

การกลายพันธุ์ของเบญจมาศด้วยสาร EMS และ Colchicine

MUTATION OF CHRYSANTHEMUM BY EMS AND COLCHICINE

อนันต์ เลิศสุตติชวาท

ANAN LERTSUTTICHAWAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2019-AG-M-101-300

การกลายพันธุ์ของเบญจมาศด้วยสาร EMS และ Colchicine

MUTATION OF CHRYSANTHEMUM BY EMS AND COLCHICINE

อนันต์ เลิศสุทธิชวาล

ANAN LERTSUTTICHAWAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2562

KMITL-2019-AG-M-101-300

MUTATION OF CHRYSANTHEMUM BY EMS AND COLCHICINE

ANAN LERTSUTTICHAWAN

**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-101-300

COPYRIGHT 2019

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การกลายพันธุ์เบญจมาศด้วยสาร EMS และ Colchicine
นักศึกษา	นายอนันต์ เลิศสุทธิवाल
รหัสประจำตัว	57604033
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.กัญจนา แซ่เตียว

บทคัดย่อ

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ในกระถางด้วยเทคนิคการหยดสารละลาย colchicine ครั้งละ 0.1 มิลลิลิตร วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 6 วัน ลงบนยอดของต้นกล้าเบญจมาศ โดยใช้สารละลายความเข้มข้น 0, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.64 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่า ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine ที่ความเข้มข้น 0.40 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตด้านความสูง ขนาดลำต้น และการเกิดตาข้างดีที่สุด เมื่อตรวจสอบขนาดของปากใบ พบว่า มีต้นเบญจมาศจำนวน 1 ต้น มีขนาดปากใบเท่ากับ 80.40 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าปากใบจากชุดควบคุมที่มีขนาด 46.72 ไมโครเมตร ลักษณะของใบจากต้นดังกล่าว มีขนาดของแผ่นใบเล็ก และประกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย ซอกใบตื้น และมีก้านใบยาวกว่า ลักษณะดอกเป็นประเภท single กลีบดอกสีม่วงเช่นเดียวกับชุดควบคุม

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ในกระถางด้วยวิธีการแช่ต้นกล้าลงในสารละลาย EMS โดยใช้สารละลายความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมงพบว่าต้นกล้าที่ได้รับสารละลาย EMS ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจะแสดงอาการซ้ำบริเวณลำต้นและใบ จากนั้นอาการดังกล่าวจะค่อยๆ ขยายเป็นวงกว้างทั่วทั้งต้น และส่งผลให้ต้นกล้าตายหมดทุกต้นภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ด้วยเทคนิคการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดของต้นกล้า พบว่าในความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง คือ 1.00 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิต 95 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่า มีต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 ต้นที่มีลำต้นยืดยาวผิดปกติ มีความสูง 38.70 เซนติเมตร ในขณะที่ชุดควบคุมมีความสูงเฉลี่ย 19.06 ± 1.68 เซนติเมตร มีการแตกตาข้างเพียง 2 กิ่ง เมื่อตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมด้วย Flow cytometry ไม่พบความแตกต่างระหว่างต้นที่มีลักษณะกลายและชุดควบคุม การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศด้วยวิธีการแช่

ต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ลงในสารละลาย EMS นาน 8 ชั่วโมงในกระถาง มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ดอกที่มีลักษณะแตกต่างกัน 3 ลักษณะ แต่ยังคงเป็นดอกประเภท single และพบต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.08 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 ต้น ที่มีลักษณะใบเป็นแผ่นกลม มีรอยหยักขอบใบน้อยและสั้น โคนใบสอบ ก้านใบยาว แตกต่างจากต้นอื่นๆ จากการตรวจสอบความแตกต่างของ DNA ด้วยเครื่องหมาย RAPD พบว่าไพรเมอร์ OPA-07, OPB-04, OPB-07, OPF-01, OPF-04, OPF-06, OPF-17 และ OPF-18 สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างต้นที่ได้รับสารกับไม่ได้รับสารได้

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อด้วยวิธีการแช่ชิ้นส่วนของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter และ Crystal white ลงในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ นาน 8 ชั่วโมง มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.018 และ 0.013 ตามลำดับ โดยต้นเบญจมาศที่พัฒนามาจากชิ้นส่วนของเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ผ่านการแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านสีดอก จากการตรวจสอบความแตกต่างของ DNA ด้วยเครื่องหมาย RAPD พบว่าไพรเมอร์ OPA-01, OPA-05, OPA-07, OPA-15, OPB-04, OPB-07, OPF-06, OPF-07, OPF-09, OPF-11, OPF-13, OPF-15, OPF-17, OPF-18, OPF-19 และ OPF-20 สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างต้นที่ได้รับสารกับไม่ได้รับสารได้ ส่วนเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์เกิดการขาดคลอโรฟิลล์ และพบลักษณะของดอกที่ต่างกัน 3 ลักษณะ จากการตรวจสอบความแตกต่างของ DNA ด้วยเครื่องหมาย RAPD พบว่าไพรเมอร์ OPA-01, OPA-05, OPA-07, OPB-04, OPB-07, OPF-01, OPF-04, OPF-06, OPF-07 และ OPF-18 สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างต้นที่ได้รับสารกับไม่ได้รับสารได้

Thesis Title	Mutation of Chrysanthemum by EMS and Colchicine
Student	Mr. Anan Lertsuttichawan
Student ID	57604033
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2019
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Kanjana Saetiew

ABSTRACT

Mutation induction of chrysanthemum cv. canter seedling was studied. The shoots of potted plant were dropped in 0.1 ml. colchicine solution with 0, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 and 1.00% on apical bud, three times a day for 6 days, LD₅₀ in colchicine obtained 0.64%. The shoots was dropped with 0.4% colchicine has the best of height, stem width and lateral bud. One of this condition had the stomata size were 80.40 µm. larger than the control at 46.72 µm, The leaves are smaller, brittle, shallow, and longer stalks more than control. The flower were purple petals single type. Mutation induction by immerse the rooting plants of chrysanthemum cv. canter into the EMS solution with 0, 0.02, 0.04, 0.08 and 0.10% for 8 hours. The seedling plants that obtained by 0.02 to 0.10% EMS, showed signs of bruising around the stems and leaves. Symptoms are gradually expanding covered entire area and the rooting plant died within 72 hours.

Mutation induction of chrysanthemum cv. crystal white. The seedling were dropped colchicine solution on apical bud. There was a 95 percent survival rate in the highest concentration at 1.00%. One of the shoots that was dropped with 0.80% colchicine has a height of 28.70 cm in which it is higher than the average with control at 19.06 cm, there were only 2 branches of lateral bud. However, the results showed no difference in DNA content. Mutation induction by immerse the seedling of chrysanthemum cv. crystal white into the EMS solution with 0, 0.02, 0.04, 0.08 and 0.10% for 8 hours, LD₅₀ in EMS obtained 0.10%. In this study, the flowers are 3 different characteristics but still in single type. One of the rooting plants was immerse in 0.08% EMS has a shape of leaves with a circular sheet. DNA differentiation tests by RAPD markers showed the OPA-07, OPB-04, OPB-07, OPF-01, OPF-04, OPF-06, OPF-17 and OPF-18 primers can differentiate between treatment and plant control.

In vitro mutation induction by immerse the node of chrysanthemum cv. canter and cv. crystal white into the EMS solution with 0, 0.02, 0.04, 0.08 and 0.10% for 8 hours, LD₅₀ in EMS obtained 0.018% and 0.013% the respectively. By the chrysanthemum developed form node of cv. canter through the immersion of 0.02% EMS There was change in the color of flower. DNA differentiation tests by RAPD markers showed the OPA-01, OPA-05, OPA-07, OPA-15, OPB-04, OPB-07, OPF-06, OPF-07, OPF-09, OPF-11, OPF-13, OPF-15, OPF-17, OPF-18, OPF-19 and OPF-20 primers can differentiate between treatment and plant control. In cv. crystal white through the immersion of 0.04% EMS there was chlorosis and there were 3 characteristic mutations. DNA differentiation tests by RAPD markers showed the OPA-01, OPA-05, OPA-07, OPB-04, OPB-07, OPF-01, OPF-04, OPF-06, OPF-07 and OPF-18 primers can differentiate between treatment and plant control.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.กัญญา แซ่เตียว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ให้คำแนะนำ และให้แนวทางแก้ไขปัญหา ในเรื่องการทดลองและเรื่องส่วนตัว จนทำให้สามารถแก้ไขปัญหในการทดลอง และสามารถดำเนินการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. สุเม อรัญนารถ ผศ.ดร. กัญญา แซ่เตียว ดร. อรุมา รุ่งน้อย และ ผศ. ดร. มณฑินี ธีรารักษ์ ที่กรุณาให้ความรู้ตลอดจนคำแนะนำตลอดจนคำแนะนำระหว่างการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้เป็นอย่างดี และกรุณาสละเวลามาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ต่างๆ ให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่การทำวิจัย

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรที่ช่วยเหลือในการเตรียมอุปกรณ์ทดลองต่างๆ

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร และห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพืชสวนที่คอยช่วยเหลือในการเตรียมสารเคมีและอุปกรณ์ ตลอดจนคอยให้กำลังใจ และคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกๆเรื่อง ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

อนันต์ เลิศสุทธิชวาล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	X
สารบัญภาพ.....	XIII
รายการคำย่อและสัญลักษณ์.....	XVI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	1
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.5 ขั้นตอนของการศึกษา.....	2
1.6 สถานที่ดำเนินงาน.....	2
1.7 ระยะเวลาการดำเนินงาน.....	2
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเบญจมาศ.....	3
2.2 การขยายพันธุ์.....	5
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเบญจมาศ.....	5
2.4 การกลายพันธุ์.....	6
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	12
3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย.....	12
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	15
3.2.1 การเตรียมต้นกล้าเบญจมาศ.....	15
3.2.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศพันธุ์ Canter ในกระถาง.....	15

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศพันธุ์ Crystal white ใน กระถาง.....	16
3.2.4 การชักนำให้เกิดการกลายด้วยสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อ.....	17
3.2.5 การวัดปริมาณ chlorophyll	18
3.2.6 การตรวจนับโครโมโซมจากปลายราก.....	18
3.2.7 การตรวจสอบโพลีพลอยด์ด้วยเทคนิค Flow cytometry.....	19
3.2.8 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค RAPD....	19
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	21
4.1 ผลของการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ในกระถาง	21
4.1.1 การชักนำให้เบญจมาศสายพันธุ์ Canter เกิดการกลายด้วยสาร colchicine ในกระถาง.....	21
4.1.1.1 อัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ต่อ สารละลาย colchicine.....	21
4.1.1.2 การเจริญเติบโตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter หลัง ได้รับสารละลาย colchicine.....	22
4.1.1.3 การตรวจสอบขนาดปากใบ ของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter หลังได้รับสารละลาย colchicine.....	25
4.1.1.4 การตรวจสอบขนาดโครโมโซม ของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter หลังได้รับสารละลาย colchicine.....	28
4.1.2 ผลของการชักนำให้เกิดการกลายด้วยสาร EMS ในเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ในกระถาง.....	28
4.2 ผลของการชักนำให้เกิดการกลายในเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ใน กระถาง.....	29

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.1 การชักนำให้เกิดการกลายด้วยสาร colchicine ในเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ในกระถาง.....	29
4.2.1.1 อัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ต่อสารละลาย colchicine.....	29
4.2.1.2 การเจริญเติบโตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white หลังได้รับสารละลาย colchicine	30
4.2.1.3 การตรวจสอบขนาดปากใบของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white หลังได้รับสารละลาย colchicine.....	34
4.2.1.4 การตรวจสอบโพลีพลอยด์ด้วยเทคนิค Flow cytometry ของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white หลังได้รับสารละลาย colchicine..	35
4.2.2 ผลของการชักนำให้เกิดการกลายด้วยสาร EMS ในเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ในกระถาง.....	36
4.2.2.1 อัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ต่อสารละลาย EMS.....	37
4.2.2.2 การเจริญเติบโตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white หลังได้รับสารละลาย EMS.....	37
4.2.2.3 ผลการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลูกเลี้ยงที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยเทคนิค RAPD.....	42
4.3 ผลของการชักนำให้เกิดการกลายในเบญจมาศด้วยสาร Ethyl methanesulfonate (EMS) ในสภาพปลอดเชื้อ.....	43
4.3.1 การชักนำให้เบญจมาศสายพันธุ์ Canter เกิดการกลายด้วยสาร Ethyl methanesulfonate (EMS) ในสภาพปลอดเชื้อ.....	43
4.3.1.1 อัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ต่อสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อ.....	43
4.3.1.2 การเจริญเติบโตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter หลังได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อ.....	44

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.1.3 ผลการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยเทคนิค RAPD.....	48
4.3.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ในเบญจมาศพันธุ์ Crystal white ในสภาพปลอดเชื้อ.....	49
4.3.2.1 อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนข้อเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ต่อสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อ.....	49
4.3.2.2 การเจริญเติบโตหลังจากการย้ายปลูกของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อ.....	50
4.3.2.3 ผลการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยเทคนิค RAPD.....	55
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	56
5.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศพันธุ์ Canter ในกระถาง.....	56
5.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศพันธุ์ Crystal white ในกระถาง.....	58
5.3 ผลของการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศด้วยสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อ.....	59
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	60
บรรณานุกรม	63
ภาคผนวก	69
1.1 ภาพถ่ายแถบแบน DNA ของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในกระถาง.....	70
1.2 ส่วนประกอบของการเตรียมปฏิกิริยา PCR.....	71
1.3 การตั้งค่าอุณหภูมิ เวลา และรอบการทำงานของเครื่อง PCR.....	71
ประวัติผู้เขียน	72

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ชนิดและลำดับของไพรเมอร์ RAPD ที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของเบญจมาศสายพันธุ์ Canter และ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน.....	20
4.1	อัตราการเจริญเติบโตด้านความสูงของทรงพุ่มเบญจมาศพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์.....	22
4.2	อัตราการเจริญเติบโตของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นเบญจมาศพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์.....	23
4.3	การเกิดตาข้าง และปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นเบญจมาศพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์.....	24
4.4	ขนาดปากใบของต้นเบญจมาศพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์.....	25
4.5	อัตราการรอดชีวิตของต้นเบญจมาศพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง.....	29
4.6	อัตราการเจริญเติบโตของขนาดลำต้นเบญจมาศพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์.....	30
4.7	อัตราการเจริญเติบโตของขนาดลำต้นเบญจมาศพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์.....	31
4.8	การเกิดตาข้าง ปริมาณคลอโรฟิลล์ของเบญจมาศพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์.....	32
4.9	ขนาดปากใบของต้นเบญจมาศพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์.....	34
4.10	อัตราการเจริญเติบโตของความสูงทรงพุ่มเบญจมาศพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์.....	37
4.11	อัตราการเจริญเติบโตของขนาดลำต้นเบญจมาศพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์.....	38
4.12	จำนวนตาข้าง และ คลอโรฟิลล์ จากใบของเบญจมาศพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสาร EMS ในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์.....	39

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.13	รูปแบบของดอกเบญจมาศที่พบในต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white หลังจากได้รับสาร EMS ในกระถาง.....	41
4.14	ขนาดของแถบ DNA ที่พบว่ามีความแตกต่างของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white หลังจากได้รับสารละลาย EMS ในกระถาง.....	42
4.15	อัตราการเจริญเติบโตด้านความสูงของทรงพุ่มเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากย้ายปลูกได้ 6 สัปดาห์.....	44
4.16	อัตราการเจริญเติบโตด้านขนาดของลำต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากย้ายปลูกได้ 6 สัปดาห์.....	45
4.17	จำนวนตาข้าง และ คลอโรฟิลล์ จากใบของเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ได้รับสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากย้ายปลูกได้ 6 สัปดาห์.....	46
4.18	รูปแบบของดอกเบญจมาศที่พบในต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter หลังจากได้รับสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากย้ายปลูกในกระถาง.....	47
4.19	ขนาดของแถบ DNA ที่พบว่ามีความแตกต่างของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter หลังจากได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อ.....	48
4.20	อัตราการเจริญเติบโตด้านความสูงของทรงพุ่มเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อหลังจากย้ายปลูกได้ 6 สัปดาห์.....	50
4.21	อัตราการเจริญเติบโตด้านขนาดลำต้นของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อหลังจากย้ายปลูกได้ 6 สัปดาห์.....	51
4.22	จำนวนตาข้าง และ คลอโรฟิลล์ จากใบของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อหลังจากย้ายปลูกได้ 6 สัปดาห์.....	52
4.23	รูปแบบของดอกเบญจมาศที่พบในต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter หลังจากได้รับสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อหลังจากย้ายปลูกในกระถาง.....	54
4.24	ขนาดของแถบ DNA ที่พบว่ามีความแตกต่างของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white หลังจากได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อ.....	55

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แสดงลักษณะของดอกเบญจมาศตาม National Chrysanthemum Society, USA....	4
3.1	เบญจมาศทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดลอง.....	12
4.1	อัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD ₅₀) ของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร วันละ 3 ครั้ง นาน 7 วัน หลังจากปลูกเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1 สัปดาห์	21
4.2	แสดงลักษณะต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอด ในกระถางอายุ 6 สัปดาห์.....	24
4.3	ภาพเซลล์ปากใบต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอด ในกระถางอายุ 6 สัปดาห์.....	26
4.4	เปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอด ในกระถางอายุ 6 สัปดาห์.....	26
4.5	เปรียบเทียบขนาดและรูปร่างของใบเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอด ในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์.....	27
4.6	แสดงลักษณะของดอกเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง.....	27
4.7	ต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย colchicine ในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์.....	32
4.8	เปรียบเทียบขนาดและลักษณะของใบต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์.....	33
4.9	แสดงลักษณะและรูปร่างของดอกเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย colchicine ในกระถาง.....	33
4.10	เปรียบเทียบของปากใบต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย colchicine ในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์.....	35
4.11	กราฟแสดงระดับขององค์ประกอบสารพันธุกรรมจากใบของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย colchicine ในกระถาง.....	35
4.12	อัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD ₅₀) ของต้นกล้าเบญจมาศพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 18 ชั่วโมง หลังจากปลูกเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1 สัปดาห์.....	36

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.13	40
4.14	40
4.15	41
4.16	42
4.17	43
4.18	46
4.19	46
4.20	47
4.21	48
4.22	49
4.23	52
4.24	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.25	ลักษณะของดอกเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อหลังย้ายปลูกในกระถาง.....	54
4.26	แสดงผลของแถบ DNA ของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ในสภาพปลอดเชื้อที่ได้รับสารละลาย EMS ที่เพิ่มจำนวนได้ของจากการใช้ไพรเมอร์ OPB-07....	55

รายการคำย่อและสัญลักษณ์

EMS	=	Ethyl methanesulfonate
cm.	=	เซนติเมตร
mm.	=	มิลลิเมตร
μm .	=	ไมโครเมตร
g.	=	กรัม
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
PCR	=	Polymerase chain reaction
RAPD	=	Random Amplified Polymorphic DNA
bp	=	คู่เบส (base pair)

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เบญจมาศ (*Dendranthema grandiflora*) เป็นไม้ดอกที่มีมูลค่าการผลิตคิดอันดับ 1 ใน 4 ของโลก ได้รับความนิยมนปลูกมากชนิดหนึ่ง โดยมีการซื้อขายในตลาดโลกเป็นอันดับที่ 3 รองจากคาร์เนชั่น และกุหลาบ สำหรับประเทศไทยปัจจุบันมีพื้นที่ปลูกทั่วประเทศประมาณ 1,400 ไร่ แหล่งผลิตที่สำคัญได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย นนทบุรี สงขลา ขอนแก่น (ห้องสมุดความรู้การเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 2557) แต่ดอกเบญจมาศที่ผลิตได้มีความหลากหลายของสีสั้นน้อย มีคุณภาพต่ำลง และไม่เพียงพอต่อความต้องการจึงมีการนำเข้าจากต่างประเทศ เช่น มาเลเซีย และเนเธอร์แลนด์ เป็นต้น

ความต้องการของดอกเบญจมาศยังคงมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งสวนทางกับการผลิตในเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณที่ลดลง จากปัญหาการขาดแคลนเบญจมาศดังกล่าวของประเทศไทย จึงมีการพัฒนาหาแนวทางแก้ไขปัญหาดังกล่าว โดยการศึกษาครั้งนี้คือการการกลายพันธุ์ดัดแปลงของเบญจมาศ ด้วยการใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ คือ colchicine และ EMS (ethyl methanesulfonate) เพื่อชักนำให้เกิดเบญจมาศสายพันธุ์ใหม่ ที่มีลักษณะแตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิม โดยคาดว่าผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์เบญจมาศต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 หาความเข้มข้นของสารละลาย colchicine และ EMS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเบญจมาศ

1.2.2 เพื่อสร้างเบญจมาศที่มีลักษณะใหม่ ที่แตกต่างไปจากลักษณะเดิมของสายพันธุ์

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

การศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย colchicine และ EMS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายในเบญจมาศ ตรวจสอบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา และความแตกต่างในระดับสารพันธุกรรม ระหว่างต้นที่ได้รับสารและต้นที่ไม่ได้รับสาร

1.4 ผลคาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบความเข้มข้นของสารละลาย colchicine และ EMS ที่เหมาะสมต่อการใช้กลายพันธุ์เบญจมาศ

1.4.2 ได้ต้นเบญจมาศที่มีลักษณะใหม่ ที่แตกต่างไปจากลักษณะเดิมของสายพันธุ์

1.5 ขั้นตอนของการศึกษา

1.5.1 เพิ่มจำนวนต้นกล้าเบญจมาศ โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อให้ได้ต้นกล้าทดลองที่ปราศจากโรคและมีความสม่ำเสมอ

1.5.2 หาช่วงความเข้มข้น และกรรมวิธีที่เหมาะสมในการใช้สารละลาย colchicine และ EMS ที่มีโอกาสทำให้พืชเกิดการกลาย

1.5.3 ให้สารก่อกลายพันธุ์กับต้นกล้าเบญจมาศ ตามกรรมวิธีที่ได้ศึกษามา

1.5.4 ตรวจสอบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา

1.5.5 ตรวจสอบความแตกต่างทางเซลล์วิทยา

1.5.5.1 ตรวจสอบความแตกต่างทางเซลล์วิทยาของต้นเบญจมาศที่ได้รับสาร colchicine ด้วยการนับจำนวนโครโมโซม และ Flow cytometry

1.5.5.2 ตรวจสอบความแตกต่างทางเซลล์วิทยาของต้นเบญจมาศที่ได้รับสาร EMS ด้วยเทคนิค RAPD

1.6 สถานที่ดำเนินงาน

1.6.1 ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สาขาพืชสวน ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

1.6.2 ห้องปฏิบัติการกลาง โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

1.6.3 แปลงทดลอง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

1.7 ระยะเวลาการดำเนินงาน

เริ่มต้นการทดลอง พฤษภาคม พ.ศ. 2558

สิ้นสุดการทดลอง กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเบญจมาศ

เบญจมาศเป็นไม้ดอกประดับชนิดหนึ่ง มีลักษณะลำต้นเป็นไม้ล้มลุกสูง 0.5-1.2 เมตร ผิวเปลือกต้นและกิ่งเป็นลายทางตามแนวยาวค่อนข้างเกลี้ยงสีเขียวอมเทา ใบเดี่ยวเรียงสลับมีหลายรูปแบบตั้งแต่ค่อนข้างกลมถึงรูปไข่ หรือรูปใบหอกปลายแหลม โคนตัด หรือสอบแหลมคล้ายรูปรีมีขอบเว้าเป็นพู 3 พู รูปกลม หรือรูปไข่ ขอบเว้าเป็นจักหยาบๆ ปลายมน และเป็นติ่งเล็กๆ แผ่นใบหยาบด้านบนสีเขียวอมเทา มีขนสีเขียวประปรายเส้นกลางใบและเส้นแขนงใบสีเขียวเด่นชัดด้านล่าง สีเขียวอมเทา มีขนหนาแน่นกว่าด้านบน ช่อดอกออกที่ปลายกิ่งและตามง่ามใบบนๆ รูปทรงดอกแบบ spray type ดอกเป็น head ประกอบด้วยดอกเล็กๆเป็นจำนวนมากดอกที่อยู่รอบนอก (ray floret) จะมีการเจริญเติบโตที่เร็วกว่ามองเห็นกลีบดอกได้ชัดเจนกว่ามีหลายสีเป็นดอกแบบ imperfect (ห้องสมุดความรู้การเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 2557)

