บทที่ 3

ผล

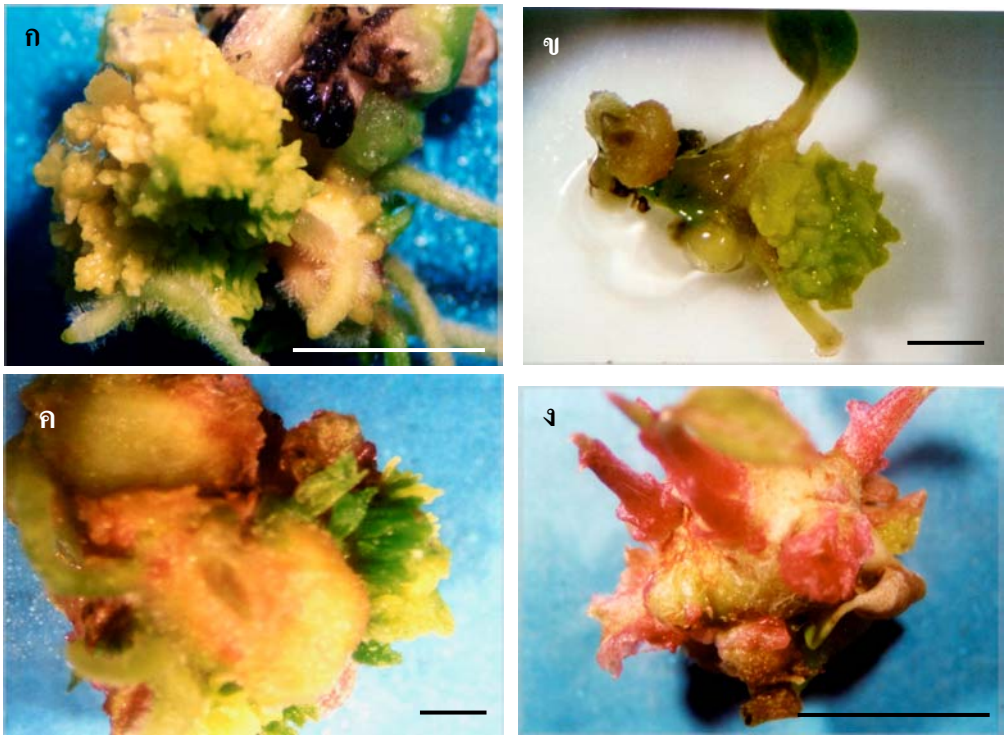
1.การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1 การศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการชักนำแคลลัสของหน้าวัว

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบและข้อของหน้าวัวพันธุ์โซเน็ต บนอาหารสูตรต่างๆ นาน 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร MS และ MMS สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุดเท่ากัน 86.6% รองลงมา คือ สูตรอาหาร WPM (66.67%) และ NN (40%) (ตารางที่ 2) สำหรับชิ้นส่วนข้อนั้น พบว่า สูตร MMS สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด คือ 100% รองลงมา คือ สูตรอาหาร MS (70%) WPM (60%) และ NN (20%) แคลลัสที่เกิดบนอาหารสูตร WPM และ MS มีลักษณะคล้ายเอ็มบริโอเจนิซิส (embryogenesis-like structure) ในขณะที่แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NN สีเหลืองปนแดงเป็นแบบโนดูลาแคลลัส ทำนองเดียวกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 2. การชักนำแคลลัสในอาหารสูตรต่างๆ เติม BA 0.5 มก/ล ร่วมกับ TDZ 0.5 มก/ล

สูตรอาหาร	จำนวนชิ้นส่วนที่เลี้ยง		เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส		ลักษณะแคลลัส
	ใบ	ข้อ	ใบ	ข้อ	
MMS	15	10	86.6	100	โนดูลาแคลลัส สีเหลือง
MS	15	10	86.6	70	คล้ายเอ็มบริโอเจนิค แคลลัส
WPM	15	10	66.67	60	คล้ายเอ็มบริโอเจนิค แคลลัสสีเหลืองใส
NN	15	10	40	20	โนดูลาแคลลัสสีเหลือง ปนแดงขนาดเล็ก



ภาพที่ 3. ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำจากชิ้นส่วนข้อของพันธุ์โซเน็ตที่เพาะเลี้ยงบน (ก) อาหารสูตร WPM อายุ 6 สัปดาห์ (ข) อาหารสูตร MS อายุ 5 สัปดาห์ (ค) อาหารสูตร MMS อายุ 6 สัปดาห์ (ง) อาหารสูตร NN อายุ 8 สัปดาห์ (บาร์ = 1 ซม.)

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ปล้อง และข้อ ของหน้าวัว 3 สายพันธุ์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่ชักนำแคลลัสได้ดีที่สุด คือ ปล้อง (72.63%) รองลงมาคือ ใบ (68.57%) และข้อ (66.8%) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ นอกจากนี้ยัง พบว่า ระยะเวลาในการชักนำแคลลัสก็แตกต่างกัน โดยชิ้นส่วนข้อและใบสามารถชักนำแคลลัสได้ช่วงสัปดาห์ที่ 4-5 ซึ่งเร็วกว่าชิ้นส่วนปล้องและ พบว่า สายพันธุ์ก็มีอิทธิพลต่อการชักนำแคลลัสเช่นกัน คือ พันธุ์วาเลนติโนชักนำแคลลัสได้สูงสุด 83.73% รองลงมา คือ พันธุ์โซเน็ต และเปลวเทียนภูเก็ต คือ 78.73% และ 45.66% ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ลักษณะแคลลัสในแต่ละสายพันธุ์ก็มีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยแคลลัสของหน้าวัวสายพันธุ์โซเน็ตสีเหลืองขุ่นใส พันธุ์วาเลนติโนค่อนข้างมีสีเขียวจับตัวกันแน่น และพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ตสีเหลืองปนขาวทึบ (ภาพที่ 4)

