

การใช้ EMS เพื่อชักนำการกลายพันธุ์ใน กล้วยไม้เหืองจันทบูร

Use of EMS to Induce Mutation in *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f.

ศิริัญญา ม่วงสอน^{1/} และ สมปอง เตชะโต^{1/}
Sirinya Muangsorn^{1/} and Sompong Te-chato^{1/}

Abstract: The study of optimum condition for EMS (ethylmethanesulphonate) to induced mutation in *Dendrobium friedericksianum* Rehb.f. was carried out using PLBs (protocorm-like bodies). PLBs were immersed in EMS at concentration of 0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1% for 60 and 90 min then cultured on phytohormone-free MS medium for 14 days. The results revealed that EMS at concentration of 0.8% for 90 min decreased the survival rate of to 50% (LD₅₀) PLBs. After culturing survival PLBs for further 2 months the highest shoot formation at 15% was obtained from non treated PLBs while EMS at concentration of 0.75 and 1% for 90 min gave the lowest shoot formation at equal percentage (2%). In case of number of shoot/explant, EMS at concentration of 1% for 90 min gave the highest results (12 shoots/explant). Morphological observation revealed that EMS at concentration 1% for 60 min gave 10% albino plants and 1% EMS for 90 min gave three characteristics of chimera, sectorial, mericlinal and periclinal at frequency of 5, 15 and 11%, respectively. Chimera leaves consisted of two colors, yellow and white. Isozyme markers could be assessed among the treatments with or without EMS.

Keywords: *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f., mutation, isozyme, esterase, EMS

^{1/} ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

^{1/} Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

บทคัดย่อ: ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการใช้สาร EMS (ethylmethanesulphonate) เพื่อชักนำการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูร โดยนำ PLBs (Protocom-like bodies) กล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรมาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 และ 90 นาที แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า หลังเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน PLBs ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง จากนั้นศึกษาการเจริญและพัฒนาการของ PLBs ที่รอดชีวิต พบว่า ภายหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน ทริตเมนต์ที่ไม่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS (ชุดควบคุม) ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดสูงสุด คือ 15 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ทริตเมนต์ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดต่ำสุดเท่ากันคือ 2 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพบว่า ทริตเมนต์ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนสูงสุดคือ 12 ยอดต่อชิ้นส่วน เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน พบว่า ทริตเมนต์ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที เกิดลักษณะต้นเผือกเป็นจำนวน 10 เปอร์เซ็นต์ และที่ EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที พบอาการใบต่าง 3 ลักษณะคือ ต่างเป็นบางส่วนของใบ (sectorial) ต่างตรงกลางใบ (mericlinal) และต่างบริเวณขอบใบ (periclinal) เป็นจำนวน 5, 15 และ 11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งลักษณะใบต่างที่เกิดขึ้นมีสีต่าง 2 สี คือ ใบด่างสีเหลืองและใบด่างสีขาว และเมื่อนำมาตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคไอโซไซม์ พบว่าให้แถบเอนไซม์ที่แตกต่างกันระหว่างทริตเมนต์ที่จุ่มแช่และไม่จุ่มแช่ EMS

คำสำคัญ: กล้วยไม้เหลืองจันทร์บูร การกลายพันธุ์ ไอโซไซม์ เอสเตอเรส อีเอ็มเอส

คำนำ

กล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f. (วชิรพงศ์, 2548) เป็นกล้วยไม้พื้นเมืองที่ขึ้นอยู่ในป่าทั่วไป ทั้งป่าสูงและป่าต่ำที่เป็นป่าดิบทางภาคตะวันออกแถบจังหวัดจันทบุรี และตราด จัดเป็นกล้วยไม้สกุลหายาก ที่มีดอกสวยงาม และออกดอกเป็นช่อทั้งต้น กลับมีสีเหลืองสดเป็นมันคล้ายพลาสติก มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ ดอกบานทนทาน ออกดอกปีละครั้งในช่วงเดือนมกราคม ถึงเดือนมีนาคม เหลืองจันทร์บูรที่พบในธรรมชาติ จะมีดอก 2 แบบ คือ ดอกสีเหลืองแถมสีม่วงแดง 2 แด้ม และดอกสีเหลืองทั้งดอก เรียกว่า ชนิดเหลืองปลอด ซึ่งในขณะนี้กำลังเป็นที่ต้องการของตลาดมาก (สำนักงานทางหลวงชนบทจังหวัดจันทบุรี, 2547) แต่เนื่องจากเหลืองจันทร์บูรเป็นกล้วยไม้หายาก มีราคาแพง จึงถูกลักลอบนำออกจากป่าเพื่อการค้านอกจากนี้เหลืองจันทร์บรยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำจึงมีโอกาสสูญพันธุ์สูง (สกุลรัตน์, 2548) ดังนั้นเพื่อป้องกันการสูญพันธุ์และสร้างสายพันธุ์ใหม่เพื่อตอบสนองความต้องการของตลาดจึงได้ทำการประยุกต์ใช้

เทคโนโลยีการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มความหลากหลายและขยายฐานทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ เหลืองจันทร์บูร และใช้เทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาใช้ในการเพิ่มปริมาณให้ได้จำนวนมาก ซึ่งปัจจุบันพบว่าเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการขยายพันธุ์ และการปรับปรุงพันธุ์มากขึ้น ดังรายงานการเพาะเลี้ยงใบในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* และ *Aranda* สามารถชักนำให้เป็นต้นเป็นจำนวนมาก (Manorama et al., 1986 อ้างโดย Arditto and Ernst, 1993) การเพาะเลี้ยงปลายรากในกล้วยไม้สกุล *Cyrtopodium* สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้เช่นกัน (Sanchez, 1988) นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ร่วมกับกระบวนการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อส่งเสริมความแปรผันและการผลิตพืชให้ได้ลักษณะตามที่ต้องการ ช่วยให้สามารถปรับปรุงพันธุ์ได้สะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น โดยกระบวนการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์มีหลักการ คือ การนำชิ้นส่วนพืชที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์ มาชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะไปจากเดิมอย่างฉับพลัน โดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ในรูปของรังสี เช่น รังสีแกมมา รังสีเอ็กซ์ หรือสารเคมี เช่น EMS

(ethylmethanesulphonate) ไดเอทิลซัลเฟต (DES: diethyl sulphate) 5-โบรมูเรซิล (5-bromouracil) เป็นต้น การใช้สารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการชักนำการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ EMS ตัวอย่างการใช้ EMS ในการชักนำการกลายพันธุ์ในไม้ดอกไม้ประดับ เช่น คาร์เนชั่น (Singh *et al.*, 2000) ขวอนชม (Wongsawad *et al.*, 2005) *Dendrobium* 'Sonia' (วัชรินทร์ และ กันยารัตน์, 2548) เป็นต้น ในการทดลองนี้ใช้ กล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อให้ได้ลักษณะหรือสายพันธุ์ใหม่ ๆ เป็นการเพิ่มมูลค่าทางการตลาด และเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาและประยุกต์ใช้ปรับปรุงพันธุ์ในพืชอื่น ๆ ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุพืชและสิ่งกักกลายพันธุ์

ใช้ PLBs ของกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรอายุ 2 เดือน ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เติมน้ำ Phytigel ความเข้มข้น 0.17 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH 5.7 วางเลี้ยงภายใต้การให้แสง นาน 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ อุณหภูมิ 26 ± 2 °C และสารละลาย EMS ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้ชักนำการกลายพันธุ์

วิธีการ

1. การศึกษาความเข้มข้นของ EMS และระยะเวลาจุ่มแช่ต่ออัตราการรอดชีวิตของ PLBs กล้วยไม้เหลืองจันทร์บูร

นำ PLBs มาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 และ 90 นาที โดยอินคิวบ์บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดกรองแยก PLBs ออกจากสารละลาย EMS ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง ซับด้วยกระดาษกรองฆ่าเชื้อ จึงนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ ๆ ละ 25 ชิ้น ภายหลังการเลี้ยง 14 วันบันทึกอัตรา

การรอดชีวิตและการเปลี่ยนแปลงของ PLBs ในแต่ละความเข้มข้นและระยะเวลา โดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ตรวจสอบค่าความเข้มข้นของ EMS ที่ยับยั้งอัตราการรอดชีวิตได้ 50% หรือ LD₅₀

2. การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นที่ได้จากการจุ่มแช่ EMS

2.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานของกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย EMS หลังเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 8 สัปดาห์ โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของใบ เช่น สีและรูปร่างของใบ ความสูงของลำต้น ตลอดจนพัฒนาการด้านอื่นๆ จำนวน 2 รุ่น (M1R1-M1R2, M1: PLBs ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ครั้งที่ 1 R1: ต้นที่พัฒนามาจาก PLBs ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ครั้งที่ 1 R2: ยอดรวมที่พัฒนามาจากต้น R1) เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ EMS

2.2 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

นำใบอ่อนของกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรที่ได้ภายหลังจากการทดลองในทุกทรีตเมนต์มาบดร่วมกับบัฟเฟอร์สำหรับสกัดเอนไซม์ในอัตราส่วน 1:5 น้ำหนัก/ปริมาตร ซึ่งสารสกัดเอนไซม์ประกอบด้วย Tris-HCl 0.5 M pH 7.5, PVP 2%, Na₂EDTA 2 mM และ 2 Mercapthoethanol 1% (เติมเมื่อบดตัวอย่างพืช) บดในโกร่งเย็นจนละเอียด จากนั้นจึงนำของเหลวที่ได้เทใส่ในหลอดเอฟเฟนดอร์ฟ นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดเอฟเฟนดอร์ฟที่สะอาด แล้วนำมาแยกเอนไซม์ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสแนวดิ่ง โดยใช้ตัวกลางหรือตัวค้ำจุนเป็นเจลโพลีอะคริลามิโดความเข้มข้น 10% โดยดูดสารละลายส่วนใสที่สกัดได้มา 15 ไมโครลิตร ผสมกับ bromophenol blue 2 ไมโครลิตร หยดใส่ร่องหีบแบนแผ่นเจลที่เตรียมไว้ แล้วแยกเอนไซม์ในสารละลายอิเล็กโตรดบัฟเฟอร์ภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำแผ่นเจลมาย้อมสีเพื่อตรวจสอบเอนไซม์ 2 ระบบคือ peroxidase

(PER) และ α -esterase (EST) เปรียบเทียบความแตกต่างของ ไซโมแกรมในแต่ละความเข้มข้นของ EMS กับการไม่จุ่มแช่ EMS

ผลการศึกษา

1. การศึกษาความเข้มข้นของ EMS และระยะเวลาจุ่มแช่ต่ออัตราการรอดชีวิตของ PLBs กล้วยไม้เหลืองจันทร์บูร

จากการจุ่มแช่ PLBs กล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00% นาน 60 และ 90 นาที แล้ววางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงผ่านไป 7 วัน PLBs ที่ทุกระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการจุ่มแช่สารละลาย EMS มีสีซีดลงจากเดิมเล็กน้อย ภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน จึงเริ่มบันทึกอัตราการรอดชีวิต พบว่า การจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ทุกระดับความเข้มข้น นาน 60 นาที มีอัตราการรอดชีวิตสูงเกิน 50% โดยให้อัตราการรอดชีวิตสูงถึง 100, 90, 80, 65 และ 55% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อจุ่มแช่นาน 90 นาที ที่ระดับความเข้มข้นของ EMS 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00% ให้อัตราการรอดชีวิตคือ 100, 85, 70, 60 และ 32% ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในทุกทรีตเมนต์ (ตารางที่ 1) เมื่อนำมาเขียนกราฟ พบว่า ที่ความเข้มข้นของ EMS 0.8% ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่ง (ภาพที่ 1) ภายหลังเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน PLBs จะเพิ่มจำนวนมาก โดย PLBs ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1% นาน 90 นาที มีลักษณะฉ่ำน้ำและมีสีเขียวเข้มกว่าชุดควบคุมและทรีตเมนต์อื่น ๆ และเริ่มมีการแตกยอดอ่อน (ภาพที่ 2) เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การสลายยอดพบว่า ทรีตเมนต์ที่ไม่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS (ชุดควบคุม) ให้เปอร์เซ็นต์การสลายยอดสูงสุด คือ 15% ในขณะที่ทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.75 และ 1% นาน 90 นาทีให้เปอร์เซ็นต์การสลายยอดต่ำสุด คือ 2% และเมื่อพิจารณาในด้านจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพบว่า ทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1% นาน 90 นาที ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อ

ชิ้นส่วนสูงสุดคือ 12 ยอดต่อชิ้นส่วน รองลงมาคือ ทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5% นาน 90 นาที ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนคือ 10 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 2)

2. การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นที่ได้จากการจุ่มแช่ EMS

2.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน

หลังจากทรีตด้วยสารละลาย EMS แล้วเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าภายหลังเพาะเลี้ยงนาน 3 เดือน ภายหลังจากทำการย้ายเพื่อชักนำ PLBs ชุดใหม่ ครั้งที่ 2 (M1R2) PLBs ที่เจริญเป็นต้นใน ทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1% นาน 60 นาที เกิดลักษณะต้นเผือกเป็นจำนวน 10.0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 3) และที่ EMS ความเข้มข้น 1% นาน 90 นาที พบอาการใบต่าง 3 ลักษณะคือ ต่างเป็นบางส่วนของใบ (sectorial), ต่างตรงกลางใบ (mericlinal) และต่างบริเวณขอบใบ (periclinal) ซึ่งลักษณะใบต่างที่เกิดขึ้นปรากฏสีต่าง 2 สี คือ ใบต่างสีเหลืองและใบต่างสีขาวเป็นจำนวน 5.0, 15.0 และ 11.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 3 A, 3B, 3C) สำหรับการเจริญเติบโตในด้านอื่น ๆ เช่น ความสูงของลำต้นหรือพื้นที่ใบ พบว่า ทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS จะเจริญเติบโตช้ากว่าทรีตเมนต์ที่ไม่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS (ตารางที่ 4)

2.2 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

เมื่อย้อมสีเจลโพลีอะคริลาไมด์ที่ผ่านการแยกเอนไซม์ ด้วยระบบสีย้อมเอนไซม์ 2 ระบบ คือ ระบบเอนไซม์ PER และ EST ของกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรที่มีลักษณะกลายไปจากเดิม 4 ลักษณะ คือ ต้นเผือก, ต้นที่มีใบต่างเป็นบางส่วนของใบ, ต่างตรงกลางใบ และต่างบริเวณขอบใบ พบว่า เมื่อย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ EST แผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ให้การติดสีและการกระจายตัวของแถบเอนไซม์ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4) โดยในชุดควบคุมมีรูปแบบเอนไซม์ 4 โซน คือ EST1, EST2, EST3 และ EST4 แต่ในโซน EST3 มีแถบเอนไซม์เพียง 3 แถบ ในขณะที่ต้นกล้วยไม้ที่มีลักษณะใบต่างเป็นบางส่วนของใบ, ต่างตรงกลางใบ และต่างบริเวณขอบใบ มีรูปแบบเอนไซม์ 4 โซน คือ EST1, EST2, EST3 และ EST4 โดยที่

Table 1 Survival rate of PLBs of *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f. after treating with various concentration of EMS.

EMS (%)	Survival rate (%) ^{1/}	
	60 min	90 min
0.0	100a	100a
0.25	90ab	85ab
0.50	80ab	70abc
0.75	65ab	60bc
1.00	55b	32c
F-test	*	**
C.V. (%)	21.20	23.80

^{1/}Means within column not sharing letters in common are significantly different by DMRT

*Significant difference at ($P \leq 0.05$)

**Significant difference at ($P \leq 0.01$)

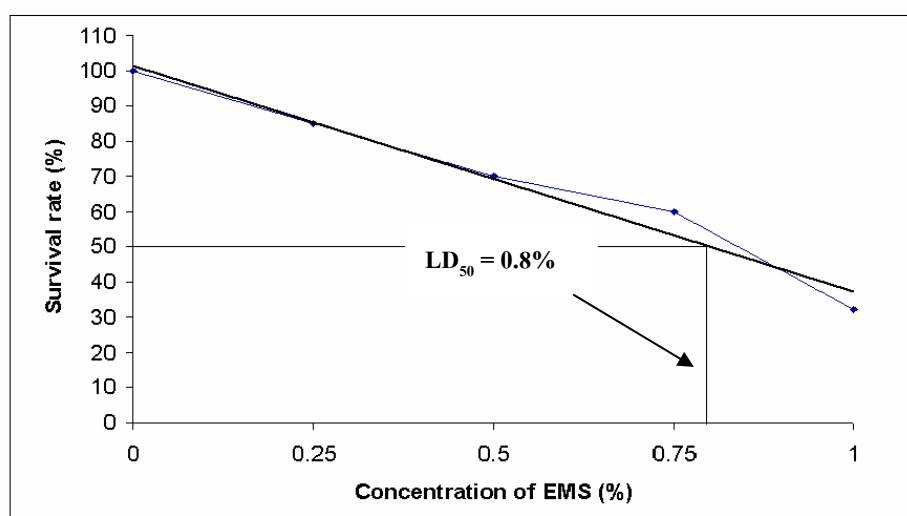


Figure 1 Survival percentage of PLBs of *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f. after treating with EMS for 90 min and culture for 14 days.

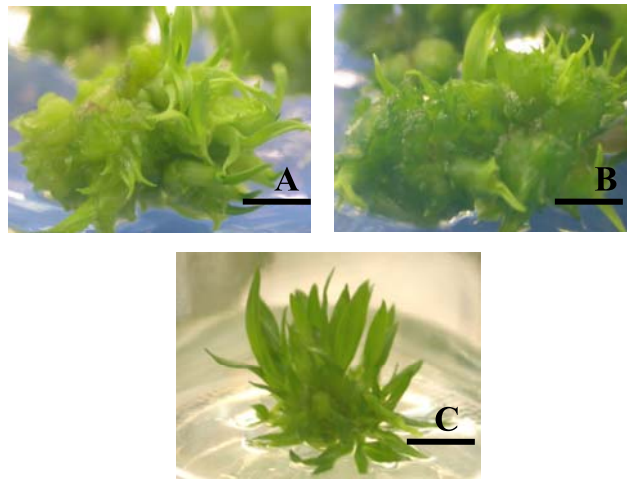


Figure 2 Morphological characteristics of PLBs of *Dendrobium fredericksianum* Rchb.f.

(A) PLBs formation without EMS (control) (B) PLBs formation after treating with 1% EMS for 90 min and cultured for 2 months (C) Multiple shoots formation from PLBs after treating with 1% EMS for 90 min and cultured for 3 months. (bar = 1 cm)

Table 2 Percentage of multiple shoots and number of shoots per explant of PLBs of *Dendrobium fredericksianum* Rchb.f. after treating with EMS and culture for 2 months.

EMS (%)	Multiple shoots (%)		Number of shoots/explant	
	60 min	90 min	60 min	90 min
0.00	15.00	15.00	7.25	7.25
0.25	12.00	8.00	3.00	8.66
0.50	7.00	4.00	4.28	10.50
0.75	5.00	2.00	7.50	7.00
1.00	3.00	2.00	7.33	12.00

Table 3 Effect of EMS on variation of morphological characteristics of *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f.

Generation	Chimera/Mutant	Chimera color	Percentage
M1R1	-	-	-
M1R2	albino*	white	10.0
	sectorial**	yellow, white	5.0
	mericlinal **	yellow, white	15.0
	periclinal**		11.0

* PLBs treated with 1% EMS for 60 min

** PLBs treated with 1% EMS for 90 min

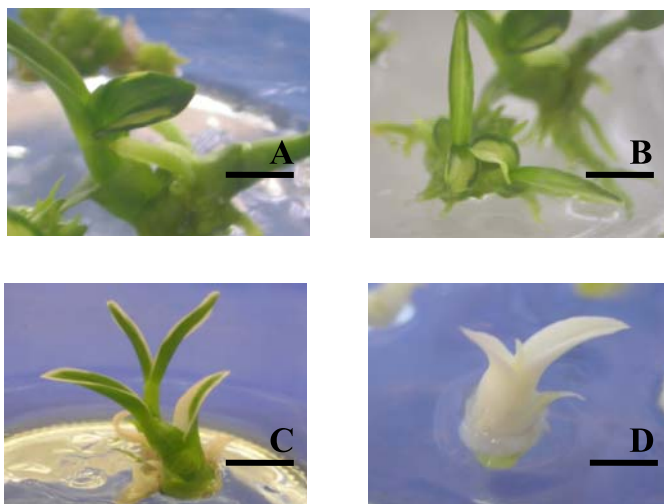


Figure 3 Leaf chimera characteristics obtained from treating with 1% EMS for 90 min after culture for 3 months.

(A) sectorial, (B) mericlinal, (C) periclinal and treating with 1% EMS for 60 min, (D) albino. (bar = 1 cm)

Table 4 Growth of *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f. after treating with EMS for 2 months.

EMS (%)	Stem length (cm)		Leave area (cm ²)	
	60 min ^{1/}	90 min	60 min	90 min
0.00	1.38a	1.38a	0.584a	0.584a
0.25	1.19a	0.98ab	0.519a	0.414b
0.50	0.78a	0.86abc	0.322a	0.290bc
0.75	0.51b	0.68bc	0.485a	0.176cd
1.00	0.44b	0.36c	0.151a	0.110d
F-test	**	**	Ns	**
C.V. (%)	20.10	29.47	68.05	25.95

^{1/} Means within column not sharing letters in common are significantly different by DMRT

^{ns} Not significant difference

**Significant difference at $P \leq 0.01$

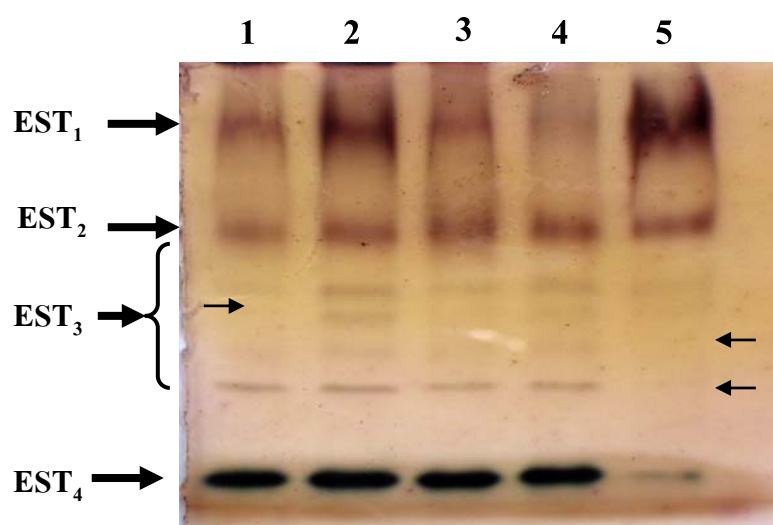


Figure 4 Zymogram patterns of PLBs after being treated with EMS, separated by 10% polyacrylamide gel and stained with EST (arrow show band deletion). (1) control, (2) sectorial, (3) periclinal, (4) mericlinal, (5) albino

EST3 มี 4 แถบเอนไซม์ ส่วนลักษณะต้นเผือก มีรูปแบบเอนไซม์ 4 โซน คือ EST1, EST 2, EST3 และ EST4 โดยที่ EST3 มี 2 แถบเอนไซม์

ลักษณะของเอนไซม์ในแต่ละโซนจะมีความชัดเจนของแถบเอนไซม์แตกต่างกันอาจเนื่องจากในต้นกล้วยไม้แต่ละลักษณะมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ต่างกัน

วิจารณ์

จากการทดลองเมื่อนำ PLBs กล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรมาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1% เป็นเวลา 60 และ 90 นาที ภายหลังเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน พบว่า EMS ที่ความเข้มข้น 0.8% นาน 90 นาที ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nuamjaroen (1998) ซึ่งได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการใช้สาร EMS เพื่อชักนำให้ดอกคำฝอยเกิดการกลายพันธุ์ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำชิ้นส่วนใบมาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ การใช้สาร EMS ที่ความเข้มข้น 0.8% นาน 3 ชั่วโมง ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง แต่เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาในการจุ่มแช่ พบว่า การศึกษาครั้งนี้ใช้ระยะเวลาในการจุ่มแช่น้อยกว่า เพียง 90 นาที ทั้งนี้อาจเป็นเพราะใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นแตกต่างกัน โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้ PLBs ระยะที่ยังไม่สร้างใบเลี้ยงและมีกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญสูงทำให้ EMS เข้าทำลายเนื้อเยื่อได้มากกว่าจึงใช้ระยะเวลาในการจุ่มแช่น้อยกว่าก็สามารถหาอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงครึ่งหนึ่งได้ ดังรายงานการศึกษาของสมปอง และวิทยา (2542) พบว่า ชิ้นส่วนที่มีกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญสูง เมื่อผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย EMS เนื้อเยื่อจะถูกทำลายเป็นจำนวนมาก ดังนั้นเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงจึงมีอัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) และ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ สมปอง (2541) รายงานว่า ความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่ยับยั้งการสร้างแคลลัสหรือการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้จำนวนครึ่งหนึ่งหรือ 50% (LD_{50}) ถือว่าเป็นค่าในการประเมินความเข้มข้นที่เหนี่ยวนำการกลายพันธุ์

ทั้งนี้เพราะ ความเข้มข้นดังกล่าวสร้างความเสียหายและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับหน่วยพันธุกรรมอย่างน้อย 50% โดยในพืชแต่ละชนิดจะมีค่า LD_{50} แตกต่างกัน เพราะขึ้นอยู่กับชิ้นส่วน อายุของชิ้นส่วน ระยะเวลาในการจุ่มแช่ และ ความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการจุ่มแช่ เช่นการศึกษาของธัญญาพร (2547) พบว่า ภายหลังจุ่มแช่ในดิวลาแคลลัสของหน้าวัวพันธุ์โซนตด้วยสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0.725% นาน 90 นาที ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ โดยเกิดลักษณะผิดปกติในรุ่น M1R2 วัชรินทร์ และกันยารัตน์ (2548) ศึกษาชักนำการกลายพันธุ์ของกล้วยไม้ *Dendrobium* 'Sonia' พบว่า EMS ที่ความเข้มข้น 1% ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง สามารถชักนำให้เกิดลักษณะผิดปกติ และมีผลทำให้การเจริญเติบโตในด้านต่าง ๆ ช้าลง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม Bhagwat and Duncan (1998) ศึกษาโดยนำชิ้นส่วนปลายยอด อายุ 4 สัปดาห์ ของกล้วยภายในหลอดทดลองมาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 30 นาที พบค่า LD_{50} คือ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลลาร์ ดังนั้นหากจุ่มแช่ PLBs กล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรด้วยสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0.8% นาน 90 นาที ทำให้ PLBs มีอัตราการรอดชีวิตลดลง 50% และ PLBs ที่รอดชีวิตมีแนวโน้มที่จะเจริญพัฒนาได้เป็นต้นกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรที่มีลักษณะกลายพันธุ์ไปจากเดิม

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน หลังจากทรีตด้วยสารละลาย EMS แล้ววางบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ภายหลังเพาะเลี้ยงนาน 3 เดือน หลังจากทำการย้ายเพื่อชักนำ PLBs ชุดใหม่ ครั้งที่ 2 (M1R2) จึงตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน พบว่า PLBs ที่เจริญเป็นต้นในทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1% นาน 60 นาที มีลักษณะผิดปกติ คือ เกิดลักษณะต้นเผือก และที่ความเข้มข้น EMS 1% นาน 90 นาที พบอาการใบด่าง 3 ลักษณะคือ ด่างเป็นบางส่วนของใบ (sectorial), ด่างตรงกลางใบ (mericlinial) และด่างบริเวณขอบใบ (periclinial) ซึ่ง Ahloowalia and Maluszynski (2001) รายงานว่า ในกระบวนการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของชิ้นส่วนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถทำได้เร็วกว่าชิ้นส่วนพืชใน

สภาพปกติ ทั้งนี้โดยกระบวนการย้ายชิ้นส่วนนั้นหลาย ๆ ครั้ง อาจพบลักษณะทางพันธุกรรมคงที่ในรุ่นที่ V_3-V_4 (*in vitro_3* – *in vitro_4*) ธีัญญาพร (2547) พบว่าภายหลังจุ่มแช่ในดูลา แคลลัสหน้าวุ้นในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.75 % นาน 90 นาที ส่งผลให้ต้นหน้าวุ้นในรุ่น M1R 2 เกิดรูปร่าง ผิดปกติ คือ ใบติดกันเป็นจีบและใบบิดเบี้ยว และที่ความเข้มข้น 1 % นาน 90 นาที เกิดใบต่างบางส่วน ต่างการจัดกระจาย และต่างทั้งใบ Wongsawad *et al.* (2005) ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในชวนชมโดยแช่ เมล็ดในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.3% นาน 2 ชั่วโมงทำให้ใบมีรูปร่างผิดปกติ และมีเส้นกลางใบ 2 เส้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Koh and Davies (2001) ที่พบว่า ภายหลังการจุ่มแช่เมล็ดของ *Tillandsia fasciculata* ในสารละลาย EMS เข้มข้น 1.2% (ปริมาตร/ ปริมาตร) นาน 22 ชั่วโมง แล้วนำมาเพาะเลี้ยง พบว่าต้น ใหม่ที่ได้มีอาการต่าง ทั้ง sectorial chimera และ mericlinal chimera แต่จากการศึกษาครั้งนี้ พบ ลักษณะ ที่ผิดปกติไป 4 ลักษณะ คือ ลักษณะต้นเผือกใบต่างเป็น บางส่วนใบ, ต่างตรงกลางใบ และต่างบริเวณขอบใบ ซึ่ง ลักษณะผิดปกติที่เกิดขึ้นนี้จะต้องทำการศึกษาต่อไป โดย ทำการตรวจสอบในระดับโปรตีนหรือดีเอ็นเอเพื่อเป็นการ ยืนยันผลว่าลักษณะผิดปกติที่เกิดขึ้นนี้ได้เกิดการกลาย พันธุ์ที่แตกต่างไปจากต้นเดิมซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการ ปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต

การตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ระบบเอนไซม์ 2 ระบบ คือ PER และ EST พบว่า เมื่อย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ PER ไม่พบ การติดสีของแถบเอนไซม์ แต่เมื่อย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ EST แผ่นเจลให้การติดสีที่ดีที่สุด สามารถใช้เอนไซม์ระบบ EST แยกความแตกต่างระหว่างลักษณะที่ผิดปกติทั้ง 4 ลักษณะ กับชุดควบคุมได้ เช่นเดียวกับศิริลักษณ์ และ คณะ (2549) ได้ศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนไอโซไซม์เพื่อ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเอื้องสายสามสี และเอื้องสายแข็งโดยใช้ระบบเอนไซม์ 8 ระบบ คือ DIA, MDH, GOT, ME, SKD, POX, EST และ SOD พบว่า เอนไซม์ระบบ EST สามารถแสดงแบบแผนไอโซไซม์ที่ แตกต่างกันระหว่างเอื้องสายสามสีและเอื้องสายแข็งได้ดี ที่สุด ธีัญญาพร (2547) รายงานเช่นเดียวกันว่า เอนไซม์

ระบบ EST สามารถแยกลักษณะที่ผิดปกติของต้นหน้าวุ้น ที่ได้จากการทรีต EMS ได้ทั้ง 3 ลักษณะ คือ ใบต่าง บางส่วน ต่างการจัดกระจาย และต่างทั้งใบ ปนัย (2547) ใช้เอนไซม์ระบบ EST ในการตรวจสอบลักษณะที่ผิดปกติ ของหน้าวุ้นพันธุ์เซเนตที่ได้จากการจุ่มแช่ชิ้นส่วนข้อในสาร ละลาย EMS พบว่า เอนไซม์ระบบ EST สามารถแยก ความแตกต่างระหว่างลักษณะที่ผิดปกติที่เกิดจากการจุ่ม แช่ EMS กับไม่จุ่มแช่ EMS ได้ เช่นเดียวกับเครือมาศ (2547) ใช้เอนไซม์ระบบ EST ในการตรวจสอบความผัน แปรของนมตำเลียที่เกิดจากการจุ่มแช่ชิ้นส่วนข้อใน สารละลาย EMS พบว่า เอนไซม์ระบบ EST สามารถแยก ความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่กับไม่จุ่มแช่ EMS ได้

สรุป

การจุ่มแช่ PLBs กล้วยไม้เหลืองจินทบูรในสาร ละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันคือ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1% เป็นเวลา 60 และ 90 นาที มีผลทำให้ PLBs มีสีซีดลงไปจากเดิมในทุกระดับความเข้มข้น ยกเว้นชุด ควบคุม และที่ความเข้มข้น 0.8% นาน 90 นาที ให้อัตรา การรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) ภายหลังเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน พบว่า PLBs กล้วยไม้เหลืองจินทบูรที่ไม่จุ่มแช่ใน สารละลาย EMS ให้อัตราการสร้างยอดสูงสุดคือ 15% ในขณะที่ทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความ เข้มข้น 0.75 และ 1% ให้อัตราการสร้างยอดต่ำสุดคือ 2% เมื่อพิจารณาจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน พบว่า ทรีต เมนต์ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 1% นาน 90 นาที ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนสูงสุดคือ 12 ยอด ต่อชิ้นส่วน ภายหลังย้ายเพื่อชักนำให้เกิด PLBs ชุดใหม่ ครั้งที่ 2 (M1R2) พบว่า ที่ EMS ความเข้มข้น 1% นาน 60 นาที เกิดลักษณะผิดปกติ คือ เกิดลักษณะต้นเผือก 10% และที่ความเข้มข้น 1% นาน 90 นาที เกิดอาการใบต่าง 3 ลักษณะ คือ ต่างบางส่วนของใบ (sectorial) ต่างตรงกลาง ใบ (mericlinal) และ ต่างบริเวณขอบใบ (periclinal) เป็น จำนวน 5, 15 และ 11% ตามลำดับ เมื่อนำลักษณะที่ ผิดปกติไปตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคไอโซไซม์ พบว่า สีย้อมระบบเอนไซม์เอสเตอเรส ให้การติดสีและการ

กระจายตัวของแถบเอนไซม์ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยในชุดควบคุมมีรูปแบบเอนไซม์ 4 โซน คือ EST1, EST2, EST3 และ EST4 แต่ในโซน EST3 มีแถบเอนไซม์เพียง 3 แถบ ในขณะที่ต้นกล้วยไม้ที่มีลักษณะใบต่างเป็นบางส่วนของใบ ต่างตรงกลางใบ และต่างบริเวณขอบใบ มีรูปแบบเอนไซม์ 4 โซน คือ EST1, EST2, EST3 และ EST4 โดยที่ EST3 มี 4 แถบเอนไซม์ ส่วนลักษณะต้นเผือก มีรูปแบบเอนไซม์ 4 โซน คือ EST1, EST 2, EST3 และ EST4 โดยที่ EST3 มี 2 แถบเอนไซม์

เอกสารอ้างอิง

- เครือมาศ รอดบน. 2547. ผลของอีเอ็มเอสต่อการเจริญ และการผันแปรของนมตำเลียในหลอดทดลอง. รายงานการฝึกงานภาคสนามพืชศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 25 หน้า
- ธัญญาพร สุสานนท์. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหน้าวัว (*Anthurium* spp.). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 57 หน้า.
- ปณัย เรืองสังข์. 2547. ผลของ EMS และ Colchicine ต่ออัตราการรอดชีวิตและการเพิ่มชุดโครโมโซมของข้อหน้าวัวพันธุ์โชเนต. รายงานการฝึกงานภาคสนามพืชศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 20 หน้า.
- วชิรพงศ์ หวลบุตรตา. 2548. คู่มือคนรักต้นไม้: กล้วยไม้ไทย. สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ. 96 หน้า.
- วัชรินทร์ ชินกวิน และ กัณยารัตน์ สุไพฑูรย์วัฒน์. 2548. การทดสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายที่ชักนำให้กลายพันธุ์และเกิดการแปรปรวนสายพันธุ์ผ่านโปรโตพลาสต์. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ. 10 หน้า.
- ศิริลักษณ์ อินทวงค์ วิวัฒน์ บัณฑิตย์ ณัฐา ควร ประเสริฐ และ พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์. 2549. การเปรียบเทียบแบบแผนไอโซไซม์และเครื่องหมายอาร์เอพีดีเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเอื้องสายสามสีและเอื้องสายแข็ง. วารสารสงขลานครินทร์ วท. 28(3): 531-537.
- สมปอง เตชะโต. 2541. การชักนำการกลายพันธุ์ในมังคุด: การตรวจสอบความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ต่อความสามารถในการสร้างแคลลัส. วารสารแก่นเกษตร 26: 184-194.
- สมปอง เตชะโต และ วิทยา พรหมมี. 2542. การชักนำการกลายพันธุ์มังคุด: ผลของสิ่งก่อกลายพันธุ์ต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และเนื้อเยื่อวิทยา. วารสารสงขลานครินทร์ วท. 21: 17-24.
- สกุลรัตน์ แสนปตะวงศ์. 2548. เทคนิคการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูร. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 71 หน้า.
- สำนักงานทางหลวงชนบทจังหวัดจันทบุรี. 2547. ราชมงคลรักษ์เหลืองจันทร์ ครั้งที่ 6. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: <http://www.dor.go.th/~chanburi/news/detail.php?No=3> (25 มิถุนายน 2550).
- Ahloowalia, B.S. and M. Maluszynski. 2001. Induced mutations - a new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118: 167-173.
- Arditti, J. and R. Ernst. 1993. Micropropagation of Orchids. John Wiley and Sons, Inc., New York. 682 pp.
- Bhagwat, B. and E. J. Duncan. 1998. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using chemical mutagens. *Scientia Horticulturae* 73: 11-22.
- Koh, Y.C. and F.T. Davies. 2001. Mutagenesis and *in vitro* culture of *Tillandsia fasciculata* Swartz var. *fasciculata* (Bromeliaceae). *Scientia Horticulturae* 87: 225-240.
- Nuamjaroen, P. 1998. Ethylmethanesulphonate induced variation and somaclonal variation of Safflower (*Carthamus tinctorius* Linn.)

- tissue culture. M.Sc. Thesis. Chulalongkorn University, Bangkok. 112 pp.
- Sanchez, M.I. 1988. Micropropagation of *Cyrtopodium* (Orchidaceae) through root tip culture. *Lindleyana* 3: 93-96.
- Singh, K. P., B. Singh, S. P. S. Raghava and C. S. Kalia. 2000. Induced flower colour mutations in carnation through *in vitro* application of chemical mutagen. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 60: 535-539.
- Wongsawad, P., C. Wongsawad, S. Mahadtanapuk, S. Kantawong, P. Chariyavidhawatt and T. Paratasilpin. 2005. Mutation in rice using ethyl methanesulphonate. Paper presented at 31st Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October 2005, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima.
-