



รายงานการวิจัย

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ด้วยวิธีกลายพันธุ์
(Mutation breeding of orchid)



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ด้วยวิธีกลายพันธุ์ (Mutation breeding of orchid)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา อลิมาณั์ ตันตสวัสดิ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. รศ.ดร. ยุวดี มานะเกษม
2. นางสาวอนรรฆอร วรรณจินดาพร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555
ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2558

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือของเจ้าหน้าที่ และหน่วยงานหลายฝ่าย คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฟาร์มมหาวิทยาลัย และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาการวิจัย รวมทั้งนักศึกษาบัณฑิตศึกษาและผู้ช่วยวิจัยหลายท่านที่ช่วยจัดเตรียมรายงานการวิจัยฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีมา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย



บทคัดย่อ

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากมีความสวยงามและหลากหลายสูง จึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีคุณภาพจึงมีความจำเป็น ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ด้วยวิธีกลายพันธุ์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลด้วยวิธีกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี sodium azide (NaN_3) ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ (1) การก่อกลายพันธุ์ protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลด้วย NaN_3 (2) การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลาย ซึ่งประกอบด้วย 3 การทดลอง คือ 2.1) การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา 2.2) การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ 2.3) การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยวิธีการระดับเซลล์ ซึ่งจากการทดสอบหาความเข้มข้นของ NaN_3 ที่เหมาะสมต่อการก่อกลายพันธุ์ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุล และบันทึกเปอร์เซ็นต์การตายที่ 3 วัน 1 และ 2 สัปดาห์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs เพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ NaN_3 ที่สูงขึ้น โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการก่อกลายพันธุ์ PLBs (LD_{30} และ LD_{50}) ด้วย NaN_3 คือ 0.1 และ 0.5 mM จากการก่อกลายพันธุ์ PLBs ด้วย NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 mM ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนาน 6 เดือน แล้วนำออกไปปลูกในสภาพโรงเรือน พบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์บางต้นมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงคือ ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้นและถี่ ใบสั้น ใบหนา รากสั้น และรากมีจำนวนน้อย แตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่พบเฉพาะลักษณะรากสั้นและรากมีจำนวนน้อย เมื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM จำนวน 24 ต้น เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 10 ต้น พบว่าได้ต้นสายพันธุ์กลายที่มีพันธุกรรมต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 20 ต้น คิดเป็น 83.3 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ inter simple sequence repeats (ISSR) ทั้ง 11 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์ จำนวน 63 แถบ จาก 194 แถบ คิดเป็น 32.3 เปอร์เซ็นต์ และจากการนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมายโมเลกุล ISSR มาใช้ประเมินความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ พบว่า ISSR มีประสิทธิภาพสูงกว่า เนื่องจากมีค่า Mantel's test cophenetic correlation (0.97) สูงกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา (0.79) และมีความสามารถในการจำแนกต้นสายพันธุ์กลายสูงกว่า จากการนับจำนวนโครโมโซมบริเวณปลายราก พบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์มีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 24$ แสดงว่า NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า NaN_3 สามารถก่อกลายพันธุ์ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเครื่องหมายโมเลกุล ISSR เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพ สามารถใช้ในการจำแนกต้นสายพันธุ์กลายได้ตั้งแต่ในระยะแรก ขณะนี้อยู่ระหว่างการปลูกเลี้ยงต้นสายพันธุ์กลายเหล่านี้เพื่อประเมินลักษณะทางพืชสวนต่อไป

ABSTRACT

Orchid is one of the most important economic ornamentals in Thailand. Owing to its beauty and high diversity, there has been a lot of demand domestically and internationally. Therefore, breeding new varieties for high quality is essential. Mutation breeding is an alternative for orchid improvement. The objective of this research was to perform mutation breeding of *Dendrobium* 'Earsakul' using sodium azide (NaN_3) in vitro. The experiment was divided into 2 parts: (1) chemical mutagenesis of *Dendrobium* 'Earsakul' protocorm-like bodies (PLBs) using NaN_3 , (2) selection and evaluation of mutants, which was divided into 3 parts: 2.1) selection and evaluation with morphological characters, 2.2) selection and evaluation with molecular markers, and 2.3) selection and evaluation with cytology method. When percentages of mortality were evaluated at 3 days, 1 and 2 weeks after treatment of *Dendrobium* 'Earsakul' PLBs in various concentrations of NaN_3 , it was found that percentages of mortality of PLBs increased when concentrations of NaN_3 increased. The 30% (LD_{30}) and 50% (LD_{50}) mortality rates were obtained with 0.1 and 0.5 mM NaN_3 , respectively. PLBs were mutagenized at the concentrations of 0, 0.1 and 0.5 mM NaN_3 and cultured for 6 months before being transferred to greenhouse. Morphological alteration has been observed in some putative mutants; dwarf, more and shorter internodes, short and thick leaves, short roots and reduced root numbers, which differed from nonmutagenized controls where only short roots and reduced root numbers were found. When genetic profiles of 24 putative mutants from mutagenesis using 0.1 and 0.5 mM NaN_3 were compared to 10 nonmutagenized controls, altered DNA profiles were found in 20 out of these 24 putative mutants (83.3%). Sixty three polymorphic bands were produced from a total of 194 bands (32.3%) by 11 inter simple sequence repeats (ISSR) primers. Genetic diversity and relatedness were evaluated among NaN_3 mutagenized plants and nonmutagenized controls by means of ISSR analysis and morphological characters. It was found that ISSR offered higher value of Mantel's test cophenetic correlation (0.97) than morphological characters (0.79) and had higher mutant differentiation capability, indicating higher efficiency of ISSR. Counting of chromosome numbers in the root tips showed that NaN_3 mutagenized plants and nonmutagenized controls had the same chromosome number of $2n = 2x = 24$, suggesting that both concentrations of NaN_3 had no effect on chromosome number. These results indicated that NaN_3 can be effectively utilized to mutagenize *Dendrobium* 'Earsakul' PLBs, and ISSR marker is a powerful tool for identification of mutants at an early stage. At present, these identified mutants are being cultured for future evaluation of their horticultural characters.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญตารางภาคผนวก	ช
สารบัญภาพ.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	7
สมมติฐานการวิจัย.....	7
ขอบเขตของการวิจัย.....	8
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	8
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
ส่วนที่ 1 การก่อกลายพันธุ์ protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์เอี้ยสกุลด้วย sodium azide (NaN_3).....	10
ส่วนที่ 2 การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลาย.....	11
2.1 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology).....	11
2.2 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers).....	12
2.3 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยวิธีการระดับเซลล์ (cytology).....	15
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล	
ส่วนที่ 1 การก่อกลายพันธุ์ protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์เอี้ยสกุลด้วย sodium azide (NaN_3).....	17
ส่วนที่ 2 การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลาย.....	19
2.1 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology).....	19
2.2 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers).....	37
2.3 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยวิธีการระดับเซลล์ (cytology).....	50
บทที่ 4 บทสรุป.....	52
เอกสารอ้างอิง.....	53
ภาคผนวก.....	57
ประวัติผู้วิจัย.....	62

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ลำดับเบส และอุณหภูมิ annealing ของไพรเมอร์ ISSR.....	13
2 ผลของระดับความเข้มข้นของสารละลาย NaN_3 ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs ที่ระยะเวลาต่างกัน.....	18
3 ดัชนีการเจริญเติบโตของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน.....	20
4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน.....	21
5 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน.....	29
6 การมี (+) หรือไม่มี (-) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน.....	30
7 แมทริกซ์ความคล้ายคลึงกัน (similarity matrix) ทางลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น.....	34
8 ดัชนีการเจริญเติบโตของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 1 ปี.....	36
9 ลำดับไพรเมอร์ อุณหภูมิ annealing จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มี ความหลากหลาย (polymorphic) เปอร์เซ็นต์ของความหลากหลาย (polymorphism) และขนาด แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุล ISSR สำหรับวิเคราะห์ต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control).....	38
10 การมี (+) หรือไม่มี (-) แถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์จากไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับ	

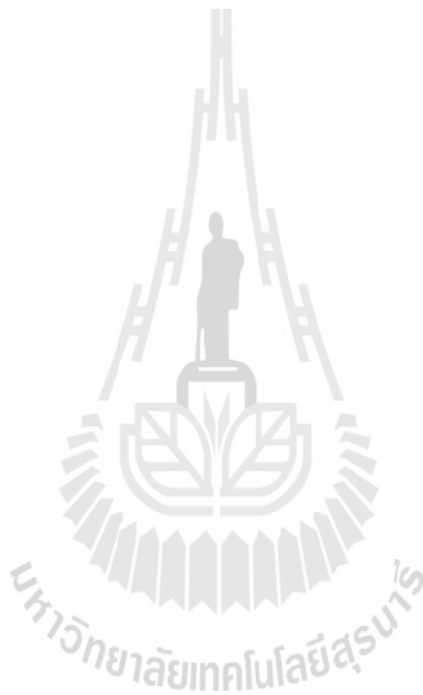
สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล.....	40
11 แมทริกซ์ความคล้ายคลึงกัน (similarity matrix) ทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น.....	48
12 จำนวนโครโมโซมของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่ได้จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control).....	51



สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
1 ดัชนีการเจริญเติบโตของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุล.....	58
2 ค่าการวิเคราะห์หาเรียนซ์ของระดับความเข้มข้นของสารละลาย NaN_3 ต่อเปอร์เซ็นต์ การตายของ PLBs ที่ระยะเวลาต่างกัน.....	61



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ NaN_3 และเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs ที่ระยะเวลา 3 วัน 1 และ 2 สัปดาห์.....	18
2 ลักษณะ PLBs ที่แช่ในน้ำ RO, 0, 0.1 และ 0.5 mM NaN_3 เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์.....	19
3 Dendrogram ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) โดย UPGMA cluster analysis ด้วยโปรแกรม NTSYSp2.2.....	32
4 แผนภาพ 3 มิติ แสดง Principle coordinate 3 แกนแรก จาก Principle coordinate analysis (PCoA) ของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control).....	33
5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M14-M23) จำนวน 15 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 8 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 1 ปี.....	36
6 รูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมายโมเลกุล ISSR 840 ของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับ 1 Kb plus DNA marker.....	39
7 Dendrogram ของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลจากเครื่องหมายโมเลกุล ISSR ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control).....	46
8 Principle coordinate analysis (PCoA) แบบ 3 มิติของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล จากเครื่องหมายโมเลกุล ISSR ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control).....	47

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ประเทศไทยมีพื้นที่ซึ่งมีความแตกต่างทางภูมิศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และความหลากหลายทางชีวภาพสูง เนื่องจากตั้งอยู่ในเขตพฤษภูมิศาสตร์ (plant geographic region) ของโลกถึง 3 เขต แต่ละเขตประกอบไปด้วยกล้วยไม้ (orchid; Orchidaceae) ที่มีความโดดเด่นแตกต่างกัน ส่งผลให้มีความหลากหลายของกล้วยไม้มากที่สุดแห่งหนึ่งของโลก สามารถพบกล้วยไม้ได้ตามธรรมชาติ ทั้งในป่าผลัดใบและไม้ผลัดใบ ปัจจุบันมีการสำรวจพบกล้วยไม้ในประเทศมากกว่า 1,154 ชนิด 174 สกุล กล้วยไม้ที่พบมากที่สุด คือสกุลหวาย (*Dendrobium*) มีประมาณ 184 ชนิด (สลิล สิทธิธรรม และนฤมล กฤษณชาติ, 2550) ซึ่งแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปตามลักษณะของสี และรูปร่างกลีบดอก สำหรับเอียสกุล (*Den. Earsakul*) ซึ่งพัฒนาสายพันธุ์มาจากพ่อแม่ *Den. Sonia Jo Daeng* มีลักษณะประจำพันธุ์ที่โดดเด่นคือ สีพื้นกลีบดอกเป็นสีขาวปนม่วง ปากดอกสีขาว พอร์มดอกทรงเหลี่ยม อย่างไรก็ตาม กล้วยไม้จัดเป็นพืชหลายฤดู อยู่ในจำพวกใบเลี้ยงเดี่ยว สามารถแบ่งลักษณะการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ออกเป็น 2 ประเภทคือ การเจริญเติบโตทางปลายยอด (monopodial vegetative) เป็นลักษณะการเจริญเติบโตของส่วนยอดที่ไม่จำกัด คือ มีเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่สามารถเจริญได้อย่างไม่สิ้นสุด และสามารถสร้างเนื้อเยื่อเจริญใหม่ขึ้นที่ด้านข้างได้ ได้แก่ สกุลฟ้ามุ่ย สกุลช้าง สกุลเข็ม สกุลแว่นดำ และการเจริญเติบโตทางด้านข้างของลำต้น (sympodial vegetative) เป็นลักษณะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีอยู่อย่างจำกัด แต่สร้างเนื้อเยื่อเจริญใหม่จากจุดเจริญที่ด้านข้างของลำต้น และจะสร้างยอดใหม่ในช่วงฤดูกาลที่เหมาะสมเท่านั้น ต้นที่สร้างขึ้นใหม่นั้น อาจเกิดชิดกับลำต้นหรือลำลูกกล้วยเดิม ทำให้มีลักษณะเป็นกอแน่น ได้แก่ สกุลกระแจะร้อน สกุลแคทลียา สกุลออนซิเดียม และสกุลหวาย เป็นต้น (สลิล สิทธิธรรม, 2550)

กล้วยไม้สกุลหวายจัดเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีความสวยงาม และได้รับความนิยมเป็นอันดับหนึ่งของไม้ดอกไม้ประดับที่มีอยู่ในปัจจุบัน ในขณะที่เดียวกันก็เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากได้รับความนิยมทั้งภายในและภายนอกประเทศ มีการส่งออกไปยังประเทศต่าง ๆ เช่น ญี่ปุ่น อเมริกา อิตาลี จีน และอินเดีย ฯลฯ สามารถทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2557) ซึ่งในปัจจุบันประเทศไทยยังคงเป็นประเทศผู้ส่งออกกล้วยไม้สกุลหวายตัดดอกมากเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก นอกเหนือจากยุโรป ฮาวาย ญี่ปุ่น ไต้หวันและสิงคโปร์ มีแนวโน้มขยายตัวทางเศรษฐกิจอย่างต่อเนื่อง (Luan et al., 2006) อย่างไรก็ตาม การที่กล้วยไม้ตัดดอกเป็นที่นิยมปลูกเพื่อการส่งออกนั้น เนื่องจากดอกกล้วยไม้มีสีสันและลวดลายสวยงาม รูปร่างดอกแปลกตา ซอดอกมีอายุการใช้งานได้นาน อีกทั้งสามารถปลูกและดูแลรักษาง่าย ต้นเจริญเติบโตได้ดี ออกดอกตลอดปี ทนต่อสภาพอากาศ สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย ประเทศไทยมีการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สกุลหวายตัดดอกอย่างครบวงจร ตั้งแต่การผสมเกสร

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เลี้ยงลูกกล้วยไม้ เลี้ยงต้นกล้าจนกระทั่งให้ดอก ตัดดอกบรรจุหีบห่อ และส่งออกไปยังต่างประเทศ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2557) แม้ว่าการส่งออกกล้วยไม้ไทยต้องแข่งขันกับหลายประเทศ เช่น สิงคโปร์ มาเลเซีย ไต้หวัน และนิวซีแลนด์ อีกทั้งยังต้องแข่งกับไม้ตัดดอกประเภทอื่น โดยเฉพาะดอกเบญจมาศ จากเนเธอร์แลนด์และมาเลเซีย หรือดอกกุหลาบและลิลลี่จากอินเดียและเกาหลีใต้ แต่เนื่องจากกล้วยไม้ของประเทศไทยมีความหลากหลาย โดดเด่นทั้งสีกลิ่นและรูปร่างดอก จึงยังเป็นที่นิยมและชื่นชอบของคนทั่วโลก (มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2551)

จากความต้องการกล้วยไม้สกุลหวายทั้งภายในและภายนอกประเทศที่เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งเพื่อให้ประเทศไทยสามารถแข่งขันทางการตลาดกับประเทศอื่นได้อย่างต่อเนื่องและยั่งยืน การพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ให้มีลักษณะดีเด่น เป็นที่ต้องการของตลาดจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นประเทศไทยจึงมีการศึกษาวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายอย่างต่อเนื่อง ทั้งการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายให้มีความหลากหลายหรือการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มคุณภาพในการส่งออก เช่น ให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีความแปลกของรูปร่างดอก สีดอก และขนาดดอก สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้นานเพื่อการส่งออก อีกทั้งมีความสามารถในการต้านทานโรคแบบยั่งยืน (วิยดา เทพหัตถิ และคณะ, 2546)

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม (conventional breeding) พันธุวิศวกรรม (genetic engineering) และการกลายพันธุ์ (mutation) ในอดีตจนถึงปัจจุบันนิยมใช้การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม คือการผสมพันธุ์ระหว่างพ่อแม่ที่มีลักษณะเสริมกัน และ/หรือมีลักษณะดีเด่นตามที่ต้องการ จากนั้นจึงคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะที่ต้องการหรือลักษณะแปลกใหม่ ซึ่งจำเป็นต้องคัดเลือกลูกผสมจำนวนมาก เพื่อให้ได้ลูกผสมที่ดีที่สุดหรือมีลักษณะตามที่ต้องการ วิธีการนี้เป็นที่นิยมในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เป็นอย่างมาก สามารถทำได้ทั้งภายในสปิซิส ข้ามสปิซิส และข้ามจีนัส ข้อดีของวิธีการนี้คือ มีโอกาสได้ลูกผสมที่ดีกว่าพันธุ์พ่อแม่ และได้ลูกผสมที่มีลักษณะหลากหลายจาก genetic recombination สามารถใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต อีกทั้งเป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก เกษตรกรสามารถปรับปรุงพันธุ์ได้เอง แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัดคือ ลูกผสมที่ได้อาจมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมแคบ ซึ่งมาจากอัลลีลที่มีอยู่ในธรรมชาติของพ่อแม่เท่านั้น ส่วนการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีพันธุวิศวกรรมเป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถปรับปรุงลักษณะต่าง ๆ ของพืชได้ตรงตามความต้องการของนักปรับปรุงพันธุ์ เป็นวิธีการถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่พันธุ์กล้วยไม้ที่มีลักษณะดีเด่นอยู่แล้ว เช่น ยีนต้านทานโรค ยีนควบคุมรูปร่าง สีดอก และยีนควบคุมอายุการใช้งาน ซึ่งมีโอกาสได้พันธุ์ที่ดีเด่นกว่าพันธุ์เดิม และ/หรือมีลักษณะแปลกใหม่ที่ไม่พบตามธรรมชาติ เป็นการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมอีกทางหนึ่ง แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ปัจจุบันยังไม่เป็นที่ยอมรับในหลายประเทศ เป็นวิธีการที่สามารถทำได้ในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น อีกทั้งเกษตรกรไม่สามารถใช้วิธีการนี้ได้ เนื่องจากเครื่องมือและสารเคมีมีราคาสูง และต้องใช้ทักษะการวิจัยสูง

ดังนั้นในปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้โดยวิธีการกลายพันธุ์ จึงนับเป็นทางเลือกหนึ่งของนักปรับปรุงพันธุ์ เป็นวิธีการที่มีโอกาสก่อให้เกิดอัลลีลแปลกใหม่ ซึ่งควบคุมลักษณะที่ไม่พบในพ่อแม่พันธุ์มาก่อน ส่งผลให้ได้สายพันธุ์กลายลักษณะใหม่ที่ดีเด่นกว่าเดิมมาก และอาจมีลักษณะบางประการที่ไม่สามารถทำได้จากวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม อย่างไรก็ตาม สามารถนำต้นสายพันธุ์กลายดังกล่าวมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการ

ปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม ส่งผลให้เกิด genetic recombination ในรูปแบบใหม่ ๆ ทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะหลากหลายกว่าเดิมอีกด้วย อีกทั้งวิธีการนี้สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะเพียงบางอย่าง โดยที่พันธุกรรมส่วนใหญ่ยังเหมือนเดิม จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ที่มีลักษณะส่วนใหญ่ดีอยู่แล้ว เพื่อเพิ่มเติมบางลักษณะที่แปลกใหม่ลงไป โดยเฉพาะลักษณะที่ถูกควบคุมโดยยีนด้อย (Medina et al., 2004) การกลายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นตามธรรมชาติและเกิดจากการกระตุ้น การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติอาจเกิดจากรังสี สารเคมีตามธรรมชาติ หรืออาจเกิดจากหน่วยดีเอ็นเอชนิดหนึ่งที่เรียกว่า transposons ที่เคลื่อนที่ไปตาม/หรือระหว่างโครโมโซม เมื่อไปจับใกล้ยีนใดก็สามารถทำให้ยีนนั้นเปลี่ยนสภาพได้ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพย์ผ่อง, 2550) ซึ่งวิธีนี้มีอัตราการกลายพันธุ์ต่ำ นักปรับปรุงพันธุ์พืชจึงใช้วิธีกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราที่สูงกว่าเดิม โดยการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) ได้แก่ รังสีและสารเคมี

สำหรับกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอเซียสกุลที่มีการใช้รังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่ารังสีแกมมาอัตรา 3-6 krad ส่งผลให้ลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้วยไม้ในเขตทดลองเปลี่ยนแปลงไป เช่น ลำต้นเตี้ยแคระ ใบหยักงอ และเมื่อนำออกปลูกในสภาพโรงเรือน มักพบลักษณะแปลกใหม่เพิ่มขึ้น เช่น ลำต้นอ้วน-ป้อมและมีสีค่อนข้างแดง แตกกอมากกว่าปกติ ใบมีลายเป็นริ้วสีแดง กลมป้อมและหนา (รุ่งนภา แก้วทองราช, 2548) ประโยชน์ของการใช้รังสีคือ รังสีบางชนิดสามารถทะลุผ่านเนื้อเยื่อเซลล์ได้หลายชั้น และรังสีสามารถให้ปริมาณการกลายพันธุ์ที่สม่ำเสมอ แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือ เกษตรกรไม่สามารถทดลองได้เอง ต้องใช้อุปกรณ์และห้องปฏิบัติการเฉพาะทาง ไม่สามารถหาซื้อได้โดยทั่วไป ดังนั้นการใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์จึงเป็นที่นิยมมากขึ้น เพราะสารเคมีก่อกลายพันธุ์สามารถหาซื้อได้ง่าย เกษตรกรสามารถทดลองเองได้ ผลการทดลองสม่ำเสมอ และประสิทธิภาพการก่อกลายพันธุ์สูง (Jain, 2005)

สารเคมีที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ sodium azide (NaN_3), ethyl methane sulphonate (EMS), pronamide และ ethyl nitroso urea (ENU) ในข้าวบาร์เลย์มีการใช้สาร NaN_3 เพื่อก่อกลายพันธุ์ พบว่าสามารถลดความถี่ของการเคลื่อนที่ของโครมาทิด (chromatid) ในระยะ metaphase ของเซลล์ปลายรากข้าวบาร์เลย์ (Velemínský et al., 1977) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและยับยั้งการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ได้ (Velemínský and Angelis, 1987) ในขณะเดียวกันกล้วยไม้สายพันธุ์เหลือง-จันทร์บุรณ มีการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มร่วมกับสาร EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 ชั่วโมง สามารถให้ต้นที่มีลักษณะเผือกได้ (ศิริญา ม่วงสอน และสมปอง เตชะโต, 2551) แม้ว่าในปัจจุบัน EMS จะเป็นที่นิยมในการใช้ก่อกลายพันธุ์ไม่ดองไม่ประดับมากที่สุด เนื่องจากมีอัตราการกลายพันธุ์สูง สามารถใช้สารความเข้มข้นต่ำและปริมาณน้อย ในการเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ได้ ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ลำดับเบส แต่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ชนิดนี้ก็มีข้อจำกัดหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับ NaN_3 เช่น EMS ราคาแพงกว่า NaN_3 อีกทั้ง EMS เป็นสารเคมีที่อันตรายมาก เนื่องจากมีอัตราการก่อกลายพันธุ์กับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสูงกว่า NaN_3 ในทางตรงกันข้าม NaN_3 เป็นสารที่ราคาถูกและอันตรายน้อยกว่า แต่สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่มีความถี่สูง และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนได้อีกด้วย (Amano, 2004) ดังนั้น NaN_3 จึงเป็นหนึ่งในสารเคมีก่อกลายพันธุ์ที่น่าสนใจในการเหนี่ยวนำพืชให้กลายพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต (Al-Quariny

and Khan, 2009) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังไม่มีการใช้ NaN_3 เพื่อก่อกลายพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอีย-สกุล

NaN_3 เป็นสารประกอบไอออนิก (ionic compound) ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการก่อกลายพันธุ์ ประกอบไปด้วย N_3 -group เชื่อมต่อกันเป็นสามเหลี่ยมทำมุม 1.18 \AA^0 ด้วยพันธะคู่ สามารถละลายน้ำได้ดี นิยมใช้ในทางด้านอุตสาหกรรม การแพทย์ การเกษตร และงานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อเพิ่มคุณภาพ และผลผลิต (Khan and Al-Quariny, 2009) สามารถนำไปใช้กระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์กับพืชและสัตว์ได้ ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์หลายรูปแบบ เช่น การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา จำนวนโครโมโซม หรือแม้กระทั่ง ลำดับเบส โดยพบว่า NaN_3 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม เช่น การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน โครโมโซมเมื่อมีการแตกหัก (translocation) โครโมโซมเคลื่อนไปสู่ขั้วเซลล์ช้ากว่าปกติ (chromosome lagging) ก่อให้เกิดโครโมโซมที่มีโครงสร้างคล้ายสะพาน (chromosome bridge) ได้ (Klasterkii et al., 1976) อีกทั้งยังพบว่า NaN_3 สามารถเปลี่ยนแปลงลำดับเบสได้ด้วย ในปัจจุบันมีการสันนิษฐานว่าพืชสามารถ สร้าง L-azidoalanine ($\text{N}_3\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)COOH}$) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับกรดอะมิโนขึ้นมาภายในเซลล์ ระหว่างกระบวนการสร้างสารชนิดนี้จะพบเอนไซม์ชนิดหนึ่งคือ O-acetylserine sulfhydrylase ซึ่งเอนไซม์นี้ สามารถเร่งปฏิกิริยาการจับกันระหว่างอะตอมของ NaN_3 และ O-acetylserine เพื่อผลิตกรดอะมิโนคือ azidoalanine หรือ L-cysteine ได้ อย่างไรก็ตาม กระบวนการนี้สามารถเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์แบบ point mutation ระหว่างการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ได้ (Kredich, 1971; La and Mongold, 1987; Owais and Kleinhofs, 1988) ทำให้เกิดการแทนที่ของลำดับเบส (base substitution) แบบทรานสเวอร์ชัน (transversion) โดยการแทนที่เบสด้วยเบสต่างกลุ่มกัน เช่น เบสเดิมเป็นกลุ่มพิวรีน (purine) ก็จะถูกแทนที่ด้วยกลุ่มไพริมิดีน (pyrimidine) หรือถ้าเบสเดิมเป็นกลุ่มไพริมิดีน ก็จะถูกแทนที่ด้วยกลุ่มพิวรีน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น กระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการพัฒนาเซลล์ชนิดต่าง ๆ ของพืชโดยตรง (Al-Quariny and Khan, 2009) มีการใช้ NaN_3 ในการก่อกลายพันธุ์เมล็ดพืชหลายชนิด เช่น ในฝ้าย (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR2) การให้ NaN_3 ที่ความเข้มข้น 10 mM นาน 180 นาที ส่งเสริมให้รากยาวและมีจำนวนมากขึ้น (Ganesan et al., 2005) ในปัจจุบันมีการใช้ NaN_3 ในพืชชนิดอื่น ๆ เช่น ถั่วปากอ้า (broad bean; *Vicia faba* L.) โดยสามารถกระตุ้นให้เกิดความผิดปกติของการแบ่งเซลล์ได้ (Ahmad et al., 2007) และ NaN_3 สามารถทำลายเสียหายให้กับโครโมโซมของข้าวบาร์เลย์ได้ (Pearson et al., 1975) อีกทั้งยังพบว่า NaN_3 สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางตำแหน่งของไม้ดอกไม้ประดับ เช่น คาร์เนชัน (*Dianthus caryophyllus* L.) และสับปะรดสี (*Aechmea fasciata*) Guzmania 'Hilda' ได้อีกด้วย (Rajib and Jagatpati, 2011) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่พบการใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ NaN_3 กับกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล จึงเป็นที่มาของการวิจัยครั้งนี้

ในการก่อกลายพันธุ์ ควรคำนึงถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ ระยะเวลาในการให้สาร และเปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่อพืช (lethal dose; LD) ซึ่งเป็นดัชนีหนึ่งในการชี้วัดความมีประสิทธิภาพ และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารก่อกลายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง มักนิยมใช้ความเข้มข้นที่ทำ

ให้เกิดอัตราการตายของเนื้อเยื่อพืชที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LD₅₀) เพื่อถ่วงน้ำหนัก แต่อาจใช้ค่าที่มากหรือน้อยกว่า ร่วมกับค่า LD₅₀ ในการทดลองได้ เช่น LD₃₀ และ LD₈₀ เป็นต้น ความเข้มข้นของสารเคมีถ่วงน้ำหนักที่ต่างกัน จะส่งผลให้อัตราการตายต่างกัน โดยการใช้อัตราการถ่วงน้ำหนักความเข้มข้นสูง จะส่งผลให้เกิดอัตราการตายที่สูง แต่อัตราการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อพืชลดลง ซึ่งเนื้อเยื่อพืชที่รอดชีวิตอาจจะพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ แต่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากเกินไป บางกรณีเกิดผลเสียในกระบวนการเจริญเติบโตของพืชได้เช่นกัน ในทางตรงกันข้าม การใช้อัตราการถ่วงน้ำหนักความเข้มข้นต่ำ ส่งผลให้เกิดอัตราการตายที่ต่ำ แต่อัตราการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อพืชมากกว่าการใช้อัตราการถ่วงน้ำหนักความเข้มข้นสูง ซึ่งเนื้อเยื่อพืชที่รอดชีวิตอาจจะพัฒนาและเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ดีกว่า แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจจะไม่เปลี่ยนแปลงหรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ต้องการ (ธัญญา ขำเลิศ, 2532; Abdullah et al., 2009) ดังนั้นการใช้ความเข้มข้นของสารเคมีที่เหมาะสมจึงจำเป็น เพราะทำให้มีจำนวนเนื้อเยื่อพืชที่รอดชีวิตในปริมาณที่เหมาะสม และมีโอกาสในการพบต้นสายพันธุ์กลายที่ต้องการสูง เพื่อให้การถ่วงน้ำหนักมีประสิทธิภาพสูงสุด และเพิ่มปริมาณต้นสายพันธุ์กลายเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการถ่วงน้ำหนักยังขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชนิดเนื้อเยื่อที่นำมาใช้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ NaN₃ อีกด้วย จากการทดลองของหลายคณะพบว่า การใช้ NaN₃ ที่ pH ต่ำ จะพบปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ในเซลล์พืชเป็นจำนวนมาก อีกทั้งยังพบการแตกตัวของ hydrazoic acid มากขึ้น ส่งผลให้เกิดอันตรายกับเซลล์พืช รวมทั้งก่อให้เกิดการถ่วงน้ำหนัก ซึ่งถ้าใช้ NaN₃ ที่ pH 3 พบว่าเกิดการแตกตัวของ hydrazoic acid มากกว่า และสามารถทำลายเซลล์พืชได้มากกว่า pH 6 (Nilan et al., 1973) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ภาวะที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มโอกาสประสบความสำเร็จในการถ่วงน้ำหนัก จะเห็นได้ว่าการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ด้วยวิธีการถ่วงน้ำหนักโดยใช้สารเคมี เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งอาจสามารถผลิตกล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่ในเวลาที่รวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้วิธีการนี้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคหนึ่งที่ยอมรับใช้ในการขยายพันธุ์พืชในปัจจุบัน มีประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์สูง เนื้อเยื่อพืชสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมและในสภาพแวดล้อมที่ควบคุม สามารถขยายพันธุ์ได้เป็นจำนวนมากในเวลาอย่างรวดเร็ว ซึ่งเทคนิคนี้เป็นที่ยอมรับในการขยายพันธุ์ด้วยส่วนต่าง ๆ ของกล้วยไม้ เช่น การเพาะเมล็ดกล้วยไม้เพื่อแก้ปัญหาอัตราการงอกต่ำในธรรมชาติ (Aktar et al., 2008) หรือการชักนำเนื้อเยื่อปลายยอด (shoot tip) ให้เกิดแคลลัสและต้น หรือโปรโตคอร์ม หรือเนื้อเยื่อส่วนอื่น (Roy and Banerjee, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ ซึ่งเรียกว่าความแปรปรวนแบบโซมาโคลนอล (somaclonal variation) การกลายพันธุ์นี้อาจเกิดจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซม โครโมโซมหักขาด หรือการเปลี่ยนแปลงของยีน ความแปรปรวนเหล่านี้ อาจเกิดจากอาหารเพาะเลี้ยง หรือสภาพการเลี้ยงที่พืชต้องปรับตัว (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพย์ผ่อง, 2550) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญ ในการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและเพิ่มโอกาสประสบความสำเร็จในการได้ต้นกล้วยไม้กลายพันธุ์

การตรวจสอบการกลายพันธุ์ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรวจสอบระดับเซลล์ และการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้มีความจำเพาะเจาะจง ทั้งรูปแบบการเจริญเติบโต ลำต้น การแตกกอ ลักษณะของดอก ช่อดอก ฝัก เมล็ด และใบ อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบลักษณะการกลายพันธุ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ใช้เวลานาน และต้นทุนสูง ต้องรอต้มกล้วยไม้ให้โตเต็มที่จนถึงระยะที่แสดงออกลักษณะเหล่านั้น อีกทั้งยังตรวจสอบได้เฉพาะการเปลี่ยนแปลงของยีนหรือโครโมโซมที่มีผลกระทบต่อฟีโนไทป์เท่านั้น

ส่วนการตรวจสอบระดับเซลล์เป็นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือจำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ สิ่งก่อกลายพันธุ์บางชนิด สามารถส่งผลให้รูปร่างโครโมโซมเปลี่ยนแปลง (ชิ้นส่วนโครโมโซมขาดหาย เพิ่มขึ้น และเปลี่ยนสลับทิศ) และจำนวนโครโมโซมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (เพิ่มขึ้นหรือลดลง) ซึ่งอาจส่งผลต่อลักษณะการแสดงออกของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ได้ วิธีการนี้มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ต้องทำในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ใช้เครื่องมือและสารเคมีที่จำเพาะเจาะจง อีกทั้งวิธีการนี้ไม่สามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับดีเอ็นเอได้ ในปัจจุบันจึงมีการนำความรู้ เทคนิค และวิธีการต่าง ๆ ด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม เครื่องหมายที่นิยมใช้ ได้แก่ restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), simple sequence repeat (SSR) หรือ inter-simple sequence repeat (ISSR) (ปริญญา ขจัดพาล, 2552) ซึ่งเครื่องหมายดังกล่าวอาจสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ หรือแยกความแตกต่างระหว่างต้นสายพันธุ์กลายออกจากต้นดั้งเดิมได้ โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม อีกทั้งยังเป็นเครื่องมือในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ตรวจประวัติทางพันธุกรรม หรือสร้างแผนที่โครโมโซม เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ในอนาคต (ทิพวัลย์ อยู่ซา และคณะ, 2549)

ในปัจจุบันพบว่ามีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิดเพื่อการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ เช่น เครื่องหมาย RAPD สามารถแยกความแตกต่างของกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิส ระหว่างต้นดั้งเดิมและต้นกลายพันธุ์ซึ่งเกิดจาก somaclonal variation ได้ (Chen et al., 1998) เครื่องหมายชนิดนี้สามารถวิเคราะห์ได้ง่าย รวดเร็ว และใช้ต้นทุนต่ำ อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 200-2,000 bp ที่อยู่ระหว่าง inverted DNA repeats ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แต่มีข้อเสียคือ บางตำแหน่ง (loci) ของแถบดีเอ็นเอ อาจให้ผลที่ไม่คงที่ ไม่สามารถประเมินความแตกต่างได้อย่างแม่นยำ จึงมักไม่นิยมใช้กันในปัจจุบัน ในขณะที่เครื่องหมาย AFLP อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สามารถตรวจสอบ polymorphic loci จำนวนมากได้ในแต่ละปฏิกิริยา ให้ผลแม่นยำกว่าเครื่องหมาย RAPD แต่วิธีการทดลองยุ่งยาก ซับซ้อนกว่า ใช้เวลานาน และต้นทุนสูงกว่าเครื่องหมาย RAPD ส่วนเครื่องหมายที่นิยมใช้อีกชนิดคือ SSR หรือ microsatellite เป็นเครื่องหมายแบบ codominance ซึ่งเครื่องหมายชนิดนี้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 19 สายพันธุ์ เพื่อจัดทำฐานข้อมูลทางพันธุกรรมสำหรับงานปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายได้ (ทิพวัลย์ อยู่ซา และคณะ, 2549) เครื่องหมายชนิดนี้อาศัยหลักการตรวจสอบความแตกต่างของ DNA repeats ขนาด 1-6 bp บริเวณ microsatellite โดยวิธี PCR เป็นเครื่องหมายที่มีข้อดีหลายประการ เช่น ให้ข้อมูลความ

แตกต่างกันสูง มีการกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม ได้ผลที่แน่นอน เป็นโมเลกุลเครื่องหมายแบบ codominance และมีวิธีการวิเคราะห์ที่ง่าย รวดเร็ว และใช้ต้นทุนไม่มาก จึงเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน แต่ข้อเสียของวิธีการนี้คือจะต้องมีการโคลนและหาลำดับเบสของ microsatellites (SSR) และดีเอ็นเอข้างเคียง (flanking DNA) ก่อนจึงจะนำไปใช้ได้ ส่วนเครื่องหมาย ISSR เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดหนึ่งที่ได้รับค่านิยมในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากเป็นเครื่องหมายที่สามารถวิเคราะห์ความแตกต่าง (polymorphism) ได้อย่างชัดเจน โดยใช้ไพรเมอร์เป็นคู่สมกับลำดับเบสของ simple sequence repeat (SSR) ซึ่งมีขนาดประมาณ 20 นิวคลีโอไทด์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง microsatellite ได้โดยตรง จึงไม่จำเป็นต้องมีการโคลนและหาลำดับเบสก่อนการทดลอง อีกทั้งวิธีการนี้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งของจีโนม (multilocus) พบว่าการใช้เครื่องหมาย ISSR สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลูกผสมพอลิครอสส์ทั้ง 16 ลูกผสมได้ (Li et al., 2010) และยังสามารถประเมินความหลากหลายและหาความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ชิมปีเดียมได้อีกด้วย (Hui-Zhong et al., 2009) อีกทั้งสามารถตรวจสอบความแตกต่างได้ปริมาณมาก ให้ผลการทดลองที่แม่นยำ มีวิธีการง่าย รวดเร็ว และใช้ต้นทุนต่ำ ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้เครื่องหมาย ISSR จึงเหมาะที่จะเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์กล้วยไม้สายพันธุ์ดั้งเดิมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ตัดดอกสกุลหวายที่นิยมปลูก และเป็นที่ต้องการของตลาด ด้วยวิธีการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้กล้วยไม้มีความหลากหลายทางสายพันธุ์ และมีคุณภาพสูงขึ้น เช่น ขนาดดอกใหญ่ขึ้น จำนวนดอกมากขึ้น สีและรูปร่างดอกสวย/แปลกใหม่ขึ้น ความยาวก้านช่อดอกมากขึ้น ความคงทนและอายุการใช้งานนานขึ้น ขนาดต้นเหมาะสมกับการใช้ประโยชน์ การเจริญเติบโตรวดเร็ว และการต้านทานโรคสูงขึ้น ฯลฯ
2. เพื่อพัฒนาวิธีการก่อกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูง เหมาะสมกับกล้วยไม้สกุลหวาย
3. เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับใช้ในการประเมินความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม
4. เพื่อคัดเลือกและตรวจสอบต้นกล้วยไม้สายพันธุ์กลายด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา และวิธีการระดับเซลล์และดีเอ็นเอ
5. เพื่อผลิตนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช

สมมติฐานการวิจัย

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม (conventional breeding) พันธุวิศวกรรม (genetic engineering) และการกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งแต่ละวิธีการมีข้อดี-ข้อเสียแตกต่างกันไป ทั้งนี้แต่ละวิธีก็เหมาะสมในการใช้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของแต่ละงานวิจัย ในปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีและเทคนิคต่าง ๆ มาใช้ร่วมกับวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อย่นระยะเวลาในการ

ทดลอง งานวิจัยนี้ใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์โดยการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีก่อกลายพันธุ์ NaN_3 ร่วมกับเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งสามารถก่อกลายพันธุ์ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่มีความถี่สูง มักก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน ค่อนข้างปลอดภัยและมีราคาถูกจากนั้นกล้วยไม้สายพันธุ์กลายที่ได้จากการก่อกลายพันธุ์จะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากพันธุ์ดั้งเดิมสามารถตรวจสอบได้ในระดับเซลล์ ลักษณะสัณฐานวิทยา หรือการใช้เครื่องหมายโมเลกุล โดยเครื่องหมาย ISSR สามารถตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายได้อย่างชัดเจน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

1. ใช้ protocom-like bodies (PLBs) จากการปั่นตากกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลในการก่อกลายพันธุ์
2. ทำการทดลองก่อกลายพันธุ์โปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลด้วยสารเคมีก่อกลายพันธุ์ คือ NaN_3
3. คัดเลือกและตรวจสอบสายพันธุ์กลายในระดับเซลล์และดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการบัณฑิตศึกษาปรับปรุงพันธุ์พืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
4. ปลูก คัดเลือก และตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นสายพันธุ์กลายในโรงเรือนเพาะชำมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป
 - 1.1 ได้วิธีการที่เหมาะสมในการชักนำการกลายพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้สารเคมี ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้โดยวิธีกลายพันธุ์ในงานวิจัย phase ต่อไป
 - 1.2 ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถประเมินความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์กลายและพันธุ์ดั้งเดิมได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้โดยวิธีกลายพันธุ์ในงานวิจัย phase ต่อไป
 - 1.3 ได้สายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม
2. นำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ ได้กล้วยไม้พันธุ์ใหม่ที่มีคุณภาพดีขึ้น (เช่น ขนาดดอกใหญ่ขึ้น จำนวนดอกมากขึ้น สีและรูปร่างดอกสวย/แปลกใหม่ขึ้น ความยาวก้านช่อดอกมากขึ้น การจัดเรียงตัวของดอกสวยงามขึ้น ความคงทนและอายุการใช้งานนานขึ้น ขนาดต้นเหมาะสมกับการใช้ประโยชน์ การเจริญเติบโตรวดเร็ว การต้านทานโรคสูงขึ้น ฯลฯ) ซึ่งสามารถนำมาขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้ปริมาณมาก เพื่อเผยแพร่แก่เกษตรกรในอนาคต พันธุ์ที่ได้นี้มหาวิทยาลัยสามารถจดลิขสิทธิ์พันธุ์ได้
3. เพิ่มศักยภาพของการผลิตกล้วยไม้ในประเทศไทย โดยสายพันธุ์ต้านทานโรคอาจลดการใช้สารปราบศัตรูพืช ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม และลดต้นทุนการผลิต รวมทั้ง

สายพันธุ์ที่หลากหลายจะช่วยเพิ่มความสามารถในการแข่งขันทางการตลาดทั้งในระดับภายในประเทศ และระหว่างประเทศ

4. เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย เกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้ได้รายได้เพิ่มขึ้นจากการปลูกกล้วยไม้ เป็นการแก้ปัญหาความยากจน และมีสุขภาพดีขึ้นจากการลดการใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดโรคพืช นอกจากนี้ผู้บริโภคยังอาจได้ซื้อกล้วยไม้คุณภาพดีที่มีราคาต่ำลงด้วย
5. ได้นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาซึ่งมีความรู้และประสบการณ์ทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้ mutation breeding อย่างน้อย 1 คน
6. ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการอย่างน้อย 1 เรื่อง เช่น การก่อกลายพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายด้วยสารเคมี และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับประเมินความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์กลายและพันธุ์ดั้งเดิม



บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยในโครงการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ 1) การก่อกลายพันธุ์ protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วย sodium azide (NaN_3) และ 2) การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์ก่อกลาย ซึ่งประกอบด้วย 3 การทดลอง คือ 2.1 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) 2.2 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers) และ 2.3 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยวิธีการระดับเซลล์ (cytology)

ส่วนที่ 1 การก่อกลายพันธุ์ protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วย sodium azide (NaN_3)

ความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์และระยะเวลาการก่อกลายพันธุ์ มีผลต่อความสำเร็จในการก่อกลายพันธุ์ การทดลองนี้ทดสอบหาความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการก่อกลายพันธุ์ PLBs ของกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุล โดยหาความเข้มข้นที่ทำให้ PLBs ตาย 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{30} และ LD_{50})

- 1.1 นำ PLBs ที่ได้จากการปั่นตากกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุลมาเลี้ยงในอาหาร VW ดัดแปลง (ปิยะดา อลิมาณ ตันตสวัสดิ์ และคณะ, ยังไม่ได้รายงานผล) ประมาณ 2 สัปดาห์ เพื่อให้เนื้อเยื่อปรับตัว
- 1.2 คัดเลือก PLBs ที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน ทั้งอายุ ขนาด รูปร่าง และสี ไปแช่ในน้ำ reversed osmosis (RO) นิ่งฆ่าเชื้อ (control 1) และสารละลาย NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0 (control 2), 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 mM ซึ่งเตรียมใน 100 mM citrate buffer (pH 5) เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง โดยแต่ละความเข้มข้นใช้ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 10 PLBs
- 1.3 เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงนำ PLBs ที่แช่อยู่ในสารละลาย NaN_3 ทุกความเข้มข้นมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร VW ดัดแปลง ภายใต้อุณหภูมิ $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ช่วงแสง 16 ชั่วโมง ความเข้มแสง $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ บันทึกผลการรอดชีวิตที่ 3 วัน 1 สัปดาห์ และ 2 สัปดาห์
- 1.4 ทำการก่อกลายพันธุ์ PLBs ตามขั้นตอนที่ 1.1-1.3 อย่างน้อย 5 ครั้ง เพื่อให้มีข้อมูลเพียงพอที่จะสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ NaN_3 และเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs จากนั้นหาค่า LD_{30} และ LD_{50}
- 1.5 เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เหมาะสมสำหรับระยะการเจริญเติบโตของ PLBs จนกระทั่งเป็นต้นสมบูรณ์และเกิดราก บันทึกผลการเจริญเติบโต
- 1.6 ใช้ความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์จากกราฟในข้อ 1.4 ซึ่งให้ค่า LD_{30} และ LD_{50} ในการชักนำ PLBs จำนวนมาก ให้เกิดต้นสายพันธุ์ก่อกลายจำนวนมาก เพื่อคัดเลือกต่อไป

- 1.7 บันทึกผลการทดลอง และวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารละลาย NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

ส่วนที่ 2 การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กล้วย ซึ่งประกอบด้วย 3 การทดลอง

การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กล้วยของกล้วยไม้สามารถทำได้หลายวิธี การทดลองครั้งนี้ใช้วิธีการตรวจสอบ 3 วิธีคือ 1) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นการตรวจสอบลักษณะที่แสดงออกทางฟีโนไทป์ที่เปลี่ยนไปจากเดิม 2) เครื่องหมายโมเลกุล เป็นการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ สามารถแยกความแตกต่างของต้นสายพันธุ์กล้วยออกจากสายพันธุ์ดั้งเดิมได้ ในการทดลองนี้ใช้เครื่องหมายโมเลกุล ISSR และ 3) การตรวจสอบระดับเซลล์ เป็นการตรวจสอบจำนวนโครโมโซมของต้นสายพันธุ์กล้วยที่เปลี่ยนแปลงไป

2.1 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

2.1.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ โดยนำต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการเพาะเลี้ยง-เนื้อเยื่อจากงานวิจัยส่วนที่ 1 อายุ 6 เดือน ออกปลูกในโรงเรือน เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ทำการบันทึกลักษณะทางฟีโนไทป์ของต้นกล้วยไม้ดังต่อไปนี้

2.1.1.1 ลักษณะต้น เช่น ความสูงทั้งต้น จำนวนข้อปล้อง ความยาวข้อปล้อง และการแตกหน่อ

2.1.1.2 ลักษณะใบ เช่น ความยาวใบ ความกว้างใบ จำนวนใบ สีใบ ใบหนา และการเรียงตัวของใบ

2.1.1.3 ลักษณะราก เช่น ความยาวราก และจำนวนราก

โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้

ลักษณะ	บันทึก
ลำต้น	ลำต้นเตี้ย คือ ลำต้นที่มีขนาด 0-3 เซนติเมตร; ลำต้นสูงตรง คือ ลำต้นที่มีขนาดมากกว่า 3 เซนติเมตร
ข้อปล้อง	ข้อปล้องสั้นและถี่ คือ ความสูงต้นไม่รวมใบ/จำนวนข้อปล้อง เท่ากับ 0-0.30 เซนติเมตร; ข้อปล้อง-ยาว คือ ความสูงต้นไม่รวมใบ/จำนวนข้อปล้อง มากกว่า 0.30 เซนติเมตร
ใบ	ใบสั้น คือ ใบที่มีความยาว 0-1.5 เซนติเมตร; ใบเรียวยาว คือ ใบที่มีความยาวมากกว่า 1.5 เซนติเมตร
ความยาวราก	รากสั้น คือ รากที่มีความยาว 0-1 เซนติเมตร; รากยาว คือ รากที่มีความยาวมากกว่า 1 เซนติเมตร
ปริมาณราก	รากมีจำนวนน้อย คือ มีราก 1-3 ราก; รากมีจำนวนมาก คือ มีราก 4 รากขึ้นไป

2.1.2 การวิเคราะห์ผล

2.1.2.1 คำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง = $(\text{จำนวนต้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลง} / \text{จำนวนต้นทั้งหมด}) \times 100$

2.1.2.2 ประเมินการมี (+) หรือไม่มี (-) การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2.1.2.3 ประเมินความเหมือนกันทางสัณฐานวิทยาระหว่างต้นกล้วยไม้สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์โดยใช้ Jaccard's genetic similarity coefficients และสร้าง phylogenetic tree ด้วย unweighted paired grouped mean arithmetic average โดยใช้ SAHN and TREE options และหาค่า similarity matrix ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.2 (Rohlf, 1993) วิเคราะห์ principle coordinate analysis (PCoA) เพื่อให้ได้ข้อมูลระยะห่างระหว่างกลุ่มเพิ่มเติมจากข้อมูลที่ได้จาก cluster analysis ประเมินความสัมพันธ์ภายในกลุ่ม dendrogram ของต้นสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์โดยวิธีของ Mantel (1967)

หมายเหตุ: บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้เมื่ออายุครบ 1 ปี แต่ไม่สามารถประเมินลักษณะต่าง ๆ ของดอกได้ในการทดลองครั้งนี้ เนื่องจากระยะเวลาการดำเนินการวิจัยมีจำกัด

2.2 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers)

2.2.1 สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนกล้วยไม้ของต้นดั้งเดิมและต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ ซึ่งได้จากงานวิจัยส่วนที่ 1 โดยวิธีการดัดแปลงจาก Zhang et al. (2005) ดังนี้

2.2.1.1 ใช้ extraction buffer ซึ่งประกอบด้วย 100 mM Tris-HCL (pH 8.0), 1.5 M NaCl, 50 mM EDTA (pH 8.0) และ 3% (w/v) cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)

2.2.1.2 บดตัวอย่างน้ำหนัก 1 กรัมในโกร่ง นำตัวอย่างใส่ในหลอด เต็ม extraction buffer ปริมาตร 600 μ L บ่มที่อุณหภูมิ 60^oซ นาน 30 นาที

2.2.1.3 เติม 24:1 chloroform: isoamyl alcohol ปริมาตร 1 V ผสมให้เข้ากัน ปั่นที่ความเร็ว 5635 x g นาน 15 นาที

2.2.1.4 ตู่น้ำใส่ใส่หลอดใหม่ เติม 5M NaCl ปริมาตร 0.5 V จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 1 V และบ่มที่อุณหภูมิ 20^oซ นาน 20 นาที

2.2.1.5 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% และ 95% (v/v) ethyl alcohol ทั้งไว้จนระเหยหมด และละลายด้วย ddH₂O ปริมาตร 200 μ L วัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงโดยใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อย

2.2.2 ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ ISSR เบื้องต้น จำนวน 60 ไพรเมอร์ เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม ที่จะนำมาใช้ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์กล้วยออก จากสายพันธุ์ดั้งเดิมได้ ดังตารางที่ 1 (Xiaohong et al., 2007; Baloch et al., 2010)

ตารางที่ 1 ลำดับเบส และอุณหภูมิ annealing ของไพรเมอร์ ISSR

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	อุณหภูมิ annealing	ไพรเมอร์	ลำดับเบส	อุณหภูมิ annealing
ISSR 801	(AT) ₈ T	53.0	ISSR 835	(AG) ₈ YC	48.0
ISSR 807	(AG) ₈ T	52.3	ISSR 836	(AG) ₈ YA	52.0
ISSR 808	(AG) ₈ C	52.0	ISSR 840	(GA) ₈ YT	48.0
ISSR 809	(AG) ₈ G	52.0	ISSR 841	(GA) ₈ YC	54.0
ISSR 810	(GA) ₈ T	50.0	ISSR 842	(GA) ₈ YG	54.0
ISSR 811	(GA) ₈ C	53.0	ISSR 843	(CT) ₈ RA	52.0
ISSR 812	(GA) ₈ A	53.0	ISSR 844	(CT) ₈ RC	54.0
ISSR 813	(CT) ₈ T	50.0	ISSR 845	(CT) ₈ RG	54.0
ISSR 815	(CT) ₈ G	52.0	ISSR 847	(CA) ₈ RC	52.0
ISSR 816	(CA) ₈ T	50.0	ISSR 848	(CA) ₈ RG	54.0
ISSR 817	(CA) ₈ A	53.0	ISSR 850	(GT) ₈ YC	56.0
ISSR 818	(CA) ₈ G	53.0	ISSR 851	(GT) ₈ YG	54.0
ISSR 819	(GT) ₈ A	50.0	ISSR 852	(TC) ₈ RA	52.0
ISSR 820	(GT) ₈ C	52.0	ISSR 855	(AC) ₈ YT	52.0
ISSR 821	(GT) ₈ T	50.0	ISSR 856	(AC) ₈ YA	52.0
ISSR 822	(TC) ₈ A	50.0	ISSR 857	(AC) ₈ YG	54.0
ISSR 823	(TC) ₈ C	52.0	ISSR 858	(TG) ₈ RT	52.0
ISSR 824	(TC) ₈ G	52.0	ISSR 859	(TG) ₈ RC	54.0
ISSR 825	(AC) ₈ T	53.0	ISSR 860	(TG) ₈ RA	52.0
ISSR 826	(AC) ₈ C	52.0	ISSR 861	(ACC) ₆	54.0
ISSR 827	(AC) ₈ G	53.0	ISSR 862	(AGC) ₆	56.0
ISSR 828	(TG) ₈ A	50.0	ISSR 864	(ATG) ₆	44.0
ISSR 829	(TG) ₈ C	58.0	ISSR 866	(CTC) ₆	56.0
ISSR 834	(AG) ₈ YT	55.4	ISSR 867	(GGC) ₆	52.0

ตารางที่ 1 ลำดับเบส และอุณหภูมิ annealing ของไพรเมอร์ ISSR (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	อุณหภูมิ annealing	ไพรเมอร์	ลำดับเบส	อุณหภูมิ annealing
ISSR 868	(GAA) ₆	48.0	ISSR 879	(CTTCA) ₃	48.0
ISSR 869	(GTT) ₆	48.0	ISSR 880	(GGAGA) ₃	48.0
ISSR 873	(GACA) ₄	48.0	ISSR 881	(GGGTG) ₃	60.0
ISSR 874	(CCCT) ₄	51.0	ISSR 887	DVD(TC) ₇	51.0
ISSR 876	(GATA) ₂ (GACA) ₂	48.0	ISSR 888	BDB(CA) ₇	51.0
ISSR 878	(GGAT) ₄	48.0	ISSR 890	VHV(GT) ₇	51.0

Y = T,C R = A,T V = A,C,G B = T,C,G H = A,T,C D = A,T,G N = A,T,C,G

2.2.3 คัดเลือกไพรเมอร์ ISSR ที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 2.2.2 จำนวน 12 ไพรเมอร์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งดัดแปลงจาก Baloch et al. (2010) และ Brown-Guedira et al. (2000) โดยใช้ 20 μ L reaction mixture ประกอบด้วย 10x PCR buffer, 25 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, 50 ng template DNA, *Taq* DNA polymerase 1 unit และ 4 μ M ISSR primer เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม ดังนี้

Denaturing step: อุณหภูมิ 94 ^o ซ	นาน 5 นาที	} จำนวน 45 รอบ
Denaturing step: อุณหภูมิ 94 ^o ซ	นาน 45 วินาที	
Annealing step: อุณหภูมิ 48-58 ^o ซ	นาน 45 วินาที	
Elongation step: อุณหภูมิ 72 ^o ซ	นาน 1.5 นาที	
Elongation step: อุณหภูมิ 72 ^o ซ	นาน 7 นาที	

หมายเหตุ: อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing step ขึ้นอยู่กับแต่ละไพรเมอร์ ดังตารางที่ 1

2.2.4 ผสม PCR products 5 μ L กับ 3x SSR loading dye (5M NaOH, 95% formamide, 0.5 mg/mL bromophenol blue และ 0.5 mg/mL xylene FF) ปริมาตร 2.5 μ L นำไป pre-heat ที่อุณหภูมิ 94^oซ นาน 5 นาที

2.2.5 แยกความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอโดยใช้ polyacrylamide gel (42% (w/v) urea, 1x TBE, 15% (v/v) acrylamide/Bis (19:1), 0.5% (v/v) ammonium persulfate (APS) และ 0.05% (v/v) TEMED) โดยทำการ pre-run ภายใต้สนามไฟฟ้า 200 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงหยดตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 2.2.4 ให้สนามไฟฟ้า 200 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 50 นาที

2.2.6 ย้อมเจลด้วย silver nitrate โดยวิธีการดัดแปลงจาก Di Gaspero and Cipriani (2003) เพื่อตรวจสอบขนาดและจำนวนท่อนของดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง โดยแช่และล้างเจลด้วยสารเคมีต่าง ๆ ตามขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1: แช่ gel ใน 10% (v/v) ethyl alcohol (EtOH) นาน 10 นาที

ขั้นตอนที่ 2: แช่ gel ใน 0.7% (v/v) nitric acid (HNO₃) นาน 6 นาที

ขั้นตอนที่ 3: แช่ gel ใน 0.2% (v/v) silver nitrate (AgNO₃) นาน 30 นาที

ขั้นตอนที่ 4: ล้าง gel ด้วย developer (2.28% (w/v) sodium carbonate, 0.06% (v/v) formaldehyde และ 0.02% (v/v) sodium thiosulphate) จำนวน 2 ครั้ง

ขั้นตอนที่ 5: แช่ gel ใน 3% (v/v) acetic acid นาน 5 นาที

ขั้นตอนที่ 6: แช่ gel ใน 10% (v/v) EtOH นาน 10 นาที

2.2.7 บันทึกผลการทดลอง ประเมินความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอระหว่างต้นกล้วยไม้สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์โดยใช้ Jaccard's genetic similarity coefficients และสร้าง phylogenetic tree ด้วย unweighted paired grouped mean arithmetic average โดยใช้ SAHN and TREE options และหาค่า similarity matrix ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.2 (Rohlf, 1993) วิเคราะห์ principle coordinate analysis (PCoA) เพื่อให้ได้ข้อมูลระยะห่างระหว่างกลุ่มเพิ่มเติมจากข้อมูลที่ได้จาก cluster analysis ประเมินความสัมพันธ์ภายในกลุ่ม dendrogram ของต้นสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์โดยวิธีของ Mantel (1967) จากนั้นเปรียบเทียบ similarity และ cophenetic matrix ด้วย matrix correspondence ของ Mantel's test ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยากับลักษณะทางพันธุกรรมของต้นสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์

2.3 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยวิธีการระดับเซลล์ (cytology)

ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้นสายพันธุ์ดั้งเดิมและต้นก่อกลายพันธุ์ทั้งหมดด้วยการนับจำนวนโครโมโซม เพื่อแยกต้นโพลีพลอยด์ออกจากดิพลอยด์ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Sharma and Sharma (1980) และ Joseph (1984)

2.3.1 ตัดปลายรากกล้วยไม้ยาว 0.5 ซม. แช่ในสารละลาย 2 mM 8-hydroxyquinoline อุณหภูมิไม่เกิน 17^oซ นาน 3-5 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง

2.3.2 ตรึงเซลล์ด้วยการแช่ปลายรากใน carnoy's fluid (60% (v/v) ethanol, 30% (v/v) chloroform, 10% (v/v) acetic acid) อุณหภูมิ 10^oซ นาน 10 นาที

2.3.3 ย่อยปลายรากด้วย 1N hydrochloric acid อุณหภูมิ 60^oซ นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง

2.3.4 แช่ปลายรากใน 45% (v/v) acetic acid นาน 10 นาที

- 2.3.5 นำปลายรากวางบนสไลด์ที่สะอาด หยด 45% (v/v) acetic acid เพื่อป้องกันรากแห้ง
เชื่อมรากออกจากส่วนปลาย ขยี้ปลายรากด้วยเข็มเขี่ย
- 2.3.6 หยดสีย้อม aceto-orcein 1-2 หยด วางสไลด์ไว้ในโถแก้วที่อิมตัวด้วย 45% (v/v)
acetic acid นาน 10 นาที ปิดสไลด์ด้วย coverslip ผ่านสไลด์บนเปลวไฟ นาน 2-3
วินาที
- 2.3.7 นับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า บันทึกภาพ
- 2.3.8 คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นโพลีพลอยด์ บันทึกความแตกต่างของลักษณะสัณฐาน-
วิทยาระหว่างต้นโพลีพลอยด์กับดิพลอยด์ เพื่อหาดัชนีสำหรับใช้แทนการตรวจนับ
จำนวนโครโมโซมในอนาคต



บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล

ส่วนที่ 1 การก่อกลายพันธุ์ protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลด้วย sodium azide (NaN_3)

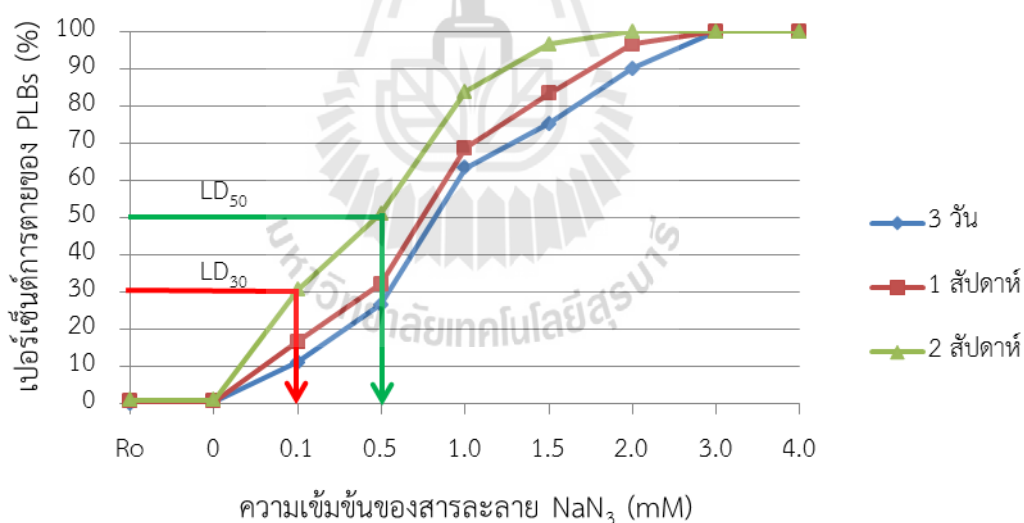
ทำการก่อกลายพันธุ์ PLBs ด้วยสารก่อกลายพันธุ์ NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 mM นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร VW ดัดแปลง บันทึกผลเปอร์เซ็นต์การตายที่ 3 วัน 1 และ 2 สัปดาห์ พบว่า PLBs ที่แช่ในสารละลาย NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตาย (mortality) ของ PLBs ในแต่ละช่วงเวลาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) ซึ่งสารละลาย NaN_3 ความเข้มข้น 1.5-4.0 mM ทำให้ PLBs ตายมากที่สุดในทุกระยะเวลา เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลา 3 วัน พบว่า PLBs ที่แช่ใน NaN_3 ความเข้มข้น 4.0 mM พบเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs มากที่สุด (100.00 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ NaN_3 ความเข้มข้น 3.0 mM (99.57 เปอร์เซ็นต์) และ NaN_3 ความเข้มข้น 2.0 mM (90.80 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันเปอร์เซ็นต์การตายในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ NaN_3 เช่นเดียวกับระยะเวลา 3 วัน ซึ่งในสัปดาห์ที่ 1 พบว่า PLBs ที่แช่ในสารละลาย NaN_3 ความเข้มข้น 3.0 และ 4.0 mM ทำให้ PLBs ตายมากที่สุด (100.00 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ สารละลาย NaN_3 ความเข้มข้น 2.0 mM (96.52 เปอร์เซ็นต์) และในสัปดาห์ที่ 2 พบว่า PLBs ที่แช่ในสารละลาย NaN_3 ความเข้มข้น 2.0, 3.0 และ 4.0 mM ทำให้ PLBs ตายมากที่สุด (100.00 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ สารละลาย NaN_3 ความเข้มข้น 1.5 mM (96.19 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตาม ในน้ำ RO และ NaN_3 0 mM ไม่พบการตายของ PLBs ในช่วง 3 วันแรก ส่วนในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ทำให้ PLBs ตายไม่เกิน 1.00 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับสารละลาย NaN_3 ความเข้มข้น 0 mM ทำให้ PLBs ตายไม่เกิน 1.00 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่ 3 วัน จนถึงสัปดาห์ที่ 2 (ตารางที่ 2)

จากผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารละลาย NaN_3 ที่สูงขึ้น โดย PLBs เริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซีดเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน และเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นในช่วงสัปดาห์แรก หลังจากนั้นจึงเริ่มคงที่ในสัปดาห์ที่ 2 เมื่อนำเปอร์เซ็นต์การตายและระดับความเข้มข้นของสารละลาย NaN_3 มาสร้างกราฟเพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้ PLBs ตาย 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{30} และ LD_{50}) ตามลำดับ โดยพิจารณาที่สัปดาห์ที่ 2 พบว่าสารละลาย NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM ทำให้ PLBs ตาย 30 เปอร์เซ็นต์ (LD_{30}) และสารละลาย NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM ทำให้ PLBs ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการก่อกลายพันธุ์ PLBs กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุล และสามารถนำไปใช้ในการทดลองต่อไปในอนาคต (ภาพที่ 1)

ตารางที่ 2 ผลของระดับความเข้มข้นของสารละลาย NaN_3 ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs ที่ระยะเวลาต่างกัน

ความเข้มข้นของ สารละลาย NaN_3 (mM)	เปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs (%)		
	3 วัน	1 สัปดาห์	2 สัปดาห์
น้ำ RO	0.00 ± 0.00 g ^{1/}	0.40 ± 0.40 g	0.80 ± 0.55 f
0	0.40 ± 0.40 g	0.40 ± 0.40 g	0.80 ± 0.55 f
0.1	10.91 ± 1.12 f	16.67 ± 1.26 f	30.53 ± 1.62 e
0.5	26.40 ± 1.14 e	32.50 ± 2.16 e	51.00 ± 1.76 d
1.0	63.20 ± 1.25 d	68.70 ± 0.72 d	83.18 ± 1.38 c
1.5	75.20 ± 1.31 c	83.33 ± 0.98 c	96.19 ± 1.09 b
2.0	90.80 ± 0.55 b	96.52 ± 1.01 b	100.00 ± 0.00 a
3.0	99.57 ± 0.43 a	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a
4.0	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a

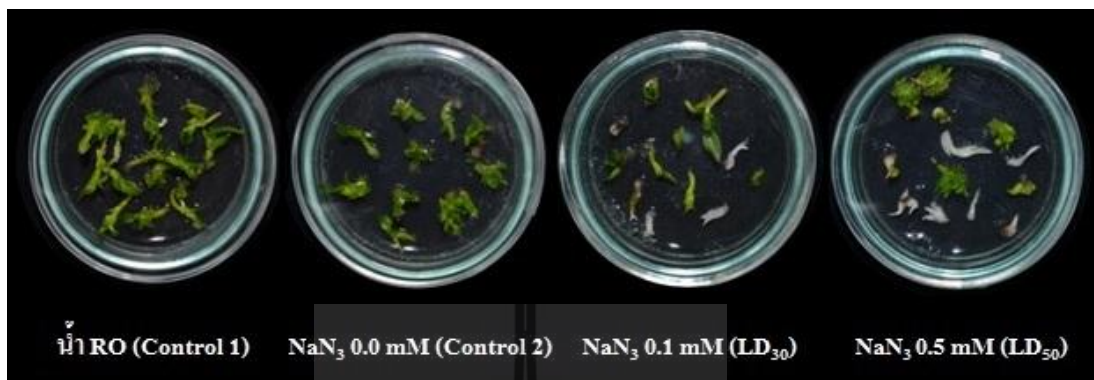
^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในสมมติ/คอลัมน์หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ NaN_3 และเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs ที่ระยะเวลา 3 วัน 1 และ 2 สัปดาห์

เมื่อพิจารณาลักษณะของ PLBs ในสารละลาย NaN_3 ที่ให้ค่าการก่อกลายพันธุ์ที่เหมาะสม (LD_{30} และ LD_{50}) เปรียบเทียบกับ control 1 (น้ำ RO) และ control 2 (NaN_3 0 mM) ในสัปดาห์ที่ 2 พบว่า PLBs ในน้ำ RO และ NaN_3 0 mM รอดชีวิตทั้งหมด (ตาย 0 เปอร์เซ็นต์) และพบว่า PLBs ในน้ำ RO มีลักษณะการ

เจริญเติบโตดีกว่าใน NaN_3 0.0 mM เพียงเล็กน้อย ส่วนใน 0.1 mM และ 0.5 mM NaN_3 พบ PLBs ซีดตาย ประมาณ 30-50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม PLBs ที่รอดชีวิต มีสีเขียวเข้ม แข็งแรง พบการเพิ่มปริมาณ PLBs บ้างเล็กน้อย เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ลักษณะ PLBs ที่แช่ในน้ำ RO, 0, 0.1 และ 0.5 mM NaN_3 เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์

ส่วนที่ 2 การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลาย

2.1 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

ทำการก่อกลายพันธุ์ PLBs ด้วยสารก่อกลายพันธุ์ NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0 (control), 0.1 และ 0.5 mM นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร VW ดัดแปลง โดยใช้ NaN_3 ความเข้มข้น 0 mM เป็น control จนกระทั่งอายุ 6 เดือน จึงนำออกปลูกในโรงเรือน จากนั้นสุ่มต้น control จำนวน 10 ต้น และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 24 ต้น โดยต้น M1-M12 มาจาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM และต้น M13-M24 มาจาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ พบว่าลักษณะองค์ประกอบโดยรวมของต้น ได้แก่ ค่าเฉลี่ยความสูงทั้งต้น ความยาวใบ ความกว้างใบ และจำนวนใบ ของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นไม่แตกต่างทางสถิติจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ตารางที่ 3) ส่วนจำนวนข้อปล้องของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM มีจำนวนข้อปล้องมากที่สุด (4.75 ข้อปล้อง)

เช่นเดียวกับความยาวข้อปล้อง ความยาวราก และจำนวนรากของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยความยาวข้อปล้องของต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์มีค่ามากที่สุด (0.82 เซนติเมตร) การพัฒนาของรากทั้งความยาวและจำนวนรากของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นมีการเจริญเติบโตน้อยกว่าต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่า NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นทำให้จำนวนข้อปล้อง ความยาวข้อปล้อง ความยาวราก และจำนวนรากของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3) การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาเหล่านี้ อาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมหรือทางสรีรวิทยา จำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป

อย่างไรก็ตาม พบว่าต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้ง 34 ต้นมีใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวาเป็นปกติ อีกทั้งไม่พบการแตกหน่อ (ตารางที่ 4) แต่การทดลองครั้งนี้พบลักษณะใบหนาในต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM จำนวน 3 ต้น คือ M1 M3 และ M6 และในต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM จำนวน 1 ต้น คือ M17 (ตารางที่ 4)






ตารางที่ 3 ดัชนีการเจริญเติบโตของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลอายุ 6 เดือน

การก่อกลายพันธุ์	ดัชนีการเจริญเติบโต ^{1/}							
	ความสูงทั้งต้น (ซม.)	จำนวนข้อปล้อง	ความยาวข้อปล้อง (ซม.)	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวราก (ซม.)	จำนวนราก
Control	5.22	2.60 b ^{2/}	0.82 a	3.16	0.59	6.50	2.87 a	5.60 a
NaN_3 0.1 mM	4.18	4.08 a	0.41 b	2.52	0.50	6.92	1.43 b	3.33 b
NaN_3 0.5 mM	3.87	4.75 a	0.43 b	2.04	0.51	7.25	1.85 b	2.75 b






^{1/} ความสูงทั้งต้น คือ ความสูงจากโคนต้นถึงปลายใบอ่อน; ความยาวใบ คือ ความยาวใบอ่อนจากโคนใบถึงปลายใบ; ความยาวข้อปล้อง คือ ค่าเฉลี่ยความยาวข้อปล้อง; ความยาวราก คือ ความยาวของรากที่ยาวที่สุดของต้น

^{2/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย \pm SE ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในสมรรถ/คอลัมน์หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)






ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุลอายุ 6 เดือน

สายพันธุ์	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ^{1/}
C1	Control		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
C2	Control		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
C3	Control		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
C4	Control		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
C5	Control		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก






ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

สายพันธุ์	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
C6	Control		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
C7	Control		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
C8	Control		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
C9	Control		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
C10	Control		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากสั้น มีจำนวนมาก


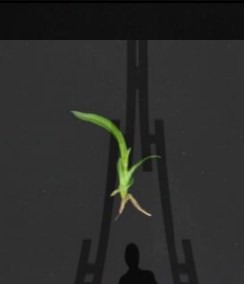



ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

สายพันธุ์	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
M1	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม ใบหนา การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
M2	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากสั้น มีจำนวนมาก
M3	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบมีสีเขียวเข้ม ใบหนา การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
M4	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
M5	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย






ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

สายพันธุ์	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
M6	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม ใบหนา การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
M7	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องสั้นและถี่ ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากสั้น มีจำนวนมาก
M8	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากสั้น มีจำนวนน้อย
M9	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
M10	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย


ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

สายพันธุ์	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
M11	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากสั้น มีจำนวนน้อย
M12	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบสั้น ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากสั้น มีจำนวนน้อย
M13	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
M14	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
M15	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องสั้นและถี่ ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย

ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

สายพันธุ์	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
M16	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องสั้นและถี่ ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
M17	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม ใบหนา การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
M18	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้นและถี่ ไม่พบการแตกหน่อ ใบสั้น ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
M19	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องสั้นและถี่ ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
M20	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้นและถี่ ไม่พบการแตกหน่อ ใบสั้น ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย

ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

สายพันธุ์	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
M21	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้นและถี่ ไม่พบการแตกหน่อ ใบสั้น ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
M22	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้นและถี่ ไม่พบการแตกหน่อ ใบสั้น ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
M23	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากสั้น มีจำนวนน้อย
M24	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นสูงตรง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย

^{1/} ลำต้นเตี้ย คือ ลำต้นที่มีขนาด 0-3 เซนติเมตร; ลำต้นสูงตรง คือ ลำต้นที่มีขนาดมากกว่า 3 เซนติเมตร; ข้อปล้องสั้นและถี่ คือ ข้อปล้องที่มีความยาวอยู่ระหว่าง 0-0.30 เซนติเมตร; ข้อปล้องยาว คือ ข้อปล้องที่มีความยาวมากกว่า 0.30 เซนติเมตร; ใบสั้น คือ ใบที่มีความยาว 0-1.5 เซนติเมตร; ใบเรียวยาว คือ ใบที่มีความยาวมากกว่า 1.5 เซนติเมตร; รากสั้น คือ รากที่มีความยาว 0-1 เซนติเมตร; รากยาว คือ รากที่มีความยาวมากกว่า 1 เซนติเมตร; รากมีจำนวนน้อย คือ มีราก 1-3 ราก; รากมีจำนวนมาก คือ มีราก 4 รากขึ้นไป

เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่อายุ 6 เดือน พบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่แตกต่างกันไปจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์มีหลายลักษณะ เช่น ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้นและถี่ ใบสั้น ใบหนา รากสั้น และรากมีจำนวนน้อย เป็นต้นซึ่งที่อาจสามารถบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้อีกทางหนึ่ง พบว่าต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ไม่พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ยกเว้นลักษณะรากสั้น และรากมีจำนวนน้อย (10.00 เปอร์เซ็นต์) โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์ของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM ที่มีลำต้นเตี้ยมีมากกว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM ถึง 2.5 เท่า นอกจากนี้ พบเปอร์เซ็นต์ต้นที่มีข้อปล้องสั้นและถี่มากกว่าประมาณ 7 เท่า และพบเปอร์เซ็นต์ต้นที่มีใบสั้นมากกว่าประมาณ 4 เท่า อย่างไรก็ตาม การทดลองครั้งนี้พบเปอร์เซ็นต์ต้นที่มีลักษณะใบหนาในต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM มากกว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ด้วย NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM ถึง 3 เท่า ในขณะที่ลักษณะรากสั้นพบในต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM มากที่สุด (41.67 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ ต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (10.00 เปอร์เซ็นต์) และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM (8.33 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ และพบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM พบลักษณะรากมีจำนวนน้อยมากที่สุด (75.00 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM (58.33 เปอร์เซ็นต์) และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (10.00 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

เมื่อพิจารณาการมี (+) หรือไม่มี (-) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลเป็นรายต้น ในตารางที่ 6 พบว่าต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ส่วนใหญ่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะ (8 ใน 10 ต้น) และมีการเปลี่ยนแปลง 1 ลักษณะ จำนวน 2 ต้น คือ มีรากสั้น (C10) และรากมีจำนวนน้อย (C3) ส่วนต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะมีจำนวน 1 และ 2 ต้น ตามลำดับ เปลี่ยนแปลง 1 ลักษณะมีจำนวน 5 และ 2 ต้น ตามลำดับ เปลี่ยนแปลง 2 ลักษณะมีจำนวน 5 และ 3 ต้น ตามลำดับ เปลี่ยนแปลง 3 ลักษณะมีจำนวน 0 และ 1 ต้น ตามลำดับ และเปลี่ยนแปลง 4 ลักษณะมีจำนวน 1 และ 4 ต้น ตามลำดับ แสดงว่า NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกันหลายลักษณะในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลได้ดีกว่า NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน

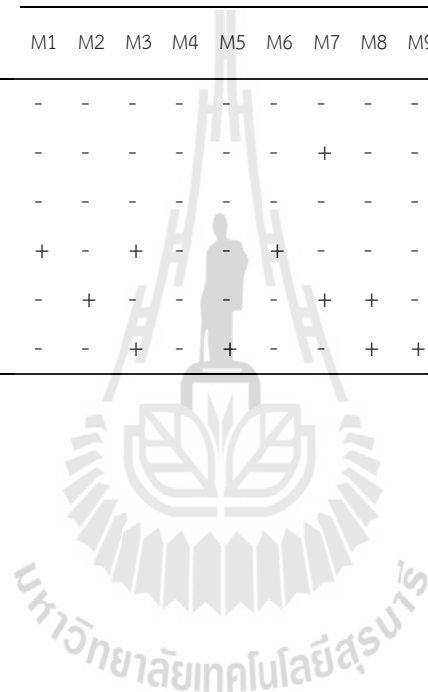
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง (%) ^{1/}		
	ต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์	ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3	
		0.1 mM	0.5 mM
ลำต้นเตี้ย	0.00	16.67	41.67
ข้อปล้องสั้นและถี่	0.00	8.33	58.33
ใบสั้น	0.00	8.33	33.33
ใบหนา	0.00	25.00	8.33
รากสั้น	10.00	41.67	8.33
รากมีจำนวนน้อย	10.00	58.33	75.00

^{1/} เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง = (จำนวนต้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลง/จำนวนต้นทั้งหมด) x 100



ตารางที่ 6 การมี (+) หรือไม่มี (-) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลอายุ 6 เดือน

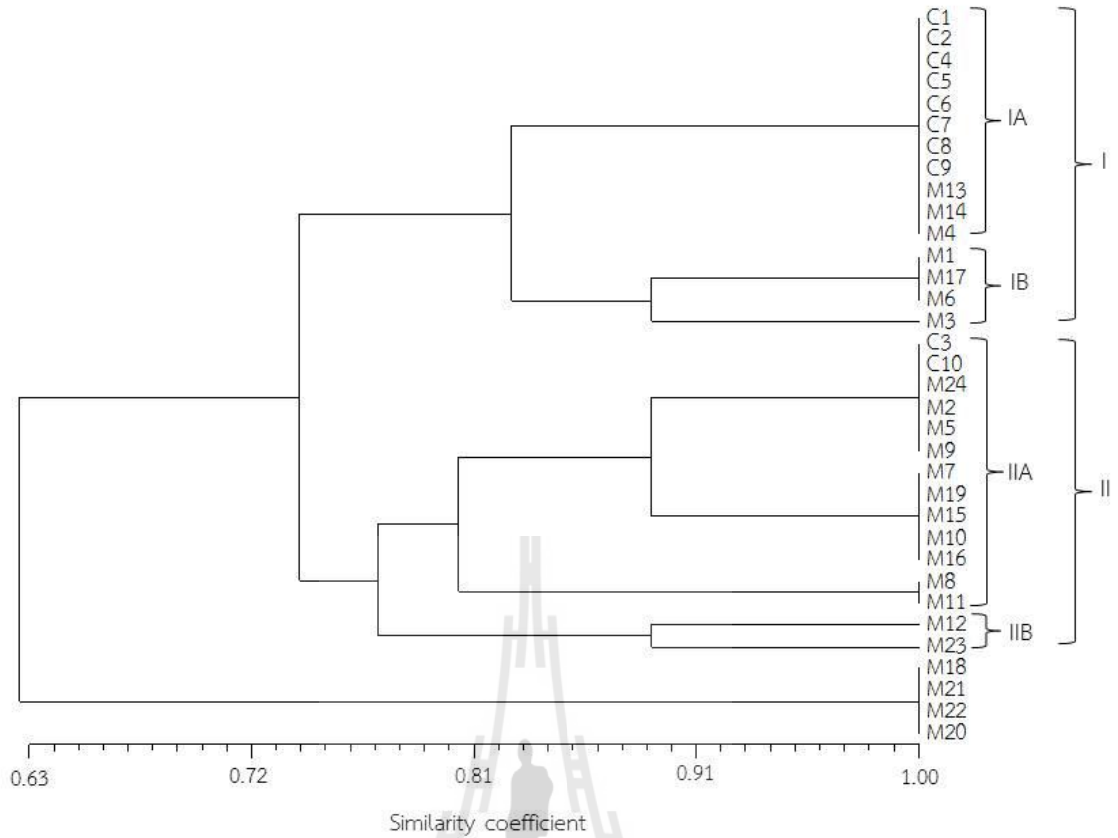
ลักษณะทางสัณฐาน- วิทยาที่เปลี่ยนแปลง	ต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์										ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (M) จาก NaN_3																							
											0.1 mM						0.5 mM																	
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24
ลำต้นเตี้ย	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
ข้อปล้องสั้นและถี่	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
ใบสั้น	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
ใบหนา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
รากสั้น	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
รากมีจำนวนน้อย	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+



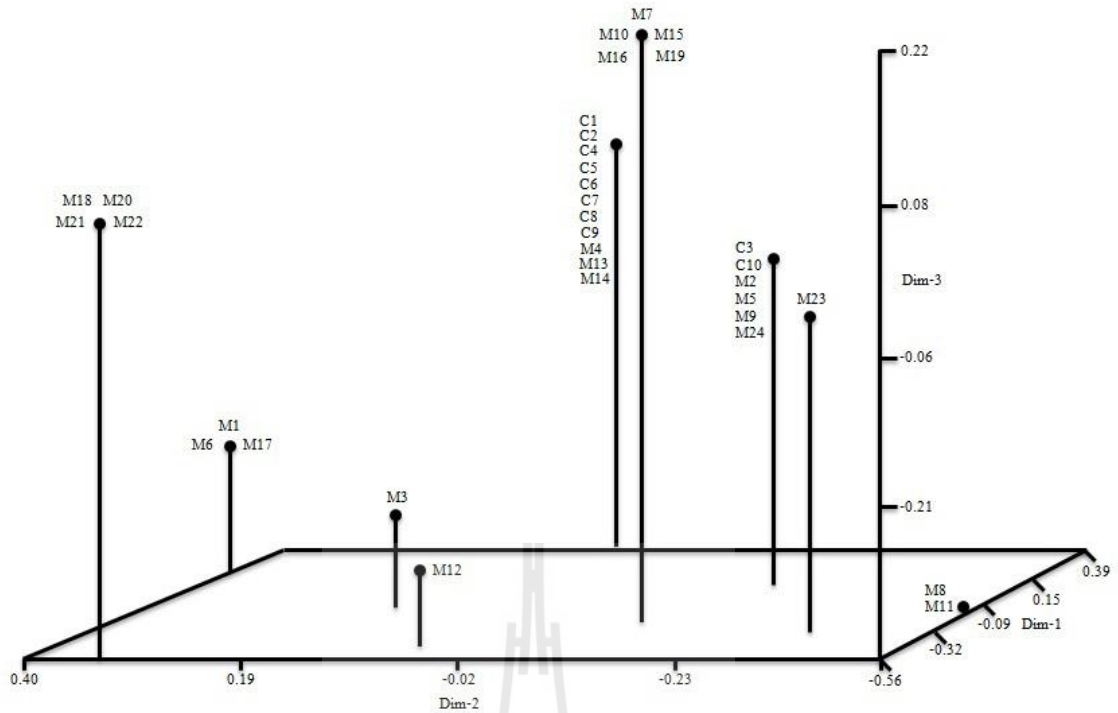
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการสามารถแยกความแตกต่างของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ออกจากต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ได้ ซึ่งต้นเหล่านี้อาจมีพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป อย่างไรก็ตาม เมื่อนำข้อมูลการมี (+) หรือไม่มี (-) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์และต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ (ตารางที่ 6) มาสร้าง dendrogram โดยวิธี UPGMA ส่งผลให้สามารถจัดกลุ่มได้ชัดเจนขึ้นจากการทดสอบความสัมพันธ์ของ Mantel ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ cophenetic 0.79 ($P < 0.01$) แสดงว่า dendrogram เป็นตัวแทนที่ดีของข้อมูลในเมทริกซ์ความคล้ายคลึงกัน จาก dendrogram สามารถจัดกลุ่มต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ จำนวน 10 ต้น ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (cluster) คือ I และ II และ 4 ต้นที่มีความแตกต่างสูง (individual) ที่ระดับความเหมือนทางพันธุกรรม 0.79 (ภาพที่ 3) ซึ่งกลุ่มที่ I สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อย (subcluster) ได้ 2 กลุ่ม คือ IA และ IB โดยพบว่ากลุ่มย่อย IA มีต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 3 ต้น คือ M4, M13 และ M14 มีความเหมือนทางสัณฐานวิทยากับต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ ส่วนกลุ่มย่อย IB ต้น M1, M6 และ M17 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับต้น M3 เช่นเดียวกันกับกลุ่มที่ II สามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม คือ IIA และ IIB โดยกลุ่มย่อย IIA มีต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 2 ต้น (C3 และ C10) มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 11 ต้น (M2, M5, M7-M11, M15, M16, M19 และ M24) และกลุ่ม IIB มีจำนวน 2 ต้น (M12 และ M23) ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน ส่วนต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่เหลือคือ M18, M20, M21 และ M22 ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ (ภาพที่ 3)

แกนทั้งสามของ PCoA อธิบายความแปรปรวน 51.73, 24.93 และ 11.74 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนทั้งหมด ตามลำดับ โดยมีผลรวม 88.40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง PCoA แบ่งความแตกต่างของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ออกจากต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์เป็น 2 กลุ่มใหญ่ เช่นเดียวกับ UPGMA cluster analysis และสามารถแสดงความแตกต่างของต้น M18, M20, M21 และ M22 อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4)

เมื่อพิจารณาความเหมือนกันทางสัณฐานวิทยาในรูปของเมทริกซ์พบว่า Jaccard's genetic similarity coefficient ระหว่างคู่สายพันธุ์มีค่าตั้งแต่ 0.500 จนถึง 1.000 โดยพบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาจากต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์มากที่สุด คือต้น M13, M19, M21 และ M22 ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม 0.500 รองลงมาคือ M23 (0.571) และ M9 และ M12 (0.667) ตามลำดับ (ตารางที่ 7)



ภาพที่ 3 Dendrogram ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุล ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) โดย UPGMA cluster analysis ด้วยโปรแกรม NTSYSp2.2



ภาพที่ 4 แผนภาพ 3 มิติ แสดง Principle coordinate 3 แกนแรก จาก Principle coordinate analysis (PCoA) ของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุล ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaNO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control)

ตารางที่ 7 เมทริกซ์ความคล้ายคลึงกัน (similarity matrix) ทางลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น

	Control			NaN ₃ 0.1 mM												NaN ₃ 0.5 mM											
	C1,2,4-9	C3	C10	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24
C1,2,4-9	1.000																										
C3	0.857	1.000																									
C10	0.857	1.000	1.000																								
M1	0.857	0.750	0.750	1.000																							
M2	0.857	1.000	1.000	0.750	1.000																						
M3	0.857	0.889	0.889	0.889	0.889	1.000																					
M4	0.750	0.857	0.857	0.857	0.857	0.750	1.000																				
M5	1.000	1.000	1.000	0.750	1.000	0.889	0.857	1.000																			
M6	0.857	0.750	0.750	1.000	0.750	0.889	0.857	0.750	1.000																		
M7	0.857	0.889	0.889	0.667	0.889	0.800	0.750	0.889	0.667	1.000																	
M8	0.750	0.857	0.857	0.571	0.857	0.750	0.667	0.857	0.571	0.750	1.000																
M9	0.667	1.000	1.000	0.750	1.000	0.889	0.857	1.000	0.750	0.889	0.857	1.000															
M10	0.857	0.889	0.889	0.667	0.889	0.800	0.750	0.889	0.667	1.000	0.750	0.889	1.000														
M11	0.750	0.857	0.857	0.571	0.857	0.750	0.667	0.857	0.571	0.750	1.000	0.857	0.750	1.000													
M12	0.667	0.667	0.667	0.667	0.667	0.800	0.500	0.667	0.667	0.800	0.750	0.667	0.800	0.750	1.000												
M13	0.500	0.857	0.857	0.857	0.857	0.750	1.000	0.857	0.857	0.750	0.667	0.857	0.750	0.667	0.500	1.000											
M14	1.000	0.857	0.857	0.857	0.857	0.750	1.000	0.857	0.857	0.750	0.667	0.857	0.750	0.667	0.500	1.000	1.000										
M15	1.000	0.889	0.889	0.667	0.889	0.800	0.750	0.889	0.667	1.000	0.750	0.889	1.000	0.750	0.800	0.750	0.750	1.000									
M16	0.750	0.889	0.889	0.667	0.889	0.800	0.750	0.889	0.667	1.000	0.750	0.889	1.000	0.750	0.800	0.750	0.750	1.000	1.000								
M17	0.750	0.750	0.750	1.000	0.750	0.889	0.857	0.750	1.00	0.667	0.571	0.750	0.667	0.571	0.667	0.857	0.857	0.667	0.667	1.000							
M18	0.857	0.667	0.667	0.667	0.667	0.800	0.500	0.667	0.667	0.800	0.500	0.667	0.800	0.500	0.800	0.500	0.500	0.800	0.800	0.667	1.000						
M19	0.500	0.889	0.889	0.667	0.889	0.800	0.750	0.889	0.667	1.000	0.750	0.889	1.000	0.750	0.800	0.750	0.750	1.000	1.000	0.667	0.800	1.000					
M20	0.750	0.667	0.667	0.667	0.667	0.800	0.500	0.667	0.667	0.800	0.500	0.667	0.800	0.500	0.800	0.500	0.500	0.800	0.800	0.667	1.000	0.800	1.000				
M21	0.500	0.667	0.667	0.667	0.667	0.800	0.500	0.667	0.667	0.800	0.500	0.667	0.800	0.500	0.800	0.500	0.500	0.800	0.800	0.667	1.000	0.800	1.000	1.000			
M22	0.500	0.667	0.667	0.667	0.667	0.800	0.500	0.667	0.667	0.800	0.500	0.667	0.800	0.500	0.800	0.500	0.500	0.800	0.800	0.667	1.000	0.800	1.000	1.000	1.000		
M23	0.571	0.750	0.750	0.500	0.750	0.667	0.571	0.750	0.500	0.889	0.857	0.750	0.889	0.857	0.889	0.571	0.571	0.889	0.889	0.500	0.667	0.889	0.667	0.667	0.667	1.000	
M24	0.857	1.000	1.000	0.750	1.000	0.889	0.857	1.000	0.750	0.889	0.857	1.000	0.889	0.857	0.667	0.857	0.857	0.889	0.889	0.750	0.667	0.889	0.667	0.667	0.667	0.750	1.000

หลังจากปลูกเลี้ยงต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 10 ต้น นาน 1 ปี พบว่าบางต้นโดยเฉพาะต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ตาย โดยต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ตาย 1 ต้น ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM ตาย 4 และ 5 ต้น ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่อายุ 1 ปี พบว่าต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งหมดมีใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวาเป็นปกติ มีการเจริญเติบโตที่เปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับต้นอายุ 6 เดือน และการศึกษาครั้งนี้พบใบหนาในต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM จำนวน 3 ต้น คือ M18, M22 และ M23 นอกจากนี้ยังพบว่าความสูงทั้งต้น ความยาวใบ ความกว้างใบ ความยาวราก และจำนวนรากของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) และพบว่าความยาวใบ ความกว้างใบ ความยาวราก และจำนวนรากของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 8) โดยต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ให้ค่าเฉลี่ยของทุกลักษณะดีกว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ดังนี้ ความสูงทั้งต้นของต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์สูงที่สุด (7.31 เซนติเมตร) รองลงมาคือ ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM (4.83 และ 3.31 เซนติเมตร) ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน ความยาวข้อปล้องของต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์และที่ 0.1 mM NaN_3 ยาวที่สุด (0.90 และ 0.84 เซนติเมตร) รองลงมาคือ ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM (0.45 เซนติเมตร) ตามลำดับ และความยาวใบของต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ยาวที่สุด (4.69 เซนติเมตร) รองลงมาคือ ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM (3.13 และ 2.21 เซนติเมตร) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าความยาวรากและจำนวนรากของต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ยาวที่สุด (4.00 เซนติเมตร/ 16.75 ราก) รองลงมาคือ ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM (2.70 เซนติเมตร/ 9.38 ราก และ 1.76 เซนติเมตร/ 9.14 ราก) ตามลำดับ ความกว้างใบของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์มีความกว้างใบมากที่สุด (0.79 เซนติเมตร) รองลงมาคือ ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM (0.69 และ 0.67 เซนติเมตร) ตามลำดับ ส่วนจำนวนข้อปล้อง จำนวนใบ และจำนวนการแตกหน่อของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นไม่แตกต่างทางสถิติจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ตารางที่ 8 และภาพที่ 5) ซึ่งจะทำการศึกษาการปลูกเลี้ยงต้นเหล่านี้เพื่อศึกษาลักษณะของดอกและช่อดอกต่อไปในอนาคต

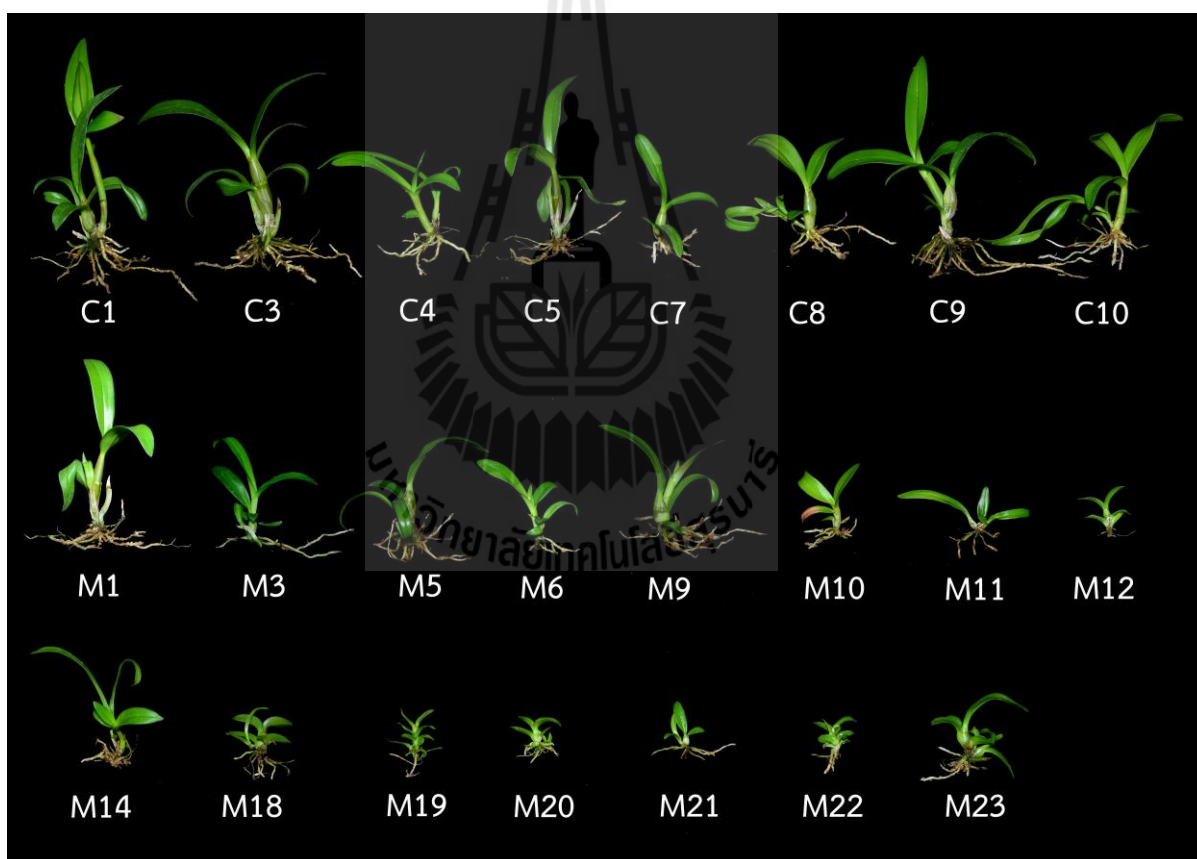
นอกจากต้นเหล่านี้ จากการทดลองยังได้ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM จำนวน 75 ต้น และโปรโตคอร์ม จำนวน 41 ขวด คิดเป็นต้นได้ประมาณ 12,300 ต้น และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM อีกจำนวน 60 ต้น และโปรโตคอร์ม จำนวน 14 ขวด คิดเป็นต้นได้ประมาณ 4,200 ต้น ซึ่งอยู่ระหว่างการปลูกเลี้ยงเพื่อประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาในระยะการเจริญทางลำต้น และในระยะออกดอกต่อไป

ตารางที่ 8 ดัชนีการเจริญเติบโตของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุลอายุ 1 ปี

การก่อกลายพันธุ์	ดัชนีการเจริญเติบโต ^{1/}								
	ความสูงทั้งต้น (ซม.)	จำนวนการแตกหน่อ	จำนวนข้อปล้อง	ความยาวข้อปล้อง (ซม.)	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวราก (ซม.)	จำนวนราก
Control	7.31 a ^{2/}	1.88	2.88	0.90 a	4.69 a	0.79 a	6.38	4.00 a	16.75 a
NaN_3 0.1 mM	4.83 b	0.88	2.00	0.84 a	3.13 b	0.69 b	5.00	2.70 b	9.38 b
NaN_3 0.5 mM	3.31 c	1.29	2.57	0.45 b	2.21 b	0.67 b	6.43	1.76 b	9.14 b

^{1/} ความสูงทั้งต้น คือ ความสูงจากโคนต้นถึงปลายใบอ่อน; ความยาวใบ คือ ความยาวใบอ่อนจากโคนใบถึงปลายใบ; ความยาวข้อปล้อง คือ ค่าเฉลี่ยความยาวข้อปล้อง; ความยาวราก คือ ความยาวของรากที่ยาวที่สุดของต้น

^{2/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์/คอลัมน์หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M14-M23) จำนวน 15 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 8 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุลอายุ 1 ปี

2.2 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers)

นำต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาทำการตรวจสอบพันธุกรรมเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ISSR จำนวน 12 ไพรเมอร์นี้ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล ISSR จำนวน 11 ไพรเมอร์ แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนและคงที่ (reproducible) ซึ่งให้ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ (polymorphic) จำนวน 10 ไพรเมอร์ และให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทุกสายพันธุ์ (monomorphic) จำนวน 1 ไพรเมอร์ แต่มีเพียงเครื่องหมายโมเลกุล ISSR 834 ที่ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ไม่คงที่ จึงไม่สามารถใช้ในการประเมินในขั้นตอนต่อไปได้ (ตารางที่ 9) เมื่อทำการตรวจสอบต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ทั้ง 10 ต้น ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ISSR จำนวน 11 ไพรเมอร์ พบว่ามีรูปแบบแถบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน ยกเว้นต้น C3 ซึ่งแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้โดยเครื่องหมายโมเลกุล ISSR 817 (ตารางที่ 10) ซึ่งอาจเป็นผลจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (somaclonal variation) ในระหว่างทำการทดลอง จำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป ซึ่งต้น C3 นี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไปคือ มีรากจำนวนน้อย

จากการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุล ISSR กับต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ จำนวน 10 ต้น และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 24 ต้น (M1-M24) พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 194 แถบ ซึ่งเป็นแถบที่มีความหลากหลายจำนวน 63 แถบ คิดเป็น 32.3 เปอร์เซ็นต์ โดยจำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบมี 10-29 แถบต่อไพรเมอร์ ซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละไพรเมอร์ โดยคิดเป็นค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์เท่ากับ 16.2 แถบ ในจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0-20 แถบต่อไพรเมอร์ คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.3 แถบ โดยมีขนาดตั้งแต่ 200 bp (ISSR 835) ถึง 4,800 bp (ISSR 801 และ 812) โดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล ISSR 818 มีเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอสูงที่สุดคือ 69.0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ISSR 829 (66.7 เปอร์เซ็นต์) และ ISSR 817 (46.2 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

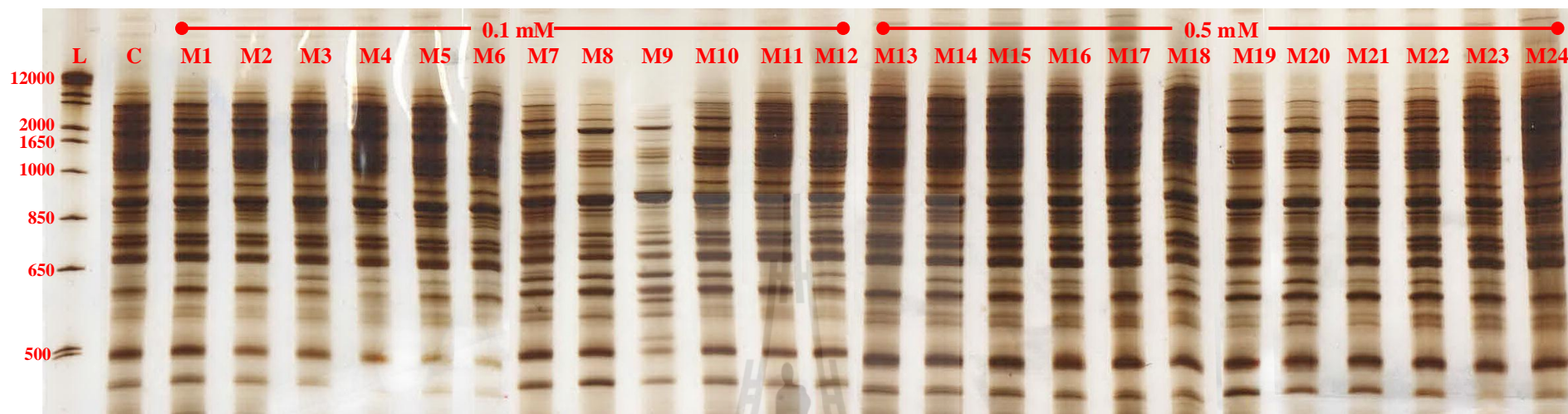
เครื่องหมายโมเลกุล ISSR ที่ให้ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอทั้ง 10 ไพรเมอร์ สามารถแยกความแตกต่างของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ได้ จำนวน 20 ต้น จาก 24 ต้น (83.33 เปอร์เซ็นต์) ภาพที่ 6 แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เปลี่ยนไป ทำให้สามารถระบุได้ว่าต้นเหล่านี้มีพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป จึงได้รับการจำแนกเป็นต้นสายพันธุ์กล้วย ในขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 13 ต้น คือ M2, M7, M9, M10, M11, M12, M15, M16, M17, M18, M19, M20 และ M21 จะพบแถบดีเอ็นเอจำเพาะ (unique band) ซึ่งแตกต่างจากต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ต้นอื่น ทั้งหมด 38 แถบ โดยพบว่าต้น M2, M15, M16 และ M18 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะดังกล่าว จำนวน 1 แถบ ต้น M7, M10, M11, M12 และ M21 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะ จำนวน 2 แถบ ต้น M17 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะ จำนวน 3 แถบ ต้น M19 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะ จำนวน 4 แถบ ต้น M20 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะ จำนวน 5 แถบ และต้น M9 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะ จำนวน 6 แถบ โดยแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับจีโนมไทป์ของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์เหล่านี้เพิ่มปริมาณได้จากเครื่องหมายโมเลกุล ISSR จำนวน 8 ไพรเมอร์ คือ ISSR 801, 807, 811, 817, 818, 825, 829 และ 840 และมีประโยชน์

สำหรับการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) และกำหนดเอกลักษณ์ของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์เหล่านี้ในอนาคต (ตารางที่ 10 และภาพที่ 6)

ตารางที่ 9 ลำดับไพรเมอร์ อุณหภูมิ annealing จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย (polymorphic) เปอร์เซ็นต์ของความหลากหลาย (polymorphism) และขนาดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุล ISSR สำหรับวิเคราะห์ต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เยี่ยมสกุลที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control)

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของ ไพรเมอร์	อุณหภูมิ annealing	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มี ความหลากหลาย	Polymorphism (%)	ขนาดแถบ ดีเอ็นเอ (bp)
ISSR 801	(AT) ₈ T	53	19	6	31.6	500-4,800
ISSR 807	(AG) ₈ T	53	17	2	11.8	350-3,800
ISSR 811	(GA) ₈ C	53	22	1	4.5	240-4,100
ISSR 812	(GA) ₈ A	53	13	0	0.0	340-4,800
ISSR 817	(CA) ₈ A	53	13	6	46.2	380-4,400
ISSR 818	(CA) ₈ G	53	29	20	69.0	280-3,000
ISSR 825	(AC) ₈ T	53	10	2	20.0	300-4,400
ISSR 827	(AC) ₈ G	53	10	2	20.0	320-4,000
ISSR 829	(TG) ₈ C	58	21	14	66.7	400-4,300
ISSR 834	(AG) ₈ YT	58	NR	NR	NA	NA
ISSR 835	(AG) ₈ YC	48	17	2	11.8	200-4,400
ISSR 840	(GA) ₈ YT	48	23	8	34.8	220-4,100
รวมทั้งหมด			194	63		
ค่าเฉลี่ย			16.2	5.3	26.4	

NA ไม่รายงานผล, NR ทำซ้ำได้ผลไม่คงที่, Y ไพริมิดีน (pyrimidines; C, T)



ภาพที่ 6 รูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมายโมเลกุล ISSR 840 ของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับ 1 Kb plus DNA marker



ตารางที่ 10 การมี (+) หรือไม่มี (-) แอบัติเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์จากไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลาย-พันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุล

ISSR	Control										ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (M)																							
											NaN ₃ 0.1 mM								NaN ₃ 0.5 mM															
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24
801 ₂₁₉₉ ^{1/}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
801 ₂₀₅₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
801 ₁₅₅₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
801 ₁₀₂₀	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
801 ₉₅₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
801 ₈₈₇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
807 ₁₆₆₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
807 ₉₅₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
811 ₅₈₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
817 ₁₂₅₈	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
817 ₁₀₉₄	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
817 ₉₅₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
817 ₇₇₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
817 ₆₉₅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

^{1/} ตัวเลขก่อนตัวเลขที่ห้อย หมายถึง ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างเครื่องหมาย; ตัวเลขที่ห้อย หมายถึง ขนาดแถบดีเอ็นเอบริเวณที่พบความแตกต่างในแต่ละไพรเมอร์ มีหน่วยคือ bp

ตารางที่ 10 การมี (+) หรือไม่มี (-) แถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์จากไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลาย-พันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุล (ต่อ)

ISSR	Control										ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (M)																								
											NaN ₃ 0.1 mM								NaN ₃ 0.5 mM																
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	
817 ₆₂₆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
818 ₂₇₁₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
818 ₂₅₂₈	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
818 ₂₃₅₈	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
818 ₂₂₇₇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
818 ₂₁₉₉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
818 ₁₆₆₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
818 ₁₄₄₆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
818 ₁₀₅₆	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
818 ₁₀₂₀	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
818 ₉₅₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
818 ₈₈₇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
818 ₈₆₉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
818 ₈₅₇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^{1/} ตัวเลขก่อนตัวเลขที่ห้อย หมายถึง ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างเครื่องหมาย; ตัวเลขที่ห้อย หมายถึง ขนาดแถบดีเอ็นเอบริเวณที่พบความแตกต่างในแต่ละไพรเมอร์ มีหน่วยคือ bp

ตารางที่ 10 การมี (+) หรือไม่มี (-) แถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์จากไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุล (ต่อ)

ISSR	Control										ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (M)																									
											NaN ₃ 0.1 mM								NaN ₃ 0.5 mM																	
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24		
829 ₂₁₉₉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
829 ₁₆₆₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
829 ₁₃₄₉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-		
829 ₁₁₇₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
829 ₁₀₂₀	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
829 ₉₅₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
829 ₈₂₇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
829 ₇₄₅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
829 ₆₇₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
829 ₆₄₈	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
829 ₅₈₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
829 ₄₁₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
829 ₃₉₈	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

^{1/} ตัวเลขก่อนตัวเลขที่ห้อย หมายถึง ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างเครื่องหมาย; ตัวเลขที่ห้อย หมายถึง ขนาดแถบดีเอ็นเอบริเวณที่พบความแตกต่างในแต่ละไพรเมอร์ มีหน่วยคือ bp

ตารางที่ 10 การมี (+) หรือไม่มี (-) แลบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์จากไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุล (ต่อ)

ISSR	Control										ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (M)																								
											NaN ₃ 0.1 mM								NaN ₃ 0.5 mM																
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	
835 ₁₆₀₆	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
835 ₇₉₉	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	
840 ₉₅₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
840 ₉₁₉	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
840 ₇₉₉	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
840 ₇₈₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
840 ₆₃₉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^{1/} ตัวเลขก่อนตัวเลขที่ห้อย หมายถึง ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างเครื่องหมาย; ตัวเลขที่ห้อย หมายถึง ขนาดแถบดีเอ็นเอบริเวณที่พบความแตกต่างในแต่ละไพรเมอร์ มีหน่วยคือ bp



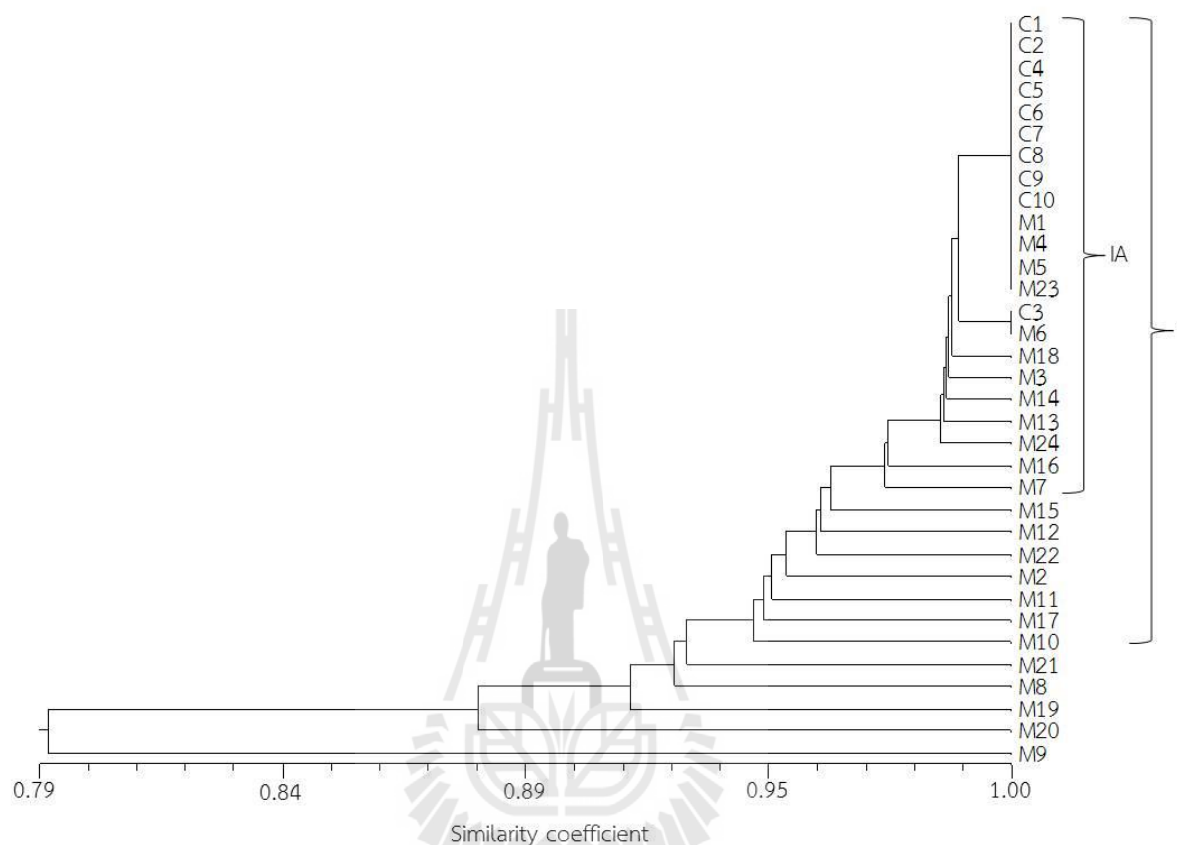
เมื่อนำข้อมูลการมีแถบ (+) และไม่มีแถบ (-) ของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ตารางที่ 10 และภาพที่ 6) มาสร้าง dendrogram โดยวิธี UPGMA ส่งผลให้สามารถแยกกลุ่มความแตกต่างได้อย่างชัดเจน ซึ่งการทดสอบความสัมพันธ์ของ Mantel ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ cophenetic 0.97 ($P < 0.01$) แสดงว่า dendrogram เป็นตัวแทนที่ดีของข้อมูลในแมทริกซ์ความคล้ายคลึงกัน ซึ่งจาก dendrogram สามารถจัดกลุ่มต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 10 ต้น ออกเป็นกลุ่มใหญ่ (cluster) 1 กลุ่ม และ 5 ต้นที่มีความแตกต่างสูง (individual) ที่ระดับความเหมือนทางพันธุกรรม 0.94 (ภาพที่ 7) โดยพบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 4 ต้น คือ M1, M4, M5 และ M23 มีพันธุกรรมไม่แตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ส่วนใหญ่ ยกเว้นต้น C3 ซึ่งกลุ่มนี้สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อย (subcluster) ได้ 1 กลุ่มย่อย คือ IA ซึ่งมีความเหมือนทางพันธุกรรมมากกว่า 0.97 และอีก 7 ต้นที่มีความแตกต่างสูงกว่า โดยกลุ่มย่อย IA ประกอบด้วยต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ทั้ง 10 ต้น และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 12 ต้น คือ M1, M3-M7, M13, M14, M16, M18, M23 และ M24 ในขณะที่มีต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ในกลุ่ม 1 ซึ่งไม่สามารถจัดกลุ่มย่อยได้ (มีความแตกต่างสูง) ประกอบด้วยต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 7 ต้น คือ M2, M10-M12, M15, M17 และ M22 ส่วนต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่เหลือคือ M8, M9, M19, M20 และ M21 มีความแตกต่างจากต้นอื่น ๆ สูงไม่สามารถจัดกลุ่มได้ (ภาพที่ 7)

การวิเคราะห์ PCoA จากเครื่องหมายโมเลกุล ISSR แสดงผลเป็นภาพสามมิติ พบว่าสอดคล้องกับการวิเคราะห์กลุ่ม UPGMA cluster analysis โดยสามารถแยกต้น M9 และ M20 ที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ และไม่สามารถจัดกลุ่มได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 8) แกนทั้งสามของ PCoA อธิบายความแปรปรวน 24.39, 11.25 และ 9.54 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนทั้งหมด ตามลำดับ โดยมีผลรวม 45.18 เปอร์เซ็นต์

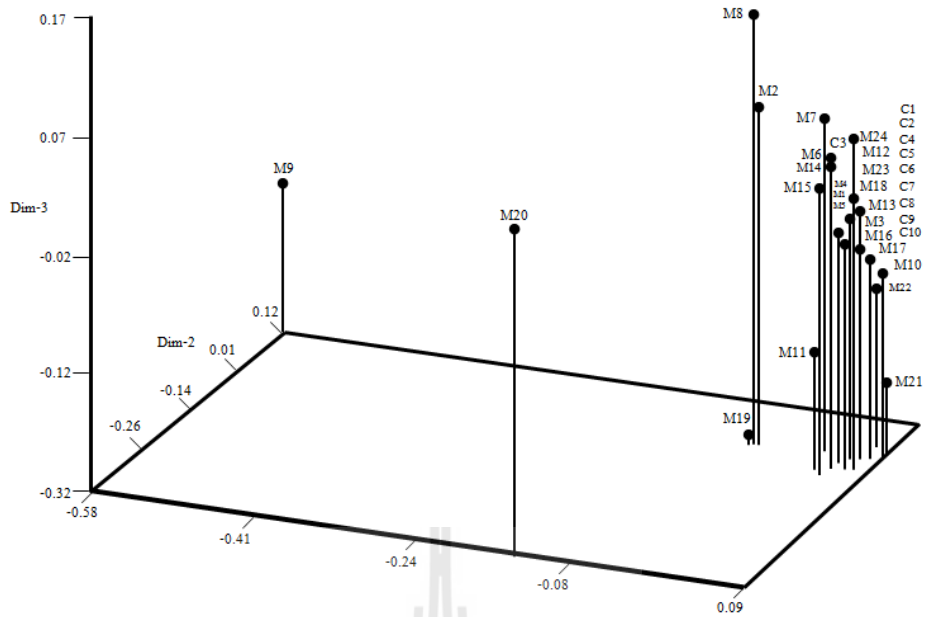
เมื่อพิจารณาความเหมือนกันทางพันธุกรรมในรูปของแมทริกซ์พบว่า Jaccard's genetic similarity coefficient ระหว่างคู่สายพันธุ์มีค่าตั้งแต่ 0.729 (M9 และ M21) จนถึง 1.0 และพบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์มากที่สุด คือต้น M9 ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม 0.795 รองลงมาคือ M20 (0.897), M19 (0.930), M8 (0.940) และ M21 (0.983) ตามลำดับ ส่วนต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ M1, M4, M5 และ M23 ไม่แตกต่างทางพันธุกรรมเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จากการประเมิน 194 ตำแหน่ง (loci) จึงอาจเป็นต้นที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม นอกจากนี้พบต้น จำนวน 1 คู่ (C3 และ M6) ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมภายในคู่เท่ากับ 1 และพบความแตกต่างเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ตารางที่ 11)

ผลของการเปรียบเทียบระหว่างการจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมายโมเลกุล ISSR โดยการเปรียบเทียบ similarity และ cophenetic matrices ด้วย matrix correspondence ของ Mantel's test (Mantel, 1967) พบว่าสหสัมพันธ์ระหว่าง similarity matrices ของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมายโมเลกุล ISSR มีค่า 0.10 ($P > 0.05$) แสดงถึงความไม่สัมพันธ์กันระหว่างเครื่องหมายทั้งสองในการกำหนดความเหมือนกันทางพันธุกรรมระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่ศึกษา และพบสหสัมพันธ์ระหว่าง matrices ของค่า cophenetic correlation สำหรับ dendrogram ของเครื่องหมายโมเลกุล ISSR และลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่มีความสัมพันธ์กัน ($r = 0.20$; $P >$

0.05) โดยพบว่าค่า goodness of fit สำหรับ cophenetic correlation ของเครื่องหมายโมเลกุล ISSR (0.97) มีค่าแตกต่างจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (0.79) สำหรับผลการทดลองนี้พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล ISSR มีประสิทธิภาพสูงกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์



ภาพที่ 7 Dendrogram ของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลจากเครื่องหมายโมเลกุล ISSR ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control)



ภาพที่ 8 Principle coordinate analysis (PCoA) แบบ 3 มิติของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุลจากเครื่องหมายโมเลกุล ISSR ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกายพันธุ์จาก NaNO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกายพันธุ์ (0 mM; control)

ตารางที่ 11 เมทริกซ์ความคล้ายคลึงกัน (similarity matrix) ทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 28 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control) จำนวน 10 ต้น

	Control (C)		NaN_3 0.1 mM												NaN_3 0.5 mM												
	C1,2,4-10	C3	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	
C1,2,4-10	1.000																										
C3	0.988	1.000																									
M1	1.000	0.988	1.000																								
M2	0.955	0.966	0.955	1.000																							
M3	0.988	0.977	0.988	0.944	1.000																						
M4	1.000	0.988	1.000	0.955	0.988	1.000																					
M5	1.000	0.988	1.000	0.955	0.988	1.000	1.000																				
M6	0.988	1.000	0.988	0.966	0.977	0.988	0.988	1.000																			
M7	0.977	0.966	0.977	0.956	0.966	0.977	0.977	0.966	1.000																		
M8	0.940	0.929	0.940	0.897	0.929	0.940	0.940	0.929	0.941	1.000																	
M9	0.795	0.809	0.795	0.804	0.787	0.795	0.795	0.809	0.800	0.782	1.000																
M10	0.952	0.941	0.952	0.909	0.965	0.952	0.952	0.941	0.930	0.892	0.750	1.000															
M11	0.955	0.944	0.955	0.913	0.944	0.955	0.955	0.944	0.933	0.897	0.783	0.909	1.000														
M12	0.964	0.952	0.964	0.920	0.952	0.964	0.964	0.952	0.941	0.902	0.759	0.916	0.920	1.000													
M13	0.988	0.977	0.988	0.944	0.977	0.988	0.988	0.977	0.966	0.929	0.787	0.941	0.944	0.952	1.000												
M14	0.988	0.977	0.988	0.966	0.977	0.988	0.988	0.977	0.966	0.929	0.809	0.941	0.944	0.952	0.977	1.000											
M15	0.965	0.953	0.966	0.944	0.953	0.965	0.965	0.953	0.943	0.905	0.809	0.918	0.921	0.952	0.953	0.977	1.000										
M16	0.977	0.966	0.977	0.933	0.966	0.977	0.977	0.966	0.955	0.918	0.778	0.953	0.956	0.941	0.966	0.966	0.943	1.000									
M17	0.953	0.943	0.953	0.911	0.966	0.953	0.953	0.943	0.932	0.894	0.756	0.930	0.933	0.918	0.943	0.943	0.920	0.966	1.000								
M18	0.988	0.977	0.988	0.944	0.977	0.988	0.988	0.977	0.966	0.929	0.787	0.941	0.966	0.952	0.977	0.977	0.953	0.966	0.943	1.000							
M19	0.930	0.920	0.930	0.889	0.920	0.930	0.930	0.920	0.909	0.871	0.778	0.884	0.911	0.894	0.943	0.920	0.897	0.909	0.886	0.920	1.000						
M20	0.897	0.886	0.897	0.879	0.886	0.897	0.897	0.886	0.876	0.860	0.769	0.851	0.879	0.884	0.886	0.886	0.864	0.876	0.854	0.886	0.854	1.000					
M21	0.983	0.927	0.938	0.894	0.927	0.938	0.938	0.927	0.916	0.875	0.729	0.914	0.918	0.925	0.927	0.927	0.927	0.915	0.892	0.927	0.892	0.833	1.000				
M22	0.964	0.952	0.964	0.920	0.952	0.964	0.964	0.952	0.941	0.902	0.759	0.940	0.943	0.927	0.952	0.952	0.929	0.965	0.941	0.952	0.894	0.860	0.925	1.000			
M23	1.000	0.988	1.000	0.955	0.988	1.000	1.000	0.988	0.977	0.940	0.798	0.952	0.955	0.964	0.988	0.988	0.965	0.977	0.953	0.988	0.930	0.897	0.938	0.964	1.000		
M24	0.988	0.976	0.988	0.943	0.976	0.988	0.988	0.976	0.965	0.915	0.782	0.940	0.943	0.951	0.976	0.976	0.952	0.965	0.941	0.976	0.918	0.884	0.925	0.951	0.988	1.000	

การทดลองครั้งนี้แสดงว่าจากต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ด้วย NaN_3 จำนวน 24 ต้น พบต้นที่มีพันธุ์กรรมต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 20 ต้น คิดเป็น 83.3 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งการทดลองนี้ยังพบลักษณะความแปรปรวนแบบโซมาโคลนอลในต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (C3) ด้วย ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ได้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล ISSR ทั้ง 10 ไพรเมอร์ มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมที่เกิดจากการก่อกลายพันธุ์และเกิดจากความแปรปรวนแบบโซมาโคลนอลได้ ในขณะเดียวกันมีรายงานการใช้เครื่องหมายโมเลกุล ISSR เพื่อแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิด เช่น ผักกาดขาว (*Brassica rapa*) สายพันธุ์ย่อย yellow sarson และกล้วยไม้ดิน *A. formosanus* ได้อีกด้วย (Zhang et al., 2010; Kumar et al., 2011)

แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (มีแถบเพิ่มขึ้นหรือลดลง) ของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ทั้ง 24 ต้น อาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอระหว่างการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เมื่อ PLBs กลัวยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลถูกเหนี่ยวนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์ ซึ่งส่งผลต่อพฤติกรรมของไพรเมอร์ในบริเวณยึดเกาะ (binding site) โดยอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่น การแทนที่คู่เบส (point mutation) การขาดช่วงการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ส่งผลทำให้ดีเอ็นเอขาดหาย (deletion) ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ (duplication) ดีเอ็นเอขาดหายแล้วสามารถต่อกลับเข้ามาใหม่แบบกลับทิศทาง (inversion) หรือดีเอ็นเอขาดหายไปต่อกับดีเอ็นเอส่วนอื่น (translocation) ซึ่ง NaN_3 มีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดความผิดปกติบนโครโมโซม โดยเกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุด มักเกิดการแทนที่คู่เบส (base-pair substitution) โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเบส GC ไปเป็น AT มากกว่าการเพิ่มหรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ (frameshift mutation) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีน (Al-Qurainy and Khan, 2009) ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ El-Mokadem and Mostafa (2014) พบว่า NaN_3 ทุกความเข้มข้น (200, 400, 600 และ 800 ppm) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีและรูปร่างดอก รวมทั้งรูปร่างใบของ *Browallia speciosa* และงานวิจัยของ Türkan et al. (2006) พบว่าการใช้ NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM (LD_{50}) เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการก่อกลายพันธุ์ถั่วลิสงเตา ในทำนองเดียวกัน Mensah and Obadoni (2007) รายงานว่าระดับความเข้มข้นของ NaN_3 ที่เหมาะสมในการก่อกลายพันธุ์ถั่วลิสงคือ 0.03% นอกจากนี้ Animasaun et al. (2014) ยังพบว่า NaN_3 ความเข้มข้น 50 mM ทำให้ถั่วลิสงพันธุ์ Samnut 20 มีปริมาณโปรตีนและไขมันมากที่สุด แสดงให้เห็นว่า NaN_3 เป็นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ และเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชในปัจจุบัน

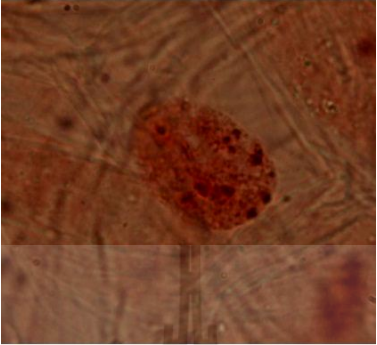
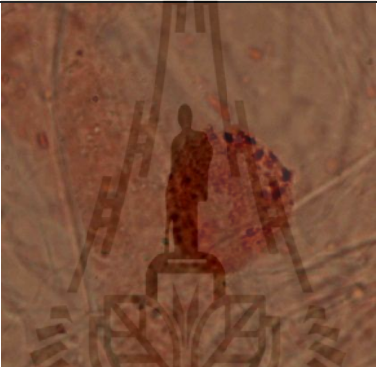
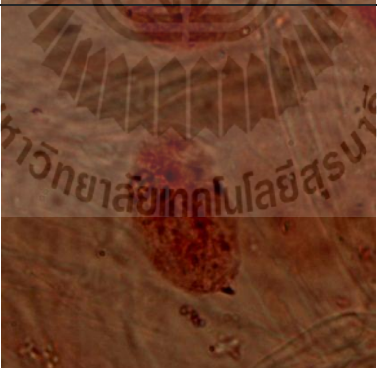
2.3 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยวิธีการระดับเซลล์ (cytology)

ตรวจสอบจำนวนโครโมโซมของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ด้วย NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM และ 0.5 mM เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ โดยวิธีนับจำนวนโครโมโซมบริเวณปลายราก ซึ่งตัดแปลงจาก Sharma and Sharma (1980) และ Joseph (1984) พบว่าต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ทั้ง 24 ต้น (M1-M24) มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ $2n = 2x = 24$ (ดิพลอยด์) แสดงว่าสารก่อกลายพันธุ์ NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล (ตารางที่ 12) อย่างไรก็ตาม ควรมีการทดลองเพิ่มเติมต่อไปในอนาคตกับต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จำนวนมากขึ้น

การใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ในพืช เพื่อเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม หรือทำความเสียหายให้กับโครโมโซม ควรใช้สารเคมีในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมกับชนิดพืชและเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากสารเคมีบางชนิดเมื่อใช้ในปริมาณที่สูงอาจเป็นพิษต่อพืช มีรายงานการใช้สารโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตและจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้เอื้องเงิน (*Dendrobium draconis* Rchb f.) พบว่าโปรโตคอร์ัมที่ผ่านการแช่ในโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 38$ ซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 4x = 76$ แสดงว่าสารโคลชิซินความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถทำให้จำนวนโครโมโซมเปลี่ยนแปลงได้ (รัชณี เพ็ชรช้าง, 2553)

ในขณะที่ยิวกันสาร NaN_3 ความเข้มข้นที่เหมาะสมกับชนิดและเนื้อเยื่อพืช สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมได้ เช่น การแทนที่คู่เบส การขาดขบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ส่งผลทำให้ดีเอ็นเอขาดหาย ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ ดีเอ็นเอขาดหายแล้วสามารถต่อกลับเข้ามาใหม่แบบกลับทิศทางหรือดีเอ็นเอขาดหายแต่ไปต่อกับดีเอ็นเอส่วนอื่น การที่โครโมโซมเคลื่อนไปสู่ขั้วเซลล์ช้ากว่าปกติ และการที่โครโมโซมมีโครงสร้างคล้ายสะพานได้ (Klasterkii et al., 1976) ซึ่งมีรายงานการใช้ NaN_3 เพื่อก่อกลายพันธุ์ในข้าวบาร์เลย์ สามารถลดความถี่ของการเคลื่อนที่ของโครมาติด (chromatid) ในระยะ metaphase ของเซลล์ปลายราก ส่งผลกับพัฒนาการของโครโมโซมโดยตรง (Velemínský et al., 1977) และสามารถทำความเสียหายให้กับโครโมโซมของข้าวบาร์เลย์ได้ (Pearson et al., 1975)

ตารางที่ 12 จำนวนโครโมโซมของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่ได้จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0 mM; control)

สายพันธุ์	การก่อกลายพันธุ์	ลักษณะโครโมโซม	จำนวนโครโมโซม	การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม
C1-C10	Control		24	ดีพลอยด์
M1-M12	NaN_3 0.1 mM		24	ดีพลอยด์
M13-M24	NaN_3 0.5 mM		24	ดีพลอยด์

บทที่ 4

บทสรุป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. การก่อกลายพันธุ์ protocom-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลด้วย sodium azide (NaN_3) พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs เพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ NaN_3 ที่สูงขึ้น โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการก่อกลายพันธุ์ PLBs (LD_{30} และ LD_{50}) ด้วย NaN_3 คือ 0.1 และ 0.5 mM
2. การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลายด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์มีลักษณะลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้นและถี่ ใบสั้น ใบหนา รากสั้น และรากมีจำนวนน้อย
3. การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลายด้วยเครื่องหมายโมเลกุล inter simple sequence repeats (ISSR) พบต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ซึ่งมีพันธุกรรมต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 20 ต้น จาก 24 ต้น คิดเป็น 83.3 เปอร์เซ็นต์ บ่งบอกความมีประสิทธิภาพของ NaN_3 ในการชักนำการกลายพันธุ์ และพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล ISSR มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลายมากกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากมีค่า Mantel's test cophenetic correlation สูงกว่า และสามารถจำแนกต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ได้ดีกว่า
4. การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลายด้วยวิธีการระดับเซลล์ พบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์มีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 24$ แสดงว่า NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม
5. ต้นสายพันธุ์กลายเหล่านี้ รวมทั้งต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่ยังไม่ได้ทดสอบ ซึ่งจากการทดลองนี้ได้ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM จำนวน 75 ต้น และโปรโตคอร์ม จำนวน 41 ขวด คิดเป็นต้นได้ประมาณ 12,300 ต้น และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM อีกจำนวน 60 ต้น และโปรโตคอร์ม จำนวน 14 ขวด คิดเป็นต้นได้ประมาณ 4,200 ต้น ซึ่งอยู่ระหว่างการปลูกเลี้ยงเพื่อประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาในระยะการเจริญทางลำต้น และในระยะออกดอกต่อไป รวมทั้งการประเมินความต้านทานโรค ฯลฯ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า หรือใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. (2557). ระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านการเกษตร [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://production.doae.go.th>.
- ธัญญา ขำเลิศ. (2532). ผลของรังสีแกมมาที่มีต่อเนื้อเยื่อบุกที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ระดับมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปริญญา ขจิตพาล. (2552). ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับศักยภาพการให้ผลผลิตและการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะความต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ระดับดุษฎีบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ทิพวัลย์ อยู่ชา, ฉัฐพร คุ่นวงศ์ และจุลภาค คุ่นวงศ์. (2549). การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์. ว. วิทย. กษ. 37(2): 163-174.
- ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพย์ผ่อง. (2550). หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 372 หน้า.
- มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (2551). การส่งออกกล้วยไม้ [ออนไลน์]. ได้จาก <http://std.kku.ac.th/4530802136/export.html>
- รุ่งนภา แก้วทองราช. (2548). การชักนำกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ 'เอียสกุล' ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว. วิทย. กษ. 39: 108-111.
- รัชณี เพ็ชรช้าง. (2553). ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการให้โคลชิซินต่อการเจริญและจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้เอื้องเงิน. ว. วิทย. เทคโนโลยี มมส. 29: 413-419.
- วิยดา เทพหัตถ์, ศศิวิมล แสงวงผล, เชษฐัฐ สาทรกิจ และทยา เจนจิตติกุล. (2546). สารานุกรมผลิตผลและผลิตภัณฑ์จากพืชในซูเปอร์มาร์เก็ต ฉบับคอมพิวเตอร์. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.sc.mahidol.ac.th/wiki>.
- ศิริยุญา ม่วงสอน และสมปอง เตชะโต. (2551). การชักนำการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้เหลืองจันทร์บุรณด้วย EMS. ว. วิทย. กษ. 39: 239-242.
- สลิล สิทธิจักรธรรม. (2550). คู่มือกล้วยไม้ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์สารคดี. 200 หน้า.
- สลิล สิทธิจักรธรรม และนฤมล กฤษณชาติ. (2550). คู่มือกล้วยไม้. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์สารคดี. 248 หน้า.
- Abdullah, T.L., Endan, J. and Nazir, B.M. (2009). Changes in flower development, chlorophyll mutation and alteration in plant morphology of *Curcuma alismatifolia* by gamma irradiation. Am. J. Appl. Sci. 6: 1436-1439.

- Ahmad B.T., Sharma, M. and Anis, M. (2007). Comparative analysis of meiotic aberrations induced by diethylsulphate and sodium azide in broad bean (*Vicia faba* L.). *Asian J. Plant Sci.* 6: 1051-1057.
- Aktar, S., Nasiruddin, K.M. and Hossain, K. (2008). Effect of different media and organic additives interaction on in vitro regeneration of *Dendrobium* orchid. *J. Agric. Dev.* 6: 69-74.
- Al-Quariny, F. and Khan, S. (2009). Mutagenic effects of sodium azide and its application in crop improvement. *World Appl. Sci. J.* 6: 1589-1601.
- Amano, E. (2004). Practical suggestions for mutation breeding. *Forum for nuclear cooperation in Asia (FNCA)*. 70 p.
- Animasaun, D.A., Oyedeji, S., Azeez, M.A. and Onasanya, A.O. (2014). Alkylating efficiency of sodium azide on pod yield, nut size and nutrition composition of Samnut 10 and Samnut 20 varieties of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev.* 14(7): 9497-9510.
- Baloch, S.H., Kurt, C., Arioglu, H. and Ozkan, H. (2010). Assaying of diversity among soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes at DNA level. *Turk. J. Agric.* 34: 285-301.
- Brown-Guedira, G.L., Thompson, J.A., Nelson, R.L. and Warburton, M.L. (2000). Evaluation of genetic diversity of soybean introductions and North American ancestors using RAPD and SSR markers. *Crop Sci.* 40: 815-823.
- Chen, W.H., Chen, T.M., Fu, Y.M., Hsieh, R.M. and Chen, W.S. (1998). Studies on somaclonal variation on *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep.* 18: 7-13.
- Di Gaspero, G. and Cipriani, G. (2003). Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like and receptor like kinase related to disease resistance in grapevine. *Mol. Gen. Genomics* 269: 612-623.
- El-Mokadem, H.E. and Mostafa, G.G. (2014). Induction of mutations in *Browallia speciosa* using sodium azide and identification of the genetic variation by peroxidase isozyme. *Afr. J. Biotechnol.* 13(1): 106-111.
- Hui-Zhong, W., Zhen-Xing, W., Jiang-Jie, L., Nong-Nong, S., Yan, Z., Zhi-Tao, Z. and Jun-Jun, L. (2009). Molecular diversity and relationships among *Cymbidium Goeringii* cultivars based on inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Genetica* 136: 391-399.
- Jain, S.M. (2005). Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 82: 113-123.

- Joseph, A. (1984). Orchid biology review and perspectives, III. Cornell university New York, USA. 410 p.
- Khan, S. and Al-Quariny, F. (2009). Mutagenic effect of sodium azide on seed germination of *Eruca sativa* (L.). Aust. J. Basic & Appl. Sci. 3: 3081-3087.
- Klasterskii, I., Natarajan, A.T. and Ramel, C. (1976). An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations. Haraditas. 83: 153.
- Kredich, N.M. (1971). Regulation of L-cysteine biosynthesis in *S. typhimurium*. J. Biol. Chem. 264: 3473-3484.
- Kumar, H., Anubha, K., Vishwakarma, M.K. and Lal, J.P. (2011). Morphological and molecular characterization of *Brassica rapa* ssp. yellow sarson mutants. J. Oilseed Brassica. 2: 1-6.
- La, V.J.M. and Mongold, J. (1987). Structure activity relationship of the azide metabolite, azidoalnine in *Salmonella typhimurium*. Mutat. Res. 177: 27-33.
- Levesque, R. and SPSS Inc. (2006). SPSS Programming and Data Management. 3rd edn. SPSS Institute, Somers, New York.
- Li, M., Wang, Y. and Ming, F. (2010). Studies on genetic relationship analysis of 16 *Phalaenopsis* hybrid cultivars by ISSR molecular marker technology [online]. Available: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-NKDB_201001017.html
- Luan, V.Q., Thien, N.Q., Khiem, D.V. and Nhut, D.T. (2006). In vitro germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture. Ho Chi Minh City, Vietnam. pp. 175-177.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27: 209-220.
- Medina, F.I.S., Amano, E. and Tano, S. (2004). Mutation Breeding Manual. Forum for Nuclear Cooperation in Asia (FNCA). 110 p.
- Mensah, J.K. and Obadoni, B. (2007). Effects of sodium azide on yield parameters of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Afr. J. Biotechnol. 6(6): 668-671.
- Nilan, R.A., Sideris, E.G., Kleinhofs, A., Sander, C. and Konzak, C.F. (1973). Azide a potent mutagen. Mutat. Res. 17: 142-144.
- Owais, W.M. and Kleinhofs, A. (1988). Metabolic activation of the mutagen azide in biological systems. Mutat. Res. 197: 313-323.
- Pearson, O.W., Sander, C. and Nilan, R.A. (1975). The effect of sodium azide on cell processes in the embryonic barley shoot. Radiat Bot. 15: 315-322.

- Rajib, R. and Jagatpati, T. (2011). Chemical mutagenic action on seed germination and related agro-metrical traits in M1 *Dianthus* generation. *Curr. Bot.* 2: 19-23.
- Rohlf, F.J. (1993). NTSYSpc V.2.2 Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.2. Exeter Software, Setauket, New York.
- Roy, J. and Banerjee, N. (2003). Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. f. *Sci. Hortic.* 97: 333-340.
- Sharma, A.K. and Sharma, A. (1980). Chromosome Techniques: Theory and Practice, 3rd ed. Butterworth's Co. Ltd., London, USA. pp 9-27.
- Türkan, A.D., Khawar, K.M., Çiftci, C.Y. and Özcan, S. (2006). Effects of mutagenic sodium azide (NaN₃) on *in vitro* development of four pea (*Pisum sativum* L.) cultivars. *Int. J. Agri. Biol.* 8(3): 349-351.
- Velemínský, J. and Angelis, K.J. (1987). Effects of sodium azide on replicative and repair DNA synthesis in barley embryos. *Mutat. Res. Lett.* 190: 125-129.
- Velemínský, J., Gichner, T. and Pokorný, V. (1977). Induction of DNA single-strand breaks in barley by sodium azide applied at pH 3. *Mutat. Res.* 42: 65-70.
- Xiaohong, Y., Li, G. and Bo, Y. (2007). Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on Inter-simple sequence repeats analysis. *Front. Biol. China* 2: 419-424.
- Zhang, F., Lv, Y., Dong, H. and Guo, S. (2010). Analysis of genetic stability through intersimple sequence repeats molecular markers in micropropagated plantlets of *Anoectochilus formosanus* Hayata, a medicinal plant. *Biol. Pharm. Bull.* 33: 384-388.
- Zhang, M., Pan, L., Fan, G., Chen, J. and Cheng, P. (2005). Study on DNA isolation from polysaccharides-rich transgenic *Dendrobium*. *Mol. Plant Breed.* 7: 209-214.

ภาคผนวก



ตารางภาคผนวกที่ 1 ดัชนีการเจริญเติบโตของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุล

การก่อกลายพันธุ์	สายพันธุ์	ดัชนีการเจริญเติบโต ^{1/}								
		ความสูงทั้งต้น (ซม.)	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนข้อปล้อง	ความยาวข้อปล้อง (ซม.)	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวราก (ซม.)	จำนวนราก
Control	C1	7.0	2.50	2	1.25	4.5	0.6	6	3.0	6
	C2	4.7	2.20	3	0.73	2.5	0.6	10	2.5	7
	C3	7.0	3.30	3	1.10	3.7	0.6	7	3.0	3
	C4	7.5	2.50	3	0.83	5.0	0.6	6	2.5	8
	C5	4.3	1.80	3	0.60	2.5	0.6	6	3.0	7
	C6	6.2	2.50	2	1.25	3.7	0.6	6	3.5	6
	C7	3.2	1.40	2	0.70	1.8	0.6	6	2.5	6
	C8	5.0	1.50	2	0.75	3.5	0.6	6	3.2	6
	C9	3.3	1.60	3	0.53	1.7	0.6	7	2.3	3
	C10	4.0	1.30	3	0.43	2.7	0.5	5	3.2	4

ตารางภาคผนวกที่ 1 ดัชนีการเจริญเติบโตของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุล (ต่อ)

การก่อกลายพันธุ์	สายพันธุ์	ดัชนีการเจริญเติบโต								
		ความสูงทั้งต้น (ซม.)	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนข้อปล้อง	ความยาวข้อปล้อง (ซม.)	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวราก (ซม.)	จำนวนราก
NaN ₃ 0.1 mM	M1	5.5	2.30	5	0.46	3.2	0.6	10	1.8	5
	M2	5.0	2.00	5	0.40	3.0	0.5	10	0.6	4
	M3	5.8	2.60	5	0.52	3.2	0.6	8	2.0	3
	M4	3.7	1.70	5	0.34	2.0	0.6	9	1.6	4
	M5	5.0	1.80	3	0.60	3.2	0.5	6	1.8	3
	M6	3.3	1.30	4	0.33	2.0	0.5	6	1.8	4
	M7	3.5	1.50	5	0.30	2.0	0.5	7	1.0	4
	M8	5.2	1.40	4	0.35	3.8	0.5	6	0.5	3
	M9	4.0	1.50	3	0.50	2.5	0.5	5	2.0	3
	M10	3.0	1.30	4	0.33	1.7	0.4	6	2.3	2
	M11	3.6	1.30	3	0.43	2.3	0.4	5	1.0	3
	M12	2.5	1.20	3	0.40	1.3	0.4	5	0.8	2

ตารางภาคผนวกที่ 1 ดัชนีการเจริญเติบโตของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (control) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุล (ต่อ)

การก่อกลายพันธุ์	สายพันธุ์	ดัชนีการเจริญเติบโต								
		ความสูงทั้งต้น (ซม.)	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนข้อปล้อง	ความยาวข้อปล้อง (ซม.)	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวราก (ซม.)	จำนวนราก
NaN_3 0.5 mM	M13	9.0	4.00	6	0.67	5.0	0.5	7	1.5	8
	M14	5.5	2.50	6	0.42	3.0	0.6	9	1.5	5
	M15	4.0	1.50	5	0.30	2.5	0.6	7	1.3	2
	M16	3.5	1.20	4	0.30	2.3	0.6	6	1.5	3
	M17	4.0	1.70	5	0.34	2.3	0.5	11	2.0	4
	M18	2.5	1.50	6	0.25	1.0	0.5	10	4.0	1
	M19	3.5	1.50	5	0.30	2.0	0.6	8	1.8	1
	M20	2.5	1.00	4	0.25	1.5	0.4	6	1.5	2
	M21	2.5	1.50	5	0.30	1.0	0.4	7	2.0	1
	M22	2.7	1.70	6	0.28	1.0	0.4	9	2.3	2
	M23	2.8	1.20	3	0.40	1.6	0.4	5	0.8	3
	M24	3.9	2.60	2	1.30	1.3	0.6	2	2.0	1

^{1/} ความสูงทั้งต้น คือ ความสูงจากโคนต้นถึงปลายใบอ่อน; ความสูงต้น คือ ความสูงทั้งต้นลบความยาวใบ; ความยาวใบ คือ ความยาวใบอ่อนจากโคนใบถึงปลายใบ; ความยาวข้อปล้อง คือ ค่าเฉลี่ยความยาวข้อปล้อง; ความยาวราก คือ ความยาวของรากที่ยาวที่สุดของต้น

ตารางภาคผนวกที่ 2 ค่าการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของระดับความเข้มข้นของสารละลาย NaN_3 ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs ที่ระยะเวลาต่างกัน

ระยะเวลา 3 วัน

Source of variation	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Treatment	8	349239.169	43654.896	2.477**	0.000
Error	210	3701.470	17.626		
Corrected Total	218	352940.639			

**= แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลา 1 สัปดาห์

Source of variation	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Treatment	8	338221.820	42277.727	2.077**	0.000
Error	194	3949.609	20.359		
Corrected Total	202	342171.429			

**= แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลา 2 สัปดาห์

Source of variation	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Treatment	8	322092.731	40261.591	1.889**	0.000
Error	179	3815.248	21.314		
Corrected Total	187	325907.979			

**= แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาง ปิยะดา อลิษามณ์ นามสกุล ตันตสวัสดี (นามสกุลเดิม ทิพย์ผ่อง)
(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Piyada Alisha Tantasawat (Thipyapong)
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3100900033308
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ.เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทร. 0-4422-4204 โทรสาร 0-4422-4150 E-mail: piyada@sut.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
 - 1) ปริญญาตรี สาขาวิชา เกษตร สถาบัน ม. เกษตรศาสตร์
ปีที่สำเร็จ 1988 (เกียรตินิยมอันดับ 1)
 - 2) ปริญญาโท ไม่มี (เข้าศึกษาต่อปริญญาเอกหลังจบปริญญาตรี)
 - 3) ปริญญาเอก สาขาวิชา การปรับปรุงพันธุ์พืช (Plant Breeding) สถาบัน Cornell
University สหรัฐอเมริกา ปีที่สำเร็จ 1997
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Plant Biotechnology, Plant Molecular Biology, Plant Breeding
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยและงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ :
ระบุสถานภาพในการทำวิจัย ว่า เป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วม
วิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น
 - 7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย:
 - 1) การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) ดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร
 - 2) การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) สายพันธุ์แท้โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร
 - 3) บทบาทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases) ในการต้านทานของมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* L.) ต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* (F.))

- 4) การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วฝักยาว ถั่วฝักยาวไร่ค่าง ถั่วเขียว และถั่วเหลือง
- 5) การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวเพื่อเพิ่มผลผลิต
- 6) การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวเพื่อเพิ่มผลผลิต ระยะที่ 2
- 7) การปรับปรุงพันธุ์องุ่น (*Vitis spp.*) ให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง
- 8) การปรับปรุงพันธุ์องุ่น (*Vitis spp.*) ให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างและโรคสแคบ ระยะที่ 2
- 9) การพัฒนาพันธุ์แตงกวา (*Cucumis sativus L.*) ลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง
- 10) การพัฒนาพันธุ์ maintainer line ของทานตะวันโดยการรวมโปรโตพลาสต์
- 11) การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายด้วยวิธีกลายพันธุ์เพื่อให้ต้านทานโรคเน่าดำ
- 12) การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้ง และการรวมยีนต้านทานในถั่ว-เขียว
- 13) การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายด้วยวิธีกลายพันธุ์เพื่อให้ต้านทานโรคเน่าดำ ระยะที่ 2
- 14) การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด และการรวมยีนต้านทานในถั่วเขียว ระยะที่ 2

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: ชื่อแผนงานวิจัย และ/หรือโครงการวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

- 1) การโคลนกลุ่มของยีนต้านทานโรค (RGAs) เพื่อให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในองุ่น (*Vitis spp.*). (2547). การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 4, เชียงใหม่ หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 2) การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วฝักยาว ถั่วฝักยาวไร่ค่าง ถั่วเขียว และถั่วเหลือง. (2551). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หัวหน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 3) การจำแนกพันธุ์ถั่วฝักยาวไร่ค่างและถั่วฝักยาวโดยใช้ ISSR analysis. (2548). การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5, ชลบุรี. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 4) การตรวจสอบลูกผสมถั่วเขียวช่วงที่หนึ่งโดยเครื่องหมายโมเลกุล ISSR. (2549). การประชุมวิชาการพืชไร่วงศ์ถั่วแห่งชาติ ครั้งที่ 1, เชียงราย. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 5) การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบถั่วเขียว (*Vigna radiata*). (2547). การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 4, เชียงใหม่. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 6) การผลิตข้าวโพด (*Zea mays L.*) ดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. (2547). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 7) การผลิตข้าวโพด (*Zea mays L.*) สายพันธุ์แท้โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. (2547). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หัวหน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 8) การแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวัน (*Helianthus annuus L.*) จากเนื้อเยื่อใบ (2551). การประชุมวิชาการ งานเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2551 “พลังงานทดแทน แก่นเกษตรยั่งยืน พื้นชีวี

- สิ่งแวดล้อม น้อมรับพระราชดำริ”, พิษณุโลก. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอมผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 9) การแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวัน. (2550). การประชุมวิชาการ งาน ทานตะวัน ละหุ่ง และคำฝอย แห่งชาติ ครั้งที่ 5, น่าน. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอมผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 - 10) การส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดภายใต้สภาพ photoautotrophic. (2546). การประชุมศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติประจำปี นครปฐม. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอมผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 - 11) การแสดงออกของยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของมะเขือเทศในเซลล์ยีสต์. (2551). การประชุมวิชาการ งานเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2551 “พลังงานทดแทน แก่นเกษตรยั่งยืน พื้นชีวี สิ่งแวดล้อม น้อมรับพระราชดำริ”, พิษณุโลก. ผู้ร่วมวิจัย (นศ.นำเสนอมผลงาน) แหล่งทุน DUO-FRANCE
 - 12) บทบาทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases) ในการต้านทานของมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* L.) ต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* (F.)). (2548).รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
 - 13) ผลของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในมะเขือเทศต่อความต้านทานของหนอนกระทู้หอม. (2548). การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5, ชลบุรี. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอมผลงาน)
 - 14) A simple and highly efficient protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration from proembryonic mass suspension culture in ‘Autumn Royal Seedless’. (2007). *Vitis* 46(1): 45-46. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4
 - 15) Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. (2004). *Planta* 220: 105-117. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
 - 16) Application of ISSR markers for verification of F₁ hybrids in mungbean (*Vigna radiata*). (2012). *Genet. Mol. Res.* 11: 3329-3338. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 - 17) Assessment of *Phytophthora palmivora* culture filtrates from different media on *in vitro* selection of black rot resistance in *Dendrobium*. (2012). The 2nd Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. Oct 28-Nov 1, Phuket, Thailand หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอมผลงาน) แหล่งทุนสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
 - 18) Association between root length density and seed yield in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). (2012). *Env. Res. J.* 6: 50-56. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 - 19) Association of ISSR markers with resistance to powdery mildew in mungbean. (2012). 10th International Congress on Plant Molecular Biology, October 21-26, ICC, Jeju Island, Republic of Korea หัวหน้าโครงการและผู้เสนอมผลงาน แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

- 20) Association of RGA-SSCP markers with resistance to downy mildew and anthracnose in grapevines. (2012). *Gen. Mol. Res.* 11: 1799-1809. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 21) Chitosan stimulates growth of micropropagated *Dendrobium* plantlets. (2010). *Acta Hort* 878: 205-212. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 22) Cloning of resistance gene analogs (RGAs) in grapevine (*Vitis cinerea*). (2005). International Grape Genomics Symposium, St. Louis, USA. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 23) Cloning of resistance gene analogs (RGAs) in grapevine hybrid. (2006). The 9th International Conference on Grape Genetics and Breeding, Udine, Italy. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 24) Correlation of total dry matter (TDM) with seed yield in mungbean. (2010). The International Conference on Sustainable Community Development. Jan 21-23, Nong Khai Campus Khon Kaen University and Vientiane, Lao PDR. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนองาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 25) Cultural characteristics of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grape anthracnose on different media. (2009). *Suranaree J. Sci. Technol.* 6(2): 149-157. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 26) Defensive role of polyphenol oxidases against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. (1996). Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists, San Antonio, Texas. *Plant Physiol.* 111s: 168. ผู้ร่วมวิจัยและเสนองาน
- 27) Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera* [Hübner]) and beet armyworm (*Spodoptera exigua* [Hübner]). (2009). *J Chem Ecol* 35: 28-38. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- 28) Development of food safety software prototype. (2006). *Suranaree J. Sci. Tech.* 13: 101-111. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4
- 29) Development of ISSR-RGA markers linked to powdery mildew resistance in mungbean. (2013). The Convergence of Two Major Meetings Joint Conference of HGM 2013 and 21st International Congress of Genetics, April 13-18, The Sands Expo and Convention Center, Marina Bay Sands, Singapore หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 30) Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. (1997). *Plant Physiol.* 113: 707-718. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
- 31) Diversity of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grapevine anthracnose in Thailand. (2006). Proceedings of the International Workshop on Tropical and

- Subtropical Fruits (at Royal Flora Ratchaphruek 2006, International Horticultural Exposition for His Majesty the King). Nov 20-23, 2006, Chiang Mai, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนองาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 32) Effects of colchicine on aseptic culture of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). (1988). ปัญหาพิเศษ
 - 33) Evaluation of genetic variability in *in vitro* sodium azide-induced *Dendrobium* 'Earsakul' mutants. (2014). Genet. Mol. Res. 13(3): 5333-5342. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1
 - 34) Evaluation of grapevines for resistance to downy mildew (*Plasmopara viticola*) under laboratory and field conditions. (2014). S. Afr. J. Enol. Vitic. 35(1): 43-50. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 - 35) Functional analysis of polyphenol oxidases by antisense/sense technology. (2007). Molecules 12: 1569-1595. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1
 - 36) Genetic diversity and pathogenicity analysis of *Sphaceloma ampelinum* causing grape anthracnose in Thailand. (2010). J. Phytopathol. 158: 837-840. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 5 แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 - 37) Genetic diversity of *Sphaceloma ampelinum* causing grape anthracnose and pathogenicity in laboratory and field conditions. The 4th AG-BIO/PERDO Graduate Conference & UT-KU Joint Seminar, December 9-10, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนองาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 - 38) Genetic diversity of the *Vigna* germplasm from Thailand and neighboring regions revealed by AFLP analysis. (2006). Gen. Res. Crop Evol. 53: 1043-1059. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4
 - 39) Grapevine breeding and genetics. UNESCO-EOLSS (Online Encyclopedia) <http://www.eolss.net/ViewChapter.aspx?CategoryId=10> หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 - 40) Growth and downy mildew resistance of grapevine hybrids. (2010). The International Conference on Sustainable Community Development. Jan 21-23, Nong Khai Campus Khon Kaen University and Vientiane, Lao PDR. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนองาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัย-แห่งชาติ
 - 41) Growth enhancement of *in vitro* maize under photoautotrophic condition. (2003). Annual Meeting of the National Corn and Sorghum Research Center, Nakhon Pathom, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนองาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 - 42) Identification of chemical mutagen-induced *Dendrobium* 'Earsakul' mutants using ISSR markers. (2012). Molecular Mapping & Marker Assisted Selection International Conference, Feb 8-11, Vienna, Austria. หัวหน้าโครงการและผู้เสนองาน แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

- 43) Identification of dwarf yard-long bean and yard-long bean cultivars using ISSR analysis. (2005). The Fifth National Horticultural Congress. Apr 26-29, 2005, Chonburi, Thailand. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
- 44) Identification of genes for resistance to powdery mildew in mungbean. (2007). Proceedings of the 8th African Crop Science Society Conference. Oct 27-31, 2007, El-Minia, Egypt. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 45) Identification of genes for powdery mildew resistance in mungbean. (2010). J. Life Sci. 4: 25-29. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 3 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 46) Increasing resistance of tomato to Lepidopteran insects by overexpression of polyphenol oxidase. (2004). 6th World Congress on the Processing Tomato, Melbourne, Australia. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน. แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- 47) Induced mutagenesis and *in vitro* selection for black rot resistance in *Dendrobium*. (2014). International Conference on Life Science & Biological Engineering, July 22-24, Renaissance Sapporo Hotel, Hokkaido, Japan หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- 48) Inheritance of downy mildew (*Plasmopara viticola*) and anthracnose (*Sphaceloma ampelinum*) resistance in grapevines. (2013). Gen. Mol. Res. 12(4): 6752-6761. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 49) Inhibition of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Phytophthora palmivora* with plant crude extracts. (2012). 2nd International Symposium of Bio-Pesticides and Ecotoxicological Network (2nd IS-BioPEN), September 24-26, Maruay Garden Hotel, Bangkok, Thailand. ผู้ร่วมวิจัย
- 50) Isolation of resistance gene analogs from grapevine resistant and susceptible to downy mildew and anthracnose. (2011). Sci. Hort. 128: 357-363. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 51) Laboratory and field evaluations of resistance to *Sphaceloma ampelinum* causing anthracnose in grapevine. (2012). Aust. Plant Pathol. 41: 263-269. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 5 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 52) Modification of polyphenol oxidase expression in transgenic tomato: role of PPO in disease resistance. (1997). Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Copper Mountain, Colorado. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
- 53) Molecular characterization of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grape-vine anthracnose in Thailand. (2007). Proceedings of the 5th International Table Grape Symposium. Nov 14-16, 2007, Cape Town, South Africa. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

- 54) Molecular, morphological and pathogenicity characterization of *Sphaceloma ampelinum* isolates from Thailand. (2006). The 9th International Conference on Grape Genetics and Breeding, Udine, Italy. หัวหน้าโครงการและผู้ยื่นเสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 55) Morphological, pathogenicity and virulence characterization of *Sphaceloma ampelinum* the causal agent of grape anthracnose in Thailand. (2012). Afr. J. Microbiol. Res. 6(10): 2313-2320. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 2
- 56) NBS-LRR-type resistance gene analogs (RGAs) in *Vitis cinerea* B9, *V. rupestris* B38 and 'Horizon. (2006). Proceedings of the International Workshop on Tropical and Subtropical Fruits (at Royal Flora Ratchaphruek 2006, International Horticultural Exposition for His Majesty the King). Nov. 20-23, 2006, Chiang Mai, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนองาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 57) Optimization of factors for efficient isolation of protoplasts in sunflower (*Helianthus annuus* L.). (2012). Aust. J. Crop Sci. 6: 1004-1010. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 3 แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 58) Overexpression of a bacterial branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex in Arabidopsis results in accumulation of branched-chain acyl-CoAs and alteration of free amino acid composition in seeds. (2003). Plant Sci. 165: 1213-1219. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 2
- 59) Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants increases resistance to common cutworm (*Spodoptera litura* (F.)). (2003). Plant Biology 2003, Honolulu, Hawaii. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน
- 60) Overexpression of tomato polyphenol oxidase increases resistance to common cutworm. (2008). Plant Sci. 174: 456-466. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4. แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- 61) Polyphenol oxidase gene family: differential expression during vegetative and reproductive development, and in response to injuries, and defensive functional analysis. (1997). Ph.D. thesis. Cornell University, Ithaca, NY. 132 p.
- 62) Polyphenol oxidase-mediated resistance to common cutworm. (2007). Proceedings of the 60th New Zealand Plant Protection Conference. Aug 13-16, 2007, Napia, New Zealand. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- 63) PPO expression and accumulation during pollen germination and pollen tube growth. (2002). Fourteenth Annual Penn State Symposium in Plant Physiology: Plant Reproduction 2002, State College, Pennsylvania. ผู้ร่วมวิจัยและเสนองาน
- 64) Production of doubled haploid maize (*Zea mays* L.) by anther culture. (2004). Ag-Biotech Graduate Conference I, Bangkok, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนองาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

- 65) Pronamide-induced polyploidy in *Rhynchostylis gigantean* and *Dendrobium*. (2010). The 28th International Horticultural Congress. Aug 22-27, Lisbon, Portugal. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
- 66) Relationships and variability of agronomic and physiological characters in mungbean. (2011). Afr. J. Biotechnol. 10: 9992-10000. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 2 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 67) Resistance gene analogs from *Vitis cinerea*, *Vitis rupestris*, and *Vitis* hybrid Horizon. (2007). Am. J. Enol. Vitic. 58(4): 484-493. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 68) Role of tomato polyphenol oxidase in resistance against beet army worm. (2005). The Fifth National Horticultural Congress. Apr 26-29, 2005, Chonburi, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน)
- 69) Seed yield in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) is correlated with root length density and total dry matter. Popescu E, Golubev I (eds). Beans: Nutrition, Consumption and Health. Nova Science Publishers, New York. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 70) SSR analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic relationship and variety identification in Thailand. (2011). Aust. J. Crop Sci. 5: 283-290. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 71) Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. (1997). 5th International Congress of Plant Molecular Biology, Singapore. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
- 72) Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. (2004). Plant Sci. 167: 693-703. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
- 73) Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. (1995). Phytochemistry 40: 673-676. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
- 74) The effects of proline and coconut water on callus induction of cucumber (*Cucumis sativus* L.). (2010). Acta Hort. 871: 589-597. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 75) Tomato polyphenol oxidase B is spatially and temporally regulated during development and in response to ethylene. (2011). Molecules 16: 493-517. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 2
- 76) Tomato polyphenol oxidase (PPO) D expression. (in preparation).
- 77) Tomato polyphenol oxidase (PPO): differential response of the PPO F promoter to injuries and wound signals. (1997). Plant Physiol. 115: 409-418. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
- 78) Tomato polyphenol oxidase (PPO): role of PPO during oxidative stress. (2004). Plant Sci. 167: 693-703. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1

- 79) Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) using morphological characters, SSR and ISSR analysis. (2010). *Sci. Hort.* 124:204-216. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 80) Variety identification and genetic relationships of mungbean and blackgram in Thailand based on morphological characters and ISSR analysis. (2010). *African Journal of Biotechnology.* 9(27): 4452-4464. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 81) Verification of F₁ hybrid using ISSR markers in mungbean (*Vigna radiate* (L.) Wilczek). *Proceedings of the First National Leguminosae Congress.* Aug 28-30, 2006, Chiangrai, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 82) Wound induction of polyphenol oxidases. (1994). Cornell Center for Advanced Technology, Ithaca, New York, USA. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อแผนงานวิจัย และ/หรือโครงการวิจัย การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

- 1) การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายด้วยวิธีกลายพันธุ์เพื่อให้ต้านทานโรคเน่าดำ ระยะที่ 2 หัวหน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 2) การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้ง และการรวมยีนต้านทานในถั่วเขียว หัวหน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 3) การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด และการรวมยีนต้านทานในถั่วเขียว ระยะที่ 2 หัวหน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