บทที่ 2

การสำรวจเอกสาร

แตงโมเป็นพืชที่จัดอยู่ใน family Cucurbitaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Citrullus lanatus* MATS. & NAKAI) เป็นไม้ล้มลุก มีช่วงอายุประมาณ 90 วัน ตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวมีลักษณะเป็นไม้เลื้อยอาบน้ำ ใบเป็นใบเดี่ยว มีการเรียงตัวแบบ alternate ดอกเป็นดอกแยกเพศ (วิทย์ เที่ยวบูรณธรรม, 2531) ที่นิยมปลูกกันมีหลายพันธุ์ คือพันธุ์เปลือกดำ หรือชูการ์เบบี้ (Sugar Baby) ผลมีลักษณะกลม เปลือกสีเขียวเข้มเกือบดำ เนื้อร่วนทรายสีแดง เป็นพันธุ์จากประเทศสหรัฐอเมริกา พันธุ์ชูการ์เบล (Sugar Belle) ผลมีลักษณะกลม เปลือกสีดำ เนื้อร่วนสีแดง เป็นพันธุ์ลูกผสมจากประเทศญี่ปุ่น พันธุ์สวีท เฟเฟละริท (Sweet Favorite) ผลมีลักษณะกลมยาวและมีขนาดใหญ่ เปลือกมีสีเขียวอ่อนมีลายสีเขียวเข้ม เนื้อสีแดง เป็นพันธุ์ลูกผสมจากประเทศญี่ปุ่น พันธุ์ไทสโตน (Taistone) ผลมีลักษณะกลมรีและมีขนาดใหญ่ เปลือกมีสีเขียวอ่อนมีลายสีเขียวเข้มเป็นร่างแห เนื้อสีแดง เป็นพันธุ์ลูกผสมจากประเทศเดนมาร์ก พันธุ์เยลโล่เบบี้ (Yellow Baby) ผลมีลักษณะกลม เปลือกมีสีเขียวอ่อนมีลายสีเขียวเข้ม เนื้อร่วนทรายสีเหลืองเป็นพันธุ์จากไต้หวัน และพันธุ์ยูสวีทธิง (You Sweet Thing) ผลมีลักษณะกลม เปลือกมีสีเขียวอ่อนมีลายเป็นทางสีเขียวเข้ม เนื้อสีแดง เป็นพันธุ์ลูกผสมจากประเทศญี่ปุ่น (ธรรยงค์ เหตานุรักษ์ และ ธวัช ลวะเปารยะ, 2522)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแตงโมและพืชชนิดใกล้เคียง</u>

วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ์ อาภรณ์ ชูสูง และดำรง สินไชย (2529) รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิด multiple shoot จากปลายยอดของต้นกล้าแตงโมพันธุ์ชูการ์เบบี้ ที่เพาะในสภาพปลอดเชื้อ โดยตัดเอาปลายยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS + IAA 0.5 mg/l + Kinetin 4 mg/l และชักนำให้เกิดรากได้โดยใช้อาหารสูตร MS + IAA 5 mg/l โดยจะเกิดรากหลังจากย้ายปลายยอดลงในอาหารได้ประมาณ 1 สัปดาห์

Shivastava (1989) รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้จากส่วน ใบเลี้ยง และ hypocotyl จาก ต้นกล้าแตงโมสายพันธุ์ Metitoposki ที่เพาะในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้อาหารสูตร MS + BAP 4.5 μM (9.67 mg/l) ชักนำให้เกิดยอดและใช้อาหารสูตร MS + NAA 0.5 μM (0.93 mg/l) และ MS + NAA 1.0 μM (1.86 mg/l) ชักนำให้เกิดราก และจากการทดลองนี้ยังได้รายงานอีกว่า IAA สามารถชักนำให้เกิดรากได้เช่นเดียวกัน แต่รากที่ได้จะมีขนาดเล็กและสั้นกว่ารากที่ได้จากการใช้ NAA

