การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลโดยโซเดียมเอไซด์

นางสาวอนรรฆอร วรรณจินดาพร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2558

MUTATION INDUCTION OF *Dendrobium* 'Earsakul' USING SODIUM AZIDE

Anakkaorn Wannajindaporn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master of Science Program in Crop Science

Suranaree University of Technology

Academic Year 2015

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลโดยโซเดียมเอไซด์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____

(ผศ. ดร.ฐิติพร มะชิโกวา)
ประธานกรรมการ

_____

(ศ. ดร.ปิยะดา อลิฌาณ์ ตันตสวัสดิ์)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

_____

(รศ. ดร.หนูเดือน เมืองแสน)
กรรมการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

_____

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปีจำนงค์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม

_____

(ศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

อนรรฆอร วรรณจินดาพร : การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลโดยโซเดียมเอไซด์ (MUTATION INDUCTION OF *Dendrobium* 'Earsakul' USING SODIUM AZIDE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อลิฌาณ์ตันตสวัสดิ์, 112 หน้า.

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากมีความสวยงามและหลากหลายสูง จึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีคุณภาพดีและมีผลผลิตสูงจึงมีความจำเป็น ซึ่งการก่อกลายพันธุ์เป็นทางเลือกหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วยวิธีกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี โซเดียมเอไซด์ (sodium azide; NaN_3) ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ 1) การก่อกลายพันธุ์ protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วย NaN_3 2) การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลาย ซึ่งประกอบด้วย 3 การทดลอง คือ 2.1) การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา 2.2) การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ 2.3) การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยวิธีการระดับเซลล์ ซึ่งจากการทดสอบหาความเข้มข้นของ NaN_3 ที่เหมาะสมต่อการก่อกลายพันธุ์ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล โดยใช้ reverse osmosis water (ROW; control 1) และ NaN_3 ความเข้มข้น 0 (control 2), 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 และ 4.0 mM 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 0.1 และ 0.5 mM และการไม่ก่อกลายพันธุ์ (ROW (control 1) และ 0 mM NaN_3 (control 2)) ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนาน 6 เดือน แล้วนำออกปลูกในสภาพโรงเรือน พบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์บางต้นมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงคือ ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้นและถี่ ใบสั้น ใบหนา รากสั้น และรากมีจำนวนน้อย แตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลง เมื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM จำนวน 24 ต้น เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์จำนวน 10 ต้น โดยใช้เครื่องหมาย inter-simple sequence repeats (ISSR) พบว่าได้ต้นสายพันธุ์กลายที่มีพันธุกรรมต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 20 ต้น คิดเป็น 83.33 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ ISSR ที่ให้ความหลากหลายทั้ง 10 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์ จำนวน 63 แถบ จาก 181 แถบ คิดเป็น 34.81 เปอร์เซ็นต์ และจากการนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย ISSR มาใช้ประเมินความหลากหลายและความสัมพันธ์ทาง

พันธุกรรมของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ พบว่าเครื่องหมายทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์กัน (r=0.19) และเครื่องหมาย ISSR มีประสิทธิภาพสูงกว่า เนื่องจากมีความสามารถในการจำแนกต้นสายพันธุ์กลายสูงกว่า จากการนับจำนวนโครโมโซมปริเวณปลายราก พบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์มีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=24 แสดงว่า NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า NaN_3 สามารถก่อกลายพันธุ์ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเครื่องหมาย ISSR เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพ สามารถใช้ในการจำแนกต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ออกจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ได้ตั้งแต่ระยะแรก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2558 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ANAKKAORN WANNAJINDAPORN : MUTATION INDUCTION OF *Dendrobium* ‘Earsakul’ USING SODIUM AZIDE. THESIS ADVISOR : PROF. PIYADA ALISHA TANTASAWAT, Ph.D., 112 PP.

CYTOLOGY/DENDROBIUM/ISSR/MORPHOLOGY/MUTATION/ORCHID/ SODIUM AZIDE

The 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 and yield 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 and (2) selection and evaluation of mutants, which was divided into 3 experiments: 2.1) selection and evaluation with morphological characters, 2.2) selection and evaluation with molecular markers, and 2.3) selection and evaluation with cytological method. When reverse osmosis water (ROW; control 1) and various concentrations of NaN_3 (0 (control 2), 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 and 4.0 mM) were evaluated to determine the optimal concentrations for inducing mutation of *Dendrobium* ‘Earsakul’ PLBs and the percentages of mortality were recorded at 3 days, 1 and 2 weeks, it was found that the percentages of mortality of PLBs increased with the increasing concentrations of NaN_3. 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 0.1 and 0.5 mM NaN_3 and cultured for 6 months before being transferred to a greenhouse.

The nonmutagenized PLBs were treated with ROW (control 1) and 0 mM NaN_3 (control 2). Morphological alterations have 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 no change was observed. When genetic profiles of 24 putative mutants from mutagenesis using 0.1 and 0.5 mM NaN_3 were compared to 10 nonmutagenized controls using inter-simple sequence repeats (ISSR) markers, altered DNA profiles were found in 20 out of these 24 putative mutants (83.33%). Sixty-three polymorphic bands were produced from a total of 181 bands (34.81%) by 10 polymorphic ISSR primers. Genetic diversity and relatedness were evaluated among NaN_3 mutagenized plants and nonmutagenized controls by means of ISSR analysis and morphological characters. No correlation was found between ISSR and morphological markers. In addition, ISSR had higher mutant differentiation capability, indicating its higher efficiency. The 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 the chromosome number. These results indicated that NaN_3 can be effectively utilized to mutagenize *Dendrobium* 'Earsakul' PLBs, and the ISSR marker is a powerful tool for identification of mutants at an early stage.

School of Crop Production Technology Student's Signature_____

Academic Year 2015 Advisor's Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เพราะได้รับความช่วยเหลือและคำแนะนำจากบุคคลฝ่ายต่าง ๆ หลายฝ่าย ทั้งในด้านวิชาการและการดำเนินการวิจัยดังต่อไปนี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อลิฌาณ์ตันตสวัสดิ์ ผู้ให้ความเมตตากรุณา ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และคอยชี้แนะแนวทางทั้งด้านการเรียนและการวิจัยอย่างดียิ่ง เป็นแบบอย่างอาจารย์และนักวิจัยที่ดีและมีคุณธรรมแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด พร้อมทั้งอบรมสั่งสอนเพื่อให้ศิษย์ประพฤติตนเป็นคนดีของสังคม ตลอดจนให้คำปรึกษาช่วยแก้ไขปัญหาในระหว่างการทำวิจัย และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ คณะกรรมการวิจัยและพัฒนาแห่งชาติ (วช.) และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่สนับสนุนทุนวิจัยเพื่อการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตรทุกท่าน ที่ให้ความรู้ ชี้แนะ และอบรมสั่งสอน

ขอขอบพระคุณ คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤกษพงศ์ เป็นอย่างสูง ที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ พร้อมทั้งเป็นกำลังใจไม่ให้ย่อท้อต่ออุปสรรคต่าง ๆ คุณอรทัย นาชิน คุณสมยงค์ พิมพ์พรม และเจ้าหน้าที่ประจำอาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือด้านสารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ในการวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้องนักศึกษาปริญญาโท ปริญญาเอก และนักวิจัยห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์พืชทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำงานวิจัยนี้จนแล้วเสร็จ

ขอขอบคุณคุณกิตติมา ชาญกิจโกศล และคุณอักษิกา อารยะเลิศ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการประสานงานและการเตรียมเอกสาร

ท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา ที่อบรมเลี้ยงดู สั่งสอน ให้คำปรึกษา ให้กำลังใจ และสนับสนุนการศึกษาเล่าเรียนมาโดยตลอดจนประสบความสำเร็จ ขอบคุณพี่น้อง และญาติทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

อนรรฆอร วรรณจินดาพร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญภาพ ..... ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ ..... ฑ

บทที่

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 1
1.3 สมมติฐานการวิจัย 4
1.4 ขอบเขตของการวิจัย 4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5

2. ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของกล้วยไม้สกุลหวาย 6
2.2 ความสำคัญของกล้วยไม้สกุลหวายทางเศรษฐกิจ 6
2.3 การจำแนกชนิดของกล้วยไม้ 8
2.4 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้ 9
2.5 อนุกรมวิธานของกล้วยไม้สกุลหวาย 11
2.6 กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล 12
2.7 วิธีการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ 13
2.8 การกลายพันธุ์ในพืช 15
2.9 ขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ 19
2.10 การใช้โซเดียมเอไซด์ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ 22

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.11 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ....23
2.12 การตรวจสอบการกลายพันธุ์....24
2.13 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม....26

3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง....28
3.2 สถานที่ทำการทดลอง....29
3.3 ระยะเวลาการทดลอง....29
3.4 วิธีการทดลอง....29
3.4.1 การก่อกลายพันธุ์ protocorm - like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วยโซเดียมเอไซด์ (sodium azide; NaN_3)....29
3.4.2 การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลาย....30
3.4.2.1 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)....30
3.4.2.2 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers)....33
3.4.2.3 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยวิธีการระดับเซลล์ (cytology)....36

4. ผลการทดลอง

4.1 การก่อกลายพันธุ์ protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วยโซเดียมเอไซด์ (sodium azide; NaN_3)....38
4.2 การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลาย....41
4.2.1 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)....41
4.2.2 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers)....65
4.2.3 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยวิธีการระดับเซลล์....78

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5. วิจารณ์ผลการทดลอง 80
6. สรุปผลการทดลอง 88
รายการอ้างอิง 91
ภาคผนวก 98
ประวัติผู้เขียน 112

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 อัตราเพิ่มมูลค่าการส่งออกกล้วยไม้สกุลหวายของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2551-2559 7

2.2 การใช้โซเดียมเอไซด์เพื่อก่อกลายพันธุ์ในพืชหลายชนิด 21

3.1 เกณฑ์การจำแนกต้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากเดิม 31

3.2 ลำดับเบส และอุณหภูมิ annealing ของไพรเมอร์ ISSR 34

4.1 ผลของระดับความเข้มข้นของ NaN_3 ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs ที่ระยะเวลาต่างกัน 39

4.2 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน 42

4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน 43

4.4 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน 55

4.5 การมี (+) หรือไม่มี (-) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน 56

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.6 แมททริกซ์ความคล้ายคลึงกัน (similarity matrix) ทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น.....60

4.7 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1, M3, M5, M6, M9-M12) และ 0.5 mM (M14, M18-M23) เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1, C3-C5), 0 mM; control 2 (C7-C10)) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 1 ปี เปรียบเทียบกับอายุ 6 เดือน 63

4.8 ลำดับไพรเมอร์ อุณหภูมิ annealing จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย (polymorphic) เปอร์เซ็นต์ของความหลากหลาย (polymorphim) ขนาดแถบดีเอ็นเอ และค่า polymorphic content (PIC) ของเครื่องหมายโมเลกุล ISSR สำหรับวิเคราะห์ต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น 67

4.9 การมี (+) หรือไม่มี (-) แถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์จากไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล.....69

4.10 แมททริกซ์ความคล้ายคลึงกัน (similarity matrix) ทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น 77

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.11 จำนวนโครโมโซมของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่ได้จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) 79

ตารางภาคผนวกที่

1 ค่าการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของระดับความเข้มข้นของ NaN_3 ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs ที่ระยะเวลาต่างกัน 99

2 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน 100

3 ค่าการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล อายุ 6 เดือน 103

4 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) จำนวน 8 ต้น และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 7 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 8 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล อายุ 1 ปี 106

5 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1, M3, M5, M6, M9-M12) และ 0.5 mM (M14, M18-M23) เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1, C3-C5), 0 mM; control 2 (C7-C10)) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน เปรียบเทียบกับอายุ 1 ปี 109

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล 12

3.1 protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล..... 29

4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ NaN_3 และเปอร์เซ็นต์ การตายของ PLBs ที่ระยะเวลา 3 วัน 1 และ 2 สัปดาห์ 40

4.2 ลักษณะ protocorm-like bodies (PLBs) ที่แช่ใน ROW, 0.0, 0.1 และ 0.5 mM NaN_3 ในสัปดาห์ที่ 2 40

4.3 Dendrogram ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) โดย UPGMA cluster analysis..... 58

4.4 แผนภาพ 3 มิติ แสดง Principle coordinate 3 แกนแรก จาก Principle coordinate analysis (PCoA) ของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ระหว่าง ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) 59

4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1, M3, M5, M6, M9-M12) และ 0.5 mM (M14, M18-M23) เปรียบเทียบกับ ต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1, C3-C5), 0 mM; control 2 (C7-C10)) อายุ 6 เดือน (ต้นด้านซ้าย) เปรียบเทียบกับอายุ 1 ปี (ต้นด้านขวา) 64

4.6 รูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมาย ISSR 840 ของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (C; controls (ROW, 0 mM)) เปรียบเทียบ ขนาดดีเอ็นเอกับ 1 Kb plus DNA marker (L) 68

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.7 Dendrogram ของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลจากเครื่องหมาย ISSR ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) 75

4.8 Principle coordinate analysis (PCoA) แบบ 3 มิติของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลจากเครื่องหมาย ISSR ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) 76

ภาพภาคผนวกที่

1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อสายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน 105

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

NaN_3	=	Sodium azide
PLBs	=	Protocorm-like bodies
LD	=	Lethal dose
ROW	=	Reversed osmosis water
CTAB	=	Cetyltrimethylammonium bromide
APS	=	Ammonium persulfate
PCR	=	Polymerase chain reaction
ISSR	=	Inter-simple sequence repeat
L	=	1 Kb plus DNA marker
CRD	=	Completely randomized design
DMRT	=	Duncan's New Multiple Range Test
UPGMA	=	Unweighted pair group method with the arithmetic averaging
PCoA	=	Principle coordinate analysis

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

กล้วยไม้ (orchid; Orchidaceae) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากได้รับความนิยมทั้งภายในและภายนอกประเทศ มีการส่งออกไปยังหลายประเทศ สามารถทำรายได้เข้าประเทศไทยปีละหลายร้อยล้านบาท (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2557) ประเทศไทยเป็นแหล่งที่พบความหลากหลายของกล้วยไม้มากที่สุดแห่งหนึ่งของโลก เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่มีความแตกต่างทางภูมิศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงและมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต ปัจจุบันมีการสำรวจพบกล้วยไม้ในประเทศ 174 สกุล มากกว่า 1,154 ชนิด (สลิล สิทธิสัจธรรม และนฤมล กฤษณชาญดี, 2550) ซึ่งเป็นกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) มากที่สุด ในประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลหวายประมาณ 184 ชนิด (ทิพวัลย์ อยู่ชา และคณะ, 2549) กล้วยไม้สกุลหวายจัดเป็นพืชดอกที่มีความสวยงาม และได้รับความนิยมเป็นอันดับต้น ๆ ของไม้ดอกไม้ประดับที่มีอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากมีลักษณะดอก สีสัน ลวดลายสวยงามและมีอายุการใช้งานนาน ปัจจุบันประเทศไทยเป็นประเทศผู้ส่งออกกล้วยไม้สกุลหวาย ตัดดอกมากเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก มีการส่งไปยังต่างประเทศ เช่น สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน เนเธอร์แลนด์ อิตาลี จีน ญี่ปุ่น แคนาดา อินเดีย และสหรัฐอเมริกา (วิกิพีเดีย, 2557; Luan et al., 2006) ประเทศไทยมีการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้หวายตัดดอกอย่างครบวงจร ตั้งแต่การผสมเกสร เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เลี้ยงลูกกล้วยไม้ เลี้ยงต้นกล้าจนกระทั่งให้ดอก ตัดดอกบรรจุหีบห่อและส่งออก โดยการขยายพันธุ์ส่วนมากได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งให้ช่อดอกที่มีคุณภาพ จำนวนดอก และลักษณะดอกใกล้เคียงกัน จึงเหมาะสมที่จะส่งออกไปยังต่างประเทศ (วิยดา เทพหัตถี และคณะ, 2546)

จากความต้องการกล้วยไม้ทั้งภายในประเทศและต่างประเทศเพิ่มมากขึ้น จึงทำให้ต้องมีการศึกษาวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้อย่างต่อเนื่อง เพื่อผลิตกล้วยไม้ที่มีความหลากหลายและมีคุณภาพมากยิ่งขึ้น เช่นได้พันธุ์ใหม่ที่มีรูปร่างดอก ขนาดดอก สีดอก และลวดลายดอกแปลกใหม่ หรือแม้กระทั่งการปรับปรุงเพื่อเพิ่มคุณภาพในการส่งออก สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้นาน มีความสามารถในการต้านทานโรคแบบยั่งยืน ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม (conventional breeding) พันธุวิศวกรรม (genetic engineering) และการกลายพันธุ์ (mutation) ในอดีตจนถึงปัจจุบันนิยมใช้การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม

เพราะเป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัดคือ พ่อแม่อาจมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมแคบ การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีพันธุวิศวกรรมเป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถปรับปรุงลักษณะของพืชได้ตรงตามความต้องการของนักปรับปรุงพันธุ์ แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัดคือ ปัจจุบันยังไม่เป็นที่ยอมรับในหลายประเทศ และใช้ต้นทุนสูง ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้โดยวิธีการกลายพันธุ์ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถทำให้ได้สายพันธุ์ใหม่เป็นจำนวนมากในเวลาที่รวดเร็ว โดยเฉพาะเมื่อใช้วิธีการนี้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถเพิ่มคุณภาพด้านต่าง ๆ ของกล้วยไม้ให้ตรงกับความต้องการของผู้บริโภคได้ เป็นวิธีการที่มีโอกาสก่อให้เกิดอัลลีลแปลกใหม่ ซึ่งควบคุมลักษณะที่ไม่พบในพ่อแม่พันธุ์มาก่อน อาจส่งผลให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีลักษณะใหม่และดีเด่นกว่าเดิม และอาจมีลักษณะบางประการที่ไม่สามารถปรับปรุงได้จากวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม อีกทั้งวิธีการนี้ ยังสามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะเพียงบางอย่าง โดยที่พันธุกรรมส่วนใหญ่ยังเหมือนเดิม จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ที่มีลักษณะส่วนใหญ่ดีอยู่แล้ว เพื่อเพิ่มเติมบางลักษณะที่แปลกใหม่ลงไป โดยเฉพาะลักษณะที่ถูกควบคุมโดยยีนด้อย (Medina et al., 2004)

การกลายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นตามธรรมชาติและเกิดจากการกระตุ้น ตามธรรมชาติอาจเกิดจากรังสี สารเคมีตามธรรมชาติ หรืออาจเกิดจากหน่วยดีเอ็นเอชนิดหนึ่งที่เรียกว่า transposons ที่เคลื่อนที่ไปตาม/หรือระหว่างโครโมโซม เมื่อไปแทรกตัวใกล้ยีนใดก็สามารถทำให้ยีนนั้นเปลี่ยนสภาพได้ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพย์ผ่อง, 2550) ซึ่งวิธีนี้มีอัตราการกลายพันธุ์ต่ำ นักปรับปรุงพันธุ์พืชจึงใช้วิธีกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราที่สูงกว่าเดิม โดยการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) ได้แก่ รังสีและสารเคมี ซึ่งโซเดียมเอไซด์ (sodium azide; NaN_3) เป็นหนึ่งในสารเคมีที่มีศักยภาพในการก่อกลายพันธุ์ เนื่องจากสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ความถี่สูง และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน นอกจากนี้ยังมีราคาถูก (Amano, 2004; Al-Quariny and Khan, 2009; Khan and Al-Quariny, 2009) สามารถนำไปใช้กระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์กับพืชและสัตว์ได้ ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์หลายรูปแบบ เช่นการเปลี่ยนแปลงจำนวนและโครงสร้างโครโมโซม หรือแม้กระทั่งลำดับเบส โดยพบว่า NaN_3 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม เช่น การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซมเมื่อมีการแตกหัก (translocation) โครโมโซมเคลื่อนไปสู่ขั้วเซลล์ช้ากว่าปกติ (chromosome lagging) ก่อให้เกิดโครโมโซมที่มีโครงสร้างคล้ายสะพาน (chromosome bridge) และสามารถเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์แบบ point mutation ระหว่างการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ได้ (Kredich, 1971; Klasterskii et al., 1976; La and Mongold, 1987; Owais and Kleinhofs, 1988) นอกจากนี้การกลายพันธุ์โดย NaN_3 ยังสามารถส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ ซึ่ง

อาจเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ชนิดต่าง ๆ ของพืชโดยตรงได้ (Al-Quariny and Khan, 2009)

ในข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) มีการใช้ NaN_3 เพื่อก่อกลายพันธุ์ พบว่าสามารถลดความถี่ของการเคลื่อนที่ของโครมาติด (chromatid) ในระยะ metaphase ของเซลล์ปลายรากข้าวบาร์เลย์ (Velemínský et al., 1977) และสามารถทำความเสียหายให้กับโครโมโซมของข้าวบาร์เลย์ (Pearson et al., 1975) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและยับยั้งการจำลองดีเอ็นเอได้ (Velemínský and Angelis, 1987) ในฝ้าย (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR2) พบว่าการให้ NaN_3 ที่ความเข้มข้น 10 mM นาน 180 นาที ส่งเสริมให้รากยาวและมีจำนวนมากขึ้น (Ganesan et al., 2005) และในถั่วปากอ้า (broad bean; *Vicia faba* L.) สามารถกระตุ้นให้เกิดความผิดปกติของการแบ่งเซลล์ได้ (Ahmad et al., 2007) อีกทั้งยังพบว่า NaN_3 สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางอย่างของไม้ดอกไม้ประดับ เช่น คาร์เนชั่น (*Dianthus caryophyllus* L.) และสับปะรดสี (Guzmania 'Hilda') ได้อีกด้วย (Rajib and Jagatpati, 2011) อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่พบการใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ NaN_3 กับกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล จึงเป็นที่มาของการวิจัยครั้งนี้

การตรวจสอบการกลายพันธุ์ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรวจสอบระดับเซลล์ และการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้มีความจำเพาะเจาะจง ทั้งรูปแบบการเจริญเติบโต ลำต้น การแตกกอ ลักษณะของดอก ช่อดอก ฝัก เมล็ด และใบ อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบลักษณะการกลายพันธุ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ใช้เวลานาน ต้นทุนสูง ต้องรอต้นกล้วยไม้ให้โตเต็มที่จนถึงระยะที่แสดงออกลักษณะเหล่านั้น อีกทั้งยังตรวจสอบได้เฉพาะการเปลี่ยนแปลงของยีนหรือโครโมโซมที่มีผลกระทบต่อฟีโนไทป์เท่านั้น แม้กระทั่งการตรวจสอบระดับเซลล์ ก็เป็นวิธีการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือจำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิต สิ่งก่อกลายพันธุ์บางชนิดสามารถส่งผลให้รูปร่าง และจำนวนโครโมโซมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งอาจส่งผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่จำเพาะเจาะจง และไม่สามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับดีเอ็นเอได้ ปัจจุบันจึงนิยมใช้การตรวจสอบโดยการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล เป็นการตรวจสอบที่แม่นยำ สามารถทำซ้ำได้ รวดเร็ว ง่าย ใช้ต้นทุนต่ำ และยังสามารถประยุกต์ใช้กับงานด้านอื่นได้ในอนาคต ซึ่งเครื่องหมาย inter-simple sequence repeat (ISSR) เป็นหนึ่งในเครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมใช้ในงานด้านปรับปรุงพันธุ์ สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ แต่ละพันธุ์ หรือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างต้นสายพันธุ์กลายออกจากต้นดั้งเดิมได้อย่างชัดเจน โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม สามารถเป็นเครื่องมือในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ตรวจประวัติทางพันธุกรรม หรือสร้างแผนที่โครโมโซมได้ (ทิพวัลย์ อยู่ชา และคณะ, 2549) พบว่าการใช้

เครื่องหมาย ISSR สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลูกผสมฟาแลนนอปซิสทั้ง 16 ลูกผสมได้ (Li et al., 2010) และยังสามารถประเมินความหลากหลายและหาความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ซิมบิเดียมได้อีกด้วย (Hui-Zhong et al., 2009) ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้เครื่องหมาย ISSR จึงเหมาะที่จะนำมาใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ด้วยวิธีการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ NaN_3 ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้กล้วยไม้มีความหลากหลายทางสายพันธุ์และมีคุณภาพสูงขึ้น

1.2.2 เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการก่อกลายพันธุ์ด้วย NaN_3 ที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพสูง เหมาะสมกับกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล

1.2.3 เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพในการระบุเอกลักษณ์ของต้นสาย-พันธุ์กลาย และประเมินการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม

1.2.4 เพื่อคัดเลือกและตรวจสอบต้นกล้วยไม้สายพันธุ์กลาย ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา วิธีการระดับเซลล์ และดีเอ็นเอ

1.3 สมมุติฐานการวิจัย

1.3.1 การใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ NaN_3 ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถก่อกลายพันธุ์ protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.3.2 กล้วยไม้สายพันธุ์กลายที่ได้จากการก่อกลายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำนวนโครโมโซม หรือการใช้เครื่องหมายโมเลกุล

1.3.3 เครื่องหมาย ISSR สามารถระบุเอกลักษณ์ของต้นสายพันธุ์กลาย และประเมินการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตได้

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาวิธีการก่อกลายพันธุ์ที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพกับ PLBs ที่ได้จากการปั่นตาของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล และใช้สารก่อกลายพันธุ์ 1 ชนิดคือสาร NaN_3 ซึ่งเป็นสารเคมีที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มในจีโนม ชักนำต้นที่ได้จากการกลายพันธุ์ให้เจริญเติบโตด้วย

อาหารเพาะเลี้ยงและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสม และตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา วิธีการระดับเซลล์ และการใช้เครื่องหมาย ISSR ในห้องปฏิบัติการบัณฑิตศึกษาปรับปรุงพันธุ์พืช ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืชและโรงเรือน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

1.5.1.1 ได้วิธีการก่อกลายพันธุ์ที่เหมาะสม สำหรับการชักนำการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลโดยใช้ NaN_3

1.5.1.2 ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถระบุเอกลักษณ์ของต้นสายพันธุ์กลาย และประเมินการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.5.2 สามารถนำความรู้ที่ได้มาประยุกต์ใช้กับกล้วยไม้สายพันธุ์อื่น หรือพืชชนิดอื่น เป็นการสร้างองค์ความรู้ด้านการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการก่อกลายพันธุ์

1.5.3 ได้สายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม

1.5.4 นำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ ได้กล้วยไม้สายพันธุ์กลายที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และอาจมีคุณภาพดีขึ้น ซึ่งสามารถนำมาขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้ปริมาณมาก เพื่อเผยแพร่แก่เกษตรกรในอนาคต

1.5.5 เพิ่มศักยภาพของการผลิตกล้วยไม้ในประเทศไทย สายพันธุ์ที่หลากหลายจะช่วยเพิ่มความสามารถในการแข่งขันทางการตลาดในระดับภายในประเทศและระหว่างประเทศ

1.5.6 เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย เกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้ได้รายได้เพิ่มจากการปลูกกล้วยไม้ เป็นการแก้ปัญหาความยากจน ผู้บริโภคอาจได้ต้นกล้วยไม้คุณภาพดีที่มีราคาต่ำลง

1.5.7 ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการอย่างน้อย 1 เรื่อง

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของกล้วยไม้สกุลหวาย

ประเทศไทยมีพื้นที่ซึ่งมีความแตกต่างทางภูมิศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และความหลากหลายทางชีวภาพสูง เนื่องจากตั้งอยู่ในเขตพฤกษภูมิศาสตร์ (plant geographic region) ของโลกถึง 3 เขต แต่ละเขตประกอบไปด้วยกล้วยไม้ที่มีความโดดเด่นแตกต่างกัน ส่งผลให้มีความหลากหลายของกล้วยไม้มากที่สุดแห่งหนึ่งของโลก สามารถพบกล้วยไม้ได้ตามธรรมชาติทั้งป่าผลัดใบและไม่ผลัดใบ ปัจจุบันมีการสำรวจพบกล้วยไม้ในประเทศมากกว่า 1,154 ชนิด 174 สกุล (สลิล สิทธิสัจธรรม และนฤมล กฤษณชาญดี, 2550) กล้วยไม้สกุลที่พบมากที่สุด คือสกุลหวาย (*Dendrobium*)

กล้วยไม้สกุลหวาย ได้รับการตั้งชื่อเมื่อ พ.ศ. 2342 โดย Peter Olof Swartz ชาวสวีเดน มาจากรากศัพท์ภาษากรีก คือ dendron (ต้นไม้) และ bios (ชีวิต) หมายถึงสิ่งมีชีวิตที่อาศัยบนต้นไม้อื่น ปัจจุบันประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลหวายประมาณ 184 ชนิด (ทิพวัลย์ อยู่ชา และคณะ, 2549) ซึ่งแต่ละชนิดแตกต่างกันไปตามลักษณะของสี และรูปร่างกลีบดอก เช่น ขาวเลอร์เวีย (*Den*. Lervia) เป็นกล้วยไม้สกุลหวายดอกสีขาว ปากดอกสีเหลืองนวล หรือเชียงใหม่พิงค์ (*Den*. Chiang Mai pink) มีดอกสีชมพูอ่อน ปากดอกสีแดง ฟอร์มดอกทรงกลม สำหรับเอียสกุล (*Den*. Earsakul) เป็นกล้วยไม้สกุลหวายดอกเป็นสีขาวปนม่วง ปากดอกสีขาว ฟอร์มดอกทรงเหลี่ยม

2.2 ความสำคัญของกล้วยไม้สกุลหวายทางเศรษฐกิจ

กล้วยไม้สกุลหวายจัดเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีความสวยงาม และได้รับความนิยมเป็นอันดับหนึ่งของไม้ดอกไม้ประดับที่มีอยู่ในปัจจุบัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2557) ในขณะเดียวกันก็เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากได้รับความนิยมทั้งภายในและนอกประเทศ มีการส่งออกไปยังประเทศต่าง ๆ เช่น ญี่ปุ่น อเมริกา อิตาลี จีน และอินเดีย ฯลฯ ซึ่งในปัจจุบันประเทศไทยยังคงเป็นประเทศผู้ส่งออกกล้วยไม้สกุลหวายตัดดอกมากเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก นอกเหนือจากยุโรป ฮาวาย ญี่ปุ่น ไต้หวัน และสิงคโปร์ มีแนวโน้มขยายตัวทางเศรษฐกิจอย่างต่อเนื่อง (ตารางที่ 2.1) สามารถทำรายได้เข้าประเทศไทยปีละหลายร้อยล้านบาท (Luan et al., 2006) อย่างไรก็ตามการที่กล้วยไม้สกุลหวายตัดดอกเป็นที่นิยมปลูกเพื่อการส่งออกนั้นเนื่องมาจากดอก

กล้วยไม้สกุลหวายมีสีสันและลวดลายสวยงาม รูปร่างดอกแปลกตา ช่อดอกมีอายุการใช้งานได้นาน อีกทั้งยังสามารถปลูกและดูแลรักษาได้ง่าย ต้นเจริญเติบโตดี ออกดอกตลอดปี ทนต่อสภาพอากาศ สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย ประเทศไทยมีการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สกุลหวายตัดดอกอย่างครบวงจร ตั้งแต่การผสมเกสร เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เลี้ยงลูกกล้วยไม้ เลี้ยงต้นกล้าจนกระทั่งให้ดอก ตัดดอกบรรจุหีบห่อและส่งออกไปยังต่างประเทศ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2557; วิกิพีเดีย, 2557) แม้ว่าการส่งออกกล้วยไม้ไทยต้องแข่งขันกับหลายประเทศ เช่น สิงคโปร์ มาเลเซีย ไต้หวัน และนิวซีแลนด์ อีกทั้งยังต้องแข่งขันกับไม้ตัดดอกประเภทอื่น ๆ โดยเฉพาะดอกเบญจมาศ จากเนเธอร์แลนด์และมาเลเซีย หรือดอกกุหลาบและลิลลี่ จากอินเดียและเกาหลีใต้ก็ตาม แต่เนื่องจากกล้วยไม้ของประเทศไทยมีความหลากหลาย โดดเด่นทั้งสีสันและรูปร่างดอก จึงยังเป็นที่นิยมและชื่นชอบจากคนทั่วโลก (มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2551; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557)

ตารางที่ 2.1 อัตราเพิ่มมูลค่าการส่งออกกล้วยไม้สกุลหวายของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2551-2559 (คณะกรรมการกล้วยไม้แห่งชาติ, 2557; อรวรรณ ชัยกาพลเลิศ, 2557)

ปี	อัตราเพิ่มมูลค่าการส่งออก (ล้านบาท)		มูลค่ารวม (ล้านบาท)
	กล้วยไม้ตัดดอก	ต้นกล้วยไม้	
2551	2,411	424	2,835
2552	2,550	450	3,000
2553	3,000	500	3,500
2554	3,400	600	4,000
2555	4,000	700	4,700
2556	4,980	870	5,850
2557	5,900	1,150	7,050
2558	7,200	1,300	8,500
2559*	8,500	2,500	10,000

* คาดการณ์และประเมินจากฐานข้อมูลทางเศรษฐกิจ

จากความต้องการกล้วยไม้สกุลหวายทั้งภายในและภายนอกประเทศที่เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งเพื่อให้ประเทศไทยสามารถแข่งขันการตลาดกับประเทศอื่น ๆ ได้อย่างต่อเนื่องและยั่งยืน การพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ให้มีลักษณะดีเด่น เป็นที่ต้องการของตลาดจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นประเทศไทยจึงมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายอย่างต่อเนื่อง เพื่อสนองความต้องการของตลาดและประโยชน์ในการใช้งานที่หลากหลายยิ่งขึ้น โดยมีการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้

สกุลหวายให้มีความหลากหลาย หรือเพิ่มคุณภาพในการส่งออก เช่น ให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีความแปลกใหม่ของรูปร่างดอก สีดอก และขนาดดอก สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้นานเพื่อการส่งออก หรือมีความสามารถในการต้านทานโรคแบบยั่งยืน (วิยดา เทพหัตถี และคณะ, 2546)

2.3 การจำแนกชนิดของกล้วยไม้

กล้วยไม้จัดเป็นพืชหลายฤดู อยู่ในจำพวกใบเลี้ยงเดี่ยว มีความหลากหลายทางธรรมชาติสูง สามารถแบ่งชนิดของกล้วยไม้ออกเป็น 2 ประเภท ตามสภาพกล้วยไม้ที่พบในธรรมชาติ และลักษณะการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ ดังนี้

