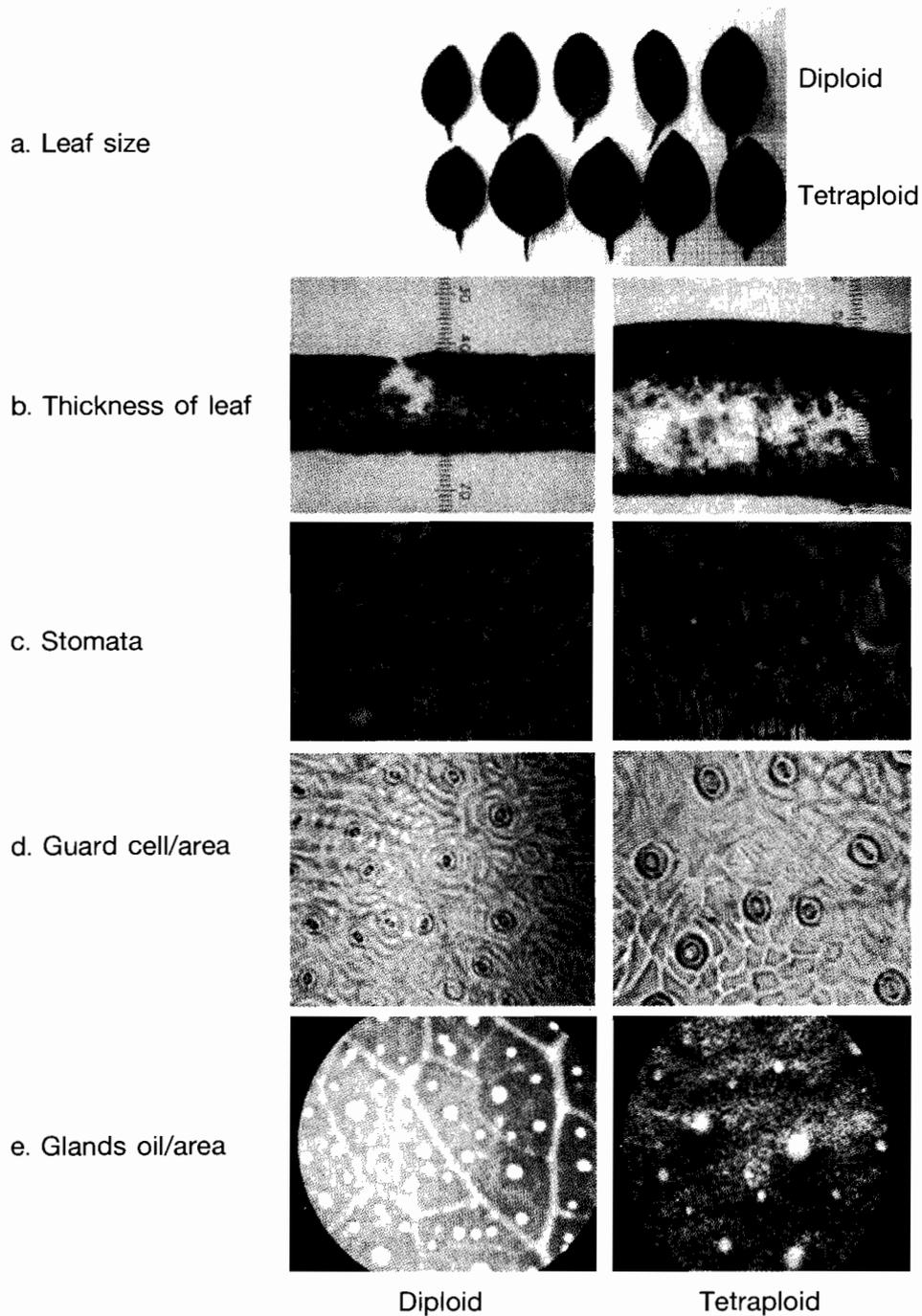


Figure 3. Comparative morphology of leaf between the diploid and tetraploid limes

4. ผลการศึกษาคุณภาพทางเคมีของน้ำมะนาว

ในการวัดปริมาณกรดรวมในน้ำมะนาว 100 มล. เปรียบเทียบระหว่างดิพลอยด์กับพอลิ-พลอยด์ พบว่าในน้ำมะนาวดิพลอยด์มีปริมาณกรดรวม 5.69 ก. และพอลิพลอยด์มีปริมาณกรดรวม 6.28 ก.