ลักษณะของดอกเบญจมาศ ซึ่งแบ่งโดย “National Chrysanthemum Society, USA” จำแนกออกเป็น 12 กลุ่ม ดังนี้ (ภาพที่ 2.1)

1. Irregular incurve ดอกมีขนาดใหญ่ ความกว้างความสูงของดอกมีขนาดใกล้เคียงกัน กลีบดอกวงนอกกว้าง และโค้งงุ้ม เข้าหาใจกลางดอกอย่างมีระเบียบและสวยงาม กลีบดอกย่อยวงนอกเรียงแบบหลวมๆ และห้อยลงมาด้านล่าง

2. Regular incurve ลักษณะดอกคล้ายแบบ Irregular incurve เพียงแต่กลีบดอกวงนอกมีลักษณะตั้งแต่แคบถึงกว้าง กลีบดอกย่อยวงนอกเรียงเป็นระเบียบและไม่ห้อยลงด้านล่าง

3. Intermediate incurve กลีบดอกของดอกย่อยวงนอก มีขนาดแคบจนถึงกว้างคล้ายกับ Regular แต่ขนาดจะสั้นกว่าและกลีบดอกโค้งเข้าเฉพาะส่วนปลายกลีบเท่านั้น

4. Decorative ดอกมีขนาดตั้งแต่ดอกขนาดใหญ่ถึงดอกขนาดเล็ก กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสั้นกว่าประเภท incurve กลีบดอกวงนอกมักห้อยลงมาด้านปลายกลีบ แต่กลีบดอกวงในโค้งเข้า จึงทำให้รูปทรงของดอกแบน

5. Reflex กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกขนาดตั้งแต่แคบจนถึงกว้าง และยาวคล้ายแบบ incurve แต่แทนที่กลีบดอกจะงุ้มเข้าหาใจกลางดอก กลีบห้อยลงด้านล่าง

6. Pompon กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสั้นกว้าง และโค้งเข้าหาใจกลางดอกทั้งแบบที่เป็นระเบียบและไม่เป็นระเบียบ เมื่อดอกบานจะไม่เห็นดอกย่อยวงใน จึงทำให้ดอกมีลักษณะกลมมนสวยงาม

7. Single กลีบดอกของดอกช่อยวงนอกมีเพียง 1-5 ชั้นเท่านั้นและเรียงตัวทำมุมฉากกับก้านดอก กลีบดอกของดอกช่อยวงในไม่พัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก

8. Anemone มีการจัดเรียงตัวของกลีบดอกช่อยวงนอกและวงในคล้ายกับ Single และรวมตัวกันเป็นกระจุก เห็นเด่นชัด

9. Spoon กลีบดอกของดอกช่อยวงนอกเป็นหลอดและตรง แต่ปลายกลีบจะคลี่แผ่ออกทำให้มองดูคล้ายซ้อน การเรียงตัวเป็นระเบียบ ขนาดใกล้เคียงกัน กลีบดอกช่อยวงในไม่พัฒนารวมตัวกันเป็นกระจุกตรงกลางดอก

10. Spider รอบนอกของกลีบดอกของดอกช่อยวงนอกยาวมาก และเป็นหลอดขนาดเล็กห้อยลงมาด้านล่าง ส่วนรอบในมีขนาดสั้นบ้างยาวบ้าง ปลายกลีบดอกมีวงอแบบคอคกลมหรือเป็นตะขอ

11. Quill กลีบดอกของดอกช่อยวงนอกเป็นหลอดตรงและสั้นกว่าแบบ Spider ปลายกลีบดอกเปิดออกเป็นรูกลวง

12. Brush & Thistle ดอกมีขนาดเล็ก กลีบดอกของดอกช่อยวงนอกเป็นหลอดขนาดเล็ก การจัดเรียงตัวของกลีบดอกตั้งตรง ขนานกับก้านดอก



1. IRREGULAR
INCURVE



2. REFLEX



3. REGULAR
INCULAR



4. DECORATIVE



5. INTERMEDIATE
INCURVE



6. POMPON



7. SINGLE



8. ANEMONE



9. SPOON



10. QUILL



11. SPIDER



12. BRUSH OR
THISTER

ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะของดอกเบญจมาศตาม National Chrysanthemum Society, USA

2.2 การขยายพันธุ์ (อดิศร กระแสชัย. 2539)

เบญจมาศสามารถขยายพันธุ์ได้หลายวิธี เช่น เพาะเมล็ด แยกหน่อ ต่อกิ่ง ปักชำ และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่วิธีที่นิยมใช้กันมากมี 2 วิธี คือ

2.2.1 ปักชำ กิ่งยอด โดยนำ กิ่งแขนงจากต้นแม่พันธุ์ที่สมบูรณ์

2.2.2 การแยกหน่อ วิธีนี้เหมาะกับพันธุ์เบญจมาศที่แตกหน่อได้ดี เมื่อเบญจมาศให้ดอกแล้ว ต้นจะแตกกอและมีหน่อจำนวนมาก แต่ละหน่อจะมีรากติดอยู่ซึ่งสามารถแยกหน่อมาปลูกลงแปลงได้ทันทีแข็งแรงและมีการเจริญเติบโตดีกว่ากิ่งปักชำ

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเบญจมาศ (นิธิยา รัตนาปนนท์ และ ดนัย บุญเกียรติ. 2537)

2.3.1 แสง

เบญจมาศเป็นพืชวันสั้นการออกดอกเบญจมาศขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการรับแสงต่อวัน โดยเบญจมาศจะออกดอกเมื่อมีแสงสั้นลงในหนึ่งวัน กล่าวคือ ต้องควบคุมให้เบญจมาศได้รับแสงน้อยกว่า 12 ชั่วโมงจึงจะมีการพัฒนาตาดอก

2.3.2 อุณหภูมิ

ดอกไม้ที่ปลูกในสถานะที่มีอุณหภูมิสูงเกินไป จะมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตลดลงทำให้ดอกไม้มีคุณภาพต่ำลงและมีอายุการใช้งานสั้นลง เพราะอุณหภูมิสูงจะทำให้ดอกไม้มีอัตราการใช้แสงสูงและมีการใช้อาหารมาก เช่น คาร์โบไฮเดรต ทำให้อาหารเหลืออยู่ใน ช่อดอกน้อย อุณหภูมิที่เหมาะสมในการออกดอกของเบญจมาศคือ 15.6 องศาเซลเซียส หากอุณหภูมิกลายเคลื่อนไปจากอุณหภูมิที่เหมาะสม จะมีผลทำให้การเกิดและการพัฒนาของดอกช้าลง และมีผลกระทบกับขนาดและรูปร่างของดอก

2.3.3 ความชื้น

การลดลงของความชื้นในบรรยากาศอย่างรวดเร็วทำให้ไม้ดอกที่ยังมีอายุน้อยและมีลักษณะอ่อนหรืออวบน้ำ ไม่สามารถดูดน้ำได้พอเพียงพอทดแทนน้ำที่สูญเสียไป โดยผ่านทางใบ เพราะมีผลทำให้ใบแห้งเกรียมซึ่งทำให้ดอกไม้สูญเสียคุณภาพไป นอกจากนี้ ความชื้นยังมีผลกระทบต่อการพัฒนาของโรคที่เกิดจากเชื้อราและแบคทีเรียด้วยการหมุนเวียนและการระบายอากาศที่เพียงพอเป็นสิ่งจำเป็นในการแก้ปัญหาเมื่อสภาพความชื้นมีมากเกินไป ความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมต่อต้นเบญจมาศ คือ 75-80 เปอร์เซ็นต์

2.4 การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ คือการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมภายในเซลล์ การกลายพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับการสูญหายไปของส่วนของยีน หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) ส่วนการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนส่วนของโครโมโซม การสูญหายไปหรือการเพิ่มเข้ามาของส่วนโครโมโซมที่ครอบคลุมมากกว่าหนึ่งยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของโครโมโซม (chromosome mutation) การกลายพันธุ์เป็นสาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งของวิวัฒนาการ โดยที่ในธรรมชาติการกลายพันธุ์เกิดขึ้นได้เองในสิ่งมีชีวิต (spontaneous mutation) เนื่องจากระบบทางสรีรวิทยาและระบบทางพันธุกรรมของพืช (สมโชค รักษาภัก. 2545) ทำให้เกิดพืชพันธุ์ใหม่ขึ้นมาในพืชที่ปลูกและที่มีประโยชน์ในทางการค้า นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธีการต่างๆ เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นได้ ดังนี้ 1.) การเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสี 2.) การเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี 3.) การเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 4.) การเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์โดยวิธีการสอดแทรก DNA (สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2540) วัตถุประสงค์สำคัญของการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ก็เพื่อสร้างลักษณะใหม่ๆ ที่ยังไม่เคยพบในธรรมชาติ ให้เกิดขึ้นในระยะเวลาอันรวดเร็ว (บุญหงส์ จงคิด. 2548) สำหรับลักษณะที่ทำได้ง่ายในพืช เช่น ความสูงของต้น อายุการเก็บเกี่ยว คุณภาพผลผลิตบางอย่าง เช่น องค์ประกอบของแป้งในเมล็ดธัญพืช ความต้านทานโรคทางใบและลำต้น เป็นต้น นอกจากการลงทุนที่ค่อนข้างสูงในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้ว โอกาสที่ได้รับความสำเร็จนั้นค่อนข้างน้อยและเป็นไปอย่างสุ่ม ยิ่งไปกว่านั้นลักษณะที่ไม่ต้องการมักติดมาด้วยในลักษณะแฝงอยู่ในพันธุ์กลาย (mutant) อีกด้วย ปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับความสำเร็จในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ได้แก่ ปริมาณหรือความเข้มข้นที่เหมาะสมของสิ่งก่อกลายพันธุ์ สภาพแวดล้อมบางอย่างที่เหมาะสมในขณะทำการชักนำ เช่น ความชื้นของเมล็ด อุณหภูมิของอากาศ เป็นต้น และที่สำคัญที่สุดคือ ส่วนที่เหมาะสมของพืชที่นำไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น ละอองเกสร เมล็ด เป็นต้น (นพพร สายัมพล. 2543) ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ลักษณะใหม่ๆ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีเช่น การใช้รังสี การใช้สารเคมี ซึ่งการใช้สารเคมีเพื่อให้พืชมีการกลายพันธุ์ โดยการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซมมีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากเดิม พืชที่เกิดขึ้นจากวิธีการนี้นอกจากคาดว่าทำให้มีความสมบูรณ์พันธุ์สูงขึ้น ช่วยให้ติดเมล็ดได้ดีขึ้นในพืชที่ไม่สามารถติดเมล็ดได้ตามธรรมชาติแล้ว มักได้ลักษณะใหม่ๆ ที่น่าสนใจ และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจเพิ่มขึ้น เช่น การเพิ่มขนาดของต้น ดอกและผล การผลิตพันธุ์ฝักและพันธุ์ไม้ผลที่ไม่มีเมล็ดจากลูกผสมที่มีจำนวนชุดโครโมโซม 3 ชุด และยังเป็นเครื่องมือในการสร้างลูกผสม (อดิศร กระแสชัย. 2539)

2.4.1 สารละลายเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methanesulfonate; EMS)

สารเคมี Ethyl methanesulfonate (EMS) มีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OC}_2\text{H}_5$ เป็นของเหลวใสไม่มีสี มีความหนาแน่น (g/m) เท่ากับ 1.203 มีจุดเดือดเท่ากับ 85 – 86 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 10 มิลลิเมตรของปรอท มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 124 ละลายน้ำได้ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารเคมีที่นิยมใช้มากที่สุดในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และใช้ได้ดีกับพืชหลายชนิด สารเคมี EMS มีหมู่เอทิล คือ C_2H_5 ซึ่งจะถูกถ่ายให้กับโมเลกุลของดีเอ็นเอ ในปฏิกิริยาแอลคิเลชัน (alkylation) โดยสาร EMS สามารถเข้าทำปฏิกิริยาแอลคิเลชันกับเบสพิวรีนและไพริมิดีน รวมทั้งหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอด้วย และปฏิกิริยาแอลคิเลชันจะเกิดมากที่สุดตำแหน่ง N-7 ของเบสกวานีน (G) หลังจากทำปฏิกิริยาแล้วกลายเป็น 7 – เอทิลกวานีน (7 - ethyguanine) หรือเรียกว่า แอลคิเลเตดกวานีน (alkylated base guanine) การกลายพันธุ์ที่เกิดจากสารเคมี EMS อาจเกิดจากการเข้าแทนที่คู่เบส (single base substitution) การหลุดหายไปของเบสพิวรีนจากสารดีเอ็นเอ (depurination) และการตัดขาดของเส้นเดี่ยวและเส้นคู่ของดีเอ็นเอ (single strand or double strand break) EMS ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดังวิธีการเหล่านี้ คือ 1. ทำให้เกิดการเข้าแทนที่ของเบสหนึ่งสาย (single base substitution) 2. การหลุดหายไปของเบสพิวรีนจากสาย DNA (depurination) 3. การตัดขาดของเส้นเดี่ยวและเส้นคู่ของ DNA (single strand or double strand break) (สิรินุช ลามศรีจันทร์, 2540)

เนื่องจากการกลายที่เกิดจากสาร EMS จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในสายพันธุกรรม จึงมีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ มาใช้ในการตรวจสอบการกลายลักษณะนี้ และเทคนิคที่นิยมเป็นลำดับต้นๆ คือเทคนิคที่เรียกว่า Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสขนาดสั้น 8-12 เบส ซึ่ง RAPD ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยใช้ร่วมกับหลักการเพิ่มปริมาณ DNA โดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว (Polymerase chain reaction; PCR) (William *et al.* 1990) พืชแต่ละชนิดจะมีการจัดเรียงตัวของลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำสารพันธุกรรมของพืชมาตรวจสอบ โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม หรือ “arbitrary primer” (หมายถึง DNA สายเดี่ยวขนาดสั้นประมาณ 10 เบสที่ไม่เจาะจงกับตำแหน่ง DNA ใดๆ) หาก RAPD ไพรเมอร์นั้นมีเบสคู่สมกับ DNA ของพืชที่นำมาตรวจสอบจะเกิดการจำลองตัวเองของ DNA ต้นแบบขึ้น ไพรเมอร์เหล่านี้จึงสามารถเข้าคู่กับ DNA ของพืชโดยสุ่มได้หลายตำแหน่ง เมื่อการเข้าคู่นั้นเกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสม จะทำให้เกิดการจำลองตัวของ DNA ของพืชนั้นๆ ดังนั้นถ้าสายพันธุ์ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบมีความแตกต่างของสารพันธุกรรมหรือเป็นคนละชนิดกัน ความสามารถในการจำลองตัวของ DNA จะแตกต่างกัน ทำให้ได้จำนวน และชิ้นของ DNA ที่มีขนาดแตกต่างกันด้วย และสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นเครื่องหมาย DNA ในการบ่งบอกชนิดของสายพันธุ์พืชได้ เช่น การใช้สาร EMS ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในไม้ดอกได้

โดย พีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์ และคณะ (2548) ศึกษาการกลายพันธุ์ในชวนชม (*Adenium obesum* Balf.) โดยแช่เมล็ดชวนชมในสาร EMS ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ นาน 1, 2 และ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเพาะและย้ายปลูกเมื่ออายุ 4 สัปดาห์เพื่อตรวจวัดการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ผิดปกติของใบ โดยมีรูปร่างผิดปกติและมีเส้นกลางใบสองเส้น เมื่อนำไปตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค HAT - RAPD (High Annealing Temperature RAPD) โดยการเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ ระหว่างต้นปกติในชุดควบคุมกับต้นที่เกิดลักษณะการกลายพันธุ์ Sahi and Ehsanpour (2014) ศึกษาผลกระทบของสารละลาย EMS และการเกิด somaclonal variations ของต้นพืชมุเนี่ย พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ EMS เวลา 60 นาที ขึ้นส่วนเริ่มต้นยังมีชีวิตอยู่แต่มีการพัฒนาไปเป็นยอดน้อย แต่ความเข้มข้นของสารละลาย 2 เปอร์เซ็นต์ เวลา 30 และ 60 นาที ขึ้นส่วนพืชตาย และจากการวัดน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของพืชพบว่าขึ้นส่วนพืชที่ได้รับสารละลาย 2 เปอร์เซ็นต์ EMS เวลา 15 นาที มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งน้อยที่สุด การวิเคราะห์ด้วย RAPD ใช้ OPA 6 และ FPK101 primer โดยพบว่าพืชที่ได้รับความเข้มข้นของสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ EMS นาน 30 นาที พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ คือ 450, 700 และ 1,000 คู่เบส ส่วนพืชที่ได้รับ 2 เปอร์เซ็นต์ EMS นาน 15 นาที จะแสดงลักษณะแบนดีเอ็นเอที่แตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย

การใช้สาร EMS เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชนั้นสามารถทำได้ในพืชหลายชนิดเช่น Fernandes *et al.* (1997) ทำการทดลอง ใช้สาร EMS ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในต้นทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) โดยการแช่เมล็ดพันธุ์ ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ คือ 0.010 M, 0.015 M และ 0.020 M. เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ความเข้มข้นของสารละลาย EMS ที่เหมาะสมคือ 0.015 M ความแข็งแรงมีมากขึ้น การให้ผลผลิตมีคุณภาพและปริมาณที่สูงขึ้นด้วย พบว่าต้นทานตะวันสามารถต้านทานต่อเชื้อ *Alettrnaria* ได้ Auld *et al.* (1998) ได้ทดลองในฝ้ายพันธุ์พื้นเมือง (*Gossypium hirsutum* L.) HS200 และ HS26 โดยใช้สาร EMS ความเข้มข้น 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าฝ้ายพันธุ์ HS200 ที่ถูกทดสอบด้วยสาร EMS ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของความยาวและความแข็งแรงของเส้นใย โดย 115 ต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงของความยาวและความแข็งแรง ถูกคัดเลือกไว้ทดสอบในแปลง แล้วนำมาวิเคราะห์เส้นใยโดยใช้ High - Volume Instrument (HVI) พบการกลายพันธุ์ 2 ต้นที่มีความยาวเฉลี่ย 0.7 นิ้ว ยาวกว่าต้นพ่อแม่เดิม และคุณภาพของเส้นใยเพิ่มมากขึ้นกว่าเดิมซึ่งมีความยาวของเส้นใยน้อยและความแข็งแรงของเส้นใยต่ำ Tejklova (2002) ได้ทดลองในเมล็ดลิกนิน 2 สายพันธุ์ด้วยสาร EMS ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยเกิดการโค้งงอของลำต้นเกิดขึ้นกับลิกนินทั้ง 2 สายพันธุ์เมื่อวิเคราะห์ผลทางพันธุกรรมแล้วอัลลีลของต้นที่โค้งงอเป็นลักษณะเด่นมากกว่าอัลลีลของ Wild Type ที่มีลำต้นตั้งตรง การแสดงออกของลักษณะลำต้น โค้งงอมากหรือน้อยเกิดจากปัจจัยอื่นๆที่เข้ามากระทบขณะที่พืชกำลังเจริญเติบโต เช่น โรค ความแห้งแล้ง และธาตุอาหารของพืชเป็นต้น

ในส่วนของเบญจมาศนั้น Latado *et al.* (2004) ศึกษาในเบญจมาศ (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) มีก้านดอกเป็นสีชมพูเข้ม โดยนำก้านดอกที่ยังอ่อนในสภาพปลอดเชื้อมาทดลองโดยแช่ในสาร EMS ความเข้มข้น 0.77 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและ 45 นาทีแล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารสูตร MS พบว่าเกิดการกลายพันธุ์ทั้งหมด 5.2 เปอร์เซ็นต์ โดยเปลี่ยนสีก้านดอกจากชมพูเข้มเป็นสีชมพูอมส้มอ่อน ชมพูอ่อนบรอนซ์ ขาว เหลือง และ ส้ม นอกจากนี้ ในพืชเศรษฐกิจที่อยู่ในวงศ์เดียวกับเบญจมาศอย่างทานตะวัน ก็มีการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้การก่อกลายพันธุ์เช่นเดียวกับเบญจมาศอีกด้วย ในปี 2014 Kapadiya *et al.* ได้ทำการทดลองโดยสารก่อกลายพันธุ์ (EMS และ DES (Diethylstilbestrol)) และรังสีแกมมา ในการชักนำให้เกิดความแปรปรวนในเบญจมาศพันธุ์ “Maghi” ซึ่งเป็นพันธุ์การค้าในประเทศอินเดีย ทำการทดลองโดย จุ่มกิ่งชำที่มีขนาด 6-7 เซนติเมตร ที่เกิดรากแล้วลงในสารละลาย EMS ที่มีความเข้มข้น 0.02, 0.03 และ 0.04 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง กิ่งชำที่ได้รับสารละลาย EMS 0.03 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตที่สูงกว่าต้นควบคุม แต่มีทรงพุ่มเตี้ยลง มีลักษณะของใบเปลี่ยนแปลงไปแต่ยังคงให้ดอกสีเหลืองเช่นเดิม

2.4.2 สารละลายโคลชิซิน (colchicine)

colchicine เป็นสารประกอบอโรมาติกในกลุ่มอัลคาลอยด์ พบในพืชบางชนิด เช่น *Colchicum autumnale* L. มีสมบัติในการเพิ่มชุดของโครโมโซม โดยสารเคมีเหล่านี้จะจับกับโมเลกุลทูบูลินของสปีนเดิล ทำให้โมเลกุลไม่ทำหน้าที่ไม่สามารถรวมตัวสร้างไมโครทิวบูล ส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างสปีนเดิลไฟเบอร์ จึงไม่สามารถแยกโครโมโซมไปที่ขั้วเซลล์ได้ ทำให้เพิ่มจำนวนโครโมโซมจากดิพลอยด์เป็นพอลิพลอยด์ การใช้ colchicine เพื่อเพิ่มชุดโครโมโซมในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อหรืออวัยวะนั้น อาจเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และล้างออกหลังจากเพาะเลี้ยงไปช่วงระยะเวลาหนึ่ง มักใช้กับเมล็ดที่กำลังงอกหรือส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ ความเข้มข้นที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ 0.1 - 0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่นิยมใช้และก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ใช้ประโยชน์ได้คือ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ สาร colchicine นี้มีผู้นำมาใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชอย่างกว้างขวาง เนื่องจากไม่เป็นอันตรายต่อต้นพืช แม้จะใช้ในอัตราสูง เพราะเป็นสารที่สกัดจากพืช เคลื่อนย้ายไปตามส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยยังคงรักษารูปเดิมและทำหน้าที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เป็นเวลานาน อีกทั้งไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยีน เนื่องจาก colchicine สลายตัวเมื่อโดนความร้อนขึ้น อย่างไรก็ตามในพืชบางชนิด colchicine ส่งผลให้พืชเป็นหมัน การเจริญเติบโตที่ผิดปกติ และเกิดการขาดของโครโมโซมได้ การนำ colchicine มาใช้กับพืชเพื่อชักนำให้พืชเพิ่มจำนวนโครโมโซม ต้องใช้กับส่วนของพืชที่กำลังเจริญเติบโต ซึ่งมีอัตราการแบ่งเซลล์สูง ดังนั้นจึงมักใช้กับเมล็ดที่กำลังงอก มีตัวแปรที่สำคัญ คือ ความเข้มข้นของ colchicine ระยะเวลาที่แช่ และพันธุ์พืช การเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยการใช้สาร colchicine กับพืชสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การจุ่มของต้นพืชลงในสารละลาย colchicine ผสมกับลาโนลิน หรือแช่เมล็ดใน

