การปรับปรุงพันธุ์มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) โดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ในหลอดทดลอง

Varietal Improvement of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) by Mutagen Application in *In Vitro*

วิทยา พรหมมี

Wittaya Prommee

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Science

Prince of Songkla University

2541

เลขหมู่ QH195.G87 D63 2541 ก.2

Bib Key 143721

ชื่อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงพันธุ์มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) โดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ในหลอดทดลอง
ผู้เขียน	นายวิทยา พรหมมี
สาขาวิชา	พืชศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีระ เอกสมทราเมษฐ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ)

บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงพันธุ์มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) โดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ในหลอดทดลอง
ผู้เขียน	นายวิทยา พรหมมี
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2540

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ใช้แคลลัสที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนสีม่วงแดงของยอดมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) ซึ่งดูแลในขวดทดลองและย้ายเลี้ยงทุกเดือนเป็นเวลา 6 เดือน นำมาให้สิ่งก่อกลายพันธุ์ 2 ชนิด คือ ethylmethane sulfonate (EMS) และรังสีแกมมาระดับความเข้มต่าง ๆ หลังจากนั้นเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตรเดิมต่อเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จึงตรวจสอบความมีชีวิตของแคลลัส ย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำยอด ส่งเสริมการยืดยาวของยอดและชักนำราก ตรวจสอบลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา ชีวเคมี และลักษณะทางสัณฐานบางประการของพืชต้นใหม่ที่ได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์ ผลการศึกษาพบว่า การใช้ EMS ความเข้มข้นสูงขึ้นให้อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลง ความเข้มข้นที่ยับยั้งการพัฒนาได้อย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ คือ ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาจุ่มแช่ EMS นานขึ้นทำให้อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลงตามลำดับ ระยะเวลาการจุ่มแช่ที่สามารถยับยั้งการพัฒนาได้อย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 30 นาที ในกรณีของการฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ พบว่ารังสีความเข้ม 20 และ 40 เกรย์ ทำให้อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส 84.20 และ 80.80 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบ ซึ่งให้อัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ (P=0.05) ผลของ EMS และรังสีแกมมา ทำให้เซลล์อิพิเดอมีสของแคลลัสที่ได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์ครั้งแรก (M_1C_1) และแคลลัสที่ได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 ($M_2R_1C_1$) ได้รับความเสียหาย เซลล์ตายมีลักษณะสีดำไม่พบองค์ประกอบของไซโทพลาสซึมภายในเซลล์ ในขณะที่ $M_2R_1C_1$ มีจำนวนชั้นของเซลล์อิพิเดอมีสที่เสียหายมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบผลความเสียหายของเซลล์ระหว่าง EMS และรังสีแกมมา พบว่า EMS มีจำนวนชั้นของเซลล์อิพิเดอมีสเสียหายน้อยกว่ารังสี แต่เซลล์อิพิเดอมีสชั้นแรกที่ได้รับ EMS เกิดความเสียหายรุนแรงมากกว่า อย่างไรก็ตามการให้ทั้ง EMS และรังสีแกมมาส่งผลให้จำนวนชั้นของเซลล์อิพิเดอมีสเสียหายมากกว่าการให้รังสี หรือ EMS เพียงอย่างเดียว เมื่อตรวจสอบไอโซไซม์จากต้นที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งได้รับรังสีก่อกลายพันธุ์ พบว่า ระบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้ความแตกต่างของใบ

จากต้นชั่วที่ 1 (M_1R_1) และแคลลัสที่ชักนำจากใบ M_1R_1 ($M_1R_1C_1$) เมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองที่ได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์ บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส คือ tris-hydroxymethyl aminomethane (Tris-HCl) เข้มข้น 0.75 โมลาร์ pH 7.5, polyvinylpyrrolidone (PVP) เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ disodium ethylenediaminetetraacetate (Na_2EDTA) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และ 2-mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับความเข้มข้นเจลอะคริลาไมด์ 10 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมาะสมที่สุดให้แถบเอนไซม์คมชัดแยกความแตกต่างได้ชัดเจน

ใบจากต้น M_1R_1 ที่ได้จากแคลลัสซึ่งได้รับการฉายรังสีแกมมา ความเข้ม 10 และ 20 เกรย์ EMS ทุกความเข้มข้น และ แคลลัส $M_1R_1C_1$ หลังจากฉายรังสีแกมมา ความเข้ม 5, 20 และ 40 เกรย์ EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ มีการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสซึ่งเป็นผลมาจากยีน

เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้น M_1R_1 ที่ได้จากการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าลำต้นเตี้ยลง มีลำต้นอวบอ้วนและเกิดกิ่งแขนง เกิดมังคุดสามใบและมีการจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ สำหรับรังสีแกมมา 10, 20 และ 40 เกรย์ ให้ผลใกล้เคียงกัน คือ มีลำต้นเตี้ยลง ปลายใบสองแฉก ขอบใบมีรอยหยัก การจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ เกิดมังคุดสามใบ เกิดกิ่งแขนง และใบมีลักษณะสีน้ำตาลไหม้

Thesis Title	Varietal Improvement of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) by Mutagen Application in *In Vitro*
Author	Mr. Wittaya Prommee
Major Program	Plant Science
Academic Year	1997

Abstract

Calli used in this investigation were obtained from culturing young purple leaves of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) plantlets which were maintained *in vitro* and subcultured monthly intervals for 6 months. The calli were treated with 2 different sources of mutagens, ethylmethane sulfonate (EMS) and gamma ray at various concentrations. After treating with the mutagens, they were cultured further in the same medium for 3 weeks. At this period of culture, percentage of survival or recovery of calli were examined. The calli were then transferred to shoot primordia induction medium, followed by elongation and root induction medium. Histological, biochemical and morphological studies of both treated calli during culture and complete plantlets were made. An increment of EMS caused a decrement of recovery rate of calli. Concentration which gave 50 % decrement of recovery rate of the calli was 0.5 %. Soaking period in EMS required for 50 % decrement of recover rate was 30 minutes. In the case of gamma irradiation, 20 and 40 grays gave recovery rates of 84.2 and 80.8 %, respectively, significantly different (P = 0.05) from that of control which provided a recovery rate of 100 %. Histological study of calli obtained from the first treatment (M_1C_1) and second treatment of leaves regenerated from M_1C_1 ($M_2R_1C_1$) revealed that both EMS and gamma ray caused damages and death of the epidermal layer. Those cells were black and had no cytoplasm. A more severe syndrome was observed in $M_2R_1C_1$. In comparison of damage to the cells after treating with EMS and gamma ray, it was found that EMS caused damage to a greater number of sub-epidermal cells than did gamma ray. However, calli treated with both EMS and gamma ray produced more virulent results than EMS or gamma ray alone. Isozyme study of plantlets obtained from first regenerating treated calli (M_1R_1) showed that the peroxidase system was clearly distinguished. The most suitable extraction buffer consisted of 0.75 M tris-hydroxymethyl aminomethane (Tris-HCl) pH 7.5, 2% polyvinylpyrrolidone (PVP), 2 mM disodium

ethylenediaminetetraacetate (Na_2EDTA) and 1% 2-mercaptoethanol. Acrylamide at concentration of 10 % gave the best resolution of zymogram patterns for identification purposes.

Leaves of M_1R_1 regenerated from calli irradiated at doses of 10 and 20 grays and calli induced from M_1R_1 leaves ($M_1R_1C_1$) showed variation of patterns of peroxidase enzyme caused by genetic control.

Morphological characters of M_1R_1 obtained from treating with 0.50 % EMS included a short and fat stem, branching, three set leaves per whorl and abnormal arrangement of leaves. With gamma irradiation at 10, 20 and 40 grays, similar results were obtained. In this case, forked, serrate and dark brown leaves were also observed.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำทั้งในด้านการเรียน การดำเนินการวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ด้วยความเอาใจใส่จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี และผู้วิจัยจะถือเอาเป็นแบบอย่างสำหรับนำไปปฏิบัติในการทำงานต่อไป และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ข้อเสนอแนะ รวมทั้งตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้สำเร็จยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี ที่ได้กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำ คณาจารย์ประจำภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ และคณาจารย์ทุกท่านที่เคยประสิทธิประสาทวิชาทุกแขนง จนทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และให้ความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่กรุณาให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ขอขอบคุณ คุณอัมพร ฝันเชียน หัวหน้าห้องปฏิบัติการฉายรังสีโคบอลท์ ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์ฉายรังสี และเพื่อน ๆ ที่ให้คำแนะนำและกำลังใจจนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบุคคลที่สำคัญที่สุดในชีวิตของผู้วิจัย คือ คุณพ่อ และคุณแม่ ด้วยความเคารพอย่างสูง ที่ท่านได้เป็นกำลังใจสำคัญ และคอยสนับสนุนการศึกษาตลอดจนการอบรมสั่งสอนให้เป็นคนดีของสังคมมาตลอด และขอขอบพระคุณพี่สาว และน้องชาย ตลอดจนคณาญาติที่ให้กำลังใจตลอดมา

วิทยา พรหมมี

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(13)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	18
2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	19
วัสดุอุปกรณ์	19
วิธีการเตรียม	20
วิธีการวิจัย	24
3. ผล	29
4. วิจารณ์	59
5. สรุป	69
เอกสารอ้างอิง	72
ภาคผนวก	79
ประวัติผู้เขียน	88

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดและองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์	27
2	ส่วนประกอบและความเข้มข้นของเจลอะคริลาไมด์ที่ใช้ในการศึกษาระบบเอนไซม์	27
3	ผลของ EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการรอดชีวิตของแคลลัส	32
4	ผลของระยะเวลาการจุ่มแช่แคลลัสในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ ต่อการรอดชีวิตของแคลลัส	33
5	ผลของความเข้มรังสีแกมมาต่อการรอดชีวิตของแคลลัส	35
6	รูปแบบไอโซไซม์จากใบของต้น M_1R_1 และ $M_1R_1C_1$ หลังจากการฉายรังสีแกมมา 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์	41
7	ลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้นกล้าที่ได้จากการจุ่มแช่แคลลัสในสารละลาย EMS	54
8	ลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้น M_1R_1 หลังจากฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ	56

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	ยอดรวมมังคุดซึ่งพัฒนาจากแคลลัสที่ชักนำจากใบ วางเลี้ยงบนอาหาร 2 ชั้น	19
2	การชักนำแคลลัส และการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ของแคลลัสมังคุด	22
3	ลักษณะของแคลลัสก่อนการจุ่มแช่สารละลาย EMS (ก) และหลังการจุ่มแช่สารละลาย EMS และเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม BA ความเข้มข้น0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2-3 วัน (ข)	30
4	ลักษณะแคลลัสที่รอดชีวิตและพัฒนาไปเป็นกลุ่มตายอด หลังจากจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0 (ก), 0.25 (ข), 0.50 (ค), 0.75 (ง) และ 1.00 (จ) เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที วางเลี้ยง 6 สัปดาห์	31
5	ผลของ EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการรอดชีวิตของแคลลัส	32
6	ผลของระยะเวลาการจุ่มแช่แคลลัสด้วยสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ ต่อการรอดชีวิต	34
7	ผลของรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ ต่อการรอดชีวิตของแคลลัส	35
8	ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ C_1 (ก) (X100) และการแบ่งตัวของเซลล์ (ข ศรชี้) (X100) หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 4 สัปดาห์	36
9	ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ C_1 (ก) และ M_1C_1 ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา 5 (ข), 10 (ค), 20 (ง) และ 40 เกรย์ (จ) หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 4 สัปดาห์ (X100)	37
10	ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ M_1C_1 มีการแบ่งเซลล์และพัฒนาไปเป็นจุดกำเนิดยอด (ก ศรชี้) (X100) และ โปรตีนสะสมภายในเซลล์ของ M_1C_1 ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา 40 เกรย์ (ข) (X200) หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 4 สัปดาห์	38

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
11	ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ $M_2R_1C_1$ ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาและ EMS	40
12	รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบ (M_1R_1) และ แคลลัส ($M_1R_1C_1$) ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์	43
13	รูปแบบเอนไซม์เอสเตอเรสจากใบ (M_1R_1) และ แคลลัส ($M_1R_1C_1$) ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์	44
14	รูปแบบเอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนสจากใบ (M_1R_1) และแคลลัส ($M_1R_1C_1$) ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์	45
15	รูปแบบเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากใบ (M_1R_1) และ แคลลัส($M_1R_1C_1$) ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์	46
16	รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบและแคลลัสชุดเปรียบเทียบและแคลลัสที่ชักนำจากใบ M_1R_1 ซึ่งสกัดด้วยบัฟเฟอร์ 3 ชนิด (B1 = ชนิดที่ 1, B2 = ชนิดที่ 2 และ B3 = ชนิดที่ 3)	48
17	รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบ M_1R_1 (เลนคี่) และ แคลลัส $M_1R_1C_1$ (เลนคู่) หลังจากฉายรังสีแกมมา 0, 5, 10,20 และ 40 เกรย์ ตามลำดับ ทำการแยกเอนไซม์บนเจลเข้มข้น 7 (ก), 10 (ข) และ12 (ค) เปอร์เซ็นต์	50
18	รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบ (M_1R_1) และ แคลลัส ($M_1R_1C_1$) หลังจากจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 120 นาที	52

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
19	ผลของ EMS ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดราก และ อัตราการรอดชีวิต หลังย้ายปลูก 3 สัปดาห์	54
20	ลักษณะผิดปกติทางสัณฐานของต้น M_1R_1 ที่พัฒนาจากแคลลัส ซึ่งได้รับการจุ่มแช่สารละลาย EMS	55
21	ผลของรังสีแกมมา ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดราก และอัตราการรอดชีวิต หลังย้ายปลูก 3 สัปดาห์	57
22	ลักษณะผิดปกติทางสัณฐานของต้น M_1R_1 ที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่ง ได้รับหลังจากฉายรังสีแกมมา	58

ตัวย่อและสัญลักษณ์

EMS	=	ethylmethane sulfonate
EST	=	esterase
MDH	=	malate dehydrogenase
PER	=	peroxidase
PGI	=	phosphoglucoisomerase
ADH	=	alcohol dehydrogenase
Na_2EDTA	=	disodium ethylenediaminetetraacetate
Tris-HCl	=	tris-hydroxylmethyl aminomethane
PVP	=	polyvinylpyrrolidone
BA	=	6-benzyladenine
TDZ	=	thidiazuron
IAA	=	indole-3-acetic acid
IBA	=	indole-3-butyric acid
NAA	=	1-naphthaleneacetic acid
MS	=	Murashige and Skoog
WPM	=	woody plant medium
1/2MS	=	half strength MS
LD_{50}	=	lethal dose 50

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) จัดอยู่ในวงศ์ Clusiaceae หรือ Guttiferae เป็นไม้ผลที่มีศักยภาพสูงในการส่งออก ดังนั้นเกษตรกรในประเทศไทยจึงให้ความสนใจในการปลูกเพิ่มขึ้น กรมส่งเสริมการเกษตร (2540) รายงานการปลูกมังคุดว่าในปีการเพาะปลูก 2537 มีพื้นที่ปลูกมังคุดรวมทั้งประเทศ 213,747 ไร่ เพิ่มจากปีการเพาะปลูก 2535 ถึง 51,782 ไร่ มงคล แซ่หลิม (2530) ได้สำรวจความต้องการต้นกล้าโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ผล และไม้ยืนต้นในภาคใต้ พบว่าความต้องการปลูกมังคุดมีมากเป็นอันดับสาม รองจากยางพารา และปาล์มน้ำมัน ข้อจำกัดของการปลูกมังคุดในปัจจุบัน คือ พันธุ์มังคุดซึ่งมีเพียงพันธุ์เดียวเท่านั้น และมีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นช้า ให้ผลผลิตได้เมื่อมีอายุ 5-6 ปี ทำให้ยากต่อการปรับปรุงผลผลิตที่มีคุณภาพให้เพียงพอตามความต้องการของตลาด ความแตกต่างหรือความแปรปรวนระหว่างต้นที่พบเห็นโดยส่วนใหญ่เป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมที่ปลูก จากความแปรปรวนข้างต้นได้มีการจัดแบ่งมังคุดออกเป็น 2 กลุ่มตามพื้นที่ปลูกคือ มังคุดนนทบุรีซึ่งมีใบค่อนข้างเรียว ผลขนาดเล็ก เมื่อสุกผลมีสีม่วงดำ คุณภาพเนื้อผลดี อีกกลุ่มเป็นมังคุดทางภาคใต้มีใบอวบอ้วนและสั้น ผลมีเปลือกหนา เมื่อผลสุกมีสีแดงอมชมพู และในปัจจุบันพบมังคุด 3 ใบ ซึ่งคาดว่าเป็นมังคุดพันธุ์ใหม่ แต่ลักษณะดังกล่าวปรากฏให้เห็นเพียงช่วงระยะเวลาใดเวลาหนึ่งเท่านั้น (สมปอง เตชะโต, 2530) และเท่าที่ผ่านมายังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์มังคุดมาก่อน ทั้งนี้เพราะปัญหาที่สำคัญคือ การเป็นหมันของละอองเกสร

จากข้อจำกัดการปรับปรุงพันธุ์มังคุดที่กล่าวข้างต้น ทำให้การประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับสิ่งก่อกลายพันธุ์ในหลอดทดลองเพื่อชักนำให้ต้นมังคุดเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม สามารถส่งเสริมการปรับปรุงพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยหลักการเมื่อนำเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยง เช่น แคลลัส มาจุ่มแช่ด้วยสารเคมีก่อกลายพันธุ์ เช่น ethylmethane sulfonate (EMS) หรือ ฉายรังสี เช่น รังสีแกมมา สามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม หรือ จีน สร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมสำหรับใช้ในการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงลักษณะที่ต้องการต่อไป ในการศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีรายงานถึงการตรวจสอบหรือจำแนกพันธุ์มังคุดด้วยวิธีการใด ๆ มาก่อน การจำแนกพันธุ์หรือการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการมักใช้วิธีการบันทึกลักษณะทางสัณฐานของต้นพืชที่ปลูก วิธีการดังกล่าวต้องใช้ระยะเวลานาน

และไม่สามารถใช้จำแนกความแปรปรวนของพันธุ์ที่เกิดขึ้นได้ทั้งหมด เพราะบางลักษณะมีความแปรปรวนไปตามสภาพแวดล้อมจึงทำให้ยากต่อการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นการใช้เทคนิคทางชีวเคมี เช่น การตรวจสอบไอโซไซม์ เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์พืชซึ่งมีรายงานว่าประสบความสำเร็จในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น มะม่วง (Degani and El-Batsri, 1992) ส้ม (Lee *et al.*, 1993) เป็นต้น

การตรวจเอกสาร

1 ลักษณะทั่วไปของมังคุด

มังคุดเป็นไม้ผลเมืองร้อนที่มีการเจริญเติบโตช้าและมีอายุยืนยาว ให้ผลผลิตได้หลังจากปลูก 5-6 ปีขึ้นไป และเมื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่สูงประมาณ 6-25 เมตร ลำต้นแข็งแรงมีสีน้ำตาลจนถึงดำ ภายในเนื้อเยื่อของลำต้นมียางหรือเรซินสีเหลือง ระบบรากอ่อนแอเนื่องจากมีรากแขนงน้อยและไม่มีรากขนอ่อน ทำให้ต้นมีการเจริญเติบโตช้า Bordeaut และ Moreuil (1970 อ้างโดย Yaacob and Tindall, 1995) ได้กล่าวถึงการพัฒนาของระบบรากมังคุดที่ปลูกในไอวอรี่โคส และสังเกตุพบว่าต้นที่สูง 3-8 เมตร และมีทรงพุ่มกว้าง 2-5 เมตร มีการพัฒนาของระบบรากเฉพาะบริเวณที่มีความลึก 5-30 เซนติเมตร และรากที่ยาวที่สุดสามารถยืดยาวและแผ่กว้างไม่เกิน 1 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยว รียาว มีการจัดเรียงตัวของใบเป็นแบบตรงข้าม ดอกเกิดบริเวณปลายกิ่ง มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกอย่างละ 4 กลีบ พบส่วนของเกสรตัวผู้มีละอองเกสรเป็นหมัน อยู่บริเวณรอบ ๆ ฐานของรังไข่ ก้านชูเกสรตัวผู้มีตำแหน่งที่ตั้งต่ำกว่าดอกตัวเมีย ดอกมีอายุสั้น บานเวลาตอนเย็นและเหี่ยวหลังดอกบาน รังไข่มีการพัฒนาไปเป็นผลในระยะต่อมา ผลพัฒนาโดยไม่ได้รับการผสมพันธุ์ เมล็ดพัฒนามาจากเนื้อเยื่อนิวเซลลัส ไม่ได้เกิดจากการผสมพันธุ์เหมือนเมล็ดพืชทั่ว ๆ ไป มังคุดมีเมล็ดพันธุ์ตั้งแต่ 0-2 เมล็ดต่อผล เมล็ดพันธุ์จัดเป็นเมล็ดพันธุ์สด (recalcitrance) ซึ่งสูญเสียความงอกเร็วเมื่อความชื้นของเมล็ดพันธุ์ลดลงทำให้เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ได้ไม่นาน ภายในเมล็ดไม่มีต้นอ่อนและใบเลี้ยง ส่วนของจุดกำเนิดยอดและรากไม่ปรากฏให้เห็นชัดเจน มังคุดสามารถขยายพันธุ์ได้โดยอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศซึ่งแต่ละวิธีมีข้อจำกัดแตกต่างกันไป การขยายพันธุ์โดยอาศัยเพศ คือ การเพาะเมล็ดพันธุ์ ต้องใช้เวลาในการงอกนานและต้นกล้าที่ได้มีการเจริญเติบโตช้า เนื่องจากพืชที่เมล็ดพันธุ์เป็นเมล็ดพันธุ์สด ส่วนใหญ่จะเป็นพืชอายุหลายปี จึงต้องใช้เวลานานในการงอก (Yap, 1980) เนื้อเยื่อเมล็ดสามารถพัฒนาให้ต้นกล้าได้จำนวนมากจากเนื้อเยื่อนิวเซลลา หรือโปรเอ็มบริโอหากมีอาหารสะสมภายในเมล็ดพันธุ์เพียงพอ แต่การเพาะเมล็ดในดินจะชักนำให้เกิดต้นกล้าเพียงต้นเดียว และต้นกล้าต้นแรกที่งอกออกมาจะยับยั้งการงอกของต้นกล้าอื่นที่กำลังพัฒนาตามมา การขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศด้วยวิธีการตอน การเสียบยอด ให้ผลสำเร็จช้าและมีประสิทธิภาพต่ำ เนื่องจากต้นมังคุดมียางสีเหลืองจำนวนมากที่สร้างออกมาเมื่อมีบาดแผลเป็นตัวขัดขวางการสร้างแคลลัสและรากในกรณีของการชำกิ่ง และขัดขวางการประสานของรอยต่อระหว่างต้นตอกับกิ่งพันธุ์

Yaacob และ Tindall (1995) รายงานว่ามังคุดมีโครโมโซมสองชุด (2n) มีจำนวนโครโมโซม 56-76, 96 และ 120-130 คู่ แต่จากการศึกษาของ Tixier (1955 อ้างโดย

Yaacob and Tindall, 1995) ซึ่งพบว่ามีจำนวนโครโมโซม 96 คู่ และมีชุดของโครโมโซมหลายชุด Richards (1990 อ้างโดย Yaacob and Tindall, 1995) สรุปว่ามังคุดมีโครโมโซมหลายชุดและอาจเป็น 4 ชุด ความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั่ว ๆ ไปในมังคุดเกิดขึ้นได้ยาก เนื่องจากเมล็ดพัฒนาจากเนื้อเยื่อนิวเซลลัสโดยไม่มีการผสมพันธุ์ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ เช่น เมล็ด ใบ ปลายยอด ปล้อง ข้อ และราก เป็นการชักนำพืชต้นใหม่โดยตรงไม่ผ่านแคลลัส ต้นพืชที่ได้มีลักษณะเหมือนเดิมทุกประการจึงไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น หรือการชักนำพืชต้นใหม่โดยผ่านกระบวนการสร้างแคลลัสชักนำให้มีการแบ่งเซลล์ผิดปกติ ดังนั้นต้นพืชที่ได้อาจมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้บ้างเพียงเล็กน้อย (สมปอง เตชะโต, 2536) ปัจจุบันนี้จะเห็นว่ามังคุดมีความแตกต่างกันในเรื่องของ ขนาดของผล ขนาดของเมล็ด ลักษณะเนื้อผล และขนาดของใบซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุจากสภาพแวดล้อมโดยเฉพาะ ร่มเงา จากการศึกษาโดย Harjadi และคณะ (1989 อ้างโดย Yaacob and Tindall, 1995) พบว่าร่มเงาส่งผลให้ต้นที่มีอายุน้อยกว่า 10 ปี ซึ่งดูแลภายใต้การให้ร่มเงาโดยพืชร่วม มีขนาดของผลเล็กลง จากที่กล่าวมาข้างต้นเห็นได้ว่าการปรับปรุงพันธุ์มังคุดมีข้อจำกัดในเรื่องการผสมพันธุ์ เนื่องจากละอองเกสรตัวผู้เป็นหมัน และก้านชูเกสรมีตำแหน่งที่ตั้งต่ำกว่าดอกตัวเมีย ดอกมีอายุสั้น ดังนั้นจึงไม่มีความแปรปรวนที่เกิดจากการรวมตัวระหว่างหน่วยพันธุกรรมของพ่อและแม่เป็นเหตุให้มังคุดไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ในปัจจุบันจึงทำให้มังคุดมีเพียงพันธุ์เดียวเท่านั้น

2 การขยายพันธุ์มังคุดในหลอดทดลอง

การขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นกว่าการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติ แต่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นจะประสบความสำเร็จได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลาย ๆ อย่าง โดยเฉพาะอาหารที่ใช้เลี้ยงซึ่งแต่ละสูตรมีองค์ประกอบที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดใดนั้นมีความจำเป็นต้องเลือกให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ สูตรอาหารที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ สูตร Murashige and Skoog (MS) ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารต่าง ๆ น้ำตาลซูโครส ไวตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ธาตุอาหารที่ต้องการในอาหารเพาะเลี้ยงจะผันแปรไปตามชนิดของพืชและวัตถุประสงค์ในการเลี้ยง ความสมดุลของสารในอาหารนับว่ามีความสำคัญมากหากสัดส่วนระหว่าง ออกซิน กับ ไซโทไคนินสูงมีผลต่อการชักนำรากแต่ในทางตรงกันข้าม ถ้าสัดส่วนระหว่าง ออกซิน กับ ไซโทไคนินต่ำจะมีผลต่อการชักนำยอด แต่หากใช้ในปริมาณเท่ากัน มีผลในการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนพืช (Chen *et al*, 1970) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้เนื้อแข็งทำได้ยาก นักวิจัยจำนวนมากค้นคว้าวิจัยในเรื่องดังกล่าวมาเป็นลำดับและประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในพืชดังกล่าวสามารถชักนำการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ เช่น ส้ม Troyer (Edriss and Burger, 1984)

องุ่น (Barlass and Skene, 1980) พลัม (Hammerschlag, 1982) ในทำนองเดียวกับมังคุด สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้สำเร็จโดยการเพาะเลี้ยงจากส่วนต่าง ๆ ดังนี้

2.1 การเพาะเลี้ยงเมล็ด

Goh และคณะ (1988) สามารถชักนำยอดรวมจากเมล็ดมังคุดได้หลังจากเพาะเลี้ยง 7 สัปดาห์ โดยการวางเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง (1/2 MS) เติม 1-naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สมปอง เตชะโต และ วันทนา เอ้งย่อง (2531) สามารถชักนำยอดรวมจากเมล็ดพันธุ์มังคุดได้ 73 เปอร์เซ็นต์ โดยการวางเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 20-25 ไมโครโมลาร์ และพบว่าอัตราการสร้างยอดเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการใช้ความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น แต่การยืดยาวของยอดลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อตัดแยกแต่ละยอดไปวางเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของ BA ลดลงเหลือ 1 ไมโครโมลาร์ ช่วยให้มีการยืดยาวของยอดได้เร็วขึ้น

ธิดารัตน์ น้อยรักษา (2533) สามารถชักนำยอดรวมจากเมล็ดบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง เติมน้ำมะพร้าว 30 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 20-50 ไมโครโมลาร์ แต่จากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร woody plant medium (WPM) ไม่สามารถชักนำยอดรวมจากเมล็ดได้ นอกจากนั้นยังพบว่า kinetin (KN) ไม่มีผลต่อการชักนำยอดรวมจากเมล็ด

Normah (1992) สามารถชักนำยอดรวมจากเมล็ดมังคุดได้ 8-12 ยอดต่อชิ้นส่วน หลังจากวางเลี้ยง 6 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 30-40 ไมโครโมลาร์ และ NAA ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ ต่อมา Normah และคณะ (1995) รายงานการชักนำยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดมังคุด (โดยตัดแบ่งเมล็ดออกเป็น 6 ชิ้น) ว่าให้จำนวนยอดเฉลี่ย 16.8 ยอดต่อชิ้นส่วน บนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ NAA ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ และรายงานว่า อาหารสูตร WPM และการเติมผงถ่านในอาหารเพาะเลี้ยงไม่สามารถส่งเสริมการสร้างยอดรวมจากเมล็ดได้

2.2 การเพาะเลี้ยงใบ

Goh และคณะ (1988) ชักนำยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนสีแดงมังคุดอายุ 7-12 วัน บนอาหารสูตร WPM พบว่าให้อัตราการสร้างยอดรวมได้ 12 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใบอ่อนสีเขียวไม่สามารถชักนำการสร้างยอดได้ และได้ทดลองเพาะเลี้ยงใบอ่อนสีแดงมังคุดทั้งใบและตัดแบ่งเป็นส่วน ๆ พบว่าการตัดแบ่งใบเป็น 2 ส่วน สามารถสร้างยอดรวมได้สูงที่สุด และยอดส่วนใหญ่เกิดขึ้นบริเวณโคนใบมากกว่าปลายใบและยอดรวมเกิดขึ้นบริเวณรอยตัดผ่านเส้นกลางใบ

