บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของความยาววัน ความเข้มแสง และอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและการออกดอก

การศึกษาผลของความยาววันที่มีต่อการเจริญเติบโตและการออกดอกของอังกาบแสดงให้เห็นว่าอังกาบพันธุ์สีม่วง ขาว และขาวแถบม่วง เป็นพืชวันสั้น (short day plant) เนื่องจากต้นที่เจริญเติบโตตามธรรมชาติในช่วงเดือนกุมภาพันธุ์ถึงตุลาคม ซึ่งเป็นวันยาวของประเทศไทย ไม่สามารถออกดอกได้แต่ต้นที่ปลูกภายใต้กรรมวิธีให้ได้รับแสงธรรมชาติ 8 ชั่วโมง (มืด 16 ชั่วโมง) พบว่า สามารถออกดอกได้ การที่พืชวันสั้นสามารถออกดอกได้เมื่อได้เมื่อได้รับวันสั้นนั้นเนื่องมาจากพืชต้องการช่วงมืดที่ยาว ช่วงมืดมีผลต่อระดับของ Pfr โดย Pfr จะลดปริมาณลงในความมืด แต่เมื่อได้รับแสงในระหว่างช่วงมืดจะทำให้ Pfr เกิดมากขึ้นอีก และจะไประงับการออกดอกได้ ดังนั้นกระบวนการออกดอกของพืชวันสั้นต้องการ Pfr ต่ำ ซึ่งอาจจะสร้างสารกระตุ้นการออกดอก (florigen) ในช่วงมืด (สมบุญ, 2536) ต้นที่ได้รับแสงในช่วงกลางของช่วงมืด (night break) จะมีการเจริญเฉพาะ ทางด้านลำต้นกิ่งและใบเท่านั้น ไม่สามารถออกดอกได้ การได้รับช่วงมืดเพื่อการออกดอกนี้จะต้องต่อเนื่องกันตลอด ซึ่งการทำลายคุณสมบัติในการออกดอกได้ดีที่สุดเมื่อให้แสงในช่วงกึ่งกลางของช่วงมืด การให้แสงในช่วงกลางของช่วงมืดเป็นระยะเวลาสั้นๆ โดยอาจสั้นเพียง 1-2 วินาที ที่เรียกว่า night break ก็สามารถลบล้างความสามารถในการออกดอกของพืชวันสั้นได้ (ดนัย, 2537) ส่วนอังกาบพันธุ์สีแดงเป็นพืชที่ไม่ตอบสนองต่อความยาววัน (day neutral plant) และยังพบว่าการได้รับแสงจากหลอดไฟต่อจากแสงธรรมชาติ 3 ชั่วโมง (16.00 น.-19.00 น.) ก่อนสว่าง 3 ชั่วโมง (05.00น.- 08.00 น.) หรือมีช่วงมืดติดต่อกันนาน 11 ชั่วโมง ก็สามารถชักนำให้อังกาบพันธุ์สีม่วง ขาว และขาวแถบม่วง ออกดอกได้ แต่จะออกดอกช้ากว่าต้นที่ได้รับช่วงมืด 16 ชั่วโมง (ได้รับแสงธรรมชาติ 8 ชั่วโมง) นั้นเป็นผลเนื่องมาจากการมีช่วงมืดที่ยาวนานติดต่อกันและเพียงพอสำหรับการบังคับให้ Pfr อยู่ในระดับต่ำ

ความเข้มแสงมีผลต่อการเจริญเติบโตและการออกดอกของอังกาบทั้ง 4 พันธุ์ โดยพบว่าพันธุ์สีม่วง ขาว และ ขาวแถบม่วง ตอบสนองต่อความเข้มแสงเหมือนกันคือ เมื่อต้นได้รับความเข้มแสงเพิ่มขึ้น (1,500 5,000 และ 25,000 ลักซ์) ความสูงต้นเพิ่มจะขึ้นตามลำดับ แต่เมื่อให้ความเข้มแสงสูงมากๆ (65,000 ลักซ์) ความสูงต้นกลับลดลง ซึ่ง อักษร (2529) กล่าวว่า เมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้นการสังเคราะห์แสงจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วยส่งผลให้มีการสร้างอาหารและสะสมภายในต้นมากจึงทำให้ต้นมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นแต่เมื่อได้รับความเข้มแสงเพิ่มขึ้นถึงจุดๆหนึ่งแล้วการสังเคราะห์แสงจะไม่เพิ่มอีกต่อไป Simbolon and Sutarno (1989) ศึกษาการตอบสนองต่อ

ความเข้มแสงของต้น Amaranthus 7 ชนิด พบว่าต้นที่ได้รับความเข้มแสงปานกลาง (8,000-9,000 ลักซ์) มีความสูงต้นมากกว่าต้นที่ได้รับความเข้มแสงสูง (42,000-69,000 ลักซ์) ส่วนต้นที่ได้รับความเข้มแสงต่ำ (800-1,500 ลักซ์) มีการเจริญเติบโตไม่ดี ส่วนในพันธุ์สีแดง พบว่า ต้นที่ปลูกภายใต้สภาพความเข้มแสงต่ำมีความสูงต้นเพิ่มขึ้นมากกว่าต้นที่ปลูกภายใต้สภาพความเข้มแสงสูง ในสภาพที่ความเข้มแสงต่ำเกินไป จะทำให้ต้นยืดยาวเก้งก้างและมีจำนวนใบน้อย (Tresho, 1970) โดยทั่วไปแสงจะยับยั้งการยืดตัวของของลำต้น การเพิ่มความเข้มแสงให้แก่พืชมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างคือ ลำต้นหนาขึ้นมีการเจริญของเนื้อเยื่อลำเลียงดีขึ้น มีข้อปล้องสั้นลงพื้นที่ใบลดลงแต่หนาขึ้น (จินดา, 2524) ขณะเดียวกันหากพืชได้รับแสงไม่เพียงพอจะทำให้ ต้นมีสีซีด ลำต้นยืดยาว ใบขยายใหญ่ผิดปกติ (สนั่น, 2523) และถ้าพืชได้รับแสงที่มีความเข้มสูงมากเกินไป อุณหภูมิของใบก็จะสูงด้วยซึ่งจะเป็นอันตรายส่งผลทำให้ใบไหม้ได้ (Hartmanm *et al.*, 1988) อังกาบทั้ง 4 พันธุ์ เมื่อได้รับความเข้มแสงเพิ่มขึ้นจะมีจำนวนกิ่งแขนงเพิ่มขึ้นและต้นที่ได้รับความเข้มแสงสูง 65,000 ลักซ์ จะออกดอกเร็วกว่าและมีจำนวนดอกมากกว่าต้นที่ได้รับความเข้มแสงต่ำ

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตและการออกดอกของอังกาบ ในครั้งนี้พบว่า อุณหภูมิกลางวันที่แตกต่างกันเพียง 3 °ซ ไม่ส่งผลให้เกิดความแตกต่างในด้านของ ความสูงต้น และจำนวนใบ แต่การให้อุณหภูมิต่ำในเวลากลางวัน (8.00 น.-16.00 น.) ร่วมกับการให้อุณหภูมิต่ำในเวลากลางคืน (19.00 น. - 04.00 น.) สามารถชักนำให้อังกาบออกดอกได้ Whealy *et al.* (1987) รายงานว่าอุณหภูมิกลางคืนมีผลต่อการสร้างจุดกำเนิดดอกและการพัฒนาของดอก *Helipterum roseum* และ *Helipterum bracteatum* โดยพบว่าอุณหภูมิที่ 15 °ซ เหมาะสมต่อการสร้างจุดกำเนิดดอกและการพัฒนาของดอก อุณหภูมิต่ำมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของฮอร์โมนภายในพืช ทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโตทางกิ่งใบ และมีผลกระตุ้นการออกดอกได้ถ้าสภาพอื่นๆ เหมาะสม เช่น มีอาหารสะสมเพียงพอ อุณหภูมิกลางคืนมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของพืชเนื่องจากการเจริญเติบโตของพืชส่วนใหญ่เกิดขึ้นในเวลากลางคืน ในสภาพกลางคืน เซลล์จะมีความเต่งไม่สูญเสียน้ำ มีการหายใจช้าลง การเผาผลาญอาหารไม่สูงเกินไปสารสังเคราะห์จึงมีเหลือสะสม ดังนั้นอุณหภูมิต่ำในเวลากลางคืนจึงทำให้มีการลำเลียงอาหารจากแหล่งสังเคราะห์ไปสู่แหล่งที่มีการเจริญเติบโต (พีรเดช ,2529 ; จินดา, 2524)

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตและการออกดอกของอังกาบในครั้งนี้ผลการทดลองที่ได้ยังไม่ชัดเจนอาจเป็นเพราะการตั้งกรรมวิธีการทดลองที่อุณหภูมิไม่แตกต่างกันมากนักเพราะไม่สามารถปรับอุณหภูมิของเครื่องปรับอากาศให้ต่ำไปกว่านี้และเครื่องปรับอากาศที่ใช้มักจะหยุดทำงานจนบางครั้งอุณหภูมิในห้องทดลองจะขึ้นสูงกว่าที่กำหนดไว้และต้นอังกาบที่ได้จากการทดลองมีข้อปล้องยืดยาวและต้นที่สูงมากกว่าปกติอาจมีสาเหตุมาจากความเข้มแสง

ภายในห้องที่ทำการทดลองไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตเนื่องจากภายในห้องติดหลอดไฟแบบ fluorescent และ incandescent เมื่อวัดความเข้มแสงแล้วพบว่ามีเพียง 6,000 ลักซ์ ถึงแม้ความแตกต่างของอุณหภูมิที่ทำการศึกษาในแต่ละกรรมวิธี จะไม่มีผลต่อความสูงต้นและจำนวนใบ ของต้นอังกาบที่ทำการศึกษา แต่พบว่าอุณหภูมิที่ต่ำในเวลากลางคืนมีผลต่อการออกดอกของอังกาบ การปลูกเลี้ยงอังกาบในสภาพบรรยากาศดัดแปลงที่ให้อุณหภูมิกลางคืนต่ำ 23 °ซ ร่วมกับวันสั้นพบว่าสามารถชักนำให้อังกาบออกดอกนอกฤดูได้เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ปลูกเลี้ยงตามสภาพธรรมชาติในช่วงเดือน เม.ย.-มิ.ย.

การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมตัวเองและผสมข้าม

การผสมพันธุ์อังกาบ 4 พันธุ์ 2 ชนิด แบบพบกันหมด 16 คู่ พบว่า ผสมสำเร็จเพียง 4 คู่ ได้แก่ ม่วงxแดง ขาวxแดง ขาวแถบม่วงxแดง และ แดงผสมตัวเอง

การผสมตัวเองของพันธุ์สีแดง มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดมากที่สุด 62.4 เปอร์เซ็นต์ และฝักที่ได้จากการผสมสามารถพัฒนาได้จนฝักแก่แล้วแตกและให้เมล็ดที่สมบูรณ์ ลูกผสมที่เกิดจากการผสมตัวเองดังกล่าว มีลักษณะดอก สีดอก รูปร่างใบ และทรงพุ่ม เหมือนกับต้นพ่อแม่

คู่ผสมข้ามที่ผสมติดล้วนแต่มีต้นพ่อเป็นพันธุ์ R สำหรับคู่ผสมข้ามอื่นๆ ที่ผสมไม่ติด อาจมีสาเหตุมาจาก ละอองเกสรของพันธุ์ V, W และ WV ที่ใช้ผสมเป็นหมันหรือไม่มีชีวิต เพราะจากการศึกษาละอองเกสรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีลักษณะแบนต่างจากลักษณะของพันธุ์ R ที่มีรูปกลม และจากการศึกษาการงอกของหลอดละอองเกสรพบว่า ละอองเกสรของอังกาบพันธุ์สีแดงเพียงพันธุ์เดียวเท่านั้น ที่สามารถงอกหลอดละอองเกสรในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงได้และไม่พบการงอกหลอดละอองเกสรในพันธุ์สีม่วง ขาว และขาวแถบม่วง อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาสาเหตุที่แท้จริงของการไม่งอกดังกล่าว อนึ่งจากการสังเกตการออกดอกของอังกาบทั้ง 4 พันธุ์ ในสภาพธรรมชาติ พบว่า พันธุ์ V, W และWV ไม่ติดเมล็ด ขยายพันธุ์โดยการแตกกอหรือโน้มกิ่ง (ground layering) ส่วนพันธุ์ R ติดเมล็ดได้เองตามธรรมชาติ

การศึกษาการงอกของหลอดละอองเกสรในซูโครส เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว แต่ผลของความมีชีวิตของละอองเกสรมักมีความถูกต้องน้อย (ผ่องพรรณ, 2538) ดังนั้นควรที่จะศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรโดยการย้อมสีละอองเกสรที่ยังไม่งอกด้วย 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, benzidine (ลาวัลย์, 2539) หรือด้วย acetocarmine (Trognitz, 1995) และ ศึกษาการงอกและเจริญของหลอดละอองเกสรในก้านชูเกสรตัวเมีย จะเป็นวิธีที่บอกความสามารถในการงอกของหลอดละอองเกสรได้ค่อนข้างถูกต้อง เนื่องจากเป็นการศึกษาการงอกและเจริญของหลอดละอองเกสรในก้านชูเกสรตัวเมียไปถึงรังไข่ ซึ่งต้องใช้เทคนิคการย้อมสีด้วย aniline blue และ

ตรวจสอบหลอดละอองเกสรหลังการถ่ายละอองเกสรด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ที่มีฟิลเตอร์ UV-G365 (Tezuka and Yamamoto, 1989)

ฝักที่ได้จาก VxR, WxR และWVxR เมื่อพัฒนาไปได้เพียง 24 วัน พบว่า ฝักฝ่อเอมบริโอตายก่อนที่ฝักจะแก่ การที่เอมบริโอ ไม่สามารถพัฒนาต่อไปจนเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ได้เนื่องจากในขั้นตอนการเกิดเอมบริโออาจมีปัญหาเกี่ยวกับไซโกตที่แบ่งเซลล์แล้วพัฒนาไปเป็นเอมบริโอรูปกลม รูปหัวใจ รูปหัวใจระยะปลาย และรูปตอปิโด ไม่สามารถใช้อาหารจากเนื้อเยื่อที่อยู่รอบๆ ถุงเอมบริโอหรืออาหารต่างๆ ไม่สามารถลำเลียงไปยัง suspensor ได้ Sangduen *et al.* (1983) ศึกษาการพัฒนาเอมบริโอที่ได้จากการผสมข้ามชนิดของอัลฟัลฟา (*M. sativa* x *M. scutellata*) โดยการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าเนื้อเยื่อของแม่ที่อยู่รอบๆถุงเอมบริโอกับเอมบริโอลูกผสมมีช่วงเวลาที่ไม่เหมาะสมหรือไม่ประสานกันในการเกิดเมตาบอลิซึมของลิปิด แป้งและผลึกต่างๆ การย่อยสลายของแป้งและลิปิดในเนื้อเยื่อ integumentary tapetum และ นิวเซลลัส รวมถึงการลำเลียงสารอาหารเข้าไปในถุงเอมบริโอ อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การพัฒนาของเอมบริโอและเอนโดสเปิร์มล่าช้าไป ไม่ประสานและเอื้ออำนวยต่อกัน ในเนื้อเยื่อของเอมบริโอลูกผสม (รูปหัวใจระยะปลาย) จะพบ dictyosome และ endoplasmic reticulum ที่ไม่ทำงานในเนื้อเยื่อของเอมบริโอลูกผสม ปัญหาที่ทำให้เอมบริโอไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้เกิดจากการที่ไม่สามารถย่อยสลายสารอาหารและลำเลียงเข้าไปในเนื้อเยื่อต่างๆ รวมทั้งนิวเซลลัส intergument tapetum เอนโดสเปิร์ม และ suspensor ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเอมบริโอในอาหารสังเคราะห์ที่มีส่วนประกอบคล้ายกับในเอนโดสเปิร์ม จึงเป็นวิธีการที่ช่วยชีวิตเอมบริโอลูกผสม

การเพาะเลี้ยงเอมบริโอ เป็นเทคนิคที่ช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชที่ประสบปัญหาเมื่อพืชที่ได้รับการผสมแล้วเอมบริโอไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้และฝ่อไปในที่สุด (บุญยืน, 2541) ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร VW (1949) ดัดแปลง ที่เพิ่ม น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และ เคซีนไฮโดรไลเสท 500 มก/ล เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเอมบริโออังกาบลูกผสมมากกว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เพิ่ม น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และ เคซีนไฮโดรไลเสท 500 มก/ล คาดว่าเป็นผลเนื่องมาจากอาหารสูตร MS (1962) มีปริมาณไนโตรเจนและโปรแตสเซียมสูงกว่าอาหารสูตร VW (1949) ซึ่งอาจเป็นความเข้มข้นที่สูงเกินไปจึงทำให้เอมบริโอไม่ค่อยเจริญ และมีเปอร์เซ็นต์การตายมาก (เกษนันท์, 2538) แต่จากการศึกษาหารสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอในครั้งนี้อาจยังให้ผลไม่ชัดเจนอันเนื่องมาจากเอมบริโอที่นำมาศึกษามีอายุอยู่ในช่วง 15-20 วัน ซึ่งเป็นช่วงอายุที่กว้างเกินไป ในการศึกษาครั้งต่อไปควรเลือกอายุของเอมบริโอที่จะนำมาศึกษาให้เท่ากัน

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเติมน้ำมะพร้าว และ เคซีนไฮโดรไลเสท มีอิทธิพลร่วมกันต่อการเจริญของเอมบริโอไปเป็นต้นกล้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เอมบริโอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เติมทั้งน้ำมะพร้าว และ เคซีนไฮโดรไลเสทมีการเจริญเติบโตทางด้านความสูงมากที่สุด โดยมีความสูงเฉลี่ย 1.61 ซม. ส่วนเอมบริโอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เติมเฉพาะน้ำมะพร้าว หรือ เคซีนไฮโดรไลเสท หรือ เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่ไม่เติมสารช่วยการเจริญเติบโต มีการเจริญเติบโตทางด้านความสูงใกล้เคียงกันโดยมีความสูงเฉลี่ย 0.59-0.86 ซม. คาดว่าเป็นผลเนื่องมาจากการที่น้ำมะพร้าวเป็นสารอินทรีย์เชิงซ้อนที่สกัดได้จากธรรมชาติ ดังนั้นการเติมน้ำมะพร้าวลงในอาหารทำให้มีปริมาณกรดอะมิโน ซึ่งน่าจะเป็น L-glutamine ในปริมาณที่เหมาะสมต่อการพัฒนาจากเอมบริโอเป็นต้นกล้า (เกษนันท์, 2538) ส่วน เคซีนไฮโดรไลเสท เป็นสารอินทรีย์ที่ช่วยการเจริญเติบโต การใช้ เคซีนไฮโดรไลเสท ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเอมบริโอในสภาพปลอดเชื้อจะช่วยให้เอมบริโอที่ได้จากการผสมของเซลล์สืบพันธุ์ที่อ่อนมากให้มีการแบ่งเซลล์และมีการพัฒนาเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้ (วิชญา, 2544) จากการศึกษาของ Cameron-Mills and Duffus (1980) พบว่า การใส่ เคซีนไฮโดรไลเสท 0.1 เปอร์เซ็นต์ ช่วยให้เอมบริโอที่มีอายุน้อยของบาร์เลย์มีการแบ่งเซลล์ และพัฒนาเร็วขึ้นกว่าการเลี้ยงบนอาหารที่ไม่ได้ใส่ เคซีนไฮโดรไลเสท

การศึกษาอายุของเอมบริโอที่เหมาะสมต่อการนำมาเพาะเลี้ยง พบว่า อายุของฝักที่เหมาะสมคือ 18 วันหลังจากผสมติด จะสังเกตได้ว่า เอมบริโออายุ 18 วัน จะมีลักษณะสมบูรณ์เห็น ใบแรก และ ราก ชัดเจน แกะออกจากเมล็ดเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงได้ง่ายส่วนเอมบริโอที่มีอายุน้อยกว่านี้จะเล็กมากแคะออกจากเมล็ดภายใต้กล้องสเตอริโอในสภาพปลอดเชื้อได้ยาก ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Mathias *et al.* (1990) กล่าวว่า เขาไม่ประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอลูกผสม *Cuphea* species เนื่องจากเอมบริโอที่นำมาเพาะเลี้ยงมีขนาดเล็กเกินไป การแคะเอมบริโอออกจากเมล็ดถ้าหากทำไม่ปราณีตจะทำให้เกิดบาดแผลที่เอมบริโอ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงจะทำให้เอมบริโอไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้แต่จะเกิดเป็นแคลลัสแทน มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเอมบริโอ มาช่วยในการสร้างลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามในพืชหลายชนิดซึ่งพบว่าอายุของเอมบริโอที่เหมาะสมต่อการนำมาเพาะเลี้ยงจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ดังเช่น จากการศึกษาของ Agnihotri *et al.* (1990) พบว่าฝักของลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามระหว่าง *Eruca sativa* x *Brassica campertris* อายุ 5-6 วันหลังจากผสมติดเหมาะที่จะนำมาแคะเอาเฉพาะเอมบริโอมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เนื่องจากพบว่าเอมบริโอจะตายก่อนที่ฝักแก่ แต่ในลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามระหว่าง *Sinapis alba* x *Brassica napus* Ripley and Arnison (1990) พบว่าฝักอายุประมาณ 10-15 วันหลังจากที่ได้รับการผสมเหมาะสมที่จะนำเอมบริโอมาเพาะเลี้ยงบน

อาหารสังเคราะห์มากกว่าฝักที่มีอายุอ่อนหรือแก่กว่านี้ การนำเอมบริโอที่ได้จากการผสมข้ามมาเพาะเลี้ยงอาจประสบปัญหาเอมบริโอตายเนื่องจากสารพิษ (toxic components) ที่ได้รับการปลดปล่อยมาจากเนื้อเยื่อของแม่แต่สามารถแก้ปัญหานี้ได้โดยการเติม activated charcoal เพื่อมาเป็นตัวดูดซับสารพิษ (Mathias *et al.*, 1990)

ลูกผสมที่ได้จาก VxR, WxR และ WVxR จัดเป็นต้นที่ได้จากการผสมข้ามชนิดเนื่องจากพันธุ์ V, W และWV จัดอยู่ในชนิด *cristata* ส่วน พันธุ์ R จัดอยู่ในชนิด *ripens* แต่ทั้ง 4 พันธุ์อยู่ในสกุลเดียวกัน พันธุ์ V, W และWV มีจำนวนโซมาติกโครโมโซมเท่ากันคือ 38 ส่วนพันธุ์ R มีจำนวนโซมาติกโครโมโซมเท่ากับ 40 ลูกผสมพันธุ์ VxR, WxR และ WVxR มีความแปรปรวนของจำนวนโซมาติกโครโมโซม คือ มีจำนวนโซมาติกโครโมโซมตั้งแต่ 37 – 40 ถึงแม้ว่าจำนวนโครโมโซมของต้นพ่อและแม่จะต่างกันแต่ก็สามารถผสมกันได้เนื่องจากมีความแตกต่างของจำนวนโครโมโซมไม่มากนัก การศึกษาจำนวนโครโมโซมเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการจำแนกความแตกต่างของพืช ดังนั้นควรศึกษา คาริโอไทป์ เพื่อจะทำให้ทราบรายละเอียดของโครโมโซมแต่ละแท่งของพืชนั้นๆ อย่างละเอียด นอกจากนี้การย้อมสีโครโมโซมก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์จีโนม (genome) ของพืช (สมศักดิ์, 2540)

สุชาดา และอรดี (2540) สร้างลูกผสมว่านสี่ทิศกับรางนาค โดยการผสมแบบสลับพ่อแม่ระหว่างว่านสี่ทิศพันธุ์ดอกสีชมพูกับรางนาค พบว่าคู่ผสมระหว่าง ว่านสี่ทิศxรางนาค มีการติดผล 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำเมล็ดอ่อนไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (1962) ที่เติม BA 2 มก/ล NAA 0.01 มก/ล และน้ำตาล 60 มก/ล เมล็ดลูกผสมมีเปอร์เซ็นต์การงอกเฉลี่ย 17.39 ได้ลูกผสมทั้งหมด 8 ต้น ลูกผสมทุกต้นมีแถบเส้นกลางใบเหมือนรางนาค ด้านหลังใบส่วนโคนสีม่วงแดงเหมือนกับว่านสี่ทิศ และลักษณะโดยทั่วไปของลูกผสมเหมือนกับรางนาคมากกว่าว่านสี่ทิศ Agnihotri *et al.* (1990) ประสบผลสำเร็จในการผสมข้ามสกุลระหว่าง *Eruca sativa* กับ *Brassica campestris* โดยการนำรังไข่ของลูกผสมอายุ 4-5 วัน หลังการถ่ายละอองเกสรแล้วมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม kinetin 1.0 มก/ล NAA 0.1 มก.ล GA 1.0 มก/ล และ เดซีนไฮโดรไลเสท 10 มก/ล พบว่าได้ลูกผสมที่มีลักษณะคล้ายทั้งของพ่อและแม่ เช่น ขนาด รูปร่างใบ และลักษณะของฝัก เมื่อนำต้นลูกผสมมาตรวจรูปแบบ DAN พบว่า ต้นลูกผสมมีแถบ DNA ที่ตรงกับแถบ DNA ของพ่อและแม่

จากการศึกษาสันนิษฐานว่ายีนที่ควบคุมการเกิดสีมีมากกว่า 1 คู่ และยีนแต่ละคู่แสดงอาการข่มแบบไม่สมบูรณ์ สังเกตได้จาก WxR ลูกผสมที่ได้มีสีชมพู ซึ่งเป็นสีกลางระหว่างขาวและสีแดง ส่วน VxR ลูกผสมที่ได้มีสีอยู่ในกลุ่มสีม่วงมีโทนสีตั้งแต่ม่วง (Purple -Violet 80 B และPurple -Violet 81 A) ซึ่งเป็นสีของแม่ จนถึง สีม่วงแดง (Red -Purple 72 A) ส่วนลูกผสมที่ได้

จาก WVxR มีทั้งสีม่วงและชมพู ยีนที่ควบคุมการเกิดสีของพ่อและแม่อาจทำปฏิกิริยากันแบบบวกสะสม ความแปรปรวนของลูกผสมที่ได้อาจเกิดจากปฏิกิริยาของยีนที่แสดงออกมา ยีนแต่ละคู่อาจแสดงผลอย่างอิสระแต่เมื่อรวมกันก็จะทำให้เกิดลักษณะใหม่ๆ

สีของดอกลูกผสมที่ได้ เกิดจากรงควัตถุ (pigment) ชนิด anthocyanin ละลายอยู่ใน sap ของ vacuole ได้แก่ กลุ่มของ สีแดง และม่วง ลูกผสมพันธุ์ VxR มีสีดอกเหมือนแม่อยู่ในกลุ่มของสีม่วงทั้งหมด และ ลูกผสมพันธุ์ WxR มีดอกอยู่ในกลุ่มสีชมพู และ สีดอกที่เปลี่ยนไปอาจเกิดจากการผสมของ anthoxanthin และ anthocyanin (เชาว์ และพรรณี , 2517) Boyle and Stimart (1989) ศึกษาความแปรปรวนของสีดอกบานเย็น พบว่าเกิดขึ้นเนื่องจากการมีหรือไม่มี carotenoids ใน chromoplasts และ anthocyanidins ใน vacuole โดยที่ถ้ามี anthocyanidins pelargonidins แต่ไม่มี carotenoids จะได้ดอกสีชมพู lavander rose maroon และ violet ส่วนสีส้ม scalet และสีแดง เกิดจากการมี carotenoids ชนิด chromoplasts

ผลของรังสีเอ็กซ์ต่อการกลายพันธุ์

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของอังกาบ 4 พันธุ์ หลังจากได้รับการฉายรังสีเอกซ์ 5 ระดับ คือ 0 5 10 15 และ 20 Gy ที่อัตรารังสี 1.63 Gy/min พบว่าการเพิ่มปริมาณรังสีให้สูงขึ้นทำให้ต้นอังกาบมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดลดลง และต้นที่ได้รับรังสีปริมาณ 10 Gy เป็นต้นไปมีการเจริญเติบโตของต้นลดลงรังสีเอกซ์ที่ปริมาณสูงโดยเฉพาะที่ 15 และ 20 Gy ทำให้ลำต้นแคระแกร็น ข้อปล้องสั้นและมีจำนวนใบต่อต้นน้อยกว่าต้นควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากรังสีไปทำให้การทำงาน และการแบ่งเซลล์ที่จุดเจริญผิดปกติ ซึ่ง อรุณี และ นวลฉวี (2536) กล่าวว่า รังสีไปยับยั้งการแบ่งเซลล์บริเวณยอด และการยืดตัวของปล้อง มีผลทำให้ข้อปล้องสั้นต้นจึงเตี้ยแคระแกร็น Bajai *et al.* (1970) กล่าวว่ารังสีที่ปริมาณสูงๆ จะทำให้ส่วนของตา หรือเนื้อเยื่อเจริญ เกิดความเสียหายมาก ดังนั้นการซ่อมแซมต้องใช้เวลามากจึงทำให้การเจริญเติบโตช้าลง และจากการศึกษาของเสริมศิริ (2532) ทำการฉายรังสีแกมมาแก่ต้นเก็กฮวยในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า รังสีที่ 4 Gy จะทำให้ข้อถี่ขึ้น ลำต้นอ้วน แตกยอดเป็นกระจุก ใบเล็กซีดเหลือง

ต้นที่ได้รับรังสีที่ปริมาณ 20 Gy มีจำนวนคู่ใบน้อยที่สุดรองลงมาคือ ปริมาณรังสีที่ 15 10 และ 5 Gy ตามลำดับ และพบใบที่มีรูปร่างผิดปกติอาทิ ขอบใบเว้าลึก เส้นกลางใบมี 2 เส้นปลายใบแยกเป็น 2 แฉก ใบแคระแกร็นเรียวแหลม ใบเหลืองเกิด chimera และการเรียงตัวของใบผิดปกติ และสังเกตเห็นว่า ใบที่มีลักษณะผิดปกติเหล่านี้จะหายไปเมื่อต้นมีการเจริญเติบโต และใบใหม่ที่เจริญขึ้นมาจะมีลักษณะปกติ ซึ่งเป็นเพราะภายหลังจากที่พืชได้รับรังสีแล้วส่วนที่กลายพันธุ์จะมีการแข่งขันระหว่างเซลล์ที่กลายพันธุ์และเซลล์ที่ปกติ ซึ่งในที่สุดเซลล์ที่เกิดการกลายพันธุ์จะถูกกำจัดออกไป (อดิศร, 2533)

ปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้นทำให้การออกดอกช้าออกไปตามลำดับ ต้นที่ได้รับรังสีปริมาณ 20 Gy ออกดอกช้าที่สุด และปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้น ทำให้จำนวนดอกต่อต้นลดลงในทุกพันธุ์ รังสีปริมาณ 5 Gy ให้จำนวนดอกต่อต้นลดลงแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการฉายรังสี จำนวนดอกจะลดลงอย่างชัดเจนเมื่อได้รับรังสีที่ปริมาณ 10 Gy เป็นต้นไป ต้นที่ได้รับรังสีที่ปริมาณ 20 Gy จะมีจำนวนดอกต่อต้นน้อยที่สุด Roest *et al.* (1981) กล่าวว่าการที่ต้นที่ได้รับรังสีแล้วยังสามารถออกดอกได้ แต่การออกดอกจะช้ากว่าต้นควบคุม เนื่องจากเป็นเพราะรังสีเข้าไปทำลายเซลล์ ถึงแม้ว่าต้นพืชสามารถซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลายได้ แต่กว่าจะสร้างจุดกำเนิดได้ต้องใช้เวลานานจึงมีผลทำให้ได้ดอกที่ผิดปกติ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงหลังจากที่ต้นได้รับรังสีในบางครั้งจะซ่อมแซมความเสียหายได้ แต่ในบางครั้งก็ไม่ได้

การเปลี่ยนแปลงของสีดอกพบในพันธุ์ WV ที่ได้รับรังสีปริมาณ 20 Gy ทำให้ดอกสีขาวแถบม่วงเปลี่ยนสี พบว่า กลีบดอกบางกลีบจะกลายจากสีขาวแถบม่วงเป็นสีขาว และพบการกลายพันธุ์จากสีขาวแถบม่วงเป็นสีขาวทั้งดอก การที่ต้นที่ได้รับรังสีเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีดอกอาจเนื่องมาจาก รังสีไปเปลี่ยนแปลงยีนที่ควบคุมลักษณะสีดอก ซึ่ง Stewart and Derman (1970) กล่าวว่าการเปลี่ยนแปลงสีของดอกจากสีม่วงเป็นสีขาวนั้นเกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของยีน เป็นผลมาจากรังสีไปทำให้ส่วนใดส่วนหนึ่งของโครโมโซมขาดหายไป ซึ่งโครโมโซมส่วนนั้นเป็นที่ตั้งของ Dominant suppressor และ รังสีที่ปริมาณ 20 Gy ทำให้กลีบดอกอังกาบพันธุ์สีม่วงและสีแดงมีจำนวนลดลงจากปกติมี 5 กลีบเหลือเพียง 4 กลีบ

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่และลูกผสมโดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ใบคู่ที่ 3 เป็นตัวอย่างพืชที่นำมาสกัด เนื่องจากถ้าใช้ใบที่อ่อนกว่านี้จะเหี่ยวง่ายหรือถ้าเป็นใบแก่จะแสดงอาการตายนึ่งใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอย่างรวดเร็ว พบว่าหลังการสกัดสารแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงเพียงครั้งเดียวจะไม่เพียงพอเนื่องจากถ้านำ supernatant มาทำอิเล็คโตโฟรีซีส จะพบเศษขยะติดอยู่ในแผ่นเจล ดังนั้นจึงต้องนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง 2 ครั้ง จึงจะมีการตกตะกอนที่ดี

แถบสีที่ได้จากเอนไซม์ esterase บางแถบมีรูปแบบเอนไซม์ที่ไม่ชัดเจนถึงแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของเจลเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ก็ตาม การที่แถบสีไม่ชัดเจนอาจเกิดเนื่องจากในระหว่างการสกัดเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสารเคมีพวก phenol เกิดการตกตะกอนทำให้สูญเสียคุณสมบัติในการกระตุ้นปฏิกิริยาต่างๆ โดยทั่วไปแล้ว สาร phenol จะอยู่ในช่องว่างภายในเซลล์ (vacuole) เมื่อเซลล์ถูกทำลายจะถูกออกซิไดส์ (oxidize) ด้วยเอนไซม์ phenol oxidase ให้ผลผลิต (product) จากปฏิกิริยา เป็น quinone และ tannin หากเป็นไปตามการคาดคะเนนี้ อาจแก้ปัญหานี้ด้วยการเติม PVP (polyvinyl pyrolidone) หรือ DIECA (diethyl dithiocabamate) เพื่อไปยับยั้งเอนไซม์

phenol oxidase ในระหว่างการสกัด (จริงแท้, 2531) และ ถ้าสภาพต่างๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาที่ไม่เหมาะสม เช่นอุณหภูมิขณะปฏิบัติงานสูงขึ้นจะมีผล ทำให้โปรตีนและเอนไซม์สลายตัว (denature) เมื่อคุณสมบัติของโปรตีนและเอนไซม์ลดลงจะส่งผลให้การตรวจสอบไม่ชัดเจน (ดวงพร, 2338) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยภายนอกอีกได้แก่ ปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้ ชนิดของสารสกัด ความเข้มข้นของตัวกลาง pH ของสารละลายบัพเฟอร์ ขั้นตอนการทำงานของตัวเครื่องรวมถึงการย้อมเอนไซม์ (Peirce and Brewbaker, 1977; Lagrimini and Rothstien, 1987; Espelie *et al,*. 1986)

เอนไซม์ peroxidase ให้แถบไอโซไซม์คมชัดปรากฏ 2 แถบ ในพันธุ์ V, W และ R แถบไอโซไซม์ที่ได้ให้ผลไม่แตกต่างกันระหว่างลูกผสมด้วยกันและระหว่างลูกผสมกับพันธุ์พ่อแม่ โดยมีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.06 และ 0.32 เอนไซม์ peroxidase สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างลูกผสมพันธุ์ WV x R กับต้นพ่อแม่ได้เท่านั้น ให้แถบไอโซไซม์คมชัดปรากฏ 3 แถบ มีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.06 0.16 และ 0.32 ตามลำดับ โดยมีแถบไอโซไซม์แถบที่ 1 ได้จากทั้งพ่อและแม่ แถบไอโซไซม์แถบที่ 2 ได้จากแม่ และแถบที่ 3 ได้จากพ่อ การที่เอนไซม์ peroxidase ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างลูกผสม ออกจากพ่อแม่ได้อาจเป็นเพราะลักษณะนี้ถูกควบคุมด้วยยีน จึงมีการแสดงออกได้ตามปกติ ดังนั้นการเปรียบเทียบความแตกต่างจึงขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้ผลการวิเคราะห์เปลี่ยนแปลงเช่นจำนวนลูกผสมที่ทำการวิเคราะห์ อายุของพืช ความเครียดที่เกิดขึ้นกับพืช การซ่อมแซมเซลล์ที่เป็นแผล (Birecka *et al.* 1975)

จากการศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถใช้ลักษณะแบบแผนการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ที่ได้จากขบวนการอิเล็คโตโฟรีซีสเป็นเกณฑ์ในการจำแนกความแตกต่างของอังกาบสายพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมได้ การจำแนกพันธุ์พืชโดยการวิเคราะห์รูปแบบของไอโซไซม์ยังมีข้อจำกัดอยู่ เนื่องจากจำนวนยีนที่ตรวจสอบได้มีไม่มากนัก และต้องมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษา จึงต้องเลือกเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ การเปรียบเทียบต้องใช้เนื้อเยื่อชนิดเดียวกันและเจริญเติบโตอยู่ในระยะเดียวกันเท่านั้นนอกจากนี้สิ่งแวดล้อมภายนอกบางอย่างก็อาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนด้วย การตรวจสอบในระดับโปรตีนจึงทำได้ไม่กว้างเท่าที่ควร ดังนั้นควรตรวจสอบในระดับ ดีเอ็นเอ ซึ่งมีข้อได้เปรียบคือ สามารถวิเคราะห์จากส่วนใดของพืชก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม ทั้งยังสามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน (สุรินทร์, 2540)