สารละลาย เป็นต้น สำหรับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ผันแปรไปตามชนิดพืชและส่วนของพืชที่ใช้ (อดิศร กระแสชัย, 2539)

การชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมด้วยสาร colchicine นั้น ยังใช้ประโยชน์ในด้านการชักนำพืชที่เป็นแฮพลอยด์ให้เป็นดิพลอยด์ เพื่อใช้ประโยชน์ในการหาสายพันธุ์แท้หรือการพัฒนาสายพันธุ์ การตรวจหาลักษณะพืชที่ถูกชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์วิธีที่ดีที่สุด คือการตรวจนับจากจำนวนโครโมโซม ซึ่งมักนิยมเป็นวิธีสุดท้ายกับพืชที่เชื่อว่าเป็นโพลีพลอยด์ทั้งนี้เพราะเป็นวิธีที่ใช้เวลามาก สำหรับเกณฑ์แรกๆ ที่ใช้คือสังเกตลักษณะต่างๆ ได้แก่ รูปร่างและขนาดของส่วนต่างๆ ของพืช เช่นใบ ดอก ผลและเมล็ด ซึ่งอาจแยกพืชได้เป็น 2 กลุ่ม คือ พวกที่ตอบสนองต่อสารละลาย colchicine กับพวกที่ไม่ตอบสนองต่อสารละลาย colchicine หรือวัดขนาดปากใบตลอดจนขนาดของละอองเกสร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าต้นปกติ (สมโชค รักษาธิ, 2545)

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคที่สามารถตรวจสอบขนาดของนิวเคลียสได้อย่างแม่นยำ เรียกเทคนิคนี้ว่า Flow Cytometry (โฟลไซโทเมทรี) เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้วิเคราะห์ขนาดของนิวเคลียส หรือปริมาณดีเอ็นเอที่เป็นองค์ประกอบในนิวเคลียส ด้วยการฉายแสงเลเซอร์ผ่านเซลล์ แล้ววัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้นตามหลักฟิสิกส์ แปรผลออกมาในรูปปริมาณดีเอ็นเอ ที่ปรากฏในเซลล์หรือกลุ่มเซลล์นั้น ๆ ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในการประเมินปริมาณดีเอ็นเอ เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็วและแม่นยำ เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาภายใต้กล้องซึ่งต้องใช้เวลาและมีความยากในการนับ โดยเฉพาะพืชที่มีโครโมโซมจำนวนมาก เครื่องโฟลไซโทมิเตอร์เปรียบเสมือนกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของอนุภาค หรือเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในของเหลว โดยใช้แสงยูวีหรือแสงเลเซอร์ ในการตรวจจับ ใช้กระจกเป็นตัวกรองแสง แล้วเปลี่ยนสัญญาณแสงเป็นตัวเลข ซึ่งก็คือเซลล์ที่นับได้ ในรูปของฮิสโทแกรมผ่านเครื่องคอมพิวเตอร์ ดังนั้น เครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ ประกอบด้วย 3 ส่วนที่สำคัญ คือ ของเหลว เลนส์หรือแสง และอิเล็กทรอนิกส์ (Ochatt, 2006) ปัจจุบันเทคนิคนี้เป็นที่นิยมมากขึ้น โดยถูกนำมาประยุกต์ใช้ กับพืชมากขึ้นจากที่เริ่มต้นนิยมใช้ในทางการแพทย์ ในพืชนั้นส่วนใหญ่พบว่ามักจะใช้ในการตรวจสอบพืชที่มีการเพิ่มชุดโครโมโซม ดังเช่น การศึกษาของ Thiem and Sliwinska (2003) ที่ใช้เทคนิคโฟลไซโทเมทรี ในการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของ cloudberry ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง โดยใช้ชิ้นส่วนยอดที่แตกต่างกัน และ แคลลัส พบว่า ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน ($2C = 8x = 56$) แต่แคลลัสที่ชักนำจากคัพพะ พบว่ามีลักษณะเป็นมิกโซพลอยด์ ($2C$, $4C$ และ $8C$) และพบว่าขนาดจีโนมของ Cloudberry คือ $2C = 2.46 \pm 0.05$ พิโคกรัม Rodrigues *et al.* (2011) ใช้โคซิซินและ amiprofos-methyl (APM) ในการเพิ่มชุดโครโมโซมในกล้วย แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี พบว่าสามารถชักนำกล้วยได้เป็นมิกโซพลอยด์ ($2C$, $4C$ และ $8C$) และเตตระพลอยด์ ($4C$) Dutt *et al.* (2010) ทำการศึกษาโดยใช้ colchicine ในการเพิ่มชุดโครโมโซมในส้มโชกุน แล้วใช้เทคนิคโฟลไซโทเมทรีในการตรวจสอบ พบว่าส้มโชกุนที่

ชักนำด้วยสาร colchicine เป็นเตตระพลอยด์ (4C)

การใช้สาร colchicine กับไม้ดอกนั้น ชบา อ่ำราไฟ และ กันยารัตน์ ไชยสุ (2527) ทำการชักนำให้เกิดโพลิพลอยด์ให้แพงพวยฝรั่งสีขาวยและสีชมพู (*Catharanthus roseus* G. Don) โดยหยดสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.2, 0.6 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ หยดบนยอดต้นกล้าครั้งละ 1 หยด วันละ 3 ครั้ง ได้แก่ 9.00 น., 13.00 น. และ 17.00 น. เป็นเวลา 2, 4 และ 6 วันตามลำดับ พบว่าทุกความเข้มข้นของสารละลาย colchicine และระยะเวลาในการหยดสาร สามารถชักนำให้เกิดโพลิพลอยด์ในแพงพวยฝรั่งทั้งสองสีได้ โดย colchicine ที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 วัน สามารถชักนำต้นแพงพวยฝรั่งสีขาวยให้เป็นโพลิพลอยด์ได้สูงสุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน colchicine ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน และ 6 วัน สามารถชักนำต้นแพงพวยฝรั่งสีชมพูให้เป็นโพลิพลอยด์ได้สูงที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน ในปี 1996 Miyoshi *et al.* ได้ทดลองในเขือบีรา *Gerbera jamesonii* โดยเลี้ยงต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เป็นแฮพลอยด์ ซึ่งมีใบ 4-6 ใบ และมีระบบรากที่แข็งแรงแล้วในอาหารที่มีส่วนผสมของสาร colchicine ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 2-6 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นที่เป็นเตตระพลอยด์ได้ถึง 24.2 - 34.1 เปอร์เซ็นต์ Ye *et al.* (2009) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเซลล์วิทยาของต้นยี่เข่ง (*Lagerstroemia indica* L.) สามสายพันธุ์ ได้แก่ Zi Wei, Hong Wei และ Yin wei ที่ผ่านการแช่สาร colchicine ความเข้มข้น 0.2, 0.5, และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาการแช่สารนาน 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า colchicine ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาการแช่สารนาน 72 ชั่วโมง ทำให้ยี่เข่งสายพันธุ์ Zi Wei เกิดการกลายพันธุ์ดีที่สุด colchicine ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาการแช่สารนาน 96 ชั่วโมง colchicine ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาการแช่สารนาน 48 ชั่วโมง และ colchicine ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาการแช่สารนาน 72 ชั่วโมง ทำให้ยี่เข่งสายพันธุ์ Yin Wei เกิดการกลายพันธุ์ดีที่สุด ส่วนยี่เข่งสายพันธุ์ Hong Wei มีการกลายพันธุ์น้อยที่สุด โดยต้นยี่เข่งที่เกิดการกลายพันธุ์มีจำนวนโครโมโซม $2n = 4x = 96$ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุมที่มีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 48$ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าเมื่อระยะเวลาการแช่สารนานขึ้นจะส่งผลทำให้มีอัตราการตายที่สูงขึ้น และการกลายพันธุ์ส่งผลทำให้พืชมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น Gao *et al.* (2016) ได้ทำการใช้สารละลาย colchicine ชักนำให้ต้นเบญจมาศให้เกิด tetraploid ได้ โดยการเขย่าขึ้นส่วนข้อของต้นเบญจมาศในสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 36 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS ที่ปราศจากฮอร์โมน หลังจากการปลูกทดสอบพบว่าต้นเบญจมาศที่เป็น tetraploid มีขนาดทรงพุ่มใหญ่กว่า มีลักษณะของใบใหญ่กว่า และมีลักษณะของกลีบดอกเปลี่ยนแปลงไป

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย

3.1.1 พืชทดลอง

3.1.1.1 เบญจมาศพันธุ์ Canter (สีม่วง) กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีม่วง บานเรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเหลืองอมเขียวไม่มีการพัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุก (ภาพที่ 3.1A)

3.1.1.2 เบญจมาศพันธุ์ Crystal white (สีขาว) กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกมีสีขาว บานเรียงซ้อนกัน 3-5 ชั้น กลีบดอกของดอกย่อยวงในมีสีเหลืองไม่บาน แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก (ภาพที่ 3.1B)



ภาพที่ 3.1 เบญจมาศทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดลอง; (A) Canter, (B) Crystal white

3.1.2 อุปกรณ์และวัสดุปลูก

3.1.2.1 ถาดหลุมขนาด 35 หลุม

3.1.2.2 กระถางพลาสติกสีดำขนาด 6 นิ้ว

3.1.2.3 วัสดุเพาะชำ (แกลบดำ)

3.1.2.4 วัสดุปลูก (ดิน : มะพร้าวสับ อัตราส่วน 1:1)

3.1.2.5 ปุ๋ยเคมี

1. สูตร 15-15-15

2. สูตร 8-24-24

3.1.3 สารเคมี

3.1.3.1 สารก่อกลายพันธุ์

- 1.colchicine
2. EMS

3.1.3.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS (Murashike and Skoog. 1962)

3.1.3.3 สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อกลีบดอกเบญจมาศ

1. สารละลายเอทานอล 70 % โดยปริมาตร
2. สารละลายคลอโรกซ์ (Clorox) 50 % โดยปริมาตร มีโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) 2.63 % โดยมวลต่อปริมาตร
3. สาร Tween-20 (Polyoxyethylee (20) sorbitan monolaurate)
4. น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3.1.3.4 สารเคมีสำหรับศึกษาพลอยดีโดยใช้เครื่อง Flow cytometer

- สารละลาย CyStain UV Ploidy

3.1.3.5 สารเคมีสำหรับการสกัด DNA

1. CTAB (Doyle and Doyle. 1987)
2. chloroform (Merck, Germany)
3. ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA, Univar, Australia)
4. isoamyl alcohol (Merck, Germany)
5. isopropanal (Merck, Germany)
6. sodium dodecyl sulfate (SDS) (Bio Basic Ins.,USA)
7. sodium chloride (Ajex Finechem, Australia)

3.1.3.6 สารเคมีสำหรับทำ PCR

1. dNTP (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) (Biotechrabbit, Germany)
2. *Taq* DNA polymerase (Apsalagen, Germany)
3. 10X *Taq* buffer (Apsalagen, Germany)
4. Mgcl₂ (Apsalagen, Germany)
5. 28 Primer

3.1.3.7 สารเคมีสำหรับทำ gel electrophoresis

1. agarose gel (invitrogen, USA)
2. ethidium bromide (Vivantis, Malaysia)

3.1.4 DNA มาตรฐาน

- 1Kb DNA ladder (Gene Direx, USA)

3.1.5 อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ

- 3.1.5.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- 3.1.5.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 3.1.5.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
- 3.1.5.4 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)
- 3.1.5.5 ไมโครปิเปต
- 3.1.5.6 กล้องจุลทรรศน์
- 3.1.5.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (Eppendorf, Model 5418, USA)
- 3.1.5.8 เครื่อง PCR (Biometra, T1 thermocycler, Germany)
- 3.1.5.9 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Eppendorf, model 6132, Germany)
- 3.1.5.10 เครื่องวัดกรด-ด่าง (Schott, CG 842, Germany)
- 3.1.5.11 ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส (Sanden Intercool, SNS0303D11A, Thailand)
- 3.1.5.12 อุปกรณ์เครื่องแก้ว
- 3.1.5.13 อุปกรณ์สำหรับการจัดบันทึกและการวัด

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การเตรียมต้นกล้าเบญจมาศ

เตรียมต้นกล้าเบญจมาศโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อให้ได้กล้าเบญจมาศที่มีความสม่ำเสมอ ปราศจากโรค และได้จำนวนต้นกล้าเบญจมาศที่เพียงพอต่อการทดลองในเวลาอันสั้น โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อ หรือตาข้างของเบญจมาศพันธุ์ Canter และ Chrystal white ขึ้นแรกเตรียมอาหารพื้นฐานที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อใช้วิธีเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS (Murashige and Skoog, 1962) จากนั้นเตรียมขึ้นตัวอย่างพืช โดยนำส่วนข้อหรือตาข้างของเบญจมาศมาทำความสะอาดด้วยการล้างผ่านน้ำไหล 20 นาที และฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 1 นาที คลอรีน 30 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำชิ้นส่วนข้อของเบญจมาศที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาเพาะเลี้ยงให้เกิดต้นโดยการตัดเอาชิ้นส่วนตาที่อยู่บนข้อ มาเพาะบนอาหารแข็ง MS ที่ปราศจากฮอร์โมนภายในระยะเวลา 30 วัน ชิ้นส่วนตาจะพัฒนาไปเป็นต้นกล้าเบญจมาศ จากนั้นนำต้นกล้าที่ได้ มาเพิ่มจำนวนด้วยการตัดแบ่งต้นกล้าตามจำนวนข้อ เป็น 1 ข้อ ต่อหนึ่งชิ้นส่วน แล้วนำไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่ปราศจากฮอร์โมนอีกครั้ง เลี้ยงข้อต่อไปอีก 30 วัน จึงทำการย้ายปลูกโดยการนำต้นกล้าเบญจมาศไปทำความสะอาด ล้างวุ้นอาหารออกให้หมด แขนในน้ำยากันเชื้อรา 5 นาที ปลูกลงในถาดหลุมขนาด 35 หลุม โดยใช้แกรบดำเป็นวัสดุเพาะชำ รดน้ำให้ชุ่ม คลุมถาดเพาะด้วยถุงพลาสติกเพื่อรักษาความชื้นของต้นกล้าเบญจมาศ ตั้งไว้ในที่ร่ม ค่อยๆ เปิดถุงพลาสติกออกทุกๆวัน จนครบ 1 สัปดาห์จึงสามารถนำต้นเบญจมาศไปใช้ทดลองในขั้นต่อไป

3.2.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศพันธุ์ Canter (ดอกประเภท single สีม่วง) ในกระถาง

3.2.2.1 การชักนำให้เบญจมาศพันธุ์ Canter เกิดการกลายด้วยสาร colchicine ในกระถาง

ทำการทดลองโดยหุ้มปลายยอดของต้นกล้าเบญจมาศด้วยสำลี หยอดสายละลาย colchicine ที่ความเข้มข้น 0, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ลงบนยอดของต้นกล้าครั้งละ 0.1 มิลลิลิตร วันละ 3 ครั้ง ได้แก่ เวลา 9.00 น., 13.00 น. และ 17.00 น. เป็นเวลา 6 วัน เนื่องจากเบญจมาศในระยะนี้จะมีการเจริญเติบโตค่อนข้างเร็วทำให้ใบอ่อนที่หุ้มยอดเบญจมาศอยู่ด้านสำลีออก จึงต้องจัดสำลีที่หุ้มปลายยอดดอกเบญจมาศทุกวันเพื่อให้สาร colchicine สัมผัสกับปลายยอดอยู่เสมอ ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) โดยมี treatment เป็นระดับความเข้มข้นของสาร colchicine เข้มข้น 0, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยใช้ต้นกล้าเบญจมาศซ้ำละ 5 ต้น หลังจากต้นกล้าเบญจมาศ

ได้รับสาร colchicine ตามกรรมวิธีข้างต้นแล้วจะถูกย้ายปลูกลงในกระถางปลูกพลาสติกขนาด 6 นิ้ว ปลูกลึกลงต่อไปจนถึงระยะเก็บเกี่ยว รวมระยะเวลาปลูกทั้งสิ้นประมาณ 60 วันต่อหนึ่งรอบการปลูก ทำการบันทึกข้อมูล จำนวนต้นที่ตาย การเจริญเติบโต ความสูง ขนาดลำต้น จำนวนกิ่งที่แตกใหม่ ลักษณะรูปทรงของใบ ลักษณะรูปทรงของดอก ตรวจวัดขนาดของปากใบ วัดปริมาณ chlorophyll ตรวจสอบโพลิพลอยด์ โดยการใช้เครื่อง Flow cytometer

3.2.2.2 การชักนำให้เบญจมาศพันธุ์ Canter เกิดการกลายด้วยสาร EMS ในกระถาง

ทำการทดลองโดยนำต้นกล้าที่มีขนาดความสูงประมาณ 4-5 เซนติเมตร มาล้างวัสดุเพาะ ฆ่าออกให้สะอาด จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ โดยแช่ต้นกล้าทั้งต้นในอัตราส่วน 20 ต้นต่อสารละลาย EMS 100 มิลลิลิตรในภาชนะที่มีฝาปิดนาน 8 ชม. ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) โดยมี treatment เป็นระดับความเข้มข้นของสารละลาย EMS เข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยใช้ต้นกล้าเบญจมาศซ้ำละ 5 ต้น หลังจากต้นกล้าเบญจมาศได้รับสารละลาย EMS ตามกรรมวิธีข้างต้นแล้วจะถูกล้างด้วยน้ำสะอาด ก่อนย้ายปลูกลงในกระถางพลาสติกขนาด 12 นิ้วปลูกลึกลงไปจนถึงระยะเก็บเกี่ยว รวมระยะเวลาปลูกทั้งสิ้นประมาณ 60 วันต่อหนึ่งรอบการปลูก ทำการบันทึกข้อมูล จำนวนต้นที่ตาย การเจริญเติบโต ความสูง ขนาดลำต้น จำนวนกิ่งที่แตกใหม่ ลักษณะรูปทรงของใบ ลักษณะรูปทรงของดอก ตรวจวัดขนาดของปากใบ วัดปริมาณ chlorophyll ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค RAPD

3.2.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศพันธุ์ Crystal white (ดอกประเภท single สีขาว) ในกระถาง

3.2.3.1 การชักนำให้เบญจมาศพันธุ์ Crystal white เกิดการกลายด้วยสาร colchicine ในกระถาง

ทำการทดลองโดยหุ้มปลายยอดของต้นกล้าเบญจมาศด้วยสำลี หยอดสายละลาย colchicine ที่ความเข้มข้น 0, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ลงบนยอดของต้นกล้าครั้งละ 0.1 มิลลิลิตร วันละ 3 ครั้ง ได้แก่ เวลา 9.00 น., 13.00 น. และ 17.00 น. เป็นเวลา 6 วัน เนื่องจากเบญจมาศในระยะนี้จะมีการเจริญเติบโตค่อนข้างเร็วทำให้ใบอ่อนที่หุ้มยอดเบญจมาศอยู่ต้นสำลีออก จึงต้องจัดสำลีที่หุ้มปลายยอดดอกเบญจมาศทุกวันเพื่อให้สาร colchicine สัมผัสกับปลายยอดอยู่เสมอ ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design)

โดยมี treatment เป็นระดับความเข้มข้นของสาร colchicine เข้มข้น 0, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยใช้ต้นกล้าเบญจมาศชำละ 5 ต้น หลังจากต้นกล้าเบญจมาศได้รับสาร colchicine ตามกรรมวิธีข้างต้นแล้วจะถูกย้ายปลูกลงในกระถางพลาสติกขนาด 6 นิ้ว ปลูกลีงต่อไปจนถึงระยะเก็บเกี่ยว รวมระยะเวลาปลูกทั้งสิ้นประมาณ 60 วันต่อหนึ่งรอบการปลูก ทำการบันทึกข้อมูล จำนวนต้นที่ตาย การเจริญเติบโต ความสูง ขนาดลำต้น จำนวนกิ่งที่แตกใหม่ ลักษณะรูปทรงของใบ ลักษณะรูปทรงของดอก ตรวจวัดขนาดของปากใบ วัดปริมาณ chlorophyll ตรวจสอบโพลิพลอยด์ โดยการใช้เครื่อง Flow cytometer

3.2.3.2 การชักนำให้เบญจมาศพันธุ์ Crystal white เกิดการกลาย ด้วยสาร EMS ในกระถาง

ทำการทดลองโดยนำต้นกล้าที่มีขนาดความสูงประมาณ 4-5 เซนติเมตร มาล้างวัสดุเพาะชำออกให้สะอาด จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ โดยแช่ต้นกล้าทั้งต้นในอัตราส่วน 20 ต้นต่อสารละลาย EMS 100 มิลลิลิตรในภาชนะที่มีฝาปิดนาน 8 ชม. ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) โดยมี treatment เป็นระดับความเข้มข้นของสารละลาย EMS เข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10% ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยใช้ต้นกล้าเบญจมาศชำละ 5 ต้น หลังจากต้นกล้าเบญจมาศได้รับสารละลาย EMS ตามกรรมวิธีข้างต้นแล้วจะถูกล้างด้วยน้ำสะอาดก่อนย้ายปลูกลงในกระถางพลาสติกขนาด 12 นิ้วปลูกลีงต่อไปจนถึงระยะเก็บเกี่ยว รวมระยะเวลาปลูกทั้งสิ้นประมาณ 60 วันต่อหนึ่งรอบการปลูก ทำการบันทึกข้อมูล จำนวนต้นที่ตาย การเจริญเติบโต ความสูง ขนาดลำต้น จำนวนกิ่งที่แตกใหม่ ลักษณะรูปทรงของใบ ลักษณะรูปทรงของดอก ตรวจวัดขนาดของปากใบ วัดปริมาณ chlorophyll ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค RAPD

3.2.4 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อ

3.2.4.1 การชักนำให้เบญจมาศสายพันธุ์ Canter (ดอกประเภท single สีม่วง) เกิดการกลายด้วยสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อ

3.2.4.2 การชักนำให้เบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white (ดอกประเภท single สีขาว) เกิดการกลายด้วยสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อ

ทำการทดลองโดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นกล้าเบญจมาศพันธุ์ Canter และ Crystal white ในสภาพปลอดเชื้อที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ธรรมดา แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) โดยมี treatment เป็นระดับความเข้มข้นของสารละลาย EMS เข้มข้น 0, 0.02,

0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10% ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ชิ้นส่วนของต้นกล้าเบญจมาศชำละ 10 ชิ้น โดยแช่ชิ้นส่วนของต้นกล้าเบญจมาศในอัตราส่วน 30 ชิ้นต่อสารละลาย EMS 20 มิลลิลิตร ในภาชนะที่มีฝาปิดนาน 8 ชม. หลังจากนั้นล้างชิ้นส่วนของต้นกล้าเบญจมาศด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ โดยแช่ชิ้นส่วนในน้ำกลั่น 3 รอบ รอบละ 1 นาทีเพื่อล้างสารละลาย EMS ส่วนเกินออกให้หมดแล้วจึงนำไปเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ธรรมดา ทำการบันทึกข้อมูล จำนวนต้นที่ตาย หลังจากปลูกทดสอบแล้วจึงเก็บข้อมูลการเจริญเติบโต ความสูง ขนาดลำต้น จำนวนกิ่งที่แตกใหม่ ลักษณะรูปทรงของใบ ลักษณะรูปทรงของดอก ตรวจวัดขนาดของปากใบ วัดปริมาณ chlorophyll ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค RAPD

3.2.5 การวัดปริมาณ chlorophyll

เก็บตัวอย่างใบของเบญจมาศพันธุ์ Canter และพันธุ์ Crystal white ที่มีอายุใกล้เคียงกัน ตัดชิ้นส่วนของใบโดยสุ่มให้ทั่วถึงแผ่นใบ ชั่งน้ำหนักชิ้นส่วน 1 กรัม สกัดด้วย methanol เข้มข้น 90 % ปริมาณ 10 มิลลิลิตร บดด้วยโกร่งให้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง นำของเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 10 นาที คูส่วนชั้นของเหลวไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 666 และ 653 นาโนเมตร (Molnar *et al.* 2013)

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

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

3.2.6 การตรวจนับโครโมโซมจากปลายราก

เก็บปลายรากในช่วงเช้าเวลา 6:00-7:00 น. โดยเลือกปลายรากที่มีลักษณะปลายแหลมรูปตัว V รากอวบน้ำสีขาวขุ่น จากนั้นตัดปลายรากขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำไปแช่ในสารละลาย Fixative solution (1 N citric acid : 95 % ethanol, 1:3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ที่มีดเป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง จากนั้นนำปลายรากไปแช่ในน้ำกลั่นประมาณ 5-10 นาที เพื่อล้าง สารละลาย Fixative solution ออก แล้วจึงนำชิ้นส่วนปลายรากมาย่อยบนแผ่นกระจกสไลด์ด้วยการหยด 4 N HCL ลงบนชิ้นส่วนปลายรากทิ้งไว้ 3 นาที ซับกรด HCL ออกและล้างด้วยการหยดน้ำกลั่นทิ้งไว้ 3 นาที ซับน้ำกลั่นออก จากนั้นใช้ใบมีดโกนสับชิ้นส่วนปลายรากให้ละเอียด จากนั้นย้อมสีโครโมโซมด้วยการหยดสีย้อม Gymza ปิดโคลฟเวอร์สไลด์ทิ้งไว้ 3 นาที แล้วจึงเคาะโคลฟเวอร์สไลด์เบาๆด้วยยางลบ เพื่อให้เซลล์ปลายรากกระจายตัวออกไปและไม่ซ้อนทับกัน ซับสีย้อมส่วนเกินที่ซึมออกมา จากนั้นนำไปตรวจนับโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ตรวจหาเซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์ในระยะเมตาเฟสเพื่อนับจำนวนโครโมโซม

3.2.7 การตรวจสอบโพลีพลอยด์ด้วยเทคนิค Flow cytometry

ตรวจสอบโพลีพลอยด์โดยใช้เครื่อง Flow cytometer กับต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicines ทำการสกัดสารพันธุกรรมจากใบของต้นเบญจมาศ โดยการบดใบเบญจมาศประมาณ 50 มิลลิกรัม ด้วยใบมีดให้ละเอียดในสารละลาย CyStain UV Ploidy ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย CyStain UV Ploidy ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นกรองใส่หลอด และนำไปวิเคราะห์ระดับพลอยดีด้วยเครื่อง Flow cytometer ซึ่งเครื่องจะวิเคราะห์ขณะที่เซลล์เคลื่อนที่ผ่านลำแสงเลเซอร์เป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยการตรวจจับนิวเคลียส และสามารถนับได้เป็นพันเซลล์ และวิเคราะห์ปริมาณ DNA จากนิวเคลียส

3.2.8 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RAPD

การตรวจสอบการแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย RAPD ใช้ไพเมอร์จำนวน 28 ไพเมอร์ (ตารางที่ 3.1) ที่มีรายงานการใช้ตรวจสอบในเบญจมาศ Padmadevi *et al.* (2011) มาเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) จากปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อปริมาณ 6.4 ไมโครลิตร DNA ต้นแบบ 50 นาโนกรัม ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ไพเมอร์เข้มข้น 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 denaturation ความเข้มข้น 5 ยูนิต ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร (ตารางภาคผนวกที่ 2) ตั้งอุณหภูมิเครื่องพีซีอาร์ดังนี้ Pre-denaturation ใช้ อุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที Denaturation ใช้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที Annealing ใช้ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที Extention ใช้ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ขึ้นตอน Denaturation, Annealing และ Extention me:he 35 รอบ Final-extention ใช้ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที (ตารางภาคผนวกที่ 3) นำ PCR product ที่ได้ จากปฏิกิริยามาตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel เตรียมใน 0.5x TAE buffer ในกระแสไฟฟ้าโดยใช้ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 45 นาที และย้อมด้วย ethidium bromide นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตแล้วถ่ายภาพด้วยเครื่อง Gel documentation เปรียบเทียบความแตกต่างของแถบ DNA ระหว่างต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS กับต้นที่ได้รับสารละลาย EMS

ตารางที่ 3.1 ชนิดและลำดับของไพรเมอร์ RAPD ที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนของเบญจมาศสายพันธุ์ Canter และ Crystalwhite ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

Primer	Sequence 5'-3'
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-05	AGGGGTCTTG
OPA-07	GAAACGGGTG
OPA-08	GTGACGTAGG
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-15	TTCCGAACCC
OPB-04	GGACTGGAGT
OPB-07	GGTGACGCAG
OPF-01	ACGGATCCTG
OPF-02	GAGGATCCCT
OPF-03	CCTGATCACC
OPF-04	GGTGATCAGG
OPF-05	CCGAATTCCC
OPF-06	GGAATTCGG
OPF-07	CCGATATCCC
OPF-08	GGGATATCGG
OPF-09	CCAAGCTTCC
OPF-10	GGAAGCTTGG
OPF-11	TTGGTACCCC
OPF-12	ACGGTACCAG
OPF-13	GGATGCAGAA
OPF-14	TGCTGCAGGT
OPF-15	CCAGTACTCC
OPF-16	GGAGTACTGG
OPF-17	AACCCGGGAA
OPF-18	TTCCCGGGTT
OPF-19	CCTCTAGACC
OPF-20	GGTCTAGAGG

บทที่ 4

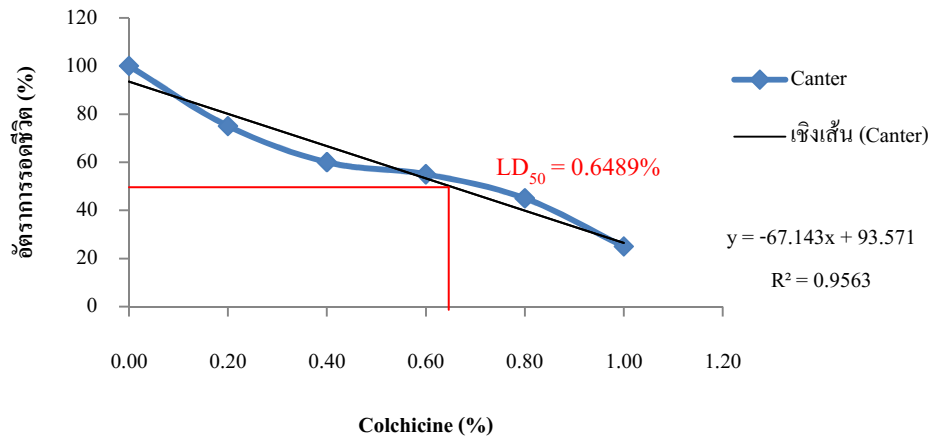
ผลการทดลอง

4.1 ผลของการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศสายพันธุ์ Canter (ดอกประเภท single สีม่วง) ในกระถาง

4.1.1 การชักนำให้เบญจมาศสายพันธุ์ Canter เกิดการกลายด้วยสาร colchicine ในกระถาง

4.1.1.1 อัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ต่อสารละลาย colchicine

เมื่อหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter พบว่าบริเวณปลายยอดที่สัมผัสกับสารละลายมีอาการเหี่ยวลงอย่างช้าๆ ในต้นที่รอดยอดของต้นกล้าจะมีอาการเหี่ยวเหลืองอยู่ระยะหนึ่ง หลังจากนั้นจะกลับมาเขียวและเจริญเติบโตต่อไปตามปกติ ส่วนในต้นที่ตายอาการเหี่ยวเหลืองจะมีความรุนแรงมากขึ้นเริ่มลามจากยอดลงมาจนทั่วทั้งต้นและแห้งตายไปจากการใช้สารละลาย colchicine ที่ความเข้มข้น 0.00, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิต 100, 75, 60, 55, 45 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่า LD_{50} ของสารละลาย colchicine ต่อต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter อยู่ที่ 0.64 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 อัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร วันละ 3 ครั้ง นาน 7 วัน หลังจากปลูกเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1 สัปดาห์

4.1.1.2 การเจริญเติบโตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter หลังได้รับสารละลาย colchicine

เนื่องจากกระบวนการหยุดสารละลาย colchicine กินเวลาทั้งสิ้น 7 วัน ก่อนจะเริ่มต้น เก็บข้อมูล ส่งผลให้ในสัปดาห์ที่ 0 ต้นกล้าจึงมีความสูงที่แตกต่างกัน การเจริญเติบโตด้านความสูงของต้นเบญจมาศในสัปดาห์ที่ 0 ซึ่งค่าเฉลี่ยความสูงของต้นกล้าที่ได้รับสารละลาย colchicine 0.40 เปอร์เซ็นต์ มีความสูงมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ในสัปดาห์ที่ 2 จุดควบคุมและความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าต้นเบญจมาศที่ได้รับสายละลาย colchicine ความเข้มข้นอื่น ๆ เนื่องจากได้รับผลกระทบจากสารละลายน้อยจึงไม่เกิดการชะงักการเจริญเติบโต เมื่อเบญจมาศที่ได้รับสาร colchicine ความเข้มข้น 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ เข้าสู่สัปดาห์ที่ 3 ต้นเบญจมาศเริ่มต้นฟื้นและกลับมาเจริญเติบโตตามปกติ จะเห็นได้ว่าในสัปดาห์ที่ 6 เบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine ทุกระดับมีระดับความสูงที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 4.1) โดยเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine ที่ความเข้มข้น 0.40, 0.60 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์มีขนาดความสูงของทรงพุ่มสูงกว่าเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine ที่ 36.15, 36.50 และ 36.86 ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 0 หลังจากเสร็จสิ้นการให้สารละลาย colchicine ตามกระบวนการ พบว่าขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine 0.8 เปอร์เซ็นต์มีขนาดใหญ่ที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงสัปดาห์ที่ 6 ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine 0.80 เปอร์เซ็นต์กลับมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำที่สุด อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ซึ่งตรงกันข้ามกับต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine 0.40 และ 0.60 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1 อัตราการเจริญเติบโตด้านความสูงของทรงพุ่มเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยุดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสาร colchicine (%)	ความสูงของทรงพุ่ม (cm.)			
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6
0.00	4.40 ± 0.34 B	18.93 ± 1.54 A	24.08 ± 3.18 C	33.78 ± 3.25 B
0.20	4.62 ± 0.36 B	18.89 ± 2.31 A	22.94 ± 1.91 C	34.31 ± 2.56 B
0.40	5.21 ± 0.48 A	15.15 ± 2.45 B	26.38 ± 2.51 B	36.13 ± 2.58 A
0.60	4.69 ± 0.36 B	12.92 ± 2.36 C	28.25 ± 2.64 A	36.50 ± 2.39 A
0.80	4.99 ± 0.47 B	15.42 ± 1.98 B	28.87 ± 2.23 A	33.66 ± 2.36 B
1.00	4.88 ± 0.59 B	12.70 ± 1.36 C	27.26 ± 1.59 AB	36.86 ± 1.11 A
F-Test	*	**	**	**
CV(%)	6.66	10.11	7.26	6.11

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's multiple range test, ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05, * มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางที่ 4.2 อัตราการเจริญเติบโตของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสาร colchicine (%)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น (mm.)			
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6
0.00	1.56 ± 0.18 B	4.95 ± 0.59 A	6.53 ± 0.39 A	9.18 ± 1.08 A
0.20	1.57 ± 0.38 B	4.43 ± 0.40 B	6.28 ± 0.47 AB	8.97 ± 1.12 A
0.40	1.28 ± 0.25 D	4.07 ± 0.50 C	6.20 ± 0.59 B	8.93 ± 1.17 A
0.60	1.41 ± 0.20 C	3.95 ± 0.36 CD	5.54 ± 0.42 C	8.16 ± 0.77 B
0.80	1.83 ± 0.13 A	4.59 ± 0.40 B	5.08 ± 0.46 D	7.50 ± 0.41 B
1.00	1.54 ± 0.26 B	3.69 ± 0.48 D	5.61 ± 0.32 C	8.01 ± 0.44 B
F-Test	*	**	**	**
CV(%)	10.89	8.70	6.11	9.06

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's multiple range test, * มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์, ** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

จำนวนตาข้างที่แตกใหม่โดยเฉลี่ยแล้วมีความแตกต่างกันทางสถิติ คือในต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ได้รับสาร colchicine ความเข้มข้น 0.40 เปอร์เซ็นต์ และ 0.80 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนตาข้างเฉลี่ย มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 4.3) จำนวนของตาข้างจะนับจำนวนจากกิ่งใหม่ที่งอกออกมา กล่าวคือ ต้นที่มีจำนวนตาข้างมากจะมีขนาดทรงพุ่มขนาดใหญ่ตามไปด้วย (ภาพที่ 4.2)

ปริมาณคลอโรฟิลล์มีความสัมพันธ์กับอัตราการสังเคราะห์แสงซึ่งสัมพันธ์กับการสร้างอาหารและการเจริญเติบโตของพืช จึงสามารถคาดการณ์ได้ว่าพืชที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงจะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงด้วย ผลของการตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์จากใบของต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine พบว่าค่าเฉลี่ยของคลอโรฟิลล์โดยรวม ของต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine 0.80 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 การเกิดตาข้าง และปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสาร colchicine (%)	จำนวนตาข้างที่แตกใหม่	Chlorophyll A ($\mu\text{g/g}$)	Chlorophyll B ($\mu\text{g/g}$)	Total Chlorophyll ($\mu\text{g/g}$)
0.00	8.83 \pm 1.85 C	6.87 \pm 0.77 B	4.20 \pm 1.04 AB	110.86 \pm 0.92 B
0.20	14.00 \pm 2.30 A	7.03 \pm 1.37 B	3.54 \pm 0.70 B	105.88 \pm 2.06 B
0.40	14.71 \pm 2.36 A	7.40 \pm 1.01 AB	3.74 \pm 0.57 B	111.50 \pm 1.57 B
0.60	13.20 \pm 2.59 AB	7.43 \pm 0.91 AB	3.63 \pm 0.56 B	110.65 \pm 1.46 B
0.80	14.00 \pm 2.58 A	7.99 \pm 0.91 A	4.45 \pm 1.10 A	124.49 \pm 1.94 A
1.00	11.46 \pm 1.14 B	7.55 \pm 0.81 AB	3.57 \pm 0.44 B	111.34 \pm 1.25 B
F-Test	**	*	*	*
CV(%)	13.04	13.31	20.07	14.06

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's multiple range test, * มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์, ** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอด ในกระถางอายุ 6 สัปดาห์; (A) ชุดควบคุม; (B) 0.20 เปอร์เซ็นต์; (C) 0.40 เปอร์เซ็นต์; (D) 0.60 เปอร์เซ็นต์; (E) 0.8เปอร์เซ็นต์; (F) 1.00 เปอร์เซ็นต์

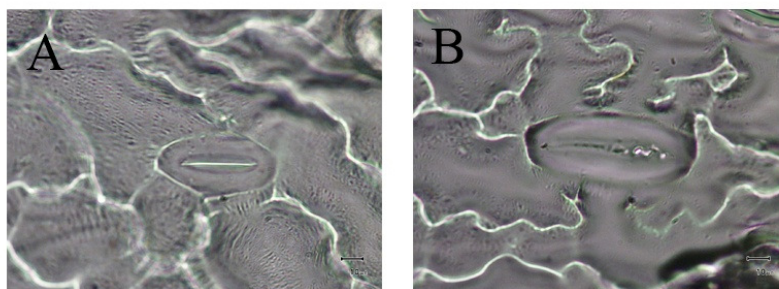
4.1.1.3 การตรวจสอบขนาดปากใบ ของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter หลังได้รับสารละลาย colchicine

สาร colchicine จะมีผลทำให้โครโมโซมมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัวซึ่งส่งผลทำให้เซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้นด้วย การตรวจสอบขนาดของเซลล์ปากใบจึงเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นที่ง่ายและมีความน่าเชื่อถือสูง จากการตรวจสอบเซลล์ปากใบของต้นเบญจมาศในแต่ละกรรมวิธี พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.40 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยของขนาดปากใบสูงที่สุด (ตารางที่ 4.4) จากการทดลอง พบเพียง 1 ต้นจากกรรมวิธีที่เบญจมาศได้รับสาร colchicine 0.40 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดปากใบใหญ่ถึง 80.40 ไมโครเมตรเมื่อเทียบกับปากใบจากชุดควบคุมที่มีขนาดปากใบ 46.72 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.3) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของตัวอย่างต้นเบญจมาศจากความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ กับต้นเบญจมาศที่พบว่ามีความยาวของเซลล์ปากใบที่มีขนาดใหญ่กว่าปกติ จะเห็นได้ว่าความสูงทรงพุ่มของทั้งสองตัวอย่างมีความใกล้เคียงกัน แต่ต้นเบญจมาศที่พบว่ามีความยาวของเซลล์ปากใบที่มีขนาดใหญ่กว่าปกตินั้นมีความสูงทรงพุ่มที่หนาแน่นกว่า (ภาพที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ขนาดปากใบในของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสาร colchicine (%)	ขนาดของปากใบ (μm .)
0.00	48.92 \pm 2.51 C
0.20	53.05 \pm 4.93 B
0.40	59.16 \pm 7.73 A
0.60	53.50 \pm 3.22 B
0.80	57.51 \pm 3.17 A
1.00	56.70 \pm 4.14 AB
F-Test	**
CV(%)	8.42

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's multiple range test, ** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.3 ภาพเซลล์ปากใบต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอด ในกระถางอายุ 6 สัปดาห์; (A) ชุดควบคุม; (B) 0.40 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่พบว่ามีความยาวของปากใหญ่กว่าปกติ

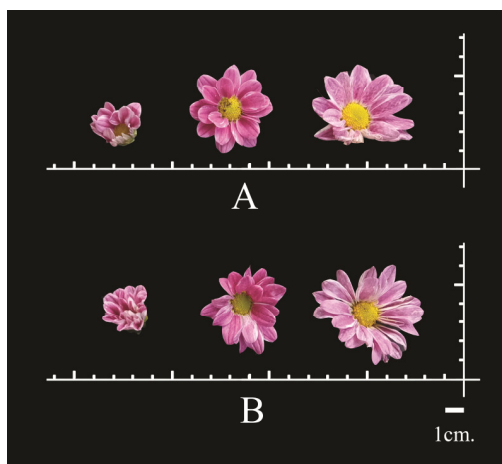


ภาพที่ 4.4 เปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอด ในกระถางอายุ 6 สัปดาห์; (A) ชุดควบคุม; (B) 0.40 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่พบว่ามีความยาวของปากใหญ่กว่าปกติ

ลักษณะของใบเมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างจากต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับสารละลาย colchicine กับต้นเบญจมาศที่พบว่ามีความหนาของเซลล์คุมปากใบที่มีความหนาใหญ่กว่าปกติ ต้นเบญจมาศที่มีความหนาปากใบใหญ่ จะมีแผ่นใบใกล้เคียงกับชุดควบคุม แต่จะมีก้านใบยาวกว่า ใบหนา ซอกใบระหว่างเส้นใบสั้น มีขอบใบหยักน้อยกว่า มีความกรอบและเปราะมากกว่า มีลักษณะหึ่งงอบริเวณขอบใบ (ภาพที่ 4.5) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะรูปทรง ขนาด และสีของดอกเบญจมาศระหว่างดอกจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย และดอกจากต้นที่มีความหนาของปากใบใหญ่กว่าปกติแล้ว พบว่ามีรูปทรงคล้ายกัน คือ เป็นดอกประเภท Single กลีบดอกชั้นนอกมีสีม่วง รูปทรงแคบและยาว เรียงซ้อนทับกัน 2-3 ชั้น ดอกย่อยวงในไม่พัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก มีสีเหลืองอมเขียว (ภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.5 เปรียบเทียบขนาดและรูปทรงของใบเบญจมาศสาย Canterbury ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอด ในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์; (A) ชุดควบคุม ; (B) 0.40 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่พบว่ามีความหนาของเซลล์คุมปากใหญ่กว่าปกติ



ภาพที่ 4.6 แสดงลักษณะของดอกเบญจมาศสายพันธุ์ Canterbury ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง; (A) 0 เปอร์เซ็นต์ ; (B) 0.40 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่พบว่ามีความหนาของเซลล์ปากใหญ่กว่าปกติ

4.1.1.4 การตรวจสอบจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter หลังได้รับสารละลาย colchicine

การตรวจสอบจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเบญจมาศสายพันธุ์ Canter หลังได้รับสารละลาย colchicine พบว่า ภาพโครโมโซมจากต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับสารกับต้นเบญจมาศที่พบว่ามีความหนาแน่นของเซลล์คุมปากใบที่มีความหนาแน่นสูงกว่าปกติ ทั้ง 2 ตัวอย่างยังไม่มี ความชัดเจนพอที่จะนับจำนวนโครโมโซมเพื่อเปรียบเทียบกันได้ ถึงแม้ว่าตัวอย่างจากต้นเบญจมาศที่พบว่ามีความหนาแน่นของปากใบที่มีความหนาแน่นสูง มีความหนาแน่นของโครโมโซมสูงกว่าโครโมโซมของต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับสาร แต่อาจเป็นไปได้ว่าภาพที่แสดงให้เห็นนั้นเป็นลักษณะของโครโมโซมที่ยังหดตัวไม่เต็มที่ จึงทำให้ดูเหมือนมีปริมาณโครโมโซมหนาแน่นสูง

4.1.2 ผลของการชักนำให้เกิดการกลายด้วยสาร EMS ในเบญจมาศสายพันธุ์ใน ภาวะถาวร

ทำการทดลองโดยใช้ต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขึ้นส่วนตาที่ผ่านการอนุบาลในโรงเรือนแล้ว คัดเลือกต้นกล้าที่แข็งแรง ขนาดความสูงจากโคนถึงปลายยอด ประมาณ 4 เซนติเมตร ไปแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.00, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ นาน 8 ชั่วโมง จากนั้นล้างสารละลายส่วนเกินออกด้วยการแช่น้ำสะอาด 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที แล้วจึงย้ายปลูกลงกระถางและอนุบาลในโรงเรือนเป็นระยะเวลา 5-7 วัน เพื่อให้ต้นกล้าได้ฟื้นตัวจากการได้รับสารละลาย EMS แล้วจึงย้ายปลูกลงกระถาง

ขณะอนุบาลอยู่ในโรงเรือน พบว่าต้นกล้าที่ได้รับสารละลาย EMS ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจะแสดงอาการช้าเป็นจุดเล็กๆ 2-3 ตำแหน่งบริเวณลำต้นและใบ จากนั้นอาการดังกล่าวจะค่อยๆ ขยายเป็นวงกว้างทั่วทั้งต้น และส่งผลให้ต้นกล้าตายหมดทุกต้นภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง

4.2 ผลของการชักนำให้เกิดการกลายในเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white (ดอกประเภท single สีขาว) ในกระถาง

4.2.1 การชักนำให้เกิดการกลายด้วยสาร colchicine ในเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ในกระถาง

4.2.1.1 อัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ต่อสารละลาย colchicine

เมื่อหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white พบว่าบริเวณปลายยอดที่สัมผัสกับสารละลายมีอาการเหี่ยวลงอย่างช้าๆ หลังจากนั้นจะกลับมาเขียวและเจริญเติบโตต่อไปตามปกติ ส่วนในต้นที่ตายอาการเหี่ยวเหลืองจะมีความรุนแรงมากขึ้นเริ่มลามจากยอดลงมาจนทั่วทั้งต้นและแห้งตายไป จากการใช้สารละลาย colchicine ที่ความเข้มข้น 0.00, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการรอดชีวิต 100, 95, 90, 95, 90 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) อัตราการรอดชีวิตของเบญจมาศที่ได้รับสาร colchicine อยู่ในระดับที่สูงมาก ส่งผลให้เส้นแนวโน้มขนานกับแกน x จึงไม่สามารถหาค่า LD_{50} ได้

ตารางที่ 4.5 อัตราการรอดชีวิตของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร วันละ 3 ครั้ง นาน 7 วัน หลังจากปลูกเลี้ยงต่อไปในกระถาง เป็นเวลา 1 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสาร colchicine (%)	อัตราการรอดชีวิต (%)
0.00	100
0.20	95
0.40	90
0.60	95
0.80	90
1.00	95

4.2.1.2 การเจริญเติบโตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white หลังได้รับสารละลาย colchicine

เนื่องจากกระบวนการหยุดสารละลาย colchicine กินเวลาทั้งสิ้น 6 วัน ในช่วงระยะเวลาดังกล่าว ต้นกล้าจึงเกิดการเจริญเติบโตได้ตามปกติ ส่งผลให้ในสัปดาห์ที่ 0 ต้นกล้าจึงมีความสูงที่แตกต่างกัน โดยต้นกล้าที่ได้รับสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์มีความสูงของต้นกล้ามากที่สุด และความเข้มข้นอื่นๆ ยังคงมีระดับความสูงใกล้เคียงกัน หลังจากเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ได้รับสาร colchicine จากการทดลองพบว่าการเจริญเติบโตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ในสัปดาห์ที่ 2 ความเข้มข้นของสารละลาย 0.20, 0.60 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยความสูงมากที่สุด แต่เมื่อเข้าสู่ในสัปดาห์ที่ 4 ต้นกล้าเบญจมาศที่ได้รับสารละลายความเข้มข้นต่ำ (0, 0.20 และ 0.40 เปอร์เซ็นต์) มีการเจริญด้านความสูงอย่างรวดเร็ว ในสัปดาห์ที่ 6 ความแตกต่างด้านความสูงจะปรากฏให้เห็นได้ชัดเจน โดยต้นเบญจมาศในชุดควบคุม มีค่าความสูงเฉลี่ยอยู่ที่ 19.04 เซนติเมตร และระดับความสูงจะลดหลั่นลงมาเรื่อยๆ ตามความเข้มข้นของสารละลายที่เพิ่มมากขึ้น ค่าเฉลี่ยความสูงต่ำที่สุดอยู่ที่ 14.63 เซนติเมตร คือต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.80 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 อัตราการเจริญเติบโตด้านความสูงของทรงพุ่มต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการหยุดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสาร colchicine (%)	ความสูงของทรงพุ่ม (cm.)			
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6
0.00	5.45 ± 1.33 AB	11.32 ± 1.71 AB	15.83 ± 1.81 A	19.04 ± 1.68 A
0.20	6.17 ± 2.03 A	11.91 ± 2.70 A	15.75 ± 4.09 A	18.03 ± 5.89 A
0.40	5.50 ± 1.50 AB	11.46 ± 1.90 AB	15.41 ± 3.84 A	18.87 ± 3.36 A
0.60	5.65 ± 1.68 AB	11.65 ± 2.00 A	14.18 ± 3.54 AB	18.09 ± 2.77 A
0.80	4.92 ± 1.04 B	9.55 ± 2.21 B	12.06 ± 2.86 B	14.63 ± 5.26 B
1.00	5.93 ± 1.52 AB	11.82 ± 2.63 A	14.18 ± 4.11AB	17.08 ± 4.42AB
F-Test	*	**	*	*
CV(%)	27.60	19.98	24.84	23.23

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's multiple range test. * มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์, ** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

การเจริญเติบโตด้านลำต้นของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white หลังจากได้รับสารละลาย colchicine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต้นกล้าเบญจมาศมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในทุกสัปดาห์ เมื่อนำข้อมูลขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางไม่แตกต่างกันทางสถิติในทุกสัปดาห์ (ตารางที่ 4.7)

เมื่อพิจารณาที่ระดับปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณคลอโรฟิลล์โดยรวม ของเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.20 และ 0.60 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือความเข้มข้น 0.40 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.80 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.8) สอดคล้องกับการเจริญเติบโตด้านความสูงซึ่งต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.80 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยด้านความสูงต่ำที่สุดอีกด้วย

ตารางที่ 4.7 อัตราการเจริญเติบโตของขนาดลำต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสาร colchicine (%)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น (mm.)			
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6
0.00	1.70 ± 0.50	3.08 ± 0.59	3.46 ± 0.84	3.75 ± 0.54
0.20	1.61 ± 0.31	2.78 ± 0.55	3.42 ± 0.81	3.62 ± 0.96
0.40	1.69 ± 0.49	2.81 ± 0.52	3.65 ± 0.91	3.43 ± 1.47
0.60	1.88 ± 0.66	3.03 ± 0.65	3.73 ± 0.84	4.08 ± 1.18
0.80	1.54 ± 0.34	3.18 ± 0.45	3.16 ± 1.00	3.33 ± 1.43
1.00	1.59 ± 0.34	2.90 ± 0.91	3.42 ± 0.74	3.82 ± 0.80
F-Test	ns	ns	ns	ns
CV(%)	27.21	20.99	25.41	31.24

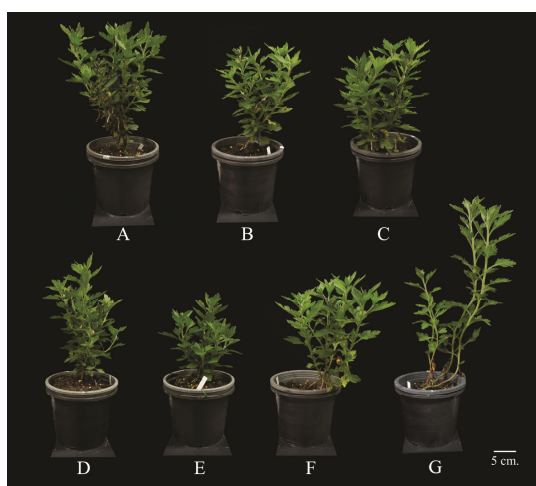
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's multiple range test, ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 4.8 การเกิดตาข้าง ปริมาณคลอโรฟิลล์ของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสาร colchicine (%)	จำนวนตาข้างที่แตกใหม่	Chlorophyll A ($\mu\text{g/g}$)	Chlorophyll B ($\mu\text{g/g}$)	Total Chlorophyll ($\mu\text{g/g}$)
0.00	7.90 \pm 1.45	46.4 \pm 23.5 ABC	42.8 \pm 11.1 A	89.2 \pm 27.7 A
0.20	7.80 \pm 1.11	59.4 \pm 19.2 A	35.3 \pm 10.9 AB	94.8 \pm 35.9 A
0.40	8.25 \pm 1.45	51.4 \pm 19.8 ABC	29.6 \pm 13.6 BC	81.1 \pm 42.0 AB
0.60	8.30 \pm 1.49	54.0 \pm 16.2 ABC	33.1 \pm 08.2 B	87.9 \pm 29.1 A
0.80	7.75 \pm 2.07	36.0 \pm 20.0 C	21.1 \pm 10.5 D	57.8 \pm 34.8 C
1.00	7.55 \pm 1.54	40.9 \pm 13.9 BC	22.7 \pm 07.1 CD	63.3 \pm 25.3 BC
F – test	ns	**	**	**
CV (%)	19.47	46.811	39.89	41.62

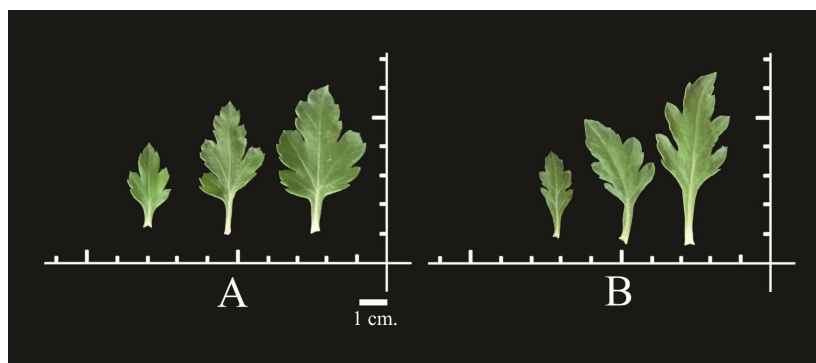
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's multiple range test, ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, ** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ในกรรมวิธีที่เบญจมาศได้รับสาร colchicine ความเข้มข้น 0.80 เปอร์เซ็นต์ พบต้นที่มีลักษณะผิดปกติจำนวน 1 ต้น โดยเบญจมาศต้นนี้มีความสูง 38.70 เซนติเมตร ในขณะที่ความสูงของต้นอื่นๆ ในชุดเดียวกันมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 14.63 \pm 5.26 เซนติเมตร และค่าเฉลี่ยความสูงของชุดควบคุมอยู่ที่ 19.06 \pm 1.68 เซนติเมตร มีตาข้างที่แตกใหม่เพียง 2 กิ่ง ค่าเฉลี่ยการแตกกิ่งใหม่ของชุดควบคุมอยู่ที่ประมาณ 8 กิ่งต่อต้น ในขณะที่ต้นเบญจมาศที่พบว่ามีความสูงมากกว่าปกติมีจำนวนกิ่งใหม่เพียงแค่ 2 กิ่งเท่านั้น (ตารางที่ 4.8), (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 ต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย colchicine ในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์; (A) 0 เปอร์เซ็นต์; (B) 0.20 เปอร์เซ็นต์; (C) 0.40 เปอร์เซ็นต์; (D) 0.60 เปอร์เซ็นต์; (E) 0.80 เปอร์เซ็นต์; (F) 1.00 เปอร์เซ็นต์; (G) 0.80 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่มีลักษณะกลาย

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของใบระหว่างใบจากต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับสารละลาย colchicine กับต้นเบญจมาศที่มีความสูงมากกว่าปกติ พบว่าต้นเบญจมาศที่มีความสูงมากกว่าปกติ มีแผ่นใบยาว และแคบกว่าชูดควบคุม ก้านใบยาวกว่า ใบหนา มีขอบใบหยักน้อยกว่า มีความกรอบและเปราะมากกว่า มีลักษณะขอบใบหยัก (ภาพที่ 4.8) เมื่อเปรียบเทียบรูปทรงของดอกเบญจมาศจะเห็นได้ว่าดอกจากต้นเบญจมาศที่พบว่ามีความสูงมากกว่าปกตินั้นมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางดอกประมาณ 5 เซนติเมตรใหญ่กว่าตัวอย่างดอกจากชูดควบคุมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางดอกประมาณ 3 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.9) เนื่องจากช่อดอกถูกแมลงเข้าทำลายทำให้ลักษณะของดอกมีลักษณะผิดแปลกไปจากเดิม ซึ่ง โดยปกติแล้ว สีของกลีบดอกชั้นนอกจะมีสีขาว มีกลีบดอกชั้นในมีสีเหลือง ไม่บาน และกระจุกอยู่ใจกลางดอก



ภาพที่ 4.8 ขนาดและลักษณะของใบต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย colchicine ในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์; (A) 0 เปอร์เซ็นต์; (B) 0.80 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่มีลักษณะกลาย



ภาพที่ 4.9 ลักษณะและรูปทรงของดอกเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย colchicine ในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์; (A) 0 เปอร์เซ็นต์; (B) 0.80 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่มีลักษณะกลาย

4.2.1.3 การตรวจสอบขนาดปากใบของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white หลังได้รับสารละลาย colchicine

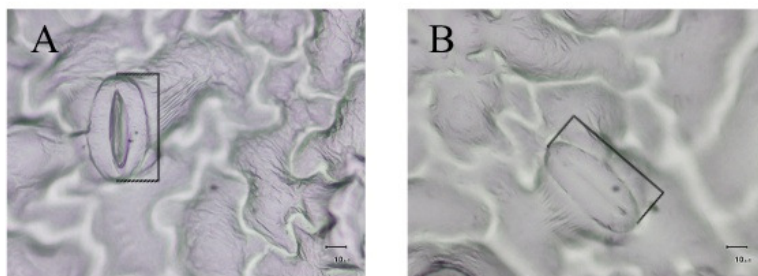
สาร colchicine จะมีผลทำให้โครโมโซมมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัวซึ่งส่งผลทำให้เซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้นด้วย การตรวจสอบขนาดของเซลล์ปากใบจึงเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นที่ง่ายและมีความน่าเชื่อถือสูง จากการตรวจสอบเซลล์ปากใบทุกต้นพบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดเซลล์ปากใบของต้นเบญจมาศในแต่ละกรรมวิธีไม่แตกต่างกันแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 4.9)

เมื่อนำต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.80 เปอร์เซ็นต์ ที่พบว่ามีความสูงต้นมากกว่าปกติมาตรวจสอบขนาดของเซลล์ปากใบเปรียบเทียบกับตัวอย่างเซลล์ปากใบจากชุดควบคุม พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกัน โดยเซลล์ปากใบของตัวอย่างจากชุดควบคุมมีขนาด 51.02 ไมโครเมตร ในขณะที่เซลล์ปากใบของต้นเบญจมาศที่พบว่ามีความสูงมากกว่าปกติมีขนาด 53.18 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.10)

ตารางที่ 4.9 ขนาดปากใบของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ลงบนยอดในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสาร colchicine (%)	ขนาดของปากใบ (μm .)
0.00	50.16 \pm 4.33
0.20	50.14 \pm 3.77
0.40	49.76 \pm 5.20
0.60	47.32 \pm 3.61
0.80	47.11 \pm 6.54
1.00	47.11 \pm 4.58
F – test	ns
CV (%)	9.82

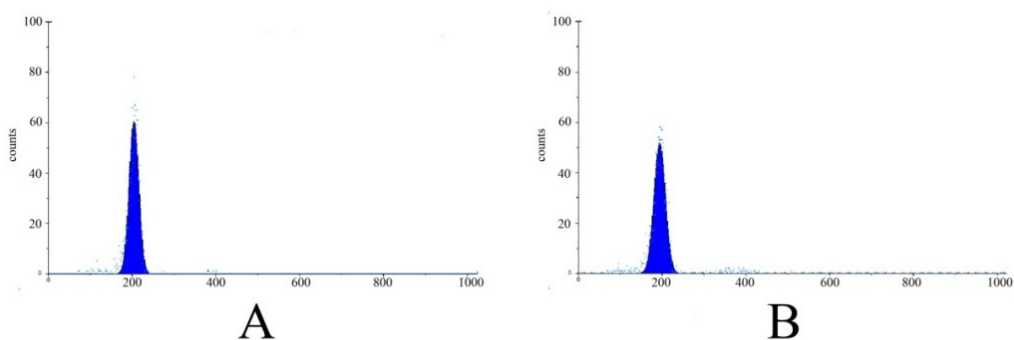
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's multiple range test, ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 4.10 เปรียบเทียบของปากใบต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย colchicine ในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์; (A) 0 เปอร์เซ็นต์; (B) 0.80 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่มีลักษณะกลาย

4.2.1.4 การตรวจสอบโพลีพลอยด์ด้วยเทคนิค Flow cytometry ของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white หลังได้รับสารละลาย colchicine

เมื่อนำชิ้นส่วนใบของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.80 เปอร์เซ็นต์ ที่มีลักษณะกลายไปตรวจสอบโพลีพลอยด์เปรียบเทียบกับต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ด้วยเทคนิค Flow cytometry พบว่าองค์ประกอบภายในสารพันธุกรรมของต้นที่มีลักษณะกลายนั้นไม่มีความเปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 4.11)



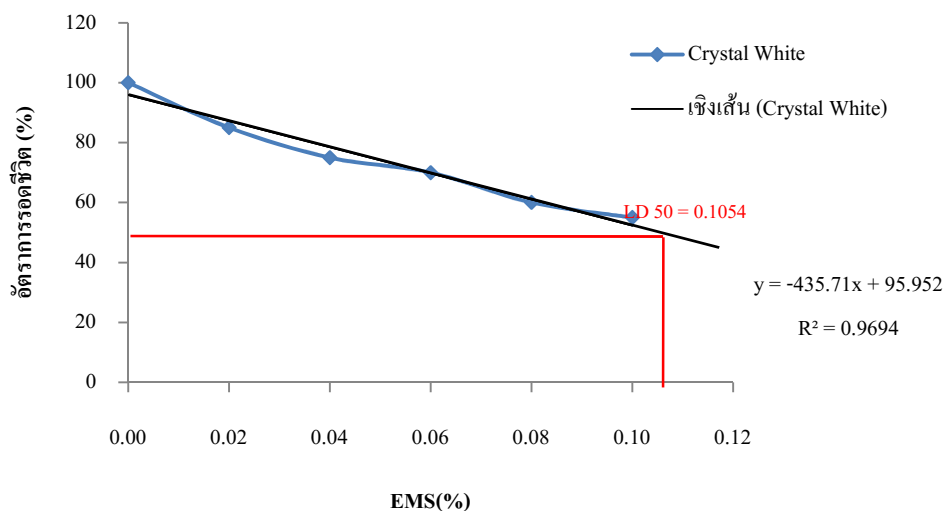
ภาพที่ 4.11 กราฟแสดงระดับขององค์ประกอบสารพันธุกรรมจากใบของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย colchicine ในกระถาง; (A) 0 เปอร์เซ็นต์; (B) 0.80 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่มีลักษณะกลาย

4.2.2 ผลของการชักนำให้เกิดการกลายด้วยสาร EMS ในเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white

ในกระถาง

4.2.2.1 อัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ต่อสารละลาย EMS

หลังจากนำต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่แช่ในสารละลาย EMS มาปลูกอนุบาลในโรงเรือน โดยแบ่งการออกเป็นความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้นพบว่าต้นกล้าเบญจมาศที่แช่ด้วยสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.00, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิต 100, 85, 75, 70, 60 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่า LD_{50} ของสารละลาย EMS ต่อต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white อยู่ที่ 0.1054 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.12) ความเข้มข้นของสารละลาย EMS แปรผกผันกับอัตราการรอดชีวิต คือ เมื่อสารละลาย EMS มีความเข้มข้นสูงขึ้น อัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white จะต่ำลง



ภาพที่ 4.12 อัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 8 ชั่วโมง หลังจากปลูกเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1 สัปดาห์

4.2.2.2 การเจริญเติบโตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white หลังได้รับสารละลาย EMS

ด้านการเจริญเติบโตด้านความสูง ในสัปดาห์ที่ 2 ต้นกล้าที่ได้รับสารละลายความเข้มข้น 0 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยความสูงมากที่สุด ส่วนต้นกล้าที่ได้รับสารละลายความเข้มข้น 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยความสูงต่ำ ในสัปดาห์ที่ 4 ต้นกล้าที่ได้รับสารละลายความเข้มข้น 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ เริ่มมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นสังเกตได้จากค่าเฉลี่ยความสูงที่มีค่ามากกว่าต้นกล้าที่ได้รับสารละลายความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 6 ต้นกล้าที่ได้รับสารละลายความเข้มข้น 0.06 และ 0.08 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยความสูงมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และ ต้นกล้าที่ได้รับสารละลายความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์มีค่าเฉลี่ยความสูงต่ำที่สุด (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.10 อัตราการเจริญเติบโตของความสูงทรงพุ่มเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสาร EMS (%)	ความสูงของทรงพุ่ม (cm.)			
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6
0.00	5.01 ± 0.38	8.33 ± 0.70 A	15.54 ± 0.93 A	22.61 ± 2.36 BC
0.02	5.09 ± 0.22	8.02 ± 0.85 A	13.71 ± 1.55 B	22.04 ± 3.05 C
0.04	4.83 ± 0.27	6.35 ± 0.76 B	14.66 ± 1.77 AB	23.63 ± 2.41 ABC
0.06	4.84 ± 0.44	5.82 ± 0.50 C	14.45 ± 1.83 AB	24.91 ± 1.90 A
0.08	4.78 ± 0.51	5.76 ± 0.41 C	14.03 ± 1.43 B	25.15 ± 2.28 A
0.10	4.92 ± 0.24	6.29 ± 0.49 B	14.14 ± 1.51 B	24.22 ± 1.71 AB
F-Test	ns	**	**	**
CV(%)	6.16	8.35	9.25	8.38

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's multiple range test, ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, ** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

การเจริญเติบโตด้านขนาดของลำต้นต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่แช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ ในระยะแรก (สัปดาห์ที่ 0-2) ต้นกล้าที่ได้รับสารละลายความเข้มข้น 0 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยของขนาดลำต้นสูงที่สุด และ ต้นกล้าที่ได้รับสารละลายความเข้มข้นที่สูงขึ้นในระดับ 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยของขนาดลำต้นและอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำ เป็นผลมาจากการแช่ต้นกล้าในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นสูง จะทำให้ต้นกล้าเกิดการบอบช้ำ ส่งผลให้ต้นกล้าชะงักการเจริญเติบโตในระยะแรก เมื่อต้นกล้าสามารถฟื้นตัวได้ก็จะกลับมาเจริญเติบโตตามปกติ ในสัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่ 6 ต้นกล้าเบญจมาศที่ได้รับสารละลายความเข้มข้น 0.08 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยของขนาดลำต้นสูงที่สุด รองลงมาคือความเข้มข้น 0.04, 0.02 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11)

ตารางที่ 4.11 อัตราการเจริญเติบโตของขนาดลำต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านแช่สารละลาย EMS ในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ สาร EMS (%)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น (mm.)			
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6
0.00	1.74 ± 0.28 AB	3.71 ± 0.71 A	4.98 ± 0.72 C	6.82 ± 0.77 D
0.02	1.85 ± 0.26 A	3.76 ± 0.70 A	5.43 ± 0.66 B	7.51 ± 0.71 C
0.04	1.50 ± 0.25 C	2.67 ± 0.47 B	5.63 ± 0.50 B	7.73 ± 0.79 BC
0.06	1.61 ± 0.31 BC	2.48 ± 0.52 B	5.60 ± 0.63 B	7.36 ± 0.69 C
0.08	1.69 ± 0.25 ABC	2.45 ± 0.55 B	6.31 ± 0.71 A	8.16 ± 0.62 AB
0.10	1.65 ± 0.28 ABC	2.31 ± 0.35 B	6.11 ± 0.65 A	8.30 ± 0.79 A
F-Test	**	**	**	**
CV(%)	13.54	17.76	9.28	8.20

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's multiple range test, ** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

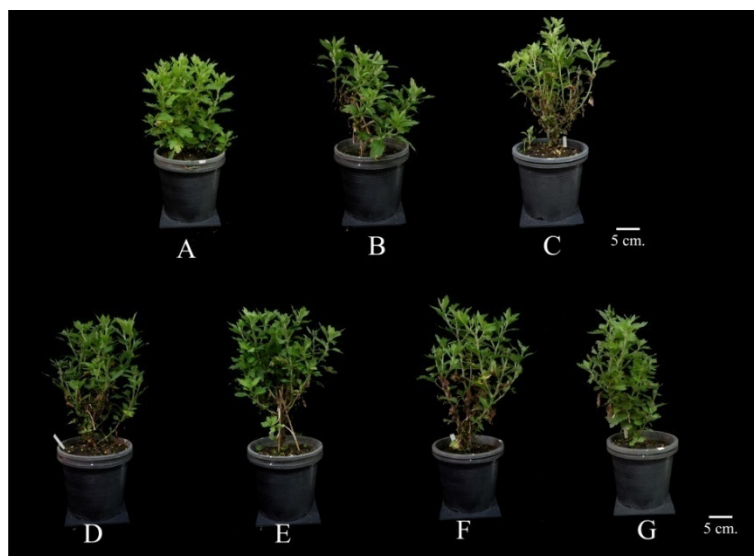
การเปลี่ยนแปลงของปริมาณคลอโรฟิลล์มีความสัมพันธ์กับอัตราการสังเคราะห์แสงซึ่งสัมพันธ์กับการสร้างอาหารและการเจริญเติบโตของพืช จึงสามารถคาดการณ์ได้ว่าพืชที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงจะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สาร EMS ยังส่งผลทำให้พืชมีอาการขาดคลอโรฟิลล์ได้อีกด้วย จากการตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์โดยรวมพบว่าค่าเฉลี่ยของคลอโรฟิลล์ในเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่แช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสูงที่สุด และที่ระดับความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีระดับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ต่ำที่สุด (ตารางที่ 4.12)

จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบลักษณะใบของต้นเบญจมาศ จำนวน 1 ต้น จากต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.08 เปอร์เซ็นต์ที่มีลักษณะแตกต่างไปจากต้นอื่นๆ คือ มีลักษณะแผ่นใบกลม มีรอยหยักขอบใบน้อยและสั้น โคนใบสอบ ก้านใบยาว (ภาพที่ 4.14)

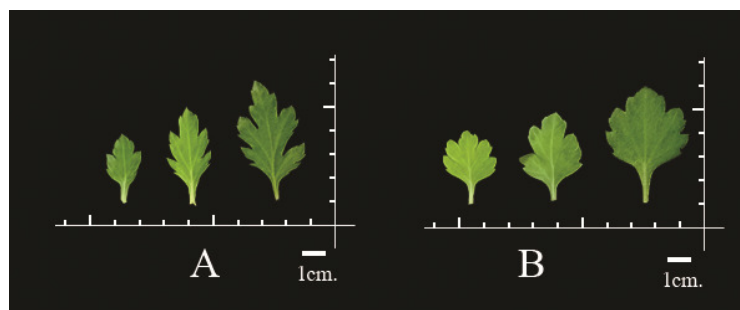
ตารางที่ 4.12 จำนวนตาข้าง และ คลอโรฟิลล์ จากใบของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสาร EMS ในกระถาง อายุ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสาร EMS(%)	จำนวนตาข้างที่แตกใหม่	Chlorophyll A (µg/g)	Chlorophyll B (µg/g)	Total Chlorophyll (µg/g)
0.00	13.44 ±1.93	46.4 ±23.5 ABC	42.8 ±11.1 A	104.53 ± 1.84 A
0.02	12.60 ±2.23	59.4 ±19.2 A	35.3 ±10.9 AB	102.26 ± 1.65 A
0.04	13.49 ±2.05	51.4 ±19.8 ABC	29.6 ±13.6 BC	100.19 ± 1.83 AB
0.06	14.16 ±1.46	54.0 ±16.2 ABC	33.1 ±08.2 B	92.68 ± 1.12 AB
0.08	13.69 ±1.53	36.0 ±20.0 C	21.1 ±10.5 D	91.60 ± 1.54 AB
0.10	14.41 ±1.55	40.9 ±13.9 BC	22.7 ±07.1 CD	85.07 ± 1.14 B
F-Test	ns	**	**	**
CV(%)	13.32	46.811	39.89	16.10

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's multiple range test, ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, ** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.13 แสดงลักษณะของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสาร EMS ในภาพแปลง อายุ 6 สัปดาห์; (A) ชูดควบคุม; (B) 0.02 เปอร์เซ็นต์; (C) 0.04 เปอร์เซ็นต์; (D) 0.06 เปอร์เซ็นต์; (E) 0.08 เปอร์เซ็นต์; (F) 0.10 เปอร์เซ็นต์; (G) 0.08 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่มีลักษณะแผ่นใบแตกต่างกันไป



ภาพที่ 4.14 ใบเปรียบเทียบขนาดและรูปทรงใบของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสาร EMS ในภาพแปลง อายุ 6 สัปดาห์; (A) ชูดควบคุม; (B) 0.08 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่มีลักษณะแผ่นใบแตกต่างกันไป

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ สามารถแบ่งลักษณะของดอกตามที่พบได้ 3 รูปแบบ และเปอร์เซ็นต์รูปแบบของดอกที่พบได้ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.13)

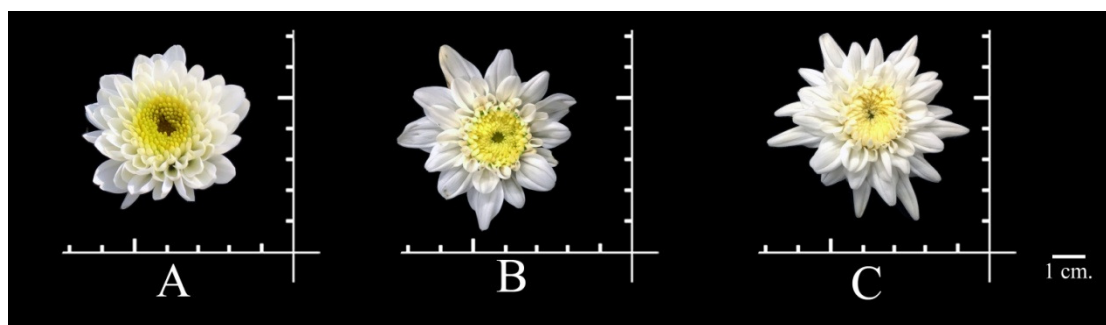
รูปแบบที่ 1 ดอกประเภท single มีกลีบดอกย่อยชั้นนอกสีขาว เรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น กลีบดอกย่อยชั้นในมีสีเหลืองยังไม่บาน (ภาพที่ 4.15A)

รูปแบบที่ 2 ดอกประเภท single มีกลีบดอกย่อยชั้นนอกสีขาว เรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น กลีบดอกย่อยชั้นในมีสีเหลืองยังไม่บาน และเรียงตัวหนาแน่นกว่ารูปแบบที่ 1 (ภาพที่ 4.15B)

รูปแบบที่ 3 ดอกประเภท single มีกลีบดอกย่อยชั้นนอกสีขาว เรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น แผ่นกลีบมีลักษณะม้วนออก กลีบดอกชั้นนอกสุดจะม้วนออกอย่างมาก จนทำให้กลีบดอกมีลักษณะเป็นทรงกรวยแหลม กลีบดอกย่อยชั้นในมีสีเหลืองยังไม่บาน (ภาพที่ 4.15C)

ตารางที่ 4.13 รูปแบบของดอกเบญจมาศที่พบในต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white หลังจากได้รับสาร EMS ในกระถาง

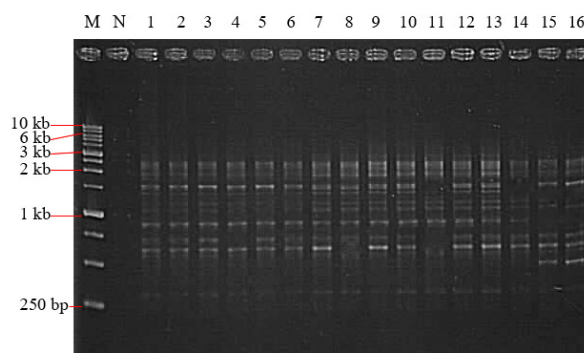
ความเข้มข้นของ สารละลาย EMS (%)	รูปแบบของดอก จำนวนต้นที่พบ ต่อจำนวนต้นทั้งหมด (%)		
	รูปแบบที่ 1	รูปแบบที่ 2	รูปแบบที่ 3
0	20/20 (100)	-	-
0.02	12/17 (71)	5/17 (29)	-
0.04	9/15 (60)	6/15 (40)	-
0.06	12/14 (86)	2/14 (14)	-
0.08	9/12 (75)	2/12 (17)	1/12 (8)
0.10	6/11 (55)	3/11 (27)	2/11 (18)



ภาพที่ 4.15 แสดงลักษณะของดอกเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสาร EMS ในกระถาง ; (A) รูปแบบที่ 1; (B) รูปแบบที่ 2; (C) รูปแบบที่ 3

4.2.2.3 ผลการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพแปลงที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยเทคนิค RAPD

จากการนำไพรเมอร์ RAPD จำนวน 28 ชนิดมาใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันในกระถาง ทั้ง 25 ตัวอย่าง พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 8 ชนิด ที่สามารถจำแนกความแตกต่างของ DNA กับตัวอย่างเบญจมาศที่นำมาใช้ได้ คือ OPA-07, OPB-04, OPB-07, OPF-01, OPF-04, OPF-06, OPF-17 และ OPF-18 (ตารางที่ 4.14) จากภาพที่ 4.16 เป็นการใช่ไพรเมอร์ OPF-17 เพื่อตรวจสอบต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS พบว่ามีความแตกต่างที่ DNA ขนาดประมาณ 500 bp และ 900 bp



ภาพที่ 4.16 แสดงผลของแถบ DNA ของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF-17; (M) 1kb ; (N) negative control ; (1-5) 0.1 เปอร์เซ็นต์; (6-10) 0.08 เปอร์เซ็นต์; (11-14) 0.06 เปอร์เซ็นต์ ที่ได้รับสารละลาย EMS ; (15-16) 0 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.14 ขนาดของแถบ DNA ที่พบว่ามีความแตกต่างของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white หลังจากได้รับสารละลาย EMS ในกระถาง

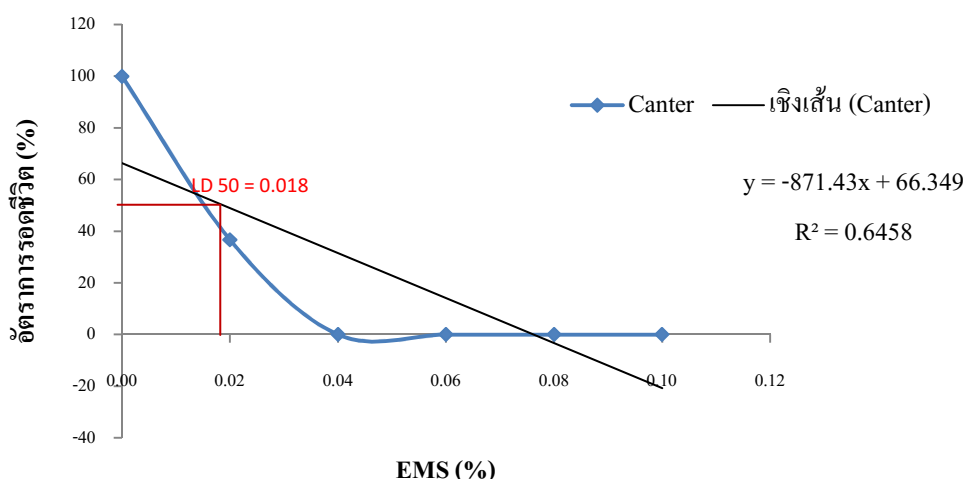
Primer	ขนาดของแถบ DNA ที่พบว่ามี ความแตกต่าง	Primer	ขนาดของแถบ DNA ที่พบว่ามี ความแตกต่าง
OPA-07	~500 bp, ~1,700 bp	OPF-04	~750 bp, ~1,300 bp, ~1,500 bp
OPB-04	~500 bp, ~1,500 bp	OPF-06	~600 bp, ~1,000 bp
OPB-07	~750 bp, ~1,400 bp	OPF-17	~500 bp, ~900 bp
OPF-01	~800 bp, ~1,300 bp	OPF-18	~650 bp

4.3 ผลของการชักนำให้เกิดการกลายในเบญจมาศด้วยสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อ

4.3.1 การชักนำให้เบญจมาศสายพันธุ์ Canter (ดอกประเภท single สีม่วง) เกิดการกลายด้วยสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อ

4.3.1.1 อัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ต่อสารละลาย EMS

หลังจากนำชิ้นส่วนของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการแช่ในสารละลาย EMS ครบตามเวลาที่กำหนดแล้วมาเลี้ยงต่อบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนข้อที่แช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.10, 0.08, 0.06 และ 0.04 เปอร์เซ็นต์ ตายทั้งหมด และความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีชิ้นส่วนข้อที่รอดและพัฒนาเป็นต้นกล้า 11 ต้นจากจำนวนทดลองทั้งหมด 30 ต้น คิดเป็นอัตราการรอดชีวิต 36.67 เปอร์เซ็นต์ ค่า LD_{50} ของสารละลาย EMS ต่อชิ้นส่วนข้อเบญจมาศสายพันธุ์ Canter อยู่ที่ 0.018 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.17) หลังจากนั้นทำการย้ายปลูกเพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา



ภาพที่ 4.17 อัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของชิ้นส่วนข้อเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อนาน 8 ชั่วโมง หลังจากเพาะเลี้ยงต่อไปในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 1 สัปดาห์

4.3.1.2 การเจริญเติบโตของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter หลังได้รับสารละลาย EMS

หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อจนอายุครบ 4 สัปดาห์ หรือ ได้ต้นกล้าขนาดความสูงประมาณ 4 เซนติเมตรจึงนำออกมาปลูกทดสอบในกระถาง พบว่าต้นที่รอดจากการได้รับสาร EMS ยังคงมีการเจริญเติบโตที่ปกติ ในสัปดาห์ที่ 0 ถึงสัปดาห์ที่ 4 ต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS และต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น และมีความสูงเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์ใกล้เคียงกัน หลังจากนั้น ในสัปดาห์ที่ 6 ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS ส่งผลให้มีความสูงมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 4.15)

ตารางที่ 4.15 อัตราการเจริญเติบโตด้านความสูงของทรงพุ่มเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ได้รับสารละลาย EMS หลังย้ายปลูกได้ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสาร EMS (%)	ความสูงของทรงพุ่ม (cm.)			
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6
0.00	4.70 ± 0.74	7.90 ± 1.52	13.74 ± 2.02	23.50 ± 1.68 B
0.02	4.80 ± 0.35	8.60 ± 2.15	15.10 ± 2.68	25.10 ± 2.20 A
0.04	-	-	-	-
0.06	-	-	-	-
0.08	-	-	-	-
0.10	-	-	-	-
F-Test	ns	ns	ns	**
CV(%)	9.08	21.86	12.82	6.81

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's multiple range test, ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, ** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

การขยายตัวของลำต้นโดยวัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น แสดงให้เห็นว่าต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS และ ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นจึงไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.16)

จำนวนตาข้างที่แตกใหม่ของต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 7.5 กิ่งต่อต้น น้อยกว่าค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีที่ใช้สารละลาย EMS 0.02 เปอร์เซ็นต์ ที่ 13 กิ่ง ต่อต้น (ตารางที่ 4.17) ส่งผลให้ขนาดทรงพุ่มของต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS มีขนาดเล็กกว่าต้นเบญจมาศที่ใช้สารละลาย EMS 0.02 เปอร์เซ็นต์เล็กน้อย (ภาพที่ 4.18)

ปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS และต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณคลอโรฟิลล์ใกล้เคียงกัน และมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.17) ใบจากต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS และต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะรูปทรงเหมือนกัน และมีความเขียวของใบใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.19)

ตารางที่ 4.16 อัตราการเจริญเติบโตด้านขนาดของลำต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากย้ายปลูกได้ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสาร EMS (%)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น (mm.)			
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6
0.00	1.47 ± 0.27	3.85 ± 0.60	5.71 ± 0.67	8.05 ± 0.59
0.02	1.30 ± 0.18	4.10 ± 0.81	5.90 ± 1.17	8.20 ± 0.98
0.04	-	-	-	-
0.06	-	-	-	-
0.08	-	-	-	-
0.10	-	-	-	-
F-Test	ns	ns	ns	ns
CV(%)	11.64	15.62	16.96	9.97

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's multiple range test, ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 4.17 จำนวนตาข้าง และ คลอโรฟิลล์ จากใบของเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ได้รับสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากย้ายปลูกได้ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสาร EMS(%)	จำนวนตาข้างที่ แตกใหม่	Chlorophyll A ($\mu\text{g/g}$)	Chlorophyll B ($\mu\text{g/g}$)	Total chlorophyll ($\mu\text{g/g}$)
0.00	7.5 \pm 2.44 B	40.29 \pm 16.93 B	42.41 \pm 11.47 A	82.73 \pm 17.69
0.02	13 \pm 4.00 A	58.61 \pm 14.07 A	25.87 \pm 7.19 B	84.49 \pm 21.18
0.04	-	-	-	-
0.06	-	-	-	-
0.08	-	-	-	-
0.10	-	-	-	-
F-Test	**	**	**	ns
CV(%)	18.20	21.40	20.97	16.76

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's multiple range test, ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, ** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.18 แสดงลักษณะต้นเบญจมาศพันธุ์ Canter ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากย้ายปลูกได้ 6 สัปดาห์; (A) ชุดควบคุม; (B) 0.02 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.19 แสดงขนาดและรูปร่างของใบจากต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อหลังจากย้ายปลูกได้ 6 สัปดาห์; (A) ชุดควบคุม; (B) 0.02 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ได้รับสารละลาย EMS สามารถแบ่งลักษณะของดอกตามที่ได้พบได้ 2 รูปแบบ และเปอร์เซ็นต์รูปแบบของดอกที่พบได้ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.18)

รูปแบบที่ 1 ดอกประเภท single มีกลีบดอกซ้อนกันสีม่วงเข้ม กลีบดอกสมบูรณ์ มีลักษณะห่อเล็กน้อย กลีบดอกชั้นในสีเหลืองไม่พัฒนา และกระจุกอยู่ใจกลางดอก (ภาพที่ 4.20A)

รูปแบบที่ 2 ดอกประเภท single คือลักษณะมีรอยด่างสีขาวกระจายอยู่ทั่วกลีบดอก มีสีม่วงอ่อน กลีบดอกชั้นในสีเหลืองไม่พัฒนา และกระจุกอยู่ใจกลางดอก (ภาพที่ 4.20B)

ตารางที่ 4.18 รูปแบบของดอกเบญจมาศที่พบในต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter หลังจากได้รับสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากย้ายปลูกในกระถาง

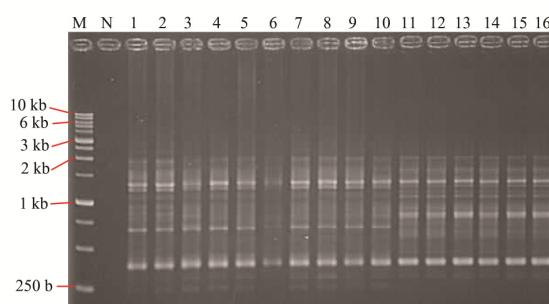
ความเข้มข้นของสารละลาย EMS (%)	รูปแบบของดอก จำนวนต้นที่พบ ต่อจำนวนต้นทั้งหมด (%)	
	รูปแบบที่ 1	รูปแบบที่ 2
0	30/30 (100)	-
0.02	9/11 (81.82)	2/11 (18.18)
0.04	-	-
0.06	-	-
0.08	-	-
0.10	-	-



ภาพที่ 4.20 ลักษณะของดอกเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อหลังย้ายปลูกในกระถาง; (A) รูปแบบที่ 1; (B) รูปแบบที่ 2

4.3.1.3 ผลการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยเทคนิค RAPD

จากการนำไพรเมอร์ RAPD จำนวน 28 ชนิดมาใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ทั้ง 16 ตัวอย่าง พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 16 ชนิดที่สามารถจำแนกความแตกต่างของ DNA กับตัวอย่างเบญจมาศที่นำมาใช้ได้ คือ OPA-01, OPA-05, OPA-07, OPA-15, OPB-04, OPB-07, OPF-06, OPF-07, OPF-09, OPF-11, OPF-13, OPF-15, OPF-17, OPF-18, OPF-19 และ OPF-20 (ตารางที่ 4.19) จากภาพที่ 4.21 เป็นการใช้ไพรเมอร์ OPF-15 เพื่อตรวจสอบต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ได้รับสารละลาย EMS พบว่ามีความแตกต่างที่ DNA ขนาดประมาณ 600 bp และ 800 bp



ภาพที่ 4.21 แสดงผลของแถบ DNA ของเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ในสภาพปลอดเชื้อที่ได้รับสารละลาย EMS ที่เพิ่มจำนวนได้ของการใช้ไพรเมอร์ OPF-15; (M) 1kb ; (N) negative control ; (1-11) 0.02 เปอร์เซ็นต์; (12-16) 0 เปอร์เซ็นต์

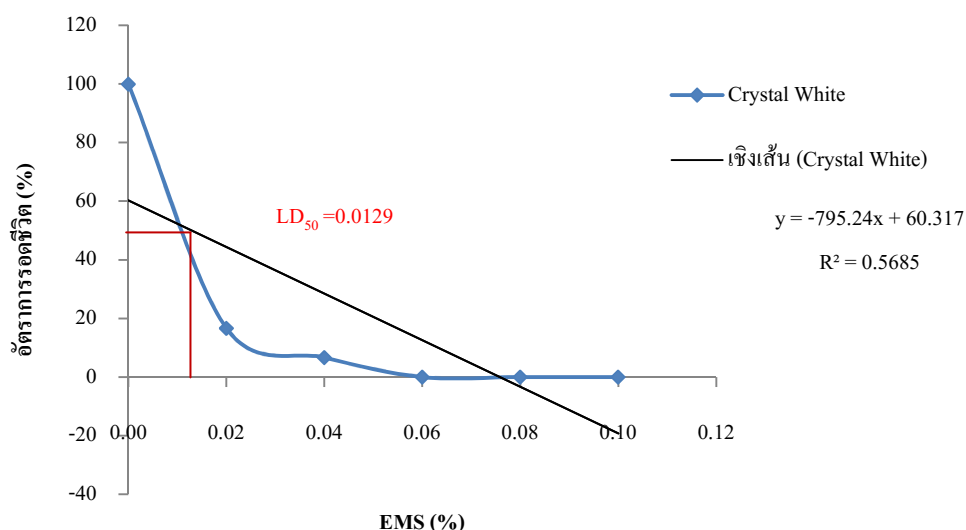
ตารางที่ 4.19 ขนาดของแถบ DNA ที่พบว่ามีความแตกต่างของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter หลังจากได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อ

Primer	ขนาดของแถบ DNA ที่พบว่ามีความแตกต่าง	Primer	ขนาดของแถบ DNA ที่พบว่ามีความแตกต่าง
OPA-01	~1,400 bp, ~2,000 bp	OPF-09	~1,100 bp
OPA-05	~1,300 bp	OPF-11	~450 bp, 1,000 bp
OPA-07	~800 bp	OPF-13	~1,400 bp
OPA-15	~800 bp	OPF-15	~600 bp, ~800 bp
OPB-04	~700 bp, ~1,000 bp	OPF-17	~750 bp
OPB-07	1,000 bp	OPF-18	~1,000 bp
OPF-06	~550 bp	OPF-19	~800 bp
OPF-07	~800 bp	OPF-20	~1,100 bp

4.3.2 การชักนำให้เกิดการกลายด้วยสาร EMS ในเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white (ดอกประเภท single สีขาว) ในสภาพปลอดเชื้อ

4.3.2.1 อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนข้อเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ต่อสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อ

หลังจากนำชิ้นส่วนข้อของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ครบตามเวลาที่กำหนดแล้วมาเลี้ยงต่อบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนข้อที่แช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.1, 0.08 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ ตายทั้งหมด ที่ระดับความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิตเพียง 6.67 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิต 16.67 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้เส้นแนวโน้มมีความชันมาก ค่า LD_{50} ของสารละลาย EMS ต่อชิ้นส่วนข้อเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white จึงอยู่ที่ 0.0129 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.22) หลังจากนั้นทำการย้ายปลูกเพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา



ภาพที่ 4.22 อัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของชิ้นส่วนข้อเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 8 ชั่วโมง หลังจากเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 1 สัปดาห์

4.3.2.2 การเจริญเติบโตหลังจากการย้ายปลูกของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อ

หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อจนอายุครบ 4 สัปดาห์ หรือได้ต้นกล้าขนาดความสูงประมาณ 4 เซนติเมตร จึงนำออกมาปลูกทดสอบในกระถาง พบว่าต้นที่รอดจากการได้รับสาร EMS ยังคงมีการเจริญเติบโตที่ปกติและมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นเรื่อยๆ ในสัปดาห์ที่ 0 ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์มีความสูงมากที่สุดทางสถิติ แต่โดยรวมแล้วค่าเฉลี่ยความสูงของต้นกล้ายังเกาะกลุ่มอยู่ที่ 4.6- 4.8 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 2 ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ยังคงมีความสูงมากที่สุดทางสถิติ และยังมีการเจริญเติบโตที่เร็วกว่าต้นเบญจมาศจากกรรมวิธีอื่นๆ ในสัปดาห์ที่ 6 ความสูงของต้นเบญจมาศที่ได้รับสาร EMS จะมีความสูงประมาณ 23-24 เซนติเมตร ในขณะที่ชุดควบคุมมีความสูงประมาณ 23 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.20)

ตารางที่ 4.20 อัตราการเจริญเติบโตด้านความสูงของทรงพุ่มเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อหลังจากย้ายปลูกได้ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสาร EMS (%)	ความสูงของทรงพุ่ม (cm.)			
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6
0.00	4.59 ± 0.39 B	9.76 ± 1.12 B	14.52 ± 2.05 B	22.88 ± 2.26 B
0.02	4.73 ± 0.39 AB	9.63 ± 1.26 B	15.28 ± 1.49 AB	24.75 ± 2.30 A
0.04	4.85 ± 0.49 A	10.40 ± 1.70 A	15.70 ± 0.99 A	22.80 ± 0.42 B
0.06	-	-	-	-
0.08	-	-	-	-
0.10	-	-	-	-
F-Test	**	**	*	**
CV(%)	4.70	6.06	6.99	5.12

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's multiple range test, * มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์, ** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

การเจริญเติบโตทางขนาดของลำต้นเมื่อวัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น พบว่าต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.02 และ 0.04 เปอร์เซ็นต์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นมากกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของต้นเบญจมาศในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.21) ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตด้านความสูงของต้นเบญจมาศ แต่เมื่อพิจารณาจำนวนตาข้างที่แตกใหม่ จะเห็นได้ว่าจำนวนตาข้างของเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์มีจำนวนตาข้างน้อยที่สุด (ตารางที่ 4.22)

ปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.22) ทั้งนี้เพราะว่ามีต้นเบญจมาศ 1 ต้นภายในความเข้มข้นดังกล่าว มีปริมาณคลอโรฟิลล์ 68.45 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสด เห็นได้ว่า สีของใบจากต้นเบญจมาศต้นนี้มีสีอ่อนกว่าต้นอื่นๆ (ภาพที่ 4.23 และ ภาพที่ 4.24)

ตารางที่ 4.21 อัตราการเจริญเติบโตด้านขนาดลำต้นของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อหลังจากย้ายปลูกได้ 6 สัปดาห์

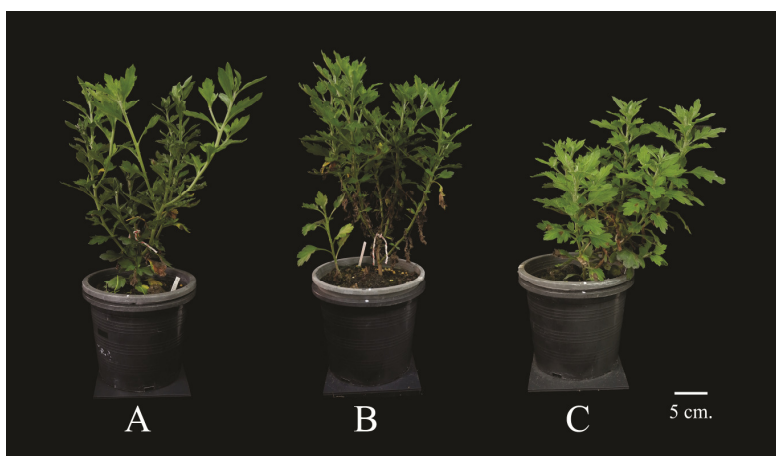
ความเข้มข้นของสาร EMS (%)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น (mm.)			
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6
0.00	1.61 ± 0.26 AB	3.25 ± 0.58 B	5.05 ± 0.87 B	6.87 ± 0.91 B
0.02	1.72 ± 0.16 A	3.11 ± 0.15 B	5.47 ± 0.90 AB	7.66 ± 1.21 A
0.04	1.58 ± 0.22 B	3.60 ± 0.06 A	5.79 ± 0.80 A	7.93 ± 0.98 A
0.06	-	-	-	-
0.08	-	-	-	-
0.10	-	-	-	-
F-Test	**	**	**	**
CV(%)	8.12	8.01	8.52	7.82

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's multiple range test, ** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

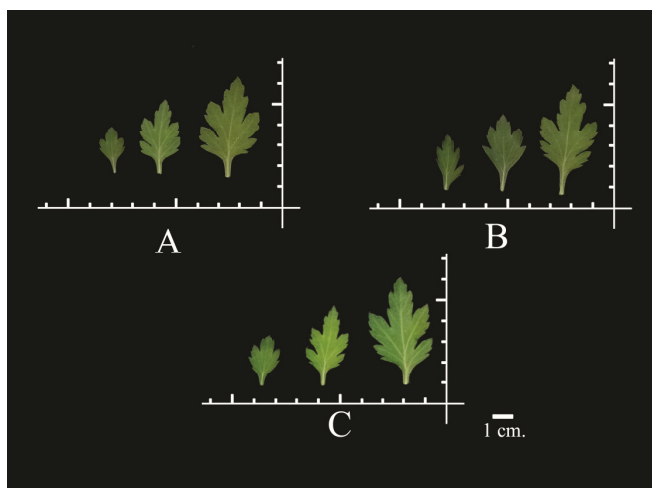
ตารางที่ 4.22 จำนวนตาข้าง และ คลอโรฟิลล์ จากใบของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อหลังจากย้ายปลูกได้ 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสาร EMS (%)	จำนวนตาข้างที่แตก ใหม่	Chlorophyll A ($\mu\text{g/g}$)	Chlorophyll B ($\mu\text{g/g}$)	Total chlorophyll ($\mu\text{g/g}$)
0.00	10.40 \pm 2.41 AB	68.73 \pm 11.74 A	40.68 \pm 16.88 A	109.42 \pm 21.17 A
0.02	11.00 \pm 2.16 A	65.87 \pm 8.27 A	27.99 \pm 4.89 B	93.87 \pm 12.99 B
0.04	9.00 \pm 0.47 B	53.71 \pm 8.51 B	22.97 \pm 3.15 B	76.69 \pm 11.66 C
0.06	-	-	-	-
0.08	-	-	-	-
0.10	-	-	-	-
F-Test	*	**	**	**
CV	23.67	9.57	25.22	10.59

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's multiple range test, * มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์, ** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.23 แสดงลักษณะต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากย้ายปลูกได้ 6 สัปดาห์; (A) ชุดควบคุม; (B) 0.02 เปอร์เซ็นต์; (C) 0.04 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.24 แสดงขนาดและรูปร่างของใบจากต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากย้ายปลูกได้ 6 สัปดาห์; (A) ชดควบคุม; (B) 0.02 เปอร์เซ็นต์; (C) 0.04 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่างๆ สามารถแบ่งลักษณะของดอกตามที่ได้พบได้ 3 รูปแบบและเปอร์เซ็นต์รูปแบบของดอกที่พบได้ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.23)

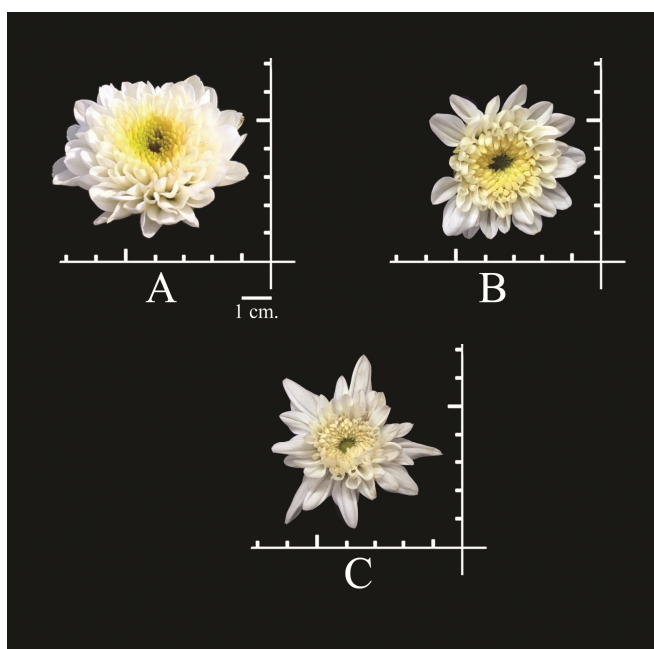
รูปแบบที่ 1 ดอกประเภท single มีกลีบดอกย่อยชั้นนอกสีขาว เรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น กลีบดอกย่อยชั้นในมีสีเหลืองยังไม่บาน (ภาพที่ 4.25A)

รูปแบบที่ 2 ดอกประเภท single มีกลีบดอกย่อยชั้นนอกสีขาว เรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น กลีบดอกย่อยชั้นในมีสีเหลืองยังไม่บาน และเรียงตัวหนาแน่นกว่ารูปแบบที่ 1 (ภาพที่ 4.25B)

รูปแบบที่ 3 ดอกประเภท single มีกลีบดอกย่อยชั้นนอกสีขาว เรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น แผ่นกลีบมีลักษณะม้วนออก กลีบดอกชั้นนอกสุดจะม้วนออกอย่างมาก จนทำให้กลีบดอกมีลักษณะเป็นทรงกรวยแหลม กลีบดอกย่อยชั้นในมีสีเหลืองยังไม่บาน (ภาพที่ 4.25C)

ตารางที่ 4.23 รูปแบบของดอกเบญจมาศที่พบในต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter หลังจากได้รับสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อหลังจากย้ายปลูกในกระถาง

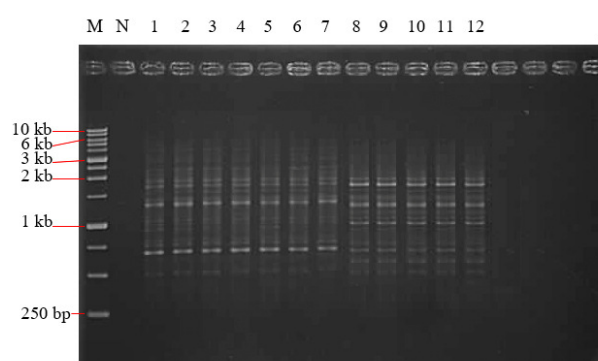
ความเข้มข้นของสารละลาย EMS (%)	รูปแบบของดอก จำนวนต้นที่พบ ต่อจำนวนต้นทั้งหมด (%)		
	รูปแบบที่ 1	รูปแบบที่ 2	รูปแบบที่ 3
0	30/30 (100)	-	-
0.02	3/5 (60)	2/5 (40)	-
0.04	-	1/2 (50)	1/2 (50)
0.06	-	-	-
0.08	-	-	-
0.10	-	-	-



ภาพที่ 4.25 ลักษณะของดอกเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อหลังย้ายปลูกในกระถาง; (A) รูปแบบที่ 1; (B) รูปแบบที่ 2; (C) รูปแบบที่ 3

4.3.2.3 ผลการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยเทคนิค RAPD

จากการนำไพรเมอร์ RAPD จำนวน 28 ชนิดมาใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันในสภาพปลอดเชื้อทั้ง 12 ตัวอย่าง พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 10 ชนิดที่สามารถจำแนกความแตกต่างของ DNA กับตัวอย่างเบญจมาศที่นำมาใช้ได้ คือ OPA-01, OPA-05, OPA-07, OPB-04, OPB-07, OPF-01, OPF-04, OPF-06, OPF-07 และ OPF-18 (ตารางที่ 4.24) จากภาพที่ 4.26 เป็นการใช้ไพรเมอร์ OPB-07 เพื่อตรวจสอบต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS พบว่ามีความแตกต่างที่ DNA ขนาดประมาณ 600 bp และ 1,000 bp



ภาพที่ 4.26 แสดงผลของแถบ DNA ของเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ในสภาพปลอดเชื้อที่ได้รับสารละลาย EMS ที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPB-07; (M) 1kb ;(N) negative control ; (1-7) 0.02 เปรอร์เซ็นต์; (8-12) 0 เปรอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.24 ขนาดของแถบ DNA ที่พบว่ามีความแตกต่างของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white หลังจากได้รับสารละลาย EMS ในสภาพปลอดเชื้อ

Primer	ขนาดของแถบ DNA ที่พบว่ามีความแตกต่าง	Primer	ขนาดของแถบ DNA ที่พบว่ามีความแตกต่าง
OPA-01	~700 bp, ~1,200 bp	OPF-01	~1,000 bp
OPA-05	~1,200 bp	OPF-04	~500 bp, ~1,100 bp
OPA-07	~1,500 bp	OPF-06	~700 bp, ~1,000 bp
OPB-04	~900 bp, ~1,000 bp, ~1,500 bp	OPF-07	~600 bp, ~1000 bp
OPB-07	~800 bp, ~1,300 bp	OPF-18	~2,300 bp

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศพันธุ์ Canter ในกระถาง

5.1.1 การศึกษาการชักนำให้เบญจมาศพันธุ์ Canter เกิดการกลายด้วยสาร colchicine ในกระถาง

ต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า อัตราการรอดชีวิตของต้นกล้ามีแนวโน้มลดลง เมื่อสารละลายมีความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Gantait *et al.* (2011) ที่ทำการทดลองโดยนำปลายยอดของเยอบีร่าแช่ในสารละลาย colchicine ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า อัตราการรอดชีวิตลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากสารละลาย colchicine สามารถแพร่เข้าไปยังส่วนต่างๆ ภายในเซลล์ของพืช ทำให้เกิดความเป็นพิษเมื่อได้รับสารละลายในความเข้มข้นสูง โดยสารละลาย colchicine มีผลทำให้ความหนืดของไซโทพลาสซึมเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้เซลล์เกิดการทำงานผิดปกติ (Dermen. 1940 ; Cook and Loudon. 1952) หรือการชักนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของโครโมโซม ทำให้เสียนิวเคลียสและตายได้ (Distabanjong and Geneve. 1997) การเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศหลังได้รับสารละลาย colchicine ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ขนาดความสูงและความกว้างลำต้นในสัปดาห์ที่ 0 มีความแตกต่างกันทางสถิติ เนื่องจากกระบวนการหยดสารละลาย colchicine กินเวลาทั้งสิ้น 6 วัน ในช่วงระยะเวลาดังกล่าว ต้นกล้าจึงเกิดการเจริญเติบโตได้ตามปกติ ส่งผลให้ในสัปดาห์ที่ 0 ต้นกล้ามีความสูงและขนาดลำต้นแตกต่างกัน

การตรวจสอบขนาดปากใบของต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า มีต้นเบญจมาศเพียง 1 ต้น จากการหยดสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.40 เปอร์เซ็นต์ ที่มีขนาดปากใบใหญ่กว่าต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับสารละลาย เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่างต้นเบญจมาศที่พบว่าปากใบใหญ่กว่าปกติ กับต้นเบญจมาศชุดเดียวกัน (colchicine ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในด้านการเจริญเติบโต และลักษณะของดอก มีแตกต่างกันเพียงลักษณะของใบเท่านั้น แต่เมื่อเปรียบเทียบกับต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับสารละลาย colchicine พบว่า ต้นเบญจมาศที่มีปากใบใหญ่กว่าปกติ มีทรงพุ่มหนาแน่นกว่า และมีรูปทรงใบแตกต่างไปจากต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับสารละลาย colchicine เล็กน้อย จึงสันนิษฐานว่าลักษณะของต้นเบญจมาศดังกล่าวเป็นผลมาจากคุณสมบัติของสารละลาย colchicine ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับการทดลองของ Jian *et al.* (2018) ที่ทำการทดลองโดยใช้สารละลาย

colchicine กับหอมใหญ่ ส่งผลให้หอมใหญ่มีขนาดปากใบใหญ่ขึ้น และ Hosseini *et al.* (2018) ทำการทดลองโดยใช้สารละลาย colchicine กับ ต้นแพงพวยฝรั่ง และพบว่าต้นที่ได้รับสารละลาย colchicine มีขนาดปากใบใหญ่ขึ้น มีรายงานว่า พืชที่ได้รับสารละลาย colchicine แล้วมีการแสดงออกในลักษณะของใบที่ผิดปกติ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของสารละลาย colchicine มีผลทำให้ เช่นการทดลองของ Saikat *et al.* (2011) ทำการทดลองโดยแช่ชิ้นส่วนยอดของต้นเขือบีร่าในสารละลาย colchicine พบว่าต้นเขือบีร่าที่เป็นเตตระพลอยด์ มีขนาดใบ และดอกใหญ่กว่าปกติ และมีก้านชูดอกที่แข็งแรงและยาวกว่าต้นดิพลอยด์ และการทดลองของ Madani *et al.* (2015) ได้ทำการทดลองโดยใช้สารละลาย colchicine กับต้น henbanes (*Hyoscyamus reticulatus* L.) ใบจากต้นเตตระพลอยด์ มีขนาดใหญ่ขึ้น และความหยักของชอกใบหายไป ทั้งนี้ เนื่องจากสารละลาย colchicine จะส่งผลต่อการสร้างไมโครทิวบูล ทำให้เกิดความผิดปกติในการสร้างเส้นใยสปินเดิล และไม่สามารถแยกโครโมโซมในขั้นตอนการแบ่งเซลล์ได้ จึงทำให้เซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นมีจำนวนเพิ่มขึ้นอีก 1 ชุด จึงทำให้เซลล์อาจมีขนาดใหญ่ขึ้น (Ade and Rai. 2010) โดยนิเวศวิทยาสายตัวตามสัดส่วนของโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น การที่เซลล์พืชมีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้อวัยวะต่างๆ ของพืชมีขนาดใหญ่ขึ้นตามไปด้วย เช่นขนาดของ guard cell ของเซลล์ปากใบใหญ่ขึ้น และละอองเกสรตัวผู้ใหญ่ขึ้น แต่อาจจะมีจำนวนลดลงได้ การเกิด polyploidy ยังส่งผลให้พืชมีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ จึงทำให้เกิดดอกช้า การแตกตายน้อยลง มีขนาดผลเล็กลง การแตกหน่อลดลง และรูปร่างของอวัยวะต่างๆ ของพืชมีลักษณะผิดปกติไป เช่นใบหนาขึ้น หรือทรงพุ่มเตี้ยลง หรือความแข็งแรงของฝักได้อีกด้วย (อมรา คัมภีรานนท์. 2546)

จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมเพื่อเปรียบเทียบจำนวนโครโมโซมระหว่างต้นเบญจมาศที่พบว่าปากใบใหญ่กว่าปกติ กับต้นเบญจมาศที่ไม่ได้รับสารละลาย colchicine ยังไม่สามารถเปรียบเทียบจำนวนโครโมโซมได้แน่ชัด จึงไม่สามารถยืนยันได้ว่า ต้นเบญจมาศที่พบว่าปากใบใหญ่กว่าปกติ เกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบ DNA หรือไม่

5.1.2 การศึกษาการชักนำให้เบญจมาศพันธุ์ Canter เกิดการกลายด้วยสาร EMS ในกระถาง

จากการทดลองการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการแช่ต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ในสารละลาย EMS พบว่า ต้นกล้าตายทั้งหมด เนื่องจากการใช้สารละลาย EMS ก่อให้เกิดเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ สารละลายจะต้องแทรกซึมเข้าไปในเซลล์ จึงส่งผลให้เกิดความเสียหายภายในเซลล์ของพืชทำให้ต้นกล้ามีความอ่อนแอ และทนทานต่อสภาพแวดล้อมหรือศัตรูพืชต่ำ ในการทดลองนี้ ต้นกล้าเบญจมาศมีอาการช้ำและเน่าตาย จึงคาดว่าเกิดจากการติดเชื้อโรคพืชที่ปะปนอยู่ในวัสดุปลูกจึงทำให้ต้นกล้าเบญจมาศที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ตายในลักษณะดังกล่าว

5.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศพันธุ์ Crystal white ในกระถาง

5.2.1 การศึกษาการชักนำให้เบญจมาศพันธุ์ Crystal white เกิดการกลายด้วยสาร colchicine ในกระถาง

ต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ผ่านการหยดสารละลาย colchicine ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตสูง ความเข้มข้นของสารละลาย colchicine สูงสุดที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 1.00 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิต 95 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจาก พืชแต่ละชนิดมีความทนทานต่อสารละลายที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของชิ้นส่วนนั้น เช่นชิ้นส่วนที่มีความหนาของชั้นผนังเซลล์มากจะทนทานได้ดีกว่า ยกตัวอย่างเมล็ดสามารถทนทานต่อความเข้มข้นของสารละลาย colchicine ได้มากกว่าชิ้นส่วนกลีบดอกเป็นต้น (รัตนารณ์ เกิดเจริญ, 2555; Abdoli *et al* 2013)

ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 ต้น มีความสูงต้นสูงกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย colchicine แต่เมื่อตรวจสอบปริมาณ DNA ของต้นเบญจมาศที่พบว่ามีความสูงมากกว่าปกติ โดยใช้เครื่อง Flow cytometer พบว่าไม่มีความแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย colchicine อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์ (2550) ได้อธิบายไว้ว่า การใช้สารก่อกลายพันธุ์ในบางกรณีอาจไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากสารก่อกลายพันธุ์มีอำนาจในการทะลุทะลวงต่ำ อาจไม่สามารถทำให้เซลล์เป้าหมายเกิดการกลายพันธุ์ได้ทุกเซลล์ การล้มเหลวในการชักนำ polyploid ด้วยสาร colchicine อาจเป็นผลมาจากสาร colchicine นั้นไม่สามารถผ่านหรือซึมเข้าไปยังกลุ่มเนื้อเยื่อเป้าหมายได้ หรือเนื้อเยื่อเหล่านี้มีความต้านทานต่อสาร colchicine สูง (Dolezel. *et al.* 2007) ชิ้นส่วนที่สามารถชักนำให้เกิด polyploid ได้ดีนั้นควรเป็นส่วนเนื้อเยื่อที่กำลังมีการเจริญเติบโต มีอัตราการแบ่งเซลล์สูง เช่น เมล็ด ต้นกล้า หรือตาอดที่กำลังเจริญเติบโต (Allum *et al.* 2007) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้หยดสารละลายลงบนยอดของต้นกล้าที่หุ้มด้วยสำลี เป็นไปได้ว่า ก้อนสำลีที่หนาเกินไป ประกอบกับต้นกล้าของเบญจมาศนั้นมีใบยอดที่ห่อคลุมยอดไว้อย่างมิดชิด ทำให้สารละลาย colchicine ที่หยดลงไปนั้นไม่สามารถซึมผ่านลงไปถึงยอดอ่อนของต้นกล้าเบญจมาศได้ ลักษณะของต้นที่มีความสูงผิดปกติอาจเป็นผลมาจากการที่มีกิ่งก้านน้อยกว่าต้นอื่นๆ เมื่อได้รับปุ๋ยในปริมาณเท่ากัน ต้นที่มีกิ่งก้านน้อยกว่าจึงได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่ ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตทางลำต้นได้ดีกว่า และมีขนาดของดอกที่ใหญ่กว่าด้วย (Viyachaia *et al.* 2015. Blok and Vermeulen. 2012. Schuch *et al.* 1998)

5.2.2 การศึกษาการชักนำให้เบญจมาศพันธุ์ Crystal white เกิดการกลายด้วยสาร EMS ในกระถาง

จากผลการศึกษาพบต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของแผ่นใบ และลักษณะของกลีบดอก เนื่องจากสารละลาย EMS ทำให้เกิดการเข้าแทนที่คู่เบส โดยการที่มีหมู่เอทิลมาอยู่ในโมเลกุลของ guanine ทำให้มีคุณสมบัติในการเกิด ionization ที่แตกต่างไปจากปกติจึงเกิดการจับคู่เบสที่ผิดปกติไปจากเดิม ซึ่งในตำแหน่งที่เบสมีการเข้าคู่ที่ผิดปกติอาจเป็นตำแหน่งที่ส่งผลถึงรูปร่างลักษณะของใบ หรือดอก จึงทำให้เกิดลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปจากพันธุ์ดั้งเดิม (Berenschot *et al.* 2008, Latado *et al.* 2004)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของเบญจมาศได้ จำนวน 28 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์จากชุดดังกล่าว จำนวน 8 ที่สามารถจำแนกความแตกต่างของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ในการศึกษาครั้งนี้ได้ การใช้เครื่องหมาย RAPD เนื่องจากไพรเมอร์ชนิดหนึ่งๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ RAPD จะจับกับ DNA แบบสุ่ม และกระจายทั่วจีโนม โดยลายพิมพ์ DNA ที่ปรากฏขึ้นเมื่อไพรเมอร์นั้นมีความจำเพาะกับลำดับเบสที่อยู่บน DNA (สุริพร เกตุงาม. 2546) สามารถสรุปได้ว่าต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ได้รับสารละลาย EMS เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับ DNA

5.3 ผลของการชักนำให้เกิดการกลายในเบญจมาศด้วยสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อ

5.3.1 การชักนำให้เบญจมาศพันธุ์ Canter เกิดการกลายด้วยสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อ

จากการใช้ชิ้นส่วนข้อของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ไซในสารละลาย EMS พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย EMS ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปมีผลทำให้ชิ้นส่วนข้อของต้นเบญจมาศเสียหาย และไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากความเข้มข้นของของสารละลาย EMS ที่สูงขึ้นสามารถเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชได้มากกว่าสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำ ประกอบกับชิ้นส่วนข้อของต้นเบญจมาศถูกตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็กๆ ทำให้สารละลาย EMS ซึมผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อได้ง่าย (รังสฤษฎ์ กาวีตะ. 2540) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบหลังจากปลูกทดสอบ พบรอบจุดค้างเล็กๆ จำนวนมากบนกลีบดอกของต้นเบญจมาศ ที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากคุณสมบัติของสารละลาย EMS (Ramezani *et al.* 2017, Khursheed *et al.* 2019)

5.3.2 การชักนำให้เบญจมาศพันธุ์ Crystal white เกิดการกลายด้วยสาร EMS ในสภาพปลอดเชื้อ

จากการใช้ชิ้นส่วนข้อของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Chrystal white แซ่ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0.06 – 0.1 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนเปลี่ยนเป็นสีดำและไม่พัฒนาเป็นต้น และพบว่าสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณคลอโรฟิลล์ต่ำอย่างมีนัยสำคัญ ส่งผลให้ใบของต้นดังกล่าวมีสีอ่อนกว่าต้นเบญจมาศจากชุดควบคุม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงคลอโรฟิลล์เป็นลักษณะบ่งชี้อย่างหนึ่งของพืชที่ได้รับผลกระทบจากสาร EMS (ธัญญาพร สุสานนท์. 2548) เช่น การทดลองของ Lee and Lee (2002) ชักนำการกลายพันธุ์ของข้าวโดยแซ่แคลลัสด้วยสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 10 และ 20 วัน พบว่า มีอาการ ขาดคลอโรฟิลล์อย่างรุนแรง และได้แคลลัสที่มีลักษณะเหือกมากขึ้น และ Svetleva (2004) ทำการทดลองโดยการแซ่เมล็ดถั่วสายพันธุ์ต่าง ในสารละลาย EMS พบว่า ต้นถั่วแต่ละชนิดเกิดการเปลี่ยนแปลงคลอโรฟิลล์แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะของกลีบดอกเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS มีความแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับสารละลาย EMS ซึ่งลักษณะการแสดงออกแบบนี้อาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติของสารละลาย EMS

5.4 การเจริญเติบโต และการสร้างดอกของต้นเบญจมาศ

ในการศึกษาการกลายพันธุ์ต้นกล้าเบญจมาศด้วยสาร EMS และ colchicine ในครั้งนี้ ไม่ได้มีการให้แสงแก่ต้นเบญจมาศในช่วงที่เบญจมาศมีการพัฒนาทางลำต้น เป็นเหตุให้การเจริญเติบโตของลำต้น คุณภาพดอก และก้านช่อดอกไม่สมบูรณ์ เนื่องจากเบญจมาศเป็นพืชวันสั้น การออกดอกจึงขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการรับแสงต่อวัน โดยเบญจมาศจะออกดอกเมื่อมีแสงสั้นลงในหนึ่งวัน กล่าวคือ ต้องควบคุมเบญจมาศให้ได้รับแสงน้อยกว่า 12 ชั่วโมงต่อวัน จึงจะมีการพัฒนาตาดอกเบญจมาศสามารถออกดอกได้เองตามธรรมชาติ ในสภาพความยาววันในช่วงฤดูหนาวของประเทศไทย การปลูกเบญจมาศในฤดูกาลนี้จึงมีการให้แสงไฟขึ้นในเวลากลางคืน เพื่อชะลอการออกดอกและเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญเติบโตทางลำต้นอย่างเพียงพอ เบญจมาศจึงจะสร้างก้านช่อดอกที่แข็งแรงส่งผลให้สามารถสร้างดอกที่สมบูรณ์ได้ (ถกลวรรณ ศิริสวัสดิ์ และคณะ. 2561)

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การหาค่าสารละลาย colchicine ลงบนยอดของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสำลี ส่งผลให้เบญจมาศสายพันธุ์ Canter มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.71 เปอร์เซ็นต์ไม่พบความเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา แม้ว่าจะพบต้นเบญจมาศที่มีขนาด guard cell ใหญ่กว่าชุดควบคุมจากการใช้สารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมยังสามารถยืนยันความแตกต่างของลักษณะทางสายพันธุ์ได้ เนื่องจากยังไม่สามารถหาวิธีการ และระยะการแบ่งตัวของเซลล์ที่เหมาะสมในการตรวจนับโครโมโซมได้

การหาค่าสารละลาย colchicine ลงบนยอดของต้นกล้าเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ไม่สามารถคำนวณหาค่า LD₅₀ ได้ เนื่องจากต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ และถึงแม้จะพบต้นเบญจมาศที่มีลักษณะลำต้นยืดยาวผิดปกติไปจากการใช้สารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แต่ผลจากการตรวจสอบปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Flow cytometry ได้ยืนยันว่าต้นที่มีลักษณะยืดยาวดังกล่าว มีปริมาณ DNA ไม่แตกต่างกัน

การแช่ต้นกล้าของเบญจมาศสายพันธุ์สายพันธุ์ Crystal white ลงในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 8 ชั่วโมงในสภาพแปลง พบว่าต้นกล้ามีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุดที่ 56.62 เปอร์เซ็นต์ มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.11 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ต้นกล้าเบญจมาศเกิดลักษณะของดอกที่เปลี่ยนแปลงไป 2 รูปแบบ และเฉพาะความเข้มข้น 0.08 เปอร์เซ็นต์ พบลักษณะของใบที่เปลี่ยนไป 1 รูปแบบ จากการตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์ด้วยเครื่องหมาย RAPD จำนวน 28 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 8 ชนิด ที่สามารถแยกความแตกต่าง DNA กับตัวอย่างเบญจมาศที่นำมาใช้ได้

การแช่ชิ้นส่วนของต้นกล้าของเบญจมาศสายพันธุ์ Canter และสายพันธุ์ Crystal white ลงในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 8 ชั่วโมงในสภาพปลอดเชื้อ และทำการเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนของเบญจมาศทั้ง 2 สายพันธุ์มีการตอบสนองที่คล้ายคลึงกัน โดยชิ้นส่วนของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Canter ที่ค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.018 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายออกปลูกเพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าต้นเบญจมาศสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ มีลักษณะของทรงพุ่ม ขนาดลำต้น ความสูง รูปทรงใบ และขนาดของใบ ไม่แตกต่างกัน แต่พบว่าดอกมีลักษณะแตกต่างกัน 2 ลักษณะ จากการตรวจสอบความแปรปรวนของสายพันธุ์ด้วยเครื่องหมาย RAPD จำนวน 28 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 16 ชนิด ที่สามารถแยกความแตกต่าง DNA กับ

ตัวอย่างเบญจมาศที่นำมาใช้ได้ และชิ้นส่วนของต้นเบญจมาศสายพันธุ์ Crystal white ที่ค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.013 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายออกปลูกเพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าต้นเบญจมาศที่ได้รับสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ มีอาการขาดคลอโรฟิลล์ และพบลักษณะรูปทรงของดอกแตกต่างกัน 3 ลักษณะ จากการตรวจสอบความแปรปรวนของสายพันธุ์ด้วยเครื่องหมาย RAPD จำนวน 28 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 10 ชนิด ที่สามารถแยกความแตกต่าง DNA กับตัวอย่างเบญจมาศที่นำมาใช้ได้

บรรณานุกรม

- ห้องสมุดความรู้การเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 2557. **เบญจมาศ**. [Online]. Available: <http://www.doae.go.th/library/html/detai/banja/index.htm>
- กันยารัตน์ ไชยสุด. 2532. **เซลล์พันธุศาสตร์และอนุกรมวิธานพืชสกุล *Zephyranthes***. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ: 260 น.
- ชบา อ่ำรำไพ และ กันยารัตน์ ไชยสุด. 2527. **การชักนำให้เกิดโพลีพลอยดีในแพงพวยฝรั่ง**. เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการทางพันธุศาสตร์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: ชมรมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย
- ชัชวาลย์ เรื่องประพันธ์. 2543. **สถิติพื้นฐาน (ฉบับปรับปรุง ครั้งที่ 5)**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- ชัยฤกษ์ ยัฒนพันธ์. 2525. **เซลล์พันธุศาสตร์**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ: 205 น.
- ถกลวรรณ ศิริสวัสดิ์ ปริญา จันทศรี ปาจริย์ ฉัตรทอง ชัชวาล ชัยชนะ และสุวิทย์ วงศ์ศิลา. 2561. “การให้แสงจากหลอดไดโอดเปล่งแสงคั่นในเวลากลางคืนเพื่อควบคุมการออกดอกของเบญจมาศ.” วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 49(พิเศษ): 303-306.
- ธัญญาพร สุสานนท์. 2548. **การกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโนผ่านการชักนำด้วยเอทิลมีเทนซัลโฟเนต**. วารสารสงขลานครินทร์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 27: 675-682.
- นพพร สายัมพล. 2543. **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 261 น.
- นิธิยา รัตนานพนธ์ และ ดนัย บุญเกียรติ. 2537. **การปฏิบัติภายหลังการเก็บเกี่ยวดอกไม้**. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 72-141 น.
- บุญหงษ์ จงคิด. 2548. **หลักและเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ: 186 น.
- พิสุทธิ์ นัยริยสัง. 2553. **โรคและแมลง ศัตรูพืชที่สำคัญ**. เชียงใหม่: สวนสัตว์แมลงสยาม (SIAMINSECT - ZOO). 591 น.
- พีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์ม สุภัก มหัทธนพรรค, สุภาภรณ์ กันทะวงศ์, ปริศนา จริยวิฑาวัฒน์ และ ทิพย์มณี ภาระตะศิลป์. 2548. **การใช้สาร EthylMethanesulphonate ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในชวนชม**.
- รังสฤษฏ์ กาวิตะ. 2540. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ
- รัตนภรณ์ เกิดเจริญ. 2555. **การชักนำบัวดินให้เกิดการกลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยรังสีแกมมาและสารโคซิซิน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

- วัลลภ พรหมทอง. 2541. **ได้ดอกยอดฮิตตระกูลคอมโพสิเต้**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มติชน.
- เสริญพงศ์ เลขะวัฒนะ. 2548. **การผลิตเบญจมาศตัดดอก. พิมพ์ครั้งที่ 1**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์แห่งประเทศไทย.
- สมชาย สุคนธ์สิงห์. 2550. **คู่มือการผลิตไม้ตัดดอกเบญจมาศ**. กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 6 น.
- สมโชค รักยารัก. 2545. **การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และการขยายพันธุ์อัญชันในสภาพปลอดเชื้อ**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 122 น.
- สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2540. **การกลายพันธุ์ของพืช**. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 197 น.
- อดิศร กระแสชัย. 2539. **การปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกโดยวิธีการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 265 น.
- อมรา คัมภีรานนท์. 2546. **พันธุศาสตร์ของเซลล์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
- Auld, D. L., M. D. Ethridge, J. K., Deverand P. D. Dotray. 1998. "Chemical mutagenesis atoolincottonimprovement." **Proceedings of the Beltwide Cotton Conference**. 63 : 550-552.
- Abdoli, M., A. Moieni and H. N. Badi. 2013. "Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicines-induced tetraploid of *Echinacea urpurea* (L.)" **Acta Physiol Plant** 35: 2075-2083.
- Allum, J.F., Bringloe, D.H., Roberts, A.V. 2007. "Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: The effects of node length, oryzalin concentration and exposure time." **Plant Cell Reports** 26: 1977-1984
- Berenschot, A. S., Zucchi, M. I., Neto, A. T. and Quecini, V. 2008. "Mutagenesis in *Petunia x hybrid* Vilm. And isolation of novel morphological mutant." **Brazilian Journal of Plant Physiology** 20: 95-103.
- Blok, C. and Vermeulen, T. 2012. "Systems design methodology to develop chrysanthemum growing systems." **Acta Horticulturae** 927: 865-878
- Cook, J.W. and L. D. Loudon. 1952. Colchicine. **The Alkaloid Chemistry and Physiology**. 2: 261-329.
- Dermen, H. 1940. Colchicine polyploidy and technique. **The Botanical Review**. 6: 599-635.

- Distabanjong, K. and Geneve, R. 1997. "Multiple shoot formation from cotyledonary node segments of Eastern redbud". **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 47:247–254.
- Dolezel, J., Greilhuber, J., Suda J. 2007. Flow cytometry with plant cells. **Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA**, Weinheim
- Dutt, M., Vasconcellos, M., Song, K. J., Gmitter, F.G. Jr. and Grosser, J. W. 2010. "In vitro Production of Autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures". **Euphytica.** 173: 235-242.
- Fernandes de Oliveira, M., Villas Bôas de Campos Leite, R. M., Rodrigues Castiglioni, V. B., Lopes de Farias Neto, A., Arrabal Arias, C. A., Gontigo Mandarino, J. M. 1997. "Mutation breeding in sunflower (*Helianthus annuus* L.) for disease resistance and oil content." **IAEA TECDOC.**1369: 153-164
- Gantait, S., Mandal, N., Das, P.K. 2011. "In vitro accelerated mass propagation and *ex vitro* evaluation of *Aloe vera* L. with aloin content and superoxide dismutase activity." **Natural Product Research.** 25: 1370-1378
- Gao, R., Wang, H., Dong, B., Yang, X., Chen, S., Jiang, J., Zhang, Z., Liu, C., Zhao, N. and Chen, F. 2016. "Morphological, Genome and Gene Expression Changes in Newly Induced Autopolyploid *Chrysanthemum lavandulifolium* (Fisch. ex Trautv.) Makino". **Molecular Sciences.** 17: 10.
- Hosseini, H.R., Chehrazi, M., Nabati A.D. and Mahmoodi, S.M. 2018. "Colchicine-induction autotetraploidy and altered plant cytogenetic and morpho-physiological traits in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don." **Advances in Horticultural Science** 32(2): 229-238.
- Hu, J., Gao, X., Liu, J., Xie, 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 markers." **Botanical Studies** 49: 189-197.
- Jian, R., Xiaoxu, W., Ce, S., Yu, L., Wenzheng, G. and Yong, W. 2018. "Induction of Polyploid Tillered Onion using Colchicine and Pendimethalin." **Sains Malaysiana** 47(11): 2617-2624.
- Kapdiya, D. B., Chawla, S. L., Patel, A.I. and Ahlawat, T. R. 2014. "Exploitation of variability through mutagenesis in *Chrysanthemum Morifolium* Ramat.)var. maghi." **The Bioscan** 9(4): 1799-1804.

- Khursheed, S., Raina, A., Parveen, K. and Khan, S. 2019. "Induced phenotypic diversity in the utagenized populations of fababean using physical and chemical mutagenesis." **Journal of the Saudi Society of Agriculture Sciences** 18(2019): 113-119.
- Latado, R. R., A. H. Adames and A. T. Neto. 2004. "In vitro mutation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) with ethylmethanesulphonate (ems) inimmature floral pedicels." **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 77: 103 – 106.
- Lee, J.H., Lee, S.Y. 2002. "Selection of stable mutants from cultured rice anthers treated with ethyl methane sulfonic acid" **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 71(2): 165-171
- Liu, Z. and Gao, S. 2007. "Micropropagation and induction of autotetraploid plants of *Chrysanthemum Cinerariifolium*(Trev.)vis." **In Vitro Cellular & Development Biology – plant** 43: 404-408.
- Madani, H., Hosseini, B., Dehghan, E., Rezaei-chiyaneh, E. 2015. "Enhanced production of scopolamine in induced autotetraploid plants of *Hyoscyamus reticulatus* L." **Acta Physiol Plant** 37: 55
- Martin, C., Uberhuaga, E. and Perez, C. 2002. "Application of RAPD markers in the characterisation of Chrysanthemum varieties and the assessment of somaclonal variation" **Euphytica** 127: 247-253
- Miyoshi, K. and N. Asakura. 1996. "Callus induction, regeneration of haploid plant and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera (*Gerbera jamesonii*)." **Plant Cell Report** 16: 1-5
- Molnar, E., Petho, D. R. and Bocsi, R. 2013. "Solid-Liquid Extraction of Chlorophyll from Microalgae from Photoautotroph Open-Air Cultivation." **Hungarian Journal of Industry and Chemistry Veszprem** 41(2): 119-122
- Murashige, T. and Skoog F. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture." **Physiologia Plantarum** 15: 473 – 497.
- Nilanthi, D., Chen, X. L., Zhao, F. C., Yang, Y. S. and Wu, H. 2009. "Induction of tetraploids from petiol explant sthrough colchicine streatments in *Echinacea purpurea* L." **Journal of Biomedicineand Biotechnology** Vol. 2009
- Ochatt, J. S. 2006. "Flow cytometry (ploidy determination, cell cycle analysis, DNA nucleus)." **Medicago truncatula handbook** November 2006.

- Pamadevi, K. and Jawaharlal, M. 2011. "Molecular Characterization of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) Mutant using RAPD Analysis." **The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology** 5(1): 42-46
- Ramezani, P., Siavoshi, M., More, A. D., Ebrahimi, M. and Dasan, S. 2017 "Gamma Rays and EMS Induced Flower Collor Mutation in Grasspea (*Lathyrus sativus* Linn.)" **Tarim Bilimleri Dergisi – Journal of Agricultural Sciences** 23: 423-427.
- Rodrigues, F. A., Soares, J. D. R., Santos, R. R., Pasqual, M. and Silva, S. O. 2011. "Colchicine and amiprofos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant" **African Journal of Biotechnology** 10(62): 13476-13481.
- Sahi, N. and Ehsanpour, A.A. 2014. "The effect of ethyl methane sulfonate(EMS) on regeneration and somaclonal variations of Petunia (*Petunia hybrid* VILM)." **Malaysian Applied Biology Journal** 43(1): 91-96.
- Saikat, G., Nirmal, M., Somnath, B. and Prakash, K.D. 2011. "Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv." **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 106: 485-493
- Sajjad, Y., Jaskani, J.J., Mehmood, A., Ahmad, I. and Abbas, H. 2013. "Effect of colchicines on *in vitro* Polyploidy induction in African Marigold (*Tagetes erecta*)." **Pakistan Journal of Botany** 45(3): 1255-1258.
- Schuch, U.K., Redak, R.A., Bethke, J.A. 1998. "Cultivar, fertilizer, and irrigation affect vegetative growth and susceptibility of chrysanthemum to western flower thrips." **Journal of the American Society for Horticultural Science** 123(4): 727-733
- Shirao, T., Ueno, K., Abe, T. and Matsuyama, T. 2013 "Development of DNA markers for identifying chrysanthemum cultivars generated by ion-beam irradiation." **Mol Breeding** 31: 729-735
- Svetleva, D.L. 2004. "Induction of Chlorophyll Mutants in Common Bean Under the Action of Chemical Mutagens ENU and EMS." **Centerl European Agriculture** 5(2): 85-90.
- Takamura, T. and I. Miyajima.1996. "Colchicine induced tetraploid in yellow- flowered cyclamens and their characteristics." **Scientia Horticulturae** 65: 305-312.

- Tejklova, E. 2002. "Curlystem – an induced mutation in flax (*Linum usitatissimum* L.)." **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**. 38: 125-128.
- Thiem, B. and Sliwinska, E. 2003. "Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) *in vitro* cultures." **Plant Science** 164: 129-134.
- Viyachaia, T., Abdullaha, L., Hassana, S. T., Kamarulzamanb, N. H. and Yusofc, W. A. W. 2015 "Development of cut chrysanthemum production in two soilless system." **Agriculture and Agricultural Science Procedia** 5(2015) : 115-121.
- Welsh, j. and McClelland, M. (1990) "Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primer." **Nucleic Acids Research** 18: 7213-7218.
- Ye, Y.M., Tong, J., Shi, X.P., Yuan, W. and Li, G.R.. 2009. "Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid line of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.)." **Scientia Horticulturae** 124: 95-101.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

การเตรียม stock solution ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร 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
Macroelement			(100 เท่า)	
MS1	NH_4NO_3	1,650.00	16.50	100 มิลลิลิตร
MS2	KNO_3	1,900.00	19.00	100 มิลลิลิตร
MS3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	450.00	4.50	100 มิลลิลิตร
MS4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00	3.70	100 มิลลิลิตร
MS5	KH_2PO_4	170.00	1.70	100 มิลลิลิตร
Microelement			(10 เท่า)	
MS6	$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	86.00	8.60	10 มิลลิลิตร
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30	2.23	
	H_3BO_3	6.20	0.62	
	KI	0.83	0.083	
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.025	
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0025	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0025	
Microelement			(10 เท่า)	
MS7	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.30	3.73	10 มิลลิลิตร
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85	2.785	
Organic nutrients			(10 เท่า)	
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	

ตารางภาคผนวกที่ 2 ส่วนประกอบของการเตรียมปฏิกิริยา PCR

สารที่ใช้	ปริมาตร (μ l)
DNA template	1.5
10 μ M Primer	1
2.8 mM dNTP	1.2
50 mM MgCl ₂	0.5
10x buffer	1.2
Taq DNA	0.2
dH ₂ O	6.4
Total	12.5

ตารางภาคผนวกที่ 3 การตั้งค่าอุณหภูมิ เวลา และรอบการทำงานของเครื่อง PCR

Program	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	ระยะเวลา	จำนวนรอบ
Pre denaturation	94	2 min	1
Denaturation	94	30 sec	} 35
Annealing	37	30 sec	
Extension	72	1 min	
Final extension	72	7 min	1

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายอนันต์ เลิศสุทธิवाल
วัน เดือน ปีเกิด	29 พฤษภาคม พ.ศ. 2534
ที่อยู่ปัจจุบัน	34 ถนนรอบตลาดเทศบาล ตำบลท่าราบ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี 76000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2556สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	Lertsutthichawan, A., Ruamrungsri, S., Duangkongsan, W. and Saetiew, K. Induced Mutation of Chrysanthemum by Colchicine. International Journal of Agricultural Technology 2018 13(7.3): 2325- 2332.