มากกว่าแผ่นใบหลังจากวางเลี้ยง 3-4 สัปดาห์ แต่การเพาะเลี้ยงทั้งใบไม่เกิดยอดรวมแม้จะวางเลี้ยงเป็นเวลานานถึง 4 สัปดาห์ ก็ตาม

สมปอง เตชะโต และคณะ (2535) สามารถชักนำยอดรวมจากใบอ่อนสีแดงมังคุดโดยผ่านกระบวนการ เอ็มบริโอเจนีซีส บนอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถสร้างกลุ่มตารวมได้สูงสุด 33.33 เปอร์เซ็นต์ และได้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 40.33 ยอดต่อใบ จากการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าตารวมมีการพัฒนาโดยกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีส ซึ่งมีกำเนิดมาจาก 2 แหล่ง คือ เนื้อเยื่อเจริญมัดท่อน้ำท่ออาหาร (vascular cambium) ของเส้นกลางใบและเส้นใบย่อย ส่วนอีกแหล่งพัฒนามาจากเซลล์ผิวใบ (epidermal cell) เซลล์ดังกล่าวมีความเข้มข้นของไซโทพลาสซึมสูง มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ และมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงมากเมื่อได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโต ออกซินและไซโทไคนินอัตราส่วนที่เหมาะสม ช่วยส่งเสริมการพัฒนาเป็นอวัยวะใหม่ได้ดี การพัฒนาของเนื้อเยื่อมีความคล้ายคลึงกับการพัฒนาของโปรแคมเบียมภายในเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS เติม BA ความเข้มข้น 5.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารเดิมเป็นเวลานานขึ้นหรือย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมตายอดมีการพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ ประกอบด้วยปลายยอด ปลายราก และใบจริงคู่แรก

ธิดารัตน์ น้อยรักษา (2533) ชักนำยอดรวมจากใบอ่อนสีแดงได้ 20-50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม BA ความเข้มข้น 20-70 ไมโครลิตร 6 สัปดาห์ และเมื่อย้ายยอดที่เกิดจากการชักนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่เติม BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ หรือร่วมกับ GA_3 (gibberellic acid) ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ทำให้ยอดเจริญเติบโตเร็วขึ้น

Goh และคณะ (1994) รายงานการชักนำการสร้างยอดโดยตรงจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนสีแดงมังคุด อายุ ประมาณ 10 วัน ที่ตัดแบ่งเป็นชิ้นส่วนตามขวาง ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร บนอาหารสูตร WPM เติม BA ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และ เจลไรท์ 2.5 กรัมต่อลิตร ได้ยอดเฉลี่ย 45 ยอดต่อใบ และยอดสามารถยืดยาวได้ดีเมื่อตัดแยกไปวางเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเติม BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์

2.3 การเพาะเลี้ยงราก

Goh และคณะ (1988) สามารถชักนำยอดรวมจากรากต้นกล้ามังคุดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลอง 7 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ การสร้างยอดเกิดตรงบริเวณใกล้ ๆ กับส่วนที่อยู่เหนือบริเวณรอยตัด เมื่อย้ายยอดที่ได้ขนาด 3

มิลลิเมตร วางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าต้นที่ได้มีลักษณะค่อนข้างเตี้ย

ธิดารัตน์ น้อยรักษา (2533) ศึกษาการชักนำยอดจากรากบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง และ WPM เติม BA 0, 20, 50, 70 และ 100 ไมโครโมลาร์ แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ

2.4 การเพาะเลี้ยงลำต้น ปลายยอด และ ข้อ

Goh และคณะ (1988) สามารถชักนำยอดรวมจากลำต้นและปลายยอดของต้นมังคุด บนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยง 4 สัปดาห์ โดยการวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสามารถชักนำการสร้างยอดรวมจากลำต้นและปลายยอดได้ 45 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การวางเลี้ยงในอาหารเหลวสามารถชักนำการสร้างยอดรวมได้เพียง 11 เปอร์เซ็นต์ และยอดที่ได้มีลักษณะเป็นใบแก้ว และนอกจากนั้นยังสามารถชักนำยอดรวมจากปลายยอด บนอาหารสูตร 1/2 MS , WPM และ B5 เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ ได้ 53, 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ธิดารัตน์ น้อยรักษา (2533) สามารถชักนำยอดรวมจากปลายยอดและข้อจากต้นกล้า บนอาหารสูตร MS ดัดแปลง และ WPM เติม BA ความเข้มข้น 0-100 ไมโครโมลาร์ ได้ 100 เปอร์เซ็นต์หลังจากวางเลี้ยง 4 สัปดาห์ และเมื่อตัดยอดรวมที่ได้เหล่านี้ออกไปก็จะมียอดใหม่ขึ้นมาได้อีก

2.5 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

ธิดารัตน์ น้อยรักษา (2533) สามารถชักนำแคลลัสจากเมล็ดมังคุดบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มออกซิน คือ 2,4-D, NAA และ IAA ความเข้มข้น 10-90 ไมโครโมลาร์ หลังจากวางเลี้ยง 4 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่ได้มีลักษณะพองฟูเป็นสีน้ำตาล และไม่พบองค์ประกอบภายในของเซลล์เหมือนแคลลัสทั่ว ๆ ไป และไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะใด ๆ

Normah (1992) สามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนเมล็ดมังคุดที่แบ่งออกเป็น 3 ส่วน วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 20-30 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะกันแน่น และตายหลังจากวางเลี้ยงต่อมาอีกเป็นเวลา 3 สัปดาห์

Te-chato และคณะ (1995a) ชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้ามังคุดในหลอดทดลอง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใบอ่อนสีม่วง ให้การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงที่สุด รองลงมาเป็นใบอ่อนสีเขียว ก้านใบ และเมล็ด ตามลำดับ

Te-chato และคณะ (1995b) สามารถชักนำการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่ชักนำจากใบอ่อนสีม่วง บนอาหารสูตร WPM เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.6 การชักนำรากจากยอดมังคุดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

ยอดที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนต่างๆ เหล่านั้นไม่มีการสร้างรากในอาหารสูตรเดิมจึงต้องย้ายเลี้ยงในอาหารอีกสูตรหนึ่งเพื่อชักนำการสร้างราก Hemmerschlag (1982) รายงานว่าการชักนำรากในไม้เนื้อแข็งทำได้ยากทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของพืชแต่ละชนิด สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง สารควบคุมการเจริญเติบโต อาหารที่ใช้เลี้ยง และวิธีการชักนำที่เหมาะสม สำหรับมังคุดมีรายงานการชักนำรากในหลอดทดลองดังต่อไปนี้

สมปอง เตชะโต และคณะ (2534) มณฑา จำเริญรักษ์ (2537) และ Te-chato (1995b) รายงานการชักนำการสร้างรากจากยอดมังคุดในหลอดทดลองได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ยอดมังคุดมีความสูง 2 เซ็นติเมตร ตัดแยกทำแผลที่ฐานยอดแล้วจุ่มแช่ในสารละลาย IBA ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (429 ไมโครโมลาร์) ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที ย้ายยอดที่ได้ไปวางเลี้ยงในอาหารสูตร WPM เติม BA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร phloroglucinol (PG) ความเข้มข้น 5.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ผงถ่านความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงแรกวางเลี้ยงในที่มืด 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายไปวางเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 3,000 ลักซ์ อีกเป็นเวลา 6 สัปดาห์

Goh และคณะ (1988) ชักนำรากจากยอดมังคุดในหลอดทดลองโดยวางเลี้ยงยอดโดยตรงบนอาหารสูตร MS เติม IBA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำรากได้ 7 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 2 สัปดาห์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ IBA เป็น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากได้ 24 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 1 สัปดาห์

ธิดารัตน์ น้อยรักษา (2533) สามารถชักนำรากจากยอดมังคุดในหลอดทดลองโดยใช้ยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2 MS เติม indoleacetic acid (IAA) ความเข้มข้น 10-20 ไมโครโมลาร์ เติมผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ แทน IAA เกิดรากได้ 20-40 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ นอกจากชักนำรากในหลอดทดลองแล้วยังสามารถชักนำรากได้นอกหลอดทดลองโดย Te-chato และคณะ (1994) สามารถชักนำรากจากต้นกล้ามังคุดนอกหลอดทดลอง โดยใช้ยอดที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลอง มีความสูง 2 เซ็นติเมตร แยกไปทำแผลที่โคนต้น 2 รอยจุ่มแช่ในสารฮอร์โมนแร่งราก seradix เบอร์ 2 ปลูกในตะกร้าขนาดเล็กที่มีดินผสม วางเลี้ยงภายใต้สภาพที่มีความชื้นสูงก่อนปลูกลงดิน สามารถชักนำรากได้สูงสุด 50 เปอร์เซ็นต์

3. การชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์

จากผลสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมังคุดที่กล่าวข้างต้นหากนำมาผสมผสานกับสิ่งก่อกลายพันธุ์ ช่วยส่งเสริมให้การปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยช่วยเพิ่มความแปรปรวนให้สูงยิ่งขึ้นและต้นที่แปรปรวนมักเกิดการกลายพันธุ์แบบกลายทั้งต้นเนื่องจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการพัฒนามาจากเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์จำนวนน้อย ดังนั้นโอกาสที่ต้นพืชจะกลายพันธุ์เพียงบางส่วนจึงต่ำ (ประภา ศรีพิจิตต์ และคณะ, 2537) ความเข้มของสิ่งก่อกลายพันธุ์มีผลต่อการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ของชิ้นส่วนพืช การให้ความเข้มสูงทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้สูงแต่การพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ลดลง นอกจากความเข้มของสิ่งก่อกลายพันธุ์แล้ว ชนิด อายุ และขนาดของชิ้นส่วนก็มีผลด้วยเช่นเดียวกัน ดังนั้นในการเลือกใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ควรเลือกใช้ให้เหมาะสมกับชนิด ขนาด และอายุของพืช

3.1 การชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีในหลอดทดลอง

สารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชแบ่งได้หลายกลุ่มแต่ที่นิยมใช้กันมากเป็นสารเคมีกลุ่มแอลคิเลทิง (alkylating) คือ EMS เป็นสารที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้กับพืชทุกชนิด โดยหมู่เอธิล (C_2H_5) ใน EMS ถูกถ่ายให้กับโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาแอลคิเลชัน EMS สามารถเข้าทำปฏิกิริยาแอลคิเลชันกับเบสพิวรีน และไพริมิดีน รวมทั้งหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการเข้าแทนที่คู่เบสในกลุ่มเดียวกัน เช่น กลุ่มเบสพิวรีนมีเบสอะดินิน (A) เข้าแทนที่เบสกัวนิน (G) หรือสลับกัน และในกลุ่มของเบสไพริมิดีนมีไซโทซิน (C) เข้าแทนที่ไธมิน (T) การแทนที่คู่เบสอาจเกิดโดยสุ่มได้ 10-100 ตำแหน่ง นอกจากนั้น EMS สามารถชักนำการกลายพันธุ์ในนิวเคลียส ไมโทคอนเดรีย ไซโทพลาสซึม ทำให้โครโมโซมขาดหายไปชั่วคราว หรือขาดหายอย่างถาวร และโครโมโซมมีการจัดเรียงตัวขึ้นใหม่ (Negrutiu,1990)

Menendez (1973) พบว่า หลังจากนำเมล็ดกล้วย (*Musa acuminata* subsp. *malaccensis*) มาจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ทำให้การงอกของต้นกล้าและการเจริญเติบโตลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.20 โมลาร์ ทำให้การเจริญเติบโตผิดปกติเพิ่มมากขึ้น และหลังจากจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ ที่ระดับความเป็นกรดเป็นด่าง 7 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้การงอกของต้นกล้าลดลง 50 เปอร์เซ็นต์

George และ Rao (1980) นำเมล็ด *Brassica juncea* พันธุ์ Rai-5 จุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที, 1 และ 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพาะในหลอดทดลอง พบว่า สารละลาย EMS ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของต้นกล้า แต่ต้นกล้าที่ได้จากการจุ่มแช่เมล็ดด้วยสารละลาย EMS นาน 30 นาที ใบเลี้ยงมีลักษณะเหลืองซีด

(chlorosis) ส่วนการจุ่มแช่นาน 2 ชั่วโมง ให้ต้นกล้าที่งอกหลังจากการเพาะ 2 สัปดาห์ มีลักษณะเหลืองซีด และใบแรกมีลักษณะผิดปกติ เมื่อตัดใบเลี้ยงจากต้นกล้าในหลอดทดลองซึ่งได้จากจุ่มแช่เมล็ดในสารละลาย EMS เป็นเวลา 30 นาที มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชักนำการสร้างยอดได้เพียง 28 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดเปรียบเทียบซึ่งให้การสร้างยอดรวมได้ถึง 96 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มเวลาการจุ่มแช่เป็น 2 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดลดลงเหลือ 16 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นใบเลี้ยงยังสามารถสร้างแคลลัสได้ โดยแคลลัสที่ได้จากใบเลี้ยงของต้นกล้าที่ได้รับการจุ่มแช่สารละลาย EMS เป็นเวลา 2 ชั่วโมงมีการเจริญเติบโตมากกว่าแคลลัสที่ได้จากใบเลี้ยงของต้นกล้าที่ได้รับการจุ่มแช่สารละลาย EMS นาน 1 ชั่วโมง ยอดทีได้ทั้งหมดมีขนาดเล็ก การเจริญเติบโตไม่ดีและมีการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้น้อย

มนสุรีย์ ก่องตาวงศ์ และ ทิพย์มณี ภะระตะศิลปินส์ (2527) ได้ทดลองแช่อับละอองเกสรของยาสูบ พันธุ์ Coker 347 ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.002, 0.004, 0.01 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 และ 18 ชั่วโมง พบว่า EMS ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ และเวลา การจุ่มแช่ 18 ชั่วโมง ส่งผลให้ละอองเกสรงอกช้า ยับยั้งการเกิดรากของต้น ต้นที่ได้มีลักษณะใบด่าง มีสีเขียว สีขาว และสีเหลืองบางส่วน ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ในเม็ดสี และให้ดอกมีลักษณะผิดปกติ

Kang และ Kameya (1993) ได้ทดลองจุ่มแช่ฝักข้าวโพด พันธุ์ Danggin ซึ่งเป็นลูกผสมชั่วที่ 2 หลังจากการที่มีการผสมเกสร 3, 6 และ 9 ชั่วโมง ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที พบว่าต้นข้าวโพดที่ได้เกิดกลายพันธุ์เพียงบางส่วน คลอโรฟิลล์ลดลง และมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาบางลักษณะ และการจุ่มแช่หลังจากที่มีการผสมเกสร 6 ชั่วโมง ให้ต้นข้าวโพดมีความต้านทานต่อ 5-methyltryptophan (5-MT) ทั้งในสภาพที่เป็นแคลลัส และต้นกล้า

Grabau และคณะ (1995) ได้ทดลองจุ่มแช่เซลล์ซัสเพนชันของถั่วเหลืองหลังจากย้ายเลี้ยง 2 วัน ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที บนเครื่องเขย่า และนำไปปั่นตกตะกอนล้างด้วยอาหารสูตร B_5C จำนวน 2 ครั้งจากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกเซลล์ซัสเพนชันที่รอดชีวิตนำไปทดสอบความต้านทานต่อโอลิโกมัยซิน โดยตรวจสอบ ดีเอ็นเอ ตามวิธีการ Southern blot พบว่าการต้านทานต่อโอลิโกมัยซินเป็นผลมาจากจีน *atp9* ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ขนาด 2.8 และ 4.8 กิโลเบส และเซลล์ซัสเพนชันมีความต้านทานต่อโอลิโกมัยซินภายหลังจากการย้ายเลี้ยง 17 เดือน จากนั้นความสามารถในการต้านทานลดลง

นอกจากการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีในหลอดทดลองแล้วมีรายงานถึงการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีนอกหลอดทดลอง ซึ่งมีรายงานโดย Raisinghani และ Mahna (1996) ชักนำการกลายพันธุ์ในคลอโรฟิลล์ ใน *Trigonella corniculata* L. โดยนำเมล็ดจุ่มแช่ในสารละลาย diethyl sulphate (DES) และ dimethyl sulphate (DMS) ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ ทำการคัดเลือกในชั่วที่ 2 พบว่าใบของต้นที่ได้ขาดคลอโรฟิลล์ มีลักษณะเป็นสีเหลืองและสีขาว

Srivastava และ Singh (1996) ชักนำการกลายพันธุ์ในถั่วมะแฮะ (pigeon pea) เพื่อให้มีผลผลิตสูง โดยนำเมล็ดพันธุ์ 'Pusa 85' และ 'Pusa 601' มาจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ และจุ่มแช่สารละลาย MNH ความเข้มข้น 0.01, 0.02 และ 0.03 เปอร์เซ็นต์ นาน 6 ชั่วโมง นำไปปลูกในแปลง หลังจากเก็บเกี่ยวผลผลิตที่ได้ พบว่า พันธุ์ 'Pusa 601' ที่จุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์ 'Pusa 85' ที่จุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ และ MNH ความเข้มข้น 0.03 เปอร์เซ็นต์ มีผลผลิตสูงขึ้นและให้จำนวนฝักต่อต้นสูง และในเวลาเดียวกันเมล็ดพันธุ์ 'Pusa 60' ที่จุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.2 เปอรเซ็นต์ และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณของโปรตีนเพิ่มมากขึ้น

Pillai และ Abraham (1996) ทำการปรับปรุงผลผลิต และลักษณะของผลพริกหวาน โดยนำเมล็ดจากพันธุ์ 'Palmulage' ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงให้เป็นพันธุ์แท้ จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.25 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 ชั่วโมง พบว่าการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ ให้ต้นที่ได้เกิดการกลายพันธุ์เล็กน้อย โดยมีผลผลิตเพิ่มขึ้น และคุณภาพของผลผลิตเปลี่ยนแปลง ซึ่งพบในต้นชั่วที่ 3 และมีลักษณะเป็นพันธุ์แท้ในต้นชั่วที่ 4 และ 5 ส่วนการใช้สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตได้สูงกว่าการใช้สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ และมีวิตามินซีสูงกว่าในชุดเปรียบเทียบ

Gupta และคณะ (1996) ชักนำการกลายพันธุ์ถั่วเหลืองได้ถั่วเหลืองพันธุ์ใหม่ ในชั่วที่ 2 โดยนำเมล็ดแห้ง พันธุ์ 'ML-5' และ 'K-851' จุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ นาน 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่าลักษณะการกลายพันธุ์ที่ได้ คือ ฝักมีการสุกแก่พร้อมกัน ต้นมีความต้านทานต่อโรค mungbean yellow mosaic virus (MYMV) ให้ผลผลิตสูง และเมื่อคัดเลือกจนถึงชั่วที่ 5 และ 6 พบว่าต้นที่ได้มีจำนวนฝักต่อต้น และให้ผลผลิตสูงขึ้น และได้ทำการทดสอบการกลายพันธุ์ต่อ พบว่าสามารถถ่ายทอดลักษณะการกลายพันธุ์ได้ถึงชั่วที่

3.2 การชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีในหลอดทดลอง

รังสีที่นำมาใช้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ผลิตอิออน และกลุ่มที่ไม่ผลิตอิออน รังสีในกลุ่มที่ผลิตอิออนเป็นรังสีที่นิยมนำมาใช้ชักนำการกลายพันธุ์ เนื่องจากมีอำนาจแทรกซึมสูงมากเมื่อจีนหรือดีเอ็นเอได้รับรังสีประเภทนี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีซึ่งเป็นผลให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ ตัวอย่างของรังสีในกลุ่มนี้ คือ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา อนุภาคนิวตรอน ส่วนรังสีในกลุ่มที่ไม่ผลิตอิออน เป็นแสงประเภทเดียวกับแสงที่เรามองเห็นแต่มีช่วงคลื่นสั้นมากจนกระทั่งมองด้วยตาเปล่าไม่เห็น เกิดการกลายพันธุ์เนื่องจากดีเอ็นเอสามารถดูดซับพลังงานจากรังสี ทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเปลี่ยนไปอยู่ในสภาวะที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้สูง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของโมเลกุลได้ ตัวอย่างของรังสีในกลุ่มนี้ ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งมีการใช้กับพืชน้อยมากเนื่องจากมีอำนาจแทรกซึมต่ำ นิยมใช้กับเซลล์ที่มีสภาพเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือกับละอองเกสรเนื่องจากรังสีไม่สามารถผ่านเนื้อเยื่อที่มีเซลล์ซ้อนกันอยู่จำนวนมากได้ อย่างไรก็ตามรังสีนี้ในช่วงคลื่น 260-290 นาโนเมตร เป็นช่วงคลื่นที่ดูดกลืนโดยกรดนิวคลีอิคได้ดีจึงทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอได้ (Negrutiu, 1990) นอกจากนั้นยังสามารถก่อให้เกิดการขาดหายของโครโมโซม โครมาติด การเพิ่มจำนวนโครโมโซม และ ยับยั้งการแบ่งเซลล์

George และ Rao (1980) นำเมล็ด *Brassica juncea* พันธุ์ Rai-5 ฉายรังสีแกมมาความเข้ม 0-25 กิโลแรด โดยอัตราการปลดปล่อยรังสี 4400 แรดต่อนาที ก่อนนำไปเพาะในหลอดทดลอง พบว่ารังสีแกมมาไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของต้นกล้า แต่การใช้รังสีความเข้มสูง 8 กิโลแรด ทำให้ต้นกล้างอกช้า 3-6 วัน และต้นกล้าที่ได้มีลักษณะผอมและเตี้ย การใช้รังสีแกมมาความเข้ม 25 กิโลแรด เมล็ดสามารถงอกได้ดี และมีความต้านทานต่อรังสีความเข้มสูง หลังจากตัดใบเลี้ยงของต้นกล้าที่ได้มาตรวจสอบความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชักนำยอดรวมได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ การใช้รังสีความเข้มสูงกว่า 2 กิโลแรด ทำให้เกิดยอดรวมลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ยอดที่ได้มีขนาดเล็กและไม่ค่อยแข็งแรง โดยเฉพาะการใช้รังสีความเข้ม 25 กิโลแรด ยับยั้งการเกิดยอด ในขณะที่รังสีความเข้ม 15 กิโลแรด ยับยั้งการเกิดราก อย่างไรก็ตามการใช้รังสีความเข้มสูง (25 กิโลแรด) ส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ดี

Vanharten และคณะ (1981) รายงานว่าต้นมันฝรั่งที่ได้จากการนำใบฉายรังสีเอกซ์มีความถี่ในการกลายพันธุ์สูง มีรูปแบบของการกลายพันธุ์กว้าง และเกิดลักษณะไคเมอราน้อยมาก ลักษณะการกลายพันธุ์ที่พบคือ ใบของต้นหลังจากการฉายรังสีมีลักษณะผิดปกติ และ

ขนาดของหัวที่ได้มีทั้งใหญ่ และเล็กกว่าชุดเปรียบเทียบ สีผิวของหัวมันฝรั่งเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

Wang และคณะ (1988) นำแคลลัสของข้าวโพดพันธุ์แท้ พันธุ์ B73 มาฉายรังสีเอกซ์ ความเข้ม 0.2-8.4 กิโลแรด พบว่า การเจริญเติบโตของแคลลัสลดลงหลังจากการฉายรังสี 1 กิโลแรด และแคลลัสมีการเจริญเติบโตลดลงมากขึ้นเมื่อใช้ความเข้มรังสีสูงขึ้น การฉายรังสีความเข้มสูงกว่า 2.7 กิโลแรด พบว่าแคลลัสที่ได้มีลักษณะสีน้ำตาล ซีดจาง และตายในที่สุด อย่างไรก็ตามการฉายรังสีความเข้ม 0.8, 1.3 และ 2.7 กิโลแรด ให้อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงกว่าชุดเปรียบเทียบ แคลลัสที่ได้รับการฉายรังสีความเข้ม 0.8 กิโลแรด มีการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้สูงกว่าการใช้รังสีความเข้มอื่น ๆ และพบว่าต้นใหม่ที่ได้นั้นมีละอองเกสรเป็นหมัน และฝักติดเมล็ดลดลง อัตราการงอกของเมล็ดจากต้น R_0 ลดลงเมื่อใช้ความเข้มรังสีเพิ่มขึ้น และต้นที่ได้มีความแข็งแรง เกสรตัวผู้ถึงระยะพร้อมที่ผสมเร็วขึ้น ถึงแม้ว่าจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของคลอโรฟิลล์

Predieri และ Fasolo Fabbri Malavasi (1989) ทดลองฉายรังสีแกมมากับใบแอปเปิ้ล พันธุ์ M26 เพื่อส่งเสริมการพัฒนาไปเป็นยอดใหม่ โดยเปรียบเทียบกับชุดเปรียบเทียบ พบว่าการฉายรังสี ความเข้ม 10 เกรย์ ทำให้การพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ลดลงแต่เมื่อเพิ่มความเข้มรังสีถึง 20 เกรย์ และ 30 เกรย์ การพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ลดลงจาก 90 เปอร์เซ็นต์เป็น 10 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนความเข้มรังสี 40 เกรย์ ไม่สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้ และความเข้มรังสีที่เหมาะสมต่อการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ คือ 10-20 เกรย์

Zhang และ Lespinasse (1991) ทดลองฉายรังสีแกมมากับละอองเกสรแอปเปิ้ล ความเข้ม 0-1,000 เกรย์ พบว่าความเข้มรังสีสูงขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรลดลง และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการฉายรังสีกับชุดเปรียบเทียบ พบว่าการฉายรังสีทำให้ผลที่ได้ไม่มีเมล็ดและเมื่อเพิ่มความเข้มรังสีขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์ของผลไม่มีเมล็ดเพิ่มสูงขึ้นด้วย

Leblay และคณะ (1992) ทำการทดลองฉายรังสีแกมมาและรังสีอัลตราไวโอเล็ตกับใบแพร์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง พบว่าการให้ความเข้มรังสีสูงขึ้นทำให้จำนวนยอดที่พัฒนาต่อชิ้นส่วนลดลง ความเข้มของรังสีแกมมาที่ยับยั้งการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากใบได้ 50 เปอร์เซ็นต์ อยู่ระหว่าง 20-50 เกรย์ ขึ้นกับพันธุ์ จากการทดลองฉายรังสีแกมมากับใบแพร์ทั้ง 4 พันธุ์ คือ Conference, Williams, Passe-Grassane และ Comice พบว่าความเข้มของรังสีที่ยับยั้งการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในแต่ละพันธุ์ มีค่า 10, 20-30, 30-40 และ 40-50 เกรย์ ตามลำดับ และจากการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาหลังจากฉายรังสีแกมมา 30 เกรย์ พบว่าใบที่ได้รับการฉายรังสี มีเนื้อเยื่อสปองจีพาเรนไคมาเกาะกันอย่างหลวม ๆ นอกจากนี้เขายังรายงานผลของรังสีอัลตราไวโอเล็ตต่อการพัฒนาไป

เป็นพืชต้นใหม่ว่าเป็นไปทำนองเดียวกับการฉายรังสีแกมมา แต่ความเข้มของรังสีที่ยับยั้งการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ไม่ได้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ แพร์ทั้ง 3 พันธุ์ คือ Conference, Passe-Crassane และ Comice ตอบสนองต่อรังสีอัลตราไวโอเล็ตเหมือนกัน ค่าความเข้มของรังสีที่ยับยั้งการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 125 จูลต่อตารางเมตร จากการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของใบหลังจากฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต 375 จูลต่อตารางเมตร พบว่าเซลล์ชั้นอิพิเดอมิสฉีกขาดและแบนราบ Brigs และ Constantin (1977 อ้างโดย Leblay *et al.*, 1992) รายงานว่ารังสีอัลตราไวโอเล็ตสามารถผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อผิวเพียงชั้นบาง ๆ จึงเหมาะที่จะใช้กับชิ้นส่วนพืชที่มีความบางเพียงชั้นเดียว มีรายงานการใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับแคลลัส เซลล์แขวนลอย และ โปรโตพลาสต์ (Eriksson, 1967; Constantin, 1984; Negrutiu *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1987; Murphy and Huerta, 1990 อ้างโดย Leblay *et al.*, 1992) ความเข้มรังสีที่ใช้ต่ำกว่า 100 จูลต่อตารางเมตร ทั้งนี้ขึ้นกับชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ใช้

Yang และ Schmidt (1994) พบว่าหลังจากนำใบเชอรี่ (*Prunus avium*) พันธุ์ '209/1' ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง มาฉายรังสีเอกซ์ ระดับความเข้มต่าง ๆ คือ 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ โดยใช้เครื่องฉายรังสีเอกซ์ขนาด 12 มิลลิแอมแปร์ 150 กิโลโวลต์ ฟิลเตอร์ชนิด A1 ระยะทางที่ปลดปล่อยรังสีจากจุดโฟคัสถึงจานเพาะเลี้ยง ประมาณ 55 เซนติเมตร ปริมาณรังสีที่ปลดปล่อย 0.9 เกรย์ต่อวินาที พบว่าความเข้มรังสี 20 เกรย์ ยับยั้งการพัฒนาไปเป็นยอดจากใบได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่ได้จากการฉายรังสี มีลักษณะเตี้ยมาก ใบมีขนาดเล็ก หนา บริเวณขอบใบมีรอยหยัก ได้เป็นสายพันธุ์ใหม่ คือ พันธุ์ '209/1-20m' เมื่อตรวจสอบความแตกต่างกับต้นปกติโดยวิธี Random amplify polymorphic DNAs (RAPDs) โดยแยกดีเอ็นเอจากใบสด นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณ โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แล้วตรวจสอบโพลีมอร์ฟิซึม พบว่าต้นกลายพันธุ์มีรูปแบบดีเอ็นเอหายไป 1 แถบ ขนาด 2 กิโลเบส จากผลดังกล่าวสรุปได้ว่าพันธุ์กลายเกิดการกลายพันธุ์ทั้งต้น

Jerzy และ Zalewska (1996) ชักนำการกลายพันธุ์เบญจมาศโดยนำใบฉายรังสีเอกซ์ และรังสีแกมมา ความเข้ม 5-25 เกรย์ อัตราการปลดปล่อยรังสี 0.29 เกรย์ต่อนาที และ 1.92 เกรย์ต่อนาที ตามลำดับหลังจากฉายรังสีแล้ววางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำยอด พบว่าต้นที่ได้หลังจากการฉายรังสีเอกซ์ และรังสีแกมมา 15 เกรย์ มีการเปลี่ยนแปลงสีของดอก ขนาดของดอก และลักษณะของช่อดอก ลักษณะทางสัณฐานของใบและลำต้นเปลี่ยนแปลงสามารถจำแนกเป็นพันธุ์ใหม่ได้ 12 พันธุ์

นอกจากการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีในหลอดทดลองแล้วมีรายงานถึงการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีนอกหลอดทดลอง ซึ่งมีรายงานโดย Tulmann และ Latado (1996) ชักนำการกลายพันธุ์เบญจมาศ พันธุ์ 'Repin' ซึ่งมีดอกสีชมพู โดยนำรากฉายรังสีแกมมาความเข้ม 20 เกรย์ ก่อนการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการปักชำราก พบว่าต้นที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงของสีดอก คือ ได้ดอกสีขาว เป็นพันธุ์ 'Cristiane' และดอกสีชมพูเข้ม เป็นพันธุ์ 'Ingrid'

Raisinghani และ Mahna (1996) ชักนำการเปลี่ยนแปลงของคลอโรฟิลล์ ใน *Trigonella corniculata* L. โดยนำเมล็ดฉายรังสีแกมมาความเข้ม 600 เกรย์ ทำการคัดเลือกในชั่วที่ 2 พบว่าใบของต้นที่ได้ขาดคลอโรฟิลล์ มีลักษณะเป็นสีเหลือง และสีขาว

Srivastava และ Singh (1996) ชักนำถั่วมะแฮะให้มีผลผลิตสูง โดยนำเมล็ดพันธุ์ 'Pusa 85' และ 'Pusa 601' ฉายรังสีแกมมาความเข้ม 150, 300 และ 450 เกรย์ นำไปปลูกในแปลง หลังจากเก็บเกี่ยวผลผลิตที่ได้ พบว่า พันธุ์ 'Pusa 601' ที่ได้รับการฉายรังสี 450 เกรย์ มีผลผลิตสูงที่สุด และให้จำนวนฝักต่อต้นสูง

Sharma และ Bhatnagar (1996) ชักนำการกลายพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์ 'PK 472' และ 'Bragg' โดยฉายรังสีแกมมาความเข้ม 150, 200 และ 250 เกรย์ กับฉาย และไม่ฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต เพื่อประเมินลักษณะการต้านทานต่อแมลงวันเจาะลำต้น พบว่า พันธุ์ 'PK 472' และ 'Bragg' ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา 200 เกรย์ ร่วมกับการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต ให้ต้นที่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น 13 ต้น และ 7 ต้น ตามลำดับ โดยต้นที่กลายพันธุ์จากพันธุ์ 'PK 472' มีลำต้นถูกเจาะน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดเปรียบเทียบ และให้ผลผลิตสูงที่สุด ได้เป็นพันธุ์ใหม่ พันธุ์ '72-12' ต้นที่กลายพันธุ์จากพันธุ์ 'Bragg' ให้ผลผลิตสูงที่สุดแต่น้อยกว่าพันธุ์ '72-12' และมีการสุกแก่เร็วกว่าพันธุ์พ่อแม่ 7 วัน ได้เป็นพันธุ์ใหม่ พันธุ์ '19510'

4. การตรวจสอบและการจำแนกพันธุ์ไม้ผลโดยใช้ไอโซไซม์

การตรวจสอบพันธุ์พืชโดยลักษณะทางสัณฐาน ต้องใช้ระยะเวลานานและลักษณะดังกล่าวไม่สามารถใช้จำแนกความแปรปรวนของพันธุ์ที่เกิดขึ้นได้ทั้งหมด เนื่องจากปัจจัยสภาพแวดล้อมมีผลต่อการแสดงออกของลักษณะดังกล่าว จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน เช่น สีของต้นกล้า รูปร่างใบ สีขนของลำต้นและฝัก และ สีตาเมล็ดของถั่วเหลือง 18 สายพันธุ์ พบว่าสามารถจำแนกถั่วเหลืองทั้ง 18 สายพันธุ์ ได้ เพียง 10 กลุ่ม ในขณะที่การตรวจสอบเอนไซม์ peroxidase (PER) จากเยื่อหุ้มเมล็ด และเอนไซม์ ucariase (UCR) ในเมล็ด สามารถจำแนกได้ 13 กลุ่ม (วันชัย จันทร์ประเสริฐ และคณะ, 2536) การพัฒนาวิธีการที่จะตรวจสอบลักษณะและพันธุ์ของไม้ผล ด้วยวิธีการวิเคราะห์ไอโซไซม์นับว่ามีความสำคัญต่อการจำแนกพันธุ์และการก

ลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในระดับจีน ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่มีผลต่อการแสดงออกในลักษณะที่สำคัญ

ไอโซไซม์ หรือ ไอโซเอนไซม์ คือ โปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง ๆทำหน้าที่ในการกระตุ้น หรือ ทำปฏิกิริยาอย่างเดียวกัน แต่มีขนาดและรูปร่างโมเลกุล แตกต่างกันออกไป และไอโซไซม์มีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และชนิดของสิ่งมีชีวิต โปรตีนดังกล่าวควบคุมการสร้างโดยจีนซึ่งเป็นตัวสำคัญในการกำหนดลักษณะทางพันธุกรรม และสามารถสกัดออกมาตรวจสอบได้ พืชสายพันธุ์เดียวกันมีรูปแบบไอโซไซม์เหมือนกันหากมีความแตกต่างของไอโซไซม์แสดงว่าพืชชนิดนั้นเป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน การตรวจสอบหรือแยกความแตกต่างของเอนไซม์โดยทั่วไปนิยมใช้เทคนิคอิเลคโตรฟอรีซีสในอดีตการจำแนกไม้ผลโดยใช้เอนไซม์ยังมีการศึกษาน้อย เนื่องจากมีข้อจำกัด คือ การสกัดเอนไซม์ที่ต้องการในเนื้อเยื่อนั้นทำได้ยาก เพราะสารประกอบพวกโพลีฟีโนล หรือ มิวโคโพลีแซคคาไรด์เป็นตัวขัดขวางการสกัดของเอนไซม์ในเนื้อเยื่อพืช (Arulsekar *et al.*, 1985) ปัจจุบันมีรายงานผลความสำเร็จในการใช้ไอโซไซม์จำแนกไม้ผลหลายชนิด เนื่องจากมีการพัฒนาวิธีการเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวได้ประสบผลสำเร็จ

Byrne และ Littleton (1989) ตรวจสอบและจำแนกความแตกต่างของลูกผสมระหว่างพลัมกับแอปริคอท โดยใช้เอนไซม์ 6 ระบบคือ PER, phosphoglucoisomerase (PGI), phosphoglucomutase (PGM), 6-phosphogluconatedehydrogenase (6PGD), leucineamino peptidase (LAP) และ malatedehydrogenase (MDH) พบว่า เอนไซม์ PER สามารถจำแนกความแตกต่างได้ดีที่สุด

เสาวณี สุริยาภณานนท์ (2535) ตรวจสอบพันธุ์มะขามเปรี้ยว และหวานที่ปลูกจากแหล่งต่าง ๆ โดยใช้ระบบเอนไซม์ 3 ระบบ คือ PER, esterase (EST) และacid phosphatase (ACP) พบว่า รูปแบบของเอนไซม์ PER สามารถใช้ตรวจสอบสายพันธุ์มะขามได้ รูปแบบของเอนไซม์ดังกล่าวมีความแตกต่างกันในมะขามแต่ละสายพันธุ์ ส่วนเอนไซม์ EST และ ACP ให้ความแตกต่างของสายพันธุ์น้อยมาก

Samimy และ Cummins (1992) ตรวจสอบแอปเปิ้ล (*Malus domestica*) พันธุ์ที่ใช้เป็นต้นตอจำนวน 13 พันธุ์ โดยใช้ระบบเอนไซม์ 6 ระบบ คือ alcoholdehydrogenase (ADH), gluco-6-phosphateisomerase (GPI), 6PGD, PGM, MDH และ PER พบว่า PGM และ 6 PGD สามารถใช้ตรวจสอบความแตกต่างต้นต่อของแอปเปิ้ลได้ดีทั้ง 13 พันธุ์

Degani และ El-Batsri (1992) ตรวจสอบไอโซไซม์ PGI จากใบของต้นกล้ามะม่วง (*Mangifera indica*) ทั้งหมด 139 สายพันธุ์ ซึ่งเก็บจากแหล่งต่าง ๆ 2 แหล่ง พบว่ามีรูปแบบเอนไซม์ PGI-2 แบ่งได้ 6 รูปแบบ ซึ่งประกอบด้วยรูปแบบของเอนไซม์ ที่มี 3 แถบ และ 1

แถบ เมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบเอนไอโซไซม์ PGI-2 ที่สกัดจากละอองเกสร พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวควบคุมด้วยจีน *Pgi-2* ซึ่งเป็นอัลลีลซึ่งกันและกันและมีลักษณะเป็นเฮเตอโรไซกัส

Cousineau และคณะ (1993) ตรวจสอบความแตกต่างของ red raspberry (*Rubus idaeus* L.) จำนวน 104 พันธุ์ โดยใช้เอนไซม์ 6 ระบบ คือ MDH, PGI, PGM, isocitratedehydrogenase (IDH), shikimatedehydrogenase (SKDH) และ triosphosphate-isomerase (TPI) พบว่า red raspberry 75 พันธุ์ มีรูปแบบไอโซไซม์ เฉพาะตัว และสามารถตรวจสอบความแตกต่างได้โดยใช้ไอโซไซม์ทั้ง 6 ระบบ

วันทนา นวรังสรรค์ (2538) ตรวจสอบพันธุ์ *Lansium domesticum* Correa. 3 พันธุ์ คือ ลองกอง ลางสาด และดูกู โดยใช้เอนไซม์ 7 ระบบ คือ PER, ACP, EST, PGI, PGM, ADH และ MDH พบว่าเอนไซม์ 4 ระบบ คือ PER, ACP, EST และ PGI ย้อมเจลติดสี อย่างไรก็ตามเอนไซม์ PER สามารถจำแนกได้ได้ดีที่สุด เอนไซม์ EST แยกความแตกต่างได้รองลงมา ส่วนเอนไซม์ ACP ให้แถบที่มีลักษณะเป็นปื้นไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ชัดเจน ส่วนเอนไซม์ PGI ให้จำนวนแถบไม่คงที่

จากรายงานผลความสำเร็จการใช้ไอโซไซม์ตรวจสอบ วิเคราะห์และจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชดังกล่าวข้างต้น สามารถนำเทคนิควิธีการนี้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชตรวจสอบการกลายพันธุ์ของพืชที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ เช่น รังสี และ สารเคมีได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาระยะเวลา และความเข้มข้นของ EMS และประเมินความเข้มของรังสีแกมมาต่อความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ในอันที่จะประเมินผลที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับจีน

2. เพื่อศึกษาตัวบ่งชี้ทางชีวเคมี เนื้อเยื่อวิทยา และลักษณะทางสัณฐานมาช่วยตรวจสอบและคัดเลือกการกลายพันธุ์ในระยะต้นกล้าในหลอดทดลอง

3. ทราบผลของการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล และลักษณะทางสัณฐานที่ปรากฏซึ่งเกิดจากสิ่งก่อกลายพันธุ์

4. สร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพื่อใช้เป็นต้นพันธุ์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป

5. นำความรู้ที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐาน สำหรับการพัฒนาวิธีการชักนำความแปรปรวนทางพันธุกรรม เพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ไม้ผลอื่น ๆ ต่อไป

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. วัสดุพืช

ในการศึกษานี้ใช้ยอดรวมมังคุดซึ่งพัฒนาจากแคลลัสที่ชักนำจากใบ วางเลี้ยงในขวดทดลองบนอาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารวุ้น สูตร WPM เติม polyvinylpyrrolidone (PVP) ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้นเจลไรท์ 0.20 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั้นบน คืออาหารเหลวสูตร 1/2MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ PVP ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อส่งเสริมการยืดยาวของยอด (รูปที่ 1) วางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 3 ปี โดยย้ายเลี้ยงเดือนละครั้ง

รูปที่ 1. ยอดรวมมังคุดซึ่งพัฒนาจากแคลลัสที่ชักนำจากใบ วางเลี้ยงบนอาหาร 2 ชั้น

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

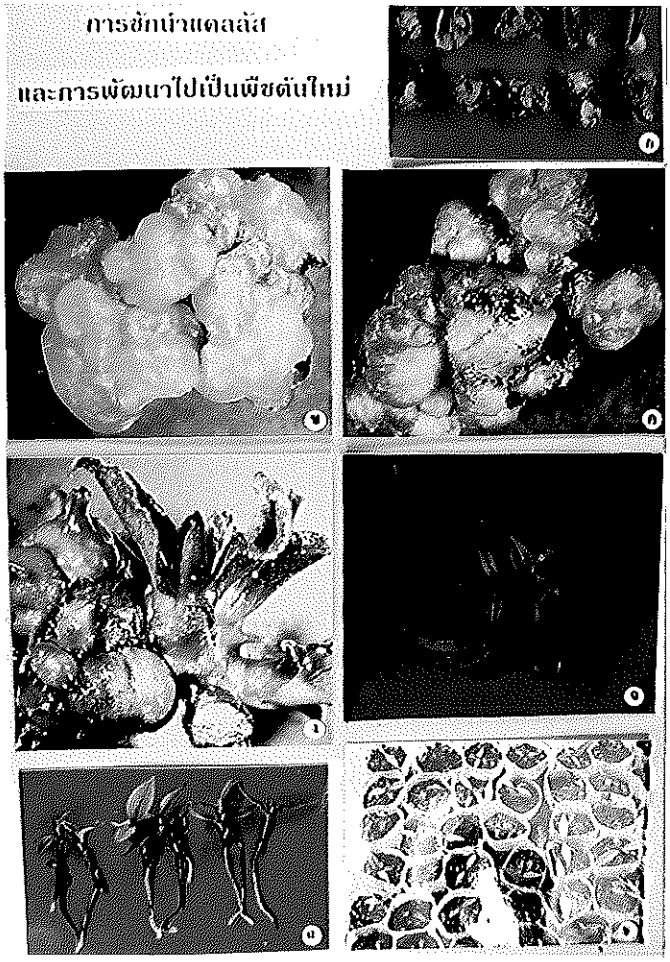
2. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการเตรียมอาหาร
   - เครื่องชั่งไฟฟ้า
   - เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
   - หม้อนึ่งความดัน
   - ตู้อบไมโครเวฟ
   - เครื่องคนอัตโนมัติ และแท่งแม่เหล็ก
   - เครื่องแก้ว และอุปกรณ์อื่น ๆ
3. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการสกัดเอนไซม์
   - กระติกน้ำแข็ง
   - โกร่งสำหรับบดตัวอย่างพืช
   - หลอด Eppendorf
   - เครื่องเซ็นตริฟิวก์
4. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการแยกไอโซไซม์
   - เครื่องอิเลคโตรฟอรีซีสแบบชนิดแนวตั้ง Midgel Multicast รุ่น 2050-200
   - เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า Pharmacia รุ่น GPS 200/400
5. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อ
   - พาราฟิน
   - แท่งพลาสติกสำหรับยึดแท่งพาราฟิน
   - เครื่องตัดเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (เครื่องไมโครโตม)
   - เครื่องอุ่นสไลด์

วิธีการเตรียม

1. การขยายพันธุ์มังคุดในหลอดทดลอง

การขยายพันธุ์มังคุดผ่านการสร้างแคลลัส ใช้ใบอ่อนสีม่วงแดง อายุ 7-12 วัน ด้วยวิธีการ 4 ขั้นตอนตามวิธีการของ Te-chato และคณะ (1995a) ดังนี้คือ ขั้นตอนแรก ชักนำแคลลัสโดยวางเลี้ยงใบให้ด้านท้องใบสัมผัสกับอาหาร (รูปที่ 2ก) อาหารที่ใช้ชักนำแคลลัส คือ สูตร MS (องค์ประกอบของธาตุอาหาร ภาคผนวกที่ 1) เติม PVP ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้นเจลไรท์ 0.20 เปอร์เซ็นต์ BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อมีการสร้างแคลลัส (รูปที่ 2ข) จึงย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมเพื่อเพิ่มปริมาณโนดูลาแคลลัส และส่งเสริมการพัฒนาจุดกำเนิดตายอดเริ่มต้น

(รูปที่ 2ค) ขั้นตอนที่สอง เป็นการชักนำตายอด (รูปที่ 2ง) โดยวางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร WPM (องค์ประกอบของธาตุอาหาร ภาคผนวกที่ 1) เติม PVP ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้นเจลไรท์ 0.25 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อมีการสร้างยอดขนาดเล็ก ขั้นตอนต่อมาเป็นการส่งเสริมการยืดยาวของยอดโดยการเติมอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม BA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ PVP ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไป (รูปที่ 2จ) ขั้นตอนที่สี่ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายเป็นการชักนำรากจากยอด โดยตัดยอดมังคุดขนาด 1-2 เซนติเมตร ทำแผลที่ฐานยอดจุ่มแช่ใน IBA ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมติอลิตร ระยะเวลา 15 นาที ในที่มืดวางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม PVP ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร PG ความเข้มข้น 5.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน 0.25 เปอเซ็นต์ เพื่อชักนำการสร้างราก (รูปที่ 2ฉ) โดยวางเลี้ยงในที่มืด 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมง ย้ายปลูกในถุงกระดาษด้วยเวอมิคูไลท์ (รูปที่ 2ช)



รูปที่ 2. การชักนำแคลลัส และการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ของแคลลัสมังคุด

ก. การชักนำแคลลัส ข. แคลลัส ค. โนดูลาแคลลัส

ง. ตายอดและยอดรวม จ. ยอดยืดยาว ฉ. การชักนำรากมังคุด

ช. ต้นกล้ามังคุดหลังย้ายปลูก

2. การชักนำการกลายพันธุ์จากโนดูลาแคลลัส

นำโนดูลาแคลลัส ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัส เป็นเวลา 6 เดือน (ย้ายเลี้ยงเดือนละครั้ง) หลังจากย้ายเลี้ยง 30 วัน นำมาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ วางบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 60 รอบต่อนาที หลังจากจุ่มแช่โดยการเขย่าเป็นระยะเวลาต่าง ๆ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัดสารละลาย EMS ส่วนเกินออก สำหรับการฉายรังสีแกมมา นำโนดูลาแคลลัสไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสในจานเพาะเลี้ยงพลาสติก (เส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร) เป็นเวลา 1 วัน นำไปฉายรังสีแกมมาซึ่งมีแหล่งกำเนิดจากโคบอลท์ 60 (โดยได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์) หลังจากได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์แล้ว วางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดและเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมง

3. การตรวจสอบเอนไซม์

นำใบจากต้นชุดเปรียบเทียบ (R_1) แคลลัสที่ชักนำจาก R_1 (C_1) ใบจากต้นซึ่งพัฒนาจากแคลลัสที่ได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์ (M_1R_1) แคลลัสที่ชักนำจาก M_1R_1 ($M_1R_1C_1$) น้ำหนัก 0.5 กรัม บดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร ในโกร่งแช่เย็น บัฟเฟอร์ที่ใช้ประกอบด้วย tris-hydroxylmethyl aminomethane (Tris-HCl) เข้มข้นต่าง ๆ pH 7.5, PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ disodium ethylenediaminetetraacetate (Na_2EDTA) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และ 2-mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) เทสารละลายที่ได้ใส่หลอด Eppendorf นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนโดยเครื่องไมโครเซ็นตริฟิวก์ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด Eppendorf ใหม่ที่สะอาด (ในกรณีที่ยังไม่ใช้ทันที เติมกลีเซอรอล เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในสารละลายเอนไซม์ เก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส) ดูดสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ 15 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นเจลอะคริลาไมด์ (วิธีการเตรียมเจล ภาคผนวกที่ 2) ซึ่งประกอบด้วย ความเข้มข้นเจลตอนบน 3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเจลตอนล่างใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการแยกเอนไซม์ภายใต้แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ ภายใต้ อุณหภูมิ 5±1 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Laemmli (1970) นำเจลที่ได้มาย้อมสีระบบต่าง ๆ (วิธีการเตรียมภาคผนวกที่ 3) เพื่อศึกษารูปแบบเอนไซม์

4. การศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา

นำ C_1, C_1 ที่ได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์ (M_1C_1) และ แคลลัสที่ได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์ครั้งที่สอง ($M_2R_1C_1$) ไปแช่ในฟิกเซทีฟ ซึ่งประกอบด้วยฟอร์มาลีน 1 ส่วน กรดอะซิติก 1 ส่วน และ แอลกอฮอล์ 18 ส่วน นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้โปรโทพลาสซึมภายในเซลล์หยุดกระบวนการต่าง ๆ นำชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการฟิกซ์ มาผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยกระบวนการดีไฮเดรชัน ตามวิธีการของ Johansen (1940) จากนั้นฝังชิ้นส่วนพืชลงในพาราฟิน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 14-16 องศาเซลเซียส นำแท่งพาราฟินที่แข็งแล้วมาตัดด้วยเครื่องไมโครโตมให้มีขนาด 7 ไมโครเมตร วางบนแผ่นสไลด์ นำแผ่นสไลด์มาย้อมด้วยสีย้อม 2 ชนิด คือ แซฟรานิน และฟาสท์กรีน จากนั้นใช้ตัวกลางยึดกระจกปิดสไลด์ด้วยคานาดาบาลซัม แล้วปิดเนื้อเยื่อพืชภายหลังการย้อมสีด้วยกระจกปิดสไลด์ วางทิ้งไว้ 2-3 วัน เพื่อให้แห้ง (วิธีการเตรียม ภาคผนวกที่ 4) แล้วจึงนำมาเช็ดทำความสะอาดด้วยไซลีน หรือ โคลบออยด์ นำไปศึกษารายละเอียดและบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดอินเวอร์เตด

วิธีการวิจัย

1. การศึกษาผลของ EMS ต่อการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัส

1.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของ EMS ต่อพัฒนาการของโนดูลาแคลลัส

นำแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส 30 วัน มาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 0.25, 0.50, 0.75, และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ วางบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 60 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 นาที ล้างแคลลัสด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง วางเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดในขวดขนาดใหญ่ (5×10 เซนติเมตร) ซึ่งบรรจุอาหารชักนำยอด 30 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน ตรวจนับการรอดชีวิต (การสร้างยอด) และลักษณะของแคลลัสที่ทำการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ ทุกสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด ขวดละ 5 ชิ้น

1.2 การศึกษาระยะเวลาการจุ่มแช่แคลลัสในสารละลาย EMS ต่อพัฒนาการของโนดูลาแคลลัส

นำแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสเป็นเวลา 30 วัน มาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นที่ยับยั้งการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชได้อย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ (ซึ่งได้จากการศึกษา 1.1) เป็นระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที ล้างแคลลัสด้วย

น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง วางเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดในขวดขนาดใหญ่ ซึ่งบรรจุอาหารชักนำยอด 30 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน ตรวจนับการรอดชีวิต (การสร้างยอด) และลักษณะของแคลลัสในแต่ละระยะเวลาการจุ่มแช่ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 8 ขวด ขวดละ 4 ชิ้น

2. การศึกษาผลของความเข้มรังสีแกมมาต่อการรอดชีวิตโนดูลาแคลลัส

นำแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัส เป็นเวลา 30 วัน ย้ายไปเลี้ยงอาหารใหม่สูตรเดิมในจานเพาะเลี้ยงขนาด 15x90 มิลลิเมตร เลี้ยงจานละ 25 ชิ้น หลังจากเพาะเลี้ยง 1 วัน นำไปฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ คือ 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ โดยอัตราการปลดปล่อยรังสี 200 เซ็นติเกรย์ต่อนาที หลังจากนั้นวางเลี้ยงในภาชนะและอาหารเดิมต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดในขวดขนาดใหญ่ ซึ่งบรรจุอาหารชักนำยอด 30 มิลลิลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน ตรวจนับการรอดชีวิต (การสร้างยอด) และลักษณะของแคลลัสที่ฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ขวด ขวดละ 6 ชิ้น

3. ผลของ EMS และรังสีแกมมา ต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อวิทยา

นำ C_1, M_1C_1 ที่ผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ และ $M_2R_1C_1$ ซึ่งได้จากการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที และ 60 นาที และ M_1C_1 ที่ฉายรังสีแกมมา ความเข้มต่าง ๆ และ $M_2R_1C_1$ ซึ่งได้จากการฉายรังสีแกมมา 40 เกรย์ มาศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา ตามวิธีการของ Johansen (1940) ดังวิธีการในหัวข้อที่ 4 เปรียบเทียบกันแต่ละชนิดและความเข้มของสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่ให้

4. ผลของ EMS และ รังสีแกมมา ต่อรูปแบบของไอโซไซม์

4.1 การศึกษาระบบเอนไซม์ที่เหมาะสม

สกัดเอนไซม์จาก M_1R_1 และ $M_1R_1C_1$ ซึ่งผ่านการฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ ด้วย บัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl 0.75 โมลาร์ pH 7.5, PVP, Na_2EDTA และ 2-mercaptoethanol ตรวจสอบแถบเอนไซม์บนเจลอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แยกภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Laemmli (1970) ดังวิธีการในหัวข้อที่ 3 ย้อมด้วยสีย้อมเอนไซม์ 5 ระบบ คือ PER, EST, ADH, MDG

และ PGI ในที่มืดจนเจลติดสีชัดเจน จากนั้นตรึงเอนไซม์ในสารละลายตรึงเอนไซม์ ล้างสีส่วนเกินออก และเก็บในสารละลายเก็บเจล หรือบันทึกภาพไซโมแกรมของเอนไซม์แต่ละระบบที่ปรากฏ เปรียบเทียบกันระหว่างความเข้มของรังสีแกมมา

4.2 การศึกษาบัฟเฟอร์และชิ้นส่วนพืชที่ใช้สกัดเอนไซม์

สกัดเอนไซม์จาก R_1 C_1 และ $M_1R_1C_1$ หลังจากฉายรังสีแกมมา 20 เกรย์ ($M_1R_1C_1$-20) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl เข้มข้นต่าง ๆ (ตารางที่ 1) นำเอนไซม์มาตรวจสอบรูปแบบไซโมแกรมบนเจลอะคริลาไมด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เปรียบเทียบความแตกต่างของแถบเอนไซม์ที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้นต่างกัน โดยใช้สีย้อมเอนไซม์ระบบที่ชัดเจนที่สุดจากการศึกษา 4.1 เพื่อคัดเลือกชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุด

4.3 การศึกษาความเข้มข้นของเจลอะคริลาไมด์

สกัดเอนไซม์จาก M_1R_1 และ $M_1R_1C_1$ ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดจากการศึกษา 4.2 มาตรวจสอบแถบเอนไซม์ บนเจลอะคริลาไมด์ โดยใช้เจลความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 7, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบของเจลในแต่ละความเข้มข้นแสดงในตารางที่ 2 แยกเอนไซม์ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ หลังจากนั้นใช้สีย้อมเอนไซม์ระบบที่ชัดเจนที่สุดจากการศึกษาที่ 4.1

4.4 ผลของ EMS ต่อรูปแบบไอโซไซม์

สกัดเอนไซม์จาก M_1R_1 และ $M_1R_1C_1$ ซึ่งผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วย บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดจากวิธีการวิจัยที่ 4.2 ตรวจสอบแถบเอนไซม์บนเจลอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แยกภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตามวิธีการในหัวข้อที่ 3 ย้อมด้วยสีย้อมเอนไซม์ เปอร์ออกซิเดสในที่มืดจนเจลติดสีชัดเจน จากนั้นตรึงเอนไซม์ในสารละลายตรึงเอนไซม์ ล้างสีส่วนเกินออก และเก็บในสารละลายเก็บเจล หรือบันทึกภาพไซโมแกรมของเอนไซม์ที่ปรากฏ เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ EMS และชุดควบคุมซึ่งไม่ได้รับการจุ่มแช่ EMS

ตารางที่ 1 ชนิดและองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์

ชนิดของบัฟเฟอร์	องค์ประกอบ
1	Tris-HCl เข้มข้น 0.25 โมลาร์ pH 7.5
	PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์
	Na_2EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์
	2-mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)
2	Tris-HCl เข้มข้น 0.50 โมลาร์ pH 7.5
	PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์
	Na_2EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์
	2-mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)
3	Tris-HCl เข้มข้น 0.75 โมลาร์ pH 7.5
	PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์
	Na_2EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์
	2-mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบและความเข้มข้นของเจลอะคริลาไมด์ที่ใช้ในการศึกษาระบบเอนไซม์

องค์ประกอบเจล	ความเข้มข้นของเจล			
	ตอนล่าง			ตอนบน
	7%	10%	12%	3%
30 % acrylamide+0.8 % bisacrylamide (ml)	2.04	3.0	3.6	0.3
1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (ml)	2.15	2.15	2.15	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (ml)	0.75	0.75	0.75	-
1 % ammoniumpersulfate (µl)	225	225	225	120
น้ำกลั่น (ml)	3.58	2.62	2.02	1.83
TEMED (µl)	5	5	5	5
ปริมาตรรวม (มล.)	9	9	9	3

5. ผลของ EMS และรังสีแกมมา ต่อลักษณะทางสัณฐาน

ตัดแยกยอดมังคุดจาก M_1R_1 ที่ได้จากการจุ่มแช่สารละลาย EMS และฉายรังสีความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ทดสอบ ความยาว 1-2 เซนติเมตร มาชักนำราก ตามวิธีการในหัวข้อวิธีการที่ 1 ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น ความยาวรากเฉลี่ย จำนวนข้อเฉลี่ย ความสูงเฉลี่ย รูปร่างของใบ หลังจากชักนำราก 1 เดือน และการรอดชีวิตของต้นหลังย้ายปลูก 3 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ EMS และรังสีแกมมาแต่ละหน่วยการทดลอง (ความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์) ทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 8 ต้น

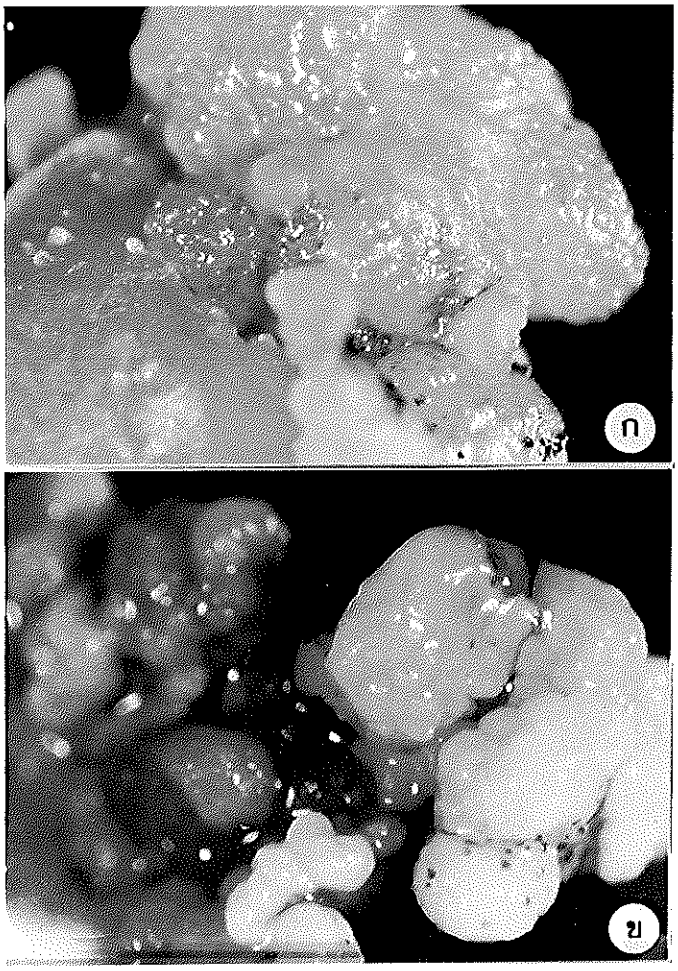
บทที่ 3

ผล

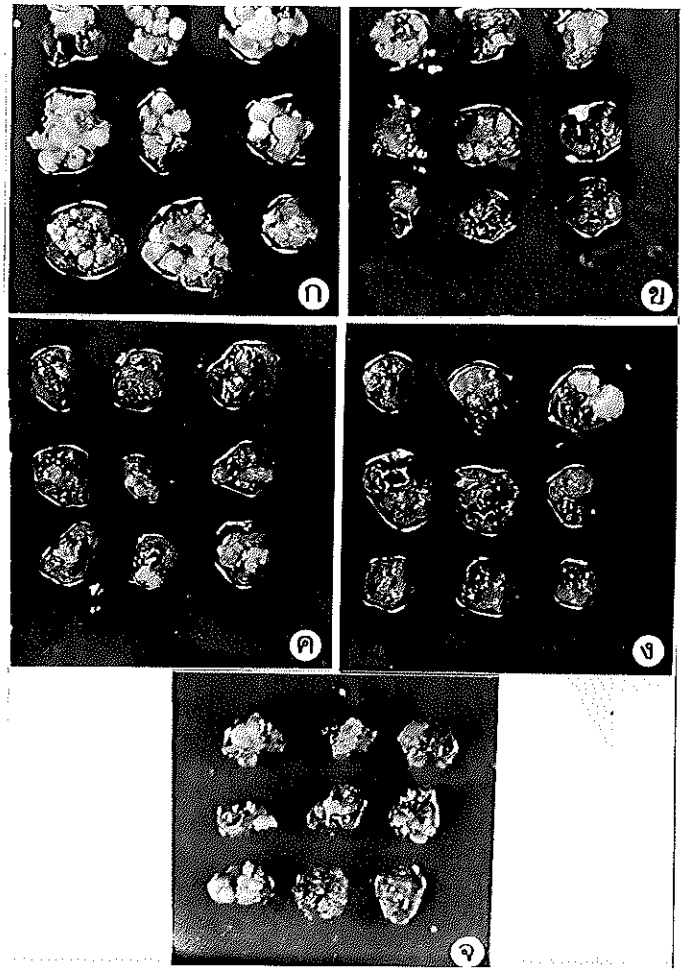
1. การศึกษาผลของ EMS ต่อการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัส

1.1 การศึกษาผลของความเข้มข้น EMS ต่อการพัฒนาการของโนดูลาแคลลัส

หลังจากนำแคลลัสจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าแคลลัสเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีขาวซีด (รูปที่ 3) และหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 วัน สีซีดเพิ่มมากขึ้นแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แคลลัสที่รอดชีวิตเปลี่ยนเป็นสีเขียวและพัฒนาไปเป็นกลุ่มยอดรวมและเป็นต้นใหม่ แคลลัสที่ได้รับ EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ มีผลทำให้การพัฒนาไปเป็นกลุ่มยอดรวมได้ต่ำกว่าชุดเปรียบเทียบ (รูปที่ 4) หลังจากวางเลี้ยง 3 สัปดาห์ ตรวจนับการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัส พบว่าการใช้ EMS ความเข้มข้นสูงขึ้นมีผลทำให้การรอดชีวิตต่ำ ในขณะที่การใช้ความเข้มข้นต่ำ คือ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการรอดชีวิตไม่แตกต่างกับชุดเปรียบเทียบ คือ 47.44 และ 58.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงขึ้นเป็น 0.50, 0.75 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตของแคลลัสลดลงเหลือ 31.55, 26.13 และ 11.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีความแตกต่างกับชุดเปรียบเทียบและความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ความเข้มข้นของ EMS ที่ยับยั้งการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้อย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ ของชุดเปรียบเทียบ คือ ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 5) ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นนี้ใช้ในการศึกษาอื่นต่อไป



รูปที่ 3 ลักษณะของแคลลัสก่อนการจุ่มแช่สารละลาย EMS (ก) และหลังการจุ่มแช่สารละลาย EMS และเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2-3 วัน (ข)

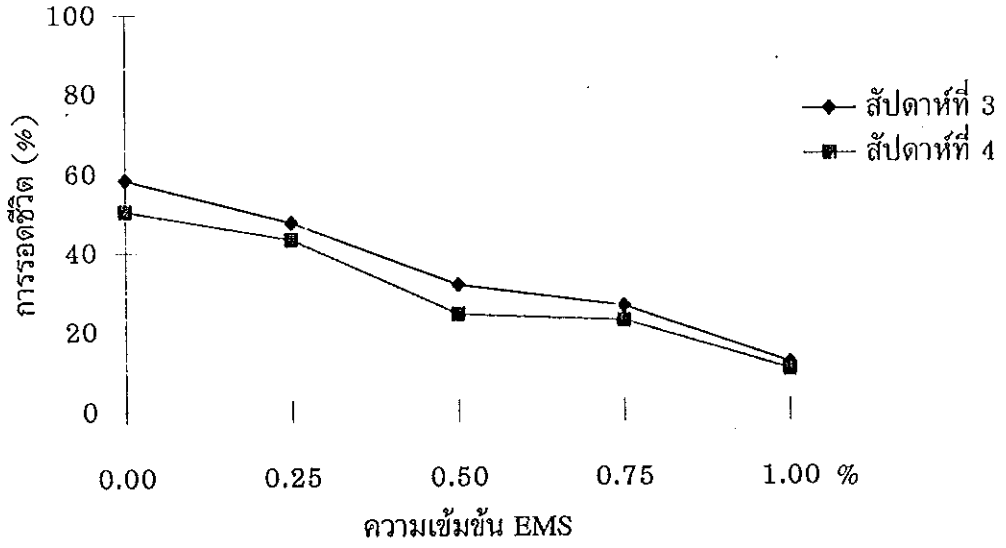


รูปที่ 4 ลักษณะแคลลัสที่รอดชีวิตและพัฒนาไปเป็นกลุ่มตายอด หลังจากจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0 (ก), 0.25 (ข), 0.50 (ค), 0.75 (ง) และ 1.00 (จ) เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 2 ชั่วโมง วางเลี้ยง 6 สัปดาห์

ตารางที่ 3 ผลของ EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการรอดชีวิตของแคลลัส

ความเข้มข้น (%)	การรอดชีวิต (%)	
	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
0	58.38a	50.47a
0.25	47.44a	43.13a
0.50	31.55b	24.13b
0.75	26.13b	22.49b
1.00	11.67c	10.00b
C.V. (%)	26.14	32.48

ค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P=0.05) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT



รูปที่ 5 ผลของ EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการรอดชีวิตของแคลลัส

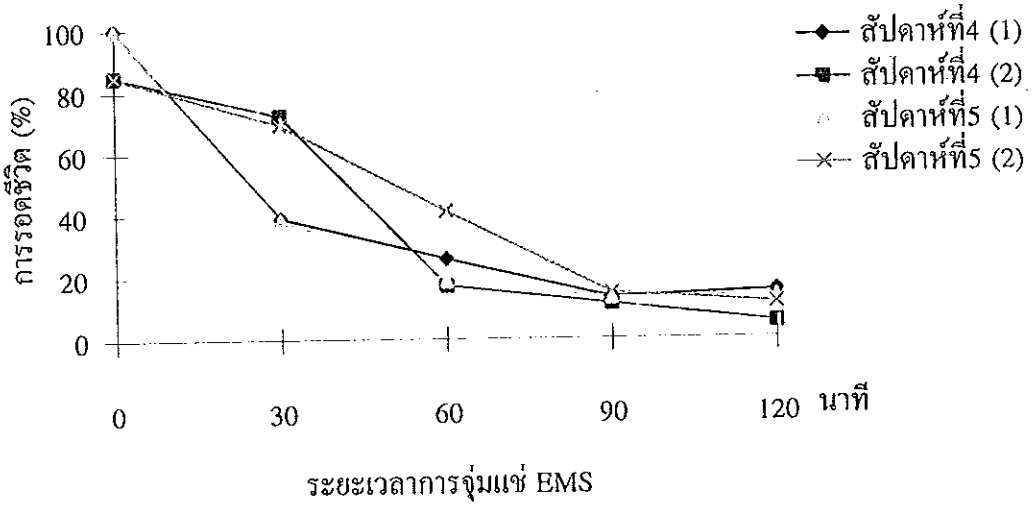
1.2 การศึกษาระยะเวลาการจุ่มแช่แคลลัสด้วยสารละลาย EMS ต่อการพัฒนาการของโนดูลาแคลลัส

หลังจากนำแคลลัสจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลาต่างกัน คือ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที พบว่าทุกระยะเวลา ให้แคลลัสมีสีซีดจางลง หลังจากการวางเลี้ยง 2-3 วัน แคลลัสมีสีซีดเพิ่มมากขึ้นและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนแคลลัสที่รอดชีวิตเปลี่ยนเป็นสีเขียวและพัฒนาไปเป็นกลุ่มยอดรวมและเป็นต้นใหม่เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1 หลังจากวางเลี้ยง 4 สัปดาห์ ตรวจนับการรอดชีวิตของแคลลัส พบว่าการใช้ระยะเวลาการจุ่มแช่สารละลาย EMS เพิ่มขึ้นมีผลทำให้การรอดชีวิตลดลง ระยะเวลาการจุ่มแช่ 30, 60, 90 และ 120 นาที ให้ผลการรอดชีวิตของแคลลัสเป็น 39.00, 25.70, 13.00 และ 15.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4) แตกต่างกับชุดเปรียบเทียบ คือ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำการทดลองซ้ำพบว่าหลังจากวางเลี้ยง 5 สัปดาห์ ระยะเวลาการจุ่มแช่ 30 นาที ให้ผลการรอดชีวิตของแคลลัส 69.25 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกับชุดเปรียบเทียบซึ่งให้การรอดชีวิต 85.00 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างกับ 60, 90 และ 120 นาที ให้การรอดชีวิต 41.00, 14.50 และ 11.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นระยะเวลาในการจุ่มแช่ที่ยับยั้งการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชได้อย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 30 นาที (รูปที่ 6)

ตารางที่ 4 ผลของระยะเวลาการจุ่มแช่แคลลัสในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ต่อการรอดชีวิตของแคลลัส

ระยะเวลาการจุ่มแช่ EMS (นาที)	การรอดชีวิต (%)					
	สัปดาห์ที่ 4			สัปดาห์ที่ 5		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	100.00a	85.00a	92.50	100.00a	85.00a	92.50
30	39.00b	72.25b	55.63	38.50b	69.25a	53.63
60	25.70c	17.00c	21.35	18.67c	41.00b	29.84
90	13.00c	11.00c	12.00	13.00cd	14.50bc	13.75
120	15.00c	5.00c	10.00	13.00d	11.00c	12.00
C.V. (%)	17.73	21.81		16.36	40.22	

ค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P=0.05) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT



รูปที่ 6 ผลของระยะเวลาการจุ่มแช่แคลลัสด้วยสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ ต่อการรอดชีวิต

2. การศึกษาผลของความเข้มรังสีแกมมาต่อการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัส

หลังจากฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ กับแคลลัส และวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ตรวจนับการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัส พบว่า การใช้รังสีความเข้มสูงขึ้นมีผลทำให้การรอดชีวิตลดลง การใช้รังสีความเข้มต่ำ ๆ คือ 5 และ 10 เกรย์ ให้ผลการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัส 96.00 และ 93.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบ คือ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความเข้มรังสีสูงขึ้นเป็น 20 และ 40 เกรย์ การรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสลดลงเหลือ 84.20 และ 80.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ กับชุดเปรียบเทียบ และ 5 เกรย์ (ตารางที่ 5) เมื่อวางเลี้ยงต่อมาอีกสัปดาห์ (4 สัปดาห์) พบว่าการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสจากการฉายรังสีทุกระดับไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และมีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 3 เพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 5 และ รูปที่ 7)

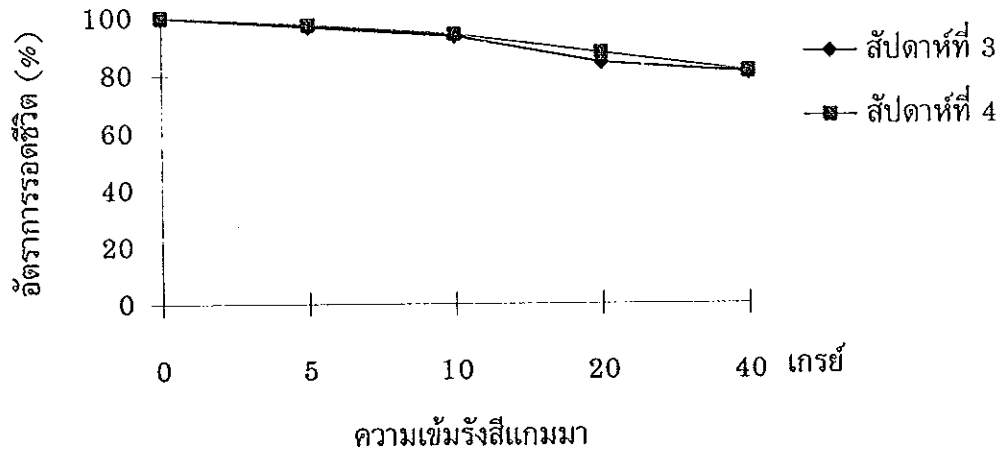
ตารางที่ 5 ผลของความเข้มรังสีแกมมาต่อการรอดชีวิตของแคลลัส

ความเข้มรังสี (เกรย์)	การรอดชีวิต (%)	
	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
0	100a	100
5	96.60a	97.40
10	93.40ab	94.2
20	84.20bc	87.60
40	80.80c	81.20
F-test	*	ns
C.V. (%)	9.78	12.3

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

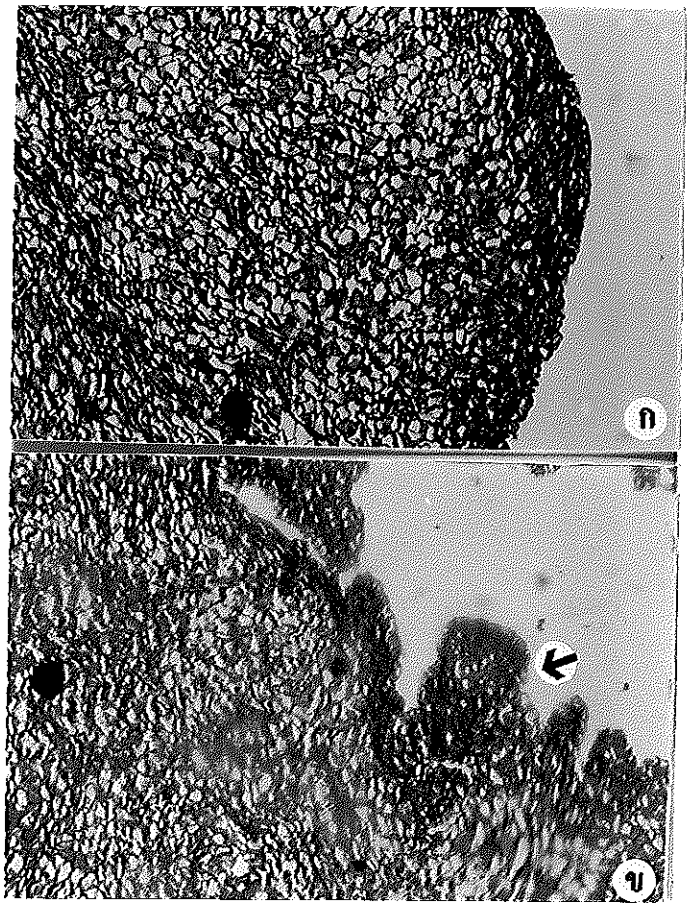
การรอดชีวิตที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT



รูปที่ 7 ผลของรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ ต่อการรอดชีวิตของแคลลัส

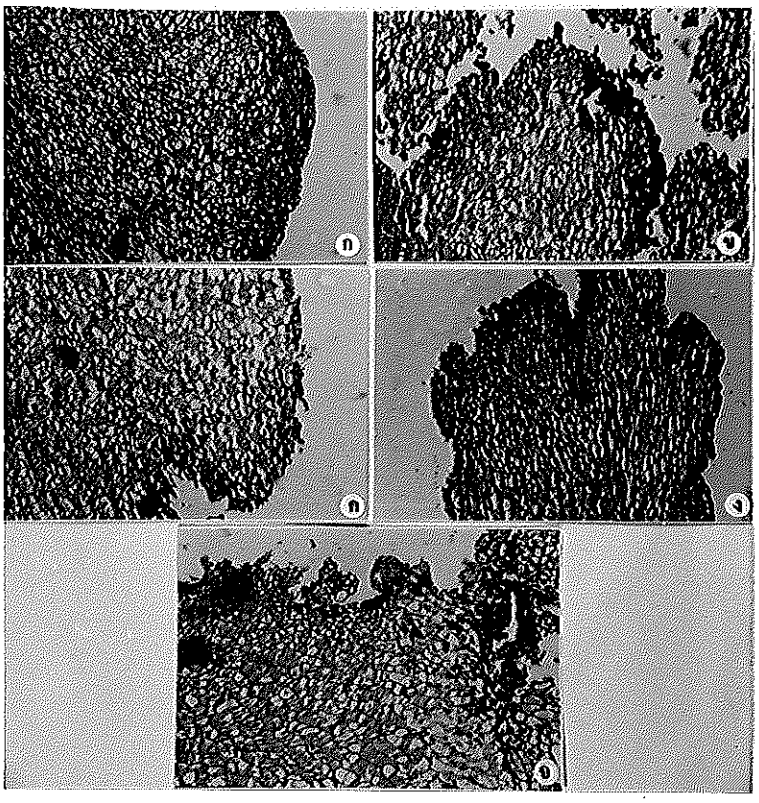
3. ผลของ EMS และ รังสีแกมมาต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อของ C_1 พบว่า เซลล์แต่ละเซลล์มีขนาดต่าง ๆ กัน มีรูปร่างคล้ายคลึงและเรียงตัวชิดกัน ภายในเซลล์ประกอบด้วยนิวเคลียสย้อมติดสีฟาสท์กรีนเข้ม อยู่ตรงกลางเซลล์ ไซโทพลาสซึมหนาแน่นติดสีฟาสท์กรีนเข้มข้น โดยเฉพาะบริเวณเซลล์อิพิเดอมีส และเซลล์ในชั้นซับอิพิเดอมีส (รูปที่ 8ก) และเซลล์ตรงบริเวณดังกล่าวมีการแบ่งตัวให้เซลล์จำนวนมาก มีการเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นเมอริสเต็มมอย หรือจุดกำเนิดยอดในระยะต่อมา (รูปที่ 8ข ศรชี้)



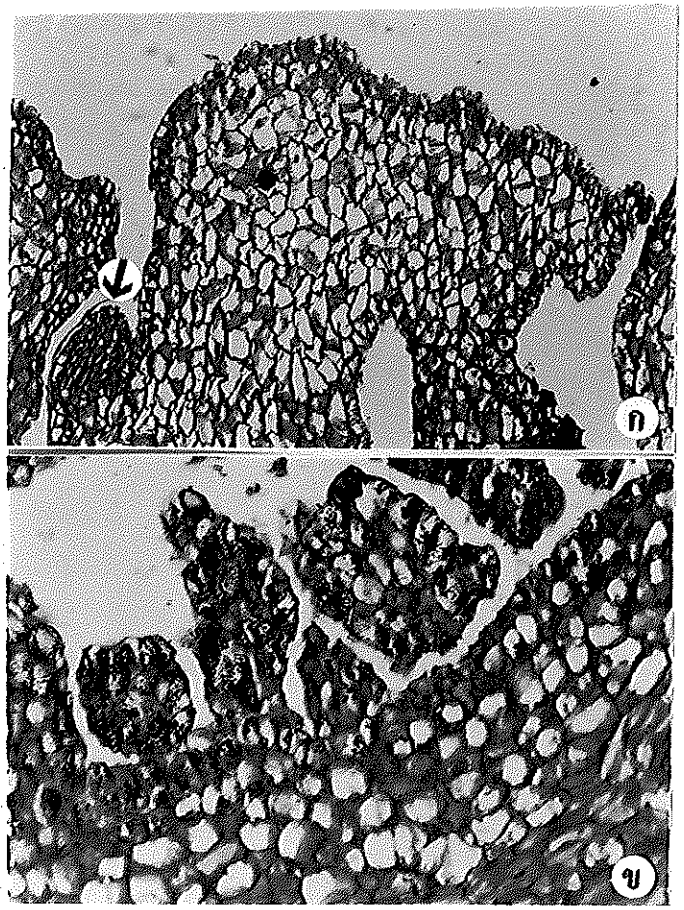
รูปที่ 8 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ C_1 (ก) (X100) และ การแบ่งตัวของเซลล์ (ข ศรชี้) (X100) หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 4 สัปดาห์

หลังจากนำ M_1C_1 ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ คือ 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ มาศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อ พบว่า หลังจากฉายรังสีทุกความเข้มรังสีบริเวณเซลล์อิพิเดอมีสมีลักษณะเป็นสีดำ ไม่พบองค์ประกอบของไซโทพลาสซึมภายในเซลล์ ไซโทพลาสซึมไม่ติดสีฟาสท์กรีน ส่วนเซลล์ที่ไม่เสียหายเนื่องจากรังสีเซลล์มีขนาดใหญ่กว่าชุดเปรียบเทียบ ภายในเซลล์มีไซโทพลาสซึมหนาแน่นน้อยกว่าและย้อมติดสีฟาสท์กรีนเข้มข้นน้อยกว่า C_1 (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ C_1 (ก) และ M_1C_1 ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา 5 (ข), 10 (ค), 20 (ง) และ 40 เกรย์ (จ) หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 4 สัปดาห์ (X100)

เซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากได้รับการฉายรังสีทุกความเข้มรังสีเมื่อวางเลี้ยงในอาหารสูตร WPM เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 4 สัปดาห์ จะมีการแบ่งเซลล์จำนวนมากและพัฒนาไปเป็นจุดกำเนิดยอด (รูปที่ 10ก ศรชี้) นอกจากนั้น M_1C_1 เซลล์ย้อมติดสีแซฟรานิน ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนสะสมภายในเซลล์มีลักษณะสีแดงเป็นเม็ดกลม เล็ก ๆ มากกว่าใน C_1(รูปที่ 10ข)

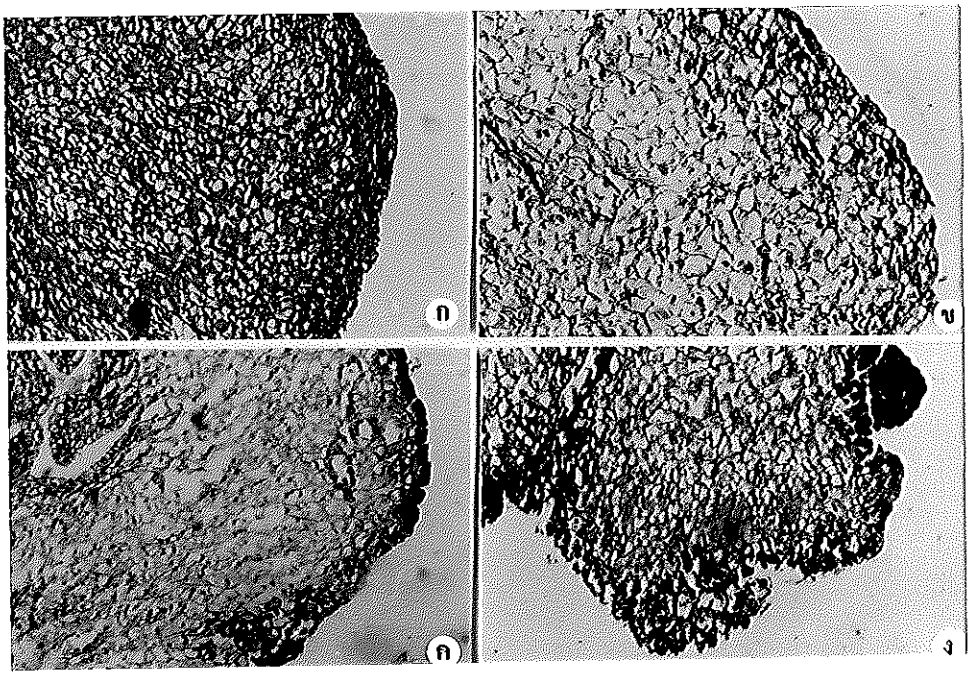


รูปที่ 10 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ M_1C_1 มีการแบ่งเซลล์และพัฒนาไปเป็นจุดกำเนิดยอด (ก ศรชี้) (X100) และ โปรตีนสะสมภายในเซลล์ของ M_1C_1 ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา 40 เกรย์ (ข) (X200) หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 4 สัปดาห์

หลังจากนำ $M_2R_1C_1$ ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา 40 เกรย์ มาศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อ พบว่าจำนวนชั้นของเซลล์อิพิเดอมีสเสียหายเนื่องจากได้รับรังสีรุนแรงมากกว่า M_1C_1 ที่ได้รับการฉายรังสีทุกความเข้มรังสี สังเกตุจากจำนวนชั้นของเซลล์อิพิเดอมีสที่ย้อมติดสีแซฟรานิน ซึ่งมีถึง 6 ชั้น นิวเคลียสติดสีเข้มข้นน้อย ความหนาแน่นของไซโทพลาสซึมต่ำ และติดสีเข้มข้นน้อยกว่าชุดเปรียบเทียบ และ M_1C_1 ที่ได้รับการฉายรังสีทุกความเข้มรังสี นอกจากนั้นเซลล์บางเซลล์มีผนังเซลล์ฉีกขาดและเซลล์มีขนาดใหญขึ้น ส่วนเซลล์ที่รอดชีวิตมีการแบ่งเซลล์และพัฒนาไปเป็นยอดได้เช่นเดียวกับชุดเปรียบเทียบ (รูปที่ 11ก และ ข)

หลังจากนำ $M_2R_1C_1$ ที่ได้รับการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที และ 60 นาที มาศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อ พบว่าจำนวนชั้นของเซลล์อิพิเดอมีสเกิดความเสียหายเนื่องจากได้รับ EMS น้อยกว่า $M_2R_1C_1$ ที่ได้รับรังสี (รูปที่ 11 ค) สังเกตุจากจำนวนชั้นของเซลล์อิพิเดอมีสย้อมติดสีแซฟรานินน้อยกว่า $M_2R_1C_1$ ที่ได้รับรังสี คือประมาณ 2 ชั้น แต่บริเวณเซลล์อิพิเดอมีสชั้นแรกของ $M_2R_1C_1$ ที่ได้รับ EMS มีความเสียหายรุนแรงมากกว่า โดยเซลล์บริเวณดังกล่าวตายมีลักษณะสีดำ ไซโทพลาสซึมถูกทำลายนิวเคลียสติดสีฟาสท์กรีนเข้มข้นน้อย ความหนาแน่นของไซโทพลาสซึม และติดสีฟาสท์กรีนน้อยกว่าชุดเปรียบเทียบ และ M_1C_1 ที่ได้รับรังสี และผนังเซลล์ฉีกขาด เช่นเดียวกับ $M_2R_1C_1$ ที่ได้รับรังสี (รูปที่ 11ข และ ค) ทำให้ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้จึงทำให้การรอดชีวิตของแคลลัสหลังจากได้รับ EMS น้อยกว่าการใช้รังสีเป็นไปทำนองเดียวกับการศึกษาผลของ EMS และรังสีแกมมาต่อการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัส

หลังจากนำ $M_2R_1C_1$ ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา 40 เกรย์ และจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที มาศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อ พบว่าบริเวณเซลล์อิพิเดอมีสมีความเสียหายรุนแรงมากกว่า $M_2R_1C_1$ ที่ได้รับรังสีและ $M_2R_1C_1$ ที่ได้รับ EMS โดยสังเกตจากบริเวณเซลล์อิพิเดอมีสมีลักษณะสีดำหลายชั้น และไซโทพลาสซึมถูกทำลายทำให้ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ นิวเคลียสติดสีฟาสท์กรีนเข้มข้นน้อย ความหนาแน่นของไซโทพลาสซึม และติดสีฟาสท์กรีนน้อยกว่าชุดเปรียบเทียบ และ M_1C_1 ที่ได้รับรังสี และผนังเซลล์ฉีกขาด เช่นเดียวกับ $M_2R_1C_1$ ที่ได้รับรังสี (รูปที่ 11ค และ ง)



รูปที่ 11 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ $M_2R_1C_1$ ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาและ EMS

ก. ชุดเปรียบเทียบ (X100)

ข. $M_2R_1C_1$ ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา 40 เกรย์ (X100)

ค. $M_2R_1C_1$ ซึ่งผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที และ 60 นาที (X100)

ง. $M_2R_1C_1$ ซึ่งผ่านการฉายรังสีแกมมา 40 เกรย์ และจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที (X100)

4. ผลของ EMS และ รังสีแกมมาต่อรูปแบบของเอนไซม์

4.1. การศึกษาระบบเอนไซม์ที่เหมาะสม

จากการศึกษาเอนไซม์ 5 ระบบ ที่สกัดจากใบของ M_1R_1 และ แคลลัส $M_1R_1C_1$ จากหน่วยทดลองที่ได้รับรังสีแกมมา 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ พบว่า ทุกความเข้มรังสีให้รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ชัดเจนที่สุด เอนไซม์เอสเตอเรสให้ผลไม่ชัดเจนและแถบติดกันเป็นปื้นยาว ส่วนเอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนส สามารถจำแนกความแตกต่างได้แต่ไม่ชัดเจน สำหรับเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส สามารถจำแนกความแตกต่างเฉพาะ $M_1R_1C_1$ ได้แต่ไม่ชัดเจนในขณะที่การใช้เอนไซม์ดังกล่าวในการตรวจสอบ M_1R_1 ย้อมไม่ติดสี ทุกความเข้มรังสี (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 รูปแบบไอโซไซม์จากใบของต้น M_1R_1 และ $M_1R_1C_1$ หลังจากการฉายรังสีแกมมา 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์

หน่วยทดลอง	ระบบเอนไซม์				
(-เกรย์)	PER	EST	MDH	ADH	PGI
R_1	+A	+B	+	-	-
M_1R_1-5	+A	+B	+	-	-
M_1R_1-10	+A	+B	+	-	-
M_1R_1-20	+A	+B	+	-	-
M_1R_1-40	+A	+B	+	-	-
C_1	+A	+B	+	+	+
$M_1R_1C_1$-5	+A	+B	+	+	+
$M_1R_1C_1$-10	+A	+B	+	+	+
$M_1R_1C_1$-20	+A	+B	+	+	+
$M_1R_1C_1$-40	+A	+B	+	+	+

PER : เปอร์ออกซิเดส
EST : เอสเตอเรส
MDH : มาเลทดีไฮโดรจีเนส
ADH : อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส
PGI : ฟอสโฟกลูโคไอโมอเรส

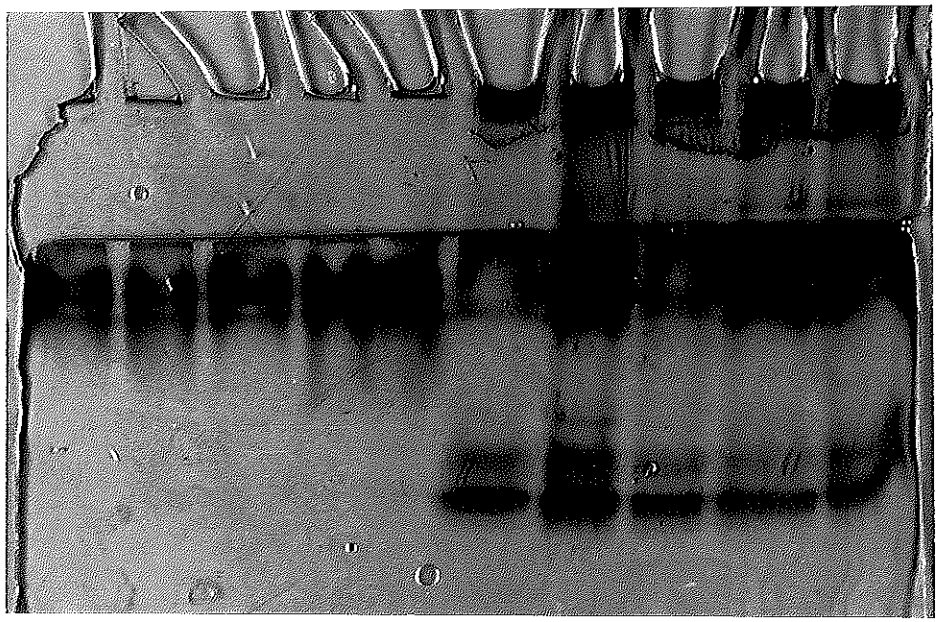
+ : ติดสี M_1R_1 : ต้นกลายพันธุ์ชั่วที่ 1
- : ไม่ติดสี $M_1R_1C_1$: แคลลัสจากต้นกลายพันธุ์ชั่วที่ 1
A : คมชัด R_1 : ใบชุดเปรียบเทียบ
B : เป็นปื้น C_1 : แคลลัสชุดเปรียบเทียบ

เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบไอโซไซม์ ของต้น M_1R_1 และ $M_1R_1C_1$ สามารถแยกรูปแบบ ของ ไอโซไซม์ได้ดังนี้

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

รูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบ M_1R_1 มีการเคลื่อนที่ของไซโมแกรมเพียง โซน เดียว (โซน 1) เมื่อพิจารณาไซโมแกรมภายใน โซน ทุกความเข้มรังสีให้รูปแบบไซโมแกรม 3 แถบ เมื่อพิจารณาความเข้มของแถบเอนไซม์ พบว่าต้นที่ได้รับรังสี 10 และ 20 เกรย์ มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าโดยสังเกตุจากความเข้มของไซโมแกรมที่ปรากฏ (รูปที่ 12)

รูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากแคลลัส $M_1R_1C_1$ มีการเคลื่อนที่ของไซโมแกรม 2 โซน (โซน 1 และ 2) โดยให้ไซโมแกรมที่มีการเคลื่อนที่ช้าเป็น โซน 1 และไซโมแกรมที่มีการเคลื่อนที่ได้เร็วเป็น โซน 2 เมื่อพิจารณาไซโมแกรมภายใน โซน 1 พบว่าสามารถแยกได้ 2 แถบ ทุกความเข้มรังสี แต่ชุดเปรียบเทียบ และ 10 เกรย์ ติดสีไม่ชัดเจน ส่วนความเข้มรังสี 5, 20 และ 40 เกรย์ แถบติดสีคมชัด เมื่อพิจารณาไซโมแกรมภายใน โซน 2 พบว่ารังสีความเข้ม 5 เกรย์ แยกได้ 3 แถบ ในขณะที่ชุดเปรียบเทียบ ความเข้มรังสี 10, 20 และ 40 เกรย์ แยกได้ 2 แถบ (รูปที่ 12) รังสี 5 เกรย์ ให้แถบเอนไซม์ใน โซน ที่ 2 มากกว่า 1 แถบ (ศรชี้)

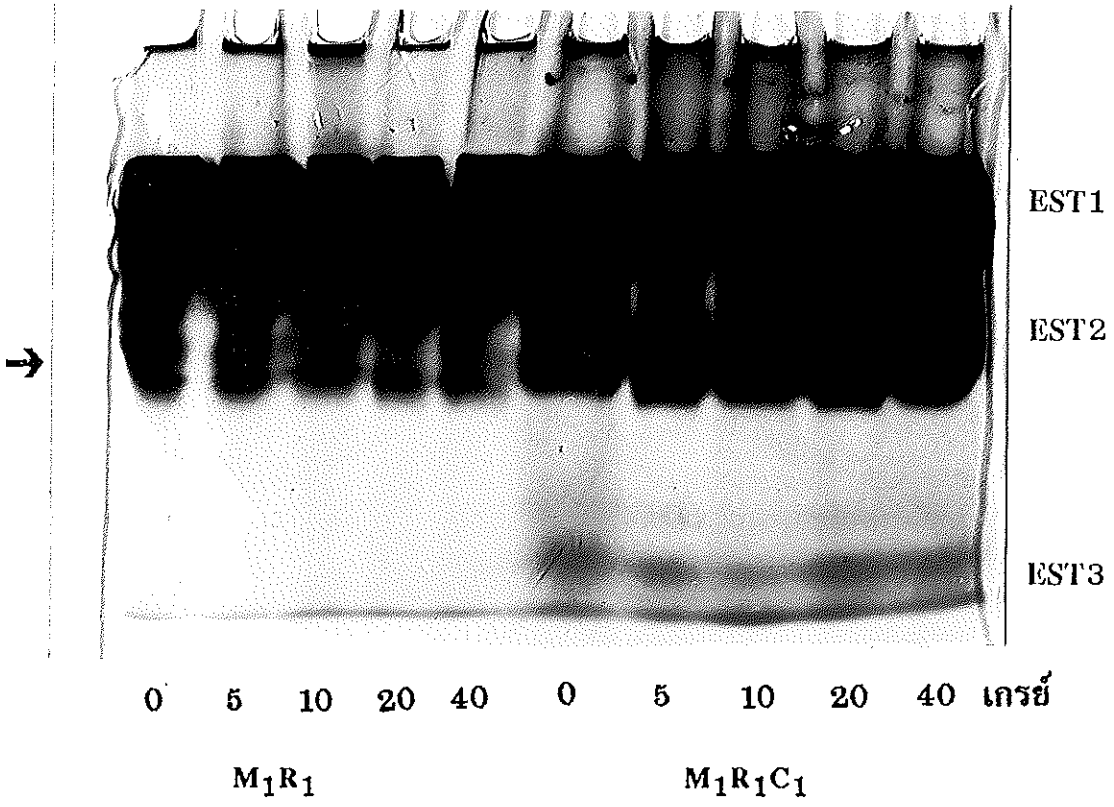


รูปที่ 12 รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบ (M_1R_1) และ แคลลัส ($M_1R_1C_1$) ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์

เอสเตอเรส

รูปแบบของเอนไซม์เอสเตอเรสจากใบ M_1R_1 สามารถแยกไซโมแกรมได้ 2 โซน เมื่อพิจารณาภายใน โซน 1 พบว่าแถบแรกทุกความเข้มรังสีเป็นปื้นยาว เมื่อพิจารณา โซน 2 ชุดเปรียบเทียบ และความเข้มรังสี 5 เกรย์ สามารถแยกได้ 2 แถบ ชัดเจน ส่วน 10, 20 และ 40 เกรย์ แยกได้แถบเดียว (รูปที่ 13 ศรชี้)

รูปแบบของเอนไซม์เอสเตอเรสจากแคลลัส $M_1R_1C_1$ สามารถแยกไซโมแกรมได้ 3 โซน เมื่อพิจารณาภายใน โซน 1 และ 2 พบว่าชุดเปรียบเทียบ ความเข้มรังสี 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ มีแถบเดียวและแถบติดกันเป็นปื้นยาวไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ส่วนใน โซน 3 ทุกความเข้มรังสีไม่มีความแตกต่างกันและแถบติดสีจางลง (รูปที่ 13)

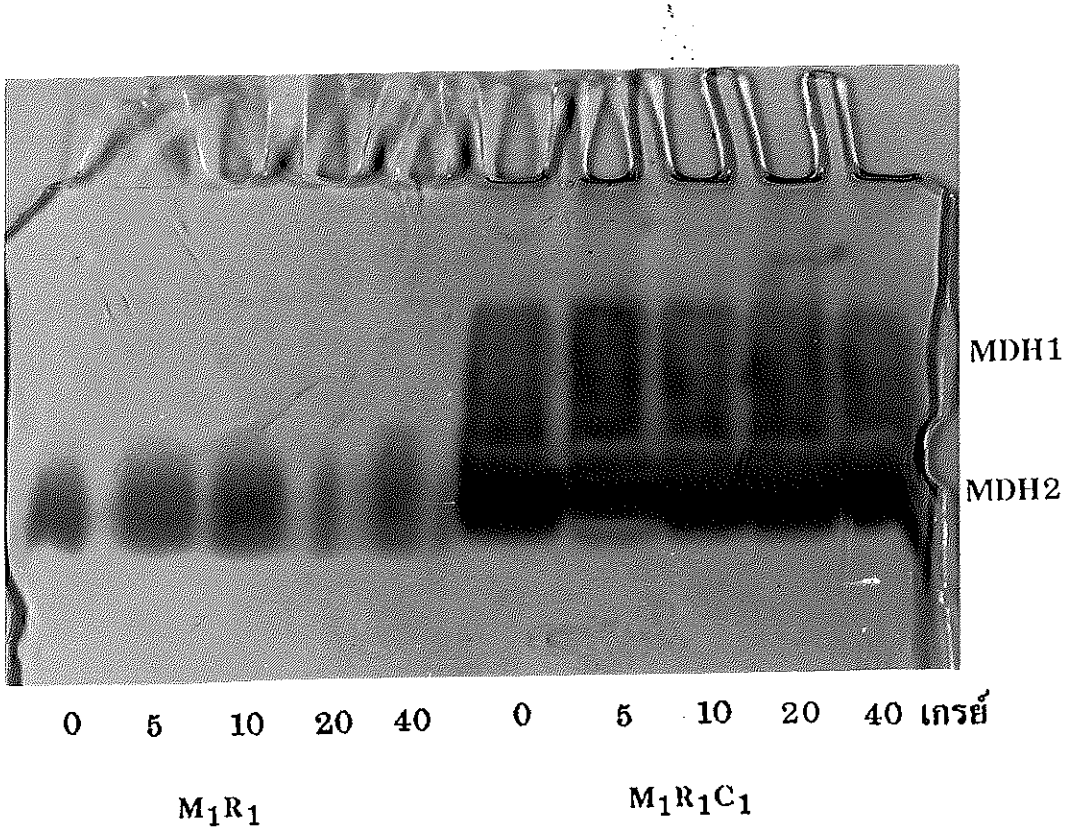


รูปที่ 13 รูปแบบเอนไซม์เอสเตอเรสจากใบ (M_1R_1) และ แคลลัส ($M_1R_1C_1$) ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์

มาเลทดีไฮโดรจีเนส

รูปแบบของเอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนสจากใบ M_1R_1 สามารถแยกไซโมแกรมได้เพียง โซน เดียวเมื่อ (โซน 2) พิจารณาไซโมแกรมพบว่าติดสีจางเป็นปื้นยาว ไม่สามารถแบ่งเป็นแถบได้ชัดเจนระหว่างชุดเปรียบเทียบและทุกความเข้มรังสี (รูปที่ 14)

รูปแบบของเอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนสจากแคลลัส $M_1R_1C_1$ สามารถแยกไซโมแกรมได้ 2 โซน เมื่อพิจารณาไซโมแกรม พบว่าทุกความเข้มรังสีติดสีจางเป็นปื้นยาว ทั้ง 2 โซน โดย โซน 1 มีความยาวของแถบมากกว่า โซน 2 อย่างไรก็ตามไม่สามารถแยกความแตกต่างของแถบได้ชัดเจน (รูปที่ 14)

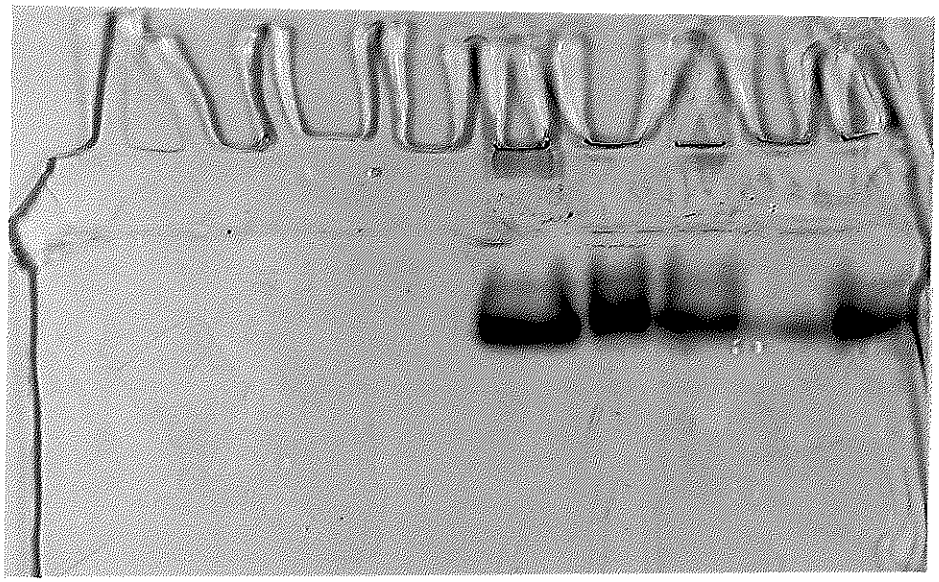


รูปที่ 14 รูปแบบเอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนสจากใบ (M_1R_1) และ แคลลัส ($M_1R_1C_1$) ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์

แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

ระบบของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากใบ M_1R_1 ย้อมเจลไม่ติดสีทุกความเข้มรังสี (รูปที่ 15)

รูปแบบของเอนไซม์แอกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากแคลลัส $M_1R_1C_1$ สามารถแยกไซโมแกรมได้เพียง โซน เดียว เมื่อพิจารณาไซโมแกรมพบว่า ชุดเปรียบเทียบ ความเข้มรังสี 5, 10 และ 40 เกรย์ แยกได้ 2 แถบโดยแถบที่ 2 ย้อมติดสีชัดกว่าแถบแรก ส่วน 20 เกรย์ แยกได้เพียงแถบเดียว และติดสีจาง (รูปที่ 15 ศรชี้)



รูปที่ 15 รูปแบบเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากใบ (M_1R_1) และ แคลลัส ($M_1R_1C_1$) ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์

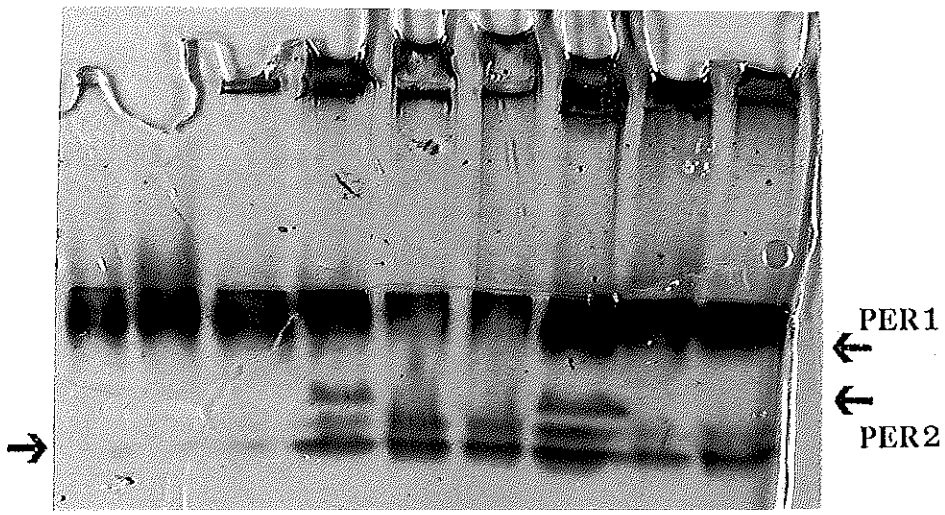
ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส

ระบบเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรสจากใบ M_1R_1 ย้อมเจลไม่ติดสีทุกความเข้มรังสี ในกรณีของเอนไซม์จากแคลลัส $M_1R_1C_1$ ย้อมเจลติดสี แต่จางมากไม่สามารถแยกรูปแบบของไซโมแกรมได้ทุกความเข้มรังสี

4.2. การศึกษาบัฟเฟอร์และชิ้นส่วนพืชที่ใช้สกัดเอนไซม์

จากการใช้บัฟเฟอร์ 3 ชนิดที่แตกต่างกัน สกัดแยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากชิ้นส่วนพืช 3 ชนิด คือ R_1, C_1 และ $M_1R_1C_1$-20 พบว่า บัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด ร่วมด้วยองค์ประกอบต่าง ๆ ระดับความเข้มข้นเดียวกันให้รูปแบบของเอนไซม์ชัดเจนไม่แตกต่างกันทุกชิ้นส่วนที่ใช้ทดสอบ แต่เมื่อพิจารณารูปแบบเอนไซม์ บัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิดให้ไซโมแกรมเป็น 2 โซน โดย ไซโมแกรมของใบ R_1 ใน โซน 2 ให้แถบเดียวและจางแต่ความคมชัดของไซโมแกรมที่สกัดจากบัฟเฟอร์ชนิดที่ 3 ชัดกว่าการใช้บัฟเฟอร์ชนิดอื่น ๆ ในกรณีของแคลลัสจาก C_1 และ $M_1R_1C_1$-20 คือ บัฟเฟอร์ชนิดที่ 1 ซึ่งให้ไซโมแกรมใน โซน 2 3แถบในขณะที่ บัฟเฟอร์ชนิดอื่น ๆ ให้ไซโมแกรมเพียง 2 แถบ แต่จากการเปรียบเทียบรูปแบบเอนไซม์นี้ ระหว่าง C_1 และ $M_1R_1C_1$-20 พบว่า บัฟเฟอร์ชนิดที่ 2 และ 3 สามารถจำแนกความแตกต่างของรูปแบบเอนไซม์ได้ดีในขณะที่บัฟเฟอร์ชนิดที่ 1 ให้รูปแบบเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 16 ศรชี้) ดังนั้นจึงใช้บัฟเฟอร์ชนิดที่ 3 สำหรับสกัดเอนไซม์เพื่อศึกษาต่อไป

จากการเปรียบเทียบรูปแบบเอนไซม์นี้ ระหว่างใบจาก R_1 แคลลัสจาก C_1 และแคลลัสจาก $M_1R_1C_1$-20 ที่สกัดโดยใช้บัฟเฟอร์ชนิดที่ 3 พบว่าใบและและแคลลัสทั้ง 2 ชนิด ให้รูปแบบของเอนไซม์แตกต่างกัน โดยใบให้ไซโมแกรมใน โซน 2 แถบเดียวและจาง แต่ในแคลลัสให้ไซโมแกรม 2 แถบและคมชัด (รูปที่ 16 ศรชี้)



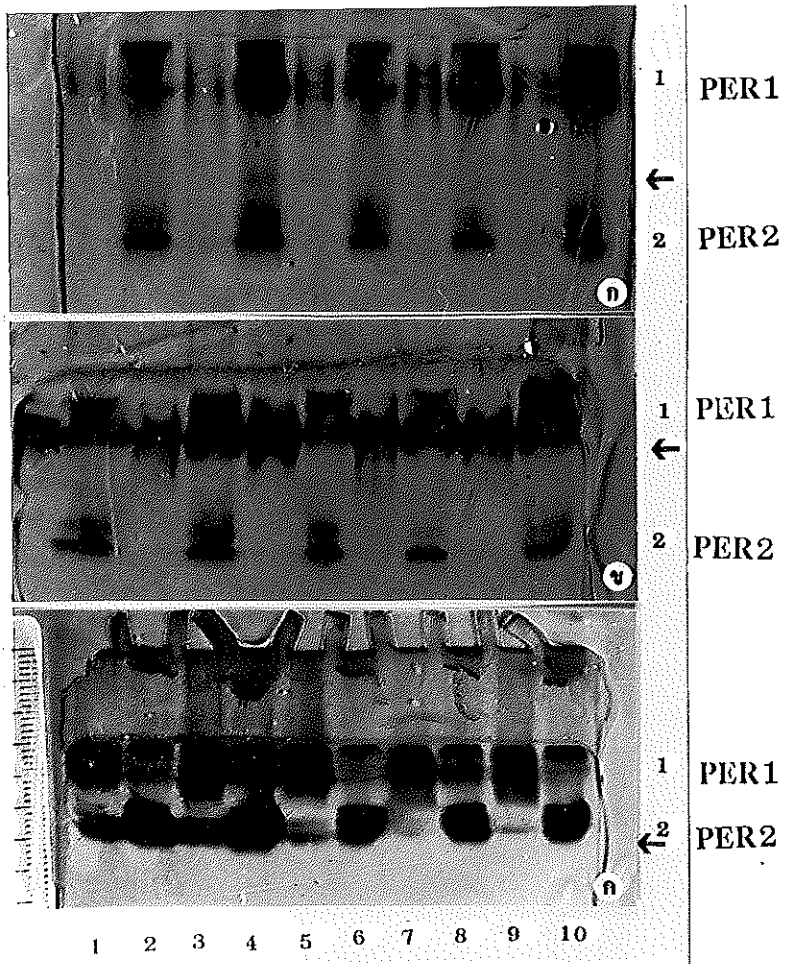
รูปที่ 16 รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบและแคลลัสชุดเปรียบเทียบ และแคลลัสที่ชักนำจากใบ M_1R_1 ซึ่งสกัดด้วยบัฟเฟอร์ 3 ชนิด (B1 = ชนิดที่ 1, B2 = ชนิดที่ 2 และ B3 = ชนิดที่ 3)

4.3. การศึกษาความเข้มข้นของเจลอะคริลาไมด์

การนำใบจากต้น M_1R_1 และ แคลลัส $M_1R_1C_1$ มาสกัดด้วยบัฟเฟอร์สกัดชนิดที่ 3 นำมาแยกเอนไซม์บนเจลอะคริลาไมด์ความเข้มข้นแตกต่างกันและย้อมด้วยสีย้อมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พบว่าอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 7, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ แยกไซโมแกรมได้คมชัดแตกต่างกัน (รูปที่ 17) โดยความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซ็นต์ แยกได้คมชัดที่สุด รองลงมา 7 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณารูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบจากต้น M_1R_1 และ แคลลัส $M_1R_1C_1$ หลังจากแยกเอนไซม์โดยใช้เจลอะคริลาไมด์ความเข้มข้นต่างกันให้ผลดังนี้ คือ

ความเข้มข้นเจล 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ แยกไซโมแกรม M_1R_1 ให้เพียง โซน เดียว เมื่อพิจารณาไซโมแกรมใน โซน พบว่าความเข้มข้นเจล 7 เปอร์เซ็นต์ แยกแถบได้ 3 แถบ ทุกความเข้มรังสีแต่ต้นที่ได้รับรังสี 10, 20 และ 40 เกรย์ มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าโดยสังเกตจากความเข้มของไซโมแกรมที่ปรากฏ ส่วนชุดเปรียบเทียบย้อมสีติดไม่คมชัด ไม่สามารถแยกแถบได้ชัดเจน (รูปที่ 17ก) เมื่อใช้ความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าชุดเปรียบเทียบแยกได้ 3 แถบส่วนความเข้มรังสี 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ แยกได้ 4 แถบ แต่ความเข้มรังสี 10 เกรย์ มีแถบที่ 4 คมชัดกว่าความเข้มรังสี 5, 20 และ 40 เกรย์ (รูปที่ 17ข ศรชี้) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเจลเป็น 12 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นเจล 12 เปอร์เซ็นต์ แยกไซโมแกรมได้ 2 โซน เมื่อพิจารณาไซโมแกรม โซน 1 พบว่า ต้นที่ได้รับรังสี 10, 20 และ 40 เกรย์ แยกไซโมแกรมได้ 3 แถบ ไม่แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบและความเข้มรังสี 5 เกรย์ แต่ต้นที่ได้รับรังสี 10, 20 และ 40 เกรย์ มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า โดยสังเกตจากความเข้มของไซโมแกรมที่ปรากฏ เมื่อพิจารณาไซโมแกรม โซน 2 พบว่าชุดเปรียบเทียบแยกแถบได้ 3 แถบ ส่วน 5, 10 และ 20 เกรย์ แยกได้ 2 แถบ แต่ 40 เกรย์ แยกได้แถบเดียว (รูปที่ 17ค ศรชี้)

$M_1R_1C_1$ ความเข้มข้นเจล 7, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ แยกไซโมแกรมได้ 2 โซน เมื่อพิจารณาไซโมแกรมใน โซน 1 พบว่าแยกได้ 2 แถบทุกความเข้มรังสี แต่ความเข้มรังสี 5 เกรย์ แถบที่ 2 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าความเข้มรังสีอื่น ๆ เมื่อพิจารณา โซน 2 พบว่าการใช้ความเข้มข้นของเจล 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ การใช้รังสีความเข้ม 5 เกรย์ แยกไซโมแกรมได้ 3 แถบ (รูปที่ 17ก ศรชี้) ส่วนชุดเปรียบเทียบ 10, 20 และ 40 เกรย์ แยกได้ 2 แถบ (รูปที่ 17ก) แต่ความเข้มข้นเจล 12 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแยกได้ 3 แถบ และสีย้อมติดคมชัดทุกความเข้มรังสี โดยเฉพาะความเข้มรังสี 5 เกรย์ (รูปที่ 17ค)



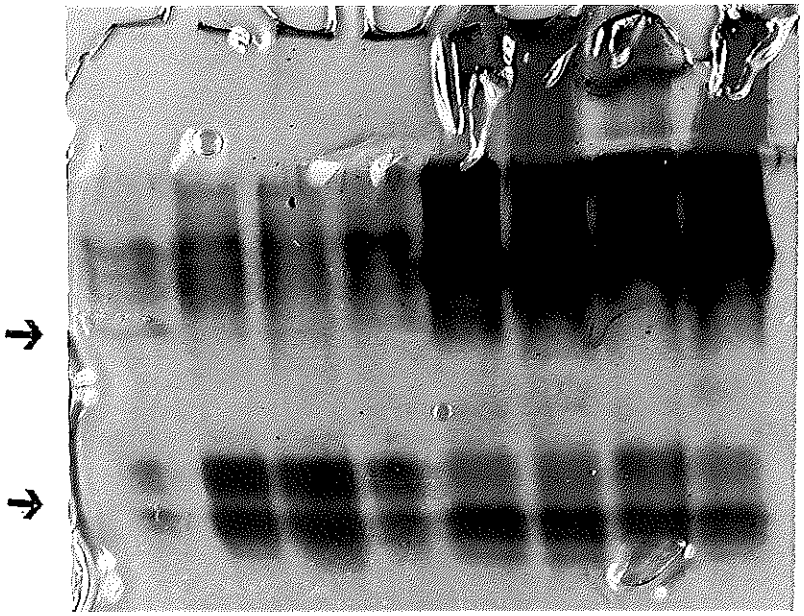
รูปที่ 17 รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบ M_1R_1 (เลนคี่) และ แคลลัส $M_1R_1C_1$ (เลนคู่) หลังจากฉายรังสีแกมมา 0, 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ตามลำดับ ทำการแยกเอนไซม์บนเจลเข้มข้น 7 (ก), 10 (ข) และ 12 (ค) เปอร์เซ็นต์

4.4 ผลของ EMS ต่อรูปแบบของไอโซไซม์

จากการศึกษารูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของ M_1R_1 และ $M_1R_1C_1$ จากหน่วยทดลองที่ผ่านการจุ่มแช่ สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า มีความแตกต่างจากชุดเปรียบเทียบ โดยไซโมแกรมที่แยกได้ เป็น 2 โซน สามารถพิจารณาแถบเอนไซม์แต่ละ โซน ได้ดังนี้

รูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของต้น M_1R_1 เมื่อพิจาราณาไซโมแกรมใน โซน 1 พบว่าชุดเปรียบเทียบและต้นที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งได้รับ EMS ความเข้มข้น 1.00 เปอร์เซ็นต์ ให้ไซโมแกรม 4 แถบ ส่วนความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ ให้ไซโมแกรม 3 แถบ แต่ต้นที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งได้รับ EMS ทุกความเข้มข้นมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าชุดเปรียบเทียบ โดยสังเกตจากความเข้มของไซโมแกรมที่ปรากฏ (รูปที่ 18 ศรชี้) เมื่อพิจารณาไซโมแกรมใน โซน 2 พบว่าชุดเปรียบเทียบ และต้นที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งได้รับการจุ่มแช่สารละลาย EMS ทุกความเข้มข้นให้ไซโมแกรม 2 แถบ แต่ละแถบติดกันเป็นปื้น แต่ต้นที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งได้รับ EMS ทุกความเข้มข้นมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า โดยสังเกตจากความเข้มของไซโมแกรมที่ปรากฏ (รูปที่ 18 ศรชี้)

รูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของ $M_1R_1C_1$ เมื่อพิจารณาไซโมแกรมใน โซน 1 พบว่าชุดเปรียบเทียบและต้นที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งได้รับ EMS ทุกความเข้มข้นให้ไซโมแกรม 2 แถบ แต่ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ แถบที่ 2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่าชุดเปรียบเทียบและการใช้ EMS ทุกความเข้มข้น (รูปที่ 18 ศรชี้) เมื่อพิจารณาไซโมแกรมใน โซน 2 พบว่า ชุดเปรียบเทียบและต้นที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งได้รับ EMS ทุกความเข้มข้น ให้ไซโมแกรม 4 แถบ โดยแถบที่ 1 ติดกันเป็นปื้น และแถบที่ 2 และ แถบที่ 3 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าแถบที่ 4 (รูปที่ 18)



รูปที่ 18 รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบ (M_1R_1) และ แคลลัส ($M_1R_1C_1$) หลังจากจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 120 นาที

5. ผลของ EMS และรังสีแกมมาต่อลักษณะทางสัณฐาน

5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้น M_1R_1 จากหน่วยทดลองที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS

จากการนำต้นกลายพันธุ์ชั่วที่ 1 ที่ได้หลังจากชักนำรากเป็นระยะเวลา 1 เดือน มาศึกษาการชักนำราก จำนวนข้อเฉลี่ยและความสูงเฉลี่ย พบว่า การใช้สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้มีจำนวนรากเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ย จำนวนข้อเฉลี่ย ความสูงเฉลี่ย และ เปอร์เซ็นต์การเกิดราก ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ คือ (ตารางที่ 7 รูปที่ 19)

จำนวนรากเฉลี่ย ต้นที่ได้หลังจากจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 1.00 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนการเกิดรากเฉลี่ยมากที่สุด คือ 1.25 ราก รองลงมาเป็นชุดเปรียบเทียบ 0.50 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ คือ 1.15, 1.09 และ 1.00 ราก ตามลำดับ

ความยาวรากเฉลี่ย ต้นที่ได้จากชุดเปรียบเทียบมีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด คือ 1.04เซ็นติเมตร รองลงมาเป็นความเข้มข้น 0.25, 0.50 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ความยาวรากเฉลี่ย 0.99, 0.88 และ 0.86 เซ็นติเมตร ตามลำดับ

เปอร์เซ็นต์การเกิดราก ต้นที่ได้หลังจากจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 1.00 เปอร์เซ็นต์ ให้การสร้างรากมากที่สุด 80 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็น ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ ชุดเปรียบเทียบ และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ให้การสร้างราก 54, 50 และ 46.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 19)

จำนวนข้อเฉลี่ย ต้นที่ได้หลังจากจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 1.00 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนข้อเฉลี่ยมากที่สุด คือ 2.63 ข้อ รองลงมาเป็นความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ ชุดเปรียบเทียบ และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ คือ 2.34, 2.07 และ 2.04 ข้อ ตามลำดับ

ความสูงเฉลี่ย การใช้สารละลาย EMS 1.00 เปอร์เซ็นต์ ให้ความสูงเฉลี่ยมากที่สุด คือ 1.13 เซ็นติเมตร รองลงมาเป็น 0.25 ชุดเปรียบเทียบ และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ คือ 0.89, 0.86 และ 0.81 เซ็นติเมตร ตามลำดับ

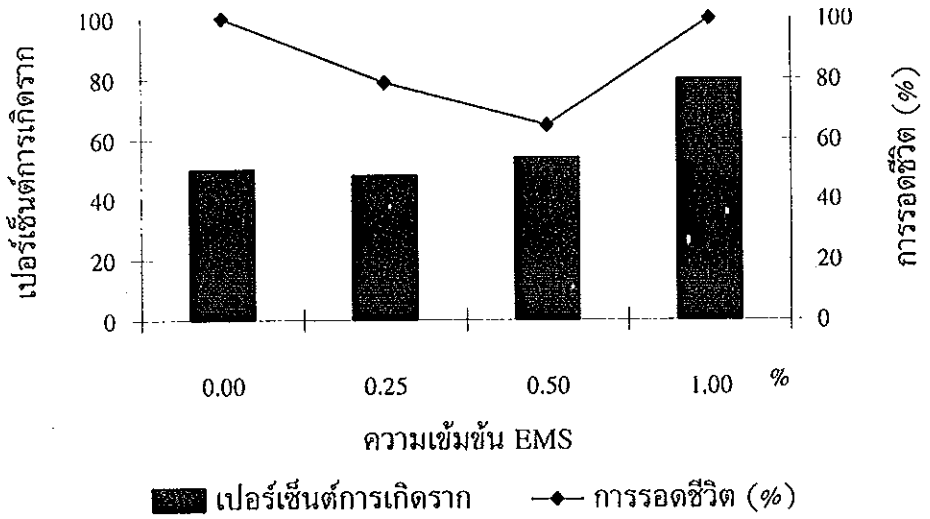
EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนข้อเฉลี่ยมากกว่าชุดเปรียบเทียบ และ EMS ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีของความสูงเฉลี่ยของต้น พบว่า EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ ให้ความสูงน้อยกว่าชุดเปรียบเทียบ และความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้น M_1R_1 หลังจากการจุ่มแช่แคลลัสในสารละลายEMS

ความเข้มข้น (%)	จ.น.รากเฉลี่ย (ราก)	ความยาวรากเฉลี่ย (ซม.)	จ.น.ข้อเฉลี่ย (ข้อ)	ความสูงเฉลี่ย (ซม.)
0	1.1	1.04	2.07	0.89
0.25	1.0	0.99	2.05	0.89
0.50	1.09	0.88	2.32	0.81
1.00	1.25	0.86	2.63	1.13
F-test	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	15.13	50.95	21.06	36.80

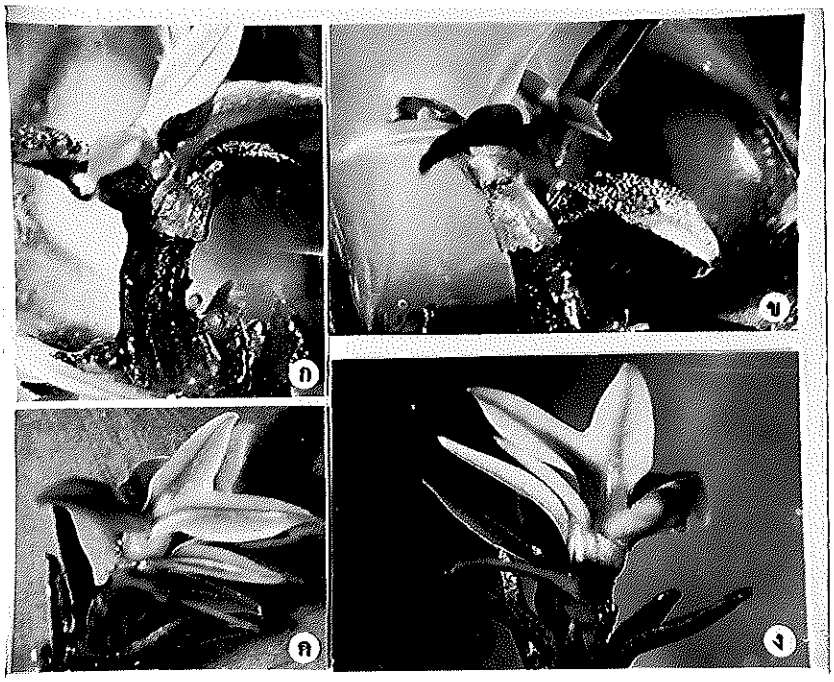
ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

หลังจากนำต้นกล้าชั่วที่ 1 ย้ายปลูกเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าต้นที่พัฒนาจากแคลลัสที่ได้จากการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 1.00 เปอร์เซ็นต์ ให้การรอดชีวิตสูงที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นชุดเปรียบเทียบ 0.25 และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ คือ 89.29, 78.92 และ 64.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 19)



รูปที่ 19 ผลของ EMS ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดราก และ การรอดชีวิตหลังย้ายปลูก 3 สัปดาห์

นอกจากนี้ลักษณะผิดปกติทางสัณฐานที่พบเห็น คือ มีลำต้นอวบอ้วน และเกิดกิ่งแขนง เกิดมังคุดสามใบ และมีการจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ (รูปที่ 20)



รูปที่ 20 ลักษณะผิดปกติทางสัณฐานของต้น M_1R_1 ที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งได้รับการจุ่มแช่สารละลาย EMS

ก.และ ข. ลำต้นอวบอ้วน และเกิดกิ่งแขนง

ค. และ ง. มังคุดสามใบ และมีการจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ

5.2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้น M_1R_1 หลังจากฉายรังสีแกมมา

นำต้นที่ได้หลังจากชักนำรากเป็นระยะเวลา 1 เดือน มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานของต้น พบว่า ต้นที่ได้รับจากการฉายรังสีความเข้มต่าง ๆ คือ 5, 10, 20 และ 40 เกรย์ มีจำนวนรากเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ย จำนวนข้อเฉลี่ย และ เปอร์เซ็นต์การเกิดราก (รูปที่ 21) สูงกว่าชุดเปรียบเทียบ (ตารางที่ 8) ส่วนความสูงเฉลี่ยนั้น พบว่าการใช้ความเข้มรังสี 5 เกรย์ ให้ความสูงเฉลี่ย 1.09 เซ็นติเมตร สูงกว่าชุดเปรียบเทียบ ซึ่งสูงเพียง 0.89 เซ็นติเมตร ในขณะที่การใช้รังสีความเข้มสูงขึ้นเป็น 10, 20 และ 40 เกรย์ ให้ความสูงเฉลี่ย 0.70, 0.80 และ 0.68 เซ็นติเมตร ตามลำดับ น้อยกว่าชุดเปรียบเทียบ (ตารางที่ 8) หลังจากนำต้นกล้าย้ายปลูก 3 สัปดาห์ พบว่าการรอดชีวิตของชุดเปรียบเทียบสูงที่สุด คือ 89.29 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ 10, 5, 40 และ 20 เกรย์ ซึ่งให้อัตรารอดชีวิต 25, 23.53, 21.05 และ 15.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 21)

ตารางที่ 8. ลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้น M_1R_1 หลังจากฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ

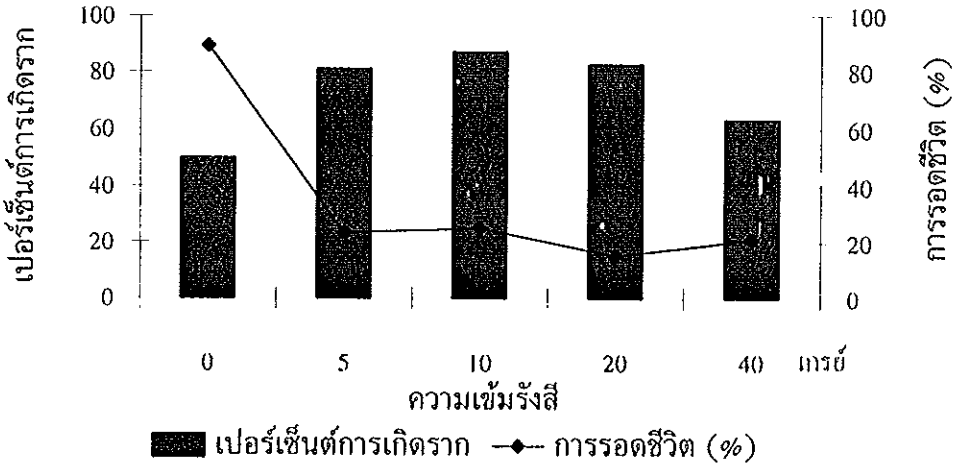
ความเข้มรังสี (เกรย์)	จ.น.รากเฉลี่ย (ราก)	ความยาวรากเฉลี่ย (ซม.)	จ.น.ข้อเฉลี่ย (ข้อ)	ความสูงเฉลี่ย (ซม.)
0	1.1	1.04b	2.07b	0.89b
5	1.12	2.67a	3.10a	1.09a
10	1.20	2.99a	2.20b	0.70b
20	1.12	1.79ab	2.55ab	0.80b
40	1.11	2.15ab	2.74ab	0.68b
F-test	ns	*	**	**
C.V. (%)	14.92	36.96	14.51	11.04

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P=0.01)

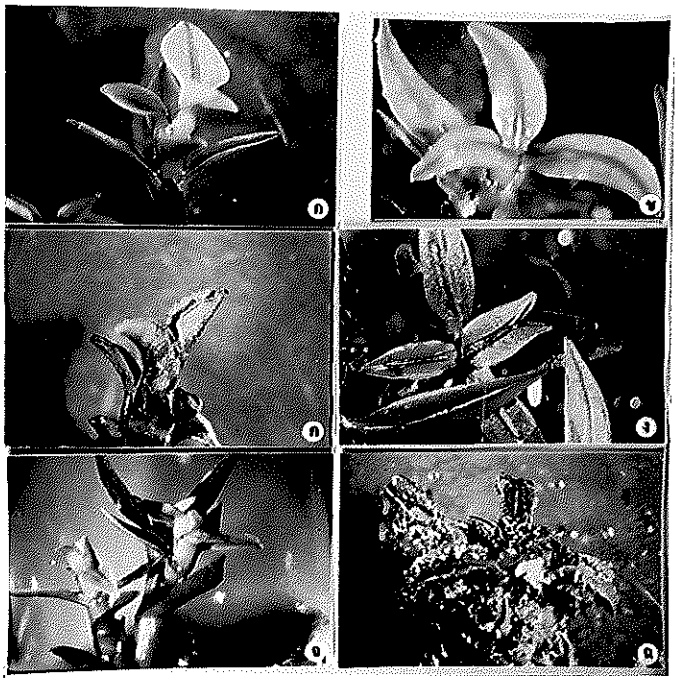
ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

การรอดชีวิตที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT



รูปที่ 21 ผลของรังสีแกมมาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดราก และการรอดชีวิตหลังย้ายปลูก 3 สัปดาห์

นอกจากนั้นลักษณะผิดปกติทางสัณฐานที่พบเห็น คือ ลักษณะปลายใบเป็นสองแฉก ขอบใบมีรอยหยัก การจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ เกิดมังคุดสามใบ และเกิดกิ่งแขนง (รูปที่ 22)



รูปที่ 22 ลักษณะผิดปกติทางสัณฐานของต้น M_1R_1 ที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งได้รับหลังจากฉายรังสีแกมมา

ก. การจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ ข. เกิดมังคุดสามใบ .

ค. ขอบใบมีรอยหยัก. ง. ลักษณะปลายใบเป็นสองแฉก จ. เกิดกิ่งแขนง

ฉ. ใบมีลักษณะสีน้ำตาลไหม้

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การศึกษาผลของความเข้มข้น และระยะเวลาการให้ EMS ต่อการรอดชีวิตของโนดูลา แคลลัส

การชักนำการกลายพันธุ์เป็นวิธีการที่นิยมนำมาใช้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างแพร่หลาย สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้สูงกว่าการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติมีอัตราการเกิดต่ำอยู่ในช่วง $1x10^{-6}$ ถึง $5x10^{-6}$ โดยเฉพาะกับพืชที่ไม่สามารถปรับปรุงพันธุ์ได้โดยวิธีการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ สารเคมีที่มีศักยภาพและนิยมนำมาใช้สำหรับการชักนำการกลายพันธุ์ คือ EMS ซึ่งเป็นสารในกลุ่มอัลคีน ก่อให้เกิดการแทนที่ของคู่เบส GC ด้วย AT มากกว่าการแทนที่ AT ด้วย GC 10 ถึง 100 เท่า การกลายพันธุ์ที่กล่าวข้างต้นเกิดในนิวเคลียส นอกจากนี้ยังพบว่า EMS สามารถชักนำการกลายพันธุ์ในไมโตคอนเดรียของยีสต์ได้ด้วย (Smolinska, 1987 อ้างโดย Nugrutiu, 1996) การชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้ EMS ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญคือ ความเข้มข้น และระยะเวลาที่ได้รับสาร โดยทั่วไปใช้ความเข้มข้น และระยะเวลาที่ยับยั้งการเจริญเติบโต และการพัฒนาได้อย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ทั้งนี้เพราะระดับความเข้มข้นและระยะเวลาดังกล่าวมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเออย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ การสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต และพัฒนาการถูกยับยั้ง มีรายงานการชักนำการกลายพันธุ์ในธัญพืชโดยใช้ EMS พบว่า ความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าได้ 20 เปอร์เซ็นต์ (LD_{20}) สามารถชักนำการกลายพันธุ์ได้ (Kamra and Brunner, 1977) จากการทดลองนี้พบว่า EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาจุ่มแช่ 30 นาที สามารถยับยั้งการพัฒนาไปเป็นยอดรวมได้ 43 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส 57 เปอร์เซ็นต์ ของชุดเปรียบเทียบ แต่จากรายงานการชักนำการกลายพันธุ์ในกล้วย (*Musa acuminata*) โดยใช้ EMS พบว่าความเข้มข้นที่ใช้เพื่อทำให้การงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 0.10 โมลาร์ (1.25 เปอร์เซ็นต์) (Menendez, 1973) ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นที่ใช้กับแคลลัสมังคุดในการศึกษานี้ ทั้งนี้เนื่องจากเมล็ดกล้วยมีเปลือกหุ้มหนา ทำให้สารละลาย EMS แทรกซึมเข้าไปภายในเนื้อเยื่อเมล็ดได้น้อยกว่า ในกรณีการชักนำการกลายพันธุ์ในถั่วมะแฮะนั้นพบว่า EMS ความเข้มข้น 0.2-0.3 เปอร์เซ็นต์มีความเหมาะสม อย่างไรก็ตามระยะเวลาการจุ่มแช่เมล็ดถั่วมะแฮะนานถึง 6 ชั่วโมง ในกรณีการเพิ่มระยะเวลาการจุ่มแช่แคลลัสมังคุดในสารละลาย EMS ทำให้การรอดชีวิตของแคลลัสลดลงเหลือเพียง 10-20 เปอร์เซ็นต์เมื่อจุ่มแช่เป็นเวลา 90 และ 120 นาที ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดคือ 30 นาที การ

ใช้ EMS ความเข้มข้นสูงมักใช้เวลาจุ่มแช่สั้น ในทางตรงข้ามหากจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่ำต้องเพิ่มระยะเวลาการจุ่มแช่นานขึ้นทำให้ประสิทธิภาพการแทรกซึมเข้าไปยังเนื้อเยื่อเป้าหมายมากขึ้น ส่งผลให้กรดนิวคลิอิคที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป นอกจาก EMS จะมีผลเสียหายก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยตรงต่อชิ้นส่วนที่จุ่มแช่แล้วยังอาจมีผลต่อความเสียหายหรือการเปลี่ยนแปลงในระยะพัฒนาการต่อมาด้วย George และ Rao (1980) ศึกษาผลของ EMS ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่เมล็ดพันธุ์ mustard plants เป็นเวลาต่าง ๆ พบว่าไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของต้นกล้า แต่เมื่อตัดแยกใบเลี้ยงจากต้นกล้ามาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าใบเลี้ยงจากต้นกล้าที่ผ่านการจุ่มแช่เมล็ดเป็นเวลา 30 นาที ให้การสร้างยอดลดลง 72 เปอร์เซ็นต์ การจุ่มแช่เมล็ดเป็นเวลานานขึ้นทำให้การสร้างยอดลดลง

2. การศึกษาผลของความเข้มรังสีแกมมาต่อการรอดชีวิตโนดูลาแคลลัส

รังสีแกมมาส่งผลให้ความมีชีวิตรอดและการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ลดลง การใช้รังสีความเข้มต่ำ ๆ คือ 5-10 เกรย์ ให้ผลการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสไม่แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบ เมื่อใช้ความเข้มสูงขึ้นเป็น 40 เกรย์ สามารถยับยั้งการพัฒนาไปเป็นยอดได้ 20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การฉายรังสีแกมมา 20-50 เกรย์ กับใบแพร์ (Leblay *et al.*, 1992) การฉายรังสีแกมมา 20 เกรย์ กับใบแอปเปิ้ล (Predieri and Fasolo Fabbri Malavasi, 1989) สามารถยับยั้งการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ จากผลข้างต้นเห็นได้ว่าความเข้มรังสีที่ยับยั้งการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่จากชิ้นส่วนใบได้ 50 เปอร์เซ็นต์ต่ำกว่าในแคลลัส ทั้งนี้เนื่องจากเนื้อเยื่อที่เป็นองค์ประกอบในชิ้นส่วนพืชแตกต่างกันทำให้มีการตอบสนองต่อความเข้มรังสีได้แตกต่างกัน เช่นเดียวกับในรายงานของ Lapins (1983 อ้างโดย Leblay *et al.*, 1992) ซึ่งกล่าวว่าชิ้นส่วนพืชแตกต่างกัน มีการตอบสนองต่อความเข้มรังสีแตกต่างกันโดยชิ้นส่วนพืชที่มีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญมีความอ่อนแอ และได้รับความเสียหายมากกว่าชิ้นส่วนพืชที่มีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อถาวรหลังจากที่ได้รับรังสีความเข้มเท่ากัน อย่างไรก็ตามการฟื้นตัวหลังจากได้รับรังสีของเนื้อเยื่อเจริญมีสูงกว่า ดังนั้นในกรณีของชิ้นส่วนที่มีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญเป็นจำนวนมากอาจใช้รังสีความเข้มสูงได้เพื่อก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ สำหรับใบเป็นชิ้นส่วนพืชที่มีองค์ประกอบของเนื่อเยื่อเจริญน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัส ความสามารถแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตหลังจากที่ได้รับการฉายรังสีต่ำ นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากใบพืชเป็นอวัยวะที่ค่อนข้างบอบบาง เนื่องจากประกอบด้วยเนื้อเยื่อเพียงไม่กี่ชั้นเซลล์ โอกาสที่เนื้อเยื่อจะตายหรือได้รับอันตรายจากรังสีที่ใช้มีมากด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงใช้ความเข้มรังสีน้อยสำหรับการยับยั้งการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับละอองเกสรของแอปเปิ้ลนั้นพบว่าต้องใช้รังสี

แกมมาความเข้มสูงถึง 750 เกรย์ เพื่อยับยั้งการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (Zhang and Lespinasse, 1991) เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของผนังเซลล์ของละอองเกสรพบว่ามีองค์ประกอบที่ซับซ้อนและมีความแข็งมากกว่า ผนังของละอองเกสรประกอบด้วยสารประกอบทางเคมีที่ทนทานต่อการสลายตัว กลุ่มเพคตินที่สำคัญ คือ sporopollenins หรือสารที่เรียกว่า pollenin (Iwanami, 1988 อ้างโดย ลาวัลย์ รักสัตย์, 2539) ดังนั้นการฉายรังสีแกมมากับละอองเกสรจึงต้องใช้ความเข้มรังสีสูงกว่าแคลลัส และใบ Visser และ Oost (1981 อ้างโดย Zhang and Lespinasse, 1991) รายงานการใช้รังสีแกมมาความเข้มสูงถึง 2,200 เกรย์ กับละอองเกสรแอปเปิ้ล สามารถยับยั้งการพัฒนาได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากรูปร่างและลายบนผนังส่วนนอกของละอองเกสรจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพันธุ์พืชทำให้มีความอ่อนแอต่อรังสีแตกต่างกัน (ลาวัลย์ รักสัตย์, 2539) นอกจากนี้ยังพบว่าพืชชนิดเดียวแต่ต่างพันธุ์กันมีการตอบสนองต่อความเข้มรังสีแตกต่างกัน จากการทดลองฉายรังสีแกมมากับใบแพร์ 4 พันธุ์ คือ Conference, Williams, Passe-Grassane และ Comice พบว่าความเข้มรังสีที่ยับยั้งการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในแต่ละพันธุ์มีค่า 10, 20-30, 30-40 และ 40-50 เกรย์ ตามลำดับ (Leblay *et al.*, 1992) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ทดสอบการตอบสนองของพันธุ์มังคุดต่อความเข้มรังสี เนื่องจากในปัจจุบันมีมังคุดเพียงพันธุ์เดียวเท่านั้นและไม่ได้ทำการศึกษาการฉายรังสีให้กับใบทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นได้ และแม้ว่าการใช้รังสีแกมมาความเข้ม 40 เกรย์ กับแคลลัสมังคุดในการศึกษานี้ มีผลยับยั้งการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ แต่เซลล์ที่รอดชีวิตเหล่านั้นอาจเกิดการ กลายพันธุ์ได้ ซึ่งรายละเอียดของลักษณะที่กลายนั้นได้กล่าวไว้ในการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา และรูปแบบเอนไซม์ เพื่อเป็นการยืนยันว่าความเข้มรังสีที่ยับยั้งการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ 20 เปอร์เซ็นต์ เพียงพอต่อการชักนำการกลายพันธุ์ในมังคุดได้ ในทำนองเดียวกับการศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะและสีดอกแพรเซียงไฮ้ โดยการใช้รังสี 40 เกรย์ พบว่าไม่มีผลต่อความอยู่รอด อัตราการรอดชีวิตหลังจากได้รับรังสี 93 เปอร์เซ็นต์ แต่ความเข้มรังสีข้างต้นส่งผลให้การเจริญเติบโตเฉลี่ยลดลง การแตกกิ่งก้านน้อย การบานดอกช้าลง เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะและสีของดอก

3. ผลของ EMS และรังสีแกมมา ต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อวิทยา

แคลลัสมังคุดที่ไม่ผ่านการให้สิ่งก่อกลายพันธุ์มีลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาเหมือนกับเนื้อเยื่อเจริญ คือ ประกอบไปด้วยเซลล์พาเร็งไคมาที่มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกัน และมีการเรียงตัวชิดกันจนไม่มีช่องว่างระหว่างเซลล์ ภายในเซลล์ประกอบด้วยไซโทพลาสซึมหนาแน่น นิวเคลียสมีลักษณะกลมย้อมติดสีฟาสท์กรีนเข้มอยู่ตรงกลางเซลล์ หลังจากนำแคลลัส C_1 ฉาย

รังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ ทำให้เซลล์บริเวณอิพิเดอมิสบางเซลล์ได้รับความเสียหายเนื่องจากได้รับรังสีแกมมา มีลักษณะเป็นสีดำและไซโทพลาสซึมถูกทำลาย ไม่พบองค์ประกอบภายในเซลล์เหมือนเซลล์ทั่ว ๆ ไปก่อนที่ได้รับสิ่งก่อกลายพันธุ์ เซลล์แต่ละเซลล์ไม่ติดสีฟาสท์กรีน ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้รับความเสียหายเนื่องจากได้รับรังสี มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ของ C_1 รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป เซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ ช่องว่างระหว่างเซลล์มีมากขึ้น ความหนาแน่นของไซโทพลาสซึมภายในเซลล์น้อยกว่าและย้อมติดสีฟาสท์กรีนน้อยกว่า เนื่องจากรังสีจัดเป็นความเครียดที่ไม่มีชีวิต ส่งผลให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุล โดยทำให้โมเลกุลที่ได้รับพลังงานจากรังสีแตกตัวเป็นไอออนและฟรีเรดิคอล มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลใหม่ ส่งผลให้ช่องว่างอากาศใหญ่ขึ้น และความสามารถในการแบ่งเซลล์เปลี่ยนแปลงไปในทางลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อกลับสู่สภาพปกติก็สามารถแบ่งเซลล์และพัฒนาไปเป็นอวัยวะใหม่ได้ ในขณะที่บางเซลล์ที่ไม่สามารถทนได้อาจถึงตาย นอกจากนั้นเซลล์บางเซลล์ใน M_1C_1 ที่ได้รับการฉายรังสี ย้อมติดสีแซฟรานิน มีลักษณะเป็นเม็ดกลมเล็ก ๆ สีแดง (รูปที่ 12) ซึ่งลักษณะดังกล่าวพบมากกว่าใน C_1 ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นโปรตีนสะสมที่อยู่ภายในเซลล์สร้างขึ้นเพื่อป้องกันตัวเองจากสภาวะเครียดที่เกิดขึ้น Leblay และคณะ (1992) รายงานการฉายรังสีแกมมา 30 เกรย์ กับใบแพร์พันธุ์ Comice ทำให้โครงสร้างของเนื้อเยื่อสปองจีพาเร็งไคมามีช่องว่างขนาดใหญ่ขึ้น จากผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าความเสียหายของเนื้อเยื่อมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนพืชที่ได้รับรังสี จากการฉายรังสีแกมมากับแคลลัสในการทดลองนี้ พบว่าเนื้อเยื่อที่เกิดความเสียหายเนื่องจากได้รับรังสีเป็นเซลล์บริเวณเซลล์อิพิเดอมีส และเซลล์พาเร็งไคมา 4-5 ชั้น (รูปที่ 11) ทั้งนี้เนื่องจากชิ้นส่วนพืชแตกต่างกันมีเนื้อเยื่อที่เป็นองค์ประกอบในชิ้นส่วนพืชแตกต่างกัน ทำให้มีการตอบสนองต่อความเข้มรังสีได้แตกต่างกัน แคลลัสมีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญมากกว่ามีความอ่อนแอ และได้รับความเสียหายมากกว่าชิ้นส่วนใบ ซึ่งมีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญน้อยกว่าหลังจากที่ได้รับรังสีแกมมาความเข้มเท่ากัน นอกจากนั้น Leblay และคณะ (1992) ยังได้รายงานว่าใบที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต 375 จูลต่อตารางเมตร มีผลทำให้เซลล์อิพิเดอมีสด้านบนมีลักษณะแบนราบ แตกต่างจากการฉายรังสีแกมมา ซึ่งเกิดความเสียหายในชั้นสปองจีพาเร็งไคมา ทั้งนี้เนื่องจากรังสีแกมมามีความสามารถในการทะลุทะลวงเข้าสู่เซลล์ภายในเนื้อเยื่อได้สูงกว่ารังสีอัลตราไวโอเล็ต อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ไม่ได้ศึกษาผลของรังสีอัลตราไวโอเล็ต แต่แคลลัสที่ได้รับรังสีแกมมาเกิดความเสียหายทั้งเซลล์ในชั้นอิพิเดอมีสและพาเร็งไคมา ความเสียหายในชั้นอิพิเดอมีสมีลักษณะเป็นสีดำไม่แบนราบเหมือนที่สังเกตพบในใบแพร์ นอกจากนี้เขาไม่ได้รายงานการสร้างเม็ดกลมสีแดงในเซลล์จากชิ้นส่วนที่ได้รับรังสี

สำหรับการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของชิ้นส่วน หรือแคลลัสที่ได้รับสารเคมีก่อกลายพันธุ์นั้นยังไม่มีรายงานในไม้ผลและไม้ยืนต้น ส่วนใหญ่เป็นการใช้ในพืชล้มลุกซึ่งมีการพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ง่าย สามารถตรวจสอบผลของการกลายพันธุ์จากลักษณะทางสัณฐานได้ง่าย และรวดเร็ว จากการศึกษานี้พบว่าลักษณะความเสียหายคล้ายกับรังสี แต่ความรุนแรงที่เกิดขึ้นมีมากกว่า จากการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของแคลลัสที่ผ่านการให้สิ่งก่อกลายพันธุ์ทั้งสองรูปแบบ พบว่าสอดคล้องกับอัตราการรอดชีวิตของแคลลัส (ตารางที่ 3 และ 5) อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสหลังจากให้ EMS ต่ำกว่าการให้รังสีมาก อย่างไรก็ตามการให้สิ่งก่อกลายพันธุ์ทั้งสองร่วมกัน คือ หลังจากฉายรังสีแล้วนำแคลลัสมาจุ่มแช่ EMS อีกครั้ง พบว่ามีความเสียหายของเนื้อเยื่อมากกว่าการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์เพียงอย่างเดียว มีรายงานผลสำเร็จในการชักนำการกลายพันธุ์ในธัญพืช และพืชตระกูลถั่วจำนวนมากจากการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ทั้งสองร่วมกัน (Gupta *et al.*, 1996) เนื้อเยื่อเป้าหมายที่สำคัญที่เสียหาย คือ เนื้อเยื่อชั้นอิพิเดอมีส ซึ่งเนื้อเยื่อชั้นนี้มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง และสามารถพัฒนาต่อไปให้จุดกำเนิดของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด $M_2R_1C_1$ ที่ได้รับทั้งรังสี และ EMS มีความเสียหายรุนแรงมากกว่า $M_2R_1C_1$ ที่ได้รับรังสี หรือ EMS เพียงอย่างเดียว ซึ่งสังเกตจากบริเวณอิพิเดอมีสมีลักษณะสีดำหลายชั้น และภายในเซลล์มีองค์ประกอบของไซโทพลาสซึมซึ่งเป็นเซลล์ที่ตายไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้ (รูปที่ 11)

4. ผลของ EMS และรังสีแกมมา ต่อรูปแบบไอโซไซม์

ระบบเอนไซม์ที่ใช้สำหรับการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชมีหลายระบบ แต่ละระบบมีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และชนิดของสิ่งมีชีวิตซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชทุกส่วน ในการศึกษาระบบเอนไซม์นั้นจำเป็นต้องใช้เนื้อเยื่อที่มีการเจริญเติบโตในระยะเดียวกัน จากการศึกษาระบบเอนไซม์ต่าง ๆ และปัจจัยที่มีผลต่อรูปแบบไอโซไซม์ของใบจากต้น M_1R_1 และแคลลัส $M_1R_1C_1$ ของมังคุดในการศึกษานี้ พบว่าระบบเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของมังคุดจากการชักนำการกลายพันธุ์ในหลอดทดลอง คือ ระบบเอนไซม์ PER เนื่องจากระบบเอนไซม์นี้ตรวจสอบได้เร็ว ไซโมแกรมที่ปรากฏบนแผ่นเจลคมชัดและสามารถแยกความแตกต่างของไซโมแกรมได้ชัดเจน ส่วนระบบเอนไซม์ EST ย้อมเจลติดสีเป็นปื้นยาวไม่สามารถแยกไซโมแกรมได้ชัดเจน นอกจากนี้ระบบเอนไซม์ MDH ADH และ PGI ย้อมเจลติดสีจางไม่สามารถตรวจสอบไซโมแกรมได้ชัดเจนผลดังกล่าวเป็นไปในทำนองเดียวกับการจำแนกพืชตระกูล *Lansium domesticum* Correa 3 พันธุ์ คือ ลองกอง ลางสาด และ ดูกู ซึ่งพบว่าระบบเอนไซม์ PER ให้ความชัดเจนสามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ดีที่สุดในขณะที่ระบบเอนไซม์อื่นคือ ACP EST และ PGI ให้แถบมีลักษณะเป็นปื้นไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ชัดเจน (วันทนา

นวรังสรรค์, 2538) เสาวณี สุริยาภณานนท์ (2535) ทำการตรวจสอบพันธุ์มะขามเปรี้ยวและมะขามหวาน โดยใช้ระบบเอนไซม์ 3 ระบบ คือ PER EST และ ACP พบว่า ระบบเอนไซม์ PER สามารถใช้ตรวจสอบพันธุ์มะขามได้ดี นอกจากนี้ Byrne และ Littleton (1989) สามารถตรวจสอบ และจำแนกความแตกต่างของพันธุ์ลูกผสมระหว่าง พลัม กับแอปริคอท โดยใช้ระบบเอนไซม์ PER จำแนกได้ดี จากรายงานการวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นเห็นได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ PER ปรากฏอยู่ทั่วไปในทุกส่วนของพืชทุกระยะพัฒนาการ แต่มีความแตกต่างกันออกไปในรูปแบบของไซโมแกรม ทั้งนี้เนื่องจากระบบเอนไซม์แต่ละระบบมีความจำเพาะกับชนิดของพืช ดังนั้นในกรณีของมังคุดก็เช่นเดียวกัน ระบบเอนไซม์ PER สามารถเกิดปฏิกิริยาได้สมบูรณ์และรวดเร็ว อาจเป็นเพราะว่าในเนื้อเยื่อของมังคุดมีเอนไซม์ PER มาก แต่มีเอนไซม์ MDH ADH และ PGI น้อยจึงทำให้ไซโมแกรมที่ปรากฏเกิดปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์จึงย้อมเจลติดสีไม่ชัดเจน หรืออาจเกิดจากบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด และอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ ไม่เหมาะสมกับระบบเอนไซม์ดังกล่าว อย่างไรก็ตามหากใช้ชิ้นส่วนเดียวกันที่มีระยะพัฒนาการในระยะเดียวกันมาศึกษาก็สามารถบอกความแตกต่างกันได้ แม้ว่า ราตรี สุจารีย์ (2540) ไม่ประสบผลสำเร็จในการตรวจสอบความแตกต่างของต้นมังคุดที่ได้จากการจุ่มแช่ด้วยโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้เอนไซม์ 4 ระบบ คือ PER, EST, ACP และ MDH แต่จากการศึกษานี้พบว่าระบบเอนไซม์ PER สามารถใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของ EMS และความเข้มรังสีแกมมาได้ดี กิจกรรมของเอนไซม์เป็นผลมาจากยีน ดังนั้นเมื่อเอนไซม์ที่แสดงออกมาความแตกต่างสรุปได้ว่ายีนมีความแตกต่างกัน ความแตกต่างของเอนไซม์ที่แสดงให้เห็นมี 2 รูปด้วยกันคือปริมาณกิจกรรมซึ่งแสดงออกมาในรูปของความเข้มของแถบเอนไซม์ และแบบหรือจำนวนของไซโมแกรมที่แตกต่างกัน การตรวจสอบทั้ง 2 รูปนั้นต้องมีการดัดแปลงวิธีการ และศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมซึ่งปัจจัยดังกล่าวที่สำคัญคือบัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับการสกัด ชนิดของชิ้นส่วนพืช ชนิดของสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่ใช้ และองค์ประกอบของเจลและความเข้มข้นสำหรับการแยกเอนไซม์แตกต่างกัน

การใช้ Tris-HCl ความเข้มข้นต่างกันเป็นองค์ประกอบของบัฟเฟอร์และการใช้ชิ้นส่วนพืชแตกต่างกันมีผลต่อการติดสีย้อมเอนไซม์ ความคมชัดของแถบไซโมแกรมแตกต่างกัน จากการทดลองใช้ Tris-HCl เข้มข้น 0.25, 0.50 และ 0.75 โมลาร์ pH 7.5 เติม PVP เข้มข้น 2 เปอรเซ็นต์ Na_2EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และ 2-Mercapthoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ร่วมกับระบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พบว่า R_1 ให้ไซโมแกรมคมชัดไม่แตกต่างกัน แต่การใช้ Tris-HCl 0.75 โมลาร์ สามารถแยกแถบได้ชัดกว่า ในขณะที่การสกัดเอนไซม์จาก C_1 โดยใช้ Tris-HCl เข้มข้น 0.25 โมลาร์ แยกแถบได้ดีกว่าความเข้มข้น 0.50 และ 0.75 โมลาร์ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง C_1 กับ $M_1R_1C_1$-20. พบว่าการใช้ Tris-HCl เข้มข้น 0.75 โมลาร์ สามารถแยกความแตกต่างระหว่างไซโมแกรม ของ C_1 และ $M_1R_1C_1$-20

ได้แตกต่างกัน ในขณะที่ความเข้ม 0.25 โมลาร์ ไม่สามารถแยกความแตกต่างของไซโมแกรมได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้ Tris-HCl เข้มข้น 0.75 โมลาร์ แต่จากการทดลองสกัดเอนไซม์ในลองกอง ลางสาด และ ดูกู พบว่าการใช้ Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 7.5 เติม PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ Na_2EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และ 2-Mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ให้ผลดีกว่าการใช้ Tris-HCl เข้มข้น 0.25 และ 1.0 โมลาร์ (วันทนา, นวรังสรรค์, 2538) ส่วนความเข้มข้นของเจลอะคริลาไมด์ พบว่ามีผลต่อการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ การใช้ความเข้มข้นสูงต้องใช้ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของเอนไซม์นาน ความเข้มข้นเจล 12 เปอร์เซ็นต์ ใช้ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของเอนไซม์นานกว่าความเข้มข้น 10 และ 7 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการใช้เจลความเข้มข้นสูง จะมีความพรุนหรือช่องว่างน้อย ทำให้เอนไซม์มีการเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าในกรณีที่มีการใช้เจลความเข้มข้นต่ำ เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบเอนไซม์ของ M_1R_1 พบว่าการใช้เจลเข้มข้น 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกไซโมแกรมได้เพียง โซนเดียว อย่างไรก็ตามการใช้เจลเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกไซโมแกรมได้ 2 โซน แต่ระยะห่างระหว่าง โซน 1 กับ โซน 2 ชิดกัน ทั้งใน M_1R_1 และ $M_1R_1C_1$ เป็นไปทำนองเดียวกันทุกความเข้มรังสี เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการแยกเอนไซม์ไม่เหมาะสม ดังนั้นการใช้เจลเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ควรใช้ระยะเวลาในการแยกเอนไซม์เพิ่มขึ้นหลังจากสีเครื่องหมายเคลื่อนที่หลุดพ้นจากแผ่นเจล ทำนองเดียวกับ การศึกษาความเข้มข้นของเจลอะคริลาไมด์ในมังคุดโดย ราตรี สุจารีย์ (2540) พบว่าการใช้ความเข้มข้นของเจลอะคริลาไมด์ 12 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกไซโมแกรมโดยใช้สีย้อมโปรตีนได้คมชัดกว่าความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดลองในลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่าการใช้เจลเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกไซโมแกรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้คมชัดกว่าความเข้มเจล 10 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามระยะระหว่างแถบของไซโมแกรมชิดกันมากกว่าความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซ็นต์ (วันทนา นวรังสรรค์, 2538)

จากการตรวจสอบความแตกต่างของต้น M_1R_1 หลังจากได้รับรังสีแกมมา และจุ่มแช่สารละลาย EMS โดยใช้ไอโซไซม์ แสดงให้เห็นว่ารังสีแกมมา และสารละลาย EMS ส่งผลให้มีความแตกต่างของรูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสระหว่างชุดเปรียบเทียบและต้น M_1R_1 ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมา 10 และ 20 เกรย์ และ $M_1R_1C_1$ จากการฉายรังสีแกมมา 5, 20 และ 40 เกรย์ M_1R_1 จากการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นทุกความเข้มข้น และ $M_1R_1C_1$ จากการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ข้างต้นเป็นผลจากการควบคุมด้วยยีน สามารถสกัดออกมาตรวจสอบได้ ทั้งนี้พืชสายพันธุ์เดียวกันจะมีรูปแบบไอโซไซม์เหมือนกัน หากมีความแตกต่างกันแสดงว่าพืชชนิดนั้นเป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน เนื่องจากไอโซไซม์เป็นสายโพลีเปปไทด์ซึ่งประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโนที่มีความจำเพาะ ลำดับของกรดอะมิโนนี้ถูกแปรรหัสมาจากพันธุกรรมบนสายนิวคลีโอไทด์ ไอโซไซม์ที่

ประกอบด้วยกรดอมิโนแตกต่างกันมีขนาดประจุสุทธิและรูปร่างของโมเลกุลแตกต่างกัน เมื่อนำไอโซไซม์มาแยกบนตัวกลางที่เหมาะสมด้วยเทคนิคอิเลคโตรฟอรีซีสในสนามไฟฟ้า โมเลกุลของเอนไซม์เคลื่อนที่ในอัตราที่แตกต่างกันด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้ถือว่าระดับความเข้มข้น ระยะเวลาการจุ่มแช่ EMS และความเข้มรังสีที่ใช้เพียงพอต่อการชักนำการกลายพันธุ์ในมังคุด การใช้วิธีการนี้ช่วยเพิ่มความแม่นยำได้และเป็นการยืนยันความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐาน นอกจากการใช้เอนไซม์แล้วยังสามารถใช้ดีเอ็นเอในการตรวจสอบเพื่อเพิ่มความแม่นยำมากยิ่งขึ้น จากการตรวจสอบความแตกต่างของใบต้นเชอรี่ พันธุ์ '209/1' ซึ่งชักนำจากการเพาะเลี้ยงใบที่ได้รับการฉายรังสีเอกซ์ 20 เกรย์ โดยวิธี Random amplify polymorphic DNAs (RAPDs) พบว่าชุดเปรียบเทียบมีรูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างจากต้นที่ได้หลังจากฉายรังสีเอกซ์ 20 เกรย์ อยู่ 1 แถบ ขนาด 2 กิโลเบส ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันควบคุมลักษณะความสูงซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานที่ปรากฏ (Yang and Schmidt, 1994) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาในระดับดีเอ็นเอ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรมีการตรวจสอบโดยใช้ดีเอ็นเอ เพื่อเพิ่มความแม่นยำมากยิ่งขึ้น และแม้ว่าการใช้รังสีความเข้ม 40 เกรย์ กับแคลลัสมังคุดในการศึกษานี้มีผลยับยั้งการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ แต่จากการตรวจสอบความแตกต่างจากใบของต้นซึ่งพัฒนาจากแคลลัสที่ได้รับการฉายรังสีโดยใช้ไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส พบว่าก่อให้เกิดเปลี่ยนแปลงได้ ดังนั้นระดับความเข้มรังสีที่ใช้ก็นับว่าเพียงพอต่อการชักนำการกลายพันธุ์ในมังคุด

5. ผลของ EMS และรังสีแกมมา ต่อลักษณะทางสัณฐาน

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้น M_1R_1 ที่ได้รับการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าต้นมังคุดที่ได้จากการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ มีความสูงลดลง นอกจากนี้ยังตรวจพบลักษณะผิดปกติทางสัณฐาน คือ มีลำต้นอวบอ้วนและเกิดกิ่งแขนง เกิดมังคุดสามใบและมีการจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานดังกล่าวในข้างต้นเป็นสิ่งที่บ่งชี้ว่าสิ่งมีชีวิตนั้นมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น ซึ่งการกลายพันธุ์ชนิดนี้สามารถคัดเลือกนำมาใช้ประโยชน์ได้ง่าย ต้นกล้ามังคุดที่ได้รับการจุ่มแช่ EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากและความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด มีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดหลังจากย้ายปลูก 3 สัปดาห์ George และ Rao (1980) พบลักษณะผิดปกติทางสัณฐานอื่น ๆ ของต้นกล้า *Brassica juncea* พันธุ์ Rai-5 ในหลอดทดลองที่ได้จากการนำเมล็ดจุ่มแช่ EMS ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที เช่น ใบเลี้ยงของต้นกล้าที่งอกมีลักษณะเหลืองซีด เมื่อเพิ่มเวลาการจุ่มแช่เป็น 2 ชั่วโมง พบว่าใบเลี้ยงมีลักษณะเหลืองซีดและใบแรกมีลักษณะบิดเบี้ยว (malformed primary leave) เมื่อตัดใบเลี้ยงจากต้นกล้าของเมล็ดที่จุ่มแช่ EMS นาน 30 นาที ชักนำยอด พบว่ายอดที่ได้ทั้งหมดมีขนาดเล็ก และมีการเจริญเติบโตไม่ดี ใน

ทำนองเดียวกันนี้มีการนำอับเรณูของยาสูบจุ่มแช่ EMS ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ นาน 18 ชั่วโมง พบว่าใบมีลักษณะสีเหลืองซีดและมีลักษณะใบด่าง เมื่อออกดอกดอกที่ได้มีลักษณะผิดปกติ (มนสุรีย์ ก่องตาวงศ์ และ ทิพย์มณี ภะระตะศิลปินส์, 2527) นอกจากมีรายงานการใช้ EMS ในการชักนำให้เกิดใบเหลืองซีดแล้ว มีรายงานว่า DES และ DMS ซึ่งเป็นสารเคมีในกลุ่มเดียวกัน กับเมล็ด *Trigonella comiculata* L. ชักนำให้เกิดใบเหลืองซีดในต้นกล้า (Raisingani and Mahna, 1996) การเปลี่ยนแปลงของลักษณะต่าง ๆ ที่กล่าวมาในข้างต้น อาจเป็นผลมาจากกระบวนการทางสรีระถูกทำลาย และกระบวนการแมแทบอลิซึมถูกขัดขวางทำให้กิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ไม่สามารถดำเนินไปตามปกติได้หรือมีประสิทธิภาพลดต่ำลง เช่น ต้นที่ได้มีลักษณะแคระแกร็น และ ใบด่าง

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้น M_1R_1 หลังจากฉายรังสีแกมมาความเข้มต่าง ๆ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปในทำนองเดียวกับต้น M_1R_1 ที่ได้รับ EMS คือ ต้นที่ได้มีจำนวนข้อเฉลี่ยมากกว่าชุดเปรียบเทียบ แสดงให้เห็นว่ารังสีแกมมา 10, 20 และ 40 เกรย์ มีผลต่อความสูงของต้นโดยมีผลทำให้ความสูงลดลง นอกจากนั้นลักษณะผิดปกติทางสัณฐานที่พบเห็น คือ ลักษณะปลายใบเป็นสองแฉก ขอบใบมีรอยหยัก การจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ และเกิดกิ่งแขนง Yang และ Schmidt (1994) รายงานว่าต้นที่ได้จากการฉายรังสีเอกซ์กับใบเซอรี่ความเข้มรังสี 20 เกรย์ มีลักษณะเตี้ยเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ใบมีขนาดเล็กหนา บริเวณขอบใบมีรอยหยัก นอกจากนี้ในการทดลองนี้พบว่าต้นที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาทุกความเข้มรังสี มีจำนวนรากเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ยและ เปอร์เซ็นต์การสร้างรากเฉลี่ยมากกว่า อย่างไรก็ตามหลังจากนำต้นกล้าย้ายปลูกเป็นเวลา 3 สัปดาห์ อัตราการรอดชีวิตของต้นที่ได้รับต่ำ อาจเนื่องมาจากต้นที่ได้รับการฉายรังสีมีจำนวนข้อมาก และจำนวนใบมาก ส่งผลให้ต้นที่ได้มีการคายน้ำทางใบสูง ถึงแม้ว่าจำนวนรากเฉลี่ยที่ได้สูงกว่าชุดเปรียบเทียบก็ตาม แต่รากมังคุดไม่มีรากแขนงและรากขนอ่อน จึงทำให้การดูดน้ำไปใช้ไม่เพียงพอต่อความต้องการ

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของต้นที่ได้รับ EMS และรังสีแกมมา รังสีแกมมาให้อัตราการรอดชีวิตของต้นหลังย้ายปลูกต่ำกว่า EMS เนื่องจากต้นที่ได้รับรังสี มีจำนวนข้อเฉลี่ยสูงกว่า ซึ่งหมายถึงจำนวนใบเฉลี่ยสูงกว่าด้วย (ตารางที่ 7 และ 8) ดังนั้นเมื่อต้นที่ได้รับรังสีมีจำนวนข้อเฉลี่ยมาก มีจำนวนใบมาก ส่งผลให้ต้นที่ได้มีการคายน้ำทางใบสูง ถึงแม้ว่าจำนวนรากและความยาวรากเฉลี่ยของต้นที่ได้รับรังสีสูงกว่า EMS (ตารางที่ 7 และ 8) ก็ตามแต่รากมังคุดไม่มีรากแขนงและรากขนอ่อน จึงทำให้ดูดน้ำไปใช้ไม่เพียงพอต่อความต้องการ

เนื่องจากมังคุดเป็นพืชที่ต้องใช้เวลานานในการปลูกถึงให้ผลผลิตทำให้ยากต่อการปรับปรุงพันธุ์ และตรวจสอบการกลายพันธุ์ จากการทดลองชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้ EMS และรังสีแกมมาในการทดลองนี้ สามารถตรวจสอบลักษณะผิดปกติทางสัณฐาน และต้นที่ได้มีรูป

แบบของเอนไซม์แตกต่างกัน ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าต้นที่ได้มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น แต่ก็เป็นเพียงการตรวจสอบในห้องทดลองเท่านั้น ดังนั้นต้องมีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ในสภาพแปลงปลูกหลังจากที่นำต้นกลายพันธุ์ปลูกในขั้นต่อไป เนื่องจากลักษณะการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นอาจไม่ถ่ายทอดไป นอกจากนั้นยังสามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ได้โดยใช้ดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มความแม่นยำมากยิ่งขึ้น ซึ่งในปัจจุบันวิธีการดังกล่าวเป็นที่นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ในการศึกษานี้ไม่ได้ใช้ดีเอ็นเอในการตรวจสอบความแตกต่างของต้น M_1R_1 ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรจะเป็นการตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ดีเอ็นเอ เพื่อเพิ่มความแม่นยำมากยิ่งขึ้น

บทที่ 5

สรุป

1. ความเข้มข้นของ EMS ที่สามารถยับยั้งการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชได้อย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับจีน หรือ ระดับดีเอ็นเอ คือ ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์

2. ระยะเวลาการจุ่มแช่แคลลัสด้วยสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ ที่เหมาะสม คือ 30 นาที สามารถยับยั้งการพัฒนาได้อย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับจีน หรือดีเอ็นเอได้

3. การใช้รังสีแกมมาความเข้มสูงขึ้นมีผลให้การรอดชีวิตลดลง โดยการฉายรังสีแกมมาความเข้ม 20 และ 40 เกรย์ ให้การรอดชีวิตแตกต่างจากชุดเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.05$)

4. แคลลัสที่ได้รับรังสีแกมมา 40 เกรย์ 2 ครั้ง มีจำนวนชั้นของเซลล์อิพิเดอมีสที่เกิดความเสียหายมากกว่าแคลลัสที่ได้รับรังสีทุกความเข้มรังสี ส่วน แคลลัสที่ได้รับ EMS 0.50 เปอร์เซ็นต์ 30 และ 60 นาที มีจำนวนชั้นของเซล์อิพิเดอมีสเกิดความเสียหายน้อยกว่าแคลลัสที่ได้รับรังสีแกมมา 40 เกรย์ 2 ครั้ง แต่เซลล์อิพิเดอมีสชั้นแรกเกิดความเสียหายรุนแรงมากกว่า สำหรับ แคลลัสที่ได้รับทั้งการฉายรังสีแกมมา 40 เกรย์ 2 ครั้ง และจุ่มแช่สารละลาย EMS 0.50 เปอร์เซ็นต์ 30 และ 60 นาที มีจำนวนชั้นของเซลล์อิพิเดอมีสที่เสียหายมากกว่าและรุนแรงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการให้รังสีแกมมา และ EMS เพียงอย่างเดียว

5. ระบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ (การเปลี่ยนแปลงในระดับจีน) ของใบจากต้นมังคุดชั่วที่ 1 และ แคลลัสที่พัฒนาจากใบของต้นชั่วที่ 1 ทุกระดับความเข้มรังสี

6. บัฟเฟอร์สกัดที่ประกอบด้วย Tris-HCl เข้มข้น 0.75 โมลาร์ pH 7.5 เติม PVP เข้มข้น 2 เปอรเซ็นต์ Na_2EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และ 2-mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถใช้สกัดเอนไซม์จากใบ และ แคลลัส ได้ดีที่สุด

7. การใช้เจลอะคริลาไมด์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ให้รูปแบบไอโซไซม์คมชัดที่สุด และสามารถตรวจสอบความแตกต่างของไซโมแกรมได้ดีกว่าความเข้มข้น 7 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ทั้งจากใบของต้นชั่วที่ 1 และ แคลลัสที่พัฒนาจากใบของต้นชั่วที่ 1 ทุกระดับความเข้มรังสี