เมื่อศึกษาอิทธิพลของการสร้างบาดแผลต่อการชักนำแคลลัสในชิ้นส่วนใบ พบว่า การสร้างบาดแผลสามารถกระตุ้นการชักนำแคลลัสได้ถึง 58.86% ในขณะที่ไม่สร้างบาดแผลชักนำ

แคลลัสได้เพียง 44.03% แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4) มีลักษณะตำแหน่งเกิดที่แตกต่างกัน ชิ้นส่วนใบที่ไม่สร้างบาดแผลแคลลัสเกิดตำแหน่งก้านใบและหากสร้างบาดแผลเกิดแคลลัสในตำแหน่งที่สร้างบาดแผลโดยตรง (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 3. ผลของการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนต่างๆ ของหน้าวัว 3 สายพันธุ์บนอาหารสูตร MMS เติม TDZ ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล

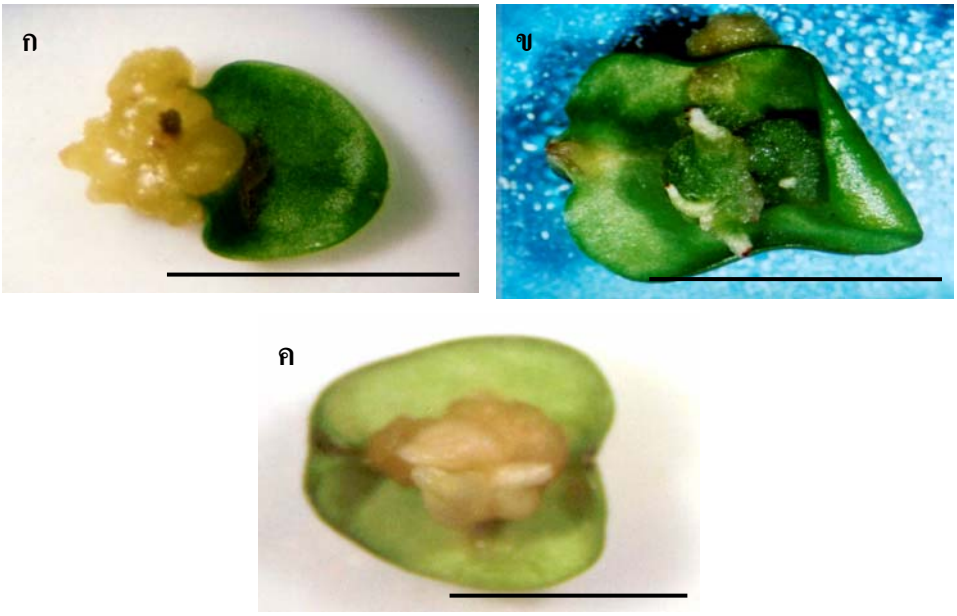
พันธุ์	เปอร์เซ็นต์เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วน			ค่าเฉลี่ย (พันธุ์)	F-Test (พันธุ์)	C.V. (%) (พันธุ์)	ลักษณะอื่นๆ
	ใบ	ปล้อง	ข้อ				
เปลวเทียนภูเก็ต	45.3	50.3	41.2	45.6B	**	4.31	สีเหลือง
โซเนท	77.6	83.6	74.8	78.67A			สีเหลืองครีม
วาเลนติโน	82.8	84.0	84.4	83.73A			สีเหลืองขุ่น
ค่าเฉลี่ย (ชิ้นส่วน)	68.57	72.63	66.8				
F-Test (ชิ้นส่วน)	ns						
C.V. (%) (ชิ้นส่วน)	30.01						

C.V. (%) พันธุ์xชิ้นส่วน = 14.94

** : มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 4. ลักษณะของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบแต่ละสายพันธุ์ อายุ 5 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เติม BA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มก/ล (ก) พันธุ์โซเน็ต (ข) พันธุ์วาเลนติโน (ค) พันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต (บาร์ = 1 ซม)

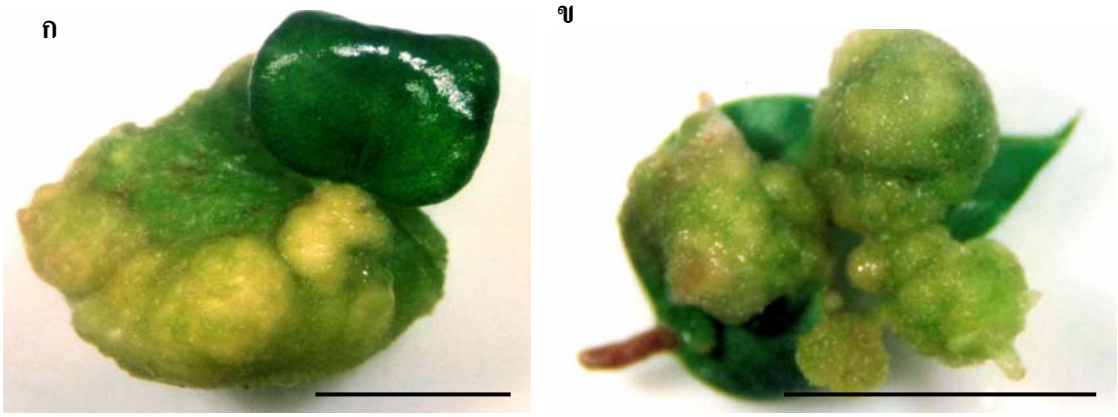
ตารางที่ 4. ผลของการสร้างบาดแผลบนชิ้นส่วนใบต่อการสร้างแคลลัสของหน้าวัวบนอาหารสูตร MMS เติม TDZ ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล

พันธุ์	เปอร์เซ็นต์เกิดแคลลัสในชิ้นส่วนใบ		ค่าเฉลี่ย (พันธุ์)	F-Test (พันธุ์)	C.V. (%) (พันธุ์)	ลักษณะอื่นๆ
	สร้างบาดแผล	ไม่สร้างบาดแผล				
เปลวเทียนภูเก็ต	78.6a	36.8c	57.70	ns	38.08	เกิดสีน้ำตาล
โซเน็ต	50.8b	37.6c	44.2			เกิดสีน้ำตาล
วาเลนติโน	47.2b	37.6c	42.4			เกิดสีน้ำตาล
ค่าเฉลี่ย(ชิ้นส่วน)	58.86	44.03				
F-Test (การสร้าง/ไม่สร้างบาดแผล)		ns				
C.V. (%)(การสร้าง/ไม่สร้างบาดแผล)		25.67				

C.V. (%) พันธุ์xการสร้างบาดแผล= 8.83

ns : ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 5. ลักษณะตำแหน่งที่เกิดแคลลัสในชิ้นส่วนใบของหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโน เนื่องจากอิทธิพล (ก) การไม่สร้างบาดแผล (อายุ 7 สัปดาห์) (ข) การสร้างบาดแผล (อายุ 6 สัปดาห์) (บาร์ = 1 ซม)

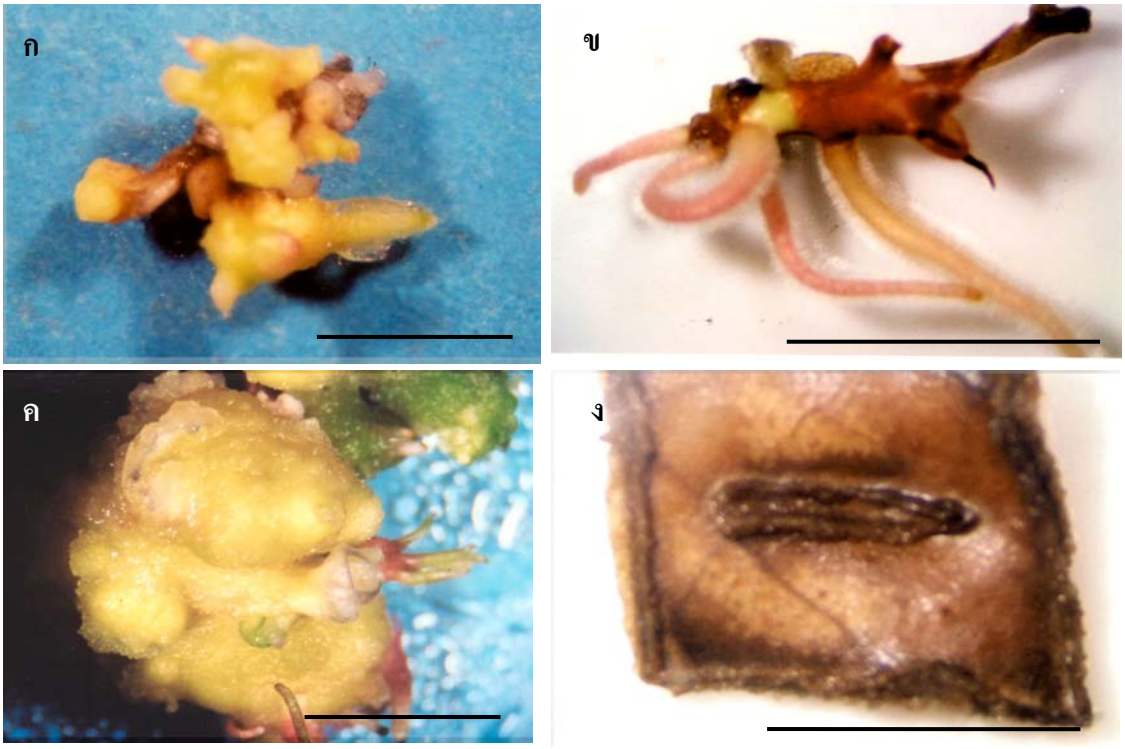
1.3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโนโดยใช้ชิ้นส่วนใบและข้อ บนอาหารสูตร MMS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อเติม TDZ และ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล ชิ้นส่วนใบและข้อให้การสร้างแคลลัส 91% และ 76% ตามลำดับ แคลลัสที่สร้างมีลักษณะแบบโนดูลาแคลลัส สำหรับ NAA 1 มก/ล ร่วมกับ BA 0.5 มก/ล ชักนำแคลลัสได้ 32% และ 52% จากชิ้นส่วนใบและข้อตามลำดับ และพบว่า ชิ้นส่วนใบและข้อให้การสร้างแคลลัสเมื่อเติม NAA 0.5 มก/ล, Picloram 0.5 มก/ล, Picloram 1 มก/ล ร่วมกับ 2,4-D 0.5 มก/ล และ Dicamba 1 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.5 มก/ล ได้ลดลงตามลำดับ (ตารางที่ 5) อย่างไรก็ตามเมื่อเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันจะส่งผลให้อัตราการสร้างแคลลัสแตกต่างกัน (ภาพที่ 6) และในการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิด เช่น Dicamba, Picloram, 2, 4-D, NAA ทั้งที่ใช้ควบคู่กันและใช้เดี่ยวๆ นอกจากจะไม่ส่งเสริมการชักนำแคลลัสแล้วยังมีผลให้ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงสีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วนอีกด้วย

