

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในมะเขือเทศโดยใช้สารโคลชิซิน
ในเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ปริญญานิพนธ์

ของ

กัลยา นารังวิศว

- 7 เม.ย. 2537.

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

กันยายน 2536

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการควบคุมและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปฏิญานพนธ์ฉบับนี้แล้วเห็นสมควร
รับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตวิชาเอกเคมีชีวภาพของ
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ได้

คณะกรรมการควบคุม

..... ประธาน
(อ.อรพินท์ แก้วลาย)

..... กรรมการ
(ดร.อนันต์ พุทธิศาสนภาพร)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน
(อ.อรพินท์ แก้วลาย)

..... กรรมการ
(ดร.อนันต์ พุทธิศาสนภาพร)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ดร.เสริมสิน ศิริวัฒนา)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปฏิญานพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศ.ดร.สมพร บัวทอง)

วันที่ 29 เดือน กันยายน พ.ศ. 2536

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จได้ด้วยคำแนะนำและการให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากอาจารย์อรพินท์ แก้วลาย ดร.อนันต์ พุทธิศาสนาสถาพร รศ.ดร.สมณฑา พรหมบุญ และ ดร.เสริมสิน ศิริวัฒนา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร.วิระพงศ์ เกียรติสุนทร ที่ให้ความสะดวกในการใช้เรือนเพาะชำ เป็นสถานที่ปลูกมะเขือเทศ และให้คำแนะนำช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ผู้วิจัยขอโน้มระลึกถึงพระคุณของคุณพ่อ คุณแม่ และกราบขอบพระคุณคุณครู อาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้มาตั้งแต่ต้นและขอขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ ที่ให้กำลังใจ

กัลยา ชำรงวิศว

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำและเอกสารอ้างอิง.....	1
	บทนำ	1
	ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	3
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	4
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	4
	เอกสารและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
	ลักษณะพฤกษศาสตร์และเซลล์วิทยาของมะเขือเทศ	5
	การใช้สารโคลชิซินชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์	5
	การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยการใช้เทคนิคการ	
	เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	6
	การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยใช้สารโคลชิซินในเทคนิค	
	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	7
2	วิธีดำเนินการค้นคว้าทดลอง	10
	อุปกรณ์และสารเคมี	10
	ขั้นตอนการวิจัย	11
	การศึกษาการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในมะเขือเทศโดยใช้	
	สารโคลชิซินด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	11
	การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากและปลายยอด	
	มะเขือเทศ	15
	การศึกษาลักษณะของมะเขือเทศที่ระดับโครโมโซมต่าง ๆ กัน	15
	การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	17

3 ผลการวิจัย	18
การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของมะเขือเทศที่	
เพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ	18
การศึกษาเซลล์วิทยา	23
การศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของมะเขือเทศ	29
การศึกษาคุณภาพผลของมะเขือเทศ	37
4 สรุป และอภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	39
การเจริญเติบโตของมะเขือเทศ ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ ..	39
การศึกษาเซลล์วิทยา	41
การศึกษาลักษณะของมะเขือเทศที่มีระดับโครโมโซมต่าง ๆ ...	44
การศึกษาคุณภาพของผล	45
ข้อเสนอแนะ	45
บรรณานุกรม	47
ภาคผนวก	54
ภาคผนวก ก	55
ภาคผนวก ข	60
ภาคผนวก ค	68
ประวัติย่อผู้วิจัย	76

บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

1	ระดับโครโมโซมปลายรากและปลายยอดของมะเขือเทศใน สภาวะต่าง ๆ	27
2	เปรียบเทียบลักษณะลำต้น ใบ ดอกมะเขือเทศดิพลอยด์และ โพลีพลอยด์	35
3	เปรียบเทียบลักษณะผล ปริมาณกรดในน้ำคั้น ปริมาณกรดแอสคอบิก และน้ำตาลรีดิวซิงของมะเขือเทศต้นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์ ..	38
4	ความสูงของมะเขือเทศที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ	61
5	จำนวนยอดของมะเขือเทศที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ	62
6	การเจริญของแคลลัสมะเขือเทศ ดิพลอยด์ และ โพลีพลอยด์ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ	63
7	จำนวนใบเฉลี่ยของมะเขือเทศ ดิพลอยด์ และ โพลีพลอยด์ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ	64
8	การเจริญของมะเขือเทศด้านความสูง จำนวนยอด ขนาดแคลลัส จำนวนใบเมื่อมีอายุได้ 6 สัปดาห์	65
9	ค่าพิสัยของลักษณะลำต้น และดอก มะเขือเทศต้นดิพลอยด์ และ โพลีพลอยด์	66
10	ค่าพิสัยของลักษณะใบมะเขือเทศดิพลอยด์ และโพลีพลอยด์	66
11	ค่าพิสัยของลักษณะผล ปริมาณกรดในน้ำคั้น ปริมาณกรดแอสคอบิก และปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงของมะเขือเทศ	67
12	การวิเคราะห์ X^2 การเกิดโพลีพลอยด์ของมะเขือเทศในสภาวะ ต่าง ๆ	69
13	ค่า df และค่า t-test ความแตกต่างของลักษณะมะเขือเทศ...	75

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แผนผังวิธีการทดลองชักนำให้มะเขือเทศเกิดโพลีพลอยด์โดยใช้ สารโคลชิซินในเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	14
2 ความสูงของมะเขือเทศต้นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์จากการ เพาะเลี้ยงตาข้างในสภาวะต่าง ๆ	21
3 จำนวนยอดมะเขือเทศจากการเพาะเลี้ยงตาข้างในสภาวะ ต่าง ๆ	22
4 ลักษณะมะเขือเทศต้นโพลีพลอยด์ และดิพลอยด์ จากการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่ออายุได้ 6 สัปดาห์	24
5 จำนวนโครโมโซมจากปลายรากมะเขือเทศ	25
6 การเกิดโพลีพลอยด์ของมะเขือเทศจากการนับจำนวนของ โครโมโซมปลายรากและปลายยอด	26
7 ลักษณะต้นมะเขือเทศดิพลอยด์และโพลีพลอยด์เมื่อนำออกปลูก ...	31
8 ลักษณะใบมะเขือเทศต้นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์	32
9 ลักษณะของปากใบและจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของ มะเขือเทศดิพลอยด์และโพลีพลอยด์	33
10 ลักษณะดอกมะเขือเทศต้นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์	34
11 ลักษณะผลมะเขือเทศต้นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์	36

บทที่ 1

บทนำและเอกสารอ้างอิง

บทนำ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่นับวันจะมีความสำคัญและความต้องการมากขึ้น โดยนำมารับประทานสดหรือเป็นวัตถุดิบสำหรับโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์มะเขือเทศ ได้แก่ น้ำมะเขือเทศข้น มะเขือเทศผง และซอสมะเขือเทศ

จากรายงานกรมวิชาการเกษตร ผลผลิตมะเขือเทศปี 2531/32 รวมทั้งประเทศ 69,564 ตัน จากพื้นที่ปลูก 37,624 ไร่ และปี 2533/34 ผลผลิตรวมทั้งประเทศ 171,850 ตัน จากพื้นที่ปลูก 86,018 ไร่ ในปี 2533 มะเขือเทศสดมีมูลค่าการส่งออก 5.9 ล้านบาท และปี 2534 มีมูลค่า 3.3 ล้านบาท มูลค่าการส่งออกมะเขือเทศลดลง น่าจะเนื่องจากการนำมะเขือเทศมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมภายในประเทศมากขึ้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, ม.ป.ป.)

โรงงานอุตสาหกรรมมีความต้องการมะเขือเทศที่มีลักษณะ ผลใหญ่ เนื้อหนา ผลสุกพร้อมกันและมีสีแดงสม่ำเสมอ เมื่อเก็บเกี่ยวผล ขั้วผลจะหลุดได้ง่าย ใ้กลางผลไม่แข็ง เปลือกหนาเหนียว เมล็ดน้อย มีคุณค่าทางอาหารสูง (เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธิ. ม.ป.ป.; สมภพ ฐิตะวสันต์. 2530)

มะเขือเทศพันธุ์เพชรเตอร์ 490 เป็นพันธุ์หนึ่งที่มีลักษณะผลสุกสีแดงสม่ำเสมอ เป็นที่ต้องการของโรงงานอุตสาหกรรมแต่ยังมีผลผลิตและความต้านทานโรคต่ำ การเร่งขยายพันธุ์และการคัดเลือกพันธุ์ตามธรรมชาติไม่สามารถทำให้มะเขือเทศเพิ่มผลผลิตได้สูงขึ้นอย่างรวดเร็วตามความต้องการ รวมทั้งความต้องการมะเขือเทศมีมากในบางช่วง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องปรับปรุงพันธุ์โดยทางชักนำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรมเพื่อให้ได้ลักษณะใหม่ ๆ ตามต้องการ และลักษณะเหล่านี้สามารถถ่ายทอดสู่ลูกหลาน ลักษณะการแปรผันทางพันธุกรรมที่สามารถถ่ายทอดได้ ย่อมเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวน หรือโครงสร้างโครโมโซม

รวมทั้งอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน ด้วยการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับโครโมโซมหรือยีน มีวิธีการต่าง ๆ วิธีการที่นิยมอย่างกว้างขวาง คือการชักนำให้พืชมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มจาก 2 ชุด เป็นหลายชุดที่เรียกว่าเกิดโพลีพลอยด์ (polyploid)

การเกิดโพลีพลอยด์เป็นปรากฏการณ์ที่เซลล์เกิดการแบ่งเซลล์ แต่ไม่มีขอบเขตของเซลล์มาขึ้น มีผลให้เซลล์ใหม่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น ได้มีการนำโพลีพลอยด์มาใช้ในการศึกษาทางพันธุกรรมและการผลิตพันธุ์พืช พืชที่เป็นโพลีพลอยด์มักมีลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิมในด้านขนาด รูปร่าง ปริมาณสารอาหารและปริมาณอัลคาลอยด์ ทั้งนี้ผลการเปลี่ยนแปลงจะได้ลักษณะดีมากขึ้นหรือน้อยขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางพันธุกรรม (Dermen. 1940; Evans and Sharp. 1983; Vasil. 1986; Lavanina and Sangeeta. 1991) ลักษณะของพืชโพลีพลอยด์ที่น่าสนใจ คือ มีจำนวนดอกมากขึ้น ดอกและผลมีขนาดใหญ่ จำนวนเมล็ดน้อย ปริมาณคุณค่าทางอาหารของผลเพิ่มขึ้น (วิมล ขวัญเกื้อ. 2527; Dermen. 1940; Chen and Goeden-Kallemeyn. 1979; Ugborogho and Sodipo. 1987)

การเกิดโพลีพลอยด์มักพบได้ยากในธรรมชาติ จึงจำเป็นต้องมีการชักนำให้เกิดขึ้นโดยทั่วไปมักมีการเริ่มทำจากต้นดิพลอยด์ด้วยวิธีการต่าง ๆ กัน ได้แก่ การใช้รังสี การใช้อุณหภูมิ ซึ่งมักใช้อุณหภูมิต่ำ ๆ ระหว่าง 0 - 6 องศาเซลเซียส การใช้สารเคมี ได้แก่ โคลชิซิน (Dermen. 1940; Hermesen and Deboer. 1971; Downes and Marshall. 1983; Mercy Kutty and Kumar. 1983; Hassan and others. 1991) ไนตรัสออกไซด์ (Watson. 1976) คาเฟอีน (Espino and Vazquez. 1981) และการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Ancora and Ramulu. 1981; Evans and Sharp. 1983; Rambaud, Dubois and Vasseur. 1992)

วิธีการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ที่ได้ผลดีและเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง คือการใช้สารโคลชิซิน เซลล์ซึ่งได้รับสารโคลชิซินจะมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น เนื่องจากขณะแบ่งเซลล์การก่อตัวและการทำงานของเส้นใยสปินเดิลถูกยับยั้งทำให้โครมาติดไม่สามารถเคลื่อนไปยังขั้วของเซลล์ อย่างไรก็ตามการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยใช้สารโคลชิซินมักมีผลให้พืชมีลักษณะเป็นไคเมอรา (chimera)

(วิมล ขวัญเกื้อ. 2527; Dermen. 1940) กล่าวคือ เกิดโพลีพลอยด์เพียงบางกลุ่มเนื้อเยื่อมีผลให้พืชแสดงลักษณะไม่สม่ำเสมอในต้นเดียวกัน (Satina, Blakeslee and Avery. 1940)

ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถนำมาใช้ขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมากและรวดเร็วตามความต้องการ นอกจากนี้มีรายงานว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ และการเกิดโพลีพลอยด์นี้จะช่วยให้เกิดลักษณะไคเมอราลดลง เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มเซลล์จำนวนน้อย (Vanharten, Bouter and Broertjes. 1981; Hermesen and others. 1981)

การใช้สารโคลชิซินร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการชักนำให้พืชเกิดโพลีพลอยด์ ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถชักนำให้พืชเกิดการกลายพันธุ์ได้ง่ายและรวดเร็วกว่าธรรมชาติ นอกจากนี้พบว่า ต้นโพลีพลอยด์ที่ได้มีลักษณะไคเมอราลดลงหรือไม่เกิดต้นที่เป็นไคเมอรา (Gupton. 1989; Kato. 1989) เทคนิคนี้สามารถนำมาปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรมทำให้ได้ลักษณะใหม่ ๆ ซึ่งเป็นลักษณะที่ติดตามต้องการได้ การใช้เทคนิคนี้ในการเพาะเลี้ยงมะเขือเทศ ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจจึงน่าจะเป็นแนวทางที่อาจทำให้ได้ลักษณะที่ดีมีคุณภาพและผลผลิตสูงตามต้องการ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงผลของการใช้สารโคลชิซินในสภาวะต่าง ๆ เพื่อชักนำมะเขือเทศให้เกิดโพลีพลอยด์ในเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและต้องการทราบว่าเทคนิคนี้สามารถลดการเกิดไคเมอราในมะเขือเทศได้หรือไม่

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเกิดโพลีพลอยด์โดยใช้สารโคลชิซินชักนำเมล็ดและตาข้างที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. เพื่อศึกษาความเข้มข้นของสารโคลชิซิน อุณหภูมิ และอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3. เพื่อศึกษาระดับโครโมโซมของมะเขือเทศที่เกิดจากการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ โดยใช้สารโคลชิซินในเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และลักษณะของมะเขือเทศต้นโพลีพลอยด์ที่ได้จากการชักนำโดยใช้สารโคลชิซินในเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับต้นดิพลอยด์

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. ทำให้ทราบวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการใช้สารโคลชิซินชักนำมะเขือเทศให้เกิดโพลีพลอยด์ โดยการใช้เมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาข้าง

2. ทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมเกี่ยวกับความเข้มข้นของสารโคลชิซิน อุณหภูมิ และสภาพอาหารเพื่อใช้ชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์เมื่อใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3. ทำให้ทราบระดับโครโมโซม และลักษณะของมะเขือเทศที่ได้จากการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ เพื่อเป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศต่อไป

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. พืชทดลอง

1.1 พืชทดลองใช้มะเขือเทศพันธุ์เฟชเชกเตอร์ 490 (P490)

1.2 ส่วนของพืชที่ใช้ คือ เมล็ดและตาข้าง

2. อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใช้สูตร มูราซิกิ และสกุค (Murashige and Skoog. 1962 - MS)

3. สารเร่งการเจริญเติบโต ได้แก่ สารกลุ่มออกซิน คือ α -naphthalene acetic acid (NAA) และสารกลุ่มไซโตไคนิน คือ 6-benzyladenine (BA)

4. โครโมโซมของมะเขือเทศศึกษาจากปลายรากของต้นมะเขือเทศ ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงตาข้างและเมล็ด จำนวน 2 ครั้ง และปลายยอดของต้นมะเขือเทศที่ปลูกในกระถาง

5. สถานที่ปลูกมะเขือเทศ เรือนเพาะชำ มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เอกสารและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะพฤกษศาสตร์และเซลล์วิทยาของมะเขือเทศ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) เป็นพืชล้มลุกจัดอยู่ในตระกูล Solanaceae สกุล *Lycopersicon* มีใบแบบใบประกอบผลเป็นแบบเบอร์รี่ อาจมีสีเหลือง ส้ม ชมพู และแดง ขนาดผลแตกต่างกัน ผลมีลักษณะกลมหรือรี ดอกเป็นดอกช่อประกอบด้วยดอกเล็ก ๆ 4 - 5 ดอก แต่ละดอกจะมีกลีบเลี้ยง 5-7 กลีบ จากการศึกษาลักษณะเซลล์วิทยาของมะเขือเทศพบว่า มีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 24$ และมียีนอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 คู่ เป็นจำนวนมาก (สมภพ วิตะวสันต์, 2530)

การใช้สารโคลชิซินชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์

การใช้สารโคลชิซินชักนำให้พืชเกิดโพลีพลอยด์สามารถทำได้ โดยใช้ส่วนต่าง ๆ ของพืชอาจเป็นเมล็ด ต้นอ่อน หรือส่วนของพืชที่อยู่ในระยะเจริญเติบโต เมื่อเซลล์ในบริเวณเนื้อเยื่อเจริญได้รับสารโคลชิซินขณะเกิดการแบ่งเซลล์ ทำให้โครมาติดไม่สามารถแยกไปยังขั้วของเซลล์ และไม่มีผนังมาทับซ้อนเขตของเซลล์ เซลล์จึงมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเท่าตัว การใช้สารโคลชิซินแก่พืชแต่ละชนิดใช้ความเข้มข้นแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีความทนต่อสารโคลชิซินแตกต่างกัน สำหรับความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เหมาะสม ซึ่งนิยมใช้ในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ คือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 - 2.00 (Dermen, 1940)

