บทที่ 4

วิจารณ์

1. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1 การชักนำแคลลัส

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบและข้อของหน้าวัวในการศึกษานี้คือ สูตร MMS ที่เติมอะดินีนซัลเฟต และลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ธาตุเหล็กลงครึ่งหนึ่งจากความเข้มข้นเดิม แต่การศึกษาของ Pierik และคณะ (1974) อ้างโดย สมปองและคณะ (2545) รายงานว่า สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวโดยใช้ชิ้นส่วนเอ็มบริโอและใบอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS ที่ใช้ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก เพียงครึ่งเดียว ธาตุอาหารรองและธาตุเหล็กเท่าเดิม อาจสรุปได้ว่าการเจริญเติบโตของเซลล์หน้าวัวจะเหมาะสมที่สุดเมื่อมีการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักและธาตุเหล็กลงพร้อมทั้งเติมอะดินีนซัลเฟต ทั้งนี้เพื่อกระตุ้นการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดียิ่งขึ้น ลักษณะของแคลลัสที่เกิดบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MMS เป็นแบบโนดูลาแคลลัส คือ แคลลัสที่เป็นปมแข็งมีการเจริญของรากและยอดไม่พร้อมกัน ในขณะที่แคลลัสที่ชักนำได้บนอาหารสูตร MS และ WPM มีลักษณะคล้ายโซมาติกเอ็มบริโอ คือ แคลลัสที่เป็นปมใสๆ มีแนวโน้วการเจริญของรากและยอดพร้อมกัน ความแตกต่างดังกล่าวเป็นผลมาจากองค์ประกอบของธาตุอาหาร และความเข้มข้นของธาตุอาหารบางตัวที่แตกต่างกันไปในแต่ละสูตรอาหาร Gamborg และคณะ (1968) อ้างโดย Bhansali และ Singh (2000) กล่าวว่า โซมาติกเอ็มบริโอสามารถชักนำและเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารสูง เช่น MS และ WPM นอกจากนี้ Bhansali และ Singh (2000) กล่าวว่า สารอนินทรีย์ไนโตรเจนในรูปแอมโนเนียมไนเตรทซึ่งเป็นธาตุอาหารที่สำคัญในสูตรอาหาร MS เหมาะต่อการเจริญของพืชบางชนิดในเขตแห้งแล้ง Reinert และคณะ (1967) อ้างโดย Bhansali และ Singh (2000) Ferguson และคณะ (1958) อ้างโดย Street (1973) รายงานว่า โพแทสเซียมไอออนมีความจำเป็นต่อการเกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนีซีสด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ธาตุเหล็กในรูปของ Fe-EDTA ยังมีผลต่อการชักนำกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนีซีส อย่างไรก็ตามความเป็นประโยชน์จะขึ้นอยู่กับช่วง pH

พันธุ์ที่ทดสอบมีผลต่อการชักนำแคลลัสแตกต่างกันทางสถิติ โดยพันธุ์วาเลนติโนให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด (83.73%) รองลงมาเป็นพันธุ์โซเน็ตและเปลวเทียนภูเก็ต สมปองและคณะ (2545) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหน้าวัว 3 สายพันธุ์ พบว่า พันธุ์ทรอปพิกา น่าชักนำแคลลัสเฉลี่ยทุกชิ้นส่วนดีที่สุด (82.66%) รองลงมาพันธุ์แชมเปญและพันธุ์ดวงสมร สรุปได้ว่าพันธุ์ที่แตกต่างกันอาจมีกิจกรรมภายในที่แตกต่างกัน เช่น อัตราการเจริญเติบโต ส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเจริญ ซึ่งเป็นผลให้ความสามารถในการชักนำแคลลัสแตกต่างกัน นอกจากนี้ชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำแคลลัสก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน เมื่อพิจารณาชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยง พบว่า ปล้องสามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด 72.63% แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชิ้นส่วนใบและข้อ อย่างไรก็ตามจากชิ้นส่วนใบและข้อสามารถชักนำแคลลัสได้ภายในสัปดาห์ที่ 4-5 เร็วกว่าชิ้นส่วนปล้องที่เป็นเช่นนี้เพราะชิ้นส่วนข้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีส่วนของตาข้างติดมาด้วย โดยตาข้างเป็นชิ้นส่วนเช่นเดียวกับใบ คือ มีส่วนของเนื้อเยื่อเจริญจำนวนมากจึงส่งเสริมการชักนำการสร้างแคลลัส แต่ในการศึกษาของ สมปอง และคณะ (2545) พบว่า การใช้ชิ้นส่วนก้านใบสามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้สูงสุด รองลงมาเป็นชิ้นส่วนแผ่นใบ ปลีดอก และจานรองดอกตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ชิ้นส่วนใบและข้อเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำแคลลัส และในการใช้ชิ้นส่วนใบเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำแคลลัสได้ทำการศึกษาผลของการสร้างบาดแผลต่อการชักนำแคลลัสควบคู่ไปด้วยพบว่า ไม่ว่าจะมีการสร้างบาดแผลบนชิ้นส่วนใบหรือไม่ก็ไม่มีผลต่อการสร้างแคลลัส โดยพบว่าชิ้นส่วนใบที่มีการสร้างบาดแผลสามารถชักนำแคลลัส 58.8% ในขณะที่ชิ้นส่วนใบที่ไม่มีการสร้างบาดแผลสามารถชักนำแคลลัส 44.03% ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ การสร้างบาดแผลเป็นการเพิ่มช่องทางในการดูดอาหารของชิ้นส่วนพืช โดยสร้างบาดแผลแนวขวางกับเส้นกลางใบทำให้ท่อไซเลมและโฟลเอ็มภายในเส้นใบสามารถดูดน้ำและอาหารได้โดยตรงผ่านทางบาดแผลมากยิ่งขึ้น และยังเป็นการกระตุ้นการชักนำแคลลัสให้เร็วยิ่งขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามการสร้างบาดแผลบางครั้งส่งผลให้ชิ้นส่วนใบดำตลอดทั้งชิ้นส่วน เพราะการสร้างบาดแผลในชิ้นส่วนพืชทำให้เกิดการออกซิเดชั่นสร้างสารประกอบพวกฟีโนล (phenolic compounds) เป็นตัวขัดขวางการดูดซับน้ำและอาหารด้วยเช่นกัน (รังสฤษดิ์, 2540) แต่ในการศึกษานี้เกิดเป็นจำนวนน้อย ดังนั้นในการชักนำแคลลัสโดยใช้ใบจึงมีการสร้างบาดแผลร่วมด้วย จากการสังเกตในการทดลองนี้แนะนำว่าในการวางเลี้ยงควรให้หลังใบสัมผัสอาหาร เพราะช่วยในการส่งเสริมการดูดน้ำธาตุอาหาร เนื่องจากปากใบและเซลล์อิพิเดอร์มิสของหน้าวัวมีกิจกรรมดังกล่าวสูงกว่าด้านท้องใบ แม้จะไม่มีการเปรียบเทียบการวางเลี้ยงระหว่างการให้ท้องใบหรือหลังสัมผัส

อาหารเพื่อช่วยส่งเสริมการชักนำการเกิดแคลลัส แต่พบว่าหากวางเลี้ยงโดยท้องใบสัมผัสอาหารจะเกิดสีน้ำตาลและตาย ส่วนการวางให้หลังใบสัมผัสอาหารจะเกิดแคลลัสได้ดีกว่า (ไม่แสดงข้อมูล)

ในเมื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสพบว่า เมื่อเติม TDZ ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล บนอาหารสูตร MMS สามารถชักนำแคลลัสในชิ้นส่วนใบ (91%) และข้อ (76%) ของหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโนได้สูงที่สุด เพราะ TDZ และ BA เป็นสารในกลุ่มไซโทไคนินซึ่งทำหน้าที่ในการส่งเสริมการแบ่งเซลล์ โดยอิทธิพลของไซโทไคนินต่อการสังเคราะห์โปรตีนทำให้เกิดการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว (สมพร, 2541) Houssa และคณะ (1990) อ้างโดย สมพร (2541) รายงานว่า ผลของ BA ส่งเสริมการแบ่งเซลล์เนื่องมาจากมีการสังเคราะห์ DNA และ โปรตีนที่ช่วยให้การแบ่งเซลล์เป็นไปได้เร็วขึ้น ในการศึกษานี้เติม TDZ ร่วมกับ BA ในอัตราส่วนที่เท่ากันจึงส่งเสริมการชักนำแคลลัส และมีลักษณะเป็นแบบโนดูลาแคลลัส แต่บางหน่วยทดลองที่เติม NAA 2, 4-D Dicamba และ Picloram ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินควบคู่กับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินคือ BA ไม่ส่งเสริมการเกิดแคลลัสหรือเกิดแคลลัสแต่มีสีน้ำตาลและตายในที่สุด เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kuehnle และคณะ (1992) รายงานว่าในการชักนำแคลลัสหน้าวัว เมื่อเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินที่ความเข้มข้น 0–0.5 มก/ล จะช่วยในการส่งเสริมการชักนำแคลลัส แต่หากเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ความเข้มข้น 0–1 มก/ล จะชักนำให้เกิดแคลลัสได้น้อยมากและแคลลัสที่ได้มีสีน้ำตาลและตาย ดังนั้นจึงชักนำแคลลัสหน้าวัวบนอาหารสูตร MMS เติม TDZ ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล

1.2 การชักนำยอด

จากผลการทดลองสามารถชักนำยอดจากโนดูลาแคลลัสหน้าวัวได้ดีในอาหารสูตร MMS เติม TDZ และ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล การใช้สารไซโทไคนินที่มีความเข้มข้นสูงจากภายนอกทำให้สมดุลของไซโทไคนินและออกซินสูงขึ้น (ไซโทไคนินสูงกว่าออกซิน) กระตุ้นให้เกิดการชักนำเป็นยอด สอดคล้องกับการศึกษาของ สมปอง (2539ก) ซึ่งรายงานว่า BA เป็นสารในกลุ่มไซโทไคนินที่มีประสิทธิภาพในการชักนำยอดได้ดีที่สุด นอกจากนี้สมปองและคณะ (2545) ยังรายงานว่าในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของหน้าวัวทุกสายพันธุ์ (ทรอปพิกาน่า แชมเปญ และดวงสมร) ในอาหารเติม BA ส่งผลให้แคลลัสมีลักษณะค่อนข้างแข็งและพัฒนาเป็นตุ่มสีเขียวโดยตุ่มนี้จะพัฒนาเป็นยอดต่อไป สมปองและคณะ (2545) รายงานว่า ไซโทไคนินมีผลต่อการชัก

นำและเพิ่มปริมาณแคลลัส ตลอดจนการพัฒนาเป็นต้นจากชิ้นส่วนหน้าวัว Handro และ Floh (2001) รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Melia azedarach* ว่าเมื่อเติม BA (ความเข้มข้น 0.5-2 มิลลิโมลาร์) ลงในอาหารเพาะเลี้ยงทำให้เกิดตารวมเพิ่มมากขึ้นโดยหนึ่งตาสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้หนึ่งหรือหลายต้น นอกจากนี้ในการศึกษาของ Matsumoto และ Kuehnle (1997) พบว่าการชักนำยอดของหน้าวัว *(A. andranum)* ในระยะแรกต้องใช้ไซโทไคนินร่วมในอาหารสูตร MS และภายใต้สภาพความเข้มแสงต่ำส่งเสริมให้เกิดยอดจำนวนมากจากการใช้ชิ้นส่วนข้อ

พบว่าการชักนำยอดในอาหารสูตร MMS เติม TDZ และ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล ที่เป็นอาหารเหลวสามารถชักนำยอดในโนดูลาแคลลัสในอาหารเหลว (23.0 ยอดต่อชิ้นส่วน) ดีกว่าบนอาหารแข็ง (11.22 ยอดต่อชิ้นส่วน) เพราะการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทำให้แคลลัสสามารถสัมผัสกับอาหารได้ทุกส่วน และหากมีการปล่อยสารฟีโนลิกก็สามารถกระจายไปยังส่วนอื่นๆได้ ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งชิ้นส่วนพืชจะสัมผัสอาหารได้เพียงบางส่วนเท่านั้น และหากมีการปล่อยสารชีวเคมีก็จะไม่สามารถกระจายไปยังส่วนอื่นได้และอาจขัดขวางการดูดซับอาหารของชิ้นส่วนพืชด้วย (รังสฤษดิ์, 2540) แต่บางครั้งในการทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในสภาพเขย่าเลี้ยงนี้ส่งผลให้มีการปนเปื้อนได้สูงเช่นกันเนื่องจากอาหารเหลวที่กระเด็นไปบริเวณปากขวดส่งเสริมให้ปนเปื้อน รายงานของ Teng และคณะ (1993) อ้างโดย Teng (1997) รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวบนอาหารเหลวสามารถชักนำยอดได้ดีกว่าบนอาหารแข็ง ต่อมา Teng (1997) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวสามารถชักนำยอดเดี่ยวๆได้เป็นจำนวนมากและใช้ระยะเวลาในการชักนำยอดน้อยกว่า ดังนั้นการชักนำยอดในอาหารเหลวใช้ระยะเวลาสั้นกว่าการชักนำยอดบนอาหารแข็ง

2. การศึกษาการกลายพันธุ์

2.1 การจุ่มแช่โนดูลาแคลลัสใน EMS

การศึกษาการชักนำการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์โซเน็ตโดยใช้สารเคมีคือ EMS ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน นาน 60 และ 90 นาที พบว่า ภายหลังการนำโนดูลาแคลลัสหน้าวัวอายุ 10 สัปดาห์ มาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS นาน 60 นาที โนดูลาแคลลัสที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นสูงสุด (1.0%) มีสีซีดลง แต่ทรีตเมนต์อื่นๆ ไม่พบลักษณะที่เปลี่ยนแปลง และเมื่อนำโนดูลาแคลลัสไปเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ พบว่าโนดูลาแคลลัสมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า

50% ขณะที่จุ่มแช่สารละลาย EMS นาน 90 นาที โนดูลาแคลลัสเริ่มมีสีซีดลงเมื่อเปรียบกับทรีตเมนต์ชุดควบคุม และภายหลังเพาะเลี้ยงพบว่า โนดูลาแคลลัสมีอัตราการรอดชีวิตลดลงต่ำกว่า 50% ในทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ในความเข้มข้น 0.75 และ 1.0% ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดโนดูลาแคลลัสจึงโดนทำลายได้มาก เนื่องมาจากในการจุ่มแช่สารละลาย EMS นาน 90 นาที เป็นเวลาที่นานกว่า 60 นาที จึงทำให้สารละลาย EMS เข้าทำลายกลุ่มเนื้อเยื่อเจริญภายในโนดูลาแคลลัสได้มากกว่า และการจุ่มแช่ทำในภายใต้สภาพเขย่าทำให้โนดูลาแคลลัสสามารถดูดซึมสารละลาย EMS ได้ทั่วถึง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของสมปอง และวิทยา (2542) รายงานว่า ภายในโนดูลาแคลลัสมีกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญสูง ดังนั้นเมื่อผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS จึงทำให้โดนทำลายเป็นจำนวนมาก ดังนั้นเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงจึงมีอัตราการรอดชีวิตต่ำด้วยเช่นกัน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lee และ Lee (2002) ในการชักนำการกลายพันธุ์ของข้าวโดยนำแคลลัสที่ชักนำได้จากอับละอองเรณูมาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 0, 10 และ 20 วัน พบว่า เดิมแคลลัสมีสีเขียว แต่เมื่อจุ่มแช่ระยะเวลานานขึ้นทำให้แคลลัสมีสีซีดและเผือกมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (จุ่มแช่นาน 0 วัน) จากการผลศึกษานี้พบว่า เมื่อจุ่มแช่โนดูลาแคลลัสในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ1.0% (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่าความเข้มข้นที่มีผลในการยับยั้งการพัฒนาของโนดูลาแคลลัสที่ระดับ 50% คือ 0.725% (ปริมาตร/ปริมาตร) โดยสมปอง (2541) รายงานว่า ความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่ยับยั้งการสร้างแคลลัสหรือการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้จำนวนครึ่งหนึ่งหรือ 50% (LD_{50}) ถือว่าเป็นค่าในการประเมินความเข้มข้นที่เหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ ทั้งนี้เพราะความเข้มข้นดังกล่าวสร้างความเสียหายและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับหน่วยพันธุกรรมอย่างน้อย 50% โดยในพืชแต่ละชนิดจะมีค่า LD_{50} แตกต่างกันเพราะขึ้นอยู่กับชิ้นส่วน และอายุของชิ้นส่วนพืชที่นำมาจุ่มแช่ ระยะเวลาในการจุ่มแช่ และความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการจุ่มแช่ (สรินุช, 2540) เช่นในการศึกษาของ Gahukar และ Jambhale (2000) พบว่าในการจุ่มแช่แคลลัสอ้อย อายุ 15 วัน หลังการย้ายเลี้ยง ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ นาน 24 ชั่วโมง มีค่า LD_{50} คือ 0.02% และการศึกษาของ Bhagwat และ Duncan (1998) ในการนำชิ้นส่วนปลายยอด อายุ 4 สัปดาห์ ของกล้วยภายในหลอดทดลองมาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ นาน 30 นาที พบค่า LD_{50} คือ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลลาร์ ดังนั้นหากจุ่มแช่โนดูลาแคลลัสหน้าวัวพันธุ์โซเน็ตด้วยสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0.725% นาน 90 นาที ทำให้โนดูลาแคลลัสมีอัตรารอดชีวิต 50% และโนดูลาแคลลัสที่รอดชีวิตมีแนวโน้มว่าจะได้หน้าวัวที่มีลักษณะกลายพันธุ์ไปจากเดิม

2.2 การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรม

ในการศึกษานี้ภายหลังนำโนดูลาแคลลัสจุ่มแช่สารละลาย EMS แล้วจึงนำโนดูลาแคลลัสมาเพาะเลี้ยงอาหารชักนำยอด นาน 4 สัปดาห์ และอาหารชักนำรากตามลำดับจำนวน 5 รุ่น คือ M1R1-M1R5 โดยภายหลังเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำราก 4 สัปดาห์ ในแต่ละรุ่นจึงตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานและทางชีวเคมี คือการใช้เทคนิคไอโซไซม์ Ahloowalia และ Maluszynski (2001) รายงานว่า ในกระบวนการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของชิ้นส่วนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถตรวจการกลายพันธุ์ได้เร็วกว่าชิ้นส่วนพืชในสภาพปกติ ทั้งนี้โดยกระบวนย้ายเลี้ยงชิ้นส่วนนั้นหลายๆ ครั้งอาจพบว่า ลักษณะทางพันธุกรรมจะคงที่ในรุ่นที่ V_3-V_4 (*in vitro* $_3$ – *in vitro* $_4$) จากการศึกษานี้ภายหลังการชักนำราก นาน 2 สัปดาห์ พบว่า ลักษณะทางสัณฐานของต้นหน้าวัวในรุ่นที่ M1R2 มีลักษณะผิดปกติ คือ เกิดอาการใบด่าง (ภาพที่ 8ก – 8จ) ทั้งชนิดด่างเป็นบางส่วน (sectorial chimera) และ ด่างกระจาย (mericlinal chimera) ในต้นหน้าวัวที่จุ่มแช่สารละลาย EMS เข้มข้น 1.0% (ปริมาตร/ปริมาตร) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Koh และ Daviest (2001) พบว่า ภายหลังการจุ่มแช่เมล็ดของ *Tillandsia fasciculata* ในสารละลาย EMS เข้มข้น 1.2% (ปริมาตร/ ปริมาตร) นาน 22 ชั่วโมง แล้วนำมาเพาะเลี้ยง พบว่าต้นใหม่ที่ได้มีอาการด่าง ทั้ง sectorial chimera และ mericlinal chimera และในการศึกษานี้ยังพบลักษณะที่ผิดปกติในรุ่นนี้อีก คือ รูปร่างใบบิดเบี้ยวผิดปกติ (ภาพที่ 9ก-9ค) ในหน้าวัวที่จุ่มแช่สารละลาย EMS เข้มข้น 0.75% (ปริมาตร/ปริมาตร) สรินุช (2540) และ Gottschalk และ Wolff (1983) รายงานว่าชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ในการชักนำการกลายพันธุ์หากเป็นชิ้นส่วนที่ประกอบด้วยเซลล์เริ่มต้นมากกว่า 1 เซลล์เมื่อใช้สารเคมีหรือรังสีที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ การกลายพันธุ์ที่ได้ในยีนนั้นอาจไม่สม่ำเสมอกันและเมื่อเซลล์เหล่านี้พัฒนาไปเป็นต้นในรุ่น M1 เซลล์จึงแสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกัน บางส่วนเป็นจีโนไทป์แบบข่มสมบูรณ์ (Aa, AA) และบางส่วนเป็นแบบด้อย (aa) ซึ่งลักษณะนี้อาจไม่ได้แสดงออกมาในรุ่น R1 เนื่องจากเสียหายจากการขุ่มแช่ในสารละลาย EMS ดังนั้นหน้าวัวในรุ่น R2 จึงได้ต้นที่แสดงลักษณะฟีโนไทป์ที่ผิดปกติออกมาจากยีนแบบด้อย

การตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยวิธีทางชีวเคมีหรือการใช้เทคนิคไอโซไซม์ในการศึกษานี้ใช้ระบบเอนไซม์จำนวน 7 ระบบ คือ PER, LDH, ADH, EST ACP, MDH และ SKD โดยใช้ชิ้นส่วนใบอ่อนที่ 3 – 6 (นับจากยอด) ของต้นหน้าวัวภายในหลอดทดลองทุกต้น อายุ 2 สัปดาห์ ภายหลังการชักนำรากมาสกัดเอนไซม์ แล้วแยกเอนไซม์บนแผ่นเจลอะคลิลาไมด์ พบว่า เมื่อย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ PER, LDH, ADH และ SKD ไม่พบการติดสี ส่วนการย้อมสีเจลด้วยระบบเอนไซม์

EST ACP และ MDH แผ่นเจลติดสี แต่เมื่อย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ EST มีการติดสีดีที่สุดและสามารถนำมาใช้ในการแยกความแตกต่างได้ อาจเนื่องจากเอนไซม์ของหน้าวัวมีความเหมาะสมกับปฏิกิริยาของระบบ EST มากที่สุด Werner (1992) รายงานว่า พืชแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อระบบเอนไซม์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Nakano และ Mii (1993) พบว่าเมื่อใช้ระบบเอนไซม์ EST ให้รูปแบบของแถบเอนไซม์ที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบเพื่อจำแนกสายพันธุ์ลูกผสมของ *Dianthus chinensis* และ *D. barbatus* ซึ่งเกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ และในการศึกษาของ Vyas และคณะ (2003) พบว่าในการจำแนกความแปรผันของสายพันธุ์วอล์นัท จำนวน 8 สายพันธุ์โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์พบว่าสามารถตรวจความแปรผันได้ดีที่สุดเมื่อใช้ระบบเอนไซม์ EST ผลให้มีการติดสีดีที่สุดและ MDH ติดสีดีรองลงมา จากการศึกษานี้พบความแปรผันของความเข้มของแถบเอนไซม์ที่ติดสี อาจเนื่องมาจากในการศึกษานี้ใช้ชิ้นส่วนใบที่อยู่ในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นใบอ่อนมาสกัดจึงอาจได้ปริมาณของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย จึงทำให้การติดสีของเอนไซม์ภายหลังย้อมติดสีได้ไม่ดี หากมีการศึกษาเรื่องการสกัดเอนไซม์จากต้นภายในหลอดทดลองควรมีการเพาะเลี้ยงต้นหน้าวัวให้มีความสมบรูณ์และเป็นใบที่แก่สีเขียวเข้ม

จากผลการศึกษานี้พบว่ารูปแบบเอนไซม์ที่ได้ในแต่ละทรีตเมนต์มีลักษณะที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 10) โดยพบว่าในทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ EMS เข้มข้น 0.75% ให้อัตราการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในทุกรุ่นต่างจากชุดควบคุมสูงสุด (35.18%) อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของหน่วยพันธุกรรมภายหลังชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้ EMS ราตรี (2540) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็นผลมาจากยีน ดังนั้นเมื่อยีนมีความแตกต่างเนื่องจากกระบวนการชักนำการกลายพันธุ์ จึงทำให้รูปแบบของเอนไซม์แตกต่างกันด้วย เช่นเดียวการศึกษาของวิทยา (2540) ที่พบการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบเอนไซม์ในใบมังคุดรุ่นที่ 1 ผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS เข้มข้น 0.5% (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งแตกต่างจากรูปแบบของเอนไซม์ในทรีตเมนต์ชุดควบคุมภายหลังย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ PER