8. EMS มีผลให้รูปแบบเอนไซม์ ของใบจากต้นมังคุดชั่วที่ 1 และ แคลลัสที่พัฒนาจากใบของต้นชั่วที่ 1 มีความแตกต่างจากชุดเปรียบเทียบ โดยไซโมแกรมที่แยกได้เป็น 2 โซน ในโซน 1 (PER1) ชุดเปรียบเทียบ และต้นที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 1.00 เปอร์เซ็นต์ ให้ไซโมแกรม 4 แถบ ส่วนความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ ให้ไซโมแกรม 3 แถบ แต่ต้นที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ทุกความเข้มข้นมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าชุดเปรียบเทียบ สำหรับ โซน 2 (PER2) ชุดเปรียบเทียบและต้นที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ทุกความเข้มข้น ให้ไซโมแกรม 2 แถบ แต่ละแถบติดกันเป็นปื้น แต่ต้นที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ทุกความเข้มข้นมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า ส่วนไซโมแกรมของแคลลัสที่พัฒนาจากใบของต้นชั่วที่ 1 ใน PER1 ต้นที่ได้จากแคลลัสซึ่งผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS และชุดเปรียบเทียบให้ไซโมแกรม 2 แถบ แต่ต้นที่ได้จากแคลลัสซึ่งผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ แถบที่ 2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่าชุดเปรียบเทียบและการใช้สารละลาย EMS ความเข้มข้นอื่น ๆ ส่วน PER2 ชุดเปรียบเทียบและต้นที่พัฒนาจากแคลลัสซึ่งผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ทุกความเข้มข้นให้ไซโมแกรม 4 แถบ แถบที่ 1 ติดกันเป็นปื้น แถบที่ 2 และ แถบที่ 3 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าแถบที่ 4

9. สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้ลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้นชั่วที่ 1 เปลี่ยนไปโดยส่งผลให้ต้นมังคุดมีขนาดเตี้ยลง ต้นที่ได้จากแคลลัสซึ่งผ่านการจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ มีการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกมากกว่าต้นในชุดเปรียบเทียบและ ความเข้มข้น 1.00 เปอร์เซ็นต์ และพบลักษณะผิดปกติทางสัณฐาน คือ มีลำต้นอวบอ้วนและเกิดกิ่งแขนง เกิดมังคุดสามใบและมีการจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ

10. รังสีแกมมาให้รูปแบบเอนไซม์ของใบจากต้นมังคุดชั่วที่ 1 และ แคลลัสที่พัฒนาจากใบของต้นชั่วที่ 1 มีความแตกต่างจากชุดเปรียบเทียบ โดยไซโมแกรมของใบจากต้นชั่วที่ 1 แยกได้เพียง 1 โซน (PER1) และต้นที่ได้จากแคลลัสซึ่งผ่านการฉายรังสีแกมมาให้ไซโมแกรมได้ไม่แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบแต่ต้นที่ได้จากแคลลัสซึ่งผ่านการฉายรังสีแกมมามีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า โดยเฉพาะความเข้มรังสี 10 และ 20 เกรย์ ส่วนไซโมแกรมของแคลลัสที่พัฒนาจากใบของต้นชั่วที่ 1 แยกได้ 2 โซน ใน PER1 แยกไซโมแกรมได้ 2 แถบ โดยต้นที่ได้จากแคลลัสซึ่งผ่านการฉายรังสีแกมมาความเข้ม 5, 20 และ 40 เกรย์ มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าชุดเปรียบเทียบและ ความเข้มรังสี 10 เกรย์ ส่วน PER2 ต้นที่ได้จากแคลลัสซึ่งผ่านการฉายรังสี 5 เกรย์ สามารถแยกไซโมแกรมได้แตกต่างจากชุดเปรียบเทียบและรังสีความเข้มอื่น ๆ โดยมีแถบเอนไซม์ PER2 มากกว่า 1แถบ

11. ความเข้มรังสีแกมมา ความเข้ม 10, 20 และ 40 เกรย์ มีผลให้ลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้นชั่วที่ 1 เปลี่ยนแปลงโดยส่งผลให้ต้นมังคุดมีขนาดเตี้ยลง คือ มีจำนวนข้อเฉลี่ยมากแต่ความสูงน้อย ต้นที่ได้จากแคลลัสซึ่งผ่านการฉายรังสีมีการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกน้อยกว่าต้นในชุดเปรียบเทียบ และพบลักษณะผิดปกติทางสัณฐาน คือ ปลายใบสองแฉก ขอบใบมีรอยหยัก การจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ เกิดมังคุดสามใบ และเกิดกิ่งแขนง

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2540. สถิติการปลูกไม้ผลไม้ยืนต้นปี 2537. ฝ่ายข้อมูลส่งเสริมการเกษตร กองแผนงาน กรมส่งเสริมการเกษตร.

ธิดารัตน์ น้อยรักษา. 2533. การขยายพันธุ์มังคุดโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ประภา ศรีพิจิตต์ อนงค์ นัยวิกุล และ วิทยา แสงแก้วสุข. 2537. การปรับปรุงข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ข้าวหอมมะลิ 105 โดยใช้เทคนิคการชักนำให้คัพภะสร้างยอดจำนวนมากร่วมกับรังสีแกมมา. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย์) 28: 180-192.

เปรมฤดี ดำยศ. 2534. การขยายพันธุ์และเนื้อเยื่อวิทยาของเอ็มบริออยด์ที่เกิดจากแคลลัสปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

มงคล แซ่หลิม. 2530. การศึกษาและวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ผลและไม้ยืนต้นในภาคใต้. ว. สงขลานครินทร์ 9: 141-144.

มณฑา จำเริญรักษ์. 2537. การเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์มังคุดจากการชักนำรากในหลอดทดลองและการต่อกิ่งนอกหลอดทดลอง. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มนสุรีย์ ก่องตาวงศ์ และ ทิพย์มณี ภะระตะศิลปินส์. 2527. ผลของ EMS ต่อลักษณะบางอย่างของต้นยาสูบที่งอกจากละอองเรณู. เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 4 ของชมรมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย 21-24 พ.ย. 2527. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

ลาวัลย์ รักสัตย์. 2539. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับละอองเรณู. ละอองเรณู. กรุงเทพมหานคร: โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์.

วันชัย จันทร์ประเสริฐ เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์ และ วรรณฤดี ศรีบุตรโรจน์. 2536. การตรวจสอบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เยื่อหุ้มเมล็ดและยูคาริเอสในเมล็ดเพื่อจำแนกพันธุ์ถั่วเหลือง. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย์) 27: 1-5.

วันทนา นวรังสรรค์. 2538. การจำแนกพันธุ์พืชในสกุล *Lansium* โดยใช้ไอโซไซม์และการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2530. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเศรษฐกิจ. หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ. สงขลา. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2536. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. สงขลา. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต และ วันทนา เอ้งย่อง. 2531. การขยายพันธุ์มังคุดจำนวนมากโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว.สงขลานครินทร์. 10: 7-11.

สมปอง เตชะโต, มงคล แซ่หลิม และ อรุณี ม่วงแก้วงาม. 2534. การเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำการสร้างรากกับต้นกล้ามังคุดในหลอดทดสอบ. ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืช 20:4-6.

สมปอง เตชะโต, มงคล แซ่หลิม และ อรุณี ม่วงแก้วงาม. 2535. การเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงใบอ่อนมังคุดในหลอดทดสอบเพื่อการขยายพันธุ์. ว. สงขลานครินทร์ 14: 1-7.

สมปอง เตชะโต, มงคล แซ่หลิม และ อรุณี ม่วงแก้วงาม. 2537. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นมังคุด : การชักนำรากและความสามารถในการตั้งตัวของต้นกล้าหลังจากย้ายลงดิน. ว.สงขลานครินทร์ 16: 1-5.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2536. วิธีการเหนี่ยวนำให้พืชกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีก่อกลายพันธุ์. การกลายพันธุ์ของพืช. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชารังสีไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เสาวณี สุริยาภณานนท์. 2535. การตรวจสอบสายพันธุ์มะขามโดยใช้ไอโซไซม์. ว. เคหการเกษตร 19: 119-112.

Arulsekar, S., Parfitt, D. E. and McGranahan, G. H. 1985. Isozyme gene markers in *Juglans* species. Journal of Heredity 76: 103-106.

Auerbach, C. 1960. Chemicals and their effects. *In* Mutation and Plant Breeding. (eds. R. A. Brink, H. F. Robinson, W. M. Myers, W. R. Singleton, F.L. Patterson, G. F. Sprague and G. F. Luckett) pp. 120-143, Washington: National Academy Sciences National Research Council.

Barlass, M. and Skene, K. G. M. 1980. A studies on the fragmented shoot apex of grapevine. Journal of Experimental Botany 31. 489-495.

Byrne, D. H. and Littleton, T. G. 1989. Interspecific hybrid verification of plum x apricot hybrids via isozyme analysis. HortScience 24: 132-134.

Chen, Z., Evans, D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P. V. and Sondahl, M. R. 1970. Hanbook of plant cell culture. (eds. Z. Chen, D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato, M. R. Sondahl) V6. pp. 22-61. U.S.A.: Macmillan publishing Co.

Cousineau, J. C., Anderson, A. K. and Daubeny, H. A. 1993. Characterization of red raspberry cultivars and selections using isoenzyme analysis. HortScience 28: 1185-1186.

Degani, C. and El-Batsri, R. 1992. Enzyme polymorphisms in mango. Journal American Society of Horticultural Science 115: 844-847.

Edriss, M. H. and Burger, D. W. 1984. *In Vitro* propagation of "Troyer" citrange from epicotyl segments. Scientia Horticulturae 23: 159-162.

George, L. and Rao, P. S. 1980. *In vitro* regeneration of mustard plant (*Brassica juncea* var. Rai-5) on cotyledon explants from non-irradiated, irradiated and mutation-treated seed. Annals of Botany 46: 107-112.

Goh, C. J., Laksmanan, P. and Loh, C. S. 1994. High frequency direct shoot bud regeneration from excised leaves of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Plant Science 101: 173-180.

Goh, H. K., Rao, A. N. and Loh, C. S. 1988. *In vitro* plantlet formation in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Annals of Botany 62: 87-93.

Grabau, E. A., Hanlon, R. and Pesce, A. 1995. Mutagenesis and selection for oligomycin resistance in soybean (*Glycine max* L. Merr) suspension culture cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42: 121-127.

Gupta, K. P., Singh, S. P. and Bahl, J. R. 1996. A new mungbean variety through mutation breeding. Mutation Breeding Newsletter. 42 pp. 6-7, Vienna: IAEA.

Hammerschlag, F. 1982. Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of the plum rootstocks Myrobalan (*Prunus ceracifera* Eheh.). Journal American Society of Horticultural Science. 107: 44-47.

Jerzy, M. and Zalewska, M. 1996. Polish cultivars of *Dendranthema grandifora* Tzvelev and *Gerbera jamesonii* Bolus bred *in vitro* by induced mutations. Mutation Breeding Newsletter. 42 pp. 12-13, Vienna: IAEA.

Johansen, D. A. 1940. Plant Microtechnique. New York : McGraw-Hill Book Company, Inc.

Kamra, O. P. and Brunner, H. 1977. Chemical mutagens. *In* manual on mutation breeding. (ed. Joint FAO/IAEA Division of Atomatic Energy in Food and Agriculture.) pp. 66-68, Vienna: IAEA.

Kang, K. K. and Kameya, T. 1993. Selection and characterization of a 5-methyltryptophan resistant mutant in *Zea mays* L. Euphytica 69: 95-101.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680.

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

Lee, M. L., Ryu, Y. J., Chung, T. V. and Park, Y. H. 1993. Identification of *Citrus* spp. in Cheju using isozymes, RFLP and RAPD markers. RNA Journal of Agriculture Science, Biotechnology 35: 193-197.

McCown, B. H. and Lloyd, G. 1981. Woody plant medium (WPM) -A mineral formulation for microculture of woody plant species. HortScience 16: 453.

Menendez, T. 1973. A note on the effect of ethylmethane sulfonate on *Musa acuminata* seed. *In* Induced Mutation in Vegetatively Propagated Plants. (ed. Joint FAO/IAEA Division of Atomatic Energy in Food and Agriculture.) pp. 85-90, Vienna: IAEA.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantalum 15: 473-497.

Negrutiu, I. 1990. *In vitro* mutagenesis. *In* Plant Cell Line Selection Procedures and Applications. (ed. J. D. Philip.) pp. 19-37, New York: Verlagsgellschaft mbH.

Normah, M. N. 1992. Micropropagation of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) through callus and multiple shoot formation. *In* Biotechnology for Forest Tree Improvement. (eds. R. C. Ummaly, I. Umboh, S. S. Tjitrosomo and N. M. Noor) pp. 81-86, Borgor: Seameo Biotrop.

Normah, M. N., Nor-Azza, A. B. and Aliudin, R. 1995. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* establishment of mangosteen. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 43: 291-294.

Patra, N. K., Chauhan, R. S. and Kandpal, A. 1996. High alkaloid yielding big capsulated dominant mutant in opium poppy. Mutation Breeding Newsletter. 42 pp. 10-11, Vienna: IAEA.

Pillai, P. S. and Abraham, S. 1996. Improvement of fruit characters and yield in sweet pepper by induced mutations. Mutation Breeding Newsletter. 42 pp. 17-18, Vienna: IAEA.

Predieri, S. and Fasolo Fabbri Malavasi, F. 1989. High-frequency shoot regeneration from leaves of the apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 17: 133-142.

Raisinghani, G. and Mahna, S. K. 1996. Behaviour of two induced chlorophyll mutants of *Trigonella corniculata* L. Mutation Breeding Newsletter. 42 pp. 12-13, Vienna: IAEA.

Samimy, C. and Cummins, J. N. 1992. Distinguishing apple rootstocks by isozyme banding patterns. HortScience 27: 829-831.

Sharma, A. N. and Bhatnagar, P. S. 1996. Radiation induced mutants for resistance to stem fly in soybean. Mutation breeding newsletter. 42 pp. 12-13, Vienna: IAEA.

Srivastava, A. and Sing, V. P. 1996. Induced high yielding pigeon pea mutants. Mutation Breeding Newsletter. 42 pp. 8-9, Vienna: IAEA.

Te-chato, S., Lim, M. and Muangkaewngam, A. 1994. Tissue culture of mangosteen: Root induction and establishment of vitro-plants to soil. Songklanakarin J. Sci. Technol. 16: 1-5.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995a. Embryogenic callus induction in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Songklanakarin J. Sci. Technol. 17: 115-120.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995b. Types of medium and cytokinins in relation with purple leaf and callus formation of mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17: 121-128.

Tulmann N. A. and Latado, R. R. 1996. 'Cristiane' and 'Ingrid'-first chrysanthemum cultivars obtained by induced mutations in Brazil. Mutation Breeding Newsletter 42 pp. 18, Vienna: IAEA.

Vanharten, A. M., Bouter, H. and Broertjes, C. 1981. *In vitro* adventitious bud techniques for vegetative propagation and mutation breeding of potato (*Solanum tuberosum* L.). II. Significance for mutation breeding. Euphytica 30: 1-8.

Wang, A. S., Cheng, D. S. K., Milcic, J. B. and Yang, T. C. 1988. Effect of X-ray irradiation on Maize inbred line B73 tissue cultures and regenerated plants. Crop Science 28: 358-368.

Yaacob, O. and Tindall, H. D. 1995. Mangosteen Cultivation. Rome: FAO Plant Production and Protection Division.

Yang, H. and Schmidt, H. 1994. Selection of a mutant from adventitious shoots formed in X-ray treated cherry leaves and differentiation of standard and mutant with RAPDs. Euphytica 77:89-92.

Yap, T. C. 1980. Breeding recalcitrant seed plants. *In* Recalcitrant Crop Seed. (eds. H. F. Chin and E. H. Roberts) Malaysia. pp. 138-145,: Tropical Press SDN.BHD.

Zhang, Y. X. and Lespinasse, Y. 1991. Pollination with gamma-irradiated pollen and development of fruits, seed and parthenogenetic plants in apple. Euphytica 56: 101-109.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1

องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตรต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมังคุด

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร) MS	WPM
1. ธาตุอาหารหลัก		
NH_4NO_3	1,650	400
KNO_3	1,900	-
KH_2PO_4	170	170
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	-	556
$CaCl_2.2H_2O$	440	96
$MgSO_4.7H_2O$	370	-
K_2SO_4	-	990
2. ธาตุอาหารรอง		
KI	0.83	-
H_3BO_3	6.20	6.20
$MnSO_4.H_2O$	16.90	16.90
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60	8.60
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	6.25
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	-
3. ธาตุเหล็ก		
$FeSO_4.7H_2O$	27.80	27.80
Na_2EDTA	37.30	37.30
4. สารอินทรีย์		
Myo-inositol	100.00	104.10
Nicotinic acid	0.50	0.50
PyridoxineHCl	0.50	0.50
ThiamineHCl	0.10	6.00
Glycine	2.00	2.00
Sucrose	30,000	30,000

ภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

องค์ประกอบ		ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร) MS	WPM
5. สารควบคุมการเจริญเติบโต			
ชักนำแคลลัส	BA	0.50	-
	TDZ	0.50	-
	PVP	500.00	-
ชักนำยอด	BA	-	0.10
	PVP	-	500.00
ชักนำราก	BA	-	0.25
	PG	-	5.6
	ผงถ่าน	-	2.5

ภาคผนวกที่ 2
การเตรียมเจลและการแยกโมเลกุลเอนไซม์

1 การเตรียม separate gel solution 30 เปอร์เซ็นต์

ชั่งอะคริลาไมด์ จำนวน 30 กรัม และ บิสอะคริลาไมด์ จำนวน 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้นาน 2 สัปดาห์

2 การเตรียมบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 M pH 8.9

ชั่ง Tris-HCl จำนวน 18.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH 8.9 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริค และ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 1 เดือน

3 การเตรียมบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 M pH 6.8

ใช้วิธีเดียวกับการเตรียม บัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 M แต่ชั่ง Tris-HCl ความเข้มข้นเพียง 6.03 กรัม และปรับ pH 6.8

4 การเตรียมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต จำนวน 0.1 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 1 สัปดาห์

5 การเตรียมอิเลคโตรดบัฟเฟอร์

ชั่ง Tris-HCl จำนวน 3.03 กรัม รวมกับ ไกลซีน จำนวน 14.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.3 โดยใช้ไกลซีน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ภาคผนวกที่ 3

การเตรียมสีย้อมเอนไซม์ สารละลายตรึงเอนไซม์ สารละลายล้างสีส่วนเกิน และสารละลายเก็บเจล

1 การเตรียมสีย้อมเอนไซม์

1.1 สีย้อมอัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (E.C. 1.1.1.1)

สารเคมี

1. 0.1 M tris-HCl pH 7.5	100	มิลลิลิตร
2. β-nicotinamide adenine dinucleotide monohydrate (NAD^+)	30	มิลลิกรัม
3. methylthiazolyldiphenyl tetrazolium bromide (MTT)	20	มิลลิกรัม
4. N-methyl-phenazonium methyl sulfate (PMS)	4	มิลลิกรัม
5. ethanol	6	มิลลิลิตร

วิธีการ ละลายสารในข้อ 2-5 ในสารละลายข้อ 1 ย้อมสีเจลในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-60 นาที

1.2. สีย้อมเอสเตอเรส (E.C. 3.1.1.2)

สารเคมี

1. 0.1 M phosphate buffer pH 6.0	100	มิลลิลิตร
2. fast blue B salt	150	มิลลิกรัม
3. 1 % α-napthyl acetate in absolute alcohol	3	มิลลิลิตร

วิธีการ ละลายสารในข้อ 3 ในสารละลายข้อ 1 ให้เข้ากันแล้วกรองในที่มืดก่อนย้อม 30 นาที และเติมสารละลายในข้อ 3 ในทันทีที่ย้อมเจล ย้อมนานจนเจลติดสีชัดเจน

1.3. สีย้อมมาเลทดีไฮโดรจีเนส (E.C. 1.1.1.37)

สารเคมี

1. 0.1 M tris-HCl pH 7.5	100	มิลลิลิตร
2. 1 M DL-malate pH 7.5	3	มิลลิลิตร
3. NAD^+	30	มิลลิกรัม
4. MTT	20	มิลลิลิตร
5. PMS	4	มิลลิกรัม

วิธีการ ละลายสารในข้อ 3-5 ในสารละลายข้อ 1 และเติมสารละลายในข้อ 2 ซึ่งเตรียมเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง ในทันทีที่ย้อม ย้อมเจลในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 15-60 นาที
หมายเหตุ สารละลายในข้อ 2 ไม่ควรเตรียมและเก็บไว้นาน

1.4. สีย้อมเปอร์ออกซิเดส (E.C. 1.11.1.7)

สารเคมี	Stock A		
1.	3-amino-9-ethylcarbazole	420	มิลลิกรัม
2.	β-napthol	290	มิลลิกรัม
3.	acetone	200	มิลลิลิตร

วิธีการ ละลายสารในข้อ 1 และ 2 ใน acetone ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเก็บไว้ในขวดสีชา

สารเคมี	Stock B (0.0125 M Tris-HCl buffer, pH 4.0)		
1.	tris-HCl	1.5	กรัม
2.	acetic acid	1.7	มิลลิลิตร
3.	น้ำกลั่น	1	ลิตร

สารเคมี	Stock C (3 % hydrogen peroxide (H_2O_2))		
1.	30 % H_2O_2	0.1	มิลลิลิตร
2.	น้ำกลั่น	0.9	มิลลิลิตร

วิธีการ ใช้ Stock A:B:C เท่ากับ 20:80:1 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนย้อมเจล ย้อมเจลในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 30-60 นาที

1.5. สีย้อมฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส (E.C. 2.7.5.1)

สารเคมี			
1.	0.1 M tris-HCl pH 7.5	100	มิลลิลิตร
2.	1 M $MgCl_2.6H_2O$	1	มิลลิลิตร
3.	fructose-6-P(Na)	80	มิลลิกรัม
4.	β-nicotinamide adenine dinucleotide ($NADP^+$)	20	มิลลิกรัม
5.	MTT	20	มิลลิกรัม
6.	PMS	4	มิลลิกรัม
7.	glucose-6-phosphate dehydrogenase (glucose -6-PDH)	20	ยูนิต

วิธีการ ละลายสารในข้อ 3-6 ในสารละลายข้อ 1 เติมสารละลายในข้อ 2 และ 7 ก่อนย้อมเจลย้อมเจลในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30-60 นาที

2 การเตรียมสารละลาย ตรึงเอนไซม์

ใช้กลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ และกรดซิตริก 7 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3 การเตรียมสารละลายล้างสีส่วนเกินหลังย้อมเจล

ใช้ methanol จำนวน 400 มิลลิลิตร รวมกับ glacial acetic acid 70 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

4 การเตรียมสารละลายเก็บเจล

ใช้ methanol จำนวน 100 มิลลิลิตร รวมกับ glacial acetic acid 70 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวกที่ 4
การเตรียมสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา

1. การเตรียมน้ำยาฟิกซ์เซทีพ (FAA)

ประกอบด้วย formalin : acetic acid : alcohol อัตราส่วน 1 : 1 : 18

2. การดึงน้ำออกจากเซลล์

แช่สารละลายตามขั้นตอนต่อไปนี้

สารขวดที่	น้ำ (มล)	95%ETOH (มล)	buthyl alcohol (มล)	ระยะเวลา (ชม)
1.	50	40	10	2
2.	30	50	20	24
3.	15	50	35	2
4.	5	40	55	2
5.	0	25	75	2
6.	pure buthyl alcohol + eosin/fastgreen (100+5 ml)			24
7.	pure buthyl alcohol			2
8.	buthyl alcohol + paraffin oil (50 + 50 cc.)			2
9.	paraplast 1			2
10.	paraplast 2			2
11.	paraplast 3			24
12.	paraplast 4			24
13.	paraplast 5			2

3.การติดสไลด์

สารเคมีที่ใช้ในการติดสไลด์

1. formalin 3 % (ต้องไม่ตกตะกอน)
2. Haupt's adhesive ประกอบด้วย

2.1 plain knox gelatin	1	กรัม
2.2 น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
2.3 phenol crystal	2	กรัม
2.4 glycerin	15	มิลลิลิตร

เตรียมได้โดยละลายสารข้อ 2.1 ใน 2.2 ที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส เมื่อละลายแล้วเติมสารในข้อ 2.3 และ 2.4 ลงไป เมื่อละลายเข้ากันดีแล้วให้กรองสารละลายดังกล่าวเก็บไว้

4. การเตรียมสีย้อม

การเตรียมสี fastgreen

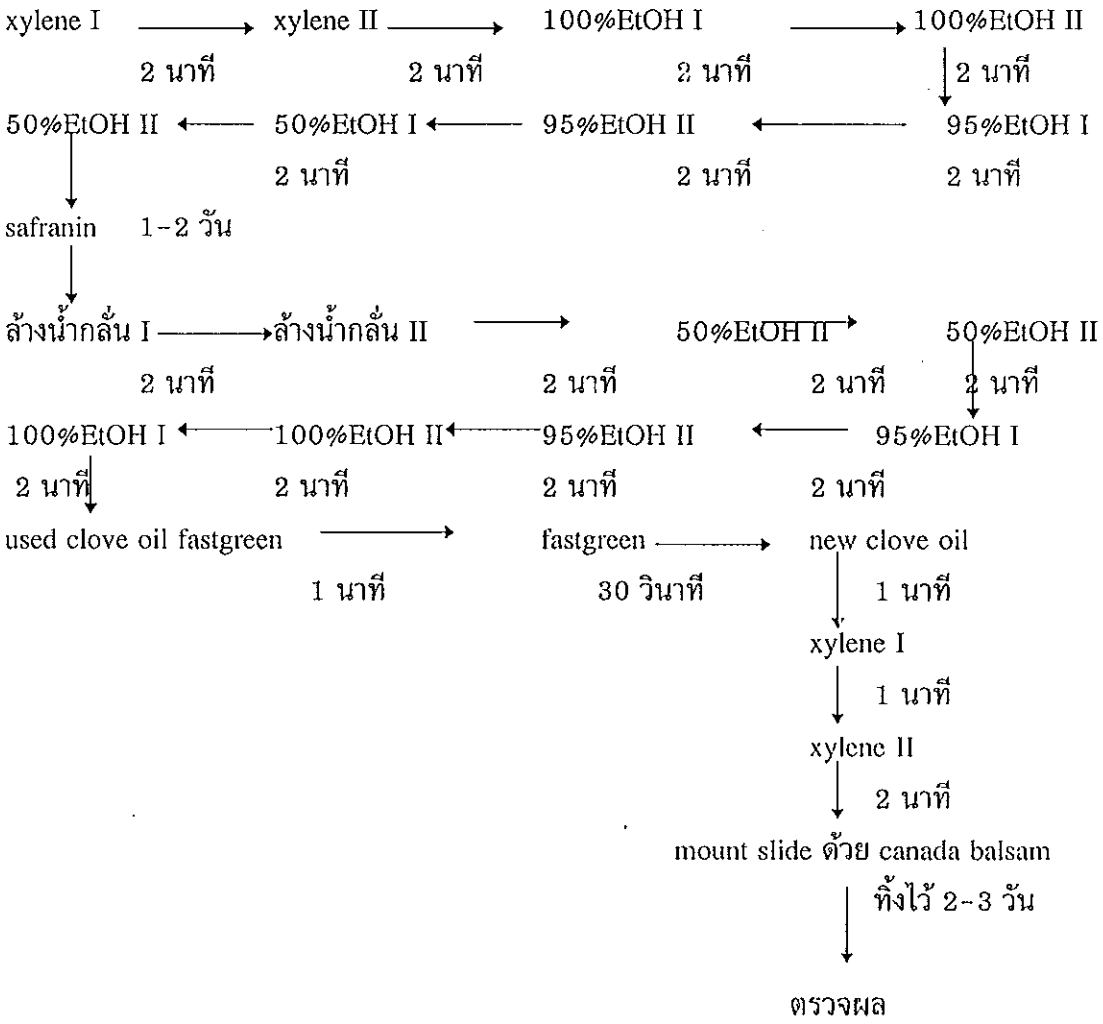
1. methyl cellosolve	50	มิลลิลิตร
2. absolute alcohol	50	มิลลิลิตร
3. clove oil	50	มิลลิลิตร
4. สี fastgreen	0.5	กรัม

การเตรียมสี safranin

1. สี safranin o	4	กรัม
2. methyl cellosolve (1-acetoxy-2-methoxy-ethane)	200	มิลลิลิตร
3. 95% ethyl alcohol	100	มิลลิลิตร
4. sodium acetate	4	กรัม
5. formalin	8	มิลลิลิตร

* สีที่เตรียมต้องนำมากรองทุกครั้งด้วยกระดาษกรอง 2-3 ครั้ง ก่อนการใช้งาน

5. วิธีการย้อมสี


xylene I
xylene II
100%EtOH I
100%EtOH II
2 นาที
2 นาที
2 นาที
2 นาที
50%EtOH II
50%EtOH I
95%EtOH II
95%EtOH I
2 นาที
2 นาที
2 นาที
safranin
1-2 วัน
ล้างน้ำกลั่น I
ล้างน้ำกลั่น II
50%EtOH II
50%EtOH II
2 นาที
2 นาที
2 นาที
2 นาที
100%EtOH I
100%EtOH II
95%EtOH II
95%EtOH I
2 นาที
2 นาที
2 นาที
2 นาที
used clove oil fastgreen
fastgreen
new clove oil
1 นาที
30 วินาที
1 นาที
xylene I
1 นาที
xylene II
2 นาที
mount slide ด้วย canada balsam
ทิ้งไว้ 2-3 วัน
ตรวจผล

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นายวิทยา พรหมมี

วัน เดือน ปี เกิด 19 เมษายน 2515

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยแม่โจ้	2538