นิพนธ์ต้นฉบับ

การกลายพันธุ์ของดอกหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโนที่ผ่านการชักนำด้วยเอทิลมีเทนซัลโฟเนต

สมปอง เตชะโต[1] และ ธัญญาพร สุสานนท์[2]

Abstract

Te-chato, S. and Susanon, T.

Floral mutation in anthurium cv. valentino after induction by ethylmethane sulfonate

Songklanakarin J. Sci. Technol., Dec. 2005, 27(Suppl. 3) : 675-682

Meristematic nodular calli of anthurium cv. valentino were treated with ethylmethane sulfonate (EMS) at various concentrations for 90 min in order to find the optimum concentration (LD_{50}). Plantlets regenerated from treated calli were grown in the field until flowering. During this period morphological characteristics of the flower were investigated. The results revealed that EMS at concentration 0.5 and 0.75% gave survival percentages of the calli of 60 and 34%, respectively (LD_{50} = 0.62%). Treatment with EMS at 0.75% gave smaller size of spathe compare with the control having 14.2% yellow spadix. EMS at 1% gave 60% yellow spadix, whereas the control treatment gave pink spadix. Moreover, spadices from those treated with EMS were shorter with more erect angle (45-90º) than the control treatment (25º). Development of female flower was 0-50% (control treatment produced 100% female flower).

Key words : Anthurium, EMS, mutation

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand.

[1]Ph.D.(Plant Cell Technology) รองศาสตราจารย์ [2]นักศึกษาหลักสูตรวท.ม. สาขาวิชาพืชศาสตร์ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: sompong.t@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 24 มีนาคม 2548 รับลงพิมพ์ 16 พฤษภาคม 2548

บทคัดย่อ

สมปอง เตชะโต และ ธัญญาพร สุสานนท์

การกลายพันธุ์ของดอกหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโนที่ผ่านการชักนำด้วยเอทิลมีเทนซัลโฟเนต

ว. สงขลานครินทร์ วทท. ธ.ค. 2548 27(ฉบับพิเศษ 3) : 675-682

นำเมอริสเต็มมาติคโนดูลาแคลลัสของหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโนมาทรีตในสารละลายเอทิลมีเทนซัลโฟเนท (ethylmethane sulfonate; EMS) ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 90 นาที เพื่อตรวจหาความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นชักนำการสร้างพืชต้นใหม่แล้วนำไปปลูกตรวจสอบลักษณะการออกดอกในแปลงปลูก พบว่า EMS ความเข้มข้น 0.5 และ 0.75% ให้อัตรารอดชีวิตของโนดูลาแคลลัส 60 และ 34% ตามลำดับ (LD_{50} = 0.62%) EMS เข้มข้น 0.75% ให้ดอกขนาดเล็กกว่าชุดควบคุม และให้ปลีดอกสีเหลือง 14.2% ส่วน EMS เข้มข้น 1.0% ให้ลักษณะดังกล่าว 60% ในขณะที่ชุดควบคุมมีปลีดอกสีชมพู นอกจากนี้ยังพบว่าปลีดอกสั้นกว่า และทำมุมตั้งกว่า (ในช่วง 45°-90°) ชุดควบคุม (25°) พัฒนาการของเกสรตัวเมีย 0-50% ในขณะที่ชุดควบคุมมีการสร้างดอกตัวเมีย 100%

หน้าวัว (*Anthurium* sp.) ที่ปลูกเป็นการค้าแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มไม้กระถาง และกลุ่มตัดดอก สำหรับหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโนเป็นกลุ่มไม้กระถางที่มีลักษณะของจานรองดอกเป็นรูปหัวใจ สีแดงสดเป็นมัน ร่องน้ำตาค่อนข้างตื้น หูจานห่างกันเล็กน้อย ปลีดอกมีสีชมพูปลายสีแดง ปลีดอกค่อนข้างอยู่ในแนวระนาบ (แนบกับจานดอก)

มีรายงานผลสำเร็จการขยายพันธุ์หน้าวัวจากการเพาะเลี้ยงคัพภะ (Pierik *et al.*, 1974) ใบอ่อน (Pierik *et al.*, 1974; Pierik, 1976; Kuehnle and Sugii, 1991; ชะอ้อน, 2531; สมปอง และคณะ, 2545) การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่เกิดโดยกระบวนการออกาโนเจนิซิสผ่านการสร้างแคลลัสใช้ระยะเวลาในการพัฒนาแตกต่างกัน ขึ้นกับชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงและพันธุ์ที่นำมาเพาะเลี้ยง อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเป็นสูตรดัดแปลง Murashige และ Skoog (1962) โดยใช้ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักเพียงครึ่งเดียว ธาตุอาหารรอง ธาตุเหล็กและสารอินทรีย์คงเดิม เติม NAA (α-naphthaleneacetic acid) (ชะอ้อน, 2531) หรือ BAP (benzylaminopurine) 1 มก./ล. เพียงอย่างเดียว (Pierik, 1976) หรืออาจใช้ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) ร่วมกับ BA (Kuehnle และ Sugii, 1991) สมปอง และคณะ (2545) รายงานการชักนำเมอริสเต็มมาติคโนดูลาแคลลัสจากใบอ่อนในอาหารสูตรดัดแปลง MS เติม BA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก./ล. ทำการเพาะเลี้ยง 4 ขั้นตอน คือ (1) ชักนำแคลลัสในที่มืดเป็นเวลา 2-3 เดือน (2) เพิ่มปริมาณแคลลัสและชักนำยอดในอาหารสูตรเดิม (3) ส่งเสริมการยืดยาวและความแข็งแรงยอดในอาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (4) ตัดแยกยอดไปชักนำรากในอาหารสูตร ½MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และอนุบาลลงดินปลูก จากการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการตามขั้นตอนข้างต้นยังไม่พบการกลายพันธุ์เกิดขึ้น

ในกระบวนชักนำการกลายพันธุ์พืชในหลอดทดลองทำโดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางฟิสิกส์ หรือการใช้สารเคมี เอทธิลมีเทนซัลโฟเนท (EMS) เป็นสารเคมีกลุ่ม alkylating agent ที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง การกลายพันธุ์เกิดโดยปฏิกิริยา alkylation และ hydrolysis ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนไอออน (เคลื่อนย้ายหมู่ alkyl group) ระหว่างสารก่อกลายพันธุ์และส่วนประกอบภายในนิวคลีโอไทด์ของเซลล์เป้าหมาย ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของเบส (Kamra and Brunner, 1977 อ้างโดย FAO/IAEA Division of Atomic Energy in Food and Agriculture, 1977) มีรายงานการใช้ EMS ในการชักนำการกลายพันธุ์ในไม้ดอกไม้ประดับ เช่น คาร์เนชั่น (Singh *et al.*, 2000) กุหลาบ (Heslot, 1966 อ้างโดย Gottschaik and Wolff, 1983) ไม้ผล เช่น มังคุด (สมปอง และวิทยา, 2542) กล้วย (Bhagwat and Duncan, 1998) และพืชอื่น ๆ เช่น ข้าวบาร์เลย์ (Zhu *et al.*, 2003) *Camelina satina* (L.) (Nothdurft *et al.*, 1998) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ในหน้าวัวยังไม่มีรายงานการชักนำการกลายพันธุ์ในหลอดทดลอง

รายงานฉบับนี้แสดงการหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ EMS ต่อการชักนำการกลายพันธุ์ในหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโน ร่วมกับเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและตรวจสอบความแปรปรวนลักษณะทางสัณฐานของต้นที่ได้จากการทรีต เพื่อพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์หน้าวัวกระถางต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุพืช

ในการศึกษานี้ใช้เมอริสเต็มมาติคโนดูลาแคลลัสของหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโน แคลลัสดังกล่าวได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนในที่มืดบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง เติม BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 3 สัปดาห์

สูตรอาหารและการเตรียม

ใช้อาหารเพาะเลี้ยงหน้าวัว 3 สูตรคือ

1. สูตรชักนำแคลลัส และเพิ่มปริมาณ เป็นอาหารสูตร MS ดัดแปลงองค์ประกอบ และปริมาณมีหน่วยเป็น มก./ล. ดังนี้คือ NH_4NO_3 825, KNO_3 950, KH_2PO_4 85, H_3BO_3 6.2, KI 0.83, $MnSO_4 1H_2O$ 22.3, $ZnSO_4 7H_2O$ 8.6, $CuSO_4 5H_2O$ 0.25, $Na_2MoO_4 2H_2O$ 0.25, $CoCl_2 6H_2O$ 0.25, $CaCl_2 2H_2O$ 440, $MgSO_4 7H_2O$ 370, $FeSO_4 7H_2O$ 13.9, Na_2EDTA 18.65, myo-innositol 100, nicotinic acid 0.5, pyridoxine-HCl 0.5, thiamine-HCl 0.1, glycine 2 และ adenine sulfate 0.1 สูตรอาหารดังกล่าวเติม BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก./ล.

2. สูตรอาหารเพิ่มความแข็งแรงของลำต้น เป็นอาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

3. สูตรอาหารชักนำราก เป็นอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่งของสูตรปกติ ($\frac{1}{2}$ MS) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

สูตรอาหารทั้งหมดเติมน้ำตาลซูโครส 3% ผงวุ้นตรานางเงือก 0.7% ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.8 ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.05 กก./ตร.ซม. อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

การทรีตด้วยเอธิลมีเทนซัลโฟเนต

เตรียม EMS 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) โดยการดูดสารละลายเข้มข้น EMS (100%) มา 1 มล. เติมลงไปในสารละลายอาหารสูตรที่ 1 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญการเติบโต ปริมาตร 99 มล. กรองด้วยกระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาด 0.22 ไมครอน ใส่ฟลาสค์ปริมาตร 125 มล. ฟลาสค์ละ 50 มล. การกรองสารทำในตู้ไบโอฮาซาด ในทำนองเดียวกับการเตรียม EMS เข้มข้น 0.25 0.50 และ 0.75% จากนั้นรวบรวมเมอริสเต็มมาติคโนดูลาแคลลัสมาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ในสัดส่วน 25 แคลลัส ต่อสารละลาย EMS 25 มล. นำไปวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบ/นาที นาน 90 นาที หลังจากนั้นแยกโนดูลาแคลลัสออกไป ล้างด้วยอาหารเหลวสูตรที่ 1 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วหลาย ๆ ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองอบฆ่าเชื้อ นำไปชักนำยอดด้วยอาหารเหลวสูตรที่ 1 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 60 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 26±2°C ให้แสง 14 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์

1. ผลของเอทิลมีเทนซัลโฟเนตต่อการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสหน้าวัว

เก็บรวบรวมเมอริสเต็มมาติคโนดูลาแคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนอายุ 3 สัปดาห์ มาทรีตด้วย EMS ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1% แต่ละความเข้มข้นใช้เวลาในการทรีตนาน 90 นาที หลังจากนั้นล้างสารละลาย EMS ส่วนเกินออก ย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 เป็นเวลา 14 วัน บันทึกอัตรารอดชีวิตของแคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ EMS โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test) แต่ละความเข้มข้นของ EMS ทำ 4 ซ้ำ (แต่ละซ้ำประกอบด้วย 1 ฟลาสค์ที่บรรจุ EMS 25 มล. และแคลลัส 25 ชิ้น)

2. การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

หลังจากศึกษาอัตรารอดชีวิตของแคลลัสแล้วย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม (สูตรที่ 1) เพื่อส่งเสริมการสร้างยอด ย้ายกลุ่มยอดไปเพิ่มความแข็งแรงใน

อาหารสูตรที่ 2 และเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 เดือน (ย้ายเลี้ยงเดือนละครั้ง) จากนั้นตัดแยกยอดเดี่ยว ๆ ในแต่ละความเข้มข้นของ EMS ไปชักนำรากในอาหารสูตรที่ 3 เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ย้ายต้นกล้าที่สมบูรณ์ลงถาดหลุมที่บรรจุเปลือกมะพร้าวสับผสมดินปลูกและเวอร์มิคิวไลท์ในสัดส่วน 1:1:1 ดูแลภายใต้การให้ความชื้นสูง เมื่อตั้งตัวได้จึงย้ายลงกระถางปลูก ดูแลในเรือนระแนงที่พรางแสง 50% ภายใต้การให้น้ำวันละ 2 ครั้ง ให้ปุ๋ยสูตรเสมอ 15-15-15 เดือนละครั้งร่วมกับปุ๋ยละลายช้าออสโมโคท หลังจากปลูกและดูแลในสภาพดังกล่าวเป็นเวลา 1 ปี ต้นหน้าวัวเริ่มมีการสร้างดอก จึงตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานของดอกดังนี้ คือ ขนาดและสีของจานดอก ขนาด สีและมุมของปลีดอก การผลิตดอกเพศผู้และเพศเมีย เปรียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ EMS

ผลการทดลอง

1. ผลของเอทิลมีเทนซัลโฟเนตต่อการรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสหน้าวัว

ภายหลังนำโนดูลาแคลลัสหน้าวัวมาทรีตในสารละลาย EMS ในระดับความเข้มข้นต่างกัน นาน 90 นาที ส่งผลให้แคลลัสมีลักษณะต่างกันคือ EMS เข้มข้น 1.0% ทำให้แคลลัสซีดจางที่สุด ในขณะที่ความเข้มข้น 0 และ 0.25% โนดูลาแคลลัสยังคงเป็นสีเขียวอยู่ และเมื่อตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของแคลลัส พบว่า EMS เข้มข้น 0 0.25 0.50 0.75 และ 1% ให้อัตราการรอดชีวิต 100 86.22 60.14 34.06 และ 7.98% ตามลำดับ (Table 1)

และเมื่อนำมาหาค่าระดับความเข้มข้น EMS ที่ให้อัตรารอดชีวิต 50% (LD_{50}) พบว่าความเข้มดังกล่าวคือ 0.62% (อยู่ในช่วงช่วงระหว่าง 0.5-0.75%) (Figure 1)

2. การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สีของปลีดอก หน้าวัวในหน่วยทดลอง เปรียบเทียบและที่ทรีต EMS เข้มข้น 0.25% มีเฉพาะปลีของดอกสีแดงเช่นเดิม 100% เท่ากัน ในขณะที่ EMS เข้มข้น 0.50% ให้ปลีสีแดงและเหลืองเท่ากันคือ 50% ส่วน EMS เข้มข้น 0.75% ให้ปลีสีเหลือง 14.2 สีเหลืองเข้ม 71.42% และ EMS เข้มข้น 1.0% มีปลีสีเหลือง 60% สีเหลืองเข้ม 20% (Table 2)

ความสูงของปลี หน่วยทดลอง เปรียบเทียบ และ EMS เข้มข้น 0.25% มีขนาดของปลีดอกเท่ากับจานรองดอกจำนวน 100% ในขณะที่ EMS เข้มข้น 0.50 และ 1.0% มีความสูงของปลี 1/2-3/4 ของจานรองดอก 100% แต่ EMS เข้มข้น 0.75% มีความสูงของปลีดอกเท่ากับจานรองดอก 42.85% และปลีสูงขนาด 1/2-3/4 ของจานรองดอก 28.5% (Table 2)

Table 1. Survival percentage of nodular callus of anthurium cv. Valentino after treated with EMS for 90 min and cultured on regeneration medium for 2 weeks.

Concentration of EMS (%)	Survival percentage
0 (Control)	100a
0.25	86.22b
0.50	60.14c
0.75	34.06d
1.0	7.98e
F-test	**
C.V. (%)	11.39

Means within column followed by different letter are significantly different at p<0.01

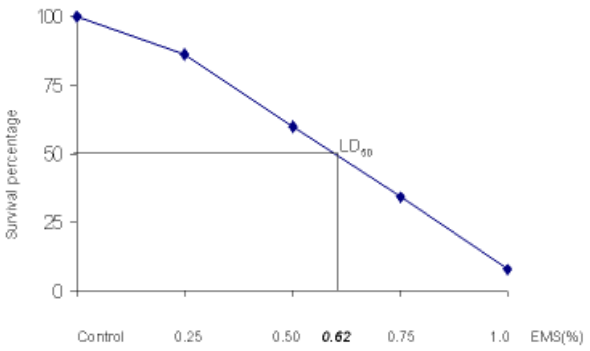

Figure 1. Survival percentage of nodular callus of anthurium cv. Valentino treated by various concentrations of EMS for 90 minutes.

Table 2. Floral morphology of regenerant anthurium cv. Valentino after treating nodular callus with 0.25-1.0% EMS. Regenerants were raised in lath-house for 12 months.

Floral morphology		Conc. of EMS (%)				
		Control	0.25	0.50	0.75	1.0
Color of spadix	Red (100%)	6/6(100)	4/4(100)	2/4(50)	0/7(0)	0/5(0)
	Yellow (100%)	0/6(0)	0/4(0)	0/4(0)-	1/7(14.28)	3/5(60)
	Yellow (50-85%)	0/6(0)-	0/4(0)-	0/4(0)-	5/7(71.42)	-0/5(0)
	Yellow (0-49%)	0/6(0)-	0/4(0)-	2/4(50)	0/7(0)-	1/5(20)
Height of spadix	Same	6/6(100)	4/4(100)	0/4(0)-	3/7(42.85)	0/5(0)-
(compare with spathe)	1/2-3/4 of spathe	0/6(0)-	0/4(0)-	4/4(100)	2/7(28.570	5/5(100)
Angle of spadix on spathe	0-25°	2/6(33.3)	0/4(0)	1/4(25)	2/7(28.57)	3/5(60)
	45°	3/6(50)	3/4(75)	3/4(75)	2/7(28.57)	1/5(20)
	90°	1/6(16.7)	0/4(0)	0/4(0)	1/7(14.28)	0/5(0)
Width of spathe	> 4 cm	6/6(100)	4/4(100)	0/4(0)	4/7(57.14)	0/5(0)
	2.5-3.5 cm	0/6(0)-	0/4(0)-	100	2/7(28.57)	5/5(100)

มุมของปลีดอก หน่วยทดลอง เปรียบเทียบ และ EMS เข้มข้น 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.0% มีปลีทำมุมขนาด 0-25 องศา กับจานรองดอก 33.3, 0 25, 28.57 และ 60% ตามลำดับ ปลีทำมุม 45° กับจานรองดอก 50, 75, 75, 28.57 และ 20% ตามลำดับ นอกจากนี้ มีปลีทำมุม 90° กับจานรองดอกเฉพาะในหน่วยทดลอง เปรียบเทียบ และ EMS เข้มข้น 0.75% เท่ากับ 16.7 และ 14.28% ตามลำดับ (Table 2)

ความกว้างของจานรองดอก หน่วยทดลอง เปรียบเทียบ และ EMS เข้มข้น 0.25% ให้ความกว้างของจานรองดอกมากกว่า 4 ซม. 100% เท่ากัน ส่วน EMS เข้มข้น 0.75% ให้ความกว้างของจานรองดอกมากกว่า 4 ซม. 57.14% EMS เข้มข้น 0.50, 0.75 และ 1.0% ให้ความกว้างของจานรองดอกระหว่าง 2.5-3 ซม. 100, 28.5 และ 100% ตามลำดับ ลักษณะดังกล่าวแสดงใน Table 2

การผลิตดอกตัวเมีย หน่วยทดลองมีการสร้างดอกตัวเมีย 100% EMS เข้มข้นสูงขึ้น ส่งผลให้การสร้างดอกตัวเมียลดลง EMS เข้มข้น 1.0% ยับยั้งการสร้างดอกตัวเมียได้ 100% (Figure 2) สำหรับจำนวนดอกเฉลี่ยที่สร้างต่อต้นนั้นไม่มีความแตกต่างกันมาก (1-1.75 ดอกต่อต้น) EMS เข้มข้น 0.75% ให้จำนวนดอกเฉลี่ยต่อต้น 1.75 ดอก สูงกว่าชุดเปรียบเทียบซึ่งให้ดอกเฉลี่ย 1.5 ดอก (Figure 3)

วิจารณ์

เมอริสเต็มมาติคโนดูลาแคลลัสที่ทรีตด้วย EMS ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ มีอาการซีดขาว (chorosis) อัตราการรอดชีวิตลดลง อาจเนื่องจากในการทรีตโนดูลาแคลลัสในสารละลาย EMS ภายใต้สภาพเขย่าเลี้ยงส่งผลให้โนดูลาแคลลัสสามารถดูดซึมสารละลาย EMS ได้ทั่วทั้งผิวแคลลัส สมปอง และวิทยา (2542) รายงานว่าภายในก้อนโนดูลาแคลลัสมังคุดประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญที่ยังมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง ดังนั้นเมื่อผ่านการทรีตสารละลาย EMS จึงทำให้โดนทำลายเป็นจำนวนมาก จากการศึกษานี้พบว่าแคลลัสในหน่วยทดลองที่ทรีตด้วย EMS เข้มข้น 1.0% และ 0.75% โดนทำลายและมีอาการดังกล่าวมากกว่าความเข้มข้น 0.5% และ 0.25% ดังนั้นเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงจึงมีอัตราการรอดชีวิตต่ำด้วยเช่นกัน เวลาในการทรีต EMS ก็มีความสำคัญ ในการศึกษานี้ไม่ได้ผันแปรเวลา เลือกใช้ที่ 90 นาที แต่อัตรารอดชีวิตยังคงสูงกว่า 50% เมื่อใช้ความเข้มข้น 0.25-0.5% ในขณะที่แคลลัสมังคุดทนต่อความเข้มข้น EMS ความเข้มข้นดังกล่าวด้วยเวลาเพียง 15-30 นาที Lee และ Lee (2002) รายงานการชักนำการกลายพันธุ์ของข้าวโดยใช้แคลลัสที่ชักนำได้จากละอองเกสร มาทรีตด้วย EMS ความเข้มข้น 0.5% (ปริมาตร/ปริมาตร) 10 และ 20 วัน

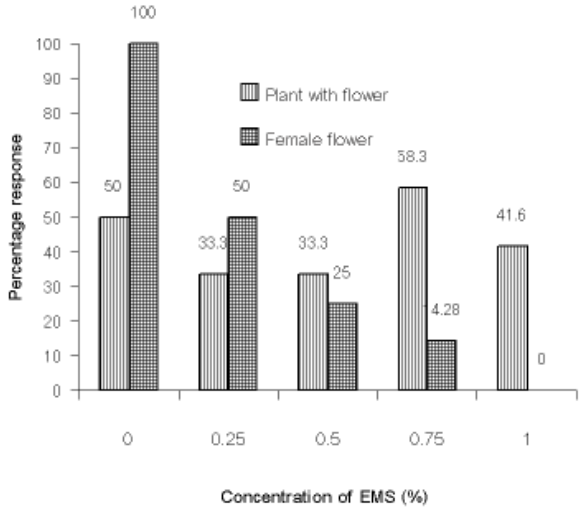

Figure 2. Percentage of plant with flowers, female and male flowers on spadix of regenerated anthurium treated with various concentrations of EMS.

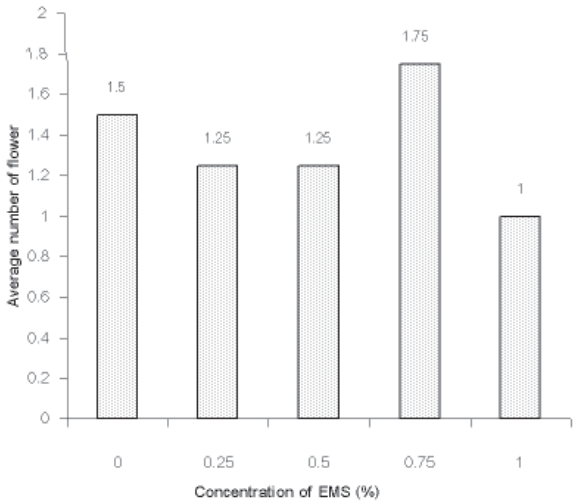

Figure 3. Average number of flowers per plant of anthurium cv. Valentino after treating with various concentrations of EMS.

Figure 4. Floral morpholgy of regenerant anthurium cv. Valentino treated by EMS at various concentrations.

พบว่ามีอาการ chlorosis ที่รุนแรง และได้แคลลัสที่มีลักษณะเผือกมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นและระยะเวลาดังกล่าวส่งเสริมการกลายพันธุ์ในข้าวโพดได้ จากการศึกษานี้พบว่า EMS เข้มข้น 0.62% (ปริมาตร/ปริมาตร) มีผลในการยับยั้งการพัฒนาของโนดูลาแคลลัส 50% ความเข้มข้นดังกล่าวสร้างความเสียหายและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับหน่วยพันธุกรรมอย่างน้อย 50% (LD_{50}) ค่านี้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชิ้นส่วน และอายุของชิ้นส่วนพืชที่นำมาทรีต ระยะเวลาในการทรีต และความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการทรีต (สิรนุช, 2540) Gahukar และ Jambhale (2000) พบว่าในการทรีตแคลลัสอ้อย อายุ 15 วัน หลังการย้ายเลี้ยงในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.02% นาน 24 ชั่วโมง ให้อัตรารอดชีวิตของแคลลัส 50% หากเป็นชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยในหลอดทดลอง อายุ 4 สัปดาห์ ค่า LD_{50} ของ EMS คือความเข้มข้น 300 มิลลิโมลลาร์ นาน 30 นาที (Bhagwat and Duncan, 1998)

จากการศึกษาการทรีต EMS เข้มข้น 1.0% กับหน้าวัวพันธุ์โซเนตในรุ่นที่ 1 (M1R1) พบใบมีอาการด่าง 3 ลักษณะ คือ ด่างเป็นบางส่วนของใบ ด่างทั้งใบ และด่างกระจายทั่วใบ นอกจากนี้ใบหน้าวัวที่ทรีตด้วย EMS เข้มข้น 0.75% ยังพบรูปร่างของใบแตกต่างไปจากลักษณะเดิมคือ ใบติดกันเป็นจีบ และใบบิดเบี้ยว ซึ่งลักษณะผิดปกติเหล่านี้เกิดขึ้นเพียงรุ่นเดียว (ธัญญาพร และสมปอง, 2547) ความผิดปกติของลักษณะทางสัณฐานที่พบในพันธุ์วาเลนติโนในระหว่างที่เลี้ยงดูในเรือนระแนงมี 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือขนาด รูปร่างของใบ (ธัญญาพร และสมปอง, 2547) และดอก การกลายของลักษณะดอกที่เห็นได้ชัดเจนคือปลีดอกที่เปลี่ยนจากสีชมพู-แดง เปลี่ยนเป็นสีเหลืองบางส่วน (ไคเมอรา) จนถึงสีเหลืองทั้งปลี (กลายพันธุ์อย่างสมบูรณ์) การกลายพันธุ์ในลักษณะดังกล่าวยังไม่มีรายงานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือการชักนำการกลายพันธุ์ในหลอดทดลองในหน้าวัวมาก่อน การกลายพันธุ์ในลักษณะสีของปลีดอก อาจเป็นการเปลี่ยนแปลงในระดับเบส โดยเบสตัวใดตัวหนึ่งเปลี่ยนแปลงไปในรูปแบบที่เรียกว่า point mutation และเบสดังกล่าวควบคุมการสร้างกรดอะมิโนหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวกับวิถีการสร้างรงควัตถุแอนโธไซยานินหรือเบตาไซยานิน ซึ่งเป็นลักษณะคุณภาพ ควบคุมโดยยีนน้อยคู่ ไม่มีความซับซ้อนในการแสดงออก เมื่อพิจารณาถึงการสร้างดอกตัวเมียพบว่าสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS เข้มข้น 1% ยับยั้งการสร้างดอกตัวเมีย 100% จากการศึกษาถึงผลของสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่ผ่านมา คงมีเพียงรายงานการเป็นหมันของเพศผู้ (FAO/IAEA, 1977) สำหรับความผิดปกติของการสร้างเกสรตัวเมีย อาจมีสาเหตุมาจากผลของ EMS ต่อความเสียหายทางสรีรวิทยา ซึ่งอาจเกิดในรุ่นแรก อย่างไรก็ตาม หากมีการถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปก็เป็นผลมาจากยีน (สิรนุช, 2540) ในขณะนี้กำลังติดตามลักษณะดังกล่าวในแปลงปลูกอยู่และใช้เทคนิคการตรวจสอบทางชีวเคมี และทางชีวโมเลกุล เพื่อตรวจสอบลักษณะดังกล่าวที่เป็นผลมาจากการกลายพันธุ์โดย EMS ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ชะอ้อน หิรัญรัตน์. 2531. การขยายพันธุ์หน้าวัวโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธัญญาพร สุสานนท์ และสมปอง เตชะโต. 2547. การชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้เอทิลมีเทนซัลโฟเนตในหน้าวัวพันธุ์โซเน็ต. ว. วิทย. กษ. 35:37-41.

วชิรพงศ์ หวลบุตตา. 2545. คู่มือคนรักต้นไม้ “หน้าวัว”. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้าน และสวน. 95 หน้า.

สมปอง เตชะโต, สมัชชา นาคสมบัติ และ จารุวรรณ บุญศิริ. 2545. ผลของพันธุ์ และชิ้นส่วนต่อการสร้างแคลลัสและการขยายพันธุ์หน้าวัวด้วยวิธีไมโครพรอพาเกชัน. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 15: 569-578.

สมปอง เตชะโต และวิทยา พรหมมี. 2542. การชักนำการกลายพันธุ์มังคุด: การตอบสนองของชิ้นส่วนพืชต่อสิ่งก่อกลายพันธุ์. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 21: 25-31.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 74-79.

Bhagwat, B. and Duncan, E. J. 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.

FAO/IAEA Division of Atomic Energy in Food and Agriculture. 1977. Manual on Mutation Breeding. Vol. 119, pp. 51-78. Vienna: International Atomic Energy Agency.

Gahukar, S.J. and Jambhale, N.D. 2000. Callus induction and regeneration in saccharum cultivars as influenced by mutagen treatments. J. Maharashtra Agric. Univ. 25: 219-220.

Gottschalk, W. and Wolff, G. 1983. Induce Mutation in Plant Breeding. Vol. 7, New York: Springer Verlag.

Kuehnle, A.R. and Sugii, N. 1991. Callus induction and plantlet regeneration in tissue culture of Hawaiian *Anthurium*. HortScience 26: 919-921.

Lee, J.H. and Lee, S.Y. 2002. Selection of stable mutants cultured rice anthers treated with ethyl methanesulfonic acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71: 165-171.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Nothdurft, B.A., Schuster, A. and Friedt, W. 1998. Breeding for modified fatty acid composition via experimental mutagenesis in *Camelina sativa* (L.) Crtz. Ind. Crops and Products 7: 291-295.

Pierik, R.L.M. 1976. *Anthurium andraeanum* plantlet produced from callus tissue cultivated *in vitro*. Physiol. Plant. 37: 80-82.

Pierik, R.L.M., Leeuwen P. V. and Rigter, G.C.C.M. 1979. Regeneration of leaf explants of *Anthurium andraeanum* Linn. *In vitro*. Neth. J.Agric Sci. 27: 221-226.

Pierik, R.L.M., Steegmans, H.H.M. and Vander, M. 1974. Plantlets formation in callus tissue of *Anthurium andraeanum* Linn. Scientia Horticulturae 2: 193-198.

Singh, K.P., Singh, B., Raghava, S.P.S. and Kalia, C S. 2000. Induced flower colour mutations in carnation through *in vitro* application of chemical mutagen. Indian J. Genetics and Plant Breeding 60: 535-539.

Zhu, M.Y., Pan, J., Wang, L., Gu, Q. and Huang, C. 2003. Mutation induced enhancement of Al tolerance in barley cell lines. Plant Sci. 164: 17-23.