รายงานวิจัย

การเพิ่มจำนวนโครโมโซม “คราม งอ” (*Indigofera suffruticosa*) โดยใช้การใช้โคลชิซิน เพื่อการสนับสนุนภูมิปัญญาของจังหวัดสกลนคร

Chromosome Doubling of “Kram ngo” (*Indigofera suffruticosa*) by Colchicine Treatment for Supporting of Sakon Nakhon Knowledge

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร.สุนทรีย์ สุรศร (หัวหน้าโครงการวิจัย) สังกัดคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

2. ดร.ศุภสิทธิ์ สิทธาพานิช (ผู้ร่วมวิจัย) สังกัดมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติสกลนคร

3. อาจารย์ณัฐพงษ์ วงษ์มา (ผู้ร่วมวิจัย) สังกัดคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยสำหรับบุคลากรมหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร
จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
เมษายน 2559

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเกิดโพลีพลอยด์ในเมล็ดครามงองอกโดยการชักนำด้วยสารละลายโคลชิซินในความเข้มข้นต่าง ๆ (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลาต่าง ๆ (0, 6 และ 12 ชั่วโมง) พบว่า ความเข้มข้น ของโคลชิซินในแต่ละระดับทำให้ลักษณะความงอก ความสูง และจำนวนใบ ของต้นกล้าครามงอมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ส่วนเวลาที่ได้รับโคลชิซินแต่ละระดับไม่ทำให้ความงอก ความสูง และจำนวนใบของต้นกล้าครามงอแตกต่างทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่า มีปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น และเวลาของการได้รับโคลชิซินของครามงอด้วย

จากการศึกษา พบว่า ต้นกล้าครามที่ได้รับโคลชิซินมีความแตกต่างกัน 2 ลักษณะจำแนกได้เป็นต้นกล้าปกติ และต้นกล้าผิดปกติ โดยต้นกล้าครามผิดปกติเกิดขึ้นในทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน (0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่ระดับเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม พบว่า ทรีตเมนต์ที่พบต้นกล้าผิดปกติมากที่สุดที่ ทรีตเมนต์ T4 (0.1, 12) และ T7 (0.4, 6) (65.69 และ67.27 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) และเมื่อตรวจสอบต้นกล้าผิดปกติ พบว่าสามารถจำแนกเป็น 3 ประเภท คือ ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ โดยทรีตเมนต์ ที่ปรากฏต้นกล้าผิดปกติมากมีจำนวน 2 ทรีตเมนต์ คือ T4 และT7 จากการตรวจสอบด้วยเทคนิคโฟลโตมิตริ พบว่า T4 มีความเป็นโพลีพลอยด์ (มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์) 90.61 เปอร์เซ็นต์ และT7 มีความเป็นโพลีพลอยด์ (มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์) 93.33 เปอร์เซ็นต์ ทั้งสองทรีตเมนต์มีความเป็นเตตราพลอยด์ใกล้เคียงกัน (27.27 และ33.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม พบว่า T6 (0.2, 12) มีต้นครามเตตราพลอยด์สูงที่สุด (50 เปอร์เซ็นต์)

เมื่อตรวจสอบความแตกต่างของต้นครามที่เป็นดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตเตราพลอยด์ พบว่า มีความแตกต่างกันในหลาย ๆ ลักษณะ ได้แก่ ความสูง จำนวนกิ่ง จำนวนใบประกอบ ดัชนีใบ จำนวนใบย่อย/ใบ และพื้นที่ใบ โดยลักษณะใบของดิพพลอยด์ และเตตราพลอยด์มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่า ลักษณะของครามมีหลายลักษณะที่มีความสัมพันธ์กันทางบวก และหลายลักษณะที่มีความสัมพันธ์กันทางลบ

Key words : Kram ngo, *Indigofera suffruticosa*, polyploid, colchicine

ABSTRACT

The study was conducted to investigate polyploidy production of *Kram ngo* (*Indigofera suffruticosa*) sprouts. The seeds were induced to produce polyploidy using colchicine treatments of various concentrations (0.0, 0.1, 0.2 and 0.4 percent) and different immersion time (0, 6 and 12 hours). It was found that different colchicine concentrations produced significant differences in terms of the Kram ngo (*Indigofera suffruticosa*) sprouts' growth traits, number of leaves and height. However, different durations of an immersion of the seeds in each particular colchicine concentration did not make any statistical differences in the growth level, height, and number of leaves of the Kram ngo (*Indigofera suffruticosa*) sprouts. Besides, there was correlation between colchicine concentrations and immersion period of Kram ngo (*Indigofera suffruticosa*).

Kram ngo (*Indigofera suffruticosa*) sprouts treated by colchicines could be categorized as normal and abnormal. The abnormal sprouts were produced by 0.1%, 0.2% and 0.4% concentrated colchicines for the period of 6 and 12 hours. Treatment 4 (0.1, 12) and Treatment 7 (0.4, 6) produced most abnormal sprouts (or 65.69 and 67.27 percent respectively). In examining these abnormal sprouts, it was found that they included diploid, mixoploid and tetraploid sprouts. Treatment 4 and Treatment 7 contained many abnormal sprouts. When employing Flow Cytometry to check these sprouts, it showed that the polyploidy (mixoploid and tetraploid) of Treatment 4 was 90.61% while that of Treatment 7 was 93.33%. Both treatments (4 and 7) had close tetraploidy (27.27% and 33.33% respectively). Anyway, Treatment 6 (0.2, 12) had the highest percentage of tetraploid *Kram ngo* (*Indigofera suffruticosa*) sprouts (50%).

In addition, the diploid, mixoploid and tetraploid *Kram ngo* (*Indigofera suffruticosa*) sprouts were different from one another in many respects: height, number of branches, number of compound leaves, leaf index, number of leaflets /leaves, and leaf area. The diploids and tetraploids were obviously different from each other. All in all, many features of the Kram ngo (*Indigofera suffruticosa*) plants were both positively and negatively correlated.

Keywords : Kram ngo, *Indigofera suffruticosa*, polyploid, colchicine

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	17
บทที่ 4 ผลการวิจัย	20
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	43
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	47
บรรณานุกรม	48

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3.1	ทรีตเมนต์ที่ทำการศึกษาในเมล็ดครามงองอก	18
ตารางที่ 4.1	ลักษณะความงอก ความสูงของต้นกล้า และจำนวนใบประกอบ ของต้นกล้าครามที่ได้รับ ความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) กับระดับเวลา (6 และ12) ที่ได้รับโคลชิซิน	22
ตารางที่ 4.2	ลักษณะของต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซิน หลังจากเพาะต้นกล้า 15 วัน	26
ตารางที่ 4.3	การเกิดต้นผิดปกติที่งอกจากเมล็ดที่ได้รับโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาระดับต่าง ๆ (0, 6 และ 12 ชั่วโมง)	28
ตารางที่ 4.4	การตรวจสอบความเป็นโพลีพลอยด์ของต้นผิดปกติที่งอกจากเมล็ดครามที่ได้รับโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาระดับต่าง ๆ (0, 6 และ 12 ชั่วโมง)	31
ตารางที่ 4.5	การเกิดต้นเตตราพลอยด์ของเมล็ดครามที่ได้รับโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาระดับต่าง ๆ (0, 6 และ 12 ชั่วโมง)	32
ตารางที่ 4.6	ลักษณะลำต้นของต้นครามงอที่มีชุดโครโมโซมเป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์	33
ตารางที่ 4.7	ลักษณะใบของต้นครามงอที่มีชุดโครโมโซมเป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ (จำนวนใบประกอบ น้ำหนักใบประกอบ จำนวนใบย่อย/1ใบประกอบ ความยาว และความกว้างใบ)	35
ตารางที่ 4.8	ลักษณะใบของต้นครามงอที่มีชุดโครโมโซมเป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ (ดัชนีใบ น้ำหนักใบย่อย พื้นที่ใบย่อย น้ำหนักใบย่อย/พื้นที่ใบย่อย)	37
ตารางที่ 4.9	ค่าสหสัมพันธ์ลักษณะต่าง ๆ ของครามงอ	42

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 4.1	ลักษณะความงอก ความสูง จำนวนใบประกอบ ของต้นกล้าครามอายุ 15 วัน หลังจากได้รับโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.0 0.1 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง	23
ภาพที่ 4.2	ลักษณะความงอก ความสูง จำนวนใบประกอบ ของต้นกล้าหลังจากเมล็ดคราม ได้รับโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่ระดับเวลา 6 ชั่วโมง	24
ภาพที่ 4.3	ลักษณะความงอก ความสูง จำนวนใบประกอบ ของต้นกล้าหลังจากเมล็ดคราม ได้รับโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่ระดับเวลา 12 ชั่วโมง	25
ภาพที่ 4.4	ลักษณะของต้นกล้าครามอายุ 15 วัน หลังจากการทรีตโคลชิซิน ก. ต้นกล้าปกติ ข. ต้นกล้าผิดปกติ	27
ภาพที่ 4.5	การเกิดต้นผิดปกติที่งอกจากเมล็ดที่ได้รับโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาระดับต่าง ๆ (0, 6 และ 12 ชั่วโมง)	28
ภาพที่ 4.6	ลักษณะฮิสโตแกรมของต้นกล้าครามที่ตรวจด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ก. ฮิสโตแกรมของต้นดิพพลอยด์ ข. ฮิสโตแกรมของต้นมิกโซพลอยด์ ค. ฮิสโตแกรมของต้นเตตราพลอยด์	30
ภาพที่ 4.7	ความเป็นโพลีพลอยด์ของต้นผิดปกติที่งอกจากเมล็ดครามที่ได้รับโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาระดับต่าง ๆ (0, 6 และ 12 ชั่วโมง)	31
ภาพที่ 4.8	การเกิดต้นเตตราพลอยด์ของเมล็ดครามที่ได้รับโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาระดับต่าง ๆ (0, 6 และ 12 ชั่วโมง)	32
ภาพที่ 4.9	ลักษณะความสูง เส้นรอบวง จำนวนข้อ และจำนวนกิ่งของต้นครามงอที่มีชุดโครโมโซมเป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์	34
ภาพที่ 4.10	ลักษณะต้นครามอายุ 3 เดือน ก. ต้นดิพพลอยด์ (ซ้าย) และต้นมิกโซพลอยด์ (ขวา)ข. ต้นดิพพลอยด์ (ซ้าย) ต้นเตตราพลอยด์ (ขวา)	34

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 4.11	ลักษณะจำนวนใบประกอบ น้ำหนักใบประกอบ จำนวนใบย่อย/1 ใบประกอบ ความยาวใบ และความกว้างใบ	36
ภาพที่ 4.12	ลักษณะใบของต้นครามอายุ 3 เดือน ก. ใบของต้นดิพพลอยด์ ข. ใบของต้นมิกโซพลอยด์ ค. ใบของต้นเตตราพลอยด์	36
ภาพที่ 4.13	ลักษณะดัชนีใบ น้ำหนักใบย่อย พื้นที่ใบย่อย น้ำหนักใบย่อย/พื้นที่ใบย่อย ของต้นครามงอที่มีชุดโครโมโซมเป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ (ต่อ)	38
ภาพที่ 4.14	ลักษณะปากใบและขนของต้นครามอายุ สัปดาห์ ก. ปากใบและขนของต้นดิพพลอยด์ ข. ปากใบและขนของต้นมิกโซพลอยด์ ค. ปากใบและขนของต้นเตตราพลอยด์	39

บทที่ 1

บทนำ

ต้นครามงอ เป็นพืชท้องถิ่นที่ให้สีคราม ต้นคราม (Indigo) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Indigofera suffruticosa* เป็นพืชในวงศ์ Leguminosae ที่พบในประเทศไทยมี 13 ชนิด มักพบมีการเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อน ชอบแสงแดดจ้า สามารถทนอากาศร้อนดินเค็ม และฝนหนักได้ ในประเทศไทยมักพบเป็นวัชพืชตามสวน และไหล่ทาง ซึ่งเป็นดอน โล่ง กลางแจ้ง การใช้ประโยชน์ ต้นและใบของครามนำมาหมัก และตกตะกอนด้วยด่าง จะให้เนื้อครามสีน้ำเงินเข้ม ใช้ย้อมสีของผ้าฝ้าย นอกจากนี้ยังมีการใช้ครามเพื่อการรักษาโรค โดยใช้ทั้งต้น แก้อาการบวมพอง ขับปัสสาวะ ขับนิ่ว เปลือกใช้แก้พิษงู แก้พิษดี ขับพยาธิ แล้โลหิตตก แก้บวม ใบช่วยดับพิษ แก้ตัวร้อน แก้ปวดศีรษะ รากแก้พิษสารหนู

ในจังหวัดสกลนครมีการผลิตผ้าย้อมครามจากต้นครามจำหน่าย และเป็นสินค้าที่ทำรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้ผลิตผ้าคราม และเป็นสินค้าที่สร้างชื่อเสียงให้จังหวัด ซึ่งจังหวัดสกลนครได้มีการพัฒนาด้านครามมากที่สุดอีกจังหวัดหนึ่งของประเทศไทย การผลิตผ้าย้อมครามเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่ดีงาม เป็นเอกลักษณ์ของชาวสกลนคร สมควรได้มีการฟื้นฟู และสืบทอดต่อไป ยังลูกหลานอันเป็นการรักษาวัฒนธรรมอันดีงาม ตลอดจนสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรผู้ผลิตผ้าย้อมครามยังและกลุ่มอาชีพต่างๆ ในอนาคตควรได้มีการพัฒนาพันธุ์ครามที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น เพื่อส่งเสริมให้การผลิตผ้าพื้นเมืองที่เกิดจากการย้อมครามเป็นอุตสาหกรรมที่สร้างชุมชนเข้มแข็งในจังหวัดสกลนครและระดับประเทศต่อไป

สำหรับผลผลิตสีจากต้นครามสามารถสกัดได้จากกิ่งใบแก่ และใบอ่อน โดยกิ่งใบครามแก่-อ่อน ให้สีครามประมาณร้อยละ 0.4 หรือ ทั้งกิ่งทั้งใบแก่และใบอ่อนประมาณ 8 กิโลกรัมให้เนื้อครามปนปูนขาว 1 กิโลกรัม สามารถย้อมฝ้ายได้ประมาณ 200 - 300 กรัม เพื่อให้ผลผลิตที่มากเพียงพอจึงต้องปลูกต้นครามค่อนข้างมาก ยิ่งถ้าทำผ้าย้อมครามตลอดปีเพื่อการค้ายิ่งทำให้ต้องปลูกครามในปริมาณมาก

การสร้างพืชที่เป็นโพลีพลอยด์ ซึ่งเป็นพืชที่มีลำต้นขนาดใหญ่ และมีปริมาณสาระสำคัญต่างๆ ในลำต้นเพิ่มขึ้น เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการพัฒนาพันธุ์พืชเพื่อเพิ่มผลผลิตที่ได้ผลในพืชหลายชนิด การศึกษาในครั้งนี้จึงได้แนวคิดในการพัฒนาพันธุ์ครามให้เป็นต้นโพลีพลอยด์ เพื่อใช้ในการพัฒนาพันธุ์ครามที่มีการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในการผลิตสีครามที่สกัดได้จากลำต้นให้เพิ่มขึ้น และใช้ในอุตสาหกรรมย้อมครามในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อหาแนวทางในการชักนำต้นครามงอให้เพิ่มโครโมโซมเป็น 2 เท่า โดยการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมด้วยกรรมวิธีต่างๆ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ต้นคราม

ต้นครามเป็นไม้พุ่มตระกูลถั่ว ชอบน้ำน้อย แดดจัด บริเวณที่เหมาะแก่การปลูกจึงมักเป็นที่ดอนโล่ง เช่น หัวไร่ปลายนา คันคูของบ่อปลาและต้องดายหญ้าเสมอ เพื่อให้ต้นครามได้รับแดดจัดเต็มที่ ใบครามสดให้สีครามประมาณร้อยละ 0.4 หรือทั้งกิ่งทั้งใบแก่และใบอ่อนประมาณ 8 กิโลกรัม จึงได้เนื้อครามปนปูนขาว 1 กิโลกรัม ย้อมฝ้ายได้ประมาณ 200 - 300 กรัม จึงต้องปลูกต้นครามค่อนข้างมาก ยิ่งถ้าทำผ้าย้อมครามตลอดปีเพื่อการค้า ยิ่งต้องปลูกประมาณปีละ 5-6 ไร่ พอต้นครามอายุ 3 เดือน ให้สีครามมากที่สุด ต้นครามสูงประมาณ 1-2 เมตร ใบประกอบแบบขนนกเรียงสลับ ปลายใบเดี่ยว ใบย่อยมีรูปรี ดอกช่อ ออกตามซอกใบ ดอกย่อยรูปดอกถั่ว กลีบดอกสีชมพู ผลเป็นฝัก มีทั้งฝักตรงและฝักโค้ง ภายในฝักมี 7-12 เมล็ด ระบบรากเป็นระบบรากแก้ว ลำต้นประกอบด้วยข้อและปล้อง มีตาและตาดอกเกิดขึ้นบริเวณข้อ แล้วเกิดเป็นช่อดอกในภายหลัง แต่ละดอกประกอบด้วยกลีบดอก 4 กลีบ เกสรตัวผู้ 10 อัน เกสรตัวเมีย 1 อัน เมล็ดของครามมีลักษณะสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ค่อนข้างกลม ขนาดเล็ก มีน้ำหนักเฉลี่ย 3.35-16.14 กรัมต่อ 1,000 เมล็ด จากการทดลองใช้ใบและก้านใบของครามอายุ 2, 4 และ 5 เดือน สกัดสีคราม พบว่าครามอายุ 3 เดือนให้ปริมาณสีครามมากที่สุด คือ 2.95 พีพีเอ็มต่อชิ้นส่วนสกัด 25 กรัม ขณะที่ครามอายุ 2, 4 และ 5 เดือน ให้ปริมาณสี 1.5, 1.26 และ 1.21 พีพีเอ็ม ตามลำดับ

การปลูกคราม

ครามชอบดินร่วน น้ำไม่ท่วมขัง แดดจัด การเลือกพื้นที่ปลูกต้องเป็นที่ดอน โล่ง มีแสงแดดเพียงพอ เช่น เชิงป่า ชายทุ่งนา คูบ่อปลา และสันคลอง โดยเตรียมดินด้วยการไถพรวนและเก็บเศษไม้ให้หมด ถ้าพื้นที่ค่อนข้างต่ำควรยกร่อง ประมาณเดือนเมษายน หว่านเมล็ดและเกลี่ยดินกลบป้องกันมดหรือแมลง โดยเกลี่ยดินบางๆ ให้ต้นอ่อนแทงดินขึ้นมาได้ หรือปลูกโดยวิธีหยอดหลุม เป็นแถวหลุมละ 3-4 เมล็ดแต่ละแถวห่างกันประมาณ 40-60 เซนติเมตร เมื่อได้น้ำฝนเมล็ดครามจะเริ่มงอก

การดูแลต้นคราม

เมื่อครามงอกเป็นต้นอ่อนเล็กๆ ค่อนข้างบอบบางต้องถอนต้นครามที่ใกล้กันเกินไปและไม่แข็งแรงทิ้งไป การดูแลที่สำคัญ คือ การดายหญ้าตลอด ไม่ให้มีวัชพืชบดบังแสงแดด เมื่อต้นครามห่างกันพอดีจะได้รับปุ๋ย น้ำฝน และแสงแดดจากธรรมชาติอย่างเพียงพอกิ่งก้านกางออก ใบหนาเขียวเข้ม จนเมื่อต้นครามอายุ 3-4 เดือน หรือสังเกตจากการออกดอก เติบโตเป็นฝักเล็ก ๆ หากเป็น

ชนิดฝักตรงจะสังเกตเห็นยอดครามแก่หงิก แสดงว่าครามแก่พอให้สีครามได้แล้ว ถ้าน้ำฝนน้อยมาก เช่นช่วงเดือนเมษายน ควรรดน้ำต้นครามสัปดาห์ละครั้ง

การเก็บเกี่ยวคราม

เก็บเกี่ยวโดยวิธีตัดหรือเกี่ยวกิ่งและใบคราม ให้เหลือตอสูงประมาณ 20 เซนติเมตร หากเป็นชนิดฝักโค้งงอจะแตกกิ่งและใบได้อีก เมื่อกิ่งรุ่นใหม่งอกใบออกดอก ออกฝัก จะเก็บใบแก่ได้อีกเรื่อย ๆ จนกว่าครามจะตายซึ่งนาน 2-3 ปี หากเป็นครามฝักตรงเกี่ยวได้ครั้งเดียว ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บใบครามคือตอนเช้ามืด เพื่อให้ได้ใบครามสดที่สุด ให้สีครามมากที่สุด หากเก็บตอนสายแดดจัดใบครามจะแห้ง เมื่อนำไปใช้แช่น้ำจะให้สีครามน้อย อีกเรื่องหนึ่งที่ควรระวัง คือ ควรสวมใส่เสื้อผ้ามิดชิดไปเก็บใบครามเพราะครามมีขนเล็กๆ มองไม่เห็น แต่ทำให้ระคายเคืองและคันทั่วร่างกาย

การเก็บเมล็ดพันธุ์

ฝักครามอ่อนมีสีเขียว เมื่อเริ่มแก่จะเป็นสีเหลือง น้ำตาลและดำ ควรเก็บฝักครามในช่วงที่เป็นสีน้ำตาล นำมาผึ่งแดดให้แห้งและเก็บในที่ร่มอากาศถ่ายเทได้ดี อาจเก็บทั้งฝักหรือบุบให้ฝักแตกเก็บเมล็ดก็ได้ ครามฝักตรง 1 ฝัก มี 9-10 เมล็ด 100 กรัมมี 16,800 เมล็ด ส่วนพันธุ์ฝักงอ 1 ฝัก มี 4-5 เมล็ด 100 กรัม จะมีประมาณ 15,900 เมล็ด ไม่ควรปล่อยไว้ให้ฝักครามเป็นสีดำคาต้น เพราะจะทำให้เมล็ดงอกยาก ก่อนนำไปปลูกให้โขลกฝักครามเบาๆ ให้ฝักแตก แล้วจึงนำไปหว่านหรือหยอดหลุม

การเตรียมสีครามธรรมชาติจากใบครามสด

ประมาณร้อยละ 90 ของผู้ทำสีครามธรรมชาติ จะทำสีครามจากใบครามสด ผู้ทำสีครามต้องระมัดระวัง ตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บใบครามจากต้น ต้องเก็บในเวลาเช้ามืดก่อนที่พระอาทิตย์ขึ้น ให้บรรจุต้น กิ่ง ใบครามสดในภาชนะ ใช้มือกดใบครามให้แน่น เติมน้ำให้ท่วมหลังมือ แช่ไว้ 10-12 ชั่วโมง จึงกลับใบครามข้างล่างขึ้นทับส่วนบน แช่ต่อไปอีก 10-12 ชั่วโมง แยกกากใบครามออกได้น้ำครามใส สีฟ้าจาง เติมปูนขาว 20 กรัมต่อน้ำคราม 1 ลิตร ถ้าชั่งใบครามสด 10 กิโลกรัม ใช้น้ำแช่ 20 ลิตร จะใช้ปูนขาว 400 กรัม หรือเติมทีละน้อยจนฟองครามเป็นสีน้ำเงิน จึงกวนจนกว่าฟองครามจะยุบพักไว้ 1 คืน รินน้ำใสทิ้ง ถ้าน้ำใสสีเขียวแสดงว่าใส่ปูนน้อย ยังมีสีครามเหลืออยู่ในน้ำคราม ถ้าใส่ปูนพอดี น้ำใสเป็นสีชา หากใส่ปูนมากเกินไป เนื้อครามเป็นสีเทาใช้ไม่ได้ เนื้อครามดีต้องเนื้อเนียนละเอียด สีน้ำเงินสดใสและเป็นเงา ซึ่งอาจเก็บเป็นเนื้อครามเปียกหรือเนื้อครามผงก็ได้ ขึ้นอยู่กับการใช้งานในขั้นตอนก่อหม้อ อย่าเชื่อว่าแช่ใบครามนานแล้วจะได้สีครามมาก เพราะผลการวิจัยปรากฏชัดว่า เมื่ออุณหภูมิคงที่ สีครามตั้งต้นในใบครามจะถูกสลาย (hydrolyse) ให้สีคราม (indoxyl) ออกมาอยู่ในน้ำครามได้มากที่สุดในเวลาที่เหมาะสมเท่านั้น การแช่ใบครามที่ใช้

เวลาน้อยหรือมากจนเกินไป จะได้สีครามน้อยแต่สิ่งปลอมปนมาก ทำให้ปนในเนื้อผ้าที่ย้อมด้วย ผ้าจึงหมอง สีไม่สวย หากต้องการสีครามเร็วให้แช่ใบครามในน้ำอุ่นไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส หรือโขลกใบครามสดในครกกระเดื่อง และแช่ในน้ำที่อุณหภูมิปกติเพียง 12 ชั่วโมง

การก่อหม้อครามเตรียมน้ำร้อน

ชั่งเนื้อครามเปียก (indigo blue) 1 กิโลกรัม ผสมน้ำขี้เถ้า 3 ลิตร ในโอ่งดินโจกน้ำย้อมทุกเช้า-เย็น สังเกต สี กลิ่น และฟอง วันที่ 3 ใช้มะขามเปียก 100 กรัมต้มกับน้ำ 1 ลิตร พักให้เย็น ผสมลงไปในโอ่งน้ำย้อม โจกครามทุกวันและสังเกตต่อไป ซึ่งน้ำย้อมจะใสขึ้น เปลี่ยนเป็นสีเขียวปนน้ำเงิน กลิ่นหอมอ่อน ฟอกสีน้ำเงินโจกครามทุกวันจนกว่าน้ำย้อมจะเป็นสีเหลืองอมเขียมหรือเขียวยอดตองขุ่นข้น ฟองสีน้ำเงินเข้มวาว ไม่แตกยุบ แสดงว่าเกิดสีคราม (indigo white) ในน้ำย้อมแล้ว ซึ่งใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 7 วัน

การเตรียมน้ำขี้เถ้า

น้ำขี้เถ้าที่ใช้ทำมาจากขี้เถ้าของไม้บางชนิดเท่านั้น และต้องเตรียมให้ได้ความเค็มคงที่ หรือ ถ.พ. 1.05 ซึ่งโดยทั่วไปมักใช้เหง้ากล้วยเป็นหลัก เพราะหาง่ายและทำให้สีครามติดฝ้ายได้ดี เตรียมโดยสับเหง้ากล้ายเป็นชิ้น ๆ ผึ่งแดดพอหมาด นำมาเผารวมกับทางมะพร้าว เปลือกผลนุ่น ฯลฯ จนไหม้เป็นเถ้า ใช้น้ำพรมดับไฟ รอให้อุ่นจึงเก็บในภาชนะปิด ถ้าทิ้งไว้ให้ขี้เถ้าเย็น การละลายของเกลือในขี้เถ้าจะน้อยลงหรือถ้ารดน้ำดับไฟแล้วทิ้งไว้นาน สารละลายเกลือจากขี้เถ้าก็ซึมลงดินบริเวณที่เผาทุกอย่างจึงต้องแย่งชิงให้ถูกจังหวะ นำขี้เถ้าชื้นนั้นบรรจุในภาชนะที่เจาะรูด้านล่างไว้อัดขี้เถ้าให้แน่นที่สุดเท่าที่ทำได้ เติมน้ำให้ได้ระดับเดียวกับขี้เถ้าก่อนกดอัด กรองเอาน้ำขี้เถ้าครั้งแรก แล้วเติมน้ำอีกเท่าเดิม กรองเอาน้ำขี้เถ้าครั้งที่สอง รวมกันกับน้ำขี้เถ้าครั้งแรก จะได้น้ำขี้เถ้าเค็มพอดีกับการใช้งานต่อไป