2.3.1 สภาพกล้วยไม้ที่พบในธรรมชาติ แบ่งได้ 2 ประเภทคือ

2.3.1.1 กล้วยไม้อากาศ (epiphyte) คือกล้วยไม้ที่เกาะอาศัยอยู่บนกิ่งไม้หรือต้นไม้อื่น ๆ กล้วยไม้ชนิดนี้ไม่ได้แย่งอาหารจากต้นไม้ที่เกาะอยู่ แต่ได้รับอาหารจากซากอินทรียวัตถุ รากกล้วยไม้ชอบอากาศถ่ายเท และการถ่ายเทน้ำที่ดี ผิวนอกของรากมีสารคล้ายฟองน้ำห่อหุ้มอยู่ เรียกว่า วิลาเมน (velamen) ทำหน้าที่อุ้มน้ำเก็บไว้ เพื่อป้องกันการขาดน้ำ และช่วยยึดเกาะติดกับต้นไม้ นอกจากนี้ในรากกล้วยไม้ยังมีคลอโรฟิลล์ ซึ่งสามารถสังเคราะห์แสงได้ เช่นสกุลแวนด้า (*Vanda*) สกุลช้าง (*Rhynchostylis*) สกุลเข็ม (*Ascocentrum*) สกุลฟาแลนนอปซิส (*Phalaenopsis*) สกุลออนซิเดียม (*Oncidium*) สกุลแคทลียา (*Cattleya*) และสกุลหวาย (*Dendrobium*)

2.3.1.2 กล้วยไม้ดิน (terrestrial) มักขึ้นอยู่ตามพื้นดินที่ปกคลุมด้วยอินทรียวัตถุ ส่วนมากเป็นกล้วยไม้ที่มีหัวอยู่ใต้ดิน พบการพักตัวตลอดฤดูแล้ง เมื่อเข้าฤดูฝนจะผลิใบและสร้างช่อดอกขึ้นมา เช่นสกุลฮาบีนาเรีย (*Habenaria*) สกุลเปคไตลิส (*Pecteilis*) และกล้วยไม้อีกประเภทหนึ่งเป็นระบบรากกึ่งดิน เช่นสกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum*) นิยมขึ้นอยู่ตามซอกหินที่มีใบไม้ผุทับถมกันอยู่ มักเป็นพวกไม่ทิ้งใบ ใบมีสีเขียวตลอดปี

2.3.2 ลักษณะการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ได้ 2 ประเภท

2.3.2.1 การเจริญเติบโตทางปลายยอด (monopodial vegetative) เป็นลักษณะการเจริญเติบโตของส่วนยอดที่ไม่จำกัด คือ มีเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่สามารถเจริญได้อย่างไม่สิ้นสุด และสามารถสร้างเนื้อเยื่อเจริญใหม่ขึ้นที่ด้านข้างได้ ได้แก่ สกุลฟ้ามุ่ย (*Vanda coerulea*) สกุลช้าง สกุลเข็ม สกุลแวนด้า

2.3.2.2 การเจริญเติบโตทางด้านข้างของลำต้น (sympodial vegetative) เป็นลักษณะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีอยู่อย่างจำกัด แต่สร้างเนื้อเยื่อเจริญใหม่จากจุดเจริญที่ด้านข้างของลำต้น และจะสร้างยอดใหม่ในช่วงฤดูกาลที่เหมาะสมเท่านั้น ต้นที่สร้างขึ้นมาใหม่นั้นอาจเกิดชิดกับลำต้นหรือลำลูกกล้วยเดิม ทำให้มีลักษณะเป็นกอแน่น ได้แก่ สกุลกะเรกะร่อน

(*Cymbidium*) สกุลแคทลียา สกุลออนซิเดียม และสกุลหวาย เป็นต้น (สลิล สิทธิสัจธรรม, 2550; กรมส่งเสริมการเกษตร, 2557)

2.4 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชที่มีวิวัฒนาการและการปรับตัวสูง จึงสามารถกระจายพันธุ์ได้ทั่วโลก ส่งผลให้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย จัดเป็นพืชวงศ์ใหญ่ และมีความแตกต่างกันภายในวงศ์อย่างชัดเจน จึงมีการจำแนกลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้ไว้อย่างชัดเจน ดังนี้

2.4.1 ลำต้น คือบริเวณส่วนที่เป็นข้อทั้งหมด เป็นส่วนที่พบกิ่งอ่อน ช่อดอก ใบ กาบใบ และกาบของลำต้น เนื้อเยื่อที่อยู่ระหว่างข้อเรียกว่าปล้อง ลำต้นของกล้วยไม้แบ่งได้ 2 ประเภทคือ ลำต้นแท้ และลำต้นเทียม

2.4.1.1 ลำต้นแท้ คือลำต้นที่มีข้อและปล้อง เหมือนกับลำต้นของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทั่วไป บริเวณเหนือข้อจะพบเนื้อเยื่อตา ซึ่งสามารถเจริญเป็นหน่อและช่อดอกใหม่ได้ ลำต้นประเภทนี้จะเจริญเติบโตออกไปทางยอด เช่น สกุลแวนด้า สกุลรองเท้านารี

2.4.1.2 ลำต้นเทียม หรือลำลูกกล้วย ทำหน้าที่สะสมอาหาร เนื้อเยื่อตาบนลำลูก-กล้วยสามารถแตกเป็นหน่อหรือช่อดอกได้ แต่ลำต้นที่แท้จริงของกล้วยไม้ประเภทนี้คือ เหง้า ซึ่งจะเจริญเติบโตในแนวนอนไปตามผิวของเครื่องปลูก เช่น สกุลหวาย สกุลแคทลียา สกุลออนซิเดียม (De et al., 2015)

2.4.2 ใบ กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เส้นใบจะขนานไปตามความยาวของใบ ใบของกล้วยไม้จะมีลักษณะแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ เช่น รูปร่าง สีสัน ขนาด และการทรงตัวตามธรรมชาติ ส่วนมากใบกล้วยไม้จะมีรูปร่างแบน กลม และร่อง (ลูกผสมระหว่างใบแบนและใบกลม) ซึ่งจะเรียงตัวแบบสลับกันและเรียงทับซ้อนกัน สีของใบส่วนมากเป็นสีเขียวและสีเขียวอมเหลือง กล้วยไม้บางชนิดมีใบที่มีสีสันลวดลายสวยงาม เช่น สกุลรองเท้านารี หลายชนิดมีใบสีเขียวแก่สลับอ่อน หรือกล้วยไม้เอื้องปากส้อม (*Anoectochilus siamensis*) มีใบสีน้ำตาลอมแดงและลายกระสีขาว ในขณะที่กล้วยไม้บางสายพันธุ์มีใบเล็กมาก เช่น กล้วยไม้พญาไร้ใบ (*Chiloshista usneoides* LDL.) ใบมีขนาดใหญ่กว่าหัวเข็มหมุดเล็กน้อย (De et al., 2015)

2.4.3 ช่อดอก จะมีลักษณะแตกต่างกันไป แล้วแต่สกุลและชนิดของกล้วยไม้ บางชนิดมีก้านช่อยาว บางชนิดมีก้านช่อตั้งแข็ง (erect) บางชนิดมีช่อดอกโค้งและห้อยหัวลง เช่นช่อดอกกล้วยไม้ไอยเรศ (*Rhynchostylis retusa*) หรือมีช่อดอกยาวและแตกแขนงออกด้านข้าง เช่น ช่อดอกกล้วยไม้สกุลเรแนนเธอร่า (*Renanthera*) ช่อดอกจะมีก้านเป็นแกนกลาง ประกอบไปด้วยข้อและปล้อง ช่อดอกของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส จะพบตาดอกอยู่ตามข้อของก้าน ซึ่งสามารถแตกและเจริญออกมาเป็นกล้วยไม้ต้นเล็ก ๆ ได้ (Ariffin et al., 2010)

2.4.4 ดอกกล้วยไม้ เป็นดอกสมบูรณ์เพศคือมีเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ทำหน้าที่สืบพันธุ์ ดอกกล้วยไม้มีลักษณะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ ดอกกล้วยไม้ประกอบไปด้วย

2.4.4.1 กลีบเลี้ยง (sepal) คือกลีบที่อยู่นอกสุด หรือด้านหลังสุด ทำหน้าที่ห่อหุ้มส่วนประกอบอื่น ๆ ของดอกไว้ขณะที่ดอกตูม ส่วนใหญ่กล้วยไม้จะมีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ รูปร่างและสีสันคล้ายคลึงกัน ยกเว้นในกลุ่มรองเท้านารีจะพบกลีบเลี้ยง 2 กลีบเท่านั้น

2.4.4.2 กลีบดอก (petal) คือกลีบชั้นในถัดจากกลีบเลี้ยง มีจำนวน 3 กลีบ แต่จะมีกลีบหนึ่งจะเปลี่ยนรูป และสีสันแตกต่างออกไปจากเดิม คือกลีบปากหรือกลีบกระเป๋า บริเวณนี้มักพบเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่สร้างกลิ่นเพื่อดึงดูดแมลง อีกทั้งเนื้อเยื่อบริเวณฐานกลีบปากสามารถสร้างน้ำหวานได้อีกด้วย

2.4.4.3 จะงอยเล็ก (rostellum) คือจะงอยเกสรเพศเมีย ทำหน้าที่กั้นแบ่งเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียไม่ให้เกิดการถ่ายละอองเรณูในต้นเดียวกัน

2.4.4.4 เกสร (pollen) กล้วยไม้เป็นดอกสมบูรณ์เพศ คือมีเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน โดยกลุ่มละอองเรณู (pollanium) ของเกสรเพศผู้ จะมีลักษณะคล้ายก้อนขี้ผึ้ง มีหลายรูปร่าง เช่นทรงกลม ทรงรี มีสีขาวใส ขาวขุ่น และเหลือง ติดอยู่บนก้านสั้น (stipe) แต่กล้วยไม้สกุลหวายไม่พบก้านชนิดนี้ ตรงบริเวณดังกล่าวจะพบเนื้อเยื่อเหนียว (viscidium) ทำหน้าที่ช่วยยึดกลุ่มละอองเรณูให้สามารถเกาะติดกับกระเปาะเรณู (pollinator) ได้ง่ายยิ่งขึ้น อีกทั้งยังพบ ฝาครอบกลุ่มเรณู (anther cap หรือ operculum) อยู่ด้านบนสุดของเส้าเกสร ทำหน้าที่ห่อหุ้มกลุ่มเรณู ทำให้เกิดการผสมพันธุ์กับเกสรตัวเมียได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ส่วนเนื้อเยื่อบริเวณด้านล่างของเส้าเกสรคือ รังไข่ (ovary) จะอยู่ใต้ชั้นวงกลีบ และยาวต่อเนื่องไปกับก้านดอก บริเวณรังไข่มีรูปร่างกลมรี และพองกว่าส่วนที่เป็นก้านดอก พบร่องตามยาว 3-6 ร่อง ภายในรังไข่มีออวุล (ovule) ขนาดเล็กจำนวนมาก

2.4.4.5 ผลหรือฝัก ฝักกล้วยไม้มีอายุแตกต่างกันไปตามชนิดของกล้วยไม้ร่วมกับสภาพแวดล้อม กล้วยไม้มีระยะเวลาตั้งแต่ผสมเกสรไปจนถึงฝักแก่ 1-6 เดือน แต่ละฝักจะพบเมล็ดเป็นจำนวนมาก มีแต่คัพภะ ไม่มีอาหารสะสม มีเปลือกบาง ๆ หุ้มเมล็ดอยู่ มีสีแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ เช่น น้ำตาล เทา เหลือง และขาว (Ariffin et al., 2010; Chaudhary et al., 2012)

2.4.5 รากกล้วยไม้มีระบบราก ลักษณะ ขนาด และจำนวนแตกต่างกันตามชนิดของกล้วยไม้ บางชนิดมีรากใหญ่ อวบน้ำและอยู่ใต้ดิน บางชนิดแตกแขนงแผ่กระจาย มีขนาดเล็ก และมีชั้นเนื้อเยื่อหนา จึงมีการแบ่งชนิดรากกล้วยไม้ตามสภาพแวดล้อมที่พบ ดังนี้

2.4.5.1 ระบบรากดิน เนื้อเยื่อรากจะเจริญออกจากบริเวณส่วนหัว มีลักษณะอวบน้ำและอาศัยอยู่ใต้ดิน เช่นสกุลนางอั้วน้อย (*Habenaria dentata*) พบกล้วยไม้ชนิดนี้ในพื้นที่ที่มีฝนตก

ชุก เมื่อถึงฤดูฝนหัวจะแตกหน่อและใบอ่อนงอกพ้นผิวดิน ออกดอกช่วงปลายฤดูฝน เมื่อพ้นระยะนี้ไปแล้วใบก็จะทรุดโทรมและร่วงไป คงเหลือแต่หัวที่อวบน้ำและมีอาหารสะสมฝังอยู่ใต้ดิน

2.4.5.2 ระบบรากกึ่งดิน รากมีลักษณะอวบน้ำ ใหญ่ หยาบ และแตกแขนงแผ่กระจายอย่างหนาแน่น สามารถสะสมน้ำและอาหารได้ดี กล้วยไม้ประเภทนี้พบตามอินทรียวัตถุที่เน่าเปื่อยผุพัง เช่นสกุลรองเท้านารี

2.4.5.3 ระบบรากกึ่งอากาศ เป็นระบบรากที่มีผนังเซลล์หนา ลักษณะคล้ายฟองน้ำ เก็บสะสมน้ำและอาหารได้ดีมาก สามารถน้ำและอาหารไปใช้ตามเซลล์ได้ตลอดความยาวของราก ระบบนี้มักมีรากแขนงใหญ่อยู่อย่างหนาแน่น ไม่มีรากขนอ่อน รากมีขนาดเล็กกว่าระบบรากอากาศ ได้แก่สกุลแคทลียา สกุลออนซิเดียม

2.4.5.4 ระบบรากอากาศ รากมีขนาดใหญ่ แขนงรากหยาบ ผนังเซลล์ทำหน้าที่เก็บสะสมน้ำและอาหารได้ดีมาก สามารถทนทานต่อความแห้งแล้งได้ดีมาก ระบบนี้ไม่ชอบอยู่ในสภาพเปียกแฉะนานเกินไป ปลายรากมีสีเขียวสด ซึ่งเป็นสีของคลอโรฟิลล์ ทำหน้าที่สังเคราะห์แสงได้เช่นเดียวกัน เช่น สกุลช้าง สกุลเข็ม สกุลเรแนนเธอร่า และสกุลหวาย (Ariffin et al., 2010)

2.5 อนุกรมวิธานของกล้วยไม้สกุลหวาย

อนุกรมวิธานเป็นการจัดระบบการจำแนกกล้วยไม้ทางพฤกษศาสตร์ มีการรวบรวมข้อมูลหลายด้านเพื่อการจำแนก เช่น ถิ่นอาศัย การแพร่กระจาย ลักษณะสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะต้น ใบ ราก และดอก การจำแนกกล้วยไม้มีการตีพิมพ์ครั้งแรกโดย John Lindley (1826) ต่อมาก็มีการปรับปรุงเพื่อความถูกต้องโดยนักวิทยาศาสตร์ นักวิจัยท่านอื่น ๆ โดยอาศัยข้อมูลที่เพิ่มมากขึ้นและความก้าวหน้าทางเทคโนโลยี (กาญจนา รุ่งรัชกานนท์, 2555) การจำแนกอนุกรมวิธานของกล้วยไม้สกุลหวาย (Wikipedia, 2015)

Kingdom	Plantae
Division	Magnoliophyta
(Unranked)	Monocots
Order	Asparagales
Family	Orchidaceae
Subfamily	Epidendroideae
Tribe	Podochileae
Subtribe	Dendrobiinae
Genus	*Dendrobium*

2.6 กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล

กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล (*Dendrobium* 'Earsakul') พัฒนาสายพันธุ์มาจากพ่อแม่ *Dendrobium* Sonia 'Jo Daeng' (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2557) มีการเจริญเติบโตแบบด้านข้างหรือเจริญเติบโตในแนวนอนไปตามผิวของเครื่องปลูก โดยมีเหง้าเป็นลำต้นแท้จริง ส่วนลำต้นเทียมหรือลำลูกกล้วย จะทำหน้าที่สะสมน้ำและอาหาร เนื้อเยื่อบนลำลูกกล้วยสามารถแตกเป็นหน่อหรือช่อดอกได้ สำหรับใบเป็นใบเดี่ยว มีลักษณะแบน แข็ง หนา สีเขียว มีเส้นใบขนานตามความยาวใบ การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา ส่วนรากมีสีเขียว อวบน้ำ ผิวของรากมีเนื้อเยื่อคล้ายฟองน้ำ คือ วีลาเมน (velamen) ทำหน้าที่ดูดซับน้ำและอาหาร ป้องกันการสูญเสียน้ำจากการระเหย และเป็นระบบรากอากาศ ส่วนช่อดอกจะมีลักษณะเฉพาะคือ มีก้านยาว โค้ง ไม่แตกแขนง และห้อยหัวลง ความยาวช่อดอกยาวประมาณ 48-58 เซนติเมตร ซึ่งดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลมีลักษณะประจำพันธุ์ที่โดดเด่นคือ สีพื้นกลีบดอกเป็นสีขาวปนม่วง ปากดอกสีขาว ฟอร์มดอกทรงเหลี่ยม ขนาดดอกเฉลี่ย 5.7-7.1 เซนติเมตร มีดอกประมาณ 10-14 ดอก/ช่อดอก ซึ่งดอกจะเริ่มบานจากดอกที่อยู่โคนช่อ และบานไล่ขึ้นไปทีละดอกจนสุดปลายช่อ เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ส่วนฝักมีลักษณะเรียวยาว สีเขียว (ภาพที่ 2.1)

ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล

2.7 วิธีการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้

ปัจจุบันการศึกษาวิจัยและพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายมีความก้าวหน้ามากยิ่งขึ้น นักวิจัยสามารถผลิตสายพันธุ์ใหม่ ๆ ออกสู่ท้องตลาดได้อย่างต่อเนื่อง อีกทั้งยังมีการนำเทคโนโลยี และความรู้ด้านต่าง ๆ เข้ามาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์อีกด้วย ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ให้มีลักษณะที่ดีเด่นมากขึ้น สามารถทำได้หลายวิธีการ เช่น การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม (conventional breeding) พันธุวิศวกรรม (genetic engineering) และการกลายพันธุ์ (mutation) ในอดีตจนถึงปัจจุบันนิยมใช้การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม คือการผสมพันธุ์กันระหว่างพ่อแม่ที่มีลักษณะเสริมกัน และ/หรือมีลักษณะดีเด่นตามที่ต้องการ จากนั้นจึงคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะที่ต้องการหรือลักษณะแปลกใหม่ ซึ่งจำเป็นต้องคัดเลือกลูกผสมจำนวนมาก เพื่อให้ได้ลูกผสมที่ดีที่สุดหรือมีลักษณะตามที่ต้องการ วิธีการนี้เป็นที่นิยมในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เป็นอย่างมาก สามารถทำได้ทั้งภายในสปีชีส์ ข้ามสปีชีส์ และข้ามจีนัส ข้อดีของวิธีการนี้คือ มีโอกาสได้ลูกผสมที่ดีกว่าพันธุ์พ่อแม่ และได้ลูกผสมที่มีลักษณะหลากหลายจาก genetic recombination สามารถใช้เป็นพื้นฐานการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต อีกทั้งเป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก เกษตรกรสามารถปรับปรุงพันธุ์ได้เอง แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัดคือ ลูกผสมที่ได้อาจมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมแคบ ซึ่งมาจาก อัลลีลที่มีอยู่ในธรรมชาติของพ่อแม่เท่านั้น ส่วนการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีพันธุวิศวกรรมเป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถปรับปรุงลักษณะต่าง ๆ ของพืชได้ตรงตามความต้องการของนักปรับปรุงพันธุ์ เป็นวิธีการถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่พันธุ์กล้วยไม้ที่มีลักษณะดีเด่นอยู่แล้ว เช่น ยีนต้านทานโรค ยีนควบคุมรูปร่าง สีดอก และยีนควบคุมอายุการใช้งาน ซึ่งมีโอกาสได้พันธุ์ที่ดีเด่นกว่าพันธุ์เดิม และ/หรือมีลักษณะแปลกใหม่ที่ไม่พบตามธรรมชาติ เป็นการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมอีกทางหนึ่ง แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ปัจจุบันยังไม่เป็นที่ยอมรับในหลายประเทศ เป็นวิธีการที่สามารถทำได้ในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น อีกทั้งเกษตรกรไม่สามารถใช้วิธีการนี้ได้เนื่องด้วยเครื่องมือและสารเคมีมีราคาสูง และยังต้องใช้ทักษะในการทำวิจัยสูงอีกด้วย

ดังนั้นในปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้โดยวิธีกลายพันธุ์ จึงนับเป็นทางเลือกหนึ่งของนักปรับปรุงพันธุ์ เป็นวิธีการที่มีโอกาสก่อให้เกิดอัลลีลแปลกใหม่ ซึ่งควบคุมลักษณะที่ไม่พบในพ่อแม่พันธุ์มาก่อน ส่งผลให้ได้สายพันธุ์กลายลักษณะใหม่ที่ดีเด่นกว่าเดิม และอาจมีลักษณะบางประการที่ไม่สามารถหาได้จากวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม อย่างไรก็ตาม สามารถนำต้นสาย-พันธุ์กลายดังกล่าวมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม ส่งผลให้เกิด genetic recombination ในรูปแบบใหม่ ๆ ทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะหลากหลายกว่าเดิมอีกด้วย อีกทั้งวิธีการนี้สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะเพียงบางอย่าง โดยที่พันธุกรรมส่วนใหญ่ยังเหมือนเดิม จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ที่มีลักษณะส่วนใหญ่ดีอยู่แล้ว เพื่อเพิ่มเติมบางลักษณะที่แปลกใหม่ลงไป โดยเฉพาะลักษณะที่ถูกควบคุมโดยยีนด้อย (Medina et al., 2004) การ

กลายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นตามธรรมชาติและเกิดจากการกระตุ้น การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติอาจเกิดจากรังสี สารเคมีตามธรรมชาติ หรืออาจเกิดจากหน่วยดีเอ็นเอชนิดหนึ่งที่เรียกว่า transposons ที่เคลื่อนที่ไปตามและ/หรือระหว่างโครโมโซม เมื่อไปจับใกล้ยีนใดก็สามารถทำให้ยีนนั้นเปลี่ยนสภาพได้ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550) ซึ่งวิธีนี้มีอัตราการกลายพันธุ์ต่ำ นักปรับปรุงพันธุ์พืชจึงใช้วิธีกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราที่สูงกว่าเดิม โดยการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) ได้แก่ รังสีและสารเคมี

สำหรับกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลที่มีการใช้รังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่ารังสีแกมมาอัตรา 3-6 krad ส่งผลให้ลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกล้วยไม้ในขวดทดลองเปลี่ยนแปลงไป เช่น ลำต้นเตี้ยแคระ ใบหยักงอ และเมื่อนำออกปลูกในสภาพโรงเรือน พบลักษณะแปลกใหม่เพิ่มขึ้น เช่น ลำต้นอ้วนป้อม และมีสีค่อนข้างแดง แตกกอมากกว่าปกติ ใบมีลายเป็นริ้ว สีแดง กลมป้อมและหนา (รุ่งนภา แก้วทองราช, 2548) ประโยชน์ของการใช้รังสีคือ รังสีบางชนิดสามารถทะลุผ่านเนื้อเยื่อเซลล์ได้หลายชั้น และรังสีสามารถให้ปริมาณการกลายพันธุ์ที่สม่ำเสมอ แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือ ต้องใช้อุปกรณ์และห้องปฏิบัติการเฉพาะทาง ไม่สามารถหาซื้อได้โดยทั่วไป ดังนั้นการใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์จึงเป็นที่นิยมมากขึ้น เพราะสารเคมีก่อกลายพันธุ์สามารถหาซื้อได้ง่าย ผลการทดลองสม่ำเสมอ และประสิทธิภาพการก่อกลายพันธุ์สูง (Jain, 2005)

สารเคมีที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ โซเดียมเอไซด์ (sodium azide; NaN_3) เอธิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulphonate; EMS) โพรนามีด (pronamide) และเอธิลไนโตรโซยูเรีย (ethyl nitroso urea; ENU) ในข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) มีการใช้ NaN_3 เพื่อก่อกลายพันธุ์ พบว่าสามารถลดความถี่ของการเคลื่อนที่ของโครมาติด (chromatid) ในระยะ metaphase ของเซลล์ปลายรากข้าวบาร์เลย์ (Veleminsky et al., 1977) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและยับยั้งการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ได้ (Veleminsky and Angelis, 1987) ในขณะเดียวกัน ศิริญญา ม่วงสอน และสมปอง เตชะโต (2551) ได้ทำการเพาะเลี้ยง protocorm - like bodies (PLBs) กล้วยไม้สกุลเหลืองจันทบูร ร่วมกับ EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 ชั่วโมง ทำให้ได้ต้นที่มีลักษณะเผือกได้ แม้ว่าในปัจจุบัน EMS จะเป็นที่นิยมนำในการใช้ก่อกลายพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับมากที่สุด เนื่องจากมีอัตราการกลายพันธุ์สูง สามารถใช้สารความเข้มข้นต่ำและปริมาณน้อยในการเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ได้ และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ลำดับเบส แต่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ชนิดนี้ก็มีข้อจำกัดหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับ NaN_3 เช่น EMS ราคาแพงกว่า NaN_3 อีกทั้ง EMS เป็นสารเคมีที่อันตรายมาก เนื่องจากมีอัตราการก่อกลายพันธุ์กับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสูงกว่า NaN_3 ในทางตรงกันข้าม NaN_3 เป็นสารที่ราคาถูกและอันตรายน้อยกว่า แต่สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ความถี่สูง และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนได้อีกด้วย (Amano, 2004) ดังนั้น NaN_3 จึงเป็นหนึ่งในสารเคมีก่อกลายพันธุ์ที่น่าสนใจในการเหนี่ยวนำพืชให้กลายพันธุ์เพื่อการปรับปรุง

พันธุ์ในอนาคต (Al-Quariny and Khan, 2009) อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่พบการใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ NaN_3 กับกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล

2.8 การกลายพันธุ์ในพืช

การกลายพันธุ์ คือการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของยีนจากลักษณะเดิมไปเป็นอีกลักษณะหนึ่ง เช่น ยีนเด่นอาจเปลี่ยนเป็นยีนด้อย (recessive mutation) หรือ ยีนด้อยอาจเปลี่ยนเป็นยีนเด่น (dominant mutation) ก็ได้ สามารถส่งต่อลักษณะดังกล่าวที่เปลี่ยนแปลงไปยังรุ่นลูกหลานได้ เป็นการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมอย่างฉับพลัน ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้นแตกต่างไปจากเดิม (วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, 2554) การกลายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) หรือเกิดจากการเหนี่ยวนำ (induced mutation) โดยสิ่งก่อกลายพันธุ์ เช่น รังสีและสารเคมี ส่งผลให้ความถี่ในการกลายพันธุ์สูงขึ้นกว่าเดิม โดยสิ่งมีชีวิตที่มีพันธุกรรมเปลี่ยนไปเนื่องจากการกลายพันธุ์เรียกว่า mutant ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์พบรูปแบบหลักของการกลายพันธุ์ 2 รูปแบบคือ

2.8.1 การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม (chromosome mutation, chromosome aberration) เซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน จะมีจำนวนโครโมโซม และการจัดเรียงตัวของยีนบนโครโมโซมเหมือนกันในทุกรุ่น ยกเว้นสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นจะเกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งอาจจะเกิดจากธรรมชาติ และการเหนี่ยวนำโดยสารเคมี และ/หรือรังสีก็ได้ ซึ่งการกลายพันธุ์ระดับโครโมโซมเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและจำนวนของโครโมโซม โดยการเปลี่ยนแปลงจะครอบคลุมมากกว่า 1 ยีนเสมอ (วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, 2554) ความผิดปกติของโครโมโซมสามารถศึกษาได้ในขณะที่เกิดการแบ่งเซลล์ทั้งไมโทซิส (mitosis) และไมโอซิส (meiosis) จำแนกการกลายพันธุ์ระดับโครโมโซมออกเป็น 2 ประเภท คือ

2.8.1.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม (variation in chromosome structure) มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลง 4 ชนิด คือการขาดหายของชิ้นส่วนโครโมโซม (deletion) คือการที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของโครโมโซมขาดหายไป ทำให้ชนิดและจำนวนของยีนขาดหายไปด้วย ชิ้นส่วนที่ขาดหายไปนั้นอาจจะเป็นส่วนปลายหรือส่วนกลางของโครโมโซมก็ได้ ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งมีชีวิตแตกต่างกัน ถ้าชิ้นส่วนที่ขาดหายไปเป็นส่วนที่สำคัญกับการดำรงชีวิตสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นก็อาจตายได้ ถ้าโครโมโซมโฮโมโลกัสที่เป็นคู่กันเกิดการขาดหายตำแหน่งเดียวกัน (homozygous deficiency) จะมีผลรุนแรงมากกว่าโครโมโซมที่เกิดการขาดหายเพียงแห่งเดียว (heterozygous deficiency) (Russell, 1999) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงโดยมีการเพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนโครโมโซม (duplication) อาจจะมาจากโครโมโซมโฮโมโลกัสที่เป็นคู่กัน โดยชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เพิ่มเข้ามาอาจจะมีลำดับยีนตามโครโมโซมเดิมหรือมีลำดับยีนกลับทิศทางก็ได้ การ

เปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีผลต่อสิ่งมีชีวิตรุนแรงน้อยกว่าการขาดหายของชิ้นส่วนโครโมโซม (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และคณะ, 2554) อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมทั้ง 2 แบบ แรกเป็นการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารพันธุกรรมบนโครโมโซม (วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, 2554) ส่วนการขาดและต่อกลับของชิ้นส่วนโครโมโซม (inversion) เป็นรูปแบบการขาดแล้วต่อกลับเข้าไปที่โครโมโซมเดิมแบบกลับหัวท้าย รูปแบบดังกล่าวไม่ได้ทำให้สารพันธุกรรมเปลี่ยนแปลง แต่ทำให้ลำดับของยีนเปลี่ยนแปลงไป อาจมีผลต่อลักษณะที่แสดงออกได้ โดยเฉพาะเมื่อเกิดกับยีนที่สำคัญ ในขณะที่การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซมเมื่อมีการแตกหัก (translocation) คือชิ้นส่วนของโครโมโซมเมื่อขาดแล้ว ชิ้นส่วนนั้นไปต่อกับโครโมโซมอื่น ๆ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของส่วนโครโมโซมและลำดับของยีน (Russell, 1999; ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และคณะ, 2554)

2.8.1.2 การเปลี่ยนแปลงจำนวนของโครโมโซม (variation in chromosome number) อาจเกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ หรือเกิดจากการเหนี่ยวนำจากรังสี สารเคมี และสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ได้ การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมมี 2 ชนิด คือ การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมทั้งชุด (euploidy) และการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมบางแท่ง (aneuploidy)

2.8.1.2.1 การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมทั้งชุด เป็นการเพิ่ม และ/หรือ ลด จำนวนโครโมโซมเป็นชุด มีหลายลักษณะ คือ monoploid (2n=x), triploid (2n=3x), tetraploid (2n=4x) และ pentaploid (2n=5x) พบว่าแกมีโตไฟท์ของพืชมอสส่วนมากเป็นลักษณะ monoploid มีการทดลองทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถบ่งชี้ลักษณะ monoploid ได้ในพืชบางชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าวไรย์ พริกไทย ยาสูบ ลำโพง ฯลฯ พบลักษณะ polyploid ประมาณ 47 เปอร์เซ็นต์ของพืชดอก และประมาณ 65เปอร์เซ็นต์ของพืชวงศ์หญ้า ซึ่งอาจทำให้พืชมีความเป็นหมันสูง ไม่มีเมล็ดหรือเมล็ดลีบ เป็นผลดีในเชิงการค้าและการบริโภค นอกจากนี้พืชบางชนิดอาจเจริญเติบโตเร็ว แข็งแรง มีดอก ใบ และผลใหญ่กว่าต้น diploid (2n=2x) ในพืชบางชนิดอาจสร้างสารบางอย่างในปริมาณที่สูงขึ้น เช่น ข้าวโพด tetraploid มีวิตามินเอมากกว่าต้น diploid 40 เปอร์เซ็นต์ ต้นยาสูบ tetraploid มีปริมาณนิโคตินสูงขึ้น 18-33 เปอร์เซ็นต์ (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และคณะ, 2554)

2.8.1.2.2 การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมบางแท่ง เป็นการเพิ่ม และ/หรือ ลดเพียงบางโครโมโซม มีหลายลักษณะ คือ monosomic (2n-1), double monosomic (2n-1-1), nulliosomic (2n-2) และ trisomic (2n+1) อย่างไรก็ตามในพืชพบความผิดปกติของการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมบางแท่งมากกว่าในสัตว์ เนื่องจากเมื่อพืชเกิดลักษณะดังกล่าวก็ยังสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้

2.8.2 การกลายพันธุ์ระดับยีน (gene mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงจำนวนของยีน เช่นการสูญหายและ/หรือ เพิ่มเข้ามาของยีน หรือเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในยีน รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) อีกด้วย ซึ่งการกลายพันธุ์ระดับยีนจะส่งผลต่อ

กระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น การจำลองดีเอ็นเอ (replication) การถอดรหัสดีเอ็นเอ (transcription) การแปลรหัสดีเอ็นเอ (translation) หรือแม้กระทั่งการซ่อมแซมตัวเอง (DNA repair) จำแนกการกลายพันธุ์ระดับยีนออกเป็น 2 ประเภท คือ

