การชักนำการกลายพันธุ์ในกล็อกซิเนีย (*Sinningia speciosa*) ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตซี (UV-C) และ เอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS)

Induced Mutation in Gloxinia (*Sinningia speciosa*) with Ultraviolet-C (UV-C) and Ethylmethanesulfonate (EMS)

ยุพาภรณ์ ศิริโสม

Yupaporn Sirisom

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Science
Prince of Songkla University
2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การชักนำการกลายพันธุ์ในกล็อกซิเนีย (*Sinningia speciosa*) ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตซี (UV-C) และ เอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS)

ผู้เขียน นางสาวยุพาภรณ์ ศิริโสม

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	**คณะกรรมการสอบ**
……	……...ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)	(รองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี)
	…….....กรรมการ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)
……	…….....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)	(รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)
	…….....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พจมาลย์ สุรนิลพงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

……..…….

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การชักนำการกลายพันธุ์ในกล็อกซิเนีย (*Sinningia speciosa*) ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตซี (UV-C) และ เอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS)
ผู้เขียน	นางสาวยุพาภรณ์ ศิริโสม
สาขาพืชศาสตร์	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2551

บทคัดย่อ

จากการนำชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียมาฉายรังสี UV-C ปริมาณ 0 - 9 kJ/m^2 และจุ่มแช่สาร EMS ที่ความเข้มข้น 0 -1 % นาน 60 และ 90 นาที จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน พบว่า อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) คือที่ปริมาณรังสี UV-C ประมาณ 4.52 kJ/m^2 โดยความสามารถในการสร้างยอดรวมในแต่ละชุดทดลองมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบการสร้างดอกในหลอดทดลองจากการย้ายเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบที่ฉายรังสี UV-C ปริมาณ 5.4 kJ/m^2 แต่ดอกพัฒนาไม่สมบูรณ์ ในขณะที่ชิ้นส่วนใบพัฒนาเป็นยอดรวมตามปกติ ส่วนค่า LD_{50} ของสาร EMS ที่ใช้จุ่มแช่ชิ้นส่วนใบ คือที่ระดับความเข้มข้น 0.88% นาน 60 นาที และ 0.73% นาน 90 นาที ซึ่งความสามารถในการสร้างยอดรวมมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อตัดยอดที่ได้จากการฉายรังสี UV-C และจุ่มแช่สาร EMS มาชักนำรากบนอาหารสูตร ½ MS นาน 14 วัน แล้วย้ายลงกระถางเป็นเวลา 60 วัน ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของต้น พบว่า ต้นที่ได้รับการฉายรังสี UV-C มีความกว้างทรงพุ่ม ความยาวและความกว้างใบ ความกว้างและความยาวดอกมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความสูงของลำต้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ สำหรับผลของรังสี UV-C ต่อลักษณะดอกนั้น พบว่า ต้นที่ได้รับรังสี UV-C ปริมาณ 5.4 kJ/m^2 มีลักษณะดอกที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากที่สุด คือ สีดอกเข้มขึ้นหรืออ่อนลง กลีบดอกหนาสีแดงคล้ายกำมะหยี่ เป็นต้น ส่วนต้นที่ได้จาการจุ่มแช่สาร EMS มีความกว้างทรงพุ่ม และความสูงของลำต้น แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ความยาวและความกว้างใบ ความกว้างและความยาวดอก ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ต้นกล็อกซิเนียที่ได้รับสาร EMS 0.75% จุ่มแช่นาน 90 นาที มีลักษณะดอกเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากที่สุด คือ สีดอกเข้มขึ้น หรืออ่อนลง กลีบดอกหนา เป็นต้น เมื่อนำต้นกล็อกซิเนียที่ผิดปกติมาตรวจสอบด้วยเทคนิคไอโซไซม์ พบว่า ระบบเอนไซม์ EST ให้แถบสีชัดเจนสามารถแยกความแตกต่างได้

Thesis Title	Induced Mutation in Gloxinia (*Sinningia speciosa*) with Ultraviolet-C (UV-C) and Ethylmethanesulfonate (EMS)
Author	Miss Yupaporn Sirisom
Major Program	Plant Science
Academic	2008

ABSTRACT

UV-C irradiation at dose of 0-9 kJ/m^2 or EMS at 0-1% for 60 and 90 min were used to treat *in vitro* leaf explants of gloxinia, followed by culturing on MS medium with 1 mg/l IAA and 5 mg/l KN. After culturing for 28 days, The LD_{50} of UV-C irradiation was 4.52 kJ/m^2 and multiple shoot formations in each treatment were significantly different. *In vitro* flowering was initiated from petiole explants treated with 5.4 kJ/m^2, however, this resulted in incompleted flowers, while leaf explants produced normal multiple shoots.The LD_{50} of EMS were 0.88% for 60 min and 0.73% for 90 min and multiple shoot formations of each treatment were significantly different. Each shoot obtained from both mutagens was transferred to induction medium of ½ MS for 14 days. The resulting plantlets were trasferred to pots containing a soil mixture and morphological characteristics were observed 60 days after transplanting. Plants irradiated with UV-C showed significant differences in the following characters: canopy width, leaf width, leaf length, flower width and flower length, while no significant difference was found in stem height. Gloxinia treated with UV-C 5.4 kJ/m^2 gave the most altered flower characteristics such as alterations in color, petal thickness, floral sections with only two corolla, etc. Plants treated with EMS showed significant difference in canopy width and stem height, while no significant differences were found in leaf width, leaf length, flower width and flower length. In gloxinia treated with 0.75% EMS for 90 min, flower characteristics were altered in term of color, petal thickness etc. The EST enzyme was successfully used to detect mutants obtained from treating with mutagens.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำสั่งสอน ทั้งด้านการเรียน การวิจัย คุณธรรมจริยธรรม และการเขียนวิทยานิพนธ์จนสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สายัณห์ สดุดี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ คณาอาจารย์ทุกท่าน ที่เคยให้การอบรมสั่งสอน และช่วยเหลือจนสำเร็จการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณยาย คุณพ่อ คุณแม่ คุณน้า และน้องๆ ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยจนสำเร็จ และให้กำลังใจมาโดยตลอด

ยุพาภรณ์ ศิริโสม

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(8)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(10)
บทที่	
1 บทที่	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	10
2 วิธีการวิจัย	11
วัสดุและอุปกรณ์	11
วิธีดำเนินการ	13
3 ผล	17
4 บทวิจารณ์	44
5 บทสรุป	50
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก	56
ประวัติผู้เขียน	61

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวม และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนของกล็อกซิเนียภาย หลังการฉายรังสี UV-C และวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	21
2	ผลของรังสี UV-C ต่อลักษณะทางสัณฐานของต้นกล็อกซิเนีย หลังจากย้ายลง แปลงปลูกเป็นเวลาประมาณ 60 วัน	25
3	อัตราการสร้างยอดรวม และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนของกล็อกซิเนียภายหลังการ จุ่มแช่สารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ	31
4	ผลของ EMS และระยะเวลาจุ่มแช่นาน 60 นาที ต่อลักษณะทางสัณฐานของ กล็อกซิเนียหลังจากย้ายลงแปลงปลูกเป็นเวลาประมาณ 60 วัน	34
5	ผลของ EMS และระยะเวลาจุ่มแช่นาน 90 นาที ต่อลักษณะทางสัณฐานของ ต้นกล็อกซิเนียหลังจากย้ายลงแปลงปลูกเป็นเวลาประมาณ 60 วัน	35
6	ลักษณะผิดปกติของดอกกล็อกซิเนียภายหลังการฉายรังสี UV-C	39
7	ลักษณะผิดปกติของดอกกล็อกซิเนียภายหลังการทรีตด้วยสาร EMS	39

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของ EMS	6
2	อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียภายหลังการฉายรังสี UV-C และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดรวม (MS + IAA 1 มก/ล + KN 5 มก/ล) เป็นเวลา 28 วัน	18
3	ลักษณะแคลลัสจากชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียภายหลังการฉายรังสี UV-C ปริมาณต่างๆ (ก) 0 kJ/m^2 (ข) 1.8 kJ/m^2 (ค) 2.4 kJ/m^2 และ (ง) 5.4 kJ/m^2 (บาร์ = 0.5 ซม)	20
4	ลักษณะของยอดรวมจากชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียภายหลังการฉายรังสี UV-C ปริมาณต่างๆ (ก) 0 kJ/m^2 (ข) 3.6 kJ/m^2 (ค) 5.4 kJ/m^2 และ (ง) 9.0 kJ/m^2 (บาร์ = 1.0 ซม)	20
5	ลักษณะยอดรวมผิดปกติ จากชิ้นส่วนใบที่ฉายรังสี UV-C (ก และ ข) ปริมาณ 7.2 kJ/m^2 (ค และ ง) และ 9.0 kJ/m^2 (บาร์ = 1 ซม)	22
6	(ก) การพัฒนาของชิ้นส่วนใบ และ (ข) ชิ้นส่วนก้านใบของกล็อกซิเนีย ภายหลังการฉายรังสี UV-C ปริมาณ 5.4 kJ/m^2 และ (ค) ลักษณะภายในของดอกเมื่อผ่าตามยาว (บาร์ = 0.5 ซม)	23
7	ลักษณะต้นกล็อกซิเนียที่ฉายรังสี UV-C ปริมาณต่าง ๆ (ก) 0 kJ/m^2 (ข) 1.8 kJ/m^2 (ค) 2.4 kJ/m^2 (ง) 3.0 kJ/m^2 (จ) 3.6 kJ/m^2และ (ฉ) 5.4 kJ/m^2	26
8	ลักษณะของดอกกล็อกซิเนียที่ได้จากการฉายรังสี UV-C ปริมาณต่างๆ แถวบน: ดอกกล็อกซิเนียจากการฉายรังสีปริมาณ 0 kJ/m^2 แถวที่ 2: ดอกกล็อกซิเนียจากการฉายรังสีปริมาณ 3.0 kJ/m^2 แถวที่ 3 และ4: ดอกกล็อกซิเนียจากการฉายรังสีปริมาณ 5.4 kJ/m^2 (บาร์ = 1.5 ซม)	27
9	อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียภายหลังจุ่มแช่สาร EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ และอาหารสูตรชักนำยอดรวม (MS + IAA 1 มก/ล + KN 5 มก/ล)	28
10	ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการจุ่มแช่ชิ้นส่วนใบในสาร EMS 0.5% ที่ระยะเวลาต่างๆ และวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดรวม (MS + IAA 1 มก/ล + KN 5 มก/ล) เป็นเวลา 45 วัน (ก) 0 นาที (ข) 60 นาที และ (ค) 90 นาที (บาร์ = 0.5 ซม)	30

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	(ก และ ข) ลักษณะยอดรวมผิดปกติที่ได้รับสาร EMS 1% เป็นเวลา 60 นาที และ (ค และ ง) 90 นาที (บาร์ = 1.0 ซม)	32
12	ลักษณะต้นกล็อกซิเนียที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้น (ก) 0% (ข) 0.25% (ง) 0.50% (จ) 0.75% และ (ฉ) 1.0% เป็นเวลา 60 นาที	36
13	ลักษณะต้นกล็อกซิเนียที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้น (ก) 0% (ข) 0.25% (ง) 0.50% (จ) 0.75% และ (ฉ) 1.0% เป็นเวลา 90 นาที	37
14	ลักษณะของดอกกล็อกซิเนียที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ แถวที่ 1: ดอกกล็อกซิเนียจากต้นปกติ แถวที่ 2: ดอกกล็อกซิเนียที่ได้รับสาร EMS เข้มข้น 0.5% นาน 60 นาที แถวที่ 3: ดอกกล็อกซิเนียที่ได้รับสาร EMS เข้มข้น 0.5% นาน 90 นาที แถวที่ 4: ดอกกล็อกซิเนียที่ได้รับสาร EMS เข้มข้น 0.75% นาน 90 นาที (บาร์ = 1.5 ซม)	38
15	ปริมาณแอนโธไซยานินของกลีบดอกกล็อกซิเนียที่ได้จากการฉายรังสี UV-C ปริมาณต่างๆ และออกปลูกในโรงเรือนเป็นเวลาประมาณ 60 วัน	40
16	ปริมาณแอนโธไซยานินของกลีบดอกกล็อกซิเนียที่ได้จากการจุ่มแช่สารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นาน 60 และ 90 นาที และออกปลูกในโรงเรือนเป็นเวลาประมาณ 60 วัน	41
17	รูปแบบเอนไซม์ในแต่ละลักษณะของต้นที่แปรปรวน ภายหลังการแยกด้วย polyacrylamide gel electrophoresis เข้มข้น 10% ย้อมสีด้วยระบบ PER ก: ต้นกล็อกซิเนียอายุ 2 เดือน ข: ต้นกล็อกซิเนียอายุ 3 เดือน	43
18	รูปแบบเอนไซม์ในแต่ละลักษณะของต้นที่แปรปรวน ภายหลังการแยกด้วย polyacrylamide gel electrophoresis เข้มข้น 10% ย้อมสีด้วยระบบ EST ก: ต้นกล็อกซิเนียอายุ 2 เดือน ข: ต้นกล็อกซิเนียอายุ 3 เดือน	43

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

APS	=	ammoniumperoxydisulphate
CRD	=	Completely Randomized Design
DMRT	=	Duncan's multiple range test
EMS	=	Ethylmethanesulfonate
IAA	=	Indoleacetic acid
$J/m^2/s$	=	Jules/ square-meter/second
kJ/m^2	=	Kilo-jules/square-meter
KN	=	Kinetin
LD_{50}	=	Lethal dose
MS	=	Murashige and Skoog (Medium)
PVP	=	Polyvinylpyrrolidone K 90
TEMED	=	N, N, N′, N′-tetramethyl ethylenediamine
UV-C	=	Ultraviolet-C

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กล็อกซิเนียเป็นไม้เนื้ออ่อนที่มีอายุอยู่ได้หลายฤดู จัดอยู่ในวงศ์ Gesneriaceae มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น *Sinningia eumorpha* (Saltao)*, S. schiffneri, S. tubiflora* และ *S. speciosa* ซึ่งสายพันธุ์ *S. speciosa* นักปรับปรุงพันธุ์พืชนิยมนำมาใช้เป็นพ่อหรือแม่พันธุ์ ผลิตลูกผสมที่มีลักษณะของต้นและดอกที่สวยงาม แต่ต้องสั่งซื้อเมล็ดพันธุ์จากต่างประเทศ เพราะต้นกล็อกซิเนียที่ปลูกโดยทั่วไปเป็นลูกผสมชั่วแรก (F_1 hybrid) ไม่สามารถผลิตเมล็ดได้ และการเพาะเลี้ยงเมล็ดพันธุ์กล็อกซิเนียนั้น ต้องใช้เวลาประมาณ 120-140 วันจึงจะออกดอก (ภาณุพงศ์, 2548) ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดังกล่าวต้องใช้ระยะเวลานาน ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้เหมาะสมต่อการผลิตพืชแต่ละชนิดเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน และสามารถผลิตพืชได้ปริมาณมาก ในระยะเวลาอันสั้น นอกจากนี้ถ้าใช้ชิ้นส่วนที่ไม่เกี่ยวกับเพศ พืชต้นใหม่ที่ได้มีความสม่ำเสมอ และให้ลักษณะที่ตรงตามพันธุ์สูง อรุณี และสมปอง (2535) ศึกษาการขยายพันธุ์กล็อกซิเนียโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า การวางเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบ และชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตรมูราชิเกะ และสคุค (MS) เติม Indoleacetic acid (IAA) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin (KN) เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดรวมได้หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์สูงถึง 94-96 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอดเฉลี่ย 17-25 ยอดต่อชิ้นส่วน ดังนั้นหากนำการใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาร่วมกับการชักนำการกลายพันธุ์ในพืช เพื่อส่งเสริมความแปรปรวนและการผลิตพืชให้ได้ลักษณะที่ต้องการ ก็จะช่วยให้สามารถปรับปรุงพันธุ์ได้สะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น กระบวนการชักนำการกลายพันธุ์มีหลักการ คือ การนำเอาชิ้นส่วนต่างๆของพืชที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์ เช่น ใบ ข้อ แคลลัส มาชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมไปจากเดิมโดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ เช่น สารเคมีก่อกลายพันธุ์ เอธิลมีเทนซัลโฟเนต ไดเอทิลซัลเฟต 5-โบรโมยูเรซิล รังสีแกมมา รังสีเอ็กซ์ รังสีอัลตราไวโอเลต อนุภาคนิวตรอน อนุภาคไอออน เป็นต้น ในการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี ประสบผลสำเร็จในพืชหลายชนิด และยังสามารถส่งเสริมให้เกิดพืชสายพันธุ์ใหม่ได้อีกด้วย ตัวอย่างการใช้รังสีในไม้ดอก ไม้ประดับ เช่น ในรายงานของ ธนวัฒน์ และเตือนใจ (2549) ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อกล็อกซิเนีย พบว่า ปริมาณ

รังสี 40 เกรย์ ส่งผลให้ดอกจากปกติที่จะมีสีชมพูทั้งดอกกลับมีสีขอบนอกของกลีบดอกจางลง หรือสีดอกเข้มขึ้นแต่มีขนาดเล็กและรูปทรงดอกผิดปกติ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้รังสีแกมมาในไม้ดอกอื่นๆ เพื่อส่งเสริมให้ สีดอก ลักษณะดอก ขนาด และรูปร่างดอก เปลี่ยนแปลงไป สามารถสร้างเป็นสายพันธุ์ทางการค้าได้ เช่น *Portulaca grandiflora* (Wongpiyasatid and Hormchan, 2000) คาร์เนชั่น (Okamura *et al*., 2003) เบญจมาศ (Ahloowalia , 1992) กุหลาบ (Ibrahim *et al*., 1998) ในพืชอื่นๆ เช่น องุ่น (Charbaji and Nabulsi, 1999) และ มันฝรั่ง (Al-Safadi *et al.*, 2000) ส่วนการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) พบรายงานในไม้ผล เช่น แพร์ (Pinet-Leblay *et al*., 1992) ในพืชสมุนไพร เช่น ในโรสแมรี มีปริมาณกรด rosmarinic และ carnosic เพิ่มขึ้นเมื่อฉายรังสี UV-B ปริมาณ 5.4 และ 31 กิโลจูลต่อตารางเมตร (Luis *et al*., 2007) ในพืชผัก เช่น ใบผักกาดหอม เมื่อฉายรังสี UV-B พบว่ามีการสร้างสารแอนไซยานินเพิ่มขึ้น (Park *et al*., 2007) ส่วนการใช้รังสี UV ในไม้ดอก ไม้ประดับ ยังไม่มีรายงานการศึกษา ส่วนตัวอย่างการใช้สารเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ในการชักนำการกลายพันธุ์ในไม้ดอก ไม้ประดับ ธัญญาพร (2547) รายงานการชักนำการกลายพันธุ์ในหน้าวัว พบว่า ต้นที่ได้จากการจุ่มแช่สาร EMS 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 90 นาที ส่งผลให้ใบหน้าวัวเกิดลักษณะผิดปกติ คือ ใบด่าง ใบติดกันเป็นจีบ เป็นต้น สำหรับรายงานการใช้สาร EMSในไม้ดอกไม้ประดับอื่นๆ เช่น เบญจมาศ (Latado *et al*., 2004) *Tillansia fasciculate* (Koh and Davies, 2001) ในไม้ผล เช่น มังคุด (สมปอง และ วิทยา, 2542) กล้วย (Bhagwat and Duncan, 1998) ในพืชอื่นๆ เช่น บาร์เลย์ (Zhu et *al*., 2003) และ *Camelina sativa* (L.) (Nothdurft *et al*., 1998) เป็นต้น

จากรายงานดังกล่าวข้างต้น เห็นได้ว่าการชักนำการกลายพันธุ์นั้นสามารถสร้างความแปรปรวนในต้นพืช ทำให้เกิดลักษณะใหม่ๆ ในไม้ดอก ไม้ประดับ ลักษณะใหม่ที่เกิดขึ้นนั้นสามารถเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจให้กับพืชชนิดนั้นได้ ดังนั้นในรายงานฉบับนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงผลของรังสี UV-C และ สาร EMS ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะกล็อกซิเนียร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อใช้ประโยชน์ในการสร้างสายพันธุ์ใหม่ในทางการค้าในอนาคต

การตรวจเอกสาร

กล็อกซิเนีย มีถิ่นกำเนิดในประเทศบราซิล นำเข้ามาปลูกครั้งแรกในประเทศไทย โดยรองศาสตราจารย์แสงธรรม คมกฤส ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อประมาณปี 2506 (สมเพียร, 2525) กล็อกซิเนียเป็นไม้เนื้ออ่อนมีอายุอยู่ได้หลายฤดู มีลักษณะของดอกและ

ลำต้นที่สวยงาม ดอกมีขนาดใหญ่ ทั้งดอกเดี่ยว และดอกซ้อน ลักษณะดอกเป็นรูประฆัง บริเวณริมของกลีบดอกมีลักษณะเป็นคลื่น กลีบดอกมีเนื้อละเอียดเหมือนกำมะหยี่ สีดอกมีตั้งแต่ สีขาว ชมพู แดง และม่วง นอกจากนี้ กล็อกซิเนียยังมีใบที่สวยงาม เป็นรูปไข่ ใบล่างมีขนาดใหญ่กว่าใบบน และใบมักจะโค้งลงด้านล่างปิดขอบกระถาง ในขณะที่ดอกจะชูขึ้นเหนือทรงพุ่ม ซึ่งมีความสวยงามมาก เป็นที่สะดุดตาแก่ผู้พบเห็น

การกลายพันธุ์ (mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสิ่งมีชีวิต อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม และลักษณะที่เปลี่ยนแปลงสามารถถ่ายทอดสู่ลูกหลานได้ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม หมายถึง การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยีน รูปร่าง หรือจำนวนโครโมโซม การกลายพันธุ์เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต มีประโยชน์ในการช่วยเพิ่มความแปรปรวนในพืช ซึ่งเป็นการเพิ่มความสำเร็จในการคัดเลือกพืชให้ได้ลักษณะตามที่ต้องการ (นพพร, 2543) การชักนำการกลายพันธุ์ สามารถทำได้โดยกระบวนการทางกายภาพ และทางเคมี ในทางกายภาพ ได้แก่ การใช้รังสีต่างๆ เช่น รังสีแกมมา รังสีเอ็กซ์ รังสี UV เป็นต้น ส่วนการชักนำการกลายพันธุ์ทางเคมี ได้แก่ การใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ ซึ่งสารเคมีหลายชนิดมีคุณสมบัติทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตได้ สำหรับพืช มีสารเคมีที่ใช้ได้ผลอยู่ไม่กี่ชนิด ที่รู้จัก และใช้กันแพร่หลายคือ สาร EMS เป็นสารก่อกลายพันธุ์ที่ใช้ได้ผลดีกับพืชหลายชนิด (สิรนุช, 2540)

การชักนำการกลายพันธุ์ในพืชโดยใช้รังสี

รังสีที่นำมาใช้ในการชักนำการกลายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ รังสีที่ก่อไอออน (ionizing radiation) เป็นรังสีที่มีอำนาจทะลุทะลวงสูง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซม เช่น รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา และนิวตรอน ส่วนรังสีอีกประเภทหนึ่งคือ รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (non-ionizing radiation) เป็นรังสีที่มีอำนาจทะลุทะลวงน้อย มักทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน เช่น รังสี UV (นพพร, 2543)

รังสี UV เป็นช่วงหนึ่งของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นสั้นกว่าแสงสีม่วง รังสี UV แบ่งงออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ UV-A มีความยาวคลื่น 320-390 นาโนเมตร UV-B มีความยาวคลื่น 280-320 นาโนเมตร และ UV-C มีความยาวคลื่นน้อยกว่า 280 นาโนเมตร (Ehsanpour and Razavizadeh, 2005) รังสี UV มีผลกระทบโดยตรงกับสารที่มีคุณสมบัติดูดซับรังสีได้เท่านั้น ในเซลล์มีสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน (ring structures) เช่น purines และ pyrimidines เท่านั้นที่สามารถดูดซับรังสี UV ได้ สารทั้งสองเป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง

thymine และ cytosine ซึ่งเป็นพวก pyrimidines จะดูดซับรังสี UV ในช่วงความยาวคลื่นต่างๆได้ดี (กฤษฎา, 2546) ตัวอย่างการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี เช่น จากรายงานของ Ahloowalia (1992) ที่ฉายรังสีแกมมา ปริมาณ 2 กิโลแรด กับต้นเบญจมาศ พันธุ์ Princess Anne Bright Golden (ดอกสีเหลือง) และ พันธุ์ Neptune (ดอกสีขาว) ที่เลี้ยงในหลอดทดลองอายุ 10 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายเลี้ยง 3 ครั้ง จะได้ต้นพืชจำนวน 10-20 เท่าในรุ่นที่ 4 (M_1V_4) พบว่าเบญจมาศพันธุ์ Neptune จำนวน 20 ต้น เกิดการเปลี่ยนแปลงความสูง รูปร่างดอก ใบ และขนาดกลีบดอก มีช่อดอกสีม่วงแดง เมื่อขยายพันธุ์โดยวิธีปกติ 3 รุ่น พบว่ามีเพียง 15 ต้นที่มีลักษณะคงที่ ส่วนในพันธุ์ Princess Anne Bright Golden มีเพียง 1 ต้นจาก 16 ต้นที่เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างดอก และลักษณะที่เปลี่ยนแปลงนั้นคงที่ Ibrahim และคณะ (1998) ศึกษาผลของรังสีเอ็กซ์ ต่อการเจริญของ adventitious bud ในกุหลาบ 3 พันธุ์ จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบในหลอดทดลอง พบว่า ที่ปริมาณรังสีเอ็กซ์ 25 เกรย์ ให้อัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ส่วนการใช้รังสี UV-C พบรายงานในไม้ผล เช่น จากรายงานของ Pinet-Leblay และคณะ (1992) ซึ่งฉายรังสี UV-C ปริมาณ 0 – 1000 จูลต่อตารางเมตรต่อวินาที กับชิ้นส่วนใบแพร์อายุ 1 เดือนในหลอดทดลอง พบว่า ค่า LD_{50} คือ ที่ปริมาณรังสีประมาณ 125 จูลต่อตารางเมตรต่อวินาที ผลของรังสี UV-C ทำให้ใบแพร์เหี่ยว ขอบใบม้วนขึ้น และ เซลล์ epidermis มีรูปร่างแบนราบ ในพืชสมุนไพร เช่น จากรายงานของ Luis และคณะ(2007) ได้ฉายรังสี UV-B กับต้นโรสแมรีที่เพาะเลี้ยงในเรือนกระจก ปริมาณ 5.4 และ 31 กิโลจูลต่อตารางเมตร ในขณะที่ชุดควบคุมได้รับรังสี UV-B ปริมาณ 0.001 กิโลจูลต่อตารางเมตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตัดใบสดและชั่งน้ำหนักประมาณ 1 กรัม นำมาบดด้วยไนโตรเจนเหลว เติมเมทานอลปริมาณ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่า ต้นที่ได้รับรังสี UV-B ปริมาณ 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร มีปริมาณกรด rosmarinic และ carnosic เพิ่มขึ้น ส่วนต้นที่ได้รับรังสี UV-B ปริมาณ 31 กิโลจูลต่อตารางเมตร มีปริมาณกรด caffeic naringin และ carnosol เพิ่มขึ้น ในพืชผัก เช่น Park และคณะ (2007) ฉายรังสี UV-B ปริมาณ 0.26 กิโลจูลต่อตารางเมตร กับใบผักกาดหอม หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำใบสดมาวิเคราะห์หาปริมาณแอนโธไซยานินโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่า มีปริมาณแอนโธไซยานินเพิ่มขึ้น และเมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน พบว่า ต้นที่ได้รับรังสี UV-B ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน คือ *chalcone synthase* (*CHS*) *flavanone 3-hydroxylase* (*F3H*) และ *dihydroflavonol 4-reductase* (*DFR*) มีการแสดงออกมากขึ้น ส่งผลให้ใบผักกาดหอมมีสีแดงเนื่องจากมีการสะสมสารแอนโธไซยานินเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีพืชอีกหลายชนิด ที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีอื่น ๆ เช่น ในองุ่น Charbaji และ Nabulsi (1999) ฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0-7 เกรย์ กับชิ้นส่วนปลายยอด พบว่า ที่ปริมาณรังสีแกมมา 5 เกรย์

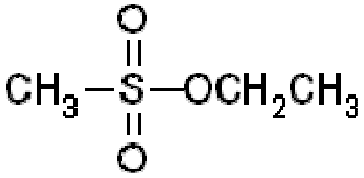
ส่งผลให้ต้นพืชมีจำนวนรากเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณรังสี 7 เกรย์ ส่งผลให้ต้นพืชมีจำนวนใบเพิ่มขึ้น Al-Safadi และคณะ (2000) รายงานการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0 - 227 เกรย์ กับชิ้นส่วนปลายยอดมันฝรั่งในแปลงปลูก พบลักษณะที่แปรปรวนไปจากเดิม เช่น รากสะสมอาหารมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นและเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีส้ม และต้นที่ฉายรังสีมีปริมาณแคโรทีนนอยด์เพิ่มขึ้น ในไม้ดอกไม้ประดับอื่นๆ เช่น รายงานของ Wongpiyasatid and Hormchan (2000) รายงานการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0 - 40 เกรย์ กับชิ้นส่วนลำต้น *Portulaca grandiflora* สองสายพันธุ์คือ “Double Orange” และ “Double Pink” พบว่า ต้นที่ฉายรังสีปริมาณ 40 เกรย์ มีสีดอก รูปทรงดอก และขนาดดอก เปลี่ยนแปลงจากเดิม และจากการศึกษานี้ทำให้ได้ *Portulaca grandiflora* สายพันธุ์ใหม่ 3 สายพันธุ์คือ ‘Chompoo Praparat’ ได้จากการฉายรังสีสายพันธุ์ ‘Double Orange’ และ ‘Double Pink’ สายพันธุ์ ‘Pattik’ และ ‘Som Arunee’ ได้จากการฉายรังสีสายพันธุ์ ‘Double Orange’ Okamura และคณะ (2003) รายงานการฉายรังสี แกมมา รังสีเอ็กซ์ และอนุภาคไอออน กับชิ้นส่วนใบ คาร์เนชั่นสายพันธุ์ Vital (กลีบดอกสีชมพู ขอบกลีบดอกหยักคล้ายฟันเลื่อย) พบว่า ต้นที่ฉายด้วยอนุภาคไอออนมีลักษณะกลายพันธุ์จากเดิมมากที่สุด คือ มีสี และรูปร่างดอกเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เช่น จากเดิมสีชมพู ขอบหยัก เป็นสีชมพูอ่อน สีแดง สีเหลือง หรือ สีส้มอ่อน บางดอกมีขอบกลีบดอกค่อนข้างเรียบ และได้สายพันธุ์ใหม่ 4 สายพันธุ์ คือ ‘Red Vital Ion’ ‘Dark Pink’ ‘Vital Ion’ และ ‘Misty Vital Ion’

การชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี

สารเคมีที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์มีอยู่เป็นจำนวนมาก แต่ละชนิดให้ผลที่แตกต่างกันออกไป สารเคมีจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยีน มากกว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม เมื่อเทียบกับการใช้รังสี มีสารเคมีอยู่ 4 กลุ่มที่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง ได้แก่

1. สารเคมีที่มีโมเลกุลคล้ายกับฐานของหน่วยพันธุกรรม (base analogues)
2. กลุ่มที่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับฐานของหน่วยพันธุกรรม (adenine guanine thymine และ cytocine)
3. alkylating agents ที่สามารถเข้าแทนที่ purine ในดีเอ็นเอ
4. acridine dyes มีคุณสมบัติในการลดหรือเพิ่มฐานของหน่วยพันธุกรรมในดีเอ็นเอ (กฤษฎา, 2546)

การใช้สารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ สามารถชักนำการกลายพันธุ์ได้หลากหลายเช่นกัน สารเคมีที่นิยมใช้มากที่สุดคือ EMS จัดอยู่ในพวก alkylating agents เป็นสารที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุด มีสูตรทางเคมีคือ $CH_3SO_2OC_2H_5$ (ภาพที่ 1) ประกอบด้วยหมู่เอธิล 1 กลุ่ม (C_2H_5) เป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีความหนาแน่น 1.203 (กรัมต่อมิลลิลิตร) มีจุดเดือด 85-86 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 10 มิลลิเมตรของปรอท มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 124.4 ละลายน้ำประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ (สิรนุช, 2540)



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ EMS

ที่มา: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/TablePage/16253605

ตัวอย่างการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้สาร EMS ในไม้ดอก ไม้ประดับ เช่น จากรายงานของ Latado และคณะ (2004) ที่จุ่มแช่ชิ้นส่วนก้านดอกคาร์เนชั่นในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ค่า LD_{50} คือ ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย EMS 0.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำต้นพืชที่ได้จากการทรีตด้วยสารละลาย EMS ออกปลูกในแปลงจำนวน 910 ต้น พบว่า สีกลีบดอกเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม 48 ต้น คือจากเดิมสีชมพู เปลี่ยนเป็น สีชมพูอมส้ม สีชมพูอ่อน สีขาว สีเหลือง หรือ สีส้มอ่อน ส่วนต้นเหลือจำนวน 862 ต้นมีลักษณะเหมือนต้นแม่ Koh และ Davies (2001) ศึกษาการจุ่มแช่เมล็ดสับปะรดประดับ (*Tillandsia fasciculate*) ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย EMS 1.2 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 3 ชั่วโมง ส่งผลให้เมล็ดตาย 59 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงจนเมล็ดงอก ต้นอ่อนแสดงอาการขาดคลอโรฟิลล์ 15.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ความเข้มข้นของสารละลาย EMS 0.4 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 5 ชั่วโมง เมล็ดพืชตาย 32 เปอร์เซ็นต์ และต้นอ่อนแสดงอาการขาดคลอโรฟิลล์ 10.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้สาร EMS ในพืชอื่นๆ เช่น จากรายงานของ Venkataiah และคณะ (2005) ได้ทรีตสาร EMS กับเมล็ดพริก (*Capsicum annuum*) ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาต่างๆ เมื่อนำเมล็ดที่ได้รับสาร EMS มาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเติม atrazine 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ต้นอ่อนมีลักษณะปกติ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และพบต้นอ่อนที่มี

ลักษณะผิดปกติคือ มีสีซีด 84 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะยอดเผือก 9.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำต้นอ่อนลักษณะปกติและต้านทานต่อสาร atrazine ลงปลูกในแปลง พบว่า สามารถเจริญได้ตามปกติ Luan และคณะ (2007) ได้จุ่มแช่แคลลัสมันเทศในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 0-3 ชั่วโมง หลังจากนั้น ตัดต้นอ่อนที่ชักนำได้จากแคลลัสย้ายลงอาหารสูตร MS เติมโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนเค็ม ผลการศึกษาพบว่า ต้นอ่อนที่ได้จากแคลลัสที่จุ่มแช่สารละลาย EMS เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 และ 2.5 ชั่วโมง สามารถเจริญได้ในอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 30 และ 32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การตรวจสอบการกลายพันธุ์

1. การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน

ในการตรวจสอบความแปรปรวนจากการกลายพันธุ์ สามารถตรวจสอบได้จากลักษณะทางสัณฐาน ซึ่งเป็นข้อมูลแรกที่สามารถสังเกตได้ง่าย และเห็นได้ชัดเจน โดยลักษณะเหล่านี้ถูกถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านยีนบนโครโมโซม ภายหลังการชักนำการกลายพันธุ์ ลักษณะที่ปรากฏเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงข้อมูลที่เป็นองค์ประกอบทางจีโนไทป์ และสิ่งแวดล้อม ที่ส่งผลให้แสดงลักษณะนั้นๆออกมา เช่น ลักษณะของลำต้น ใบ ดอก การขาดคลอโรฟิลล์ ลักษณะของผล หรือเมล็ด เป็นต้น Arunyanart และ Soontronyatara (2002) ศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์ในบัว (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา และรังสีเอ็กซ์ กับต้นอ่อนในหลอดทดลอง พบว่า ค่า LD_{50} คือปริมาณรังสี 2 กิโลแรด ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานที่พบคือ ก้านดอกมีลักษณะผิดรูป ปากใบกว้างกว่าต้นปกติ เกิดลักษณะใบแก้ว ใบซีด ส่วนของตาข้าง ราก แขนง มีการเจริญเติบโตลดลง เมื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมแบบ aneuploid คือมีจำนวนโครโมโซม 2n =18 และ 20 ซึ่งต้นปกติมีจำนวนโครโมโซม 2n = 16 Koh และ Davies (2001) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของสับปะรดประดับ *Tillandsia fasciculate* ที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้ EMS พบว่า ใบแสดงอาการด่าง ทั้งด่างเป็นบางส่วน และด่างกระจายทั่วใบ ในการทดลองที่จุ่มแช่เมล็ดด้วย EMS เข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 22 ชั่วโมง ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บีลดลง ธัญญาพร (2547) ชักนำการกลายพันธุ์ในหน้าวัว โดยจุ่มแช่โนดูลาแคลลัสในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าค่า LD_{50} คือ ที่ความเข้มข้น 0.72 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที เมื่อนำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน พบว่า ต้นหน้าวัวรุ่นที่ 2 (M_1R_2) มีใบผิดปกติ โดยพบว่า EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ใบด่าง

เป็นบางส่วน ด่างกระจัดกระจาย และด่างทั้งใบ ที่ EMS เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ทำให้รูปร่างใบผิดปกติ คือ ใบติดกันเป็นจีบและบิดเบี้ยว

ลักษณะทางสัณฐานที่ปรากฏ นอกจากเป็นผลของจีโนไทป์ บางลักษณะที่แสดงออกมา อาจเป็นผลร่วมกันระหว่างจีโนไทป์และสภาพแวดล้อมด้วย นอกจากนี้การใช้วิธีดังกล่าวในการตรวจสอบต้องใช้เวลานาน อาจต้องรอถึงระยะออกดอกหรือติดผล ดังนั้นจึงมีการตรวจสอบความแปรปรวนด้วยวิธีอื่นควบคู่ไปด้วยเพื่อเป็นการยืนยัน และร่นระยะเวลาการตรวจสอบความแปรปรวนให้สั้นลง (ธัญญาพร, 2547)

2. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

ไอโซไซม์ คือ เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อซับสเตรทตัวเดียวกัน จึงเร่งปฏิกิริยาเดียวกัน แต่มีรูปแบบของโมเลกุลและคุณสมบัติบางประการที่ต่างกัน โดยมีสาเหตุสำคัญมาจากพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (มนตรี และคณะ, 2542) ไอโซไซม์เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาทางพันธุกรรม การวิวัฒนาการ และกระบวนการเมแทบอลิซึมในสิ่งมีชีวิต ในด้านพืชสามารถใช้เทคนิคไอโซไซม์เป็นดัชนีระบุความแปรปรวนทางพันธุกรรม สายพันธุ์ การตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ และการวินิจฉัยโรคพืชต่างๆ (พรรณี, 2543) ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเทคนิคไอโซไซม์ อาศัยการทำอิเล็กโตรโฟริซิส มีหลักการที่สำคัญคือ ไอโซไซม์เป็นโพลีเปปไทด์ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เรียงลำดับกัน โดยลำดับกรดอะมิโนนี้ถูกแปลรหัสมาจากหน่วยพันธุกรรมบนสายนิวคลีโอไทด์ที่ถูกชักนำให้เกิดความแปรปรวนจากกระบวนการชักนำการกลายพันธุ์ เป็นผลให้ไอโซไซม์ ประกอบด้วยกรดอะมิโนแตกต่างกัน เช่น ขนาดประจุสุทธิ และรูปร่างโมเลกุล ดังนั้นเมื่อนำไอโซไซม์มาแยกบนตัวกลางที่เหมาะสม ภายในสนามไฟฟ้า โมเลกุลของไอโซไซม์จึงเคลื่อนที่ในอัตราที่ต่างกัน โดยไอโซไซม์ที่มีประจุมากกว่าเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าไอโซไซม์ที่มีประจุน้อยกว่า (Doehlert and Duke, 1983) หลังจากนั้นจึงย้อมสีด้วยปฏิกิริยาจำเพาะสำหรับ ไอโซไซม์แต่ละชนิด ปรากฏแถบสีของเอนไซม์รูปแบบต่างๆ (Russell, 1994) แถบสีที่ปรากฏนี้เรียกว่า รูปแบบของเอนไซม์ สามารถนำมาเขียนแผนภาพที่เรียกว่า ไซโมแกรม ที่แยกความแตกต่างของพืชนั้นได้ โดยสามารถสรุปได้ว่า ไอโซไซม์ มีผลเกี่ยวข้องกับยีนโดยตรง เพราะเอนไซม์ คือโปรตีนที่เป็นผลผลิตจากการแสดงออกของยีน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงใดๆในยีน ย่อมมีผลต่อการสร้างโปรตีน (ราตรี, 2540) ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคไอโซไซม์ในพืชหลายชนิด เช่น การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ ของบัวหลวง 4 ชนิด ได้แก่ ปทุม บุณฑริก สัตตบุษย์ โดยใช้ใบอ่อน ก้านใบอ่อน ใบแก่ และกลีบดอก มาสกัดในสารสกัด 3 ชนิด คือ (1) NaCl 0.9

เปอร์เซ็นต์ (2) Tris-HCl 0.2 โมลาร์ Mercaptoethanol 0.14 เปอร์เซ็นต์ และ(3) Tris-HCl 0.1 โมลาร์ ค่า pH 7.0 EDTA 1 มิลลิโมลาร์ PVP 0.5 เปอร์เซ็นต์ DTT 2 มิลลิโมลาร์ และ Mercaptoethanol 10 มิลลิโมลาร์ พบว่า ชนิดของสารสกัดที่เหมาะสมคือ ชนิดที่ 3 ชิ้นส่วนที่เหมาะสมคือ ส่วนใบอ่อน และก้านใบอ่อน ทั้งสองชิ้นส่วนให้แบบแผนที่แตกต่างกัน กลูตาเมทออกซาโลอะซิเตสทรานสะมิเนส สามารถแยกบัวหลวงบุณฑริกออกจากพันธุ์อื่น และเอสเตอเรสสามารถแยกบัวพันธุ์ปทุมและบุณฑริกจากพันธุ์สัตตบงกช และสัตตบุษย์ (กัญจนา และ สุเม, 2542) ปราโมทย์ และเกศิณี (2543) ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปติเดส เอสเตอเรส และ ชิกิมิกดีไฮโดรจีเนส ในการจำแนกพันธุ์ลูกผสมสตรอเบอรี่ พบว่า การใช้รูปแบบเอสเตอเรสร่วมกับลิวซีนอะมิโนเปปติเดส สามารถจำแนกได้ 4 พันธุ์ กับ 3 กลุ่ม โดยพบเอสเตอเรส 7 รูปแบบ มีเอนไซม์ 9 แถบ และลิวซีนอะมิโนเปปติเดส พบ 2 รูปแบบ มีเอนไซม์ 4 แถบ การใช้เอนไซม์เอสเตอเรสร่วมกับ ลิวซีนอะมิโนเปปติเดส สามารถจำแนกลูกผสมบางเบอร์ออกจากพันธุ์แม่ หรือพันธุ์พ่อ หรือระหว่างลูกผสมด้วยกันเอง ส่วนเอนไซม์ชิกิมิกดีไฮโดรจีเนสแสดงออก 1 แถบ อรอุมา (2550) ตรวจสอบลักษณะต้นกล้วยน้ำว้าที่ผิดปกติในหลอดทดลอง 5 ลักษณะ คือ ลำต้นยืดยาว หน่อ ปม ใบดาบ ลักษณะคล้ายหน่อ และลักษณะสีซีด ด้วยการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ เปอร์ออกซิเดส (PER) และเอสเตอเรส (EST) พบว่า PERให้รูปแบบของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ในขณะที่ EST เจลย้อมไม่ติดสี Rizza และคณะ (2002) ใช้เทคนิคไอโซไซม์ตรวจสอบลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *Solanum melongena* และ *S. aethiopicum* พบว่า ชิคิเมทดีไฮโดรจีเนส และ กลูโคสซิกฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส สามารถใช้แยกความแตกต่างของลูกผสมออกจากพ่อ หรือแม่ได้ Ray และคณะ (2006) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของ *Cordyline terminalis* (L) Kunth. ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 10 สายพันธุ์เซลล์ (C_1-C_{10}) ด้วยวิธีไอโซไซม์ โดยย้อมด้วยเอนไซม์ 6 ระบบ คือ เอสเตอเรส เปอร์ออกซิเดส แอซิดฟอสฟาเทส มาเลทดีไฮโดรจีเนส ไทโรซิเนส และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส พบว่า สายพันธุ์เซลล์ C_8 ให้แถบเอนไซม์แตกต่างจากสายพันธุ์เซลล์อื่นเมื่อย้อมด้วยระบบ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส ในขณะที่ระบบอื่นๆ ให้แถบเอนไซม์ที่ไม่แตกต่างกันในทุกสายพันธุ์เซลล์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของรังสี UV-C และ สาร EMS ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะกล็อกซิเนีย ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. เพื่อสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมในกล็อกซิเนีย
3. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการชักนำการกลายพันธุ์ในพืชชนิดอื่นๆ ต่อไป

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุ และอุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

- ในการศึกษานี้ใช้ใบอ่อนกล็อกซิเนียสายพันธุ์ Quick red อายุ 1 เดือนที่ได้จากการชักนำยอดรวมจากชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร MS เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้การให้แสง นาน 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส

1.2 สิ่งก่อกลายพันธุ์

- รังสี UV-C ที่ได้จากหลอดขนาด 40 วัตต์ ซึ่งใช้ฆ่าเชื้อในตู้ย้ายเลี้ยง
- สาร EMS

1.3 สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS

ประกอบด้วย ธาตุอาหารหลัก NH_4NO_3 KNO_3 KH_2PO_4 $CaCl_2.2H_2O$ และ $MgSO_4.7H_2O$ ธาตุอาหารรอง KI H_3BO_3 $MnSO_4.H_2O$ $ZnSO_4.7H_2O$ $CuSO_4.5H_2O$, $Na_2MoO_4.2H_2O$ $CoCl_2.6H_2O$ $FeSO_4.7H_2O$ และ Na_2EDTA สารอินทรีย์ Myo-inositol Nicotinic acid Pyridoxine HCl Thiamine HCl และ Glycine (รายละเอียดแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1)

- สารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ KN
- น้ำตาลซูโครส

- วุ้นตรานางเงือก

สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคไอโซไซม์

- สารเคมีที่ใช้สกัดเอนไซม์ และการทำอิเล็คโตโฟริซีส ประกอบด้วย Tris-HCl ค่า pH 8.6 และ 6.8 ความเข้มข้น 1.5 และ 0.5 โมลาร์ ตามลำดับ polyvinylpyrrolidone K 90 (PVP) 2-mercaptonethanol Na_2EDTA polyacrylamide gel (acrylamide เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ และ bisacrylamide เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์) N, N, N′, N′-tetramethyl ethylenediamine (TEMED) ammoniumperoxydisulphate (APS) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ Glycine

- กรดไฮโดรคลอริก เมทานอล และ เอทานอล

- สารเคมีย้อมสีเอนไซม์ 2 ระบบประกอบด้วย 3-Amino-9-ethylcarbazole β-Napthol Acetone Tris-HCl Acetic acid Phosphate buffer Monobasic sodium Dibasic sodium Fast blue B salt α-Napthyl acetate in absolute alcohol (รายละเอียดแสดงในตาราง ภาคผนวกที่ 2)

2. อุปกรณ์การทดลอง

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- อุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร ประกอบด้วย เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้อบไมโครเวฟ เครื่องคนสารละลาย และแท่งแม่เหล็ก

- อุปกรณ์ในการย้ายเลี้ยง ประกอบด้วย ปากคีบ กระดาษชำระ ตู้ย้ายเลี้ยง ด้ามมีด และใบมีดผ่าตัด

- เครื่องแก้วชนิดต่างๆ ประกอบด้วย ปิเปต กระบอกตวง ไมโครปิเปต ขวดปรับปริมาตร บิกเกอร์ ขวดบรรจุอาหาร 4 ออนซ์พร้อมฝาปิด

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบเอนไซม์

- อุปกรณ์สำหรับสกัดเอนไซม์ ประกอบด้วย โกร่ง หลอดเอฟเพนดอร์ฟ และเครื่องเซนตริฟิวก์

- เครื่องอิเล็กโตรโฟริซิสแนวตั้ง และเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

2.3 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์แอนโธไซยานิน

- อุปกรณ์สำหรับสกัดแอนโธไซยานิน ประกอบด้วย โกร่ง หลอดทดลอง และเครื่องเซนตริฟิวก์ ที่วางหลอดทดลอง
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

วิธีดำเนินการ

1. ศึกษาผลของรังสี UV-C ต่อการกลายพันธุ์ของกล็อกซิเนีย

1. 1 ศึกษาผลของปริมาณ และระยะเวลาการฉายรังสี UV-C ต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนีย

นำชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนีย มาวางบนจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ใช้อาหารเหลวสูตร MS เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KN 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หยดเป็นชั้นบางๆ เพื่อป้องกันการแห้งของชิ้นส่วนพืช นำมาฉายรังสี UV-C ปริมาณ 0 1.2 1.8 2.4 3.0 3.6 5.4 7.2 และ 9.0 กิโลจูลต่อตารางเมตร (วัดปริมาณรังสีด้วยเครื่องวัดแสงซึ่งมีหน่วยเป็น วัตต์ต่อตารางเมตร แล้วนำมาคำนวณให้เป็นหน่วย กิโลจูลต่อตารางเมตร) จากนั้น นำชิ้นส่วนใบที่ได้มาซับด้วยกระดาษกรองฆ่าเชื้อจนแห้ง นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KN 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในสภาพที่มืด อุณหภูมิ 26± 2องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นจึงย้ายมาเลี้ยงในที่มีแสง ต่ออีกเป็นเวลา 14 วัน บันทึกอัตราการรอดชีวิต และหาค่า LD_{50}

1.2 ศึกษาผลของรังสี UV-C ต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียในหลอดทดลอง

ศึกษาเปรียบเทียบการพัฒนาของชิ้นส่วนใบในแต่ละปริมาณรังสี ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 30 วัน โดยดูลักษณะ และสีของแคลลัส เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมและจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน

2. ศึกษาผลของ EMS ต่อการกลายพันธุ์ของกล็อกซิเนีย

2.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลาย EMS และระยะเวลาจุ่มแช่ต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนีย

นำชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียมาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ระดับความเข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (ละลาย EMS ด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต บรรจุในฟลาสก์ ๆ ละ 30 มิลลิลิตร) จุ่มแช่นาน 60 และ 90 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำชิ้นส่วนใบที่ได้มาซับด้วยกระดาษกรองฆ่าเชื้อจนแห้ง นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KN 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในสภาพที่มีแสง ภายหลังการเพาะเลี้ยง 28 วัน บันทึกอัตราการรอดชีวิต และลักษณะการพัฒนาของชิ้นส่วนใบในแต่ละปริมาณรังสี และระยะเวลา และหาค่า LD_{50}

2.2 ศึกษาผลของสาร EMS ต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียในหลอดทดลอง

ศึกษาเปรียบเทียบการพัฒนาของชิ้นส่วนใบภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 30 วัน ในแต่ละความเข้มข้นของสาร EMS และระยะเวลาการจุ่มแช่ โดยดูลักษณะ และสีของแคลลัส เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวม และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน

ในการศึกษาที่ 1 และ 2 ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ๆ ละ 15 ใบ โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) เปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

3. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล็อกซิเนีย

3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของต้นอ่อนภายหลังออกปลูกภายในโรงเรือน

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานที่เกิดขึ้น จากต้นที่ได้รับรังสี UV-C และ EMS ปริมาณต่าง ๆ โดยตัดยอดกล็อกซิเนียไปชักนำรากบนอาหารสูตร ½ MS ภายหลังการเพาะเลี้ยง 14 วัน ย้ายต้นกล้ากล็อกซิเนียไปอนุบาลในวัสดุปลูก เพอไลต์ : เวอมิคิวไลต์ (1:1) หลังจากการย้ายปลูก

เป็นเวลาประมาณ 60 วัน ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของต้น และดอก โดยการบันทึก ความกว้างของทรงพุ่ม ความสูงของลำต้น ความกว้าง และความยาวของใบ และดอก ในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 ต้น โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี DMRT

3.2 ศึกษาปริมาณแอนโธไซยานิน

ชั่งน้ำหนักกลีบดอกกล็อกซิเนียประมาณ 0.1 กรัม มาสกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นแยก ความเร็วรอบสูง 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนบนที่ใส ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง เพื่อคำนวณหาปริมาณแอนโธไซยานิน ตามวิธีการของ (Zhong *et al.,* 1991 อ้างโดย อัญจนา 2547)

การคำนวณหาปริมาณแอนโธไซยานินโดยใช้สูตร

$$AC = (27.208A + 0.0591)\ DF\ (10/1{,}000 \times FW)$$

โดยที่ AC = ปริมาณแอนโธไซยานิน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)

A = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

FW = น้ำหนักสดกลีบดอกกล็อกซิเนีย (กรัม)

DF = ปริมาตรสารละลายที่ใช้เจือจาง (มิลลิลิตร)

3.3 ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเทคนิคไอโซไซม์

เก็บรวบรวมใบที่ 1-4 นับจากยอด ของต้นกล็อกซิเนียที่ได้ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ และต้นที่ไม่ได้ชักนำการกลายพันธุ์ มาบดร่วมกับบัฟเฟอร์สำหรับสกัดเอนไซม์ (extraction buffer) ปริมาตร 5 : 1 เท่าของน้ำหนักพืชในโกร่งเย็นให้ละเอียด จากนั้นจึงนำของเหลวที่ได้เทใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสตอนบน (supernatant) ใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟใหม่ที่สะอาด แล้วนำมาแยกเอนไซม์ด้วยเครื่องอิเลคโตรโฟริซิสแนวตั้ง โดยใช้ตัวกลางหรือตัวค้ำจุนเป็นเจลโพลีอะคริลาไมด์ แบบไม่ต่อเนื่อง ซึ่งประกอบด้วย stacking gel และส่วน separating gel ดูดสารละลายส่วนใสที่สกัดจากตัวอย่างใบกล็อกซิเนียมา 15 ไมโครลิตร ผสมกับ bromphenol blue 2

ไมโครลิตร หยอดใส่ร่องหวีบนแผ่นเจลที่เตรียมไว้ซึ่งแต่ละแผ่นเจลสามารถใส่ตัวอย่างได้ 10 ตัวอย่าง ทดลองพร้อมกันครั้งละ 2 แผ่น แล้วแยกเอนไซม์ในสารละลายอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ ภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง หรือจนแถบของ bromphenol blue เคลื่อนที่มาถึงขอบล่างของเจล หลังจากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมสีเพื่อตรวจสอบเอนไซม์ 2 ระบบ คือ ระบบเปอร์ออกซิเดส (peroxidase; PER) และ ระบบแอลฟาเอสเตอเรส (α-esterase; EST)

การย้อมสีเอนไซม์ข้างต้นทำในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วประมาณ 60 รอบต่อนาที รอจนเห็นไซโมแกรมชัดเจน คงที่ ไม่เปลี่ยนแปลงจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง เปรียบเทียบความแตกต่างของไซโมแกรมในแต่ละการทดลอง

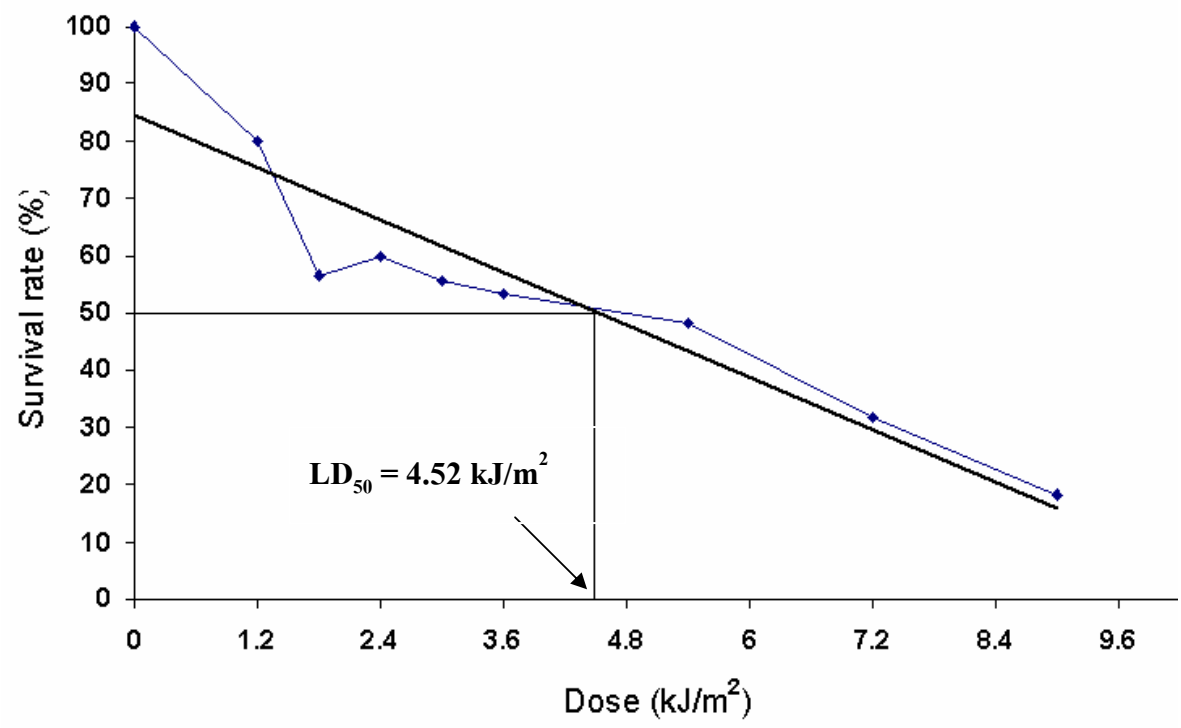
บทที่ 3

ผล

1. ผลของรังสี UV-C ต่อกล็อกซิเนีย

1.1 ผลของรังสี UV-C ต่ออัตราการรอดของชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียในหลอดทดลอง

จากการฉายรังสี UV-C กับชิ้นส่วนใบอ่อนกล็อกซิเนียอายุ 1 เดือน และวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดรวมสูตร MS ร่วมกับ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนใบ พบว่า ที่ปริมาณรังสี UV-C 0 1.2 1.8 2.4 3.0 3.6 5.4 7.2 และ 9.0 กิโลจูลต่อตารางเมตร ให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนใบ 100 80 56.67 60.00 55.55 53.33 48.33 31.67 และ 18.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อศึกษาระดับปริมาณรังสี UV-C มีค่า LD_{50} ประมาณ 4.52 กิโลจูลต่อตารางเมตร (ภาพที่ 2) โดยอัตราการรอดชีวิตในแต่ละชุดทดลองมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ลักษณะของชิ้นส่วนใบที่รอดชีวิต คือ ใบยังคงมีสีเขียว เกิดการบวม ขอบใบจะม้วน และมีขนาดใหญ่ขึ้น และเริ่มมีการสร้างแคลลัสสีเขียว ใส บริเวณขอบใบ ในขณะที่ชิ้นส่วนใบที่ตาย ใบจะเกิดอาการเหี่ยว สีของใบจะเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ และไม่มีการม้วนบริเวณขอบใบ แต่เมื่อวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบดังกล่าวเป็นเวลาประมาณ 45 วัน พบว่า เริ่มมีการสร้างแคลลัสขนาดเล็กขึ้นบริเวณขอบใบและบริเวณเส้นกลางใบ ลักษณะแคลลัสเกาะตัวกันแน่น มีสีน้ำตาลเข้มหรือดำ แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดรวมได้

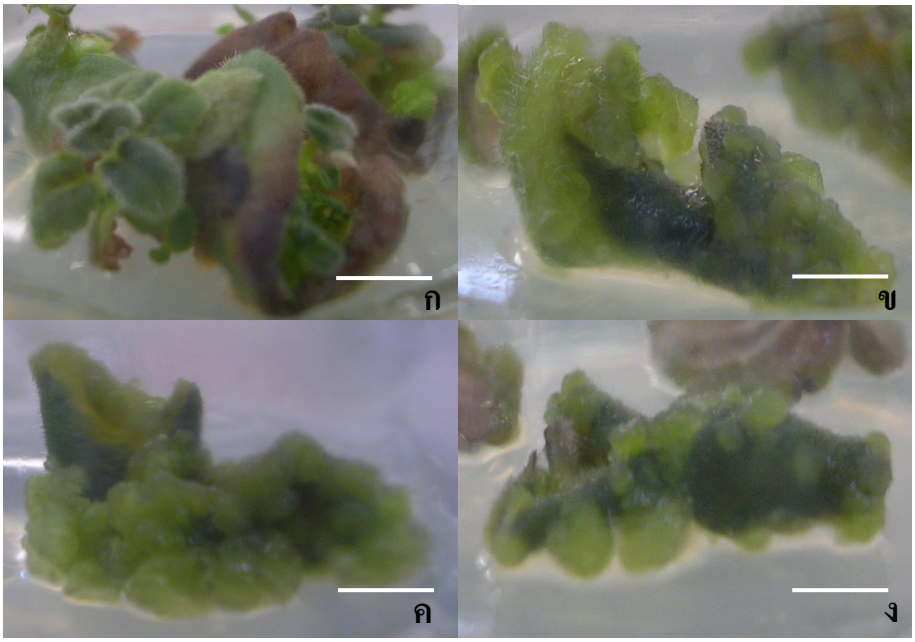


ภาพที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียภายหลังการฉายรังสี UV-C และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดรวม (MS + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + KN 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 28 วัน

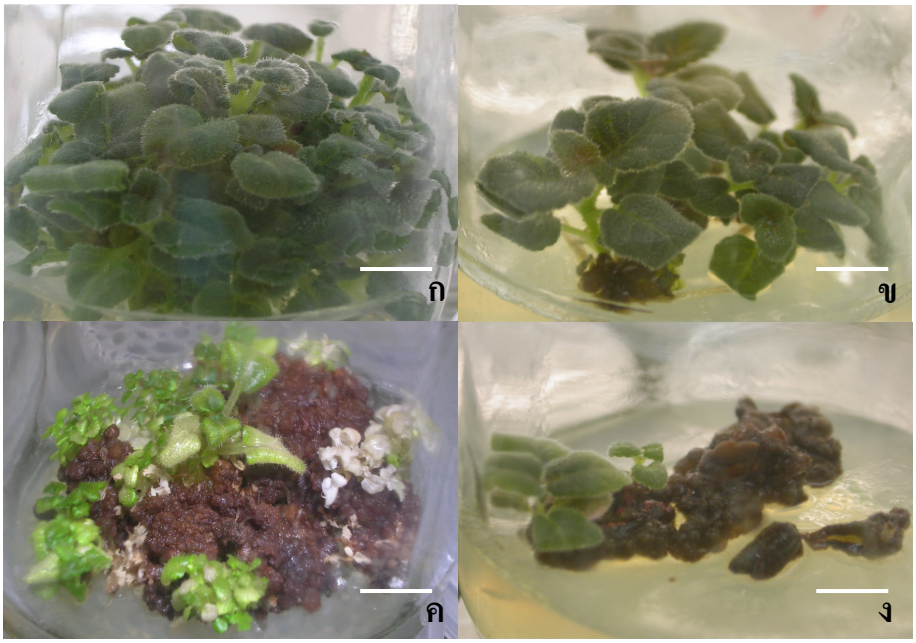
1.2 ผลของรังสี UV-C ต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียในหลอดทดลอง

ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียที่ฉายรังสีปริมาณต่างๆ บนอาหารสูตรชักนำยอดรวมเป็นเวลา 28 วัน พบว่า ชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียเริ่มมีการสร้างแคลลัส ลักษณะของแคลลัสเมื่อเริ่มสร้างจะเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ (friable callus) มีสีเขียว ใส มีทั้งที่เกิดขึ้นบริเวณรอบๆขอบใบ บริเวณที่เกิดบาดแผล และเกิดกระจายทั่วไปบนใบ ซึ่งลักษณะของแคลลัสดังกล่าวจะเริ่มมีการพัฒนาเป็นแคลลัสที่เกาะตัวกันแน่น (compact callus) และมีสีเขียวเข้มมากขึ้น (ภาพที่ 3) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 30 วัน ที่ปริมาณรังสี 0 1.2 1.8 2.4 3.0 และ 3.6 กิโลจูลต่อตารางเมตร แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นยอดรวมได้ตามปกติ แต่มีการพัฒนาช้ากว่าชิ้นส่วนใบที่ไม่ได้ฉายรังสี ที่ปริมาณรังสี 5.4 7.2 และ 9.0 กิโลจูลต่อตารางเมตร แคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเข้ม เริ่มเกิดเป็นกลุ่มแคลลัสขนาดใหญ่มีสีน้ำตาลเข้ม หรือสีดำ และมีการตายของเซลล์บางส่วน แต่กลุ่มแคลลัสดังกล่าวสามารถพัฒนาไปเป็นยอดรวมได้ แต่มีจำนวนยอดรวมน้อย และมีลักษณะผิดปกติ คือ ยอด และใบมีขนาดเล็ก สีเขียวอ่อน และซีด (ภาพที่ 4ค) เมื่อตัด

ชิ้นส่วนใบสีเขียวอ่อน และซีดมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดรวม พบว่า ชิ้นส่วนใบที่มีสีเขียวอ่อนสามารถเจริญเป็นยอดรวมได้ตามปกติ ส่วนชิ้นส่วนใบซีดนั้น บางชิ้นส่วนสามารถเจริญเป็นยอดรวมตามปกติเช่นเดียวกัน ซึ่งลักษณะยอดรวมที่เกิดขึ้นใหม่นั้นมีสีเขียวเหมือนยอดปกติ แต่มีบางชิ้นส่วนที่ไม่สามารถเจริญเป็นแคลลัสหรือยอดรวมได้ ใบเกิดอาการเหี่ยว กลายเป็นสีน้ำตาลหรือดำ และตายในที่สุด ส่วนชิ้นส่วนใบที่ไม่ได้ฉายรังสีมีการพัฒนาเป็นยอดตามปกติ ใบมีสีเขียวเข้ม และมีขนาดใหญ่ มีเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวม และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนสูงเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนใบที่ฉายรังสี โดยมีความสามารถในการสร้างยอดรวม 96.67 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดรวมเฉลี่ยสูงสุด 21.63 ยอดต่อชิ้นส่วน แตกต่างกับชิ้นส่วนใบที่ฉายรังสีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ชิ้นส่วนใบที่ฉายรังสีปริมาณ 1.2 1.8 2.4 3.0 3.6 และ 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร มีความสามารถในการสร้างยอดรวม 80.0 60.00 40.00 33.34 31.67 30.00 และ 26.67 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดรวมเฉลี่ย 16.50 16.00 15.75 11.25 7.50 3.50 และ 3.25 ยอดต่อหนึ่งชิ้นส่วน ตามลำดับ ส่วนที่ปริมาณรังสี 9.0 กิโลจูลต่อตารางเมตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมน้อยที่สุดคือ 13.33 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดรวมเฉลี่ย 3.25 ยอดต่อหนึ่งชิ้นส่วน (ตารางที่ 1) และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลาประมาณ 60 วัน ยอดรวมที่เกิดจากชิ้นส่วนใบที่ฉายรังสีปริมาณ 7.2 และ 9.0 กิโลจูลต่อตารางเมตร เริ่มเหี่ยวลง และใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีการสร้างสารประกอบฟีโนลิก สังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของอาหารที่เพาะเลี้ยง คือจากปกติใส เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนยอดรวมที่เกิดจากชิ้นส่วนใบที่ฉายรังสีปริมาณอื่น สามารถเจริญได้ตามปกติ ซึ่งยอดรวมที่เกิดขึ้นดังกล่าวจะตัดเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำรากสูตร ½ MS เป็นเวลา 14 วัน และนำออกปลูกในโรงเรือนเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานต่อไป



ภาพที่ 3 ลักษณะแคลลัสจากชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียภายหลังการฉายรังสี UV-C ปริมาณต่างๆ (ก) 0 kJ/m^2 (ข) 1.8 kJ/m^2 (ค) 2.4 kJ/m^2 และ (ง) 5.4 kJ/m^2 (บาร์ = 0.5 ซม)



ภาพที่ 4 ลักษณะยอดรวมจากชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียภายหลังการฉายรังสี UV-C ปริมาณต่างๆ (ก) 0 kJ/m^2 (ข) 3.6 kJ/m^2 (ค) 5.4 kJ/m^2 และ (ง) 9.0 kJ/m^2 (บาร์ = 1.0 ซม)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวม และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนของกล็อกซิเนียภายหลังการฉายรังสี UV-C และวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ปริมาณรังสี (kJ/m^2)	% การสร้างยอดรวม	จำนวนยอด / ชิ้นส่วน
0	96.67a	21.63a
1.2	80.00ab	16.50b
1.8	60.00cb	16.00b
2.4	40.00cd	15.75b
3.0	33.34d	11.25cb
3.6	31.67d	7.50cd
5.4	30.00d	3.50d
7.2	26.67d	3.25d
9.0	13.33d	3.25d
F-test	*	*
C.V. (%)	34.56	27.01

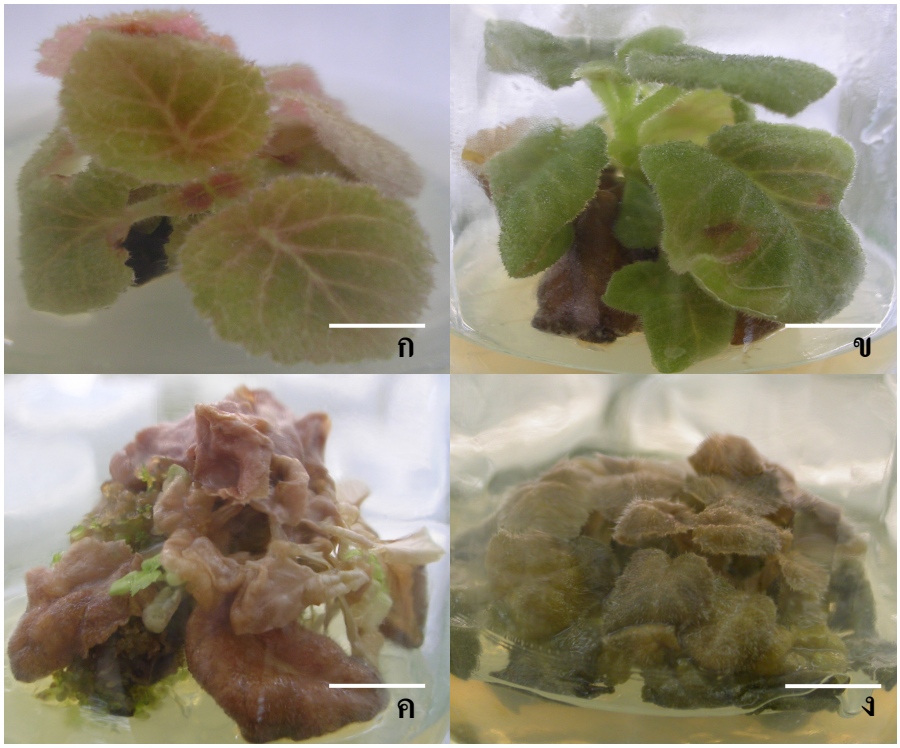
* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

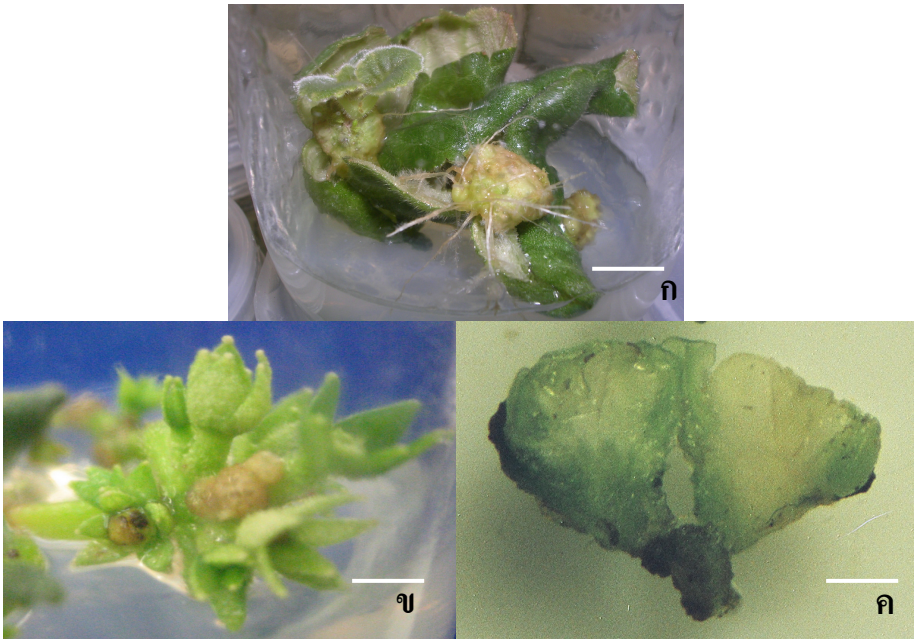
1.3 ผลของรังสี UV-C ต่อความผิดปกติของลักษณะทางสัณฐานในหลอดทดลอง

เมื่อทำการย้ายเลี้ยงชิ้นส่วนใบ และก้านใบจากต้นที่ฉายรังสีลงบนอาหารสูตรชักนำยอดรวม (MS + IAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + KN 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่า ชิ้นส่วนใบ และก้านใบที่มาจากต้นที่ฉายรังสีปริมาณ 0 1.2 1.8 2.4 3.0 3.6 และ 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร สามารถเจริญเป็นยอดรวมได้ตามปกติ แต่ลักษณะยอดที่เกิดขึ้นจากต้นที่ฉายรังสี มีใบขนาดใหญ่ และสีเขียวเข้มกว่าปกติ ชิ้นส่วนใบที่ฉายรังสีปริมาณ 7.2 กิโลจูลต่อตารางเมตร ยอดรวมที่เกิดขึ้นมีจำนวนน้อยมีใบขนาดใหญ่ เส้นกลางใบ และเส้นใบมีสีแดง และเมื่อวางเลี้ยงได้ระยะหนึ่งยอดรวมดังกล่าวนั้น จะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 5ก) และเมื่อย้ายเลี้ยงชิ้นส่วนใบที่มีสีแดงดังกล่าววางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดรวม พบว่า ชิ้นส่วนใบไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ เกิดเป็นสีน้ำตาล หรือดำ และตายในที่สุด หรือบางต้นใบขนาดใหญ่ มีสีเขียวอ่อน เมื่อวางเลี้ยงได้ระยะหนึ่ง

ใบจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตาย (ภาพที่ 5ข) ส่วนต้นที่ได้รับรังสีปริมาณ 9.0 กิโลจูลต่อตารางเมตร ใบมีขนาดใหญ่ สีเขียวอ่อน และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเช่นเดียวกัน และเกิดกลุ่มยอดขนาดเล็ก สีเขียวอ่อน บริเวณฐานของต้น บางส่วนของกลุ่มยอดขนาดเล็กมีสีน้ำตาล (ภาพที่ 5ค) และบางต้นมีใบขนาดปกติ แต่มีสีน้ำตาล หรือดำ (ภาพที่ 5ง) นอกจากนี้ยังพบลักษณะผิดปกติ จากชิ้นส่วนก้านใบจำนวนสองก้านที่มาจากต้นที่ฉายรังสีปริมาณ 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร มีการพัฒนาเป็นดอก โดยมีจำนวนดอกต่อก้าน 9 และ 4 ดอก ซึ่งดอกที่เกิดขึ้นมีลักษณะเหมือนกันทุกดอก คือมีกลีบดอก และก้านดอกสีเขียว ประกอบด้วยส่วนก้านดอก กลีบเลี้ยง 5 กลีบ (ภาพที่ 6ข) เมื่อผ่าดอกตามยาวเพื่อศึกษาลักษณะภายในของดอก พบว่า ไม่มีการพัฒนาของ กลีบดอก เกสรตัวผู้ และ เกสรตัวเมีย (ภาพที่ 6ค) ส่วนชิ้นส่วนใบมีการพัฒนาเป็นยอดตามปกติ (ภาพที่ 6ก) เมื่อทำการย้ายเลี้ยงดอกดังกล่าวบนอาหารสูตรชักนำยอดรวม โดยการวางเลี้ยงทั้งดอก และแยกวางเลี้ยงเฉพาะส่วนกลีบเลี้ยง พบว่า เมื่อวางเลี้ยงทั้งดอก ส่วนก้านดอกมีการสร้างยอดรวมปกติ แต่ตรงบริเวณดอกเกิดเป็นสีน้ำตาลเข้ม และตาย ส่วนการแยกวางเลี้ยงเฉพาะกลีบเลี้ยง ชิ้นส่วนพืชไม่พัฒนา เกิดเป็นสีน้ำตาล และตายเช่นเดียวกัน



ภาพที่ 5 ลักษณะยอดรวมผิดปกติ จากชิ้นส่วนใบที่ฉายรังสี UV-C ปริมาณ 7.2 kJ/m^2 (ก และ ข) และ 9.0 kJ/m^2 (ค และ ง) (บาร์ = 1 ซม)



ภาพที่ 6 การพัฒนาของชิ้นส่วนใบ (ก) และ ชิ้นส่วนก้านใบของกล็อกซิเนีย (ข) ภายหลังจากการย้ายเลี้ยงลงบนอาหารสูตรชักนำยอดรวม จากต้นที่ฉายรังสี UV-C ปริมาณ 5.4 kJ/m^2 และ ลักษณะภายในของดอกเมื่อผ่าตามยาว (ค) (บาร์ = 0.5 ซม)

1.4 ผลของรังสี UV-C ต่อลักษณะทางสัณฐานของต้นกล็อกซิเนียภายหลังขยายพันธุ์ในสภาพที่ปลูกภายในโรงเรือน

จากการนำต้นกล็อกซิเนียที่ฉายรังสี UV-C และไม่ได้ฉายรังสี มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำราก (1/2 MS) เป็นเวลา 14 วัน และย้ายลงแปลงปลูก หลังจากย้ายปลูกเป็นเวลาประมาณ 60 วัน พบว่า ต้นกล็อกซิเนียที่ฉายรังสี มีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นที่ไม่ได้ฉายรังสี สังเกตได้จาก ต้นมีขนาดเล็กกว่า และออกดอกช้ากว่าต้นปกติประมาณ 7 วัน ซึ่งต้นปกติมีลักษณะใบใหญ่หนา สีเขียวเข้ม ขอบใบหยัก ต้นที่ได้รับรังสี ปริมาณ 1.2 1.8 และ 2.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร มีลักษณะใบ ขอบใบ และขนาดใบ คล้ายกับต้นปกติ และช่วงเวลาการออกดอกใกล้เคียงกัน แต่ต้นที่ได้รับรังสีในปริมาณสูงคือ 3.0 3.6 และ 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร พบว่า บางต้นมีลำต้นมีลักษณะแคระแกร็น ใบมีขนาดเล็กกว่าปกติ บาง ใบหงิก ใบมีขอบหยักน้อย เมื่อศึกษาความกว้างทรงพุ่ม พบว่า ต้นกล็อกซิเนียที่ฉายรังสีปริมาณ 0 1.2 1.8 2.4 3.0 3.6 และ 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร มีความกว้างทรงพุ่มเฉลี่ย 29.78 23.08 22.10 20.50 18.85 18.75 และ 15.58 เซนติเมตร ตามลำดับ

ความสูงของต้นเฉลี่ย 0.99 0.99 0.98 0.97 0.95 0.94 และ 0.93 เซนติเมตร ตามลำดับ ความกว้างของใบ 11.48 9.75 8.23 5.85 5.03 4.43 และ 4.33 เซนติเมตร และความยาวใบ 14.20 12.40 11.95 7.73 6.85 4.43 และ 4.33 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2 ภาพที่ 7) โดยที่ ความกว้างทรงพุ่ม ความยาว และความกว้างใบ ของแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความสูงของลำต้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สำหรับผลของรังสี UV-C ต่อการชักนำให้เกิดลักษณะการกลายพันธุ์ของดอกกล็อกซิเนียนั้น พบลักษณะของดอกที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งต้นปกติมีดอกสีแดงทั้งดอก กลีบดอกบาง กลีบดอกซ้อนกัน 3 ชั้น (ภาพที่ 8 แถวที่ 1) ดอกกล็อกซิเนียที่เกิดจากต้นที่ฉายรังสีปริมาณ 1.2 1.8 2.4 และ 3.0 กิโลจูลต่อตารางเมตร พบว่ามีลักษณะดอกใกล้เคียงกับดอกปกติ (ภาพที่ 8 แถวที่ 2) ต้นกล็อกซิเนียที่ได้จากการฉายรังสี ปริมาณ 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร มีลักษณะดอกผิดปกติมากที่สุด คือ จากสีแดงปกติ เป็นสีแดงเข้ม กลีบดอกคล้ายกำมะหยี่ และมีกลีบดอกเพียงสองชั้น กลีบดอกหนา มีบางดอก สีดอกอ่อนลง ขอบดอกหยัก และมีขอบสีขาว ห่างจากปลายกลีบดอกเข้ามาประมาณ 0.3 มิลลิเมตร เป็นต้น (ภาพที่ 8 แถวที่ 3 และ 4)

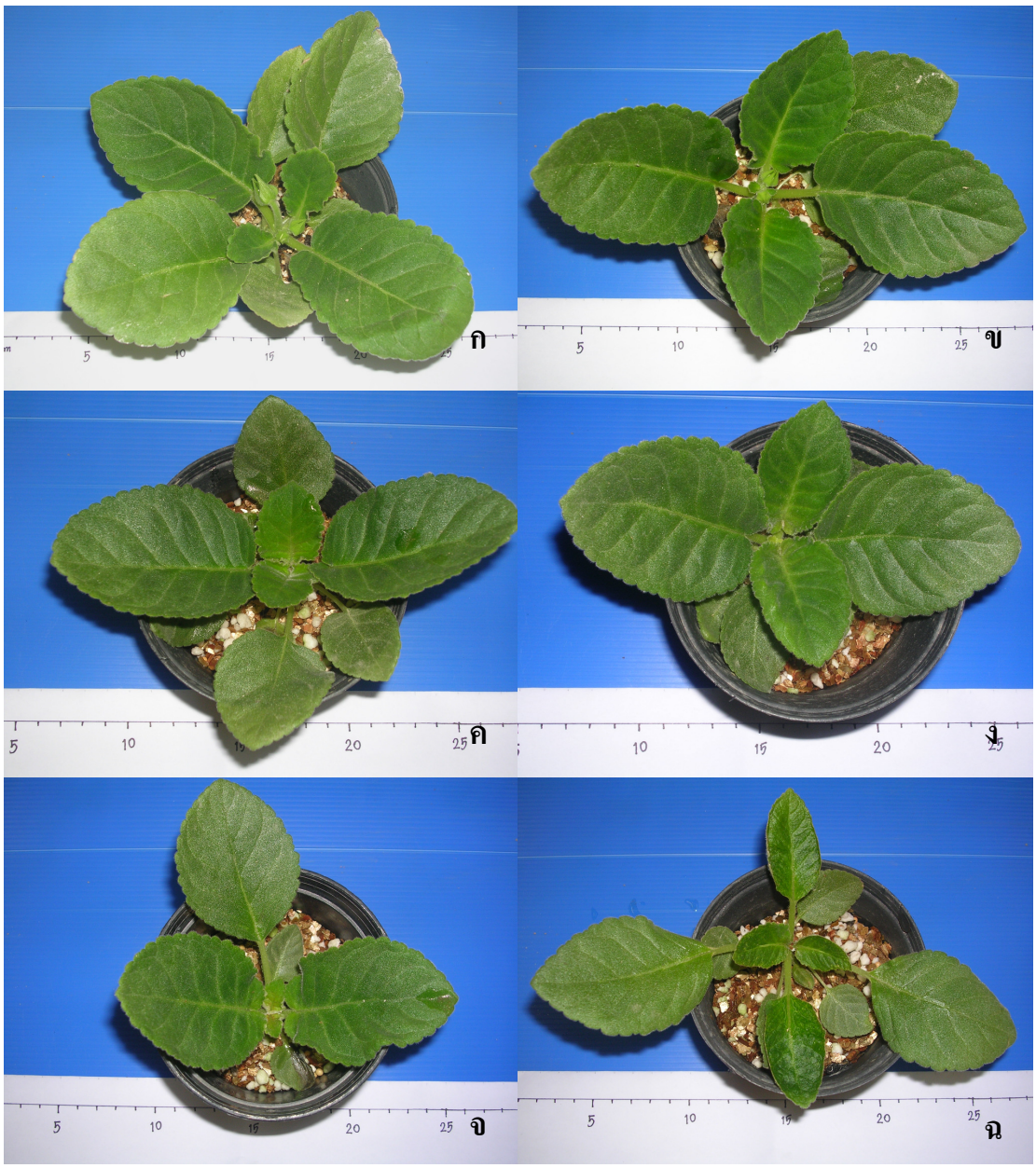
ตารางที่ 2 ผลของรังสี UV-C ต่อลักษณะทางสัณฐานของต้นกล็อกซิเนีย หลังจากย้ายลงแปลงปลูกเป็นเวลาประมาณ 60 วัน

ปริมาณรังสี (kJ/m^2)	ความกว้างทรงพุ่ม (ซม)	ความสูงลำต้น (ซม)	ความกว้างใบ (ซม)	ความยาวใบ (ซม)	ความกว้างดอก (ซม)	ความยาวดอก (ซม)
0	29.78a	0.99a	11.48a	14.20a	5.07a	4.15a
1.2	23.08b	0.99a	9.75b	12.40b	4.80a	4.02ab
1.8	22.10b	0.98a	8.23c	11.95c	4.65abc	3.68ab
2.4	20.50bc	0.97a	5.85d	7.73d	4.45abc	3.49ab
3.0	18.85bc	0.95a	5.03de	6.85d	4.18abc	3.50ab
3.6	18.75bc	0.94a	4.43e	6.43d	3.90bc	3.36ab
5.4	15.58c	0.93a	4.33e	6.20d	3.63c	3.23b
F-test	*	Ns	*	*	*	*
C.V. (%)	18.75	14.75	10.48	9.26	15.73	13.16

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 7 ลักษณะต้นกล็อกซิเนียที่ฉายรังสี UV-C ปริมาณต่าง ๆ (ก) 0 kJ/m^2 (ข) 1.8 kJ/m^2 (ค) 2.4 kJ/m^2 (ง) 3.0 kJ/m^2 (จ) 3.6 kJ/m^2และ (ฉ) 5.4 kJ/m^2

ภาพที่ 8 ลักษณะของดอกกล็อกซิเนียที่ได้จากการฉายรังสี UV-C ปริมาณต่างๆ

แถวที่ 1: ดอกกล็อกซิเนียจากการฉายรังสีปริมาณ 0 kJ/m^2

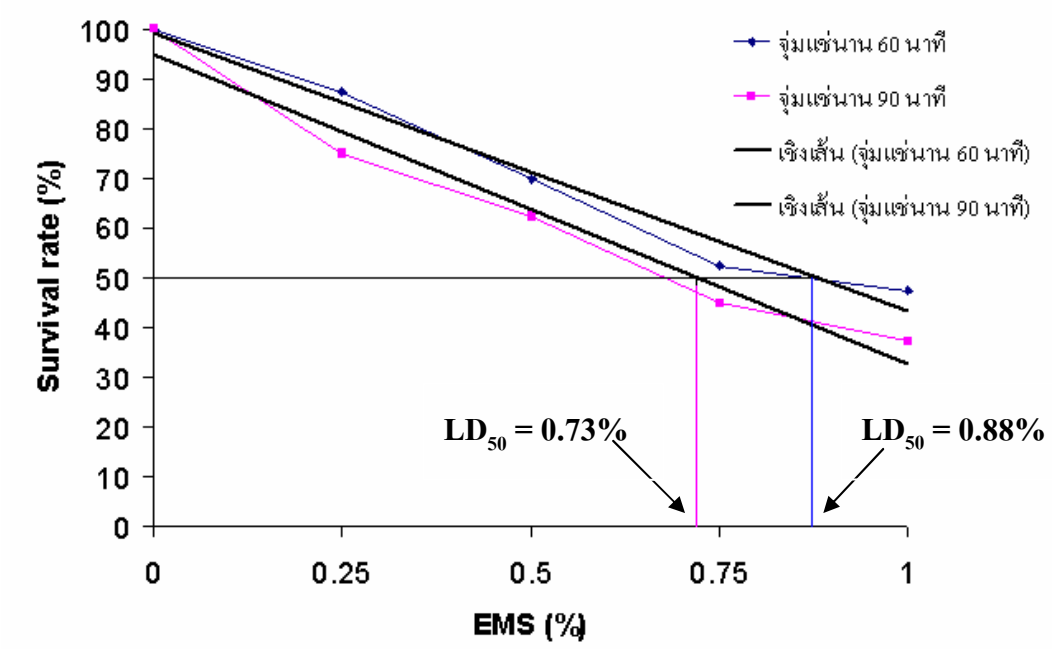
แถวที่ 2: ดอกกล็อกซิเนียจากการฉายรังสีปริมาณ 3.0 kJ/m^2

แถวที่ 3 และ4: ดอกกล็อกซิเนียจากการฉายรังสีปริมาณ 5.4 kJ/m^2 (บาร์ = 1.5 ซม)

2. ผลของ EMS ต่อกล็อกซิเนีย

2.1 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย EMS และระยะเวลาจุ่มแช่ ต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียในหลอดทดลอง

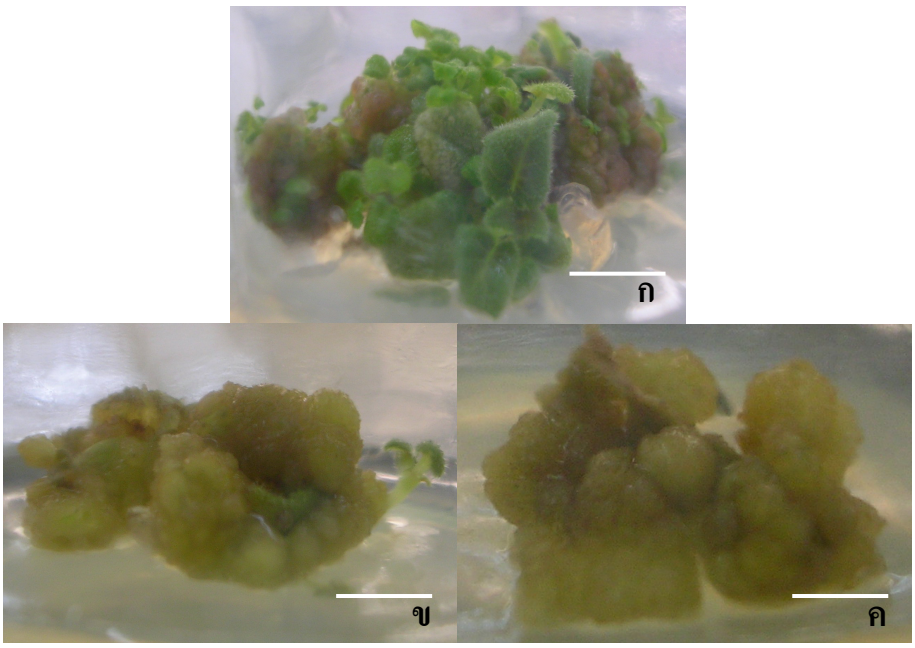
หลังจากการจุ่มแช่ชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 และ 90 นาที เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน พบว่าชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียที่จุ่มแช่สารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 นาที มีอัตราการรอดชีวิต 100 87.5 70 52.5 และ 47.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนชิ้นส่วนใบที่จุ่มแช่สารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 90 มีอัตราการรอดชีวิต 100 75 62.5 45 และ 37.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ค่า LD_{50} คือ ที่ความเข้มข้นของสารละลาย EMS 0.88 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาการจุ่มแช่นาน 60 นาที และ ที่ความเข้มข้นของสารละลาย EMS 0.73 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาการจุ่มแช่นาน 90 นาที (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียภายหลังจุ่มแช่สาร EMS ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ และอาหารสูตร MS + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + KN 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2 ผลของ EMS ต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียในหลอดทดลอง

เมื่อศึกษาการพัฒนาของชิ้นส่วนใบภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดรวมเป็นเวลา 30 วัน พบว่า ชิ้นส่วนใบที่ได้รับสาร EMS ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ เริ่มมีการพัฒนาเป็นแคลลัส ในขณะที่ชิ้นส่วนใบที่ไม่ได้จุ่มแช่สาร EMS มีการพัฒนาเป็นกลุ่มยอดรวม (ภาพที่ 10ก) ลักษณะแคลลัสที่ได้เป็นกลุ่มแคลลัสที่เกาะตัวกันแน่น (compact callus) ในระยะเริ่มแรกแคลลัสที่เกิดขึ้นมีสีเหลืองอ่อน เกิดขึ้นบริเวณขอบใบ และบริเวณที่มีบาดแผล เช่น ชิ้นส่วนใบที่จุ่มแช่สารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น EMS 0.5 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 60 และ 90 นาที ชิ้นส่วนใบเกิดการพัฒนาเป็น compact callus มีสีเหลืองเข้ม และ มีกลุ่มเซลล์บางส่วนเกิดเป็นสีน้ำตาล แต่ยังสามารถพัฒนาเป็นยอดรวมได้ แต่ปริมาณยอดรวมที่เกิดขึ้นมีจำนวนน้อย (ภาพที่ 10ข และ ค) ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 45 วัน แคลลัสจะเริ่มมีสีเขียว และพัฒนาเป็นกลุ่มแคลลัสที่มีขนาดใหญ่มากขึ้น และเริ่มมียอดเกิดขึ้น เมื่อศึกษาความสามารถในการสร้างยอดรวม พบว่า ชิ้นส่วนใบที่จุ่มแช่สารละลาย EMS ทุกความเข้มข้น สามารถเจริญเป็นยอดรวมได้ ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย EMS 0 0.25 0.50 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่ชิ้นส่วนใบเป็นเวลา 60 นาที มีความสามารถในการสร้างยอดรวม 96.67 70.00 36.67 46.67 และ 35.00 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดรวมเฉลี่ย 22.50 12.00 12.50 9.75 และ 9.75 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้นของสารละลาย EMS ดังกล่าว แต่จุ่มแช่นาน 90 นาที ชิ้นส่วนใบมีความสามารถในการสร้างยอดรวม 96.67 73.33 51.67 26.67 และ 26.67 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดรวมเฉลี่ย 22.50 11.00 10.75 9.50 และ 9.50 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับชิ้นส่วนใบที่ไม่ได้จุ่มแช่สารละลาย EMS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 10 ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการจุ่มแช่ชิ้นส่วนใบในสาร EMS 0.5% ที่ระยะเวลาต่างๆ และวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดรวม (MS + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + KN 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 45 วัน (ก) 0 นาที (ข) 60 นาที และ (ค) 90 นาที (บาร์ = 0.5 ซม)

ตารางที่ 3 อัตราการสร้างยอดรวม และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนของกล็อกซิเนียภายหลังการจุ่มแช่สารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ

ความเข้มข้นของ EMS (%)	60 นาที		90 นาที	
	% การสร้างยอดรวม	จำนวนยอด/ชิ้นส่วน	% การสร้างยอดรวม	จำนวนยอด/ชิ้นส่วน
0	96.67a	22.50a	96.67a	22.50a
0.25	70.00b	12.00b	73.33ab	11.00b
0.50	36.67c	12.50b	51.67bc	10.75b
0.75	41.67c	9.75b	26.67c	9.50b
1.0	35.00c	9.75b	26.67c	9.50b
F-test	*	*	*	*
C.V. (%)	25.81	22.43	29.65	21.96

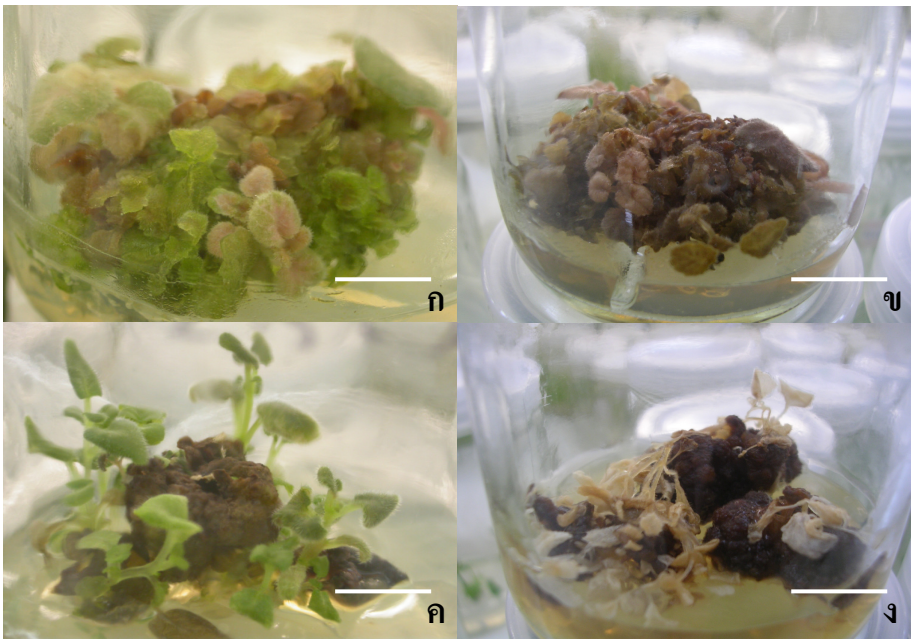
* = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย วิธี DMRT

2.3 ผลของ EMS ต่อความผิดปกติของลักษณะทางสัณฐานในหลอดทดลอง

เมื่อพิจารณาถึงลักษณะยอดรวมที่พัฒนาได้ พบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลาย EMS 0.25 0.50 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 90 นาที ชิ้นส่วนใบบางชิ้นส่วนให้การพัฒนายอดรวมจำนวนน้อย แต่ยอดและใบมีขนาดใหญ่ สีเขียวอ่อน ส่วนท้องใบ และเส้นใบมีสีแดง แต่บางชิ้นส่วนมีการพัฒนาเป็นยอดรวมจำนวนมาก ยอดมีขนาดเล็ก ใบมีสีเขียวอ่อน และซีด ในขณะที่ใบปกติด้านท้องใบ และเส้นใบมีสีเขียวเข้ม ชิ้นส่วนใบที่จุ่มแช่สารละลาย EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 นาที พบลักษณะที่ผิดปกติคือ ชิ้นส่วนใบสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ตามปกติ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงได้ระยะหนึ่งจะเริ่มมีสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ ซึ่งแคลลัสดังกล่าวยังสามารถพัฒนาเป็นยอดรวมได้ แต่ยอดรวมมีขนาดเล็ก ใบมีสีเขียวอ่อน บางยอดใบมีสีแดง ซีด แต่เมื่อเพาะเลี้ยงได้ระยะหนึ่งยอดรวมที่พัฒนานั้นเริ่มเหี่ยว และตายในที่สุด (ภาพที่ 11 ก และ ข) และเมื่อย้ายเลี้ยงชิ้นส่วนใบที่ผิดปกติ พบว่า ไม่สามารถเจริญพัฒนาได้ ในขณะที่ชิ้นส่วนใบที่จุ่มแช่สารละลาย EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 90 นาที ชิ้นส่วนใบพัฒนาเป็นกลุ่มแคลลัสขนาด

ใหญ่ สีน้ำตาลหรือดำ แต่ยังมีบางเซลล์สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ แต่มีจำนวนน้อย และใบเหี่ยว จนกลายเป็นสีน้ำตาลถึงดำ และตายในที่สุด (ภาพที่ 11 ค และ ง)



ภาพที่ 11 ลักษณะยอดรวมผิดปกติที่ได้รับสาร EMS 1% เป็นเวลา 60 นาที (ก และ ข) และ 90 นาที (ค และ ง) (บาร์ = 1.0 ซม)

2.4 ผลของ EMS ต่อลักษณะทางสัณฐานของต้นกล็อกซิเนียภายหลังขยายพันธุ์ในสภาพที่ปลูกภายในโรงเรือน

จากการนำต้นกล็อกซิเนียที่ได้จากการจุ่มแช่สารละลาย EMS มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำราก (1/2MS) เป็นเวลา 14 วัน และย้ายลงแปลงปลูก หลังจากย้ายปลูกเป็นเวลาประมาณ 60 วัน พบว่า ต้นกล็อกซิเนียที่จุ่มแช่สารละลาย EMS มีการเจริญเติบโต และมีลักษณะใบลำต้น ใกล้เคียงกับต้นปกติ ซึ่งต้นปกติมีลักษณะใบใหญ่ หนา สีเขียวเข้ม ขอบใบหยัก แต่พบบางต้นที่มีลักษณะผิดปกติ คือต้นที่จุ่มแช่สารลาย EMS 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 90 นาที มีลักษณะลำต้นแคระแกร็น ใบหนา สีเขียวเข้ม เมื่อศึกษาความกว้างทรงพุ่ม พบว่า ต้นกล็อกซิเนียที่จุ่มแช่สารละลาย EMS 0 0.25 0.50 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที มีความกว้างทรงพุ่มเฉลี่ย 29.85 26.70 22.33 28.40 และ 19.13 เซนติเมตร ความสูงลำต้นเฉลี่ย 1.17 1.23 1.06 1.06 และ 0.93 เซนติเมตร ความกว้างของใบเฉลี่ย 9.60 9.85 9.43 10.30 และ 10.20 เซนติเมตร ความ

ยาวใบเฉลี่ย 12.48 12.40 12.15 13.13 และ 12.63 เซนติเมตร ความกว้างดอกเฉลี่ย 5.18 4.93 5.30 4.90 และ 4.40 เซนติเมตร และ ความสูงดอกเฉลี่ย 4.43 4.21 4.35 3.93 และ 4.43 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยที่ ความกว้างทรงพุ่ม และความสูงลำต้น ของแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความกว้างใบ ความยาวใบ ความกว้างดอก และความสูงดอกไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) และที่จุ่มแช่สารละลาย EMS 0 0.25 0.50 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที มีความกว้างทรงพุ่มเฉลี่ย 29.85 25.58 28.48 23.85 และ 28.95 เซนติเมตร ความสูงลำต้นเฉลี่ย 1.17 0.92 0.95 0.96 และ 0.88 เซนติเมตร ความกว้างของใบเฉลี่ย 9.60 10.15 9.33 10.30 และ 9.85 เซนติเมตร ความยาวใบเฉลี่ย 12.48 12.70 12.15 13.05 และ 12.68 เซนติเมตร ความกว้างดอกเฉลี่ย 5.18 4.93 4.55 4.65 และ 4.43 เซนติเมตร และ ความสูงดอกเฉลี่ย 4.43 3.85 4.26 3.93 และ 4.00 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งความสูงลำต้น มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความกว้างทรงพุ่ม ความกว้าง ความยาวใบ ความกว้าง และความสูงดอก ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) ลักษณะต้นกล็อกซิเนียที่ได้แสดงดังภาพที่ 12 และ 13

สำหรับผลของสาร EMS ต่อการชักนำให้เกิดลักษณะการกลายพันธุ์ของดอกกล็อกซิเนียนั้น พบว่า มีลักษณะของดอกที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เช่น ดอกกล็อกซิเนียที่ได้จากการทรีตด้วยสารละลาย EMS 0.5 เปอร์เซ็นต์ สีดอกอ่อนลง และกลีบดอกมีขอบสีขาว หรือในดอกกล็อกซิเนียที่ได้จากการทรีตด้วยสารละลาย EMS 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 90 นาที พบว่าสีดอกเข้มขึ้น และกลีบดอกมี 2 ชั้น จากดอกปกติซึ่งมีกลีบดอกซ้อนกัน 3-4 ชั้น ดอกสีเข้มขึ้น หรืออ่อนลง กลีบดอกมีขอบสีขาว โดยทั่วไปแล้วดอกกล็อกซิเนียที่ได้รับสาร EMS 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะดอกใกล้เคียงกับดอกปกติ ซึ่งความหลากหลายของดอกกล็อกซิเนียแสดงดังภาพที่ 14 นอกจากนี้ยังพบลักษณะผิดปกติของดอกที่ได้รับสาร EMS 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 และ 90 นาที คือ ดอกมีขนาดเล็ก และไม่บาน

ตารางที่ 4 ผลของ EMS และระยะเวลาจุ่มแช่นาน 60 นาที ต่อลักษณะทางสัณฐานของกล็อกซิเนีย หลังจากย้ายลงแปลงปลูกเป็นเวลาประมาณ 60 วัน

ความเข้มข้นของ EMS (%)	ความกว้างทรงพุ่ม (ซม)	ความสูงลำต้น (ซม)	ความกว้างใบ (ซม)	ความยาวใบ (ซม)	ความกว้างดอก (ซม)	ความยาวดอก (ซม)
0	29.85a	1.17ab	9.60a	12.48a	5.18a	4.43a
0.25	26.70ab	1.23a	9.85a	12.40a	4.93a	4.21a
0.50	22.33ab	1.06ab	9.43a	12.15a	5.30a	4.35a
0.75	28.40a	1.06ab	10.30a	13.13a	4.90a	3.93a
1.0	19.13b	0.93b	10.20a	12.63a	4.40a	4.43a
F-test	*	*	ns	ns	ns	Ns
C.V. (%)	21.13	15.91	10.01	7.90	11.35	8.88

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 5 ผลของ EMS และระยะเวลาจุ่มแช่นาน 90 นาที ต่อลักษณะทางสัณฐานของต้นกล็อกซิเนียหลังจากย้ายลงแปลงปลูกเป็นเวลาประมาณ 60 วัน

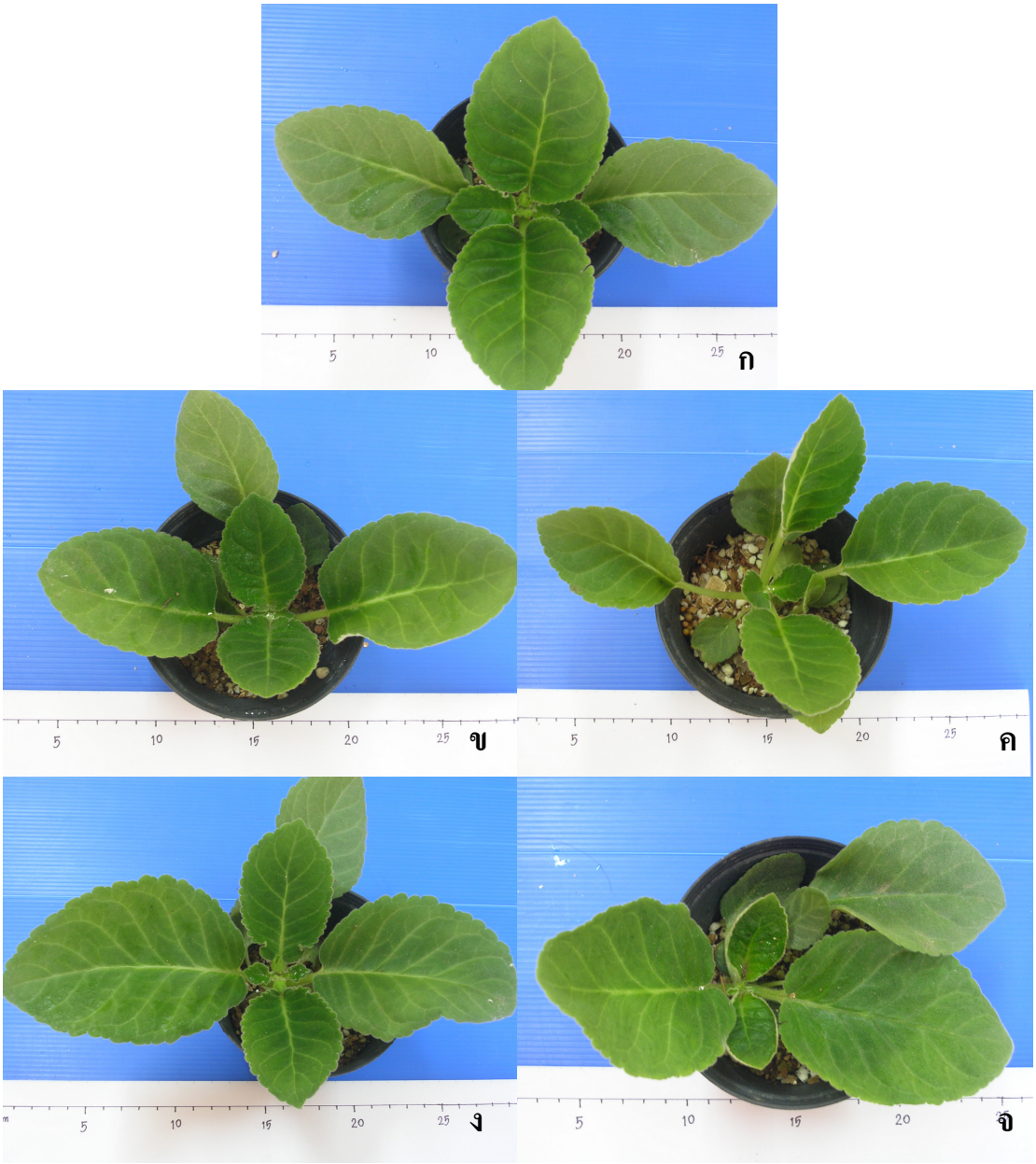
ความเข้มข้นของ EMS (%)	ความกว้างทรงพุ่ม (ซม)	ความสูงลำต้น (ซม)	ความกว้างใบ (ซม)	ความยาวใบ (ซม)	ความกว้างดอก (ซม)	ความยาวดอก (ซม)
0	29.85a	1.17a	9.60a	12.48a	5.18a	4.43a
0.25	25.58a	0.92b	10.15a	12.70a	4.93a	3.85a
0.50	28.48a	0.95b	9.33a	12.15a	4.55a	4.26a
0.75	23.85a	0.96b	10.30a	13.05a	4.65a	3.93a
1.0	28.95a	0.88b	9.85a	12.68a	4.43a	4.00a
F-test	ns	*	Ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	22.28	8.25	10.01	7.90	10.64	11.09

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย วิธี DMRT

ภาพที่ 12 ลักษณะต้นกล็อกซิเนียที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้น (ก) 0% (ข) 0.25% (ค) 0.50% (ง) 0.75% และ (จ) 1.0% เป็นเวลา 60 นาที



ภาพที่ 13 ลักษณะต้นกล็อกซิเนียที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้น (ก) 0% (ข) 0.25% (ค) 0.50% (ง) 0.75% และ (จ) 1.0% เป็นเวลา 90 นาที

ภาพที่ 14 ลักษณะของดอกกล็อกซิเนียที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ

แถวที่ 1: ดอกกล็อกซิเนียจากต้นปกติ

แถวที่ 2: ดอกกล็อกซิเนียที่ได้รับสาร EMS เข้มข้น 0.5% นาน 60 นาที

แถวที่ 3: ดอกกล็อกซิเนียที่ได้รับสาร EMS เข้มข้น 0.5% นาน 90 นาที

แถวที่ 4: ดอกกล็อกซิเนียที่ได้รับสาร EMS เข้มข้น 0.75% นาน 90 นาที (บาร์ = 1.5 ซม)

หลังจากตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานของดอกกล็อกซิเนียภายหลังการฉายรังสี UV-C พบลักษณะดอกที่มีลักษณะแตกต่างจากเดิม 6 ลักษณะคือ ดอกสีซีดขอบขาว ดอกขอบหยักสีแดงเข้ม ดอกสีแดงกำมะหยี่กลีบดอกหนามีกลีบดอก 2 ชั้น ดอกสีแดงเข้มขอบเขียวบางส่วน ดอกสีซีดขอบหยัก และดอกไม่บาน เป็นจำนวน 37.14 25.17 10.00 8.57 7.14 6.43 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 6) และต้นกล็อกซิเนียที่ผ่านการทรีตสาร EMS พบลักษณะดอกผิดปกติ คือ ดอกสีซีดขอบหยัก ดอกสีแดงเข้ม ดอกไม่บาน เป็นจำนวน 36.5 23.5 และ 16.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 7) จากลักษณะผิดปกติดังกล่าว นำไปตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคไอโซไซม์ เพื่อตรวจสอบว่าลักษณะที่เกิดขึ้นนั้นเป็นการเปลี่ยนแปลงของยีนหรือไม่

ตารางที่ 6 ลักษณะผิดปกติของดอกกล็อกซิเนียภายหลังการฉายรังสี UV-C

ลักษณะผิดปกติ	**เปอร์เซ็นต์**
ดอกสีซีดขอบขาว	37.14
ดอกสีแดงเข้มขอบหยัก	25.71
ดอกสีแดงเข้มขอบเขียวบางส่วน	10.00
ดอกสีแดงกำมะหยี่กลีบดอกหนามีกลีบดอก 2 ชั้น	8.57
ดอกสีซีดขอบหยัก	7.14
ดอกไม่บาน	6.43

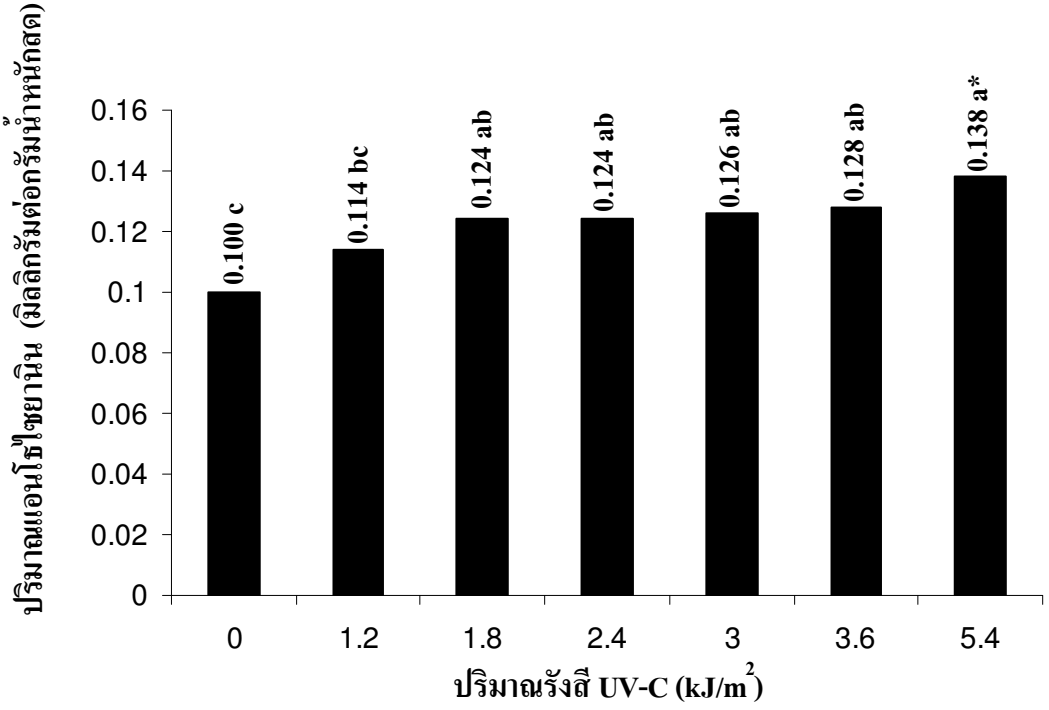
ตารางที่ 7 ลักษณะผิดปกติของดอกกล็อกซิเนียภายหลังการทรีตด้วยสาร EMS

ลักษณะผิดปกติ	**เปอร์เซ็นต์**
ดอกสีซีดขอบหยัก	36.5
ดอกสีแดงเข้ม	23.5
ดอกไม่บาน	16.5

3. ผลของรังสี UV-C และ EMS ต่อปริมาณแอนโธไซยานินในกลีบดอกกล็อกซิเนีย

3.1 ผลของรังสี UV-C ต่อปริมาณแอนโธไซยานินในกลีบดอกกล็อกซิเนีย

จากการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโธไซยานินจากกลีบดอกกล็อกซิเนีย โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่า ต้นกล็อกซิเนียที่ได้จากการฉายรังสี UV-C กับชิ้นส่วนใบปริมาณ 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร ให้ปริมาณแอนโธไซยานินสูงสุด 0.138 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือที่ปริมาณรังสี 3.6 กิโลจูลต่อตารางเมตร ให้ปริมาณแอนโธไซยานิน 0.128 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ส่วนดอกจากต้นปกติมีปริมาณแอนโธไซยานินน้อยที่สุดคือ 0.100 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด (ภาพที่ 15) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

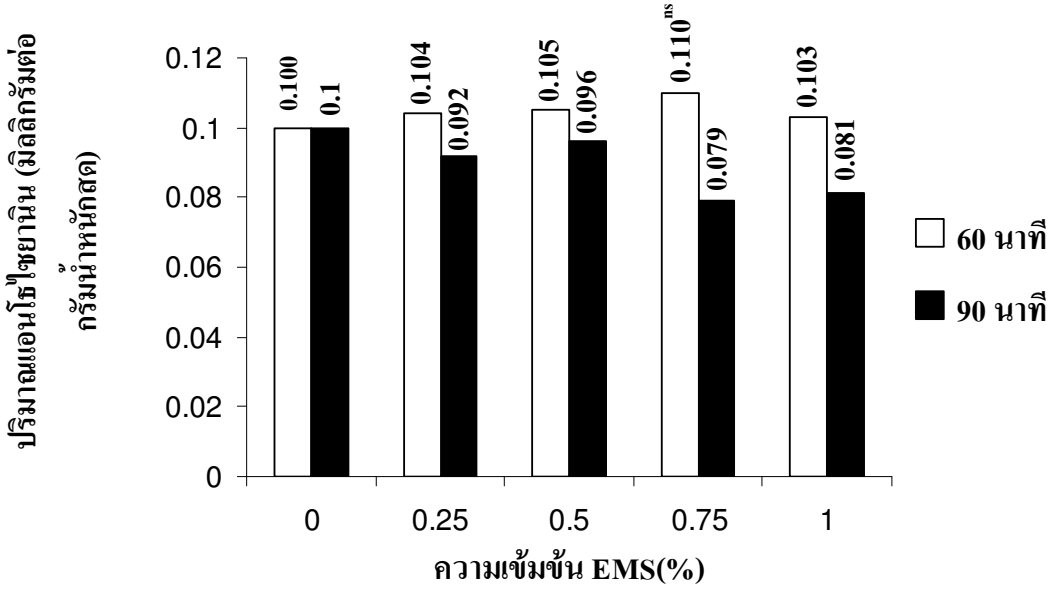


ภาพที่ 15 ปริมาณแอนโธไซยานินของกลีบดอกกล็อกซิเนียที่ได้จากการฉายรังสี UV-C ปริมาณต่างๆ และออกปลูกในโรงเรือนเป็นเวลาประมาณ 60 วัน

* ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วย วิธี DMRT

3.2 ผลของ EMS ต่อปริมาณแอนโธไซยานินในกลีบดอกกล็อกซิเนีย

จากการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโธไซยานินจากกลีบดอกกล็อกซิเนีย โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่า ต้นกล็อกซิเนียที่ได้จากการจุ่มแช่ชิ้นส่วนใบในสารละลาย EMS 0.75 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที ให้ปริมาณแอนโธไซยานินสูงสุด 0.110 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ ที่ความเข้มข้น EMS 0.5 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 60 นาที ให้ปริมาณแอนโธไซยานิน 0.105 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ส่วนที่ระดับความเข้มข้น EMS 0.25 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 90 นาที ให้ปริมาณแอนโธไซยานิน 0.092 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด โดยปริมาณแอนโธไซยานินในแต่ละทรีตเมนต์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ภาพที่ 16)

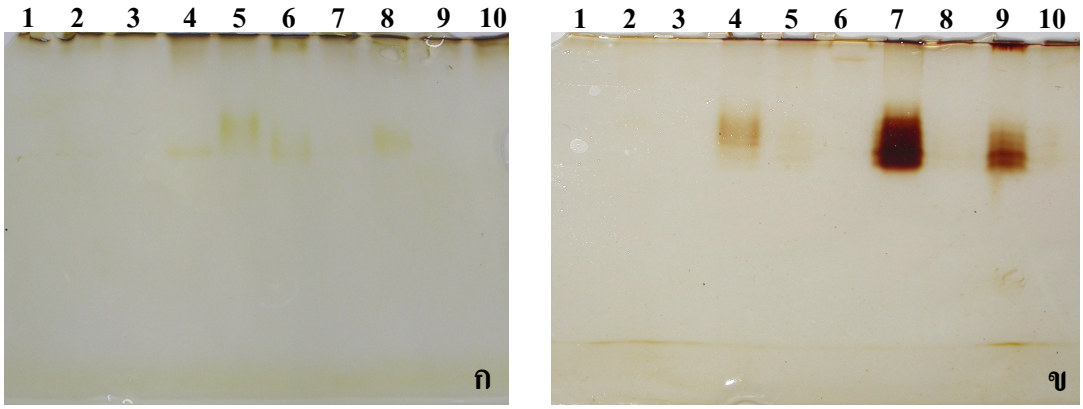


ภาพที่ 16 ปริมาณแอนโธไซยานินของกลีบดอกกล็อกซิเนียที่ได้จากการจุ่มแช่สารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นาน 60 และ 90 นาที และออกปลูกในโรงเรือนเป็นเวลาประมาณ 60 วัน

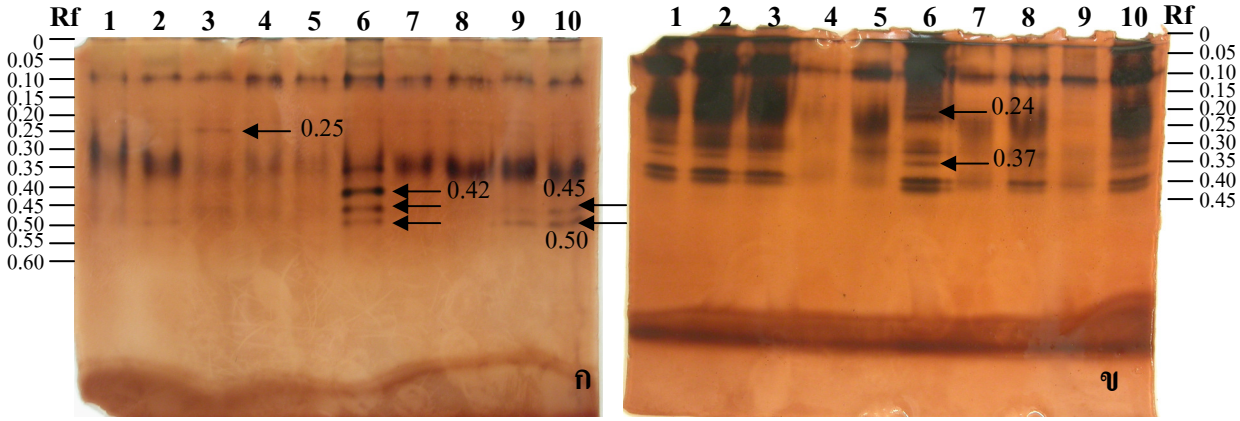
ns = ไม่แตกต่างทางสถิติเปรียบเทียบด้วย วิธี DMRT

4. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกล็อกซิเนียด้วยเทคนิคไอโซไซม์

เมื่อย้อมสีเจลโพลีอะคริลาไมด์ที่ผ่านการแยกเอนไซม์ ด้วยระบบสีย้อมเอนไซม์ 2 ระบบ คือ ระบบเอนไซม์ PER และ EST ของต้นกล็อกซิเนียที่มีลักษณะแปรปรวนไปจากเดิมคือ ดอกสีซีดขอบขาวจากต้นที่ทรีตด้วย EMS 0.75 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที ดอกสีซีดจากต้นที่ทรีตด้วย EMS 0.75 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที ดอกขอบหยักสีแดงเข้มจากต้นที่ฉายรังสี UV-C 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร ดอกสีแดงกำมะหยี่กลีบดอก 2 ชั้นจากต้นที่ฉายรังสี UV-C กิโลจูลต่อตารางเมตร ดอกไม่บานจากต้นที่ทรีตด้วย EMS 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที ดอกสีแดงเข้มขอบเขียวจากต้นที่ฉายรังสี UV- C 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร ดอกสีซีดขอบหยักจากต้นที่ทรีตด้วย EMS 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที ดอกไม่บานจากต้นที่ทรีตด้วย EMS 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที พบว่า ระบบเอนไซม์ PER มีบางแถบที่ย้อมไม่ติดสี (ภาพที่ 17) แต่ระบบ EST ให้การติดสี และการกระจายตัวของแถบเอนไซม์ที่ชัดเจน จากรูปแบบเอนไซม์ที่สกัดจากใบคู่แรกนับจากยอดของต้นกล็อกซิเนียอายุ 2 เดือน ให้รูปแบบแถบเอนไซม์แตกต่างกัน คือ แถบเอนไซม์จากต้นที่ดอกมีลักษณะสีแดงกำมะหยี่กลีบดอกสองชั้นจากต้นที่ฉายรังสี UV-C ปริมาณ 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร (แถวที่ 6, ภาพที่ 18ก) ให้แถบเอนไซม์ แตกต่างจากต้นปกติอย่างชัดเจนมีตำแหน่งของแถบที่ Rf 0.42 และพบแถบเอนไซม์ จำนวน 1 แถบ จากต้นที่ดอกมีสีซีดต้นที่ทรีตด้วย EMS 0.75 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที มีตำแหน่งของแถบที่ Rf 0.25 นอกจากนี้ยังพบแถบเอนไซม์จำนวน 2 แถบ ในต้นที่มีดอกสีแดงกำมะหยี่มีกลีบดอก 2 ชั้นจากต้นที่ฉายรังสี UV-C ปริมาณ 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร ดอกสีซีดขอบหยักจากต้นที่ ทรีตด้วย EMS 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที และดอกสีซีดกลีบดอกไม่บานจากต้นที่ทรีตด้วย EMS 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที มีตำแหน่งของแถบที่ Rf 0.45 และ 0.50 (ภาพที่ 18ก) ส่วนรูปแบบเอนไซม์ที่สกัดจากใบที่ 3 จากยอดของต้นกล็อกซิเนียอายุ 3 เดือน แถบเอนไซม์จากต้นที่ดอกที่มีลักษณะสีแดงกำมะหยี่ กลีบดอกสองชั้น ให้แถบเอนไซม์ที่แตกต่างจากต้นปกติจำนวน 1 แถบซึ่งมีตำแหน่งของแถบที่ Rf 0.24 ซึ่งลักษณะของแถบเอนไซม์ที่ความแตกต่างกัน อาจเนื่องจากกล็อกซิเนียในแต่ละลักษณะมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 17 รูปแบบเอนไซม์ในแต่ละลักษณะของต้นที่แปรปรวน ภายหลังการแยกด้วย polyacrylamide gel electrophoresis เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีด้วยระบบ PER ก: ต้นกล็อกซิเนียอายุ 2 เดือน ข: ต้นกล็อกซิเนียอายุ 3 เดือน