สำหรับพืชที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับแตงโม Pink และ Walkey (1984) รายงานว่าสามารถใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในการขยายพันธุ์ต้นฟักทอง (Cucurbita pepo L.) สายพันธุ์ Cinderella โดยการนำเอาส่วนปลายยอดของต้นกล้าที่เพาะในหลอดทดลองมาเพิ่มจำนวนยอดในอาหารสูตร MS + BAP 1 mg/l จนกระทั่งได้ปริมาณมาก จากนั้นจึงนำปลายยอดมาชักนำให้เกิดรากในอาหารสูตร MS + NAA 8 mg/l เมื่อได้ต้นที่มีรากที่สมบูรณ์แล้วสามารถนำไปปลูกได้

Tabei และ Kanno (1989) รายงานว่า ในแตงกวาสามารถชักนำให้เกิดยอดจากใบเลี้ยงที่เพาะในหลอดทดลอง โดยใช้อาหารสูตร MS + 2,4-D 0.1 mg/l + NAA 1.0 mg/l และชักนำให้เกิด somatic embryos โดยใช้อาหารสูตร MS + 2,4-D 1.0 mg/l + NAA 50 mg/l

Cade และคณะ (1990) รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิด somatic embryogenesis จากใบเลี้ยงของแตงกวา ได้ในอาหารสูตร MS + 2,4-D 2 mg/l และ kinetin 0.5 mg/l

Msikita และคณะ (1990) รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดดอกได้จากใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงกวา พันธุ์ลูกผสม Burpless Hybrid โดยนำใบเลี้ยงมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS + BAP 2.0 mg/l + NAA 0.3 mg/l พบว่าได้ดอกตัวเมีย 1 ดอกซึ่งได้รับการถ่ายละอองเกสรในหลอดทดลองและสามารถพัฒนาจนเป็นผลเล็ก ๆ ที่มีเมล็ดที่มีชีวิต

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเกิดพอลิพลอยด์ในแตงโม

แตงโมเป็นพืชที่นิยมรับประทาน เพราะมีรสหวาน แต่เนื่องจากปกติ ใน 1 ผลจะมีเมล็ดประมาณ 400-800 เมล็ด (ดำรง, 2521) ทำให้ไม่สะดวกในการรับประทาน จึงมีการผลิตผลแตงโมที่ไม่มีเมล็ด โดยสร้างสายพันธุ์ที่เป็น ทริปพลอยด์ (3n = 33) ซึ่งได้จากการผสมระหว่างแตงโมเตตระพลอยด์ (4n = 44) กับดิพลอยด์ (2n = 22) ในการปลูกต้นแตงโมทริปพลอยด์จะต้องปลูกสลับกับต้นดิพลอยด์ เพื่อให้มีการผสมเกสรเกิดขึ้น จึงจะเกิดเป็นผลแตงโมแต่จะไม่มีเมล็ดที่ปกติ เนื่องมาจากความผิดปกติของ meiosis ของ ทริปพลอยด์ ซึ่งมักจะไม่สามารถสร้างเซลสืบพันธุ์ปกติที่มีโครโมโซมครบชุด คือเป็น 11 และ 22 แท่ง เซลล์สืบพันธุ์ที่มีจำนวนโครโมโซมไม่ครบชุดจะไม่สามารถทำงานได้ จึงไม่อาจจะผสมกันได้เมล็ดที่สมบูรณ์ เมล็ดจึงมีลักษณะลีบ มีสีขาว และสามารถรับประทานได้ (Allard, 1960)

ในการทำให้ต้นแตงโมปกติซึ่งเป็นดิพลอยด์ ให้กลายเป็นต้นเตตระพลอยด์นั้นทำได้โดยใช้สารโคลชิซีนเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้เป็นสองเท่า (Allard, 1960) โคลชิซีนเป็นสารเคมีที่จัดอยู่ในกลุ่มอัลคาลอยด์ที่พบในพืชวงศ์ Liliaceae สกัดได้จาก รากของต้น *Colchicum autumnale* มีสูตรโมเลกุล เป็น $C_{22}H_{25}O_6H$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 399.43 มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง มีรสขม เมื่อโดนแสงจะเปลี่ยนเป็นสีดำ มีคุณสมบัติเป็นด่างอ่อนหรือเป็นกลาง ละลาย ได้ดีในคลอโรฟอร์ม แอลกอฮอล์ และน้ำ (วราภรณ์, 2529) สารโคลชิซีนจะเสียสภาพเมื่อได้รับความร้อนสูง เช่น ความร้อนที่เกิดขึ้นในขบวนการนึ่งฆ่าเชื้อ (Pierix, 1987)

Eigsti และคณะ (1949) รายงานว่า Pernice (1889) เป็นผู้พบคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของสารโคลชิซีนซึ่งพบครั้งแรกในเซลล์สัตว์โดยพบว่าสารโคลชิซินมีผลทำให้ขนาดของเซลล์โตขึ้น และมีจำนวนโครโมโซมมากกว่าในเซลล์ปกติ

Watson (1977) รายงานว่า สารโคลชิซิน จะมีผลต่อเซลล์ที่กำลังแบ่งนิวเคลียสแบบ mitosis โดยจะไปทำให้โครงสร้างของ spindle fiber เปลี่ยนรูปไปจากเดิม ไม่สามารถดึงโครโมโซมไปยังขั้วเซลล์จึงเป็นผลให้ไม่เกิดการแยกของโครโมโซม ดังนั้นโครโมโซมจะยังคงอยู่ระหว่างขั้วเซลล์ทั้งสองเมื่อเกิดการสร้างผนังนิวเคลียสขึ้นใหม่ ทำให้เซลล์ใหม่ที่ได้มีจำนวนโครโมโซม เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า

การใช้สารโคลชิซีนทำให้พืชเปลี่ยนจาก ดิพลอยด์ เป็น เตตระพลอยด์ ส่วนใหญ่เป็นการทำในแปลงทดลอง สำหรับในแตงโมนั้นพบว่าจะเกิดในอัตราที่ค่อนข้างต่ำโดย ดำรง สินไชย (2521) รายงานว่าสามารถใช้สารโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซนต์นำมาหยดที่ปลายยอดของแตงโมสายพันธุ์ชูการ์เบบี้ ในระยะที่ใบเลี้ยงเริ่มคลี่ โดยหยด เช้าเย็น 6 8 และ 10 ครั้ง พบว่าเกิดต้นเตตระพลอยด์ขึ้น 4.22 5.12 และ 8.19 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ธรรยงค์ เหดานุรักษ์ และธวัช ลาะเปาระ (2522) รายงานว่าจากการเปรียบเทียบการตอบสนองต่อสารโคลชิซีนในแตงโม 6 สายพันธุ์ได้แก่ You sweet thing Yellow baby Sweet favorite Sugar baby Super bells และ Taistone โดยใช้สารโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซนต์ หยดที่ปลายยอดต้นกล้าในระยะที่ใบเลี้ยงเริ่มคลี่ โดยหยด เช้าและเย็น ติดต่อกัน 5 วัน สามารถตรวจพบต้นแตงโมที่เปลี่ยนเป็น พอลิพลอยด์ 17.46 15.91 11.65 8.49 5.26 และ 3.82 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ซึ่งยังเป็นอัตราที่ค่อนข้างต่ำ

<u>การชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในหลอดทดลอง</u>

การเพิ่มจำนวนโครโมโซมพืชโดยการใช้สารโคลชิซีนในสภาพธรรมชาตินั้น ต้องทำเป็นจำนวนมาก เพราะมีโอกาสน้อยที่จะได้ต้นที่มีจำนวนโครโมโซมตามที่ต้องการ เนื่องจากอัตราการเจริญของเซลล์ที่เป็นพอลิพลอยด์ จะต่ำกว่าเซลล์ที่เป็นดิพลอยด์ ทำให้มีการทดลองชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง ซึ่งสามารถเกิดได้ง่ายกว่าการใช้สารชักนำชนิดเดียวกันกับต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ (Murashige, 1974) จึงมีการทดลองนำสารโคลชิซินมาใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อที่จะเพิ่มปริมาณของต้นที่เกิดพอลิพลอยด์

Heinz and Mee (1970) รายงานว่าจากการทดลองใช้สารโคลชิซินชักนำให้เซลล์แขวนลอยของอ้อยเพิ่มจำนวนโครโมโซม โดยนำเซลล์แขวนลอยของอ้อยมาแช่ในสารโคลชิซีนเข้มข้น 50 ppm นาน 4 วัน เมื่อนำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปชักนำให้เกิดแคลลัสพบว่าแคลลัสสามารถเจริญเป็นต้นได้ เมื่อนำต้นอ้อยที่ได้ออกปลูก แล้วนำปลายรากมาตรวจนับพบว่ามีจำนวนโครโมโซมเพิ่มจาก 2n = 112 เป็น 2n = 232

Chen (1979) รายงานว่า จากการทดลองใน *Hemerocallis flava* ซึ่งเป็นพืชในตะกูลดอกไม้จีน (daylily) พบว่าจากการใช้สารโคลชิซีน 40 mg/l กับแคลลัสของดอกไม้จีนเป็นเวลา 7 วัน เมื่อนำแคลลัสที่ได้มาชักนำให้เกิดต้นพบว่าต้นที่ได้กว่า 50 เปอร์เซนต์ เปลี่ยนเป็น เตตระพลอยด์

Espino and Vazquel (1981)รายงานว่าจากการทดลองในต้น แอฟริกัน ไวโอเล็ต (*Saintpaulia ionantha* L.) โดยแช่ใบในสารโคลชิซีน 100 150 และ 200 mg/l เป็นเวลา 4 7 13 และ 16 วัน จากนั้นจึงย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตรที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นจากแผ่นใบ แล้วย้ายต้นที่ได้ออกปลูกแล้วนำรากมาตรวจจำนวนโครโมโซม พบว่าสารโคลชิซีนความเข้มข้น 150 mg/lโดยแช่นาน 4 วันทำให้เกิดปริมาณพอลิพลอยด์สูงที่สุดคือ 46 เปอร์เซนต์

Lyrene และ Perry (1982) รายงานว่า จากการทดลองในบลูเบอร์รี่พบว่าสามารถชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ โดยนำปลายยอดมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร modified Knop ที่มีสารโคลชิซีน 0.2 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Perry และ Lyrene (1983) ได้ทำการทดลองในบลูเบอร์รี่อีก 5 สายพันธุ์ โดยนำท่อนบลูเบอร์รี่มาแช่ในอาหารเหลวสูตร modified Knop เช่นเดียวกัน โดยใช้ความเข้มข้นของสารโคลชิซีนเป็น 0 0.01 0.05 0.10 และ 0.20 เปอร์เซนต์ ที่เวลาต่าง ๆ คือ 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมงพบว่าความเข้มข้นและเวลาที่สามารถชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ดีที่สุดที่คือที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซนต์ นาน 72 ชั่วโมง และเกิดพอลิพลอยด์จำนวน 20 เปอร์เซนต์

Niemirowicz (1984) รายงานว่า จากการทดลองใน *Fragaria vesca* L. โดยใช้สารโคลชิซีน 0.1 และ 0.5 เปอร์เซนต์เป็นเวลา 48 ชั่วโมงจากนั้นจึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดรากแล้วย้ายออกปลูกเมื่อนำ รากมาตรวจโครโมโซม พบว่าได้ต้นที่เป็นเตตระพลอยด์ 37.87 และ 43.58 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

Miyazaki (1985) รายงานว่า จากการทดลองกับเผือก (*Colocasia esculenta* Schott) โดยใช้สารโคลชิซีน 0.05 เปอร์เซนต์พบว่าทำให้เกิดเตตระพลอยด์ 4.3 เปอร์เซนต์ และพบ chimera 18.3เปอร์เซนต์

ทนง พรประดับเกียรติ (2528) รายงานว่าจากทดลองใช้สารโคลชิซีน 0.05 0.1 และ 0.2 เปอร์เซนต์ กับเซลล์แขวนลอยของอ้อย 6 สายพันธุ์พบว่าสารโคลชิซีน ทั้ง 3 ความเข้มข้นมีผลทำให้อัตราการเจริญ ของแคลลัสอ้อยทั้ง 6 สายพันธุ์ช้าลงกว่าปกติแต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้

สมทรง โชติชื่น เกษม สุขสถาน และไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา (2529) รายงานการทดลองในอ้อยอีกสายพันธุ์ โดยใช้สารโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 50 100 และ 150 ppm กับเซลล์แขวนลอยของอ้อยนาน 4 วัน พบว่าที่ความเข้มข้น 50 ppm สามารถชักนำให้เซลล์แขวนลอยเจริญเป็นต้นได้ และมีอัตราการเจริญช้ากว่าปกติในขณะที่ความเข้มข้น 100 และ 150 ppm ไม่สามารถชักนำให้เซลล์แขวนลอยเจริญเป็นต้นได้ เมื่อนำต้นอ้อยที่ได้มาตรวจนับจำนวนโครโมโซมพบต้นพอลิพลอยด์ประมาณ 40 เปอร์เซนต์

ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และอรดี สหวัชรินทร์ (2529) รายงานว่าจากการทดลองในขิงโดยการแช่ต้นขิงที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในสารโคลชิซินความเข้มข้น 0 0.25 0.50 0.75 และ 1.00 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 1 2 3 และ 4 วัน พบว่าความเข้มข้นของ สารโคลชิซินและเวลาที่เพิ่มขึ้น ทำให้การเจริญ และการรอดชีวิตของต้นขิงลดลง จากการตรวจนับโครโมโซมจากต้นขิงที่รอดชีวิตพบว่าที่ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซนต์ แช่เป็นเวลา 1 วัน และ 0.05 เปอร์เซนต์ แช่เป็นเวลา 2 วัน พบว่าทำให้ต้นขิงที่ได้จากการย้ายอาหาร ครั้งที่ 2 เป็น เตตระพลอยด์ คิดเป็น 50 และ 33 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และจากการย้ายอาหาร ครั้งที่ 3 เป็นเตตระพลอยด์ คิดเป็น 60 และ 40 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

เสริมศิริ เอี่ยมแฟง อรดี สหวัชรินทร์ และสนธิชัย จันทร์เปรม (2532) รายงานว่าจากการใช้สารโคลชิซีนกับต้นเก็กฮวยพันธุ์หังโจว โดยใช้ท่อนของต้นเก็กฮวยมาแช่ในสารละลายโคลชิซีนนาน 1 2 3 4 และ 5 ชั่วโมง พบว่าต้นที่เป็นเตตระพลอยด์มีจำนวนน้อย คือ อยู่ในช่วง 1.65 ถึง 4.47 เปอร์เซนต์ โดยบางต้นจะเกิดลักษณะของ physiological damage ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากความเป็นพิษของสารโคลชิซีนเอง

Gupton (1989) รายงานว่าจากการการทดลองใช้สารโคลชิซีนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Rubus allegheniensis* และ *R. rusticanus* โดยใช้ปลายยอดแช่ใน สารโคล-ชิซีน ความ เข้มข้น 0.02 0.04 0.06 และ 0.08 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น

ย้ายลงในสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดรากเมื่อปลายยอดเจริญขึ้นจนมีใบ 3-4 ใบจึงย้ายปลูกเพื่อทำให้เกิดรากดีขึ้น เมื่อนำปลายรากมานับจำนวนโครโมโซม พบว่าเกิดเตตระพลอยด์ของทั้ง 2 พันธุ์ โดย *R. allegheniensis* พบ 40 เปอร์เซนต์ ที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซนต์ *R. rusticanus* พบปริมาณพอลิพลอยด์ 15 เปอร์เซนต์ เท่ากัน ในสองความเข้มข้น คือ 0.04 และ 0.06 เปอร์เซนต์

ดังนั้นในการนำคุณสมบัติของเซลล์ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพหลอดทดลอง ที่มีการตอบสนองต่อสารชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ง่าย ก็น่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะสร้างต้นแตงโมที่เป็นเตตระพลอยด์ สำหรับใช้เป็นต้นแม่พันธุ์ในการผลิตเมล็ดพันธุ์แตงโมที่ไม่มีเมล็ดได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบสูตรอาหารสำหรับชักนำให้เกิดยอด และสูตรอาหารสำหรับชักนำให้เกิดรากของแตงโมในหลอดทดลองซึ่งอาจใช้ประโยชน์ได้ต่อไปในการขยายพันธุ์แตงโม

2. ทราบความเข้มข้น ของสารโคลชิซีน และระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ ของแตงโมในหลอดทดลอง เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อแตงโม

2. เพื่อชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในแตงโมพันธุ์พันธุ์ชูการ์เบบี้ในหลอดทดลองโดยใช้สารโคลชิซีน

3. เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของโคลชิซินที่เหมาะสม ในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย