

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเบญจมาศในสภาพหลอดทดลอง
ด้วยสารเคมี

MUTATION INDUCTION OF CHRYSANTHEMUM BY CHEMICAL
MUTAGEN *In vitro* CULTURE

วารีย์ อยู่สำราญ

VAREE YOOSUMRAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2019-AG-M-101-291

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเบญจมาศในสภาพหลอดทดลอง
ด้วยสารเคมี

MUTATION INDUCTION OF CHRYSANTHEMUM BY CHEMICAL
MUTAGEN *In vitro* CULTURE

วารีย์ อยู่สำราญ

VAREE YOOSUMRAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2562

KMITL-2019-AG-M-101-291

**MUTATION INDUCTION OF CHRYSANTHEMUM BY CHEMICAL
MUTAGEN *In vitro* CULTURE**

VAREE YOOSUMRAN

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2019

KMITL-2019-AG-M-101-291

COPYRIGHT 2019

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเบญจมาศ ในสภาพปลอดทดลองด้วยสารเคมี
ชื่อนักศึกษา	นางสาววารีย์ อยู่สำราญ
รหัสประจำตัว	57604031
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2562
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. กัญจนา แซ่เตียว

บทคัดย่อ

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยนำแคลลัสเบญจมาศสายพันธุ์วิวก (ดอกประเภท single สีขาว) มาแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 และ 120 นาที จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่าค่า LD₅₀ (60 นาที) และ LD₅₀ (120 นาที) คือ 1.15 เปอร์เซ็นต์ และ 0.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แคลลัสที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS มีขนาดแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด และจำนวนยอดต่อแคลลัสมากที่สุด เมื่อเริ่มเจริญเติบโตเป็นลำต้น พบว่าต้นที่ได้รับสารละลาย EMS 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที มีขนาดปากใบ จำนวนคลอโรพลาสต์ ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีมากที่สุด เมื่อนำออกปลูกทั้งหมด 120 ต้น พบว่าได้ต้นกลายพันธุ์ทั้งหมด 9 แบบ ดังนี้ต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS พบลักษณะของดอกประเภท single และอีกลักษณะเป็นดอกประเภท pompon ซึ่งคาดว่าเกิดจาก somaclonal variation มีกลีบดอกมีสีขาว ต้นที่ได้รับสารละลาย EMS 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที พบลักษณะของดอก 2 ประเภทได้แก่ single และ pompon มีกลีบดอกมีสีขาว ต้นที่ได้รับสารละลาย EMS 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที พบดอกประเภท single 2 แบบ มีกลีบดอกสีขาวและสีเหลืองในดอกเดียวกัน, กลีบดอกมีสีเหลือง และดอกประเภท pompon 2 แบบ มีกลีบดอกสีขาว ต้นที่ได้รับสารละลาย EMS 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 120 นาที พบดอกประเภท single มีกลีบดอกสีขาว จากการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 28 ไพรเมอร์ พบว่ามี 8 ไพรเมอร์ที่สามารถให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ และเมื่อนำมาจัดกลุ่มด้วยโปรแกรม NTSYS 2.10m สามารถจัดกลุ่มเบญจมาศได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม และผลที่ได้จากการวิเคราะห์ค่า PCoA สอดคล้องกับการวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยแผนโคจรแกรม

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยนำกลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์ซีรี่เบรท (ดอกประเภท single สีเหลือง) และสายพันธุ์แคนเทอร์ (ดอกประเภท single สีม่วง) มาแช่ในสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์พบว่าค่า LD₅₀ (12 ชั่วโมง) และ LD₅₀ (24 ชั่วโมง) ของสายพันธุ์ซีรีเบรท คือ 0.21 และ 0.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสายพันธุ์แคนเทอร์ คือ 0.2 และ 0.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กลีบดอกทั้งสองพันธุ์ที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน มีขนาดแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด และจำนวนยอดต่อแคลลัสมากที่สุด เมื่อเริ่มเจริญเติบโตเป็นลำต้น พบว่าขนาดปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อปากใบไม่แตกต่างกันทางสถิติ พันธุ์ซีรีเบรท ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 12 ชั่วโมง มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีมากที่สุด แต่พันธุ์แคนเทอร์มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีไม่แตกต่างกันทางสถิติ และพบว่ามี 1 ต้นจากทั้งหมด 30 ต้น ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.15 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง มีลำต้นสีขาว และใบด่าง คิดเป็น 3.33 เปอร์เซ็นต์การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer พบว่า พันธุ์ซีรีเบรท ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ นาน 12 ชั่วโมง จากทั้งหมด 30 ต้น มีเพียง 1 ต้น ที่มีจำนวนปริมาณดีเอ็นเอลดลงจาก 2n ลดลงเหลือ n คิดเป็น 3.33 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์แคนเทอร์พบว่าต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง จากทั้งหมด 30 ต้น มีเพียง 1 ต้น ที่พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า คิดเป็น 3.33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำออกปลูกทั้งหมด 200 ต้น พันธุ์ซีรีเบรท ได้ดอกประเภท single กลีบดอกสีเหลือง ซึ่งไม่แตกต่างจากต้นควบคุม พันธุ์แคนเทอร์ ได้ดอกประเภท single และมีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุมโดยชัดเจน 5 ต้น ได้แก่ ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีกลีบดอกสีชมพูอมส้มอ่อนๆ ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีกลีบดอกสีชมพูอมส้มอ่อนๆ กลีบดอกบานขึ้นเดียว ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีกลีบดอกสีม่วงอ่อน และสีขาว และอีกลักษณะที่พบในความเข้มข้น และเวลาที่เท่ากัน คือมีกลีบดอกสีชมพูอ่อน และมีสีขาวบริเวณขอบๆ กลีบดอก และต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีกลีบดอกสีม่วง และมีสีขาวบริเวณขอบๆ กลีบดอก และเป็นต้นที่มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (4n)

Title	Mutation Induction of Chrysanthemum by Chemical Mutagen <i>In vitro</i> Culture
Student	Miss Varee Yoosumran
Student ID	57604031
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2019
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Kanjana Saetiew

ABSTRACT

Mutation induction of chrysanthemum cv.vivic (single type) was induced using ethylmethanesulfonate (EMS). The callus was soaked in 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2% for 60 and 120 minutes. The calli were cultured on Murashige and Skoogs (MS) medium supplemented with 2 mg/l NAA and 4 mg/l kinetin. The lethal dose (LD₅₀) value for callus survival has 1.15 and 0.72% for 60 and 120 minutes. In control showed the most of callus size highest percentage of shoot induction and number of shoot/callus. Plantlets were treated with 0.5% EMS for 60 minutes showed the most of stomata size highest chloroplast number and chlorophyll a and b contents. One hundred and twenty plantlets were transferred to pot plant. There were 9 characteristic mutation. Two characters were found in control, single type and pompon type. There was expected from somaclonal variation and white petals. Plantlets were treated with 0.5% EMS for 60 minutes showed two-characters mutation, white petals single type and pompon type. Plantlets were treated with 1% EMS for 60 minutes showed two characteristics of single type has white and yellow petals, yellow petals and pompon type has white petals. The last mutation character was found in 0.5% EMS for 120 minutes showed characteristics of white petals single type. The evaluation was carried out using 28 RAPD primers. The results obtained showed 8 primers were identified 5 groups of chrysanthemum and the results from analysis of PCoA values in accordance with the analysis of grouping with dendrogram.

Mutation induction of chrysanthemum cv.celebrate and cv.canter (single type) was induced using colchicine. The petal was soaked in 0, 0.05, 0.10, 0.15 and 0.20% for 12 and 24 hours. The petal was cultured on MS medium supplemented with 2 mg/l NAA and 4 mg/l kinetin. The lethal dose (LD₅₀) value for callus survival has to 0.21 and 0.19% for 12 and 24 hours in

cv. celebrate and the lethal dose (LD_{50}) value for callus survival has to 0.2 and 0.19% for 12 and 24 hours in cv. canter. In control showed the most of callus size highest percentage of shoot induction and number of shoot/callus. There was no statistically significant different in stomata size and number of chloroplast in cv. celebrate and cv. canter. For cv.celebrate were treated with 0.1% colchicine for 12 hours showed highest chlorophyll a and b contents. But cv.canter chlorophyll a and b contents no statistically significant difference. The plantlets were treated with 0.15% colchicine for 24 hours showed white stem and chimera accounted for 3.33% of the total 30 trunks. Flow cytometer analysis showed plantlets were treated with 0.05% colchicine for 12 hours had the number of chromosome reduced from $2n$ to n accounted for 3.33% of the total 30 trunks in cv. celebrate. The chrysanthemum cv. canter plantlets treated with 0.2% colchicine for 24 hours had the doubled chromosome accounted for 3.33% of the total 30 trunks. Two hundred plantlets were transferred to pot plant. There were characteristic not different from the control in cv. celebrate. But the chrysanthemum cv. canter had single type and 5 characteristic mutation. The plantlets were treated with 0.05% colchicine for 24 hours showed pink and light orange petals. The plantlets were treated with 0.1% colchicine for 24 hours showed pink and light orange petals and single layer petal. The plantlets were treated with 0.15% colchicine for 24 hours showed two-characters mutation, light purple and white petals and light pink and white edge petals. The last mutation character was found in 0.2% colchicine for 24 hours purple and white edge petals and this plantlet has DNA doubled.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. กัญญา แซ่เตียว อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน แนะนำแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น และตรวจสอบข้อบกพร่องจนทำให้วิทยานิพนธ์นี้เกิดความสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. สุเมธ อรัญนารถ ดร. อรุมา รุ่งน้อย และ ผศ.ดร. มณฑินี ธีรารักษ์ กรรมการสอบหัวข้อ และโครงร่างวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะในการจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่มีส่วนช่วยให้การทำงานวิจัยประกอบวิทยานิพนธ์ให้ดำเนินไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนจากศูนย์วิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

ขอขอบพระคุณครอบครัว และขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาปริญญาโททุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้เป็นอย่างดีมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้หากมีข้อผิดพลาดประการใด ข้าพเจ้าขออภัยเป็นอย่างสูง ในข้อบกพร่องและความผิดพลาดนั้น และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์เล่มนี้ คงมีประโยชน์ไม่มากนักน้อยสำหรับผู้ที่มีความสนใจในด้านนี้

วาริ อยู่สำราญ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	IX
สารบัญภาพ.....	XII
สารบัญภาคผนวก.....	XIV
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเบญจมาศ.....	3
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	6
2.3 การปรับปรุงพันธุ์พืช.....	7
2.4 การกลายพันธุ์.....	8
2.5 คุณสมบัติของสารละลาย EMS.....	10
2.6 คุณสมบัติของสารละลายโคลชิซิน.....	13
2.7 ค่า LD ₅₀	15
2.8 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ในพืช.....	15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
3.1 เครื่องมือและวิธีการ.....	19
3.2 สถานที่ดำเนินงาน.....	21
3.3 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง.....	21
3.4 วิธีการดำเนินงาน.....	21

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแคลลัสเบญจมาศสายพันธุ์วิวก โดยใช้สารละลาย EMS.....	21
3.4.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกลีบดอกเบญจมาศโดยใช้ สารละลายโคลชิซิน.....	23
การทดลองที่ 2.1 กลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรท.....	23
การทดลองที่ 2.2 กลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์.....	23
3.4.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological) ที่เปลี่ยนแปลง ไปของต้นเบญจมาศที่ย้ายออกปลูกในสภาพโรงเรือน.....	24
3.4.4 ตรวจสอบลักษณะการกลายพันธุ์ของต้นเบญจมาศ.....	25
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	28
4.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแคลลัสเบญจมาศสายพันธุ์วิวก โดยใช้ สารละลาย EMS.....	28
4.1.1 อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส.....	28
4.1.2 ขนาดแคลลัส.....	28
4.1.3 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและจำนวนยอดต่อแคลลัส.....	29
4.1.4 ความสูงต้น และจำนวนใบเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อรุ่น M1 และ M2.....	32
4.1.5 ความกว้าง ความยาว จำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ และ ปริมาณคลอโรฟิลล์.....	35
4.1.6 การย้ายปลูกเบญจมาศสายพันธุ์วิวกนอกสภาพปลอดเชื้อ.....	39
4.1.7 การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเบญจมาศสายพันธุ์ วิวกด้วยเทคนิค RAPD.....	46
4.1.7.1 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism และค่า PICs จาก แต่ละคู่ไพรเมอร์.....	52
4.1.7.2 การจัดกลุ่มเบญจมาศสายพันธุ์วิวกด้วย โปรแกรม NTSYS 2.10m.....	53

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรท โดยใช้สารละลายโคลชิซิน.....	58
4.2.1 อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส.....	58
4.2.2 ขนาดแคลลัส.....	58
4.2.3 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและจำนวนยอดต่อแคลลัส.....	58
4.2.4 ความสูงต้น และจำนวนใบเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อรุ่น M1 และ M2.....	62
4.2.5 ความกว้าง ความยาว จำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ และ ปริมาณคลอโรฟิลล์.....	66
4.2.6 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer.....	70
4.2.7 การย้ายปลูกเบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรทนอกสภาพปลอดเชื้อ.....	72
4.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ โดยใช้สารละลายโคลชิซิน.....	78
4.3.1 อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส.....	78
4.3.2 ขนาดแคลลัส.....	78
4.3.3 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและจำนวนยอดต่อแคลลัส.....	78
4.3.4 ความสูงต้น และจำนวนใบเบญจมาศในสภาพ ปลอดเชื้อรุ่น M1 และ M2.....	82
4.3.5 ความกว้าง ความยาว จำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ และ ปริมาณคลอโรฟิลล์.....	86
4.3.6 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer.....	90
4.3.7 การย้ายปลูกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์นอกสภาพปลอดเชื้อ...	92
บทที่ 5 วิจัยณ์ผลการทดลอง.....	99
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	107
บรรณานุกรม	110
ภาคผนวก	117
ประวัติผู้เขียน	121

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
4.1	ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่ออัตราการรอดชีวิตของแคลลัสเบญจมาศสายพันธุ์วิวก ภายหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	30
4.2	ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ของเบญจมาศสายพันธุ์วิวกต่อความกว้าง ความยาวของแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด/แคลลัส ภายหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	31
4.3	แสดงความสูงต้น และจำนวนใบ ของเบญจมาศสายพันธุ์วิกรุ่น M1 และรุ่น M2 ที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	34
4.4	ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่อขนาดปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์เบญจมาศสายพันธุ์วิวก ภายหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	37
4.5	ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์เบญจมาศสายพันธุ์วิวกภายหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	38
4.6	แสดงอัตราการรอดชีวิตหลังจากย้ายปลูกเบญจมาศสายพันธุ์วิวก เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์.....	44
4.7	แสดงความสูง จำนวนใบ จำนวนดอก และขนาดของดอกเบญจมาศสายพันธุ์วิวก หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์.....	45
4.8	ชนิดและลำดับเบสของไพรเมอร์อาร์เอพีดีที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของเบญจมาศสายพันธุ์วิวก ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	47
4.9	จำนวนแถบดีเอ็นเอจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเบญจมาศสายพันธุ์วิวกที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยเทคนิค RAPD จำนวน 8 ไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism จากแต่ละไพรเมอร์.....	52
4.10	ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของเบญจมาศสายพันธุ์วิวก 26 ตัวอย่าง จากการคำนวณด้วยวิธี Jaccard's coefficient โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.10m.....	54
4.11	แสดงการจัดกลุ่มของต้นเบญจมาศสายพันธุ์วิวกที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาที่แตกต่างกันที่ได้จาก Phylogenetic tree.....	56

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.12 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิตของแคลลัสเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรท ภายหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	60
4.13 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ของเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรทต่อความกว้าง ความยาวของแคลลัสเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด/แคลลัส ภายหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	61
4.14 แสดงความสูงต้น และจำนวนใบ ของเบญจมาศสายพันธุ์ ซีรีเบรทรุ่น M1และรุ่น M2 ที่เลี้ยงบน อาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	65
4.15 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่อขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ เบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรท ภายหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	68
4.16 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์เบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรทภายหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์...	69
4.17 แสดงอัตราการรอดชีวิตหลังจากย้ายปลูกเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรท เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์.....	76
4.18 แสดงความสูง จำนวนใบ จำนวนดอก และขนาดของดอก เบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรท หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์.....	77
4.19 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่ออัตราการรอดชีวิตของแคลลัสเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ ภายหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	80
4.20 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ของเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ ต่อความกว้าง ความยาวของแคลลัสเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด/แคลลัส ภายหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	81
4.21 แสดงความสูงต้น และจำนวนใบ ของเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์รุ่น M1 และรุ่น M2 ที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	85

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.22 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่อขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์เบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	88
4.23 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์เบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	89
4.24 แสดงอัตราการรอดชีวิตหลังจากย้ายปลูกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์.....	97
4.25 แสดงความสูง จำนวนใบ จำนวนดอก และขนาดของดอกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์.....	98

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	ลักษณะดอกเบญจมาศ 12 ชนิด..... 5
3.1	เบญจมาศทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง..... 19
3.2	การตัดกลีบดอกเบญจมาศขนาด 0.5 เซนติเมตร ที่นำไปใช้ในการทดลอง..... 22
4.1	กราฟอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ Kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 29
4.2	ต้นเบญจมาศสายพันธุ์วิจิตร M1 และ M2 ในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 33
4.3	ขนาดของปากใบและจำนวนคลอโรพลาสต์ของต้นเบญจมาศสายพันธุ์วิจิตรในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 36
4.4	ต้นเบญจมาศสายพันธุ์วิจิตร M2 หลังจากย้ายปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ 41
4.5	ลักษณะของใบเบญจมาศสายพันธุ์วิจิตรหลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 42
4.6	ลักษณะของดอกเบญจมาศสายพันธุ์วิจิตรหลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 11 สัปดาห์..... 42
4.7	ลักษณะของดอกเบญจมาศสายพันธุ์วิจิตรหลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 11 สัปดาห์ที่จังหวัดเชียงใหม่..... 43
4.8	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-07..... 48
4.9	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-08..... 48
4.10	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPB-07..... 49
4.11	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF-06..... 49
4.12	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF-08..... 50
4.13	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF-13..... 50
4.14	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF-14..... 51
4.15	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF-18..... 51
4.16	Phylogenetic tree ของเบญจมาศสายพันธุ์วิจิตรที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน และนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10m โดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิค RAPD..... 55
4.17	การกระจายตัวของเบญจมาศสายพันธุ์วิจิตร 26 ตัวอย่างแบบ 2 มิติ ที่ได้จากการวิเคราะห์ Principal Coordinates Analysis (PCoA) โดยเครื่องหมาย RAPD 57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.18 กราฟอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัม ต่อลิตร และ Kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	59
4.19 ต้นเบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรทรุ่น M1 ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	63
4.20 ต้นเบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรทรุ่น M2 ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	64
4.21 ขนาดของปากใบและจำนวนคลอโรพลาสต์ของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรทในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	67
4.22 ลักษณะกราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรท.....	71
4.23 ต้นเบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรทหลังจากย้ายปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	73
4.24 ลักษณะของใบเบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรทหลังจากย้ายปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	74
4.25 ลักษณะของดอกเบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรทหลังจากย้ายปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์....	75
4.26 กราฟอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัม ต่อลิตรและ Kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	79
4.27 ต้นเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์รุ่น M1 ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	83
4.28 ต้นเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์รุ่น M2 ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	84
4.29 ขนาดของปากใบและจำนวนคลอโรพลาสต์ของต้นเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	87
4.30 ลักษณะกราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์.....	91
4.31 ต้นเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์หลังจากย้ายปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	94
4.32 ต้นเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ (ต้นต่าง) หลังจากย้ายปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	95
4.33 ลักษณะของใบเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์หลังจากย้ายปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์...	95
4.34 ลักษณะของดอกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 11 สัปดาห์.....	96

สารบัญภาคผนวก

	หน้า
1.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige and Skoog. 1962).....	118
1.2 การเตรียมบัฟเฟอร์ CTAB	119
1.3 การเตรียมสารละลาย TE (Tris-EDTA) buffer.....	119
1.4 การเตรียมสารละลาย TAE (Tris acetate EDTA) buffer.....	119
1.5 การเตรียม Ethidium bromide.....	120

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

เบญจมาศ (*Dendranthema grandiflora*) เป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของโลก เป็นไม้ตัดดอกเมืองหนาว มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีนและตอนเหนือของประเทศญี่ปุ่น เป็นไม้ดอกที่มีความสวยงามมาก มีสีสันสดใส และมีหลายสายพันธุ์ (อดิศร กระแสชัย, 2535) ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกเบญจมาศประมาณ 2,000 ไร่ ผลผลิตของประเทศไทยประมาณ 150 ล้านช่อ/ปี แหล่งผลิตเบญจมาศที่สำคัญ ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย เพชรบูรณ์ สระบุรี หนองคาย อุดรธานี ขอนแก่น นครราชสีมา อุบลราชธานี และยะลา เบญจมาศสามารถผลิตได้ดีในพื้นที่ราบสูงของภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือในช่วงฤดูหนาว ซึ่งจะให้ผลผลิตในช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนมีนาคม ส่วนพื้นที่ที่มีการผลิตทั้งปีจะผลิตภายในโรงเรือนพลาสติกบนที่สูง แหล่งผลิตเบญจมาศที่สำคัญส่วนใหญ่อยู่ที่จังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย (มณฑกาพ ถีลา, 2555) ในการปรับปรุงพันธุ์เบญจมาศมุ่งเน้นการปรับปรุงทางด้านคุณภาพของดอก สี ขนาด เพื่อให้ดอกมีคุณภาพดี มีสีสันที่สวยงาม อายุการปักแจกันที่นานขึ้น รวมถึงการต้านทานต่อโรค แมลง และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จะสามารถผลิตดอกเบญจมาศเพื่อบริโภคภายในประเทศแข่งขันกับตลาดต่างประเทศทำเงินรายได้เข้าประเทศมูลค่าประมาณ 8,007,118 บาท (สถิติการส่งออกเบญจมาศ, 2559) ดังนั้นจึงมีการใช้เทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากจะสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้รวดเร็วแล้ว ยังสามารถชักนำให้การกลายพันธุ์ในหลอดทดลองโดยใช้กลีบดอก ช่อ และตาในการขยายพันธุ์ (Teixeira da Silva *et al.* 2015)

การกลายพันธุ์ เป็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสิ่งมีชีวิต อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม และลักษณะที่เปลี่ยนแปลงสามารถถ่ายทอดสู่ลูกหลานได้ ยังเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต มีประโยชน์ในการช่วยเพิ่มความแปรปรวนในพืชซึ่งเพิ่มความสำเร็จ กลายพันธุ์ สามารถทำได้โดยกระบวนการทางกายภาพ และทางเคมี ในทางกายภาพ ได้แก่ การใช้รังสีต่างๆ เช่น รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา รังสีอัลตราไวโอเล็ต เป็นต้น ส่วนทางเคมี ได้แก่ เอทิลซัลเฟต (dES: diethyl sulphate) 5 – โบร โมยูเรซิล (5-bromouracil) สารละลายเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS :ethyl methanesulphonate) และสารละลายโคลชิซิน (Colchicine) เป็นต้น

การชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลาย EMS และ สารละลายโคลชิซินเป็นที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในระดับยีน ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุศาสตร์ ซึ่งนำมาสู่การใช้สารละลาย EMS และสารละลายโคลชิซินกับต้นเบญจมาศ

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของสารละลายเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) และสารละลายโคลชิซิน (Colchicine) ต่อการกลายพันธุ์ของเบญจมาศ ในสภาพปลอดเชื้อ

1.2.2 เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเบญจมาศที่เปลี่ยนแปลงไปและตรวจสอบการกลายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ และโครโมโซม

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ทำการศึกษาการกลายพันธุ์ของเบญจมาศสายพันธุ์วิวิค โดยนำแคลัสมาแช่ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาของสารที่แตกต่างกัน และศึกษาการกลายพันธุ์เบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรทและสายพันธุ์แคนเทอร์ โดยนำกลีบดอกมาแช่ในสารละลายโคลชิซิน ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาของสารที่แตกต่างกัน

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ในการแช่ชิ้นส่วนของสารละลาย EMS และสารละลาย Colchicine ที่เหมาะสมต่อการกลายพันธุ์ของเบญจมาศ

1.4.2 ได้ต้นเบญจมาศที่มีลักษณะใหม่ที่เกิดจากการกลายพันธุ์

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเบญจมาศ

เบญจมาศมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Dendranthema grandiflora* วงศ์ Compositae ชื่อสามัญ Chrysanthemum และเป็นไม้ดอกมีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศจีนและญี่ปุ่น โดยจะผลิตเป็นไม้ตัดดอก หรือไม้กระถางขึ้นอยู่กับชนิดของเบญจมาศ ซึ่งในปัจจุบันมีการพัฒนาพันธุ์เบญจมาศกระถางมากมาย นอกจากจะมีความหลากหลายของสีแล้ว ยังมีความหลากหลายในเรื่องของรูปทรงดอก ลักษณะการเจริญเติบโตและการแตกพุ่ม เบญจมาศเป็นไม้ขนาดเล็กสูงประมาณ 1-3 ฟุต ตามกิ่งก้านและลำต้นมีขนละเอียด ใบเป็นใบเดี่ยวเรียวยาว ขอบใบหยักมีสีเขียวอ่อนนุ่มมีขนอ่อนๆ ทั่วทั้งใบ แตกกิ่งมาก การเรียงตัวของใบเป็นแบบ spiral หรือ vacates สามารถแตกหน่อใหม่ได้ ดอกกลม กลีบดอกจะซ้อนกันมีหลากหลายสี เช่น สีแดง สีบานเย็น สีขาว สีม่วง สีชมพู สีเหลือง สีส้ม และอื่นๆ ดอกเบญจมาศเป็นดอกชนิด inflorescence ซึ่งแต่ละดอกในช่อ ประกอบด้วยดอกย่อย (floret) 2 ชนิด คือ ชนิดแรก ดอกย่อยชั้นนอกของฐานรองดอก (ray floret) เป็นดอกเพศเมีย ซึ่งจำนวนชั้นของดอกเพศเมียขึ้นอยู่กับชนิดของดอกว่าเป็นดอกชั้นเดียว (single) ดอกซ้อน (double) หรือชนิดอื่นๆ และชนิดที่สองดอกย่อยชั้นใน (disc floret) ที่อยู่ถัดจากดอกย่อยชั้นนอกเข้ามาครอบคลุมพื้นที่ส่วนกลางของฐานรองดอก เป็นดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) มีทั้งเกสรตัวผู้ (stamen) ซึ่งมีส่วนที่อยู่บนสุดเรียกว่า อับละอองเรณู (anther) และเกสรตัวเมีย (carpel) มีส่วนที่อยู่บนสุดเรียกว่า ยอดเกสรตัวเมีย (stigma) ซึ่งจำนวนชั้นของดอกจะสัมพันธ์กับดอกเพศเมีย เช่น ดอกชั้นเดียว (single) จะมีชั้นของกลีบดอกย่อยชั้นนอก 2-5 ชั้น พื้นที่ส่วนใหญ่ของฐานรองดอกจะถูกคลุมไปด้วยดอกย่อยชั้นใน ส่วนในดอกซ้อน (double) จะมีดอกย่อยชั้นนอกเป็นจำนวนน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับดอกย่อยชั้นในที่มีอยู่ เป็นต้น ทั้งดอกย่อยชั้นนอกและชั้นในแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ กลีบดอก (corolla) และกลีบใบหุ้มดอก (calyx) เบญจมาศมีทั้งที่เป็น พืชล้มลุก (annual) พืชสองปี (biennial) และพืชยืนต้น (perennial) แต่นิยมปลูกเป็นพืชปีเดียว เพราะต้นเบญจมาศจะโทรมเร็ว มีอายุ 90-150 วัน และเป็นพืชไวต่อความยาวของวันหรือช่วงแสง โรคและแมลงเข้าทำลายง่ายเมื่ออยู่ในพื้นที่ปลูกเป็นระยะเวลานาน สามารถขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด การปักชำ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (อดิศร กระแสชัย, 2535)

2.1.1 การจำแนกลักษณะของดอกเบญจมาศ

ลักษณะของดอกเบญจมาศ ซึ่งแบ่งโดย “National Chrysanthemum Society, USA” จำแนกออกได้เป็น 12 ชนิด ดังนี้

2.1.1.1 Irregular incurve เป็นดอกที่มีขนาดใหญ่ ความกว้างและความสูงของดอกมีขนาดใกล้เคียงกัน กลีบดอกย่อยวงนอกกว้าง และโค้งงุ้มเข้าหาใจกลางดอกอย่างมีระเบียบ และสวยงาม กลีบดอกย่อยวงนอกเรียงแบบหลวมๆ และห้อยลงมาด้านล่าง (ภาพที่ 2.1A)

2.1.1.2 Regular incurve ลักษณะดอกคล้ายแบบ Irregular incurve เพียงแต่กลีบดอกวงนอกมีลักษณะแคบถึงกว้าง กลีบดอกย่อยวงนอกจัดเป็นระเบียบและไม่ห้อยลงด้านล่าง (ภาพที่ 2.1B)

2.1.1.3 Intermediate incurve กลีบดอกย่อยวงนอกมีขนาดแคบถึงกว้างคล้ายกับ Regular incurve แต่ขนาดจะสั้นกว่าและกลีบดอกโค้งเข้า เฉพาะส่วนปลายกลีบเท่านั้น (ภาพที่ 2.1C)

2.1.1.4 Decorative ดอกมีขนาดตั้งแต่ดอกใหญ่ถึงขนาดดอกเล็ก กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสั้น และกว้างกว่าประเภท incurve กลีบดอกวงนอกมักห้อยลงมาด้านล่างคล้ายกับแต่กลีบดอกวงในโค้งเข้า จึงทำให้รูปทรงของดอกแบน (ภาพที่ 2.1D)

2.1.1.5 Reflex กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีขนาดตั้งแต่แคบจนถึงกว้าง และยาวคล้ายแบบ incurve กลีบดอกไม่งุ้มเข้าหาใจกลางดอก แต่ห้อยลงด้านล่าง (ภาพที่ 2.1E)

2.1.1.6 Pompon กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสั้นและกว้าง โค้งงุ้มเข้าหาใจกลางดอกทั้งแบบที่เป็นระเบียบและไม่เป็นระเบียบ เมื่อดอกบานจะไม่เห็นดอกย่อยวงใน จึงทำให้ดอกมีลักษณะกลมมนสวยงาม (ภาพที่ 2.1F)

2.1.1.7 Single กลีบดอกของดอกย่อยวงนอก มีเพียง 1-5 ชั้นเท่านั้น และเรียงตัวทำมุมฉากกับก้านดอก กลีบดอกของดอกย่อยวงในไม่พัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก (ภาพที่ 2.1G)

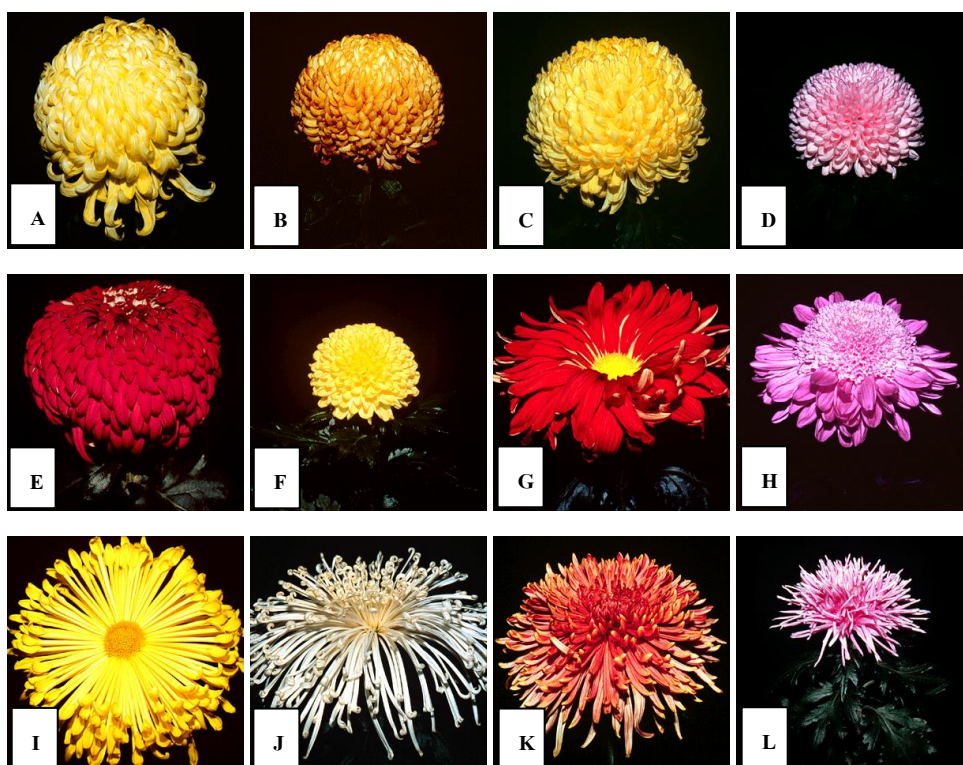
2.1.1.8 Anemone กลีบดอกย่อยวงนอกและวงในมีการจัดเรียงตัวของกลีบดอกคล้ายกับ Single และรวมตัวกันเป็นกระจุกเห็นเด่นชัด (ภาพที่ 2.1H)

2.1.1.9 Spoon กลีบดอกของดอกช่อขวงนอก มีลักษณะเป็นหลอดและตรงแต่ปลายกลีบจะคลี่แผ่ออกทำให้มองดูคล้ายช้อน การเรียงตัวเป็นระเบียบ ขนาดใกล้เคียงกัน กลีบดอกช่อขวงในไม่พัฒนา รวมตัวเป็นกระจุกอยู่ตรงกลางดอก (ภาพที่ 2.1I)

2.1.1.10 Spider รอบนอกของกลีบดอกช่อขวงนอกยาวมาก และมีลักษณะเป็นหลอดขนาดเล็กห้อยลงมาด้านล่าง ส่วนรอบในมีขนาดสั้น และยาว ปลายกลีบดอกม้วนงอแบบคอคกลมหรือเป็นตะขอ (ภาพที่ 2.1J)

2.1.1.11 Quill กลีบดอกของดอกช่อขวงนอกเป็นหลอดตรงและสั้นกว่าแบบ Spider ปลายกลีบดอกเปิดออกเป็นรูกลวง (ภาพที่ 2.1K)

2.1.1.12 Brush and Thistle ดอกมีขนาดเล็กกลีบดอกของดอกช่อขวงนอกเป็นแบบหลอดขนาดเล็ก การจัดเรียงตัวของกลีบดอกตั้งตรงขนานกับก้านดอก (ภาพที่ 2.1L)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะดอกเบญจมาศ 12 ชนิด (A) Irregular incurve (B) Regular incurve (C) Intermediate incurve (D) Decorative (E) Reflex (F) Pompon (G) Single (H) Anemone (I) Spoon (J) Spider (K) Quill และ (L) Brush and Thistle

ที่มา: National Chrysanthemum Society, USA

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคโนโลยีที่มีประโยชน์อย่างมาก ในการขยายพันธุ์พืช หรือปรับปรุงพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ การเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช ไม่ว่าจะเป็นอวัยวะ เนื้อเยื่อเซลล์หรือเซลล์ที่ไม่มีผนัง (protoplast) มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และอยู่ในสภาวะควบคุมสิ่งแวดล้อม ส่วนของพืชเหล่านี้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้หลายรูปแบบ คือ เป็นต้นโดยตรง หรือเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ เรียกว่าแคลลัส (callus) หรือ เกิดเป็นคัพภะ เรียกว่าโซมาติกเอมบริโอ (somatic embryo) และเมื่อตัดเป็นชิ้นๆ แล้วเปลี่ยนอาหารก็สามารถเพิ่มปริมาณได้ไม่มีที่สิ้นสุด จะได้ต้นจำนวนมากที่ลักษณะเหมือนกันทุกประการ (รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ. 2541)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะประสบความสำเร็จมากน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างที่มีบทบาทควบคุมการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืช สรุปได้ ดังนี้

2.2.1 ปัจจัยภายในพืช (endogenous factors)

2.2.1.1 ลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) คือ การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อไปเป็นยอดหรือรากนั้นขึ้นอยู่กับชนิดพืช พืชบางชนิดอาจเกิดเป็นยอดหรือรากได้ง่าย ในขณะที่พืชอีกชนิดหนึ่งเกิดได้ยาก แม้จะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของพันธุกรรม

2.2.1.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (phytohormone) ในชิ้นส่วนพืช สฮอร์โมนบางชนิดอาจจะช่วยส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชและสฮอร์โมนบางชนิดก็สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้เช่นกัน

2.2.2 ปัจจัยภายนอก (exogenous factors)

2.2.2.1 แสง (light) แสงไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการปรุงอาหารของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงแต่แสงช่วยให้เนื้อเยื่อมีการพัฒนาไปเป็นส่วนต่างๆ ของพืชได้ ซึ่งการให้แสงควรพิจารณา ดังนี้ คุณภาพของแสง ความเข้มข้นของแสง และระยะเวลาในการให้แสง

2.2.2.2 อุณหภูมิ (temperature) โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อจะประมาณ 25 องศาเซลเซียส

2.2.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) การเกิดเป็นต้น รากหรือแคลลัสของพืชแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความสมดุลของปริมาณออกซินและไซโตไคนินในอาหาร

2.2.3 ปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเลี้ยง สภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและส่วนประกอบของอาหาร (รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ. 2541)

2.3 การปรับปรุงพันธุ์พืช

การปรับปรุงพันธุ์พืชเป็นวิทยาศาสตร์ประยุกต์สาขาหนึ่ง ที่ต้องการความรู้ในสาขาวิชาอื่นๆ มาประยุกต์ใช้ให้เกิดความสำเร็จตามวัตถุประสงค์ เช่น พันธุศาสตร์ เซลล์พันธุศาสตร์ การจำแนกพืช พืชไร่นา นิเวศวิทยา เคมี ปฐพีวิทยา สถิติ สรีรวิทยาของพืช เป็นต้น การปรับปรุงพันธุ์พืชเริ่มมาตั้งแต่เมื่อมนุษย์รู้จักปลูกพืชเป็นอาหาร ในสมัยนั้นการปรับปรุงพันธุ์ถูกจัดว่าเป็นศิลปะอย่างหนึ่งที่ต้องอาศัยการสังเกตและความชำนาญของเกษตรกร เนื่องจากเกิดการสังเกตความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในประชากรพืช ทำให้ทราบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติโดยลักษณะใหม่ที่เป็นประโยชน์จะถูกคัดเลือกไว้ทำพันธุ์ต่อไป วิธีคัดเลือกลักษณะนี้ทำมาช้านานแล้ว แต่เนื่องจากลักษณะที่เกิดขึ้นใหม่มีโอกาสเกิดขึ้นเองได้น้อยมาก ส่งผลทำให้การปรับปรุงพันธุ์เป็นไปได้ช้า ในระยะต่อมามีวิธีการใหม่ๆ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ การฉายรังสี การเพิ่มชุดโครโมโซม การผสมพืชข้ามชนิด หรือข้ามสกุล การใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพทำการถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่พืช และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งวิธีการดังกล่าวช่วยให้ปรับปรุงพันธุ์พืชตามวัตถุประสงค์ได้ผลดีและรวดเร็วขึ้น (กฤษฎา สัมพันธรักษ์, 2546; นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์, 2546) ในการปรับปรุงพันธุ์พืชใดๆ หรือการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อวัตถุประสงค์ใดๆ จะมีกระบวนการที่เป็นแบบแผนเดียวกันคือ

2.3.1 การรวบรวมพันธุ์พืช คือการเก็บรวบรวมแหล่งพันธุกรรมของลักษณะที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์ ได้แก่ แหล่งพันธุกรรมที่ได้จากพันธุ์ปลูก พันธุ์ป่า พันธุ์พืชที่อยู่ในชนิดหรือสกุลเดียวกัน ทั้งที่หาได้ในประเทศและต่างประเทศ เป็นต้น

2.3.2 การคัดเลือก ทำการคัดเลือกพืชที่มีลักษณะที่ต้องการจากพันธุ์ และประชากรที่รวบรวมได้โดยปลูกแล้วคัดเลือก

2.3.3 การผสมพันธุ์ คือการนำสายพันธุ์หรือประชากรที่นำมาคัดเลือกว่ามีลักษณะที่ดีมาทำการผสมกัน เพื่อให้เกิดการกระจายตัวและรวมตัวใหม่ของยีนในชั่วลูกหลาน

2.3.4 การทำให้กลายพันธุ์ และการเพิ่มชุดโครโมโซม เป็นวิธีที่ทำให้เกิดลักษณะใหม่โดยใช้สารเคมีหรือรังสี สารเคมีที่ใช้ เช่น โคโลซิซิน และ EMS เป็นต้น ส่วนรังสีที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงระดับยีนได้ เช่น รังสีนิวตรอน รังสีเบต้า และรังสีแกมมา เป็นต้น

2.3.5 การใช้เทคโนโลยีชีวภาพ คือการนำยีนควบคุมลักษณะที่ต้องการเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรง จากนั้นนำเซลล์พืชมาเพาะเลี้ยงจนได้ต้นที่สมบูรณ์

2.4 การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ คือ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมภายในเซลล์ การกลายพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับการสูญหายไปของส่วนของยีน หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) ส่วนการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนส่วนของโครโมโซม การสูญหายไปหรือการเพิ่มเข้ามาของส่วนโครโมโซมที่ครอบคลุมมากกว่าหนึ่งยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของโครโมโซม (chromosome mutation) (สิรินุช ลามศรีจันทร์, 2540)

2.4.1 การกลายพันธุ์ของยีนเป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของยีนที่เกี่ยวข้องกับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide base) เพียงไม่กี่โมเลกุล ในยีนหนึ่งๆ สามารถทำให้สารทางพันธุกรรมของยีนนั้นต่างไปจากเดิม การกลายพันธุ์ของยีนแบ่งตามการเกิดได้ 2 ชนิด คือ

2.4.1.1 frameshift mutation การเพิ่มหรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จากโมเลกุลดีเอ็นเอเพียง 1 โมเลกุล สามารถทำให้กรอบการอ่านของรหัสที่ละ 3 โมเลกุล เปลี่ยนไปจากเดิม เป็นผลให้โปรตีนที่สร้างจากยีนดังกล่าวผิดไปจากเดิม ทำให้ไม่สามารถทำงานได้เหมือนเดิม หรือทำงานไม่ได้เลย

2.4.1.2 base substitution การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการแทนที่คู่เบส มีการเข้าแทนที่คู่เบสด้วยเบสอื่นในกลุ่มเดียวกัน เรียกว่า ทรานซิชัน (transition) ส่วนการเปลี่ยนแปลงแบบสลับคู่ของเบสที่ต่างกลุ่มกัน เรียกว่า ทรานสเวอร์ชัน (transversion) การกลายพันธุ์ของยีนแบบเบสซัพสตีติวชัน มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า การกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation)

2.4.2 การกลายพันธุ์ของโครโมโซม คือการเปลี่ยนแปลงจำนวนหรือโครงสร้างของโครโมโซม แบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่

2.4.2.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม (changes in the structure of chromosome) คือการขาดหายไปของส่วนของโครโมโซม (deletion หรือ deficiency) ทำให้ยีนจำนวนหนึ่งขาดหายไปด้วย หรือการที่มียีนหรือส่วนของโครโมโซมเพิ่มเข้ามามากกว่าปกติ (duplication) หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงกลับทิศทางของส่วนของโครโมโซม (inversion) หรือเกิดการย้ายสลับที่ระหว่างส่วนของโครโมโซมที่ต่างคู่กัน (translocation) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้มีผลมากน้อยต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของยีน และจำนวนยีนที่เกี่ยวข้อง

2.4.2.2 การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม (changes in the number of chromosome) เกิดจากความผิดปกติในกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) โดยที่โครโมโซมที่เป็นคู่กันคู่ใดคู่หนึ่งไม่แยกจากกัน เรียกว่า นอนดิสจังก์ชัน (nondisjunction) หรืออาจเกิดจากการยับยั้งการเคลื่อนที่ของโครโมโซมไปยังขั้วของเซลล์ในระยะแอนาเฟส (anaphase) ทำให้เซลล์สืบพันธุ์บางเซลล์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น และบางเซลล์มีจำนวนโครโมโซมน้อยกว่าปกติเมื่อมีการผสม

พันธุ์ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ปกติหรือผิดปกติด้วยกันก็ตาม ทำให้ได้ต้นลูกที่เกิดใหม่มีความผิดปกติในจำนวนโครโมโซม

2.4.3 สาเหตุของการกลายพันธุ์มี 2 ประการ คือ

2.4.3.1 การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ คือเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยมนุษย์ไม่มีส่วนเกี่ยวข้อง สาเหตุของการกลายตามธรรมชาติไม่เป็นที่แน่ชัดไม่สามารถบอกได้ว่ามาจากปัจจัยใดปัจจัยหนึ่ง หรือหลายๆ ปัจจัยร่วมกัน อาจเป็นผลของปัจจัยภายในเซลล์ของพืชเองหรืออาจเกิดจากสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นปัจจัยภายนอกและเกิดขึ้นในอัตราค่อนข้างต่ำ

2.4.3.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยสิ่งก่อกลายพันธุ์ คือสิ่งก่อกลายพันธุ์แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี กับสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ สำหรับสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมีคือสารเคมีหลายชนิดที่สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ในสิ่งมีชีวิต โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยีน หรือจำนวนชุดโครโมโซมสารเคมีที่มีการศึกษาและนิยมใช้อย่างกว้างขวางในการทำให้เปลี่ยนแปลงที่มียีนมี 4 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก คือสารเคมีที่มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกับเบสในดีเอ็นเอ กลุ่มสอง คือกลุ่มที่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับเบสในดีเอ็นเอ กลุ่มสามคือสารที่สามารถเข้าแทนที่เบส purine ในสายดีเอ็นเอได้ เช่น พวก alkylating agents และ กลุ่มสี่คือสารที่มีคุณสมบัติในการลดหรือเพิ่มเบสในดีเอ็นเอ เช่น acridine สำหรับสารเคมีที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมหรือพอลิพลอยด์ คือโคลชิซิน (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2550) ส่วนสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา รังสีอัลตราไวโอเล็ต และอนุภาคนิวตรอน รังสีมีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยมีผลตั้งแต่ระดับโมเลกุลไปจนกระทั่งถึงระดับเซลล์ เนื้อเยื่อและอวัยวะ ผลทางตรงได้แก่ การที่รังสีที่เกิดจากการแตกตัวของประจุ ทำลายโมเลกุลของสารต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ หรือเป็นองค์ประกอบของเซลล์ เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิก โดยเฉพาะดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นสารที่เก็บข้อมูลและถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ส่วนผลทางอ้อม คือ รังสีจะทำให้ น้ำซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของเซลล์สิ่งมีชีวิตถูกไอออไนซ์ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นอาจรวมตัวกับ โมเลกุลอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ที่อยู่ในเซลล์ ทำให้โครงสร้างทางเคมีของสารนั้นเปลี่ยนแปลงไป หรืออนุมูลอิสระอาจรวมตัวกันใหม่กลายเป็นสารอื่นๆ ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์หรือสารต่างๆ ภายในเซลล์ จากผลของอนุมูลอิสระดังกล่าว อาจทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต จนกระทั่งถึงตายได้ (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2550)

2.4.4 การกลายพันธุ์เนื่องจาก การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ มักทำให้ได้พืชที่กลายพันธุ์ในระดับต่างๆ กัน อัตราการกลายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อในสารอาหาร ขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ใช้เพาะเลี้ยง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง โดยปกติเนื้อเยื่อจากตาข้าง (axillary bud) ปลายยอด (shoot tip) และเนื้อเยื่อที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (meristem) อื่นๆ มีอัตราการกลายพันธุ์ต่ำ อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการแยกเนื้อเยื่อดังกล่าว และเพาะเลี้ยงต่อไป เพื่อการขยายพันธุ์

หรือแยกเนื้อเยื่อออกจากกันเพื่อให้ได้เซลล์อิสระ หรือย่อยผนังเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ไร้ผนัง (protoplast) พืชที่ได้จากเนื้อเยื่อเซลล์เหล่านี้ มักมีอัตราการกลายพันธุ์สูง และอัตราการกลายพันธุ์จะเพิ่มมากยิ่งขึ้น เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสารอาหารนานขึ้น ก่อนที่จะกระตุ้นให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อพัฒนาเป็นต้นพืช เรียกความแปรปรวนทางพันธุกรรม ที่เกิดจากกลุ่มของเซลล์ (callus) ที่เลี้ยงในสารอาหารว่า somaclonal variation ถ้าเกิดจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนัง เรียกว่า protoclonal variation ถ้าเกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อสืบพันธุ์ เรียกว่า gametoclonal variation สภาพแวดล้อมในสารอาหารประกอบกับกระบวนการพัฒนาย้อนกลับ (dedifferentiation) และกลับมาพัฒนาใหม่ (redifferentiation) ของเซลล์ เป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ ในบางกรณีการกลายพันธุ์ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ และเนื้อเยื่อ อาจเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ แต่กลับเป็นผลเสียต่อการขยายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงเซลล์อิสระ (single cell) ก่อนหรือหลังการเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ ช่วยให้หลีกเลี่ยงปัญหา การเกิดเซลล์ผิดปกติปนอยู่กับเซลล์ปกติ (chimera) และช่วยให้การค้นหาพืชกลายพันธุ์ที่มีเซลล์ผิดปกติล้วนๆ (uniform mutant) สะดวกยิ่งขึ้น จำนวนของเซลล์ในสารอาหารสามารถเพิ่มปริมาณได้นับล้านอย่างรวดเร็ว ช่วยเพิ่มโอกาสที่จะได้เซลล์กลายพันธุ์มากยิ่งขึ้น (รังสฤษฎี กาวิฑีระ. 2541)

2.5 คุณสมบัติของสารละลาย ethyl methanesulphonate (EMS)

สารละลาย ethyl methanesulphonate (EMS) มีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OC}_2\text{H}_5$ เป็นของเหลวใสไม่มีสี มีความหนาแน่น เท่ากับ 1.203 (g/ml) มีจุดเดือดเท่ากับ 85-86 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 10 มิลลิเมตรของปรอท มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 124 ละลายน้ำได้ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารเคมีที่นิยมใช้มากที่สุดในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และใช้ได้ผลดีกับพืชหลายชนิด EMS ประกอบด้วยหมู่เอทิล (C_2H_5 : ethyl group) 1 หมู่ จะถูกถ่ายให้กับโมเลกุลของดีเอ็นเอในปฏิกิริยาแอลคิลเลชัน (alkylation) สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับเบสพิวรีนและไพริมิดีน รวมทั้งหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาแอลคิลเลชันจะเกิดมากที่สุดที่ตำแหน่ง N-7 ของเบสกวานีน (G) ภายหลังทำปฏิกิริยาแล้วกลายเป็น 7-เอทิลกวานีน (7-ethylguanine) หรือที่เรียกว่า แอลคิลเลเตดกวานีน (alkylated guanine) วิธีการที่สาร EMS ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ซึ่งรายงานโดย Iaea *et. al.* (1977) มีดังต่อไปนี้ เช่น ทำให้เกิดการเข้าแทนที่คู่เบส โดยการที่มีหมู่เอทิลมาอยู่ในโมเลกุลของ guanine ทำให้คุณสมบัติในการเกิด ionization ที่แตกต่างไปจากปกติ จึงเกิดการจับคู่เบสที่ผิดปกติไปจากเดิมได้ เช่น กรณีที่ 7-ethylguanine สามารถจับคู่กับเบส thymine (T) ซึ่งจะนำไปสู่การกลายพันธุ์ชนิด transition สารละลาย EMS ยังทำให้เกิดการหลุดหายไปของเบสพิวรีนจากสายดีเอ็นเอ เพราะการที่มีหมู่เอทิลเข้าไปจับอยู่ในตำแหน่งต่างๆ ในเบสพิวรีน ทำให้เกิดการตัดขาดของพันธะที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลกับเบส จึงเกิดการหลุดออกไปของเบสพิวรีนและเกิดช่องว่างขึ้น ต่อมาเมื่อเซลล์มีกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเออาจเกิดความผิดพลาดได้ที่เบสที่

แตกต่างกันไปจากเดิม ซึ่งนำไปสู่การกลายพันธุ์แบบ transition และ transversion ได้ และนอกจากนี้ การตัดขาดของหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาล อาจทำให้เกิดการขาดจากกันของดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายคู่ ซึ่งนำไปสู่การหลุดหายไปของส่วนดีเอ็นเอและเกิดการกลายพันธุ์ในที่สุด

2.5.1 รายงานผลการวิจัยของสารละลาย EMS ที่เกี่ยวข้อง

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลาย EMS นั้นสามารถทำได้ในพืชดอกหลายชนิดทั้งในประเทศและต่างประเทศ ดังนี้ ยูพาทรณ์ ศิริ โสม และสมปอง เตชะโต (2551) นำชิ้นส่วนใบกล้วยฉาบในหลอดทดลองมาจุ่มแช่สารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0-1 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 และ 90 นาที พบว่าค่า LD₅₀ ของสาร EMS ที่ใช้จุ่มแช่ชิ้นส่วนใบเป็นระยะเวลา 60 นาที คือ 0.88 เปอร์เซ็นต์ ส่วน 90 นาที คือ 0.73 เปอร์เซ็นต์ และพบลักษณะยอรวมที่ผิดปกติ เช่น ยอดรวมมีขนาดเล็ก ใบสีเขียวอ่อน และใบชิด ศิริบุญญา ม่วงสอน และสมปอง เตชะโต (2551) นำ PLBs (Protocom-likebodies) กล้วยไม้เหลืองจันทบูรมาแช่ในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 และ 90 นาที พบว่าทริทเมนต์ที่แช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที เกิดลักษณะต้นเฟือกเป็นจำนวน 10 เปอร์เซ็นต์ และที่ EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที พบใบด่าง และเมื่อนำมาตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคไอโซไซม์ พบว่าให้แถบเอนไซม์ที่แตกต่างกันระหว่างทริทเมนต์ที่แช่และไม่แช่สารละลาย EMS เช่นเดียวกับ ชานนท์ ลากิจิตร และเมิง-เจียว เิง (2560) ได้นำ PLBs (Protocom-likebodies) ของ กล้วยไม้ *Erycina pusilla* มาแช่สาร EMS ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0, 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาในการแช่สารแตกต่างกันคือ 1 และ 2 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน ชิ้นส่วนของ PLBs เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน สารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เวลา 1 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตของ PLBs สูงที่สุด และมีการเจริญเติบโตหลังได้รับสารดีที่สุดใน และ ไชนิยะ สมะละลา และคณะ (2557) นำชิ้นส่วนข้อเบญจมาศในหลอดทดลองมาแช่สารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 และ 90 นาที พบว่าค่า LD₅₀ ที่เวลา 60 นาที คือความเข้มข้น 1.01 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เวลา 90 นาที คือความเข้มข้น 0.44 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นสาร EMS 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 นาที ส่งผลให้เกิดรูของปากใบ 2 รู ต่อปากใบ ดังนั้นการแช่ชิ้นส่วนข้อในสารละลาย EMS เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที และ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที ส่งผลให้ปากใบมีการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังพบว่ามีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศโดยทำการทดลองที่ต่างประเทศ เช่น Latado *et al.* (2004) ศึกษาการกลายพันธุ์ของเบญจมาศสายพันธุ์ที่มีดอกสีชมพูเข้ม โดยใช้สารละลาย EMS นำก้านดอกอ่อนแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น

0.77 เเปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง 45 นาที พบว่าเกิดการกลายพันธุ์ทั้งหมด 5.2 เเปอร์เซ็นต์ ทำให้กลีบดอกเปลี่ยนสีจากดอกสีชมพูเข้มเป็น สีชมพูส้ม สีชมพูอ่อนบรอนซ์ สีขาว สีเหลือง และ สีส้ม Kapadiya *et al.* (2016) ทำการศึกษาสารก่อกลายพันธุ์ (EMS, DES (Diethylstilbestrol)) และ รังสีแกมมา ในการชักนำให้เกิดความแปรปรวนในเบญจมาศสายพันธุ์ “Maghi” ซึ่งเป็นเบญจมาศสายพันธุ์การค้าในประเทศอินเดีย โดยการนำกิ่งที่มีรากแล้วขนาด 6-7 เซนติเมตร มาแช่ในสารละลาย EMS และ DES ที่ความเข้มข้น 0.02, 0.03 และ 0.04 เเปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย Silver thiosulphate (STS) 0.3 เเปอร์เซ็นต์ เพื่อล้าง EMS และ DES ออก และนำไปล้างด้วยน้ำสะอาดอีก 20 นาที และนำกิ่งชำที่มีขนาด 6-7 เซนติเมตร ที่เกิดรากแล้ว ไปฉายรังสีแกมมา ที่มีความยาวคลื่นแสง 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 kR ในแกมมาเซลล์ 200 (Cobalt-60 ปล่อยรังสี 3,600 rads) จากนั้นนำไปปลูกลงในแปลงโดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD และ ต้นที่ไม่ได้รับสารเป็นต้นควบคุม สังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น สีดอก ลักษณะของดอก ผลการทดลองสรุปว่ากิ่งชำที่ถูกฉายด้วยรังสีแกมมา 0.5 และ 1.0 kR มีเปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตที่สูงกว่าการใช้สารเคมี เพราะรังสีแกมมาจะไปยับยั้งฮอร์โมนในกลุ่มของออกซินที่ ส่งผลต่อการแบ่งเซลล์พืช กิ่งชำที่ได้รับสารละลาย EMS 0.03 เเปอร์เซ็นต์ และกิ่งชำที่ฉายรังสีแกมมา 1.0 kR ให้ผลผลิตที่สูงกว่าต้นควบคุม แต่ยังคงให้ดอกสีเหลืองเหมือนเดิม และยังพบว่ามี พืชดอกที่อยู่ในวงศ์เดียวกับเบญจมาศ เช่น เยอร์บีร่า ก็มีการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้สารก่อกลายพันธุ์ เช่นเดียวกับเบญจมาศอีกด้วย Ghani *et al.* (2013) ศึกษาการชักนำให้เกิดความแปรปรวนทาง ภายนอกและการใช้สารก่อกลายพันธุ์ในเยอร์บีร่า ทำการฉายรังสีแกมมาที่ 0, 1.5, 2, 2.5, 5, 10, 15, 20 และ 30 เกรย์ นำยอดมาทรีทด้วยสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8 และ 1 เเปอร์เซ็นต์ เวลา 10 และ 20 นาที พบว่าต้นควบคุม มีอัตราการรอดชีวิต 100 เเปอร์เซ็นต์ ส่วนต้นที่ โดสนฉายรังสีแกมมา 1.5 เกรย์ มีอัตราการรอดชีวิต 89.10 เเปอร์เซ็นต์ และต้นที่โดสนฉายรังสีแกมมา 15 เกรย์ มีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุด 8.75 เเปอร์เซ็นต์ ยอดเยอร์บีร่าที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.1 เเปอร์เซ็นต์ เวลา 10 นาที มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 87.64 เเปอร์เซ็นต์ ส่วนยอดเยอร์บีร่า ที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เเปอร์เซ็นต์ เวลา 20 นาที มีอัตราการรอดชีวิตน้อยที่สุด 10.89 เเปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านไป 4 สัปดาห์ ได้นำออกปลูกพบว่า มีอัตราการรอดชีวิต 92.27 เเปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้นที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา 5 เกรย์ มีอัตราการรอดชีวิตน้อยสุด 54.90 เเปอร์เซ็นต์ ต้นที่ ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.1 เเปอร์เซ็นต์ เวลา 10 นาที มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 72.89 เเปอร์เซ็นต์ และต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.1 เเปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที มีอัตราการรอดชีวิตน้อยสุด ความยาวและขนาดของดอกเฉลี่ยของต้นที่ได้รับการฉายรังสี 53.02 เซนติเมตร

และมีเส้นผ่านศูนย์กลางดอกเฉลี่ย 5.94 เซนติเมตร ส่วนความยาวและขนาดของดอกเฉลี่ยของต้นที่ได้รับสารละลาย EMS มีขนาด 60.03 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางดอกเฉลี่ย 6.02 เซนติเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าชุดควบคุม ต่อมา Fang (2011) ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในต้นแอฟริกันไวโอเล็ตโดยใช้สารละลาย EMS 4 ความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.2, 0.4 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ และเวลาที่แช่สาร 5 เวลา ได้แก่ 0, 30, 60, 120 และ 240 นาที พบว่าที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เวลา 30 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 80 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าความเข้มข้นของสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เวลา 30 นาที และ 120 นาที มีลักษณะของดอกที่แตกต่างไปจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS

2.6 คุณสมบัติของสารละลายโคลชิซิน (colchicine)

สารละลายโคลชิซินเป็นสารประกอบอโรมาติก เรียกว่า อัลคาลอยด์ มีสูตรโมเลกุล $C_{22}H_{25}NO_6$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 399.43 สามารถสกัดจากต้นโคลคัส (*Colchicum autumnal*) (Sharma and Sharma. 1999) หรือจากส่วนหัวและเมล็ดของต้นดอกคิง (*Gloriosa superba*) (วิเชียร ตั้งชนานุวัฒน์. 2546) สารโคลชิซินบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นเกล็ดหรือเป็นผงสีเหลืองอ่อน เมื่อถูกแสงจะมีสีเข้มมากขึ้น ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และน้ำเย็น (รังสฤษฎ์ กาวีตะ. 2541) แต่ละลายได้น้อยในอีเทอร์ หรือปิโตรเลียม (ดวงสุรีย์ แสนสิระ. 2546) สารละลายโคลชิซินเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงมาก เมื่อทดสอบกับหนูทดลองพบว่ามีค่า LD_{50} ที่ 0.125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารละลายโคลชิซินมีคุณสมบัติเป็นสารที่จับกับเบต้าทูบูลิน (Bai et al. 2000) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พัฒนาไปเป็นไมโครทิวบูล ส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล ทำให้การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสไม่มีการดึงโครโมโซมไปยังขั้วเซลล์ จึงทำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมขึ้นมา (Watson. 1977) โคลชิซินเป็นสารที่ใช้ได้ผลดีที่สุดและเป็นอันตรายน้อยมากกับพืชที่ใช้เกือบทุกชนิด (กฤษฎา สัมพันธ์ราษฎร์. 2546) แม้จะใช้ในอัตราสูง เพราะเป็นสารที่สกัดมาจากพืช สามารถเคลื่อนย้ายไปตามส่วนต่างๆ ของพืชโดยยังรักษารูปเดิม และทำหน้าที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้ยังไม่มีคุณสมบัติที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับโครงสร้างของยีนอีกด้วย (นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์. 2546)

2.6.1 รายงานผลการวิจัยของสารละลายโคลชิซินที่เกี่ยวข้อง

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน นั้นสามารถทำได้ในพืชดอกหลายชนิดทั้งในประเทศและต่างประเทศ ดังนี้ อุษา เพชรบ้านนา และคณะ (2552) โดยนำต้นกล้ากล้วยไม้ดินใบหมากอายุ 3 เดือน หลังจากเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อมาแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เวลา 48 ชั่วโมง ให้อัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าที่น้อยที่สุด คือ 66.25 เปอร์เซ็นต์ จำนวนคลอโรพลาสต์ต่อปากใบ ขนาดของปากใบ และจำนวนปากใบต่อพื้นที่

ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละหน่วยการทดลอง ในปี 2558 ศตปพร เกิดสุวรรณ และคณะ ศึกษาผลของโคลชิซินต่อการชักนำโพลีพลอยดีในแววมยุราในหลอดทดลอง พบว่าปลายยอดที่แช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) จากการตรวจสอบจำนวนโครโมโซมเซลล์ปลายราก พบว่า สามารถชักนำต้นมิโกโซพลอยด์ ($2n=2x=18$ และ $2n=4x=36$) ได้สูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาต้นมิโกโซพลอยด์ พบว่า กลีบดอกล่างมีขนาดใหญ่ขึ้น ดอกมีสีม่วงอมชมพู สีดอกเข้มขึ้น ใบ และรังไข่ขนาดใหญ่กว่าชุดควบคุม ในต่างประเทศมีการนำสารละลายโคลชิซินมาใช้ในกลายพันธุ์กับพืช เช่น He *et al.* (2016) ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นโพลีพลอยด์โดยใช้สารละลายโคลชิซินในต้นเบญจมาศ โดยใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ ยอด เมล็ดที่ยังไม่งอก และเมล็ดที่งอกแล้ว นำมาแช่ในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 100, 200, 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาที่ใช้ในการแช่สาร 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเมล็ดที่งอกแล้วที่ถูกแช่ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีอัตราการกลายพันธุ์สูงสุด 14.5 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดที่ยังไม่งอกที่ถูกแช่ที่ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 48 ชั่วโมง มีอัตราการกลายพันธุ์สูงสุด 11 เปอร์เซ็นต์ และยอดถูกแช่ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจาก 7 วันพบว่าอัตราการกลายพันธุ์สูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อต้นเบญจมาศออกดอกพบว่าต้นเทตราพลอยด์มีลักษณะของใบ ดอก และปากใบใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ และเยอร์บีราซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับเบญจมาศ โดย Miyoshi *et al.* (1996) ทำการศึกษาในต้นเยอร์บีรา *Gerbera jamesonii* โดยเลี้ยงต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เป็นแฮพลอยด์ มีใบ 4-6 ใบ และมีระบบรากที่แข็งแรงแล้วในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 2-6 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นเทตราพลอยด์ได้ถึง 24.2-34.1 เปอร์เซ็นต์ และ Gantait *et al.* (2011) ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมของต้นเยอร์บีราโดยใช้สารละลายโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ส่วนยอดที่เพาะได้ในสภาพปลอดเชื้อไปแช่สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 2, 4 และ 8 ชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบเทตราพลอยด์ได้ดีที่สุด โดยสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ถึง 64 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการย้ายปลูกพบว่า ต้นเยอร์บีราที่เป็นเทตราพลอยด์มีการเจริญเติบโตช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นเยอร์บีราที่เป็นดิพลอยด์ นอกจากนี้ยังพบว่า ต้นเยอร์บีราที่เป็นเทตราพลอยด์มีขนาดใบ ดอกที่ใหญ่ขึ้น และมีก้านชูดอกยาวขึ้นและแข็งแรงกว่าต้นเยอร์บีราที่เป็นดิพลอยด์ นอกจากนี้ยังมีงานทดลองในพืชชนิดอื่นๆ อีกมากที่ใช้สารละลายโคลชิซิน เช่น Seneviratne *et al.* (2007) ศึกษาการเหนี่ยวนำต้นแอฟริกันไวโอเล็ตให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการใช้สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 0.04, 0.06 และ 0.09 เปอร์เซ็นต์ และแช่เป็นระยะเวลา 21.5, 22.5, 23.5 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำใบที่แช่ในสารละลายโคลชิซินมาปักชำในวัสดุเพาะชำ พบว่าสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ เวลา 22.5 ชั่วโมง ทำให้ดอกมีสีขาวขอบกลีบดอกสีม่วง ซึ่งหลังจากดอกบานได้ 7 วัน ดอกแอฟริกันไวโอเล็ตจะมีสีม่วงเหมือนเดิม Hamidou *et*

al. (2009) ศึกษาผลของสารละลายโคลชิซินต่อ Oranamental ginger (*Hedychium muluense* R.M. Smith) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำ somatic embryo มาใส่สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดเทตราพลอยด์ได้ดีที่สุด โดยต้นที่ได้รับสารโคลชิซินมีปริมาณโครโมโซมเพิ่มขึ้น และมีขนาดปากใบใหญ่ขึ้น Nilanthi et al. (2009) ศึกษาการชักนำของต้นเทตราพลอยด์ จากชิ้นส่วนก้านใบโดยใช้สารละลายโคลชิซินในต้น *Echinacea purpurea* L. นำมาแช่สารละลายโคลชิซินที่แตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น คือ 0, 30, 60, 120 และ 240 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 30 วัน และความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 120 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลาที่แตกต่างกันคือ 7, 14, 21 และ 28 วัน พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลา 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงสุดและที่เวลา 28 วัน ชักนำให้เกิดต้นเทตราพลอยด์มากที่สุด ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าปากใบของต้นเทตราพลอยด์ มีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ และเมื่อนำออกปลูกพบว่ามีการออกดอกที่สั้นเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่

2.7 ค่า median lethal dose (LD₅₀)

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารที่ร่างกายได้รับ กับอาการตอบสนองต่อพิษนั้น ทำโดยนำสัตว์มาทดลองกับสารพิษเพื่อดูว่าสัตว์ทดลองมีอาการตอบสนองต่อสารพิษอย่างไร การศึกษามักเริ่มต้นด้วยการหาค่า median lethal dose (LD₅₀) (มลิวรรณ บุญเสนอ. 2544) โดยค่า LD₅₀ หมายถึง ปริมาณของสารพิษหรือวัตถุเคมีหน่วยเป็นมิลลิกรัม เทียบกับน้ำหนักของสัตว์ทดลองหน่วยเป็นกิโลกรัม ที่สามารถทำให้สัตว์ทดลองตายลงครึ่งหนึ่งของจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด (สมชัย ภัทรชนานันท์. 2539; อรุณี คงศักดิ์ไพศาลและคณะ. 2557) ส่วนในการทดลองหาค่า LD₅₀ ในพืชสามารถศึกษาได้จากกรทำให้สารพิษหรือวัตถุเคมีปริมาณหนึ่ง แล้วทำให้พืชตาย 50 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม เมื่อตรวจสอบต้นพืชที่ระยะใดระยะหนึ่งหลังจากการให้สารพิษหรือวัตถุเคมี เช่น 30 วัน (LD₅₀₍₃₀₎) หรือ 60 วัน (LD₅₀₍₆₀₎) เป็นต้น (อรุณี วงศ์ปิยะสกลิตย์. 2550)

2.8 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ในพืช

วิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของพืช ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลาย EMS และสารละลายโคลชิซิน สามารถตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ

2.8.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ความแปรปรวนจากการกลายพันธุ์ สามารถตรวจสอบได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้ง่าย จากการสังเกตลักษณะที่เกิดขึ้น มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านยีนบนโครโมโซม ภายหลังจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งลักษณะที่ปรากฏ เป็นผลมาจาก

การเปลี่ยนแปลงข้อมูลที่เป็นองค์ประกอบทางจีโนมไทป์ และสิ่งแวดล้อมส่งผลให้แสดงลักษณะนั้นๆ ออกมา เช่น ลักษณะการเจริญเติบโต ลำต้น ใบ ดอก ผล ราก เป็นต้น

2.8.2 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคโฟลไซโทมิเตอร์

โฟลไซโทมิเตอร์เป็นเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยอ่านค่านิวเคลียสของเซลล์พืชที่ต้องการศึกษาด้วยแสงเลเซอร์ ทำให้สามารถประมาณดีเอ็นเอที่เป็นองค์ประกอบในนิวเคลียสและขนาดของจีโนมพืชที่ต้องการศึกษาได้ นอกจากนี้ยังสามารถบ่งชี้ถึงระดับการเปลี่ยนแปลงเพิ่มหรือลดของจำนวนชุดโครโมโซม รวมทั้งสามารถยืนยันถึงความเสถียรของโครโมโซมพืชที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อเป็นระยะเวลาอันยาวนาน การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอสามารถปฏิบัติได้อย่างรวดเร็ว และให้ผลที่แม่นยำ ปัจจุบันเทคนิคดังกล่าวเป็นที่นิยมเนื่องจากการตรวจสอบการเกิดพอลิพลอยด์ โดยการนับจำนวนโครโมโซมนั้นมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก สารเคมีที่ใช้ในการศึกษามีความจำเพาะและต้องใช้ความชำนาญของผู้ปฏิบัติการสูง การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โฟลไซโทมิเตอร์จากเนื้อเยื่อเจริญของพืช เช่น แคลลัส ยอด ใบอ่อน และเอ็มบริโอ ได้รับความนิยมนสูง วิธีการ คือการเตรียมเซลล์พืชให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วยการสับเนื้อเยื่อด้วยใบมีด หรือการตีด้วยเม็คบีท ในสารละลายบัฟเฟอร์ และย้อมนิวเคลียสด้วยสารละลาย propidium iodide (PI) หรือ 4: 6 – diamino – 2 – phenylindole (DAPI) หลังจากนั้นวิเคราะห์ระดับพลอยดี (ploidy) ด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ ซึ่งเครื่องจะวิเคราะห์ขณะที่เซลล์เคลื่อนที่ผ่านลำแสงเลเซอร์เป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยการตรวจนับนิวเคลียส และสามารถนับได้เป็นพันเซลล์ และเครื่องดังกล่าวจะวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากนิวเคลียส ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับระดับพลอยดี (ploidy) จึงสามารถตรวจสอบระดับพลอยดี (ploidy) ของพืชได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sun *et al.* (2009) ศึกษาการชักนำต้น polyploidy ในหลอดทดลองโดยใช้สารละลายโคลชิซิน และการเกิดต้นใหม่จากชิ้นส่วนใบของต้น diploid ของลูกแพร์ เมื่อนำพืชที่ได้รับสารละลายโคลชิซินแล้วมาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคโฟลไซโทมิเตอร์พบว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินมี peak อยู่ที่ 200 ซึ่งเป็นพืช diploid ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมี peak อยู่ที่ 300 เป็นพืชทริพลอยด์ peak อยู่ที่ 400 เป็นพืชเตตราพลอยด์ และ peak อยู่ที่ 200-400 เป็นพืชมิทซ์ไซพลอยด์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Rodrigues *et al.* (2011) ได้ใช้สารละลายโคลชิซิน และ amiprophos-methyl (APM) ในการเพิ่มชุดโครโมโซมในกล้วย แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิคโฟลไซโทมิเตอร์พบว่าสามารถชักนำกล้วยได้เป็นต้นมิทซ์ไซพลอยด์ (2C, 4C และ 8C) และต้นเตตราพลอยด์ (4C)

2.8.3 เทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

RAPD เป็นวิธีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR แบบหนึ่งที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primers) วิธีการนี้มีการเรียกชื่อแบบอื่นได้อีก เช่น arbitrarily primed PCR (AP-PCR), DNA amplification fingerprinting (DAF) หรือ multiple arbitrary amplicon profiling (MAAP) ซึ่งแต่ละวิธีที่เรียกนี้มีชื่อแตกต่างกันบ้าง คือขนาดของไพรเมอร์ที่ใช้ แต่หลักการ

ไม่แตกต่างกัน โดยจะใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม มีนักวิจัยบางกลุ่มใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดพร้อมกัน ซึ่งก็ใช้ได้เช่นเดียวกัน แต่ที่นิยม คือใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวและใช้วิธีแบบที่เรียกว่า RAPD ซึ่งตั้งขึ้น โดย William และคณะในปี ค.ศ. 1990 โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิลเดียมโบรไมด์ (สุรินทร์ ปิยะ โสภณกุล, 2552)

หลักการทำ RAPD (Principle of RAPD ใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่มีเบสคู่สมกัน โดยไม่จำเป็นต้องทราบว่ไพรเมอร์จะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอส่วนใดบนโครโมโซมใด โอกาสที่จะพบลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับไพรเมอร์คือ 1 ใน 4 โดยประมาณ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอโดยเกิดคู่สมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดมีสัดส่วนเท่าๆ กันในจีโนม สามารถประมาณค่าของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่จะเกิดขึ้นจากไพรเมอร์ 1 ชนิดได้จากสมการ $b = (2,000 \times 4^{2n}) \times C$ เมื่อ b คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่คาดหมายในหนึ่งไพรเมอร์ n คือความยาวของไพรเมอร์ คิดเป็นจำนวนนิวคลีโอไทด์ และ C คือค่าของขนาดจีโนมหรือค่า C value ตัวอย่างเช่น ข้าวโพดมีจีโนมขนาด 6×10^9 คู่เบส นำมาทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ (10-mer) จะได้แถบดีเอ็นเอประมาณ 10.9 แถบ แต่จากการทดลองของนักวิจัยหลายท่านพบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอยู่กับขนาดของจีโนม พืชที่มีจีโนมขนาดใหญ่อาจเกิดแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าพืชที่มีจีโนมขนาดเล็กก็ได้ การเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นผลมาจากไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้หลายบริเวณ ถ้าไพรเมอร์ไปเกาะกับดีเอ็นเอ 2 บริเวณที่อยู่ไม่ไกลกันมาก โดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางเข้ากัน (5' ไป 3') จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงดังกล่าวได้ แต่ถ้าไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอสายเดียวกันในทิศทางเดียวกัน หรือเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายแต่ทิศทางแยกออกจากกัน หรือเกาะได้ใน 2 สายที่ห่างไกลกันมากแม้ทิศทางจะเข้าหากันก็ไม่สามารถจะเกิดผลผลิตได้ ความแตกต่างของแถบ RAPD หรือพอลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นระหว่างแต่ละตัวอย่างอาจเกิดจาก การมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่มาสอดแทรกในระหว่างตำแหน่ง 2 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะทำให้ไพรเมอร์ทั้งสองโมเลกุลอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นที่เกาะกับไพรเมอร์หายไปหนึ่งตำแหน่งหรือทั้ง 2 ตำแหน่งทำให้ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอจากบริเวณดังกล่าว มีการแทนที่หรือเปลี่ยนแปลงบริเวณที่เป็นที่เกาะของไพรเมอร์ทำให้ไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายไม่ได้จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กสอดแทรกเข้ามาหรือหายไป ทำให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเปลี่ยนแปลงไป อย่างไรก็ตามพอลิมอร์ฟิซึมของ RAPD มักเกิดขึ้นในลักษณะการมีและการไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ มากกว่าการเปลี่ยนขนาดของแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอของพืชที่พบทั้งจากนิวเคลียส คลอโรพลาสต์ และไมโทคอนเดรีย ในการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ RAPD พบว่าแถบดีเอ็นเอบางส่วนประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของไมโทคอนเดรีย และน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์มาจากดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ ดังนั้นแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RAPD (RAPD marker) ส่วนใหญ่จึงมาจากดีเอ็นเอใน

นิวเคลียส ซึ่งมีการถ่ายทอดมาจากทั้งฝ่ายพ่อและฝ่ายแม่ แม้ว่าเทคนิค RAPD จะทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลได้มาก แต่ก็มีข้อเสียในเรื่องการทดลองซ้ำ บางครั้งได้ผลที่ต่างจากเดิมเนื่องจาก RAPD มีความไวต่อการเปลี่ยนสภาวะต่างๆ จึงต้องระมัดระวังและควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ นอกจากนี้แถบดีเอ็นเอที่เกิดจาก RAPD ยังแสดงการข่ม (dominance) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ (สุรินทร์ ปิยะ โขชนากุล. 2552)

เนื่องจาก RAPD เป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อน สามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว แต่ก็มีข้อเสียในเรื่องการทำซ้ำ ทั้งนี้งานวิจัยของ Rajput *et al.* 2006 ได้ทำการศึกษาและพบว่าประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของการทำซ้ำด้วยเทคนิค RAPD จะให้ผลที่เหมือนเดิม โดยงานวิจัยนี้ใช้ไพรเมอร์ 60 ไพรเมอร์ ในมะเขือเทศป่า (*Lycopersicon hirsutum*) นอกจากนี้เทคนิค RAPD ยังถูกนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และลักษณะทางพันธุกรรม ในพืชหลายชนิดด้วย เช่น อมรรัตน์ พรหมบุญ และคณะ (2552) ศึกษาการจำแนกหม่อน (*Morus species*) พันธุ์พื้นเมืองโดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าไพรเมอร์ 62 ชนิดให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ในหม่อน 3 พันธุ์ และในการจำแนกหม่อนพันธุ์พื้นเมืองนั้น ได้เลือกใช้ไพรเมอร์จำนวน 33 ชนิด เพื่อทำการวิเคราะห์ในตัวอย่าง 2 ชุด รวม 25 พันธุ์ พบว่าแถบดีเอ็นเอ ที่สังเคราะห์ได้มี 543 แถบ มีขนาดระหว่าง 160-2,720 คู่เบส ทุกไพรเมอร์ให้ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน

สำหรับเบญจมาศนั้นก็นิยมใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกความแตกต่างลักษณะของต้นเบญจมาศที่ได้รับสารก๋อกลายพันธุ์กับต้นที่ไม่ได้รับสารก๋อกลายพันธุ์ Padmadevi (2011) ทำการศึกษาลักษณะของต้นเบญจมาศที่ได้รับสารก๋อกลายพันธุ์ร่วมกับรังสีแกมมาโดยใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ ไพรเมอร์ ทั้งหมด 28 ไพรเมอร์ ในการตรวจสอบ พบว่า ไพรเมอร์ OPF-14 และ OPF-15 สามารถจำแนกความแตกต่างลักษณะของต้นเบญจมาศที่ได้รับสารก๋อกลายพันธุ์กับต้นที่ไม่ได้รับสารก๋อกลายพันธุ์ได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

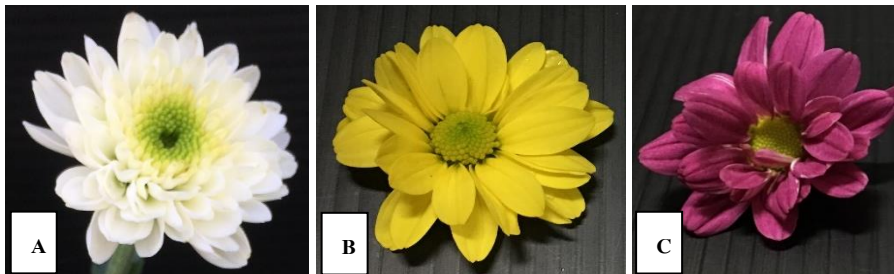
3.1 เครื่องมือและวิธีการ

3.1.1 พืชทดลอง เบญจมาศประเภท single

3.1.1.1 เบญจมาศ สายพันธุ์วีวิก (สีขาว) กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีขาว บานเรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียวไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก (ภาพที่ 3.1A)

3.1.1.2 เบญจมาศ สายพันธุ์ซีริเบรท (สีเหลือง) กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีเหลือง บานเรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียวไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก (ภาพที่ 3.1B)

3.1.1.3 เบญจมาศ สายพันธุ์แคนเทอร์ (สีม่วง) กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีม่วง บานเรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียวอมเขียวไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก (ภาพที่ 3.1C)



ภาพที่ 3.1 เบญจมาศทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

1. NAA (1-Napthalene acetic acid)
2. kinetin (N⁶-furfuryladenine)

3.1.2.2 สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อกลีบดอกเบญจมาศ

1. สารละลายเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์
2. สารละลายคลอโรกซ์ (Clorox) 50 เปอร์เซ็นต์ มีโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) 2.63 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร

3. สาร Tween-20 (Polyoxyethylene (20) sorbitam monolaurate)

4. น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3.1.2.3 สารก่อกลายพันธุ์

1. สารละลาย Ethyl methanesulphonate (EMS)

2. สารละลายโคลชิซิน (Colchicine)

3.1.2.4 สารเคมีสำหรับศึกษาพลอยดีโดยใช้เครื่อง Flow cytometer

- สารละลาย CyStain UV Ploidy

3.1.2.5 สารละลายบัพเฟออร์ CTAB (Doyle and Doyle. 1987)

3.1.2.6 agarose gel สำหรับทำ gel electrophoresis (invitrogen, USA)

3.1.2.7 chloroform (Merck, Germany)

3.1.2.8 ethidium bromide (Vivantis, Malaysia)

3.1.2.9 ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA, Univar, Australia)

3.1.2.10 isoamyl alcohol (Merck, Germany)

3.1.2.11 isopropanol (Merck, Germany)

3.1.2.12 sodium dodecyl sulfate (SDS) (Bio Basic Ins., USA)

3.1.2.13 sodium chloride (Ajax Finechem, Australia)

3.1.2.14 สารเคมีสำหรับทำพีซีอาร์

1. dNTP (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) (Biotech rabbit, Germany)

2. *Taq* DNA polymerase (Apsalagen, Germany)

3. 10X *Taq* buffer (Apsalagen, Germany)

4. MgCl₂ (Apsalagen, Germany)

5. 28 Primers

3.1.3 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

- 1 Kb DNA ladder (Gene Direx, USA)

3.1.4 อุปกรณ์ เครื่องแก้ว และเครื่องมือต่างๆ

3.1.4.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)

3.1.4.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, BSA2202s-CW, Germany)

3.1.4.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BP221S, Germany)

3.1.4.4 เครื่องถ่ายภาพเจล (Syngene, Genegenius, Japan)

- 3.1.4.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (Eppendorf, Model 5418, USA)
- 3.1.3.6 เครื่อง PCR (Biometra, T1 thermocycler, Germany)
- 3.1.4.7 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Eppendorf, Model 6132, Germany)
- 3.1.4.8 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Schott, CG 842, Germany)
- 3.1.4.9 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Sanden Intercool, SNH0303D11A, Thailand)
- 3.1.4.10 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Hirayama, HEV-50, Japan)
- 3.1.4.11 ไมโครปิเปต (Labnet, USA)
- 3.1.4.12 เครื่องมือสำหรับย้ายเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ปากคีบ และมีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
ตะเกียงแอลกอฮอล์ ขวดใส่แอลกอฮอล์ งานแก้ว และกระดาษสำหรับซับของเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- 3.1.4.13 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ กระบอกตวง บีกเกอร์ ปิเปต แท่งแก้วคนสาร กรวย
ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดรูปชมพู่ ขวด Duran ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.1.4.14 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ปากกา ดินสอ ไม้บรรทัด สมุดบันทึก กล้องถ่ายภาพ
- 3.1.4.15 อุปกรณ์สำหรับย้ายปลูก ได้แก่ ดินปลูก มะพร้าวสับ ขี้เถ้าแกลบ ถาดหลุม
กระดาษ 6 นิ้ว ถูพลาสติก

3.2 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลักสูตรพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

ห้องปฏิบัติการ โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

3.3 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ทำการทดลองระหว่าง พฤษภาคม 2558 – ธันวาคม 2561

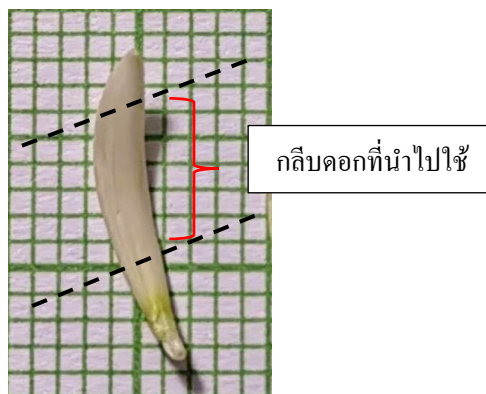
3.4 วิธีการดำเนินงาน

3.4.1 การทดลองที่ 1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแคลลัสของเบญจมาศสายพันธุ์วิวิค (ดอกประเภท single สีขาว) โดยใช้สารละลาย Ethyl methanesulphonate (EMS)

3.4.1.1 การเตรียมอาหารพื้นฐานที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อใช้วิธีเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS (1962) (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (สุเม อริญนารถ, 2524)

3.4.1.2 การเตรียมชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น โดยการนำกลีบดอกเบญจมาศมาผ่านน้ำไหล 20 นาที และฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 1 นาที คลอรีน 30 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.4.1.3 นำกลีบดอกเบญจมาศที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาชักนำให้เกิดแคลลัสโดยการเลี้ยงกลีบดอกขนาด 0.5 เซนติเมตร บนอาหารแข็ง MS (1962) (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 3.2 แสดงการตัดกลีบดอกเบญจมาศขนาด 0.5 เซนติเมตร ที่นำไปใช้ในการทดลอง

3.4.1.4 นำแคลลัส (compact callus) อายุ 8 สัปดาห์ ที่ได้จากการชักนำในสภาพปลอดเชื้อ มาตัดให้มีขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร มาแช่ในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นและช่วงระยะเวลาต่างๆ ตามแผนการทดลอง และนำไปเขย่าในที่มีดความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที จากนั้นย้ายลงเลี้ยงในอาหารแข็ง MS (1962) (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่มีสภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน วางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design มี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด ต่อทรีทเมนต์ ปัจจัยการทดลองมี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัย a คือ ความเข้มข้นของ EMS มี 5 ระดับคือ

a_1	=	0	เปอร์เซ็นต์
a_2	=	0.5	เปอร์เซ็นต์
a_3	=	1.0	เปอร์เซ็นต์
a_4	=	1.5	เปอร์เซ็นต์
a_5	=	2.0	เปอร์เซ็นต์

ปัจจัย b คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการแช่สาร มี 2 ระดับ คือ

b_1	=	60 นาที
b_2	=	120 นาที

3.4.1.5 ศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสเบญจมาศ

- ก. การเจริญเติบโตของแคลลัสโดยทำการวัดความกว้างและความยาวของแคลลัส
- ข. อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส และการหาค่า LD₅₀
- ค. เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด
- ง. จำนวนยอดต่อแคลลัส

3.4.1.6 ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ

- ก. การเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศโดยทำการวัดความสูงและจำนวนใบของต้นเบญจมาศในต้นรุ่น M1 และ M2
- ข. วัดปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีของใบเบญจมาศระยะ 8 สัปดาห์
- ค. วัดขนาดความกว้างและความยาวของปากใบ และนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์

3.4.1.7 ตรวจสอบลักษณะการกลายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD กับต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS เทียบกับต้นควบคุม

3.4.1.8 ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS เทียบกับต้นควบคุม

3.4.2 การทดลองที่ 2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกลีบดอกของเบญจมาศโดยใช้สารละลายโคลชิซิน

การทดลองที่ 2.1 เบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรท (ดอกประเภท single สีเหลือง)

การทดลองที่ 2.2 เบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ (ดอกประเภท single สีม่วง)

3.4.2.1 การเตรียมอาหารพื้นฐานที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อใช้วิธีเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS (1962) (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (สุเม อรัญนารถ, 2524)

3.4.2.2 การเตรียมชิ้นส่วนเริ่มต้นโดยการนำกลีบดอกเบญจมาศมาผ่านน้ำไหล 20 นาที และฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 1 นาที คลอรีน 30 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.4.2.3 นำกลีบดอกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาแช่ในสารละลายโคลชิซินในระดับความเข้มข้นและช่วงระยะเวลาต่างๆ ตามแผนการทดลอง และนำไปเขย่าความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที จากนั้นย้ายเลี้ยงในอาหารแข็ง MS (1962) (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่มีสภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

วางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design มี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด ต่อ ทริทเมนต์ ปัจจัยการทดลองมี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัย a คือ ความเข้มข้นของโคลชิซินมี 5 ระดับคือ

a_1	=	0	เปอร์เซ็นต์
a_2	=	0.05	เปอร์เซ็นต์
a_3	=	0.10	เปอร์เซ็นต์
a_4	=	0.15	เปอร์เซ็นต์
a_5	=	0.20	เปอร์เซ็นต์

ปัจจัย b คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการแช่สาร มี 2 ระดับ คือ

b_1	=	12 ชั่วโมง
b_2	=	24 ชั่วโมง

3.4.2.4 ศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสเบญจมาศ

- ก. การเจริญเติบโตของแคลลัสโดยทำการวัดความกว้างและความยาวของแคลลัส
- ข. อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส และการหาค่า LD_{50}
- ค. เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด
- ง. จำนวนยอดต่อแคลลัส

3.4.2.5 ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ

- ก. การเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศโดยทำการวัดความสูงและจำนวนใบของต้นเบญจมาศในต้น รุ่น M1 และ M2
- ข. วัดปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีของใบเบญจมาศระยะ 8 สัปดาห์
- ค. วัดขนาดความกว้างและความยาวของปากใบ และนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์

3.4.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological) ที่เปลี่ยนแปลงไปของต้นเบญจมาศที่ ย้ายออกปลูกในสภาพโรงเรือน มีขั้นตอนดังนี้

3.4.3.1 นำต้นเบญจมาศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้รับสารละลาย EMS และ สารละลายโคลชิซิน ออกปลูกในสภาพแปลง โดยใช้วัสดุปลูก (ดินปลูกและมะพร้าวสับ อัตราส่วน 1:1)

3.4.3.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศ โดยทำการศึกษาดังต่อไปนี้

- ก. จำนวนต้นรอดชีวิตของต้นเบญจมาศ

ข. นับจำนวนใบ และศึกษาลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปของใบ

ค. นับจำนวนดอก ศึกษาลักษณะของดอกที่เปลี่ยนแปลงไป สีดอก และกลีบดอก

ง. วัดความสูงของลำต้นเบญจมาศ

3.4.4 ตรวจสอบลักษณะการกลายพันธุ์ของต้นเบญจมาศ มีขั้นตอนดังนี้

3.4.4.1 ศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ (mg/gFW) ของต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS และสารละลายโคลชิซิน คัดแปลงวิธีการของ Dere *et al.* (1998) โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างใบเบญจมาศมา 1 กรัม สกัดด้วย methanol ความเข้มข้น 96 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 1 กรัม จากนั้นนำใบมาบดด้วยโกร่งเป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วกรองด้วยผ้าขาวบางและนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 666 และ 653 นาโนเมตร

$$\text{คลอโรฟิลล์ A} = 15.65A_{666} - 7.340A_{653} \dots \dots \dots (1)$$

$$\text{คลอโรฟิลล์ B} = 27.05A_{653} - 11.21A_{666} \dots \dots \dots (2)$$

3.4.4.2 ศึกษาความกว้าง ความยาว และการนับจำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ โดยการนำใบมาลอกผิวใบด้าน upper epidermis ด้วยใบมีดโกน จนได้ชั้นเนื้อเยื่อ lower epidermis จากนั้นทำการตัดส่วนของเนื้อเยื่อไปวางบนสไลด์ หยดน้ำสะอาด 1 หยด และปิดด้วยกระจกสไลด์ ศึกษาลักษณะของปากใบด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.4.4.3 ตรวจสอบโพลีพลอยดีโดยใช้เครื่อง Flow cytometer กับต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ทำการสกัดสารพันธุกรรมจากใบของต้นเบญจมาศ โดยการบดใบเบญจมาศประมาณ 50 มิลลิกรัม ด้วยใบมีดให้ละเอียดในสารละลาย CyStain UV Ploidy ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย CyStain UV Ploidy ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นกรองใส่หลอด และนำวิเคราะห์ระดับพลอยดีด้วยเครื่อง Flow cytometer ซึ่งเครื่องจะวิเคราะห์ห้วงขณะที่เซลล์เคลื่อนที่ผ่านลำแสงเลเซอร์เป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยการตรวจนับนิวเคลียส และสามารถนับได้เป็นพันเซลล์ และวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากนิวเคลียส

3.4.4.4 ตรวจสอบลักษณะการกลายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD กับต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS (คัดแปลงวิธีของ Padmadevi *et al.* 2011) โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.4.4.4.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอเบญจมาศ ด้วยการคัดแปลงวิธีการของ CTAB/Chloroform-Isoamyl Alcohol DNA Extraction Protocol (Doyle and Doyle 1987) นำใบเบญจมาศที่บดเป็นผงด้วยไนโตรเจนเหลว ปริมาณ 2 กรัม แล้วตัดผงใบเบญจมาศใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย CTAB extraction buffer [CTAB 0.2 กรัม, NaCl 1 มิลลิโมลาร์, PVP 0.1 กรัม, Sodium metabisulfate 0.01 กรัม, Tris-HCl (pH 8.0) 100 มิลลิโมลาร์,

EDTA 20 มิลลิโมลาร์] ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม 2-mercaptoethanol ปริมาตร 3 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที กลับหลอดทุกๆ 10 นาที จากนั้นเติม Chloroform : isoamy alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน โดยกลับหลอดไปมา ประมาณ 10-15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที ดูดสารละลาย ส่วนใสด้านบนปริมาณ 350 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย potassium acetate ความเข้มข้น 7.5 โมลาร์ ที่แช่เย็นปริมาตร 0.08 เท่าของสารละลาย (ประมาณ 28 ไมโครลิตร) และสาร iso-propanal ที่แช่เย็นปริมาตร 0.5 เท่าของสารละลาย ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 10 ครั้ง จากนั้นนำหลอดไปบ่มในตู้ -20 องศาเซลเซียสเพื่อ ตกตะกอนดีเอ็นเอเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ ใช้ไมโครปิเปตค่อยๆ ดูดสารละลายออกจากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็น ปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ 10 ครั้ง เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที ใช้ไมโครปิเปตค่อยๆ ดูดสารละลายออก จากนั้นล้าง ตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็นปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับหลอด ไปมาเบาๆ 10 ครั้ง เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที เป็น ระยะเวลา 5 นาที ใช้ไมโครปิเปตค่อยๆ ดูดสารละลายออก ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วละลาย ตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 30 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ให้ตะกอนดีเอ็นเอละลาย จากนั้นกำจัดอาร์ เอ็นเอโดยเติมเอนไซม์ RNase A (Fermentas, USA) วัดปริมาณ และคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้ด้วย เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Eppendorf, Model 6132, Germany) โดยเกณฑ์ค่า OD 260/280 ที่เลือกใช้ อยู่ระหว่าง 1.65-2.00 เพราะดีเอ็นเอจะมีความบริสุทธิ์สูง ถ้าต่ำกว่านี้จะมีการปนเปื้อนของโปรตีน ถ้าสูงกว่านี้จะมีการปนเปื้อนของคลอโรฟอร์ม และทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ ด้วยวิธี เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็น ระยะเวลา 40 นาที เปรียบเทียบขนาดและความเข้มข้นดีเอ็นเอกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Gene Direx, USA) เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.4.4.2 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย อาร์เอพีดีไอใช้ไพรเมอร์จำนวน 28 ไพรเมอร์ ที่มีการรายงานการใช้ตรวจสอบในเบญจมาศ Padmadevi *et al.* (2011) คือ OPA01 OPA05 OPA07 OPA08 OPA13 OPA15 OPB04 OPB07 OPF01 OPF02 OPF03 OPF04 OPF05 OPF06 OPF07 OPF08 OPF09 OPF10 OPF11 OPF12 OPF13 OPF14 OPF15 OPF16 OPF17 OPF18 OPF19 และ OPF20 มาเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) จากปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยน้ำกลั่นหนึ่งหม่าเชื้อปริมาตร 6.4 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 50 นาโนกรัม ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10x Taq buffer 1.2 ไมโครลิตร MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร dNTP ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร

และ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิต ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร ตั้งอุณหภูมิเครื่องพีซีอาร์ ดังนี้ Pre-denaturation ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที Annealing ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที Extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ขั้นตอน Denaturation, Annealing และ Extention ทำซ้ำ 35 รอบ Final-extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน Agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน TAE บัฟเฟอร์ ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ 40 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 15 นาที และล้างน้ำกลั่น 5 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation เปรียบเทียบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS กับต้นที่ได้รับสารละลาย EMS โดยขั้นตอนการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดีทำซ้ำ 2 รอบ

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.5.1 นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.5.2 การวิเคราะห์ผลใช้โปรแกรม NTSYS pc 2.10m (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD แล้วบันทึกแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากไพรเมอร์แต่ละคู่ โดยกำหนดสัญลักษณ์ 1 คือการเกิดแถบดีเอ็นเอ และสัญลักษณ์ 0 คือการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกัน คำนวณค่า Polymorphic Information Contents (PICs) เป็นค่าที่บอกถึงโอกาสที่จะพบตัวอย่างที่เลือกแบบสุ่ม 2 ตัวอย่างที่มีความแตกต่างกัน (polymorphism) จากสูตร $H = 1 - \sum P_i^2$ เมื่อ P_i คือ ความถี่ของแอลลีลที่ i ซึ่ง P_i ประกอบด้วย ความถี่ของจำนวนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอ P_A (absent allele) และความถี่ของจำนวนตัวอย่างพบแถบดีเอ็นเอ P_p (Present allele) (Otto, 1990) วิเคราะห์ความสัมพันธ์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์ต่างๆ ที่ละคู่ ในรูปของ Jaccard similarity coefficient (Jaccard, 1908) พร้อมทั้งสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ในรูปแบบ phylogenetic tree โดยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) วิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยวิเคราะห์ค่า genetic similarity ใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard และคำนวณค่า Cophenetic correlation (r) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าการจัดกลุ่มที่ได้ยอมรับได้หรือไม่ และวิเคราะห์ค่า Principal Coordinates Analysis (PCoA)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแคลลัสของเบญจมาศสายพันธุ์วิวก (ดอกประเภท single สีขาว) โดยใช้สารละลาย EMS

4.1.1 อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส

หลังจากการแช่เลี้ยงแคลลัสขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร ของเบญจมาศสายพันธุ์วิวก ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าสัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป ต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที และความเข้มข้นของสารละลาย EMS 2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที มีอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสเพียง 6.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 8 ความเข้มข้นของสารละลาย EMS 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที พบว่าแคลลัสไม่สามารถรอดชีวิตได้ สีของแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและดำ ทำให้เหลือแคลลัสเพียง 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที (ตารางที่ 4.1) ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ความเข้มข้นของสารละลาย EMS ระยะเวลา 60 นาที มีค่า LD_{50} เท่ากับ 1.15 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 120 นาที มีค่า LD_{50} เท่ากับ 0.72 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.1)

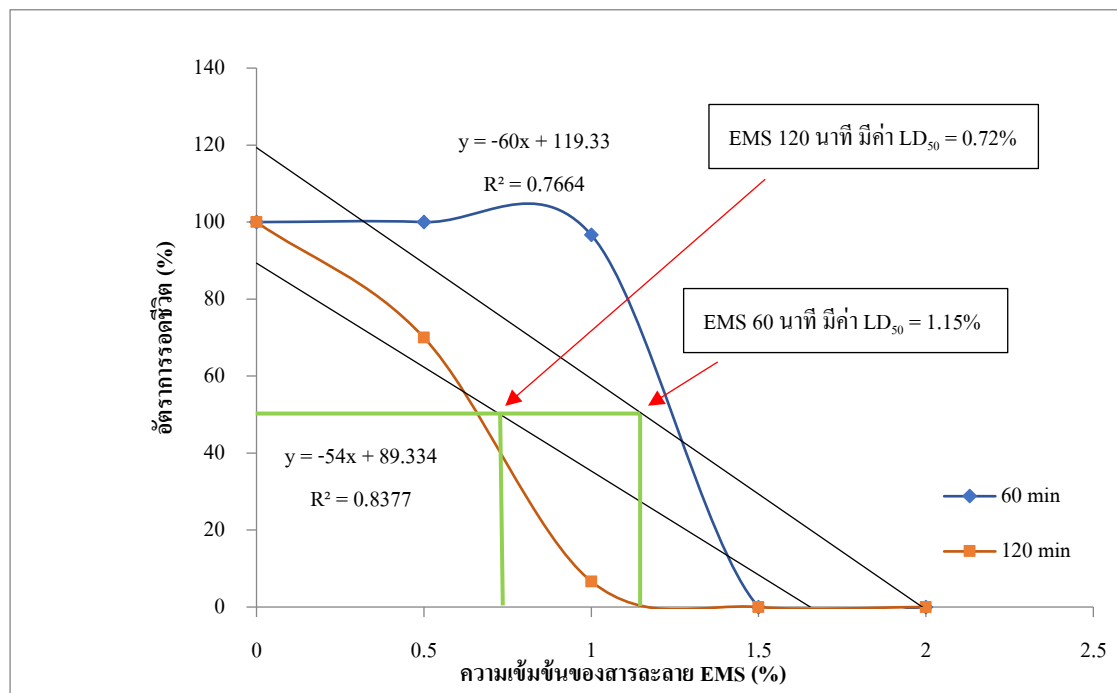
4.1.2 ขนาดของแคลลัส

หลังจากการแช่เลี้ยงแคลลัสขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร ของเบญจมาศสายพันธุ์วิวก ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่ออายุ 2 สัปดาห์ พบว่าแคลลัส มีแนวโน้มที่จะใหญ่ขึ้นเมื่อมีอายุเพิ่มมากขึ้น โดยแคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่น มีสีเขียวอ่อนเกิดขึ้นที่ผิวนอกและรอยตัดของชิ้นส่วน เมื่อเลี้ยงแคลลัสมาเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์พบว่าแคลลัสที่มีขนาดความกว้าง และความยาวมากที่สุด คือ 1.45 และ 1.51 เซนติเมตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารละลาย EMS 0 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที (ต้นควบคุม) ส่วนแคลลัสที่มีขนาดความกว้าง และความยาวน้อยที่สุด คือ 0.40 และ 0.40 เซนติเมตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารละลาย EMS 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที

(ตารางที่ 4.2) ซึ่งมีขนาดความกว้าง และความยาวของแคลลัสน้อยกว่าต้นควบคุม 27.58 และ 26.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.1.3 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและจำนวนยอดต่อแคลลัส

หลังจากการแช่แคลลัสของเบญจมาศสายพันธุ์วิวก ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ ชิ้นส่วนเริ่มต้นมีการพัฒนามาจากกลุ่มแคลลัสหรือก้อนเนื้อเยื่อที่พัฒนาขึ้นมา โดยการพัฒนาไปเป็นแคลลัสที่มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน ผิวขรุขระ มีสีเขียวอ่อน หรือสีเหลืองบริเวณรอยตัด และการพัฒนาไปเป็นส่วนยอดโดยผ่านการเกิดแคลลัส โดยแคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่น (compact callus) เมื่ออายุ 12 สัปดาห์พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย EMS 0 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที (ต้นควบคุม) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมากที่สุด 76.67 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดต่อแคลลัสมากที่สุด 1.73 ยอด ส่วนความเข้มข้นของสารละลาย EMS 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดน้อยที่สุด 43.33 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดต่อแคลลัสน้อยที่สุด 1.06 ยอด (ตารางที่ 4.2)



ภาพที่ 4.1 กราฟอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 4.1 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่ออัตราการรอดชีวิตของแคลลัสเบญจมาศสายพันธุ์วิวก ภายหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

		อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) (\pm SE) ^U					
		อายุ (สัปดาห์)					
		2	4	6	8	10	12
EMS (%)	0	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a
	0.5	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	85.00 \pm 17.60b	85.00 \pm 17.60b	85.00 \pm 17.60b	85.00 \pm 17.60b
	1.0	100.00 \pm 0.00a	56.67 \pm 44.12b	56.67 \pm 44.12c	51.66 \pm 49.56c	51.66 \pm 49.56c	51.66 \pm 49.56c
	1.5	96.67 \pm 5.16a	8.33 \pm 5.16c	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d
	2.0	90.00 \pm 10.95b	6.67 \pm 5.16c	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d
F-test		**	**	**	**	**	**
ระยะเวลา (นาทึ)	60	98.67 \pm 5.16	62.66 \pm 46.93a	60.00 \pm 49.42a	59.33 \pm 50.20a	59.33 \pm 50.20a	59.33 \pm 50.20a
	120	96.00 \pm 7.36	46.00 \pm 45.95b	37.33 \pm 42.16b	35.33 \pm 43.40b	35.33 \pm 43.40b	35.33 \pm 43.40b
F-test		ns	**	**	**	**	**
EMS (%)	ระยะเวลา (นาทึ)						
0	60	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a
	120	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a
0.5	60	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a
	120	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	70.00 \pm 10.00b	70.00 \pm 10.00b	70.00 \pm 10.00b	70.00 \pm 10.00b
1.0	60	100.00 \pm 0.00a	96.67 \pm 5.77a	96.67 \pm 5.77a	96.67 \pm 5.77a	96.67 \pm 5.77ab	96.67 \pm 5.77ab
	120	100.00 \pm 0.00a	16.67 \pm 5.77b	16.67 \pm 5.77c	6.67 \pm 5.77c	6.67 \pm 5.77c	6.67 \pm 5.77c
1.5	60	100.00 \pm 0.00a	10.00 \pm 5.77bc	3.33 \pm 5.77d	0.00 \pm 0.00c	0.00 \pm 0.00c	0.00 \pm 0.00c
	120	93.33 \pm 5.77ab	6.67 \pm 5.77c	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00c	0.00 \pm 0.00c	0.00 \pm 0.00c
2.0	60	93.33 \pm 11.54ab	6.67 \pm 5.77c	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00c	0.00 \pm 0.00c	0.00 \pm 0.00c
	120	86.67 \pm 11.54b	6.67 \pm 5.77c	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00c	0.00 \pm 0.00c	0.00 \pm 0.00c
F-test		**	**	**	**	**	**
CV%		5.62	7.51	9.18	8.62	8.62	8.62

^Uค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
 ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ของเบญจมาศสายพันธุ์วิวกต่อความกว้าง ความยาวของแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด/แคลลัส ภายหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

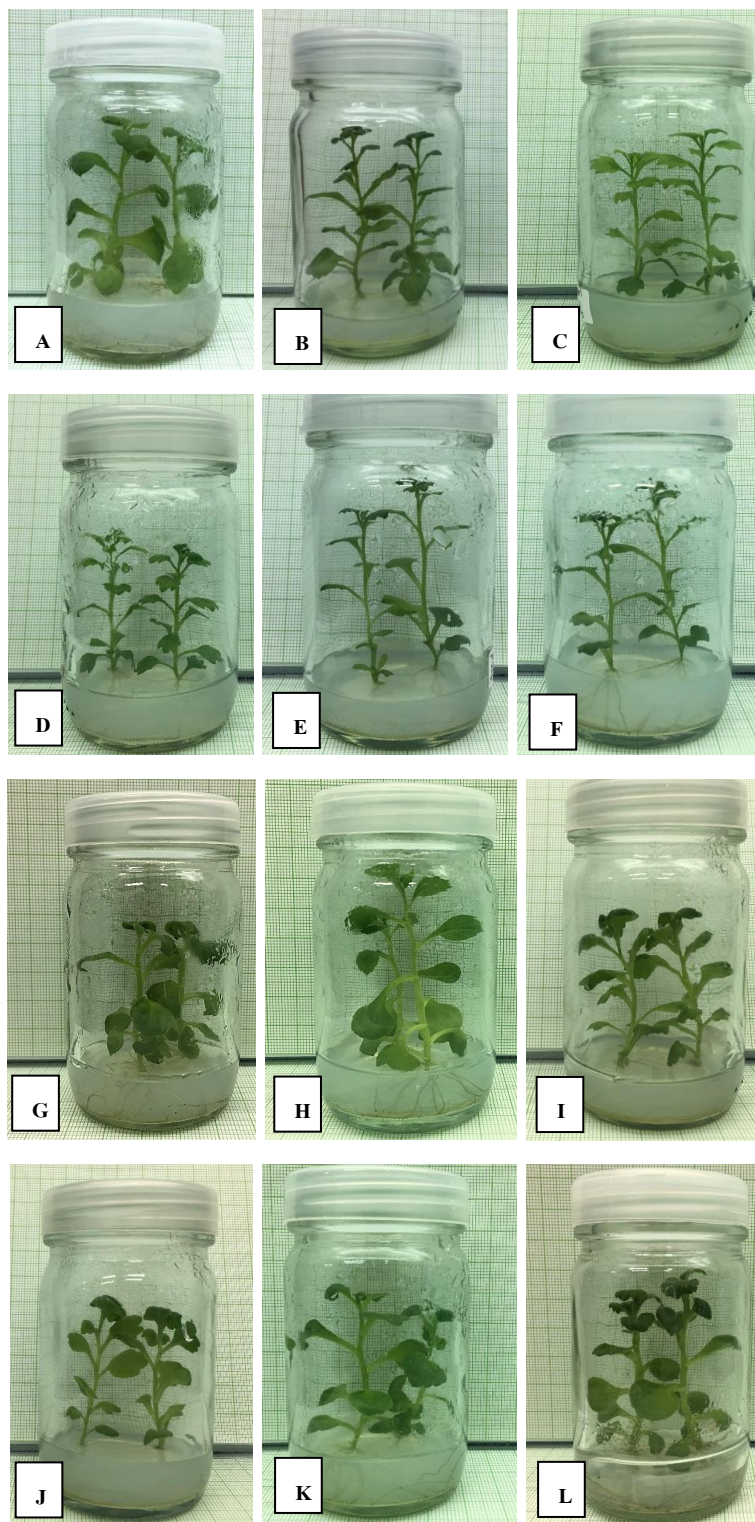
		ขนาดแคลลัส			
		ความกว้าง	ความยาว	เปอร์เซ็นต์การเกิด	จำนวนยอด/
		(ซม.) (\pm SE) ^u	(ซม.) (\pm SE) ^u	ยอด (\pm SE) ^u	แคลลัส (\pm SE) ^u
EMS (%)	0	1.31 \pm 0.17a	1.31 \pm 0.17a	71.66 \pm 11.69a	1.70 \pm 0.16a
	0.5	1.17 \pm 0.23a	1.17 \pm 0.23a	55.00 \pm 5.47b	1.35 \pm 0.12b
	1.0	0.86 \pm 0.56b	0.86 \pm 0.56b	46.67 \pm 5.16c	1.10 \pm 0.10c
	1.5	0.00 \pm 0.00c	0.00 \pm 0.00c	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d
	2.0	0.00 \pm 0.00c	0.00 \pm 0.00c	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d
F-test		**	**	**	**
ระยะเวลา (นาที)	60	0.90 \pm 0.61a	0.90 \pm 0.61a	36.67 \pm 32.87a	0.84 \pm 0.74
	120	0.51 \pm 0.53b	0.51 \pm 0.53b	32.67 \pm 28.90b	0.81 \pm 0.72
F-test		**	**	**	ns
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)				
0	60	1.45 \pm 0.12a	1.51 \pm 0.13a	76.67 \pm 15.27a	1.73 \pm 0.20a
	120	1.17 \pm 0.07bc	1.23 \pm 0.10ab	66.67 \pm 5.77ab	1.66 \pm 0.15a
0.5	60	1.34 \pm 0.03ab	1.39 \pm 0.03a	56.67 \pm 5.77bc	1.36 \pm 0.11b
	120	1.01 \pm 0.23c	1.06 \pm 0.26b	53.33 \pm 5.77cd	1.33 \pm 0.15b
1.0	60	1.32 \pm 0.12ab	1.41 \pm 0.09a	50.00 \pm 0.00cd	1.13 \pm 0.05c
	120	0.40 \pm 0.36d	0.40 \pm 0.36c	43.33 \pm 5.77d	1.06 \pm 0.15c
1.5	60	0.00 \pm 0.00e	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d
	120	0.00 \pm 0.00e	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d
2.0	60	0.00 \pm 0.00e	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d
	120	0.00 \pm 0.00e	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d
F-test		**	**	**	**
CV%		21.30	20.99	17.46	13.73

^uค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.1.4 ความสูงต้น และจำนวนใบเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ รุ่น M1 และ M2

หลังจากการแช่แคลลัสของเบญจมาศสายพันธุ์วิวก ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือนยอดจะพัฒนาไปเป็นต้น นำต้นที่ได้มาตัดบริเวณข้อ และนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต จะได้ต้นในรุ่น M1 พบว่าต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลาย EMS 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที มีลักษณะของลำต้น และใบไม่แตกต่างกัน โดยความสูงของต้น และใบพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกๆ สัปดาห์ ลำต้นและใบมีสีเขียว ในสัปดาห์ที่ 4 ก่อนทำการเปลี่ยนอาหารพบว่าความสูงต้นเฉลี่ยสูงสุด 3.99 เซนติเมตร และจำนวนใบมากที่สุด 7.43 ใบ คือต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลาย EMS 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที (ภาพที่ 4.2B), (ตารางที่ 4.3) เมื่อต้นรุ่น M1 เจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 1 เดือนทำการเปลี่ยนอาหาร โดยการตัดส่วนข้อและนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต จะได้ต้นในรุ่น M2 ซึ่งจะพบว่าต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลาย EMS 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที มีลักษณะของต้น และใบไม่แตกต่างกัน โดยความสูงของต้นและใบพบว่ามีความสูงเพิ่มขึ้นทุกๆ สัปดาห์ ลำต้นและใบมีสีเขียว ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าความสูงต้นเฉลี่ยสูงสุด 3.94 เซนติเมตร และจำนวนใบมากที่สุด 7.46 ใบ คือต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลาย EMS 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที (ภาพที่ 4.2H), (ตารางที่ 4.3)



ภาพที่ 4.2 ต้นเบญจมาศพันธุ์วิจิตรุ่น M1 (A-F) และ M2 (G-L) ตามลำดับ ในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร (A),(G) ต้นควบคุม 0% 60 นาที (B),(H) 0.5% 60 นาที (C),(I) 1% 60 นาที (D),(J) ต้นควบคุม 0% 120 นาที (E),(K) 0.5% 120 นาที และ (F),(L) 1% 120 นาที

ตารางที่ 4.3 แสดงความสูงต้น และจำนวนใบ ของเบญจมาศสายพันธุ์วิกิรุ่น M1 และรุ่น M2 ที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

		ต้นเบญจมาศรุ่น M1 (\pm SE) ¹		ต้นเบญจมาศรุ่น M2 (\pm SE) ¹	
		ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนใบ	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนใบ
EMS (%)	0	3.80 \pm 0.11	7.00 \pm 0.58	2.80 \pm 0.05b	5.23 \pm 0.08b
	0.5	3.88 \pm 0.13	7.00 \pm 0.12	3.92 \pm 0.06a	7.03 \pm 0.45a
	1.0	3.84 \pm 0.13	7.05 \pm 0.12	3.92 \pm 0.05a	7.41 \pm 0.19a
F-test		ns	ns	**	**
ระยะเวลา (นาที)	60	3.93 \pm 0.10a	7.71 \pm 0.25a	3.57 \pm 0.54	6.68 \pm 1.00
	120	3.75 \pm 0.07b	6.85 \pm 0.33b	3.53 \pm 0.57	6.53 \pm 1.08
F-test		**	**	ns	ns
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)				
0	60	3.87 \pm 0.14abc	7.00 \pm 0.20ab	2.84 \pm 0.01b	5.26 \pm 0.05b
	120	3.74 \pm 0.00c	6.56 \pm 0.51b	2.77 \pm 0.06b	5.20 \pm 0.10b
0.5	60	3.99 \pm 0.05a	7.43 \pm 0.20a	3.94 \pm 0.08a	7.46 \pm 0.25a
	120	3.78 \pm 0.09bc	7.00 \pm 0.00ab	3.91 \pm 0.03a	7.36 \pm 0.15a
1.0	60	3.93 \pm 0.08ab	7.10 \pm 0.17a	3.93 \pm 0.03a	7.13 \pm 0.20a
	120	3.74 \pm 0.09c	7.00 \pm 0.00ab	3.91 \pm 0.08a	6.93 \pm 0.66a
F-test		*	*	**	*
CV%		2.33	3.57	1.64	4.76

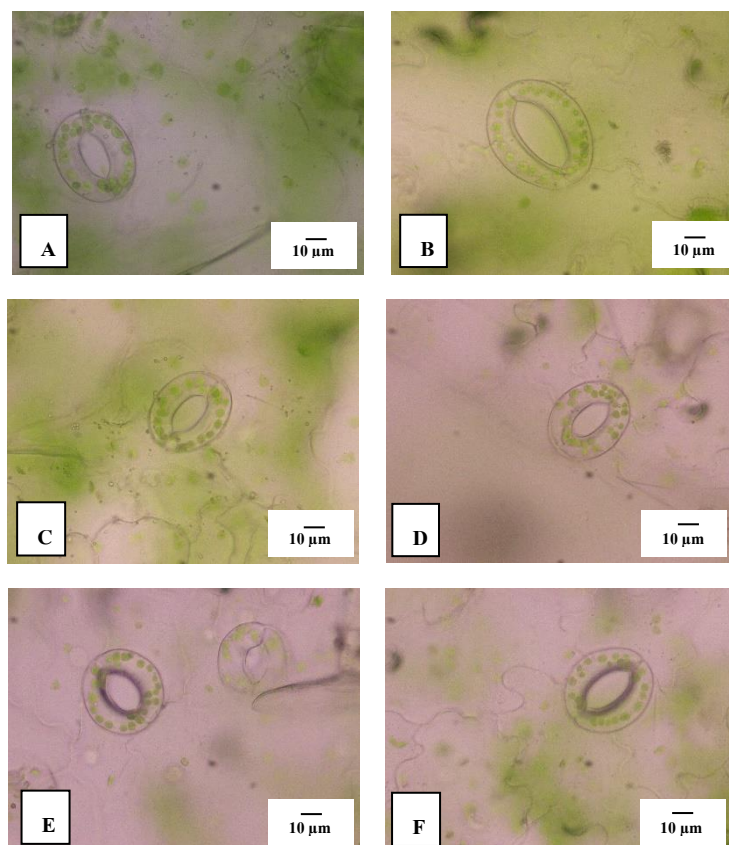
¹ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.1.5 ความกว้าง ความยาว จำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ และปริมาณคลอโรฟิลล์

นำใบที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้ออายุ 8 สัปดาห์มาวัดขนาดความกว้างของปากใบต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที พบว่าขนาดความกว้างของปากใบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติส่วนใหญ่จะมีความกว้างโดยเฉลี่ยประมาณ 25-28 ไมโครเมตร และต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที มีความกว้างของปากใบมากที่สุด 28.70 ไมโครเมตร แต่ขนาดความยาวของปากใบมีความแตกต่างกันทางสถิติโดยต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที มีขนาดความยาวของปากใบมากที่สุด 60.70 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.3B), (ตารางที่ 4.4) จำนวนคลอโรพลาสต์ต่อปากใบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติส่วนใหญ่จะมีปริมาณเม็ดคลอโรพลาสต์โดยเฉลี่ยประมาณ 26-29 เม็ดต่อปากใบ แต่จะพบว่าจำนวนคลอโรพลาสต์มีมากที่สุด 29.25 เม็ดต่อปากใบ คือต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที (ภาพที่ 4.3B), (ตารางที่ 4.4) จากการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอมีความแตกต่างกันทางสถิติโดยต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอมากที่สุด 118.50 มิลลิกรัม/น้ำหนักสด และต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที (ต้นควบคุม) มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอน้อยที่สุด 33.10 มิลลิกรัม/น้ำหนักสด ส่วนคลอโรฟิลล์บีมีความแตกต่างกันทางสถิติโดยต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที มีปริมาณคลอโรฟิลล์บีมากที่สุด 50.57 มิลลิกรัม/น้ำหนักสด และต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที มีปริมาณคลอโรฟิลล์บีน้อยที่สุด 9.90 มิลลิกรัม/น้ำหนักสด (ตารางที่ 4.5)



ภาพที่ 4.3 ขนาดของปากใบและจำนวนคลอโรพลาสต์ของต้นเบญจมาศสายพันธุ์วิจิในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ดัชนีควบคุม 0% 60 นาที (B) 0.5% 60 นาที (C) 1% 60 นาที (D) ดัชนีควบคุม 0% 120 นาที (E) 0.5% 120 นาที และ (F) 1% 120 นาที (bar = 10 μm)

ตารางที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่อขนาดของปากใบ และจำนวน
คลอโรพลาสต์เบญจมาศสายพันธุ์วิวกิ ภายหลังการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

		ขนาดปากใบ (\pm SE) ^L		จำนวนคลอโร พลาสต์/ปากใบ (\pm SE) ^L
		ความกว้าง (μ M)	ความยาว (μ M)	
EMS (%)	0	26.95 \pm 3.39	47.08 \pm 4.80b	28.01 \pm 3.45
	0.5	27.88 \pm 1.89	56.43 \pm 5.86a	27.73 \pm 1.86
	1.0	27.10 \pm 2.15	49.76 \pm 7.83b	29.01 \pm 0.96
F-test		ns	**	ns
ระยะเวลา (นาที)	60	27.84 \pm 1.23	55.05 \pm 6.85a	29.03 \pm 2.72
	120	26.78 \pm 3.24	47.13 \pm 5.18b	27.47 \pm 1.44
F-test		ns	**	ns
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)			
0	60	27.39 \pm 1.62	48.99 \pm 3.85bc	28.55 \pm 2.33
	120	26.51 \pm 5.05	45.17 \pm 5.64c	26.83 \pm 1.64
0.5	60	28.70 \pm 0.93	60.70 \pm 4.34a	29.25 \pm 4.78
	120	28.33 \pm 2.72	52.17 \pm 3.54abc	26.76 \pm 0.65
1.0	60	27.43 \pm 0.95	55.47 \pm 7.13ab	29.20 \pm 1.03
	120	25.50 \pm 1.73	44.05 \pm 2.20c	28.83 \pm 1.06
F-test		ns	**	ns
CV%		9.49	9.24	8.38

^Lค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลาย EMS ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์เบญจมาศสายพันธุ์
วิวิคภายหลังการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

		ปริมาณคลอโรฟิลล์ (มิลลิกรัม/น้ำหนักสด) (\pm SE) ^{1/2}	
		คลอโรฟิลล์เอ	คลอโรฟิลล์บี
EMS (%)	0	60.47 \pm 30.13a	30.23 \pm 13.33a
	0.5	78.95 \pm 43.34ab	30.24 \pm 22.62ab
	1.0	54.98 \pm 22.90b	21.37 \pm 15.85b
F-test		*	*
ระยะเวลา (นาที)	60	67.82 \pm 39.17	30.20 \pm 20.60
	120	61.78 \pm 27.42	24.36 \pm 13.54
F-test		ns	ns
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)		
0	60	87.84 \pm 4.45b	29.51 \pm 20.98ab
	120	33.10 \pm 1.81c	30.96 \pm 1.47ab
0.5	60	118.50 \pm 2.56a	50.57 \pm 6.14a
	120	39.40 \pm 2.15b	9.90 \pm 0.98b
1.0	60	51.87 \pm 8.30c	10.52 \pm 3.94b
	120	58.10 \pm 34.83c	32.23 \pm 16.10a
F-test		**	**
CV%		22.86	41.15

^{1/2}ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

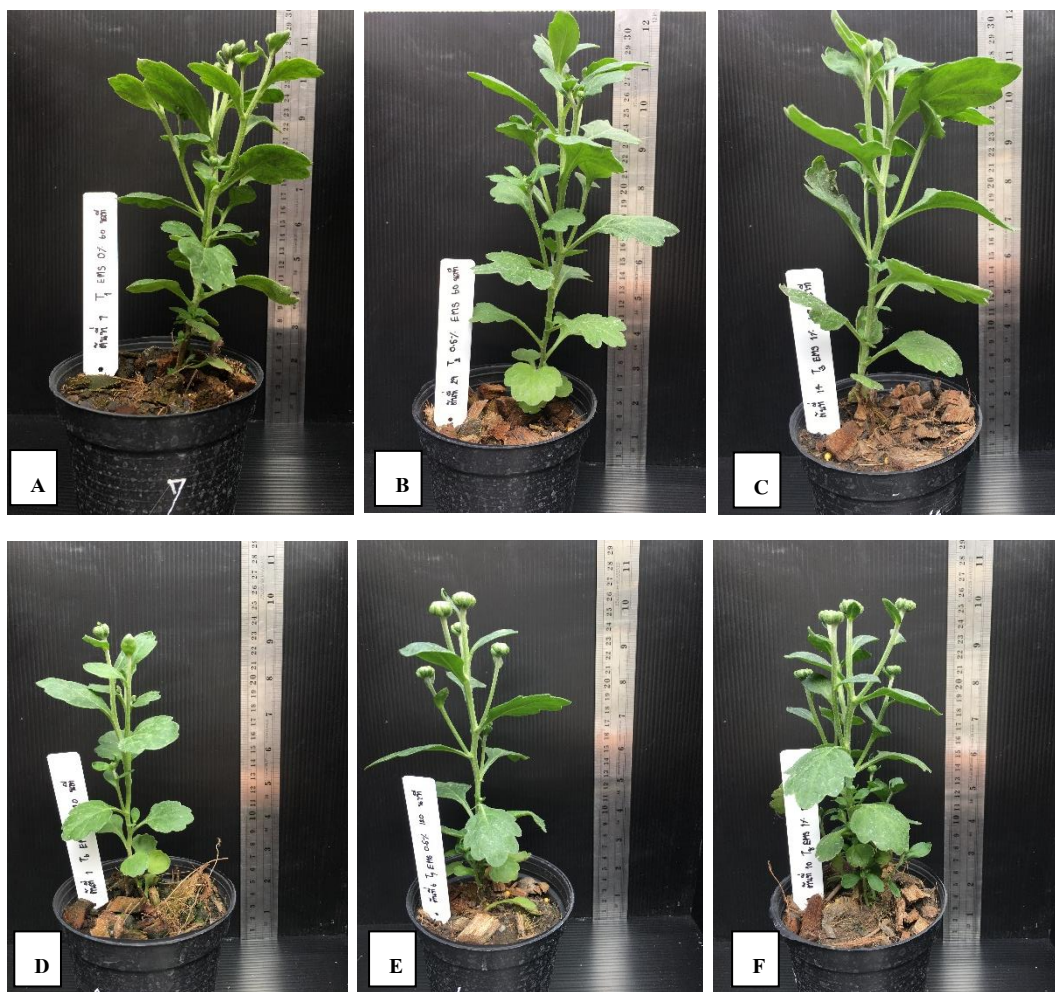
4.1.6 การย้ายปลุกเบญจมาศสายพันธุ์วิคนอกสภาพปลอดเชื้อ

การย้ายปลุกเบญจมาศนอกสภาพปลอดเชื้อ โดยนำต้นเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อรุ่น M2 ย้ายออกปลุกจำนวน 20 ต้นต่อ 1 ทริทเมนต์ทำได้โดยนำต้นเบญจมาศที่มีรากและเจริญเติบโตประมาณ 4-5 สัปดาห์ในสภาพปลอดเชื้อนำมาปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ 2-3 วัน โดยการย้ายมาเลี้ยงที่อุณหภูมิจากห้อง หลังจากนั้นให้ย้ายต้นเบญจมาศออกจากขวดทำการล้างวันที่ติดกับรากให้สะอาดเตรียมมะพร้าวสับเพื่อใช้เป็นวัสดุปลูก และนำต้นเบญจมาศที่ล้างวันสะอาดแล้วปลุกลงในวัสดุที่เตรียมไว้ รดน้ำให้ชุ่ม ใช้ถุงพลาสติกคลุมกระถาง เพื่อให้ต้นเบญจมาศค่อยๆ ปรับตัว นำไปวางในที่ที่มีแสง แต่ไม่ต้องโดนแดดเพราะจะทำให้ต้นเบญจมาศตายเมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์ให้เจาะรูที่ถุงพลาสติกเพื่อให้ต้นเบญจมาศมีอากาศถ่ายเท พอต้นเบญจมาศเริ่มสร้างใบใหม่ให้เตรียมย้ายปลุกในดินผสมมะพร้าวสับ อัตราส่วน 1:1 เริ่มใส่ปุ๋ยสูตร 16-16-16 ในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากเลี้ยงต้นเบญจมาศเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดชีวิตของต้นเบญจมาศโดยส่วนใหญ่มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ จะมีต้นเบญจมาศที่ตาย เนื่องจากมีแมลงศัตรูพืชเข้าทำลาย และบางกระถางมีน้ำขัง ทำให้ราก และลำต้นเน่าตายทำให้มีอัตราการรอดชีวิต 95.23 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.6) ภายหลังจากการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์ ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที ความสูงต้น และจำนวนใบ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกๆ สัปดาห์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ลักษณะลำต้นมีสีเขียว (ภาพที่ 4.4) ใบเป็นรูปใบหอกปลายแหลมหรือบางใบค่อนข้างกลม เส้นกลางใบและเส้นแขนงใบสีเขียวอ่อนเห็นได้ชัด ผิวใบด้านบนมีสีเขียวเข้ม ผิวใบด้านล่างสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.5) ในสัปดาห์ที่ 7 ต้นเบญจมาศเริ่มมีการออกดอก พบว่าจำนวนดอกของแต่ละต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยเฉลี่ยแล้วมีจำนวนดอก 6-8 ดอกต่อต้น เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 11 ดอกจะมีลักษณะบานเต็มที่ มีขนาดดอกไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยขนาดของดอกโดยเฉลี่ย 2 เซนติเมตร วัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางของดอก (ตารางที่ 4.7) สำหรับต้นที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลาย EMS 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที มีความสูงต้น จำนวนใบ จำนวนดอก และขนาดดอกมากที่สุด 22.69 เซนติเมตร, 18.38 ใบ, 8.14 ดอก และ 2.16 เซนติเมตร ตามลำดับ และต้นที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลาย EMS 0 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที (ต้นควบคุม) มีความสูงต้น จำนวนใบ จำนวนดอก และขนาดดอกน้อยที่สุด 20.01 เซนติเมตร, 17.09 ใบ, 6.66 ดอก และ 1.82 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) สุดท้ายพบว่าลักษณะของดอกในทริทเมนต์ที่ได้รับสารละลาย EMS ระยะเวลา 60 นาที และ 120 นาที มีลักษณะแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS ดังนี้ ต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS ลักษณะของดอกเป็นประเภท single โดยมีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีขาว บานเรียงซ้อนกัน

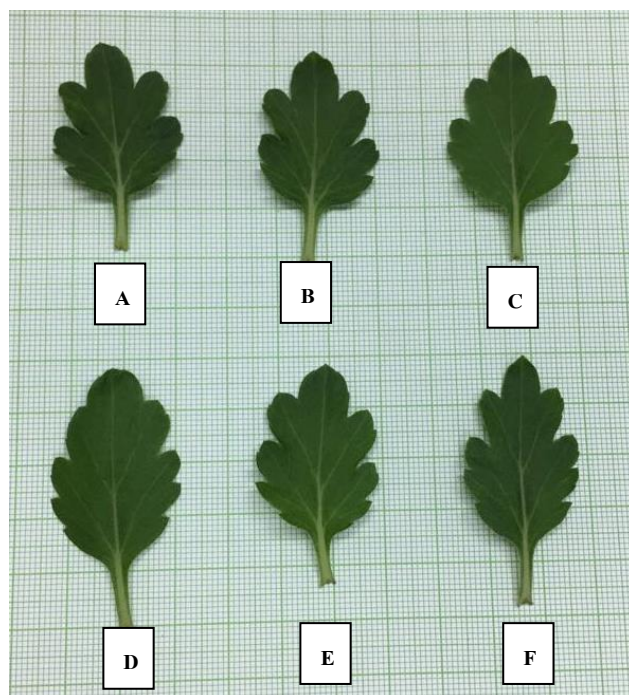
2-3 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว ไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก (ภาพที่ 4.6A) ต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที ลักษณะของดอกเป็นประเภท single โดยมีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีขาว บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว มีลักษณะกลม ไม่มีการพัฒนา อยู่ตรงใจกลางดอก พบ 1 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.6B) ต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที ลักษณะของดอกเป็นประเภท single โดยมีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีขาว และสีเหลืองบานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว ไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก (ภาพที่ 4.6C) และมีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีเหลืองบานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว ไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก พบ 1 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.6D) และต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที ลักษณะของดอกเป็นประเภท single โดยมีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีขาว บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น กลีบดอกมีลักษณะเรียวยาวบริเวณปลายกลีบ กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว ไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก พบ 1 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.6E และ 4.6F)

หลังจากย้ายปลูกเบญจมาศสายพันธุ์วิคนอกสภาพปลอดเชื้อที่จังหวัดเชียงใหม่พบว่าดอกเบญจมาศที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS ในบางต้นที่สุ่มเลือกมาปลูกนั้นมีลักษณะแตกต่างกัน คือลักษณะของดอกเป็นประเภท single โดยมีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีขาว บานเรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว ไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก (ภาพที่ 4.7A) และมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของดอกจากประเภท single เป็นประเภท pompon โดยกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีขาว มีลักษณะสั้น และกว้าง โค้งเข้าหาใจกลางดอก กลีบดอกบานเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ เมื่อดอกบานจะไม่เห็นดอกย่อยวงใน ทำให้ดอกมีลักษณะกลม พบ 1 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.7B) ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ที่ระยะเวลา 60 นาที มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของดอกจากประเภท single เป็นประเภท pompon โดยกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีขาว มีลักษณะสั้น และกว้าง โค้งเข้าหาใจกลางดอก กลีบดอกบานเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ เมื่อดอกบานจะไม่เห็นดอกย่อยวงใน ทำให้ดอกมีลักษณะกลม ตรงใจกลางดอกพบเกสรสีเหลือง พบ 1 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.7C) ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 60 นาที มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของดอกจากประเภท single เป็นประเภท pompon

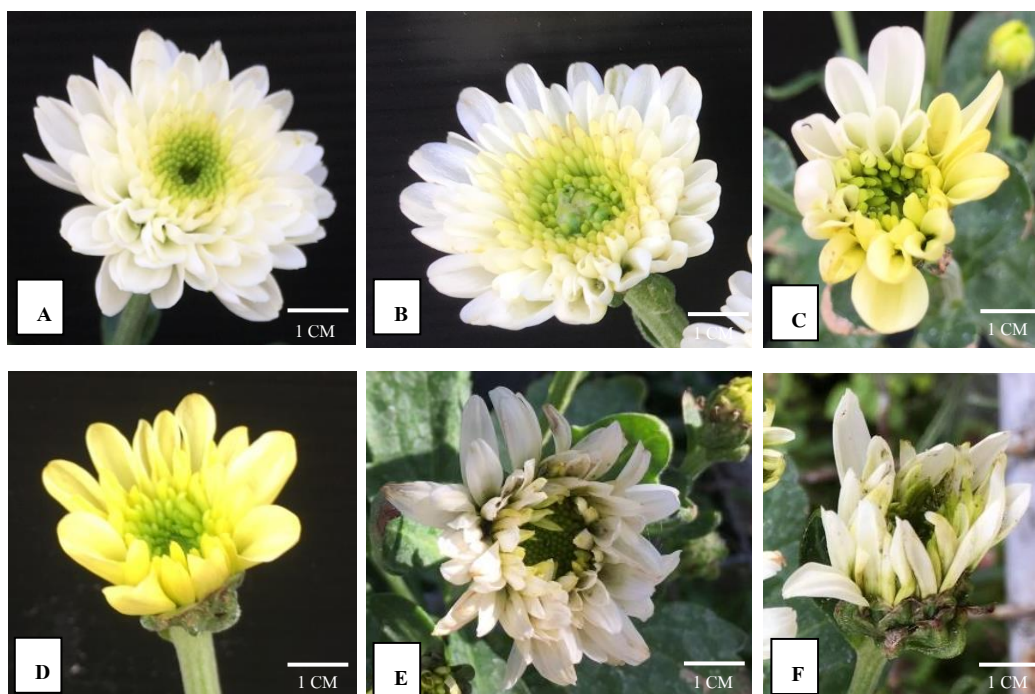
โดยกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีขาว มีลักษณะสั้น และกว้าง โคนง่าเข้าหาใจกลางดอก กลีบดอกบานเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว ไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก พบ 1 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.7D) และอีกหนึ่งลักษณะที่พบคือกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีขาว ลักษณะสั้น และกว้าง โคนง่าเข้าหาใจกลางดอก กลีบดอกบานเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ เมื่อดอกบานจะไม่เห็นดอกย่อยวงใน ทำให้ดอกมีลักษณะกลม ตรงใจกลางดอกพบเกสรสีเหลือง พบ 1 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.7E)



ภาพที่ 4.4 ต้นเบญจมาศพันธุ์วิวิกรุ่น M2 หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ที่ระดับความเข้มข้นสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 60 นาที (B) 0.5% 60 นาที (C) 1% 60 นาที (D) ต้นควบคุม 0% 120 นาที (E) 0.5% 120 นาที และ (F) 1% 120 นาที



ภาพที่ 4.5 ลักษณะของใบเบญจมาศสายพันธุ์วิคหลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 60 นาที (B) 0.5% 60 นาที (C) 1% 60 นาที (D) ต้นควบคุม 0% 120 นาที (E) 0.5% 120 นาที และ (F) 1% 120 นาที



ภาพที่ 4.6 ลักษณะของดอกเบญจมาศสายพันธุ์วิคหลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 11 สัปดาห์ ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สาร (A) ต้นควบคุม 0% 60 และ 120 นาที (B) 0.5% 60 นาที (C,D) 1% 60 นาที และ (E,F) 0.5% 120 นาที



ภาพที่ 4.7 ลักษณะของดอกเบญจมาศพันธุ์วีวีกหลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 11 สัปดาห์ ที่จังหวัด เชียงใหม่ ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย EMS และระยะเวลาในการซ้สาร (A) ด้นควบคุม 0% 60 นาที (B) 0% 60 นาที (C) 0.5% 60 นาที และ (D, E) 1% 60 นาที

ตารางที่ 4.6 แสดงอัตราการรอดชีวิตหลังจากย้ายปลูกเบญจมาศสายพันธุ์วิค เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์

		อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) (\pm SE) ^U						
		อายุ (สัปดาห์)						
		1	2	3	4	5	6	7
EMS (%)	0	100.00 \pm 0.00	97.61 \pm 15.43	97.61 \pm 15.43	97.61 \pm 15.43	97.61 \pm 15.43	97.61 \pm 21.55	97.61 \pm 21.55
	0.5	100.00 \pm 0.00	98.41 \pm 12.59	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
	1.0	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	97.61 \pm 0.00
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ระยะเวลา (นาที)	60	100.00 \pm 0.00	98.41 \pm 12.59	98.41 \pm 12.59	98.41 \pm 12.59	100.00 \pm 0.00	96.82 \pm 17.67	96.82 \pm 17.67
	120	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)							
0	60	100.00 \pm 0.00	95.23 \pm 21.82	95.23 \pm 21.82	95.23 \pm 21.82	95.23 \pm 21.82	95.23 \pm 17.67	95.23 \pm 17.67
	120	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
0.5	60	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
	120	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
1.0	60	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	95.23 \pm 0.00
	120	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV%		0.00	8.97	8.97	8.97	8.97	12.80	12.80

^Uค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.

ตารางที่ 4.7 แสดงความสูง จำนวนใบ จำนวนดอก และขนาดของดอกเบญจมาศสายพันธุ์วิวก หลังจากย้ายปลูก เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์

		ความสูงต้น (ซม.) (\pm SE) ^L	จำนวนใบ (\pm SE) ^L	จำนวนดอก (\pm SE) ^L	ขนาดของดอก (ซม.) (\pm SE) ^L
EMS (%)	0	20.61 \pm 6.31	17.26 \pm 4.67	6.88 \pm 3.58	1.99 \pm 0.49
	0.5	21.56 \pm 3.12	17.83 \pm 1.69	7.40 \pm 2.54	2.12 \pm 0.36
	1.0	21.63 \pm 4.59	17.78 \pm 3.51	7.45 \pm 2.74	1.99 \pm 0.34
F-test		ns	ns	ns	ns
ระยะเวลา (นาที)	60	21.43 \pm 6.45	17.52 \pm 4.53	7.42 \pm 3.09	1.97 \pm 0.48
	120	21.10 \pm 4.25	17.73 \pm 2.38	7.06 \pm 2.82	2.09 \pm 0.30
F-test		ns	ns	ns	ns
EMS (%)	ระยะเวลา (นาที)				
0	60	20.01 \pm 7.96	17.09 \pm 2.16	6.66 \pm 2.50	1.82 \pm 0.50
	120	21.21 \pm 3.86	17.42 \pm 6.12	6.80 \pm 2.47	2.12 \pm 0.49
0.5	60	22.69 \pm 2.85	18.38 \pm 1.46	8.14 \pm 2.38	2.16 \pm 0.49
	120	20.43 \pm 2.90	17.71 \pm 1.53	6.95 \pm 3.98	2.13 \pm 0.18
1.0	60	21.61 \pm 5.65	17.19 \pm 4.78	7.19 \pm 2.22	1.99 \pm 0.47
	120	21.66 \pm 3.15	17.95 \pm 1.78	7.71 \pm 2.74	1.99 \pm 0.14
F-test		ns	ns	ns	ns
CV%		26.33	20.74	41.18	19.52

^Lค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

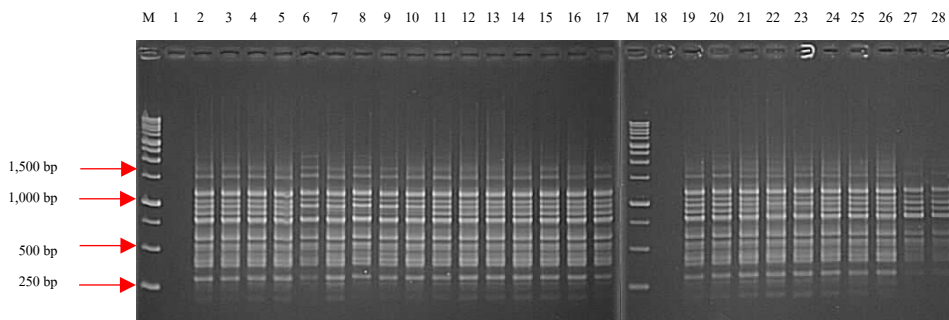
ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.1.7 การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเบญจมาศสายพันธุ์วิวก ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน ด้วยเทคนิค RAPD

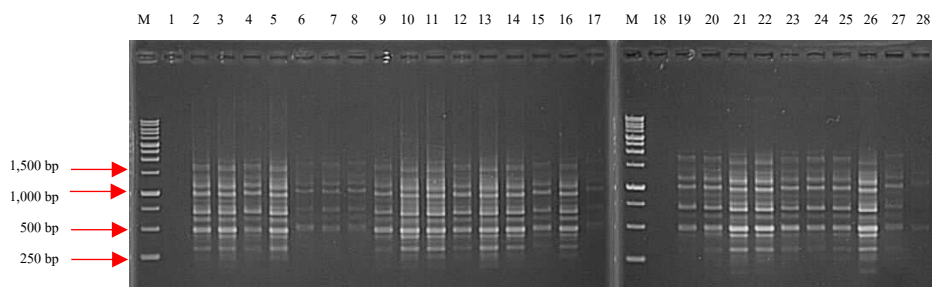
จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเบญจมาศสายพันธุ์วิวก ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกันจำนวน 26 ตัวอย่างที่มาจากรีทเมนต์ที่ได้รับการคัดเลือกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาว่ามีความแตกต่างจากต้นควบคุม ดังต่อไปนี้ ต้นควบคุมที่ชักนำให้เกิดต้น โดยผ่านการเกิดแคลลัสและไม่ได้ผ่านการแช่สารละลาย EMS, ต้นควบคุมที่ชักนำให้เกิดต้น โดยไม่ได้ผ่านการเกิดแคลลัสและไม่ได้ผ่านการแช่สารละลาย EMS และต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างทั้งหมดมาทดสอบด้วยความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้ไพรเมอร์ RAPD จำนวน 28 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 4.8) พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ 8 ไพรเมอร์ คือ OPA-07, OPA-08, OPB-07, OPF-06, OPF-08, OPF-13, OPF-14 และ OPF-18 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนจำนวน 11, 10, 10, 11, 10, 8, 8 และ 8 แถบ ตามลำดับ ขนาดตั้งแต่ 250-2,000 คู่เบส (ภาพที่ 4.8-4.15) โดยขนาดของแถบดีเอ็นเอต่ำสุด 250 bp ในไพรเมอร์ OPF-14 (ภาพที่ 4.14) และขนาดของแถบดีเอ็นเอสูงสุด 2,000 bp ในไพรเมอร์ OPF-06 (ภาพที่ 4.11) ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 78 แถบ และให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความต่าง (Polymorphism) ทั้งหมด 34 แถบ คิดเป็น 23.44 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอที่มีความต่างทั้งหมดเท่ากับ 4.25 แถบ ต่อไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความต่างมากที่สุดคือไพรเมอร์ OPF-13 8 แถบ ส่วนไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความต่างน้อยที่สุด OPF-14 1 แถบ (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.8 ชนิดและลำดับเบสของไพรเมอร์อาร์เอฟดีที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของเบญจมาศสายพันธุ์วิวก
ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

Primer	Sequence
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-05	AGGGGTCTTG
OPA-07	GAAACGGGTG
OPA-08	GTGACGTAGG
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-15	TTCCGAACCC
OPB-04	GGAATTCGG
OPB-07	GGTGACGCAG
OPF-01	ACGGATCCTG
OPF-02	GAGGATCCCT
OPF-03	CCTGATCACC
OPF-04	GGTGATCAGG
OPF-05	CCGAATTCCC
OPF-06	GGGAATTCGG
OPF-07	CCGATATCCC
OPF-08	GGGATATCGG
OPF-09	CCAAGCTTCC
OPF-10	GGAAGCTTGG
OPF-11	TTGGTACCCC
OPF-12	ACGGTACCAG
OPF-13	GGCTGCAGAA
OPF-14	TGCTGCAGGT
OPF-15	CCAGTACTCC
OPF-16	GGAGTACTGG
OPF-17	AACCCGGGAA
OPF-18	TTCCCGGGTT
OPF-19	CCTCTAGACC
OPF-20	GGTCTAGAGG



ภาพที่ 4.8 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพริเมอ์ OPA-07



ภาพที่ 4.9 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพริเมอ์ OPA-08

ช่อง M = 1Kb DNA Ladder

ช่อง 1 และ 18 = Negative control

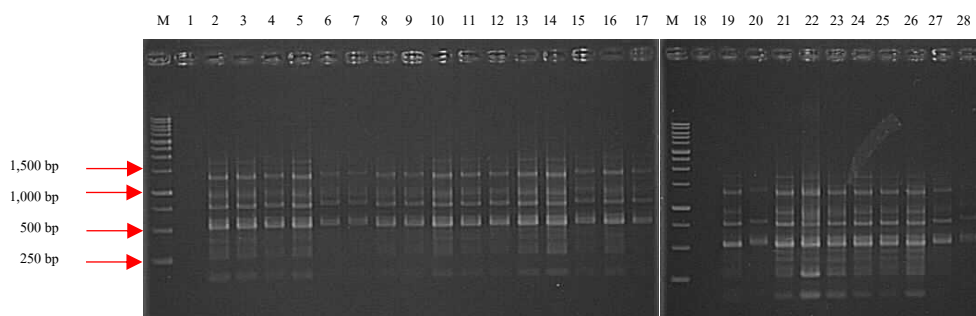
ช่อง 2-5, 19-21 = EMS 0% 60 นาที

ช่อง 6-13, 22, 23 = EMS 0.5% 60 นาที

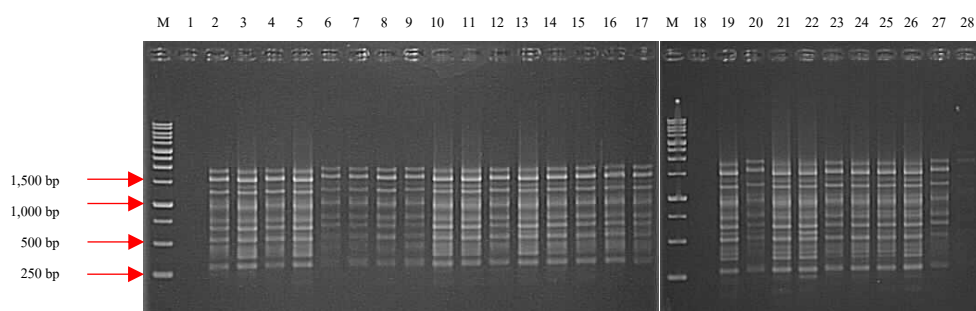
ช่อง 14-17, 24-25 = EMS 1% 60 นาที

ช่อง 26 = ต้นควบคุมที่ผ่านการชักนำให้เกิดแคลลัส

ช่อง 27-28 = ต้นควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการชักนำให้เกิดแคลลัส



ภาพที่ 4.10 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรมอร์ OPB-07



ภาพที่ 4.11 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรมอร์ OPF-06

ช่อง M = 1Kb DNA Ladder

ช่อง 1 และ 18 = Negative control

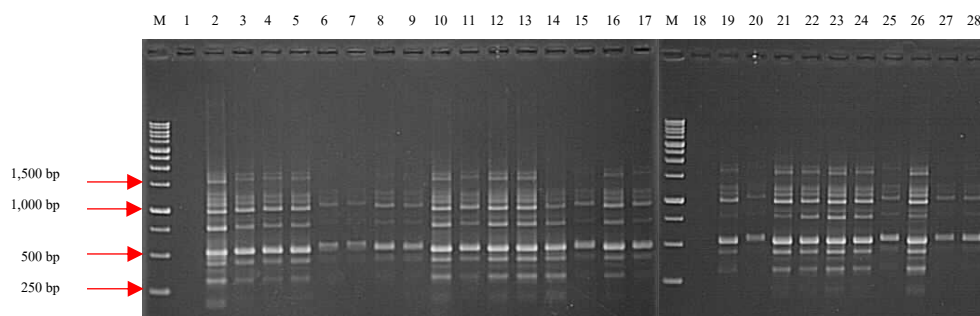
ช่อง 2-5, 19-21 = EMS 0% 60 นาที

ช่อง 6-13, 22, 23 = EMS 0.5% 60 นาที

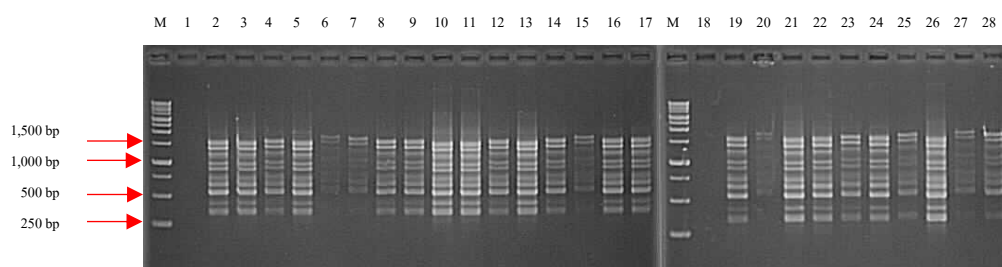
ช่อง 14-17, 24-25 = EMS 1% 60 นาที

ช่อง 26 = ต้นควบคุมที่ผ่านการชักนำให้เกิดแคลัส

ช่อง 27-28 = ต้นควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการชักนำให้เกิดแคลัส



ภาพที่ 4.12 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรมอร์ OPF-08



ภาพที่ 4.13 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรมอร์ OPF-13

ช่อง M = 1Kb DNA Ladder

ช่อง 1 และ 18 = Negative control

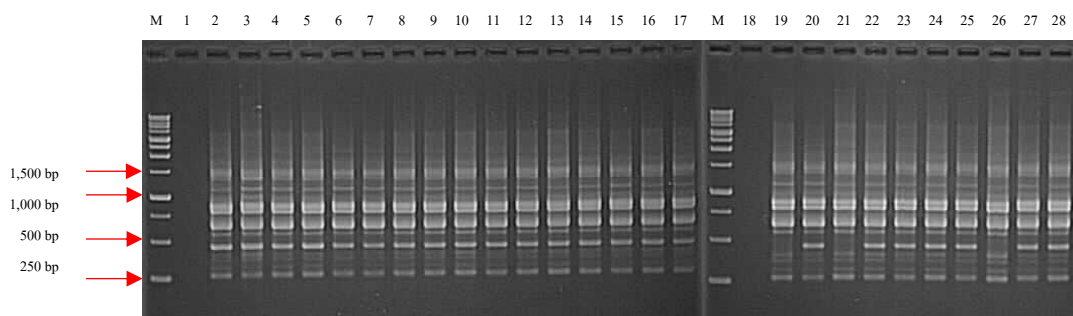
ช่อง 2-5, 19-21 = EMS 0% 60 นาที

ช่อง 6-13, 22, 23 = EMS 0.5% 60 นาที

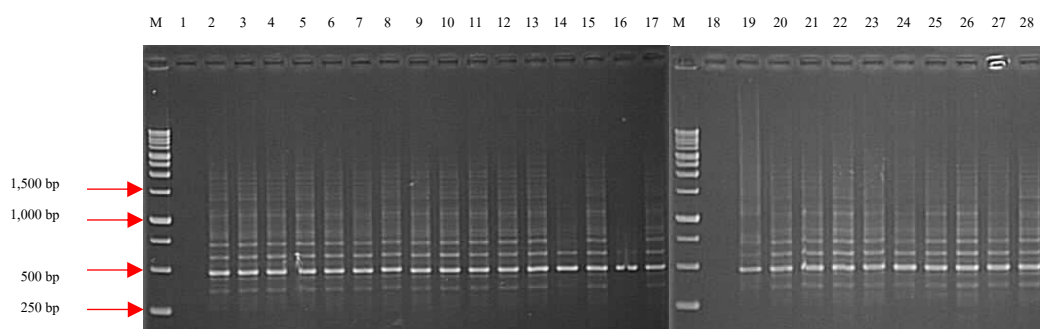
ช่อง 14-17, 24-25 = EMS 1% 60 นาที

ช่อง 26 = ต้นควบคุมที่ผ่านการชักนำให้เกิดแคลลัส

ช่อง 27-28 = ต้นควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการชักนำให้เกิดแคลลัส



ภาพที่ 4.14 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรมอร์ OPF-14



ภาพที่ 4.15 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรมอร์ OPF-18

ช่อง M = 1Kb DNA Ladder

ช่อง 1 และ 18 = Negative control

ช่อง 2-5, 19-21 = EMS 0% 60 นาที

ช่อง 6-13, 22, 23 = EMS 0.5% 60 นาที

ช่อง 14-17, 24-25 = EMS 1% 60 นาที

ช่อง 26 = ต้นควบคุมที่ผ่านการชักนำให้เกิดแคลัส

ช่อง 27-28 = ต้นควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการชักนำให้เกิดแคลัส

4.1.7.1 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism และค่า PICs จากแต่ละคู่ไพรเมอร์

การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของของเบญจมาศสายพันธุ์วิวกที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยเทคนิค RAPD พบไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างจำนวนทั้งหมด 8 ไพรเมอร์ และให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) 1-8 แถบ เฉลี่ย 4.25 แถบต่อไพรเมอร์ และมีค่าเฉลี่ย polymorphic bands 44.2 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ที่ให้เปอร์เซ็นต์ polymorphic bands สูงสุดคือ OPF18 ซึ่งให้ความต่างของแถบดีเอ็นเอถึง 87.5 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของค่า Polymorphic Information Contents (PICs) ซึ่งแต่ละไพรเมอร์มีค่า PICs ดังนี้ OPA-07 มีค่า PICs 0.05, OPA-08 มีค่า PICs 0.12, OPB-07 มีค่า PICs 0.13, OPF-06 มีค่า PICs 0.02, OPF-08 มีค่า PICs 0.13, OPF-13 มีค่า PICs 0.07, OPF-14 มีค่า PICs 0.02 และ OPF-18 มีค่า PICs 0.08 ให้ค่าเฉลี่ยทั้งหมดเท่ากับ 0.07 (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 จำนวนแถบดีเอ็นเอจากหลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเบญจมาศสายพันธุ์วิวกที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยเทคนิค RAPD จำนวน 8 ไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism จากแต่ละไพรเมอร์

ลำดับ	ชนิดไพรเมอร์	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอที่ แตกต่าง	% polymorphic bands	PICs
1	OPA07	11	3	27.27	0.05
2	OPA08	10	6	60	0.12
3	OPB07	10	3	30	0.13
4	OPF06	10	2	20	0.02
5	OPF08	11	4	36.33	0.13
6	OPF13	10	8	80	0.07
7	OPF14	8	1	12.5	0.02
8	OPF18	8	7	87.5	0.08
รวมทั้งหมด		78	34	353.60	0.62
เฉลี่ย		9.75	4.25	44.2	0.07

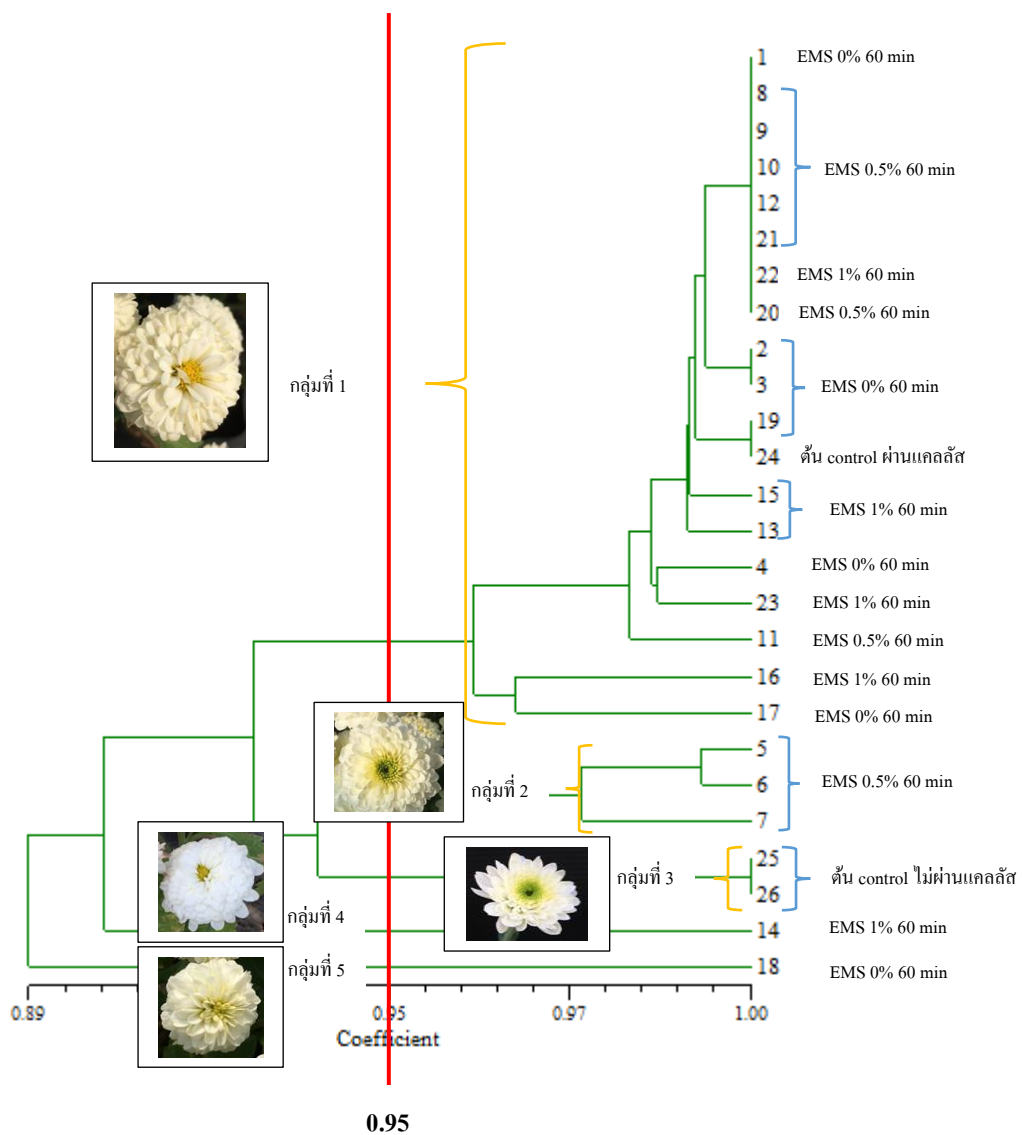
4.1.7.2 การจัดกลุ่มเบญจมาศสายพันธุ์วิวกที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกันด้วยโปรแกรม NTSYS 2.10m

จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยนำเมตริกซ์ความเหมือนตัวแทนสัมประสิทธิ์แจค คาร์ด (Jaccard's coefficient) เพื่อจัดกลุ่มข้อมูลโดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS 2.10m (ตารางที่ 4.10) มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.95 สามารถจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเบญจมาศสายพันธุ์วิวกได้ 5 กลุ่ม จากทั้งหมด 26 ตัวอย่าง (ภาพที่ 4.16) และ (ตารางที่ 4.11) และมีค่า cophenetic correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.97 ซึ่งเป็นการจัดกลุ่มที่ดีมาก และเนื่องจากมีค่าเป็นบวก หมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์แบบทางเดียว (วสันต์ จันทราทิตย์ และคณะ. 2547) และสอดคล้องกับการจำแนกกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลการจำแนกการจัดกลุ่มด้วยการวิเคราะห์ห้อยค์ประกอบหลัก (Principle Coordinates Analysis; PCoA) โดยดูจากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด 78 แถบ เมื่อพิจารณาค่าการกระจายตัวของเบญจมาศสายพันธุ์วิวกทั้งหมด 26 ตัวอย่าง ซึ่งแสดงผลของการกระจายตัวในรูปแบบสองมิติ (ภาพที่ 4.17) มีค่า PCoA ลำดับที่ 1, 2 และ 3 ครอบคลุมระดับความแปรปรวนอยู่ที่ 80.00, 5.39 และ 4.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าสอดคล้องกับผลการจัดกลุ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของเบญจมาศสายพันธุ์วิวกจำนวน 26 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการจัดกลุ่มข้อมูลจากค่าสัมประสิทธิ์ของความเหมือน (similarity coefficient)