Table 3. Comparison of fruit characteristics between diploid and tetraploid

Characteristics	Diploid (mean)	Tetraploid (mean)	Different from diploid
1. Diameter of fruit(cm)	3.87	5.15	+1.28
2. Height of fruit (cm)	3.41	4.89	+1.48
3. Thickness of peel (mm)	1.75 ± 0.50	3.50 ± 0.58	+1.75
4. Size of segment			
width (mm)	18.95 ± 1.53	21.18 ± 1.96	+2.23
length (mm)	35.52 ± 2.23	40.50 ± 4.12	+4.98
5. Weight of segment (g)	3.89 ± 0.91	4.93 ± 1.54	+1.04
6. Number of seed per fruit	12.5 ± 3.70	30.5 ± 7.90	+18
7. Width of seed (mm)	4.39 ± 0.84	5.07 ± 0.96	+0.68
8. Length of seed (mm)	9.50 ± 9.66	9.64 ± 1.64	+0.14

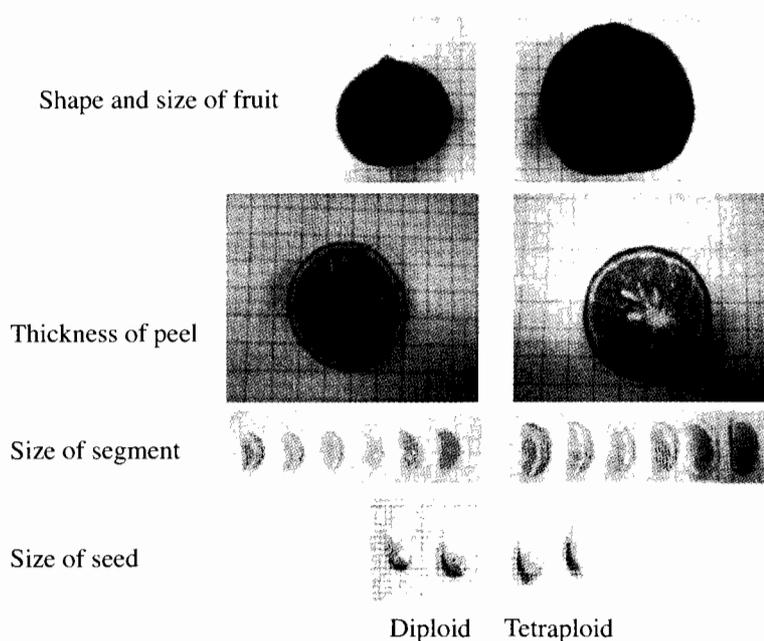


Figure 4. Morphological characteristic of fruit and seed comparison between diploid and tetraploidy limes

การใช้สารโคลชิซินเป็นเครื่องมือในการยับยั้งกระบวนการไมโทซิสในบริเวณเนื้อเยื่อเจริญของพืช โดยมีเป้าหมายเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดของโครโมโซม และเปลี่ยนสภาพของเซลล์จากดิพลอยด์เป็นพอลิพลอยด์วิธีการนี้ถูกนำมาใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชหลายชนิดซึ่งส่วนใหญ่เป็นไม้ดอกไม้ประดับและพืชอาหารสัตว์ (Rose et al., 2000.; Jaskani et al., 2005.; Koutoulis et al., 2005; Liu et al., 2007; Wei et al., 2007; Ye et al., 2010) และบางส่วนมีการทดลองกับไม้ผลและพืชผัก เช่น พุทรา Japanese quince ทับทิมและแอสฟารากัส (Kumitake, et al., 1998. ; Shao et al., 2003.; Gu et al., 2005; Stanys et al., 2006.)