ตารางที่ 5. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ต่อการสร้างแคลลัสและลักษณะแคลลัส

สารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนชิ้นส่วนที่วางเลี้ยง		เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส		หมายเหตุ
	ใบ	ข้อ	ใบ	ข้อ	
0.5 TDZ, 0.5 BA	50	50	91[1] (45)[2]	76 (38)	แคลลัสแบบโนดูลา
0.5 NAA	50	50	32 (16)	50.2 (25)	แคลลัสพัฒนาช้ามาก
1 NAA, 0.5 BA	50	50	32.4 (16)	52.0 (26)	แคลลัสแบบโนดูลา
1 NAA, 0.5 Dicamba	50	50	0	0	สีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน
1 NAA, 0.5 Picloram	50	50	0	0	สีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน
1 NAA, 0.5 2, 4-D	50	50	0	0	สีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน
0.5 Picloram	50	50	6.6d (3)	0	เกิดบริเวณขอบใบหลังเกิด 3-4วันจะมีสีน้ำตาล
1 Picloram, 0.5 BA	50	50	0	0	สีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน
1 Picloram, 0.5 Dicamba	50	50	0	0	สีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน
1 Picloram, 0.5 NAA	50	50	0	0	สีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน
1 Picloram, 0.5 2, 4-D	50	50	0	28 (14)	เกิดรากสีแดงจำนวนมาก
0.5 2, 4-D	50	50	0	0	สีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน
1 2, 4-D, 0.5 BA	50	50	0	0	สีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน
1 2, 4-D, 0.5 Dicamba	50	50	0	0	สีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน
1 2, 4-D, 0.5 Picloram	50	50	0	0	สีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน
1 2,4-D, 0.5 NAA,	50	50	0	0	สีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน
0.5 Dicamba	50	50	0	0	สีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน
1 Dicamba, 0.5 BA	50	50	0	0	สีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน
1 Dicamba, 0.5 NAA	50	50	46.2 (23)	40(20)	เกิดบริเวณขอบใบหลังเกิด 2-3 วันจะมีสีน้ำตาล
1 Dicamba, 0.5 Picloram	50	50	0	0	สีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน
1 Dicamba, 0.5 2, 4-D	50	50	0	0	สีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน

[1] : เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส [2]: จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส



ภาพที่ 6. ลักษณะแคลลัสหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโนบนอาหาร MMS (ก) ชักนำแคลลัสจากข้อ เติม NAA 1 มก/ล ร่วมกับ BA 0.5 มก/ล (ข) ชักนำแคลลัสจากข้อ เติม Picloram 1 มก/ล ร่วมกับ BA 0.5 มก/ล (ค) ชักนำแคลลัสจากใบเติม TDZ ร่วมกับ BA อย่างละ 0.5 มก/ล (ง) ชักนำแคลลัสจากใบ ลักษณะชิ้นส่วนที่เกิดสีน้ำตาล (บาร์ = 1 ซม)

1.4 การศึกษาการชักนำยอดจากโนดูลาแคลลัสของหน้าวัว

ในการศึกษาการชักนำยอดจากโนดูลาแคลลัสหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโนในอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MMS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่างๆ หลังเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ พบว่า การชักนำยอดจากโนดูลาแคลลัสหน้าวัวในอาหารเหลวให้ผลดีกว่าการชักนำยอดในอาหารแข็ง มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเติม TDZ ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล สามารถชักนำยอดได้สูงสุดเฉลี่ย 23.0 ยอดต่อชิ้นส่วน ลักษณะของยอดมีสีเขียว รองลงมาคือ เติม NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 1 มก/ล ให้ยอดเฉลี่ย 18.8 ยอดต่อชิ้นส่วน ส่วนในการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติม TDZ และ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล ร่วมกับ CH ความเข้มข้น 500 มก/ล ให้การสร้างยอดเฉลี่ย 12.48 ยอดต่อชิ้นส่วน และการเติม CH ความเข้มข้น 500 มก/ล, TDZ และ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล, NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 1 มก/ล ร่วมกับ CH ความเข้มข้น 500 มก/ล และ NAA ร่วม

กับ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 1 มก/ล สามารถชักนำยอดได้ลดลงตามลำดับ (ตารางที่ 6) นอกจากนี้ยังพบว่า การเติม CH เพื่อชักนำยอดทำให้ต้นของหน้าวัวที่ได้มีลำต้นเล็กและยืดยาวกว่าต้นที่ไม่มีการเติม แต่หากเติม NAA จะส่งผลทำให้ใบของหน้าวัวที่ได้จากการชักนำยอดมีขนาดเล็กไม่สมบรูณ์ แตกต่างจากยอดในอาหารเติม TDZ ซึ่งมีลำต้นที่สมบรูณ์

ตารางที่ 6. ผลของการชักนำยอดจากโนดูลาแคลลัสของในอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MMS

อาหาร	สารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนยอดเฉลี่ย/ชิ้นส่วน	ความยาวยอดเฉลี่ย(ซม.)	หมายเหตุ
เหลว	500 CH	0d	-	ไม่มีการพัฒนาของยอดเป็นสีดำในเวลาต่อมา
	0.5 TDZ, 0.5 BA	23.0a (18-27)[1]	2.5	ยอดสีเขียวอ่อนสมบูรณ์
	1 NAA,1BA	18.8b (16-21)	2.3	เกิดยอดสีแดงเป็นตุ่มก่อนจึงพัฒนาเป็นยอดต่อไป
	0.5 TDZ, 0.5 BA, 500 CH	0d	-	ไม่มีการพัฒนา เป็นสีดำ
	1 NAA, 1 BA, 500 CH	0d	-	ไม่มีการพัฒนา เป็นสีดำ
แข็ง	500 CH	12.0c (9-11)	1.6	เกิดยอดสีแดงปนน้ำตาล ยอดยาวเล็ก
	0.5 TDZ, 0.5BA	11.22c (6-16)	2.6	เกิดยอดสีแดงยอดยาวเล็ก
	1 NAA, 1BA	9.24c (6-13)	2.3	เกิดยอดสีแดงยอดขนาดเล็ก
	0.5 TDZ, 0.5BA, 500 l CH	12.48c (8-21)	1.5	เกิดยอดสีแดงเป็นต้นที่ลักษณะสมบรูณ์
	1 NAA, 1BA, 500 CH	9.88c (5-13)	1.4	เกิดยอดสีแดง ใบมีขนาดเล็ก
F - test		**		
C.V.(%)		29.9		

[1]จำนวนต่ำสุด-สูงสุด

** = มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติ

2. การชักนำการกลายพันธุ์

2.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาจุ่มแช่โนดูลาแคลลัสใน EMS ต่ออัตรารอดชีวิต

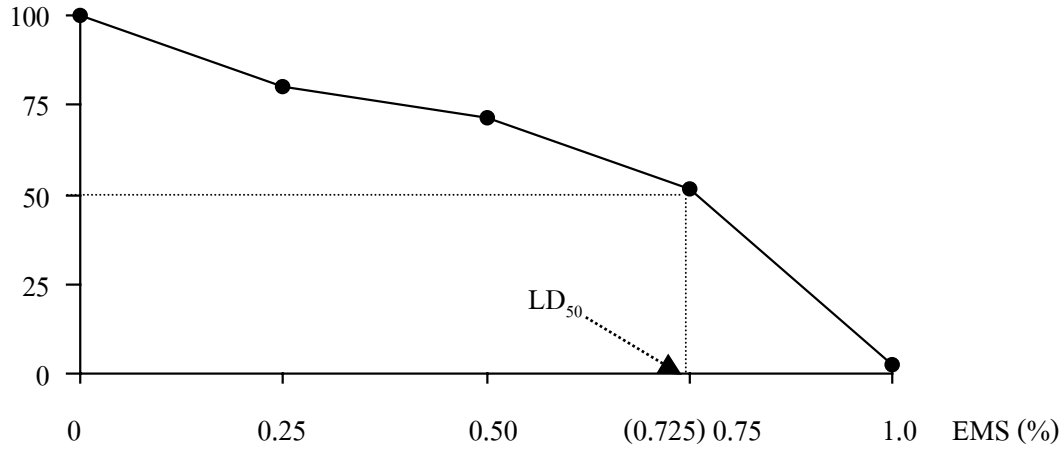
ภายหลังจุ่มแช่โนดูลาแคลลัสพันธุ์โซเน็ตด้วยสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน คือ 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.0% นาน 60 และ 90 นาที พบว่า ในการจุ่มแช่โนดูลาแคลลัสนาน 60 นาที ที่ระดับความเข้มข้น EMS 1.0% มีผลให้ลักษณะโนดูลาแคลลัสมีสีซีดลงเล็กน้อยจากเดิมและในความเข้มข้นอื่นไม่พบลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม แต่เมื่อจุ่มแช่โนดูลาแคลลัสนาน 90 นาที พบว่า โนดูลาแคลลัสหน้าวัวในทุกทรีตเมนต์ซึ่งเดิมมีสีเขียวเข้มเริ่มมีสีซีดลงและบางชิ้นที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 1.0% พบว่าโนดูลาแคลลัสมีสีขาวซีด จากนั้นจึงกรองแยกโนดูลาแคลลัสหน้าวัวไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MMS เติม BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล ภายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน จึงเริ่มบันทึกอัตรารอดชีวิต พบว่า การจุ่มแช่ EMS ทุกระดับความเข้มข้น นาน 60 นาที โนดูลาแคลลัสมีอัตรารอดชีวิตสูงเกิน 50% การจุ่มแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 0, 0.25, 0.50 0.75% และ 1.0% มีอัตรารอดชีวิต 100, 97.3, 85.5 80.3% และ 60.4% ตามลำดับ แต่เมื่อจุ่มแช่นาน 90 นาที พบว่า ที่ระดับ EMS เข้มข้น 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.0% มีอัตรารอดชีวิต 100, 80.3, 71.3, 51.26 และ 2.36% ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในทุกทรีตเมนต์ (ตารางที่ 7) และเมื่อนำมาเขียนกราฟ พบว่า EMS เข้มข้น 0.725% ให้อัตรารอดชีวิตลดลงครึ่ง (ภาพที่ 7)

ตารางที่ 7. ผลของการอัตราการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS

ความเข้มข้นของสารละลาย EMS (%)	อัตราการรอดชีวิต (%)	
	60 นาที	90 นาที
0.0	100a	100a
0.25	97.3b	80.3b
0.50	85.5b	71.3c
0.75	80.3b	51.26d
1.00	60.4c	2.36e
F-test	**	**
C.V. (%)	5.59	9.70

** : มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติ



ภาพที่ 7. อัตราการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสหน้าวัวภายหลังการชักนำการกลายพันธุ์ด้วย EMS นาน 90 นาที

2.2 การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นที่ได้จากการจุ่มแช่ EMS

1.1.1 ลักษณะทางสัณฐาน

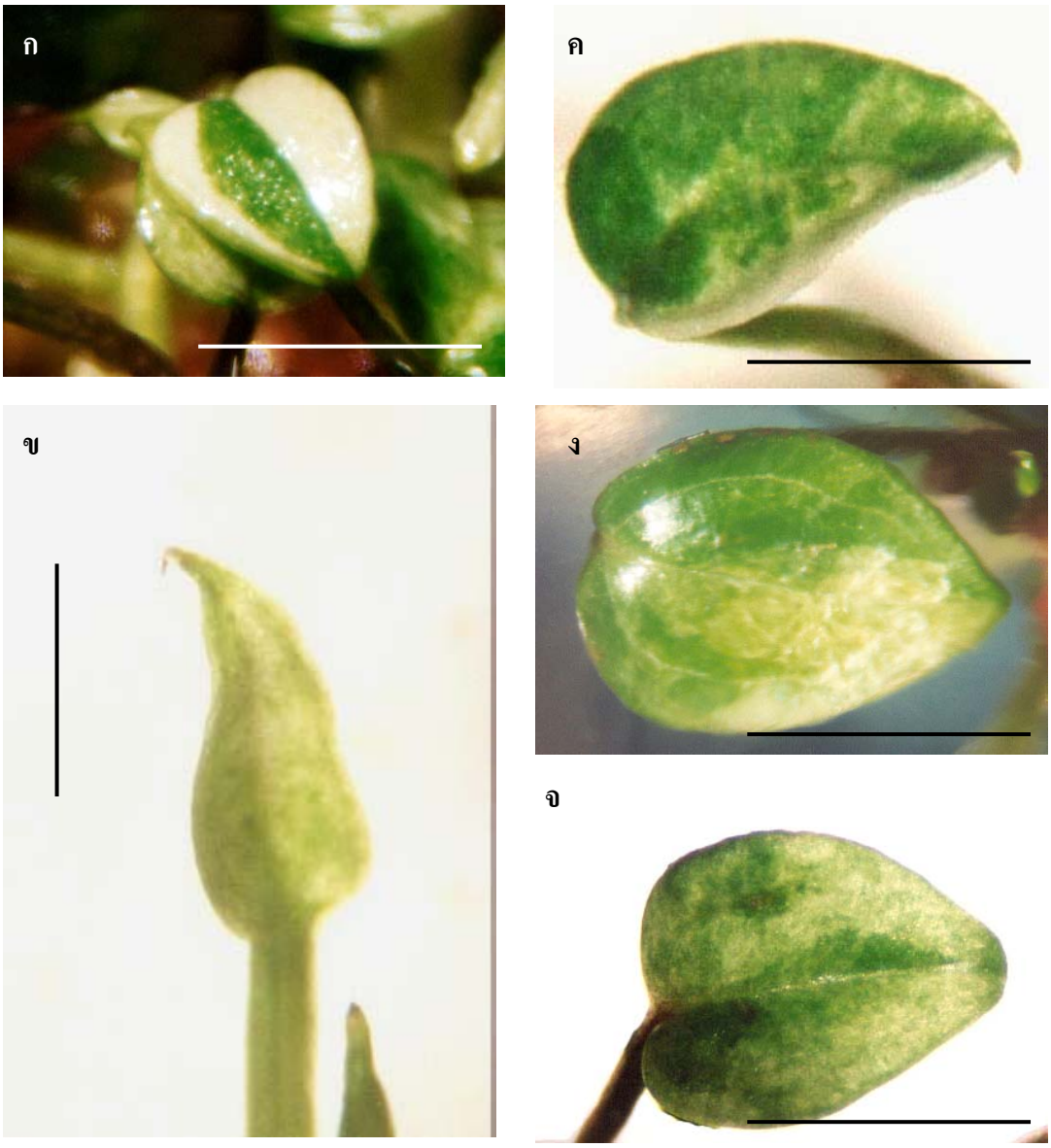
ภายหลังทรีตสารละลาย EMS แล้วนำโนดูลาแคลลัสมาชักนำยอดตั้งแต่รุ่น M1R1-M1R5 แล้วนำยอดที่ได้ในแต่ละรุ่นมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MMS เติม BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล พบว่า ภายหลังการตัดยอดมาเพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ หน้าวัวในรุ่นที่ M1R2 ที่จุ่มแช่สารละลาย EMS เข้มข้น 1.0% นาน 90 นาที ใบมีอาการด่าง 3 ลักษณะ (ภาพที่ 8) คือ ด่างเป็นบางส่วนของใบ (ภาพ 8ก) ด่างทั้งใบ (ภาพ 8ข) และด่างกระจายทั่วใบ (ภาพ 8ค- 8จ) นอกจากนี้ในใบหน้าวัวที่ทรีตด้วย EMS เข้มข้น 0.75% นาน 90 นาที มีรูปร่างของใบแตกต่างไปจากลักษณะเดิม (ภาพที่ 9) คือ ใบติดกันเป็นจีบ (9ก) และใบบิดเบี้ยว (9ข, 9ค) ซึ่งลักษณะผิดปกติเหล่าเกิดขึ้นในรุ่นที่ 2 (M1R2) เพียงรุ่นเดียว โดยลักษณะทางสัณฐานที่เปลี่ยนแปลงพบมากที่สุดในรุ่นที่ 2 ในทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ EMS เข้มข้น 0.75% (3.57%) รองลงมาคือ ในทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ EMS เข้มข้น 1.0% (1.2%) (ดังตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานในหน้าวัวที่จุ่มแช่ EMS ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น EMS (%)	ลักษณะที่เปลี่ยนแปลง (%)	หมายเหตุ
0.0	0	-
0.25	0.02	เกิดการเปลี่ยนแปลงรุ่น 2 รุ่นเดียว
0.50	0.31	เกิดการเปลี่ยนแปลงในรุ่น 2 รุ่นเดียว
0.75	3.57	ส่วนใหญ่เปลี่ยนแปลงในรุ่นที่ 2
1.0	1.2	เกิดการเปลี่ยนแปลงในรุ่นที่ 2

1.1.2 การตรวจสอบความแปรผันโดยใช้ไอโซไซม์

เมื่อย้อมสีเจลโพลีอะคริลาไมด์ที่ผ่านการแยกเอนไซม์ ด้วยระบบสีย้อมเอนไซม์ 7 ระบบ คือ ระบบเอนไซม์ PER, EST, LDH, ACP, ADH, MDH และ SDH พบว่า เมื่อย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ EST ACP และ MDH แผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ติดสี แต่หากย้อมด้วยระบบเอนไซม์ EST ให้ไซโมแกรมชัดที่สุด ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบเอนไซม์ที่เกิดขึ้นได้อย่างชัดเจน และเมื่อย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ ACP และ MDH พบว่า ไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างของเอนไซม์ได้ ขณะที่ย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ PER, LDH, ADH และ SDH (ตารางที่ 9) พบว่า เจลไม่ติดสี ดังนั้นจึงใช้ระบบเอนไซม์ EST ในการย้อมสีเพื่อตรวจสอบความแปรผันของหน้าวัวโซเน็ตที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ตั้งแต่รุ่นที่ M1R1- M1R5



ภาพที่ 8. ลักษณะการเกิดอาการด่างของใบหน้าวัว อายุ 2 สัปดาห์ภายหลังชักนำรากในรุ่นที่ 2 ที่ผ่านการใช้ EMS เข้มข้น 1.0% ชักนำการกลายพันธุ์ (ก) อาการด่างชนิดบางส่วนของใบ (ข) อาการด่างทั้งใบ (ค-ง) ด่างกระจายทั่วใบ (บาร์ = 1 ซม.)

ภาพที่ 9. ลักษณะของใบหน้าวัวอายุ 3 สัปดาห์ภายหลังการชักนำรากในรุ่นที่ 2 ซึ่งผ่านการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้ EMS เข้มข้น 0.75% (ก-ค) ลักษณะใบที่มีรูปร่างบิดเบี้ยวผิดปกติไปจากเดิม (บาร์ = 1 ซม.)

ตารางที่ 9. ผลการติดสีย้อมระบบต่างๆ ของแผ่นอะคริลาไมด์เจลที่ผ่านการแยกเอนไซม์ด้วยเครื่องอิเลคโตรโฟริซิส

ระบบเอนไซม์ที่ย้อมสี	คะแนนการติดสี	หมายเหตุ
PER	-	
EST	+++	สามารถแยกความแตกต่างของแถบเอนไซม์ได้
LDH	-	
ACP	+	ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้
ADH	-	
MDH	+	ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้
SDH	-	

+++ : คะแนนการติดสีชัดเจน + : คะแนนการติดสีเล็กน้อย - : คะแนนการไม่ติดสี

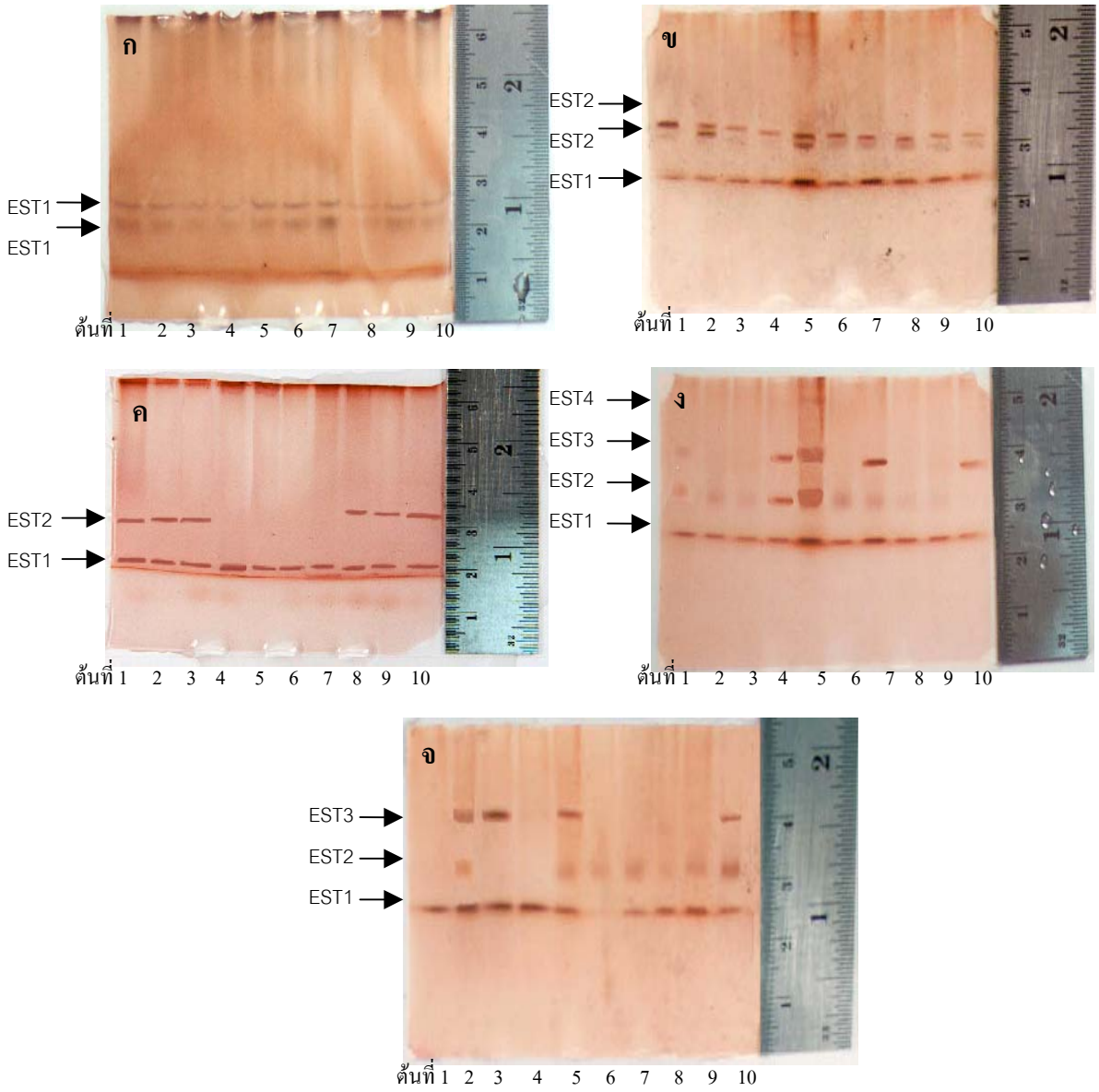
จากการย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ EST ในรุ่นที่ M1R1-M1R5 พบความแปรผันของความเข้มของสีย้อมในแต่ละรุ่น แต่ละทรีตเมนต์เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้ใบของหน้าวัวภายในหลอดทดลองซึ่งเป็นใบที่ 3-6 นับจากยอด แต่จากการทดลองพบว่า รูปแบบของเอนไซม์ที่ได้ในแต่ละรุ่นมีความแตกต่างกัน คือ

ชุดควบคุม (ไม่ผ่านการจุ่มแช่ EMS) มีรูปแบบเอนไซม์ 1 โซน คือ EST1 ซึ่งมี 2 แถบเอนไซม์ แต่ทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ EMS เข้มข้น 0.25, 0.50 และ 1.0% มีรูปแบบเอนไซม์ 2 โซน คือ EST1 และ EST2 ซึ่งทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ EMS เข้มข้น 0.25% พบว่า EST1 มีแถบเอนไซม์เพียง 1 แถบเอนไซม์ และ EST2 มี 2 แถบเอนไซม์ ทำนองเดียวกับทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ EMS เข้มข้น 1.0% พบว่า EST1 มี 1 แถบเอนไซม์และ EST2 มี 2 แถบเอนไซม์ และในทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ EMS เข้มข้น 0.5% พบว่า EST1 และ EST2 มี 1 แถบเอนไซม์ ส่วนทรีตเมนต์ที่ทรีต EMS เข้มข้น 0.75% มีรูปแบบเอนไซม์ 4 โซน คือ EST1 EST2 EST3 และ EST4 และทรีตเมนต์ที่ทรีต EMS เข้มข้น 1.0% มีรูปแบบเอนไซม์ 3โซน คือ โดยพบว่า EST1 EST2 และ EST3 มี 1 แถบเอนไซม์ (ภาพที่ 10)

ภายหลังการตรวจความแปรผันที่เกิดขึ้นด้วยไอโซไซม์ในหน้าวัวที่ผ่านการจุ่มแช่ EMS ในรุ่นที่ 1 –5 โดยพบว่า ต้นหน้าวัวที่จุ่มแช่ EMS เข้มข้น 0.25 0.5 0.75 และ 1.0% มีแถบเอนไซม์ที่แตกต่างจากชุดควบคุม 8.04, 5.38, 35.18 และ 33% ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของไอโซไซม์ในหน้าวัวที่ทรีต EMS ความเข้มข้นต่างๆ ในรุ่นที่ 1-5

ความเข้มข้น EMS (%)	จำนวนต้นที่ตรวจสอบ	แถบเอนไซม์ที่ต่างจากชุด Control (%)
0.0	300	0
0.25	224	8.04
0.50	130	5.38
0.75	54	35.18
1.0	15	33



ภาพที่ 10. รูปแบบเอนไซม์ในแต่ละทรีตเมนต์ในรุ่น M1R1 ภายหลังย้อมสี 10% polyacrylamide gel electrophoresis ด้วยระบบ EST (ก) ทรีตเมนต์ชุด Control (ข) ทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ EMS เข้มข้น 0.25% (ค) ทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ EMS เข้มข้น (ง) ทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ EMS เข้มข้น (จ) ทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ EMS เข้มข้น 1.0%