ตารางที่ 4.10 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของเบญจมาศสายพันธุ์วิวก 26 ตัวอย่าง จากการคำนวณด้วยวิธี Jaccard's coefficient โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.10m

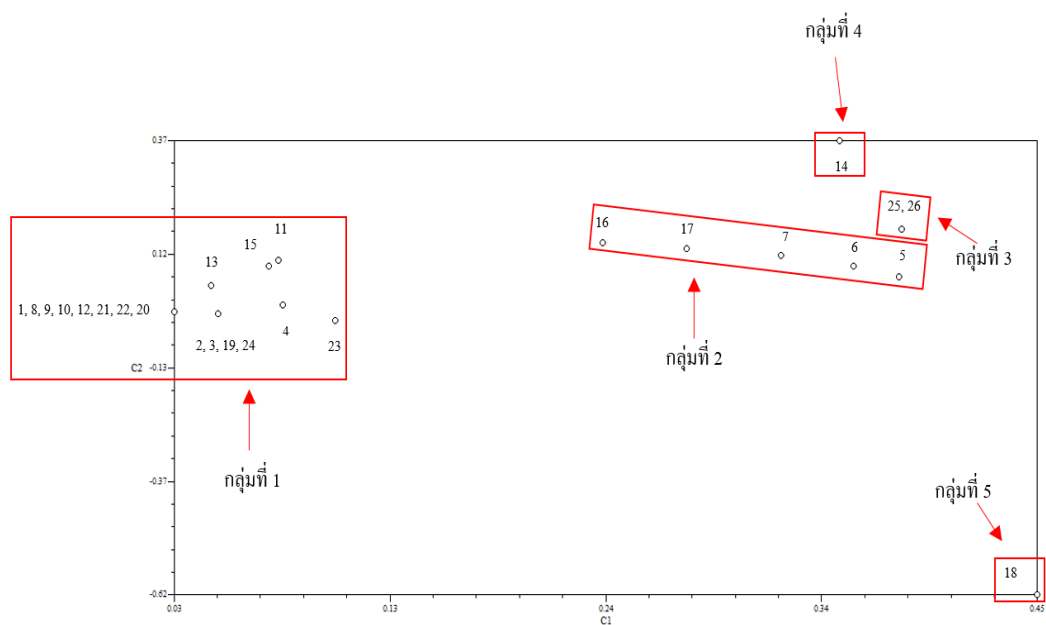
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26		
1	1.00																											
2	0.99	1.00																										
3	0.99	1.00	1.00																									
4	0.98	0.99	0.99	1.00																								
5	0.91	0.92	0.92	0.93	1.00																							
6	0.92	0.93	0.93	0.93	0.99	1.00																						
7	0.94	0.95	0.95	0.94	0.97	0.97	1.00																					
8	1.00	0.99	0.99	0.98	0.91	0.92	0.94	1.00																				
9	1.00	0.99	0.99	0.98	0.91	0.92	0.94	1.00	1.00																			
10	1.00	0.99	0.99	0.98	0.91	0.92	0.94	1.00	1.00	1.00																		
11	0.98	0.97	0.97	0.97	0.90	0.91	0.93	0.98	0.98	0.98	1.00																	
12	1.00	0.99	0.99	0.98	0.91	0.92	0.94	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00																
13	0.99	0.98	0.98	0.97	0.91	0.91	0.93	0.99	0.99	0.99	0.97	0.99	1.00															
14	0.90	0.90	0.90	0.90	0.89	0.89	0.90	0.90	0.90	0.90	0.91	0.90	0.90	1.00														
15	0.99	0.98	0.98	0.97	0.92	0.93	0.93	0.99	0.99	0.99	0.97	0.99	0.98	0.90	1.00													
16	0.96	0.95	0.95	0.95	0.92	0.92	0.95	0.96	0.96	0.96	0.95	0.96	0.97	0.92	0.95	1.00												
17	0.95	0.95	0.95	0.94	0.92	0.93	0.95	0.95	0.95	0.95	0.94	0.95	0.95	0.90	0.95	0.96	1.00											
18	0.88	0.89	0.89	0.88	0.91	0.90	0.91	0.88	0.88	0.88	0.87	0.88	0.88	0.85	0.88	0.89	0.90	1.00										
19	0.99	0.98	0.98	0.97	0.91	0.91	0.93	0.99	0.99	0.99	0.97	0.99	0.98	0.89	0.98	0.95	0.96	0.88	1.00									
20	1.00	0.99	0.99	0.98	0.91	0.92	0.94	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	0.99	0.90	0.99	0.96	0.95	0.88	0.99	1.00								
21	1.00	0.99	0.99	0.98	0.91	0.92	0.94	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	0.99	0.90	0.99	0.96	0.95	0.88	0.99	1.00	1.00							
22	1.00	0.99	0.99	0.98	0.91	0.92	0.94	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	0.99	0.90	0.99	0.96	0.95	0.88	0.99	1.00	1.00	1.00						
23	0.98	0.99	0.99	0.98	0.93	0.93	0.95	0.98	0.98	0.98	0.97	0.98	0.97	0.90	0.97	0.95	0.94	0.9	0.97	0.98	0.98	0.98	1.00					
24	0.99	0.98	0.98	0.97	0.91	0.91	0.93	0.99	0.99	0.99	0.97	0.99	0.98	0.89	0.98	0.95	0.96	0.88	1.00	0.99	0.99	0.99	0.97	1.00				
25	0.91	0.92	0.92	0.91	0.92	0.93	0.94	0.91	0.91	0.91	0.9	0.91	0.91	0.88	0.92	0.92	0.94	0.89	0.91	0.91	0.91	0.91	0.93	0.91	1.00			
26	0.91	0.92	0.92	0.91	0.92	0.93	0.94	0.91	0.91	0.91	0.9	0.91	0.91	0.88	0.92	0.92	0.94	0.89	0.91	0.91	0.91	0.91	0.93	0.91	1.00	1.00		



ภาพที่ 4.16 Phylogenetic tree ของเบญจมาศสายพันธุ์วิกที่ ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน และนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10m โดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิค RAPD

ตารางที่ 4.11 แสดงการจัดกลุ่มของต้นเบญจมาศสายพันธุ์วิวกที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกันที่ได้จาก Phylogenetic tree

ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน	ดอกเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน
ต้นควบคุมที่ไม่ได้ผ่านแคลลัส	 <div data-bbox="1023 607 1150 680" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">กลุ่มที่ 3</div>
ต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS 60 นาที	 <div data-bbox="938 909 1066 983" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">กลุ่มที่ 1</div> <div data-bbox="1091 909 1219 983" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 20px;">กลุ่มที่ 5</div>
ต้นที่ได้รับสารละลาย EMS 0.5% 60 นาที	 <div data-bbox="938 1200 1066 1274" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">กลุ่มที่ 1</div> <div data-bbox="1091 1200 1219 1274" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 20px;">กลุ่มที่ 2</div>
ต้นที่ได้รับสารละลาย EMS 1% 60 นาที	 <div data-bbox="938 1491 1066 1565" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">กลุ่มที่ 1</div> <div data-bbox="1091 1491 1219 1565" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 20px;">กลุ่มที่ 4</div>



ภาพที่ 4.17 การกระจายตัวของเบญจมาศสายพันธุ์วิวก 26 ตัวอย่างแบบ 2 มิติ ที่ได้จากการวิเคราะห์ Principal Coordinates Analysis (PCoA) โดยเครื่องหมาย RAPD

4.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรท (ดอกประเภท single สีเหลือง) โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

4.2.1 อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส

หลังจากการแช่กลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรท ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าสัปดาห์ที่ 2 กลีบดอกมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ในสัปดาห์ที่ 4 จนถึงสัปดาห์ที่ 12 กลีบดอกมีอัตราการรอดชีวิตที่น้อยลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินสูงขึ้น อัตราการรอดชีวิตลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.12) ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงกลีบดอกเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.21 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.19 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.18)

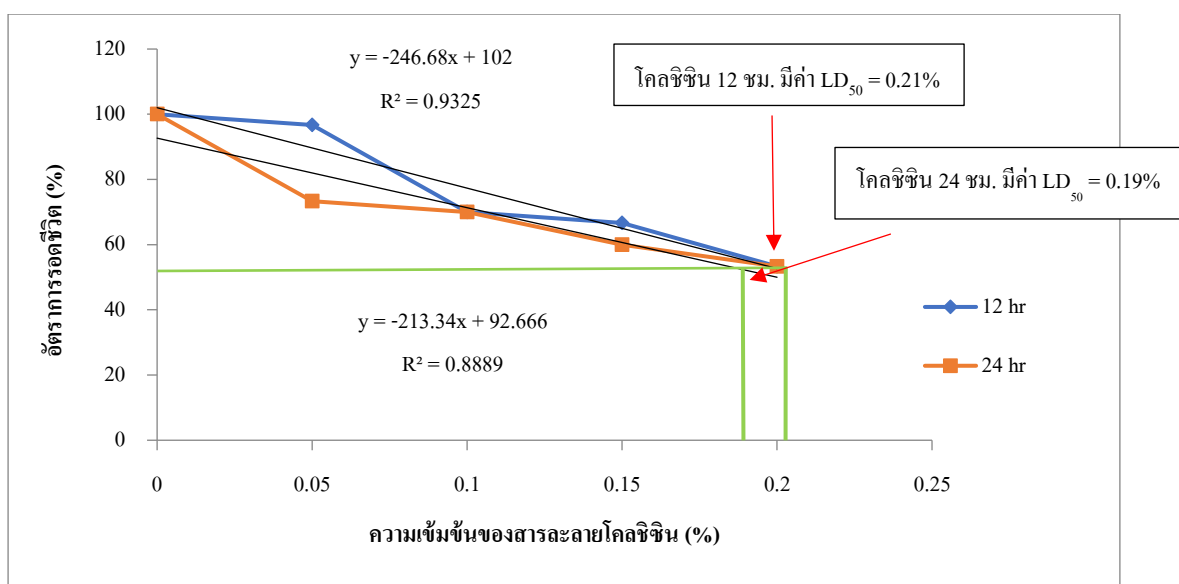
4.2.2 ขนาดของแคลลัส

หลังจากการแช่กลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรท ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่ออายุ 2 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนเริ่มต้นเริ่มมีแคลลัสเกิดขึ้น และแคลลัสมีแนวโน้มที่จะใหญ่ขึ้นเมื่อมีอายุเพิ่มมากขึ้น โดยแคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่น มีสีเขียวอ่อนเกิดขึ้นที่ผิวนอกและรอยตัดของชิ้นส่วน เมื่อเลี้ยงแคลลัสมาเป็นระยะ 12 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่มีขนาดความกว้าง และความยาวมากที่สุด คือ 1.66 และ 1.83 เซนติเมตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ต้นควบคุม) ส่วนแคลลัสที่มีขนาดความกว้าง และความยาวน้อยที่สุด คือ 1.11 และ 1.06 เซนติเมตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.13) ซึ่งมีขนาดความกว้าง และความยาวของแคลลัสน้อยกว่าต้นควบคุม 66.87 และ 57.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.2.3 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและจำนวนยอดต่อแคลลัส

หลังจากการแช่กลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรท ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ ชิ้นส่วนเริ่มต้นมีการพัฒนามาจากกลุ่มแคลลัสหรือก้อนเนื้อเยื่อที่พัฒนาขึ้นมา โดยการ

พัฒนาไปเป็นแคลลัสที่มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน ผิวขรุขระ มีเขียวอ่อนหรือสีเหลืองบริเวณรอยตัด และการพัฒนาไปเป็นส่วนยอดโดยผ่านการเกิดแคลลัส โดยแคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่น (compact callus) เมื่ออายุ 12 สัปดาห์พบว่าความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ต้นควบคุม) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมากที่สุด 90.00 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดต่อแคลลัสมากที่สุด 2.20 ยอด ส่วนความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดน้อยที่สุด 43.33 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดต่อแคลลัสน้อยที่สุด 1.20 ยอด (ตารางที่ 4.13)



ภาพที่ 4.18 กราฟอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

ตารางที่ 4.12 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิตของแคลัส เบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรท ภายหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

		อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) (\pm SE) ^L					
		อายุ (สัปดาห์)					
		2	4	6	8	10	12
โคลชิซิน (%)	0	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a
	0.05	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	98.33 \pm 0.00	95.00 \pm 5.47b	90.00 \pm 8.94b	85.00 \pm 13.78b
	0.10	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	95.00 \pm 5.47	85.00 \pm 5.47c	76.67 \pm 5.16c	70.00 \pm 0.00c
	0.15	100.00 \pm 0.00	96.67 \pm 5.16	91.67 \pm 4.08	78.33 \pm 4.08d	71.67 \pm 4.08cd	63.33 \pm 5.16d
	0.20	100.00 \pm 0.00	93.33 \pm 5.16	90.00 \pm 0.00	76.67 \pm 5.16d	66.67 \pm 5.16d	53.33 \pm 5.16e
F-test		ns	ns	ns	**	**	**
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	100.00 \pm 0.00	98.00 \pm 4.14	96.00 \pm 5.07	88.67 \pm 10.60	82.67 \pm 14.37	77.33 \pm 19.07a
	24	100.00 \pm 0.00	98.00 \pm 4.14	93.33 \pm 4.87	85.33 \pm 9.90	79.33 \pm 12.79	71.33 \pm 16.84b
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	**
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)						
0	12	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a
	24	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a
0.05	12	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	96.67 \pm 5.77a	96.67 \pm 5.77a
	24	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	96.67 \pm 5.77ab	90.00 \pm 0.00b	83.33 \pm 5.77b	73.33 \pm 5.77b
0.10	12	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	96.67 \pm 5.77ab	86.67 \pm 5.77bc	76.67 \pm 5.77bc	70.00 \pm 0.00b
	24	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	93.33 \pm 5.77ab	83.33 \pm 5.77bcd	76.67 \pm 5.77bc	70.00 \pm 0.00b
0.15	12	100.00 \pm 0.00	96.67 \pm 5.77	93.33 \pm 5.77ab	80.00 \pm 0.00d	73.33 \pm 5.77cd	66.67 \pm 5.77bc
	24	100.00 \pm 0.00	96.67 \pm 5.77	90.00 \pm 0.00b	76.67 \pm 5.77d	70.00 \pm 0.00cd	60.00 \pm 0.00cd
0.20	12	100.00 \pm 0.00	93.33 \pm 5.77	90.00 \pm 0.00b	76.67 \pm 5.77d	66.67 \pm 5.77d	53.33 \pm 5.77d
	24	100.00 \pm 0.00	93.33 \pm 5.77	90.00 \pm 0.00b	76.67 \pm 5.77d	66.67 \pm 5.77d	50.00 \pm 0.00d
F-test		ns	ns	**	**	**	**
CV%		0.00	3.72	3.34	4.69	5.96	5.49

^Lค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวดิ่ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ 4.13 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ของเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรทต่อ ความกว้าง ความยาวของแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด/แคลลัส ภายหลังจากเลี้ยงเป็น ระยะเวลา 12 สัปดาห์

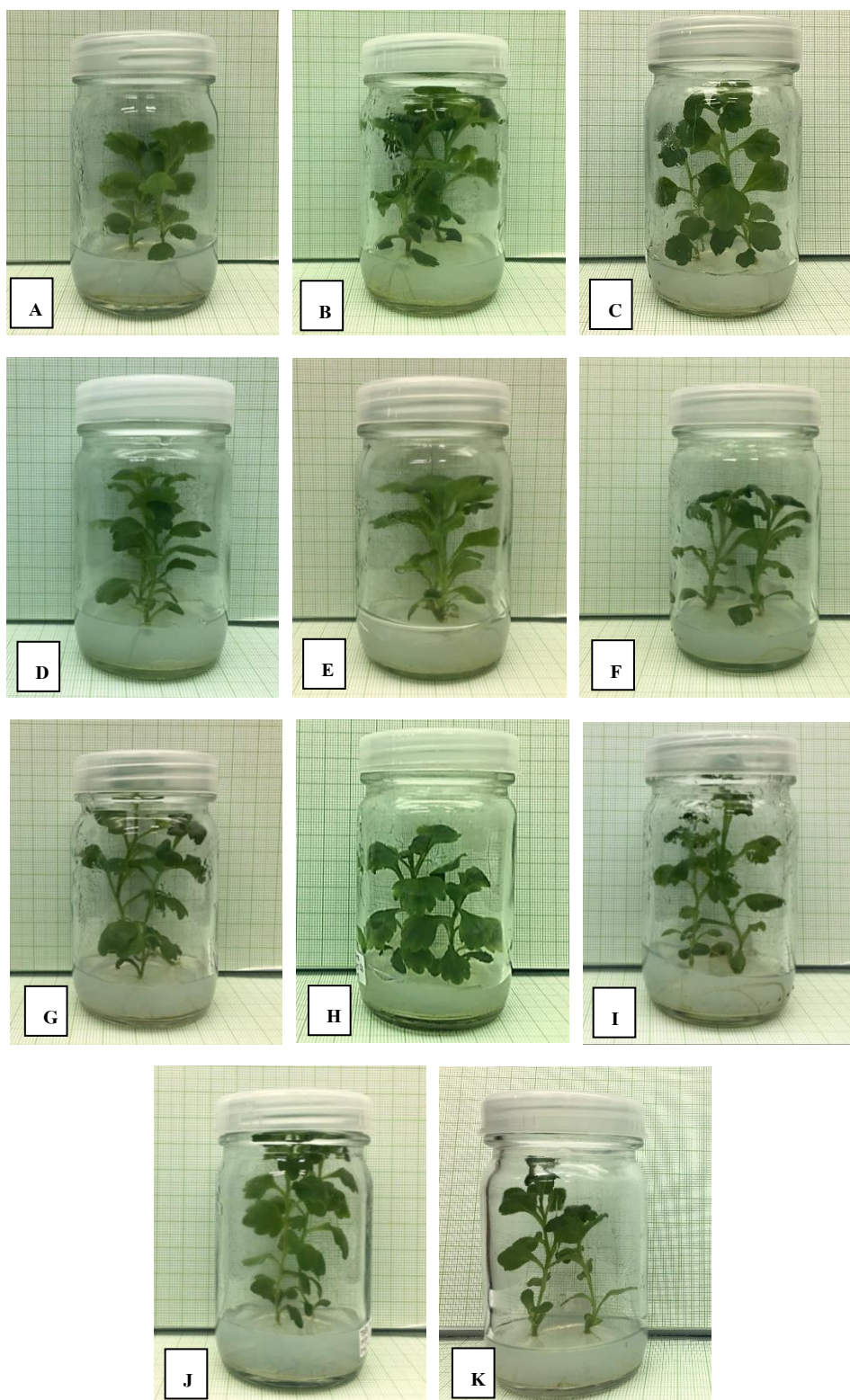
		ขนาดแคลลัส		เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด (\pm SE) ^L	จำนวนยอด/ แคลลัส (\pm SE) ^L
		ความกว้าง (ซม.) (\pm SE) ^L	ความยาว (ซม.) (\pm SE) ^L		
โคลชิซิน (%)	0	1.59 \pm 0.08a	1.67 \pm 0.17a	86.67 \pm 5.16a	2.13 \pm 0.08a
	0.05	1.24 \pm 0.05b	1.31 \pm 0.13b	60.00 \pm 6.32b	1.61 \pm 0.07b
	0.10	1.22 \pm 0.06b	1.31 \pm 0.16b	51.66 \pm 4.08c	1.45 \pm 0.05c
	0.15	1.16 \pm 0.08c	1.13 \pm 0.03c	45.00 \pm 5.16c	1.30 \pm 0.08d
	0.20	1.12 \pm 0.01c	1.09 \pm 0.03c	43.00 \pm 5.47d	1.20 \pm 0.06e
F-test		**	**	**	**
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	1.31 \pm 0.19a	1.39 \pm 0.26a	59.33 \pm 17.91a	1.56 \pm 0.36
	24	1.22 \pm 0.16b	1.21 \pm 0.17b	55.33 \pm 15.97b	1.52 \pm 0.32
F-test		**	**	**	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)				
0	12	1.66 \pm 0.04a	1.83 \pm 0.02a	90.00 \pm 0.00a	2.20 \pm 0.00a
	24	1.52 \pm 0.02b	1.52 \pm 0.01b	83.33 \pm 5.77a	2.06 \pm 0.05a
0.05	12	1.29 \pm 0.01c	1.42 \pm 0.01c	63.33 \pm 5.77b	1.63 \pm 0.05b
	24	1.19 \pm 0.0ef	1.20 \pm 0.09d	56.67 \pm 5.77bc	1.60 \pm 0.10b
0.10	12	1.28 \pm 0.02cd	1.45 \pm 0.07bc	53.33 \pm 5.77cd	1.46 \pm 0.05c
	24	1.17 \pm 0.02efg	1.16 \pm 0.01de	50.00 \pm 0.00cde	1.43 \pm 0.05cd
0.15	12	1.21 \pm 0.01de	1.14 \pm 0.03de	46.67 \pm 5.77e	1.30 \pm 0.10de
	24	1.13 \pm 0.09g	1.12 \pm 0.01ef	46.67 \pm 5.77e	1.30 \pm 0.10de
0.20	12	1.12 \pm 0.01g	1.11 \pm 0.01ef	46.33 \pm 5.77de	1.22 \pm 0.10e
	24	1.11 \pm 0.09g	1.06 \pm 0.01f	43.33 \pm 5.77e	1.20 \pm 0.00e
F-test		**	**	**	**
CV%		2.97	3.13	9.00	4.74

^Lค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

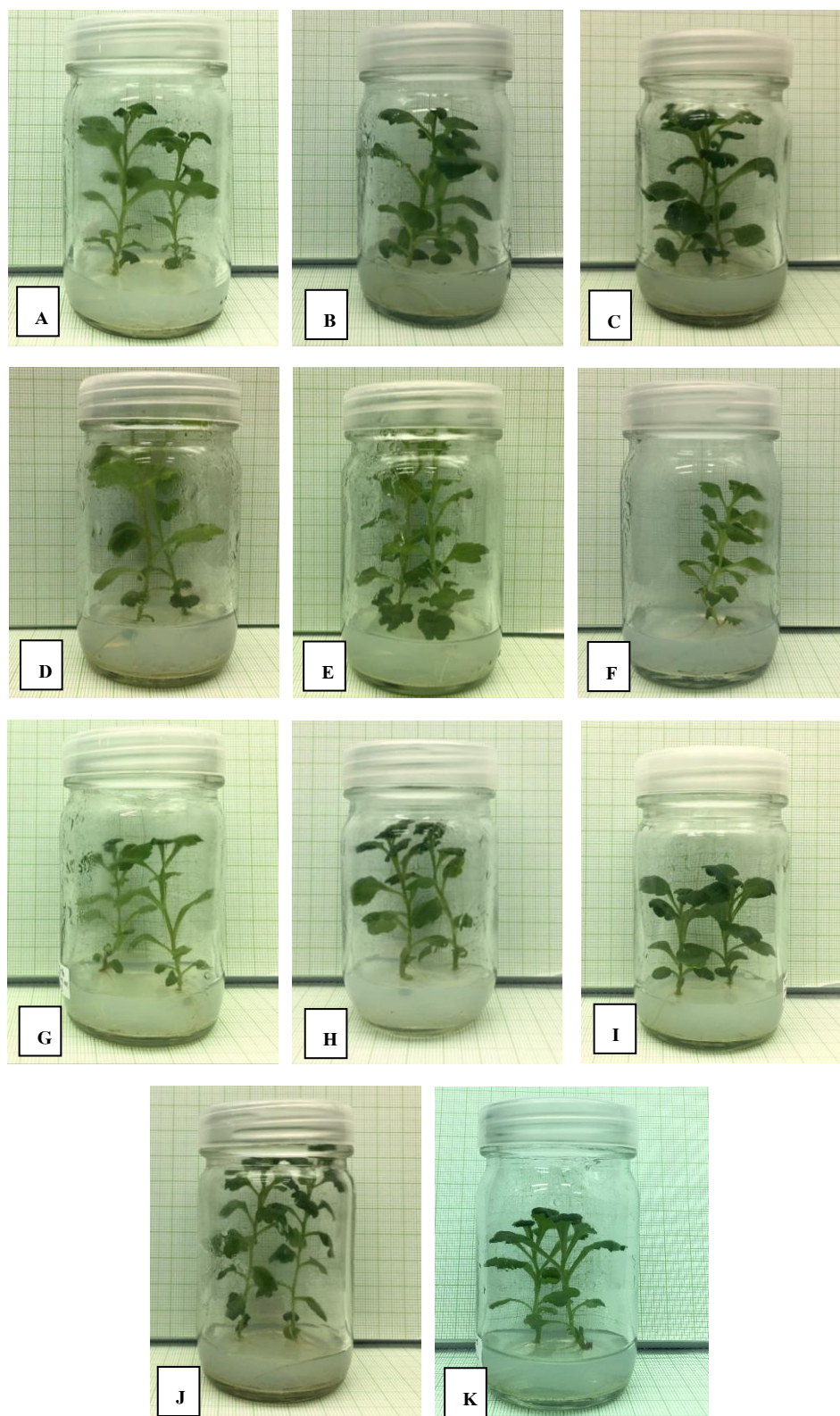
ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.2.4 ความสูงต้น และจำนวนใบเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ รุ่น M1 และ M2

หลังจากการแช่กลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรท ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือนยอดจะพัฒนาไปเป็นต้น นำต้นที่ได้มาตัดบริเวณข้อ และนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต จะได้ต้นในรุ่น M1 พบว่าต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีลักษณะของต้น และใบไม่แตกต่างกัน โดยความสูงของต้นและใบพบว่ามีความเพิ่มขึ้นทุกๆ สัปดาห์ ลำต้นและใบมีสีเขียว ในสัปดาห์ที่ 4 ก่อนทำการเปลี่ยนอาหารพบว่าความสูงต้นเฉลี่ย 4 เซนติเมตร และจำนวนใบเฉลี่ย 7 ใบ (ภาพที่ 4.19), (ตารางที่ 4.14) เมื่อต้นรุ่น M1 เจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 1 เดือนทำการเปลี่ยนอาหารโดยการตัดส่วนข้อและนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต จะได้ต้นในรุ่น M2 ซึ่งจะพบว่าต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีลักษณะของต้น และใบไม่แตกต่างกัน โดยความสูงของต้นและใบพบว่ามีความเพิ่มขึ้นทุกๆ สัปดาห์ ลำต้นและใบมีสีเขียว ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าความสูงต้นเฉลี่ย 4 เซนติเมตร และจำนวนใบเฉลี่ย 7 ใบ (ภาพที่ 4.20), (ตารางที่ 4.14)



ภาพที่ 4.19 ต้นเบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรทรุ่น M1 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 12 ชั่วโมง (A)-(E) และ 24 ชั่วโมง (F)-(J) ในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (A) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% (B) โคลชิซิน 0.05% (C) โคลชิซิน 0.1% (D) โคลชิซิน 0.15% (E) โคลชิซิน 0.2% (F) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% (G) โคลชิซิน 0.05% (H) โคลชิซิน 0.10% (I) โคลชิซิน 0.15% (J) โคลชิซิน 0.2% และ (K) โคลชิซิน 0.05% 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.20 ต้นเบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรทรุ่น M2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 12 ชั่วโมง (A)-(E) และ 24 ชั่วโมง (F)-(J) ในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (A) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% (B) โคลชิซิน 0.05% (C) โคลชิซิน 0.1% (D) โคลชิซิน 0.15% (E) โคลชิซิน 0.2% (F) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% (G) โคลชิซิน 0.05% (H) โคลชิซิน 0.1% (I) โคลชิซิน 0.15% (J) โคลชิซิน 0.2% และ (K) โคลชิซิน 0.05% 12 ชั่วโมง

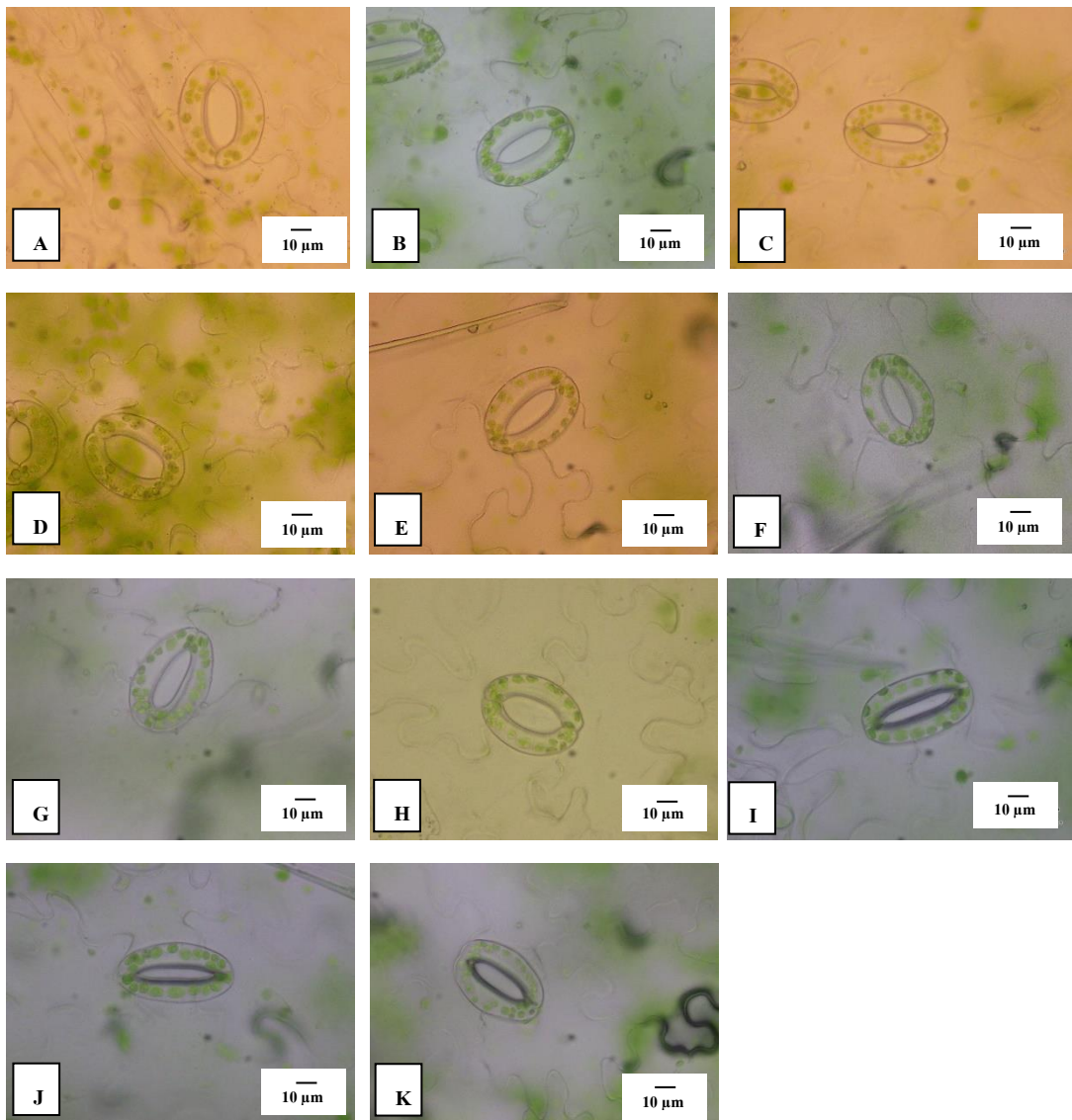
ตารางที่ 4.14 แสดงความสูงต้น และจำนวนใบ ของเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรทรุ่น M1 และรุ่น M2 ที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

		ต้นเบญจมาศรุ่น M1(±SE) ¹		ต้นเบญจมาศรุ่น M2 (±SE) ¹			
		ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนใบ	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนใบ		
โคลชิซิน (%)	0	4.15±0.04	7.11±0.11	4.14±0.03	7.05±0.08		
	0.05	4.14±0.06	7.10±0.08	4.11±0.03	7.10±0.06		
	0.10	4.12±0.06	7.10±0.08	4.09±0.02	7.10±0.08		
	0.15	4.12±0.07	7.15±0.12	4.10±0.02	7.11±0.09		
	0.20	4.10±0.09	7.10±0.08	4.10±0.04	7.10±0.12		
F-test		ns	ns	ns	ns		
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	4.14±0.05	7.11±0.09	4.10±0.03	7.09±0.10		
	24	4.12±0.07	7.11±0.09	4.12±0.03	7.09±0.07		
F-test		ns	ns	ns	ns		
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	0	12	4.15±0.04	7.13±0.15	4.15±0.03	7.06±0.11
			24	4.15±0.05	7.10±0.10	4.15±0.04	7.03±0.05
0.05		12	24	4.17±0.02	7.10±0.10	4.17±0.03	7.13±0.05
			24	4.11±0.07	7.10±0.10	4.11±0.05	7.06±0.05
0.10		12	24	4.13±0.07	7.10±0.10	4.13±0.02	7.06±0.11
			24	4.12±0.06	7.10±0.10	4.12±0.03	7.13±0.05
0.15		12	24	4.11±0.09	7.13±0.11	4.11±0.02	7.10±0.10
			24	4.14±0.06	7.16±0.15	4.14±0.02	7.13±0.11
0.20		12	24	4.13±0.07	7.10±0.10	4.13±0.06	7.10±0.17
			24	4.07±0.11	7.10±0.10	4.07±0.04	7.10±0.10
F-test		ns	ns	ns	ns		
CV%		1.74	1.60	1.21	1.43		

¹ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.2.5 ความกว้าง ความยาว จำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ และปริมาณคลอโรฟิลล์

นำใบที่อยู่ในสภาพปลอดภัยอายุ 8 สัปดาห์มาวัดขนาดความกว้างของปากใบต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าขนาดความกว้างและความยาวของปากใบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนใหญ่จะมีความกว้างของปากใบเฉลี่ยประมาณ 21-24 ไมโครเมตร และมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 44-56 ไมโครเมตร โดยความกว้างของปากใบมากที่สุด 24.67 ไมโครเมตร ความยาวปากใบมากที่สุด 56.95 ไมโครเมตร และจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อปากใบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนใหญ่จะมีปริมาณเม็ดคลอโรพลาสต์โดยเฉลี่ยประมาณ 27-30 เม็ดต่อปากใบ และพบว่าจำนวนคลอโรพลาสต์มากที่สุด 30.73 เม็ดต่อปากใบ คือต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.21E), (ตารางที่ 4.15) จากการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอมีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่คลอโรฟิลล์บีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอมากที่สุด 263.95 มิลลิกรัม/น้ำหนักสด ปริมาณคลอโรฟิลล์บีมากที่สุด 250.71 มิลลิกรัม/น้ำหนักสด และต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอน้อยที่สุด 209.75 มิลลิกรัม/น้ำหนักสด ปริมาณคลอโรฟิลล์บีน้อยที่สุด 217.37 มิลลิกรัม/น้ำหนักสด (ตารางที่ 4.16)



ภาพที่ 4.21 ขนาดของปากใบและจำนวนคลอโรพลาสต์ของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรทในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (A) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% 12 ชั่วโมง (B) โคลชิซิน 0.05% 12 ชั่วโมง (C) โคลชิซิน 0.1% 12 ชั่วโมง (D) โคลชิซิน 0.15% 12 ชั่วโมง (E) โคลชิซิน 0.2% 12 ชั่วโมง (F) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% 24 ชั่วโมง (G) โคลชิซิน 0.05% 12 ชั่วโมง (H) โคลชิซิน 0.1% 12 ชั่วโมง (I) โคลชิซิน 0.15% 12 ชั่วโมง (J) โคลชิซิน 0.2% 12 ชั่วโมง และ (K) โคลชิซิน 0.05% 12 ชั่วโมง (bar = 10 μm)

ตารางที่ 4.15 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่อขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์เบญจมาศสายพันธุ์ชิวีเรท ภายหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

		ขนาดปากใบ (\pm SE) ^L		จำนวนคลอโรพลาสต์/ปากใบ (\pm SE) ^L
		ความกว้าง (μ M)	ความยาว (μ M)	
โคลชิซิน (%)	0	23.45 \pm 1.79	52.90 \pm 6.27	28.33 \pm 1.57
	0.05	21.76 \pm 1.21	54.23 \pm 6.77	29.35 \pm 1.28
	0.10	21.48 \pm 2.67	46.50 \pm 6.76	29.13 \pm 1.98
	0.15	22.55 \pm 0.91	50.81 \pm 4.22	27.96 \pm 1.29
	0.20	23.92 \pm 1.33	56.12 \pm 6.02	26.93 \pm 2.99
F-test		ns	ns	ns
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	23.04 \pm 1.45	53.13 \pm 5.72	29.93 \pm 2.32
	24	22.22 \pm 2.14	55.09 \pm 7.18	28.83 \pm 1.45
F-test		ns	ns	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)			
0	12	23.69 \pm 0.27	56.17 \pm 6.07	27.10 \pm 0.55
	24	23.21 \pm 2.78	55.36 \pm 6.83	29.56 \pm 1.15
0.05	12	22.15 \pm 1.08	50.44 \pm 5.79	29.13 \pm 1.00
	24	21.17 \pm 0.97	56.06 \pm 7.34	29.56 \pm 1.72
0.10	12	21.55 \pm 1.62	48.97 \pm 2.29	30.36 \pm 0.30
	24	21.42 \pm 3.90	44.02 \pm 9.53	27.90 \pm 2.28
0.15	12	23.13 \pm 0.09	53.12 \pm 1.95	27.33 \pm 1.22
	24	21.96 \pm 1.02	48.51 \pm 4.96	28.60 \pm 1.21
0.20	12	24.67 \pm 1.33	56.95 \pm 9.14	30.73 \pm 4.25
	24	23.37 \pm 0.97	51.50 \pm 2.94	28.53 \pm 0.83
F-test		ns	ns	ns
CV%		8.00	11.95	6.26

^Lค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.16 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์เบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรทภายหลังการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

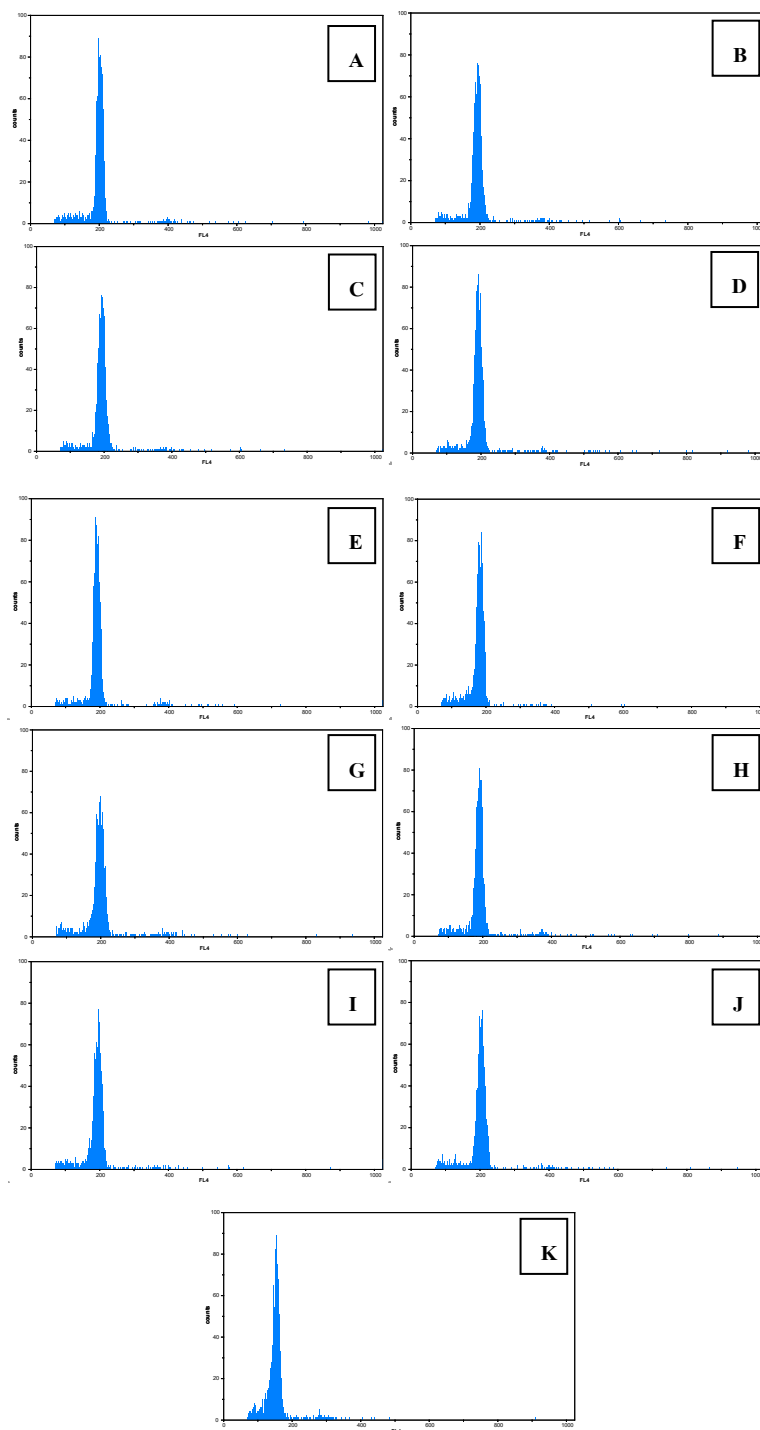
		ปริมาณคลอโรฟิลล์ (มิลลิกรัม/น้ำหนักสด) (\pm SE) ¹	
		คลอโรฟิลล์เอ	คลอโรฟิลล์บี
โคลชิซิน (%)	0	241.68 \pm 15.61	222.39 \pm 12.13
	0.05	238.85 \pm 21.77	229.98 \pm 17.43
	0.10	242.92 \pm 26.46	237.72 \pm 16.49
	0.15	247.31 \pm 20.09	239.24 \pm 18.39
	0.20	235.33 \pm 28.70	229.32 \pm 13.63
F-test		ns	ns
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	256.84 \pm 9.12a	238.13 \pm 15.31
	24	225.35 \pm 19.08b	225.33 \pm 13.63
F-test		**	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)		
0	12	249.98 \pm 6.22abc	221.42 \pm 4.09
	24	233.40 \pm 19.09bcd	223.37 \pm 18.67
0.05	12	251.19 \pm 5.07abc	221.42 \pm 13.60
	24	226.56 \pm 26.51cd	230.49 \pm 25.04
0.10	12	263.95 \pm 13.40a	250.71 \pm 9.77
	24	220.63 \pm 12.79d	224.73 \pm 8.83
0.15	12	258.17 \pm 8.29ab	247.80 \pm 8.88
	24	263.45 \pm 24.22abcd	230.69 \pm 23.40
0.20	12	260.92 \pm 6.89ab	228.15 \pm 17.04
	24	209.75 \pm 6.97d	217.37 \pm 9.88
F-test		**	ns
CV%		6.19	6.64

¹ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.2.6 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer

หลังจากการแช่กลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์ชีริเบรท ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตรเมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือนยอดจะพัฒนาไปเป็นต้น นำต้นที่ได้มาตัดบริเวณข้อ และนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 1 เดือน เมื่อครบ 8 สัปดาห์ได้นำไปมาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer ทั้งนี้ได้นำไปเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินทุกความเข้มข้น และทุกระยะเวลาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.22B, 4.22C, 4.22D และ 4.22E) และความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.1, 0.05, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.22G, 4.22H, 4.22I และ 4.22J) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอ โดยยังคงมีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับการแช่สารละลายโคลชิซิน (ภาพที่ 4.22A และ 4.22F) แต่ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอไปจากเดิม คือจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน จาก $2n$ ลดลงเหลือ n ทั้งนี้พบจำนวน 1 ต้น จากทั้งหมด 30 ต้นในทริทเมนต์ดังกล่าว คิดเป็น 3.33 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.22K)

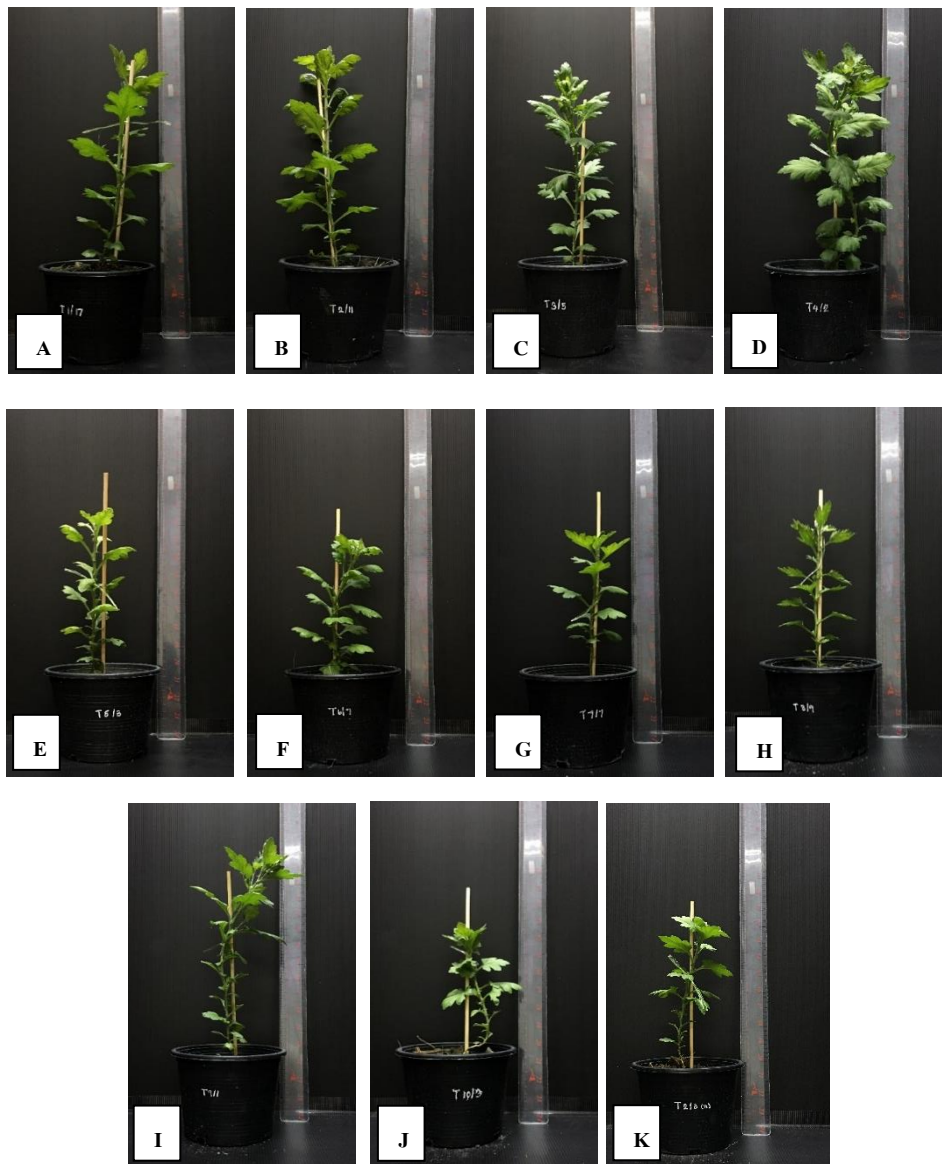


ภาพที่ 4.22 ลักษณะกราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรทที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 12 ชั่วโมง (A)-(E) และ 24 ชั่วโมง (F)-(J) ในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (A) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% (B) โคลชิซิน 0.05% (C) โคลชิซิน 0.1% (D) โคลชิซิน 0.15% (E) โคลชิซิน 0.2% (F) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% (G) โคลชิซิน 0.05% (H) โคลชิซิน 0.1% (I) โคลชิซิน 0.15% (J) โคลชิซิน 0.2% และ (K) โคลชิซิน 0.05% 12 ชั่วโมง

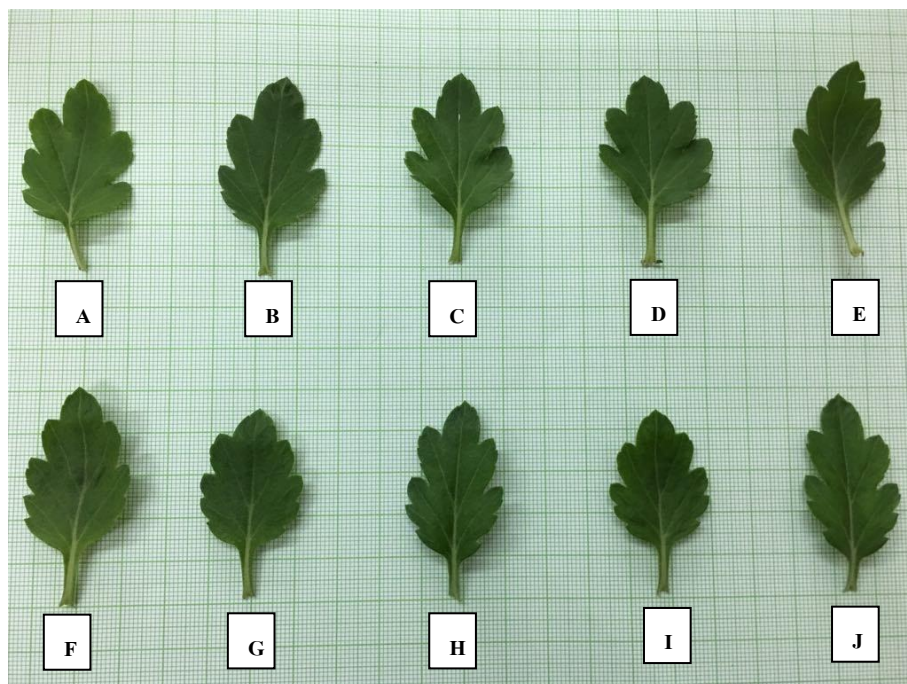
4.2.7 การย้ายปลูกเบญจมาศสายพันธุ์ชีรีเบรทนอกสภาพปลอดเชื้อ

การย้ายปลูกเบญจมาศนอกสภาพปลอดเชื้อ โดยนำต้นเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อรุ่น M2 ย้ายออกปลูกจำนวน 20 ต้นต่อ 1 ทรืทเมนต์ทำได้โดยนำต้นเบญจมาศที่มีรากและเจริญเติบโตประมาณ 4-5 สัปดาห์ในสภาพปลอดเชื้อนำมาปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ 2-3 วัน โดยการย้ายมาเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นให้ย้ายต้นเบญจมาศออกจากขวด ทำการล้างวันที่ติดกับรากให้สะอาดเตรียมมะพร้าวสับเพื่อใช้เป็นวัสดุปลูก และนำต้นเบญจมาศที่ล้างวันที่สะอาดแล้วปลูกลงในวัสดุที่เตรียมไว้รดน้ำให้ชุ่ม ใช้ถุงพลาสติกคลุมกระถาง เพื่อให้ต้นเบญจมาศค่อยๆ ปรับตัว นำไปวางในที่ที่มีแสงแต่ไม่ต้องโดนแดดเพราะจะทำให้ต้นเบญจมาศตายเมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์ให้เจาะรูที่ถุงพลาสติกเพื่อให้ต้นเบญจมาศมีอากาศถ่ายเท พอดต้นเบญจมาศเริ่มสร้างใบใหม่ให้เตรียมย้ายปลูกในดินผสมมะพร้าวสับ อัตราส่วน 1:1 เริ่มใส่ปุ๋ยสูตร 16-16-16 ในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากเลี้ยงต้นเบญจมาศเป็นระยะเวลา 1-7 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดชีวิตของต้นเบญจมาศโดยเฉลี่ย 85-90 เปอร์เซ็นต์ เพราะมีต้นเบญจมาศที่ตายบ้าง เนื่องจากมีแมลงศัตรูพืชเข้าทำลาย และบางกระถางมีน้ำขัง ทำให้รากและลำต้นเน่าตาย (ตารางที่ 4.17) ภายหลังจากการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์ ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ความสูงต้น และจำนวนใบ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกๆ สัปดาห์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ลักษณะลำต้นมีสีเขียว (ภาพที่ 4.23) ใบเป็นรูปใบหอกปลายแหลมหรือบางใบค่อนข้างกลม เส้นกลางใบและเส้นแขนงใบสีเขียวอ่อนเห็นได้ชัด ผิวใบด้านบนมีสีเขียวเข้ม ผิวใบด้านล่างสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.24) ในสัปดาห์ที่ 7 ต้นเบญจมาศเริ่มมีการออกดอก พบว่าจำนวนดอกของแต่ละต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยเฉลี่ยแล้วมีจำนวนดอก 7-10 ดอกต่อต้น สำหรับต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ต้นควบคุม) พบว่ามีความสูงต้น จำนวนใบ และจำนวนดอกมากที่สุด 31.40 เซนติเมตร, 19.65 ใบ และ 10.90 ดอก ตามลำดับ และสำหรับต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีความสูงต้น จำนวนใบ และจำนวนดอกน้อยที่สุด 25.58 เซนติเมตร, 13.35 ใบ และ 7.65 ดอก ตามลำดับ (ตารางที่ 4.18) เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 11 ดอกจะมีลักษณะบานเต็มที่ มีขนาดดอกไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยขนาดของดอกโดยเฉลี่ย 2 เซนติเมตรวัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางของดอก โดยขนาดของดอกใหญ่ที่สุด 2.49 เซนติเมตร คือต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ขนาดของดอกเล็กที่สุด 1.88 เซนติเมตร คือต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ต้นควบคุม) (ตารางที่ 4.18) ลักษณะของดอกเบญจมาศสายพันธุ์

ซีรีเบรทหลังจากย้ายออกปลูกลง พบว่าลักษณะของดอกเป็นประเภท single กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีเหลือง บานเรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว ไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก ซึ่งต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้นต่างๆ และระยะเวลาที่แตกต่างกันนั้น รวมถึงต้นมีปริมาณคลอโรฟิลล์แตกต่างกัน มีลักษณะของดอกและการบานของดอกไม่แตกต่างกันจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (ภาพที่ 4.25)



ภาพที่ 4.23 ต้นเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรทหลังจากย้ายปลูกลงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 12 ชั่วโมง (A)-(E) และ 24 ชั่วโมง (F)-(J) (A) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% (B) โคลชิซิน 0.05% (C) โคลชิซิน 0.1% (D) โคลชิซิน 0.15% (E) โคลชิซิน 0.2% (F) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% (G) โคลชิซิน 0.05% (H) โคลชิซิน 0.1% (I) โคลชิซิน 0.15% (J) โคลชิซิน 0.2% และ (K) โคลชิซิน 0.05% 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.24 ลักษณะของใบเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรทหลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (A) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% 12 ชั่วโมง (B) โคลชิซิน 0.05% 12 ชั่วโมง (C) โคลชิซิน 0.1% 12 ชั่วโมง (D) โคลชิซิน 0.15% 12 ชั่วโมง (E) โคลชิซิน 0.2% 12 ชั่วโมง (F) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% 24 ชั่วโมง (G) โคลชิซิน 0.05% 24 ชั่วโมง (H) โคลชิซิน 0.1% 24 ชั่วโมง (I) โคลชิซิน 0.15% 24 ชั่วโมง และ (J) โคลชิซิน 0.2% 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.25 ลักษณะของดอกเบญจมาศพันธุ์ซีรีเบรท หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 11 สัปดาห์ (A) ดันควบคุม โคลชิซิน 0% 12 ชั่วโมง (B) โคลชิซิน 0.05% 12 ชั่วโมง (C) โคลชิซิน 0.1% 12 ชั่วโมง (D) โคลชิซิน 0.15% 12 ชั่วโมง (E) โคลชิซิน 0.2% 12 ชั่วโมง (F) ดันควบคุม โคลชิซิน 0% 24 ชั่วโมง (G) โคลชิซิน 0.05% 24 ชั่วโมง (H) โคลชิซิน 0.1% 24 ชั่วโมง (I) โคลชิซิน 0.15% 24 ชั่วโมง (J) โคลชิซิน 0.2% 24 ชั่วโมง และ (K),(L) โคลชิซิน 0.05% 12 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.17 แสดงอัตราการรอดชีวิตหลังจากย้ายปลูกเบญจมาศสายพันธุ์สวีเบรท เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์

		อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) (\pm SE) ^u							
		อายุ (สัปดาห์)							
		1	2	3	4	5	6	7	
โคลชิซิน (%)	0	85.00 \pm 26.67	82.50 \pm 33.49	80.00 \pm 33.49	80.00 \pm 33.49	80.00 \pm 33.49	80.00 \pm 33.49	80.00 \pm 33.49	
	0.05	92.50 \pm 33.49	92.50 \pm 33.49	92.50 \pm 36.16	92.50 \pm 36.16	92.50 \pm 36.16	92.50 \pm 36.16	92.50 \pm 36.16	
	0.10	87.50 \pm 26.67	85.00 \pm 30.38	82.50 \pm 33.49	82.50 \pm 33.49	82.50 \pm 33.49	82.50 \pm 33.49	82.50 \pm 33.49	
	0.15	87.50 \pm 36.16	85.00 \pm 36.16	85.00 \pm 36.16	85.00 \pm 36.16	85.00 \pm 36.16	85.00 \pm 36.16	85.00 \pm 36.16	
	0.20	90.00 \pm 36.16	90.00 \pm 36.16	90.00 \pm 36.16	90.00 \pm 36.16	90.00 \pm 36.16	90.00 \pm 36.16	90.00 \pm 36.16	
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	89.00 \pm 32.65	89.00 \pm 34.87	89.00 \pm 35.88	89.00 \pm 35.88	89.00 \pm 35.88	89.00 \pm 35.88	89.00 \pm 35.88	
	24	88.00 \pm 31.44	85.00 \pm 32.65	83.00 \pm 33.79	83.00 \pm 17.14	83.00 \pm 17.14	83.00 \pm 17.14	83.00 \pm 17.14	
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	0	12	90.00 \pm 30.77	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63
		24	95.00 \pm 22.36	90.00 \pm 30.77	90.00 \pm 30.77	90.00 \pm 30.77	90.00 \pm 30.77	90.00 \pm 30.77	90.00 \pm 30.77
0.05	12	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	
	24	90.00 \pm 30.77	90.00 \pm 30.77	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	
0.10	12	95.00 \pm 22.36	90.00 \pm 30.77	85.00 \pm 30.77	85.00 \pm 30.77	85.00 \pm 30.77	85.00 \pm 30.77	85.00 \pm 30.77	
	24	90.00 \pm 30.77	90.00 \pm 30.77	90.00 \pm 36.63	90.00 \pm 36.63	90.00 \pm 36.63	90.00 \pm 36.63	90.00 \pm 36.63	
0.15	12	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	
	24	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	
0.20	12	95.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	
	24	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	85.00 \pm 36.63	
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
CV%		36.70	39.20	40.63	40.63	40.63	40.63	40.63	

^uค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.18 แสดงความสูง จำนวนใบ จำนวนดอก และขนาดของดอกเบญจมาศสายพันธุ์ซีเบรท หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์

		ความสูงต้น (ซม.) (±SE) ^U	จำนวนใบ (±SE) ^U	จำนวนดอก (±SE) ^U	ขนาดของดอก (ซม.) (±SE) ^U		
โคลชิซิน (%)	0	25.60±13.51	15.62±7.19	9.27±3.51	2.05±0.72		
	0.05	28.20±14.53	17.82±7.90	10.15±2.83	2.38±0.84		
	0.10	27.22±13.33	16.42±7.20	10.15±3.21	2.11±0.77		
	0.15	29.14±12.96	18.20±7.89	10.32±2.36	2.10±0.93		
	0.20	28.50±11.49	19.52±7.30	9.57±1.87	2.22±0.94		
F-test		ns	ns	ns	ns		
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	29.10±13.74	17.80±7.73	9.78±2.48	2.25±0.84		
	24	26.36±12.60	17.24±7.15	9.67±3.10	2.09±0.84		
F-test		ns	ns	ns	ns		
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	0	12	31.40±15.09	19.65±7.46	10.90±3.15	1.88±0.78
		24	26.00±11.52	19.40±7.33	9.20±3.65	2.00±0.92	
0.05	12	27.85±14.71	17.55±7.33	9.95±2.37	2.49±0.75		
	24	28.54±14.69	18.10±8.57	10.35±3.30	2.26±0.94		
0.10	12	26.39±14.67	16.45±8.24	10.70±3.24	2.08±0.87		
	24	28.06±12.19	16.40±6.18	9.60±3.26	2.01±0.54		
0.15	12	28.88±13.17	17.70±8.29	9.75±0.86	2.01±0.93		
	24	29.40±13.09	18.70±7.61	9.85±2.51	2.10±0.96		
0.20	12	31.01±11.75	17.90±8.11	9.30±0.88	2.25±0.94		
	24	25.58±11.73	13.35±6.34	7.65±3.44	2.20±0.97		
F-test		ns	ns	ns	ns		
CV%		47.14	42.55	28.17	38.86		

^Uค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ (ดอกประเภท single สีม่วง) โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

4.3.1 อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส

หลังจากการแช่กลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าสัปดาห์ที่ 2 กลีบดอกมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ในสัปดาห์ที่ 4 จนถึงสัปดาห์ที่ 12 กลีบดอกมีอัตราการรอดชีวิตที่น้อยลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินสูงขึ้น อัตราการรอดชีวิตลดลงถึง 50.00 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.20 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.19) ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงกลีบดอกเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.20 เปอร์เซ็นต์ และ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.19 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.26)

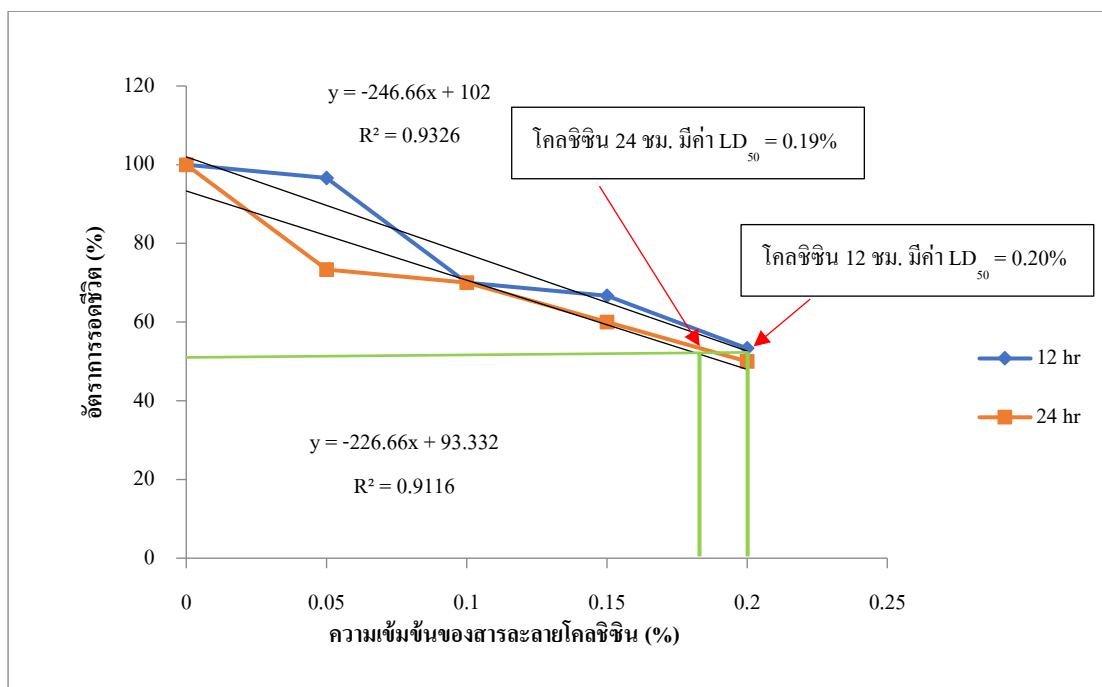
4.3.2 ขนาดของแคลลัส

หลังจากการแช่กลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่ออายุ 2 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนเริ่มต้นเริ่มมีแคลลัสเกิดขึ้น และแคลลัสมีแนวโน้มที่จะใหญ่ขึ้นเมื่อมีอายุเพิ่มมากขึ้น โดยแคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่น มีสีเขียวอ่อนเกิดขึ้นที่ผิวนอกและรอยตัดของชิ้นส่วน เมื่อเลี้ยงแคลลัสมาเป็นระยะ 12 สัปดาห์พบว่า แคลลัสที่มีขนาดความกว้างและความยาวมากที่สุด คือ 1.65 และ 1.74 เซนติเมตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ต้นควบคุม) ส่วนแคลลัสที่มีขนาดความกว้างและความยาวน้อยที่สุด คือ 1.07 และ 1.06 เซนติเมตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.20) ซึ่งมีขนาดความกว้าง และความยาวของแคลลัสเล็กกว่าต้นควบคุม 64.84 และ 60.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.3.3 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและจำนวนยอดต่อแคลลัส

หลังจากการแช่กลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่ออายุ

4 สัปดาห์ ชิ้นส่วนเริ่มต้นมีการพัฒนามาจากกลุ่มแคลลัสหรือก้อนเนื้อเยื่อที่พัฒนาขึ้นมา โดยการพัฒนาไปเป็นแคลลัสที่มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน ผิวขรุขระ มีเขียวอ่อนหรือสีเหลืองบริเวณรอยตัด และการพัฒนาไปเป็นส่วนยอดโดยผ่านการเกิดแคลลัส โดยแคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่น (compact callus) เมื่ออายุ 12 สัปดาห์พบว่าความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ต้นควบคุม) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมากที่สุด 83.33 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดต่อแคลลัสมากที่สุด 2.16 ยอด ส่วนความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดน้อยที่สุด 40.33 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดต่อแคลลัสน้อยที่สุด 1.20 ยอด (ตารางที่ 4.20)



ภาพที่ 4.26 กราฟอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

ตารางที่ 4.19 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิตของแคลัสเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ ภายหลังจากการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

		อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) (\pm SE) ^L					
		อายุ (สัปดาห์)					
		2	4	6	8	10	12
โคลชิซิน (%)	0	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a
	0.05	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00a	98.33 \pm 0.00a	95.00 \pm 5.47b	90.00 \pm 8.94b	85.00 \pm 13.78b
	0.10	100.00 \pm 0.00	96.67 \pm 5.16ab	91.67 \pm 4.08b	81.67 \pm 4.08c	75.00 \pm 5.47c	70.00 \pm 0.00c
	0.15	100.00 \pm 0.00	96.67 \pm 5.16ab	11.67 \pm 4.08c	78.33 \pm 4.08cd	71.67 \pm 4.08cd	63.33 \pm 5.16d
	0.20	100.00 \pm 0.00	93.33 \pm 5.16b	90.00 \pm 0.00b	76.67 \pm 5.16d	66.67 \pm 5.16d	51.67 \pm 4.08e
F-test		ns	**	**	**	**	**
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	100.00 \pm 0.00	97.33 \pm 4.57	96.00 \pm 5.07a	88.00 \pm 10.82a	82.67 \pm 14.37a	77.33 \pm 19.07a
	24	100.00 \pm 0.00	97.33 \pm 4.57	93.33 \pm 4.87b	84.67 \pm 9.90b	78.67 \pm 13.02b	70.67 \pm 17.51b
F-test		ns	ns	*	*	*	**
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)						
0	12	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a
	24	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a
0.05	12	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	96.67 \pm 5.77a	96.67 \pm 5.77a
	24	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	96.67 \pm 5.77ab	90.00 \pm 0.00b	83.33 \pm 5.77b	73.33 \pm 5.77b
0.10	12	100.00 \pm 0.00	96.67 \pm 5.77	96.67 \pm 5.77ab	83.33 \pm 5.77c	76.67 \pm 5.77bc	70.00 \pm 0.00b
	24	100.00 \pm 0.00	96.67 \pm 5.77	90.00 \pm 0.00c	80.00 \pm 0.00c	73.33 \pm 5.77cd	70.00 \pm 0.00b
0.15	12	100.00 \pm 0.00	96.67 \pm 5.77	93.33 \pm 5.77bc	80.00 \pm 0.00c	73.33 \pm 0.00cd	66.67 \pm 5.77b
	24	100.00 \pm 0.00	96.67 \pm 5.77	90.00 \pm 0.00c	76.67 \pm 5.77c	70.00 \pm 5.77cd	60.00 \pm 0.00c
0.20	12	100.00 \pm 0.00	93.33 \pm 5.77	90.00 \pm 0.00c	76.67 \pm 5.77c	66.67 \pm 5.77d	53.33 \pm 5.77d
	24	100.00 \pm 0.00	93.33 \pm 5.77	90.00 \pm 0.00c	76.67 \pm 5.77c	66.67 \pm 5.77d	50.00 \pm 0.00d
F-test		ns	ns	**	**	**	**
CV%		0.00	4.59	3.34	4.22	5.98	4.93

^Lค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
 ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ 4.20 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ของเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ต่อ ความกว้าง ความยาวของแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด/แคลลัส ภายหลังจากเลี้ยงเป็น ระยะเวลา 12 สัปดาห์

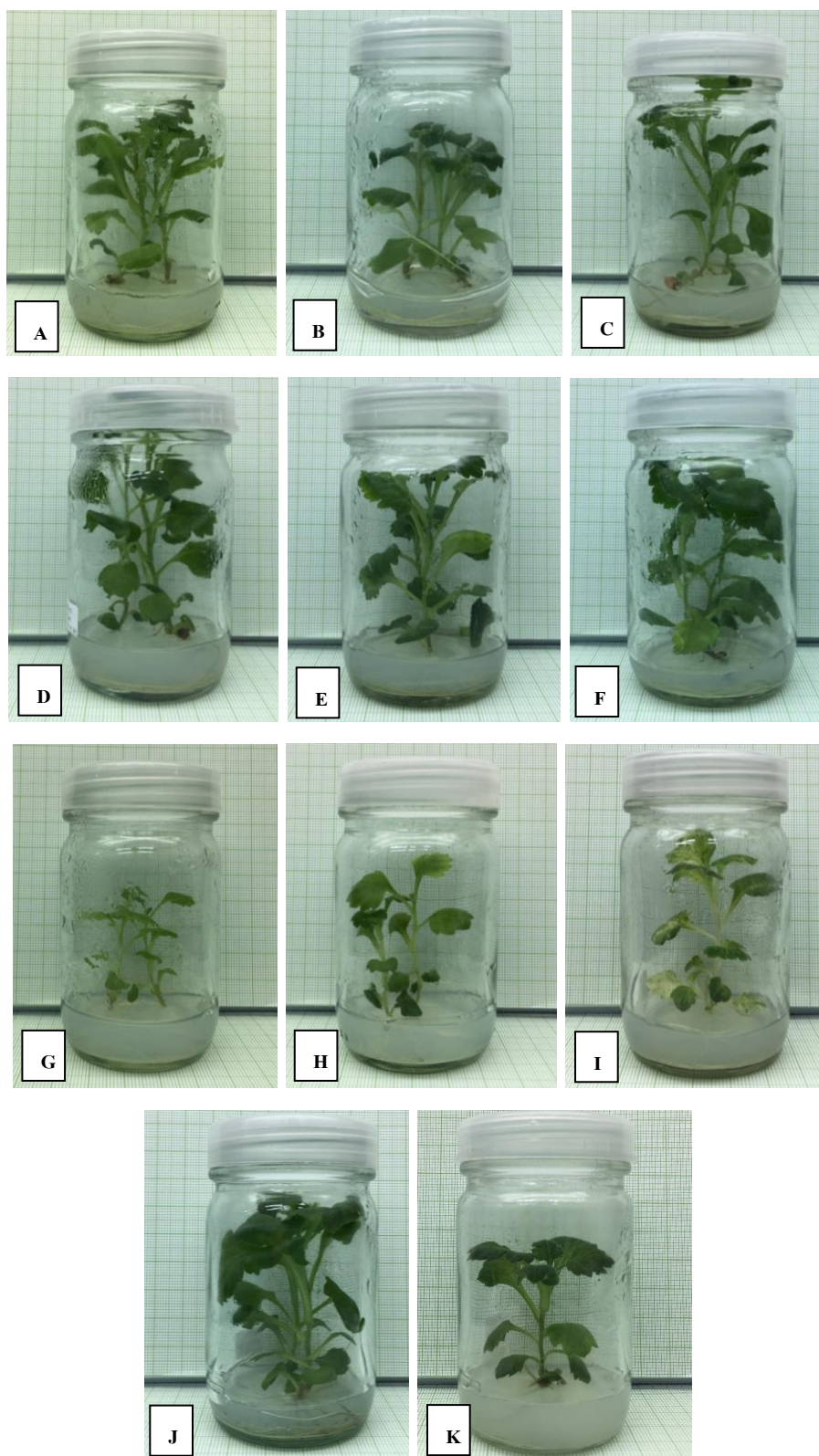
		ขนาดแคลลัส (\pm SE) ^L		เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด (\pm SE) ^L	จำนวนยอด/ แคลลัส (\pm SE) ^L
		ความกว้าง (ซม.)	ความยาว (ซม.)		
โคลชิซิน (%)	0	1.58 \pm 0.08a	1.61 \pm 0.15a	76.67 \pm 10.32a	2.11 \pm 0.07a
	0.05	1.21 \pm 0.09b	1.30 \pm 0.13b	60.00 \pm 6.32b	1.61 \pm 0.07b
	0.10	1.20 \pm 0.08b	1.30 \pm 0.16b	51.67 \pm 4.08c	1.45 \pm 0.05c
	0.15	1.09 \pm 0.04c	1.12 \pm 0.02c	45.00 \pm 5.47c	1.30 \pm 0.08d
	0.20	1.11 \pm 0.01c	1.09 \pm 0.03c	45.00 \pm 5.47c	1.21 \pm 0.07d
F-test		**	**	**	**
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	1.29 \pm 0.20a	1.37 \pm 0.24a	58.67 \pm 15.05a	1.55 \pm 0.35
	24	1.19 \pm 0.17b	1.20 \pm 0.13b	52.670 \pm 11.62b	1.52 \pm 0.31
F-test		**	**	**	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)				
0	12	1.65 \pm 0.05a	1.74 \pm 0.04a	83.33 \pm 5.77a	2.16 \pm 0.05a
	24	1.51 \pm 0.01b	1.48 \pm 0.05b	70.00 \pm 10.00b	2.06 \pm 0.05a
0.05	12	1.28 \pm 0.01c	1.41 \pm 0.01b	63.33 \pm 5.77bc	1.63 \pm 0.05b
	24	1.14 \pm 0.08d	1.19 \pm 0.09c	56.67 \pm 5.77cd	1.60 \pm 0.10b
0.10	12	1.28 \pm 0.02c	1.44 \pm 0.08c	53.33 \pm 5.77cde	1.46 \pm 0.05c
	24	1.12 \pm 0.02d	1.16 \pm 0.01c	50.00 \pm 0.00de	1.43 \pm 0.05cd
0.15	12	1.16 \pm 0.01d	1.13 \pm 0.03cd	46.67 \pm 5.77de	1.30 \pm 0.10de
	24	1.11 \pm 0.01d	1.11 \pm 0.01cd	43.33 \pm 5.77e	1.30 \pm 0.10de
0.20	12	1.12 \pm 0.01d	1.11 \pm 0.01cd	46.67 \pm 5.77de	1.23 \pm 0.05e
	24	1.07 \pm 0.06e	1.06 \pm 0.01d	40.33 \pm 5.77e	1.20 \pm 0.10e
F-test		**	**	**	**
CV%		3.25	3.80	10.87	5.02

^Lค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

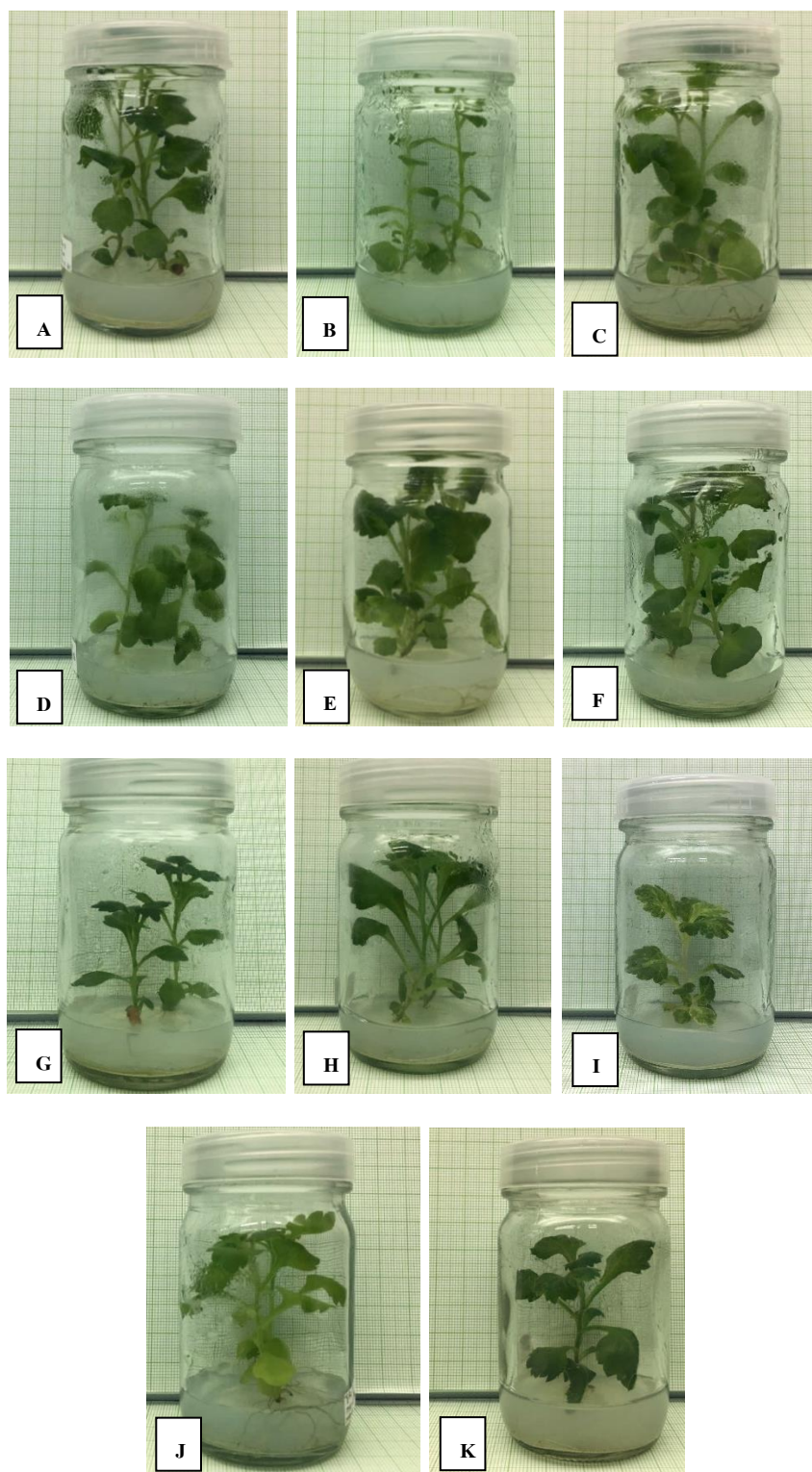
ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

4.3.4 ความสูงต้น และจำนวนใบเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ รุ่น M1 และ M2

หลังจากการแช่กลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือนยอดจะพัฒนาไปเป็นต้น นำต้นที่ได้มาตัดบริเวณข้อ และนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต จะได้ต้นในรุ่น M1 พบว่าต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีลักษณะของต้น และใบไม่แตกต่างกัน โดยความสูงของต้นและใบพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกๆ สัปดาห์ ลำต้นและใบมีสีเขียว แต่มีบางต้นที่ได้รับความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าต้นเบญจมาศมีลำต้นสีขาว ใบด่าง (ภาพที่ 4.27I) พบจำนวนต้นด่าง 1 ต้น จากทั้งหมด 30 ต้น คิดเป็น 3.33 เปอร์เซ็นต์ ของทริทเมนต์ดังกล่าว โดยลักษณะของลำต้นมีสีขาว ใบด่าง เมื่อต้นรุ่น M1 เจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 1 เดือนทำการเปลี่ยนอาหารโดยการตัดส่วนข้อและนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต จะได้ต้นในรุ่น M2 พบว่าต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีลักษณะของต้น และใบไม่แตกต่างกัน โดยความสูงของต้นและใบพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกๆ สัปดาห์ ลำต้นและใบมีสีเขียว แต่มีบางต้นที่ได้รับความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าต้นเบญจมาศมีลำต้นสีขาว ใบด่าง (ภาพที่ 4.28I) พบจำนวนต้นด่าง 1 ต้น จากทั้งหมด 30 ต้น คิดเป็น 3.33 เปอร์เซ็นต์ ของทริทเมนต์ดังกล่าว ซึ่งต้นที่ได้ลักษณะแบบนี้เป็นต้นเดียวกันกับต้นในรุ่น M1 ในสัปดาห์ที่ 4 ก่อนทำการเปลี่ยนอาหารพบว่าความสูงต้นเฉลี่ย 4 เซนติเมตร และจำนวนใบเฉลี่ย 7 ใบ (ตารางที่ 4.21)



ภาพที่ 4.27 ต้นเบญจมาศพันธุ์แคนเทอร์รุ่น M1 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 12 ชั่วโมง (A)-(E) และ 24 ชั่วโมง (F)-(K) ในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (A) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% (B) โคลชิซิน 0.05% (C) โคลชิซิน 0.1% (D) โคลชิซิน 0.15% (E) โคลชิซิน 0.2% (F) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% (G) โคลชิซิน 0.05% (H) โคลชิซิน 0.1% (I) โคลชิซิน 0.15% (ต่าง) (J) โคลชิซิน 0.2% และ (K) โคลชิซิน 0.2% (4n)



ภาพที่ 4.28 ต้นเบญจมาศพันธุ์แคนเทอร์รู้น M2 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 12 ชั่วโมง (A)-(E) และ 24 ชั่วโมง (F)-(K) ในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (A) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% (B) โคลชิซิน 0.05% (C) โคลชิซิน 0.1% (D) โคลชิซิน 0.15% (E) โคลชิซิน 0.2% (F) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% (G) โคลชิซิน 0.05% (H) โคลชิซิน 0.1% (I) โคลชิซิน 0.15% (J) โคลชิซิน 0.2% (K) และ โคลชิซิน 0.2% (4n)

ตารางที่ 4.21 แสดงความสูงต้น และจำนวนใบ ของเบญจมาศสายพันธุ์เคนเทอร์รุ่น M1 และรุ่น M2 ที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

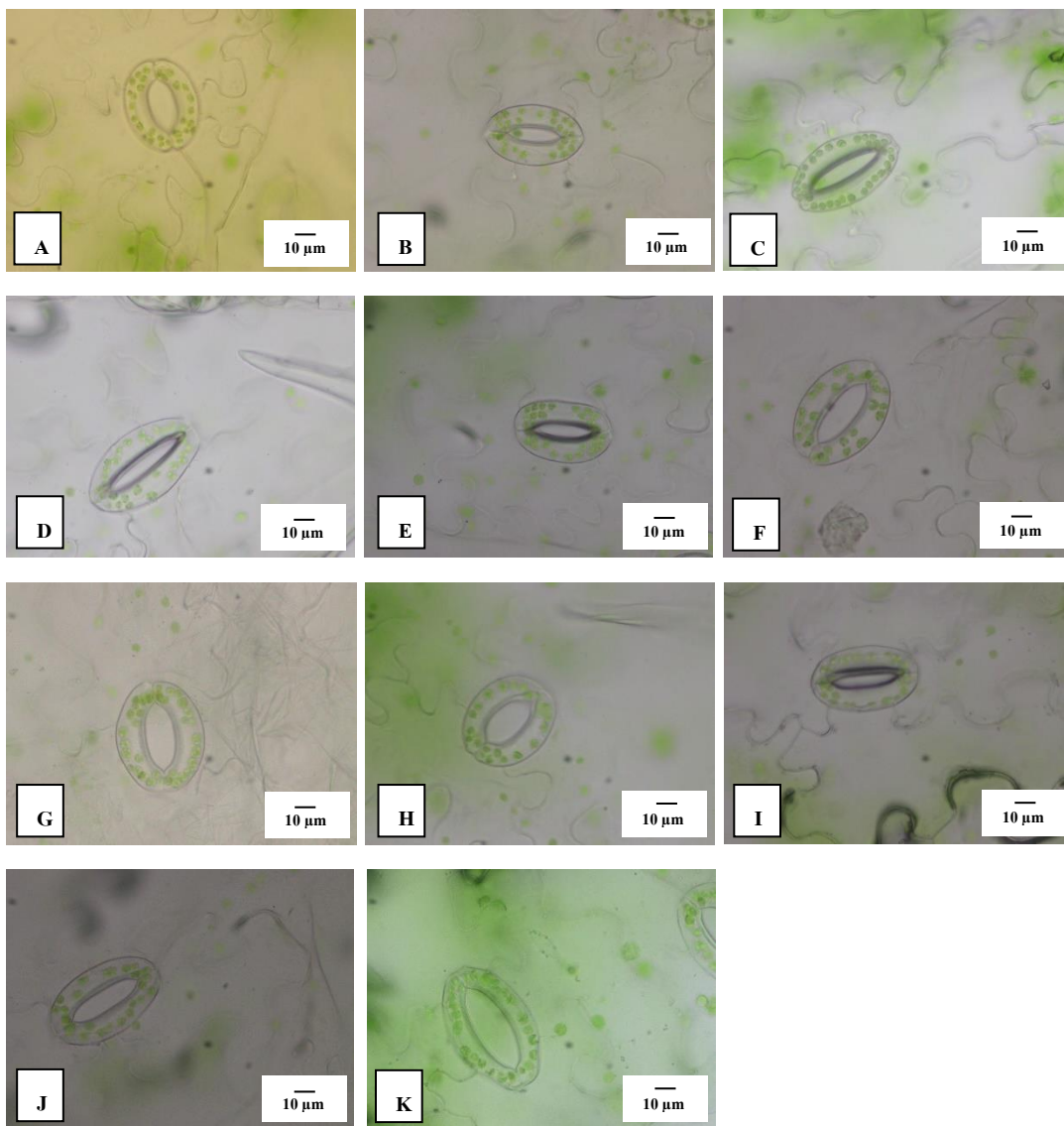
		ต้นเบญจมาศรุ่น M1 (\pm SE) ¹		ต้นเบญจมาศรุ่น M2 (\pm SE) ¹	
		ความสูงต้น(ซม.)	จำนวนใบ	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนใบ
โคลชิซิน (%)	0	4.11 \pm 0.02	7.81 \pm 0.21	4.08 \pm 0.01	7.83 \pm 0.15
	0.05	4.11 \pm 0.01	7.86 \pm 0.13	4.09 \pm 0.02	7.85 \pm 0.20
	0.10	4.10 \pm 0.02	7.81 \pm 0.21	4.09 \pm 0.02	7.81 \pm 0.21
	0.15	4.10 \pm 0.02	7.85 \pm 0.18	4.09 \pm 0.03	7.85 \pm 0.23
	0.20	4.10 \pm 0.01	7.81 \pm 0.23	4.09 \pm 0.02	7.80 \pm 0.12
F-test		ns	ns	ns	ns
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	4.10 \pm 0.02	7.84 \pm 0.18	4.09 \pm 0.02	7.83 \pm 0.19
	24	4.10 \pm 0.01	7.82 \pm 0.19	4.09 \pm 0.02	7.82 \pm 0.17
F-test		ns	ns	ns	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)				
0	12	4.10 \pm 0.03	7.83 \pm 0.15	4.09 \pm 0.01	7.86 \pm 0.20
	24	4.10 \pm 0.01	7.80 \pm 0.30	4.08 \pm 0.02	7.80 \pm 0.10
0.05	12	4.12 \pm 0.01	7.86 \pm 0.15	4.09 \pm 0.02	7.86 \pm 0.25
	24	4.10 \pm 0.01	7.86 \pm 0.30	4.08 \pm 0.03	7.83 \pm 0.20
0.10	12	4.11 \pm 0.02	7.80 \pm 0.15	4.09 \pm 0.02	7.80 \pm 0.26
	24	4.10 \pm 0.02	7.83 \pm 0.15	4.08 \pm 0.02	7.83 \pm 0.20
0.15	12	4.10 \pm 0.03	7.86 \pm 0.15	4.09 \pm 0.03	7.86 \pm 0.20
	24	4.11 \pm 0.02	7.83 \pm 0.25	4.09 \pm 0.03	7.83 \pm 0.30
0.20	12	4.10 \pm 0.01	7.83 \pm 0.25	4.09 \pm 0.03	7.76 \pm 0.15
	24	4.10 \pm 0.01	7.80 \pm 0.26	4.09 \pm 0.02	7.83 \pm 0.11
F-test		ns	ns	ns	ns
CV%		0.54	2.83	0.66	2.69

¹ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.3.5 ความกว้าง ความยาว จำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ และปริมาณคลอโรฟิลล์

นำใบที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้ออายุ 8 สัปดาห์มาวัดขนาดความกว้างของปากใบต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าขนาดความกว้างและความยาวของปากใบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนใหญ่จะมีความกว้างเฉลี่ยประมาณ 22-25 ไมโครเมตร และมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 49-58 ไมโครเมตร โดยความกว้างของปากใบมากที่สุด 25.48 ไมโครเมตร ความยาวปากใบมากที่สุด 58.99 ไมโครเมตร คือต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.29K), (ตารางที่ 4.22) จำนวนคลอโรพลาสต์ต่อปากใบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติส่วนใหญ่จะมีปริมาณเม็ดคลอโรพลาสต์โดยเฉลี่ยประมาณ 30-35 เม็ดต่อปากใบ และพบว่าจำนวนคลอโรพลาสต์มากที่สุด 35.90 เม็ดต่อปากใบ คือต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.29E), (ตารางที่ 4.22) จากการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ต้นควบคุม) มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอมากที่สุด 281.81 มิลลิกรัม/น้ำหนักสด ปริมาณคลอโรฟิลล์บีมากที่สุด 262.52 มิลลิกรัม/น้ำหนักสด และต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอน้อยที่สุด 190.68 มิลลิกรัม/น้ำหนักสด ปริมาณคลอโรฟิลล์บีน้อยที่สุด 161.61 มิลลิกรัม/น้ำหนักสด (ตารางที่ 4.23)



ภาพที่ 4.29 ขนาดของปากใบและจำนวนคลอโรพลาสต์ของต้นเบญจมาศสายพันธุ์เคนเทอร์ในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (A) ดันควบคุม โคลชิซิน 0% 12 ชั่วโมง (B) โคลชิซิน 0.05% 12 ชั่วโมง (C) โคลชิซิน 0.1% 12 ชั่วโมง (D) โคลชิซิน 0.15% 12 ชั่วโมง (E) โคลชิซิน 0.2% 12 ชั่วโมง (F) ดันควบคุม โคลชิซิน 0% 24 ชั่วโมง (G) โคลชิซิน 0.05% 24 ชั่วโมง (H) โคลชิซิน 0.1% 24 ชั่วโมง (I) โคลชิซิน 0.15% 24 ชั่วโมง (J) โคลชิซิน 0.2% 24 ชั่วโมง และ (K) โคลชิซิน 0.2% 24 ชั่วโมง (4n) (bar = 10 μ m)

ตารางที่ 4.22 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซินต่อขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์เบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ ภายหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

		ขนาดปากใบ (\pm SE) ¹		จำนวนคลอโรพลาสต์/ปากใบ (\pm SE) ¹
		ความกว้าง (μ M)	ความยาว (μ M)	
โคลชิซิน (%)	0	22.89 \pm 1.91	53.57 \pm 5.95	32.50 \pm 2.86
	0.05	24.56 \pm 1.62	55.40 \pm 5.15	33.08 \pm 3.44
	0.10	24.25 \pm 1.72	50.40 \pm 3.81	32.15 \pm 2.20
	0.15	24.12 \pm 1.23	56.41 \pm 6.23	34.17 \pm 3.31
	0.20	24.58 \pm 1.68	58.33 \pm 3.82	34.78 \pm 2.12
F-test		ns	ns	ns
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	24.12 \pm 1.25	53.81 \pm 5.15	32.99 \pm 3.07
	24	24.04 \pm 2.04	55.84 \pm 5.76	33.66 \pm 2.61
F-test		ns	ns	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)			
0	12	22.89 \pm 0.75	49.51 \pm 4.52	30.23 \pm 2.00
	24	22.90 \pm 2.93	51.30 \pm 3.67	34.76 \pm 1.04
0.05	12	23.98 \pm 1.00	55.43 \pm 4.66	31.23 \pm 2.23
	24	25.14 \pm 2.14	55.38 \pm 6.68	34.93 \pm 3.78
0.10	12	24.86 \pm 0.64	50.51 \pm 7.71	32.36 \pm 2.20
	24	23.64 \pm 2.33	56.64 \pm 0.93	31.93 \pm 3.45
0.15	12	25.19 \pm 1.28	53.84 \pm 3.77	35.23 \pm 3.85
	24	23.04 \pm 0.70	58.70 \pm 3.89	33.00 \pm 2.98
0.20	12	23.68 \pm 1.31	57.97 \pm 4.58	35.90 \pm 2.29
	24	25.48 \pm 1.72	58.99 \pm 7.93	33.67 \pm 1.50
F-test		ns	ns	ns
CV%		6.99	9.55	7.80

¹ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.23 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่สารละลายโคลชิซิน ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์เบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ภายหลังการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

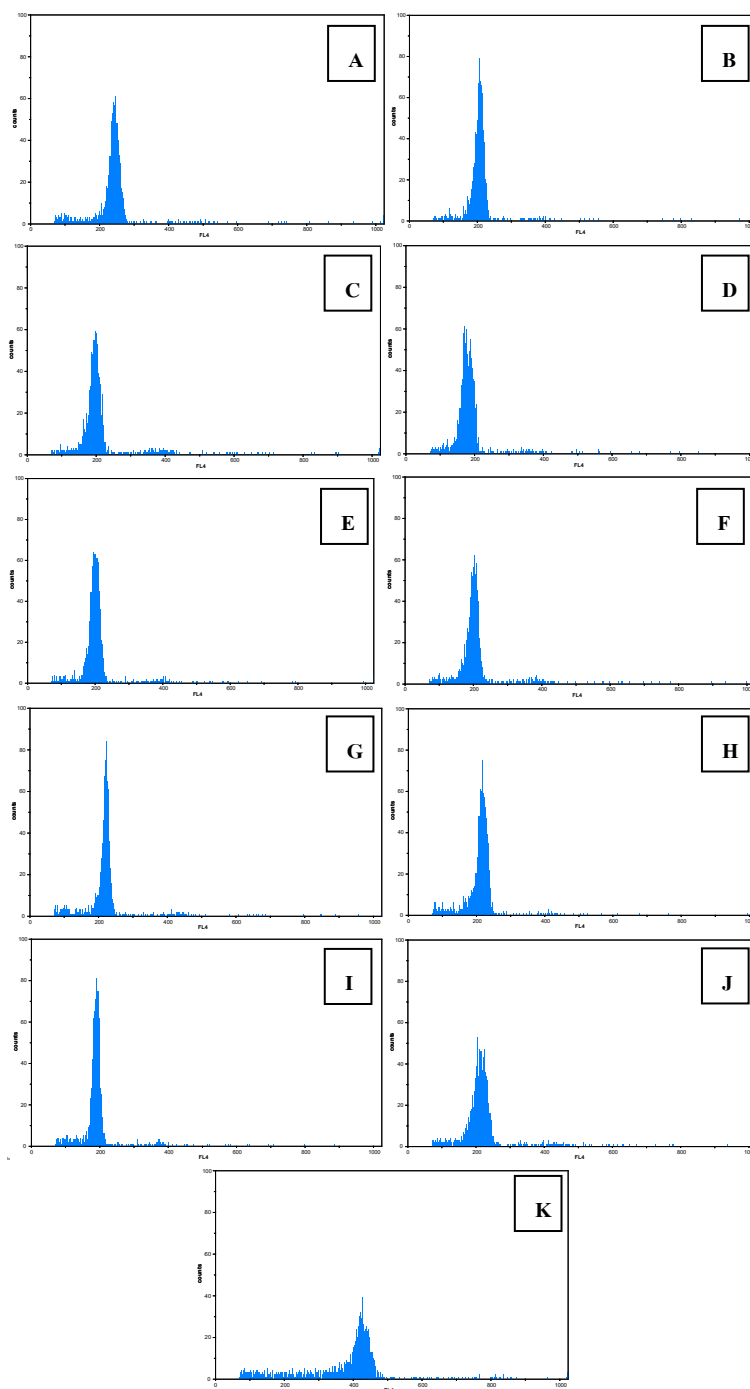
		ปริมาณคลอโรฟิลล์ (มิลลิกรัม/น้ำหนักสด) (\pm SE) ^{1/2}	
		คลอโรฟิลล์เอ	คลอโรฟิลล์บี
โคลชิซิน (%)	0	257.32 \pm 36.32	252.10 \pm 71.28a
	0.05	224.39 \pm 16.36	176.44 \pm 22.37b
	0.10	239.01 \pm 31.20	174.995 \pm 38.11b
	0.15	268.57 \pm 28.60	206.19 \pm 30.06ab
	0.20	247.23 \pm 20.15	191.93 \pm 24.60b
F-test		ns	*
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	254.35 \pm 29.47	198.84 \pm 31054
	24	240.25 \pm 27.21	201.80 \pm 61.37
F-test		ns	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)		
0	12	272.50 \pm 38.99	241.69 \pm 42.61
	24	281.81 \pm 8.65	262.52 \pm 102.77
0.05	12	258.10 \pm 22.58	186.55 \pm 26.10
	24	190.68 \pm 3.82	161.61 \pm 51.14
0.10	12	249.90 \pm 11.11	188.29 \pm 21.97
	24	258.12 \pm 34.87	166.33 \pm 6.24
0.15	12	242.14 \pm 32.98	192.73 \pm 13.77
	24	255.33 \pm 38.01	219.64 \pm 39.07
0.20	12	239.45 \pm 9.66	184.96 \pm 17.36
	24	255.00 \pm 27.22	198.90 \pm 32.65
F-test		ns	ns
CV%		20.91	22.04

^{1/2}ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.3.6 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer

หลังจากการแช่กลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตรเมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือนยอดจะพัฒนาไปเป็นต้น นำต้นที่ได้มาตัดบริเวณข้อ และนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 1 เดือน เมื่อครบ 8 สัปดาห์ได้นำใบมาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer ทั้งนี้ได้นำใบเบญจมาศทุกความเข้มข้นและทุกระยะเวลาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.30B, 4.30C, 4.30D และ 4.30E) และความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.30G, 4.30H, 4.30I และ 4.30J) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอโดยยังคงมีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับการแช่สารละลายโคลชิซิน (ภาพที่ 4.30A และ 4.30F) แต่ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 เท่า (4n) ของต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน และมีจำนวน 1 ต้นจากทั้งหมด 30 ต้น ของทริทเมนต์ดังกล่าว (ภาพที่ 4.30K)



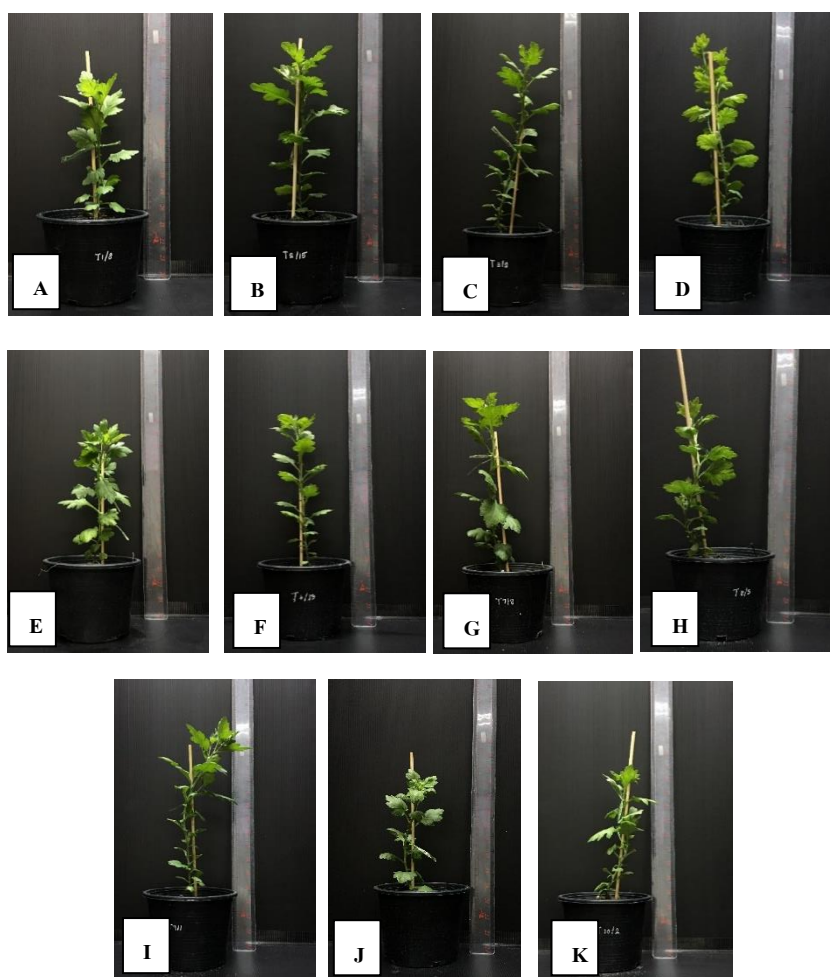
ภาพที่ 4.30 ลักษณะกราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของต้นเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 12 ชั่วโมง (A)-(E) และ 24 ชั่วโมง (F)-(K) ในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (A) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% (B) โคลชิซิน 0.05% (C) โคลชิซิน 0.1% (D) โคลชิซิน 0.15% (E) โคลชิซิน 0.2% (F) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% (G) โคลชิซิน 0.05% (H) โคลชิซิน 0.1% (I) โคลชิซิน 0.15% (J) โคลชิซิน 0.2% และ (K) โคลชิซิน 0.2% (4n)

4.3.7 การย้ายปลูกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์นอกสภาพปลอดเชื้อ

การย้ายปลูกเบญจมาศนอกสภาพปลอดเชื้อ โดยนำต้นเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อรุ่น M2 ย้ายออกปลูกจำนวน 20 ต้น ต่อ 1 ทรืทเมนต์ทำได้โดยนำต้นเบญจมาศที่มีรากและเจริญเติบโตประมาณ 4-5 สัปดาห์ในสภาพปลอดเชื้อนำมาปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ 2-3 วัน โดยการย้ายมาเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นให้ย้ายต้นเบญจมาศออกจากขวด ทำการล้างรากที่ติดกับรากให้สะอาดเตรียมมะพร้าวสับเพื่อใช้เป็นวัสดุปลูก และนำต้นเบญจมาศที่ล้างรากสะอาดแล้วปลูกลงในวัสดุที่เตรียมไว้ รดน้ำให้ชุ่ม ใช้ถุงพลาสติกคลุมกระถาง เพื่อให้ต้นเบญจมาศค่อยๆ ปรับตัว นำไปวางในที่ที่มีแสง แต่ไม่ต้องโดนแดดเพราะจะทำให้ต้นเบญจมาศตาย เมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์ให้เจาะรูที่ถุงพลาสติกเพื่อให้ต้นเบญจมาศมีอากาศถ่ายเท พอตต้นเบญจมาศเริ่มสร้างใบใหม่ให้เตรียมย้ายปลูกในดินผสมมะพร้าวสับ อัตราส่วน 1:1 เริ่มใส่ปุ๋ยสูตร 16-16-16 ในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากเลี้ยงต้นเบญจมาศเป็นระยะเวลา 1-2 สัปดาห์ พบว่า อัตราการรอดชีวิตของต้นเบญจมาศ โดยส่วนใหญ่มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากสัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไป มีต้นเบญจมาศที่ตาย เนื่องจากมีแมลงศัตรูพืชเข้าทำลาย และบางกระถางมีน้ำขัง ทำให้รากและลำต้นเน่าตาย ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย 90-100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.24) ภายหลังจากการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์ ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ความสูงต้น และจำนวนใบ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกๆ สัปดาห์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ลักษณะลำต้นมีสีเขียว (ภาพที่ 4.31) ใบเป็นรูปใบหอกปลายแหลมหรือบางใบค่อนข้างกลม เส้นกลางใบเส้นแขนงใบสีเขียวอ่อนเห็นได้ชัด ผิวใบด้านบนมีสีเขียวเข้ม ผิวใบด้านล่างสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.33) แต่มีบางต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าต้นเบญจมาศมีลำต้นสีเขียวอ่อน ใบค่อนข้างกลม ผิวใบด้านบนมีลักษณะใบด่าง ผิวใบด้านล่างมีสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.32) ในสัปดาห์ที่ 7 ต้นเบญจมาศเริ่มมีการออกดอก พบว่าจำนวนดอกของแต่ละต้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยเฉลี่ยแล้วมีจำนวนดอก 7-8 ดอกต่อต้น สำหรับต้นเบญจมาศที่ได้รับ ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ต้นควบคุม) พบว่ามีความสูงต้น จำนวนใบ และจำนวนดอกมากที่สุด 26.73 เซนติเมตร, 19.92 ใบ และ 8.70 ดอก ตามลำดับ และสำหรับต้นเบญจมาศที่ได้รับ ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.10 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ามีความสูงต้น จำนวนใบ และจำนวนดอกน้อยที่สุด 23.10 เซนติเมตร, 18.10 ใบ และ 7.70 ดอก ตามลำดับ เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 11 ดอกจะมีลักษณะบานเต็มที่ มีขนาดดอกไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยขนาดของดอกโดยเฉลี่ย 2 เซนติเมตร วัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางของดอก โดยขนาดของดอกใหญ่

ที่สุด 2.07 เซนติเมตร คือต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ขนาดของดอกที่เล็กที่สุด 2.00 เซนติเมตร คือต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ต้นควบคุม) (ตารางที่ 4.25) ลักษณะของดอกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์หลังจากย้ายออกปลูก พบว่าความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินทั้ง 5 ความเข้มข้น และ 2 ระยะเวลา ได้ลักษณะของดอกประเภท single ที่มีสีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกแตกต่างกัน แต่กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเหลืองอมเขียว ไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอกที่เหมือนกัน ดังนี้ ต้นควบคุม ระยะเวลา 12 ชั่วโมง กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีม่วง บานเรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น (ภาพที่ 4.34A) ต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีม่วง และมีสีขาวบริเวณขอบๆ กลีบดอก บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น พบ 1 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.34B) ต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีม่วงอมชมพู และมีสีขาวบริเวณขอบๆ กลีบดอก บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น พบ 1 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.34C) ต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีม่วง และมีสีขาวบริเวณขอบๆ กลีบดอก บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น พบทีละ 1 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.34D และ 4.34E) ต้นควบคุม ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีม่วง และมีสีขาวบริเวณขอบๆ กลีบดอกเล็กน้อย บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น (ภาพที่ 4.34F) ต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีชมพูอมส้มอ่อนๆ บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น พบ 1 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.34G) ต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีชมพูอมส้มอ่อนๆ กลีบดอกบานเรียงกันชั้นเดียว พบ 1 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.34H) ต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีม่วงอ่อน และสีขาวในกลีบดอกเดียวกัน บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น พบ 1 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.34I) ต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีม่วง และมีสีขาวบริเวณขอบๆ กลีบดอก บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น พบ 1 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.34J) ต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลาย

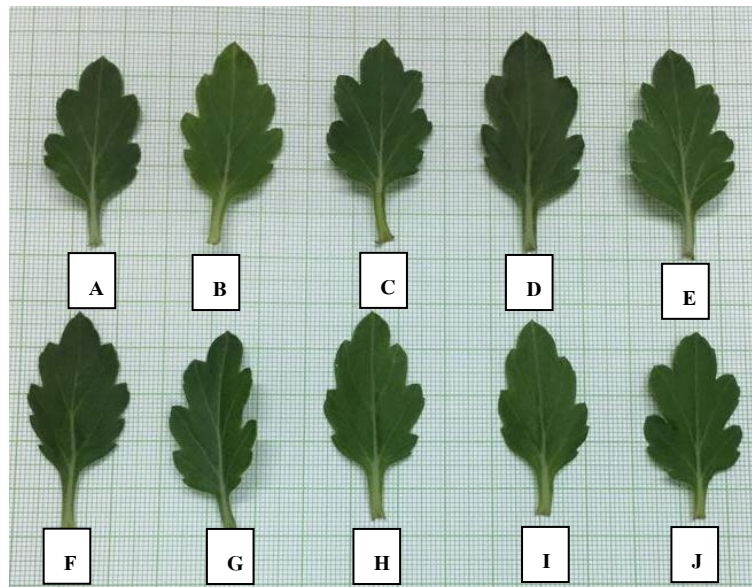
โคลชิซิน 0.15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ต้นต่าง) กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีชมพูอ่อน และมีสีขาวบริเวณขอบๆ กลีบดอก บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น พบ 1 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.34K) ต้นเบญจมาศที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ต้นที่มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น 2 เท่า) กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีม่วง และมีสีขาวบริเวณขอบๆ กลีบดอก บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น พบ 1 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.34L)



ภาพที่ 4.31 ต้นเบญจมาศพันธุ์แคนเทอร์หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 12 ชั่วโมง (A)-(E) และ 24 ชั่วโมง (F)-(K) (A) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% (B) โคลชิซิน 0.05% (C) โคลชิซิน 0.1% (D) โคลชิซิน 0.15% (E) โคลชิซิน 0.2% (F) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% (G) โคลชิซิน 0.05% (H) โคลชิซิน 0.1% (I) โคลชิซิน 0.15% (J) โคลชิซิน 0.2% และ (K) โคลชิซิน 0.2% (4n)



ภาพที่ 4.32 ต้นเบญจมาศพันธุ์แคนเทอร์หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.15% ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ปรากฏลักษณะต่าง



ภาพที่ 4.33 ลักษณะของใบเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (A) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% 12 ชั่วโมง (B) โคลชิซิน 0.05% 12 ชั่วโมง (C) โคลชิซิน 0.1% 12 ชั่วโมง (D) โคลชิซิน 0.15% 12 ชั่วโมง (E) โคลชิซิน 0.2% 12 ชั่วโมง (F) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% 24 ชั่วโมง (G) โคลชิซิน 0.05% 24 ชั่วโมง (H) โคลชิซิน 0.1% 24 ชั่วโมง (I) โคลชิซิน 0.15% 24 ชั่วโมง และ (J) โคลชิซิน 0.2% 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.34 ลักษณะของดอกเบญจมาศพันธุ์แคนเทอร์ หลังจกย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 11 สัปดาห์ (A) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% 12 ชั่วโมง (B) โคลชิซิน 0.05% 12 ชั่วโมง (C) โคลชิซิน 0.1% 12 ชั่วโมง (D) โคลชิซิน 0.15% 12 ชั่วโมง (E) โคลชิซิน 0.2% 12 ชั่วโมง (F) ต้นควบคุม โคลชิซิน 0% 24 ชั่วโมง (G) โคลชิซิน 0.05% 24 ชั่วโมง (H) โคลชิซิน 0.1% 24 ชั่วโมง (I) โคลชิซิน 0.15% 24 ชั่วโมง (J) โคลชิซิน 0.2% 24 ชั่วโมง (K) โคลชิซิน 0.15% 24 ชั่วโมง (ค่า) และ (L) โคลชิซิน 0.2% (4n)

ตารางที่ 4.24 แสดงอัตราการรอดชีวิตหลังจากย้ายปลูกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์

		อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) (\pm SE) ^L							
		อายุ (สัปดาห์)							
		1	2	3	4	5	6	7	
โคลชิซิน (%)	0	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	
	0.05	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	
	0.10	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	95.00 \pm 26.67	97.50 \pm 26.67	97.50 \pm 26.67	97.50 \pm 26.67	97.50 \pm 26.67	
	0.15	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	
	0.20	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	97.50 \pm 15.81	97.50 \pm 26.67	97.50 \pm 26.67	97.50 \pm 26.67	97.50 \pm 26.67	
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	99.00 \pm 17.14	97.00 \pm 17.14	97.00 \pm 17.14	97.00 \pm 17.14	97.00 \pm 17.14	
	24	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	97.00 \pm 10.00	97.00 \pm 17.14	97.00 \pm 17.14	97.00 \pm 17.14	97.00 \pm 17.14	
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	0	12	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
		24	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
0.05	12	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	
	24	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	
0.10	12	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	90.00 \pm 30.17	90.00 \pm 30.77	90.00 \pm 30.77	90.00 \pm 30.77	90.00 \pm 30.77	
	24	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	95.00 \pm 22.36	95.00 \pm 22.36	95.00 \pm 22.36	95.00 \pm 22.36	95.00 \pm 22.36	
0.15	12	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	
	24	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	
0.20	12	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	95.00 \pm 22.36	95.00 \pm 22.36	95.00 \pm 22.36	95.00 \pm 22.36	95.00 \pm 22.36	
	24	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	90.00 \pm 30.77	90.00 \pm 30.77	90.00 \pm 30.77	90.00 \pm 30.77	
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
CV%		0.00	0.00	14.23	17.54	17.54	17.54	17.54	

^Lค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.25 แสดงความสูง จำนวนใบ จำนวนดอก และขนาดของดอกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ หลังจกย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์

		ความสูงต้น (ซม.) (\pm SE) ^U	จำนวนใบ (\pm SE) ^U	จำนวนดอก (\pm SE) ^U	ขนาดของดอก (ซม.) (\pm SE) ^U
โคลชิซิน (%)	0	26.48 \pm 1.37	19.82 \pm 0.90	8.67 \pm 0.85	2.01 \pm 0.59
	0.05	24.40 \pm 2.21	19.72 \pm 0.75	8.22 \pm 1.02	2.07 \pm 0.11
	0.10	24.17 \pm 6.97	18.55 \pm 5.40	7.97 \pm 2.40	2.01 \pm 0.58
	0.15	26.40 \pm 1.02	19.85 \pm 0.83	8.45 \pm 0.78	2.04 \pm 0.09
	0.20	24.63 \pm 7.03	18.62 \pm 5.14	8.00 \pm 2.43	2.06 \pm 0.12
F-test		ns	ns	ns	ns
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	12	25.13 \pm 4.75	19.19 \pm 3.50	8.78 \pm 1.70	2.04 \pm 0.37
	24	25.30 \pm 4.68	19.06 \pm 3.51	8.67 \pm 1.67	2.03 \pm 0.38
F-test		ns	ns	ns	ns
โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)				
0	12	26.61 \pm 1.57	19.75 \pm 0.91	8.65 \pm 0.67	2.02 \pm 0.48
	24	26.73 \pm 1.17	19.92 \pm 0.91	8.70 \pm 1.03	2.00 \pm 0.68
0.05	12	26.16 \pm 2.41	19.70 \pm 0.73	7.80 \pm 1.05	2.07 \pm 0.11
	24	26.24 \pm 2.06	19.75 \pm 0.78	8.65 \pm 0.81	2.06 \pm 0.11
0.10	12	23.10 \pm 8.09	18.10 \pm 6.22	7.70 \pm 2.77	2.02 \pm 0.48
	24	24.19 \pm 5.80	19.00 \pm 4.56	8.20 \pm 2.09	2.01 \pm 0.48
0.15	12	25.38 \pm 0.84	19.80 \pm 0.89	8.55 \pm 0.75	2.06 \pm 0.09
	24	25.66 \pm 1.18	19.90 \pm 4.55	8.35 \pm 0.81	2.03 \pm 0.10
0.20	12	24.63 \pm 5.93	19.10 \pm 4.55	8.30 \pm 2.07	2.06 \pm 0.09
	24	23.46 \pm 8.09	18.15 \pm 6.25	7.75 \pm 2.71	2.06 \pm 0.12
F-test		ns	ns	ns	ns
CV%		18.38	18.06	28.17	38.86

^Uค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแคลลัสของเบญจมาศเบญจมาศสายพันธุ์วิวิค (ดอกประเภท single สีขาว) โดยใช้สารละลาย Ethyl methanesulphonate (EMS)

สารละลาย EMS เป็นสารเคมีที่นิยมใช้มากที่สุดในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และใช้ได้ผลดีกับพืชหลายชนิด อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จของการก่อกลายพันธุ์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ธรรมชาติของเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ชนิดเนื้อเยื่อ ขนาดเนื้อเยื่อ และระยะการพัฒนาระยะของเนื้อเยื่อ หรือสัณฐานวิทยาของสารก่อกลายพันธุ์ (ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความเข้มข้นของสาร) นอกจากนี้ระยะเวลาที่ใช้ในการแช่สารก็มีความสำคัญเป็นอย่างมาก ที่จะส่งผลต่อความสำเร็จในการก่อกลายพันธุ์ (Khan *et al.* 2009; Gruszka *et al.* 2012) ซึ่งปัจจัยต่างๆ ที่ได้กล่าวมานั้น เป็นองค์ประกอบส่งเสริมความมีประสิทธิภาพ และความเหมาะสมของการก่อกลายพันธุ์พืชชนิดต่างๆ

ความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ที่เหมาะสม มีผลต่อการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อพืช โดยการใส่สารก่อกลายพันธุ์ความเข้มข้นสูง จะส่งผลให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์สูง แต่อัตราการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อพืชจะลดลง ในทางตรงกันข้ามการใส่สารก่อกลายพันธุ์ความเข้มข้นต่ำ ส่งผลให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์ต่ำ แต่การรอดชีวิตของเนื้อเยื่อจะสูงขึ้น ดังนั้นการใช้ความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ที่เหมาะสมจึงจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากทำให้มีจำนวนเนื้อเยื่อพืชที่รอดชีวิตในปริมาณที่เหมาะสม และมีโอกาสพบต้นกลายพันธุ์ที่ต้องการ สำหรับการทดลองนี้พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.5-2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 120 นาที ส่งผลให้แคลลัสมีสีน้ำตาล และสีดำ ทำให้ไม่สามารถพัฒนาหรือเจริญเติบโตต่อไปได้ เนื่องจากการใช้สารเคมีก่อการกลายพันธุ์ในหลอดทดลองที่มีความเข้มข้นที่สูงขึ้น หรือที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันแต่ระยะเวลาที่ได้รับสารเคมีนานขึ้นจะส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลง และความเข้มข้นของสารละลาย EMS ในปริมาณที่สูงเข้าทำลายกลุ่มเนื้อเยื่อได้มากกว่า (Wu and Mooney. 2002; วิชชุดา รุ่งเรือง. 2537) นอกจากนี้จากการทดลองได้แช่แคลลัสภายใต้สภาพเขย่า ทำให้สามารถดูดซึมสารละลาย EMS ได้ทั่วถึง เมื่อพิจารณาถึงค่า LD₅₀ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย EMS ที่ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสเบญจมาศลดลงครั้งหนึ่ง คือความเข้มข้น 1.15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่เป็นระยะเวลา 60 นาที และความเข้มข้น 0.72 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่เป็นระยะเวลา 120 นาที โดยสมปอง เตชะโต และวิทยา พรหมมี (2542) รายงานว่า LD₅₀ ถือเป็นค่าใน

การประเมินความเข้มข้นที่เหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ ทั้งนี้เพราะความเข้มข้นดังกล่าวสร้างความเสียหายและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับหน่วยพันธุกรรมอย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ พืชแต่ละชนิดมีค่า LD₅₀ ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนและอายุของชิ้นส่วนพืชที่นำมาแช่ ระยะเวลาในการแช่และความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของยูพากรณ์ ศิริ โสม และสมปอง เตชะ โด (2551) ชักนำการกลายพันธุ์จากใบกล้วยที่แช่ในหลอดทดลอง มาแช่สารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0-1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 90 นาที พบว่าลักษณะยอครวมผิดปกติ เช่น ยอครวมมีขนาดเล็ก ใบสีเขียวอ่อน ใบขีด และงานวิจัยของ Kuma *et. al.* 2010 ได้นำแคลลัสของกล้วยมาแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ และนำมาเลี้ยงบนอาหาร พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลาย EMS เพิ่มขึ้น อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลง โดยที่ความเข้มข้นของสารละลาย EMS 0.4 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้แคลลัสตายทั้งหมด แคลลัสที่รอดชีวิตหลังจากการแช่สารละลาย EMS เหลือเพียง 3 ความเข้มข้นได้แก่ 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ที่ระยะเวลา 60 และ 120 นาที ขนาดของแคลลัสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกสัปดาห์ แคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะกันแน่น (compact callus) และเริ่มมีการพัฒนาไปเป็นยอด

การวัดความกว้าง ความยาว และจำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ พบว่าความกว้าง และจำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบไม่แตกต่างกันกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS แต่ความยาวของปากใบมีลักษณะที่แตกต่างกับต้นที่ได้รับสารละลาย EMS โดยต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที มีขนาดความยาวของปากใบมากที่สุด เนื่องจากสารละลาย EMS ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ในระดับยีน ซึ่งแสดงออกถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาที่แตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS และเมื่อนำมาวัดปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี พบว่ามีปริมาณคลอโรฟิลล์ที่แตกต่างกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS โดยต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และบีมากที่สุด แต่ก็พบว่าต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้นมากที่สุดก็มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีน้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS เนื่องจากสารละลาย EMS ทำให้เกิดการกระจายตัวที่ไม่สม่ำเสมอของปริมาณคลอโรฟิลล์ (อรุณี วงศ์ปิยะสกลิตย์. 2550) และคลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุที่มีบทบาท และมีหน้าที่สำคัญในการดูดซับพลังงานแสงเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ดังนั้นปริมาณของคลอโรฟิลล์ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อส่วนใบของพืชจึงสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งบอกถึงความสามารถในการสร้างอาหารเพื่อการเจริญเติบโตของพืช ตลอดจนการตอบสนองต่อปัจจัยต่างๆ ด้านสภาพแวดล้อม (วิรัตน์ ภูมิวิวัฒน์. 2539)

หลังจากย้ายเบญจมาศสายพันธุ์วิคออกปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อ พบว่า การเจริญเติบโตของลำต้น และใบมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น ลักษณะของดอกแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS ทั้งหมด 9 แบบ โดยต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS พบลักษณะของกลีบดอก 2 แบบ คือลักษณะของดอกเป็นประเภท single โดยมีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีขาว บานเรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว ไม่มีการพัฒนาแต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก และอีกลักษณะที่พบ คือมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของดอกจากประเภท single เป็น pompon โดยกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีขาว ลักษณะสั้น และกว้าง โคนงอกเข้าหาใจกลางดอก กลีบดอกบานเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ เมื่อดอกบานจะไม่เห็นดอกย่อยวงใน ทำให้ดอกมีลักษณะกลม เนื่องจากเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม ที่เกิดจากกลุ่มของเซลล์ (callus) ที่เลี้ยงในอาหารเรียกว่า somaclonal variation (รังสฤษดิ์ กาวิตะ. 2541) ส่วนต้นที่ได้รับการเข้มข้นของสารละลาย EMS และระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยประเภทของดอกจะมีทั้ง single และเปลี่ยนจากประเภท single เป็น pompon และบางต้นมีสีของกลีบดอกที่เปลี่ยนไปจากเดิม เนื่องจากสารละลาย EMS ทำให้เกิดการเข้าแทนที่คู่เบส โดยการที่มีหมู่เอทิลมาอยู่ในโมเลกุลของ guanine ทำให้คุณสมบัติในการเกิด ionization ที่แตกต่างไปจากปกติ จึงเกิดการจับคู่เบสที่ผิดปกติไปจากเดิมได้ สารละลาย EMS ยังทำให้เกิดการหลุดหายไปของเบสเพียวรีนจากสายดีเอ็นเอ เพราะการที่มีหมู่เอทิลเข้าไปจับอยู่ในตำแหน่งต่างๆ ในเบสเพียวรีน ทำให้เกิดการตัดขาดของพันธะที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลกับเบส จึงเกิดการหลุดออกไปของเบสเพียวรีนและเกิดช่องว่างขึ้น ต่อมาเมื่อเซลล์มีกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ อาจเกิดความผิดพลาดได้ที่เบสที่แตกต่างไปจากเดิม ซึ่งนำไปสู่การกลายพันธุ์แบบ transition และ transversion ได้ และนอกจากนี้การตัดขาดของหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาล อาจทำให้เกิดการขาดจากกันของดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายคู่ ซึ่งนำไปสู่การหลุดหายไปของส่วนดีเอ็นเอและเกิดการกลายพันธุ์ในที่สุด จึงทำให้ต้นที่ได้รับสารละลาย EMS มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS (Iaea *et.al.* 1977) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Latado *et al.* (2004) ศึกษาการกลายพันธุ์ของเบญจมาศสายพันธุ์ที่มีดอกสีชมพูเข้ม โดยใช้สารละลาย EMS นำก้านดอกอ่อนจุ่มแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.77 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง 45 นาที ทำให้กลีบดอกเปลี่ยนสีจากดอกสีชมพูเข้ม เป็นสีชมพูส้ม สีชมพูอ่อน สีบรอนซ์ สีขาว สีเหลือง และสีส้ม ส่วนลักษณะภายนอกเหมือนดอกชูดควบคุม จากการศึกษาพบว่าสารละลาย EMS มีประสิทธิภาพในการกลายพันธุ์ของเบญจมาศในหลอดทดลอง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Fang (2011) ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในต้นแอฟริกันไวโอเล็ต โดยใช้สารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ และเวลาที่แช่สารแตกต่างกัน 5 เวลา ได้แก่ 0, 30, 60, 120 และ 240 นาที

พบว่าสีของดอกมีลักษณะเปลี่ยนไปจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS จากดอกสีม่วง เป็นดอกสีชมพูมีสีขาวบริเวณขอบดอก

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเบญจมาศสายพันธุ์วิค ที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลาย EMS และระยะเวลาที่แตกต่างกัน จำนวน 26 ตัวอย่างด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 28 ไพรเมอร์ จากการทดลองพบว่าเครื่องหมาย RAPD สามารถใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นเบญจมาศได้ ซึ่งมีจำนวน 8 ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ โดยดูจากอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึม และสามารถจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเบญจมาศสายพันธุ์วิคได้ออกเป็น 5 กลุ่ม เช่นเดียวกับการศึกษาของ Hu *et al.* (2008) พบว่าต้นบุก (*Amorphophallus albus*) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมหลังจากตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RAPD ใดๆก็ตาม ชนวดิพรหมจันทร์ และคณะ (2552) รายงานการใช้ไพรเมอร์จำนวน 7 ไพรเมอร์ ในการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน พบว่าไพรเมอร์ OPAB09 และ OPAB01 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด แต่ไพรเมอร์ดังกล่าวให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น โมนอมอร์ฟิซึม นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่า บางตัวอย่างมีหลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน ซึ่งหลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD นี้เกิดจากไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอแบบสุ่มและกระจายทั่วจีโนม โดยโพลิมอร์ฟิซึม เกิดจากจำนวนของตำแหน่งที่ไพรเมอร์ไปเกาะไม่เท่ากันหรือบริเวณที่ไพรเมอร์เกาะได้หายไปหรือเพิ่มขึ้นมาหรือมีการเปลี่ยนแปลงเบสในบริเวณที่ไพรเมอร์เกาะ หรือเกิดการหายไปหรือเพิ่มขึ้นมาของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ (สุริพร เกตุงาม, 2546) จากการรายงานของ Yu *et al.* (2012) ค่า PICs มีประสิทธิภาพสูงเมื่อ $PICs > 0.5$ ประสิทธิภาพปานกลาง $0.25 < PICs < 0.5$ และมีประสิทธิภาพต่ำ เมื่อ $PICs < 0.2$ จากการศึกษาพบว่าทั้ง 8 ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ ให้ค่า PICs ที่มีประสิทธิภาพต่ำ อย่างไรก็ตามในการศึกษารุ่นนี้ได้ใช้จำนวนไพรเมอร์น้อย ซึ่งอาจไม่ใช่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการแยกความแตกต่างของเบญจมาศสายพันธุ์วิค ข้อมูลที่ได้จากการปรากฏแถบดีเอ็นเอจึงยังไม่เพียงพอในการจำแนก และจัดกลุ่มเบญจมาศสายพันธุ์วิคให้สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ จึงควรทดลองใช้ไพรเมอร์ชนิดอื่นในการศึกษาจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอในครั้งต่อไป

5.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรท (ดอกประเภท single สีเหลือง) และกลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ (ดอกประเภท single สีม่วง) โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

หลังจากการนำกลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรท และแคนเทอร์มาฟอกฆ่าเชื้อและนำไปแช่ในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 2 พบว่าชิ้นส่วนเริ่มต้นมีการพัฒนามาเป็นแคลลัส โดยแคลลัสจะเริ่มเกิดขึ้นที่บริเวณรอยตัดเพราะบริเวณรอยตัดมีการตอบสนองต่อสารต่างๆ ได้ก่อนบริเวณอื่น และมีการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ดีกว่าเซลล์ข้างใน (คำนำญกาญจนภูมิ, 2542) ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินและระยะเวลาการแช่สารที่นานขึ้น ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของกลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรท และแคนเทอร์ลดลง เนื่องมาจากสารละลายโคลชิซินมีความเป็นพิษสูง (Takamura and Miyajima, 1996) โดยสารละลายโคลชิซินส่งผลต่อความหนืดของไซโทพลาสซึมและการทำงานของเซลล์ให้ผิดปกติไปจากเดิม (Cook and Loudon, 1952) นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนโครโมโซมทำให้เซลล์เสียหายและตายได้ (วิทยา บัวเจริญ, 2557) ดังนั้นการนำสารละลายโคลชิซินมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ จึงจำเป็นต้องหาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสม (สุพัตรา สรรธรรม และคณะ, 2551) เมื่อพิจารณาถึงค่า LD₅₀ พบว่าความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน ที่ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของกลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรทลดลงครั้งหนึ่ง คือความเข้มข้น 0.21 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง และความเข้มข้น 0.19 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน ที่ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของกลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ลดลงครั้งหนึ่ง คือความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง และความเข้มข้น 0.19 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

การวัดขนาดของแคลลัส พบว่าเมื่อกลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรทและสายพันธุ์แคนเทอร์ที่รอดชีวิตหลังจากการแช่สารละลายโคลชิซิน ขนาดของแคลลัสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกๆ สัปดาห์ แคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะกันแน่น (compact callus) ซึ่งแคลลัสที่ได้นั้นมีลักษณะที่ไม่แตกต่างกัน และเริ่มมีการพัฒนาไปเป็นยอด หลังจากที่ยอดพัฒนามาเป็นต้นจะพบว่าต้นเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรทที่เจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อที่ได้รับความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายโคลชิซิน ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน จะมีลักษณะของลำต้น และใบมีสีเขียว ความสูงของ

ลำต้นและใบมีลักษณะที่ไม่แตกต่างกัน แต่ต้นเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมงพบเพียง 1 ต้น จากทั้งหมด 30 ต้นของτριทเมนต์ดังกล่าว มีลักษณะลำต้นสีขาว ใบด่าง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของปรางทิพย์มณีแสง (2552) ที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในบัวหลวงโดยใช้สารละลายโคลชิซิน พบว่าสารละลายโคลชิซินสามารถทำให้เกิดลักษณะต่างของใบต้นบัวหลวงได้ เนื่องจากสารละลายโคลชิซินส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนคลอโรพลาสต์ และมีการสะสมแป้งเพิ่มมากขึ้น ส่งผลทำให้ลักษณะรูปร่างของแผ่นใบเปลี่ยนไป เช่น ใบหนาขึ้น ผิวใบขุ่น ใบด่าง ใบบิดเบี้ยว เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นลักษณะการเกิดไคเมอรา (chimera) เป็นลักษณะการกลายพันธุ์ที่พบในส่วนของเซลล์ร่างกาย ซึ่งตามปกติเป็นเหตุการณ์ที่เรียกว่า “one cell event” คือ มักเกิดในเซลล์ๆ เดียวเท่านั้น แต่ในเนื้อเยื่อเจริญส่วนที่จะเจริญไปเป็นกิ่ง (เช่น ตายอด ตาข้าง) จะมีจำนวนเซลล์อยู่หลายเซลล์ (multicellular cell) และมีการเรียงตัวกันอยู่เป็นชั้นๆ ที่ค่อนข้างจะเป็นอิสระต่อกัน (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2530)

การวัดขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ พบว่าความกว้างและจำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบของเบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรท และแคนเทอร์ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน โดย Allum *et al.* (2007) รายงานว่าความสามารถในการลำเลียงสารก่อนกลายพันธุ์เข้าสู่เนื้อเยื่อพืช และลักษณะพันธุกรรมของพืชเป็นปัจจัยที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และการเพิ่มชุดจำนวนโครโมโซม และจากการศึกษาความกว้าง ความยาว จำนวนคลอโรพลาสต์ของปากใบ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เช่นเดียวกับการศึกษาของอุษา เพชรบ้านนา และคณะ (2552) ศึกษาการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้ดินใบหมากโดยการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยการนำต้นกล้วยไม้ดินใบหมากอายุ 3 เดือน หลังจากเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อมาแช่ในสารละลายโคลชิซิน พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้นอัตราการรอดชีวิตจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อปากใบ ขนาดของปากใบไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละหน่วยการทดลอง แต่เบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์พบ 1 ต้นที่ปากใบมีขนาดความกว้างและความยาวมากที่สุด คือต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีความกว้างและความยาวของปากใบมากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายโคลชิซินสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รงควัตถุ ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น (Dermen, 1940) จากลักษณะการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารพันธุกรรม ทำให้อวัยวะส่วนต่างๆ ของต้นพืชมีขนาดใหญ่ขึ้น (บุญหงส์ จงคิด, 2548) และเมื่อนำเบญจมาศสายพันธุ์ซีริเบรทมาวัดปริมาณคลอโรพลาสต์เอและบี พบว่าปริมาณคลอโรพลาสต์เอแตกต่างกันกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน แต่ปริมาณคลอโรพลาสต์บีไม่แตกต่างกันกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ส่วน

เบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีไม่แตกต่างกันกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีของต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินจะมีค่ามากกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน เนื่องจากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ต่อปากใบมากกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (Shao *et al.* 2003) ในทางตรงกันข้าม Xu *et al.* (2010) พบว่าต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีน้อยกว่าต้นควบคุม สาเหตุอาจเนื่องมาจากการไม่รวมกันของระบบ thylakoid membrane อย่างไรก็ตาม Warner and Edwards (1989) รายงานว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ในต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินไม่แตกต่างกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer เบญจมาศสายพันธุ์ชีรีเบรทและสายพันธุ์แคนเทอร์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน เนื่องจากระบบการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer เป็นการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอทุกเซลล์จากตัวอย่าง (Dolezel, *et al.* 2007) อธิบายไว้ว่าการเปลี่ยนแปลงขนาดปากใบเกิดขึ้นในบางเซลล์ไม่ได้เกิดขึ้นในกลุ่มเซลล์ส่วนใหญ่ภายในต้นพืช ดังนั้นเมื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer จึงไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอ อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์ (2550) อธิบายว่าการใช้สารก่อกลายพันธุ์ในบางกรณีอาจไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากสารก่อกลายพันธุ์มีอำนาจในการทะลุทะลวงต่ำอาจไม่สามารถทำให้ทุกเซลล์เป้าหมายเกิดการกลายพันธุ์ได้ทุกเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับพืชที่มีจำนวนเซลล์มาก มีต้นเบญจมาศสายพันธุ์ชีรีเบรทเพียง 1 ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง เป็นต้นเบญจมาศที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอจาก $2n$ เหลือ n (ต้นที่ตรวจพบมีปริมาณดีเอ็นเอลดลงครึ่งหนึ่ง) ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายโคลชิซินจะสลายตัวเมื่อโดนความร้อนขึ้น ส่งผลให้การเพิ่มชุดโครโมโซมลดลงหรือหายไป (Zhang *et al.* 2007) ดังนั้นจึงต้องกรองด้วยกระดาษกรองมิลลิพอร์ ทำให้สะดวกในการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ อย่างไรก็ตามในพืชบางชนิดโคลชิซินส่งผลให้พืชเป็นหมัน การเจริญเติบโตผิดปกติ และเกิดการขาดของโครโมโซมได้ (Luckett, 1989) และเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ พบว่าต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมงมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอจาก $2n$ เป็น $4n$ โดย Kermani *et al.* (2003) รายงานว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชขึ้นกับชนิดของสารก่อกลายพันธุ์ โดยสารละลายโคลชิซินจัดเป็นสารก่อกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม กลไกการทำงานของสารกลุ่มนี้จะเข้าจับกับอัลฟาทูบูลินไดเมอร์ (α -tubulin dimer) หรือเบต้าทูบูลินไดเมอร์ (β -tubulin dimer) ที่ตำแหน่งที่แตกต่างกัน

จึงไม่มีสปีนเคิลไฟเบอร์ ดังนั้นไม่สามารถควบคุมการแยกของโครโมโซมไปที่ขั้วเซลล์ เป็นผลให้ไม่เกิดการแบ่งเซลล์ จึงหยุดที่ระยะเมตาเฟส เมื่อโครมาทิดแยกออกจากกันจึงไม่ถูกดึงไปที่ขั้ว ส่งผลให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มเป็น 2 เท่า ถ้ามีการแพร่สารดังกล่าวที่นานขึ้น อาจส่งผลให้มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มเป็น 4 เท่า ซึ่งแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน

หลังจากย้ายเบญจมาศสายพันธุ์ซีรีเบรทออกปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อพบว่า การเจริญเติบโตของลำต้น และใบมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น ลักษณะของดอกไม้แตกต่างกันจากต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ลักษณะของดอกเป็นประเภท single กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีเหลือง บานเรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว ไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก และไม่แตกต่างกันจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ส่วนเบญจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์เมื่อย้ายออกปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อพบว่า การเจริญเติบโตของลำต้น และใบมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น ลักษณะของดอกไม้แตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินโดยชัดเจน 5 ต้น โดยทั้ง 5 ต้นนี้มีลักษณะของดอกประเภท single แต่มีสีของกลีบดอกเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีของดอกอาจเป็นผลเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของยีน และส่วนมากเป็นการเปลี่ยนจากยีนคือยีนเป็นยีนเด่น (Broertjes, 1996) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ ศตปพร เกิดสุวรรณ และคณะ (2558) ศึกษาผลของโคลชิซินต่อการชักนำโพลีพลอยดีในแวมยูราในหลอดทดลอง พบว่าปลายยอดที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (LD₅₀) และพบว่า กลีบดอกล่างมีขนาดใหญ่ขึ้น ดอกมีสีม่วงอมชมพู สีดอกเข้มขึ้น

เนื่องจากเบญจมาศเป็นพืชวันสั้นการออกดอกจึงขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการรับแสงต่อวัน โดยเบญจมาศจะออกดอกเมื่อมีแสงสั้นลงในหนึ่งวัน กล่าวคือ ต้องควบคุมเบญจมาศให้ได้รับแสงน้อยกว่า 12 ชั่วโมง จึงจะมีการพัฒนาตาดอก แต่ก็สามารถออกดอกได้ตลอดปีในสภาพความยาววันของประเทศไทย การปลูกเบญจมาศจึงมีการให้แสงไฟคั่นในเวลากลางคืน (night-breaking) เพื่อชะลอการออกดอก และให้มีการเจริญเติบโตทางลำต้นเพียงพอก่อนที่จะปล่อยให้ดอกออก ทำให้ดอกมีก้านยาวซึ่งเป็นการเพิ่มคุณภาพของดอก (ถกลวรรณ ศิริสวัสดิ์ และคณะ, 2561) แต่จากการทดลองทั้ง 3 การทดลองที่ย้ายปลูกเบญจมาศไม่ได้มีการให้แสง ทำให้มีการเจริญเติบโตของลำต้นคุณภาพของดอก และก้านช่อดอกไม่สมบูรณ์

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

6.1 เบลูมาตสายพันธุ์วิวก (ดอกประเภท single สีขาว)

การชักนำการกลายพันธุ์ในเบลูมาต โดยการนำแคลลัสมาแช่สารละลาย EMS ทั้ง 5 ความเข้มข้น 2 ระยะเวลา พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย EMS ที่ระยะเวลา 60 นาที มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 1.22 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 120 นาที มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.72 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงสุด 76.67 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดต่อแคลลัสสูงสุด 1.73 ยอด ลักษณะของดอกในทริทเมนต์ที่ได้รับสารละลาย EMS ระยะเวลา 60 นาที และ 120 นาที มีลักษณะแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS ซึ่งจะพบว่าได้ต้นกลายพันธุ์ทั้งหมด 9 แบบ ดังนี้ต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS พบลักษณะของกลีบดอก 2 แบบ คือลักษณะของดอกเป็นประเภท single โดยมีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีขาว บานเรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว ไม่มีการพัฒนาแต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก และอีกลักษณะที่พบคือ มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของดอกจากประเภท single เป็น pompon โดยกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีขาว ลักษณะสั้น และกว้าง โคนงอกเข้าหาใจกลางดอก กลีบดอกบานเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ เมื่อดอกบานจะไม่เห็นดอกย่อยวงใน ทำให้ดอกมีลักษณะกลม ต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที พบลักษณะของกลีบดอก 2 แบบ คือ ลักษณะดอกเป็นประเภท single โดยมีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีขาว บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว มีลักษณะกลม ไม่มีการพัฒนา อยู่ตรงใจกลางดอก และอีกลักษณะที่พบคือ มีการเปลี่ยนแปลงจากดอกประเภท single เป็น pompon โดยกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีขาว ลักษณะสั้น และกว้าง โคนงอกเข้าหาใจกลางดอก กลีบดอกบานเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ เมื่อดอกบานจะไม่เห็นกลีบดอกย่อยวงใน ทำให้ดอกมีลักษณะกลม ตรงใจกลางดอกพบเกสรสีเหลือง ต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที พบดอกที่ลักษณะแตกต่างกัน 4 แบบ ดังนี้ ลักษณะที่ 1 มีลักษณะของดอกเป็นประเภท single โดยมีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีขาว และสีเหลือง บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว ไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก ลักษณะที่ 2 มีลักษณะของดอกเป็นประเภท single กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีเหลืองบานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว ไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก ลักษณะที่ 3 มีการเปลี่ยนแปลงของดอกจากประเภท single เป็น pompon

โดยกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีขาว ลักษณะสั้น และกว้าง โคนงอกเข้าหาใจกลางดอก กลีบดอกบานเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว ไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันกระจุกอยู่ตรงใจกลางดอก และลักษณะที่ 4 มีการเปลี่ยนแปลงของดอกจากประเภท single เป็น pompon กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีขาว ลักษณะสั้น และกว้าง โคนงอกเข้าหาใจกลางดอก กลีบดอกบานเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ เมื่อดอกบานจะไม่เห็นดอกย่อยวงใน ทำให้ดอกมีลักษณะกลม ตรงใจกลางดอกพบเกสรสีเหลือง ต้นที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 120 นาที ลักษณะของดอกเป็นประเภท single โดยมีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีขาว บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น กลีบดอกมีลักษณะเรียวยาวบริเวณปลายกลีบ กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว ไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก

6.2 เบลูจมาศสายพันธุ์ซีริเบรท (ดอกประเภท single สีเหลือง)

การชักนำการกลายพันธุ์ในเบญจมาศ โดยการนำกลีบดอกมาแช่สารละลายโคลชิซินทั้ง 5 ความเข้มข้น 2 ระยะเวลา ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.21 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.19 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและจำนวนยอดต่อแคลลัสพบว่าชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงสุด 90.00 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดต่อแคลลัส 2.20 ยอด การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer พบว่าต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากทั้งหมด 30 ต้น มีเพียง 1 ต้น ที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอไปจากเดิมจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 2n ลดลงเหลือ n หลังจากย้ายต้นเบญจมาศออกปลูกพบว่า ลักษณะของดอกเป็นประเภท single กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีเหลือง บานเรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเขียว ไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก และไม่แตกต่างกันจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน

6.3 เบลูจมาศสายพันธุ์แคนเทอร์ (ดอกประเภท single สีม่วง)

การชักนำการกลายพันธุ์ในเบญจมาศ โดยการนำกลีบดอกมาแช่สารละลายโคลชิซินทั้ง 5 ความเข้มข้น 2 ระยะเวลา ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.19 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและจำนวนยอดต่อแคลลัสพบว่าชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงสุด 83.33 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดต่อแคลลัส 2.16 ยอด พบต้นเบญจมาศ 1 ต้น จากทั้งหมด 30 ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ลำต้นมีสีขาว ใบด่าง

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Flow cytometer พบว่ามีต้นเบญจมาศ 1 ต้นจากทั้งหมด 30 ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมงได้ต้นที่มีลักษณะ 4n ซึ่งแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน หลังจากย้ายปลูกต้นเบญจมาศ พบว่าต้นควบคุมมีลักษณะของดอกประเภท single กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีม่วง บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเหลืองอมเขียว ไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก นอกจากนี้ได้ดอกที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุมโดยชัดเจน 5 ต้น ได้แก่ ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีชมพูอมส้มอ่อนๆ บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีชมพูอมส้มอ่อนๆ กลีบดอกบานชั้นเดียว ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีม่วงอ่อน และสีขาบบานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น และอีกลักษณะที่พบในความเข้มข้น และเวลาที่เท่ากัน คือมีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีชมพูอ่อน และมีสีขาบบริเวณขอบๆ กลีบดอก บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น และต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสีม่วง และมีสีขาบบริเวณขอบๆ กลีบดอก บานเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น และเป็นต้นที่มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ทั้ง 5 ต้นนี้เป็นต้นที่มีลักษณะของดอกประเภท single โดยมีกลีบดอกของดอกย่อยวงในสีเหลืองอมเขียว ไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก

บรรณานุกรม

- กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2546. การปรับปรุงพันธุ์พืช: พื้นฐาน วิธีการ และแนวคิด. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 237 น.
- คำบุญ กาญจนภูมิ. 2552. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 162 น.
- ชานนท์ ลากจิตร และเมิง-เจิว เจิง. 2560. “ประสิทธิภาพในการกลายพันธุ์ และผลของ Ethyl methanesulphonate (EMS) ต่อกัญชัวไม้ *Erycina pusilla*.” วารสารแก่นเกษตร 45(พิเศษ): 386-391.
- ไชนียะ สะมาลา นูรมา มาซากิ และ นอร์ริษา ปอ. 2557. “ผลของเอทิลมีเทนซัลโฟเนตต่ออัตราการรอดชีวิตและลักษณะของเซลล์ปากใบ *Chrysanthemum morifolium* ในสภาวะปลอดเชื้อ.” วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 1(4): 16-19.
- ดวงสุรีย์ แสนสีระ. 2546. “ศึกษาการผลิตสารโคลชิซินจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคองคิง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 101 น.
- ถกวรรณ ศิริสวัสดิ์ ปริญา จันทรศรี บาจริย์ ฉัตรทอง ชัชวาลย์ ชัยชนะ และสุวิทย์ วงศ์ศิลา. 2561. “การให้แสงจากหลอดไดโอดเปล่งแสงคั่นในเวลากลางคืนเพื่อควบคุมการออกดอกของเบญจมาศ.” วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 49(พิเศษ): 303-306.
- ธนวดี พรหมจันทร์ อาสตัน ฮิล และสมปอง เตชะโต. 2552. “การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน.” วารสารเกษตร 25: 211-218.
- นพพร ค้ายพงษ์พันธุ์. 2546 เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 261 น.
- บุญหงส์ จงคิด. 2548. หลักและเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 186 น.
- ปรางทิพย์ มณีแสง. 2552. “การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของบัวหลวงโดยใช้สารละลายโคลชิซิน.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 100 น.
- มณฑกาฬ ลีมา. (2559). สถิติการส่งออกเบญจมาศ. สืบค้นเมื่อวันที่ 17 ธันวาคม 2561, จาก http://www.agriman.doae.go.th/home/news/year/202017/024.1_dendranthema.pdf.

- มลิวรรณ บุญเสนอ. 2544. **พืชวิทยาสิ่งแวดล้อม**. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม: มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์. 152 น.
- ยุพารักษ์ ศิริโสม และสมปอง เตชะโต. 2551. “ผลของเอชเอ็มเทนซัลโฟเนต (EMS) ต่ออัตราการรอดชีวิตและการสร้างยอดรวมของกลีอกซิเนีย (*Sinningia speciose*) ในหลอดทดลอง.” **วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร** 39(พิเศษ): 223-226.
- รังสฤษฎ์ กาวีตะ. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค**. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 219 น.
- วสันต์ จันทราทิตย์ วีระพงศ์ ลุติตานนท์ พุทธภูมิ ลำเจียกเทศ สมหญิง พรหมโต วงศกร พูนพิริยะ เอกวัฒน์ ผสมทรัพย์ และสยาม คุณเศษ. **เรียนรู้โปรแกรมชีวสารสนเทศด้วยตนเอง**. กรุงเทพฯ: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 244 น.
- วิษุตา รุ่งเรือง. 2537. “ผลของโคลชิซินและรังสีแกมมาที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์ Double Spathe ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ.” **วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**. 105 น.
- วิเชียร ตั้งชนานุวัฒน์. 2546. **ตายด้วยยา ฆ่าด้วยพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: อนิเมทกรุ๊ป. 184 น.
- วิทยา บัวเจริญ. 2527. **หลักการผสมและปรับปรุงพืช**. กรุงเทพฯ: กรุงเทพมหานครพิมพ์. 169 น.
- วิรัตน์ ภูวิวัฒน์. 2539. การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดคลอโรฟิลล์จากใบพืช. **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า** 14(3) หน้า 3-7.
- ศตปพร เกิดสุวรรณ และ สมปอง เตชะโต. 2558. “ผลของโคลชิซินต่อการชักนำโพลีพลอยดีในแวมมูราในหลอดทดลอง.” **วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์** 2(1): 17-23.
- ศิริกัญญา ม่วงสอน และสมปอง เตชะโต. 2551. “การใช้สาร EMS เพื่อชักนำการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้เหลืองจันทร์.” **วารสารเกษตร** 24(2): 153-164.
- สมชัย ภัทรชนานันท์. 2539. **12 สารเคมีอันตรายต่อชีวิตและสิ่งแวดล้อม**. กรุงเทพฯ: พิมพ์ดี. 130 น.
- สมปอง เตชะโต และวิทยา พรหมมี. 2542. “การชักนำการกลายพันธุ์ มังคุด: การตอบสนองของชิ้นส่วนพืชต่อสิ่งก่อกลายพันธุ์.” **วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์** 2(21): 25-31.
- สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2540. **การกลายพันธุ์ของพืช**. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 205 น.

- สุพัตรา สรรธรรม, มาลี ณ นคร และสุรียา ตันติวิวัฒน์. 2551. “ผลของระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับสารละลายโคลชิซินของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องแซะหอมต่อการเกิดต้น โพลีพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ.” ใน การประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 153-160.
- สุเม อรัญนารถ. 2524. “การขยายพันธุ์เบญจมาศโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 53 น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 269 น.
- สุรีพร เกตุงาม. 2546. “เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช.” วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 5(2): 37-58.
- อดิศร กระแสชัย. 2535. เบญจมาศ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 129 น.
- อมรรัตน์ พรหมบุญ. 2552. การจำแนกสายพันธุ์หม่อนพื้นเมืองโดยใช้ RAPD markers. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สืบค้นเมื่อวันที่ 14 พฤศจิกายน 2561, จาก http://www.researchgate.net/publication/31869484_RAPD_markers.
- อรุณี คงศักดิ์ไพศาล มาลีณี ชัยศุกกิจสินธุ์ และสินีนารถ สระต้นดี. 2547. เคมีเกษตร. พิมพ์ครั้งที่ 3 กรุงเทพฯ: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 152 น.
- อรุณี วงศ์ปิยะสกลิตย์. 2530. เอกสารการสอนการใช้รังสีและไอโซโทป. กรุงเทพฯ: ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 92 น.
- อรุณี วงศ์ปิยะสกลิตย์. 2550. การกลายพันธุ์: เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 351 น.
- อุษา เพชรบ้านนา, อนุชิต ชินาจริยวงศ์ และพวงมาลัย สุรนิลพงค์. 2552. “การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อของกล้วยไม้ดินใบหมากโดยใช้สารโคลชิซิน.” ใน การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 8. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยแม่โจ้. หน้า 50
- Allum, J.F., Bringloe, D.H. and Roberts, A.V. 2007. “Chromosome doubling in *Rosa rugosa* Thunb. Hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time.” **Plant Cell** 26: 1977-1984.

- Bai, R., D.G. Covell, X.F. Pei, J.B. Ewell, N.Y. Nguyen, A. Brossi and E. Hamel. 2000. "Mapping the binding site of colchicinoids on β -tubulin." **The Journal of Biological chemistry** 275(51): 40443-40452.
- Broertjes, C. 1966. "Mutation breeding of chrysanthemum." **Euphytica** 15: 156-162.
- Cook, J.W. and L.D. Loudon. 1952. "Colchicine." **The Alkaloid Chemistry and Physiology** 2: 261-329.
- Dere, S., Gunes, T. and Sivaci, R. 1998. "Spectrophotometric determination of chlorophyll-A,B content of some algae species using different solvent." **Turkish Journal of Botany** 22: 13-17.
- Dermen, H. 1940 "Colchicine polyploidy and technique." **The Botanical Review** 6: 599-635.
- Dolezel, J., J. Greihuber and J. Suda. 2007. **Flow Cytometry with Plant Cells**. Darmstadt: Wiley-VCH. Pages 423-438.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. "Isolation of plant DNA from fresh tissue." **Focus**. 12: 13-15.
- Fang, J.Y. 2011. "*In vitro* Mutation Induction of Saintpaulia Using Ethyl methanesulfonate." **Hort Science** 46(7): 981-984.
- Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., and Kanti Das, P. 2011. "Induction and identification of tetraploid using *In vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella." **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 106: 485-493.
- Ghani, M., Kumar, S. and Thakur, M. 2013. "Induction of novel variants through physical and chemical mutagenesis in Barbeton daisy (*Gerbera jamesonii* Hook.) ." **Journal of Horticultural Science & Biotechnology** 88(5): 585-590.
- Gruszka, D. Szarejko, I. and Maluszynski, M. 2012. **Plant Mutation Breeding and Biotechnology**. CABI International Wallingford 159-166.
- Hamidou, F.S., R. Kanniah, Y.K. Rowena and I. Nurul. 2009. "Induced polyploidy in diploid Ornamental ginger (*Hedychium muluense* R.M. Smith) using colchicine and oryzalin." **HortScience** 44(7): 1809-1814.
- He, Miao., Gao, W., Gao. Y., Yang. X., Jiao. H. and Zhou. Y. 2016. " Polyploidy induced by colchicine in *Dendranthema indicum* var. aromaticum, a scented chrysanthemum. " **Journal of Horticultural Science** 81(4): 219-226.

- Hu, J., Gao, X., Liu, J., C. and Li, J. 2008. "Plant regeneration from petiole callus of *Amorphophallus albus* and analysis of somaclonal variation of regenerated plants by RAPD and ISSR marker." **Botanical Studies** 49: 189-197.
- Iaea. 1977. **Manual on mutation breeding**. Technical reports species no. 119. 2nd ed. Joint FAO/IAEA division of Atomic Energy in Food and Agriculture. Vienna, Austria.
- Jaccard, P. 1908. "Nouvelles recherches sur la distribution florale." **Bulletin de la Societe des Sciences Naturelles** 44: 223-270.
- Kapadiya, D.B., Chawla, S.L., Patel, A.L. and Bhatt, D. 2016. "Induction of variability through *in vivo* mutagenesis in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) var. Jaya." **Indian Journal of Horticulture** 73(1): 141-144.
- Kermani, M.J., Sarasan, V., Roberts, A.V., Yokoya, K., Wentworth, J. and Sieber, V.K. 2003. "Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and effect on plant morphology and pollen viability." **Theoretical and Applied Genetics** 107: 1195-1200.
- Khan, S., Al-Qurainy, F. and Anwar, F. 2009. "Sodium azide: a chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants." **Environment and We International Journal of Science and Technology** 4:1-21.
- Kuma, K., Gill, M. I. S., Kaur, H., Choudhary, O.P. and Gosal, S.S. 2010. "*In vitro* mutagenesis and somaclonal variation assisted salt tolerance in 'Rough Lemon' (*Citrus jambhiri* Lush.)" **European Journal of Horticultural Science** 75: 233-238.
- Latado, R.R., Adamas, A.H. and Neto, A.T. 2004. "*In vitro* mutation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) with ethyl methanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels." **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 77: 103-106.
- Luckett, D. 1989. "Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton." **Euphytica** 42: 177-182.
- Miyoshi, K. and N. Asakura. 1996. "Callus induction, regeneration of haploid plant and Chromosome doubling in ovule culture of pot gerbera (*Gerbera jamesonii*)." **Plant Cell** 16: 1-5.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. "A revised medium for rapid grow and bioassay with tobacco tissue culture." **Plant Physiology** 15: 473-497.

- Nilanthi, D., Chen, X.L., Z., F.C., Yang, Y.S. and Wu, H. 2009. "Induction of tetraploid from Petiole Explants through Colchicine Treatments in *Echinacea purpurea* L." **Journal of Biotechnology** 10: 1-7.
- Otto, F.J. 1990. "DAPI staining of fixed cells for high – resolution flow cytometry of nuclear DNA." **Method in cell Biology** 33: 105-110.
- Padmadevi, K. and Jawaharlal, M. 2011. "Induction of in vitro mutation in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) ray florets (var. Ravi Kiran) using gamma rays and EMS." **Floriculture and Ornamental Biotechnology** 5(1): 74-77.
- Rajput, S., Wable, K., Sharma, K., Kubde, P., and Mulay, S. 2006. "Reproducibility testing of RAPD and SSR markers in tomato." **African Journal of Biotechnology** 5(2): 108-112.
- Rodrigues, F.A., Soares, J.R., Santos, R., Pasqual, M. and Silva, S. 2011. "Colchicine and amiprofos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant." **African Journal of Biotechnology** 10(62): 13476-13481.
- Seneviratne, K.A. C. N. and D. S. A. wijessundara. 2007. "First African violet (*saintpaulia ionantha* H. Wendl.) with changing colour pattern induced by mutation." **American Journal of Plant Physiology** 2(3): 223-236.
- Shao, J., Chen, C., and Deng, X. 2003. "*In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*)." **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 75: 241-246.
- Sharma, K.A. and A. Sharma. 1999. **Plant Chromosome**. Netherlands: Hardwood Academic.
- Sun, Q., Sun, H., LI, L. and Bell, R.L. 2009. "*In vitro* colchicine-induce polyploidy plantlet production and regeneration from leaf explants of the diploid pear (*Pyrus communis* L.) cultivar, 'Fertility'." **Journal of Horticultural Science & Biotechnology** 84(5): 548-552.
- Takamura, T. and I. Miyajima. 1996. "Colchicine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their characteristics." **Scientia Horticulturae** 65: 305-312.
- Teixeira de Silva, J.A., Lema-Ruminska, J., Tymoszuk, A. and Kulpa D. 2015. "Regeneration from chrysanthemum flowers: a review." **Acta Physiologiae Plantarum** 37: 1-16.
- The National Chrysanthemum Society. 1954. **Chrysanthemum Classification**. [online].

- Warner, D. A. and Edwards, G. E. 1989. "Effects of polyploidy on photosynthetic rates, photosynthetic enzymes, contents of DNA, chlorophyll and sizes and numbers of photosynthetic cells in C4 dicot *Artiplex confertifolia*." **Plant Physiology** 91: 1143-1151.
- Watson, J.D. 1977. **Molecular Biology of gene**. 3th ed. New York: W.A. Benjamin inc.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.I., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker." **Nucleic Acids Research** 18: 6231-6235.
- Wu, J.H. and Mooney, P. 2002. "Autotetraploid tangor plant regeneration from in vitro Citrus somatic embryogenic callus treated with colchicine." **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 70: 99-104.
- Xu, L., Najeeb, U., Naeem, M.S., Daud, M.K., Cao, J.S., Gong, H.J., Shen, W.Q. and Zhou, W.J. 2010. "Induction of tetraploidy in *Juncus effuses* by colchicine." **Biologia Plantarum** 54: 659-663.
- Yu, J. Z., Fang, D. D., Kohel, R. J., Ulloa, M., Hinze, L. L., Percy, R. G., and Jones, D. C. 2012. "Development of a core set of SSR markers for the characterization of *Gossypium* germplasm." **Euphytica** 187: 203-213.
- Zhang, J., Zhang, M. and Deng, X. 2007. "Obtaining autotetraploids *in vitro* at high frequency in *Citrus sinensis*." **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 89: 211-216.

ภาคผนวก

1.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

1.1.1 การเตรียม stock solution ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเตรียม stock solution ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS โดยเตรียมส่วนของ Macroelements (MS1-MS5) ให้มีความเข้มข้น 10 เท่า ของความเข้มข้นที่ต้องการใช้ และส่วนของ Microelements (MS6-MS8) ให้มีความเข้มข้น 100 เท่า ดังตารางด้านล่าง

MS	สารเคมี	ความเข้มข้น (mg/L)	ความเข้มข้นของ stock solution (g/L)	ปริมาตรของ stock solution
Macroelements			(100 เท่า)	
MS1	NH ₄ NO ₃	1,650.00	16.50	100 มิลลิลิตร
MS2	KNO ₃	1,900.00	19.00	100 มิลลิลิตร
MS3	CaCl ₂ ·2H ₂ O	450.00	4.50	100 มิลลิลิตร
MS4	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.00	3.70	100 มิลลิลิตร
MS5	KH ₂ PO ₄	170.00	1.70	100 มิลลิลิตร
Microelements			(10 เท่า)	
MS6	ZnSO ₄ ·5H ₂ O	86.00	8.60	10 มิลลิลิตร
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.30	2.23	
	H ₃ BO ₃	6.20	0.62	
	KI	0.83	0.083	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.025	
	cuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.0025	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.0025	
Microelements			(10 เท่า)	10 มิลลิลิตร
MS7	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.30	3.73	10 มิลลิลิตร
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85	2.785	
Organic nutrients			(10 เท่า)	10 มิลลิลิตร
MS8	Myo-inositol	100.00	10.00	10 มิลลิลิตร
	Nicotinic acid	0.50	0.05	
	Pyridoxine·HCl	0.50	0.05	
	Thiamine·HCl	0.10	0.01	
	Glycine	2.00	0.20	

1.2 การเตรียมบัฟเฟอร์ CTAB ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (Doyle and Doyle. 1987)

1M Tris buffer pH 8.0	100 มิลลิลิตร
5M NaCl	280 มิลลิลิตร
0.5M EDTA	40 มิลลิลิตร

CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) 20 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เมื่อนำบัฟเฟอร์ไปใช้สกัด DNA ให้เติมสาร polyvinylpyrrolidone มวล โมเลกุล 40,000 (PVP-40) 4 กรัม และสาร β -mercaptoethanol 500 ไมโครลิตร ต่อปริมาตรสารละลายบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้)

1.3 การเตรียมสารละลาย TE (Tris-EDTA) buffer

10mM Tris-HCl pH 8.0	1,000 ไมโครลิตร
1mM EDTA pH 8.0	100 ไมโครลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.4 การเตรียมสารละลาย TAE (Tris acetate EDTA) buffer

1.4.1 การเตรียมสารละลาย 50x TAE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Tris-base	242 กรัม
Acetic acid	57.1 มิลลิลิตร
0.5M EDTA pH 8.0	100 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	700 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันและปรับปริมาตรของสารละลายให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (Acetic acid) เป็นกรดเข้มข้น ควรใส่ถุงมือกันกรด และเตรียมภายในตู้ดูดควัน

1.4.2 การเตรียมสารละลาย 0.5x TAE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ตวงสารละลาย 50x TAE buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.5 การเตรียม Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Ethidium bromide	0.5 กรัม
------------------	----------

น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร
----------	-----------------

ละลาย Ethidium bromide ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน เก็บสารละลายในขวดแก้วทึบแสง (Ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง ควรใส่ถุงมือในการเตรียม)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาววาริ อยู่สำราญ
วัน เดือน ปี เกิด	15 กรกฎาคม พ.ศ.2534
ที่อยู่ปัจจุบัน	31/3 หมู่ 3 ตำบลบางกระบือ อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม 73120
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2556 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 10520
ทุนวิจัยที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)
ผลงานทางวิชาการ	Yoosumran, V., Ruamrungsri, S., Duangkongsan, W. and Saetiew K. Induced Mutation of <i>Dendranthemum grandiflora</i> through Tissue Culture by Ethyl Methanesulphonate (EMS). International Journal of Agricultural Technology 2018 14(1): 73-82.