สำหรับพืชวงศ์ส้มในประเทศไทยมีรายงานการชักนำให้มะนาวลูกผสม คัมควท ส้มและมะนาวฝรั่งเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมด้วยสารโคลชิซินและสารเคมีอื่น ซึ่งผลการทดลองพบการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดของโครโมโซมเกิดขึ้น (อริยา, 2540; สุนทรีย์, 2542; สถาพรและคณะ, 2554 ; เทิดไทย, 2552) ซึ่งจากรายงานดังกล่าวพบว่าเนื้อเยื่อพืชวงศ์ส้มที่ถูกนำมาใช้ชักนำมีความแตกต่างกันคือ อาจเป็นชิ้นส่วนของต้นกล้าและเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ หรือการชักนำจากตากิ่ง ปลายยอดและเนื้อเยื่อเจริญในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ความเข้มข้นของสารโคลชิซินแตกต่างกันไปตามสภาพของเนื้อเยื่อ ซึ่งโดยทั่วไปอยู่ในช่วง 0.05-2% สำหรับในการศึกษาคั้งนี้ได้เลือกใช้สารโคลชิซิน

0.4% ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่มีการนำมาใช้ในพืชวงศ์ส้มดังกล่าวมา และใช้วิธีการแช่เมล็ดที่ลอกเปลือกออกแล้ว เวลาที่ใช้ 6 8 10 และ 24 ชม. เมื่อต้นกล้าที่ผ่านการแช่เมล็ดส่วนใหญ่ไม่รอดชีวิตเหลือเพียงที่การทดลอง 0.4% เป็นเวลา 6 ชม. ที่พบว่ารอดชีวิตจำนวน 6 ต้น โดยมี 1 ต้นที่ตรวจสอบโดยวิธีการนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากที่งอกจากเมล็ดที่เกิดจากผลของต้นทดลองอายุ 3-4 ปี พบว่าเป็นเทตระพลอยด์โดยมีจำนวนโครโมโซม $2n = 4x = 36$ (ดิพลอยด์ $2n = 2x = 18$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Flow cytometry ซึ่งพบว่าต้นเทตระพลอยด์มีปริมาณ ดีเอ็นเอมากกว่าดิพลอยด์เท่าตัว

จำนวนโครโมโซมของมะนาวเทตระพลอยด์ในรายงานนี้มีจำนวนเท่ากับรายงานอื่นๆที่มีผู้ศึกษาไว้แล้ว (อริยา, 2540 ; สุนทรีย์, 2542 ; Krug 1943; Cameron, 1968) แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาคั้งนี้ ยังพบว่าพื้นฐานทางพันธุกรรมของมะนาวส่วนใหญ่เป็นแอนูพลอยด์คือในต้นดิพลอยด์พบจำนวนโครโมโซมในแต่ละเซลล์อยู่ในช่วง 13-22 โครโมโซมโดยพบเซลล์ที่มี 18 โครโมโซมมากที่สุดที่ 48.53% และทำนองเดียวกันเมื่อถูกชักนำให้เป็นเทตระพลอยด์จำนวนโครโมโซมก็มีความแปรผันโดยอยู่ในช่วง 20-38 โครโมโซมแต่พบเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 36 มากที่สุด (38.11%) ซึ่งผลการศึกษาไปในทิศทางเดียวกับรายงานความเป็นไปได้ในการเกิดแอนูพลอยด์ในลูกผสมของพืช

วงศ์ล้ม (Esen and Soost, 1972)

การศึกษาทางสัณฐานวิทยาของใบและผล พบว่าลักษณะของใบจากต้นเทพระ-พลอยด์มีลักษณะกลมกว่า ขนาดของใบความหนาของใบ และขนาดของเซลล์คุมใหญ่กว่าต้น ดิพลอยด์ ส่วนความหนาแน่นของจำนวนปากใบ และปริมาณต่อมน้ำมันที่ใบต้นเทพระพลอยด์พบน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ ซึ่งผลดังกล่าวจะไปในทิศทางเดียวกับรายงานผลการทดลองของผู้วิจัยที่เคยทำมาแล้ว (อริยา, 2540 เทิดไทย, 2552; สถาพรและคณะ, 2554)

สำหรับผลของต้นเทพระพลอยด์อาจไม่มีคุณค่าในการนำไปบริโภคเพราะผลมีขนาดใหญ่ ผิวหนา และขรุขระอีกทั้งมีการติดเมล็ดจำนวนมาก การติดผลไม่ตก แต่หากมีการพิจารณานำไปใช้ประโยชน์อื่น เช่น สกัดองค์ประกอบที่มีความเป็นกรดและสารอื่นเช่นกรดซิตริก มาลิก เพคติน หรือสารหอมระเหยเช่น limonene (Kale and Adsule, 1995 Show, 1979; Ranganna *et al.*, 1983) เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์อื่นก็อาจมีความเป็นไปได้สูงเพราะจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณกรดรวมในต้นเทพระพลอยด์มีปริมาณสูงกว่าต้นดิพลอยด์

ส่วนคุณค่าในด้านการปรับปรุงพันธุ์นั้น มะนาวเทพระพลอยด์นับว่ามีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผสมข้ามกับต้นดิพลอยด์เพื่อวัตถุประสงค์ในการสร้างสายพันธุ์ทรพลอยด์ที่ให้ผลไม่มีเมล็ด และนอกจากนี้ด้วยคุณสมบัติของเทพระพลอยด์ที่มีความทนทานต่อความเครียดในสิ่งแวดล้อมเช่นความ

แล้ง ความเค็มได้ดีกว่าดิพลอยด์ (Li *et al.*, 1996; Pustovoitova *et al.*, 1996) ดังนั้นการใช้ต้นต่อมะนาวเทพระพลอยด์สำหรับพืชวงศ์ล้มด้วยกันจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความเป็นไปได้สูง

สรุปผลการทดลอง

การชักนำมะนาวแป้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดของโครโมโซมเป็นเทพระพลอยด์ โดยใช้วิธีการนำเมล็ดแช่ในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.4% เป็นเวลา 6 ชม. พบการเปลี่ยนแปลงเป็นเทพระพลอยด์ 16% และจากการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสของต้นเทพระพลอยด์ พบว่ามีปริมาณมากกว่าดิพลอยด์เท่าตัว จำนวนโครโมโซมที่นับได้จากเซลล์ปลายรากของเมล็ดจากต้นเทพระพลอยด์เท่ากับ 36 แท่ง (ดิพลอยด์ 18 แท่ง) ต้นเทพระพลอยด์มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของใบโดยมีใบสีเขียวเข้ม หนาและรูปร่างป้อมกว่า ผลมีขนาดใหญ่ผิวขรุขระและมีเปลือกหนากว่าดิพลอยด์ นอกจากนี้มีปริมาณของกรดรวมในน้ำมะนาวจากต้นเทพระพลอยด์มีมากกว่าต้นดิพลอยด์

คำขอบคุณ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยศิลปากร และได้รับความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือ Flow cytometer จากศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม

เอกสารอ้างอิง

- นิรนาม. 2012 *การปลูกมะนาว*. http://www.sisaket.go.th/WEB_Idd/Plant/Page07.htm. 13/7/2012.
- เทิดไทย แก้วทองค้. 2552. จำนวนชุดโครโมโซมจากต้นกล้าสัมพันธุ์สายน้ำผึ้งกับสัมพันธุ์โอเชียนจากเมล็ดขนาดเล็กและการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยการใช้สารเคมีในพืชวงศ์ส้ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพืชสวน มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 180 หน้า.
- สถาพร มณี สท ตุลพงษ์ สุรีย์พร เจริญประเสริฐ และเศรษฐา ศิริพิันธ์. 2554. การเพิ่มชุดโครโมโซม และการผลิตต้นกล้าที่มีโครโมโซม 3 ชุดของมะนาวน้ำหอมมะนาวแป้นทะวาย และคัมควอทโดยการใช้สารโคลชิซิน และสารไตรฟลูราลิน. หน้า 572-581. In : *The 12th Graduate Research Conference*, 12-13 กุมภาพันธ์ 2009, Khon Kaen University.
- สุนทรีย์ สุรคร. 2542. ผลของโคลชิซินที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเมล็ดและยอดของส้มเขียวหวานในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพืชสวน มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 99 หน้า.
- อริยา สาตรพันธ์. 2540. การชักนำให้มะนาว (*Citrus aurantifolia* Swingle) เป็นโพลีพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ดุสิตบัณฑิต (เกษตรเขตร้อน) สาขาวิชาเกษตรเขตร้อน (พืชสวน) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ 110 หน้า.
- Amador, J. 2005. Laboratory Manual Procedures for Analysis of citrus products. *Anon FMC Technologies* : 24-95.
- Anon. The Wealth of India. A dictionary of Indian raw materials and industrial products, vol. 3. Pages 12-952. In : *Publications and information Directorate*. New Delhi : CSIR.
- Aryavand, A. B. Ehdai, B. Tran, J. G. Waines. 2003. Stomata frequency and size differentiate ploidy levels in *Aegilops neglecta*. *Genet. Res. Crop Evol.* 50 : 175-182.
- Barrett, H.C., D.J. Hutchinson. 1982. Occurrence of spontaneous octoploidy in apomictic seedlings of a tetraploid Citrus hybrid, *Proc. Int. Soc. Citric* 1 : 29-30.
- Cameron, J.W., H.B. Frost. 1968. Genetic breeding and nucellar embryony. Pages 325-370. In : *the Citrus Industry*, Reuther W., L.D., Batchelor H.J. Webber (eds.), University of California Press, Berkeley.

- Esen, A., R.K. Soost. 1972. Aneuploid in citrus. *Am. J. of Bot.* 59 (5): 473-477.
- Ezeonu, F.C., G.I. Chidume, S.C. Udedi. 2001. Insecticidal properties of volatile extracts of orange peels. *Bioresource Tech.* 76 : 273-274.
- Gu, X.F., A.F. Yang., H. Meng, J.R. Zhang. 2005. *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujube* Mill. cv. *Zhanhua*. *Plant Cell Report* 24 : 671-676.
- Hancock, J.F., 1997. The colchicines story. *Hortscience* 32 : 1011-1012.
- Hynniewta, M., S.K. Malik, S.R. Rao. 2011. Karyogical studies in ten species of *Citrus* (Linnaeus, 1753) (Rutaceae) of North-East India. *Comparative Cytogenetics* : 277-287.
- Jaskani, M.J., I.A. Khan and M.M. Khan. 2005. Fruit set, seed development and embryo germination in interpollid cross of citrus. *Scientia Horticulturae* 107 : 51-57.
- Jaskani, M.J., M.M. Khan, I.A. Khan. 2002. Growth, morphology and fruit comparison of diploid and tetraploid Kinnow Mandarin. *Pakistan J. of Agric. Sci.* 39 : 126-128.
- Kale, P.N. and P.G. Adsule. 1995. *Citrus*. Pages 39-65. *In : Handbook of Fruit Science and Technology. Production, Composition, Storage and Processing*, Salunkhe D.K. and S.S. Kadam (eds.), Marcel Dekker, New York,
- Kermani, M.J.,V. Sarasan, A.V. Roberts, K. Yokoya, J. Wentworth, V.K. Sieber. 2003. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1195-1200.
- Koutoulis, A., A.T. Roy, A. Price, L. Sherriff, G. Leggett. 2005. DNA ploidy level of colchicines-treated hops (*Humulus lupulus* L.). *Scientia Horticulturae* 105 (2): 263-268.
- Krug, C.A. 1943. Chromosome numbers in subfamily *Aurantiodeae* with special reference to the genus, *Citrus*. *Bot. Gaz*: 48 : 602-611.
- Kunitake, H.,T. Nakashima, K. Mori, M. Tanaka. 1998. Somaclonal and chromosomal effects of genotype, ploidy and culture duration in *Asparagus officinalis* L. *Euphytica* 102 : 309-316.
- Lehrer, J.M., M.H. Brand, J.D. Lebell. 2008. Induction of tetraploidy in

- meristematically active seeds of Japanese barberry (*Berberis thubergii* var. *atropurpurea*) through exposure to colchicine and *Oryza* L. *Scientia Horticulture*. 119 : 67-71.
- Li, W.L., G.P. Berlyn, M.S. Ashton. 1996. Polyploids and their structural and physiological characteristics relative to water deficit in *Betula papyrifera* (*Betulaceae*) *Am.J. Bot.* 83 : 15-20.
- Li, W., D.N. Li, H. Hu, X.Y. Chen. 2007. Polyploid induction of *Lespedeza formosa* by colchicines treatment. *Forestry Studies in China* 9 (4): 283-286.
- Liu, G.F., ZN. Li, M.Z. Bao. 2007. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. *Euphytica* 157: 145-154.
- Pustovoitova, T.N., G.V. Eremin, E.G. Rassvetaeva, N.E. Zhdanova, V.N. Zholkevich. 1996. Drought resistance, recovery capacity, and phytohormone content in polyploidy plum leaves, *Russian J. Plant Phys.* 43 : 232-235.
- Ranganna, S., V.S. Govindrajan, K.V.R. Ramana. 1983. Citrus fruit-varieties, chemistry, technology and quality evaluation. Part II. Chemistry, Technology and Evaluation. *CRC Critical Reviews in Food Sci. and Nutrition* 18 : 313.
- Rose, J.B., J. Kubba, K.R. Tobutt. 2000. Induction of tetraploidy in *Buddleia globosa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 63: 121-125.
- Saleh, B., T. Allario, D. Dambier, P. Ollitrault R. Morillon. 2008. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *Biologies* 331 : 703-710.
- Shao, J.Z., C.L. Chen, X.X. Deng. 2003. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 75: 241-246.
- Shaw, P.E. 1979. Review of quantitative analysis of citrus essential oils. of *Agric. and Food Chem.* 27 : 246-257.
- Soost, R.K. and J.W. Cameron, 1975. Citrus. Pages 507-540. In : *Adv. in Fruit Breed*, Janick J., J.N, Moore (eds.), Purdue University Press, West Lafayette.
- Stanys, V., A. Weckman, G. Staniene, P.Duchovskis. 2006. *In vitro* induction of polyploidy in Japanese

- quince (*Chaenomeles japonica*).
Plant Cell Tissue and Organ Culture
84: 263-268.
- Wei, L., H. Dong-nan, L. Hui, C. Xiao-yang.
2007. Polyploid induction of
Lespedeza formosa by colchicines
treatment. *Forestry Stud/China* 9
(4) : 283-286.
- Ye, Y.M., J. Tong, X.P. Shi, W. Yuan,
G.R.Li. 2010. Morphological and
cytological studies of diploid and
colchicines-induced tetraploid lines
of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.)
Scientia Horticulturae 124 : 95-101.