ภาพที่ 18 รูปแบบเอนไซม์ในแต่ละลักษณะของต้นที่แปรปรวน ภายหลังการแยกด้วย polyacrylamide gel electrophoresis เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีด้วยระบบ EST ก: ต้นกล็อกซิเนียอายุ 2 เดือน ข: ต้นกล็อกซิเนียอายุ 3 เดือน

หมายเหตุ

1, 2 ดอกจากต้นปกติ

3 ดอกสีซีดขอบขาวจากต้นที่ทรีตด้วย EMS 0.75% นาน 90 นาที

4 ดอกสีซีดจากต้นที่ทรีตด้วย EMS 0.75% นาน 90 นาที

5 ดอกขอบหยักสีแดงเข้มจากต้นที่ฉายรังสี UV-C 5.4 kJ/m^2

6 ดอกสีแดงกำมะหยี่กลีบดอก 2 ชั้นจากต้นที่ฉายรังสี UV-C 5.4 kJ/m^2

7 ดอกไม่บานจากต้นที่ทรีตด้วย EMS 1% นาน 60 นาที

8 ดอกสีแดงเข้มขอบเขียวจากต้นที่ฉายรังสี UV- C 5.4 kJ/m^2

9 ดอกสีซีดขอบหยักจากต้นที่ทรีตด้วย EMS 1% นาน 60 นาที

10 ดอกไม่บานจากต้นที่ทรีตด้วย EMS 1% นาน 90 นาที

บทที่ 4

บทวิจารณ์

1. ผลของรังสี UV-C ต่อกล็อกซิเนีย

จากการศึกษาผลของรังสี UV-C ต่อการกลายพันธุ์ของกล็อกซิเนียในหลอดทดลอง พบว่าชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียที่ฉายรังสี จะมีลักษณะเหี่ยวลง เมื่อเทียบกับชิ้นส่วนใบที่ไม่ได้ฉายรังสีซึ่งมีลักษณะใบเป็นปกติ เมื่อวิเคราะห์ค่า LD_{50} เปรียบเทียบกับชุดควบคุม มีค่าประมาณ 4.52 กิโลจูลต่อตารางเมตร ซึ่ง Pinet-Leblay และคณะ (1992) ได้ศึกษาการใช้รังสีแกมมา และรังสี UV-C กับชิ้นส่วนใบแพร์ในหลอดทดลอง พบว่าค่า LD_{50} เมื่อใช้รังสี UV-C มีค่าประมาณ 125 จูลต่อตารางเมตร ชิ้นส่วนใบที่ฉายรังสี UV-C ขอบใบเกิดการม้วนงอ และใบมีลักษณะเหี่ยวลง เช่นเดียวกับการศึกษานี้ แต่เมื่อพิจารณาถึงค่า LD_{50} พบว่ามีค่าต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพืชแต่ละชนิด มีการตอบสนองต่อรังสีต่างกัน ถึงแม้ว่าจะเป็นพืชชนิดเดียวกัน แต่มีระยะการพัฒนา ชิ้นส่วนต่างกัน หรือมีอายุที่ต่างกัน การตอบสนองต่อรังสีก็อาจจะต่างกันด้วย เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบดังกล่าวเป็นเวลา 20 วัน ศึกษาลักษณะการพัฒนาของชิ้นส่วนใบ พบว่า ชิ้นส่วนใบที่ฉายรังสี UV-C มีการพัฒนาเป็นแคลลัส มีลักษณะเป็น friable callus มีสีเขียว ใส เกิดขึ้นบริเวณขอบๆใบ และบริเวณที่มีบาดแผล และมีการพัฒนาเป็น compact callus ซึ่งลักษณะของแคลลัสที่เกิดนั้น อาจเป็นผลมาจากรังสี UV-C โดย Whittle และ Johnston (2003) รายงานว่า รังสี UV มีผลทำให้เกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอ รวมทั้งการเกิดความผิดปกติของเบสที่เป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอ เช่น การเกิดการจับกันเองของเบส ไพริมิดีน (pyrimidine dimer) จึงทำให้เซลล์ส่วนที่ได้รับรังสีเกิดลักษณะผิดปกติ ในการศึกษานี้รังสี UV-C อาจทำให้เกิดความเสียหายของเซลล์ ทำให้เซลล์อาจเกิดความผิดปกติ เกิดการเจริญเป็นกลุ่มแคลลัสแทนที่จะเจริญเป็นส่วนยอดเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดรวม จากการฉายรังสี UV-C ที่มีปริมาณสูงคือ 5.4 7.0 และ 9.0 กิโลจูลต่อตารางเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงไปได้ระยะหนึ่งแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม หรือดำ และมีการสร้างสารประกอบฟีโนลิก ซึ่งสารนี้อาจมีผลยับยั้งหรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ Ozyigit และคณะ (2007) รายงานว่า สารประกอบฟีโนลิกมีผลยับยั้งการงอกของเมล็ดฝ้ายจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งปริมาณสารฟีโนลิกจะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งวันที่ 28 ของการเพาะเลี้ยง สอดคล้องกับการศึกษานี้ที่สารนี้คือมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งสารประกอบฟีโนลิกที่ชิ้นส่วนพืชสร้างขึ้นมานั้น มีผลมาจากรังสี UV-C ชิ้นส่วนพืชที่ฉายรังสี UV-C ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้มี

เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เซลล์บางส่วนตาย รวมทั้งมีผลยับยั้งความสามารถในการสร้างยอดรวม และจำนวนยอดรวมต่อหนึ่งชิ้นส่วนลดลงด้วย ซึ่ง Park และคณะ (2007) รายงานว่า รังสี UV ส่งเสริมให้เกิดการสร้างสารชีวเคมีทุติยภูมิหลายชนิดเพิ่มขึ้น แต่ถ้าได้รับในปริมาณที่สูง และระยะเวลานานเกินไป อาจจะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษภายในเซลล์พืชได้ จากการย้ายเลี้ยงชิ้นส่วนใบ และชิ้นส่วนก้านใบที่ฉายรังสี UV-C ปริมาณต่างๆ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดรวม พบว่า ที่ปริมาณรังสี UV-C 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร ส่งเสริมให้ชิ้นส่วนก้านใบมีการพัฒนาเป็นดอก ในขณะที่ชิ้นส่วนใบพัฒนาเป็นยอดรวมปกติ ซึ่งการเกิดดอกของพืชแต่ละชนิดในหลอดทดลอง ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่น ชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต รวมถึงสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง แต่ส่วนใหญ่ดอกที่ชักนำให้เกิดในหลอดทดลอง มักมีลักษณะผิดปกติ เช่นละอองเกสรเป็นหมัน เช่น ในกล้วยไม้เหลืองจันทบูร (ปรัชพรรณ, 2550) ในกล้วยไม้สกุลหวาย สายพันธุ์ Madame Thong-In ดอกจะมีรูปร่างผิดปกติเมื่อย้ายลงอาหารเหลว (Sim *et al.,* 2007) เช่นเดียวกับการศึกษานี้ ดอกกล็อกซิเนียที่ชักนำได้มีการพัฒนาเพียงส่วนกลีบเลี้ยง แต่กลีบดอก เกสรตัวผู้ และเกสรตัวเมีย ไม่พัฒนา ลักษณะดังกล่าวอาจเนื่องมาจากรังสี UV-C แต่รังสี UV-C ไปมีผลอย่างไรต่อการเกิดดอกในหลอดทดลองนั้น ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจส่งผลให้เซลล์พืชเกิดความผิดปกติ และอาจส่งผลกระทบทางด้านสรีรวิทยา มีส่วนไปกระตุ้นให้ตาดอกมีการพัฒนาได้เร็วขึ้น ซึ่งต้องมีการศึกษาในระดับโมเลกุลต่อไป สำหรับผลของรังสี UV ต่อลักษณะการกลายพันธุ์ของต้นกล็อกซิเนียภายหลังออกปลูกในแปลงนั้น ส่วนใหญ่ต้นที่ฉายรังสี มีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นที่ไม่ได้ฉายรังสี และในต้นที่ได้รับรังสีในปริมาณสูง พบลักษณะต้นแคระแกร็น ใบมีรูปร่างผิดปกติ บางต้นไม่สามารถออกดอกได้ ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจาก ต้นพืชได้รับปริมาณรังสีในปริมาณที่สูงเกินไปจนทำให้เนื้อเยื่อพืชเสียหายมากจนไม่อาจออกดอกได้ (ธนวัฒน์ และเตือนใจ, 2549) เมื่อศึกษาลักษณะดอก พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงหลายลักษณะ เช่น ดอกสีเข้มขึ้นหรืออ่อนลง กลีบดอกหนา กลีบดอกมีขอบสีขาว และบางดอกบริเวณปลายกลีบดอกมีสีเขียว ทั้งนี้ลักษณะที่มีการเปลี่ยนแปลงหลายๆลักษณะที่เกิดเกิดขึ้นนั้นอาจเป็นผลมาจากรังสีร่วมกับสิ่งแวดล้อม แต่บางลักษณะที่มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิมเล็กน้อย เช่นสีดอกเข้มขึ้นหรือจางลงเล็กน้อย อาจเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมภายในแปลงปลูก ดังนั้นควรการตรวจสอบทางด้านชีวเคมี เพื่อศึกษาว่าลักษณะที่กลายพันธุ์นั้นเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของยีนหรือไม่ เป็นต้น และภายหลังจากการตรวจสอบปริมาณแอนโธไซยานินจากกลีบดอกจากต้นกล็อกซิเนียที่ได้รับรังสีปริมาณต่างๆ พบว่าต้นที่ได้รับปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณแอนโธไซยานินในกลีบดอกเพิ่มสูงขึ้นด้วย สอดคล้องกับการศึกษาของ Park และคณะ (2007) พบว่า เมื่อฉายรังสี UV-B ปริมาณ 0.26 กิโลจูลต่อตารางเมตร กับใบผักกาดหอมส่งผลให้มีการสังเคราะห์สารแอนโธไซยานินเพิ่มมากขึ้น โดยรังสี

UV-B ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์สารแอนโธไซยานิน ซึ่งจากการศึกษานี้เป็นไปได้ว่า รังสี UV-C อาจจะไปกระตุ้นการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารแอนโธไซยานินเช่นเดียวกัน จึงส่งผลให้สีดอกกล็อกซิเนียที่เกิดจากต้นที่ได้รับรังสีเข้มกว่าดอกจากต้นปกติ แต่ลักษณะดอกสีเข้มขึ้นนั้นเป็นการศึกษาจากต้นกล็อกซิเนียเพียงรุ่นแรก ซึ่งลักษณะดังกล่าวนั้นอาจปรากฏ หรือไม่ปรากฏในรุ่นถัดไป ขึ้นอยู่กับว่าลักษณะกลายพันธุ์นั้นคงที่หรือไม่ อย่างไรก็ตามมีการลักษณะกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นดังกล่าว อาจจะเป็นลักษณะการกลายพันธุ์ที่ยังไม่คงที่ ซึ่งจะต้องดูลักษณะผิดปกตินี้ในรุ่นถัดไปว่ามีลักษณะคงเดิมหรือไม่ จึงจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างสายพันธุ์ใหม่ในทางการค้าต่อไป

2. ผลของ EMS ต่อกล็อกซิเนีย

จากการศึกษาการใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ในพืช พบว่า ชิ้นส่วนใบที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 และ 90 นาทีสีของใบจะซีดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งความเข้มข้นของสาร EMS ในปริมาณสูงจึงเข้าทำลายกลุ่มเนื้อเยื่อเจริญได้มากกว่า และการจุ่มแช่ทำภายใต้สภาพเขย่าร่วมกับการทำบาดแผลให้ชิ้นส่วนพืชทำให้สามารถดูดซึมสารละลาย EMS ได้ทั่วถึง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lee และ Lee (2002) ที่ชักนำการกลายพันธุ์ในข้าวโดยนำแคลลัสที่ได้ชักนำจากอับละอองเกสรมาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 0 10 และ 20 วันพบว่าแคลลัสมีสีซีด และเผือกมากขึ้นจากเดิมที่มีสีเขียว เมื่อพิจารณาถึงค่า LD_{50} พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย EMS ที่ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชลดลงครึ่งหนึ่งคือ 0.88 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่เป็นเวลา 60 นาที และ 0.73 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่เป็นเวลา 90 นาที โดย สมปอง (2541) รายงานว่า ค่า LD_{50} ถือเป็นค่าในการประเมินความเข้มข้นที่เหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ ทั้งนี้เพราะความเข้มข้นดังกล่าวสร้างความเสียหาย และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับหน่วยพันธุกรรมอย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ โดยพืชแต่ละชนิดมีค่า LD_{50} แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วน และอายุของชิ้นส่วนพืชที่นำมาจุ่มแช่ ระยะเวลาในการจุ่มแช่ และความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ (สิรนุช, 2540) เช่น ในการศึกษาของ Bhagwat และ Duncan (1998) ได้นำชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยในหลอดทดลองอายุ 4 สัปดาห์ มาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที พบว่า ค่า LD_{50} คือที่ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ และการศึกษาของ Gahukar และ Jambhale (2000) จุ่มแช่แคลลัสอ้อยอายุ 15 วันในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ค่า LD_{50} อยู่ที่ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น หากจุ่มแช่ชิ้นส่วนใบกล็อกซิเนียในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0.88 หรือ 0.73 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 หรือ 90 นาที ชิ้นส่วนใบ

ที่รอดชีวิตมีแนวโน้มว่าจะได้ต้นกล็อกซิเนียที่มีลักษณะแตกต่างไปจากเดิม ภายหลังการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบดังกล่าวประมาณ 30 วัน ศึกษาลักษณะการพัฒนาของชิ้นส่วนใบ พบว่า มีการพัฒนาเป็นแคลลัส เช่นเดียวกับ ชิ้นส่วนใบที่ได้รับรังสี UV-C แต่ลักษณะแคลลัสที่ได้แตกต่างกันคือ ในการทดลองที่ใช้สาร EMS แคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็น compact callus ตั้งแต่เริ่มเกิดเป็นแคลลัส มีสีเหลือง มีบางส่วนเริ่มเป็นสีเขียว และสีน้ำตาล และเริ่มมียอดเกิดขึ้น ส่วนชิ้นส่วนใบที่ได้รับรังสี UV-C แคลลัสที่เกิดขึ้น จะเป็น friable callus เมื่อเพาะเลี้ยงไปได้ระยะจึงเริ่มเกิดเป็น compact callus เช่นเดียวกัน และเมื่อเพาะเลี้ยงได้ระยะหนึ่งกลุ่มแคลลัสดังกล่าวมีการพัฒนาเป็นยอดรวม แต่มีกลุ่มแคลลัสบางกลุ่มที่ได้รับสาร EMS ในปริมาณสูง และระยะเวลามากขึ้น ไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดรวมได้ตามปกติ จะเกิดเป็นกลุ่มเซลล์สีน้ำตาล หรือดำ และมีการปล่อยสารประกอบฟีนอลออกมาเหมือนกับลักษณะแคลลัสที่เกิดจากการฉายรังสี UV-C ทั้งนี้เพราะว่าสาร EMS อาจเป็นพิษต่อพืช ถ้าความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ และระยะเวลาที่ได้รับสารไม่เหมาะสมทำให้พืชไม่พัฒนา และตายได้ สอดคล้องกับรายงานของ สุมนา (2549) ซึ่งได้จุ่มแช่ยอดอ่อนเยอบีร่าในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0-45 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 และ 5 ชั่วโมง พบว่า เยอบีร่าที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้นสูงขึ้น และระยะเวลามากขึ้น ทำให้อัตราการรอดชีวิต และเกิดต้นอ่อนน้อยลง สำหรับลักษณะทางสัณฐานของต้นกล็อกซิเนียภายหลังย้ายลงในแปลงปลูก พบว่า โดยทั่วไป ต้นกล็อกซิเนียที่ได้รับสาร EMS มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับต้นปกติ แต่ก็ยังมีลักษณะที่ผิดปกติที่พบในต้นที่ได้รับสาร EMS ในปริมาณสูงคือ ลำต้นมีลักษณะแคระแกร็น ใบมีขนาดเล็ก ใบหนา ค่อนข้างเรียบ ต้นที่ได้รับสาร EMS 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 90 นาที เมื่อออกปลูกในระยะแรก พบว่า มีจำนวน 2 ต้นที่ตาย และหลังจากนั้น ได้มีต้นที่เจริญขึ้นมาใหม่ ซึ่งพบลักษณะผิดปกติคือ ใบมีสีเขียวเข้ม หนา ขอบใบค่อนข้างเรียบ ซึ่งลักษณะการกลายพันธุ์ในต้นที่เจริญขึ้นใหม่หลังจากการพักตัวของหัวเช่นนี้ อาจเกิดจากการที่เซลล์ซึ่งกลายพันธุ์จากการทรีตสาร EMS เป็นเซลล์ที่อยู่บริเวณข้อของต้นในรุ่น M_1V_1และยังไม่เจริญเติบโตพอที่จะเห็นความผิดปกติ เมื่อต้นบนดินเหี่ยวไปแล้วเซลล์ที่กลายพันธุ์ไปจึงเริ่มงอกออกมาใหม่ และทำให้ลักษณะที่กลายพันธุ์ได้แสดงออกมา (ธนวัฒน์ และเตือนใจ, 2549) ส่วนผลของสาร EMS ต่อลักษณะทางสัณฐานของดอกกล็อกซิเนียนั้น พบว่า มีลักษณะของดอกที่เปลี่ยนแปลงไปหลายประการเช่นเดียวกับต้นที่ฉายรังสี UV-C เช่น ดอกมีสีซีดลง หรือเข้มขึ้น ดอกขอบขาว ดอกมีขนาดเล็กและไม่บาน เป็นต้น ลักษณะที่เกิดขึ้นต่างๆนี้ เป็นผลมาจากการทำงานของยีนร่วมกับสภาพแวดล้อม แต่บางลักษณะที่มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิมเล็กน้อย เช่นสีดอกเข้มขึ้นหรือจางลงเล็กน้อย เช่นเดียวกับลักษณะดอกที่เกิดจากต้นที่ฉายรังสี UV-C ก็อาจเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมภายในแปลงปลูก Gottschalk และ Wolff (1983) รายงานว่า ลักษณะที่ปรากฏนั้นเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงข้อมูลที่เป็นองค์ประกอบทาง

จีโนไทป์ที่ควบคุมลักษณะนั้นๆ แต่บางลักษณะที่แสดงออกมาอาจเป็นผลร่วมกัน ระหว่างยีนและสิ่งแวดล้อม และลักษณะผิดปกตินั้นอาจเพิ่มมากขึ้น หากชิ้นส่วนพืชมีการกลายพันธุ์เริ่มต้น หรือยีนที่ควบคุมลักษณะที่ผิดปกตินั้น อาจจะยังไม่แสดงออกในชั่วแรก เมื่อนำมาเพิ่มจำนวน หรือขยายพันธุ์ในลูกรุ่นถัดไป จึงได้ต้นที่มีลักษณะผิดปกติเพิ่มขึ้น เมื่อศึกษาปริมาณแอนโธไซยานินในกลีบดอกกล็อกซิเนียจากต้นที่ได้รับสาร EMS ปริมาณต่างๆ พบว่า ส่วนใหญ่มีปริมาณใกล้เคียงกับดอกจากต้นปกติ แต่ที่ระดับความเข้มข้น EMS 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 90 นาที มีปริมาณแอนโธไซยานินน้อยกว่าดอกปกติ ส่งผลให้สีดอกอ่อนลงกว่าเดิม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทรีตด้วยสาร EMS ในปริมาณสูง อาจส่งผลให้เกิดการยับยั้งทำงานของยีนบางตัวที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารแอนโธไซยานิน ลักษณะความผิดปกติต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับต้นกล็อกซิเนียที่ทำการศึกษานั้นเป็นลักษณะที่เกิดขึ้นในรุ่นแรก โดยลักษณะต่างๆ นั้นอาจยังไม่คงที่ เช่นเดียวกับต้นกล็อกซิเนียที่ฉายรังสี UV-C ซึ่งจะต้องศึกษาลักษณะที่ผิดปกติในรุ่นถัดไปเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างสายพันธุ์ใหม่ในทางการค้าต่อไป

3. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม

การตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยวิธีทางชีวเคมี หรือการใช้เทคนิคไอโซไซม์ ในการศึกษานี้ใช้ระบบเอนไซม์จำนวน 2 ระบบ คือ เปอร์ออกซิเดส (PER) และเอสเทอเรส (EST) โดยใช้ชิ้นส่วนใบคู่ที่ 1 -4 นับจากยอดของจากต้นที่คัดเลือกและคาดว่าน่าจะเป็นลักษณะที่ผิดปกติภายหลังนำมาสกัดเอนไซม์ แล้วแยกเอนไซม์บนแผ่นเจลอะคลิลาไมด์ พบว่า เมื่อย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ PER มีเพียงบางแถบเท่านั้นที่ติดสี ส่วนการย้อมด้วยระบบ EST แผ่นเจลติดสีทุกแถบ และสามารถใช้แยกความแตกต่างได้ อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ของกล็อกซิเนียมีความจำเพาะกับปฏิกิริยาของระบบ EST Werner (1992) รายงานว่า พืชแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อระบบเอนไซม์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Nakano และ Mii (1993) พบว่า เมื่อใช้ระบบเอนไซม์ EST ให้รูปแบบของแถบเอนไซม์ที่สามารถนำมาใช้ตรวจสอบเพื่อจำแนกสายพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *Dianthus chinensis* และ *D. barbatus* และในการศึกษาของ Vyas และคณะ (2003) พบว่าระบบเอนไซม์ EST สามารถใช้ตรวจสอบความแปรผันของวอล์นัทได้ดีที่สุด ในขณะที่ อรอุมา (2550) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกล้วยน้ำว้า พบว่า ระบบเอนไซม์ PER ให้รูปแบบเอนไซม์ที่แตกต่างกัน และสามารถใช้แยกความแตกต่างได้ดีที่สุด จากการศึกษานี้พบความแปรปรวนของความเข้มของแถบเอนไซม์ที่ติดสี อาจเนื่องมาจาก การใช้ใบอ่อนจากต้นอายุ 2 เดือนนำมาสกัด (ภาพที่ 17ก) จึงอาจทำให้ได้ปริมาณของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย

หรือยังมีกิจกรรมของเอนไซม์น้อย จึงทำให้การติดสีของเอนไซม์ภายหลังการย้อมไม่ดี ในขณะที่การใช้ใบอ่อนจากต้นอายุ 3 เดือน ซึ่งใบมีอายุแก่กว่า (ภาพที่ 17ข) อาจจะมีปริมาณของเอนไซม์มากกว่า ดังนั้นเมื่อนำมาย้อมด้วยระบบเอนไซม์ เจลจึงให้การติดสีเข้มชัดเจน

จากผลการศึกษานี้ พบว่ารูปแบบเอนไซม์ที่ได้ในแต่ละทรีตเมนต์มีลักษณะแตกต่างกัน (ภาพที่ 18) โดยพบว่า ต้นกล็อกซิเนียที่มีดอกสีแดงกำมะหยี่มีกลีบดอก 2 ชั้นซึ่งได้จากการฉายรังสี UV-C ปริมาณ 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร (ภาพที่ 18-ก แถวที่ 6) ให้แถบเอนไซม์ติดสีมีความแตกต่างจากต้นปกติมากที่สุด อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของหน่วยพันธุกรรมภายหลังการฉายรังสี ซึ่ง ราตรี (2540) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็นผลมาจากยีน ดังนั้นเมื่อยีนมีความแตกต่างกันเนื่องจากกระบวนการชักนำการกลายพันธุ์ จึงทำให้รูปแบบเอนไซม์แตกต่างกันด้วย

บทที่ 5

บทสรุป

1. การชักนำการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV-C

ในการชักนำการกลายพันธุ์ในกล็อกซิเนียจากการใช้ชิ้นส่วนใบฉายรังสี UV-C พบว่า ค่า LD_{50} คือ ปริมาณรังสี 4.52 กิโลจูลต่อตารางเมตร เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานหลังจากการย้ายเลี้ยงชิ้นส่วนใบ และก้านใบ พบว่า ที่ปริมาณรังสี 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร ชิ้นส่วนก้านใบมีการพัฒนาเป็นดอก แต่ไม่สมบูรณ์ และเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานหลังจากย้ายลงแปลงปลูก พบว่าต้นที่ได้รับรังสีปริมาณ 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร มีลักษณะผิดปกติมากที่สุด คือ ลำต้นแคระแกร็น ใบหนาสีเขียวเข้ม ดอกสีเข้มหรือลง ดอกสีแดงเข้มมีกลีบดอกเพียง 2 ชั้น และกลีบดอกมีขอบสีขาว หรือกลีบดอกมีสีเขียวตรงปลายกลีบดอกบางส่วน

2. การชักนำการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS

ในการชักนำการกลายพันธุ์ในกล็อกซิเนียจากการใช้ชิ้นส่วนใบจุ่มแช่สารละลาย EMS พบว่า ค่า LD_{50} คือ ที่ความเข้มข้นของ EMS 0.88 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 60 นาที และ 0.73 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 90 ลักษณะทางสัณฐานที่ผิดปกติของต้นที่เลี้ยงในหลอดทดลองคือ ยอดรวมมีขนาดเล็ก ใบสีเขียวอ่อน บางใบมีสีแดง บางยอดมีขนาดใหญ่ ใบสีเขียวอ่อน และเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานหลังจากย้ายลงแปลงปลูก พบว่าต้นที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่นาน 90 นาที มีลักษณะผิดปกติมากที่สุด คือ ลำต้นแคระแกร็น ใบหนาสีเขียวเข้ม บางต้นมีใบบาง สีเขียวอ่อนขอบใบค่อนข้างเรียบ ดอก ดอกสีเข้มขึ้น หรือดอกสีซีดลง กลีบดอกมีขอบสีขาว และดอกไม่บาน

เมื่อนำลักษณะที่ผิดปกติจากการฉายรังสี UV-C และ ทรีตด้วยสาร EMS มาตรวจสอบด้วยเทคนิคไอโซไซม์ พบว่า การย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ EST เจลให้การติดสี และการกระจายตัวของแถบเอนไซม์ดีที่สุด เมื่อศึกษารูปแบบเอนไซม์ที่ได้ พบว่า ดอกที่มีลักษณะผิดปกติ คือ ดอกสีแดงกำมะหยี่มีกลีบดอก 2 ชั้นที่ได้จากการฉายรังสีปริมาณ 5.4 กิโลจูลต่อตารางเมตร ให้รูปแบบเอนไซม์ชัดเจนแตกต่างจากชุดควบคุมมากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

กัญจนา แซ่เตียว และ สุเม อรัญนารถ. 2542. การศึกษาแบบแผนของไอโซไซม์ของบัวหลวง กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 28 หน้า.

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2546. การปรับปรุงพันธุ์พืช: พื้นฐาน วิธีการ และแนวคิด. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 237 หน้า.

ธนวัฒน์ แก่นศักดิ์ศิริ และ เตือนใจ โก้สกุล. 2549. ผลของรังสีแกมมาต่อกล็อกซิเนีย. ว. วิจัยวิทยาศาสตร์ 5: 13-23.

ธัญญาพร สุสานนท์. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหน้าวัว (*Anthurium* spp.) วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 57 หน้า.

นพพร สายมพล. 2543. เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 261 หน้า.

ปรัชพรรณ หนูจีน. 2550. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการออกดอกของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 53 หน้า.

ปราโมทย์ คำนวณ และ เกศิณี ระมิงค์วงศ์. 2543. การจำแนกพันธุ์ลูกผสมสตรอเบอรี่โดยวิธีสัณฐานวิทยา และ อิเล็กโทรโฟรีซีส. วารสารเกษตร 16: 198-205.

พรรณี อัศวตรีรัตนกุล. 2543. การประยุกต์ใช้เทคนิคไอโซไซม์ในการจำแนกสายพันธุ์กล้วยไม้. รายงานการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 34 หน้า.

ภาณุพงศ์ ศรีอ่อน. 2548. กล็อกซิเนีย. นครปฐม: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 13 หน้า.

มนตรี จุฬาวัฒนทล, ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ภิญโญ พานิชพันธ์, ประหยัด โกมารทัต, พิณทิพ รื่นวงษา, ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, บุรชัย สนธยานนท์, สุมาลี ตั้งประทับกุล และมธุรส พงษ์ลิขิตมงคล. 2542. ชีวเคมี. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัดจิรรัชการพิมพ์. 589 หน้า.

ราตรี สุจารีย์. 2540. การปรับปรุงพันธุ์มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) โดยใช้โคลชิซินในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 65 หน้า.

สมปอง เตชะโต และ วิทยา พรหมมี. 2542. การชักนำการกลายพันธุ์มังคุด: การตอบสนองของชิ้นส่วนพืชต่อสิ่งก่อกลายพันธุ์. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 21: 25-31.

สมเพียร เกษมทรัพย์. 2525. กล็อกซิเนีย. ไม้ดอกกระถาง หน้า 45-54. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์อักษรวิทยา. 241 หน้า.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 205 หน้า.

สุมนา จำปา. 2549. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเยอบีร่าโดยใช้สารโคลชิซิน และสารเอธิลมีเทนซัลโฟเนต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 93 หน้า.

อัญจนา จันทร์ประทิว. 2547. การผลิตแอนโธไซยานินในการเพาะเลี้ยงแคลลัสและเซลล์ซัสเพนชันของกุหลาบมอญ (*Rosa damascena* Mill.). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 54 หน้า.

อรอุมา บุญมี. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยน้ำว้า *Musa* (ABB group) และ ความแปรปรวนทางพันธุกรรม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 49 หน้า.

อรุณี ม่วงแก้วงาม และ สมปอง เตชะโต. 2535. การขยายพันธุ์กล็อกซิเนียโดยไม่อาศัยเพศในหลอดทดลอง. ว. แก่นเกษตร. 20: 336-342.

Ahloowalia, B.S. 1992. *In vitro* induced mutants *Chrysanthemum*. Mutation Breeding Newsletter 39: 6.

Al-Safadi, B, Z. Ayyoubi and Jawdat, D. 2000. The effect of gamma irradiation on potato microtuber production *in vitro* application of chemical mutagen. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 61: 183-187.

Arunyanart S. and Soontronyatara S. 2002. Mutation induction by gamma and X-ray irradiation in tissue cultured lotus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 57: 122-129.

Bhagwat, B. and Duncan, E.J. 1998. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* using chemical mutagens. Scientia Horticulturae 73:11-22.

Charbaji T. and Nabulsi L. 1999. Effect of low doses of gamma irradiation on *in vitro* growth of grapevine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 57: 129-132.

Doehlert, D.C. and Duke, S.H. 1983. Specific determination of amylase activity in crude plant extracts containing-amylase. Plant Physiology 71: 229-234.

Ehsanpour, A.A. and Razavizadeh, R. 2005. Effect of UV-C on Drought Tolerance of Alfalfa (*Medicago sativa*) Callus. American Journal of Biochemistry and Biochemistry and Biotechnology. 1: 107-110.

Gahukar, S.J. and Jambhale, N.D. 2000. Callus induction and regeneration in saccharum cultivars as influenced by mutagen treatments. Journal of Maharashtra Agricultural Universities 25: 219-220.

Gottschalk, W. and Wolff, G. 1983. Induce Mutation in Plant Breeding. Vol. 7 New York: Springer Verlag.

Ibrahim, R., Mondelers, W. and Debergh, P.C. 1998. Effect of X-irradiation on adventitious bud regeneration from *in vitro* leaf explants of *Rosa hybrida*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54: 37-44.

Koh, Y.C. and Davies, F.T.Jr. 2001. Mutagenesis and *in vitro* culture of *Tillandsia fasciculate* Swart var.fasciculate (Bromeliaceae). Scientia Horticulturae 87: 225-240.

Latado, R.R., Adames, A.H. and Neto, A.T. 2004. *In vitro* mutation of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with ethylmethanesulfonate (EMS) in immature floral pedicels. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 103-106.

Lee, J.H. and Lee, S.Y. 2002. Selection of stable mutants cultured rice anthers treated with ethylmethanesulfonate acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71: 165-171.

Luan, Y.S., Zhang, J., Gao, X.R. and An, L.J. 2007. Mutation induced by ethylmethanesulfonate (EMS) *in vitro* screening for salt tolerance and regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 88: 77-81.

Luis, J.C., Perez, R.M. and Gonzalez F.V. 2007. UV – B radiation effect on foliar concentrations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants. Food Chemistry 101: 1211-1215.

Nakano, M. and Mii, M. 1993. Somatic hybridization between *Dianthus chinensis* and *D. barbatus* through protoplast fusion. Theor. Appl. Gent. 86: 1-5.

Nothdurft, B.A., Schuster, A. and Friedt, W. 1998. Breeding for modified fatty acid composition via experimental mutagenesis in *Camelina sativa* (L.) Crtz. Industrial Crops and Products 7: 291-295.

Okamura, M., Yasuno, N., Ohtsuka, M., Tanaka, A., Shikazono, N. and Hase, Y. 2003. Wide variety of flower-color and shape mutants regenerated from leaf cultures irradiated with ion beams. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 206: 574-578.

Ozyigit, I.I., Kahraman, M.V. and Eracn, O. 2007. Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). African Journal of Biotechnology 6: 003-008.

Park J.S., Choung, M.G., Kim, J.B., Hahn, B.S., Kim, J.B., Bae, S.C., Roh, K.H., Kim, Y.H., Cheon, C.I., Sung,M.K. and Cho, K.J. 2007. Genes up-regulated during red coloration in UV-B irradiated lettuce leaves. Plant Cell Reports 26: 507-516.

Pinet-Leblay, C, F.X. Turpin and E. Chevreau. 1992. Effect of gamma and ultraviolet irradiation on adventitious regeneration from *in vitro* cultured pear leaves. Euphytica 62: 225-233.

Ray, T., Saha. P. and Roy, S.C. 2006. Commercial production of *Cordyline terminalis* (L) Kunth. from shoot apex meristem and assessment for genetic stability of somaclones by isozyme markers. Scientia Horticulturae 108: 289–294.

Rizza, F., Mennella, G., Collonnier, C., Sihachakr, D., Kashyap, V., Rajam, M.V., Presterà, M. and Rotino, G.L. 2002. Androgenic dihaploids from somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. aethiopicum* group gilo as a source of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melongenae*. Plant Cell Reports 20: 1022-1032.

Russell, H. 1994. Molecular markers. In Biotechnology in forest tree improvement. pp. 41. New York: FAO Forestry Paper.

Sim, G.E., Loh, C.S. and Goh, C.J. 2007. High frequency early *in vitro* flowering of *Dendrobium* Madame Thong-In (Orchidaceae). Plant Cell Reports 26: 383-393.

Venkataiah, P., Christopher, T. and Karampuri, S. 2005. Selection of atrazine-resistant plants by *in vitro* mutagenesis in pepper (*Capsicum annuum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 83: 75-82.

Vyas, D., Sharma, S.K. and Sharma, D.R. 2003. Genetics structure of walnut genotype using leaf isozymes as variability measure. Scientia Horticulturae 97: 141-152.

Werner, D.W. 1992. Catalase polymorphism and inheritance in peach. HortScience 27: 41-43.

Whittle, C.A. and Johnston M.O. 2003. Male-biased transmission of deleterious mutations to the progeny in *Arabidopsis thaliana*. PNAS 100: 4055-4059.

Wongpiyasatid, A. and Hormchan, P. 2000. New mutants of perennial *Portulaca grandiflora* through gamma radiation. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 34: 408-416.

Zhu, M,Y., Pan, J., Wang, L., Gu, Q. and Huang, C. 2003. Mutation induced enhancement of A1 tolerance in barley cell lines. Plant Science 164: 17-23.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS)

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1650.00
KNO_3	1900.00
KH_2PO_4	170.00
$CaCl_2.2H_2O$	440.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
ธาตุอาหารรอง	
KI	0.83
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.H_2O$	16.90
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.10
Glycine	2.00
Sucrose (กรัม)	30.00
วุ้น (กรัม)	7.50
pH	5.7

ตารางภาคผนวกที่ 2 สารเคมีย้อมสีเอนไซม์ 2 ระบบ

ระบบเอนไซม์	ส่วนประกอบ
เปอร์ออกซิเดส (peroxidase; PER)	3-Amino-9-ethylcarbazole, ß-Napthol, Acetone, Tris-HCl, Acetic acid และ Hydrogen peroxidase 3%
แอลฟาเอสเทอเรส (esterase; EST)	Phosphate buffer (monobasic sodium phosphate และ dibasic sodium phosphate), Fast blue B Salt และ Napthyl acetate

ตารางภาคผนวกที่ 3 ส่วนประกอบของเจลตอนบน (stacking gel) และเจลตอนล่าง (separating gel) สำหรับเจล 2 แผ่น

สารเคมี	ความเข้มข้น (%)	
	เจลตอนล่าง (%)	เจลตอนบน (%)
30% acrylamide gel (ml)	3.0	0.30
1.5 M Tris-HCl (pH 8.9) (ml)	1.45	-
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) (ml)	-	0.375
น้ำกลั่น (ml)	4.435	2.265
TEMED (µl)	5.0	5
10% APS (µl)	225	120
ปริมาตรรวม (ml)	9.115	3.065

ที่มา: ธัญญาพร (2547)

ภาคผนวกที่ 1 ส่วนประกอบสารเคมี

1. **Extraction buffer**
   - Tris-HCl 0.5 M pH 7.5 6.05 กรัม
   - PVP 2% 2.0 กรัม
   - Na_2EDTA 2 Mn 0.074 กรัม
   - น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
   - 2-Mercapthoetanol 1% (เติมเมื่อบดตัวอย่าง)

2. Electrode buffer

- Tris-HCl 0.5 M pH 8.3	3.03 กรัม
- Glycine	14.04 กรัม

หมายเหตุ นำ Tris-HCl และ Glycine ละลายในน้ำ 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH 8.3

3. ระบบสีย้อมเอนไซม์

แอลฟาเอสเทอเรส (α-Esterase)

1. Phosphate buffer 0.1 M pH 6.0	100 มิลลิลิตร
สารเคมี Stock A	
- Solution of monobasic sodium phosphate 0.1 M	43.8 มิลลิลิตร
สารเคมี Stock B	
- Solution of dibasic sodium phosphate 0.1 M	6.15 มิลลิลิตร
2. Fast blue S salt	150 มิลลิลตร
3. α-Naphyl acetate in absolute alcohol	3 มิลลิลิตร

หมายเหตุ นำ Stock A และ Stock B ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร และปรับ pH 6.0 ละลายสารในข้อ 1 และ 2 ให้เป็นเนื้อเดียวกันกรองในที่มืด และเติมสารในข้อ 3 เมื่อเขย่าย้อมในที่มืดจนกว่าเจลจะติดสีชัดเจน

เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase)

สารเคมี Stock A

1. 3-Amino-9-ethylcarbazole	210 มิลลิลิตร
2. β-Napthol	145 มิลลิลตร
3. Acetone	100 มิลลิลตร

หมายเหตุ ละลายสารเคมีในข้อ 1 และ 2 ในข้อ 3 ให้เป็นเนื้อเดียวกันและเก็บในขวดสีชา

สารเคมี Stock B

1. Tris-HCl	1.50 มิลลิลิตร
2. Acetic acid	1.70 มิลลิลิตร
3. น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

สารเคมี Stock C

1. Hydrogen peroxidase 3% (H_2O_2)	1 มิลลิลิตร

หมายเหตุ ผสม Stock A: B: C ในอัตราส่วน 20: 80: 1 เท่า ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เขย่าย้อมในที่มืดจนกว่าเจลจะติดสีชัดเจน

ภาคผนวกที่ 2 การเกิดปฏิกิริยาของสีย้อมแต่ละระบบเอนไซม์

1. **แอลฟาเอสเทอเรส (α-Esterase; EST)**

   เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาทางเคมี

   α-Naphyl acetate + H_2O $\longrightarrow$ α-Naphthol + Acetate

   เร่งปฏิกิริยาในสภาพมืด เกิดแถบสีม่วงหรือม่วงดำบนแผ่นเจล

2. **เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase; PER)**

   เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาทางเคมี

   H_2O_2 + Donor $\longrightarrow$ Oxidized donor + $2H_2O$

   อาศัยหลักการเปลี่ยนสีของ Aromatic amides เช่น o-dianisidine เมื่อมี H_2O และ peroxidase เร่งปฏิกิริยาในสภาพมืดเกิดแถบสีน้ำตาลส้มบนแผ่นเจล

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวยุพาภรณ์ ศิริโสม

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4842036

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยทักษิณ	2547