การชักนำมะเขือเทศให้เกิดโพลีพลอยด์โดยใช้สารโคลชิซิน มีการใช้ความเข้มข้นและเวลา การใช้สารโคลชิซินแตกต่างกันซึ่งจะได้ผลแตกต่างกัน

มีรายงานว่าเมื่อแช่เมล็ดในสารละลายโคลชิซินที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.4 นาน 24 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงแต่จะเกิดโพลีพลอยด์เมื่อใช้เวลานานขึ้น ต้นที่เกิดขึ้นมีทั้งต้นเตตระพลอยด์และมิโกสปลอยด์ จากการศึกษาเซลล์วิทยาพบว่า มะเขือเทศที่ผ่านการให้สารโคลชิซิน ขณะแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสโครโมโซมมีทั้งแบบไบวาเลนต์และควอดริวาเลนต์ ส่วนใหญ่จะเป็นควอดริวาเลนต์ รวมทั้งโครโมโซมอาจเกิดทรานสโลเคชัน (translocation) และอะนาเฟสบริดจ์ (anaphase bridges) ด้วย (Bohn. 1947; Ugborogho and Sodipo. 1987) แต่เมื่อนำเมล็ดมะเขือเทศที่ผ่านการพอกฆ่าเชื้อที่ผิว แช่สารละลายโคลชิซินที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.125 ผสมวันแช่เข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 20 วัน พบว่า เกิดต้นมะเขือเทศเตตระพลอยด์ ร้อยละ 30 (Moens. 1963) นอกจากความเข้มข้นและเวลาการให้สารโคลชิซินแล้วชนิดมะเขือเทศ ก็มีผลต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ด้วย

มะเขือเทศที่เกิดโพลีพลอยด์จะมีผลขนาดใหญ่ และมีปริมาณวิตามินซีเพิ่มขึ้น (Dermen. 1940) เกียรติเกษตร (เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธ์. ม.ป.ป.) รายงานว่า มะเขือเทศที่มีปริมาณวิตามินซีสูงจะมีผลผลิตต่ำ มีผลขนาดเล็กและรูปร่างผลไม่สวยงามมะเขือเทศต้นโพลีพลอยด์ อาจมีลักษณะต้นไม่สมบูรณ์ ประกอบ เช่น ส่วนต่าง ๆ จะอวบอ้วนและการเติบโตช้า (Bohn. 1947) ใบเลี้ยงยาวบวมและบิดเบี้ยว ใบมีขนดก ลำต้นมีปล้องสั้น (Ugborogho and Sodipo. 1987)

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชและประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรมและเกิดโพลีพลอยด์ การเกิดโพลีพลอยด์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะช่วยลดการเกิดลักษณะไคเมอรา เนื่องจาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากกลุ่มเซลล์จำนวนน้อย (Roest. 1977) นอกจากนี้มีรายงานว่า การเกิดโพลีพลอยด์จากการเพาะเลี้ยงและการรวม

โปรโตพลาสต์จะทำให้ได้จำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น ซึ่งได้ผลแน่นอนและโครโมโซมที่ได้มีลักษณะเหมือนกัน (Rambaud, Dubois and Vasseur. 1992)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก่อให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรม โดยมีผลให้จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นและเกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน (Evans and Sharp. 1983; Evans, Sharp and Medina - Filho. 1984; Uijtewaal. 1987) ปัจจัยที่ทำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรมอาจเนื่องจากสารเร่งการเจริญเติบโต โดยเฉพาะสารในกลุ่มออกซินจะมีโอกาสเกิดมาก มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารที่มี 2,4 - dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) kinetin (K) การใช้ 2,4-D ร่วมกับ K และการใช้น้ำมะพร้าวร่วมด้วยมีผลให้เกิดโพลีพลอยด์ได้ (Ghosh and Gadgil. 1979; Cappadocia and Ramulu. 1980; Ancora and Ramulu. 1981) ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและการย้ายเปลี่ยนอาหารโดยเฉพาะในระยะแคลลัสจะมีผลทำให้ระดับโครโมโซมเพิ่มสูงขึ้น (McCoy and Bingham. 1977; Cappadocia and Ramulu. 1980; Creemers-Molenaar and others. 1992) นอกจากนั้นลักษณะทางพันธุกรรมและชนิดของเนื้อเยื่อ ก็มีผลทำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศโดยใช้ ใบ ใบเลี้ยงไฮโปคอติล ลำต้นส่วนที่อยู่ระหว่างข้อ และอับละอองเรณู สามารถชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ได้ อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงตาข้างของมะเขือเทศพันธุ์เพชเชกเตอร์ 490 และพันธุ์เพชเชกเตอร์ 600 เพื่อศึกษาลักษณะการถ่ายทอดของสีผลโดยใช้อาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยการเติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดและรากโดยไม่มีการเติมสารเคมีใด ๆ เพื่อชักนำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรม พบว่าการถ่ายทอดลักษณะสีผลและจำนวนโครโมโซมไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ทิพย์วรรณ สุดปฐม. 2534)

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยใช้สารโคลชิซินในเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารที่มีสารก่อการกลายพันธุ์สามารถทำให้เกิดการแปรผันของโครโมโซมได้ง่ายและรวดเร็วกว่าเซลล์พืชที่ได้รับสาร

ที่ก่อการกลายพันธุ์ในสภาพที่เป็นต้น (Murashige and Nakano. 1974) โคลชิซินเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ ซึ่งมีการนำมาใช้ชักนำพืชให้เกิดโพลีพลอยด์ ในเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อได้รับความสำเร็จในพืชหลายชนิด ได้แก่การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของอ้อย (ทนง พรประดับเกียรติ. 2528) มันฝรั่ง (Weatherhead and Henshaw. 1979; Singh, Uhrig and Salamini. 1988) ออฟริกันไวโอเลต (Espino and Vazquez. 1981) ลิลลี่ (Chen and Goeden-Kallemeyn. 1979) การให้สารโคลชิซินทำได้ โดยรวมกับอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงพืช ซึ่งจะใช้เวลาเข้มข้นและระยะเวลา ต่างกันที่นิยม คือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.01-0.5 เวลา 2-3 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อและชนิดพืชที่ใช้ การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในเทคนิคนี้ อาจมีผลจากสารเร่งการเจริญเติบโตร่วมด้วย ซึ่งทำให้มีโอกาสเกิดโพลีพลอยด์ สูงขึ้น การทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสของลิลลี่ (*Hemerocallis flara*) ในอาหาร MS ซึ่งดัดแปลงโดยเติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ K 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและให้สารโคลชิซิน ความเข้มข้นต่างๆ ทำให้เกิดต้นโพลีพลอยด์ ร้อยละ 50.9 ซึ่งผลในการเกิดความแปรผันนี้น่าจะมีอิทธิพลของ 2,4-D ร่วมด้วย (Chen and Goeden-Kallemeyn. 1979)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารระยะหนึ่งก่อนการให้สารโคลชิซินจะ ชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์สูงขึ้น การเพาะเลี้ยงแคลลัสของลิลลี่ในอาหารก่อน 7 วัน แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารที่มีโคลชิซินสามารถชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ ร้อยละ 50.9 (Chen and Goeden - Kallemeyn. 1979) และการเพาะเลี้ยงข้อ ของโคลเวอร์ (*Trifolium spp.*) สามารถชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ได้ถึง ร้อยละ 81 จากการตรวจโครโมโซมปลายราก (Anderson and others. 1991)

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ จากการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อนอกจากจะเริ่มทำจากต้นดิพลอยด์แล้ว ยังสามารถเริ่มจากต้นทรिพลอยด์ (Ancora and Ramulu. 1981) ต้นเฮกซาพลอยด์ (Lyrene and Perry. 1982) และต้นแปปพลอยด์ (Weatherhead and Henshaw. 1979) โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูซึ่งเป็นเซลล์แปปพลอยด์ ทำให้ได้ต้น แปปพลอยด์ ซึ่งสามารถนำไปใช้ปรับปรุงพันธุ์ได้ มีรายงานการเพาะเลี้ยงอับ

ละอองเรณูของ *Solanum verrucosum* ปรากฏว่า เกิดต้นแฮปพลอยด์จากการ เพาะเลี้ยงเพียงร้อยละ 9 เมื่อนำต้นแฮปพลอยด์ที่ได้มาให้สารโคลชิซินความ เข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ทุกต้นมีจำนวนโครโมโซม เพิ่มขึ้น ต้นที่ได้มีดอกที่มีละอองเรณูจำนวนน้อยหรือไม่เกิดดอก แต่การเพาะเลี้ยง อับละอองเรณู *Solanum tuberosum* และให้สารโคลชิซินที่มีความเข้มข้น ร้อยละ 0.05 จะได้ต้นที่มีลักษณะแฮปพลอยด์และดิพลอยด์และนำมาทาบกับต้น มะเขือเทศทำให้ต้นเจริญเติบโตสามารถออกดอกได้ (Singh, Uhrig and Salamini. 1988)

การให้สารโคลชิซินโดยการเติมในอาหารเพาะเลี้ยงทำให้ลดการ เกิดไคเมอรา การเพาะเลี้ยงปลายยอดของ *Rubus* และนำมาแช่สารละลาย โคลชิซินความเข้มข้น ร้อยละ 0.02 - 0.08 แล้วแช่เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ต้นเตตระพลอยด์ที่ไม่มีลักษณะไคเมอรา (Gupton. 1989)

บทที่ 2

วิธีดำเนินการค้นคว้าทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ที่มีชั้นวางขวด ซึ่งได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ ช่วงแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน
2. สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสูตร มูราชิเกะและสกอท (Murashige and Skoog. 1962) (MS)
3. สารเร่งการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินและกลุ่มออกซิน ได้แก่ 6-benzyladenine (BA), α -naphthalene acetic acid (NAA)
4. สารโคลชิซิน (colchicine) Fluka Bio chemika
5. สารสำหรับฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ เอทานอล โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ทวิน 20 (tween 20) คลีนไซด์ (kleenacide) ดีเทอร์เจนต์ (detergent)
6. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซม ได้แก่ พาราไดคลอโรเบนซีน (p-dichlorobenzene) เอทานอล กลacial acetic acid (glacial acetic acid) อะซีโตคาร์มีน (aceto-carmin) ชนิดความเข้มข้นร้อยละ 2 กรดเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 5 อะซีโตอร์ซีน (aceto-orcein) ชนิดความเข้มข้นร้อยละ 2
7. สารเคมีสำหรับศึกษาลักษณะและคุณภาพผล ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดแอสคอบิก ฟีนอล์ฟทาลีน โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต กรดเกลือ กรดซัลฟูริก เอทานอล คอปเปอร์ซัลเฟต กลูโคส โพลแตสเซียมไอโอไดด์ โปตัสเซียมไดโครเมท โซเดียมไฮโอซิลเฟต แป้ง โพลแตสเซียมโซเดียมตาร์เตรท เมตาฟอสฟอริกอะซิติกแอซิด 2,6-ไดคลอโรอินโดฟินอล (2,6 - dichloroindophenol)

ขั้นตอนการวิจัย

1. การศึกษาการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในมะเขือเทศโดยใช้สารโคลชิซินด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1 ปลุกมะเขือเทศพันธุ์ P490 ในกระถางขนาด 8 นิ้ว จำนวน 10 ต้น นาน 2 เดือน

1.2 เตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.1 อาหารสูตร MS โดยเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 3 ร้อยละ 0.6 ปรับ pH 5.8 (MS)

1.2.2 อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงโดยการเติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (MSB_1)

1.2.3 อาหารแข็งสูตร MSB_1 และเติมสารโคลชิซิน ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ($MSB_1C_{0.05}$) และร้อยละ 0.1 ($MSB_1C_{0.1}$)

1.2.4 อาหารเหลวสูตร MSB_1 และเติมสารโคลชิซิน ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ($MSB_1C_{0.05}L$) และร้อยละ 0.1 ($MSB_1C_{0.1}L$)

1.2.5 อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงโดยการเติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ($MSN_{0.1}$)

นำอาหารที่เตรียมได้ทั้งหมดเทใส่ขวด ขวดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนั่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 การฟอกฆ่าเชื้อผิวเนื้อเยื่อมะเขือเทศ

1.3.1 เมล็ดแช่เมล็ดในสารละลายดีเทอร์เจนต์และคลีนไซด์ แล้วล้างน้ำหลาย ๆ ครั้ง และนำมาแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 และร้อยละ 5 ที่เติมทวิน 20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 10 นาที และ 5 นาที ตามลำดับแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นานครั้งละ 1 นาที และจุ่มเมล็ดในเอทานอลร้อยละ 95 แล้วนำมาผ่านเปลวไฟ

1.3.2 เนื้อเยื่อตาข้าง ตัดกิ่งมะเขือเทศที่ปลูกนาน 2 เดือน กิ่งที่ตัดมีข้อ 3 - 5 ข้อ ตัดใบออกนำมาฟอกฆ่าเชื้อ โดยล้างและแช่ในสารละลายดีเทอร์เจนต์และคลีนไซด์ และล้างออกหลาย ๆ ครั้ง นำส่วน

ข้อแช่ในสารละลายเอทานอลร้อยละ 70 นาน 1 นาที และนำมาแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 และ ร้อยละ 5 ที่เดิมทวิน 20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลานาน 15 นาที และ 20 นาที ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นานครั้งละ 1 นาที

1.4 การเพาะเลี้ยงเมล็ด นำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วแช่ในน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 0.1 และ 0.4 โดยแต่ละความเข้มข้นใช้เมล็ดจำนวน 40 เมล็ด ในสารละลายโคลชิซินปริมาณ 15 ลูกบาศก์เซนติเมตร เป็นเวลานาน 3 วัน แล้วนำไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเมื่ออายุได้ 4 สัปดาห์ ตัดรากศึกษาโครโมโซมและตัดส่วนยอดประมาณ 1-1.5 เซนติเมตรนำไปเลี้ยงในอาหาร MSN_{0.1} ชักนำให้เกิดรากเพื่อศึกษาโครโมโซมครั้งที่ 2 และย้ายสู่อาหาร MSN_{0.1} ชักนำให้เกิดรากเพื่อนำออกปลูก

1.5 การเพาะเลี้ยงตาข้างตัดเนื้อเยื่อกิ่งที่ฟอกฆ่าเชื้อบริเวณข้อยาว 2 มิลลิเมตร วางบนอาหารและเพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ ดังนี้

1.5.1 อาหาร MSB₁ เก็บที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นชุดควบคุม

1.5.2 อาหาร MSB₁ เก็บที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 7 วัน แล้วย้ายสู่อาหาร MSB₁ ที่เติมสารโคลชิซินความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 0.1 ทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลวนำไปเพาะเลี้ยงที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (MSB₁C_{0.05} MSB₁C_{0.1} MSB₁C_{0.05}L MSB₁C_{0.1}L) และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (MSB₁C_{0.05}T MSB₁C_{0.1}T MSB₁C_{0.05}LT MSB₁C_{0.1}LT) การทดลองทั้งหมดใช้เวลา 3 วัน โดยแต่ละชุดอาหารมี 20 ตัวอย่าง

1.5.3 นำเนื้อเยื่อจากข้อ 1.5.2 ย้ายสู่อาหาร MSB₁ และเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งมีอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ ช่วงแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน

1.6 นำต้นมะเขือเทศที่ได้จากข้อ 1.5.3 ซึ่งมีอายุ 6 สัปดาห์ มาชักนำให้เกิดราก โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร MSN_{0.1} เป็นเวลา 2 สัปดาห์

แล้วตัดรากเพื่อศึกษาโครโมโซมและชักนำให้เกิดรากใหม่ เพื่อศึกษาโครโมโซมครั้งที่ 2 หลังจากนั้นชักนำให้เกิดรากในอาหาร $MSN_{0.1}$ อีกครั้ง เพื่อนำออกปลูก

1.7 การปลูกมะเขือเทศ โดยนำต้นมะเขือเทศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดและตาข้าง ชุดละ 5 ตัวอย่าง ล้างวันออกให้สะอาดแล้วแช่ในยาป้องกันราและปลูกในถุงพลาสติกขนาดเล็กซึ่งบรรจุวัสดุปลูกที่ประกอบด้วยดิน:ทราย : แกลบ = 1 : 1 : 1 ซึ่งหนึ่งฟุตแช่แล้วเก็บต้นมะเขือเทศที่ปลูกในถุงนี้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในภาชนะควบคุมความชื้นที่เรือนเพาะชำเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จึงย้ายลงปลูกในกระถางขนาด 12 นิ้วที่เรือนเพาะชำ (ภาพประกอบ 1)

2. ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากและปลายยอดมะเขือเทศ

ตัดปลายรากมะเขือเทศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตาข้างและเมล็ดยาวประมาณ 2 เซนติเมตร โดยสับตัวอย่างชุดการทดลองละ 20 ต้น และจากปลายยอดของตาข้างจากต้นที่นำออกปลูก แخذในสารละลายย้อมตัวของพารา-ไดคลอโรเบนซีน นาน 20-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อจากนั้นนำมาแช่ในสารละลายคาร์นอย (Carnoy's fluid, เอทานอล : กรดอะซิติก = 3:1) นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วย้ายไปแช่ในสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม หลังจากนั้นนำปลายรากและปลายยอดนี้ แخذในสารละลายกรดเกลือเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้ง ตัดปลายรากยาวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร และปลายยอดวางบนสไลด์ และย้อมสีสำหรับปลายรากใช้สีอะซิโตคาร์มีน ส่วนปลายยอดใช้สีอะซิโตออร์ซิน บดเนื้อเยื่อด้วยแผ่นโลหะแบนปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดแล้วนำไปให้ความร้อน โดยผ่านเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ 2-3 ครั้ง คว่ำสไลด์บนกระดาษซับ แล้วใช้นิ้วหัวแม่มือกดบนสไลด์ให้ทั่วกระจกปิดแล้วนำไปตรวจหาโครโมโซม

3. ศึกษาลักษณะของมะเขือเทศซึ่งมีระดับโครโมโซมต่าง ๆ กัน

3.1 ลำต้น ศึกษาความสูง ความกว้างของทรงพุ่ม

3.2 ใบ ศึกษารูปร่าง ขนาด จำนวนปากใบ ขนาดของปากใบ จำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม โดยใช้ใบที่ 2-3 จากยอด ลอกเซลล์ผิวใบด้านล่างวางบนสไลด์ หยดสารละลายไอโอดีน ตรวจหา นับจำนวนปากใบและคลอโรพลาสต์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.3 ดอก ศึกษาจำนวนดอกต่อช่อ ขนาดของดอก

3.4 ผล ศึกษาขนาดของผล น้ำหนักผล และความหนาของเนื้อผล สีผล

3.5 ศึกษาคุณภาพผล โดยศึกษา

3.5.1 ปริมาณกรดในน้ำคั้น (titratable acidity, TA) โดยใช้ น้ำคั้นจากผลมะเขือเทศจำนวน 5 มิลลิลิตร ไตเตรทด้วยสารละลายเบสมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.095 N. จนกระทั่งถึงจุดสมมูลย์ ซึ่ง

สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนโดยใช้ฟีนอลฟทาลีนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นอินดิเคเตอร์ และนำปริมาณสารละลายเบสมาคำนวณหาปริมาณกรดในน้ำคั้นโดยใช้สูตร

$$\%TA = \frac{(N \text{ ของ NaOH}) (ml \text{ ของ NaOH ที่ใช้}) (0.06404) \times 100}{ml \text{ ของน้ำคั้นที่ใช้}}$$

3.5.2 ปริมาณกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid)

ตามวิธีของ A.O.A.C. (A.O.A.C. 1980) โดยการชั่งเนื้อมะเขือเทศหนัก 20 กรัม บดละเอียด เติมสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก - อะซีติก แอซิด (HPO_3 -HOAC) 20 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองวอกแมนเบอร์ 1 นำส่วนที่กรองได้จำนวน 2 มิลลิลิตร มาไทเทรตกับ dye-solution จนถึงจุดสมดุลง่าย คือเป็นสีชมพูอย่างน้อย 15 วินาที นำปริมาณ dye-solution ที่ใช้ไทเทรตมาคำนวณหาปริมาณกรดแอสคอร์บิก จากสูตร

$$\begin{aligned} &mg \text{ ของกรดแอสคอร์บิกต่อ } 100 \text{ g น้ำหนักสด} \\ &= \frac{ml \text{ ของ dye-solution} \times dye \text{ factor} \times ml \text{ ของสารตัวอย่างเริ่มต้น} \times 100}{ml \text{ ของสารตัวอย่างที่ใช้} \times g \text{ ของสารตัวอย่างที่ใช้}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} dye \text{ factor} &= \text{ค่าที่ได้จากการทำมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ตามวิธีของ} \\ &A.O.A.C. (A.O.A.C. 1980) \text{ ซึ่งเท่ากับ } \frac{0.5}{ml \text{ ของ dye-solution ที่ใช้}} \end{aligned}$$

3.5.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง (reducing sugar)

โดยอบมะเขือเทศที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน เมื่อแห้งสนิทนำมาบดให้ละเอียดแล้วนำมาสกัดน้ำตาลรีดิวซิง โดยการชั่งมะเขือเทศที่บดละเอียดแล้วหนัก 0.05 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอทานอลร้อยละ 50 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ปิดด้วยแผ่นกระดาษอลูมิเนียม และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เขย่าทุกครึ่งชั่วโมง

เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วกรองด้วยกระดาษกรองวอกแมนเบอร์ 40 นำสารละลายที่กรองได้ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่น และนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงโดยใช้สารละลายที่สกัดได้ ปริมาตร 2 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำยาเซฟเฟอร์ - โซโมจิคาร์บอเนต (Shaffer - Somogyi carbonate) จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันขณะเดียวกันทำแบลนด์ เพื่อเปรียบเทียบ (โดยใช้ น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง) ปิดจุกหลอดทดลองและนำไปวางในน้ำเดือดนาน 15 นาที แล้วค่อย ๆ เติมไอโอดีนไดออกไซด์ออกซาลेट (iodide - oxalate) หลอดละ 2 มิลลิลิตรอย่างช้า ๆ และตามด้วย $2\text{ N H}_2\text{SO}_4$ หลอดละ 3 มิลลิลิตร เขย่าและทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำที่เย็นจัด นาน 5 นาที เอาจปริมาณที่ได้จากการไตเตรทสารตัวอย่าง ลบแบลนด์ แล้วหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในสารตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับสารละลายกลูโคสที่รู้ปริมาณแน่นอนจากการทำกราฟมาตรฐาน

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. บันทึกผลการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ มะเขือเทศจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. นับจำนวนและถ่ายภาพโครโมโซมในระดับต่าง ๆ ที่ได้จากการชักนำมะเขือเทศให้เกิดโพลีพลอยด์
3. บันทึกและถ่ายภาพลักษณะต่าง ๆ ของมะเขือเทศต้นดิพลอยด์ และต้นโพลีพลอยด์
4. หาคณภาพผล จากปริมาณกรดจากน้ำคั้น กรดแอสคอบิกและ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงของมะเขือเทศต้นดิพลอยด์ และต้นโพลีพลอยด์

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของมะเขือเทศที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ

1.1 เมล็ด

เมื่อแช่เมล็ดมะเขือเทศในสารละลายโคลชิซินที่มีความเข้มข้น ร้อยละ 0.05 0.1 และ 0.4 เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS พบว่าเมล็ดทุกเมล็ดเริ่มงอกในสัปดาห์ที่ 1 มะเขือเทศ อายุ 3 สัปดาห์ จะมีความสูงเฉลี่ย 6 เซนติเมตร ทุกต้นสามารถเกิดราก เมื่อตัดยอดย้ายสู่อาหาร $MSN_{0.1}$ จะเกิดรากที่สมบูรณ์ รากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร $MSN_{0.1}$ จะแข็งแรงและมีจำนวนมากกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ต้นมะเขือเทศที่ได้จากการเพาะเมล็ดเป็นต้นที่สมบูรณ์ เจริญเติบโตรวดเร็ว และมีอัตราการรอดตายสูง ขณะเดียวกันจะได้ต้นที่ไม่มียอด ซึ่งเกิดใบเพียง 1-2 ใบ มีร้อยละ 11.66

1.2 ตาข้าง

เมื่อนำตาข้างมะเขือเทศเพาะเลี้ยงในอาหาร MSB_1 เป็นเวลา 7 วัน แล้วย้ายสู่อาหารที่มีสารโคลชิซินในสภาวะต่างๆ คือ $MSB_1C_{0.05}$ $MSB_1C_{0.1}$ $MSB_1C_{0.05}T$ $MSB_1C_{0.1}T$ $MSB_1C_{0.05}L$ $MSB_1C_{0.1}L$ $MSB_1C_{0.05}LT$ และ $MSB_1C_{0.1}LT$ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MSB_1 พบว่าตาข้างจะมีการเจริญเติบโตและเกิดเป็นยอดได้ภายใน 2 สัปดาห์ ขณะเดียวกันเกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดซึ่งแคลลัสที่เกิดขึ้นมีทั้งแบบหลวมและเกาะกันแน่น แคลลัสบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และมีสีน้ำตาลเข้มในสัปดาห์ที่ 3 ตาข้างที่ให้สารโคลชิซินในอาหารนี้เกิดแคลลัสสีน้ำตาลมากกว่าในอาหารเหลว และแคลลัสนี้บางส่วนตาย เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์ แคลลัสมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1

เซนติเมตร แคลลัสที่ได้บางส่วนเจริญเป็นรากแต่รากมีจำนวนน้อยและมีขนาดเล็กไม่สมบูรณ์ บางส่วนเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยเฉลี่ย 1 ตาข้างเกิด 2 ยอด ต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงตาข้างมีลักษณะต่างๆ บางส่วนเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ บางส่วนเจริญเป็นช่อดอกซึ่งสามารถเจริญต่อไปเกิดผลได้ บางส่วนเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์แต่อ่อนแอ และตายในที่สุดมีร้อยละ 16 และเจริญเป็นใบเพียง 1-2 ใบ ซึ่งมีร้อยละ 7.77

การเพาะเลี้ยงตาข้างในอาหารที่มีสารโคลชิซินในสภาวะต่าง ๆ คือ $MSB_1C_{0.05}$ $MSB_1C_{0.1}$ $MSB_1C_{0.05}T$ $MSB_1C_{0.1}T$ $MSB_1C_{0.05}L$ $MSB_1C_{0.1}L$ $MSB_1C_{0.05}LT$ และ $MSB_1C_{0.1}LT$ เป็นเวลา 3 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหาร MSB_1 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ได้ต้นโพลีพลอยด์ที่เกิดจากการให้สารโคลชิซินในสภาวะ $MSB_1C_{0.1}L$ เจริญดีที่สุดมีความสูงเฉลี่ย 2.84 เซนติเมตร และใน $MSB_1C_{0.1}$ มีการเจริญน้อยที่สุด มีความสูงเฉลี่ย 1.07 เซนติเมตร สำหรับต้นโพลอยด์จะเจริญได้ดีที่สุดเมื่อได้รับสารโคลชิซินในสภาวะ $MSB_1C_{0.05}LT$ มีความสูงเฉลี่ย 2.78 เซนติเมตร และเจริญน้อยที่สุดใน $MSB_1C_{0.1}LT$ มีความสูงเฉลี่ย 1 เซนติเมตร (ภาพประกอบ 2, ตาราง 4)

ต้นมะเขือเทศที่เกิดจากการให้สารโคลชิซินในอาหารแข็ง คือ $MSB_1C_{0.05}$ $MSB_1C_{0.1}$ $MSB_1C_{0.05}T$ $MSB_1C_{0.1}T$ และอาหารเหลว คือ $MSB_1C_{0.05}L$ $MSB_1C_{0.1}L$ $MSB_1C_{0.05}LT$ $MSB_1C_{0.1}LT$ การเจริญของต้นโพลีพลอยด์ที่ได้แตกต่างกัน กล่าวคือ ต้นโพลีพลอยด์ที่ได้จากการให้สารโคลชิซินในสภาพอาหารเหลวเจริญดีกว่าอาหารแข็ง ต้นที่มีความสูงเฉลี่ย 2.27 เซนติเมตร และ 1.33 เซนติเมตรตามลำดับ ส่วนต้นโพลอยด์ในอาหารเหลวและอาหารแข็งมีความสูงเฉลี่ย 2.16 เซนติเมตร และ 1.33 เซนติเมตรตามลำดับ (ภาพประกอบ 2)

ตาข้างที่ได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้นร้อยละ 0.05 คือ $MSB_1C_{0.05}$ $MSB_1C_{0.05}T$ $MSB_1C_{0.05}L$ $MSB_1C_{0.05}LT$ และความเข้มข้นร้อยละ 0.1 คือ $MSB_1C_{0.1}$ $MSB_1C_{0.1}T$ $MSB_1C_{0.1}L$ $MSB_1C_{0.1}LT$ ต้นมะเขือเทศมีความสูงแตกต่างกัน ความสูงของต้นมะเขือเทศ เมื่อให้สารโคลชิซินความเข้มข้นร้อยละ 0.05 มีมากกว่าความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ต้นโพลีพลอยด์ที่ได้มีความสูงเฉลี่ย 1.96 เซนติเมตร และ 1.64 เซนติเมตร

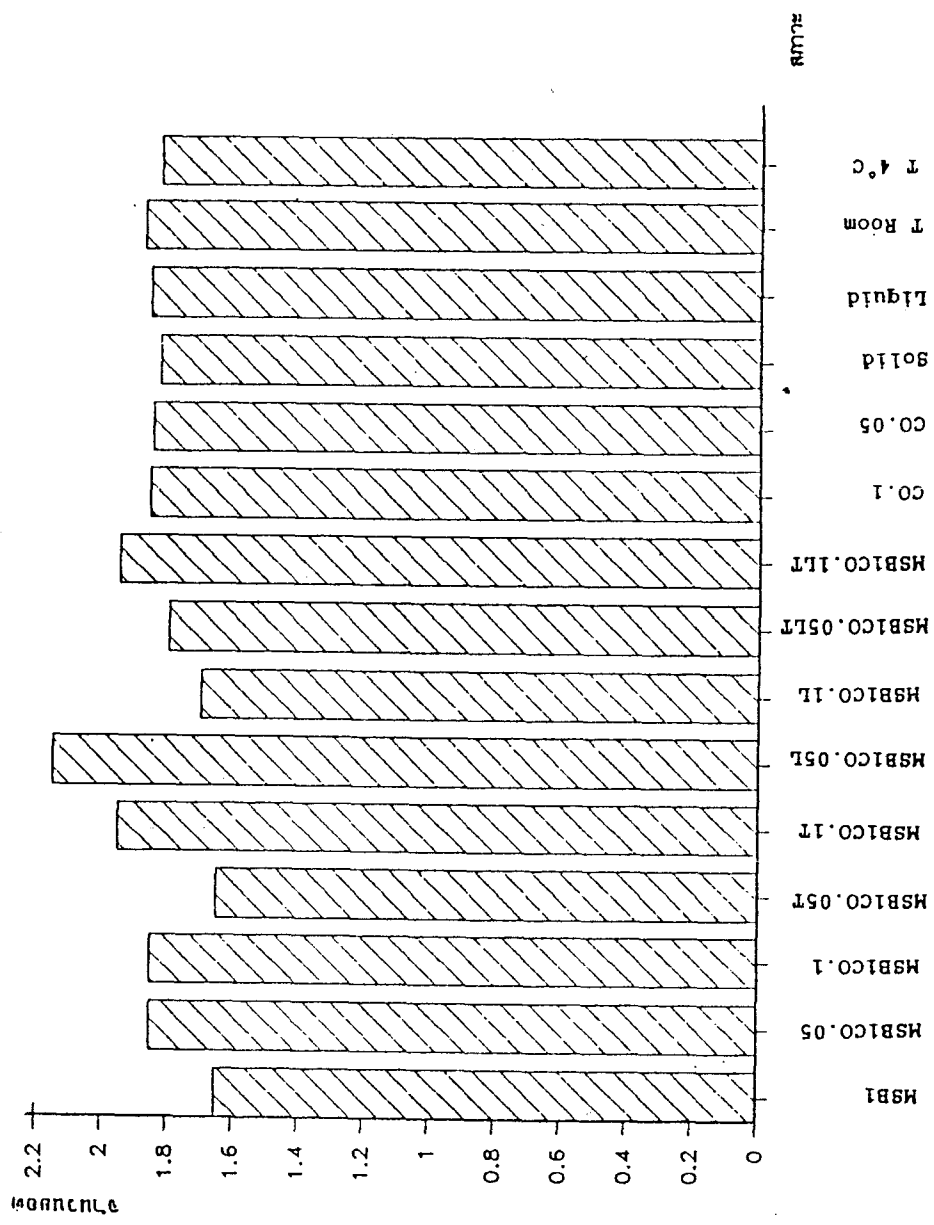
ตามลำดับ สำหรับต้นดิพลอยด์มีความสูงเฉลี่ย 1.83 เซนติเมตร และ 1.65 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพประกอบ 2)

ตาข้างมะเขือเทศที่ได้รับสารโคลชิซินที่อุณหภูมิห้อง คือ สภาวะ $MSB_1C_{0.05}$ $MSB_1C_{0.1}$ $MSB_1C_{0.05}L$ $MSB_1C_{0.1}L$ และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คือสภาวะ $MSB_1C_{0.05}T$ $MSB_1C_{0.1}T$ $MSB_1C_{0.05}LT$ และ $MSB_1C_{0.1}LT$ ต้นดิพลอยด์มีความสูงแตกต่างกัน ต้นมะเขือเทศที่ได้รับสารโคลชิซินที่อุณหภูมิห้องมีความสูงมากกว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีความสูงเฉลี่ย 2.01 เซนติเมตร และ 1.59 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนต้นดิพลอยด์มีความสูงเฉลี่ย 1.81 เซนติเมตร และ 2.16 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพประกอบ 2)

ตาข้างมะเขือเทศที่ได้รับสารโคลชิซินในสภาวะต่างกัน จะมีความสูงแตกต่างกัน โดยเฉพาะสภาวะการให้สารโคลชิซินในอาหารเหลวจะชักนำให้เกิดดิพลอยด์ได้สูงสุดและมีการเจริญด้านความสูงมากกว่าสภาวะอื่น อย่างไรก็ตามต้นมะเขือเทศดิพลอยด์และดิพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตาข้างมีความสูงเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบต้นมะเขือเทศที่เจริญจากตาข้างที่ผ่านการให้สารโคลชิซินและต้นควบคุม ซึ่งไม่ได้รับสารโคลชิซินปรากฏว่าต้นควบคุมเจริญได้ดีกว่า

ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารโคลชิซินในสภาวะต่าง ๆ จะเกิดยอดซึ่งเจริญเป็นต้น เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารโคลชิซิน เป็นเวลา 3 วัน แล้วย้ายสู่อาหาร MSB_1 พบว่า $MSB_1C_{0.05}L$ มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.15 ยอด และเฉลี่ยต่ำสุด 1.65 ยอด ในอาหาร $MSB_1C_{0.05}T$ การเพาะเลี้ยงตาข้างที่ให้สารโคลชิซินในสภาวะต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมตาข้างที่ผ่านการให้สารโคลชิซินจะเกิดยอดได้ดีกว่า (ภาพประกอบ 3, ตาราง 5)

เมื่อย้ายยอดที่ได้สู่อาหาร $MSN_{0.1}$ เกิดรากที่สมบูรณ์จำนวนมาก อาหาร MS และ $MSN_{0.1}$ สามารถชักนำให้เกิดรากได้แต่รากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงใน $MSN_{0.1}$ มีจำนวนมาก และแข็งแรงกว่า การสร้างรากบางต้นจะเกิดแคลลัสเล็กน้อยก่อนเกิดราก ตาข้างมะเขือเทศเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารโคลชิซิน แล้วย้ายสู่อาหารที่ไม่มีสารโคลชิซิน เมื่อเจริญเติบโตเป็นต้นมะเขือเทศ ใบที่สัมผัสกับอาหารมีลักษณะหนา แต่เมื่อย้ายสู่อาหาร $MSN_{0.1}$



ภาพประกอบ 3 จำนวนขยะเชื้อเพลิงจากการเผาเสียต่างในสถานะต่าง ๆ

ใบมีลักษณะปกติ ลักษณะมะเขือเทศต้นดีพลอยด์และโพลีพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตาข้างไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน (ภาพประกอบ 4)

2. การศึกษาเซลล์วิทยา

การศึกษาเซลล์วิทยาจากปลายรากมะเขือเทศ 2 ครั้ง พบว่ามะเขือเทศที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MSB_1 ที่ไม่เติมสารโคลชิซิน จำนวนโครโมโซมไม่เปลี่ยนแปลง คือ $2n = 24$ ส่วนมะเขือเทศที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารโคลชิซิน ในสภาวะต่าง ๆ คือ $SC_{0.05}$ $SC_{0.1}$ $SC_{0.4}$ $MSB_1C_{0.05}$ $MSB_1C_{0.1}$ $MSB_1C_{0.05}T$ $MSB_1C_{0.1}T$ $MSB_1C_{0.05}L$ $MSB_1C_{0.1}L$ $MSB_1C_{0.05}LT$ และ $MSB_1C_{0.1}LT$ เมื่อย้ายสู่อาหาร MSB_1 และ $MSN_{0.1}$ ทุกสภาวะ จำนวนโครโมโซมมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น (ภาพประกอบที่ 5)

จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมปลายรากครั้งที่ 1 จำนวนโครโมโซมปลายรากมะเขือเทศจากการเพาะเมล็ดในสภาวะ $SC_{0.05}$ $SC_{0.1}$ และ $SC_{0.4}$ เกิดต้นโพลีพลอยด์ ร้อยละ 40 50 และ 55 ตามลำดับ (ภาพประกอบ 6, ตาราง 1) การให้สารโคลชิซินเข้มข้นร้อยละ 0.4 เกิดโพลีพลอยด์มากที่สุด ต้นมะเขือเทศจากการเพาะเลี้ยงตาข้างที่ได้รับสารโคลชิซินในสภาวะ $MSB_1C_{0.05}$ $MSB_1C_{0.1}$ $MSB_1C_{0.05}T$ $MSB_1C_{0.1}T$ $MSB_1C_{0.05}L$ $MSB_1C_{0.1}L$ $MSB_1C_{0.05}LT$ และ $MSB_1C_{0.1}LT$ ได้ต้นโพลีพลอยด์ร้อยละ 55 60 50 50 40 65 65 75 ตามลำดับ (ภาพประกอบ 6, ตาราง 1) กล่าวได้ว่าสภาวะที่ชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ได้สูง คือ $MSB_1C_{0.1}LT$ ส่วน $MSB_1C_{0.05}L$ เกิดน้อยที่สุด (ภาพประกอบ 6) เมื่อตรวจหาเซลล์ปลายรากพบว่าจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 24 และมากกว่า 24 จำนวนโครโมโซมสูงสุดที่พบคือ 96 (ตาราง 1)

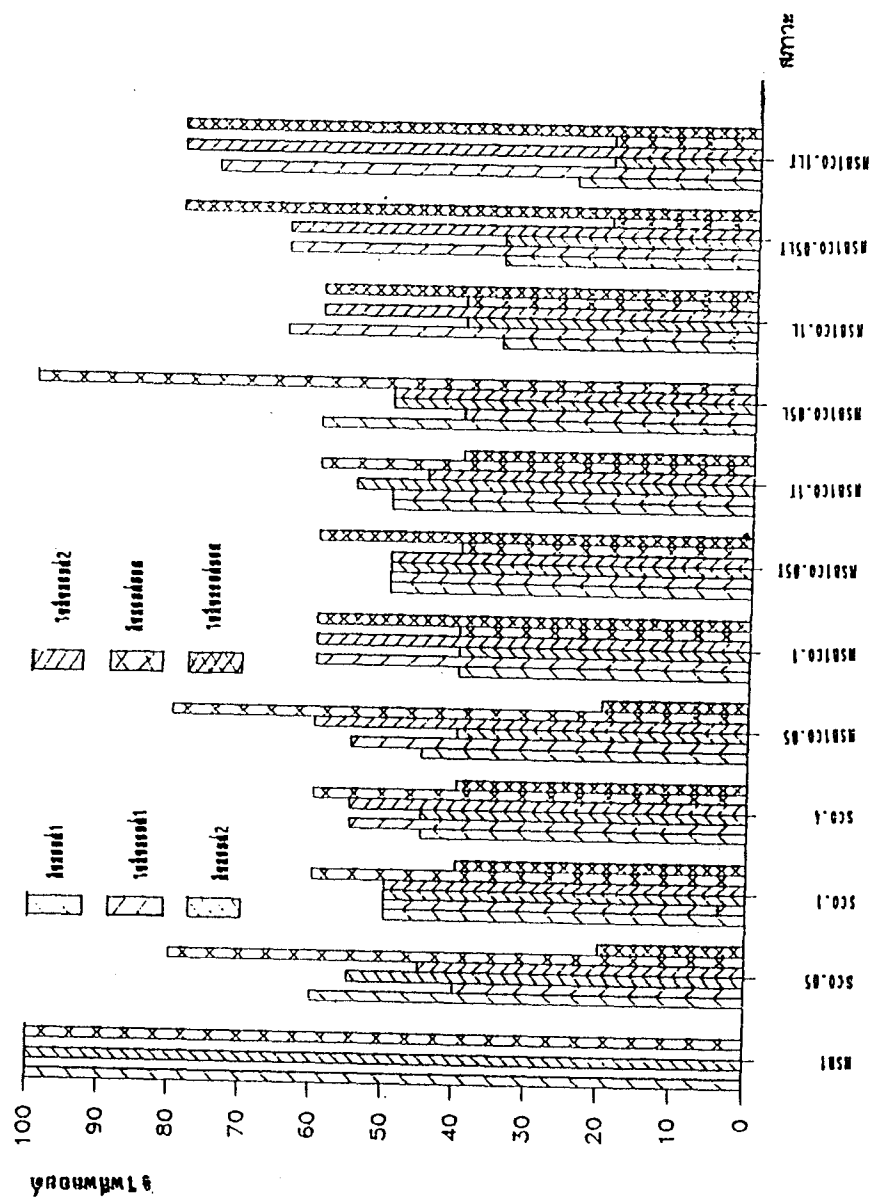
การตรวจนับจำนวนโครโมโซมปลายรากครั้งที่ 2 ต้นมะเขือเทศที่เกิดจากการได้รับสารโคลชิซินในสภาวะ $SC_{0.05}$ $SC_{0.1}$ และ $SC_{0.4}$ ได้ต้นโพลีพลอยด์ร้อยละ 45 50 55 ตามลำดับ ต้นมะเขือเทศจากการเพาะเลี้ยงตาข้างที่ให้สารโคลชิซินในสภาวะ $MSB_1C_{0.05}$ $MSB_1C_{0.1}$ $MSB_1C_{0.05}T$ $MSB_1C_{0.1}T$ $MSB_1C_{0.05}L$ $MSB_1C_{0.1}L$ $MSB_1C_{0.05}LT$ และ $MSB_1C_{0.1}LT$ ได้ต้นโพลีพลอยด์ร้อยละ 60 60 50 45 50 60 65 80



ภาพประกอบ 4 ลักษณะมะเขือเทศต้นโพลีลลอยด์ และดิพลอยด์ จากการ
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเมื่ออายุได้ 6 สัปดาห์
ก. โพลีลลอยด์ ข. ดิพลอยด์



ภาพประกอบ 5 จำนวนโครโมโซมจากปลายรากมะเขือเทศ กำลังขยาย 670 x
 ก. ดิพลอยด์ (24 โครโมโซม) ข. โพลีพลอยด์ (48 โครโมโซม)



ภาพประกอบ 6 การเกิดฟิสิกส์ของมะเขือเทศจากการนำจำนวนของรังสีจากปลายราก
และปลายยอด

ตาราง 1 ระดับของโรครวมที่ปลายรากและปลายยอดของมะเขือเทศในสภาวะต่าง ๆ

วิธีการทดลอง		จำนวนพืชที่ตายในสภาวะต่าง ๆ									
		ราก					ยอด				
		ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		
ความเข้มข้น สารเคมี	ชนิดพืช	จำนวน พืช	24-48 ชม.	24-96 ชม.	24-360 ชม.	24-360 ชม.	จำนวน พืช	24-48 ชม.	24-96 ชม.	24-360 ชม.	จำนวน พืช
1. ควบคุม	MSB1	20	20(100)	-	-	20(100)	5	5(100)	-	-	5
2. SC0.05	SC0.05	20	12(60)	7(35)	1(5)	8(40)	11(55)	8(40)	1(5)	9(45)	5
0.1	SC0.1	20	10(50)	10(50)	-	10(50)	10(50)	10(50)	-	10(50)	5
0.4	SC0.4	20	9(45)	11(55)	-	11(55)	9(45)	11(55)	-	11(55)	5
0.05	MSB1CO.05	20	8(40)	10(50)	1(5)	11(55)	8(40)	10(50)	2(10)	12(60)	5
0.1	MSB1CO.1	20	8(40)	11(55)	1(5)	12(60)	8(40)	11(55)	1(5)	12(60)	5
0.05	MSB1CO.05T	20	10(50)	8(40)	2(10)	10(50)	10(60)	10(50)	-	10(50)	5
0.1	MSB1CO.1T	20	10(50)	7(35)	3(15)	10(50)	11(55)	7(35)	2(10)	9(45)	5
0.05	MSB1CO.05L	20	12(60)	7(35)	1(5)	8(40)	10(50)	9(45)	1(5)	10(50)	5
0.1	MSB1CO.1L	20	7(35)	12(60)	1(5)	13(65)	8(40)	12(60)	-	12(60)	5
0.05	MSB1CO.05LT	20	7(35)	12(60)	1(5)	13(65)	7(35)	13(65)	-	13(65)	5
0.1	MSB1CO.1LT	20	5(25)	13(65)	2(5)	15(75)	4(20)	15(75)	1(5)	16(80)	5

ตามลำดับ (ภาพประกอบ 6, ตาราง 1) ต้นโพธิ์พลอยด์เกิดมากที่สุดเมื่อให้สารโคลชิซินในสภาวะ $MSB_1C_{0.1}LT$ และน้อยที่สุดใน $MSB_1C_{0.1}T$ (ภาพประกอบ 6)

การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากมะเขือเทศทั้งสองครั้ง ได้ผลคล้ายคลึงกันกล่าวคือ จำนวนโครโมโซมที่พบมี 24 และมากกว่า 24 จำนวนโครโมโซมสูงสุดที่พบคือ 96 ต้นโพธิ์พลอยด์เกิดได้มากที่สุดเมื่อให้สารโคลชิซินในสภาวะ $MSB_1C_{0.1}LT$ เมื่อเปรียบเทียบการชักนำให้เกิดโพธิ์พลอยด์โดยใช้ตาข้างกับเมล็ดปรากฏว่า ตาข้างเกิดโพธิ์พลอยด์มากกว่าเมล็ด

การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากปลายยอดของต้นมะเขือเทศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตาข้างแล้วนำออกปลูก ผลปรากฏว่าเมื่อให้สารโคลชิซินแก่เมล็ดในสภาวะ $SC_{0.05}$ $SC_{0.1}$ และ $SC_{0.4}$ เกิดต้นโพธิ์พลอยด์ร้อยละ 20 40 40 ตามลำดับ (ภาพประกอบ 6, ตาราง 1) สภาวะที่เกิดต้นโพธิ์พลอยด์มากที่สุดคือ $SC_{0.4}$ การเพาะเลี้ยงตาข้างที่ได้รับสารโคลชิซินในสภาวะต่าง ๆ คือ $MSB_1C_{0.05}$ $MSB_1C_{0.1}$ $MSB_1C_{0.05}T$ $MSB_1C_{0.1}T$ $MSB_1C_{0.05}L$ $MSB_1C_{0.1}L$ $MSB_1C_{0.05}LT$ และ $MSB_1C_{0.1}LT$ ได้ต้นโพธิ์พลอยด์ร้อยละ 20 60 60 40 0 60 80 80 ตามลำดับ (ภาพประกอบ 6, ตาราง 1) กล่าวได้ว่า สภาวะที่ชักนำให้เกิดต้นโพธิ์พลอยด์มากที่สุด คือ $MSB_1C_{0.05}LT$ และ $MSB_1C_{0.1}LT$ ส่วน $MSB_1C_{0.05}L$ ไม่พบต้นโพธิ์พลอยด์ (ภาพประกอบ 6, ตาราง 1)

จากการตรวจนับโครโมโซมปลายรากและปลายยอดปรากฏว่าจำนวนต้นที่เป็นโพธิ์พลอยด์จากปลายรากมีร้อยละ 50.4 โดยมีจำนวนโครโมโซมสูงสุดคือ 96 และโพธิ์พลอยด์จากปลายยอดมีร้อยละ 41.66 โดยมีจำนวนโครโมโซมสูงสุด คือ 48 (ตาราง 1) จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมปลายรากและปลายยอดได้ผลเช่นเดียวกัน คือ ต้นโพธิ์พลอยด์เกิดมากที่สุด ในสภาวะ $MSB_1C_{0.1}LT$ นอกจากนี้พบว่าเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟสของต้นโพธิ์พลอยด์มีขนาดของเซลล์ และนิวเคลียสใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์

ผลการนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากมะเขือเทศ ซึ่งให้สารโคลชิซินในสภาวะต่าง ๆ เมื่อวิเคราะห์ผลโดยใช้ X^2 (P0.05) พบว่าสภาวะที่ให้สารโคลชิซินเพื่อชักนำให้เกิดโพธิ์พลอยด์ระหว่างกลุ่มที่เพาะเลี้ยงเมล็ดและ

ตาข้าง ความเข้มข้นของสารโคเลสเตอรอล 0.05 และ 0.1 ลักษณะอาหารแห้ง และอาหารเหลว สภาพการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. การศึกษาลักษณะของมะเขือเทศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแล้วนำออกปลูกในเรือนเพาะชำ

ต้นมะเขือเทศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงปลูกในวัสดุปลูก โดยใช้ดิน : แกลบเผา : ทราาย = 1:1:1 การปลูกในภาชนะที่ควบคุมความชื้นก่อนออกปลูกในสภาพแวดล้อม ทำให้ได้ต้นมะเขือเทศที่มีการเจริญแข็งแรง และมีอัตราการรอดตายสูงถึงร้อยละ 97 ต้นมะเขือเทศโพลีพลอยด์เจริญเติบโตเร็วกว่าต้นดิพลอยด์ เมื่อปลูกในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ต้นมะเขือเทศโพลีพลอยด์มีความสูงและความกว้างทรงพุ่มมากกว่าต้นดิพลอยด์ (ภาพประกอบ 7) โดยต้นโพลีพลอยด์สูง 59.53 ± 11.95 เซนติเมตร และทรงพุ่มกว้าง 64.15 ± 7.76 เซนติเมตร ส่วนต้นดิพลอยด์สูง 54.38 ± 9.46 เซนติเมตร และทรงพุ่มกว้าง 63.00 ± 8.98 เซนติเมตร (ตาราง 2)

ลักษณะใบมะเขือเทศต้นโพลีพลอยด์และต้นดิพลอยด์มีความแตกต่างกัน (ภาพประกอบ 8) ต้นโพลีพลอยด์มีใบกว้าง และอัตราส่วนความกว้างต่อความยาวใบมากกว่าต้นดิพลอยด์ ทำให้ใบมีลักษณะกลมกว่าต้นดิพลอยด์ ต้นโพลีพลอยด์มีใบยาว 6.03 ± 0.70 เซนติเมตร กว้าง 2.87 ± 0.42 เซนติเมตร ต้นดิพลอยด์มีใบยาว 5.60 ± 0.57 เซนติเมตร กว้าง 2.55 ± 0.16 เซนติเมตร (ตาราง 2)

ปากใบมะเขือเทศต้นโพลีพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ โดยต้นโพลีพลอยด์มีปากใบยาว 0.031 ± 7.10 ไมโครเมตร และกว้าง 0.019 ± 3.73 ไมโครเมตร ต้นดิพลอยด์มีขนาดปากใบยาว 0.026 ± 3.24 ไมโครเมตร กว้าง 0.017 ± 3.96 ไมโครเมตร จำนวนและการกระจายตัวของปากใบมะเขือเทศต้นโพลีพลอยด์มีน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ โดยต้นโพลีพลอยด์มีจำนวนปากใบเฉลี่ย 290.41 ± 72.11 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร ส่วนต้นดิพลอยด์มีปากใบเฉลี่ย 309.89 ± 76.99 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร จำนวน

คลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของต้นโพลีพลอยด์มีจำนวนมากกว่ต้นดิพลอยด์ คือ ต้นโพลีพลอยด์มี 21.25 ± 4.83 และต้นดิพลอยด์มี 15.89 ± 2.30 (ตาราง 2, ภาพประกอบ 9)

มะเขือเทศต้นโพลีพลอยด์และต้นดิพลอยด์ออกดอกพร้อม ๆ กัน แต่ดอกจากต้นโพลีพลอยด์จะบานนานกว่าต้นดิพลอยด์ ดอกที่ได้จากต้นโพลีพลอยด์มีจำนวนดอกต่อช่อดอกมากกว่าต้นดิพลอยด์ โดยเฉลี่ยดอกจากต้นโพลีพลอยด์มี 3.59 ± 0.71 ดอกต่อช่อดอก ขณะที่ต้นดิพลอยด์มี 2.79 ± 0.52 ดอกต่อช่อดอก ดอกของต้นโพลีพลอยด์มีขนาดดอก ความกว้างของกลีบดอก และขนาดของอับละอองเรณูใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ ต้นโพลีพลอยด์มีดอกขนาด 2.43 ± 0.25 เซนติเมตร และดิพลอยด์ 2.15 ± 0.17 เซนติเมตร ต้นโพลีพลอยด์มีดอกสีเหลืองเข้มกว่าต้นดิพลอยด์ (ภาพประกอบ 10, ตาราง 2)

ผลมะเขือเทศต้นโพลีพลอยด์และต้นดิพลอยด์มีความแตกต่างกัน ลักษณะผลจากต้นโพลีพลอยด์ มีทั้งผลกลม และค่อนข้างกลมกันแหลม ขนาดผลใหญ่ รวมทั้งมีเนื้อผลหนากว่าต้นดิพลอยด์ (ภาพประกอบ 11) โดยผลจากต้นโพลีพลอยด์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.06 ± 0.32 เซนติเมตร น้ำหนักสด 110.35 ± 30.94 กรัม ความหนาของเนื้อผล 0.73 ± 0.18 เซนติเมตร ผลจากต้นดิพลอยด์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.22 ± 0.22 เซนติเมตร น้ำหนักสด 44.86 ± 10.92 กรัม และความหนาของเนื้อผล 0.59 ± 0.10 เซนติเมตร (ตาราง 3) ต้นโพลีพลอยด์บางต้นมีผลที่มีความแตกต่างกันมากคือ มีทั้งขนาดเท่ากับผลจากต้นดิพลอยด์และขนาดใหญ่กว่า แต่ผลที่ได้มีสีแดงสม่ำเสมอทั้งผล

มะเขือเทศต้นโพลีพลอยด์และต้นดิพลอยด์มีลักษณะต้น ใบ ดอก ผลแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามความแตกต่างก็เกิดขึ้นในกลุ่มเช่นกัน แต่จะพบว่าภายในกลุ่มต้นโพลีพลอยด์มีความแตกต่างมากกว่าต้นดิพลอยด์ จึงมีพิสัยกว้างกว่า (ตาราง 9, 10 และ 11)

ผลการศึกษาลักษณะของต้นมะเขือเทศต้นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์โดยใช้ t-test (P0.01) พบว่าลักษณะความสูงของต้น ทรงพุ่ม จำนวน ปากใบ ความยาวของปากใบ ความกว้างของปากใบ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ขนาดใบ จำนวนคลอโรพลาสต์ จำนวนดอก ขนาดของดอก ขนาดผล และน้ำหนักผล มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



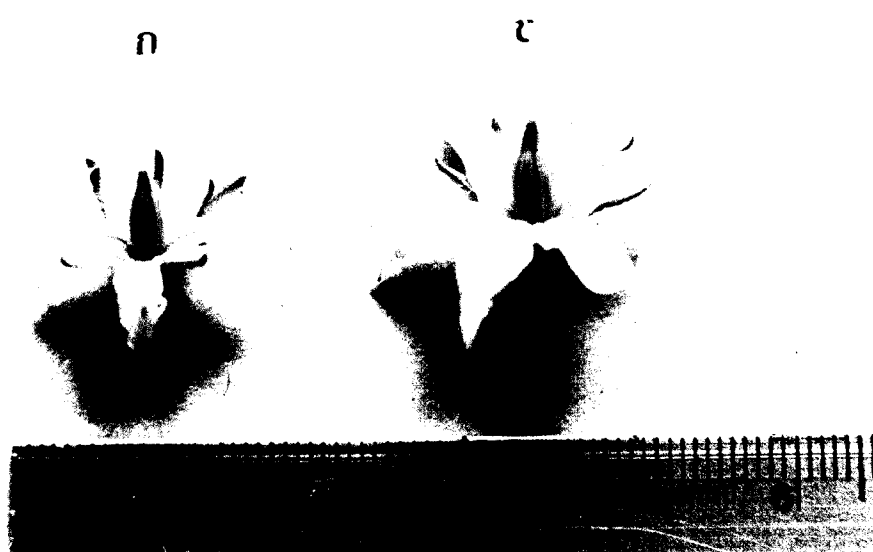
ภาพประกอบ 7 ลักษณะมะเขือเทศต้นโพลีพลอยด์และต้นดิพลอยด์

- | | | |
|------------------|-------------|----------------------|
| 1. ก. โพลีพลอยด์ | ข. ดิพลอยด์ | เมื่อปลูกได้ 1 เดือน |
| 2. ก. โพลีพลอยด์ | ข. ดิพลอยด์ | เมื่อปลูกได้ 2 เดือน |



ภาพประกอบ 8 ลักษณะใบมะเขือเทศต้นดิพลอยด์ และโพลีพลอยด์

ก. โพลีพลอยด์	ข. ดิพลอยด์
	



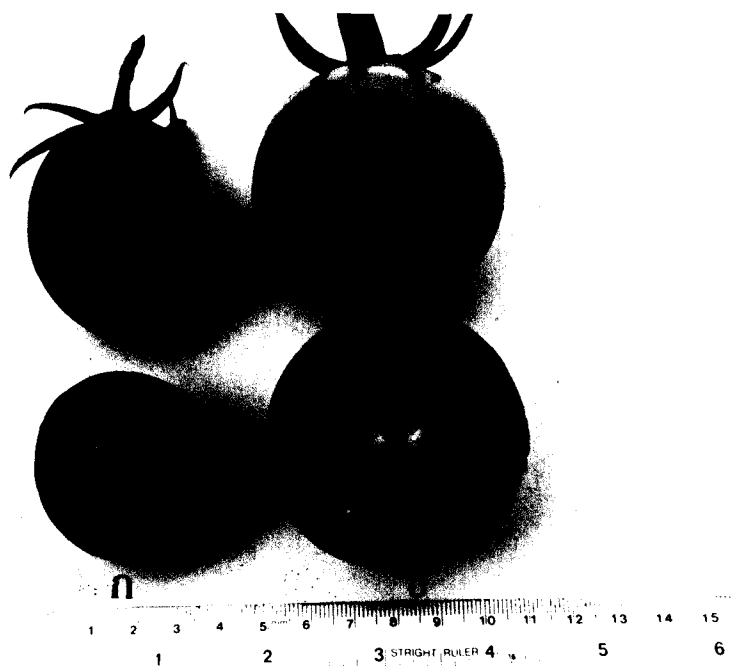
ภาพประกอบ 10 ลักษณะดอกมะเขือเทศต้นดิพลอยด์ และโพลีพลอยด์

ก. ดิพลอยด์

ข. โพลีพลอยด์

ตาราง 2 เปรียบเทียบลักษณะลำต้น ใบ ดอก มะเจือเทศที่พลอยด์และรีพลอยด์

ลักษณะ พอลอยด์	ต้น		ใบ						ดอก	
	ความสูง (ซม.)	ความกว้าง พวงหรีด (ซม.)	ขนาดใบ		จำนวนใบตม ใบตม/ม ²	ขนาดใบตม		จำนวน ดอก/ใบตม	จำนวนดอก พอลอยด์	ขนาดดอก (ซ.ม.)
			ยาว (ซ.ม.)	กว้าง (ซ.ม.)		ยาว(ซม)	กว้าง(ซม)			
	$\bar{X} \pm (SD)$	$\bar{X} \pm (SD)$	$\bar{X} \pm (SD)$	$\bar{X} \pm (SD)$	$\bar{X} \pm (SD)$	$\bar{X} \pm (SD)$	$\bar{X} \pm (SD)$	$\bar{X} \pm (SD)$	$\bar{X} \pm (SD)$	$\bar{X} \pm (SD)$
ต้นแม่										
ต้นลูก	54.38(±9.48)	63.00(±8.98)	5.6 (±0.57)	2.55(±0.16)	309.89(±76.99)	0.026(±3.24)	0.017(±3.86)	15.89 (±2.3)	2.79(±0.52)	2.15(±0.17)
ต้นผสม	59.53(±11.95)	64.15(±7.76)	6.83(±0.70)	2.87(±0.42)	290.41(±72.11)	0.031(±7.10)	0.018(±3.73)	21.25(±4.83)	3.58(±0.71)	2.43(±0.25)



ภาพประกอบ 11 ลักษณะผลของมะเขือเทศต้นดิพลอยด์ และโพลีพลอยด์

ก. ดิพลอยด์

ข. โพลีพลอยด์

4. การศึกษาคุณภาพผลมะเขือเทศ

ผลมะเขือเทศจากต้นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดในน้ำคั้นจะพบว่าปริมาณเท่ากัน คือร้อยละ 0.26 ค่า pH ของน้ำคั้นต้นโพลีพลอยด์มีค่า 4.24 ± 0.07 และต้นดิพลอยด์มี ค่า 4.19 ± 0.12 (ตาราง 3)

ปริมาณกรดแอสคอบิกของผลจากต้นโพลีพลอยด์มีมากกว่าต้นดิพลอยด์คือต้นโพลีพลอยด์ 25.92 ± 6.10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสด 100 กรัม ขณะที่ต้นดิพลอยด์มี 15.83 ± 3.40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสด 100 กรัม (ตาราง 3)

ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงของมะเขือเทศจากต้นโพลีพลอยด์มีมากกว่าต้นดิพลอยด์ โดยโพลีพลอยด์มีปริมาณ 134.61 ± 4.41 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ขณะที่ต้นดิพลอยด์มีปริมาณ 128.75 ± 5.41 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม (ตาราง 3)

จากการศึกษาคุณภาพของผลต้นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์ โดยใช้ t - test (P0.01) พบว่า ค่า pH ปริมาณกรดในน้ำคั้นและปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปริมาณกรดแอสคอบิก มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตาราง 3 เปรียบเทียบลักษณะผล ปริมาณการคำนวณน้ำหนัก ปริมาณการดองสคอปีค และ น้ำตาลตัวจริง และ เนื้อเยื่อที่หลงเหลือและ ไขมันหลงเหลือ

ลักษณะ ผลหลงเหลือ	ขนาด (ซ.ม.) $\bar{X} \pm (SD)$	น้ำหนักผล (กรัม) $\bar{X} \pm (SD)$	ความหนา ของเนื้องอก $\bar{X} \pm (SD)$	pH ของน้ำหนัก $\bar{X} \pm (SD)$	ปริมาณการค งน้ำหนัก % $\bar{X} \pm (SD)$	ปริมาณการดองสคอปีค mg/100 กรัมน้ำหนักผล $\bar{X} \pm (SD)$	ปริมาณน้ำตาลตัวจริง mg/g น้ำหนักแห้ง $\bar{X} \pm (SD)$
ดอง	4.22 (± 0.22)	44.86 (± 10.92)	0.59 (± 0.10)	4.19 (± 0.12)	0.26 (± 0.84)	15.83 (± 3.40)	128.75 (± 5.41)
ไขมันหลงเหลือ	5.06 (± 0.32)	110.35 (± 30.94)	0.73 (± 0.18)	4.24 (± 0.07)	0.26 (± 0.04)	25.92 (± 6.10)	134.61 (± 4.41)

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผล

1. การเจริญเติบโตของมะเขือเทศที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ

1.1 เมล็ด

เมล็ดที่แช่สารโคลชิซิน ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 0.1 และ 0.4 เป็นเวลา 3 วัน แล้วเพาะเลี้ยงในอาหาร MSB₁ ต้นมะเขือเทศเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันและมีอัตราการรอดตายสูง แสดงว่าความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ทำให้ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต และไม่ทำให้เซลล์เป็นอันตราย เนื่องจากเปลือกหุ้มเมล็ดทำให้การแพร่ของสารโคลชิซินสู่เซลล์ได้ช้า ดังนั้นมะเขือเทศสามารถทนต่อสารโคลชิซินได้ สอดคล้องกับการชักนำให้มะเขือเทศเกิดโพลีพลอยด์โดยแช่สารโคลชิซินความเข้มข้นร้อยละ 0.125 (Moens. 1963) และความเข้มข้นร้อยละ 0.4 (Bohn. 1947, Ugborogho and Sodipo. 1987)

1.2 ตาข้าง

การเพาะเลี้ยงตาข้างมะเขือเทศเมื่อให้สารโคลชิซินในสภาวะต่างๆ การเจริญมีความแตกต่างกันน่าจะเกี่ยวกับลักษณะอาหารและสภาวะที่ให้ตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสารโคลชิซินแล้วย้ายสู่ MSB₁ มีการเจริญเติบโตและมีอัตราการรอดตายสูงกว่าอาหารแข็ง ซึ่งสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงปลายยอดของบลูเบอรี่ ในอาหารเหลวที่มีสารโคลชิซินความเข้มข้นร้อยละ 0.2 อัตราการรอดตายสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (Lyrene and Perry. 1982) แต่การเพาะเลี้ยงหญาเกล็ดปลาในอาหารที่ไม่เติมสารโคลชิซิน การเจริญของแคลลัสในอาหารเหลวน้อยกว่าอาหารแข็ง (อารีรัตน์ โรจน์เพ็ญเพียร. 2530) การเจริญของตาข้างที่ให้สารโคลชิซินความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เจริญดีกว่าความเข้มข้นร้อยละ 0.1 การเจริญของเนื้อเยื่อน่าจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารโคลชิซิน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองเพาะเลี้ยงปลายยอดบลูเบอรี่ เมื่อ

ใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.001 จะมีการเจริญเช่นเดียวกับการให้อาหารที่ไม่มีโคลชิซิน แต่อัตราการเจริญจะลดลงและมีอัตราการตายสูงเมื่อให้สารโคลชิซิน ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 0.05 และ 0.2 (Lyrene and Perry. 1982)

เมื่อเพาะเลี้ยงตาข้างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เจริญน้อยกว่าที่อุณหภูมิห้อง แต่มีโอกาสรอดตายสูงอาจเป็นได้ว่าสารโคลชิซินจะมีพิษน้อยกว่าที่อุณหภูมิต่ำ จึงทำให้เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดตายสูง ชิฟฟินและมาเรีย (Schifino and Maria. 1987) รายงานว่า ที่อุณหภูมิสูง สารโคลชิซินจะมีพิษมากขึ้นและทำให้มีการตายสูง ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงโคลเวอร์ (*Trifolium spp.*) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มีอัตราการตายสูง (Anderson and others. 1990)

การเพาะเลี้ยงตาข้างในอาหาร MSB₁ ก่อนเป็นเวลา 7 วัน แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโคลชิซินในสภาวะต่าง ๆ ทำให้อัตราการรอดตายสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงลิลี (Chen and Goeden - Kallemeyn. 1979) และการเพาะเลี้ยง *Camellia japonica* L. (Kato. 1989) มีรายงานว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระยะหนึ่งก่อนให้สารโคลชิซินจะมีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอด (Hovenkamp - Hermelink and others. 1988) นอกจากนี้ แอนเดอสันและคนอื่น ๆ (Anderson and others. 1991) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงระยะหนึ่งก่อนให้สารโคลชิซินสามารถทำให้เกิดโพลีพลอยด์สูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากทำให้เนื้อเยื่อมีการปรับตัว และกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ไมโทซิส เมื่อเซลล์ได้รับสารโคลชิซินทำให้เกิดโพลีพลอยด์ได้รวดเร็วขึ้น

การเกิดสีน้ำตาลและตายของแคลลัส รวมทั้งใบที่สัมผัสอาหารมีลักษณะหนา แสดงว่าเซลล์ได้รับสารโคลชิซินและมีปฏิกิริยาตอบสนอง การเกิดแคลลัสสีน้ำตาลและตาย แสดงว่าสารโคลชิซินได้แพร่เข้าสู่เซลล์ และทำให้ไฮโดรพลาสซึมทำหน้าที่ผิดปกติ มีผลทำให้เนื้อเยื่อตาย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองเพาะเลี้ยงใบอาฟริกกันไวโอเลต (Espino and Vazquez. 1981) การแยกยอดและหน่อเล็ก ๆ ของเยอบีราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสารโคลชิซิน ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ผลปรากฏว่าตายหมด (รงรอง วิเศษสุวรรณ. 2528)

ตาข้างบางส่วนเจริญเป็นแคลลัส หรือเจริญเป็นใบ 1-2 ใบ แต่ไม่สามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ลักษณะเช่นนี้สอดคล้องกับการทดลองตัดยอดยาสูบในเรือนเพาะชำ และให้สารเร่งการเจริญเติบโตพวกออกซินเพื่อชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ พบว่า บริเวณรอยตัดจะเกิดแคลลัส ซึ่งสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์และต้นที่ไม่สมบูรณ์ หรืออาจเกิดเป็นราก (Greenleaf. 1938) ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางสรีระ เคมี หรือกายภาพของเซลล์ รวมทั้งเกิดจากความไม่สมดุลย์ของสารเร่งการเจริญเติบโต และลักษณะทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนที่ใช้ (ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524) หรืออาจเกิดจากการขาดโพลาไรตีของเนื้อเยื่อเนื่องจากการรับสารโคลชิซิน มีผลทำให้ความสามารถเกิดต้นลดลง (Dolezel and Binarova. 1989)

การเพาะเลี้ยงในอาหาร MS และ $MSN_{0.1}$ สามารถชักนำให้มะเขือเทศเกิดรากได้ แต่ $MSN_{0.1}$ จะมีรากเกิดขึ้นจำนวนมาก ลักษณะรากมีความแข็งแรง และมีขนาดใหญ่กว่า MS การเพาะเลี้ยงในอาหาร $MSN_{0.1}$ จึงเหมาะสมในการชักนำให้เกิดราก เพื่อนำมาศึกษาโครโมโซมและนำออกปลูก

2. การศึกษาเซลล์วิทยา

การเพาะเลี้ยงเมล็ดและตาข้างในสภาวะต่าง ๆ คือ $SC_{0.05}$, $SC_{0.1}$, $SC_{0.4}$, $MSB_1C_{0.05}$, $MSB_1C_{0.1}$, $MSB_1C_{0.05}T$, $MSB_1C_{0.1}T$, $MSB_1C_{0.05}L$, $MSB_1C_{0.1}L$, $MSB_1C_{0.05}LT$ และ $MSB_1C_{0.1}LT$ ทุกสภาวะที่ให้สามารถชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์จากการเพาะเลี้ยงตาข้างดีกว่าใช้เมล็ด เมื่อแช่เมล็ดในสารละลายโคลชิซินที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.05 0.1 และ 0.4 ต้นโพลีพลอยด์เกิดมากที่สุดเมื่อใช้สารโคลชิซินที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.4 คิดเป็นร้อยละ 55 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองแช่เมล็ดมะเขือเทศในสารโคลชิซิน ทำให้ได้ต้นเตตระพลอยด์ และมิโกโซพลอยด์ (Bohn. 1947; Ugborogho and Sodipo. 1987) แสดงว่าความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เมล็ดมะเขือเทศเกิดโพลีพลอยด์ คือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.4

จากการทดลองเพาะเลี้ยงตาข้างที่ได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.05 ที่อุณหภูมิห้องพบว่าสารโคลชิซินเข้มข้นร้อยละ 0.1 เกิดต้นโพลีพลอยด์ดีกว่าร้อยละ 0.05 ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว แสดงว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้ตาข้างมะเขือเทศเกิดโพลีพลอยด์ในการทดลองนี้ คือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เมื่อเพาะเลี้ยงตาข้างมะเขือเทศในอาหารที่มีสารโคลชิซินสภาวะต่าง ๆ ต้นโพลีพลอยด์เกิดได้มากเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสารโคลชิซินความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 0.1 ซึ่งเลี้ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต้นโพลีพลอยด์เกิดได้มากถึงร้อยละ 65 และ 75 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ได้มาก หรือน้อยนอกจากความเข้มข้นของสารโคลชิซินแล้ว สภาพของอุณหภูมิก็น่าจะมีผลต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ด้วย เดอร์เมน (Dermen, 1938) พบว่าอุณหภูมิต่ำมีผลต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ โดยทำให้ไซโตพลาสซึมของเซลล์มีลักษณะหนืดและโครมาติดเคลื่อนที่ได้ยาก ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำมะเขือเทศให้เกิดโพลีพลอยด์ คือตาข้างที่ได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ผลการทดลองดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงข้อของโคลเวอร์ (*Trifolium spp.*) บนอาหารที่มีโคลชิซินความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เวลา 2 วัน 3 วัน ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืดและที่สว่างเกิดโพลีพลอยด์ต่างกัน การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน เกิดโพลีพลอยด์ดีที่สุด (Anderson and others, 1991) เมื่อทดสอบเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย X^2 ขึ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ใช้ตาข้างกับเมล็ด สภาพแวดล้อมที่ให้คือ ลักษณะอาหารแข็งกับอาหารเหลว ความเข้มข้นของสารโคลชิซินร้อยละ 0.05 กับร้อยละ 0.1 และอุณหภูมิห้องกับอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ของกลุ่มสภาวะที่ให้ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ จากการเพาะเลี้ยงอาฟริกันไวโอเล็ตในอาหารที่มีสารโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ (Espino and Vazquez, 1981)

จากการทดลองเพาะเลี้ยงตาข้างมะเขือเทศ ในสภาวะที่เจริญดี คือ $MSB_1C_{0.1}L$ แต่เกิดโพลีพลอยด์น้อยกว่า $MSB_1C_{0.1}LT$ แสดงว่าสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์คือ $MSB_1C_{0.1}LT$

เมื่อเปรียบเทียบการชักนำมะเขือเทศให้เกิดโพลีพลอยด์ โดยการใช้เมล็ด และการเพาะเลี้ยงตาข้าง พบว่า ตาข้างเกิดโพลีพลอยด์ดีกว่า และจากการเพาะเลี้ยงตาข้างเกิดต้นใหม่จำนวนมากกว่าการใช้เมล็ด ดังนั้นการใช้ตาข้างมะเขือเทศชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์จึงเหมาะสมกว่าการใช้เมล็ด

จากการตรวจนับโครโมโซมบริเวณปลายรากและปลายยอดของมะเขือเทศ การเพาะเลี้ยงมะเขือเทศที่ใส่สารโคลชิซินทุกสภาวะเกิดต้นโพลีพลอยด์ เมื่อตรวจนับโครโมโซมปลายราก 2 ครั้ง พบว่าจำนวนโครโมโซมที่ตรวจนับครั้งที่ 1 บางต้นแตกต่างจากครั้งที่ 2 และจำนวนโครโมโซมของปลายรากบางต้นแตกต่างจากปลายยอด น่าจะมีผลจากการตรวจนับโครโมโซมไม่ได้ตรวจนับทุกราก แต่ได้จากการสุ่มตัวอย่างหรือเนื่องจากต้นโพลีพลอยด์ที่ได้มีลักษณะไคเมอร่าทำให้มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกัน แสดงว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่ได้ทำให้การเกิดลักษณะไคเมอร่าลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีโอกาสเกิดโพลีพลอยด์และมักมีลักษณะเป็นไคเมอร่า (Hussey and Hephher. 1978; Ancora and Ramulu. 1981; Ramulu. 1982) แต่แตกต่างจากรายงานการเกิดโพลีพลอยด์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะช่วยลดการเกิดลักษณะไคเมอร่าในพืช (Vanharten, Bouter and Broertjes. 1981; Hermesen and Deboer. 1971) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่จะลดการเกิดลักษณะไคเมอร่าได้ จะต้องเกิดจากเซลล์จำนวนน้อยหรือเซลล์เดี่ยว ขณะเดียวกันก็มีผู้รายงานว่า การใช้สารโคลชิซินย่อมทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดโพลีพลอยด์และมักมีลักษณะไคเมอร่า (Satina, Blakeslee and Avery. 1940; Emsweller. 1949; Downes and Marshall. 1983) การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีลักษณะเช่นเดียวกับการใช้สารโคลชิซิน กล่าวคือ การเกิดแคลลัสในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและพัฒนาเป็นยอดใหม่มีลักษณะเช่นเดียวกับการเกิดก้อนปม และเป็นยอดใหม่เมื่อให้สารโคลชิซินจึงมีโอกาสเกิดลักษณะไคเมอร่า (Downes and Marshall. 1983)

การให้สารโคเลชิซินในอาหารเมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ต้นโพลีพลอยด์ที่มีลักษณะเป็นไคเมอราสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงแคลลัสของลิลี (Chen and Goeden-Kallemeyn, 1979) ออฟริกันไวโอเลต (Espino and Vazquez, 1981) มันฝรั่ง (Hovenkamp - Hermelink and others, 1988) การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Medicago spp.* (Dolezel and Binarova, 1989) แต่การเพาะเลี้ยงปลายยอดบลูเบอรี่ และ *Rubus spp.* จะไม่เกิดลักษณะไคเมอรา (Lyrene and Perry, 1982; Gupton, 1989) การเพาะเลี้ยงเอมบริโอ *Camellia japonia L.* (Kato, 1983) และ *Lolium spp.* (Hassan and others, 1991) ก็ไม่เกิดลักษณะไคเมอราเช่นเดียวกัน

3. การศึกษาลักษณะของมะเขือเทศที่มีระดับโครโมโซมต่าง ๆ

ลักษณะมะเขือเทศต้นดิพลอยด์จะแตกต่างจากต้นโพลีพลอยด์ ทั้งด้านขนาดของใบ ดอกและผล จะมีขนาดใหญ่ขึ้น ลักษณะต่าง ๆ ในต้นเดียวกันแสดงออกไม่สม่ำเสมอ แสดงว่าพืชเกิดลักษณะไคเมอรา (Emsweller, 1949; Jacobs and Yoder, 1989) พืชที่ได้รับสารโคเลชิซิน โดยวิธีใดก็ตามเกิดโพลีพลอยด์กับเซลล์บางกลุ่ม มีผลทำให้แสดงลักษณะไม่สม่ำเสมอในต้นเดียวกัน เนื่องจากเซลล์ทุกเซลล์ไม่ตอบสนองต่อการชักนำของสารในระดับเดียวกัน (วิมล ขวัญเกื้อ, 2527)

ลักษณะรูปร่างของใบ ต้นโพลีพลอยด์มีลักษณะค่อนข้างกลมเนื่องจากใบมีความกว้างมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ โอคอนเนล ฮอสทิกกา และ ฮานสัน (O'Connell, Hosticka and Hanson, 1986) รูปร่างของใบมะเขือเทศเมื่อมีระดับต้นโพลีพลอยด์สูงขึ้นจะมีลักษณะกลม ต้นดิพลอยด์มีจำนวนและการกระจายตัวของคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คูน้อยกว่าต้นโพลีพลอยด์กล่าวคือ ต้นดิพลอยด์มีคลอโรพลาสต์จำนวน 15 และต้นโพลีพลอยด์มีจำนวน 21 ซึ่งสอดคล้องกับการใช้สารโคเลชิซิน ทำให้เกิดโพลีพลอยด์ใน *Nicandra physaloides* (Gupta and Roy, 1986) และสอดคล้องกับการศึกษาของ โอคอนเนล ฮอสทิกกา และ ฮานสัน (O'Connell, Hosticka and Hanson, 1986) มีจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คูน้อยกว่าของ $2n$ จำนวน 13 $4n$ จำนวน 26

และ 8n จำนวน 41 อย่างไรก็ตามจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุมจะแตกต่างกันขึ้นกับขนาดของเซลล์อายุของใบ และชนิดของพืชด้วย (Koornneff and others. 1989; Hassan and others. 1991)

3. การศึกษาคุณภาพของผล

การตรวจหาปริมาณสารจากผลของมะเขือเทศต้นโพลีพลอยด์และต้นดิพลอยด์ได้ค่าแตกต่างกัน ต้นโพลีพลอยด์มีปริมาณวิตามินซีมากกว่าต้นดิพลอยด์สอดคล้องกับรายงานของ เดอร์เมน (Dermen. 1940) อย่างไรก็ตามคุณภาพของผลจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อม ระยะเวลาการเก็บเกี่ยวผลและการเก็บรักษาผลด้วย (อัญชลี วงษ์วีระพันธ์. 2528)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรใช้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อส่วนอื่น เช่น ใบเลี้ยง อับละอองเรณู เพื่อชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ ปริมาณมากขึ้นและไม่มีลักษณะไคเมอรา
2. ควรศึกษาพฤติกรรมของโครโมโซมจากการแบ่งเซลล์ไมโอซิสของมะเขือเทศ
3. ควรศึกษากายวิภาคของปลายยอดและปลายรากของต้นโพลีพลอยด์ที่มีลักษณะไคเมอรา

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธ์. มะเขือเทศ. พิมพ์ครั้งที่ 3. นนทบุรี ; ศูนย์
ผลิตตำราเกษตรเพื่อชนบท, ม.ป.ป.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. สถิติการปลูกพืชผักรายปี. ฝ่ายวิเคราะห์ข้อมูล
ส่งเสริมการเกษตร : กองแผนงานและโครงการพิเศษ, ม.ป.ป.
- ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์, ม.ป.ป.
- ทอง พรประดับเกียรติ. ผลของ colchicine และรังสีที่มีต่อเซลล์แขวนลอย
ของอ้อยในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ :
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน, 2528. อัดสำเนา.
- * ทิพย์วรรณ สดปทุม. การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะของสีผลมะเขือเทศด้วยวิธี
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ วท.ม. : มหาวิทยาลัย
ศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2534. อัดสำเนา.
- * รงรอง วิเศษสุวรรณ. การชักนำให้เยื่อปรีากลายพันธุ์ในหลอดทดลอง.
วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
บางเขน, 2528. อัดสำเนา.
- วิมล ขวัญเกื้อ. "การใช้สารโคลชิซินกับพืช," วิทยาศาสตร์. 38 (4) :
208 - 215; 2527.
- ศิริพรต ผลสินธุ์. ศัพทานุกรมชีววิทยา. วิ.เจ.พรินต์, 2528.
- สมภพ จิตะวสันต์. การผลิตมะเขือเทศเพื่อการค้า. ม.ป.ท., 2530.
- อัญชลี วงษ์วีระพันธ์. อายุของผลที่มีต่อคุณภาพภายหลังการเก็บเกี่ยวของ
มะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์ บางเขน, 2528. อัดสำเนา.
- อารีรัตน์ โรจน์เพ็ญเพียร. ปัจจัยบางประการที่มีอิทธิพลต่อการเพาะเลี้ยง
เนื้อเยื่อหญาเมล็ดปลา. วิทยานิพนธ์ กศ.ม. : มหาวิทยาลัย
ศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2530. อัดสำเนา.
- อรดี สหวัชรินทร์. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 3.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2533.

- Anderson, J.A. and others. "An In Vitro Chromosome Doubling Method for Clovers (*Trifolium spp.*)," Genome. 34 : 1 - 5 ; 1991.
- Ancora, G. and K.Sree Ramulu. "Plant Regeneration from In Vitro Cultures of Stem Internodes in Self- Incompatible Triploid *Lycopersicon peruvianum* Mill. and Cytogenetic Analysis of Regenerated Plants," Plant Sci Let. 22 : 197 - 204 ; 1981.
- A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. Washington ; 1980.
- Bohn, G.W. "Colchicine Treatments for Use with Tomatoes," J Heredity. 38 : 157 - 160 ; 1947.
- Cappadocia, M. and K.Sree Ramulu. "Plant Regeneration from In Vitro Cultures of Anthers and Stem Internodes in An Interspecific Hybrid, *Lycopersicon esculentum* L. x *L.pervianum* Mill. and Cytogenetic Analysis of the Regenerated Plants," Plant Sci. Let. 20 : 157 - 166 ; 1980.
- Chen, C.H. and Y. Goeden - Kallemeyn. "In Vitro Induction of Tetraploid Plants from Colchicine - Treated Diploid Daylily Callus," Euphytica. 28 : 705 - 709 ; 1979.
- Creemers - Molenaar, J. and others. "The Effect of Genotype, Cold Storage and Ploidy Level on the Morphogenic Response of Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.) Suspension Cultures," Plant Science. 83 : 87 - 94 ; 1992.
- Dermen, H. "A Cytological Analysis of Polyploidy Induced by Colchicine and by Extremes of Temperature," J.Heredity. 6 : 211 - 229 ; 1938
- Dermen, H. "Colchicine Polyploidy and Technique," The Botanical Review. 6 : 599 - 629 ; 1940.

- Dolezel, J. and P. Binarova. "The Effects of Colchicine on Ploidy Level, Morphology and Embryogenic Capacity of Alfalfa Suspension Cultures," Plant science. 64 : 213 - 219 ; 1989.
- Downes, R.W. and D.R.Marshall. "Colchicine - Induced Variants in Sunflower," Euphytica. 32 : 757 - 766 ; 1983.
- Emsweller, S.L. "Colchicine - Induced Polyploidy in *Lilium longiflorum*," Amer.J.Bot. 36 : 135 - 144 ; 1949.
- Espino, F.J. and A.M. Vazquez. "Chromosome Numbers of *Saintpaulia ionantha* Plantlets Regenerated from Leaves Cultured In Vitro with Caffeine and Colchicine," Euphytica. 30 : 847 - 853 ; 1981.
- Evans, D.A. and W.R. Sharp. "Single Gene Mutations in Tomato Plants Regenerated from Tissue Culture," Science. 221 : 949 - 951 ; 1983.
- Evans, D.A., W.R. Sharp and H.P. Medina - Filho. "Somaclonal and Gametoclonal Variation," Amer. J. Bot. 71 (6) : 759 - 774 ; 1984.
- Ghosh, A. and V.N. Gadgil. "Shift in Ploidy Level of Callus Tissue : A Function of Growth Substances," Indian J. Ex. Bio. 17 : 562 - 564 ; 1979.
- Greenleaf, W.H. "Induction of Polyploidy in *Nicotiana* by Hetero - Auxin Treatment," J. Heredity. 6 : 451 - 464 ; 1938.
- Gupta, S.K. and S.K. Roy "Induced Colchiploidy in *Nicandra physaloides*," Cytologia. 51 : 319-324; 1986.
- Gupton, J. L. "Production of Non - Chimera Colchiploids in *Rubus* species by Tissue Culture," Euphytica. 44 : 133 - 135 ; 1989.

- Hassan, L. and others. "Colchicine - Induced Heritable Variation in Cell Size and Chloroplast Number in the Leaf Cells of Inbred Ryegrasses (*Lolium perenne*, *L. multiflorum*)," Euphytica, 52 : 39 - 45 ; 1991.
- Hermesen, J.G.Th. and A.J.E. Deboer. "The Effect of Colchicine Treatment on *Solanum acaule* and *S.bulbocastanum* ; A Complete Analysis of Ploidy Chimeras in *S.bulbocastanum*," Euphytica. 20 : 171-180 ; 1971.
- Hermesen, J.G. Th. and others. "Chromosome Doubling Through Adventitious Shoot Formation on In Vitro Cultivated Leaf Explants from Diploid Interspecific Potato Hybrids," Euphytica. 30 : 239 - 246 ; 1981.
- Horak, J. and others. "Regeneration of Diploid and Polyploid Plants from the Stem Pith Explants of Diploid Marrow Stem Kale (*Brassica oleracea* L.)," Ann. Bot. 39 : 571 - 577 ; 1975.
- Hovenkamp - Hermelink, J.H.M. and others. "Cytological Studies on Adventitious Shoots and Minitubers of a Monoploid Potato Clone," Euphytica. 39 : 213 - 219 ; 1988.
- Hussey, G. and A.Hepher. "Clonal Propagation of Sugar Beet Plants and the Formation of Polyploids by Tissue Culture," Ann. Bot. 42 : 477 - 479 ; 1978.
- Jacobs, J.P. and J.I. Yoder. "Ploidy Levels in Transgenic Tomato Plants Determined by Chloroplast Number," Plant Cell Report. 10 : 662 - 664 ; 1989.
- Kato, M. "Polyploids of Camellia Through Culture of Somatic Embryos," Hort Science. 24(6) : 1023 - 1025 ; 1989.

- Koornneef, M. and others. "Chromosomal Instability in Cell and Tissue Cultures of Tomato Haploids and Diploids," Euphytica. 43 : 179 - 186 ; 1989.
- Lavania, U.C. and Sangeeta Srivastava. "Enhanced Productivity of Tropane Alkaloids and Fertility in Artificial Autotetraploids of *Hyoscyamus niger* L.," Euphytica. 52 : 73 - 77 ; 1991.
- Lyrene, P.M. and J.L. Perry. "Production and Selection of Blueberry Polyploids In Vitro," J. Heredity. 73 : 377 - 378 ; 1982.
- McCoy, T.J. and E.T. Bingham. "Regeneration of Diploid Alfalfa Plants from Cells grown in Suspension Culture," Plant Sci.Let. 10 : 59 - 66 ; 1977.
- Mercy Kutty, V.C. and H. Kumar. "Studies on Induced Tetraploid in Four Diverse Cultivars of Pea (*Pisum sativum* L.)," Cytologia. 48 : 51 - 58 ; 1983.
- Moens, P.B. "Chiasma Distribution and Segregation of Markers in Chromosome 2 of the Tetraploid Tomato," J. Heredity. 6 : 123 - 133 ; 1963.
- Murashige, T. and R. Nakano. "Tissue Culture as a Potential Tool in Obtaining Polyploid Plants," J. Heredity. 3 : 155 - 118 ; 1974.
- Murashige, T. and F. Skoog. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assay with Tobacco Tissue Cultures," Physiol. Plant. 15 : 473 - 497 ; 1962.
- O'Connell, M. A., L. P. Hosticka and M. R. Hanson. "Examination of Genome Stability in Cultured *Lycopersicon*," Plant Cell Reports. 5 : 276 - 279 ; 1986.

- Rambaud, C., J. Dobois and J. Vasseur. "The Induction of Tetraploidy in Chicory (*Cichorium intybus* L. var. Magdebourg) by Protoplast Fusion," Euphytica. 60 : 63 - 67 ; 1992.
- Ramulu, K. Sree. "Genetic Instability at the S-Locus of *Lycopersicon peruvianum* Plants Regenerated from In Vitro Culture of Anthers : Generation of New S-Specificities and S-Allele Reversions," J. Heredity. 49(3) : 319 - 330 ; 1982.
- Ramulu, K. Sree and P. Dijkhuis. "Flow Cytometric Analysis of Polysomaty and In Vitro Genetic Instability in Potato," Plant Cell Reports. 3 : 234 - 237 ; 1986.
- Roest, S. "Vegetative Propagation In Vitro and Its Significance for Mutation Breeding," Acta. Hort. 78 : 349 - 357 ; 1977.
- Satina, S., A.F Blakeslee and A. G. Avery. "Demonstration of the Three Germ Layers in the Shoot Apex of *Datura* by Means of Induced Polyploidy in Periclinal Chimeras," Amer.J.Bot. 27 : 895 - 905 ; 1940.
- Schifino, M.T. and M.I. Moraes Fernandes. "Induction of Polyplidy and Cytological Characterization of Autotetraploids of *Trifolium riograndense* Burkart (Leguminosae)," Euphytica. 36 : 863 - 872 ; 1987.
- Singh, A.K., H. Uhrig and F. Salamini. "Implications of Chromosome Pairing in a Monohaploid and Its Colchidiploid of *Solanum tuberosum* (x = 12)," Genome. 30 : 347 - 351 ; 1988.
- Ugborogho, R.E. and E.O. Sodipo. "Studies on the mutagenic Effect of Colchicine on *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) in Nigeria," Biol abstr. 83(4) : AB - 443 ; 1987.

- Uijtewaal, B.A. "Ploidy Variability in Greenhouse Cultured and In Vitro Propagated Potato (*Solanum tuberosum*) Monohaploids ($2n = x = 12$) as Determined by Flow Cytometry," Plant cell Reports. 6 : 252 - 255 ; 1987.
- Vanharten, A.M., H. Bouter and C. Broertjes. "In Vitro Adventitious Bud Techniques for Vegetative propagation and Mutation Breeding of Potato (*Solanum tuberosum* L.) II Significance for Mutation Breeding," Euphytica. 30 : 1 - 8 ; 1981.
- Vasil, I.K. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant. Vol 3. Academic press inc, 1986.
- Watson, L. "Doubling the Chromosome Number of Trifolium Species Using Nitrous Oxide," Crop Science. 16 : 516 - 518 ; 1976.
- Weatherhead, M.A and G.G. Henshaw. "The Production of Homozygous Diploid Plants of *Solanum verrucosum* by Tissue Culture Techniques," Euphytica. 28 : 765 - 768 ; 1979.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารสูตรรายปีและสกุ (MS)

1. เตรียมสารละลายเข้มข้นของอาหารสูตร MS ดังนี้

สารละลาย.		ต่อลิตร
1.1 <u>สารละลายเข้มข้นที่ 1 (100 X)</u>		
NH_4NO_3	165	กรัม
KH_2PO_4	17	กรัม
H_3BO_3	620	มิลลิกรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,230	มิลลิกรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	860	มิลลิกรัม
KI	83	มิลลิกรัม
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25	มิลลิกรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.5	มิลลิกรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5	มิลลิกรัม
1.2 <u>สารละลายเข้มข้นที่ 2 (100 X)</u>		
KNO_3	190	กรัม
1.3 <u>สารละลายเข้มข้นที่ 3 (100 X)</u>		
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44	กรัม
1.4 <u>สารละลายเข้มข้นที่ 4 (100 X)</u>		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37	กรัม
1.5 <u>สารละลายเข้มข้นที่ 5 (100 X)</u>		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.78	กรัม
$\text{Na}_2 - \text{EDTA}$	3.73	กรัม

สารละลาย		ต่อลิตร
1.6 สารละลายเข้มข้นที่ 6 (200 X)		
Myo - inositol	20	กรัม
Niotinic acid	100	มิลลิกรัม
Pyridoxine HCl	100	มิลลิกรัม
Thiamine HCl	20	มิลลิกรัม
Glycine	400	มิลลิกรัม

2. การเตรียมอาหาร ดังนี้ :-

สารละลายเข้มข้นที่ 1	10	มิลลิลิตร
สารละลายเข้มข้นที่ 2	10	มิลลิลิตร
สารละลายเข้มข้นที่ 3	10	มิลลิลิตร
สารละลายเข้มข้นที่ 4	10	มิลลิลิตร
สารละลายเข้มข้นที่ 5	10	มิลลิลิตร
สารละลายเข้มข้นที่ 6	5	มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารเร่งการเจริญเติบโต ทำเป็นสารละลายเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยซึ่งสารเร่งการเจริญเติบโต คือ NAA, BA อย่างละ 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. การเตรียม dye - solution

ละลายเกลือโซเดียมของ 2, 6 - dichloroindophenol 50 มิลลิกรัม ในน้ำร้อนซึ่งมีโซเดียมไฮดรอกไซด์คาร์บอเนต 42 มิลลิกรัม จำนวน 150 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร กรองแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น นำมาทำมาตรฐานกับกรดแอสคอบิกมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการหาปริมาณกรดแอสคอบิก

5. การเตรียมเซฟเฟอร์ - โซโมไจคาร์บอเนต 50 รีเอเจนต์ (5 กรัม ของโปแตสเซียมไฮโอไดด์) ละลายโซเดียมคาร์บอเนตและโปแตสเซียมคาร์เตท อย่างละ 25 กรัม กับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ เติมสารละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (10 เปอร์เซ็นต์) 75 มิลลิลิตร โดยให้ปลายกรวยอยู่ใต้ผิวของสารละลาย เติมโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 20 กรัม ทำให้ละลายแล้วเติมโปแตสเซียมไฮโอไดด์ 5 กรัม เทสารละลายทั้งหมดในขวด วัดปริมาตร ขนาด 1 ลิตร เติมโปแตสเซียมไฮโอเดต 0.1 N (3.567 กรัม ของโปแตสเซียมไฮโอเดต ในน้ำ 1 ลิตร) จำนวน 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร กรองเก็บไว้ 1 คืน ก่อนนำมาใช้

6. การเตรียมสารละลายไฮโอไดด์ออกซาลेट ละลายโปแตสเซียมไฮโอไดด์ และโปแตสเซียมออกซาลेट อย่างละ 2.5 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (น้ำยานี้ต้องเตรียมใหม่ทุกสัปดาห์)

7. การเตรียมสารละลายบั้งเพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ ผสมบั้ง 2.5 กรัม กับเมอคิวไรด์ไฮโอไดด์ ประมาณ 10 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อย คนให้เข้ากัน นำทั้งหมดไปละลายในน้ำกลั่นที่กำลังเดือด ประมาณ 500 มิลลิลิตร ปลอຍให้เดือดนาน 1 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเก็บในตู้เย็น

8. การเตรียมไฮโอซิลเฟตมาตรฐาน การเตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮโอซิลเฟต 0.1 นอร์มอล เป็นสารละลายเข้มข้น โดยละลายโซเดียมไฮโอซิลเฟต ประมาณ 25 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ค่อย ๆ ต้มให้เดือด 5 นาที แล้วเทใส่ขวดที่สะอาดขณะร้อน (ล้างขวดด้วยกรดโครมิกที่ร้อน แล้วล้างน้ำอุ่น ๆ ที่ต้มเดือด) เก็บสารละลายในที่มืดและเย็น เมื่อต้องการสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ต้มแล้ว (สารละลายที่เข้มข้นต่ำจะไม่อยู่ตัวควรเตรียมไว้ใช้เฉพาะวันเท่านั้น)

9. การทำสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮโอซิลเฟต โดยอบโปแตสเซียมไดโครเมทที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ซึ่งอย่าง

ละเอียด 0.2 - 0.3 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่เติมน้ำกลั่นที่มีโปแตสเซียม
ไอโอไดด์ 2 กรัม ละลายอยู่ จำนวน 80 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือ 1 นอร์มอล
ประมาณ 20 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเก็บไว้ในที่มืด 10 นาที จึงไตเตรทกับสาร
ละลายโซเดียมไฮโอซิลเฟตที่เตรียมไว้ เมื่อไอโอไดด์ละลาย เติมน้ำปิ้ง
สารละลายจะเปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นเขียวอ่อน เมื่อถึงจุดสมมูลย์

$$N \text{ ของ } Na_2S_2O_3 = \frac{\text{น้ำหนักของ } K_2Cr_2O_7 \text{ (g)} \times 100}{ml \text{ ของ } Na_2S_2O_3 \times 49.032}$$

ภาคผนวก ข

ตาราง 4 ความสูง ของมะเขือเทศที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ

สภาวะ	ความสูง (ซม.)																	
	ต้น						โพย						โพย					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
MSB1	0.08	0.41	1.00	1.36	1.85	2.05	-	-	-	-	-	-	0.08	0.41	1.00	1.36	1.85	2.05
MSB1C0.05	0.06	0.32	0.44	0.72	1.10	1.10	0.03	0.32	0.59	1.00	1.36	1.56	0.05	0.32	0.52	0.87	1.25	1.40
MSB1C0.1	-	0.28	0.47	0.92	1.21	1.28	-	0.28	0.33	0.59	1.03	1.07	0.01	0.23	0.36	0.77	1.10	1.15
MSB1C0.05T	0.03	0.24	0.30	0.78	0.93	1.10	0.03	0.30	0.46	1.15	1.15	1.60	0.03	0.27	0.38	0.89	1.01	1.35
MSB1C0.1T	0.09	0.39	0.75	1.35	1.75	1.85	0.04	0.23	0.48	0.85	1.10	1.50	0.06	0.31	0.61	1.15	1.45	1.62
MSB1C0.05L	-	0.60	1.30	1.75	2.18	2.36	-	0.57	1.38	2.05	2.55	2.60	0.10	0.59	1.34	1.89	2.35	2.50
MSB1C0.1L	0.05	0.34	0.88	1.38	1.78	2.50	0.02	0.42	1.30	2.00	2.15	2.84	0.03	0.39	1.16	1.78	2.02	2.12
MSB1C0.05LT	-	0.17	1.71	1.85	2.57	2.78	-	0.37	0.74	1.07	1.61	2.11	-	0.49	1.08	1.35	1.95	2.35
MSB1C0.1LT	0.04	0.04	0.20	0.70	0.80	1.00	0.04	0.78	1.20	1.30	1.56	1.76	0.04	0.59	0.95	1.15	1.37	1.57

ตาราง 5 จำนวนยอด ของมะเขือเทศที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ

สภาวะ	จำนวนยอด																	
	ต้นผลยอด						โพธิ์ผลยอด						ข พวงผล					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
MSB1	0.10	0.35	0.65	1.10	1.40	1.65	-	-	-	-	-	-	0.10	0.35	0.65	1.10	1.40	1.65
MSB1C0.05	-	0.11	0.22	1.11	1.55	1.77	-	0.09	0.18	1.36	1.81	1.90	-	0.10	0.20	1.25	1.65	1.85
MSB1C0.1	-	-	0.28	1.00	1.71	2.14	-	-	-	0.92	1.15	1.69	-	-	0.10	0.95	1.35	1.85
MSB1C0.05T	-	-	0.20	1.20	1.20	1.80	-	-	0.30	0.52	0.52	1.52	-	-	0.25	0.85	0.85	1.65
MSB1C0.1T	-	0.10	0.60	1.40	1.70	2.50	-	0.10	0.40	0.80	1.20	1.40	-	0.20	0.50	1.10	1.45	1.95
MSB1C0.05L	-	0.36	0.81	1.80	2.00	2.09	-	0.22	1.00	1.77	1.88	2.22	-	0.30	0.90	1.80	1.96	2.15
MSB1C0.1L	-	0.12	0.50	1.14	1.14	1.42	-	0.15	0.92	1.46	1.46	1.84	-	0.15	0.80	1.35	1.35	1.70
MSB1C0.05LT	-	0.57	1.00	1.28	1.42	1.71	-	0.38	0.76	1.23	1.61	1.84	-	0.45	0.85	1.25	1.55	1.80
MSB1C0.1LT	-	-	-	0.80	1.20	2.00	-	0.20	0.45	1.40	1.46	1.93	-	0.20	0.45	1.25	1.40	1.95

ตาราง 6 การเจริญของแมลงศัตรูพืช เชื้อเห็ด ศัตรูพืช ศัตรูพืช เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ

สภาวะ	ขนาดของแมลงศัตรู (มม.)																	
	ศัตรูพืช									ศัตรูพืช								
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
MSB1	-	0.28	0.52	0.75	1.12	1.12	-	-	-	-	-	-	-	-	0.28	0.52	0.75	1.12
MSB1C0.05	0.05	0.11	0.38	0.66	1.05	1.05	0.07	0.13	0.27	0.59	1.04	1.04	0.06	0.12	0.32	0.62	1.10	1.10
MSB1C0.1	-	-	0.21	0.42	0.92	0.92	-	0.15	0.40	0.65	1.00	1.00	-	0.15	0.34	0.57	0.97	0.97
MSB1C0.05T	0.05	0.02	0.45	0.55	1.10	1.10	0.01	0.22	0.45	0.57	0.90	0.90	0.02	0.21	0.45	0.56	1.00	1.00
MSB1C0.1T	0.10	0.15	0.32	0.65	1.05	1.05	0.05	0.20	0.38	0.80	0.75	0.75	0.07	0.17	0.35	0.72	0.90	0.90
MSB1C0.05L	-	0.27	0.40	0.54	0.68	0.68	-	0.38	0.50	0.55	0.77	0.77	-	0.32	0.45	0.55	0.72	0.72
MSB1C0.1L	0.21	0.35	0.50	0.50	0.71	0.71	0.03	0.11	0.50	0.61	0.84	0.84	0.10	0.20	0.50	0.60	0.80	0.80
MSB1C0.05LT	-	0.28	0.35	0.50	0.64	0.64	-	0.38	0.50	0.88	0.96	0.96	-	0.35	0.45	0.75	0.85	0.85
MSB1C0.1LT	0.01	0.10	0.60	0.60	0.90	0.90	0.01	0.13	0.30	0.43	0.63	0.63	0.01	0.25	0.37	0.47	0.70	0.70

ตาราง 7 จำนวนมะเขือเทศ คีพลอยด์ ไร่พลอยด์ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ

สภาวะ	จำนวนใบ																	
	คิลอยด์						โพสคิลอยด์						๒ พินนด					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
MSB1	-	1.00	1.60	1.90	2.35		-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	1.60	1.90	2.35
MSB1C0.05	0.20	0.20	2.00	2.44	2.55		0.09	0.09	2.09	2.63	2.72		0.15	0.15	2.05	2.45	2.65	
MSB1C0.1	-	0.85	1.85	2.42	3.14		-	0.53	1.46	2.07	2.53		-	0.65	1.60	2.20	2.75	
MSB1C0.05T	-	0.60	1.50	1.60	2.40		0.10	0.50	1.30	1.30	2.40		0.10	0.55	1.40	1.45	2.40	
MSB1C0.1T	0.10	1.70	2.40	2.50	2.70		0.10	0.40	0.90	1.40	2.10		0.10	1.05	1.65	1.95	2.40	
MSB1C0.05L	-	1.36	2.63	2.80	2.90		-	1.66	2.22	3.00	3.33		-	1.50	2.45	2.90	3.10	
MSB1C0.1L	-	0.85	1.57	1.71	2.28		-	1.76	2.53	2.84	3.07		-	1.45	2.20	2.45	2.80	
MSB1C0.05LT	-	1.85	2.14	2.71	3.14		0.28	1.15	1.84	2.38	2.76		0.10	1.40	1.96	2.50	2.90	
MSB1C0.1LT	-	0.60	1.80	2.00	2.80		0.30	1.66	2.53	2.60	3.08		0.30	1.40	2.35	2.45	3.00	

ตาราง 8 การเจริญของมะเขือเทศด้านความสูง จำนวนยอด ขนาดแคลลัส จำนวนใบ เมื่อมีอายุได้ 6 สัปดาห์

สภาวะ	สูง		ยอด		แคลลัส		จำนวนใบ	
	ใบ ทรงกลม	ใบ รูปไข่	ใบ รูปไข่	ใบ รูปไข่	ใบ รูปไข่	ใบ รูปไข่	ใบ รูปไข่	ใบ รูปไข่
MSB1	2.05	2.05	-	1.65	1.65	1.12	-	2.35
MSB1CO.05	1.40	1.10	1.56	1.85	1.77	1.90	1.04	2.55
MSB1CO.1	1.15	1.28	1.07	1.85	2.14	1.69	0.92	3.14
MSB1CO.05T	1.35	1.10	1.60	1.65	1.80	1.50	1.10	2.40
JSB1CO.1T	1.62	1.85	1.10	1.95	2.50	1.40	1.05	2.70
MSB1CO.05L	2.50	2.36	2.60	2.15	2.09	2.22	0.68	2.90
MSB1CO.1L	2.12	2.50	2.84	1.70	1.42	1.84	0.71	2.28
MSB1CO.05LT	2.35	2.78	2.11	1.80	1.71	1.84	0.84	3.14
MSB1CO.1LT	1.57	1.00	1.56	1.95	2.00	1.93	0.90	2.80
รวมค่าเฉลี่ย	1.79	1.78	1.67	1.83	1.89	1.59	0.90	2.69
ค่าพหุคูณ								2.44

ตาราง 9 ค่าพิสัยของลักษณะลำต้น และดอก มะเขือเทศฝอยดัด และโพลีพลอยด์

ลำต้น		ดอก			
ความสูง (ซม.)		ทรงพุ่ม (ซม.)		จำนวนดอก/ช่อ	ขนาดดอก
คัลลอยด์	โพลีพลอยด์	คัลลอยด์	โพลีพลอยด์	คัลลอยด์	โพลีพลอยด์
39 - 72	37 - 77	43 - 79	48 - 75	2 - 4	2.0 - 2.5
				2 - 5	2 - 3

ตาราง 10 ค่าพิสัยของลักษณะใบมะเขือเทศฝอยดัด และโพลีพลอยด์

ขนาดใบ		ปากใบ				จำนวน ต่อใบปกติ	
ยาว (ซม.)		กว้าง (ซม.)		จำนวนปากใบ (mm ²)		ขนาดปากใบ	
						ยาว (μm)	กว้าง (μm)
คัลลอยด์	โพลีพลอยด์	คัลลอยด์	โพลีพลอยด์	คัลลอยด์	โพลีพลอยด์	คัลลอยด์	โพลีพลอยด์
4.58-7.0	4.58-8.0	2.25-2.88	2.25-3.91	133.23-425.97	73.54-395.05	0.0189-0.0337	0.0205-0.0588
				0.0123-0.0222	0.0139-0.0382	11.9-20.2	13.2-34.2

ตาราง 11 ค่าพิสัยของลักษณะผล ปริมาณการค้ำน้ำคืน ปริมาณการดูดแอสคอบีค ปริมาณน้ำตาลคิง ของมะเขือเทศ

ขนาดผล 0 (ซม)	น้ำหนักผล (กรัม)		ความหนาของเยื่อผล (ซม)		ผล ของ น้ำคืน (%)		ปริมาณการดูดน้ำคืน (%)		ปริมาณการดูดแอสคอบีค (มก/100 กรัม น.บ.แห้ง)		ปริมาณน้ำตาลคิง (มก/กรัม น.บ.แห้ง)		
	โพธิ์คหอยค	คหอยค	โพธิ์คหอยค	คหอยค	โพธิ์คหอยค	คหอยค	โพธิ์คหอยค	คหอยค	โพธิ์คหอยค	คหอยค	โพธิ์คหอยค		
1-4.60	4.50-5.60	31.10-63.82	72.09-157.45	0.50-0.80	0.50-1.00	4.06-4.50	4.16-4.38	0.18-0.42	0.19-0.35	11.36-21.44	16.89-34.64	118.30-134.20	128.20-140.80

ภาคผนวก ค

ตาราง 12 การวิเคราะห์ χ^2 การเกิดโหลี่พลอยด์ของมะเขือเทศในสภาวะต่าง ๆ

สภาวะ	คิพลอยด์	โหลี่พลอยด์	รวม
Co.05	9 (8.5)	11 (11.5)	20
Co.1	8 (8.5)	12 (11.5)	20
รวม	17	23	40

$$\chi^2 = 0.1023$$

สภาวะ	คิพลอยด์	โหลี่พลอยด์	รวม
Co.05L	12 (9.5)	8 (10.5)	20
Co.1L	7 (9.5)	13 (10.5)	20
รวม	19	21	40

$$\chi^2 = 2.5062$$

ตาราง (ต่อ)

สภาวะ	คิพลอยด์	โพลิพลอยด์	รวม
Co.05LT	7 (6)	13 (14)	20
Co.1LT	5 (6)	15 (14)	20
รวม	12	28	40

$$\chi^2 = 0.4761$$

สภาวะ	คิพลอยด์	โพลิพลอยด์	รวม
เมล็ด	31 (27)	29 (33)	60
ตาข้าง	68 (72)	92 (88)	160
รวม	99	121	220

$$\chi^2 = 1.4813$$

ตาราง (ต่อ)

สภาวะ	คิพลอยด์	โพสิพลอยด์	รวม
เมล็ด 0.05	12 (11)	8 (9)	20
ตาข้าง 0.1	10 (11)	10 (9)	20
รวม	22	18	40

$$X^2 = 0.4040$$

สภาวะ	คิพลอยด์	โพสิพลอยด์	รวม
อาหารเหลว 0.05	19 (18.5)	21 (21.5)	40
อาหารเหลว 0.1	18 (18.5)	22 (21.5)	40
รวม	37	43	80

$$X^2 = 0.0502$$

ตาราง (ต่อ)

สภาวะ	คิพลอยด์	โพลีพลอยด์	รวม
อาหารแข็ง 0.05 ^๕ ทั้งหมด	19 (15.5)	21 (24.5)	40
อาหารแข็ง 0.1 ^๕ ทั้งหมด	12 (15.5)	28 (24.5)	40
รวม	31	49	80

$$\chi^2 = 2.5806$$

สภาวะ	คิพลอยด์	โพลีพลอยด์	รวม
ความเข้มข้น 0.05	50 (45)	50 (55)	100
ความเข้มข้น 0.1	40 (45)	60 (55)	100
รวม	90	110	200

$$\chi^2 = 2.0202$$

ตาราง (ต่อ)

สภาวะ	คิพลอยด์	โพลีพลอยด์	รวม
อุณหภูมิห้อง	36 (34)	44 (46)	80
อุณหภูมิ 4 °C	32 (34)	48 (46)	80
รวม	68	92	160

$$\chi^2 = 0.4092$$

สภาวะ	คิพลอยด์	โพลีพลอยด์	รวม
อาหารเหลวอุณหภูมิห้อง	17 (18.5)	23 (21.5)	40
อาหารเหลวอุณหภูมิ 4 °C	20 (18.5)	20 (21.5)	40
รวม	37	43	80

$$\chi^2 = 0.4525$$

ตาราง (ต่อ)

สภาวะ	คิพลอยด์	โพลีพลอยด์	รวม
อาหารแข็งอุณหภูมิห้อง	19 (15.5)	21 (24.5)	40
อาหารแข็งอุณหภูมิ 4 °C	12 (15.5)	28 (24.5)	40
รวม	31	49	80

$$\chi^2 = 2.5806$$

สภาวะ	คิพลอยด์	โพลีพลอยด์	รวม
อาหารแข็ง	37 (34)	43 (46)	80
อาหารเหลว	31 (34)	49 (46)	80
รวม	68	92	160

$$\chi^2 = 0.9207$$

ตาราง 13 ค่า df และค่า t-test ความแตกต่างของลักษณะมะเขือเทศ

ลักษณะ	df	t
ความสูง	48.94	- 1.84
ทรงพุ่ม	35.89	- 0.49
ความยาวใบ	47.84	- 2.44**
ความกว้างใบ	58.00	- 3.24**
จำนวนปากใบ	38.97	0.84
ความยาวปากใบ	58.00	- 0.81
ความกว้างปากใบ	53.09	- 2.25
จำนวนคลอโรพลาสต์	58.00	- 4.68**
จำนวนดอก	54.06	- 4.11**
ขนาดดอก	58.00	- 3.91**
ขนาดผล	16.00	- 6.38**
น้ำหนักผล	18.00	- 5.99**
ความหนาของเนื้อผล	14.22	- 1.98
ค่า pH ของน้ำคั้น	15.25	- 1.15
ปริมาณกรดของน้ำคั้น	13.97	0.00
กรดแอสคอบิก	14.10	- 4.34**
น้ำตาลรีดิวซิง	17.30	- 2.51

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวกัลยา ชื้อสกุล ชำรงวิศว

เกิดวันที่ 20 เดือนสิงหาคม พุทธศักราช 2496

สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดตรัง

สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 396 ถนนกันตัง อำเภอเมือง
จังหวัดตรัง 92000

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ 2 ระดับ 6

ที่ทำงานปัจจุบัน โรงเรียนวิเชียรมาตุ จังหวัดตรัง

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2513 มัธยมศึกษาตอนต้น จากโรงเรียนยุวราชบุรีวิทยา
จังหวัดตรัง

พ.ศ. 2517 ป.กศ.สูง (วิทยาศาสตร์) จากวิทยาลัยครูยะลา

พ.ศ. 2519 กศ.บ. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สงขลา

พ.ศ. 2536 วท.ม. (เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประสานมิตร

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในมะเขือเทศโดยใช้สารโคลชิซิน
ในเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

บทคัดย่อ

ของ

กัลยา ชำรงวิศว

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
กันยายน 2536

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในมะเขือเทศ เพชเชกเตอร์ 490 โดยใช้สารโคลชิซิน 2 วิธี คือ แช่เมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วในสารละลายโคลชิซินที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.05 0.1 และ 0.4 เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำเมล็ดวางบนอาหาร MS อีกวิธีหนึ่งโดยการเพาะเลี้ยงตาข้างในอาหาร MS ดัดแปลงโดยการเติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (MSB_1) เป็นเวลานาน 7 วัน แล้วย้ายสู่อาหาร MSB_1 ที่มีสารโคลชิซินความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 0.1 ทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลว แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ต่อจากนั้นย้ายเนื้อเยื่อสู่อาหารเติม คือ MSB_1 ที่ไม่มีสารโคลชิซินเพื่อชักนำให้เกิดต้น และย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหาร $MSN_{0.1}$ เพื่อชักนำให้เกิดราก

การศึกษาโครโมโซมจากปลายรากและปลายยอด พบว่าต้นโพลีพลอยด์มีร้อยละ 50.4 และ 41.66 ตามลำดับ และต้นที่ได้มีลักษณะเป็นไตรเมอรา สารโคลชิซินสามารถชักนำให้ตาข้างเกิดโพลีพลอยด์ได้มากกว่าเมล็ด และการใช้สารโคลชิซินที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ดีที่สุด ต้นโพลีพลอยด์ที่ได้มีขนาดใบ ขนาดดอก และขนาดผล ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ นอกจากนี้จำนวนและการกระจายตัวของคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของต้นโพลีพลอยด์แตกต่างจากต้นดิพลอยด์ เมื่อศึกษาคุณภาพผลของมะเขือเทศ พบว่าต้นโพลีพลอยด์มีปริมาณกรดแอสคอบิกสูงกว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ปริมาณกรดในน้ำคั้นและปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงจากผลมะเขือเทศต้นโพลีพลอยด์และต้นดิพลอยด์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

COLCHICINE - INDUCED POLYPLOIDY IN *Lycopersicon esculentum*
BY TISSUE CULTURE

AN ABSTRACT
BY
KALAYA THAMRONGWISAWA

Presented in partial fulfillment of the requirements for the
Master of Science degree in Biological Chemistry
at Srinakharinwirot University
September 1993

Tomato polyploidy was induced in Pacessetter 490 by colchicine treatment. Two methods of colchicine application were employed. First, seeds were sterilized and immersed in 0.05, 0.1 and 0.4% colchicine for 3 days before being transferred to MS medium. Second, auxillary meristems were cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l BA (MSB₁) for 7 days prior to colchicine treatment. The explants were placed on solid and liquid MSB₁ which contained 0.05 and 0.1% colchicine and cultured at 25 ± 2°C and 4°C for 3 days, then transferred to induce shoot on MSB₁ without colchicine. The treatment with 0.05% colchicine in liquid MSB₁ induced multiple shoots and grew with best results. Plantlets were induced roots on MS medium containing 0.1 mg/l NAA.

The chromosome number of regenerated plantlets were counted from root tips and shoot tips. Chromosome doubling was 50.40% from root tips and 41.66% from shoot tips with high frequencies of cytochimeric plantlets. Induced polyploidy in auxillary meristem explants produced better results than those from seed. The polyploid production in liquid MS medium containing 0.1% colchicine at 4°C created best results. Polyploid leaves, flowers and fruits were larger than those of diploid. Distribution and number of chloroplast in guard cells of the polyploid were obvious. The result demonstrated that the polyploid yielded higher ascorbic acid in tomato fruits. However, the difference was not statistically significant