การย้อมคราม

สีครามในน้ำย้อม (indigo white) แทรกเข้าไปอยู่ภายในโครงสร้างของเส้นใยฝ้ายได้ดี เมื่อยกเส้นใยพ้นน้ำย้อม สัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ สีครามจะถูกออกซิไดส์เป็นสีน้ำเงิน (indigo blue) ขังอยู่ภายในเส้นใย เส้นใยที่ย้อมติดสีครามได้ดีจึงเป็นเส้นใยเซลลูโลสที่มีหมู่ -OH ในโครงสร้าง โดยเฉพาะใยฝ้าย ดังนั้นก่อนย้อมต้องทำความสะอาดฝ้ายและทำให้ฝ้ายเปียกด้วยน้ำสะอาด หากล้างฝ้ายไม่สะอาด เมื่อนำไปย้อมจะทำให้สีครามในน้ำย้อมเปลี่ยนไป ย้อมไม่ติด หรือหม้อหนี หากทำฝ้ายเปียกน้ำไม่ทั่ว เมื่อนำไปย้อม สีครามแทรกเข้าเส้นฝ้ายไม่สม่ำเสมอทำให้เกิดรอยด่าง เส้นใยเรยอนที่โรงงานอุตสาหกรรมนำเศษฝ้ายและเศษไม้มาปรับแต่งเป็นเส้นใยขนาดเล็กสม่ำเสมอ นุ่ม มันวาวย้อมติดสีครามได้ดี ให้สีน้ำเงิน สวยงาม แต่ทนต่อการนุ่งห่มน้อยกว่าใยฝ้าย นอกจากสีคราในน้ำย้อมแล้ว น้ำย้อมที่เย็นจะย้อมติดสีครามได้ดีกว่า ดังนั้นจึงควรใช้โอ่งดินทำหม้อ

คราม เพราะน้ำที่ซึมจากโอ่งดินจะช่วยระบายความร้อน ทำให้อุณหภูมิของน้ำย้อมเย็นกว่าปกติ หรือตอนเช้าและตอนเย็นเป็นเวลาที่เหมาะสมในการย้อมคราม เมื่อจะย้อมคราม ให้ตักน้ำย้อมประมาณ 1 ลิตร ออกไว้ก่อน จึงนำฝ้ายหมาดน้ำลงย้อม ขณะย้อมต้องระวังให้อากาศสัมผัสน้ำย้อมน้อยที่สุดนั่นคือ ค่อยๆ กำเส้นฝ้ายใต้น้ำย้อมให้แน่นแล้วคลายมือให้สีครามแทรกเข้าไปในทุกอณูของเส้นฝ้าย กำและคลายไล่เรียงไปตามวงเส้นฝ้าย สังเกตน้ำย้อมสีเหลืองจางไปสีน้ำเงินเข้มมาแทน ความข้นหนืดลดลง จึงหยุดย้อม บิดเส้นฝ้ายให้หมาด กระตุกให้ฝ้ายเรียงเส้นและสัมผัสอากาศ แล้วเก็บฝ้ายชิ้นนั้นในภาชนะปิด ถ้าตากฝ้ายที่ย้อมทันทีจะเกิดรอยด่างในเส้นฝ้าย หากต้องการสีเข้มต้องย้อมซ้ำในหม้อครามอื่นอีกต่อไป พักไว้ 3-5 นาที จึงล้างให้สะอาดจนน้ำล้างใสไม่มีสี ผึ่งลมให้แห้งนำไปใช้งานต่อไป ส่วนน้ำย้อมที่ตักไว้ใช้เป็นเชื้อ เทกลับคืนหม้อครามเดิมและเติมเนื้อครามอีก

การดูแลน้ำย้อมในหม้อคราม

การดูแลน้ำย้อมในหม้อครามให้ย้อมได้ทุกวันเช้า - เย็น ติดต่อกันนานๆ เป็นขั้นตอนที่ยากที่สุดในการทำสีคราม แต่ถ้าช่างย้อมเข้าใจสีคราและหมั่นสังเกตอีกทั้งซื่อตรงสม่ำเสมอในการปฏิบัติจะสามารถดูแดหม้อครามแต่ละหม้อได้นานหลายปี การดูแลหม้อครามเป็นงานที่ท้าทาย และเป็นตัวชี้วัดความชำนาญของช่างย้อม ซึ่งส่วนใหญ่ใช้เวลาฝึกฝน สังเกต และทดลองทุกวันตลอด 3-5 ปี ถ้าอยากเรียนลัดเป็นช่างที่ชำนาญการย้อมครามภายใน 1 ปี ต้องรู้จักสีคราให้ดี หลักการสำคัญต้องช่างสังเกตและสม่ำเสมอ ฝึกความชำนาญวิธีใดวิธีหนึ่ง ไม่ควรเปลี่ยนวัตถุดิบที่เคยใช้ และแต่ละกลุ่มไม่ควรเปลี่ยนคนย้อมและดูแลหม้อคราม กระบวนการผลิตสีคราม และย้อมคราม ทุกขั้นตอนจึงมีข้อจำกัดในเรื่องส่วนผสม เวลา อุณหภูมิ ความชื้น และความเป็นกรด - ด่าง ปริมาณสารที่เกี่ยวข้องและทักษะปฏิบัติที่กล่าวข้างต้นล้วนสำคัญต่อคุณภาพของสีและผ้าย้อมคราม ช่องย้อมต้องช่างสังเกต เข้าใจ ยอมรับ เคารพ และศรัทธา ไม่ว่าจะก่อหม้อครามด้วยสูตรใดก็ตาม ต้องสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงสี กลิ่น ฟองและความหนืดของน้ำย้อมทุกวัน โดยทุกเช้าและเย็น ต้องตักน้ำย้อมยกขึ้นสูงประมาณ 1 ฟุต แล้วเทน้ำย้อมกลับคืนลงหม้อเดิม 4-5 ครั้ง เรียกว่าโจกคราม ลักษณะของน้ำย้อม วันแรกสีน้ำเงิน ฟองใสไม่มีสีแตกยุบตัวเร็ว กลิ่นเนื้อคราม น้ำย้อมเหลว วันต่อไป น้ำย้อมใสสีน้ำตาล กลิ่นและฟองเหมือนเดิม ประมาณวันที่ 7 จะได้กลิ่นหอมเฉพาะตัวของสีคราม น้ำย้อมจะเป็นสีเขียว ฟองสีฟ้าใสแตกง่าย ประมาณวันที่ 10-15 กลิ่นสีครามแรงมากขึ้น

ผิวหน้าของน้ำย้อมเป็นสีน้ำเงินเข้ม เมื่อปาดผิวหน้าจะเห็นน้ำย้อมสีเหลืองเข้มปนสีเขียวอ่อน เมื่อโจกครามจะเห็นน้ำย้อมหนืด ขุ่นข้น เกิดฟองสีน้ำเงินเข้มขุ่น เป็นเงาสีเทา ไม่แตก และเห็นริ้วสีน้ำเงินของ Indigo blue ที่เกิดจาก Indigo white ในน้ำย้อมถูกออกซิไดส์โดยอากาศ การเกิดสีครามเช่นนี้ คนทำสีครามเรียกว่าหม้อนิลมา ทำการย้อมฝ้ายได้ แต่มีบางครั้งไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว เรียกว่าหม้อนิลไม่มาน้ำย้อมเป็นสีน้ำเงินไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ภูมิปัญญาแก้ไขโดยการเติมสิ่งต่อไปนี้อย่างใดอย่างหนึ่ง ผลมะเฟืองทุบ มะขามเปียก ฝักส้มป่อย น้ำต้มใบโมงส่าเหล้า และน้ำอ้อย หากแก้ไขแล้วหม้อนิลยังไม่มา น้ำย้อมอาจเน่าเหม็นหรือเป็นสีน้ำตาล แสดงว่าไม่สามารถแก้ไขได้แล้ว คนทำครามเรียกว่าหม้อนิลตาย ต้องเทน้ำย้อมทิ้งตั้งต้นก่อหม้อนิลใหม่ การเตรียมสีครามหรือการก่อหม้อครามทำได้หลายสูตร แต่ใช้วัตถุดิบที่จำเป็นเหมือนกัน คือ

ประกอบด้วยเนื้อครามกับน้ำขี้เถ้า และปูนขาวอีกเล็กน้อย ภูมิปัญญาท้องถิ่นแถบอีสานเหนือส่วนใหญ่ใช้เนื้อครามในสภาพเหลวเหมือนเนยเหลว (Indigo paste) ส่วนน้อยใช้เนื้อครามในน้ำคราม ไม่เคยใช้เนื้อครามแห้ง ดังนั้นภูมิปัญญาท้องถิ่นแถบอีสานเหนือจึงระวังดูแลเนื้อครามเป็นอย่างดี ไม่ให้แห้ง แม้จะเก็บไว้เป็นปีก็ตาม ขณะที่ภูมิปัญญาท้องถิ่นแถบอีสานใต้ใช้เนื้อครามเป็นก้อนและแห้ง (ภาษาท้องถิ่นเรียกว่า ตรม) เมื่อจะก่อหม้อครามก็ใช้ตรม 2 ก้อนถูกันให้ผงของตรมร่วงลงไปในน้ำขี้เถ้า ภูมิปัญญาท้องถิ่นแถบอีสานเหนือจะใช้สีครามย้อมฝ้ายแต่ภูมิปัญญาท้องถิ่นแถบอีสานใต้ใช้สีครามย้อมไหม สำหรับขี้เถ้าที่ใช้ก่อหม้อครามทำจากขี้เถ้าของไม้บางชนิดด้วยเทคนิคพิเศษต่างจากขี้เถ้าที่ได้จากฟืนหรือถ่านไม้สำหรับหุงต้มในครัวเรือน ไม้ที่ทำขี้เถ้าสำหรับก่อหม้อคราม ได้แก่ ต้นเพกา ต้นจามจุรี ต้นขี้เหล็ก ต้นนุ่น ต้นมะละกอ เหง้ากล้วย เปลือกฝักนุ่น ทางมะพร้าว งวงตาล (เกสรตัวผู้) ต้นผักขมหนาม ฯลฯ แล้วแต่จะหาชนิดใดได้ง่าย ไม้เหล่านี้หากมีลักษณะไม่แห้งนักจะยิ่งดี ในการเผาให้ไหม้ในระดับหนึ่ง ไม่ถึงขั้นเป็นผงขี้เถ้า เมื่อเผาได้ที่แล้วจะพรมน้ำเล็กน้อยในขี้เถ้าขณะร้อน พักไว้ให้อุ่นๆ พอจับต้องได้ จึงเก็บขี้เถ้าชั้นนั้นในภาชนะปิด หากทิ้งไว้ให้ขี้เถ้าเย็นหรือแห้งเป็นผง เมื่อนำมาทำน้ำขี้เถ้าจะได้น้ำขี้เถ้าที่ไม่เค็มเพียงพอ ในการทำน้ำขี้เถ้าก็เตรียมภาชนะที่เจาะรูด้านล่างไว้และรองด้วยใยมะพร้าวหรือปุยนุ่น หรือฟองน้ำเก่าๆ ก็ได้ จากนั้นบรรจุขี้เถ้าชั้นในภาชนะดังกล่าวกดอัดขี้เถ้าให้แน่น เติมน้ำให้ได้ระดับเดียวกับระดับของขี้เถ้าก่อนกด กรองเอาน้ำขี้เถ้าครั้งที่ 1 เติมน้ำระดับเดิมและกรองครั้งที่ 2 รวมน้ำขี้เถ้าทั้ง 2 ครั้งเข้าด้วยกัน การทำเช่นนี้เป็นการควบคุมความเข้มข้นของน้ำขี้เถ้าให้พอดี เก็บน้ำขี้เถ้าไว้ในภาชนะที่ไม่ซึมและทนเค็ม หลังจากก่อหม้อครามด้วยสูตรต่างๆ แล้ว น้ำย้อมเริ่มต้นจะมีความเป็นกรด-ด่าง (pH) มากกว่า 11 เนื่องจากปูนขาวในเนื้อครามและน้ำขี้เถ้าต่างก็เป็นด่าง ผู้ทำครามต้องโจกครามทุกเช้า-เย็น เติมออกซิเจนแก่จุลินทรีย์ด้วย หากไม่โจกครามจะเกิดฟิล์มเมือกปิดผิวหน้าของน้ำย้อม น้ำย้อมมีกลิ่นเหม็นเน่าเสียต้องเททิ้ง ประโยชน์อีกอย่างของการโจกครามก็เพื่อสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงสีและฟองของน้ำย้อม ซึ่งเริ่มแรกจะมีสีน้ำเงินเข้ม ฟองใสไม่มีสี ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำย้อมลดลงทุกวัน ประมาณวันที่ 5-7 น้ำย้อมจะมีสีเขียว กลิ่นหอมเฉพาะตัว ถ้าน้ำย้อมไม่เปลี่ยนสี กลิ่นไม่เปลี่ยน ให้เติมน้ำต้มมะขามเปียก (มะขามเปียก 100 กรัม) ต้มในน้ำ 1 ลิตร พักให้เย็น กรองเอาน้ำเก็บในภาชนะปิด) ประมาณ 200 มิลลิลิตร ต่อน้ำคราม 3 ลิตร หากวันรุ่งขึ้นสียังไม่เปลี่ยนให้เติมอีกและสังเกตสีทุกวัน หลังจากนั้นสีของน้ำย้อมเหลืองมากขึ้น เขียวลดลง ลักษณะน้ำย้อมหนืด ข่นข้น จนประมาณวันที่ 15-20 หรืออาจไม่นานถึงวันที่ 20 หากน้ำย้อมเหลืองจัดให้ย้อมได้เลย เส้นใยที่ย้อมติดสีครามได้ดีที่สุดคือใยฝ้ายธรรมชาติ ถ้าเป็นฝ้ายจากร้านค้าจะถูกเคลือบด้วยแป้งมันมาก การติดสีจะไม่ดีหรือติดแล้วก็ลอกหลุดภายหลังพร้อมกับแป้งมัน ถ้าเป็นใยโทเรจะติดสีไม่เข้ม ได้สีฟ้า-เทา แต่มีความวาวสวยงาม ใยไหมติดสีครามยากเช่นกัน

ภูมิปัญญาจังหวัดสุรินทร์จะเติมน้ำส้มมดแดงในน้ำย้อมและเติมเหล้าขาวประมาณ 1 ช้อนชาต่อน้ำย้อม 1 ลิตร ก่อนย้อมไหมฟอก เส้นใยที่ใช้ย้อมต้องสะอาดและหมาดน้ำ ฝ้ายที่ใช้ย้อมมีปริมาณพอเหมาะ คือน้ำย้อม 3 ลิตร ควรใช้ฝ้ายไม่เกิน 100 กรัม ขณะย้อมให้สังเกตน้ำย้อมด้วย เมื่อน้ำย้อมเหลวมากขึ้นสีเหลืองจะจางลง สีเขียวจะเข้มขึ้น ให้หยุดย้อม ทั้งนี้เพราะเมื่อสีครามเกิดมากพอแล้วในน้ำย้อม แสดงว่าขณะนั้นภาชนะของน้ำย้อมสมดุลพอดี ระหว่างปริมาณเนื้อคราม สีคราม ปูนขาว น้ำขี้เถ้า และภาวะความเป็นกรด-ด่าง เมื่อย้อมฝ้ายปริมาณพอดี ในเวลาพอดี ให้

มีสีครามเหลืออยู่พอที่จะย้อมได้อีก น้ำย้อมอยู่ในภาวะสมดุล เมื่อเติมน้ำครามกับน้ำขี้เถ้าอีกเพียงเล็กน้อยไม่ให้ไปรบกวนช่วงกรด-ด่าง (pH) ของการเกิดสี ใช้เวลาอีกไม่น้อยกว่า 6 ชั่วโมง น้ำย้อมจะเหลืองจัดและย้อมได้อีก เติมเนื้อครามกับน้ำขี้เถ้าอีกเล็กน้อย พักไว้อีกไม่น้อยกว่า 6 ชั่วโมง ก็ย้อมได้อีกทำซ้ำๆ จะย้อมได้เรื่อยๆ นานหลายปี ด้วยเหตุนี้จึงพบบางครัวเรือนมีหม้อครามตั้งแต่รุ่นคุณยายซึ่งเป็นคนย้อมครามชั้นครู ตกทอดถึงลูกหลาน ถ้าใช้ฝ้ายมากเกินไปหรือย้อมนานเกินไปฝ้ายจะดูดซับสีครามไปมากหรือหมดไปจากน้ำย้อม เมื่อเติมเนื้อครามและน้ำขี้เถ้าอีกก็เหมือนการเริ่มก่อหม้อครามใหม่ ต้องรออีก 15-20 วัน เหตุการณ์เช่นนี้ภูมิปัญญาท้องถิ่นเรียกว่าหม้อนิลหนี โดยภูมิปัญญาอธิบายถึงสาเหตุไม่ได้แต่บอกต่อๆ กันมาว่าให้เติมมะขามเปียก 1 กำมือ หรือแช่เปลือกมะม่วงแผ่นเท่าฝ่ามือ หรือทุบมะเฟืองทั้งลูกแช่ลงไป อีก 2-3 วัน หม้อนิลก็จะกลับมา ถ้าย้อมฝ้ายในปริมาณและในเวลาพอดี แต่เติมเนื้อครามกับน้ำขี้เถ้ามากจนรบกวนกรด-ด่าง (pH) ของน้ำย้อมให้สูงเกินช่วงเกิดสี หม้อนิลก็หนีอีกเช่นกัน เรียกกลับมาได้โดยเติมสิ่งเปรี้ยวๆ แต่หากเติมมากเกินไป ทำให้ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่ำกว่าช่วงเกิดสีก็จะเรียกว่าหม้อนิลตาย ต้องเททิ้ง ทางแก้คือเติมปูนขาวลงไปหม้อนิลก็กลับมา ซึ่งปรากฏการณ์หม้อนิลหนีคือปัญหาใหญ่ที่สุดของการทำสีครามและย้อมคราม

การลงทุน

การทอผ้าย้อมคราม จะทอได้วันละ 4 เมตร รายได้ 200-250 บาท/วัน และมีรายได้เฉลี่ยต่อเดือน 4,000-5,000 บาท

การเตรียมสีคราม

1) การเตรียมสีครามจากใบสด ประมาณร้อยละ 90 จะผลิตสีครามจากใบครามสดและต้องระมัดระวังในการเก็บใบครามที่สุดเท่าที่จะทำได้ อาจเก็บตอนเช้ามืดก่อนพระอาทิตย์ขึ้นขณะที่น้ำค้างยังมีอยู่หรือแบบชาวเกาหลีที่เก็บใบครามไว้ใกล้น้ำแข็ง แม้การแช่ใบครามแช่ในน้ำแข็งเมื่อได้องเหลวสีเขียวสดใช้ย้อมผ้าได้ทันที ชาวเกาหลีมีวิธีการผลิตสีครามจากใบครามสดที่น่าสนใจอีก 2 วิธี ได้แก่

(1) ใช้ในน้ำขี้เถ้าเป็นตัวละลายสกัดสีครามออกจากใบคราม กระทำโดยแช่ใบครามสดในหม้อน้ำ หมักไว้ 1-3 วันแยกกากใบครามออกเติมน้ำขี้เถ้าทันทีในอัตราส่วนของน้ำคราม : น้ำขี้เถ้า 5:5 กวนแรง ๆ ด้วยพายไม้ไผ่จนกระทั่งเกิดฟองโตขนาดผลมะละกอ จึงหยุดกวนและเอาพายไม้ไผ่ออก ทิ้งน้ำครามไว้ 1 สัปดาห์ จะได้สีครามสำหรับการย้อมผ้าต่อไป

(2) ใช้ปูนขาวตกตะกอนเนื้อครามจึงเติมน้ำขี้เถ้าภายหลัง วิธีนี้จะกระทำในพื้นที่ใกล้เคียงแม่น้ำหรือทะเล เพราะต้องอาศัยปูนขาวจากการเผาเปลือกหอยเซลล์ (shell) และเปลือกหอยนางลม กระทำโดยแช่ใบครามในหม้อน้ำ นาน 1-4 วัน แยกกากใบครามออกได้น้ำครามสีเขียวในหม้อน้ำครามเติมปูนขาวจากเปลือกหอยในหม้อน้ำครามสีเขียวนั้นในอัตราส่วน น้ำคราม : ปูนขาว 10:1 ปั่นของผสมด้วยไม้ไผ่รูปตัวที จนกระทั่งเกิดฟองและเมื่อฟองจมลง (ฟองแตกเร็ว) ทิ้งไว้ให้

ของเหลวส่วนบนใส จึงแยกส่วนที่ใสออก แล้วเติมน้ำขี้เถ้าในตะกอนคราม หมักไว้จนได้สีครามสำหรับย้อมผ้าต่อไป

การผลิตสีครามของชาวอินโดนีเซียใช้ใบครามสดเช่นกัน ต่างจากชาวเกาหลีบ้างเล็กน้อย โดยการแช่ใบครามสดในน้ำราว 1 สัปดาห์ให้ใบครามเปื่อยแล้วจึงแยกกากครามออก เติมกากน้ำตาลหรือปูนขาวในเนื้อครามเละๆ นั้น เพื่อรีดิวส์สีครามให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้จุ่มผ้าในหม้อน้ำครามประมาณ 15 นาที จึงนำผ้าออกผึ่งในที่ร่ม 15 นาที และจุ่มย้อมซ้ำ จนกระทั่งได้สีน้ำเงินตามต้องการ ซึ่งอาจต้องย้อมซ้ำ 20-30 ครั้ง จึงล้างออกด้วยน้ำสะอาด เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกต่างๆ เช่น เศษปูนขาวและฟอง ถ้าหากต้องการให้สีเข้มอีกให้ผสมเนื้อครามและกับปูนขาวหรือกากน้ำตาลแล้วปล่อยทิ้งไว้ 1 คืน จึงทำการย้อมและทำเหมือนเดิมอีก 3 วัน ติดต่อกัน

ชาวอิหร่านจะให้แอมโนเนีย (NH_3) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แทนปูนขาวเป็นตัวทำให้น้ำครามเปลี่ยนเป็นน้ำครามอินดิโกจมลงแยกตัวจากน้ำ จึงรินน้ำทิ้ง และเตรียมสีครามโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 7 กรัม กับเนื้อครามผง 60 กรัม เติมน้ำ คนให้เข้ากันพร้อมกับปรับปริมาตรให้ได้ 3 ลิตร พักของเหลวผสมไว้ครึ่งชั่วโมงจะได้ของเหลวสีเหลืองอ่อน ถ้าหยอดของเหลวลงบนแผ่นกระจกมันจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ย้อมในของเหลวสีเหลืองนั้น

อินเดียใช้เนื้อครามผงผสมน้ำ 1 คืน จึงเตรียมโซเดียมโฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันดีเติมโฮโดรเจนซัลเฟต (HSO_4) คนให้เข้ากันดี กรองเอาของเหลวไปใช้ย้อมผ้าซ้ำ ๆ หลายครั้งจึงล้างออกด้วยน้ำและตากให้แห้ง

จากการศึกษาภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทยได้ข้อมูลว่า การผลิตสีครามเกิดจากใบครามสดเท่านั้นและเชื่อว่าถ้าปล่อยให้เกิดครามเหลวที่เตรียมไห้แห้งเป็นผงแล้ว จะไม่สามารถนำมาเตรียมสีครามได้ ซึ่งทำให้เสียเวลาและสิ้นเปลืองวัตถุดิบอย่างต้นคราม สำหรับวิธีการผลิตสีครามแบบภูมิปัญญาท้องถิ่นอีสาน สามารถทำได้ 2 ขั้นตอน คือ การเตรียมเนื้อครามและการเตรียมสีคราม (http://pieapple-eyes.snru.ac.th/cram/index.php?q=node/105)

2) การเตรียมสีครามจากใบแห้ง ในประเทศหนาวเช่นเกาหลีและญี่ปุ่นมีใบครามสดในช่วงเวลาสั้นๆ เขาอาจเก็บใบครามแห้งและครามผงไว้เพื่อเตรียมสีครามโดยชาวเกาหลีใช้ใบครามแห้งในไฮโดรเจนซัลไฟต์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งเป็นวิธีที่เร็วแต่ได้สีน้ำเงินไม่เข้ม

ประเทศในเขตอบอุ่น เช่น ญี่ปุ่น และเกาหลี ทำสีครามจาก polygonum tinctorium ในที่นี้จะเรียกว่า คราม เช่นกัน ทั้งสองประเทศมีใบครามสดในช่วงเวลาสั้น เขาจึงเก็บใบครามแห้งไว้เตรียมสีครามโดยชาวเกาหลีจะนำใบครามแห้งแช่ในสารไฮโดรซัลไฟต์กับโซดาไฟ แล้วหมักผ้าลงไปเพื่อย้อมเป็นวิธีการที่เร็วแต่ได้สีไม่เข้ม สำหรับในญี่ปุ่น เมื่อย่างเข้าหน้าหนาว ชาวญี่ปุ่นจะเก็บครามสดตากให้แห้ง ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 วัน จากนั้นจึงเอาใบครามแห้งชุบน้ำพอให้ชื้น บรรจุใส่ถุงตาข่ายวางบนฟางข้าว ทับด้วยถุงฟางข้าวชื้นและของหนักๆ ทับอีกชั้นหนึ่ง ปล่อยไว้ประมาณ 20 วัน จึงเปิดปากถุงคลุกเคล้าพลิกกลับใบคราม แล้วปิดปากถุงและทับด้วยถุงฟางชื้นอย่างเดิมอีกประมาณ 100 วัน นำใบครามหมักแล้วนี้มาโขลกให้ละเอียดด้วยครกกระเดื่องหรือครกหิน ปั้นผงใบครามเป็นก้อนกลมขนาดเท่าลูกพลับเรียกว่า (indigo ball) ตากให้แห้ง ซึ่งใช้เวลาอีก 3-7 วัน และเก็บไว้ใช้เตรียมสีครามต่อไป เมื่อต้องการเตรียมสีคราม จะใช้ครามก่อนผสมขี้เถ้าสีดำสัดส่วน 5:4 เติมน้ำอุ่นทุกวันๆ ละน้อย ทำให้ของผสมร้อนขึ้น ต้องระวังอย่าให้ร้อนเกินไป คนเบา ๆ

และช้าๆ หลังจากนั้นพักไว้ 30 วัน จึงจะย้อมได้ อีกวิธีหนึ่งใช้น้ำอุ่นที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส เติมครามก้อนผสมเอทานอลเล็กน้อย น้ำปูนใสและฝุ่นผงสังกะสี คนช้าๆ อุ่นและคนแรงๆ อีกประมาณ 5 นาที จึงปิดฝาภาชนะและพักไว้ 3-5 ชั่วโมง ทดสอบการเกิดสีโดยใช้เส้นฝ้ายสีขาวจุ่มในของเหลวนั้นเมื่อยกขึ้นสังเกตเส้นฝ้ายเป็นสีเขียว สักครู่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าเกิดสีครามในน้ำย้อมแล้ว
(http://pineapple-eyse.snru.ac.th/cram/index.php?q=node/106)

การทรีตโคลชิซินในเมล็ด

Grouh *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาใน *Salvia hains* โดยนำเมล็ดทำความสะอาดโดยแช่ในโซเดียมคลอไรด์ (NaOH) เป็นเวลา 23 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 4 นาที และเพาะใน petridish (0.2 กรัม หรือประมาณ70 เมล็ด) บนกระดาษกรองเติมสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ ลงในแต่ละจานเพาะในแต่ละความเข้มข้น ทรีตเมล็ด 250 เมล็ด เติม DMSO และTween 20 2-3 หยด เพื่อให้โคลชิซินซึมเข้าไปในเมล็ดได้ดีขึ้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ย้ายเมล็ดที่ทรีตแล้วลงเพาะในกระดาษกรองใหม่ที่จุ่มน้ำกลั่นผนึก petridish ด้วยแผ่น paraflim เก็บไว้ในอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพการให้แสง 16 ชั่วโมง พบว่าเกิดเตตราพลอยด์ขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นที่ดีที่สุด คือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (4 ต้น) และวิธีการที่ได้ผลดี คือ วางเมล็ดบนกระดาษกรองเติม DMSO + Tween 20 (2-3 หยด) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ 24 ชั่วโมง

Alan Walters and Wehner (2002) ทำการศึกษาในแตงกวา *Cucumis sativa* และ *C. metuliferus* ก่อนการทดลองจะทำการ pre-germinateed โดยแช่เมล็ดในน้ำกลั่น โดย *C. sativa* ใช้เวลาในการแช่น้ำนาน 24 ชั่วโมง *C. metuliferus* ใช้เวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการทรีตโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 หรือ 20 ชั่วโมง หลังจากการทรีตโคลชิซินแล้วล้างเมล็ดในน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเมล็ดลงปลูกในกระถางดินเหนียวที่มีส่วนผสมของ peat-lite mix (ขนาดกระถางเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร) วางในเรือนทดลองที่อุณหภูมิ 24-30 องศาเซลเซียส (ตอนกลางวัน) และ 20-24 องศาเซลเซียส (ตอนกลางคืน) ให้น้ำ 2 ครั้งต่อวันให้ปุ๋ยสูตร 20-20-20 สัปดาห์ละครั้ง จากการศึกษาพบว่า ทำการ pre-germinateed โดยแช่เมล็ดในน้ำกลั่น 24 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า ทั้งสองสปีชีส์ ที่แช่สารละลายโดยชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง ให้ผลดีที่สุด

การศึกษาของ Xing *et al*. (2011) ใน *Catharanthus roseus* (L.) G. Don โดยการเตรียมสารละลายโคลชิซินเป็น stock solution 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ส่วน working solution เตรียมโดยการเจือจางจาก stock solution ในน้ำกลั่น ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง (0.22 μM) นำเมล็ดแช่ในสารละลายที่บรรจุในหลอด eppendorf ขนาด 2 มิลลิลิตร ในความเข้มข้น 0.05-0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

3-4 ครั้งในตู้ขนาด 60 ช่อง ที่บรรจุดิน และorganic manure mixture เก็บไว้ใน green house เป็นเวลา 2 สัปดาห์ อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65.3-73.1 เปอร์เซ็นต์ สภาพแสง 16 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 0. เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมกับการทรีต และที่ระดับความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีเตตราพลอยด์สูงสุด (30 เปอร์เซ็นต์)

Wongpiyasatid *et al.* (2003) ทำการศึกษาในฝ้าย *Gossypium arboretum* พันธุ์ light brown cotton (PM2) และ White cotton (PM3) โดยจุ่มเมล็ดในสารละลายโคลชิซิน (ยาเม็ดโคลชิซิน) ละลายในน้ำ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเขย่าขวดทรีตเมนต์เป็นครั้งคราว หลังจาก 24 ชั่วโมง ล้างเมล็ดในน้ำไหลเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเมล็ดลงปลูกในกระถาง โดยคอนโทรลใช้น้ำเปล่า

Mensah *et al*. (2007) ทำการทรีต *Sesame indicum* L. โดยทรีตเมล็ดในสารละลายโดลชิซิน ความเข้มข้น 0-0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างเมล็ดในน้ำไหล นำเมล็ดลงเพาะใน petridish ที่บรรจุน้ำกลั่นสังเกตการณ์งอกทุกวันเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นย้ายต้นกล้าลงในกระถางที่บรรจุ sandy loan จากการศึกษา พบว่า ทรีตเมนต์ที่ดีที่สุด คือ 0.25 เปอร์เซ็นต์ 24 ชั่วโมง

Omran and Mohammad (2008) ได้ทำการทรีตเมล็ดฝ้าย *Gossypium herbacum* และ *G. Arboretum* นำเมล็ดฝ้ายเพาะในกระดาษเพาะ (paper towels) เก็บที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-30 ชั่วโมง นำเมล็ดมาจุ่มในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6 หรือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4, 8, 12 และ 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเมล็ดมาล้างด้วยน้ำกลั่นเพาะเมล็ดในกระดาษเพาะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำปลายรากมาตรวจสอบด้วยวิธี squash method ตามวิธีการของ Singh (1993) พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.6-0.9 เวลา 12-16 ชั่วโมง ให้เตตราพลอยด์สูง

Pirkoohi *et al*. (2011) ทำการศึกษาใน mint โดยล้างเมล็ด mint ในน้ำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บเมล็ดไว้เป็นเวลา 36-40 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใน cuvettes วาง blotting paper ที่เปียก ระหว่างนี้เมล็ดจะบวมขึ้นแต่ยังไม่งอกราก นำเมล็ดมาทรีตในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.4 ปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำเมล็ดไปปลูกในเรือนกระจก (green house) 2 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด จากการศึกษาพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดเตตราพลอยด์สูงสุด (52.92 เปอร์เซ็นต์)

พรพิรุณ และคณะ (2553) ทำการเพิ่มชุดโครโมโซมในพริกขี้หนูสวน (*Capsicum frutescens* L.) โดยนำเมล็ดพริกมาเพาะบนกระดาษเพาะในอุณหภูมิห้องเมื่อรากยาว 1 มิลลิเมตร นำเมล็ดไปแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้พริก 15 เมล็ดต่อสารละลายโคลชิซิน 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ในสภาพมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นล้างเมล็ดในน้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับเมล็ดด้วยกระดาษกรอง นำไปเพาะเพื่อทดสอบการเพิ่มจำนวนโครโมโซม

ผลของโคลชิซินต่อการเพิ่มโครโมโซม

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ (polyploidy) ในพืชได้กลายเป็นกระบวนการสำคัญสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์ แม้มีการใช้สารเคมีหลายชนิดและใช้อุณหภูมิเพื่อชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ แต่พบว่าสารโคลชิซินเป็นสารที่ให้ผลค่าเฉลี่ยที่สม่ำเสมอที่สุด โคลชิซินเป็นสาเหตุแห่งการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่าในพืชหลายชนิด ขณะที่มีการแบ่งเซลล์ในสภาวะปกติในระยะเมตาเฟส (metaphase) โครโมโซมมาเรียงตรงกลางเซลล์ และบริเวณขั้วเซลล์มีการเส้นใยสปินเดิลไฟเบอร์ (spindle fiber) เข้าจับที่ส่วนของเซนติเมตรโตเมียร์ (centromere) ของโครโมโซมและดึงโครโมโซมให้แยกจากกันในระยะแอนาเฟส ทำให้เมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์จำนวนโครโมโซมเท่าเดิม แต่เมื่อพืชได้รับสารโคลชิซินส่วนที่เป็นไมโครทูบูล (microtubule) ของเส้นใยสปินเดิลไฟเบอร์ (spindle fiber) มีความผิดปกติ หรือเกิดได้ไม่สมบูรณ์ เป็นเหตุให้โครโมโซมไม่สามารถแยกจากกันไปยังขั้วของเซลล์ได้ในระยะแอนาเฟส เซลล์พืชไม่มีการเซลล์เพลท (cell plate) ทำให้ไม่อาจแบ่งเซลล์ได้สำเร็จส่งผลให้เซลล์นั้นมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น

หากจำแนกชนิดของโพลีพลอยด์ตามลักษณะของชุดโครโมโซม สามารถแบ่งลักษณะการเกิดโพลีพลอยด์ออกเป็น 2 ลักษณะใหญ่ ๆ คือ พวกที่เป็นออโตพลอยด์ (autoploid) และออโลพลอยด์ (alloploid) และการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยการใช้สารโคลชิซินเตตราพลอยด์ที่เป็นออโตเตตราพลอยด์ (autotetraploid) เกิดจากการเพิ่มชุดโครโมโซมจากพืชชนิดเดียว ส่วนเตตราพลอยด์ที่เป็นออโลเตตราพลอยด์ (alltetraploid) เกิดจากการสร้างลูกผสมจากพืชต่างชนิดที่มีชุดโครโมโซมต่างกัน แล้วทำการให้โคลชิซินแก่เมล็ด หรือต้นกล้าของลูกผสมนั้น ชิ้นส่วนของพืชที่ให้โคลชิซินควรเป็นส่วนที่กำลังเจริญเติบโต เช่น ส่วนตา และยอด (Langenheim and Thimann, 1982) ในพืชหลายชนิดที่ได้รับโคลชิซิน ต้นมีขนาดใหญ่ขึ้น มีดอกหรือผลใหญ่ขึ้น นอกจากนี้ (Hill *et al*., 1967) จากการศึกษาในพืชชนิดต่าง ๆ มาเป็นเวลานาน พบว่า การเพิ่มโครโมโซมเนื่องจากโคลชิซินทำให้พืชหลายชนิดเป็นโพลีพลอยด์ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากดิพลอยด์หลายประการ เช่น ในลูกผสมระหว่าง *Cyclamen persicum* Mill. (2n = 2x = 48, AA) กับ *C. purpurascens* (2n = 2x = 34, BB) มีจำนวนโครโมโซม 41 แท่ง (2n = 41, AB) กระตุ้นโอวูลด้วยโคลชิซิน50 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 10 และ15 วัน ในสภาพปลอดเชื้อมีโครโมโซม 82 แท่ง (2n = 82, AABB) (Ishizaka and Uenatsu, 1995) ส้ม 2n = 4x = 36 (Gmitter *et al*., 1991) เป็นต้น ในลักษณะทางสัณฐานวิทยาใน *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. พันธุ์ Kaghizi ที่ตายอดได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 วัน มีรูปแบบใบ สีใบ ความหนาใบ ก้านใบ และลักษณะหนามเปลี่ยนไป (Anis and Ansari, 1992) *Arachis paraguariensis, A. batizocoi, A. Senosperma* และ *A. hypogaca* พันธุ์ TN4 และ TS9 ในสภาพดิพพลอยด์ที่ได้รับโคลชิซินระดับความเข้มข้น 0.06 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 4 และ 8 ชั่วโมง ทำให้ต้นกล้าอายุ 10 วัน มีใบหนา ผิดปกติ ต้นเตี้ย ความแข็งแรงลดลง (Huang and Li, 1992) ในพืชจำพวกแตง (melon) เตตราพลอยด์ (tetraploid) สายพันธุ์ C879-J2-4x มีใบเลี้ยงกลม ข้อสั้น ใบหนา ขนมาก ดอกสีครีม ขนาดใหญ่กว่าดิพพลอยด์ (เพิ่มขึ้นร้อยละ 33) ละอองเกสรเป็นสามเหลี่ยม เปลี่ยนจากเดิมที่เป็นสี่เหลี่ยม เมล็ดสั้นลงแต่ความกว้างเพิ่มขึ้น เนื้อผลแน่น ขนาดผลเล็ก แผลที่ก้น

ผลมีขนาดใหญ่ขึ้น มีเพศเป็นโมโนอิเชียส (monoecious) หรือเป็นเพศผู้เป็นส่วนใหญ่ (androecious) (Nugent, 1994) ใบหม่อนที่เป็นเตตราพลอยด์ สายพันธุ์ Kaeryangppong ใบมีสัดส่วนของความกว้างมากกว่าความยาว ใบหนาแม้ว่าบางครั้งใบอาจมีลักษณะเรียวแคบ ลำต้นอวบอ้วน จำนวนกิ่ง และความยาวระหว่างข้อมากกว่าต้นดิพลอยด์ (park, 1995) ในเมล็ดแรดิชที่ได้รับโคลชิซิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ความงอกลดลง (ร้อยละ 45) น้อยกว่าเมล็ดที่ไม่ได้รับโคลชิซิน (ร้อยละ95) มีความยาวรากและไฮโปคลอทิล (hypocotyls) ลดลง แต่เส้นรอบวงของไฮโปคอทิลมีขนาดเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับโคลชิซิน (Scialabba *et al*., 1995) ในแอปเปิลที่เป็นโพลีพลอยด์ จากโคลชิซินส่วนใหญ่ พบว่า มีความสูงลดลง (Khosotova, 1996) ในแตงกวา *Cucumis sativa* L. พันธุ์ Sativa และพันธุ์ Hardwickii ที่มีสภาพเป็นดิพพลอยด์ 6 สายพันธุ์ เมื่อได้รับโคลชิซิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีแผ่นใบใหญ่ วงกลีบดอก และละอองเกสรขนาดใหญ่ขึ้น แต่ผลเล็กลง (Mackiewicz and Malepszy, 1996) จากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา พบว่าโคลชิซินทำให้พืชหลายชนิดมีลักษณะทางสรีรวิทยาเปลี่ยนแปลงไป เช่น *Citrus aurantifolia* พันธุ์ Kaghzi ที่มีชุดโครโมโซม เป็นเตตราพลอยด์ มีปริมาณกรดอะมิโนโดยรวม (total amino acid) สูงกว่าต้นที่เป็นดิพพลอยด์ Anis and Ansari, 1992) จากการศึกษาใน *Arachis paraguariensis*, *A. batizocoi*, *A. Senosperma* และ *A. hypogaca* พันธุ์ TN4 และ TS9 เกิดการกลายพันธุ์คลอโรฟิลล์ของคลอโรฟิลล์ในใบ (Huang and Li, 1992) ใน Aphi fabae สายพันธุ์ AJ-polyl และ AJ-polycana ที่เป็นเตตราพลอยด์มีแคโรทีนมากกว่าดิพพลอยด์ (Gaweda and Luczak, 1993) ในออโตเตราพลอยด์ *Colcus forskohlii* พันธุ์ Garnai มีน้ำหนักแห้งต้นกล้า น้ำหนักแห้งของใบ จำนวนใบต่อต้น พื้นที่ใบ/ต้น ดัชนีพื้นที่ใบ อัตราพื้นที่ใบ (leaf area ratio) พื้นที่ใบจำเพาะ (specific leaf area) และอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (relative growth rate) ต่ำลง (Hedge and Krishnan, 1994) ในต้นกล้าหม่อนที่ได้รับโคลชิซินระดับความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในหม่อนพันธุ์ Kaeryangppong ซึ่งมีชุดโครโมโซมเป็นเตตราพลอยด์ เมื่อนำใบลำดับที่ 5 มาทำการศึกษา พบว่า ใบมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงมากกว่าต้นที่เป็นดิพพลอยด์ (Park, 1995) ในใบแอปเปิ้ลที่เป็นโพลีพลอยด์ พบว่ามีปริมาณคลอโรฟิลล์ กรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) และมีกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) สูงขึ้น นอกจากนี้จากการศึกษาในพืชหลายชนิด พบว่า เซลล์และภายในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง เช่น ในข้าวสาลี พันธุ์ Maris Huntsman ที่ได้รับโคลชิซิน 2 มิลลิโมล เซลล์ที่รากมีการเปลี่ยนแปลงโดยทำให้เซลล์ซีฟ (sieve cell) ผิดปกติ พลาสติด (plastid) ผิดปกติโดยมีการตกตะกอน และสะสมของสารบางอย่างในพลาสติก โดยสารชนิดนี้มีลักษณะขุ่นทึบในสโตรมา (stroma) มีโครงสร้างของ vasicularและ plastoglouli ผิดปกติ มีไมโตคอนเดรีย (mitochondria) ลักษณะบวมและรูปร่างผิดปกติ ผนังเซลล์หนาขึ้น และอาจทำให้ตำแหน่งของ plasmodesmata เปลี่ยนแปลงไป นิวเคลียสมีลักษณะเป็นโพลีพลอยด์เกิดขึ้น (Eleftheriou, 1993) จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนในข้าวสาลีพันธุ์นี้ พบว่า ผนังเซลล์ protophloem sieve บริเวณตำแหน่ง golgi vesicle และ plasma membrane ผิดปกติใน cellulose microfibril, plasmodesmata และ sieve pore แคบ ผนังเซลล์หนาไม่เรียบเหมือนปกติ (Eleftheriou, 1994) ใน *Vigna sinensis* L. พบว่า กลุ่มเซลล์ซีฟ (sieve sell) ในใบหลัก (primary leaf) มีขนาดใหญ่ ผนังเซลล์หนา มีการสะสมเซลลูโลส (cellulose) ลงไปในชั้นไพรมา

รีวอลล์ (primary wall) ทั้งตามยาวและตามขวางของผนังเซลล์ มีการพัฒนาผิดปกติโดยปราศจากการแบ่งเซลล์ เซลล์ซีฟมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา (differentiation) โดยไม่มีการแบ่งเซลล์

ในพืชหลายชนิดมีการเปลี่ยนแปลงขนาดและความหนาแน่นของปากใบ เช่น ในพริกไทยพันธุ์ Panniyur1 ที่ได้รับโคลชิซิน 0.05 หรือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ อายุ 6 เดือน มีความหนาแน่นของปากใบลดลง (Nair and Ravindran, 1992) ในพืชตระกูล Rosaceae ที่เป็นเตตราพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อมีความหนาแน่นของปากใบน้อยกว่าทริพพลอยด์ (Blank *et al*., 1994) ในพืชหลายชนิดจำนวนโครโมโซมที่เกิดการเปลี่ยนแปลงมีผลต่อการผสมพันธุ์ เช่น *Cucumis sativa* L. พันธุ์ Sativa และพันธุ์ Hardwickii ที่เป็นเตตราพลอยด์ มีความสามารถในการผสมติด (fertility) ลดลง เมื่อทำการผสมข้ามระหว่างต้นเตตราพลอยด์กับต้นดิพพลอยด์ พบว่า ผลมีเมล็ดจำนวนมากเมื่อต้นพ่อแม่เป็นเตตราพลอยด์ ตัวเมีย (female) แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ต้นที่ให้เมล็ดได้ดีที่สุดคือสายพันธุ์ WI-5551/603 MI-805 และ GYGV และมีแนวโน้มที่ดอกจะเป็นดอกกะเทย (Mackiewicz and Malepszy, 1996)และจากการสร้างลูกผสมแอมฟิดิพพลอยด์ (amphidiploid) โดยการผสมข้ามระหว่าง*Cyclamen persicum* Mill. (2n = 2x = 48, AA) กับ *C. purpurascens* (2n = 2x = 34, BB) ลูกผสมมีโครโมโซม 41 แท่ง (2n = 41, AB) มีการสร้างละอองเกสรน้อยและผสมตัวเองไม่ติดแต่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยโคลชิซิน 50 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 10 และ 15 วัน มีโครโมโซม 82 แท่ง (2n = 82, AABB) สามารถสร้างละอองเกสรได้มาก และสามารถผสมติดให้เมล็ดจำนวนมาก (Ishizaka and Uenatsu, 1995) และลักษณะการเป็นโพลีพลอยด์สามารถนำเอาลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นไปใช้ปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ลักษณะทางคุณภาพและลักษณะทางปริมาณตามที่นักปรับปรุงพันธุ์ หรือเกษตรกรต้องการได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโคลชิซินชักนำให้เกิดเอมบริโอ (embryogenesis) ในละอองเกสรของ *Brassica napus* L. พันธุ์ Topus แทนการใช้ความร้อน (32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) (Zhao *et al*., 1996)

วิธีการตรวจสอบโพลีพลอยด์

1. เทคนิค Flow cytometry เป็นวิธีการตรวจวัดระดับโพลีพลอยด์ดี (polyploidy) ของพืชหลังจากการได้รับสารละลายโคลชิซิน หรือ สารต่อต้านการเกิดไมโตซีส โดยใช้เครื่องตรวจสอบระดับพลอยด์ดีจากการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ (DNA) โดยรวมของนิวเคลียสแต่ละอันภายในเซลล์พืช โดยระหว่างการตรวจสอบต้องมีพืชที่เป็นดิพพลอยด์ปกติเป็นตัวมาตรฐานอ้างอิงดังตัวอย่างการใช้วิธีนี้ เช่น วิธีการของ Tepakum and Veilleux (1998) ได้ทำการศึกษาความเป็นลูกผสมรวม สปีชีส์ระหว่าง *Solanum cacoehse* x *Solanum phureja*

1) ตัดใบอ่อนใบพืชที่ไดรับสารโคลชิซิน หรือออริซาลิน ใหมีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ด้วยมีโกณคม ๆ ในจานพลาสติก ขนาด 55 มิลลิเมตร ที่มีสารละลาย HR-A nuclei extraction

2) กรองด้วยแผ่นกรองชนิดใช้แล้วทิ้งที่มีรูขนาด 20 ไมครอน จะได้นิวเคลียสที่ถูกปลดปล่อยออกมาแขวนลอยอยู่

3) ย้อมนิวเคลียสด้วย HR-B DAPI โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง HR-A solution : HR-B-staining ปริมาตร 1 : 4

4) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้รับการย้อมสีแล้วเข้าวิเคราะห์ในเครื่อง PA ploidy analyzer, partec

5) วัดยอดกราฟมาตรฐาน (standard peak) ของเซลล์ที่มีลักษณะเป็นดิพพลอยด์ (Diploid cell) 2n อย่างน้อย 10 ใบ ซึ่งได้จากต้นแม่ที่ปลูกในเรือนทดลอง และผ่านการตรวจสอบจำนวนโครโมโซมแล้วว่าเป็น 2n = 2x = 28

6) standard peak ของต้นดิพพลอยด์ปรากฏขึ้นที่ช่อง 100 ใน relative fiuorescent intensity

7) นำตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบระดับดิพพลอยด์ดี (ploidy) วิเคราะห์เปรียบเทียบกับต้นที่เป็นดิพพลอยด์ปกติ

2. การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอเป็นหน่วยที่ควบคุมลักษณะดีเอ็นเอส่วนใหญ่ปรากฏอยู่ในโครโมโซม ปริมาณดีเอ็นเอในเซลล์ร่างกาย (diploid) จะเป็นสองเท่าของปริมาณดีเอ็นเอในหน่วยสืบพันธุ์ (haploid) (ไพศาล, 2535) จากการศึกษาของ Raina *et al*. (1994) พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณดีเอ็นเอของพืชที่เป็น ดิพพลอยด์ (diploid) สกุล *Vacia, Tephrosia* และ *Phlox* มีค่าน้อยกว่าต้นที่เป็นเตตราพลอยด์ (tetraploid) ที่เกิดจากการชักนำของโคลชิซิน เช่น *T. villosa* (2n = 2x) มีค่าเฉลี่ยปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 2.5 ± 0.05 (x 10^{-12} กรัม) และต้นที่ถูกชักนำด้วยโคลชิซินมีค่า 5.10 ± 0.09 (x 10^{-12} กรัม) เป็นต้น

3. การศึกษาโครโมโซม เนื่องจากโคลชิซินมีผลต่อกระบวนการทำงานของสปินเดิลไฟเบอร์ (spindle fiber) ทำให้โครโมโซมที่เพิ่มขึ้นไม่เคลื่อนไปอยู่คนละขั้วของเซลล์ตามปกติ ดังนั้นเซลล์จึงมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มเป็นสองเท่า เช่น ในส้ม 2n = 2x = 36 (Gmitter *et al*., 1991) นอกจากโคลชิซินทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมแล้วยังมีสารอื่น ๆ ที่ใช้ในการทำการเพิ่มโครโมโซม และนอกจากการใช้สารเคมีชักนำให้เกิดการเพิ่มโครโมโซมแล้ว วิธีการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) ในพืชต่างๆ ยังเป็นสาเหตุให้จำนวนโครโมโซมเปลี่ยนแปลงไปได้อีกด้วย เช่นการเพิ่มโครโมโซมเป็นสองเท่าของส้มลูกผสมเซลล์ร่างกาย (Grosser *et al*., 1992a, 1992b) นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาโครโมโซมด้วยเหตุผลอื่นๆ ในพืชอีกหลายชนิดและการค้นหาระดับโพลีพลอยด์ (polyploidy) ในพืชก็เป็นอีกเหตุผลหนึ่งในการศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น การศึกษาผลของโคลชิซินที่มีต่อบลูเบอร์รี่ในสภาพปลอดเชื้อ (Goldy and Lyrene, 1984) การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ (polyploidy) โดยการใช้โคลชิซินในส้ม (Gmitter *et al*., 1991) สำหรับเทคนิควิธีการในการศึกษาจำนวนโครโมโซมก็แตกต่างกันตามชนิดของพืช และความสะดวกของผู้ทดลอง เช่น Gmitter *et al.* (1990) โดยทำการหาโครโมโซมในส้มด้วยการเตรียม (pretreated) ใน p-dichlorobenzene 2-3 ชั่วโมงก่อน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส รักษาสภาพเซลล์ (fixed) ใน ethanol : glacial acetic acid อัตราส่วน 3:1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำ hydrolysised ด้วย 5N HCl เป็นเวลา 8, 12 และ15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อชิ้นส่วนพืชที่ใช้เป็น callus embryo และปลายรากตามลำดับ เพิ่มให้เนื้อเยื่อนุ่มอาจแช่ใน EMS (2 [N-morpholino] ethane sulfonic acid) ความเข้มข้น 6

มิลลิโมล Ling and Iwamasa (1994) ได้ศึกษาจากแคลลัส (callus) ของส้มโดยพรีทรีต (pretreated) ใน 8-hydroxy quinolone ความเข้มข้น 0.002 โมลาร์ เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง ในอุณหภูมิห้อง รักษาสภาพเซลล์ (fixed) ใน ethanol : acetic acid (3:1 v/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง lacto-propionic orcein (w/v) 1 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาของ Toolapong *et al*. (1995) ในส้ม โดยเตรียมพรีทรีต (pretreated) ใน 8-hydroxy quinolone ความเข้มข้น 0.002 โมลาร์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส, รักษาสภาพเซลล์ในสาร ethyl alcohol 99 เปอร์เซ็นต์ ต่อ acetic acid (3 : 1 v/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บชิ้นส่วนพืชไว้ในแอลกอฮอล์ (alcohol) 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมสีโครโมโซมใน lacto-propionic orcein (w/v) 1 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นต้น

4. การหาขนาด และความหนาแน่นของปากใบ จากการศึกษาลักษณะของปากใบ เช่น ขนาด (ความกว้าง หรือ ความยาว) ของปากใบ และความหนาแน่นของปากใบ ในพืชหลายชนิด พบว่า ลักษณะดังกล่าวสามารถใช้ในการจำแนกระดับความเป็นโพลีพลอยด์ได้ในระดับหนึ่ง อย่างคร่าว ๆ ในช่วงต้น ๆ เช่น การศึกษาโดยใช้ EPU (eyepiece unit) ในการวัดความยาวของปากใบของข้าวบาร์เลย์ พบว่า ความยาวปากใบของโพลีพลอยด์ระดับต่างๆ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งสามารถใช้ลักษณะความยาวปากใบในการจำแนก แฮพพลอยด์ ดิพพลอยด์และเตตราพลอยด์ได้ ในข้าวไรน์สามารถใช้ความยาวของปากใบในการจำแนกต้นที่เป็นดิพพลอยด์ออกจากเตตราพลอยด์ได้อย่างหยาบๆ แต่ความยาวของปากใบอาจมีความแตกต่างกันได้เมื่อใบมีอายุ แตกต่างกัน (Borrino and Powell, 1988) ใน *A. fistulosum* L. พบว่า โพลีพลอย์มีขนาดความยาวของปากใบยาวขึ้น (Adaniya and Ardian, 1994) การศึกษาใน *Lolium multiflorum* และ *L. perenne* พบว่า ความยาวปากใบของดิพพลอยด์ และเตตราพลอยด์ มีค่าแตกต่างกัน (Speckmann *et al*., 1965)

จากการศึกษาลักษณะปากใบใน *Dactylis* พบว่า ความยาวปากใบของดิพพลอยด์แตกต่างจากทริพพลอยด์ และเตตราพลอยด์ แต่ความยาวปากใบของต้นที่มีลักษณะเป็นทริพพลอยด์ และเตตราพลอยด์ไม่แตกต่างกันมากนัก และสามารถใช้ความยาวของปากใบในการจำแนกระดับความเป็นโพลีพลอยด์ได้ในระดับหนึ่ง (Santen and Casler, 1986)

5. การนับโคลโรพลาสต์ ในพืชบางชนิดการนับคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของปากใบเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการจำแนกระดับโพลีพลอยด์ได้ สามารถใช้วิธีการนี้ในการจำแนกต้นดิพพลอยด์ออกจากต้นเตตราพลอยด์ในพืชหลายชนิดได้ดี โดยเฉพาะในพืชตระกูลแตง เช่น แตงโมต้นที่เป็นดิพพลอยด์จำนวนคลอโรพลาสต์ ในปากใบมีน้อยกว่าต้นที่เป็นเตตราพลอยด์ เช่น ในพันธุ์ Mickylee เมื่อทำการนับคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของปากใบจากใบในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าแตงโมต้นที่เป็นดิพพลอยด์มีจำนวนคลอโรพลาสต์ เฉลี่ย 11.2 คลอโรพลาสต์ ส่วนแตงโมต้นเตตราพลอยด์มีค่าเฉลี่ยจำนวนคลอโรพลาสต์ 18.6 คลอโรพลาสต์ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ (Compton *et al*., 1996) นอกจากแตงโมแล้วยังมีพืชอื่น ๆ ที่ใช้การนับคลอโรพลาสต์ในปากใบเพื่อใช้ในการจำแนกระดับโพลีพลอยด์ เช่น ในแตงเทศ (muskmelon) (Fassuliotis and Nelson, 1992) *Trifolium* บางชนิด (Najcevska, 1968) อัลฟัลฟ่า (alfalfa) (Bingham, 1968) *Arachis* (Singsit and Ozia-Akins, 1992) เป็นต้น

6. ขนาด และสีส่วนต่างๆ ของลำต้น ในพืชบางชนิดที่มีลักษณะเป็นโพลีพลอยด์อาจพิจารณาจากการมองดูได้ด้วยตาเปล่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความชำนาญในการสังเกตของผู้ศึกษา เช่น ในส้มมีลำต้นอ้วน (stout) ใบการแผ่กว้าง สีเขียวเข้ม หนา และค่อนข้างกลม (Gmitter *et al*., 1991) ในพริกไร่พริก ใบมีขนาดใหญ่ หนา สีเขียวเข้ม (วิมล และอนันต์, 2526) ในแตงโมใบมีขนาดใหญ่ขึ้น (ดำรง, 2525) ในบลูเบอร์รี่ พบว่า โพลีพลอยด์มีขนาดของลำต้นใหญ่ขึ้น และความหนาของใบเพิ่มขึ้น (Perry and Lyrene, 1984 ; Goldy *et al*., 1984) เป็นต้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง หรือ เก็บข้อมูล

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในเมล็ดความงอด้วยการให้โคลชิซินหลังจากการเพาะเมล็ดในกระดาษเพาะ

วัสดุอุปกรณ์

1) สารโคลชิซิน
2) DMSO
3) ขวดเตรียมสารเคมี 4 ขวด
4) ขวดทรีตเมนต์ 8 ขวด
5) ถาดเพาะขนาด 60 หลุม
6) เมล็ดคราม งอ
7) เมล็ดคราม งอ
8) เพลท
9) พีทมอส
10) แท็ก + ดินสอ

ขั้นตอนการศึกษา

1) นำเมล็ดครามลงล้างในน้ำประปาไหลผ่าน ตะแกรงบรรจุเมล็ดคราม 5 นาที ล้างเมล็ดด้วยน้ำยาล้างจาน
2) ล้างเมล็ดด้วยน้ำประปาไหลผ่านอีก 5 นาที
3) แช่เมล็ดในคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที
4) ล้างเมล็ดในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
5) ทำการเพาะเมล็ดในกระดาษเพาะบน petridish เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (จำนวน 8 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 1 petridish โดยแต่ละ petridish มี 400 เมล็ด)
6) ทรีตเมล็ดในทรีตเมนต์ต่าง ๆ ในตาราง (ตารางที่ 2) โดยแช่เมล็ดในขวดทรีตเมนต์ขวดละ 30 มิลลิลิตร จำนวน 8 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 400 เมล็ด (ทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำๆ 100 เมล็ด)
7) เมื่อครบกำหนดเวลา นำเมล็ดในแต่ละทรีตเมนต์ล้างในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซับเมล็ดด้วยกระดาษชำระให้หมาด
8) นำเมล็ดลงเพาะในถาดเพาะทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำๆ 60 เมล็ด โดยเพาะหลุมละ 1 เมล็ด
9) หลังจากนั้นเป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนเมล็ดงอก ครั้งที่ 1 และหลังเพาะ 14 วัน นับจำนวนเมล็ดงอกครั้งที่ 2

ตารางที่ 3.1 ทรีตเมนต์ที่ทำการศึกษาในเมล็ดคราม

ทรีตเมนต์	ความเข้มข้นของโคลชิซิน (เปอร์เซ็นต์)	เวลาที่ได้รับโคลชิซิน (ชั่วโมง)
T1	0.0	6
T2	0.0	12
T3	0.1	6
T4	0.1	12
T5	0.2	6
T6	0.2	12
T7	0.4	6
T8	0.4	12

3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.3.1 การศึกษาลักษณะการงอก

1) จำนวนใบ โดยการนับจำนวนเฉพาะใบที่คลี่แล้วทั้งหมด

2) ลักษณะทั่วไปของต้นกล้า โดยการสังเกต และบรรยายลักษณะต้นกล้า ลักษณะต้นกล้าที่งอกจากเมล็ดที่ได้รับโคลชิซิน โดยเปรียบเทียบลักษณะต้นกล้าที่เกิดจากหน่วยทดลองที่ได้รับโคลชิซิน และไม่ได้รับโคลชิซิน

3.3.2 การเจริญเติบโตของต้นกล้า

1) จำนวนใบ โดยการนับจำนวนเฉพาะใบที่คลี่แล้วทั้งหมด

2) ความกว้างของใบ โดยวัดจากบริเวณกึ่งกลางของใบ

3) ความยาวใบ โดยวัดจากปลายก้านในถึงส่วนยอดของใบ

4) ค่าดัชนีใบ (ดำรง, 2525) และค่า specific leaf area (เฉลิมพล, 2538) ได้จาก

$$\text{ดัชนีใบ (leaf index)} = \frac{\text{ความกว้างของใบ (เซนติเมตร)}}{\text{ความยาวของใบ (เซนติเมตร)}}$$

3.3.3 การศึกษาปากใบ

1) วิธีการหาความหนาแน่นของปาก โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Feungchun (1975) จากใบที่ 3 หรือ 4 จากโคนต้น โดยสุ่มจากหน่วยทดลองที่สามารถงอกใบใหม่ได้แต่ไม่เกิน 5 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาทากาวชนิดพิเศษทางด้านหลัง (lower) ใบเพื่อลอกดูลักษณะปากใบโดยตัดเอาเฉพาะบริเวณกลางใบวางบนแผ่น สไลด์ (slide) ปิดด้วยแผ่นแก้วปิด ติดผนึกด้วยน้ำยาทาเล็บ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายเลนส์วัตถุ 40 เท่า ที่เลนส์ตาบรรจุ ocular micrometer ชนิด square ทำการนับจำนวนปากใบในเฟรม (flame)

2) การหาขนาดของปากใบ โดยการวัด 5 ปากใบต่อ 1 หน่วยทดลองละ 5 ตัวอย่าง ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายเลนส์วัตถุ 40 เท่าที่เลนส์ตาบรรจุ ocular micrometer ชนิด scale ทำการวัดขนาดของปากใบ

3.3.4 การตรวจสอบลักษณะโพลีพลอยด์

1) วิเคราะห์โพลีพลอยด์ โดยใช้เทคนิค Flow cytometry

2) อัตราการเกิดโพลีพลอยด์

3.3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS version 16 การเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ของแต่ละทรีตเมนต์ ใช้วิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

3.4 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

เรือนทดลอง และห้องปฏิบัติการ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

3.5 ระยะเวลาและแผนปฏิบัติการวิจัย ตามแผนการในตาราง ระยะเวลา 1 ปี

บทที่ 4

ผลการวิจัย

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในเมล็ดคราม งอ โดยการเพาะเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้เมล็ดครามงอกหลังจากนั้นจึงนำเมล็ดงอกมาทรีตด้วยโคลชิซิน ในระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ ตามทรีตเมนต์ดังต่อไปนี้

T1	=	โคลชิซินเข้มข้น 0.0 เปอร์เซ็นต์ / เวลา 6 ชั่วโมง
T2	=	โคลชิซินเข้มข้น 0.0 เปอร์เซ็นต์ / เวลา 12 ชั่วโมง
T3	=	โคลชิซินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ / เวลา 6 ชั่วโมง
T4	=	โคลชิซินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ / เวลา 12 ชั่วโมง
T5	=	โคลชิซินเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ / เวลา 6 ชั่วโมง
T6	=	โคลชิซินเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ / เวลา 12 ชั่วโมง
T7	=	โคลชิซินเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ / เวลา 6 ชั่วโมง
T8	=	โคลชิซินเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ / เวลา 12 ชั่วโมง

หลังจากการทรีตด้วยโคลชิซินนำเมล็ดครามงอกลงเพาะในวัสดุเพาะ(พีทมอส) เป็นเวลา 15 วันทำการศึกษาลักษณะเปอร์เซ็นต์การงอก ความสูงของต้นกล้าครามงอ จำนวนใบประกอบ ลักษณะความผิดปกติของต้นกล้า และตรวจสอบความเป็นโพลีพลอยด์ ตรวจสอบความเป็นเตตราพลอยด์ หลังจากการตรวจสอบความเป็นโพลีพลอยด์ ด้วยเทคนิค flow cytometry แล้วจำแนกครามงอที่ศึกษาเป็น 3 ชนิด คือ ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ ทำการศึกษาของต้นคราม อายุ 3 เดือน โดยเปรียบเทียบ ความสูง เส้นรอบวงต้น จำนวนข้อ จำนวนกิ่ง จำนวนใบประกอบ น้ำหนักใบประกอบ จำนวนใบย่อย/1ใบประกอบ ความยาวใบ ความกว้างใบ ดัชนีใบ น้ำหนักใบย่อย 1 ใบ พื้นที่ใบย่อย 1 ใบ น้ำหนักใบย่อย/พื้นที่ใบ และศึกษาค่าสหสัมพันธ์ของแต่ละลักษณะ โดยวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS version 16 การเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ของแต่ละทรีตเมนต์ใช้วิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT (Duncan’s Multiple Range Test) และศึกษาความยาวปากใบ ความหนาแน่นของปากใบ พบว่า มีผลการศึกษาดังต่อไปนี้

1. ลักษณะเปอร์เซ็นต์การงอก

จากการศึกษาลักษณะความงอกของต้นกล้าที่อายุ 15 วัน หลังจาการได้รับโคลชิซินที่ 3 ระดับความเข้มข้น (0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่า ระดับความเข้มข้นที่ผลต่อความงอกอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ส่วนเวลาไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความงอก อีกทั้งยังพบว่ามีปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของโคลชิซิน และระดับเวลาที่ได้รับโคลชิซิน โดยเมื่อเมล็ดครามงอได้รับโคลชิซินระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ทำให้ความงอกลดลง บ่งชี้ว่า ระดับความเข้มข้นมีอิทธิพลต่อความงอกของเมล็ดครามงอ เมื่อพิจารณาในแต่ละทรีตเมนต์ พบว่า ทรีตเมนต์ที่

ไม่ได้รับโคลชิซินที่ระดับเวลา 6 ชั่วโมง (T1) มีความงอกสูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ T6, T2, T3, T4, T8, T7 และ T5 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1และภาพที่ 4.1)

2. ลักษณะความสูงของต้นกล้า

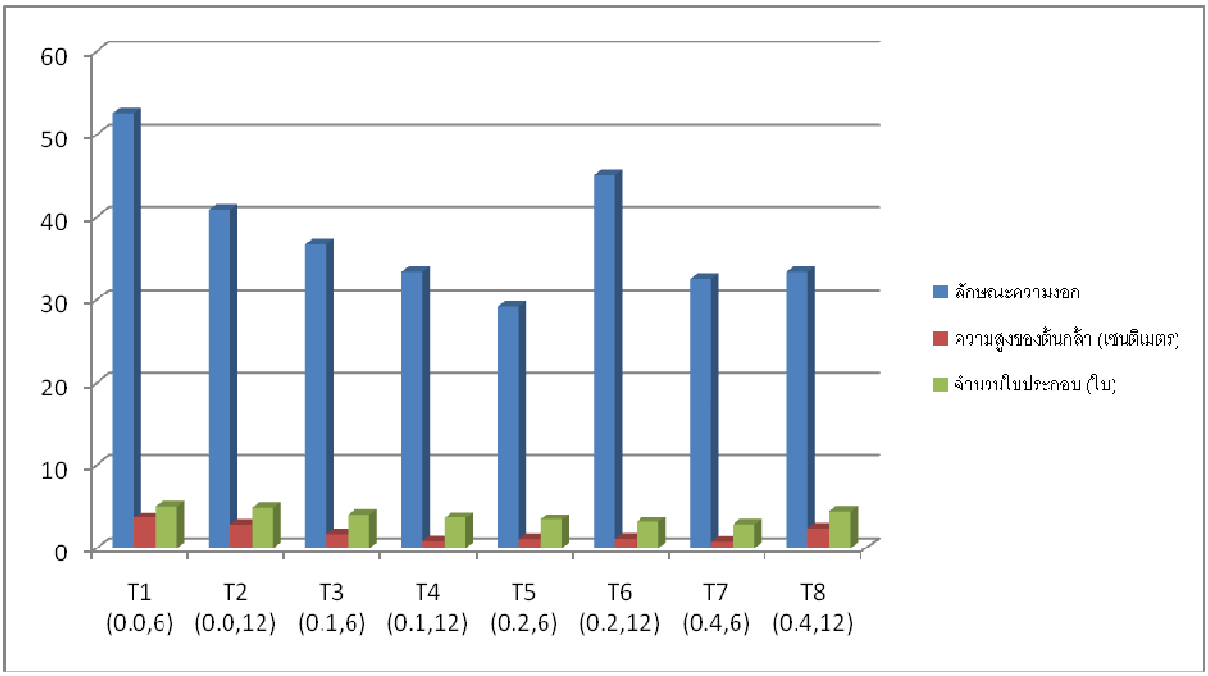
จากการศึกษาลักษณะความสูงของต้นกล้าที่อายุ 15 วัน หลังจากการได้รับโคลชิซินที่ 3 ระดับความเข้มข้น (0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่า ระดับความเข้มข้นที่ผลต่อความสูงของต้นกล้าอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ส่วนเวลาไม่มีผลต่อความสูงของต้นกล้า และพบว่า มีปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของโคลชิซิน และระดับเวลาที่ได้รับโคลชิซิน โดยเมื่อเมล็ดครามงอได้รับโคลชิซินระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ทำให้ความสูงของต้นกล้าลดลง บ่งชี้ว่า ระดับความเข้มข้นมีอิทธิพลต่อความสูงของต้นกล้าครามอายุ 15 วัน เมื่อพิจารณาในแต่ละทรีตเมนต์ พบว่า ทรีตเมนต์ที่ไม่ได้รับโคลชิซินที่ระดับเวลา 6 ชั่วโมง (T1) มีความสูงของต้นกล้ามากที่สุด รองลงมา ได้แก่ T2, T8, T3, T6, T5, T4 และ T7 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1)

3. ลักษณะจำนวนใบประกอบ

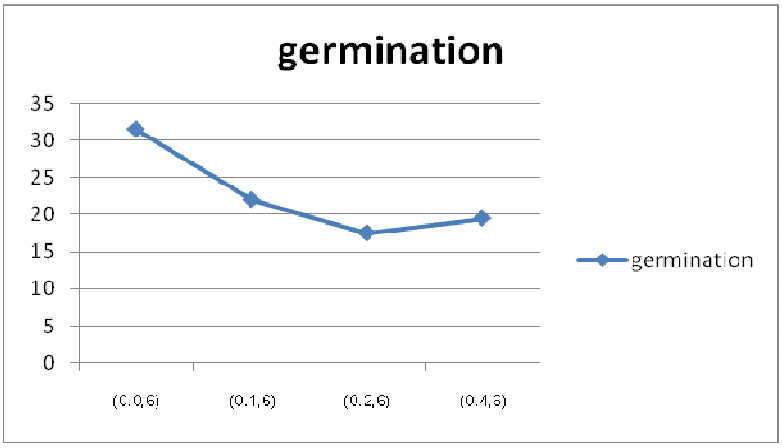
จากการศึกษาลักษณะจำนวนใบประกอบของต้นกล้าที่อายุ 15 วัน หลังจากการได้รับโคลชิซินที่ 3 ระดับความเข้มข้น (0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่า ระดับความเข้มข้นที่ผลต่อจำนวนใบประกอบของต้นกล้าอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ส่วนเวลาไม่มีผลต่อจำนวนใบประกอบของต้นกล้า และ พบว่า มีปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของโคลชิซิน และระดับเวลาที่ได้รับโคลชิซินต่อจำนวนใบประกอบ โดยเมื่อเมล็ดครามงอได้รับโคลชิซินระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ทำให้จำนวนใบประกอบของต้นกล้าลดลง บ่งชี้ว่า ระดับความเข้มข้นมีอิทธิพลต่อจำนวนใบประกอบของต้นกล้าครามอายุ 15 วัน เมื่อพิจารณาในแต่ละทรีตเมนต์ พบว่า ทรีตเมนต์ที่ไม่ได้รับโคลชิซินที่ระดับเวลา 6 ชั่วโมง (T1) มีจำนวนใบประกอบของต้นกล้ามากที่สุด รองลงมา ได้แก่ T2, T8, T3, T4, T5, T6 และ T7 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1และภาพที่ 4.1, 4.2 และ 4.3)

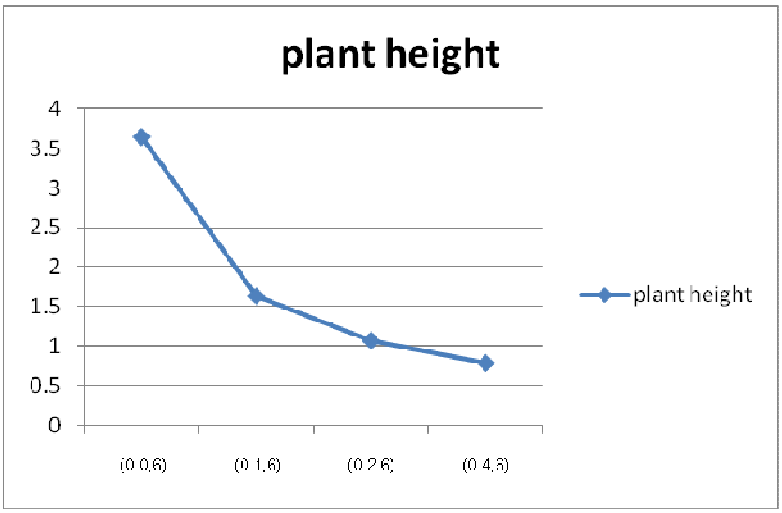
ตารางที่ 4.1 ลักษณะความงอก ความสูงของต้นกล้า และจำนวนใบประกอบ ของต้นกล้าครามที่ได้รับ ความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) กับระดับเวลา (6 และ12) ที่ได้รับโคลชิซิน

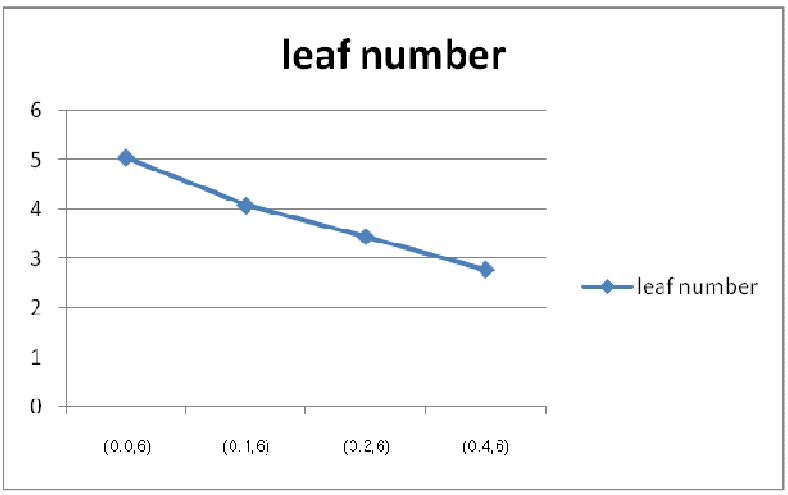
ทรีตเมนต์	ลักษณะความงอก	ความสูงของต้นกล้า	จำนวนใบประกอบ
0.0	46.667[a]	3.0989[a]	4.9650[a]
0.1	35.000[b]	1.2416[bc]	3.8644[b]
0.2	35.209[b]	1.0979[c]	3.2823[b]
0.4	32.917[b]	1.5573[b]	3.6128[b]
ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	**	**	**
6	36.771	1.7864	3.8372
12	38.125	1.7114	4.0250
เวลา (ชั่วโมง)	ns	ns	ns
T1 (0.0,6)	52.500[a]	3.638[a]	5.042[a]
T2 (0.0,12)	40.833[bc]	2.766[b]	4.889[ab]
T3 (0.1,6)	36.667[bc]	1.637[c]	4.080[bcd]
T4 (0.1,12)	33.333[bc]	0.846[d]	3.649[cde]
T5 (0.2,6)	29.167[c]	1.077[cd]	3.444[de]
T6 (0.2,12)	45.000[ab]	1.119[cd]	3.121[e]
T7 (0.4,6)	32.500[c]	0.794[d]	2.784[e]
T8 (0.4,12)	33.333[bc]	2.321[b]	4.422[abc]
ความเข้มข้น*เวลา	**	**	**
cv (%)	17.17	21.72	15.85



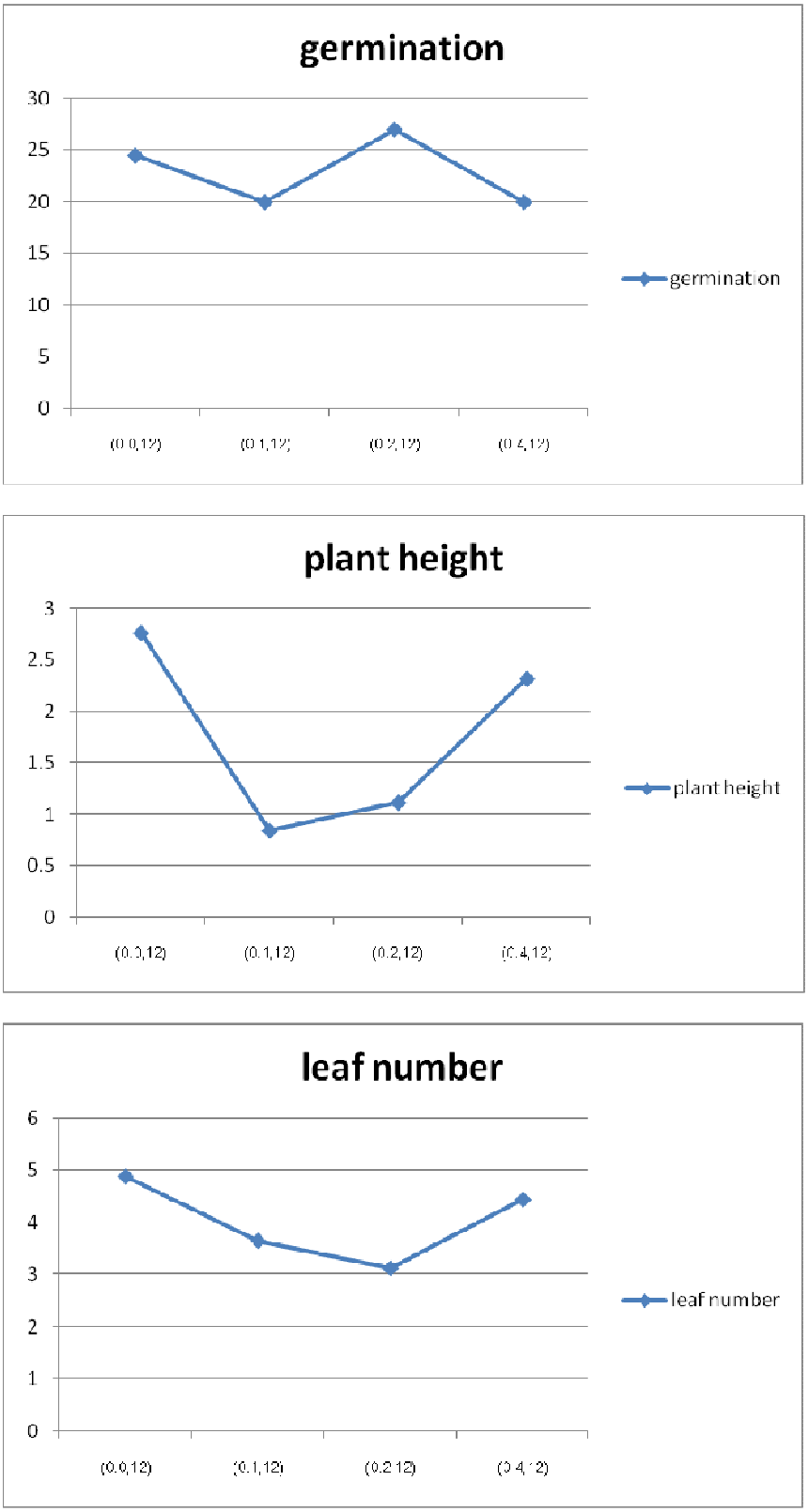
ภาพที่ 4.1 ลักษณะความงอก ความสูง จำนวนใบประกอบ ของต้นกล้าครามอายุ 15 วัน หลังจากได้รับโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.0 0.1 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง







ภาพที่ 4.2 ลักษณะความงอก ความสูง จำนวนใบประกอบ ของต้นกล้าหลังจากเมล็ดคราม ได้รับโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่ระดับเวลา 6 ชั่วโมง



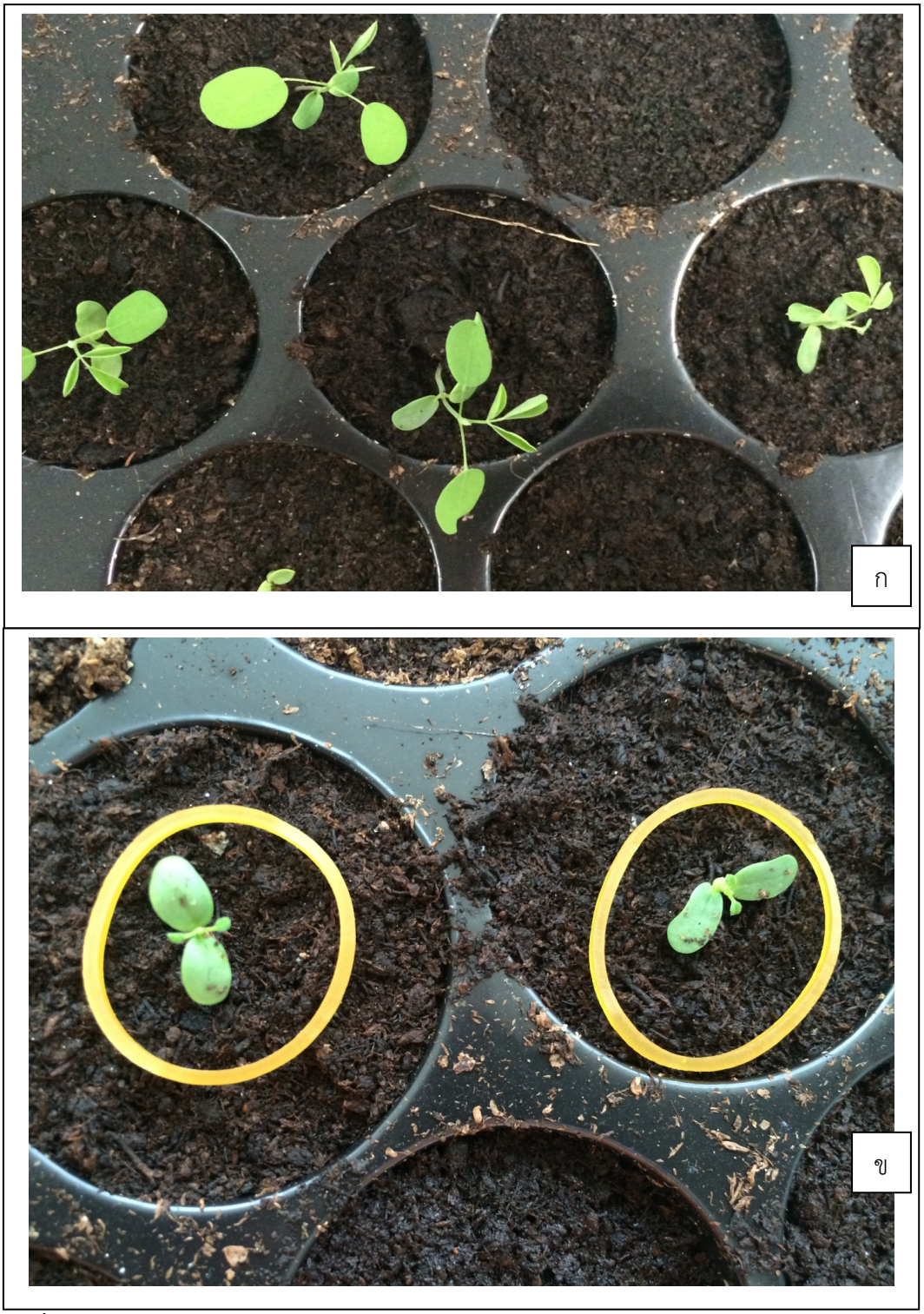
ภาพที่ 4.3 ลักษณะความงอก ความสูง จำนวนใบประกอบ ของต้นกล้าหลังจากเมล็ดคราม ได้รับโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่ระดับเวลา 12 ชั่วโมง

4. ลักษณะของต้นกล้า

จากการศึกษาลักษณะของต้นกล้าที่อายุ 15 วัน หลังจากการได้รับโคลชิซินที่ 3 ระดับความเข้มข้น (0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่า สามารถจำแนกลักษณะของต้นกล้าครามงอกได้เป็น 2 ลักษณะ คือ ต้นกล้าที่มีลักษณะเป็นต้นกล้าปกติ และต้นกล้าผิดปกติ (ตารางที่ 4.2) โดยจากการศึกษา พบว่า ในทรีตเมนต์ที่ไม่ได้รับโคลชิซิน (T1 และ T2) มีลักษณะเป็นต้นกล้าปกติทั้งหมด แต่ในทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินมีลักษณะต้นกล้าผิดปกติจำนวนหนึ่ง ดังต่อไปนี้ T7 (0.4, 6) พบต้นกล้าผิดปกติมากที่สุด เท่ากับ 67.27 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ T4 (0.1, 12) เท่ากับ 65.69 เปอร์เซ็นต์ T5 (0.2, 6) เท่ากับ 55.56 เปอร์เซ็นต์ T6 (0.2, 12) เท่ากับ 52.31 เปอร์เซ็นต์ T3 (0.1, 6) เท่ากับ 43.64 เปอร์เซ็นต์ และ T8 (0.4, 12) เท่ากับ 20.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ลักษณะของต้นกล้าที่ได้รับโคลชิซิน หลังจากเพาะต้นกล้า 15 วัน

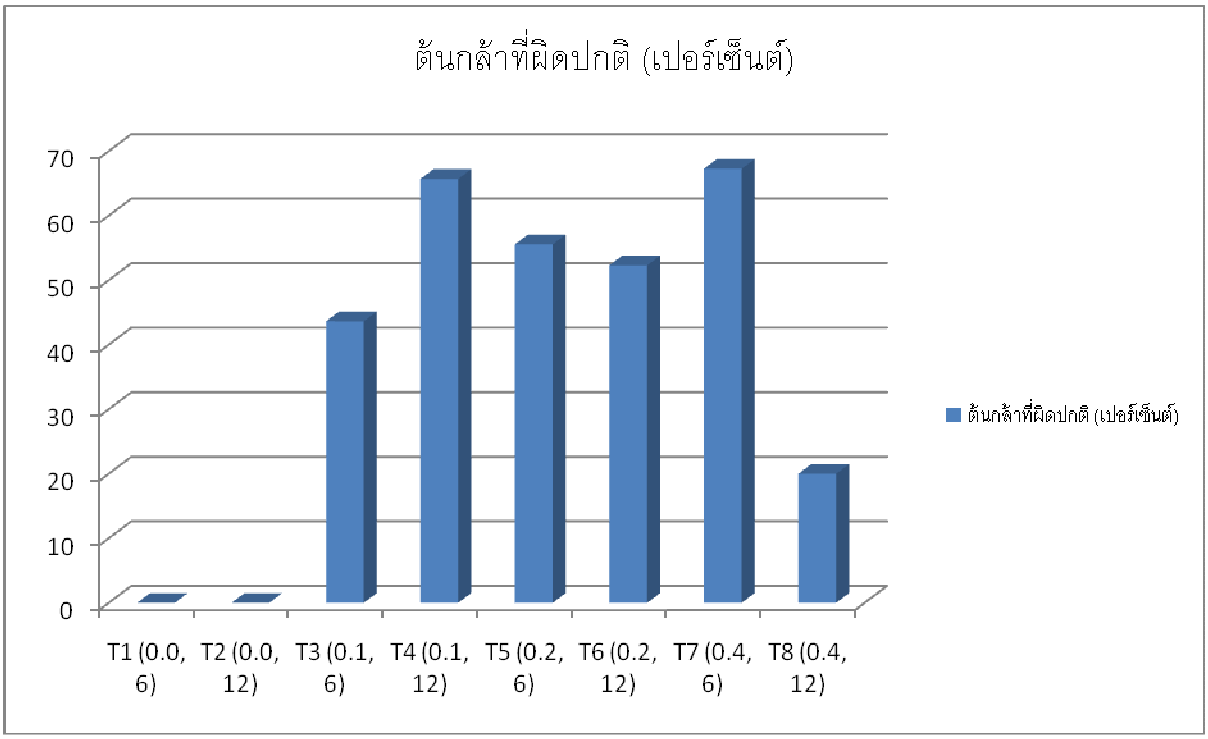
ชนิดต้นกล้าคราม	ลักษณะที่ปรากฏ
ต้นกล้าปกติ	ส่วนของไฮโปคอทิล และเอพิคอทิล ปกติ ทั้ง 2 ส่วนมีการยืดขยายยาว ลักษณะต้นสูงยาวผอม มีใบเลี้ยง 1 คู่ ใบจริง 1-2 คู่ คือใบจริงคู่ที่ 1 ที่เป็นใบเดี่ยว และใบจริงคู่ที่ 2 ที่เป็นใบประกอบ สีใบเขียว
ต้นกล้าผิดปกติ	ต้นกล้างอกช้า ต้นเตี้ย ส่วนใหญ่มีเฉพาะใบเลี้ยง และใบจริงคู่แรก ส่วนของไฮโปคอทิล บวม อ้วนสั้น ส่วนของเอพิคอทิลไม่ยืดยาว ส่วนที่เป็นเอพิคอทิลยืดได้ช้าใช้เวลานาน ใบจริงคู่แรกมีลักษณะบิดไม่แผ่กางขยายเหมือนพวกต้นปกติ ส่วนของใบเขียวเข้ม ใบจริงคู่แรกยังมีขนาดเล็ก และยังไม่ค่อยแผ่กาง



ภาพที่ 4.4 ลักษณะของต้นกล้าคราม อายุ 15 วัน หลังจากการทรีตโคลชิซิน ก. ต้นกล้าปกติ ข. ต้นกล้าผิดปกติ

ตารางที่ 4.3 การเกิดต้นผิดปกติที่งอกจากเมล็ดที่ได้รับโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาระดับต่าง ๆ (0, 6 และ 12 ชั่วโมง)

ทรีตเมนต์ (เปอร์เซ็นต์, ชั่วโมง)	ต้นกล้าที่ผิดปกติ (เปอร์เซ็นต์)
T1 (0.0, 6)	0.00
T2 (0.0, 12)	0.00
T3 (0.1, 6)	43.64
T4 (0.1, 12)	65.69
T5 (0.2, 6)	55.56
T6 (0.2, 12)	52.31
T7 (0.4, 6)	67.27
T8 (0.4, 12)	20.00

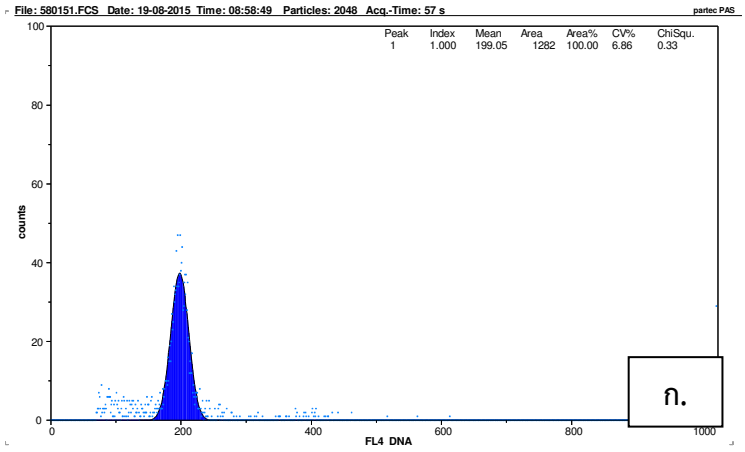


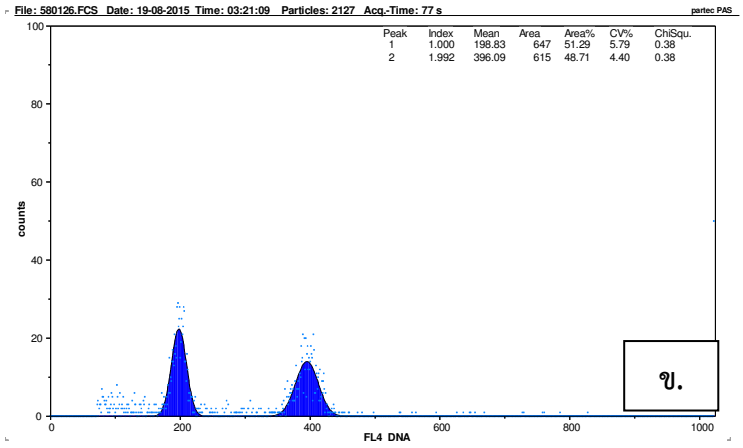
ภาพที่ 4.5 การเกิดต้นผิดปกติที่งอกจากเมล็ดที่ได้รับโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาระดับต่าง ๆ (0, 6 และ 12 ชั่วโมง)

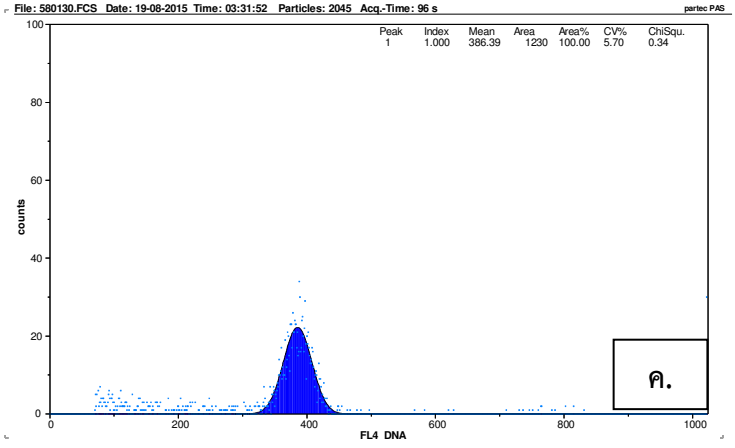
5. การตรวจสอบความเป็นโพลีพลอยด์ (ตารางที่ 2 และ3)

หลังจากทำการตรวจสอบลักษณะต้นกล้าดังกล่าวได้เบื้องต้น ได้นำต้นกล้าที่มีความผิดปกติที่ได้ทำเครื่องหมายเอาไว้ไปทำการตรวจสอบความเป็นโพลีพลอยด์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ผลการตรวจสอบ พบว่า ต้นที่มีลักษณะผิดปกติในเบื้องต้น คือ มีลักษณะต้นกล้างอกช้า ต้นเตี้ย ส่วนใหญ่มีเฉพาะใบเลี้ยง และใบจริงคู่แรก ส่วนของไฮโปคอทิล บวม อ้วนสั้น ส่วนของเอพิคอทิลไม่ยืดยาว ส่วนที่เป็นเอพิคอทิลยืดได้ช้าใช้เวลานาน ใบจริงคู่แรกมีลักษณะบิดไม่แผ่กางขยายเหมือนพวกต้นปกติ ส่วนของใบเขียวเข้ม ใบจริงคู่แรกยังมีขนาดเล็ก และยังไม่ค่อยแผ่กาง สามารถจำแนกด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์เป็น 3 ชนิด คือ ต้นที่เป็น ดิพพลอยด์ ต้นที่เป็นมิกโซพลอยด์ และต้นที่เป็นเตตราพลอยด์ ซึ่งมีลักษณะฮิสโตรแกรมดังภาพ (ภาพที่ 4.6) และการตรวจสอบความเป็นโพลีพลอยด์ของต้นผิดปกติที่งอกจากเมล็ดครามที่ได้รับโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาระดับต่าง ๆ (0, 6 และ 12 ชั่วโมง) พบว่า T1 (0.0, 6) และ T2 (0.0, 12) ต้นกล้าเป็นปกติ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดครามงอกในทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน ซึ่งมีลักษณะผิดปกติมีสัดส่วนความเป็นโพลีพลอยด์ชนิดต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ T3 (0.1, 6) มีดิพพลอยด์ 0.00 เปอร์เซ็นต์ มิกโซพลอยด์ 40.00 เปอร์เซ็นต์ และเตตราพลอยด์ 60.00 เปอร์เซ็นต์ T4 (0.1, 12) มีดิพพลอยด์ 9.09 เปอร์เซ็นต์ มิกโซพลอยด์ 63.34 เปอร์เซ็นต์ และเตตราพลอยด์ 27.27 เปอร์เซ็นต์ T5 (0.2, 6) มีดิพพลอยด์ 0.00 เปอร์เซ็นต์ มิกโซพลอยด์ 66.67 เปอร์เซ็นต์ และเตตราพลอยด์ 33.33เปอร์เซ็นต์ T6 (0.2, 12) มีดิพพลอยด์ 16.67 เปอร์เซ็นต์ มิกโซพลอยด์ 33.33 เปอร์เซ็นต์ และเตตราพลอยด์ 50.00 เปอร์เซ็นต์ T7 (0.4, 6) มีดิพพลอยด์ 0.00 เปอร์เซ็นต์ มิกโซพลอยด์ 60.00 เปอร์เซ็นต์ และเตตราพลอยด์ 33.33เปอร์เซ็นต์ T8 (0.4, 12) มีดิพพลอยด์ 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีมิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ (ตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.7)

เมื่อศึกษาการเกิดต้นเตตราพลอยด์ของเมล็ดครามที่ได้รับโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาระดับต่าง ๆ (0, 6 และ 12 ชั่วโมง) พบว่า ทรีตเมนต์ที่เกิดเตตราพลอยดได้สูงที่สุด คือ T4 (0.1, 12) รองลงมาได้แก่ T6 (0.2, 12) T3 (0.1, 6) T5 (0.2, 6) และ T7 (0.4, 6) ตามลำดับ ส่วน T8 (0.4, 12) จากการตรวจสอบ ไม่พบ เตตราพลอยด์ (ตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.8)



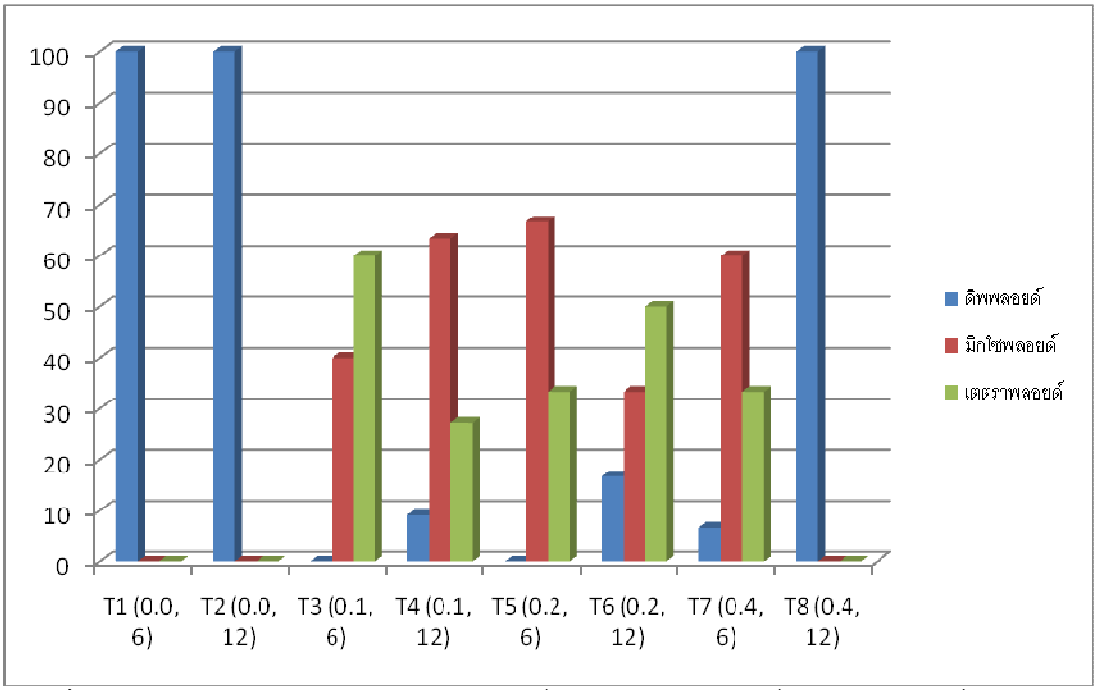




ภาพที่ 4.6 ลักษณะฮิสโตแกรมของต้นกล้าครามที่ตรวจด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ก. ฮิสโตแกรมของต้นดิพพลอยดด์ ข. ฮิสโตแกรมของต้นมิกโซพลอยดด์ ค. ฮิสโตแกรมของต้นเตตราพลอยดด์

ตารางที่ 4.4 การตรวจสอบความเป็นโพลีพลอยด์ของต้นผิดปกติที่งอกจากเมล็ดครามที่ได้รับโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาระดับต่าง ๆ (0, 6 และ 12 ชั่วโมง)

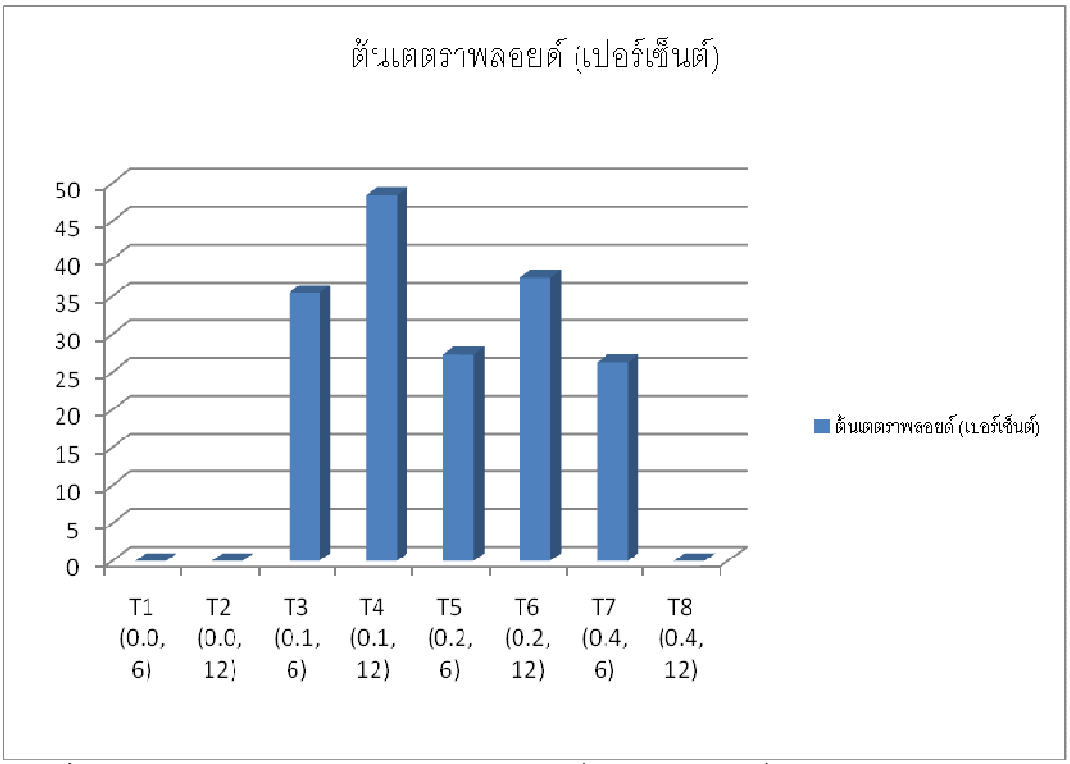
ทรีตเมนต์ (เปอร์เซ็นต์, ชั่วโมง)	ระดับความเป็นโพลีพลอยด์ (ploidy level)		
	ดิพพลอยด์ (เปอร์เซ็นต์)	มิกโซพลอยด์ (เปอร์เซ็นต์)	เตตราพลอยด์ (เปอร์เซ็นต์)
T1 (0.0, 6)	100.00	0.00	0.00
T2 (0.0, 12)	100.00	0.00	0.00
T3 (0.1, 6)	0.00	40.00	60.00
T4 (0.1, 12)	9.09	63.34	27.27
T5 (0.2, 6)	0.00	66.67	33.33
T6 (0.2, 12)	16.67	33.33	50.00
T7 (0.4, 6)	6.67	60.00	33.33
T8 (0.4, 12)	100.00	0.00	0.00



ภาพที่ 4.7 ความเป็นโพลีพลอยด์ของต้นผิดปกติที่งอกจากเมล็ดครามที่ได้รับโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาระดับต่าง ๆ (0, 6 และ 12 ชั่วโมง)

ตารางที่ 4.5 การเกิดต้นเตตราพลอยด์ของเมล็ดครามที่ได้รับโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาระดับต่าง ๆ (0, 6 และ 12 ชั่วโมง)

ทรีตเมนต์ (เปอร์เซ็นต์, ชั่วโมง)	ต้นเตตราพลอยด์ (เปอร์เซ็นต์)
T1 (0.0, 6)	0.00
T2 (0.0, 12)	0.00
T3 (0.1, 6)	35.45
T4 (0.1, 12)	48.46
T5 (0.2, 6)	27.27
T6 (0.2, 12)	37.50
T7 (0.4, 6)	26.26
T8 (0.4, 12)	0.00



ภาพที่ 4.8 การเกิดต้นเตตราพลอยด์ของเมล็ดครามที่ได้รับโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาระดับต่าง ๆ (0, 6 และ 12 ชั่วโมง)

6. การเปรียบเทียบลักษณะของต้นคราม (ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์)

6.1 ลักษณะลำต้น (ความสูงต้น เส้นรอบวงต้น จำนวนข้อ และจำนวนกิ่ง)

จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะความสูงของต้นครามงอที่เป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ พบว่า ความสูงของต้นครามงอทั้ง 3 ชนิด มีความสูงแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยต้นดิพพลอยด์มีความสูงมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.9 และ 4.10)

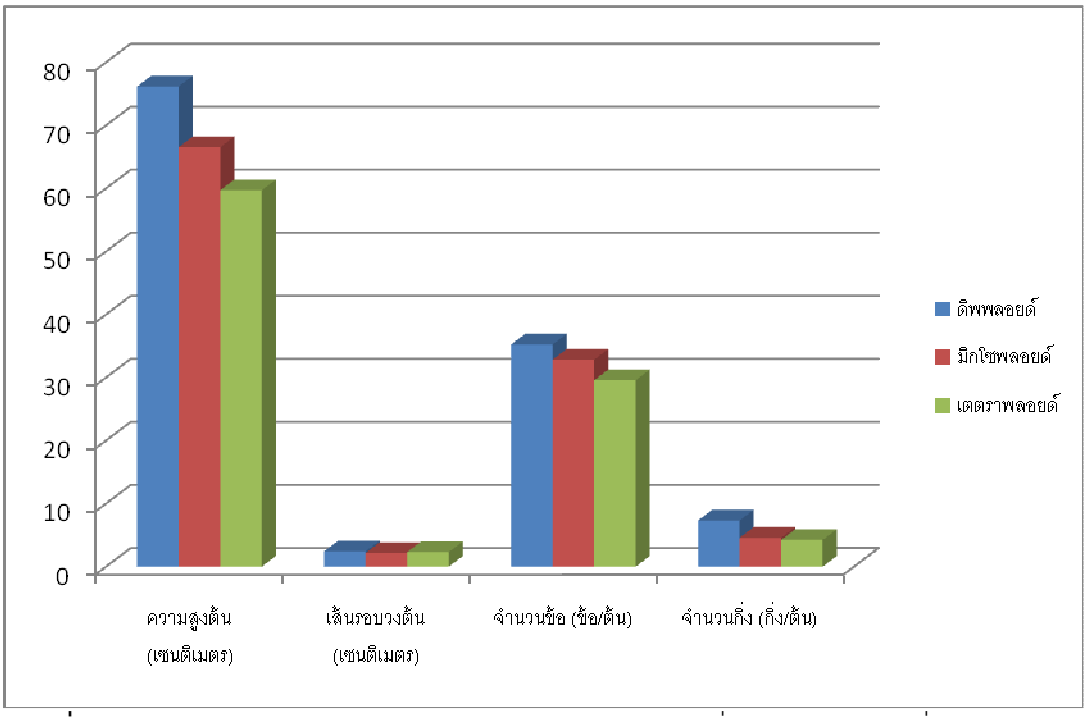
จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะเส้นรอบวงของต้นครามงอที่เป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ พบว่า เส้นรอบวงของต้นครามงอทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.9 และ 4.10)

จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะจำนวนข้อของต้นครามงอที่เป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ พบว่า จำนวนข้อของต้นครามงอทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.9 และ 4.10)

จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะจำนวนกิ่งของต้นครามงอที่เป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ พบว่า จำนวนกิ่งของต้นครามงอทั้ง 3 ชนิด มีจำนวนแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยต้นดิพพลอยด์มีจำนวนกิ่งมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.9 และ 4.10)

ตารางที่ 4.6 ลักษณะลำต้นของต้นครามงอที่มีชุดโครโมโซมเป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์

ระดับโพลีพลอยด์	ความสูงต้น (เซนติเมตร)	เส้นรอบวงต้น (เซนติเมตร)	จำนวนข้อ (ข้อ/ต้น)	จำนวนกิ่ง (กิ่ง)
ดิพพลอยด์	76.167[a]	2.434	35.250	7.334[a]
มิกโซพลอยด์	66.542[ab]	2.175	32.834	4.584[b]
เตตราพลอยด์	59.709[b]	2.317	29.583	4.250[b]
F-test	*	ns	ns	*



ภาพที่ 4.9 ลักษณะความสูง เส้นรอบวง จำนวนข้อ และจำนวนกิ่งของต้นครามงอที่มีชุดโครโมโซมเป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์

ภาพที่ 4.10 ลักษณะต้นครามอายุ 3 เดือน ก. ต้นดิพพลอยด์ (ซ้าย) และต้นมิกโซพลอยด์ (ขวา) ข. ต้นดิพพลอยด์ (ซ้าย) ต้นเตตราพลอยด์ (ขวา)

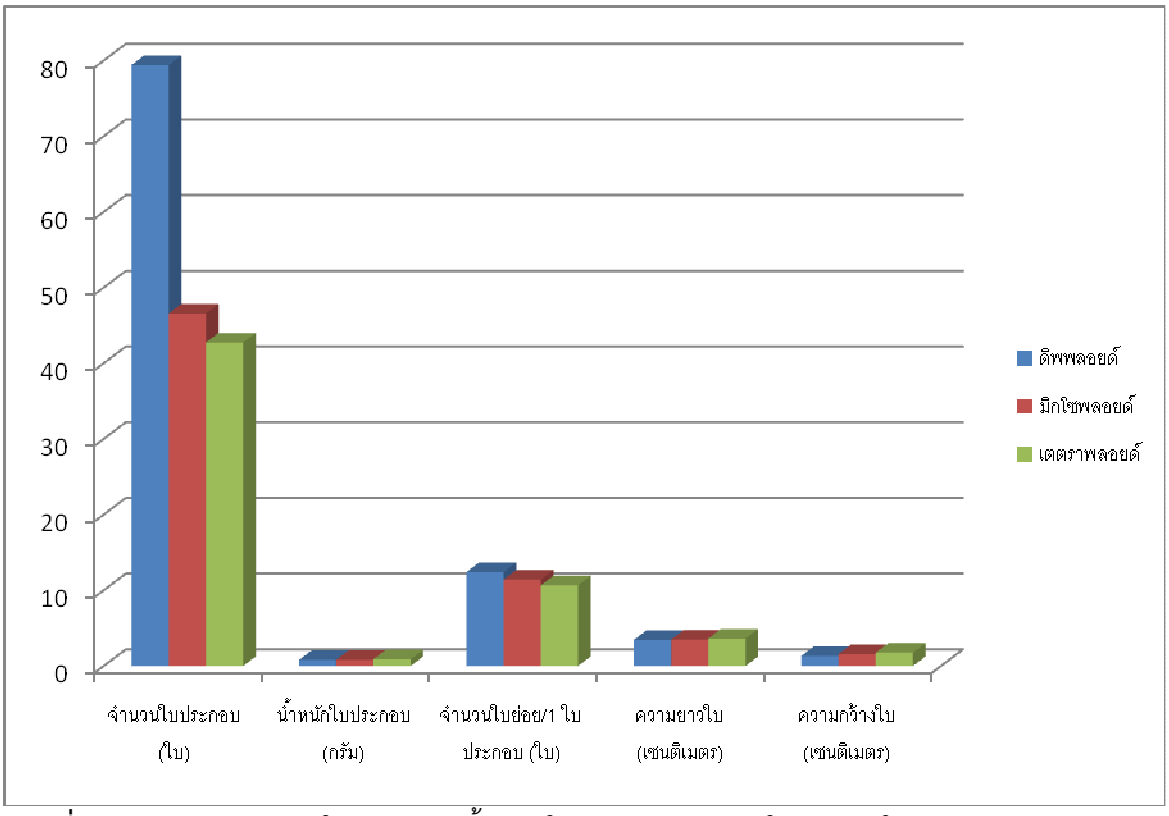
6.2 ลักษณะใบ (จำนวนใบประกอบ น้ำหนักใบประกอบ จำนวนใบย่อย/1 ใบประกอบ ความยาวใบ ความ และกว้างใบ)

จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะจำนวนใบประกอบของต้นคราม งอที่เป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ พบว่า จำนวนใบประกอบของต้นคราม งอทั้ง 3 ชนิด มีจำนวนแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยต้นดิพพลอยด์มีจำนวนใบประกอบมากที่สุด รองลงมาได้แก่ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.11และ4.12)

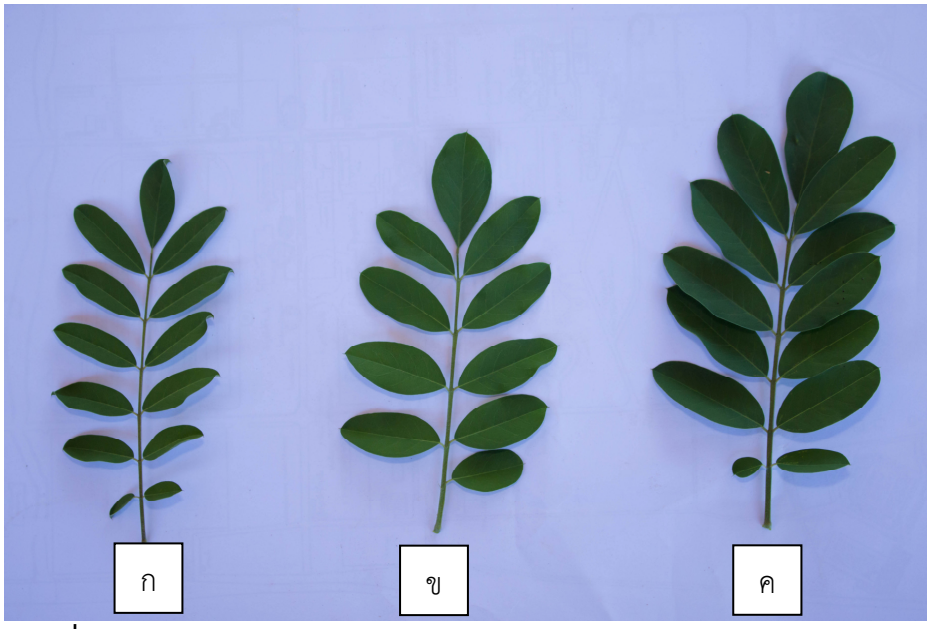
จากการศึกษาลักษณะน้ำหนักใบประกอบ จำนวนใบย่อย/1ใบประกอบ ความยาวใบ และความกว้างใบ ของต้นคราม งอที่เป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.11และ4.12)

ตารางที่ 4.7 ลักษณะใบของต้นคราม งอที่มีชุดโครโมโซมเป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ (จำนวนใบประกอบ น้ำหนักใบประกอบ จำนวนใบย่อย/1ใบประกอบ ความยาว และความกว้างใบ)

ระดับโพลีพลอยด์	จำนวนใบประกอบ (ใบ)	น้ำหนักใบประกอบ (กรัม)	จำนวนใบย่อย/1 ใบประกอบ (ใบ)	ความยาวใบ (เซนติเมตร)	ความกว้างใบ (เซนติเมตร)
ดิพพลอยด์	79.417[a]	0.807	12.417	3.451	1.331
มิกโซพลอยด์	46.583[b]	0.833	11.417	3.468	1.579
เตตราพลอยด์	42.750[b]	0.911	10.667	3.619	1.775
F-test	**	ns	ns	ns	ns



ภาพที่ 4.11 ลักษณะจำนวนใบประกอบ น้ำหนักใบประกอบ จำนวนใบย่อย/1 ใบประกอบ ความยาวใบ และความกว้างใบ



ภาพที่ 4.12 ลักษณะใบของต้นครามอายุ 3 เดือน ก. ใบของต้นดิพพลอยด์ ข. ใบของต้นมิกโซพลอยดด์ ค. ใบของต้นเตตราพลอยดด์

6.3 ลักษณะใบย่อย (ดัชนีใบ น้ำหนักใบย่อย พื้นที่ใบย่อย และน้ำหนัก/พื้นที่ใบย่อย)

จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะดัชนีใบของต้นครามงอที่เป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ พบว่า ดัชนีใบของต้นครามงอทั้ง 3 ชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยต้นดิพพลอยด์มีดัชนีใบมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ ตามลำดับ บ่งชี้ว่า ลักษณะใบของโพลีพลอยด์ มีลักษณะค่อนข้างกลม (ตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.13)

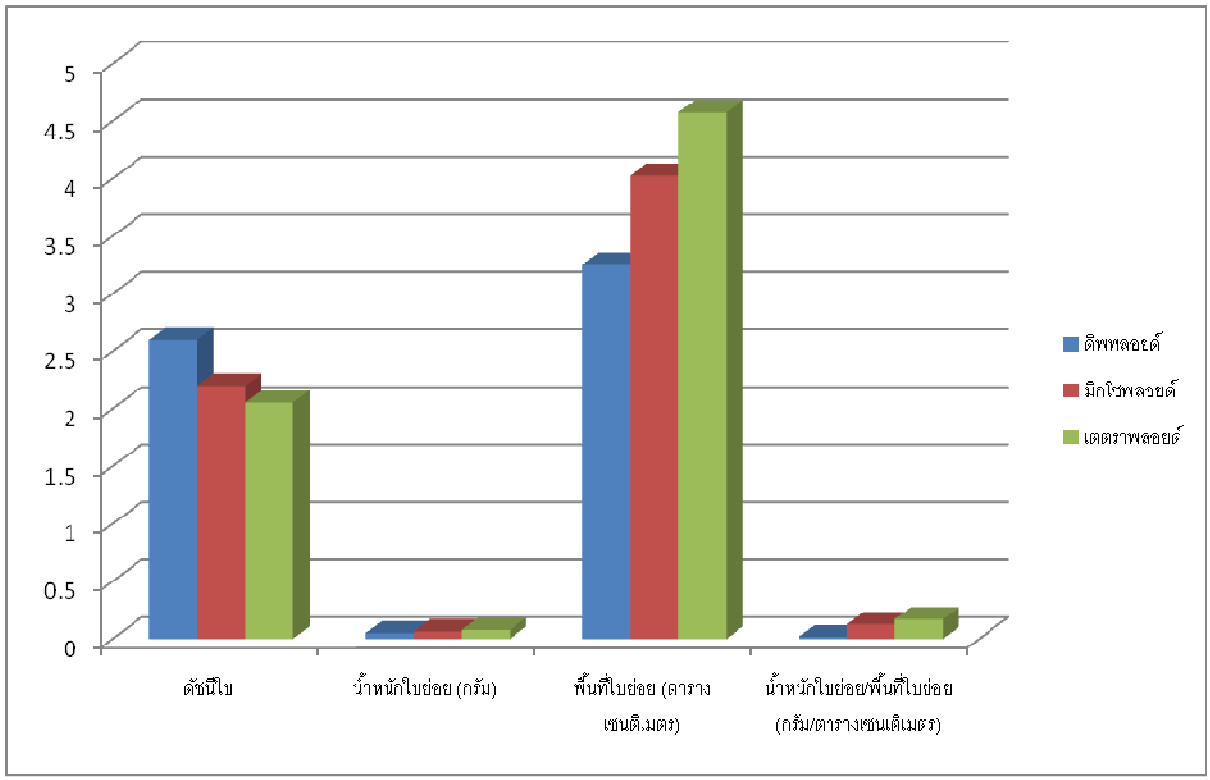
จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะน้ำหนักใบย่อยของต้นครามงอที่เป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ พบว่า น้ำหนักใบย่อยของต้นครามงอทั้ง 3 ชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยต้นเตตราพลอยด์ มีน้ำหนักใบย่อยมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ มิกโซพลอยด์ และดิพพลอยด์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.13)

จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะพื้นที่ใบย่อยของต้นครามงอที่เป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ พบว่า พื้นที่ใบย่อยใบย่อยของต้นครามงอทั้ง 3 ชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยต้นเตตราพลอยด์ มีพื้นที่ใบย่อยมากที่สุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับต้นมิกโซพลอยด์ ส่วนดิพพลอยด์มีพื้นที่ใบย่อยต่ำที่สุด (ตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.13)

จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะน้ำหนักใบย่อย/พื้นที่ใบย่อยของต้นครามงอที่เป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ พบว่า น้ำหนักใบย่อย/พื้นที่ใบย่อยของต้นครามงอทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม พบว่า ต้นเตตราพลอยด์ มีแนวโน้มที่จะมีน้ำหนักใบย่อย/พื้นที่ใบย่อยมากที่สุด บ่งชี้ว่า ใบของเตตราพลอยด์น่าจะมีความหนามากที่สุด (ตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.13)

ตารางที่ 4.8 ลักษณะใบของต้นครามงอที่มีชุดโครโมโซมเป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ (ดัชนีใบ น้ำหนักใบย่อย พื้นที่ใบย่อย น้ำหนักใบย่อย/พื้นที่ใบย่อย)

ระดับโพลีพลอยด์	ดัชนีใบ	น้ำหนักใบย่อย (กรัม)	พื้นที่ใบย่อย (ตารางเซนติเมตร)	น้ำหนักใบย่อย/พื้นที่ใบย่อย (กรัม/ตารางเซนติเมตร)
ดิพพลอยด์	2.595^{a}	0.0495^{b}	3.250^{b}	0.0151
มิกโซพลอยด์	2.199^{b}	0.0635^{ab}	4.025^{a}	0.1275
เตตราพลอยด์	2.054^{b}	0.0782^{a}	4.575^{a}	0.1700
F-test	**	*	**	ns

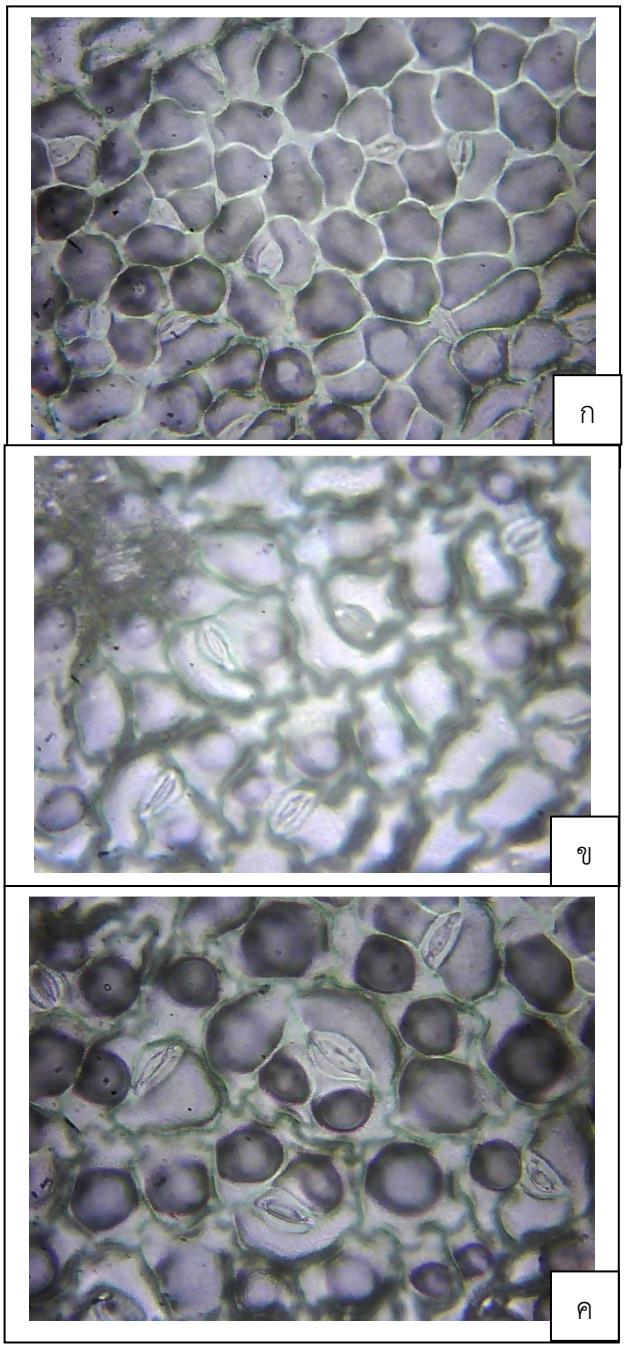


ภาพที่ 4.13 ลักษณะดัชนีใบ น้ำหนักใบย่อย พื้นที่ใบย่อย น้ำหนักใบย่อย/พื้นที่ใบย่อย ของต้นครามงอที่มีชุดโครโมโซมเป็น ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ (ต่อ)

7. ลักษณะปากใบของคราม

จากการพิจารณาปากใบของต้นครามดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์พบว่า ในเบื้องต้นมีขนาดแตกต่างกันพอสมควร โดยขนาดปากใบของต้นดิพพลอยด์มีขนาดเล็ก และความหนาแน่นมากที่สุด รองลงมา เป็น มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ (ภาพที่ 4.14)

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการลอกปากใบด้วยกาวชนิดพิเศษ การลอกปากใบของครามทำได้ยาก เนื่องจากมีขนมาก ใบบาง ปากใบมีขนาดเล็ก เมื่อเทียบกับส้มเขียวหวาน และควรได้ศึกษาเพิ่มเติมต่อไป อย่างไรก็ตามจากการพิจารณาความเป็นโพลีพลอยด์เบื้องต้นจากสัณฐานของต้นกล้าในพืชชนิดนี้สามารถทำได้ง่ายกว่าการจัดจำแนกใช้ปากใบ



ภาพที่ 4.14 ลักษณะปากใบและขนของต้นครามอายุ สัปดาห์ ก. ปากใบและขนของต้นดิพพลอยดด์ ข. ปากใบและขนของต้นมิกโซพลอยดด์ ค. ปากใบและขนของต้นเตตราพลอยดด์

8. การศึกษาสหสัมพันธ์ของลักษณะต่าง ๆ ของต้นคราม

จากการศึกษาค่าสหสัมพันธ์ของลักษณะต่าง ๆ ของครามงอ พบว่า ความสูงมีความสัมพันธ์ทางบวกกับลักษณะจำนวนข้อ/ต้น จำนวนกิ่ง/ต้น จำนวนใบต่อต้น ค่าดัชนีใบ และมีความสัมพันธ์ทางลบกับลักษณะความกว้างใบย่อย น้ำหนักใบย่อย พื้นที่ใบย่อย น้ำหนักใบย่อย/พื้นที่ใบย่อย

ลักษณะเส้นรอบวงต้นมีความสัมพันธ์ทางบวกกับลักษณะจำนวนกิ่ง จำนวนใบ คือ เมื่อ เส้นรอบวงใหญ่ขึ้นจำนวนกิ่ง และจำนวนใบมีจำนวนเพิ่มขึ้นด้วย

ลักษณะจำนวนข้อมีความสัมพันธ์ทางบวกกับลักษณะความสูง จำนวนใบ จำนวนใบย่อยต่อใบ และค่าดัชนีใบ บ่งชี้ว่า ต้นที่มีจำนวนใบมาก จะมีจำนวนใบย่อย/ใบ และค่าดัชนีใบมาก ซึ่ง เป็นลักษณะของดิพพลอยด์ คือ มีจำนวนใบ/ต้นมาก มีจำนวนใบย่อย/ใบมาก และมีลักษณะใบค่อนข้างรี นอกจากนี้ จำนวนข้อยังมีความสัมพันธ์ทางลบ กับลักษณะความกว้างใบ น้ำหนักใบ และพื้นที่ใบ บ่งชี้ ว่า ต้นที่มีจำนวนข้อมาก จะมีลักษณะความกว้างใบน้อย น้ำหนักใบ และพื้นที่ใบน้อย มีจำนวนข้อมากมักมีลักษณะใบเรียวเล็ก

ลักษณะจำนวนกิ่งมีความสัมพันธ์ทางบวกกับลักษณะความสูง เส้นรอบวงต้น จำนวนใบ และดัชนีใบ บ่งชี้ว่า ต้นครามที่มีจำนวนกิ่งมากจะมีความสูง เส้นรอบวงต้น จำนวนใบมาก และใบค่อนข้างรี

ลักษณะจำนวนใบ มีความสัมพันธ์ทางบวกกับ ลักษณะความสูง เส้นรอบวง จำนวนข้อ จำนวนกิ่ง จำนวนใบย่อย/ใบ ค่าดัชนีใบ และมีความสัมพันธ์ทางลบกับลักษณะความกว้างใบ และพื้นที่ใบ

ลักษณะน้ำหนักใบมีความสัมพันธ์ทางบวกกับลักษณะความยาวใบ

ลักษณะจำนวนใบย่อย/ใบ มีความสัมพันธ์ทางบวกกับ ลักษณะความสูง จำนวนข้อ จำนวนใบ และดัชนีใบ มีความสัมพันธ์ทางลบกับลักษณะ ความกว้างใบ และน้ำหนักใบ

ลักษณะความยาวใบมีความสัมพันธ์ทางบวกกับลักษณะน้ำหนักใบ ความกว้างใบ น้ำหนักใบย่อย และพื้นที่ใบ

ลักษณะความกว้างใบ มีความสัมพันธ์ทางบวกกับลักษณะน้ำหนัก และพื้นที่ใบ มีความสัมพันธ์ทางลบกับลักษณะความสูง จำนวนข้อ จำนวนใบย่อย/ใบ และดัชนีใบ

ลักษณะดัชนีใบมีความสัมพันธ์ทางบวกกับลักษณะความสูง จำนวนข้อ จำนวนกิ่ง จำนวนใบ จำนวนใบย่อย/ใบ และมีความสัมพันธ์ทางลบกับลักษณะความกว้างใบย่อย น้ำหนักใบย่อย และพื้นที่ใบ

ลักษณะน้ำหนักใบย่อย มีความสัมพันธ์ทางบวกกับ ความยาวใบย่อย ความกว้างใบย่อย พื้นที่ใบย่อย และ น้ำหนักใบย่อย/พื้นที่ใบย่อย และมีความสัมพันธ์ทางลบกับ ลักษณะความสูง จำนวนข้อ จำนวนใบย่อย/ใบ ดัชนีใบ

ลักษณะพื้นที่ใบย่อยมีความสัมพันธ์ทางบวกกับ ลักษณะความยาว ใบย่อย ความกว้างใบย่อย และน้ำหนักใบย่อย และมีความสัมพันธ์ทางลบกับ ลักษณะความสูง จำนวนข้อ จำนวนใบ และค่าดัชนีใบ

ลักษณะน้ำหนักใบย่อย/พื้นที่ใบย่อยมีความสัมพันธ์ทางบวกกับ ลักษณะน้ำหนักใบย่อย และมีความสัมพันธ์ทางลบกับ ลักษณะความสูง

ตารางที่ 4.9 ค่าสหสัมพันธ์ลักษณะต่าง ๆ ของครามงอ

	plant height	circumference	node no.	branch no.	leaf number	leaf weight	leaflets/leaf	leaflet length	leaflet width	leaflet index	leaflet weight	leaflet area	leaflet weight/ leaf area
plant height	1	0.436	0.861**	0.623*	0.802**	-0.314	0.886**	-0.359	-0.858**	0.881**	-0.815**	-0.765**	-0.611*
circumference	0.436	1	0.384	0.651*	0.696*	0.419	0.527	0.412	-0.177	0.346	0.019	-0.179	0.197
node no.	0.861**	0.384	1	0.556	0.662*	-0.290	0.781**	-0.516	-0.816**	0.724**	-0.825**	-0.769**	-0.564
branch no.	0.623*	0.651*	0.556	1	0.921**	0.065	0.364	-0.057	-0.517	0.603*	-0.362	-0.462	-0.098
leaf number	0.802**	0.696*	0.662*	0.921**	1	-0.148	0.632*	-0.168	-0.657	0.750**	-0.527	-0.603*	-0.261
leaf weight	-0.314	0.419	-0.290	0.065	-0.148	1	-0.218	0.767**	0.414	-0.276	0.559	0.535	0.495
leaflets/leaf	0.886**	0.527	0.781**	0.364	0.632*	-0.218	1	-0.192	-0.685*	0.713**	-0.647*	-0.574	-0.505
leaflet length	-0.359	0.412	-0.516	-0.057	-0.168	0.767**	-0.192	1	0.651*	-0.431	0.766**	0.758**	0.541
leaflet width	-0.858**	-0.177	-0.816**	-0.517	-0.657*	0.414	-0.685*	0.651*	1	-0.953**	0.898**	0.972**	0.507
leaflet index	0.881**	0.346	0.724**	0.603*	0.750**	-0.276	0.713**	-0.431	-0.953**	1	-0.790**	-0.899**	-0.409
leaflet weight	-0.815**	0.019	-0.825**	-0.362	-0.527	0.559	-0.647*	0.766**	0.898**	-0.790**	1	0.900**	0.812**
leaflet area	-0.765**	-0.079	-0.769**	-0.462	-0.603*	0.535	-0.574	0.758**	0.972**	-0.899**	0.900**	1	0.488
leaflet weight / leaf area	-0.611*	0.197	-0.564	-0.098	-0.261	0.495	-0.505	0.541	0.507	-0.409	0.812**	0.488	1

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

ต้นครามงอ เป็นพืชท้องถิ่นที่ให้สีคราม ต้นคราม (Indigo) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Indigofera suffruticosa* เป็นพืชในวงศ์ Leguminosae ที่พบในประเทศไทยมี 13 ชนิด มักพบมีการเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อน ต้นครามชอบแสงแดดจ้า สามารถทนอากาศร้อน ดินเค็ม และฝนหนักได้ ในประเทศไทยมักพบเป็นวัชพืชตามสวน และไหล่ทาง ซึ่งเป็นดอน โล่ง กลางแจ้ง การใช้ประโยชน์ต้นและใบของครามนำมาหมัก และตกตะกอนด้วยด่าง จะให้เนื้อครามสีน้ำเงินเข้ม ใช้ย้อมสีของผ้าฝ้าย ในจังหวัดสกลนครมีการผลิตผ้าย้อมครามจากต้นครามจำหน่าย และเป็นสินค้าที่ทำรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้ผลิตผ้าคราม และเป็นสินค้าที่สร้างชื่อเสียงให้จังหวัด ซึ่งจังหวัดสกลนครได้มีการพัฒนาด้านครามมากที่สุดอีกจังหวัดหนึ่งของประเทศไทย การผลิตผ้าย้อมครามเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่ดีงาม เป็นเอกลักษณ์ของชาวสกลนคร สมควรได้มีการฟื้นฟู และสืบทอดต่อไป ในอนาคตควรได้มีการพัฒนาพันธุ์ครามที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น เพื่อส่งเสริมให้การผลิตผ้าพื้นเมืองที่เกิดจากการย้อมครามเป็นอุตสาหกรรมที่สร้างชุมชนเข้มแข็งในจังหวัดสกลนครและระดับประเทศต่อไป ปัจจุบันครามที่ใช้ย้อมผ้ามาจากต้นคราม 2 ชนิด คือ ครามฝักตรง และครามฝักงอ เนื่องจากครามเป็นพืชในวงศ์ Leguminosae ซึ่งเป็นพืชผสมตัวเอง มีดอกขนาดเล็กมากเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กับพืชชนิดนี้ การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการมาตรฐานทั่วไปเป็นสิ่งที่ทำได้ยาก ในอนาคตเมื่อสภาพแวดล้อม และอุณหภูมิของโลกเปลี่ยนแปลง โรค และแมลงชนิดใหม่เกิดขึ้น อาจสร้างปัญหาให้แก่พืชชนิดนี้อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ แนวทางหนึ่งที่จะสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรม เพื่อพัฒนาพืชชนิดนี้ คือ การสร้างพืชโพลีพลอยด์ขึ้นในต้นคราม

จากการศึกษาในพืชหลายชนิดพบว่า การสร้างพืชที่เป็นโพลีพลอยด์มีข้อได้เปรียบหลายประการ ในพืชที่เป็นโพลีพลอยด์มีลักษณะต้นใหญ่ขึ้น มีชีวมวลมากขึ้น เช่น เตตราพลอยด์ และทริพพลอยด์ ของลูกผสม Novel Shrub Willow (*Salix*) (Serapiglia *et al.,* 2015) ใน Centella asiatica (L.) Urban (Thong-on *et al*., 2014) ในทริพพลอยด์ ลูกผสม shrub willow Serapiglia *et al*., 2014) อย่างไรก็ตาม พบว่า เตตราพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่าดิพพลอยด์ของมันเองบางจีโนไทป์ และเป็นต้นเตตราพลอยด์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เช่น ใน *Echinacea purpurea* L. clone code 04 ที่เป็นเตตราพลอยด์มีผลผลิตชีวมวลของส่วนใต้ดิน และส่วนที่อยู่เหนือดินสูงกว่าดิพพลอยด์ และเตตราพลอยด์ใน clone code อื่น ๆ (Chen *et al*., 2016) ใน P28 เตตราพลอยด์ *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen มีชีวมวลเพิ่มขึ้นมากกว่าดิพพลอยด์ทั้งในสภาพปลอดเชื้อ และสภาพนอกหลอดทดลอง ในพืชที่เป็นโพลีพลอยด์หลายชนิด พบว่า มีความต้านทานความเครียดจากสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic stress) เช่น สภาพความหนาวเย็น ความร้อน ความแห้งแล้ง ความเค็ม ความเป็นพิษของธาตุอาหารพืชบางชนิด เช่น Tan *et al*. (2015) ได้ชักนำให้เกิดเตตราพลอย์ในต้นส้ม (*Citrus junos* cv. Ziyang xiangcheng) เพื่อพัฒนาเป็นต้นตอส้ม (citrus rootstock) ที่มีความต้านทานต่อสภาพเครียด (stress resistance improvement) จากการศึกษาพบว่าต้นส้มเตตราพลอยด์ดังกล่าวมีการสะสมสารปฐมภูมิหลายชนิด เช่น น้ำตาลหลายชนิด

(sugars) กรดอินทรีย์หลายชนิด (organic acids) กรดอะมิโนหลายชนิด (amino acids) กรดไขมันหลายชนิด (fatty acids) และสารในกลุ่มแอลกอฮอล์หลายชนิด (alcohols) ที่มีอิทธิพลต่อการต้านทานต่อสภาพเครียดของต้นส้มชนิดนี้ Zhang *et al*. (2015) พบว่า แอปเปิ้ลที่เป็นเตตราพลอยด์ มีความทนทานต่อความแห้งแล้งมากกว่าดิพพลอย์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Laere *et al*. (2011) ที่พบว่า Spathiphyllum wallisii ที่เป็นเตตราพลอยด์ทุกจีโนไทป์ที่ศึกษาทนทานต่อความแห้งแล้งมากกว่าต้นดิพพลอยด์ของมัน เป็นต้น นอกจากนี้พืชโพลีพลอยด์ยังมีความต้านทานต่อความเครียดที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต (biotic stress) เช่น โรค (Predieri, 2001) และแมลง จากการศึกษาในไม้ยืนต้นพบว่า ต้นที่เป็นทริพพลอยด์มีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าต้นที่เป็นดิพพลอยด์ปกติ เช่นใน *Populus tomentosa* (Zhang *et al*., 2012) ในไม้ผลหลายชนิดที่เป็นโพลีพลอยด์มีขนาดผลใหญ่ขึ้น เช่น สตรอเบอรี่ หม่อน องุ่น ไม้ผลที่มีชุดโครโมโซมเป็นทริพพลอยด์มีลักษณะไร้เมล็ด (seedless) เช่น ในส้ม แตงโม องุ่น ข้าวสาลีที่เป็นเฮกซาพลอยด์มีลักษณะเมล็ดใหญ่ขึ้น มีคุณภาพในการทำขนมปังได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า ในพืชบางชนิด ที่เป็นเตตราพลอยด์ยังมีการสะสมสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น เช่น *Tanacetum parthenium* Schulz-Bip. (Majadi *et al*., 2010) และ *Centella asiatica* (L.) Urban (Thong-on *et al.,* 2014) เป็นต้น

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีวิธีการสร้างโพลีพลอยด์ได้ 2 วิธีการหลัก ๆ ได้แก่ การสร้างโพลีพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ และการสร้างโพลีพลอยด์ในห้องปฏิบัติการหรือในสภาพเรือนทดลอง จากการศึกษาในหลาย ๆ รายงาน พบว่า การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ (Sattler *et al*., 2016) เนื่องจากสามารถใช้กับเนื้อเยื่อเจริญที่มีขนาดเล็กได้หลายชนิด เช่น ตา เอมบริโอ โปรโตคอร์ม ยอด และสามารถทำได้ในปริมาณที่มากกว่าสภาพห้องปฏิบัติการหรือในสภาพเรือนทดลองเนื่องจากเนื้อเยื่อที่นำมาชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์มีขนาดเล็กจึงใช้สารเคมีในปริมาณที่น้อยกว่า ทำให้ประหยัดสารโคลชิซิน อย่างไรก็ตามการชักนำให้เกิดการเพิ่มโครโมโซมในสภาพปลอดเชื้อ ต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ดังนั้น ผู้ที่จะทำการชักนำให้เกิดการเพิ่มโครโมโซมในพืชด้วยเทคนิคนี้ต้องมีความรู้ และทักษะในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช นอกจากนี้ผู้วิจัยต้องสามารถชักนำให้พืชที่ได้รับโคลชิซินเกิดเป็นพืชต้นใหม่ หรือ สามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชในสภาพปลอดเชื้อได้จึงจะถือว่าประสบความสำเร็จ เมื่อได้ต้นพืชในสภาพปลอดเชื้อแล้ว พืชต้นใหม่ต้องสามารถย้ายออกมาปลูกในสภาพภายนอกได้อย่างปลอดภัยสามารถเจริญเติบโตเป็นพืชต้นใหม่ได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในสภาพห้องปฏิบัติการ และในเรือนทดลอง พืชไม่จำเป็นต้องอยู่ในสภาพปลอดเชื้อเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้นขั้นตอนในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์จึงไม่มีความยุ่งยาก สามารถทำได้ง่ายกว่า แต่ต้องใช้โคลชิซินในปริมาณที่มากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่า การชักนำในสภาพเรือนทดลองมีโอกาสที่พืชจะเกิดเป็นไคเมอราสูงกว่าในสภาพปลอดเชื้อ อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้เป็นการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในเมล็ดคราม งอกอายุประมาณ 2 วัน ดังนั้นการทรีตโคลชิซินด้วยวิธีการดังกล่าวจึงใช้พื้นที่ และสารโคลชิซินในปริมาณน้อย หลังจากการทรีตด้วยโคลชิซินต้องย้ายลงปลูกด้วยความนุ่มนวลในวัสดุปลูกที่เหมาะสมจะทำให้อัตราการรอดของต้นกล้ามีมาก

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ความเข้มข้น และระยะเวลาในการทรีตโคลชิซินให้กับเมล็ดคราม งอกมีผลต่อความงอก ความสูง และจำนวนใบประกอบของต้นกล้า โดยทรีตเมนต์ที่ได้รับโคล

ชิซินที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นความงอก ความสูง และจำนวนใบลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาในหลายรายงาน พบว่า การได้รับโคลชิซินทำให้ความงอกลดลง เช่นการศึกษาของ Surson *et al.* (2015) พบว่า ระดับความเข้มข้นของโคลชิซินที่เพิ่มขึ้นทำให้ความงอกของส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulate* Blanco) ลดลง ความสูง และจำนวนใบของต้นกล้าอายุ 1 เดือนลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาในรายงานอื่น ๆ เช่น ในเมล็ดฝ้าย (Wongpiyasatid *et al*., 2003) ในต้นกล้า *Hyoscyamus reticulate* L. อายุ 2 สัปดาห์ (Madani *et al*., 2015) ใน เมล็ดของ Salvia hains (Grouh *et al.,* 2011) ในเมล็ด *Capsicum frutescens* L. (Pleankong *et al*., 2010) เป็นต้น

หลังจากการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมขึ้นในพืชชนิดต่าง ๆ ต้นพืชจะได้รับการตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซมด้วยตัวบ่งชี้โดยตรง และโดยอ้อม (Zhang *et al*., 2016) สำหรับตัวบ่งชี้โพลีพลอยด์โดยอ้อม เช่น ลักษณะของใบ (สีใบ ความกว้างใบ ความยาวใบ ความหนาใบ และ leaf index) ลักษณะปากใบ (ความกว้าง ความยาวของปากใบ และความหนาแน่นของปากใบ) ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ ปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถใช้ในการจำแนกต้นโพลีพลอยด์ออกจากดิพพลอยด์ได้ง่าย เร็ว แต่ไม่แม่นยำนัก ส่วนการใช้ตัวบ่งชี้โดยตรง เช่น การนับจำนวนโครโมโซม และตรวจสอบด้วยเทคนิคโฟลไซโตมิตริ ซึ่งวิธีที่ได้รับการยอมรับว่าแม่นยำมากที่สุด อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้ การนับจำนวนโครโมโซมมีข้อจำกัดคือใช้เวลามากทำได้ยาก ส่วนตรวจสอบด้วยเทคนิคโฟลไซโตมิตริแม้ใช้เวลาสั้นและแม่นยำที่สุดแต่ข้อจำกัดคือมีค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบต่อหนึ่งหน่วยตัวอย่างมาก หากมีวิธีการคัดกรองต้นที่เป็นโพลีพลอยด์ในเบื้องต้นก่อนการตรวจสอบด้วยการใช้เทคนิคโฟลไซโตมิตริจะช่วยลดภาระในการตรวจสอบต้นโพลีพลอยด์ได้มากขึ้น

ในการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมในคราม้งอด้วยการชักนำด้วยสารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แล้ว ต้นกล้าจะได้รับการคัดกรองในเบื้องต้นเป็นต้นกล้าปกติ และต้นกล้าผิดปกติ เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ พบว่า เป็นทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีการเกิดเป็นต้นกล้าผิดปกติสูงถึง 65.69 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการเกิดเตตราพลอยด์ทั้งหมด 48.46 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นจำนวนเตตราพลอยด์ที่สูงที่สุด ส่วนทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซิน 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แม้จะมีการเกิดต้นกล้าผิดปกติถึง 67.27 เปอร์เซ็นต์ แต่จากการตรวจสอบพบว่าให้เตตราพลอยด์ทั้งหมดเพียง 26.26 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น จะเห็นว่าเมล็ดครามงองอกที่ได้รับโคลชิซินในอัตราความเข้มข้นสูง นอกจากจะมีความงอกน้อยลงแล้วต้นที่สามารถงอกได้ยังเป็นต้นดิพพลอยด์ซึ่งมีโครโมโซมไม่เปลี่ยนแปลง บ่งชี้ว่าการได้รับโคลชิซินในความเข้มข้นที่สูงเกินไปจะทำให้เมล็ดไม่งอกส่วนต้นที่งอกจะเป็นต้นที่มีจำนวนโครโมโซมไม่เปลี่ยนแปลงเป็นส่วนใหญ่

หลังจากการคัดแยกต้นกล้าครามงอเป็นต้นกล้าปกติ และผิดปกติแล้วจึงทำการตรวจสอบต้นกล้าผิดปกติด้วยเทคนิคโฟลไซโตมิตริ เมื่อทำการตรวจสอบต้นกล้าผิดปกติด้วยเทคนิคโฟลไซโตมิตริ พบว่า ต้นกล้าผิดปกติส่วนใหญ่เป็นโพลีพลอยด์ที่ประกอบด้วย มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ ดังนั้น การคัดกรองก่อนจากลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ปรากฏของต้นกล้าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง (จากการศึกษาในครั้งนี้เป็นต้นกล้าผิดปกติ มีลักษณะต้นกล้างอกช้า ต้นเตี้ย ส่วนใหญ่มีเฉพาะใบเลี้ยงและใบจริงคู่แรก ส่วนของไฮโปคอทิล บวม อ้วนสั้น ส่วนของเอพิคอทิลไม่ยืดยาว ส่วนที่เป็น

เอพิคอทิลยืดได้ช้าใช้เวลานาน ใบจริงคู่แรกมีลักษณะบิดไม่แผ่กางขยายเหมือนพวกต้นปกติ ส่วนของใบเขียวเข้ม ใบจริงคู่แรกยังมีขนาดเล็ก และยังไม่ค่อยแผ่กาง) การคัดเฉพาะต้นกล้าผิดปกติออกมาตรวจสอบจะช่วยให้การคัดเลือกเตตราพลอยด์ได้เร็ว และมีประสิทธิ และประหยัดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบความเป็นโพลีพลอยด์ได้มากขึ้น และถ้าหากเปรียบเทียบการคัดกรองจากการตรวจสอบจากความผิดปกติของต้นกล้าครามงอ กับการคัดกรองด้วยการพิจารณาจากลักษณะของปากใบ (ความกว้าง ความยาว และความหนาแน่นของปากใบ) พบว่า วิธีการพิจารณาจากลักษณะผิดปกติของต้นกล้าทำได้ง่าย และเร็วกว่า อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบด้วยความผิดปกติของต้นกล้าต้องทำในขณะที่ต้นกล้าเพิ่งงอกมีใบจริงเพียง 1 คู่ อายุต้นกล้าไม่ควรเกิน 7-10 วัน เพราะการคัดกรองในระยะดังกล่าวจะช่วยให้มีประสิทธิภาพการคัดเลือกได้ดีมีความแตกต่างระหว่างต้นกล้าปกติและผิดปกติชัดเจน อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวไม่สามารถจำแนกต้นที่เป็นมิกโซพลอยด์ออกจากเตตราพลอยด์ได้ ดังนั้น หลังจากการคัดกรองจากลักษณะต้นกล้าผิดปกติแล้วควรตรวจสอบต้นกล้าผิดปกติด้วยเทคนิคโฟลไซโตมิตริด้วยจึงสามารถแยกมิกโซพลอยด์ออกจากเตตราพลอยด์ได้ การคัดกรองต้นกล้าครามจากลักษณะความผิดปกติของต้นกล้าก่อนจะช่วยลดค่าใช้จ่าย และแยกได้ต้นเตตราพลอยด์ได้ง่ายอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นครามงอดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์อายุ 3 เดือน พบว่า ต้นครามงอทั้ง 3 ชนิด ลักษณะต้น ได้แก่ ความสูงต้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่า ต้นโพลีพลอยด์มีสีใบเข้มขึ้น เส้นรอบวงต้น จำนวนข้อ และจำนวนกิ่ง ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในลักษณะใบ พบว่า จำนวนใบประกอบของครามงอทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ส่วนลักษณะน้ำหนักใบประกอบ จำนวนใบย่อย/1 ใบประกอบ ความยาวใบ และกว้างใบไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดัชนีใบแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง น้ำหนักใบย่อยมีความแตกต่างทางสถิติ พื้นที่ใบมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และลักษณะน้ำหนักย่อยน้ำหนักใบย่อย/พื้นที่ใบย่อยไม่แตกต่างทางสถิติ ลักษณะใบของครามงอที่มีสีเข้ม ขนาดใบใหญ่ขึ้น (น้ำหนัก ความกว้างความยาวใบ ความหนาเพิ่มขึ้น) เช่นเดียวกับใน *Morus alba* L. (Chakraborti *et al.,* 1998) ส่วนลักษณะรูปร่างใบ พบว่า ครามงอโพลีพลอยด์ มีลักษณะใบกางค่อนข้างกลมกว่าใบครามงอที่เป็นดิพพลอย์ (พิจารณาจากลักษณะด้วยตา และค่าดัชนีใบ) สอดคล้องกับการศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น ใน *Eriobotrya japonica* (Thumb.) Lindl. (Blasco *et al*., 2015) แม้ว่าในลักษณะบางลักษณะของครามงอที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เช่น ความยาวใบ ความกว้างใบ น้ำหนักย่อยน้ำหนักใบย่อย/พื้นที่ใบย่อย มีแนวโน้มว่า เตตราพลอยด์จะมีลักษณะเหล่านี้สูงกว่าดิพพลอยด์ จำเป็นต้องมีการตรวจสอบในชั่วรุ่นถัดไป เนื่องจากต้นครามงอในชั่วแรกที่ได้รับโคลชิซินมีผลกระทบทางสรีรวิทยาที่ทำให้งอกและมีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นดิพพลอยด์ปกติที่ไม่ได้รับโคลชิซิน ทั้งนี้ในชั่วถัดไปน่าจะได้ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบการให้ผลผลิต อาทิ น้ำหนักต่อต้น น้ำหนักใบ/ต้น น้ำหนักผลผลิต/ไร่ เป็นต้น

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการเกิดโพลีพลอยด์ในเมล็ดครามงองอกโดยการชักนำด้วยสารละลายโคลชิซินในความเข้มข้นต่าง ๆ (0.0, 0.1, 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลาต่าง ๆ (0, 6 และ 12 ชั่วโมง) พบว่า ความเข้มข้นของโคลชิซินต่าง ๆ ทำให้ ความงอก ความสูง และจำนวนใบของต้นกล้าครามงอ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ส่วนเวลาที่แตกต่างกันไม่ทำให้ความงอก ความสูง และจำนวนใบของต้นกล้าครามงอ แตกต่างทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่า มีปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโคลชิซิน และเวลาที่ไดรับโคลชิซินอีกด้วย

จากการศึกษาการเกิดโพลีพลอยด์หลังจากที่ได้รับโคลชิซินของเมล็ดครามงอ พบว่าสามารถพบโพลีพลอยด์ (มิกโซพลอยด์และเตตราพลอยด์) ในทุกทรีตเมนต์ที่ได้รับโคลชิซินทุกระดับความเข้มข้น (0.1 0.2 และ0.4 เปอร์เซ็นต์) และทุกระดับเวลา (6 และ 12 ชั่วโมง) จากการคัดแยกโดยพิจารณาจากลักษณะต้นกล้าด้วยสายตา สามารถจำแนกต้นกล้าได้ 2 ลักษณะ คือต้นกล้าปกติ (ส่วนของไฮโปคอทิล และเอพิคอทิล ปกติ ทั้ง 2 ส่วนมีการยืดขยายยาว ลักษณะต้นสูงยาวผอม มีใบเลี้ยง 1 คู่ ใบจริง 1-2 คู่ คือใบจริงคู่ที่ 1 ที่เป็นใบเดี่ยว และใบจริงคู่ที่ 2 ที่เป็นใบประกอบ สีใบเขียว) และต้นกล้าผิดปกติ (ต้นกล้างอกช้า ต้นเตี้ย ส่วนใหญ่มีเฉพาะใบเลี้ยง และใบจริงคู่แรก ส่วนของไฮโปคอทิล บวม อ้วนสั้น ส่วนของเอพิคอทิลไม่ยืดยาว ส่วนที่เป็นเอพิคอทิลยืดได้ช้าใช้เวลานาน ใบจริงคู่แรกมีลักษณะบิดไม่แผ่กางขยายเหมือนพวกต้นปกติ ส่วนของใบเขียวเข้ม ใบจริงคู่แรกยังมีขนาดเล็ก และยังไม่ค่อยแผ่กาง) เมื่อตรวจสอบต้นกล้าผิดปกติ พบว่า ส่วนใหญ่เป็นโพลีพลอยด์ (T3 (0.1, 6) = 100 เปอร์เซ็นต์, T4 (0.1, 12) = 90.61 เปอร์เซ็นต์, T5 (0.2, 6) = 100 เปอร์เซ็นต์, T6 (0.2, 12) = 83.33 เปอร์เซ็นต์, T7 (0.4, 6) =93.33 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตาม พบว่า ทรีตเมนต์ที่ 5 มี จำนวนต้นเตตราพลอยด์สูงสุด (T6 (0.2, 12) = 50 เปอร์เซ็นต์)

เมื่อตรวจสอบความแตกต่างระหว่าง ดิพพลอยด์ มิกโซพลอยด์ และเตตราพลอยด์ พบว่า มีความแตกต่างกันในหลาย ๆ ลักษณะ ได้แก่ ความสูง จำนวนกิ่ง จำนวนใบประกอบ ดัชนีใบ จำนวนใบย่อย/ใบ และพื้นที่ใบ โดยลักษณะใบของดิพพลอยด์ และเตตราพลอยด์มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่า ลักษณะของครามมีหลายลักษณะที่มีความสัมพันธ์กันทางบวก และหลายลักษณะที่มีความสัมพันธ์กันทางลบ

บรรณานุกรม

กาญจนา กล้าแข็ง ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ สาธิต ทยาพัชร เผดิม ระติสุนทร พรรณี รอดแรง บุญ งามชื่น คงเสรี เครือวัลย์ อัตตะวิริยะสุข กัปนาท มุขดี. 2537. การผลิตข้าว polyploidy และ ลักษณะบางประการ. ว. วิทย.กษ. 27: 159-165.

ดำรง สินไชย. 2525. การชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในแตงโมพันธุ์ชูการ์เบบี้. วารสารสำนักงานกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 14: 1-35.

ทนง พรประดับเกียรติ. 2528. ผลของโคลชิซินที่มีต่อเซลล์แขวนลอยของอ้อยในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิรนาม. 2554. การเตรียมสีจากใบแห้ง. ออนไลน์จาก http://pineappli-eyes.snru.ac.th/cram/index.php?q=node/106 ค้นคว้าเมื่อวันที่ 10 มิถุนายน 2556.

นิรนาม. 2554. การเตรียมสีจากใบสด. ออนไลน์จาก http://pineappli-eyes.snru.ac.th/cram/index.php?q=node/105 ค้นคว้าเมื่อวันที่ 10 มิถุนายน 2556.

นิรนาม. 2555. Bicoloured flowers. ออนไลน์จาก http://apps.rhs.org.uk/advicesearch/Profile.aspx?pid =654 ค้นคว้าเมื่อวันที่ 1 มีนาคม 2555.

นิรนาม. 2555. Mutants. ออนไลน์จาก http://www.flickr.con/photos/darrenabbey/galleries/72157622558360598 ค้นคว้าเมื่อวันที่ 1 มีนาคม 2555.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, เผดิม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธธิดา, กาญจนา กล้าแข็ง, นิตย์ศรี แสงเดือน, ชัยฤกษ์ มณีพงษ์ และสงกรานต์ จิตรากร. 2537. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนร่วมกับการชักนำด้วยโคลชิซิน. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.). 28: 193-199.

ประสาทพร สมิตมาน. 2529. โปรโตพลาสต์เทคนิคการเลี้ยงและการประยุกต์ใช้. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

วิมล ขวัญเกื้อ และอนันต์ ภู่พิทยาสถาพร. 2526. การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในพริกโดยการใช้สารโคลชิซิน. วิทยาศาสตร์. 37: 488-492.

วิมล ขวัญเกื้อ. 2527. การใช้โคลชิซินกับพืช. วิทยาศาสตร์. 208-215.

ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธ์. 2547. การปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 253 หน้า.

สำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (สำนักงาน กปร.) 2012. 2555. คู่มือการผลิตผ้าย้อมคราม. ศูนย์การศึกษาพัฒนาภูพานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จ.สกลนคร. 21 หน้า.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. ภาควิชาใช้ประยุกต์และโอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 205 หน้า.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2546. นิวเคลียร์เทคโนโลยีกับการปรับปรุงพันธุ์พืช เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ นิวเคลียร์เทคโนโลยีกับชีวิตและสิ่งแวดล้อมรุ่นที่ 2 ระหว่างวันที่ 3-4 กรกฎาคม 2546 ศูนย์บริหารฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 69-86.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2546. วิธีการ และขั้นตอนในการปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับโดยใช้รังสีแกมมา. เอกสารประกอบการฝึกอบรม โครงการวิจัยเชิงถ่ายทอดเทคโนโลยี การพัฒนาพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับด้วยรังสีแกมมาสู่เกษตรกร ระหว่างวันที่ 26-29 มิถุนายน 2546 ภาควิชารังสีประยุกต์และโอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ ร่วมกับ ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และกรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 10 -24.

สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2552. การปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 259 หน้า.

สุภาพันธ์ ชวนะสุพิชญ์. 2538. การพัฒนาดองดึงเป็นพืชเศรษฐกิจ. สัมมนาพืชสวนครั้งที่ 6 ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สุรพล แสนสุข. 2543. การศึกษาสัณฐานวิทยาโครโมโซมและละอองเรณูของพรรณไม้วงศ์ขิง ในอุทยานแห่งชาติภูพาน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อมรา คัมภิรานนท์. 2540 พันธุศาสตร์ของเซลล์. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 253 หน้า.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิต. 2539. เอกสารคำสอนเรื่องการใช้รังสีในการปรับปรุงพันธุ์พืช ภาควิชารังสีประยุกต์และโอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 96 หน้า.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิต. 2546. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับรังสี และการใช้รังสีในการปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับ เอกสารประกอบการฝึกอบรม โครงการวิจัยเชิงถ่ายทอดเทคโนโลยี การพัฒนาพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับด้วยรังสีแกมมาสู่เกษตรกร ระหว่างวันที่ 26-29 มิถุนายน 2546 ภาควิชารังสีประยุกต์และโอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ ร่วมกับ ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์ เทคโนโลยี สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และกรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-9.

อัญชลี ศรีสุวรรณ. 2546. จำนวนโครโมโซมของฝรั่งกลุ่มรับประทานสด กลุ่มแปรรูป และลูกผสม วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อัญชลี เติมวิชชากร. 2521. การขยายพันธุ์มันฝรั่งด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อำไพ สินพัฒนานนท์. 2537. การจำแนก การศึกษาโครโมโซมและการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยเทคนิคการเพาเลี้ยงเนื้อเยื่อของหม่อนบางพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาพันธุศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abdoli, M., Moieni A. and Naghdi Badi H. 2011. Morphological, physiological, cytological and phytochemicalstudies in diploid and colchicines-induced tetraploid plantsof *Echinacea purpurea* (L.). Plant Cell Tiss Organ Cult 107: 451-459.

Abdoli, M., Moieni, A. and Badi, H.N. 2013. Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicines-induced tetraploid plants of *Echinacea purpurea* (L.). Axta Physiol Plant. 35:2075-2083.

Adaniya, S. and Ardian S. 1994. A New Method for Selecting Cytochimeras by the Maimum number of Nucleoli per Cell in Allium wakegi Araki and A. fistulosum L. Euphytica. 79: 5-12.

Ahmadi, H. and Royce S. B. 1992. Breeding Strawberries at the Decaploid Level. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117: 856-862.

Anis, M. and Ansari M.K. 1992. Induction of Autotetraploid in *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. New Botanist. 19: 77-80.

Arunyanart, S. and Soontroyatara, S. 2002. Mutation induction by γ and χ-Ray Irradiation in Tissue Culture Lotus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 70: 119-122.

Barrett, H.C. 1974. Colchicine – Induce Polyploid in Citrus. Bot. Gaz. 135: 29-41.

Bewal, S. Purohit J., Kumar A., Khedasana R. and Rao R. S. 2009. Cytogenetical Investigations in Colchicine-induced Tetraploids of *Cyamopsis tetragonoloba* L. Czech J. Genet. Plant Breed., 45: 143-154.

Bingham, E.T. 1968. Stomatal Chloroplast in Alfalfa at Four Ploidy Levels. Crop Science. 8: 509-510.

Blanke, M.M., Hofer M. and Pring R.J. 1994. Stomata and Structure of Tetraploid Apple Leaves Cultured in Vitro. Annal of Botany. 73: 651-654.

Blasco, M.Badenes, M.L. and Naval, M.M. 2015. Colchicine-induced polyploidy in loqouat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). Plant Cell Tiss Organ Cult. 120:453-461

Borrino, E.M. and Powell W. 1988. Stomatal Guard Cell Length as An Indicator of Polyploid in Microspore-Derived Plants of Barley. Genome. 30: 158-160.

Burns, G.W. 1983. The Science of Genetics an Introduction to Heredity. 5th ed. Macmillan Publishing, New York.

Cagampang, G.B. and Rodriguez F.M. 1980. Method of Analysis for Screening Crop of Appropriate Qualities. Analytical Services Laboratory Insitute of Plant Breeding University of the Philippines at Los Banos, Philippines.

Cameron, I. W. and Soost R.K. 1980. Mono and Polyembrony among Tetraploid Citrus Hybrid. HortScience. 15: 730-731.

Chaisan, T., Somta, P., Srinive, P., Chanprame, S., Kaveeta, R. and Dumrongkittikule, S. 2013. Development of Tetraploid Plants from an Interspecific Hybrid between Mungbean (*Vigna radiata*) and Rice Bean (*Vigna umbellata*). J. Crop Sci. Biotech. 16 : 45-51.

Chakraborti, S. P., Vijayan K. Roy B. N. and Qadri S. M. H. 1998. In vitro induction of tetraploidy in mulberry (Morus alba L.). Plant Cell Reports. 17: 799-803.

Chauvin, J. E, Souchet C, Dantec J. P. and Ellisseche. 2003. Chromosome doubling of 2x *Solanum* species by oryzalin: method development and comparison with spontaneous chromosome doubling *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 73: 65-73.

Chavez, D. J. and Lyrene P. M. 2009. Production and Identification of Colchicine-derived Tetraploid Vaccinium darrowiii and Its Use in Breeding. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 134 : 356-363.

Chen, R., Jiang, W., Li, Q., Li, X., Chen, X., Yang, Y. and Wu, H. 2016. Comparison of seven colchicines-induced tetraploid clones with their original diploid clones in purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). Euphytica. 207:387-399.

Chinachit, W. and Sreemaung, S. 2008. Colchicine affecting the alteration of ploidy level in plantlets of *Eulophia andamanensis* Reichb. F. Agricultural Sci. J. 39: 275-277.

Compton, M. E, Gray D. J. and Elmstrom G. W. 1996. Identification of tetraploid regenerants from cotyledons of diploid watermelon cultured *in vitro*. Euphytica. 87: 165-172

Corrêa, P.J.P.O., Vital, C.E., Pinheiro, M.V.M., Saldanha, C.W., Ferreira da Cruz, C., Notini, M.M., Freitas, D.M.S., DaMatta, F.M. and Otoni, W.C. 2016. Induced polyploidization increases 20-hydroxyecdysone content, in vitro photoautotrophic growth, and ex vitro biomass accumulation in *Pfaffia glomerata* (Spreng.). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 52:45–55.

Daughtry, C. S. T., 1990. Direct measurements of canopy structure. Remote Sens. Rev. 5, 45-60.

Dhamayanthi, K. P. M. and Gotmare V. 2010. Induction of polyploidy in two diploid wild cotton (*G. armourianum and G. aridum*) species by colchicine treatment. Electronic Journal of Plant Breeding. 1: 966-972.

Duren, V. M., Morpurgo R. and Afza, R. 1996. Induction and verification of autotetraploids in banana (*Musa acuminate*). Euphytica. 88: 25-34.

Dutt, M., Vasconcellos M., Song K. J., Gmitter F. G. Jr. and Grosser J. W. 2010. In vitro production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulate* Blanco) using cell suspension cultures. Euphytica. 173: 235-242.

Dweikat, I. M. and Lyrene P. M. 1991. Induced Tetraploidy in *Vaccinium elliottii* Clone Facilitates Crossing with Cultivated Highbrush. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116: 1063-1066.

Eleftheriou, E. P. 1993. Prospective Companion cells differentiate into abnormal sieve element in colchicines treat root of *Triticum aestivum*. Protoplasma. 176: 151-164.

Eleftheriou, E. P. 1994. Abnormal Structure of Protophloem Seive – Elelement Cell Wall in Colchicine – Treated Roots of *Triticum aestivum* L. Planta. 193: 266-274.

Fassuliotis, G. and Nelson B. V. 1992. Regeneration of tetraploid muskmelons from cotyledons and their morphological differences from two diploid muskmelon genotypes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117 : 863-866.

Feungchun, S. 1975. Growth Potential of anueploid guava (*Psidium guajava* L.) in relation to rootstock selection. PhD Thesis submitted to IARI, New Delhi.

Galatis, B. 1991. Aberrant sieve element differentiation in primary leave of *Vigna sinensis* Endl. Affected by colchicines. New Phytologist. 117: 619-631.

Gaweda, M. and Luczak I. 1993. The role of chemical factors in sugar beet resistance to invasion by black bean pnphid *Aphis fabae*. Bulletin – OILB – SROP. 16: 185-191.

Gmitter, F. G., Jr., and Ling X. B. 1991. Embryogenesis in vitro and non chimeric tetraploid plant recovery from undeveloped citrus ovules treated with colchicines. J. Amer. Soc. Hort. 116: 317-321.

Gmitter, F. G., Jr., Ling X. B. and Deng X. X. 1990. Induction of triploid citrus plants from endosperm calli in vitro. Theor. Appl. Genet. 80: 785-790.

Gmitter, F. G. Jr., Ling X. B., Cai C. and Grosser J. W. 1991. Colchicine – induced polyploid in citrus embryogenesis culture, somatic embryo, and regenerate plantlet. HortScience.74: 135-141.

Goldy, R. G. and Lyrene P. M. 1984. In Vitro colchicines treatment of blueberry, *Vaccinium sp*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109: 336-338.

Grosser, J. W., Gmitter F. G., Jr., Sesto F., Ling X. X., and Chandler J. L. 1992b. Six New Somatic Citrus Hybrids and Their Potential for Cultivar Improvement. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117: 169-173.

Grosser, I. W., Gmitter F. G., Jr., Lozada E. S., and Chandler J. L. 1992a. Production of Somatic Hybrid and Autotetraploid Breeding Parents for Seedless Citrus Development. HortScience. 27: 1125-1127.

Grouh, M.S.H., Meftahizade, H., Lotfi, N., Rahimi, V. and Baniasadi, B. 2011. Doubling the chromosome number of Salvia hains using colchicines : Evaluation of morphological traits of recovered plants. Journal of Medicinal Plants Research. 5:4892-4898.

Gu, X. F., Yang A. F., Meng H. and Zhang J. R. 2005. In vitro induction of tetraploid plants from diploid Zizyphus jujube Mill. cv. Zhanhua. Plant Cell Rep. 24: 671-676.

Hamill, S. D., Smith M. K. and Dodd W. A. 1992. In Vitro Induction of Banana Autotetraploids by Colchicine Treatment of Microprogated Dipolid. Australian Journal of Botany. 40 : 887-896.

He, L. Y., Ding Z., Jiang F., Jin B., Li W., Ding X., Sun J. and Li G. 2012. Induction and identification of hexadecaploid of *Pinellia ternate* Euphytica. 186: 479-788.

Hegde, L. and Krishman R. 1994. Growth Analysis in Autotetraploid *Coleus forskohlii*. Indian Journal of Agricultural Sciences. 64: 405-408.

Hegdus, A., Erdei S. and Horvath G. 1997. Is Colchicine a Stress Factor. Horticutural Science. 29 : 53-57.

Hein, D. J. and Mee G. W. P. 1970. Plant Differentiation from Callus Tissue of *Saccharum species*. Crop Science. 9 : 346-348.

Hill, T. B., Poopp H. W. and Grove Jr. A. R. 1967. Botany. 4th ed. Mcgraw – Hill Book Company, New York.

Huang, H. J. and Li W. C. 1992. Comparative Studies in The Effect of Colchicine Treatments between Cultivated and Wild Species Peanuts. Journal of Agriculture and Forestry. 41 : 27-37.

Ishikawa, K., Misshiba K., Yoshida H. and Nunomura O. 1997. Establishment of Tetraploid Plant of *Capsicum annuum* L. by Colchicine Treatment with the Analysis of Flow Cytometry. Capsicum and Egg Plant Newsleter. 16 : 44-47.

Ishizaka, H. and Uenatsu J. 1994. Amphidiploids between *cyclamen pericum* Mill. and *C. hedorifolium* Aitom Induced though Colchicine Treatment of Ovule in Vitro and Plants. Breeding Science. 44 : 161-166.

Kaensaksiri, T., Soontornchainaksaeng, P. and Prathanturarug,, S. 2011. In vitro induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. Plant Cell Tiss Organ Cult. 107:187-194.

Kerdsuwan, N. and Te-chato, S. 2012. Effects of colchicine on survival rate, morphological, physiological and cytological characters of chang daeng orchid (*Rhynchostylis gigantean* var. *rubrum* Sagarik) *In Vitro*. Journal of Agricultural Technology. 8 : 1451-1460.

Khostva, I. V. 1996. Some Feature of Apple Polyploids. Sadovostov-I-Vinogradarstvo. 2 : 15-16.

Knight, R. J., Jr. 1991. Development of Tetrapliod Hybrid Passion Fruit Clones with Potential for the North Temperate Zone. hortScience. 26 : 1541-1543.

Konieczny, R, Czaplicki A. Z., Golczyk H. and Przywara L. 2003. Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 73 : 177-187.

Laere, K.V., Franca, S.C., Vansteenkiste, H., Huylenbroeck, J.V., Steppe, K. and Labeke, M.V. 2011. Influence of ploidy level on morphology, growth and drought s usceptibility in *Spathiphyllum wallisii*. Acta Physiol Plant. 33:1149–1156.

Langehiem, J. H. and Thimann K. V. 1982. Botany. John Willey & Sons, New York.

Lee, J. H. and Lee, S. Y. 2002. Selection of Stable Mutants from Cultured Rice Anthers Treated with Ethyl Metane Sulfonic Acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 71 : 165-171.

Lim, W. and Earle E. D. 2009. Enhanced recovery of doubled haploid lines from parthenogenetic plants of melon (*Cucumis melo* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult. 98 : 351-356.

Ling, J. T. and Iwamasa M. 1994. Somatic Hybridization between *Citrus reticurata* and *Citropsis gabunnensis* through Electrofusion. Plant Cell Report. 13 : 493-497.

Liu, G., Li Z. and Bao M. 2007. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its eVect on plant morphology. Euphytica. 157 : 145-154.

Liu, Z. and Gao S. 2007. Micropropagation and induction of autotetraploid plants of Chrysanthemum cinerariifolium (Trev.) Vis. In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 43 : 404-408.

Lotfi M., Alan A. R., Henning M. J., Jahn M. M. and Earle E. D. 2003. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. Plant Cell Rep. 21 : 1121-1128.

Louzada, E. S., Grosser J. W. and Gmitter F. G., Jr. 1993. Intergeneric Somatic Hybridization of Sexually Incompatible Parents : *Citrus sinensis* and *Atlantia ceylanica*. Plant Cell Report. 12 : 687-690.

Louzada, E. S., Grosser J. W., Gmitter F. G., Jr., Nielsen B., Chandler J. L., Deng X. X., and Tusa N. 1992. Eight New Somatic Hybrid Citrus Rootstock with Potential for Improved Disease Resistance. HortScience. 27 : 1033-1036.

Lu, C. and Bridgen M. P. 1997. Chromosome doubling and fertility study of *Alstroemeria aurea* x *A. caryophyllaea*. Euphytica. 94 : 75-81.

Madani, H., Hosseini, B., Dehghan, E. and Rezaei-chiyaneh, E. 2015. Enhanced production of scopolamine in induced autotetraploid plant of *Hyoscyamus reticulates* L. Acta physiol Plant. 37:55.

Mackiewicz, H. O. and Maleepszy S. 1996. Obtaining and Characterization of Tetraploid froms in Cucumber - *Cucumis sativa* L. Var. Sativus and Var. Hardwickickii Alef. Folia – Hortculturae. 8 : 3-10.

Majdi, M., Karimzadeh, G., Malboobi, M.A., Omidbaigi, R. and Mirzaghaderi, G. 2010. Induction of tetraploidy to Feverfew (*Tanacetum parthenium* Schulz-Bip) : morphological, physiological, cytological, and phytochemical changes. Hortscience. 45:16-21.

Mandal, A. K. A, Chakrabarty D. and Datta S. K. 2000. Application of *in vitro* techniques in mutation breeding of chrysanthemum. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 60 : 33-38.

Meglic, V. and Smith R. R. 1992. Self – Incompatibility and Seed Set in Colchicine, Nitrous oxcide -, and Sexually Derived Tetraploid Red Clover. Crop Science. 32 : 1133-1137.

Moore, G. A. 1985. Factors Affecting in Vitro Emryogenesis from Undeveloped Ovules of Mature Citrus Fruit. J. Amer. Hort. Sci. 110 : 66-70.

Moriguchi, T., Hidaka T. and Omura M. 1996. Genotype and Parental Combination Influence Efficiency of Cybrid Induction in Citrus by Electrofusion. HortScience. 31 : 275-278.

Murashige, T. and Skoog F. 1962. A Relative Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Culture. Physiol. Plantarum. 15 : 473-479.

Naicevska, C. M. and Specmann, G. J. 1968. Number of Chloroplasts and Pollen Grain Pores in Polyploid and Tetraploid Varieties of some Trifolum Species. Euphytica. 17 : 357-362.

Nair, R. R. and Ravidran P. N. 1992. Induced in Black Pepper (*Piper nigrum* L.). Journal of Spices and Aromatic Crops. 1 : 151-153.

Najicevska, C. M. and Speckmann G. J. 1968. Numbers of Chloroplasts and Pollen Grian Pores in Diploid and Tetraploid Varieties of Some *Trifolium Species*. Euphytica. 17 : 357-362.

Nugent, P. E. 1994. Moneecious – Flowering. Tetraploid, Viresent Melon C879-J2-4x. HortScience. 29 : 47-48.

Nura, S., Adamu, A. K., Mu'Azu, S., Dangra, D. B. and Mahamud, F. M. 2011. Mutational rectification induced via colchicines in sesame (*Sesamum indicum* L.). International Journal of Emerging Technologies in Sciences and Engineering. 5 : 57-64.

Pan, W. H. Houben, and Schlecgel R. 1992. Highly Effective Cell Synchronization in Plant Roots by Hydroxyurea and Amiprophos-Methyl or Colchicine. Genome. 36 : 387-390.

Park, K.J.1995. Characteristics of Several Tetraploid Induced by Colchicine Treatment in Muberry Seedling (*Morus alba* L.) Selfing Ist Generation of Kaeryangppohg). RDA – Journal – of Agricultural – Science, - Farm – Management, - Agricultural – Engineering, - Sericulture, - and – Farm – Products – Utilization. 37 : 759-765.

Perry, J. L. and Lyrene P. M. 1984. In Vitro Induction of Tetraploidy in *Vaccinium darrowi, V. elliottii* and *V. darrowi* x *V. elliottii* with Colchicine Treatment. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109 : 4-6.

Petersen, K. K., Hagberg, P. and Kristiansen, K. 2003. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 73 : 137-146.

Pindel, Z. 1993. Selected Problems in the Biology of 3 *Gloriosa* Species. Zeszyty Naukowe Akdemii Rolnicej im., Krakow. (Abstract).

Pirkoohi, M. H., Kevanloo, M. and Hasanpoor, M. 2011. Colchicine – induced polyploidy in mint by seed treatment. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 3-4 : 102-104.

Pleankong, P., Suksa-Ard, P. and Wannakrairoj, S. 2010. Induction polyploidy of *Capsicum frutescens* L. by colchicines. Agricultural Sci, J. 41:181-184.

Raina, S. N., Parida A., Koul K. K., Salimath S.S., Bisht M. S. and Raja V. 1994. Associated Chromosomal DNA Change in Polyploid. Genome. 37 : 560-564.

Rajagopalan, A., Khader J. and Abdul K. J. 1994. A Compairison of Different Methods of Estimation of Colchicine in *Gloriosa superba* L. Crop Research Hisar. 8 : 549-551.

Raza, H., Jafar Jaskani, M., Mumtaz Khan, M. and Malik, T. 2003. *In vitro* induction of polyploids in watermelon and estimation based on DNA content. Int. J. Agri. Biol. 5 : 298-302.

Re^go, M. M., Re^go E. R., Bruckner C. H., Finger F. L. and Otoni W. C. 2011. In vitro inductionof autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. Plant Cell Tiss Organ Cult. 107 : 451-459.

Reed, S. M. 1999. Production of haploid tobacco plants using anther culture *In* Trigiano R. N. Gray D. J. U. S. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. Pp 291-296.

Rodrigues, F. A., Rodrigues Soares, J. D., Rocha dos Santos, R., Pasqual, M. and Oliveira e Silva, S. 2011. Colchicine and amiprophos – methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant. African Journal of Biotechnology. 10 : 13476-13481.

Sarathum S., Hegele, M., Tantiviwat S. and Nanakorn, M. 2010. Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. Europ. J. Hort. Sci. 75 : 123-127.

Sattler, M.C., Carvalho, C.R. and Clarindo, W.R. 2016. The polyploidy and its key role in plant breeding. Planta. 243:281–296.

Scialbba, A., Melatic M. R. and Liberto C. D. 1995. Colchicine Induce Change in the Growth and Secondary Wall Depostion of Cotyledonless Radish Seedling. Acta – Botanica – Gallica. 142 : 773-787.

Serapiglia, M.J., Gouker, F.G. and Smart, L.B. 2014. Early selection of novel triploid hybrids of shrub willow with improved biomass yield relative to diploids. BMC Plant Biology. 14:74.

Serapiglia, M..J., Gouker, F.E., Hart, J.F., Unda, F., Mansfield, S.D., Stipanovic, A.J. and Smart, L.B. 2015. Ploidy Level Affects Important Biomass Traits of Novel Shrub Willow (*Salix*) Hybrids. Bioenerg. Res. 8:259–269

Sheikh, S., Noh J., Seong M. H., Jung G. T., Kim J. M., Ju H., and Huh Y. C. 2013. Phenotypic Markers for Tetraploid Watermelon [Citrullus lanatus (Thunb.) Matsum. Et Nakai] Following Parental Exposure to Colchicine in T0 Generation. Hort. Environ. Biotechnol. 54 : 524-530.

Shinichi, A. and Shinichi A. 1994. A New Method for Selecting Cytochimeras by the Maximum number of Nucleoli per Cell in *Allium wakegi* Araki and *A. fistulosum* L. Euphytica. 79 : 5-12.

Singh, S., Ray B. K., Bhattacharyya S. and Deka P.C. 1994. Invitro Propagation of *Citrus reticurata* Burm. F. Hortscience. 29 : 214-216.

Singsit, C. and Ozias – Akins P. 992. Rapid Estimation of Ploidy Levelsy in Invitro Regenerated Interspecific Arachis Hybrid and Fertile Triploids. Euphytica. 64 : 183-188.

Sinski, I., Bosco D. D., Pierozzi N. I. Maia J. D. G., Ritschel P. S. and Quecini V. 2014. Improving in vitro induction of auto polyploidy in grapevine seedless cultivars. Euphytica. 196 : 299-311.

Smith, M. A. L. and Rogers R. B. 1999. Pigment production in Ajuga cell cultures : Trigiano R. N. Gray D. J. U. S. *In* Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. pp 361-372.

Soost, R. K. and Cameron J. W. 1985. 'Melogold', A Triploid Pummelo – Grapefruit Hybrid. HortScience. 20 : 1134-1135.

Soost, R. K. and Cameron. J. W. 1980. 'Oroblanco', A Triploid Pummelo – Grapefruit Hybrid. HortScience. 15 : 667-669.

Speckman, G. J., Post J., Jr. and Dijkstra H. 1965. The Length of Stomata as an Indicator for Polyploidy in Rye – grasses. Euphytica. 14 : 225-230.

Surson, S. 1999. Effect of colchicine on seed and shoot differentiation of *Citrus reticulate* Blanco *in vitro*. M. S. Thesis, Khon Kaen University.

Surson, S., Sitthaphanit, S. and Wongma, N. 2015. In vivo induction of tetraploid in tangerine citrus plant (*Citrus reticulata* Blanco) with the use colchicines. Pakistan Journal of Biological Sciences. 18:37-41.

Tan, G. Y. and Dunn G. M. 1973. Relationship of Stomatal Length and Frequenes and Pollen – Grain Diameter to Ploidy Level in *Bromus inermis* Leyss. Crop Science. 3 : 332-334.

Tan, H.T., Liang, W., Long, J., Wu, X., Zhang, H. and Guo, W. 2015. Comparative metabolic and transcriptional analysis of a doubled diploid and its diploid citrus rootstock (*C. junos* cv. Ziyang xiangcheng) suggests its potential value for stress resistance improvement. BMC Plant Biology. 15:89.

Tang Z. Q., Chen D. L., Song Z. J., He Y. C., Cai D. T. 2010. In vitro induction and identification of tetraploid plants of Paulownia tomentosa. Plant Cell Tiss Organ Cult. 102 : 213-220.

Teparkum, S. and Veilleux Richard E. 1998. Indifference of potato anther culture to colchicines and Genetic similarity among anther – derived monoploid regenerants determined by RAPD analysis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 53 : 49-58.

Thao, N. T. P, Ozaki Y. and Okubo H. 2003. Callus induction and plantlet regeneration in ornamental *Alocasia micholitziana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 73 : 285-289.

Thao, N. T. P, Ureshino K, Miyajima I, Ozaki Y. and Okubo H. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicines and oryzalin treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 72 : 19-25.

Thong-on, W., Arimatsu, P., Pitiporn, S., Soonthronchareonnon, N. and Prathanturarug, S. 2014. Field evaluation of in vitro-induced tetraploid and diploid *Centella asiatica* (L.) Urban. J. Nat Med. 68:267-273.

Toolapong, P., Komatsu H. and Iwamasa M. 1996. Triploids and haploid Proginies Derived from Small Seed of 'Banpeiyu' A Pummelo, Crossed with 'Ruby Red' Grapefruit. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 65 : 225-260.

Toolapong, P., Komatsu H. and Iwamasa M. 1995. Tripolids from Small Seeds of Polyembryonic Citrus Cultivars. Proc. Sch. Agric. Kyushu Tokai Univ. 14 : 1-8.

Tulay, E. and Unal M. 2010. Production of colchicine induced tetraploids in *Vicia villosa* roth Caryologia. 63 : 292-303.

Tusa, N., Gmitter F. G., Jr. and Louzada E. S. 1992. Production of Tetraploid Somatic Hybrid Breeding Parents for Use in Lemon Cultivar Improvement. HortScience. 27 : 445-447.

Tusa, N., Grosser J. W. and Gmitter F. G., Jr. 1990. Plant Regeneration of 'Valencia' Sweet Orange, 'Femminello' Lemon, and Interspecific Somatic Hybrid Following Protoplast Fusion. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115 : 1043-1046.

Umoh, E. O. and Etim L. 1992. Themutagenic Effect of Colchicine on the Germination, Morphology and Yield of Two Varieties of *Vigna unguiculata* (L.) Walpers (Papilionaceae) in Nigeria. Boletim – da- Sociedade – Broteriana. 65 : 163-171.

Usman, M., Fatima, B., Usman, M., Samad, W. A. and Bakhsh, K. 2012. Embryo culture to enhance efficiency of colchicine induced polyploidization in grapefruit. *Pak. J. Bot*. 44 : 399-405.

Verdi, A. and Spiegel R. P. 1982. Plantion from Citrus Protoplasts: Variability in Methodological Requirements among Cultivars and Species. Theor. Appl. Genet. 62 : 171-176.

Verheij, E. W. M. and Coronel R. E. 1992. Plant Resources of South – East Asia 2. Borgor Indonesia, Indonesia.

Wongpiyasatid, A.., Hormchan, P. and Rattanadilok, N. 2003. Preliminary test induction in cotton (*Gossypium arboretum*) using colchicines treatment. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 37:27-32.

Wu J. H., Ferguson A. R., and Murray B. G. 2011. Manipulation of ploidy for kiwifruit breeding: in vitro chromosome doubling in diploid Actinidia chinensis Planch. Plant Cell Tiss Organ Cult. 106 : 503-511.

Wu, J. H. and Mooney P. 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from in vitro Citrus somatic embryogenic callus treated with colchicines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 70 : 99-104.

Xi-Ling, W., Jin – Xing Z., Mao – De Y., Zhen – Gang L., Xiao – Yun J. and Qi – You L. 2011. Highly efficient plant regeneration and in vitro polyploidy induction using hypocotyl explants from diploid mulberry (*Morus multicaulis* Poir.). In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant. 47 : 434-440.

Xu, L., Najeeb U., Naeem M. S., Daud M. K., Cao J. S., Gong H. J., Shen W. Q. and Zhou W. J. 2010. Induction of tetraploidy in *Juncus effuses* by colchicines. Biologia plantarum. 54 : 659-663.

Zhang, F., Xue, H., Lu, X., Zhang, B., Wang, F., Ma, Y. and Zhang, Z. 2015. Autotetraploidization enhances drought stress tolerance in two apple cultivars. Trees. 29:1773–1780.

Zhang, J., Zhang M. and Deng. X. 2007. Obtaining autotetraploids in vitro at a high frequency *in Citrus sinensis.* Plant Cell Tiss Organ Cult. 89 : 211-216.

Zhang, Q. Y., Luo F. X., Liu L. and Guo F. C. 2010. In vitro induction of tetraploids in crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult. 101 : 41-47.

Zhao, J., Simmonds D. H. and Newcomb W. 1996. Induction of Embryogenesis with Colchicine Instead of Heat in Microspore of *Brassica napus* L. cv. Topua. Planta. 198 : 433-439.