2.8.2.1 การแทนที่คู่เบส (base pair substitution mutation หรือ point mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงโดยมีการแทนที่เบสเดิมด้วยเบสคู่อื่น แบ่งเป็น 2 รูปแบบคือ ทรานซิชั่น (transition) คือการแทนที่เบสด้วยเบสกลุ่มเดิม เช่นเบสพิวรีน (purine; A, G) ถูกแทนที่ด้วยเบสพิวรีนอีกตัวหนึ่ง หรือเบสไพริมิดีน (pyrimidine; C, T) ถูกแทนที่ด้วยเบสไพริมิดีนอีกตัวหนึ่ง เช่น A ⇌ G หรือ C ⇌ T แต่ถ้าการแทนที่เบสเดิมด้วยเบสต่างกลุ่ม เรียกว่า ทรานสเวอร์ชั่น (transversion) เช่นเบสพิว-รีนถูกแทนที่ด้วยเบสไพริมิดีน หรือเบสไพริมิดีนถูกแทนที่ด้วยเบสพิวรีนก็ได้ เช่น A/G ⇌ T/C การเปลี่ยนแปลงลักษณะดังกล่าวสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ

2.8.2.1.1 nonsense mutation คือการแทนที่ของลำดับเบสแล้วทำให้โคดอน (codon) ตำแหน่งดังกล่าวแปลรหัสสิ้นสุด ทำให้การสังเคราะห์สายโปรตีนสั้นกว่าเดิม

2.8.2.1.2 missense mutation คือการแทนที่ของลำดับเบสแล้วทำให้โคดอนตำแหน่งดังกล่าวแปลรหัสกรดอะมิโนผิด เกิดการสังเคราะห์โปรตีนผิดชนิด ทำให้สิ่งมีชีวิตอาจมีลักษณะที่แตกต่างไปจากเดิม

2.8.2.1.3 silent mutation คือการแทนที่ของลำดับเบส แต่ไม่ส่งผลทำให้การแปลรหัสกรดอะมิโนผิดไป ยังมีการสังเคราะห์โปรตีนเหมือนเดิม (วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, 2554)

2.8.2.2 เฟรมชิฟท์มิวเทชั่น (frameshift mutation) คือการเพิ่ม และ/หรือ ลดลำดับเบสตั้งแต่ 1 โมเลกุล ทำให้โคดอนเลื่อน (shift) จึงแปลรหัสกรดอะมิโนผิดทั้งสายดีเอ็นเอ โปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นมาก็จะเป็นชนิดอื่น หรือเป็นโปรตีนที่ไม่ทำงาน

การกลายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นตามธรรมชาติและเกิดจากการกระตุ้น การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติอาจเกิดจากรังสี สารเคมีตามธรรมชาติ ทำให้เกิดการเปลี่ยนตำแน่งอะตอมไฮโดรเจนในโมเลกุลของเบส (tautomeric shift) หรือการสูญเสียอะตอมไฮโดรเจนในโมเลกุลของเบส (ionization) ทำให้การจับคู่ของเบสผิดไปจากเดิม ส่งผลให้เกิดการแทนที่คู่เบส ทำให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และคณะ, 2554) หรืออาจเกิดจากหน่วยดีเอ็นเอชนิดหนึ่งที่เรียกว่า transposons ที่เคลื่อนที่ไปตามหรือระหว่างโครโมโซม เมื่อไปจับใกล้หรือภายในยีนใดก็สามารถทำให้ยีนนั้นเปลี่ยนสภาพได้ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550) อย่างไรก็ตามกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์พืช อาจมีผลให้เกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติได้ เช่น เกิดจากความผิดปกติภายในจีโนมของพืชเอง ซึ่งอาจเกิดจากความผิดพลาดระหว่าง recombination การจำลองดีเอ็นเอ และการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554) แม้กระทั่งภาวะสรีรวิทยาของพืชก็มีผลให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ โดยภาวะ physiological ageing ของเมล็ดพืชบางชนิดส่งผลต่อ

ความถี่ของการกลายพันธุ์ การทดลองปลูกพืชจากเมล็ดที่เก็บไว้นาน เปรียบเทียบกับเมล็ดที่เพิ่งเก็บเกี่ยวใหม่ พบว่าต้นอ่อนที่ได้จากเมล็ดที่เก็บไว้นาน มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูงกว่าต้นอ่อนที่ได้จากเมล็ดที่เพิ่งเก็บเกี่ยวใหม่ อย่างไรก็ตามเมล็ดพืชที่ยังมีชีวิต ก็ย่อมมีกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) เกิดขึ้น ซึ่งสารเมตาบอไลต์ (metabolite) บางชนิดที่เกิดระหว่างกระบวนการ อาจมีคุณสมบัติเป็นสารก่อกลายพันธุ์ได้ โดยสารเหล่านี้มีความสำคัญกับวิวัฒนาการของพืชขั้นสูง ในสภาวะปกติพืชมีกลไกการควบคุมสารเมตาบอไลต์ต่าง ๆ ให้ทำงานอย่างถูกต้อง ยกเว้นเมื่อมีสภาวะกระตุ้นบางอย่าง เช่น การเกิดบาดแผล ทำให้สารเมตาบอไลต์บางชนิดทำงานเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ (จินดา เดชบุญ, 2555) ในขณะที่ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอกก็มีผลที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ เช่น การปลูกพืชในดินที่ขาดธาตุอาหารบางชนิด มีการทดลองปลูกต้นลิ้นมังกรในดินที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส ไนโตรเจน และกำมะถัน พบว่าต้นลิ้นมังกรมีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าต้นที่ปลูกในดินที่สมบูรณ์ (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2554) แม้กระทั่งการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิก็ส่งผลเช่นเดียวกัน โดยพบว่าการให้ความร้อนกับเมล็ดข้าวบาร์เลย์แล้วนำไปปลูกเพื่อศึกษาความผิดปกติของโครโมโซม ได้ต้นที่มีความผิดปกติของโครโมโซม และพบการกลายพันธุ์สูงกว่าต้นที่ปลูกจากเมล็ดที่ไม่ได้รับความร้อน (Peto, 2011)

อย่างไรก็ตาม การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติมีอัตราการกลายพันธุ์ต่ำประมาณ 10^{-6} หรือ 10^{-5} นักปรับปรุงพันธุ์พืชจึงใช้วิธีกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราที่สูงกว่าเดิม โดยการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ ได้แก่ รังสีและสารเคมี รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) มีอำนาจในการทะลุผ่านเนื้อเยื่อสูง มักทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม เช่น รังสีอัลฟา รังสีเบตา รังสีแกมมา รังสีเอ็กซ์ และนิวตรอน ส่วนรังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (non ionizing radiation) มีอำนาจในการทะลุผ่านเนื้อเยื่อต่ำ มักทำให้เกิด thymine dimer หรือ cytosine dimer เช่น รังสีอัลตาไวโอเลต

ในขณะที่สารเคมีบางชนิดก็มีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ เช่น สารเคมีกลุ่มอัลไคเลติงเอเจน (alkylating agent) เป็นสารเคมีที่มีหมู่อัลคีล (alkyl group) เป็นองค์ประกอบ โดยหมู่อัลคีลจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลดีเอ็นเอ กลุ่มฟอสเฟต และเบสไพริมิดีน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนและ/หรือ โครโมโซมได้ สารเคมีที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ EMS (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพย-ผ่อง, 2550) อย่างไรก็ตาม มีสารเคมีบางกลุ่มที่มีโมเลกุลคล้ายเบส (base analogues) สามารถเข้าไปแทนที่คู่เบส เช่น 5-โบรโมยูราซิล (5-Bromouracil; 5-BU) และ2-อะมิโนพิวรีน (2-Amino-purine; 2-AP) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายไทมีนและอะดีนีนตามลำดับ ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์แบบทรานซิชั่นในอัตราคงที่ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550; วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, 2554) ในขณะที่สารเคมีบางชนิดสามารถทำให้เกิดการเพิ่ม/ลดนิวคลีโอไทด์ได้ มีผลทำให้การแปลรหัสพันธุกรรมเปลี่ยนไป สารเคมีเหล่านี้ได้แก่สีย้อม (acridine dye) เช่น โปรฟลาวิน (proflavin), เอคริฟ

ลาวิน (acriflavin), เอคริดีนออเร้นจ์ (acridine orange) และเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromine) (จินดา เดชบุญ, 2555) หรือสารเคมีกลุ่มเอไซด์ (azide) เช่น โพแทสเซียมเอไซด์ (potassium azide; KN_3) หรือ NaN_3 มีประสิทธิภาพในการก่อกลายพันธุ์สูง มักทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับยีนและการหักขาดของโครโมโซม (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550)

การกลายพันธุ์ในพืชไม่ว่าจะเป็นการกลายพันธุ์ระดับโครโมโซมหรือยีนก็ตาม จะมีผลต่อการแสดงออกที่แตกต่างกัน ซึ่งการกลายพันธุ์ที่ปรากฏผลอย่างชัดเจน (macro mutation) จะสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า หรือแยกความแตกต่างด้วยวิธีการที่ง่าย ส่วนใหญ่เป็นลักษณะด้อย เช่น การเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์ และการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน ขณะที่การกลายพันธุ์บางลักษณะปรากฏผลเชิงปริมาณมากกว่าคุณภาพ (micro mutation) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของยีนเป็นกลุ่ม สามารถตรวจสอบโดยวิธีการทางสถิติ อย่างไรก็ตามเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ก็จะทำให้เกิดความแปรปรวนของลักษณะดังกล่าวขึ้น นิยมใช้ทดสอบลักษณะต่าง ๆ เช่น ความสูง ขนาดเมล็ด และผลผลิต

2.9 ขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์

การปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยวิธีการกลายพันธุ์โดยสารเคมี เป็นเครื่องมือชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ ก่อให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์สูง ในระหว่างทำการทดลองต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่จะส่งผลให้การกลายพันธุ์ประสบความสำเร็จ เช่น เนื้อเยื่อ (ชนิดเนื้อเยื่อ ขนาดเนื้อเยื่อ และระยะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ) และความสามารถของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ (ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความเข้มข้นของสาร) อย่างไรก็ตามระยะเวลาระหว่างทำการทดลองก็มีความสำคัญอย่างยิ่งต้องศึกษาเพื่อให้มีความเหมาะสมกับชนิดของพืช (ตารางที่ 2.2) เพื่อการก่อกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด อย่างไรก็ตามมีการก่อกลายพันธุ์ในเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด เช่น ใบ เมล็ด ละอองเกสร แคลลัส (callus) ฯลฯ ในกล้วยไม้นิยมก่อกลายพันธุ์โดยใช้เนื้อเยื่อ PLBs และเมล็ด การก่อกลายพันธุ์มีขั้นตอนการทดลองพอสังเขป ดังนี้

2.9.1 ตั้งวัตถุประสงค์ของการก่อกลายพันธุ์ เพื่อทำการหาข้อมูลที่เกี่ยวกับพืชชนิดดังกล่าว ชนิดของสารเคมีที่จะก่อกลายพันธุ์ และข้อมูลเกี่ยวกับการตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ ที่เปลี่ยนแปลงไปอันเกิดจากการกลายพันธุ์

2.9.2 เลือกชนิดเนื้อเยื่อพืช เพื่อหาความเหมาะสมในการใช้ชนิดสารเคมี และความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ที่เหมาะสม

2.9.3 ทำการทดสอบความเป็นพิษ และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชนั้น ๆ

2.9.4 เมื่อได้ความเข้มข้นสารเคมีก่อกลายพันธุ์ที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อและพืชชนิดนั้น ก็ทำการก่อกลายพันธุ์พืชในปริมาณมาก เป็นการเพิ่มโอกาสที่จะพบต้นกลายพันธุ์ที่มีลักษณะแปลกออกไปจากเดิมมากขึ้น

2.9.5 ทำการตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ ที่เหมาะสม เช่น การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา การตรวจสอบระดับเซลล์ และการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งในแต่ละวิธีจะมีความละเอียดของผลการตรวจสอบที่แตกต่างกันออกไป ควรเลือกใช้วิธีการตรวจสอบให้เหมาะสมกับชนิดของพืชและวัตถุประสงค์

ตารางที่ 2.2 การใช้โซเดียมเอไซด์เพื่อก่อกลายพันธุ์ในพืชหลายชนิด

ชนิดพืช	ปัจจัยการทดลอง			
	ชนิดเนื้อเยื่อ	ความเข้มข้นสาร (mM)	ระยะเวลาการให้สาร (ชั่วโมง)	วัตถุประสงค์ในการทดลอง
Purple false brome (*Brachypodium distachyon*)	เมล็ด	1.5	2	ศึกษาประสิทธิภาพของการก่อกลายพันธุ์
ปอกระเจา (*Corchorus capsularis*)	เมล็ด	20	NA	พัฒนาสายพันธุ์ใหม่
	เมล็ด	1.5	3	ศึกษาความเป็นพิษ และประสิทธิภาพของการก่อกลายพันธุ์
บาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*)	เมล็ด	1	3	ศึกษาความเป็นพิษ และประสิทธิภาพของการก่อกลายพันธุ์
	เมล็ด	1	2	ศึกษาประเภทของการกลายพันธุ์
	เมล็ด	0.1, 0,5, 1, 5	20	ศึกษาความเข้มข้นที่มีผลต่อการกลายพันธุ์
	อับละอองเกสร	0.1, 1	6	ศึกษา androgenic doubled haploid mutants
ข้าว (*Oryza sativa*)	เมล็ด	1	3	ศึกษาความถี่ของการกลายพันธุ์
	เมล็ด	0.1, 1, 5, 10, 50	NA	ศึกษาความเป็นพิษ และประสิทธิภาพของการก่อกลายพันธุ์

NA คือไม่พบข้อมูล

2.10 การใช้โซเดียมเอไซด์ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

NaN_3 เป็นสารประกอบไอออนิก (ionic compound) ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการก่อกลายพันธุ์ ประกอบไปด้วย N_3-group เชื่อมต่อกันเป็นสามเหลี่ยมทำมุม 1.18 A^0 ด้วยพันธะคู่ สามารถละลายน้ำได้ดี นิยมใช้ในงานด้านอุตสาหกรรม การแพทย์ การเกษตร และงานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อเพิ่มคุณภาพและผลผลิต (Khan and Al-Quariny, 2009) สามารถนำไปใช้กระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์กับพืชและสัตว์ได้ ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์หลายรูปแบบ เช่นการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา จำนวนโครโมโซม หรือแม้กระทั่งลำดับเบส โดยพบว่า NaN_3 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม เช่น การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซมเมื่อมีการแตกหัก โครโมโซมเคลื่อนไปสู่ขั้วเซลล์ช้ากว่าปกติ (chromosome lagging) ก่อให้เกิดโครโมโซมที่มีโครงสร้างคล้ายสะพาน (chromosome bridge) ได้ (Klasterskii et al., 1976) อีกทั้งยังพบว่า NaN_3 สามารถเปลี่ยนแปลงลำดับเบสได้ด้วย ในปัจจุบันมีการสันนิษฐานว่าพืชสามารถสร้าง L-azidoalanine (N_3-CH_2-$CH(NH_2)$-COOH) หรือ L-cysteine ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับกรดอะมิโนขึ้นมาภายในเซลล์ ระหว่างกระบวนการสร้างสารชนิดนี้จะพบเอนไซม์ชนิดหนึ่งคือ O-acetylserine sulfhydrylase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาการจับกันระหว่างอะตอมของเอไซด์ (N^-_3) หรือซัลไฟต์ (sulfide; S^-_2) กับ O-acetylserine เพื่อผลิตกรดอะมิโนคือ L-azidoalanine หรือ L-cysteine ได้ อย่างไรก็ตาม กระบวนการนี้สามารถเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์แบบ point mutation ระหว่างการจำลองดีเอ็นเอได้ (Kredich, 1971; La and Mongold, 1987; Owais and Kleinhofs, 1988) ทำให้เกิดการแทนที่ของลำดับเบสแบบทรานสเวอร์ชั่น โดยการแทนที่เบสด้วยเบสต่างกลุ่มกัน เช่น เบสเดิมเป็นกลุ่มพิวรีน ก็จะถูกแทนที่ด้วยกลุ่มไพรริมิดีน หรือถ้าเบสเดิมเป็นกลุ่มไพรริมิดีน ก็จะถูกแทนที่ด้วยกลุ่มพิวรีน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น กระบวนการเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและพัฒนาของเซลล์ชนิดต่าง 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 สามารถทำความเสียหายให้กับโครโมโซมของข้าวบาร์เลย์ได้ (Pearson et al., 1975) อีกทั้งยังพบว่า NaN_3 สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางอย่างของไม้ดอกไม้ประดับ เช่น คาร์เนชั่น (*Dianthus caryophyllus* L.) และสัปปะรดสี (*Guzmania* Hilda) ได้อีกด้วย (Rajib and Jagatpati, 2011)

ระหว่างทำการทดลองก่อกลายพันธุ์ ควรคำนึงถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ ระยะเวลาในการให้สาร และเปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่อพืช (lethal dose; LD)

ซึ่งเป็นดัชนีหนึ่งในการชี้วัดความมีประสิทธิภาพ และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารก่อกลายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง มักนิยมใช้ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดอัตราการตายของเนื้อเยื่อพืชที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) เพื่อก่อกลายพันธุ์ แต่อาจใช้ค่าที่มากหรือน้อยกว่าร่วมกับค่า LD_{50} ในการทดลองได้ เช่น LD_{30} และ LD_{80} (คือความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ที่ทำให้เนื้อเยื่อพืชตาย 30 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) เป็นต้น ความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ที่แตกต่างกัน จะส่งผลให้อัตราการกลายพันธุ์แตกต่างกัน โดยการใช้สารก่อกลายพันธุ์ความเข้มข้นสูง จะส่งผลให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์สูง แต่อัตราการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อพืชจะลดลง ซึ่งเนื้อเยื่อพืชที่รอดชีวิตอาจจะพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ แต่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากเกินไป บางกรณีเกิดผลเสียในกระบวนการเจริญเติบโตของพืชได้เช่นกัน ในทางตรงกันข้าม การใช้สารก่อกลายพันธุ์ความเข้มข้นต่ำ ส่งผลให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์ต่ำ แต่อัตราการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อพืชมากกว่าการใช้สารก่อกลายพันธุ์ความเข้มข้นสูง ซึ่งเนื้อเยื่อพืชที่รอดชีวิตอาจจะพัฒนาและเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ดีกว่า แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจจะไม่เปลี่ยนแปลงหรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ต้องการ (ธัญญา ขำเลิศ, 2532; Abdullah et al., 2009) ดังนั้นการใช้ความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ที่เหมาะสมจึงจำเป็น เพราะทำให้มีจำนวนเนื้อเยื่อพืชที่รอดชีวิตในปริมาณที่เหมาะสม และมีโอกาสในการพบต้นสายพันธุ์กลายที่ต้องการสูง เพื่อให้การก่อกลายพันธุ์มีประสิทธิภาพสูงสุด และเพิ่มปริมาณต้นสายพันธุ์กลายเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการก่อกลายพันธุ์ยังขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชนิดเนื้อเยื่อพืชที่นำมาใช้ และค่า pH ของ NaN_3 อีกด้วย จากการทดลองของหลายคณะพบว่าการใช้ NaN_3 ที่ pH ต่ำจะพบปฏิกิริยารีดักชั่น (reduction) ในเซลล์พืชเป็นจำนวนมาก อีกทั้งยังพบการแตกตัวของ hydrazoic acid มากขึ้น ส่งผลให้เกิดอันตรายกับเซลล์พืช รวมทั้งก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งถ้าใช้ NaN_3 ที่ความเข้มข้นเดียวกัน แต่ pH ต่างกันพบว่า ที่ pH 3 เกิดการแตกตัวของ hydrazoic acid มากกว่า และสามารถทำความเสียหายกับเยื่อหุ้มเซลล์พืชได้มากกว่า pH 6 (Nilan et al., 1973) ดังนั้นจำเป็นต้องใช้ภาวะที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มโอกาสประสบความเสร็จในการก่อกลายพันธุ์ และได้ต้นกลายพันธุ์ในอัตราสูงขึ้นอีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้วิธีการนี้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.11 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมใช้ในการขยายพันธุ์พืชในปัจจุบัน มีประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์สูง เนื้อเยื่อพืชสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมและในสภาพแวดล้อมที่ควบคุม สามารถขยายพันธุ์ได้เป็นจำนวนมากในเวลาที่รวดเร็ว ซึ่งเทคนิคนี้เป็นที่นิยมในการขยายพันธุ์ส่วนต่าง ๆ ของกล้วยไม้ เช่น การเพาะเมล็ดกล้วยไม้เพื่อแก้ปัญหาอัตราการงอกต่ำในธรรมชาติ หรือการชักนำเนื้อเยื่อปลายยอด (shoot tip) เพื่อให้เกิด

แคลลัสและต้นโตเต็มวัยได้ (Aktar et al., 2008) อีกทั้งยังสามารถชักนำโปรโตคอร์มจากเมล็ด หรือชักนำ PLBs จากเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ ของต้น *Dendrobium fimbriatum* Lindl. (Roy and Banerjee, 2003) ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ ซึ่งเกิดจากความแปรปรวนแบบโซมาโคนอล (somaclonal variation) การกลายพันธุ์นี้อาจเกิดจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซม โครโมโซมหักขาด หรือการเปลี่ยนแปลงของยีน ความแปรปรวนเหล่านี้อาจเกิดจากอาหารเพาะเลี้ยง หรือสภาพการเลี้ยงที่พืชต้องปรับตัว (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและเพิ่มโอกาสประสบความสำเร็จในการได้ต้นกล้วยไม้สายพันธุ์กลายอีกทางหนึ่ง

2.12 การตรวจสอบการกลายพันธุ์

การตรวจสอบการกลายพันธุ์ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรวจสอบระดับเซลล์ และการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้มีความจำเพาะเจาะจง ทั้งรูปแบบการเจริญเติบโต ลำต้น การแตกกอ ลักษณะของดอก ช่อดอก ฝัก เมล็ด และใบ อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบลักษณะการกลายพันธุ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ใช้เวลานานและต้นทุนสูง ต้องรอต้นกล้วยไม้ให้โตเต็มที่จนถึงระยะที่แสดงออกลักษณะเหล่านั้น อีกทั้งยังตรวจสอบได้เฉพาะการเปลี่ยนแปลงของยีนหรือโครโมโซมที่มีผลกระทบต่อฟีโนไทป์เท่านั้น

ส่วนการตรวจสอบระดับเซลล์เป็นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือจำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ สิ่งก่อกลายพันธุ์บางชนิดสามารถส่งผลให้รูปร่างโครโมโซมเปลี่ยนแปลง (ชิ้นส่วนโครโมโซมขาดหาย เพิ่มขึ้น และเปลี่ยนสลับทิศ) และจำนวนโครโมโซมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (เพิ่มขึ้นหรือลดลง) ซึ่งอาจส่งผลต่อลักษณะการแสดงออกของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ได้ วิธีการนี้มีข้อจำกัดหลายประการ เช่นต้องทำในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ใช้เครื่องมือและสารเคมีที่จำเพาะเจาะจง อีกทั้งวิธีการนี้ไม่สามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับดีเอ็นเอได้ ในปัจจุบันจึงมีการนำความรู้ เทคนิค และวิธีการต่าง ๆ ด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล มาประยุกต์ใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม เครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมใช้ 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) ซึ่งเครื่องหมายดังกล่าวสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้แต่ละสายพันธุ์ หรือแยกความแตกต่างระหว่างต้นสายพันธุ์กลายออกจากต้นดั้งเดิมได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ตรวจ

ประวัติทางพันธุกรรม หรือสร้างแผนที่โครโมโซม เพื่อใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ในอนาคต (ทิพวัลย์ อยู่ชา และคณะ, 2549)

ในปัจจุบันพบว่า มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิดเพื่อการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ เช่น เครื่องหมาย RAPD สามารถแยกความแตกต่างของกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิส ระหว่างต้นดั้งเดิมและต้นสายพันธุ์กลายซึ่งเกิดจากความแปรปรวนแบบโซมาโคนอลได้ (Chen et al., 1998) เครื่องหมายชนิดนี้สามารถวิเคราะห์ได้ง่าย รวดเร็ว และใช้ต้นทุนต่ำ อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 200–2,000 bp ที่อยู่ระหว่าง inverted DNA repeats ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แต่ก็ยังมีข้อเสียคือ บางตำแหน่ง (loci) ของแถบดีเอ็นเอ อาจได้ผลที่ไม่คงที่ ไม่สามารถประเมินความแตกต่างได้อย่างแม่นยำ จึงมักไม่นิยมใช้กันในปัจจุบัน ในขณะที่เครื่องหมาย AFLP อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ สามารถตรวจสอบ polymorphic loci จำนวนมากได้ในแต่ละปฏิกิริยา ให้ผลแม่นยำกว่าเครื่องหมาย RAPD แต่วิธีการทดลองยุ่งยาก ซับซ้อนกว่า ใช้เวลานาน และต้นทุนสูงกว่าเครื่องหมาย RAPD ส่วนเครื่องหมายที่นิยมใช้อีกชนิดคือ SSR หรือ microsatellite เป็นเครื่องหมายแบบ codominance ซึ่งเครื่องหมายชนิดนี้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 19 สายพันธุ์ เพื่อจัดทำฐานข้อมูลทางพันธุกรรมสำหรับงานปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายได้ (ทิพวัลย์ อยู่ชา และคณะ, 2549) เครื่องหมายชนิดนี้อาศัยหลักการตรวจสอบความแตกต่างของ DNA repeats ขนาด 1-6 bp บริเวณ microsatellite โดยวิธี PCR เป็นเครื่องหมายที่มีข้อดีหลายประการ เช่น ให้ข้อมูลความแตกต่างสูง มีการกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม ได้ผลการทดลองที่แน่นอน เป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบ codominance และมีวิธีการวิเคราะห์ที่ง่าย รวดเร็ว และใช้ต้นทุนไม่มาก จึงเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน แต่ข้อเสียของวิธีการนี้คือ จะต้องมีการโคลนและหาลำดับเบสของ microsatellite และดีเอ็นเอข้างเคียง (flanking DNA) ก่อนจึงจะนำไปใช้ทำการทดลองได้ ส่วนเครื่องหมาย ISSR เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากเป็นเครื่องหมายที่สามารถวิเคราะห์ความแตกต่าง (polymorphism) ได้อย่างชัดเจน โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นคู่สมกับลำดับเบสของ SSR ซึ่งมีขนาดประมาณ 20 นิวคลีโอไทด์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง microsatellite ได้โดยตรง จึงไม่จำเป็นต้องมีการโคลนและหาลำดับเบสก่อนการทดลอง อีกทั้งวิธีการนี้ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งของจีโนม (multilocus) พบว่าการใช้เครื่องหมาย ISSR สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลูกผสมฟาแลนนอปซิสทั้ง 16 ลูกผสมได้ (Li et al., 2010) และยังสามารถประเมินความหลากหลายและหาความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ซิมบิเดียมได้อีกด้วย (Hui-Zhong et al., 2009) อีกทั้งสามารถตรวจสอบความแตกต่างได้ปริมาณมาก ให้ผลการทดลองที่แม่นยำ วิธีการง่าย รวดเร็ว และต้นทุนต่ำ

ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้เครื่องหมาย ISSR จึงเหมาะสมในการนำมาใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีประสิทธิภาพ

2.13 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสำคัญต่อการศึกษาด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นกระบวนการหนึ่งที่มีผลต่อวิวัฒนาการและการอยู่รอดของพืชในแต่ละชนิด หากไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม พืชแต่ละชนิดจะไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้เกิดการสูญพันธุ์ในอนาคตได้ อีกทั้งความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นประโยชน์อย่างมากในการปรับปรุงพันธ์พืช เช่น ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงสายพันธุ์ หรือเป็นการเพิ่มจำนวนของสายพันธุ์อีกด้วย สามารถประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางด้านชีววิทยา ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพ และด้านเทคโนโลยีการเกษตร ซึ่งการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถทำได้หลายวิธีการ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ปัจจุบันนักปรับปรุงพันธุ์พืชได้มีการนำความรู้ด้านเครื่องหมายโมเลกุลมาประยุกต์ในงานปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากสามารถประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมได้

การประเมินความมีประสิทธิภาพและความเหมาะสมในการแยกความหลากหลายทางพันธุกรรมของเครื่องหมายโมเลกุลในแต่ละชนิด จะใช้ค่า polymorphic information content (PIC) ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 ซึ่งหาก PIC มีค่ามาก หมายถึงเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนั้นมีประสิทธิภาพในการแยกความหลากหลายทางพันธุกรรม เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

$$PIC = 1 - \sum p^2_{ij}$$

กำหนดให้ pij เป็นความถี่ของอัลลีล i ของเครื่องหมายโมเลกุล j ตามลำดับ (Botstein et al., 1980)

ในขณะเดียวกัน ค่า phylogenetics เป็นสมมติฐานที่สร้างขึ้นเพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตในลักษณะแผนภูมิ dendrogram สามารถอธิบายความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชแต่ละชนิด ซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางชีวภาพของพืชชนิดนั้นได้ เป็นการอาศัยองค์ความรู้ด้านวิวัฒนาการ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต และข้อมูลทางชีววิทยาเชิงโมเลกุล เช่น ลำดับกรดอะมิโนของสายโปรตีน หรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ โดยค่า goodness for fit ของสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ cophenetic แสดงถึงความมีประสิทธิภาพของ dendrogram สามารถเป็นตัวแทนข้อมูลในแมททริกซ์ความคล้ายคลึงกันได้ ซึ่งถ้ามีค่ามาก หมายถึงแผนภูมิ dendrogram มีข้อมูลที่แม่นยำและสอดคล้อง

กับสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ได้จากการทดลอง อย่างไรก็ตามเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละชนิดที่นำมาใช้ในการทดลอง ก็มีความเหมาะสมต่อลักษณะงานและวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นควรเลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมกับการทดลอง ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่จะนำไปสู่ผลการทดลองที่ถูกต้อง โดยเครื่องหมายโมเลกุลที่ดีควรมีระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เหมาะสมกับการทดลอง และให้ผลคงที่เมื่อทำการทดลองซ้ำอีกด้วย (Rizzo and Rouchka, 2007)

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

ดำเนินการวิจัยโดยแบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1: การก่อกลายพันธุ์ protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วยโซเดียมเอไซด์ (sodium azide; NaN_3)

การทดลองที่ 2: การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลาย

1) การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)
2) การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers)
3) การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยวิธีการระดับเซลล์ (cytology)

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. PLBs กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล
2. ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (laminar flow cabinet)
3. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
5. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
6. เครื่องชั่งชนิดหยาบ (course balance)
7. เครื่องชั่งชนิดละเอียด (fine balance)
8. หม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ (automatic autoclave)
9. เครื่องดูดถ่ายสารปริมาณน้อย (adjustable pipettes)
10. ชั้นไฟสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (micro centrifuge)
12. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)
13. ตู้ดูดไอสารเคมี (fume hood)
14. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler)
15. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงโดยใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อย (nanodrop)
16. เครื่องส่องดูเจล (UV transluminater) พร้อมชุดบันทึกภาพลงแผ่นดิสก์
17. เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอแนวตั้ง (vertical gel electrophoresis apparatus)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

18. กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)
19. เครื่องเขย่าสารละลาย (shaker)
20. อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ
21. อุปกรณ์ทางการเกษตร

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์พืช ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช โรงเรือน ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3

3.3 ระยะเวลาการทดลอง

มีนาคม 2555 – กันยายน 2558

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การทดลองที่ 1: การก่อกลายพันธุ์ protocorm - like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วยโซเดียมเอไซด์ (sodium azide; NaN_3)

ความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์และระยะเวลาการก่อกลายพันธุ์ มีผลต่อความสำเร็จในการก่อการกลายพันธุ์ การทดลองนี้ทดสอบหาความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการก่อกลายพันธุ์ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล โดยหาความเข้มข้นที่ทำให้ PLBs ตาย 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{30} และ LD_{50})

3.4.1.1 นำ PLBs ที่ได้จากการปั่นตากล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล (บริษัททีเค-ออร์คิด ฟาร์ม, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย) มาเลี้ยงในอาหาร VW1 (Tantasawat et al., 2015) ประมาณ 2 สัปดาห์ เพื่อให้เนื้อเยื่อปรับตัว (ภาพที่ 3.1)

ภาพที่ 3.1 protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล

3.4.1.2 คัดเลือก PLBs ที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน ทั้งอายุ ขนาด รูปร่าง และสี ไปแช่ในreverse osmosis water (ROW) นึ่งฆ่าเชื้อ (control 1) และสารละลาย NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.0 (control 2), 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 และ 4.0 mM ซึ่งเตรียมใน 100 mM citrate buffer (pH 5) เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) โดยแต่ละความเข้มข้นใช้ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 10 PLBs

3.4.1.3 เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงนำ PLBs จากข้อ 3.4.1.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร VW1 ภายใต้อุณหภูมิ 27±2°ซ ช่วงแสง 16 ชั่วโมง ความเข้มแสง 100 μmol. $m^{-2}.s^{-1}$ บันทึกผลการตายที่ 3 วัน 1 สัปดาห์ และ 2 สัปดาห์

3.4.1.4 ทำการก่อกลายพันธุ์ PLBs ตามขั้นตอนที่ 3.4.1.1-3.4.1.3 ซ้ำ 8 ครั้ง นำข้อมูลมาหาค่าเฉลี่ยเพื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ NaN_3 และเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs จากนั้นหาค่า LD_{30} และ LD_{50}

3.4.1.5 เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เหมาะสมสำหรับระยะการเจริญเติบโตของ PLBs จนกระทั่งเป็นต้นสมบูรณ์และเกิดราก

3.4.1.6 ใช้ความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์จากกราฟในข้อ 3.4.1.4 ซึ่งให้ค่าที่ LD_{30} และ LD_{50} ในการชักนำ PLBs จำนวนมาก ให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกต้นสายพันธุ์กลายต่อไป

3.4.1.7 บันทึกผลการทดลอง และวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารละลาย NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

3.4.2 การทดลองที่ 2: การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลาย

การคัดเลือกและตรวจสอบสายพันธุ์กลายของกล้วยไม้สามารถทำได้หลายวิธี การทดลองครั้งนี้ ใช้วิธีการตรวจสอบ 3 วิธีคือ 1) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นการตรวจสอบลักษณะที่แสดงออกทางฟีโนไทป์ที่เปลี่ยนไปจากเดิม 2) เครื่องหมายโมเลกุล เป็นการตรวจสอบระดับดีเอ็น-เอ ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์กลายออกจากสายพันธุ์ดั้งเดิมได้ ในการทดลองนี้ใช้เครื่องหมายโมเลกุล ISSR และ 3) การตรวจสอบระดับเซลล์วิทยา เป็นการตรวจสอบจำนวนโครโมโซมของสายพันธุ์กลายที่เปลี่ยนแปลงไป

3.4.2.1 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

3.4.2.1.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ โดยนำต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากการทดลองที่ 1 อายุประมาณ 6 เดือน นำออกปลูกในโรงเรือน โดยเปรียบเทียบต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2

(C6-C10)) จำนวน 10 ต้น กับต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM NaN_3 (M13-M24) จำนวน 24 ต้น วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำการบันทึกลักษณะของต้นกล้วยไม้ดังต่อไปนี้

1) ลักษณะต้น ได้แก่ ความสูงทั้งต้น จำนวนข้อปล้อง ความยาวข้อปล้อง และการแตกหน่อ โดยความสูงต้น คือความสูงจากโคนต้นถึงปลายลำลูกกล้วย (pseudobulb); จำนวนข้อปล้อง คือจำนวนข้อปล้องของลำลูกกล้วย; ความยาวข้อปล้อง คือค่าความสูงต้น หารด้วยจำนวนข้อปล้อง; การแตกหน่อ คือการมีหน่อแตกออกมาจากต้นแม่

2) ลักษณะใบ ได้แก่ จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ สีใบ ใบหนา และการเรียงตัวของใบ โดยจำนวนใบ คือจำนวนใบทั้งหมด; ความยาวใบ คือความยาวจากโคนใบถึงปลายใบของใบบนสุด; ความกว้างใบ คือความกว้างใบบนสุด; สีใบ คือสีของใบ; ใบหนา คือใบที่มีลักษณะหนา แข็ง และสีเขียวเข้ม สังเกตด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน; การเรียงตัวของใบ คือการเรียงตัวของใบบนต้น

3) ลักษณะราก ได้แก่ จำนวนราก และความยาวราก โดยจำนวนราก คือจำนวนรากทั้งหมด; ความยาวราก คือความยาวจากโคนต้นถึงปลายรากที่ยาวที่สุด

โดยมีเกณฑ์การจำแนกต้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากเดิม ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 เกณฑ์การจำแนกต้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากเดิม

ลักษณะ	เกณฑ์การจำแนก
ความสูงต้น	ลำต้นเตี้ย คือ ลำต้นที่มีความสูง 0-1.20 เซนติเมตร; ลำต้นสูง (ลักษณะปกติ) คือ ลำต้นที่มีความสูง > 1.20 เซนติเมตร
ความยาวข้อปล้อง	ข้อปล้องสั้น คือ ความยาวข้อปล้อง 0-0.30 เซนติเมตร; ข้อปล้องยาว (ลักษณะปกติ) คือ ความยาวข้อปล้อง > 0.30 เซนติเมตร
จำนวนข้อปล้อง	จำนวนข้อปล้องถี่ คือ มีจำนวนข้อปล้อง > 5 ข้อปล้อง; จำนวนข้อปล้องปกติ คือ มีจำนวนข้อปล้อง 1- 5 ข้อปล้อง
ความยาวใบ	ใบสั้น คือ ใบที่มีความยาว 0-1.50 เซนติเมตร; ใบยาว (ลักษณะปกติ) คือ ใบที่มีความยาว > 1.50 เซนติเมตร
ความหนาใบ	ใบหนา คือใบที่มีลักษณะหนา แข็ง และสีเขียวเข้ม สังเกตด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน; ใบปกติ คือ ใบที่มีลักษณะบาง ไม่แข็ง และสีเขียวปกติ

ตารางที่ 3.1 เกณฑ์การจำแนกต้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากเดิม (ต่อ)

ลักษณะ	เกณฑ์การจำแนก
ความยาวราก	รากสั้น คือ รากที่มีความยาว 0-1.00 เซนติเมตร; รากยาว (ลักษณะปกติ) คือ รากที่มีความยาว > 1.00 เซนติเมตร
จำนวนราก	รากมีจำนวนน้อย คือ มีราก 1-2 ราก; รากมีจำนวนมาก (ลักษณะปกติ) คือ มีราก > 2 ราก

3.4.2.1.2 การวิเคราะห์ผล

1) วิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM NaN_3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

2) คำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยใช้สูตรเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง = (จำนวนต้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลง/จำนวนต้นทั้งหมด) x 100 โดยจำนวนต้นทั้งหมดของต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก ROW และ 0 mM NaN_3 คือ 10 ต้น ส่วนจำนวนต้นทั้งหมดของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก 0.1 mM NaN_3 คือ 12 ต้น และจำนวนต้นทั้งหมดของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก 0.5 mM NaN_3 คือ 12 ต้น

3) ประเมินการมี (+) หรือไม่มี (-) การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐาน-วิทยา

4) ประเมินความเหมือนกันทางสัณฐานวิทยาระหว่างต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM NaN_3 โดยใช้ 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, 2000) วิเคราะห์ principle coordinate analysis (PCoA) เพื่อให้ได้ข้อมูลระยะห่างระหว่างกลุ่มเพิ่มเติมจากข้อมูลที่ได้จาก cluster analysis ประเมินความสัมพันธ์ภายในกลุ่ม dendrogram ของต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM NaN_3 โดยวิธีของ Mantel (1967)

3.4.2.1.3 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ที่อายุ 1 ปี เช่นเดียวกับที่อายุ 6 เดือน

3.4.2.1.4 การวิเคราะห์ผล วิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่

ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM NaN_3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

หมายเหตุ: บันทึกลักษณะลำต้น ใบ และราก ของต้นกล้วยไม้เมื่ออายุครบ 1 ปี แต่ไม่สามารถประเมินลักษณะต่าง ๆ ของดอกได้ในการทดลองครั้งนี้ เนื่องจากกล้วยไม้ยังไม่ออกดอก

3.4.2.2 การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลายด้วยเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers)

3.4.2.2.1 สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนกล้วยไม้ของต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM NaN_3 ที่ได้จากการทดลองที่ 1 โดยวิธีการดัดแปลงจาก Zhang et al. (2005) ดังนี้

1) ใช้ extraction buffer ซึ่งประกอบด้วย 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.5 M NaCl, 50 mM EDTA (pH 8.0) และ 3% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Miaobin et al. (2009)

2) บดตัวอย่างใบน้ำหนัก 1 กรัมในโกร่ง นำตัวอย่างใส่ในหลอด เติม extraction buffer ปริมาตร 600 µL บ่มที่อุณหภูมิ 60 ^{o}ซ นาน 30 นาที

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

4) ดูดน้ำใสใส่หลอดใหม่ เติม 5M NaCl ปริมาตร 0.5 V จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 1 V และบ่มที่อุณหภูมิ 20 ^{o}ซ นาน 20 นาที

5) ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% และ 95% (v/v) ethanol ทิ้งไว้จนระเหยหมด และละลายด้วย ddH_2O ปริมาตร 200 µl วัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงโดยใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อย

3.4.2.2.2 ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ ISSR เบื้องต้น จำนวน 60 ไพรเมอร์ เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม ที่จะนำมาใช้ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM NaN_3 ดังตารางที่ 3.2 (Xiaohong et al., 2007; Baloch et al., 2010)

ตารางที่ 3.2 ลำดับเบส และอุณหภูมิ annealing ของไพรเมอร์ ISSR

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	อุณหภูมิ annealing	ไพรเมอร์	ลำดับเบส	อุณหภูมิ annealing
ISSR 801	$(AT)_8T$	53.0	ISSR 835	$(AG)_8YC$	48.0
ISSR 807	$(AG_8)T$	52.3	ISSR 836	$(AG)_8YA$	52.0
ISSR 808	$(AG_8)C$	52.0	ISSR 840	$(GA)_8YT$	48.0
ISSR 809	$(AG_8)G$	52.0	ISSR 841	$(GA)_8YC$	54.0
ISSR 810	$(GA_8)T$	50.0	ISSR 842	$(GA)_8YG$	54.0
ISSR 811	$(GA_8)C$	53.0	ISSR 843	$(CT)_8RA$	52.0
ISSR 812	$(GA)_8A$	53.0	ISSR 844	$(CT)_8RC$	54.0
ISSR 813	$(CT)_8T$	50.0	ISSR 845	$(CT)_8RG$	54.0
ISSR 815	$(CT)_8G$	52.0	ISSR 847	$(CA)_8RC$	52.0
ISSR 816	$(CA)_8T$	50.0	ISSR 848	$(CA)_8RG$	54.0
ISSR 817	$(CA)_8A$	53.0	ISSR 850	$(GT)_8YC$	56.0
ISSR 818	$(CA)_8G$	53.0	ISSR 851	$(GT)_8YG$	54.0
ISSR 819	$(GT)_8A$	50.0	ISSR 852	$(TC)_8RA$	52.0
ISSR 820	$(GT)_8C$	52.0	ISSR 855	$(AC)_8YT$	52.0
ISSR 821	$(GT)_8T$	50.0	ISSR 856	$(AC)_8YA$	52.0
ISSR 822	$(TC)_8A$	50.0	ISSR 857	$(AC)_8YG$	54.0
ISSR 823	$(TC)_8C$	52.0	ISSR 858	$(TG)_8RT$	52.0
ISSR 824	$(TC)_8G$	52.0	ISSR 859	$(TG)_8RC$	54.0
ISSR 825	$(AC)_8T$	53.0	ISSR 860	$(TG)_8RA$	52.0
ISSR 826	$(AC)_8C$	52.0	ISSR 861	$(ACC)_6$	54.0
ISSR 827	$(AC)_8G$	53.0	ISSR 862	$(AGC)_6$	56.0
ISSR 828	$(TG)_8A$	50.0	ISSR 864	$(ATG)_6$	44.0
ISSR 829	$(TG)_8C$	58.0	ISSR 866	$(CTC)_6$	56.0
ISSR 834	$(AG_8)YT$	55.4	ISSR 867	$(GGC)_6$	52.0
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

ตารางที่ 3.2 ลำดับเบส และอุณหภูมิ annealing ของไพรเมอร์ ISSR (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	อุณหภูมิ annealing	ไพรเมอร์	ลำดับเบส	อุณหภูมิ annealing
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

3.4.2.2.3 คัดเลือกไพรเมอร์ ISSR ที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 3.4.2.2.2 จำนวน 12 ไพรเมอร์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งดัดแปลงจาก Baloch et al. (2010) และ Brown-Guedira et al. (2000) โดยใช้ 20 µl reaction mixture ประกอบด้วย 1x PCR buffer, 25 mM $MgCl_2$, 2 mM dNTP, 50 ng template DNA, *Taq* DNA polymerase 1 unit และ 4 µM ISSR primer เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยโปรแกรม ดังนี้

Denaturing step: อุณหภูมิ 94 °ซ 5 นาที

Denaturing step: อุณหภูมิ 94 °ซ 45 วินาที
Annealing step: อุณหภูมิ 48-58 °ซ 45 วินาที } จำนวน 45 รอบ
Elongation step: อุณหภูมิ 72 °ซ 1.5 นาที

Elongation step: อุณหภูมิ 72 °ซ 7 นาที

หมายเหตุ: อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing step ขึ้นอยู่กับแต่ละไพรเมอร์ ดังตารางที่ 3.2

3.4.2.2.4 ผสม 5 µL PCR products กับ 2.5 µL 3x loading dye (5M NaOH, 95% formamide, 0.5 mg/mL bromophenol blue และ 0.5 mg/mL xylene FF)

3.4.2.2.5 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) ทำการ pre-run ภายใต้สนามไฟฟ้า 200 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง หยดตัวอย่างในหลุม แล้วรันเจลภายใต้สนามไฟฟ้า 200 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 50 นาที

3.4.2.2.6 ย้อมเจลด้วย silver nitrate โดยวิธีการดัดแปลงจาก Di Gaspero and Cipriani (2003) เพื่อตรวจสอบขนาดและจำนวนท่อนของดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง โดยแช่และล้าง gel ด้วยสารเคมีต่าง ๆ ตามขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1: แช่เจล ใน 10% EtOH นาน 10 นาที

ขั้นตอนที่ 2: แช่เจล ใน 0.7% HNO_3 นาน 6 นาที

ขั้นตอนที่ 3: แช่เจล ใน 0.2% $AgNO_3$ นาน 30 นาที

ขั้นตอนที่ 4: ล้างเจล ด้วย developer (0.02 mg/ml Na_2CO_3, 0.625 µL/ml formaldehyde และ 0.2 µL/ml sodiumthiosulfate) จำนวน 2 ครั้ง

ขั้นตอนที่ 5: แช่เจล ใน 3% acetic acid นาน 5 นาที

ขั้นตอนที่ 6: แช่เจล ใน 10% EtOH นาน 10 นาที

3.4.2.2.7 บันทึกผลการทดลอง ประเมินความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอระหว่างต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM NaN_3 โดยใช้ Jaccard's genetic similarity coefficient และสร้าง phylogenetic tree ด้วย unweighted pair group method with the arithmetic averaging (UPGMA) โดยใช้ SAHN and TREE option และหาค่า similarity matrix ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.2 (Rohlf, 2000) วิเคราะห์ principle coordinate analysis (PCoA) เพื่อให้ได้ข้อมูลระยะห่างระหว่างกลุ่มเพิ่มเติมจากข้อมูลที่ได้จาก cluster analysis ประเมินความสัมพันธ์ภายในกลุ่ม dendrogram ของต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อ กลายพันธุ์ และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM NaN_3 โดยวิธีของ Mantel (1967) จากนั้นเปรียบเทียบ similarity และ cophenetic matrix ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย ISSR ด้วย matrix correspondence ของ Mantel's test

3.4.2.3 การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลายด้วยวิธีการระดับเซลล์ (cytology)

ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM NaN_3 ทั้งหมด ด้วยการนับจำนวนโครโมโซม เพื่อแยกต้นโพลีพลอยด์ออกจากดิพลอยด์ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Sharma and Sharma (1980) และ Joseph (1984)

3.4.2.3.1 ตัดปลายรากกล้วยไม้ยาว 0.5 เซนติเมตร แช่ในสารละลาย 2 mM 8-hydroxyquinoline อุณหภูมิไม่เกิน 17 ^{o}ซ นาน 3-5 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง

3.4.2.3.2 ตรึงเซลล์ด้วยการแช่ปลายรากใน Carnoy's fluid (60% ethanol (v/v), 30% chloroform (v/v), 10% acetic acid (v/v)) อุณหภูมิ 10 ^{o}ซ นาน 10 นาที

3.4.2.3.3 ย่อยปลายรากด้วย 1N HCl อุณหภูมิ 60 ^{o}ซ นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง

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

3.4.2.3.5 นำปลายรากวางบนสไลด์ที่สะอาด หยด 45% (v/v) acetic acid เพื่อป้องกันรากแห้ง เขี่ยหมวกรากออกจากส่วนปลาย ขยี้ปลายรากด้วยเข็มเขี่ย

3.4.2.3.6 หยดสีย้อม aceto-orcein 1-2 หยด วางสไลด์ไว้ในโถแก้วที่อิ่มตัวด้วย 45% (v/v) acetic acid นาน 10 นาที ปิดสไลด์ด้วย coverslip ผ่านสไลด์บนเปลวไฟนาน 2-3 วินาที

3.4.2.3.7 นับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า บันทึกภาพ

3.4.2.3.8 คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นโพลีพลอยด์ บันทึกความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยาระหว่างต้นโพลีพลอยด์และดิพลอยด์ เพื่อหาดัชนีสำหรับใช้แทนการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การก่อกลายพันธุ์ protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วยโซเดียมเอไซด์ (sodium azide; NaN_3)

ทำการก่อกลายพันธุ์ PLBs ด้วยสารก่อกลายพันธุ์โซเดียมเอไซด์ (sodium azide; NaN_3) ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 และ 4 mM นาน 1 ชั่วโมง โดยใช้ reverse osmosis water (ROW; control 1) และ NaN_3 0 mM (control 2) เป็นตำรับควบคุม (controls) จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร VW1 บันทึกผลเปอร์เซ็นต์การตายที่ 3 วัน 1 และ 2 สัปดาห์ พบว่า PLBs ที่แช่ใน NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตาย (mortality) ของ PLBs ในแต่ละช่วงเวลาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) ซึ่ง NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 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 ในขณะเดียวกันเปอร์เซ็นต์การตายในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ NaN_3 เช่นเดียวกับระยะเวลา 3 วัน ซึ่งในสัปดาห์ที่ 1 พบว่า PLBs ที่แช่ใน NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 3.0 และ 4.0 mM ทำให้ PLBs ตายมากที่สุด (100.00 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ NaN_3 ความเข้มข้น 2.0 mM (96.52 เปอร์เซ็นต์) และในสัปดาห์ที่ 2 พบว่า PLBs ที่แช่ใน NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 2.0, 3.0 และ 4.0 mM ทำให้ PLBs ตายมากที่สุด (100.00 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ NaN_3 ความเข้มข้น 1.5 mM (96.19 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตามใน ROW (control 1) ไม่พบการตายของ PLBs ในช่วง 3 วันแรก ส่วนในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ทำให้ PLBs ตายไม่เกิน 1.00 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ NaN_3 0 mM (control 2) ทำให้ PLBs ตายไม่เกิน 1.00 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่ 3 วัน จนถึงสัปดาห์ที่ 2 (ตารางที่ 4.1)

จากผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ NaN_3 ที่สูงขึ้น โดย PLBs เริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซีดเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน และเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นในช่วงสัปดาห์แรก หลังจากนั้นจึงเริ่มคงที่ในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากสัปดาห์ที่ 2 ไม่พบการตาย เพิ่มขึ้น จึงนำเปอร์เซ็นต์การตายและระดับความเข้มข้นของ NaN_3 ที่สัปดาห์ที่ 2 มาสร้างกราฟเพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้ PLBs ตาย 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{30} และ LD_{50}) ตามลำดับ

พบว่า NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM ทำให้ PLBs ตาย 30 เปอร์เซ็นต์ (LD_{30}) และ NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM ทำให้ PLBs ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) (ภาพที่ 4.1)

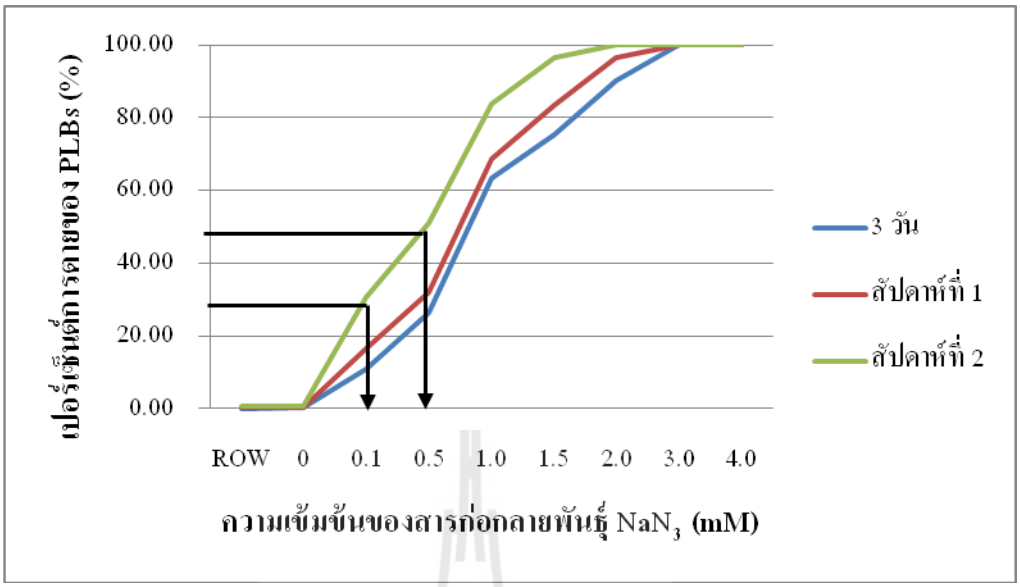
ตารางที่ 4.1 ผลของระดับความเข้มข้นของ NaN_3 ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs ที่ระยะเวลาต่างกัน

ความเข้มข้นของ NaN_3[1/]	**เปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs (%)**		
(mM)	**3 วัน**	**สัปดาห์ที่ 1**	**สัปดาห์ที่ 2**
ROW (control 1)	0.00 ± 0.00 g[2/]	0.40 ± 0.40 g	0.80 ± 0.55 f
0 (control 2)	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

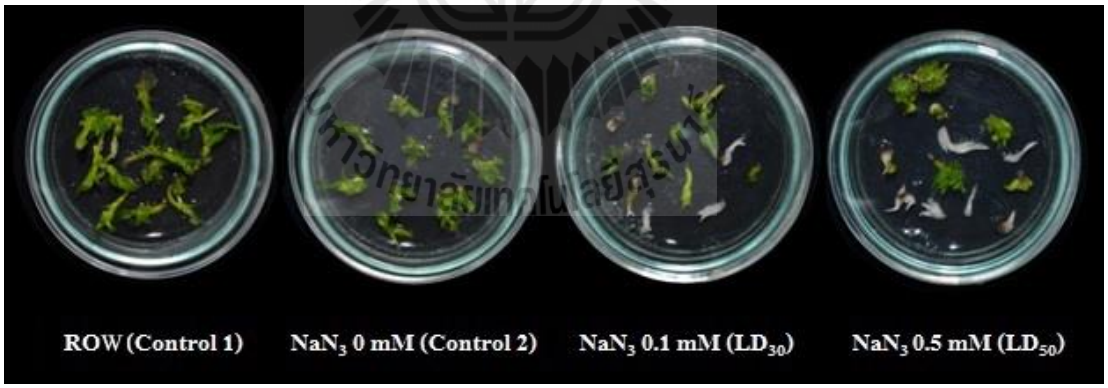
[1/] NaN_3 คือโซเดียมเอไซด์; ROW คือ น้ำปราศจากไอออน (reverse osmosis water); PLBs คือ protocorm-like bodies

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

จากการทดลองตัวอย่าง เมื่อพิจารณาลักษณะของ PLBs ใน NaN_3 ที่ให้ค่าการก่อกลายพันธุ์ที่เหมาะสม (LD_{30} และ LD_{50}) เปรียบเทียบกับ ROW (control 1) และ NaN_3 0.0 mM (control 2) ในสัปดาห์ที่ 2 พบว่า PLBs ใน ROW และ NaN_3 0.0 mM รอดชีวิตทั้งหมด (ตาย 0 เปอร์เซ็นต์) และพบว่า PLBs ใน ROW มีลักษณะการเจริญเติบโตดีกว่าใน NaN_3 0.0 mM เพียงเล็กน้อย ส่วนใน NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM และ 0.5 mM พบ PLBs ชีดตายประมาณ 30-50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม PLBs ที่รอดชีวิต มีสีเขียวเข้ม แข็งแรง พบการเพิ่มปริมาณ PLBs บ้างเล็กน้อย (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ NaN_3 และเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs ที่ระยะเวลา 3 วัน 1 และ 2 สัปดาห์; NaN_3 คือ โซเดียมเอไซด์; ROW คือ น้ำปราศจากไอออน (reverse osmosis water); PLBs คือ protocorm-like bodies



ภาพที่ 4.2 ลักษณะ protocorm-like bodies (PLBs) ที่แช่ใน ROW, 0.0, 0.1 และ 0.5 mM NaN_3 ในสัปดาห์ที่ 2; NaN_3 คือ โซเดียมเอไซด์; ROW คือ น้ำปราศจากไอออน (reverse osmosis water)

4.2 การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลาย

4.2.1 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

ทำการก่อกลายพันธุ์ PLBs ด้วยสารก่อกลายพันธุ์ NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร VW1 โดยใช้ ROW และ NaN_3 0 mM เป็น controls จนกระทั่งอายุ 6 เดือน จึงนำออกปลูกในโรงเรือน จากนั้นสุ่มต้น controls 10 ต้น โดยต้น C1-C5 มาจาก ROW และต้น C6-C10 มาจาก NaN_3 0 mM และสุ่มต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ 24 ต้น โดยต้น M1-M12 มาจาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM (LD_{30}) และต้น M13-M24 มาจาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM (LD_{50}) ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ พบว่าค่าเฉลี่ยความสูงต้นและจำนวนใบของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ตารางที่ 4.2) ซึ่งการที่ค่าเฉลี่ยความสูงต้นของต้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แม้ว่าจะมีค่าเฉลี่ยจำนวนข้อปล้องที่สูงขึ้น อาจจะเป็นผลมาจากค่าเฉลี่ยที่ลดลงของความยาวข้อปล้อง โดยพบว่าค่าเฉลี่ยความสูงทั้งต้นของต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์มีค่ามากที่สุด (2.06 ซม.) รองลงมาคือต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ความเข้มข้น 0.5 mM (1.83 ซม.) และ 0.1 mM (1.66 ซม.) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM มีจำนวนใบมากที่สุด (7.25 ใบ) รองลงมาคือต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM (6.92 ใบ) และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (6.50 ใบ) ตามลำดับ ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM มีจำนวนข้อปล้องมากที่สุด (4.75 ข้อปล้อง) โดยจำนวนข้อปล้องของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ความยาวข้อปล้อง ความกว้างใบ จำนวนราก และความยาวรากของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) นอกจากนี้ พบว่าค่าเฉลี่ยความยาวใบของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM แตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ แต่ไม่แตกต่างจากต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยลักษณะทางสัณฐาน-วิทยาทุกลักษณะของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นมีค่าน้อยกว่าต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ ยกเว้นลักษณะจำนวนข้อปล้อง และจำนวนใบ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน

การก่อกลายพันธุ์	ความสูงต้น (ซม.)[1/]	จำนวนข้อปล้อง	ความยาวข้อปล้อง (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
NaN_3[2/] 0 mM, ROW (controls)	2.06	2.60 b[3/]	0.82 a	6.50	3.16 a	0.59 a	5.60 a	2.87 a
NaN_3 0.1 mM	1.66	4.08 a	0.41 b	6.92	2.52 ab	0.50 b	3.33 b	1.43 b
NaN_3 0.5 mM	1.83	4.75 a	0.43 b	7.25	2.04 b	0.51 b	2.75 b	1.85 b

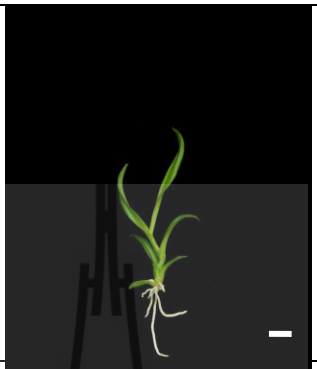
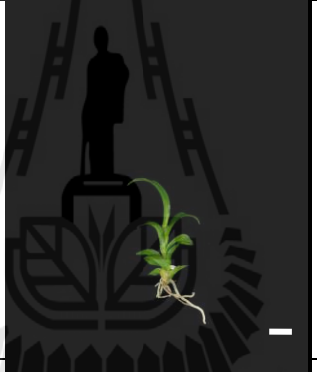
[1/] ความสูงต้น คือ ความสูงจากโคนต้นถึงปลายลำลูกกล้วย (pseudobulb); จำนวนข้อปล้อง คือจำนวนข้อปล้องของลำลูกกล้วย; ความยาวข้อปล้อง คือค่าความสูงต้น หารด้วยจำนวนข้อปล้อง; จำนวนใบ คือจำนวนใบทั้งหมด; ความยาวใบ คือความยาวจากโคนใบถึงปลายใบของใบบนสุด; ความกว้างใบ คือความกว้างใบบนสุด; จำนวนราก คือจำนวนรากทั้งหมด; ความยาวราก คือความยาวจากโคนต้นถึงปลายรากที่ยาวที่สุด

[2/] NaN_3 คือโซเดียมเอไซด์; ROW คือ น้ำปราศจากไอออน (reverse osmosis water)

[3/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์บางต้นมีลักษณะลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้น ข้อปล้องถี่ ใบสั้น ใบหนา รากมีจำนวนน้อย และรากสั้น นอกจากนี้ พบว่าต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้ง 34 ต้นมีใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวาเป็นปกติ อีกทั้งไม่พบการแตกหน่อ การทดลองครั้งนี้พบลักษณะใบหนาในต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก 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 4.3)

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน

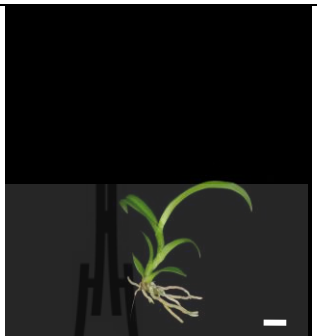
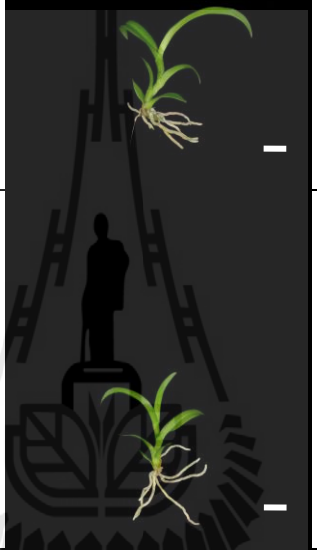
ต้น	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา [1/]
C1	control 1		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
C2	control 1		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
C3	control 1		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย

[1/] ลำต้นเตี้ย คือลำต้นที่มีความสูง 0-1.20 เซนติเมตร; ลำต้นสูง (ลักษณะปกติ) คือลำต้นที่มีความสูงมากกว่า 1.20 เซนติเมตร; ข้อปล้องสั้น คือความยาวข้อปล้อง 0-0.30 เซนติเมตร; ข้อปล้องยาว (ลักษณะปกติ) คือความยาวข้อปล้องมากกว่า 0.30 เซนติเมตร; จำนวนข้อปล้องถี่ คือมีจำนวนข้อปล้องมากกว่า 5 ข้อปล้อง; จำนวนข้อปล้องปกติ คือมีจำนวนข้อปล้อง 1-5 ข้อปล้อง; ใบสั้น คือ ใบที่มีความยาว 0-1.50 เซนติเมตร; ใบยาว (ลักษณะปกติ) คือ ใบที่มีความยาวมากกว่า 1.50 เซนติเมตร; ใบหนา คือใบที่มีลักษณะหนา แข็ง และสีเขียวเข้ม สังเกตด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน; ใบปกติ คือใบที่มีลักษะบาง ไม่แข็ง และสีเขียวปกติ; รากสั้น คือ รากที่มีความยาว 0-1.00 เซนติเมตร; รากยาว (ลักษณะปกติ) คือ รากที่มีความยาวมากกว่า 1.00 เซนติเมตร; รากมีจำนวนน้อย คือ มีราก 1-2 ราก; รากมีจำนวนมาก (ลักษณะปกติ) คือ มีรากมากกว่า 2 ราก

━ ขนาด = 1 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

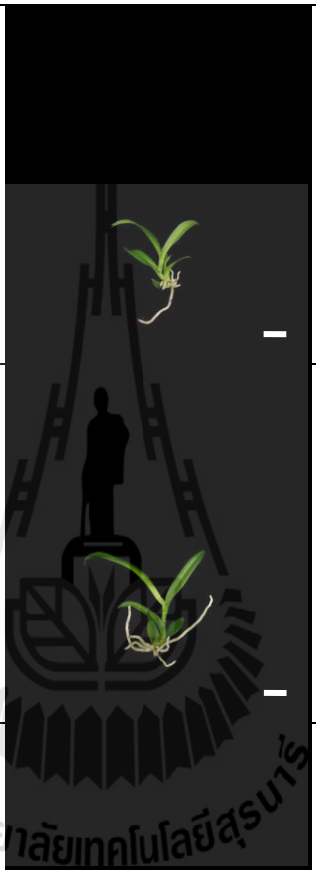
ต้น	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา [1/]
C4	control 1		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
C5	control 1		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
C6	control 1		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก

[1/] ลำต้นเตี้ย คือลำต้นที่มีความสูง 0-1.20 เซนติเมตร; ลำต้นสูง (ลักษณะปกติ) คือลำต้นที่มีความสูงมากกว่า 1.20 เซนติเมตร; ข้อปล้องสั้น คือความยาวข้อปล้อง 0-0.30 เซนติเมตร; ข้อปล้องยาว (ลักษณะปกติ) คือความยาวข้อปล้องมากกว่า 0.30 เซนติเมตร; จำนวนข้อปล้องถี่ คือมีจำนวนข้อปล้องมากกว่า 5 ข้อปล้อง; จำนวนข้อปล้องปกติ คือมีจำนวนข้อปล้อง 1-5 ข้อปล้อง; ใบสั้น คือ ใบที่มีความยาว 0-1.50 เซนติเมตร; ใบยาว (ลักษณะปกติ) คือ ใบที่มีความยาวมากกว่า 1.50 เซนติเมตร; ใบหนา คือใบที่มีลักษณะหนา แข็ง และสีเขียวเข้ม สังเกตด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน; ใบปกติ คือใบที่มีลักษณะบาง ไม่แข็ง และสีเขียวปกติ; รากสั้น คือ รากที่มีความยาว 0-1.00 เซนติเมตร; รากยาว (ลักษณะปกติ) คือ รากที่มีความยาวมากกว่า 1.00 เซนติเมตร; รากมีจำนวนน้อย คือ มีราก 1-2 ราก; รากมีจำนวนมาก (ลักษณะปกติ) คือ มีรากมากกว่า 2 ราก

━ ขนาด = 1 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

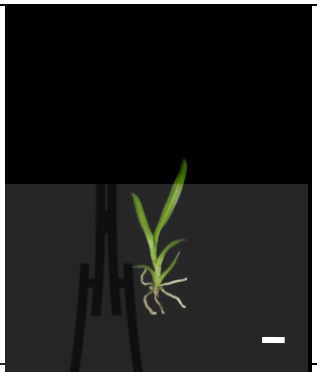
ต้น	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา [1/]
C7	control 2		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
C8	control 2		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
C9	control 2		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก

[1/] ลำต้นเตี้ย คือลำต้นที่มีความสูง 0-1.20 เซนติเมตร; ลำต้นสูง (ลักษณะปกติ) คือลำต้นที่มีความสูงมากกว่า 1.20 เซนติเมตร; ข้อปล้องสั้น คือความยาวข้อปล้อง 0-0.30 เซนติเมตร; ข้อปล้องยาว (ลักษณะปกติ) คือความยาวข้อปล้องมากกว่า 0.30 เซนติเมตร; จำนวนข้อปล้องถี่ คือมีจำนวนข้อปล้องมากกว่า 5 ข้อปล้อง; จำนวนข้อปล้องปกติ คือมีจำนวนข้อปล้อง 1-5 ข้อปล้อง; ใบสั้น คือ ใบที่มีความยาว 0-1.50 เซนติเมตร; ใบยาว (ลักษณะปกติ) คือ ใบที่มีความยาวมากกว่า 1.50 เซนติเมตร; ใบหนา คือใบที่มีลักษณะหนา แข็ง และสีเขียวเข้ม สังเกตด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน; ใบปกติ คือใบที่มีลักษะบาง ไม่แข็ง และสีเขียวปกติ; รากสั้น คือ รากที่มีความยาว 0-1.00 เซนติเมตร; รากยาว (ลักษณะปกติ) คือ รากที่มีความยาวมากกว่า 1.00 เซนติเมตร; รากมีจำนวนน้อย คือ มีราก 1-2 ราก; รากมีจำนวนมาก (ลักษณะปกติ) คือ มีรากมากกว่า 2 ราก

━ ขนาด = 1 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

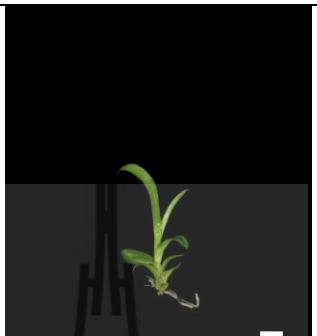
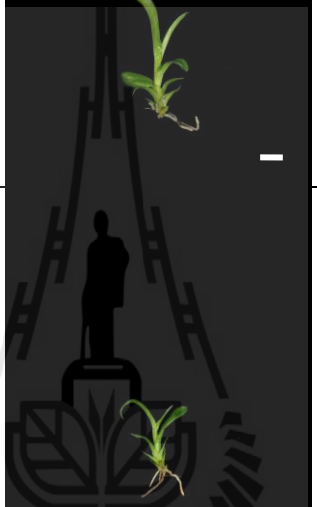
ต้น	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา [1/]
C10	control 2		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากสั้น มีจำนวนมาก
M1	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม ใบหนา การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
M2	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากสั้น มีจำนวนมาก

[1/] ลำต้นเตี้ย คือลำต้นที่มีความสูง 0-1.20 เซนติเมตร; ลำต้นสูง (ลักษณะปกติ) คือลำต้นที่มีความสูงมากกว่า 1.20 เซนติเมตร; ข้อปล้องสั้น คือความยาวข้อปล้อง 0-0.30 เซนติเมตร; ข้อปล้องยาว (ลักษณะปกติ) คือความยาวข้อปล้องมากกว่า 0.30 เซนติเมตร; จำนวนข้อปล้องถี่ คือมีจำนวนข้อปล้องมากกว่า 5 ข้อปล้อง; จำนวนข้อปล้องปกติ คือมีจำนวนข้อปล้อง 1-5 ข้อปล้อง; ใบสั้น คือ ใบที่มีความยาว 0-1.50 เซนติเมตร; ใบยาว (ลักษณะปกติ) คือ ใบที่มีความยาวมากกว่า 1.50 เซนติเมตร; ใบหนา คือใบที่มีลักษณะหนา แข็ง และสีเขียวเข้ม สังเกตด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน; ใบปกติ คือใบที่มีลักษะบาง ไม่แข็ง และสีเขียวปกติ; รากสั้น คือ รากที่มีความยาว 0-1.00 เซนติเมตร; รากยาว (ลักษณะปกติ) คือ รากที่มีความยาวมากกว่า 1.00 เซนติเมตร; รากมีจำนวนน้อย คือ มีราก 1-2 ราก; รากมีจำนวนมาก (ลักษณะปกติ) คือ มีรากมากกว่า 2 ราก

━ ขนาด = 1 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

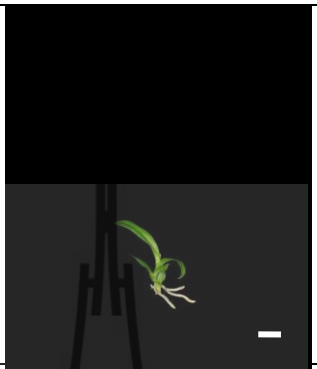
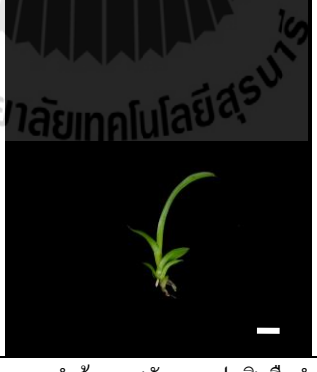
ต้น	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา [1/]
M3	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบมีสีเขียวเข้ม ใบหนา การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
M4	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
M5	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย

[1/] ลำต้นเตี้ย คือลำต้นที่มีความสูง 0-1.20 เซนติเมตร; ลำต้นสูง (ลักษณะปกติ) คือลำต้นที่มีความสูงมากกว่า 1.20 เซนติเมตร; ข้อปล้องสั้น คือความยาวข้อปล้อง 0-0.30 เซนติเมตร; ข้อปล้องยาว (ลักษณะปกติ) คือความยาวข้อปล้องมากกว่า 0.30 เซนติเมตร; จำนวนข้อปล้องถี่ คือมีจำนวนข้อปล้องมากกว่า 5 ข้อปล้อง; จำนวนข้อปล้องปกติ คือมีจำนวนข้อปล้อง 1-5 ข้อปล้อง; ใบสั้น คือ ใบที่มีความยาว 0-1.50 เซนติเมตร; ใบยาว (ลักษณะปกติ) คือ ใบที่มีความยาวมากกว่า 1.50 เซนติเมตร; ใบหนา คือใบที่มีลักษณะหนา แข็ง และสีเขียวเข้ม สังเกตด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน; ใบปกติ คือใบที่มีลักษณะบาง ไม่แข็ง และสีเขียวปกติ; รากสั้น คือ รากที่มีความยาว 0-1.00 เซนติเมตร; รากยาว (ลักษณะปกติ) คือ รากที่มีความยาวมากกว่า 1.00 เซนติเมตร; รากมีจำนวนน้อย คือ มีราก 1-2 ราก; รากมีจำนวนมาก (ลักษณะปกติ) คือ มีรากมากกว่า 2 ราก

━ ขนาด = 1 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

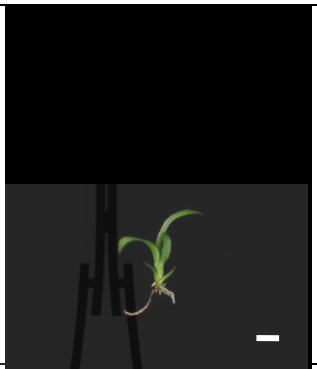
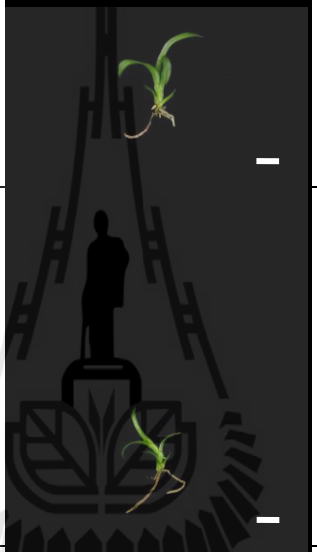
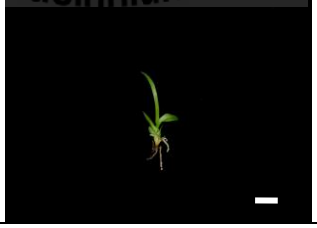
ต้น	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา [1/]
M6	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม ใบหนา การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
M7	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องสั้นและถี่ ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากสั้น มีจำนวนมาก
M8	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากสั้น มีจำนวนน้อย

[1/] ลำต้นเตี้ย คือลำต้นที่มีความสูง 0-1.20 เซนติเมตร; ลำต้นสูง (ลักษณะปกติ) คือลำต้นที่มีความสูงมากกว่า 1.20 เซนติเมตร; ข้อปล้องสั้น คือความยาวข้อปล้อง 0-0.30 เซนติเมตร; ข้อปล้องยาว (ลักษณะปกติ) คือความยาวข้อปล้องมากกว่า 0.30 เซนติเมตร; จำนวนข้อปล้องถี่ คือมีจำนวนข้อปล้องมากกว่า 5 ข้อปล้อง; จำนวนข้อปล้องปกติ คือมีจำนวนข้อปล้อง 1-5 ข้อปล้อง; ใบสั้น คือ ใบที่มีความยาว 0-1.50 เซนติเมตร; ใบยาว (ลักษณะปกติ) คือ ใบที่มีความยาวมากกว่า 1.50 เซนติเมตร; ใบหนา คือใบที่มีลักษณะหนา แข็ง และสีเขียวเข้ม สังเกตด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน; ใบปกติ คือใบที่มีลักษะบาง ไม่แข็ง และสีเขียวปกติ; รากสั้น คือ รากที่มีความยาว 0-1.00 เซนติเมตร; รากยาว (ลักษณะปกติ) คือ รากที่มีความยาวมากกว่า 1.00 เซนติเมตร; รากมีจำนวนน้อย คือ มีราก 1-2 ราก; รากมีจำนวนมาก (ลักษณะปกติ) คือ มีรากมากกว่า 2 ราก

━ ขนาด = 1 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

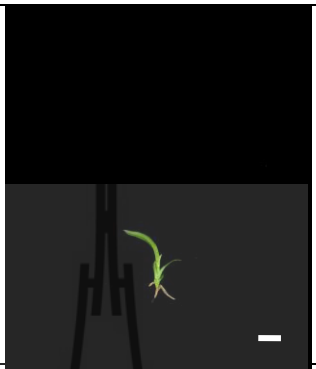
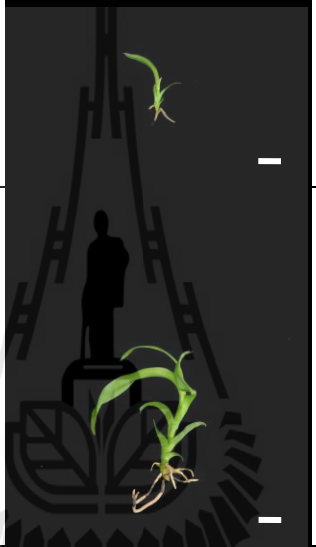
ต้น	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา [1/]
M9	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
M10	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
M11	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากสั้น มีจำนวนน้อย

[1/] ลำต้นเตี้ย คือลำต้นที่มีความสูง 0-1.20 เซนติเมตร; ลำต้นสูง (ลักษณะปกติ) คือลำต้นที่มีความสูงมากกว่า 1.20 เซนติเมตร; ข้อปล้องสั้น คือความยาวข้อปล้อง 0-0.30 เซนติเมตร; ข้อปล้องยาว (ลักษณะปกติ) คือความยาวข้อปล้องมากกว่า 0.30 เซนติเมตร; จำนวนข้อปล้องถี่ คือมีจำนวนข้อปล้องมากกว่า 5 ข้อปล้อง; จำนวนข้อปล้องปกติ คือมีจำนวนข้อปล้อง 1-5 ข้อปล้อง; ใบสั้น คือ ใบที่มีความยาว 0-1.50 เซนติเมตร; ใบยาว (ลักษณะปกติ) คือ ใบที่มีความยาวมากกว่า 1.50 เซนติเมตร; ใบหนา คือใบที่มีลักษณะหนา แข็ง และสีเขียวเข้ม สังเกตด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน; ใบปกติ คือใบที่มีลักษะบาง ไม่แข็ง และสีเขียวปกติ; รากสั้น คือ รากที่มีความยาว 0-1.00 เซนติเมตร; รากยาว (ลักษณะปกติ) คือ รากที่มีความยาวมากกว่า 1.00 เซนติเมตร; รากมีจำนวนน้อย คือ มีราก 1-2 ราก; รากมีจำนวนมาก (ลักษณะปกติ) คือ มีรากมากกว่า 2 ราก

━ ขนาด = 1 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

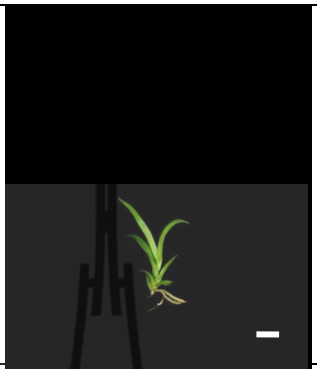
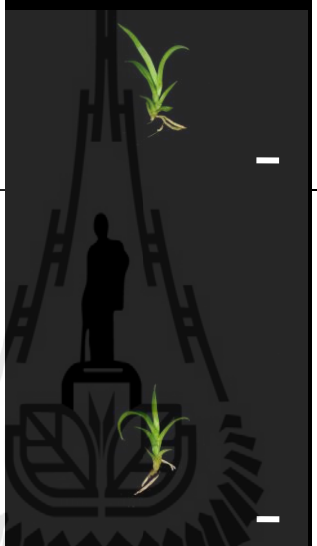
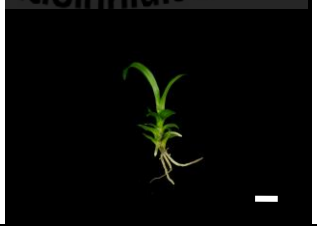
ต้น	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา [1/]
M12	NaN_3 0.1 mM		ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบสั้น ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากสั้น มีจำนวนน้อย
M13	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก
M14	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก

[1/] ลำต้นเตี้ย คือลำต้นที่มีความสูง 0-1.20 เซนติเมตร; ลำต้นสูง (ลักษณะปกติ) คือลำต้นที่มีความสูงมากกว่า 1.20 เซนติเมตร; ข้อปล้องสั้น คือความยาวข้อปล้อง 0-0.30 เซนติเมตร; ข้อปล้องยาว (ลักษณะปกติ) คือความยาวข้อปล้องมากกว่า 0.30 เซนติเมตร; จำนวนข้อปล้องถี่ คือมีจำนวนข้อปล้องมากกว่า 5 ข้อปล้อง; จำนวนข้อปล้องปกติ คือมีจำนวนข้อปล้อง 1-5 ข้อปล้อง; ใบสั้น คือ ใบที่มีความยาว 0-1.50 เซนติเมตร; ใบยาว (ลักษณะปกติ) คือ ใบที่มีความยาวมากกว่า 1.50 เซนติเมตร; ใบหนา คือใบที่มีลักษณะหนา แข็ง และสีเขียวเข้ม สังเกตด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน; ใบปกติ คือใบที่มีลักษณะบาง ไม่แข็ง และสีเขียวปกติ; รากสั้น คือ รากที่มีความยาว 0-1.00 เซนติเมตร; รากยาว (ลักษณะปกติ) คือ รากที่มีความยาวมากกว่า 1.00 เซนติเมตร; รากมีจำนวนน้อย คือ มีราก 1-2 ราก; รากมีจำนวนมาก (ลักษณะปกติ) คือ มีรากมากกว่า 2 ราก

━ ขนาด = 1 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

ต้น	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา [1/]
M15	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องสั้นและถี่ ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
M16	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องสั้นและถี่ ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
M17	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม ใบหนา การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนมาก

[1/] ลำต้นเตี้ย คือลำต้นที่มีความสูง 0-1.20 เซนติเมตร; ลำต้นสูง (ลักษณะปกติ) คือลำต้นที่มีความสูงมากกว่า 1.20 เซนติเมตร; ข้อปล้องสั้น คือความยาวข้อปล้อง 0-0.30 เซนติเมตร; ข้อปล้องยาว (ลักษณะปกติ) คือความยาวข้อปล้องมากกว่า 0.30 เซนติเมตร; จำนวนข้อปล้องถี่ คือมีจำนวนข้อปล้องมากกว่า 5 ข้อปล้อง; จำนวนข้อปล้องปกติ คือมีจำนวนข้อปล้อง 1-5 ข้อปล้อง; ใบสั้น คือ ใบที่มีความยาว 0-1.50 เซนติเมตร; ใบยาว (ลักษณะปกติ) คือ ใบที่มีความยาวมากกว่า 1.50 เซนติเมตร; ใบหนา คือใบที่มีลักษณะหนา แข็ง และสีเขียวเข้ม สังเกตด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน; ใบปกติ คือใบที่มีลักษะบาง ไม่แข็ง และสีเขียวปกติ; รากสั้น คือ รากที่มีความยาว 0-1.00 เซนติเมตร; รากยาว (ลักษณะปกติ) คือ รากที่มีความยาวมากกว่า 1.00 เซนติเมตร; รากมีจำนวนน้อย คือ มีราก 1-2 ราก; รากมีจำนวนมาก (ลักษณะปกติ) คือ มีรากมากกว่า 2 ราก

━ ขนาด = 1 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

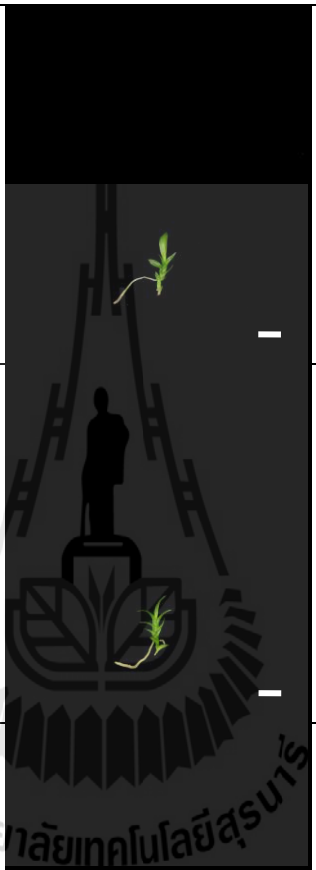
ต้น	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา [1/]
M18	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้นและถี่ ไม่พบการแตกหน่อ ใบสั้น ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
M19	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องสั้นและถี่ ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
M20	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้นและถี่ ไม่พบการแตกหน่อ ใบสั้น ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย

[1/] ลำต้นเตี้ย คือลำต้นที่มีความสูง 0-1.20 เซนติเมตร; ลำต้นสูง (ลักษณะปกติ) คือลำต้นที่มีความสูงมากกว่า 1.20 เซนติเมตร; ข้อปล้องสั้น คือความยาวข้อปล้อง 0-0.30 เซนติเมตร; ข้อปล้องยาว (ลักษณะปกติ) คือความยาวข้อปล้องมากกว่า 0.30 เซนติเมตร; จำนวนข้อปล้องถี่ คือมีจำนวนข้อปล้องมากกว่า 5 ข้อปล้อง; จำนวนข้อปล้องปกติ คือมีจำนวนข้อปล้อง 1-5 ข้อปล้อง; ใบสั้น คือ ใบที่มีความยาว 0-1.50 เซนติเมตร; ใบยาว (ลักษณะปกติ) คือ ใบที่มีความยาวมากกว่า 1.50 เซนติเมตร; ใบหนา คือใบที่มีลักษณะหนา แข็ง และสีเขียวเข้ม สังเกตด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน; ใบปกติ คือใบที่มีลักษะบาง ไม่แข็ง และสีเขียวปกติ; รากสั้น คือ รากที่มีความยาว 0-1.00 เซนติเมตร; รากยาว (ลักษณะปกติ) คือ รากที่มีความยาวมากกว่า 1.00 เซนติเมตร; รากมีจำนวนน้อย คือ มีราก 1-2 ราก; รากมีจำนวนมาก (ลักษณะปกติ) คือ มีรากมากกว่า 2 ราก

━ ขนาด = 1 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

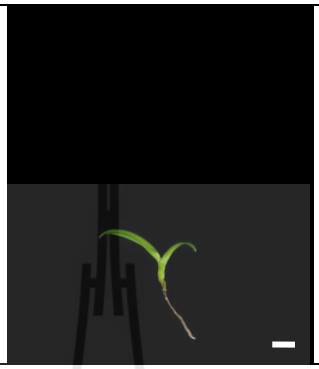
ต้น	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา [1/]
M21	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้นและถี่ ไม่พบการแตกหน่อ ใบสั้น ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
M22	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้นและถี่ ไม่พบการแตกหน่อ ใบสั้น ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย
M23	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากสั้น มีจำนวนน้อย

[1/] ลำต้นเตี้ย คือลำต้นที่มีความสูง 0-1.20 เซนติเมตร; ลำต้นสูง (ลักษณะปกติ) คือลำต้นที่มีความสูงมากกว่า 1.20 เซนติเมตร; ข้อปล้องสั้น คือความยาวข้อปล้อง 0-0.30 เซนติเมตร; ข้อปล้องยาว (ลักษณะปกติ) คือความยาวข้อปล้องมากกว่า 0.30 เซนติเมตร; จำนวนข้อปล้องถี่ คือมีจำนวนข้อปล้องมากกว่า 5 ข้อปล้อง; จำนวนข้อปล้องปกติ คือมีจำนวนข้อปล้อง 1-5 ข้อปล้อง; ใบสั้น คือ ใบที่มีความยาว 0-1.50 เซนติเมตร; ใบยาว (ลักษณะปกติ) คือ ใบที่มีความยาวมากกว่า 1.50 เซนติเมตร; ใบหนา คือใบที่มีลักษณะหนา แข็ง และสีเขียวเข้ม สังเกตด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน; ใบปกติ คือใบที่มีลักษะบาง ไม่แข็ง และสีเขียวปกติ; รากสั้น คือ รากที่มีความยาว 0-1.00 เซนติเมตร; รากยาว (ลักษณะปกติ) คือ รากที่มีความยาวมากกว่า 1.00 เซนติเมตร; รากมีจำนวนน้อย คือ มีราก 1-2 ราก; รากมีจำนวนมาก (ลักษณะปกติ) คือ มีรากมากกว่า 2 ราก

━ ขนาด = 1 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

ต้น	การก่อกลายพันธุ์	ต้นอายุ 6 เดือน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา [1/]
M24	NaN_3 0.5 mM		ลำต้นสูง ข้อปล้องยาว ไม่พบการแตกหน่อ ใบเรียวยาว ใบสีเขียวเข้ม การเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวา รากยาว มีจำนวนน้อย

[1/] ลำต้นเตี้ย คือลำต้นที่มีความสูง 0-1.20 เซนติเมตร; ลำต้นสูง (ลักษณะปกติ) คือลำต้นที่มีความสูงมากกว่า 1.20 เซนติเมตร; ข้อปล้องสั้น คือความยาวข้อปล้อง 0-0.30 เซนติเมตร; ข้อปล้องยาว (ลักษณะปกติ) คือความยาวข้อปล้องมากกว่า 0.30 เซนติเมตร; จำนวนข้อปล้องถี่ คือมีจำนวนข้อปล้องมากกว่า 5 ข้อปล้อง; จำนวนข้อปล้องปกติ คือมีจำนวนข้อปล้อง 1-5 ข้อปล้อง; ใบสั้น คือ ใบที่มีความยาว 0-1.50 เซนติเมตร; ใบยาว (ลักษณะปกติ) คือ ใบที่มีความยาวมากกว่า 1.50 เซนติเมตร; ใบหนา คือใบที่มีลักษณะหนา แข็ง และสีเขียวเข้ม สังเกตด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน; ใบปกติ คือใบที่มีลักษะบาง ไม่แข็ง และสีเขียวปกติ; รากสั้น คือ รากที่มีความยาว 0-1.00 เซนติเมตร; รากยาว (ลักษณะปกติ) คือ รากที่มีความยาวมากกว่า 1.00 เซนติเมตร; รากมีจำนวนน้อย คือ มีราก 1-2 ราก; รากมีจำนวนมาก (ลักษณะปกติ) คือ มีรากมากกว่า 2 ราก

ขนาด = 1 เซนติเมตร

เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่อายุ 6 เดือน พบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้ง 2 ความเข้มข้นบางต้นมีลักษณะแตกต่างไปจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์หลายลักษณะ เช่น ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้น ข้อปล้องถี่ ใบสั้น ใบหนา รากสั้น และรากมีจำนวนน้อย ส่วนต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ไม่พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทุกต้น ในทางตรงกันข้ามต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM และ 0.5 mM มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา 75.00 และ 100.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM มีเปอร์เซ็นต์ต้นที่ลำต้นเตี้ยมากกว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM ถึง 3 เท่า นอกจากนี้พบเปอร์เซ็นต์ต้นที่มีข้อปล้องสั้นมากกว่าประมาณ 7 เท่า เปอร์เซ็นต์ต้นที่มีใบสั้นมากกว่าประมาณ 5 เท่า และเปอร์เซ็นต์ต้นที่มีรากจำนวนน้อยมากกว่า 3.5 เท่า ในขณะที่ลักษณะข้อปล้องถี่ (33.33 เปอร์เซ็นต์) พบเฉพาะในต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM เท่านั้น อย่างไรก็ตามการทดลองครั้งนี้พบเปอร์เซ็นต์ต้นที่มีลักษณะใบหนาและรากสั้นในต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM มากกว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ด้วย NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM ถึง 3 และ 5 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลง	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง (%)[1/]		
	ต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์	ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3[2/]	
		0.1 mM	0.5 mM
ลำต้นเตี้ย	0.00	8.33	25.00
ข้อปล้องสั้น	0.00	8.33	58.33
ข้อปล้องถี่	0.00	0.00	33.33
ใบสั้น	0.00	8.33	41.67
ใบหนา	0.00	25.00	8.33
รากสั้น	0.00	41.67	8.33
รากมีจำนวนน้อย	0.00	16.67	58.33

[1/] เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง = (จำนวนต้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลง/จำนวนต้นทั้งหมด) x 100

[2/] NaN_3 คือโซเดียมเอไซด์

เมื่อพิจารณาการมี (+) หรือไม่มี (-) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2; (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลเป็นรายต้นในตารางที่ 4.5 พบว่าต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ทุกต้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา ส่วนต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยามีจำนวน 3 ต้น คือ M4, M5 และ M9 ในทางตรงกันข้ามต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM ทุกต้นพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยพบว่ามีจำนวนต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM ที่มีการเปลี่ยนแปลง 1 ลักษณะ จำนวน 7 และ 3 ต้น ตามลำดับ เปลี่ยนแปลง 2 ลักษณะ จำนวน 1 และ 5 ต้น ตามลำดับ เปลี่ยนแปลง 3 ลักษณะ จำนวน 0 และ 1 ต้น ตามลำดับ และเปลี่ยนแปลง 4 ลักษณะ จำนวน 1 และ 3 ต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 การมี (+) หรือไม่มี (-) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน

ลักษณะทางสัณฐาน-วิทยาที่เปลี่ยนแปลง	ต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์										ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 [1/]																							
											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	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
ข้อปล้องสั้น	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
ข้อปล้องถี่	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
ใบสั้น	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
ใบหนา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
รากสั้น	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
รากมีจำนวนน้อย	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+

[1/] NaN_3 คือโซเดียมเอไซด์

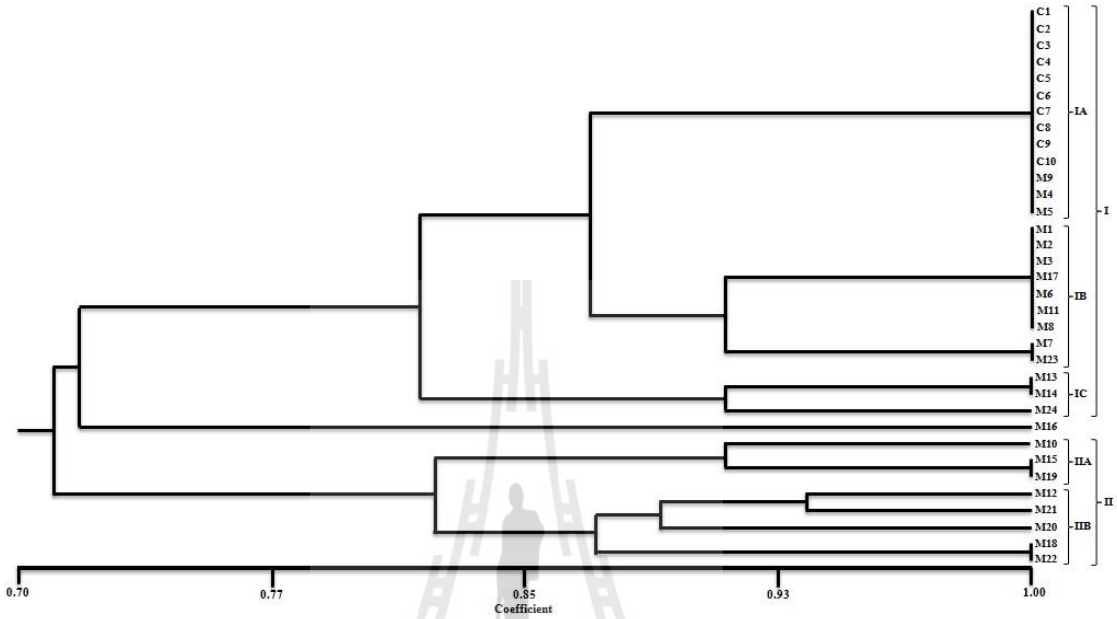
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เมื่อนำข้อมูลความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์และต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ (ตารางที่ 4.5) มาสร้าง dendrogram โดยวิธี UPGMA ทำให้สามารถจัดกลุ่มได้ชัดเจนขึ้น จากการทดสอบความสัมพันธ์ของ Mantel ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ cophenetic 0.84 (P<0.01) แสดงว่า dendrogram เป็นตัวแทนที่ดีของข้อมูลในแมท-ทริกซ์ความคล้ายคลึงกัน จาก dendrogram สามารถจัดกลุ่มต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์จำนวน 10 ต้น ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (cluster) คือกลุ่มที่ I และ II และต้นที่ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ (individual) 1 ต้น (M16) ที่ระดับความเหมือนทางพันธุกรรม 0.80 (ภาพที่ 4.3) ซึ่งกลุ่มที่ I ประกอบไปด้วยต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ทุกต้น และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ทั้งหมด 15 ต้น สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อย (subcluster) ได้ 3 กลุ่ม คือ IA, IB และ IC โดยพบว่ากลุ่มย่อย IA ประกอบด้วยต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 3 ต้น คือ M4, M5 และ M9 ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ (C1-C10) ส่วนกลุ่มย่อย IB ประกอบด้วยต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 7 ต้น (M1, M2, M3, M6, M8, M11 และ M17) ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันและคล้ายคลึงกับต้น M7 และ M23 ส่วนกลุ่มย่อย IC ประกอบด้วยต้น M13 และ M14 ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันและคล้ายคลึงกับต้น M24 ในขณะที่กลุ่มที่ II สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม คือ IIA และ IIB พบว่ากลุ่มย่อย IIA ประกอบด้วยต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 2 ต้น (M15 และ M19) ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันและคล้ายคลึงกับต้น M10 ส่วนกลุ่มย่อย IIB ประกอบด้วยต้นที่ผ่านการก่อกลาย-พันธุ์ จำนวน 5 ต้น คือ M12, M18, M20, M21 และ M22 และพบประเด็นที่น่าสนใจคือ ต้นเหล่านี้เป็นต้นที่มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา 3-4 ลักษณะ ซึ่งมาจากการก่อกลายพันธุ์ด้วย NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM จำนวน 1 และ 4 ต้น ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการกระจายตัวของต้นที่ได้จากการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM พบว่าต้นที่ได้จากทั้ง 2 ความเข้มข้นมีการกระจายตัวอยู่ในทุกกลุ่ม (ภาพที่ 4.3)

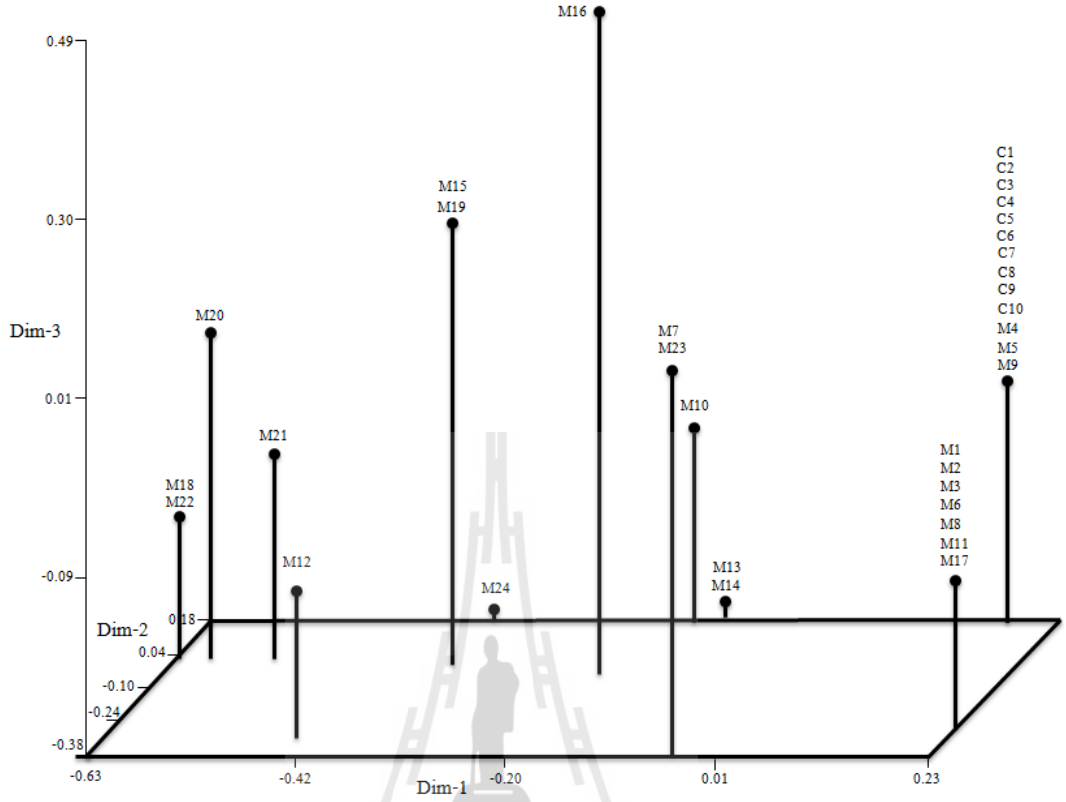
แกนทั้งสามของ PCoA อธิบายความแปรปรวน 48.79, 24.28 และ 12.46 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนทั้งหมด ตามลำดับ โดยมีผลรวม 88.40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง PCoA แบ่งความแตกต่างของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ออกจากต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์เป็น 2 กลุ่มใหญ่ เช่นเดียวกับ UPGMA cluster analysis และสามารถแสดงความแตกต่างของต้น M12, M18, M20, M21 และ M22 ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4.4)

เมื่อพิจารณาความเหมือนกันทางสัณฐานวิทยาในรูปของแมททริกซ์พบว่า Jaccard's genetic similarity coefficient ระหว่างคู่สายพันธุ์มีค่าตั้งแต่ 0.545 จนไปถึง 1.000 โดยพบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาจากต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์มากที่สุด คือ

ต้น M18, M20 และ M22 ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม 0.600 เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ รองลงมาคือ M12 (0.667) และ M21 (0.727) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)



ภาพที่ 4.3 Dendrogram ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) โดย UPGMA cluster analysis



ภาพที่ 4.4 แผนภาพ 3 มิติแสดง 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 (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10))

ตารางที่ 4.6 แมททริกซ์ความคล้ายคลึงกัน (similarity matrix) ทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น

		NaN_3 0.1 mM												NaN_3 0.5 mM											
	C1-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-C10	1.000																								
M1	0.889	1.000																							
M2	0.889	1.000	1.000																						
M3	0.889	1.000	1.000	1.000																					
M4	1.000	0.889	0.889	0.889	1.000																				
M5	1.000	0.889	0.889	0.889	1.000	1.000																			
M6	0.889	1.000	1.000	1.000	0.889	0.889	1.000																		
M7	0.800	0.909	0.909	0.909	0.800	0.800	0.909	1.000																	
M8	0.889	1.000	1.000	1.000	0.889	0.889	1.000	0.909	1.000																
M9	1.000	0.889	0.889	0.889	1.000	1.000	0.889	0.800	0.889	1.000															
M10	0.889	0.800	0.800	0.800	0.889	0.889	0.800	0.727	0.800	0.889	1.000														
M11	0.889	1.000	1.000	1.000	0.889	0.889	1.000	0.909	1.000	0.889	0.800	1.000													
M12	0.667	0.769	0.769	0.769	0.667	0.667	0.769	0.857	0.769	0.667	0.769	0.769	1.000												
M13	0.889	0.800	0.800	0.800	0.889	0.889	0.800	0.727	0.800	0.889	0.800	0.800	0.769	1.000											
M14	0.889	0.800	0.800	0.800	0.889	0.889	0.800	0.727	0.800	0.889	0/800	0.800	0.769	1.000	1.000										
M15	0.800	0.727	0.727	0.727	0.800	0.800	0.727	0.833	0.727	0.800	0.909	0.727	0.857	0.727	0.727	1.000									
M16	0.750	0.667	0.667	0.667	0.750	0.750	0.667	0.800	0.667	0.750	0.667	0.667	0.667	0.667	0.667	0.800	1.000								
M17	0.889	1.000	1.000	1.000	0.889	0.889	1.000	0.909	1.000	0.889	0.800	1.000	0.769	0.800	0.800	0.727	0.667	1.000							
M18	0.600	0.545	0.545	0.545	0.600	0.600	0.545	0.667	0.545	0.600	0.727	0.545	0.857	0.727	0.727	0.833	0.600	0.545	1.000						
M19	0.800	0.727	0.727	0.727	0.800	0.800	0.727	0.833	0.727	0.800	0.909	0.727	0.857	0.727	0.727	1.000	0.800	0.727	0.833	1.000					
M20	0.600	0.545	0.545	0.545	0.600	0.600	0.545	0.667	0.545	0.600	0.727	0.545	0.857	0.727	0.727	0.833	0.800	0.545	0.833	0.833	1.000				
M21	0.727	0.667	0.667	0.667	0.727	0.727	0.667	0.769	0.667	0.727	0.833	0.667	0.933	0.833	0.833	0.923	0.727	0.667	0.923	0.923	0.923	1.000			
M22	0.600	0.545	0.545	0.545	0.600	0.600	0.545	0.667	0.545	0.600	0.727	0.545	0.857	0.727	0.727	0.833	0.600	0.545	1.000	0.833	0.833	0.923	1.000		
M23	0.800	0.909	0.909	0.909	0.800	0.800	0.909	1.000	0.909	0.800	0.727	0.909	0.857	0.727	0.727	0.833	0.800	0.909	0.667	0.833	0.667	0.769	0.667	1.000	
M24	0.800	0.727	0.727	0.727	0.800	0.800	0.727	0.667	0.727	0.800	0.909	0.727	0.857	0.909	0.909	0.833	0.600	0.727	0.833	0.833	0.833	0.923	0.833	0.667	1.000

มหาวิทยาลัยรังสิต

หลังจากปลูกเลี้ยงต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 10 ต้น นาน 1 ปี พบว่าบางต้นตาย โดยเฉพาะต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ทั้ง 2 ความเข้มข้น ซึ่งต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์รอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ (8 ต้น จาก 10 ต้น) ส่วนต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM รอดชีวิต 66.67 และ 58.33 เปอร์เซ็นต์ (8 และ 7 ต้น จาก 12 ต้น) ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาภาพรวมของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่อายุ 1 ปี พบว่า ความสูงต้น ความยาวข้อปล้อง ความยาวใบ ความกว้างใบ จำนวนราก และความยาวราก ของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้ง 2 ความเข้มข้นแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ โดยต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ให้ค่าเฉลี่ยของทุกลักษณะดีกว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้ง 2 ความเข้มข้น ในขณะที่จำนวนข้อปล้อง และจำนวนใบ ของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้ง 2 ความเข้มข้นไม่แตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ และต้นที่ได้จากการทดลองทุกต้นมีการเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวาเป็นปกติ มีการเจริญเติบโตที่เปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด และพบลักษณะใบหนาในต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM จำนวน 3 ต้น คือ M18, M22 และ M23 นอกจากนี้ต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM พบการแตกหน่อทุกต้น ส่วนต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM พบการแตกหน่อบางต้น (M1, M3, M5, M9 และ M11) (ไม่แสดงผล)

เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้ง 2 ความเข้มข้นที่อายุ 1 ปี เปรียบเทียบกับอายุ 6 เดือน พบว่าต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์มีค่าเฉลี่ยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพิ่มขึ้นทุกลักษณะ สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมได้อย่างชัดเจน ส่วนต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM มีค่าเฉลี่ยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพิ่มขึ้นบางลักษณะ คือ ความสูงต้น ความยาวข้อปล้อง ความยาวใบ ความกว้างใบ จำนวนราก และความยาวราก ส่วนต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM มีค่าเฉลี่ยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพิ่มขึ้นบางลักษณะเช่นกัน คือ ความยาวข้อปล้อง ความยาวใบ ความกว้างใบ และจำนวนราก และพบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงลบมากที่สุด รองลงมาคือต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM (ตารางที่ 4.7)

จากผลการทดลองพบว่า ต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาทุกลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยความสูงของต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นทุกต้น ประมาณ 0.1-1.5 เซนติเมตร ยกเว้นต้น C4 มีความสูงเท่าเดิม ส่วนต้น C1 และ C3 พบจำนวนข้อปล้องเพิ่มขึ้น 1 ข้อปล้อง ความยาวข้อปล้องเพิ่มขึ้นทุกต้น ยกเว้นต้น C3, C4 และ C8 ในขณะที่ต้น C1 มีจำนวนใบเพิ่มขึ้นมากที่สุด (4 ใบ) รองลงมาคือต้น C3 และ C10 (2 ใบ) ส่วนต้นที่เหลือมี

จำนวนใบลดลง 1-2 ใบ อย่างไรก็ตามใบของต้นของที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ยาวขึ้นทุกต้น ยกเว้นต้น C8 และทุกต้นมีใบกว้างขึ้น มีการเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวาเป็นปกติ ส่วนจำนวนรากและความยาวรากเพิ่มขึ้นทุกต้น โดยต้น C9 เป็นต้นที่มีความยาวข้อปล้อง ความยาวใบ จำนวนรากและความยาวรากเพิ่มขึ้นมากที่สุด (0.64 เซนติเมตร 3.3 เซนติเมตร 22 ราก และ 3.7 เซนติเมตร ตามลำดับ)

ส่วนต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM มีลักษณะทางสัณฐาน-วิทยาส่วนใหญ่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม พบว่าความสูงเพิ่มขึ้นทุกต้น ประมาณ 0.1-1.0 เซนติเมตร ยกเว้นต้น M3, M9 และ M11 อย่างไรก็ตามจำนวนข้อปล้องลดลงทุกต้น 1-3 ข้อปล้อง เนื่องจากข้อปล้องด้านบนสุดของต้นหลุดออกไปในระหว่างการเจริญเติบโต ซึ่งมีผลกระทบโดยตรงกับจำนวนข้อปล้องที่ลดลง แต่ความยาวข้อปล้องกลับเพิ่มขึ้นทุกต้น เนื่องจากมีการเจริญเติบโต โดยต้นที่มีความยาวข้อปล้องเพิ่มมากที่สุดคือต้น M3 (0.78 เซนติเมตร) นอกจากนี้การหลุดของข้อปล้องยังมีผลกระทบทำให้จำนวนใบลดลง โดยพบว่าต้น M1 มีจำนวนใบลดลงมากที่สุด (6 ใบ) ในขณะที่ต้น M6 และ M9 มีจำนวนใบเพิ่มขึ้นเพียง 1 ใบ ส่วนต้นที่เหลือมีจำนวนใบลดลง 1-2 ใบ ซึ่งความยาวใบเพิ่มขึ้นทุกต้นประมาณ 0.3-1.3 เซนติเมตร ยกเว้นต้น M3 และ M12 ในขณะที่ใบกว้างขึ้นทุกต้น และมีการเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวาเป็นปกติ ส่วนจำนวนรากเพิ่มขึ้นทุกต้น ยกเว้นต้น M6 โดยต้น M5 มีจำนวนรากเพิ่มขึ้นมากที่สุด (15 ราก) ส่วนความยาวรากเพิ่มขึ้นประมาณ 0.2–2.5 เซนติเมตร

ในขณะที่ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมเล็กน้อย พบว่าทุกต้นมีความสูงเท่าเดิม ยกเว้นต้น M19 และ M21 มีความสูงลดลงเพียงเล็กน้อย (0.2 และ 0.5 เซนติเมตร ตามลำดับ) อีกทั้งจำนวนข้อปล้องลดลงทุกต้น 1-4 ข้อปล้อง เนื่องจากข้อปล้องด้านบนสุดของต้นหลุดออกไปในระหว่างการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM แต่ความยาวข้อปล้องเพิ่มขึ้นทุกต้น ยกเว้นต้น M19 และ M23 ในขณะเดียวกันต้น M19 และ M23 มีจำนวนใบเพิ่มขึ้น 1 ใบ ส่วนต้น M14 และ M18 มีจำนวนใบลดลง 4 ใบ ส่วนความยาวใบเพิ่มขึ้นบางต้นประมาณ 0.5–1.9 เซนติเมตร ยกเว้นต้น M19, M20 และ M22 ในขณะที่ใบกว้างขึ้นทุกต้น และมีการเรียงตัวของใบสลับซ้ายขวาเป็นปกติ ส่วนจำนวนรากเพิ่มขึ้นทุกต้น ประมาณ 2-12 ราก อย่างไรก็ตามความยาวรากลดลงบางต้น เนื่องจากรากขาดในระหว่างการเจริญเติบโต ยกเว้นต้น M14, M21 และ M23 ซึ่งต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM เหล่านี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างอย่างชัดเจนจากต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์คือ มีลักษณะต้นเตี้ย (ตารางภาคผนวกที่ 5 และรูปที่ 4.5)

ตารางที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1, M3, M5, M6, M9-M12) และ 0.5 mM (M14, M18-M23) เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1, C3-C5), 0 mM; control 2 (C7-C10)) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 1 ปี เปรียบเทียบกับอายุ 6 เดือน

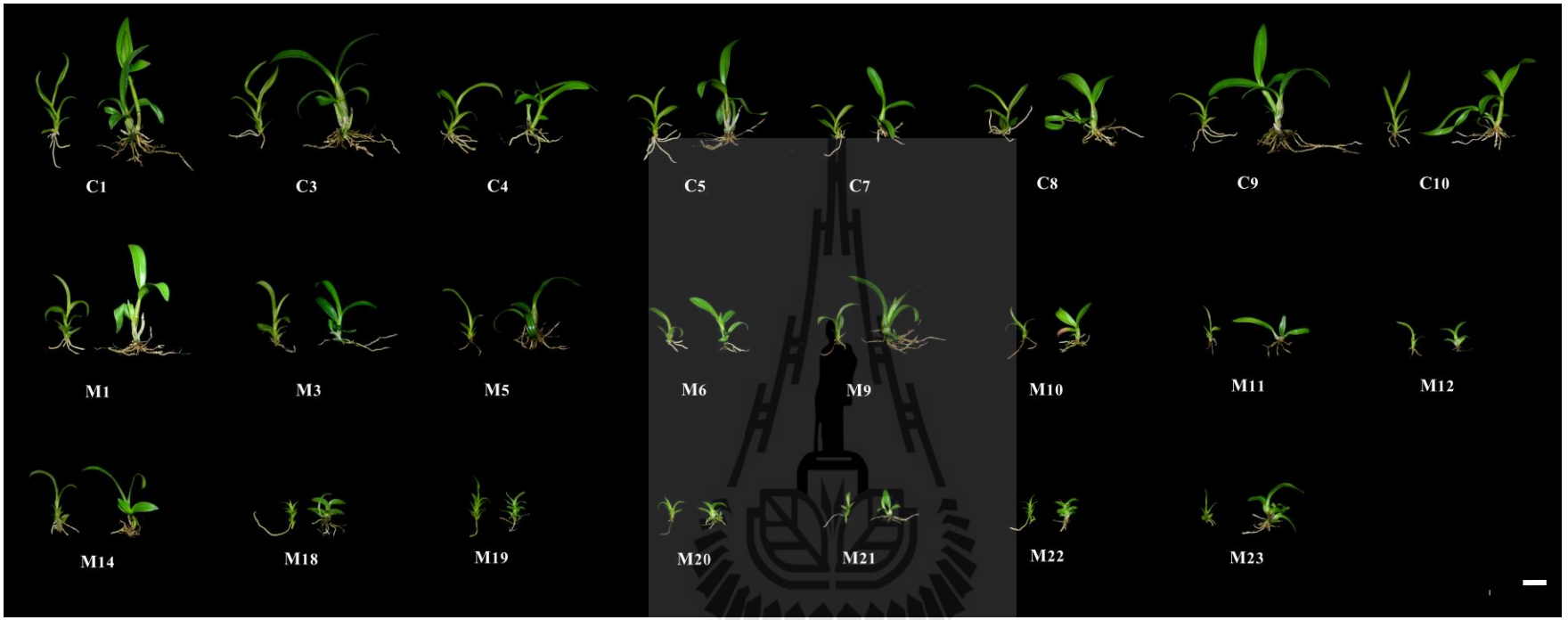
การก่อกลายพันธุ์	ความสูงต้น (ซม.)[1/]	จำนวนข้อปล้อง	ความยาวข้อปล้อง (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
NaN_3[2/] 0 mM, ROW (controls)	0.60[3/]	0.25	0.13	0.25	1.51	0.20	11.38	1.16
NaN_3 0.1 mM	0.14	-1.75	0.40	-1.38	0.70	0.20	6.25	1.01
NaN_3 0.5 mM	-0.10	-2.43	0.14	-1.29	0.63	0.20	7.00	-0.23

[1/] ความสูงต้น คือ ความสูงจากโคนต้นถึงปลายลำลูกกล้วย (pseudobulb); จำนวนข้อปล้อง คือจำนวนข้อปล้องของลำลูกกล้วย; ความยาวข้อปล้อง คือค่าความสูงต้น หารด้วยจำนวนข้อปล้อง; จำนวนใบ คือจำนวนใบทั้งหมด; ความยาวใบ คือความยาวจากโคนใบถึงปลายใบของใบบนสุด; ความกว้างใบ คือความกว้างใบบนสุด; จำนวนราก คือจำนวนรากทั้งหมด; ความยาวราก คือความยาวจากโคนต้นถึงปลายรากที่ยาวที่สุด

[2/] NaN_3 คือโซเดียมเอไซด์; ROW คือ น้ำปราศจากไอออน (reverse osmosis water)

[3/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยา ซึ่งคำนวนจาก ค่าลักษณะที่อายุ 1 ปี ลบค่าลักษณะที่อายุ 6 เดือน โดยตัวเลขที่เป็นบวก คือค่าลักษณะที่เพิ่มขึ้น และตัวเลขที่เป็นลบ คือค่าลักษณะที่ลดลง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1, M3, M5, M6, M9-M12) และ 0.5 mM (M14, M18-M23) เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1, C3-C5), 0 mM; control 2 (C7-C10)) อายุ 6 เดือน (ต้นด้านซ้าย) เปรียบเทียบกับอายุ 1 ปี (ต้นด้านขวา); ▬ ขนาด = 2.5 เซนติเมตร

4.2.2 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers)

นำต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาทำการตรวจสอบพันธุกรรมเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมาย ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 12 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ ISSR จำนวน 11 ไพรเมอร์ แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนและคงที่ (reproducible) ซึ่งให้ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ (polymorphic) จำนวน 10 ไพรเมอร์ และให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทุกสายพันธุ์ (monomorphic) จำนวน 1 ไพรเมอร์ ซึ่งมีเพียงเครื่องหมาย ISSR 834 ที่ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ไม่คงที่ จึงไม่สามารถใช้ในการประเมินในขั้นตอนต่อไปได้ (ตารางที่ 4.8) เมื่อทำการตรวจสอบต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ทั้ง 10 ต้น ด้วยเครื่องหมาย ISSR ที่ให้ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ จำนวน 10 ไพรเมอร์ พบว่ามีรูปแบบแถบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน ยกเว้นต้น C3 ซึ่งแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้โดยเครื่องหมาย ISSR 817 (ตารางที่ 4.9)

จากการวิเคราะห์เครื่องหมาย ISSR ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและคงที่ จำนวน 11 ไพรเมอร์ กับต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ จำนวน 10 ต้น (C1-C10) และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 24 ต้น (M1-M24) พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 194 แถบ ซึ่งเป็นแถบที่มีความหลากหลายจำนวน 63 แถบ คิดเป็น 32.47 เปอร์เซ็นต์ โดยจำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบมี 10-29 แถบต่อไพรเมอร์ ซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละไพรเมอร์ โดยคิดเป็นค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์เท่ากับ 17.6 แถบ ในจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0-20 แถบต่อไพรเมอร์ คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.7 แถบ โดยมีขนาดตั้งแต่ 200 bp (ISSR 835) ถึง 4,800 bp (ISSR 801) โดยพบว่า เครื่องหมาย ISSR ที่ให้ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ จำนวน 10 ไพรเมอร์ มีค่าเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายต่อไพรเมอร์เท่ากับ 6.3 แถบ และมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 34.81 เปอร์เซ็นต์ เครื่องหมาย ISSR 818 มีเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอสูงที่สุดคือ 69.0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ISSR 829 (66.7 เปอร์เซ็นต์) และ ISSR 817 (46.2 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมในการแยกความหลากหลายมากที่สุด คือ ISSR 835 (ค่า PIC=0.1090) รองลงมาคือ ISSR 807 และ 827 (ค่า PIC=0.0839) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

ไพรเมอร์ ISSR ที่ให้ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ทั้ง 10 ไพรเมอร์ สามารถแยกความแตกต่างของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ได้ จำนวน 20 ต้น จาก 24 ต้น (83.33 เปอร์เซ็นต์) ภาพที่ 4.6 แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เปลี่ยนไป ทำให้สามารถระบุได้ว่าต้นเหล่านี้มีพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป จึงได้รับการจำแนกเป็นต้นสายพันธุ์กลาย ในขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 13 ต้น คือ M2, M7, M9, M10, M11, M12, M15, M16, M17, M18, M19,

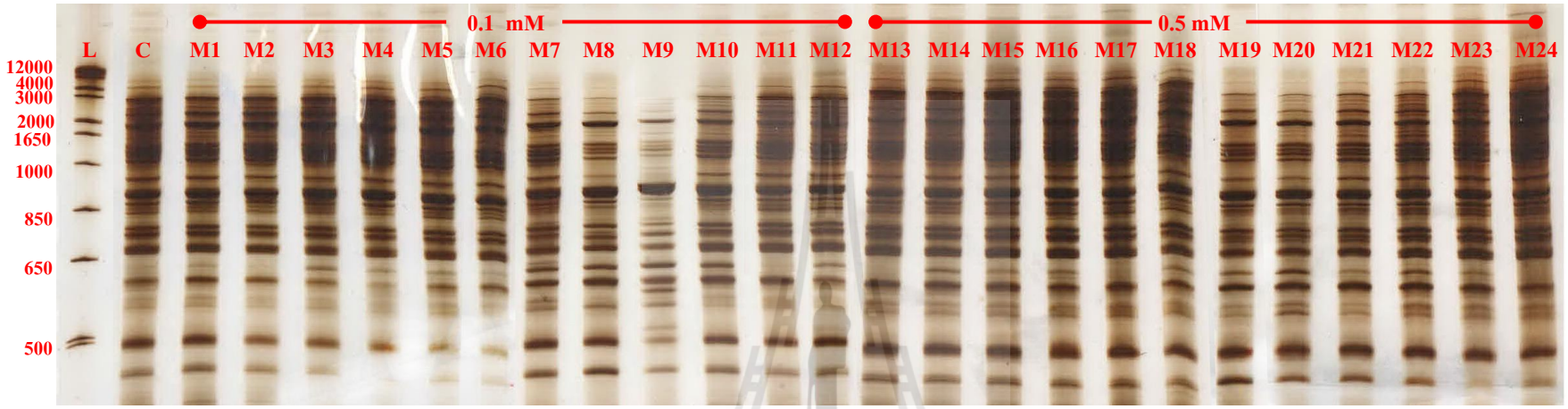
M20 และ M21 จะพบแถบดีเอ็นเอจำเพาะ (unique band) ซึ่งแตกต่างจากต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ต้นอื่น ทั้งหมด 38 แถบ โดยพบว่าต้น M2, M15, M16 และ M18 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะดังกล่าว จำนวน 1 แถบ ต้น M7, M10, M11, M12 และ M21 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะ จำนวน 2 แถบ ต้น M17 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะ จำนวน 3 แถบ ต้น M19 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะ จำนวน 4 แถบ ต้น M20 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะ จำนวน 5 แถบ และต้น M9 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะ จำนวน 6 แถบ โดยแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับจีโนไทป์ของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์เหล่านี้เพิ่มปริมาณได้จากเครื่องหมายโมเลกุล ISSR จำนวน 8 ไพรเมอร์ คือ ISSR 801, 807, 811, 817, 818, 825, 829 และ 840 (ตารางที่ 4.9 และภาพที่ 4.6)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.8 ลำดับไพรเมอร์ อุณหภูมิ annealing จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย (polymorphic) เปอร์เซ็นต์ของความหลากหลาย (polymorphism) ขนาดแถบดีเอ็นเอ และค่า polymorphic information content (PIC) ของเครื่องหมาย ISSR สำหรับวิเคราะห์ต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์	อุณหภูมิ annealing	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย	Polymorphism (%)	ขนาดแถบดีเอ็นเอ (bp)	ค่า PIC
ISSR 801	$(AT)_8T$	53	19	6	31.6	500-4,800	0.0660
ISSR 807	$(AG)_8T$	53	17	2	11.8	350-3,800	0.0839
ISSR 811	$(GA)_8C$	53	22	1	4.5	240-4,100	0.0571
ISSR 812	$(GA)_8A$	53	13	0	0.0	340-4,800	NA
ISSR 817	$(CA)_8A$	53	13	6	46.2	380-4,400	0.0744
ISSR 818	$(CA)_8G$	53	29	20	69.0	280-3,000	0.0757
ISSR 825	$(AC)_8T$	53	10	2	20.0	300-4,400	0.0571
ISSR 827	$(AC)_8G$	53	10	2	20.0	320-4,000	0.0839
ISSR 829	$(TG)_8C$	58	21	14	66.7	400-4,300	0.0686
ISSR 834	$(AG)_8YT$	58	NR	NR	NA	NA	NA
ISSR 835	$(AG)_8YC$	48	17	2	11.8	200-4,400	0.1090
ISSR 840	$(GA)_8YT$	48	23	8	34.8	220-4,100	0.0785
11 ไพร์เมอร์ที่ให้แถบชัดเจนและคงที่		รวม	194	63			
		ค่าเฉลี่ย	17.6	5.7	28.7		
10 ไพร์เมอร์ที่ให้แถบหลากหลาย		รวม	181	63			0.7542
		ค่าเฉลี่ย	18.1	6.3	31.6		0.0754

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



ภาพที่ 4.6 รูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมาย ISSR 840 ของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (C; controls (ROW, 0 mM)) เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับ 1 Kb plus DNA marker (L); โดย C คือ ต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW, 0 mM) ซึ่งมีรูปแบบแถบดีเอ็นเอเหมือนกันหมดทั้ง 10 ต้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.9 การมี (+) หรือไม่มี (-) แถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์จากไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล

ISSR	Control										ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์																							
											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} [a/]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
801_{2051}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
801_{1551}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
801_{1020}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
801_{951}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
801_{887}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
807_{1663}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
807_{951}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
811_{584}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
817_{1258}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
817_{1094}	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
817_{951}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
817_{772}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[a/] ตัวเลขก่อนตัวเลขที่ห้อย หมายถึงไพร์เมอร์ที่ใช้ในการสร้างเครื่องหมาย; ตัวเลขที่ห้อย หมายถึงขนาดแถบดีเอ็นเอบริเวณที่พบความแตกต่างในแต่ละไพรเมอร์ มีหน่วยคือ bp

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.9 การมี (+) หรือไม่มี (-) แถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์จากไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล (ต่อ)

ISSR	Control										ต้นสายพันธุ์กลาย																							
											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_{695}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
817_{626}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
818_{2711}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
818_{2528}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
818_{2358}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
818_{2277}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
818_{2199}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
818_{1663}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
818_{1446}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
818_{1056}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
818_{1020}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
818_{951}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[a/] ตัวเลขก่อนตัวเลขที่ห้อย หมายถึงไพร์เมอร์ที่ใช้ในการสร้างเครื่องหมาย; ตัวเลขที่ห้อย หมายถึงขนาดแถบดีเอ็นเอบริเวณที่พบความแตกต่างในแต่ละไพรเมอร์ มีหน่วยคือ bp

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.9 การมี (+) หรือไม่มี (-) แถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์จากไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล (ต่อ)

ISSR	Control										ต้นสายพันธุ์กลาย																							
											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
818_{887}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
818_{869}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
818_{857}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
818_{827}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
818_{799}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
818_{671}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
818_{584}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
818_{564}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
818_{544}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
818_{220}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
825_{827}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
825_{626}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

[a/] ตัวเลขก่อนตัวเลขที่ห้อย หมายถึงไพร์เมอร์ที่ใช้ในการสร้างเครื่องหมาย; ตัวเลขที่ห้อย หมายถึงขนาดแถบดีเอ็นเอบริเวณที่พบความแตกต่างในแต่ละไพรเมอร์ มีหน่วยคือ bp

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.9 การมี (+) หรือไม่มี (-) แถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์จากไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล (ต่อ)

ISSR	Control										ต้นสายพันธุ์กลาย																							
											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
827_{1020}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
827_{648}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
829_{4577}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
829_{2199}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
829_{1663}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
829_{1349}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
829_{1173}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
829_{1020}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
829_{951}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
829_{827}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
829_{745}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
829_{671}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

[a/] ตัวเลขก่อนตัวเลขที่ห้อย หมายถึงไพร์เมอร์ที่ใช้ในการสร้างเครื่องหมาย; ตัวเลขที่ห้อย หมายถึงขนาดแถบดีเอ็นเอบริเวณที่พบความแตกต่างในแต่ละไพรเมอร์ มีหน่วยคือ bp

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.9 การมี (+) หรือไม่มี (-) แถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์จากไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล (ต่อ)

ISSR	Control										ต้นสายพันธุ์กลาย																							
											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_{648}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
829_{584}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
829_{412}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
829_{398}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
835_{1606}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
835_{799}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
840_{951}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
840_{919}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
840_{799}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
840_{782}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
840_{639}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

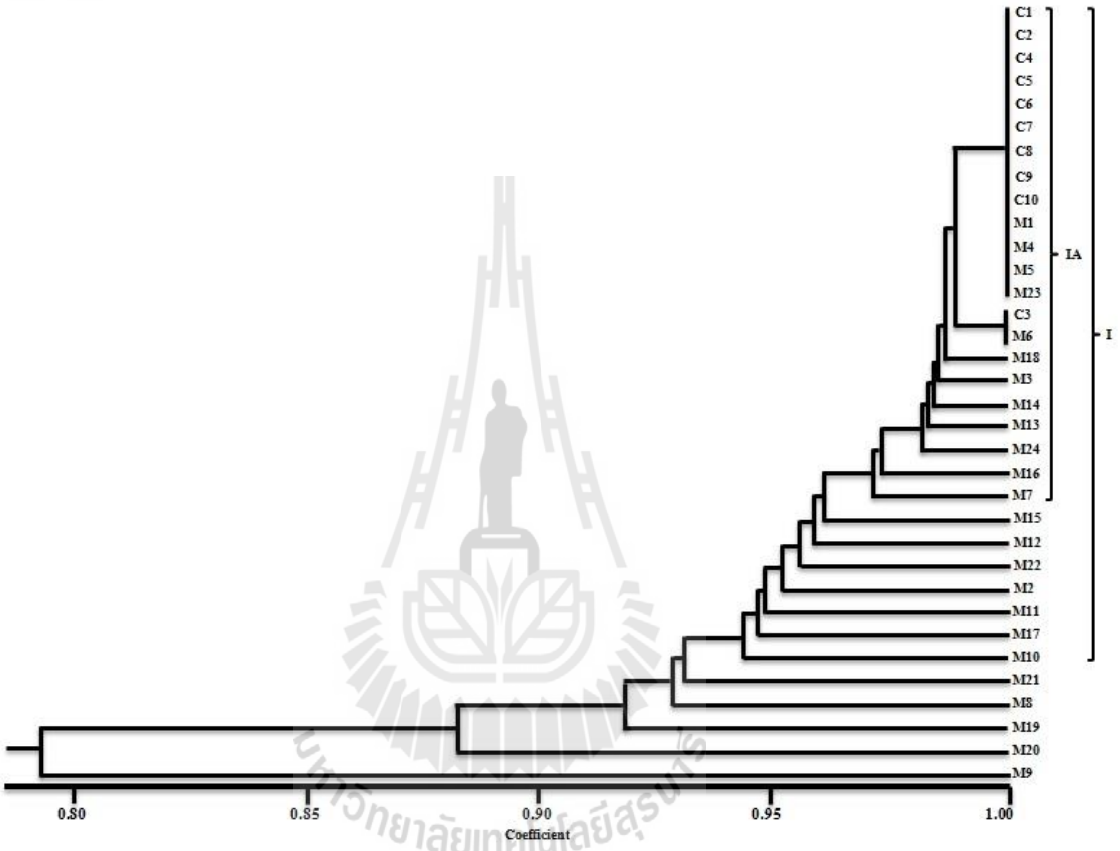
[a/] ตัวเลขก่อนตัวเลขที่ห้อย หมายถึงไพร์เมอร์ที่ใช้ในการสร้างเครื่องหมาย; ตัวเลขที่ห้อย หมายถึงขนาดแถบดีเอ็นเอบริเวณที่พบความแตกต่างในแต่ละไพรเมอร์ มีหน่วยคือ bp

เมื่อนำข้อมูลการมีแถบ (+) และไม่มีแถบ (-) ของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ตารางที่ 4.9 และภาพที่ 4.6) มาสร้าง dendrogram โดยวิธี UPGMA ส่งผลให้สามารถแยกกลุ่มความแตกต่างได้อย่างชัดเจน ซึ่งการทดสอบความสัมพันธ์ของ Mantel ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ cophenetic 0.97 (P<0.01) แสดงว่า dendrogram เป็นตัวแทนที่ดีของข้อมูลในแมททริกซ์ความคล้ายคลึงกัน ซึ่งจาก dendrogram สามารถจัดกลุ่มต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 10 ต้น ออกเป็นกลุ่มใหญ่ (cluster) 1 กลุ่ม คือ กลุ่ม I และ 5 ต้นที่มีความแตกต่างสูง (individual) ที่ระดับความเหมือนทางพันธุกรรม 0.94 (ภาพที่ 4.7) โดยพบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 4 ต้น คือ M1, M4, M5 และ M23 มีพันธุกรรมไม่แตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ส่วนใหญ่ ยกเว้นต้น C3 ซึ่งกลุ่ม I นี้สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อย (subcluster) ได้ 1 กลุ่มย่อย คือ IA ซึ่งมีความเหมือนทางพันธุกรรมมากกว่า 0.97 และอีก 7 ต้นที่มีความแตกต่างสูง (M2, M10-M12, M15, M17 และ M22) โดยกลุ่มย่อย IA ประกอบด้วยต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ทั้ง 10 ต้น และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 12 ต้น คือ M1, M3-M7, M13, M14, M16, M18, M23 และ M24 ส่วนต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่เหลือคือ M8, M9, M19, M20 และ M21 มีความแตกต่างจากต้นอื่นมากที่สุดจึงไม่สามารถจัดกลุ่มได้ (ภาพที่ 4.7) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ พบว่า NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM สามารถเหนี่ยวนำให้ลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป จำนวน 9 ต้น (M2, M3, M6-M12) จาก 12 ต้น (75.00 เปอร์เซ็นต์) และ NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM จำนวน11 ต้น (M13-M22, M24) จาก 12 ต้น (91.67 เปอร์เซ็นต์)

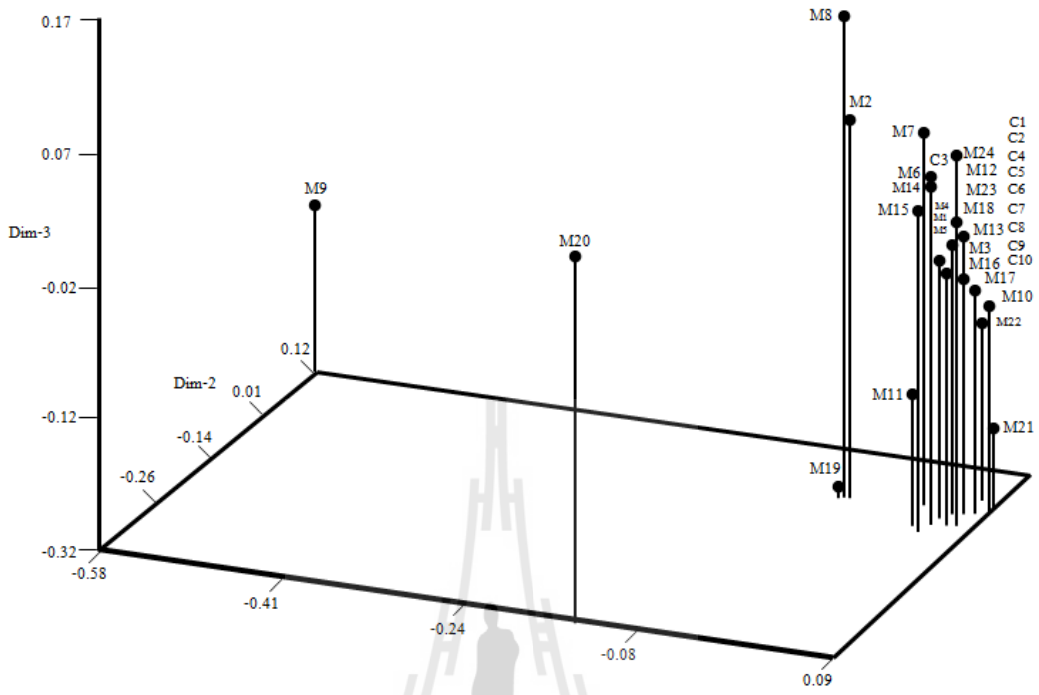
การวิเคราะห์ PCoA จากไพรเมอร์ ISSR แสดงผลเป็นภาพสามมิติ พบว่าสามารถจัดกลุ่มต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 10 ต้น ออกเป็นกลุ่มได้ไม่ค่อยชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกับการวิเคราะห์กลุ่มโดย UPGMA cluster analysis แต่สามารถแยกต้น M9 และ M20 ออกมาจากกลุ่มทั้งหมดได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4.8) แกนทั้งสามของ PCoA อธิบายความแปรปรวน 24.39, 11.25 และ 9.54 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนทั้งหมดตามลำดับ โดยมีผลรวม 45.18 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาความเหมือนกันทางพันธุกรรมในรูปของแมททริกซ์พบว่า Jaccard's genetic similarity coefficient ระหว่างคู่สายพันธุ์มีค่าตั้งแต่ 0.729 (M9 และ M21) จนไปถึง 1.0 และพบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์มากที่สุดคือต้น 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 นอกจากนี้พบว่าต้น C3 และ M6 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมภายในคู่เท่ากับ 1.000 และพบความแตกต่างเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ส่วนใหญ่ (ตารางที่ 4.10)



รูปที่ 4.7 Dendrogram ของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลจากเครื่องหมาย ISSR ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10))



รูปที่ 4.8 Principle coordinate analysis (PCoA) แบบ 3 มิติของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลจากเครื่องหมาย ISSR ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10))

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.10 แมททริกซ์ความคล้ายคลึงกัน (similarity matrix) ทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น

	Controls (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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา และความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้น เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ พบว่าต้น M4 และ M5 ไม่พบความแตกต่างทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางพันธุกรรม ในขณะที่ต้น M1 และ M23 พบความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรม ในทางตรงกันข้าม ต้น C3 และ M9 ไม่พบความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่พบความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งต้น C3 สามารถตรวจสอบพบโดยไพรเมอร์ ISSR 817 ส่วนต้น M9 สามารถตรวจสอบพบโดยไพรเมอร์ ISSR 801, 811, 817, 818, 829, 835 และ 840

ผลของการเปรียบเทียบระหว่างการจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย ISSR โดยการเปรียบเทียบ similarity และ cophenetic matrices ด้วย matrix correspondence ของ Mantel's test (Mantel, 1967) พบว่าสหสัมพันธ์ระหว่าง similarity matrices ของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย ISSR มีค่า 0.12 (P>0.05) แสดงถึงความไม่สัมพันธ์กันระหว่างเครื่องหมายทั้งสองในการกำหนดความเหมือนกันระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่ศึกษา และพบว่าค่า cophenetic correlation สำหรับ dendrogram ของเครื่องหมาย ISSR และลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่มีความสัมพันธ์กัน (r = 0.19; P>0.05) โดยพบว่าค่า goodness of fit สำหรับ cophenetic correlation ของเครื่องหมาย ISSR (0.97) มีค่าสูงกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา (0.84) สำหรับผลการทดลองนี้พบว่า เครื่องหมาย ISSR มีประสิทธิภาพสูงกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์

4.2.3 การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยวิธีการระดับเซลล์

การนับจำนวนโครโมโซมบริเวณปลายรากของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ด้วย NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM และ 0.5 mM เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ พบว่าต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ และต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ทั้ง 24 ต้น (M1-M24) มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ 2n=2x=24 (ดิพลอยด์) แสดงว่าสารก่อกลายพันธุ์ NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลในการทดลองนี้ (ตารางที่ 4.11)

ตารางที่ 4.11 จำนวนโครโมโซมของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ระหว่างต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่ได้จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) กับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10))

การก่อกลายพันธุ์	**จำนวนโครโมโซม**	**ระดับ ploidy**
NaN_3 0 mM, ROW (controls)	24	ดิพลอยด์
NaN_3 0.1 mM	24	ดิพลอยด์
NaN_3 0.5 mM	24	ดิพลอยด์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

การก่อกลายพันธุ์ protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วยโซเดียมเอไซด์ (sodium azide; NaN_3)

NaN_3 เป็นสารเคมีที่นิยมนำมาใช้ก่อกลายพันธุ์พืชหลายชนิด และสามารถก่อกลายพันธุ์ในเนื้อเยื่อพืชได้หลากหลาย อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จของการก่อกลายพันธุ์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ธรรมชาติของเนื้อเยื่อพืช (ชนิดเนื้อเยื่อ ขนาดเนื้อเยื่อ และระยะการพัฒนาของเนื้อเยื่อ) และ/หรือ ศักยภาพของสารก่อกลายพันธุ์ (ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความเข้มข้นของสาร) นอกจากนี้ ระยะเวลาในการทำการทดลองก็มีความสำคัญเป็นอย่างมาก ที่จะส่งผลต่อความสำเร็จในการก่อกลายพันธุ์ (Khan et al., 2009; Gruszka et al., 2012) ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ ที่ได้กล่าวมานั้น เป็นองค์ประกอบส่งเสริมความมีประสิทธิภาพและความเหมาะสมของการก่อกลายพันธุ์พืชชนิดต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ที่เหมาะสม มีผลต่อการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อพืช โดยการใช้สารก่อกลายพันธุ์ความเข้มข้นสูง จะส่งผลให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์สูง แต่การรอดชีวิตของเนื้อเยื่อพืชจะลดลง ในทางตรงกันข้าม การใช้สารก่อกลายพันธุ์ความเข้มข้นต่ำ ส่งผลให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์ต่ำ แต่การรอดชีวิตของเนื้อเยื่อจะสูงขึ้น ดังนั้นการใช้ความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ที่เหมาะสมจึงจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากทำให้มีจำนวนเนื้อเยื่อพืชที่รอดชีวิตในปริมาณที่เหมาะสม และมีโอกาสพบต้นกลายพันธุ์ที่ต้องการ สำหรับการทดลองนี้พบว่า ความเข้มข้นของ NaN_3 ที่เหมาะสมต่อการก่อกลายพันธุ์ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล (LD_{30} และ LD_{50}) สำหรับการแช่ PLBs ใน NaN_3 นาน 1 ชั่วโมง คือ 0.1 และ 0.5 mM ซึ่ง PLBs ที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์และรอดชีวิต จะมีลักษณะสีเขียวเข้ม แข็งแรง เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ส่วนงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า NaN_3 ความเข้มข้น 1 mM (LD_{50}) เหมาะสมสำหรับก่อกลายพันธุ์เมล็ดถั่วเขียว (Türkan et al., 2006) เช่นเดียวกันกับ Mensah และ Obadoni (2007) ซึ่งค้นพบว่า NaN_3 ความเข้มข้น 4.62 mM เหมาะสมสำหรับก่อกลายพันธุ์เมล็ดถั่วลิสง อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบการก่อกลายพันธุ์ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วย NaN_3 ในครั้งนี้กับงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าความเข้มข้นที่ทำให้ PLBs ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) คือ 0.5 mM เช่นเดียวกับการใช้ก่อกลายพันธุ์ในยอดของสับปะรดสี 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ Bromeliad (*Aechmea fasciata*) และพันธุ์ Guzmania (*Guzmania* Hilda) ซึ่งความเข้มข้นของ NaN_3 และระยะเวลาที่เหมาะสม (LD_{50}) ที่ทำให้

ยอดของสับปะรดสีรอดชีวิต 51.30 เปอร์เซ็นต์คือ 0.5 mM นาน 60 นาที (Rajib and Jagatpati, 2011; Huang, 2012) ในขณะที่เมล็ดข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) และคาร์เนชั่น (*Diathus caryophyllus* L.) ต้องใช้ NaN_3 ความเข้มข้นสูงกว่าการใช้ใน PLBs กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล (9.24 และ 107.66 mM ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NaN_3 ที่ใช้ในการก่อกลายพันธุ์ ขึ้นอยู่กับชนิดพืชและชนิดเนื้อเยื่อพืช จึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในแต่ละพืช

นอกจากนี้การรอดชีวิตของเนื้อเยื่อพืชยังขึ้นอยู่กับค่า pH ของ NaN_3 อีกด้วย จากการทดลองของ Nilan และคณะ (1973) พบว่าการใช้ NaN_3 ที่ pH ต่างกัน ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อแตกต่างกัน โดยการใช้ NaN_3 ที่ pH 3 จะพบการแตกตัวของ hydrozonic acid ในระหว่างปฏิกิริยารีดักชั่นภายในเซลล์พืชเป็นจำนวนมากกว่าการใช้ NaN_3 ที่ pH 5 ซึ่งสารดังกล่าวสามารถทำความเสียหายกับเยื่อหุ้มเซลล์พืช ส่งผลต่อการรอดชีวิตของพืชโดยตรง ดังนั้น จึงจำเป็นต้องใช้ NaN_3 ในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อพืชอีกทางหนึ่ง จากการทดลองครั้งนี้ ผู้ทำการทดลองเลือกใช้ NaN_3 ที่ pH 5 เนื่องจากได้ทำการทดลองเบื้องต้น ศึกษาเปอร์เซ็นต์การตายและลักษณะภายนอกที่สังเกตได้ของ PLBs เมื่อใช้ NaN_3 ความเข้มข้น 0 mM ที่ pH 3, 4 และ 5 นาน 1 ชั่วโมง บันทึกผลที่ระยะเวลา 3 วัน พบว่าการใช้ NaN_3 ความเข้มข้น 0 mM ที่ pH 3 และ 4 ส่งผลให้ PLBs มีสีเหลืองซีด เนื้อเยื่ออ่อนตัว พบการตายมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น pH 3 และ 4 จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดลอง ในขณะที่ pH 5 ส่งผลให้ PLBs มีสีเขียว เนื้อเยื่อคงตัวปกติ พบการตายน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น pH 5 จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดลองกับ PLBs ต่อไป

การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลาย

การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

หลังจากก่อกลายพันธุ์ PLBs กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วยสารก่อกลายพันธุ์ NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM โดยใช้ ROW และ NaN_3 0 mM เป็น controls เพาะเลี้ยงบนอาหาร VW1 ในขวดทดลอง จนกระทั่งอายุ 6 เดือน จึงนำออกปลูกในโรงเรือน จำนวน 34 ต้น พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการเช่น ความยาวข้อปล้อง ความกว้างใบ จำนวนราก และความยาวรากของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้น มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทุกลักษณะของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นให้ค่าเฉลี่ยน้อยกว่าต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลาย-พันธุ์ ยกเว้นลักษณะจำนวนข้อปล้องและจำนวนใบ โดยพบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงมากที่สุด รองลงมาคือต้นที่ผ่านการ

ก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM ส่วนต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโดยการเปลี่ยนแปลงที่มีลักษณะเด่นชัด ได้แก่ ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้น ข้อปล้องถี่ ใบสั้น ใบหนา รากสั้น และรากมีจำนวนน้อย

เมื่อพิจารณาภาพรวมของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ทั้งสองความเข้มข้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ อายุ 1 ปี จำนวน 23 ต้น พบว่าต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ให้ค่าเฉลี่ยของทุกลักษณะทางสัณฐานวิทยาดีกว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ทั้งสองความเข้มข้น ซึ่งต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์มีค่าเฉลี่ยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพิ่มขึ้นจากที่อายุ 6 เดือนทุกลักษณะ สามารถสังเกตการเจริญเติบโตได้อย่างชัดเจน รองลงมาคือต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM ในขณะเดียวกันต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM มีการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาเชิงลบมากที่สุด นอกจากนี้ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM ยังรอดชีวิตน้อยที่สุด (58.33 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (66.67 และ 80.00 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งการรอดชีวิตที่แตกต่างกันอาจจะเป็นผลมาจากสิ่งแวดล้อม และ/หรืออาจเป็นผลมาจากความเป็นพิษ (toxicity) ของสารก่อกลายพันธุ์ NaN_3

จากการทดลองครั้งนี้พบว่า การใช้ NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM (LD_{50}) สามารถเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกันหลายลักษณะได้ดีกว่า NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM (LD_{50}) แต่ในทางตรงกันข้ามกลับส่งผลกระทบทำให้การเจริญเติบโตและการอยู่รอดลดลง ดังนั้นการใช้ NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM อาจเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมมากกว่าความเข้มข้น 0.5 mM แม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจจะไม่เปลี่ยนแปลงหรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย เนื่องจากพบการรอดชีวิตสูงกว่า และต้นที่รอดชีวิตพัฒนาและเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ดีกว่า เป็นการเพิ่มโอกาสที่จะพบต้นสายพันธุ์กลายที่ดี สามารถนำไปใช้ในเชิงการค้าได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหล่านี้อาจจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม และ/หรือการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการ เช่น ข้อปล้องสั้นและถี่ ใบสั้น และรากมีจำนวนน้อย อาจจะสามารถแยกความแตกต่างของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ออกจากต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ได้และอาจจะสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากการทดลองครั้งนี้มีจำนวนต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์น้อย จึงยังไม่สามารถสรุปลักษณะที่จะใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ได้อย่างชัดเจน จำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไปโดยใช้ต้นสายพันธุ์กลายจำนวนมากขึ้น

จากการทดลองของ Kleinhofs และคณะ (1978) และ Zhang (2000) พบว่า NaN_3 สามารถส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ที่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ โดยเอไซด์ไอออน (azide ions) ของ NaN_3 สามารถยับยั้งเอนไซม์ cytochrome oxidase ใน

กระบวนการฟอสโฟริเลชั่น (phosphorylation) เพื่อยับยั้งการสังเคราะห์ ATP (adenosine tri phosphate) ภายในเซลล์พืชได้ ซึ่ง ATP เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญที่สุดในการพัฒนาและการเจริญเติบโตของเซลล์พืช ในขณะที่เซลล์พืชได้รับพลังงานน้อยลง ก็อาจจะส่งผลโดยตรงต่อการพัฒนาและการเจริญเติบโตของเซลล์พืชได้ (Al-Quariny and Khan, 2009; Srivastava et al., 2011) อีกทั้ง NaN_3 สามารถยับยั้งการทำงานของ proton pump และยังส่งผลต่อศักยภาพการทำงานของเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียอีกด้วย (Kleinhofs et al., 1978; Zhang, 2000) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า NaN_3 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา การพัฒนาและการเจริญเติบโตของพืชได้เช่นกัน

มีรายงานการใช้ NaN_3 ในพืชหลายชนิด ซึ่งงานวิจัยหลายคณะพบว่า NaN_3 สามารถส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชที่ศึกษาได้ โดยการใช้ NaN_3 ในเมล็ดฝ้าย (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR2) ความเข้มข้น 10 mM นาน 180 นาที ส่งเสริมให้รากยาวและมีจำนวนมากขึ้น (Ganesan et al., 2005) และสามารถกระตุ้นให้เกิดความผิดปกติของการแบ่งเซลล์รากในต้นอ่อนถั่วปากอ้า (broad bean; *Vicia faba* L.) ได้ (Ahmad et al., 2007) ส่วนการใช้ NaN_3 ในเมล็ดข้าวสาลี ที่ระดับความเข้มข้น 3.08, 6.16 และ 9.24 mM พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวยอด และความยาวรากลดลง ลักษณะทางพืชไร่บางประการมีการเปลี่ยนแปลงในทางที่ดีขึ้น และแย่ลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติ (Srivastava et al., 2011) นอกจากนี้มีรายงานการใช้ NaN_3 ความเข้มข้น 50 mM ในเมล็ดถั่วลิสงสายพันธุ์ Samnut 20 ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้น อีกทั้งสามารถเหนี่ยวนำให้ปริมาณโปรตีนและไขมันเพิ่มสูงขึ้น (Animasaun et al., 2014) ส่วนในคาร์เนชั่น พบว่า NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 15.38, 61.54 และ 107.66 mM มีผลต่อพฤติกรรมการงอกของเมล็ด อัตราการตาย ความเป็นหมันของเกสร และลักษณะทางสัณฐานวิทยาทางการเกษตร (Roychowdhury and Tah, 2011) ในขณะที่ El-Mokadem และ Mostafa (2014) พบว่าการใช้ NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 3.7, 6.15, 9.2 และ 12.3 mM รดลงบนดิน ที่ปลูกบลูเบล (bluebells; *Browallia speciosa*) ส่งผลให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมเช่นเดียวกัน ซึ่ง NaN_3 ความเข้มข้นสูงที่สุด (12.3 mM) มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของกิ่งและใบ ปริมาณคลอโรฟิลล์ น้ำหนักสดของยอดและราก น้ำหนักแห้งของยอดและราก และความยาวราก อีกทั้งทุกความเข้มข้นสามารถเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงของสีดอก รูปร่างดอก และรูปร่างใบได้อีกด้วย ในขณะเดียวกันการใช้ NaN_3 กับแคลลัสของสับปะรดสี 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ Bromeliad และพันธุ์ Guzmania สามารถทำให้ตาและยอดของสับปะรดมีจำนวนเพิ่มขึ้นอีกทั้งสามารถเหนี่ยวนำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (Rajib and Jagatpati, 2011; Huang, 2012) จากรายงานการวิจัยดังที่กล่าวมานี้แสดงให้เห็นว่า NaN_3 เป็นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการ

ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ สามารถเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้หลายลักษณะ และเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชในปัจจุบัน

การวิเคราะห์ dendrogram และลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มและแยกความแตกต่างของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน สามารถจัดกลุ่มและแยกความแตกต่างได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (I และ II) และ 1 ต้น (M16) ที่มีความแตกต่างสูง ซึ่งในแต่ละกลุ่มใหญ่ก็ยังสามารถจัดกลุ่มและแยกความแตกต่างเป็นกลุ่มย่อยได้เช่นกัน ในขณะที่ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่มีความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์มากที่สุด คือ M18, M20 และ M22 ในทำนองเดียวกัน PCoA สามารถแยกความแตกต่างของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ได้เช่นเดียวกับ dendrogram จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า NaN_3 มีประสิทธิภาพในการก่อให้เกิดเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาได้อย่างชัดเจน ซึ่งอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับกล้วยไม้สายพันธุ์อื่นได้

การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers)

การคัดเลือกและตรวจสอบต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นและต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ด้วยเครื่องหมาย inter-simple sequence repeats (ISSR) พบว่าเครื่องหมาย ISSR แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนและคงที่ (reproducible) ให้ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ (polymorphic) ได้ จากการทดลองในครั้งนี้พบว่า ไพร์เมอร์ ISSR 817 สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้น C3 ออกจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่เหลือ (controls) ได้ ซึ่งอาจเป็นผลจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจากความแปรปรวนแบบโซมาโคนอล (somaclonal variation) ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระหว่างทำการทดลอง จำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป โดยความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจเกิดจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของเนื้อเยื่อพืช ชิ้นส่วนพืช (explants) ที่ใช้ในการทดลอง องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยง ระยะเวลาระหว่างการเพาะเลี้ยง และวิธีการเพาะเลี้ยง ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอได้ (Leva et al., 2012) ซึ่งการทดลองครั้งนี้พบต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่มีพันธุกรรมต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 20 ต้น จาก 24 ต้น คิดเป็น 83.33 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ต้นที่เหลืออีก 4 ต้น ไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างได้ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ในการตรวจสอบ ไม่ครอบคลุมตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของกล้วยไม้เหล่านี้ หรือต้นดังกล่าวมีพันธุกรรมคงเดิม ไม่เกิดการกลายพันธุ์ จากผลการทดลองบ่งบอกความมีประสิทธิภาพของ NaN_3 ในการชักนำการกลายพันธุ์ อีกทั้งเป็นข้อบ่งชี้ได้ว่าเครื่องหมาย ISSR ที่ให้ความหลากหลายของ

แถบดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ ทั้ง 10 ไพรเมอร์ มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมที่เกิดจากการก่อกลายพันธุ์ออกจากต้นที่ไม่ได้ก่อกลายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน

เมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (มีแถบเพิ่มขึ้นหรือลดลง) ของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ทั้ง 20 ต้น พบว่าอาจจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอที่เกิดจากการก่อกลายพันธุ์ในระหว่างการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ทั้งนี้ก่อนทำการทดลอง ควรจะพิจารณาความเหมาะสมของชนิดและลำดับเบสของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมให้เหมาะสมกับชนิดของพืช ในขณะที่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลถูกเหนี่ยวนำด้วย NaN_3 อาจจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่น การแทนที่คู่เบส (point mutation) การขัดขวางการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ส่งผลทำให้ดีเอ็นเอขาดหาย (deletion) ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ (duplication) ดีเอ็นเอขาดหายแล้วต่อกลับเข้ามาใหม่แบบกลับทิศทาง (inversion) หรือดีเอ็นเอขาดหายแต่ไปต่อกับดีเอ็นเอส่วนอื่น (translocation) (Wannajindaporn et al., 2014) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้อาจส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมการเกาะตัวของไพรเมอร์ในบริเวณยึดเกาะ (binding site) ได้

นอกจากนี้มีรายงานว่า NaN_3 มีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดความผิดปกติบนโครโมโซม (Klasterskii et al., 1976) และสามารถเปลี่ยนแปลงลำดับเบสได้ (Al-Qurainy and Khan, 2009) จากการทดลองหลายคณะพบว่าเอนไซม์ O-acetylserine sulfhydrylase สามารถเร่งปฏิกิริยาการจับกันระหว่างอะตอมของเอไซด์ (N^-_3) หรือซัลไฟด์ (sulfide; S^-_2) กับ O-acetylserine เพื่อผลิตสาร L-azidoalanine (N_3-CH_2-$CH(NH_2)$-COOH) หรือ L-cysteine ขึ้นมาภายในเซลล์ ซึ่งสารดังกล่าวมีโครงสร้างคล้ายกับกรดอะมิโน และสารนี้สามารถเหนี่ยวนำก่อให้เกิดการการกลายพันธุ์แบบ point mutation ระหว่างการจำลองดีเอ็นเอได้ (Kredich, 1971; La and Mongold, 1987; Owais and Kleinhofs, 1988) โดยการกลายพันธุ์แบบ point mutation หรือการแทนที่คู่เบส (base pair substitution) ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย NaN_3 เป็นการเปลี่ยนแปลงโดยมีการแทนที่เบสเดิมด้วยเบสต่างกลุ่ม เรียกว่าทรานสเวอร์ชั่น (transversion) เช่นเบสพิวรีนถูกแทนที่ด้วยเบสไพริมิดีน หรือเบสไพริมิดีนถูกแทนที่ด้วยเบสพิวรีน (A/G $\rightleftharpoons$ T/C) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้อาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโน และอาจจะเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนได้ (Al-Qurainy and Khan, 2009) ในขณะเดียวกันการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว อาจส่งผลให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน เมื่อตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย ISSR

มีรายงานการใช้เครื่องหมาย ISSR เพื่อแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิด เช่น ผักกาดขาว (*Brassica rapa*) สายพันธุ์ย่อย yellow sarson และกล้วยไม้ดิน *A. formosanus* (Zhang et al., 2010; Kumar et al., 2011) นอกจากนี้เครื่องหมาย ISSR ยังมีประโยชน์ด้านอื่น เช่น สามารถใช้กำหนดเอกลักษณ์ของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ และการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ได้ การทดลองครั้งนี้เป็นรายงานแรกที่แสดงให้เห็นว่า NaN_3 มีความสามารถและ

ประสิทธิภาพสูงในการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์กับ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมได้โดยการใช้เครื่องหมาย ISSR ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคต

การวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis และ PCoA สามารถจัดกลุ่มและแยกความแตกต่างของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน และพบว่าเครื่องหมาย ISSR มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลายมากกว่าลักษณะทางสัณฐาน-วิทยา เนื่องจากสามารถจำแนกต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ได้ดีกว่า อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 บางต้นมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป แต่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรม เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย ISSR ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากความเป็นพิษของสารก่อกลายพันธุ์ NaN_3 และ/หรืออาจเป็นผลมาจากสิ่งแวดล้อม ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังกล่าว ในทางตรงกันข้าม ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 บางต้นสามารถพบความแตกต่างทางพันธุกรรมเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย ISSR แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ไม่ใช่ยีน หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงในยีนที่ควบคุมลักษณะอื่นที่ไม่ได้ศึกษาในการทดลองนี้ จำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป สำหรับต้น C3 ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง 1 แถบโดยใช้ไพร์เมอร์ ISSR 817 อาจจะเป็นผลจากความแปรปรวนแบบโซมาโคนอลในขณะที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ผลของการเปรียบเทียบการจัดกลุ่มระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย ISSR พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย ISSR ไม่มีความสัมพันธ์กัน ($r = 0.19$) ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากความหลากหลายในระดับโมเลกุล ซึ่งมีความเป็นกลาง อาจไม่สะท้อนความหลากหลายในระดับสัณฐานวิทยา (Karhu et al., 1996; Tar'an et al., 2005) นอกจากนี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการประเมินในการทดลองครั้งนี้ มีเพียง 7 ลักษณะเท่านั้น ซึ่งข้อมูลที่นำมาประเมินอาจจะไม่เพียงพอที่จะสะท้อนความแปรปรวนทางพันธุกรรมจริงของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ได้ (Tantasawat et al., 2010) มีรายงานความไม่สัมพันธ์กันของการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย RAPD เพื่อแยกความแตกต่างของถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata* L. Walp) (Nkongolo, 2003) และความไม่สัมพันธ์กันของการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย SSR และ ISSR เพื่อแยกความแตกต่างของถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) (Tantasawat et al., 2010)

การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยวิธีการระดับเซลล์

การคัดเลือกและตรวจสอบต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นและต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีการระดับเซลล์ พบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้ง

สองความเข้มข้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์มีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 24 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลเหล่านี้ อย่างไรก็ตาม ควรมีการทดลองเพิ่มเติมต่อไปในอนาคตกับต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จำนวนมากขึ้น

การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซมส่วนมากเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและจำนวนโครโมโซม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงจะครอบคลุมมากกว่า 1 ยีนเสมอ โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโครโมโซมมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่จำเพาะ คือ การขาดหายของชิ้นส่วน การเพิ่มขึ้นของชิ้นส่วน การขาดและต่อกลับของชิ้นส่วน และการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และคณะ, 2554; วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, 2554; Russell, 1999) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมเป็นการเปลี่ยนแปลงจำนวนทั้งชุดและเปลี่ยนแปลงบางแท่ง (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และคณะ, 2554) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว จะส่งผลต่อการพัฒนาและการเจริญเติบโตของเซลล์พืชได้ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า NaN_3 สามารถเหนี่ยวนำพฤติกรรมบางลักษณะของโครโมโซมให้เปลี่ยนแปลงไปจากพฤติกรรมเดิม เพื่อก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ เช่น โครโมโซมเคลื่อนไปสู่ขั้วเซลล์ช้ากว่าปกติ ก่อให้เกิดโครโมโซมที่มีโครงสร้างคล้ายสะพาน ซึ่งกระบวนการดังกล่าวสามารถเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์แบบ point mutation ในระหว่างการจำลองดีเอ็นเอได้ (Klasterskii et al., 1976) ในขณะที่การใช้ NaN_3 เพื่อก่อกลายพันธุ์ในข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) สามารถลดความถี่ของการเคลื่อนที่ของโครมาติด (chromatid) ในระยะ metaphase ของเซลล์ปลายราก ส่งผลต่อพัฒนาการของโครโมโซมโดยตรง (Veleminsky et al., 1977) และสามารถทำความเสียหายให้กับโครโมโซมของข้าวบาร์เลย์ได้เช่นกัน (Pearson et al., 1975)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

การก่อกลายพันธุ์ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วย NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs ในแต่ละช่วงเวลาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ NaN_3 และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NaN_3 ในการก่อกลายพันธุ์ของ PLBs กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล นาน 1 ชั่วโมง คือ 0.1 และ 0.5 mM (LD_{30} และ LD_{50}) ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมีที่ใช้ในการก่อกลายพันธุ์ขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดเนื้อเยื่อพืช และระยะเวลาระหว่างทำการก่อกลายพันธุ์

เมื่อต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน จึงนำออกปลูกในโรงเรือน ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าความสูงต้นและจำนวนใบของต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ ในทางตรงกันข้ามลักษณะทางสัณฐานวิทยาลักษณะอื่น คือ ความยาวข้อปล้อง ความกว้างใบ จำนวนราก และความยาวราก ของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้น แตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนใหญ่ของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้น มีค่าน้อยกว่าต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จากการทดลองครั้งนี้ พบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีลักษณะทางสัณฐานที่เปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ ลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้น ข้อปล้องถี่ ใบสั้น ใบหนา รากมีจำนวนน้อย และรากสั้น และเมื่อต้นอายุ 1 ปี พบว่าต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ให้ค่าเฉลี่ยของทุกลักษณะทางสัณฐานวิทยาดีกว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ทั้งสองความเข้มข้น ส่วนต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM มีการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาเชิงลบมากที่สุด และรอดชีวิตน้อยที่สุด (58.33 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ ต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (66.67 และ 80.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) โดย NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mM สามารถเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกันหลายลักษณะได้ดีกว่า NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM แต่ส่งผลกระทบทำให้การเจริญเติบโตและการอยู่รอดลดลง ดังนั้น NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 mM อาจจะเป็น

ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการก่อกลายพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลมากกว่า NaN_3 ความเข้มข้น 0.5 mMเนื่องจากพบการรอดชีวิตมากกว่า และต้นที่รอดชีวิตอาจจะพัฒนาและเจริญเติบโตเป็นต้นกล้วยไม้ที่สมบูรณ์ได้ดีกว่า จากการทดลองพบว่า NaN_3 เป็นสารเคมีที่มีศักยภาพในการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา การพัฒนาและการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล

เครื่องหมาย ISSR มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้น ออกจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ได้ เนื่องจากมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอชัดเจนและคงที่ (reproducible) และให้ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ (polymorphic) โดยเครื่องหมาย ISSR ที่ให้ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ จำนวน 10 ไพรเมอร์ สามารถตรวจพบต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ซึ่งมีพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม 83.33 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไพร์เมอร์ ISSR 817 สามารถตรวจพบความแตกต่างทางพันธุกรรมที่อาจจะเป็นผลมาจากความแปรปรวนแบบโซมาโคนอลได้ ในขณะเดียวกันเครื่องหมาย ISSR มีประสิทธิภาพสามารถระบุเอกลักษณ์ของต้นสายพันธุ์กลายได้ พบต้นสายพันธุ์-กลายที่มีลักษณะพันธุกรรมเปลี่ยนไปเด่นชัดคือ ต้น M9 ในขณะที่การวิเคราะห์ dendrogram โดยวิธี UPGMA และ PCoA ของลักษณะทางพันธุกรรม เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ สามารถจัดกลุ่มและแยกความแตกต่างของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นส่วนใหญ่ ออกจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน และยังสามารถจัดกลุ่มและจำแนกต้นที่มีความแตกต่างสูงได้อีกด้วย นอกจากนี้พบว่าเครื่องหมาย ISSR มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบต้นสาย-พันธุ์กลายมากกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลายด้วยวิธีการระดับเซลล์ เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ แต่ในการทดลองครั้งนี้พบว่า NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล เนื่องจากพบจำนวนโครโมโซมเท่ากันทุกต้น ($2n = 2x = 24$) อย่างไรก็ตาม ควรมีการทดลองเพิ่มเติมต่อไปในอนาคตกับต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จำนวนมากขึ้น เพื่อผลการทดลองที่แม่นยำยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตามกล้วยไม้ที่ได้จากการทดลองมีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาและพันธุกรรม ซึ่งจะสามารถประเมินลักษณะดอก และลักษณะทางสัณฐานวิทยาลักษณะอื่นได้ในอนาคต และอาจได้ต้นสายพันธุ์กลายที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า หรือเป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคต ในขณะเดียวกันความรู้ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ นับเป็นองค์ความรู้ในการก่อกลายพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล เป็นการพัฒนาความรู้แบบองค์รวม สามารถนำความรู้ที่ได้มาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้หรือพืชชนิดอื่นได้ อีกทั้งยังเป็นการพัฒนาสายพันธุ์กล้วยไม้ให้มีความหลายหลาย มีคุณภาพ และ

สามารถนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ และเป็นการเพิ่มศักยภาพการผลิตกล้วยไม้ของเกษตรกรไทย เพื่อรับมือกับการแข่งขันทางการตลาดในระดับภายในประเทศและระหว่างประเทศได้อีกทางหนึ่ง

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. (2557). ระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านการเกษตร. [ออนไลน์, 9 สิงหาคม 2558]. ได้จาก: http://production.doae.go.th.

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์. (2555). **กล้วยไม้ เทคโนโลยีและการประยุกต์การใช้งาน.** โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. อุบลราชธานี. 252 หน้า.

คณะกรรมการกล้วยไม้แห่งชาติ. (2557). **ยุทธศาสตร์การแข่งขันกล้วยไม้ไทยในตลาดโลก พ.ศ. 2554-2559.** กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 87 หน้า.

จินดา เดชบุญ. (2555). การชักนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* โดยการใช้สารโคลชิซินและรังสีแกมมาในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ระดับมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ทิพวัลย์ อยู่ชา, ฉัฐพร คุ้นวงศ์ และจุลภาค คุ้นวงศ์. (2549). การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าโดยการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทิลไลท์.

ธัญญา ขำเลิศ. (2532). ผลของรังสีแกมมาที่มีต่อเนื้อเยื่อบุกที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ระดับมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล และสมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช. (2554). **ชีววิทยา 3**. มูลนิธิ สอวน. กรุงเทพฯ. 145 หน้า.

ปริญญา ขจัดพาล. (2552). ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับศักยภาพการให้ผลผลิตและการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะความต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ระดับดุษฎีบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง. (2550). **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 372 หน้า.

มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (2551). การส่งออกกล้วยไม้. [ออนไลน์, 9 สิงหาคม 2558]. ได้จาก http://std.kku.ac.th/ 4530802136/export.html

รัชนี เพ็ชร์ช้าง. (2553). ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการให้โคลซิซินต่อการเจริญและจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้เอื้องเงิน. **ว วิทย์ เทคโน มมส.** 29: 413-419.

รุ่งนภา แก้วทองราช. (2548). การชักนำกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ ‘เอียสกุล’ ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. **ว.วิทย์.กษ.** 39: 108-111.

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. (2554). **พันธุศาสตร์.** โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 250 หน้า.

วิกิพีเดีย. (2557). กล้วยไม้ในประเทศไทย. [ออนไลน์, 9 สิงหาคม 2558]. ได้จาก https://th.wikipedia.org/wiki/กล้วยไม้ในประเทศไทย.

วิยดา เทพหัตถี, ศศิวิมล แสวงผล, เชฏฐ์ สาทรกิจ และทยา เจนจิตติกุล. (2546). สารานุกรมผลิตผลและผลิตภัณฑ์จากพืชในซุปเปอร์มาร์เก็ต ฉบับคอมพิวเตอร์. [ออนไลน์, 9 สิงหาคม 2558]. ได้จาก: http://www.sc.mahidol.ac.th/wiki.

ศิริญญา ม่วงสอน และสมปอง เตชะโต. (2551). การชักนำการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้เหลืองจันทร-บูรณ์ด้วย EMS. **ว.วิทย์.กษ.** 39: 239-242.

สลิล สิทธิสัจธรรม และนฤมล กฤษณชาญดี. (2550). **คู่มือกล้วยไม้**. สำนักพิมพ์สารคดี. กรุงเทพฯ. 248 หน้า.

สลิล สิทธิสัจธรรม. (2550). **คู่มือกล้วยไม้ 2**. สำนักพิมพ์สารคดี. กรุงเทพฯ

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2557). สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2557 [ออนไลน์, 9 สิงหาคม 2558]. ได้จาก http://www.oae.go.th/download/journal/trends_FEB2557.pdf

อรวรรณ ชัยกาพลเลิศ. (2557). **สินค้ากล้วยไม้. สำนักพัฒนาการค้าและธุรกิจการเกษตรและอุตสาหกรรม กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ**. กรุงเทพฯ. 5 หน้า.

อรุณีย์ วงศ์ปิยะสถิตย์. (2554). หลักการและวิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี. **ในการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการการใช้เทคนิคการกลายพันธุ์เพื่อสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์พืช รุ่นที่ 5.** วันที่ 19-21 ตุลาคม 2554. ศูนย์วิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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. Applied 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 hypogea* L.). **Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev.** 14: 9497-9510.

Baloch, S.H., Kurt, C., Arioglu, H. and Ozkan, H. (2010). Assaying of diversity among soybean (*Glycin max* (L.) Merr.) and peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes at DNA level. **Turk. J. Agric.** 34: 285-301.

Broillette, J.A. and Venta, P.J. (2002). Within-breed heterozygosity of canine single nucleotide polymorphisms identified by across-breed comparison. **Animal Genetics** 33: 464-467.

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.

Chaudhary, B., Chattopadhyay, P. Verma, N. and Banerjee, N. (2015). Understanding the Phylomorphological Implications of Pollinia from *Dendrobium* (Orchidaceae). **American J. Plant Sci.** 3: 816-828.

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.

De, L.C., Rao, A.N., Rajeevan, P.K., Srivastava, M. and Chhetri, G. (2015). Morhpological characterization in Dendrobium species. **J. Global Biosci**. 4: 1198-1215.

Di, G.G. and Cipriani, G. (2003). Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like and receptor like kinase related to disease resistance in grapevine. **Mol. Genet. 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: 106-111.

Ganesan, M., Bhanumathi, P. and Jayabalan, N. (2005). Mutagenic effect of sodium azide on somatic

embryo regeneration and root growth of cotton (*Gossypium hirsutum* L. CV. SVPR2). **J. Agr. Sci. Tech.** 1: 365-380.

Gruszka, D. Szarejko, I. and Maluszynski, M. (2012). **Plant Mutation Breeding and Biotechnology.** CABI International, Wallingford, UK, pp.159-166.

Huang, P.L. (2012). Preliminary studies on mutagenic effect of sodum azide and γ-Ray Irradiation on organogenesis in *Guzmania* and *Aechmea* Bromeliads. Research bulletin of KDARES. 21: 18-28.

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.** 82: 113-123.

Joseph, A. (1984). **Orchid Biology Review and Perspectives, lll.** Cornell University. New York, USA. 410 p.

Karhu, A., Hurme, P., Karjalainen, K., Karvonan, P., Ka¨rkkainen, K., Neale, D. and Savolainen, O. (1996). Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers? **Theor. Appl. Genet.** 93: 215–221.

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.

Khan, S., Al-Qurainy, F. and Anwar, F. (2009). Sodium azide: a chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants. Environ. **We Int. J. Sci. Tech.** 4: 1-21.

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.

Kleinhofs, A., Owais, W.M. and Nilan, R.A. (1978). Azide. **Mutation Res.** 55: 165-195.

Kredich, N.M. (1971). Regulation of L-cysteine biosynthesis in *S. typhimurium*. **J. Biol. Chem**. 264: 3473-3484.

Kuehnle, A.R. (2006). **Flower Breeding and Genetics: chapter 20: Orchids, *Dendrobium.*** Springer, pp. 539-560.

Kumar, H. Anubha, Vishwakarma, M.K. and Lal, J.P. (2011). Morphological and molecular characterization of *Brassica rapa* ssp yellow sarson mutants. **J. of Oilseed Brass**. 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.

Leva, A.R., Petruccelli, R. and Rinaldi, L.M.R. (2012). Somaclonal variation in tissue culture: a case study with olive. Available [online, 2015 August 9]: http://dx.doi.org/10.5772/50367. 123-150 p.

Levesque, R. and SPSS Inc. (2006). SPSS Programming and Data Management. 3rd ed. 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. **J. Agr. Sci. Tech**. Available [online, 2015 August 9]: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-NK DB20100101777.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, III.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: 668-671.

Miaobin, Z., Lijing, P. and Ganqun, F. (2009). Study on DNA isolation from polysaccharides-rich transgenic *Dendrobium*. **Mol. Plant Breed.** 7: 209-214.

Nilan, R.A., Sideris, E.G., Kleinhofs, A., Sander, C. and Konzak, C.F. (1973). Azide a potent mutagen. **Mutat. Res.** 17: 142-144.

Nkongolo, K.K. (2003). Genetic characterization of Malawian cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) landraces: diversity and gene flow among accessions. **Euphytica** 129: 219–228.

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.

Peto, F.H. (2011). The effect of aging heat on the chromosomal mutation rates in maize and barley. **Canadian J. Res.** 9: 261-264.

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.

Rizzo, J. and Rouchka, E.C. (2007). Review of phylogenetic tree construction. Bioinformatics laboratory technical report series. TR-ULBL: 1-8.

Rohlf, F.J. (2000). Ntsys-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.2 User guide. **Applied Biostatistics, Inc.,** 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.

Roychowdhury, R. and Tah, J. (2011). Chemical mutagenic action on seed germination and related agro-metrical traits in M1 *Dianthus* generation. **Curr. Bot.** 2: 19-23.

Russell, P.J., (1999). **Genetic.** 5th ed. Harper Collins college publishers. New York. USA.

Sharma, A.K. and Sharma, A. (1980). **Chromosome Techniques: Theory and Practice**. 3rd ed. Butterworth's Co. Ltd,. London, UK. pp 9-27.

Srivastava, P., Marker, S. and Tiwari, D.K. (2011). Mutagenic effects of sodium azide on the growth and yield characteristics in wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). **Asian J. Plant Sci.** 10: 190-201.

Tantasawat, P., Trongchuen, J., Prajongjai, T., Seehalak, W. and Jittayasothorn, Y. (2010). Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) using morphological characters, SSR and ISSR analysis. **Scientia Hort.** 124: 204–216.

Tar'an, B., Zhang, C., Warkentin, T., Tullu, A. and Vandenberg, A. (2005). Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. **Genome** 48: 257–272

Türkan, A.D., Khawar, K.M., Çiftci, C.Y. and Özcan, S. (2006). Effects of mutagenic sodium azide (NaN_3) on *in vitro* development of four pea (*Pisum sativum* L.) cultivars. **Int. J. Agri. Biol.** 8: 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.

Wannajindaporn, A., Poolsawat, O., Chaowiset, W. and Tantasawat, P.A. (2014). Evaluation of genetic variability in *in vitro* sodium azide-induced *Dendrobium* 'Earsakul' mutants. **Genet. Mol. Res.** 13: 5333-5342.

Wikipedia. (2015). Dendrobium. Available [online, 2015 August 9]: http://en.wikipedia.org/wiki/dendrobium.

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, B.H. (2000). Regulation of plant growth regulator on cotton somatic ambryogenesis and plant regeneration. **Biochem.** 39: 1567.

Zhang, F., Lv, Y., Dong, H. and Guo, S. (2010). Analysis of genetic stability through inter-simple 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.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ค่าการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของระดับความเข้มข้นของ NaN_3 ต่อเปอร์เซ็นต์ การตายของ PLBs ที่ระยะเวลาต่างกัน

ระยะเวลา 3 วัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Treatment	8	349239.169	43654.896	2.477E3**	0.000
Error	210	3701.470	17.626		
Corrected Total	218	352940.639			

**= แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

ระยะเวลา 1 สัปดาห์

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Treatment	8	338221.820	42277.727	2.077E3**	0.000
Error	194	3949.609	20.359		
Corrected Total	202	342171.429			

**= แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

ระยะเวลา 2 สัปดาห์

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Treatment	8	322092.731	40261.591	1.889E3**	0.000
Error	179	3815.248	21.314		
Corrected Total	187	325907.979			

**= แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

ตารางภาคผนวกที่ 2 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน

การก่อกลายพันธุ์	ต้น	ความสูงต้น (ซม.) [1/]	จำนวนข้อปล้อง	ความยาวข้อปล้อง (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
NaN_3 0 mM, ROW[2/]	C1	2.50	2	1.25	6	4.5	0.6	6	3.0
(controls)	C2	2.20	3	0.73	10	2.5	0.6	7	2.5
	C3	3.30	3	1.10	7	3.7	0.6	3	3.0
	C4	2.50	3	0.83	6	5.0	0.6	8	2.5
	C5	1.80	3	0.60	6	2.5	0.6	7	3.0
	C6	2.50	2	1.25	6	3.7	0.6	6	3.5
	C7	1.40	2	0.70	6	1.8	0.6	6	2.5
	C8	1.50	2	0.75	6	3.5	0.6	6	3.2
	C9	1.60	3	0.53	7	1.7	0.6	3	2.3
	C10	1.30	3	0.43	5	2.7	0.5	4	3.2
ค่าเฉลี่ย		2.06	2.60	0.82	6.50	3.16	0.59	5.60	2.87

[1/] ความสูงต้น คือ ความสูงจากโคนต้นถึงปลายลำลูกกล้วย (pseudobulb); จำนวนข้อปล้อง คือจำนวนข้อปล้องของลำลูกกล้วย; ความยาวข้อปล้อง คือค่าความสูงต้น หารด้วยจำนวนข้อปล้อง; จำนวนใบ คือจำนวนใบทั้งหมด; ความยาวใบ คือความยาวจากโคนใบถึงปลายใบของใบบนสุด; ความกว้างใบ คือความกว้างใบบนสุด; จำนวนราก คือจำนวนรากทั้งหมด; ความยาวราก คือความยาวจากโคนต้นถึงปลายรากที่ยาวที่สุด

[2/] NaN_3 คือโซเดียมเอไซด์; ROW คือ น้ำปราศจากไอออน (reversed osmosis water)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 2 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

การก่อกลายพันธุ์	ต้น	ความสูงต้น (ซม.) [1/]	จำนวนข้อปล้อง	ความยาวข้อปล้อง (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
NaN_3 0.1 mM [2/]	M1	2.30	5	0.46	10	3.2	0.6	5	1.8
	M2	2.00	5	0.40	10	3.0	0.5	4	0.6
	M3	2.60	5	0.52	8	3.2	0.6	3	2.0
	M4	1.70	5	0.34	9	2.0	0.6	4	1.6
	M5	1.80	3	0.60	6	3.2	0.5	3	1.8
	M6	1.30	4	0.33	6	2.0	0.5	4	1.8
	M7	1.50	5	0.30	7	2.0	0.5	4	1.0
	M8	1.40	4	0.35	6	3.8	0.5	3	0.5
	M9	1.50	3	0.50	5	2.5	0.5	3	2.0
	M10	1.30	4	0.33	6	1.7	0.4	2	2.3
	M11	1.30	3	0.43	5	2.3	0.4	3	1.0
	M12	1.20	3	0.40	5	1.3	0.4	2	0.8
ค่าเฉลี่ย		1.66	4.08	0.41	6.92	2.52	0.50	3.33	1.43

[1/] ความสูงต้น คือ ความสูงจากโคนต้นถึงปลายลำลูกกล้วย (pseudobulb); จำนวนข้อปล้อง คือจำนวนข้อปล้องของลำลูกกล้วย; ความยาวข้อปล้อง คือค่าความสูงต้น หารด้วยจำนวนข้อปล้อง; จำนวนใบ คือจำนวนใบทั้งหมด; ความยาวใบคือความยาวจากโคนใบถึงปลายใบของใบบนสุด; ความกว้างใบ คือความกว้างใบบนสุด; จำนวนราก คือจำนวนรากทั้งหมด; ความยาวราก คือความยาวจากโคนต้นถึงปลายรากที่ยาวที่สุด

[2/] NaN_3 คือโซเดียมเอไซด์; ROW คือ น้ำปราศจากไอออน (reversed osmosis water)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 2 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน (ต่อ)

การก่อกลายพันธุ์	ต้น	ความสูงต้น (ซม.) [1/]	จำนวนข้อปล้อง	ความยาวข้อปล้อง (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
NaN_3 0.5 mM[2/]	M13	4.00	6	0.67	7	5.0	0.5	8	1.5
	M14	2.50	6	0.42	9	3.0	0.6	5	1.5
	M15	1.50	5	0.30	7	2.5	0.6	2	1.3
	M16	1.20	4	0.30	6	2.3	0.6	3	1.5
	M17	1.70	5	0.34	11	2.3	0.5	4	2.0
	M18	1.50	6	0.25	10	1.0	0.5	1	4.0
	M19	1.50	5	0.30	8	2.0	0.6	1	1.8
	M20	1.00	4	0.25	6	1.5	0.4	2	1.5
	M21	1.50	5	0.30	7	1.0	0.4	1	2.0
	M22	1.70	6	0.28	9	1.0	0.4	2	2.3
	M23	1.20	3	0.40	5	1.6	0.4	3	0.8
	M24	2.60	2	1.30	2	1.3	0.6	1	2.0
ค่าเฉลี่ย		1.83	4.75	0.43	7.25	2.04	0.51	2.75	1.85

[1/] ความสูงต้น คือ ความสูงจากโคนต้นถึงปลายลำลูกกล้วย (pseudobulb); จำนวนข้อปล้อง คือจำนวนข้อปล้องของลำลูกกล้วย; ความยาวข้อปล้อง คือค่าความสูงต้น หารด้วยจำนวนข้อปล้อง; จำนวนใบ คือจำนวนใบทั้งหมด; ความยาวใบ คือความยาวจากโคนใบถึงปลายใบของใบบนสุด; ความกว้างใบ คือความกว้างใบบนสุด; จำนวนราก คือจำนวนรากทั้งหมด; ความยาวราก คือความยาวจากโคนต้นถึงปลายรากที่ยาวที่สุด

[2/] NaN_3 คือโซเดียมเอไซด์; ROW คือ น้ำปราศจากไอออน (reversed osmosis water)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน

ความสูงต้น

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Treatment	2	0.882	0.441	1.006^{ns}	0.377
Error	31	13.596	0.439		
Corrected Total	33	14.478			

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

จำนวนข้อปล้อง

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Treatment	2	25.963	12.981	13.611**	.000
Error	31	29.567	.954		
Corrected Total	33	55.529			

**= แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

ความยาวข้อปล้อง

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Treatment	2	1.116	.558	9.445**	.001
Error	31	1.831	.059		
Corrected Total	33	2.947			

**= แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

จำนวนใบ

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Treatment	2	3.069	1.534	.397^{ns}	.675
Error	31	119.667	3.860		
Corrected Total	33	122.735			

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ความยาวใบ

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Treatment	2	6.830	3.415	3.358*	.048
Error	31	31.530	1.017		
Corrected Total	33	38.360			

*= แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05

ความกว้างใบ

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Treatment	2	.052	.026	5.137*	.012
Error	31	.158	.005		
Corrected Total	33	.211			

*= แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05

จำนวนราก

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Treatment	2	48.242	24.121	8.975**	.001
Error	31	83.317	2.688		
Corrected Total	33	131.559			

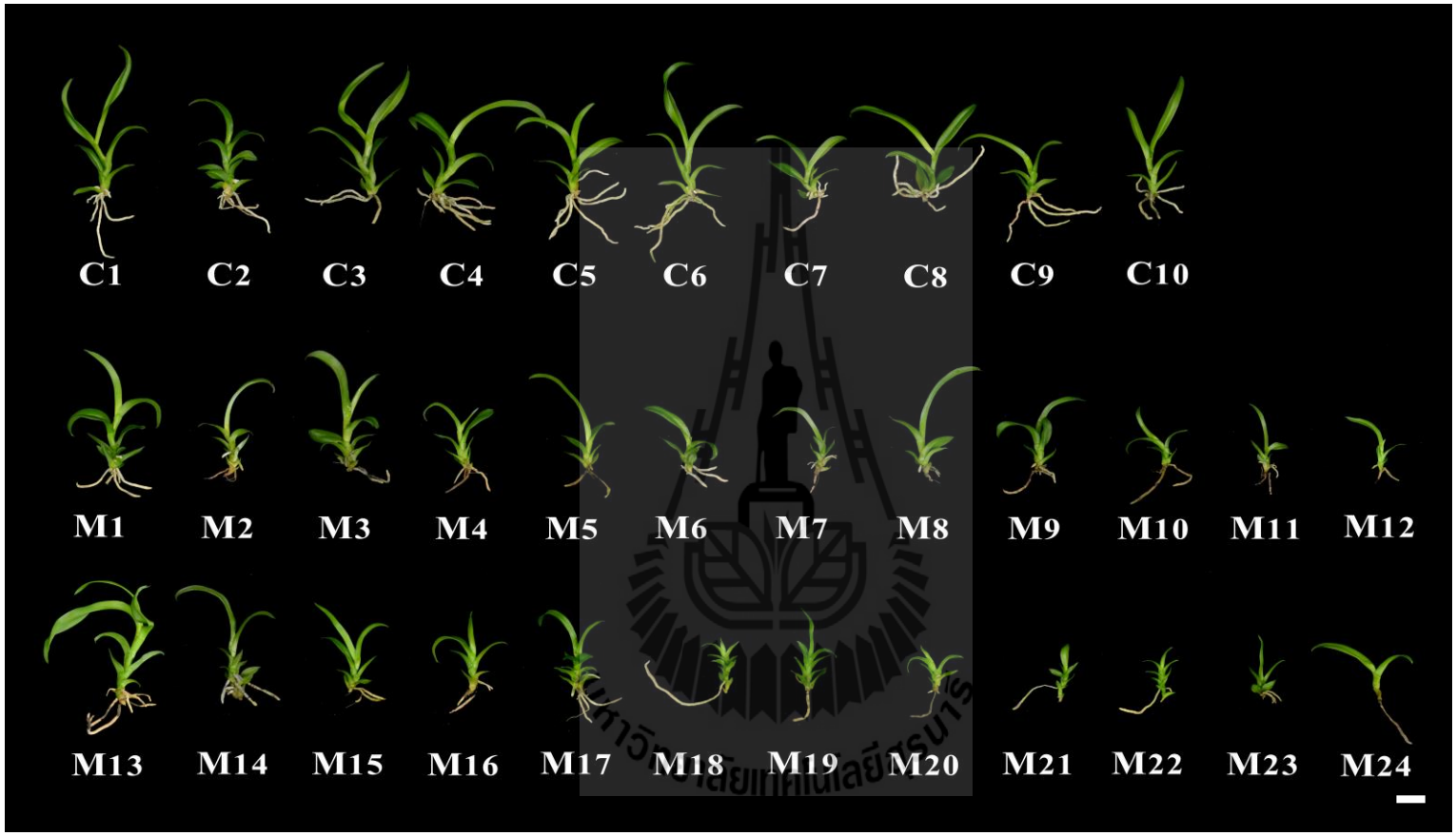
**= แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ความยาวราก

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Treatment	2	11.692	5.846	14.665**	.000
Error	31	12.358	.399		
Corrected Total	33	24.050			

**= แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01



ภาพภาคผนวกที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 24 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 10 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน; ▬ ขนาด = 1.5 เซนติเมตร

ตารางภาคผนวกที่ 4 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) จำนวน 8 ต้น และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 7 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 8 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 1 ปี

การก่อกลายพันธุ์	ต้น	ความสูงต้น (ซม.) [1/]	จำนวนการแตกหน่อ	จำนวนข้อปล้อง	ความยาวข้อปล้อง (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
NaN_3 0 mM,	C1	4.00	3.0	3	1.33	10	6.0	0.8	17.0	5.5
ROW[2/] (controls)	C3	3.50	3.0	4	0.88	9	5.0	0.8	20.0	4.5
	C4	2.50	1.0	3	0.67	5	6.0	0.8	12.0	2.5
	C5	2.50	3.0	3	1.00	4	4.5	0.8	15.0	3.0
	C7	1.50	0.0	2	0.75	4	3.5	0.8	11.0	2.5
	C8	1.70	1.0	2	0.75	5	3.5	0.8	16.0	4.0
	C9	3.00	2.0	3	1.17	7	5.0	0.8	25.0	6.0
	C10	2.00	2.0	3	0.67	7	4.0	0.7	18.0	4.0
ค่าเฉลี่ย		2.59	1.88	2.88	0.90	6.38	4.69	0.79	16.75	4.00

[1/] ความสูงต้น คือ ความสูงจากโคนต้นถึงปลายลำลูกกล้วย (pseudobulb); จำนวนข้อปล้อง คือจำนวนข้อปล้องของลำลูกกล้วย; ความยาวข้อปล้อง คือค่าความสูงต้น หารด้วยจำนวนข้อปล้อง; จำนวนใบ คือจำนวนใบทั้งหมด; ความยาวใบ คือความยาวจากโคนใบถึงปลายใบของใบบนสุด; ความกว้างใบ คือความกว้างใบบนสุด; จำนวนราก คือจำนวนรากทั้งหมด; ความยาวราก คือความยาวจากโคนต้นถึงปลายรากที่ยาวที่สุด

[2/] NaN_3 คือโซเดียมเอไซด์; ROW คือ น้ำปราศจากไอออน (reversed osmosis water)

ตารางภาคผนวกที่ 4 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) จำนวน 8 ต้น และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 7 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 8 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 1 ปี (ต่อ)

การก่อกลายพันธุ์	ต้น	ความสูงต้น (ซม.) [1/]	จำนวนการแตกหน่อ	จำนวนข้อปล้อง	ความยาวข้อปล้อง (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
NaN_3 0.1 mM	M1	3.30	2.0	3	1.10	4	4.5	0.8	15.0	4.0
	M3	2.60	1.0	2	1.30	6	3.2	0.8	4.0	4.5
	M5	2.00	1.0	2	1.00	4	4.5	0.7	18.0	3.0
	M6	1.50	0.0	2	0.50	7	3.0	0.7	4.0	2.0
	M9	1.20	2.0	2	0.60	6	3.8	0.7	13.0	4.3
	M10	1.00	0.0	2	0.50	4	2.0	0.6	9.0	2.3
	M11	1.00	1.0	1	1.00	4	3.0	0.6	8.0	1.0
	M12	1.30	0.0	2	0.75	5	1.0	0.6	4.0	0.5
ค่าเฉลี่ย		1.88	0.88	2.00	0.84	5.00	3.13	0.69	9.38	2.70

[1/] ความสูงต้น คือ ความสูงจากโคนต้นถึงปลายลำลูกกล้วย (pseudobulb); จำนวนข้อปล้อง คือจำนวนข้อปล้องของลำลูกกล้วย; ความยาวข้อปล้อง คือค่าความสูงต้น หารด้วยจำนวนข้อปล้อง; จำนวนใบ คือจำนวนใบทั้งหมด; ความยาวใบ คือความยาวจากโคนใบถึงปลายใบของใบบนสุด; ความกว้างใบ คือความกว้างใบบนสุด; จำนวนราก คือจำนวนรากทั้งหมด; ความยาวราก คือความยาวจากโคนต้นถึงปลายรากที่ยาวที่สุด

[2/] NaN_3 คือโซเดียมเอไซด์; ROW คือ น้ำปราศจากไอออน (reversed osmosis water)

ตารางภาคผนวกที่ 4 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1-M12) จำนวน 8 ต้น และ 0.5 mM (M13-M24) จำนวน 7 ต้น และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1-C5), 0 mM; control 2 (C6-C10)) จำนวน 8 ต้น ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 1 ปี (ต่อ)

การก่อกลายพันธุ์	ต้น	ความสูงต้น (ซม.) [1/]	จำนวนการแตกหน่อ	จำนวนข้อปล้อง	ความยาวข้อปล้อง (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
NaN_3 0.5 mM	M14	2.50	1.0	2	0.75	5	4.5	0.8	9.0	1.5
	M18	1.50	1.0	2	0.50	6	1.5	0.7	13.0	2.0
	M19	1.30	1.0	4	0.25	9	2.0	0.8	5.0	1.5
	M20	1.00	1.0	2	0.50	6	1.5	0.6	12.0	1.0
	M21	1.00	2.0	2	0.50	4	1.5	0.6	7.0	2.3
	M22	1.70	1.0	4	0.43	9	1.0	0.6	4.0	1.5
	M23	1.20	2.0	2	0.25	6	3.5	0.6	14.0	2.5
ค่าเฉลี่ย		1.46	1.29	2.57	0.45	6.43	2.21	0.67	9.14	1.76

[1/] ความสูงต้น คือ ความสูงจากโคนต้นถึงปลายลำลูกกล้วย (pseudobulb); จำนวนข้อปล้อง คือจำนวนข้อปล้องของลำลูกกล้วย; ความยาวข้อปล้อง คือค่าความสูงต้น หารด้วยจำนวนข้อปล้อง; จำนวนใบ คือจำนวนใบทั้งหมด; ความยาวใบ คือความยาวจากโคนใบถึงปลายใบของใบบนสุด; ความกว้างใบ คือความกว้างใบบนสุด; จำนวนราก คือจำนวนรากทั้งหมด; ความยาวราก คือความยาวจากโคนต้นถึงปลายรากที่ยาวที่สุด

[2/] NaN_3 คือโซเดียมเอไซด์; ROW คือ น้ำปราศจากไอออน (reversed osmosis water)

ตารางภาคผนวกที่ 5 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1, M3, M5, M6, M9-M12) และ 0.5 mM (M14, M18-M23) เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1, C3-C5), 0 mM; control 2 (C7-C10)) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน เปรียบเทียบกับอายุ 1 ปี

การก่อกลายพันธุ์	ต้น	ความสูงต้น (ซม.) [1/]	จำนวนข้อปล้อง	ความยาวข้อปล้อง (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
NaN_3 0 mM, ROW[2/]	C1	1.50[3/]	1	0.08	4	1.5	0.2	11	2.5
(controls)	C3	0.20	1	-0.22	2	1.3	0.2	17	1.5
	C4	0.00	0	-0.16	-1	1.0	0.2	4	0.0
	C5	0.70	0	0.40	-2	2.0	0.2	8	0.0
	C7	0.10	0	0.05	-2	1.7	0.2	5	0.0
	C8	0.20	0	0.00	-1	0.0	0.2	10	0.8
	C9	1.40	0	0.64	0	3.3	0.2	22	3.7
	C10	0.70	0	0.24	2	1.3	0.2	14	0.8
ค่าเฉลี่ย		0.60	0.25	0.13	0.25	1.51	0.20	11.38	1.16

[1/] ความสูงต้น คือ ความสูงจากโคนต้นถึงปลายลำลูกกล้วย (pseudobulb); จำนวนข้อปล้อง คือจำนวนข้อปล้องของลำลูกกล้วย; ความยาวข้อปล้อง คือค่าความสูงต้น หารด้วยจำนวนข้อปล้อง; จำนวนใบ คือจำนวนใบทั้งหมด; ความยาวใบ คือความยาวจากโคนใบถึงปลายใบของใบบนสุด; ความกว้างใบ คือความกว้างใบบนสุด; จำนวนราก คือจำนวนรากทั้งหมด; ความยาวราก คือความยาวจากโคนต้นถึงปลายรากที่ยาวที่สุด

[2/] NaN_3 คือโซเดียมเอไซด์; ROW คือ น้ำปราศจากไอออน (reversed osmosis water)

[3/] ค่าที่เป็นบวกหมายถึง มีการเพิ่มขึ้นของลักษณะ ส่วนค่าที่เป็นลบหมายถึง มีการลดลงของลักษณะ

ตารางภาคผนวกที่ 5 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1, M3, M5, M6, M9-M12) และ 0.5 mM (M14, M18-M23) เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1, C3-C5), 0 mM; control 2 (C7-C10)) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน เปรียบเทียบกับอายุ 1 ปี (ต่อ)

การก่อกลายพันธุ์	ต้น	ความสูงต้น (ซม.) [1/]	จำนวนข้อปล้อง	ความยาวข้อปล้อง (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
NaN_3 0.1 mM	M1	1.00	-2	0.64	-6	1.3	0.2	10	2.2
	M3	0.00	-3	0.78	-2	0.0	0.2	1	2.5
	M5	0.20	-1	0.40	-2	1.3	0.2	10	1.2
	M6	0.20	-2	0.17	1	1.0	0.2	0	0.2
	M9	-0.30	-1	0.10	1	1.3	0.2	15	2.3
	M10	0.20	-2	0.17	-2	0.3	0.2	7	0.0
	M11	-0.30	-2	0.57	-1	0.7	0.2	5	0.0
	M12	0.10	-1	0.35	0	-0.3	0.2	2	-0.3
ค่าเฉลี่ย		0.14	-1.75	0.40	-1.38	0.70	0.20	6.25	1.01

[1/] ความสูงต้น คือ ความสูงจากโคนต้นถึงปลายลำลูกกล้วย (pseudobulb); จำนวนข้อปล้อง คือจำนวนข้อปล้องของลำลูกกล้วย; ความยาวข้อปล้อง คือค่าความสูงต้น หารด้วยจำนวนข้อปล้อง; จำนวนใบ คือจำนวนใบทั้งหมด; ความยาวใบ คือความยาวจากโคนใบถึงปลายใบของใบบนสุด; ความกว้างใบ คือความกว้างใบบนสุด; จำนวนราก คือจำนวนรากทั้งหมด; ความยาวราก คือความยาวจากโคนต้นถึงปลายรากที่ยาวที่สุด

[2/] NaN_3 คือโซเดียมเอไซด์; ROW คือ น้ำปราศจากไอออน (reversed osmosis water)

[3/] ค่าที่เป็นบวกหมายถึง มีการเพิ่มขึ้นของลักษณะ ส่วนค่าที่เป็นลบหมายถึง มีการลดลงของลักษณะ

ตารางภาคผนวกที่ 5 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM (M1, M3, M5, M6, M9-M12) และ 0.5 mM (M14, M18-M23) เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (ROW; control 1 (C1, C3-C5), 0 mM; control 2 (C7-C10)) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลอายุ 6 เดือน เปรียบเทียบกับอายุ 1 ปี (ต่อ)

การก่อกลายพันธุ์	ต้น	ความสูงต้น (ซม.) [1/]	จำนวนข้อปล้อง	ความยาวข้อปล้อง (ซม.)	จำนวนใบ	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
NaN_3 0.5 mM	M14	0.00	-4	0.33	-4	1.5	0.2	4	0.0
	M18	0.00	-4	0.25	-4	0.5	0.2	12	-2.0
	M19	-0.20	-1	-0.05	1	0.0	0.2	4	-0.3
	M20	0.00	-2	0.25	0	0.0	0.2	10	-0.5
	M21	-0.50	-3	0.20	-3	0.5	0.2	6	0.3
	M22	0.00	-2	0.15	0	0.0	0.2	2	-0.8
	M23	0.00	-1	-0.15	1	1.9	0.2	11	1.7
ค่าเฉลี่ย		-0.10	-2.43	0.14	-1.29	0.63	0.20	7.00	-0.23

[1/] ความสูงต้น คือ ความสูงจากโคนต้นถึงปลายลำลูกกล้วย (pseudobulb); จำนวนข้อปล้อง คือจำนวนข้อปล้องของลำลูกกล้วย; ความยาวข้อปล้อง คือค่าความสูงต้น หารด้วยจำนวนข้อปล้อง; จำนวนใบ คือจำนวนใบทั้งหมด; ความยาวใบ คือความยาวจากโคนใบถึงปลายใบของใบบนสุด; ความกว้างใบ คือความกว้างใบบนสุด; จำนวนราก คือจำนวนรากทั้งหมด; ความยาวราก คือความยาวจากโคนต้นถึงปลายรากที่ยาวที่สุด

[2/] NaN_3 คือโซเดียมเอไซด์; ROW คือ น้ำปราศจากไอออน (reversed osmosis water)

[3/] ค่าที่เป็นบวกหมายถึง มีการเพิ่มขึ้นของลักษณะ ส่วนค่าที่เป็นลบหมายถึง มีการลดลงของลักษณะ

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอนรรฆอร วรรณจินดาพร เกิดเมื่อวันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2530 ที่อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลายที่โรงเรียนชลบุรี “สุขบท” อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ในปี พ.ศ. 2548 ได้เข้าศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยสำเร็จการศึกษา ปี พ.ศ. 2552 หลังจากนั้นได้เข้าทำงานในตำแหน่งผู้ช่วยวิจัย ภายใต้โครงการวิจัยของ ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อลิฆาณ์ ตันตสวัสดิ์ และในปี พ.ศ. 2553 เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี