



วิทยานิพนธ์

บทบาทของออกซินและเอทิลีนต่อการร่วงของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย
หลังการเก็บเกี่ยว

**ROLE OF AUXIN AND ETHYLENE IN ABSCISSION OF
DENDROBIUM FLOWERS AFTER HARVEST**

นางสาวกาญจนา รุ่งรักษานนท์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ปรัชญาคุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว)
ปริญญา

เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สาขา วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต
โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ภาควิชา

เรื่อง บทบาทของออกซินและเอทิลีนต่อการร่วงของดอกกล้วยไม้สกุลหวายหลังการเก็บเกี่ยว

Role of Auxin and Ethylene in Abscission of *Dendrobium* Flowers after Harvest

นามผู้วิจัย นางสาวกาญจนา รุ่งรักษานนท์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์สายชล เกตุษา, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์อรรณ ชัชวาลการพาณิชย์, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์กฤษณา กฤษณพุกต์, D.Agr.)

ประธานสาขาวิชา

(ศาสตราจารย์สายชล เกตุษา, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อางคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 9 เดือน สิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๐

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

บทบาทของออกซินและเอทิลีนต่อการร่วงของดอกกล้วยไม้สกุลหวายหลังการเก็บเกี่ยว

Role of Auxin and Ethylene in Abscission of *Dendrobium* Flowers after Harvest

โดย

นางสาวกาญจนา รุ่งรักษานนท์

เสนอ

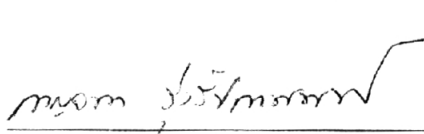
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว)

พ.ศ. 2550

กาญจนา รุ่งรักษานนท์ 2550: บทบาทของออกซินและเอทิลีนต่อการร่วงของดอก
กล้วยไม้สกุลหวายหลังการเก็บเกี่ยว ปรินญาปรัชญาคุณฐิบัณฑิต (เทคโนโลยีหลังการเก็บ
เกี่ยว) สาขาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ศาสตราจารย์สายชล เกตุษา, Ph.D. 119 หน้า

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างออกซินและเอทิลีนต่อการร่วงของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย
พันธุ์มัสตินซึ่งดอกบานไม่ตอบสนองต่อเอทิลีน เพื่อพิสูจน์ว่าออกซินในดอกบานทำให้เนื้อเยื่อ
บริเวณ abscission zone (AZ) ที่โคนก้านดอกไม่ตอบสนองต่อเอทิลีน โดยใช้สารยับยั้งการทำงานของ
ออกซิน 2-(4-chlorophenoxy)-2-methyl propionic acid (CMPA) และสารยับยั้งการเคลื่อนที่
ของออกซิน 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) หยดลงบนแอ่งเกสรตัวเมียของดอกบานร่วมกับการ
ให้เอทิลีนความเข้มข้น 0.4 พีพีเอ็มหรือไม่ให้เอทิลีน ผลการทดลองพบว่า การให้สารยับยั้งออกซิน
ทั้งสองชนิดทำให้ดอกบานร่วง ขณะที่ดอกที่ได้รับเอทิลีนเพียงอย่างเดียวไม่มีการร่วง การให้
1-methylcyclopropene (1-MCP) ความเข้มข้น 500 พีพีเอ็มกับดอกกล้วยไม้ก่อนการได้รับสารยับยั้ง
ออกซิน พบว่าสามารถชะลอหรือยับยั้งการร่วงของดอกบานได้ แสดงว่าการร่วงของดอกบานที่ได้
รับสารยับยั้งออกซินนั้นมีสาเหตุเกิดจากเอทิลีน การกำจัดแหล่งของออกซินโดยการตัดดอกตูมและ
ดอกบานออกทำให้เกิดการร่วงของก้านดอก เมื่อให้ออกซินจากภายนอกทดแทนหลังจากตัดดอก
ออกสามารถยับยั้งการร่วงของก้านดอกตูมและก้านดอกบาน นอกจากดอกที่ควบคุมการร่วงของ
ก้านดอก ความยาวของก้านดอกยังมีความสำคัญต่อการร่วงของก้านดอกที่เหลืออยู่ด้วย การมีส่วน
ของก้านดอกยาวมากสามารถยับยั้งการร่วงได้ดีกว่าการมีส่วนของก้านดอกสั้น จากการทดลองครั้ง
นี้สนับสนุนว่าออกซินในดอกหรือในก้านดอกมีส่วนทำให้เนื้อเยื่อบริเวณ AZ ที่โคนก้านดอกไม่
ตอบสนองต่อเอทิลีน การศึกษาทางกายวิภาคของเซลล์บริเวณ AZ ของดอกบานกล้วยไม้สกุลหวาย
พันธุ์มัสติน พบว่า AZ ประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็กรูปร่างกลมหรือเหลี่ยม เรียงตัว 2-3 แถว
กระบวนการร่วงเกิดขึ้นระหว่างชั้นเซลล์ขนาดเล็ก 2 ชั้นนี้ การร่วงของดอกบานมีกิจกรรมของ
เอนไซม์ β -1,4-glucanase (cellulase) ใน AZ ของโคนก้านดอกเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องก่อนการร่วง
ในดอกบานที่ได้รับสารยับยั้งออกซินและมีการร่วง ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ polygalacturonase
เกิดขึ้นขณะที่ดอกบานกำลังร่วง การแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase (*Den-Cel*) มีความ
สัมพันธ์ใกล้ชิดกับกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase โดยมีการสะสม mRNA ของยีน *Den-*
Cel มากใน AZ ของดอกบานที่ได้รับสารยับยั้งออกซินและมีการร่วง

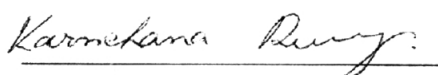

ลายมือชื่อนิสิต


ลายมือชื่อประธานกรรมการ

18 / ๗๖ / 50

Karnchana Rungruchkanont 2007: Role of Auxin and Ethylene in Abscission of *Dendrobium* Flowers after Harvest. Doctor of Philosophy (Postharvest Technology), Major Field: Postharvest Technology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Professor Saichol Ketsa, Ph.D. 119 pages.

The study of relationship between auxin and ethylene in controlling abscission of cut *Dendrobium* flowers, *Dendrobium* cv. Miss Teen, whose open flowers are ethylene insensitive, was carried out to prove if auxin in open flowers causes tissue in the abscission zone (AZ) insensitive to ethylene. In order to inhibit action of auxin, two auxin inhibitors, 2-(4-chlorophenoxy)-2-methyl propionic acid (CMPA, an inhibitor of auxin action) and 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA, an inhibitor of auxin transport), were applied separately to the stigma of open flowers in combination with and without 0.4 ppm ethylene. The result showed that both inhibitors induced high abscission rates and ethylene treatment alone did not induce abscission of open flowers. The effects of the auxin inhibitors virtually disappeared when the inflorescences were treated with 500 ppb 1- methylcyclopropene (1-MCP), indicating that the abscission induced by auxin inhibitors was due to ethylene action. Removal of auxin sources by cutting off the floral buds and open flowers hastened time to abscission of the remaining pedicel. IAA in lanolin, placed on the cut surface of the pedicel to replace the effect of removed floral buds and open flowers, resulted in inhibiting abscission of the pedicels. Distal part of the pedicel also affected abscission of the remaining pedicel. The long distal part of the pedicel had lower effect on abscission of the remaining pedicel than the short distal part of the pedicel. The result indicated that auxin in open flowers or pedicels of *Dendrobium* cv. Miss Teen are involved in ethylene insensitivity of AZ. Anatomical study of the abscission zone at the base of *Dendrobium* cv. Miss Teen pedicels found small cells located in two to three layers in AZ. Separation occurred precisely between two layers of small cells. β -1,4- Glucanase (cellulase) activity prior to abscission increased considerably in AZ of *Dendrobium* cv. Miss Teen open flowers previously treated with auxin inhibitors. While an increase in polygalacturonase activity in AZ coincided with abscission. The expression of β -1,4-glucanase gene (*Den-Cel*) had a close relationship with β -1,4-glucanase activity and accumulation of *Den-Cel* mRNA was abundant in AZ of flowers previously treated with auxin inhibitors and abscised.



Student's signature



Thesis Advisor's signature

18, Jan, 07

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สายชล เกตุษา ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ และด้านอื่นๆ อย่างเอาใจใส่เสมอมา ขอขอบพระคุณ ดร. อรพรรณ ชัชวาลการพาณิชย์ กรรมการสาขาวิชาเอก รองศาสตราจารย์ ดร. กฤษณา กฤษณพุกต์ กรรมการสาขาวิชาเอก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมโภชน์ น้อยจินดา ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จ ลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ Dr. Wouter G. van Doorn ที่ช่วยตรวจแก้ไขเรื่องสำหรับลงในวารสาร

ขอขอบพระคุณ โครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงาน กองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โครงการพัฒนาอาจารย์ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนในการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณสุภาภรณ์ เอี่ยมแข่ง พี่ๆ น้องๆ และเจ้าหน้าที่งานวิจัยพืชผลหลังการเก็บเกี่ยวทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจตลอดมา ขอขอบคุณ งานวิจัยพืชผลหลังการเก็บเกี่ยว ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และกลุ่มวิจัยด้านพืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ เครื่องมือ อุปกรณ์ สถานที่ทำการวิจัย

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่และน้องทุกคน ที่เป็นกำลังใจในการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์

กาญจนา รุ่งรักษานนท์
มกราคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
ผล	44
วิจารณ์	85
สรุป	95
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	97
ภาคผนวก	115

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพรมอร์ที่ได้รับการออกแบบและใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase และยีน Actin	76
ตารางผนวกที่		
1	การวิเคราะห์ทางสถิติ (analysis of variance) ปริมาณ IAA ในส่วนเส้าเกสร+รังไข่ และปริมาณ IAA ในส่วนก้านดอก ทั้งในดอกตูมและดอกบานของดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสทิน	116

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แบบจำลองสมมูลของออกซินและเอทิลีนต่อการหลุดร่วง	11
2	แบบจำลองความสัมพันธ์ของเอทิลีนและออกซินที่ควบคุมการหลุดร่วงในใบ	13
3	การร่วงของดอกบาน (A) และดอกตูม (B) กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสติน หลังจากให้สารยับยั้งการทำงานของออกซิน (CMPA) ความเข้มข้น 0-40 ไมโครกรัม ต่อดอกแก่ดอกบาน ร่วมกับเอทิลีนทริทเม้นท์	46
4	การร่วงของดอกบาน (A) และดอกตูม (B) กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสติน หลังจากให้สารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซิน (TIBA) ความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัม ต่อดอกแก่ดอกบาน ร่วมกับเอทิลีนทริทเม้นท์	47
5	การร่วงของดอกบาน (A) และดอกตูม (B) กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสติน หลังจากดอกบานได้รับ TIBA หรือ CMPA ร่วมกับการได้รับเอทิลีนและไม่ได้รับเอทิลีน	48
6	การร่วงของดอกบานกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสตินที่เก็บเกี่ยวทันทีจากสวน กล้วยไม้และให้ดอกบานได้รับ TIBA หรือ CMPA ร่วมกับการได้รับเอทิลีนและไม่ได้รับเอทิลีน	49
7	การร่วงของดอกบานกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสติน ที่ได้รับ TIBA หรือ CMPA ร่วมกับการได้รับ 1-MCPและไม่ได้รับ 1-MCP	52
8	การสร้างเอทิลีนของดอกบานกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสติน ที่ได้รับ TIBA หรือ CMPA ร่วมกับการได้รับ 1-MCPและไม่ได้รับ 1-MCP	53
9	การร่วงของดอกบานกล้วยไม้พันธุ์มัสตินที่ตัดก้านดอกตูมทิ้ง ในสภาพที่ได้รับเอทิลีนและไม่ได้รับเอทิลีน	54
10	การร่วงของก้านดอกบาน (A) และก้านดอกตูม (B) กล้วยไม้พันธุ์มัสตินที่ตัดดอกออกและได้รับ IAA ร่วมกับการได้รับเอทิลีนและไม่ได้รับเอทิลีน	55
11	การร่วงของก้านดอกบานกล้วยไม้พันธุ์มัสติน หลังจากตัดดอกออกร่วมกับการได้รับ 1-MCP และไม่ได้รับ 1-MCP	56

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	การร่วงของดอกบานกล้วยไม้พันธุ์มัสทีน หลังจากตัดส่วนต่าง ๆ ของดอกบาน ออกร่วมกับการได้รับเอทิลีน (B) และไม่ได้รับเอทิลีน (A)	58
13	การร่วงของดอกบานกล้วยไม้พันธุ์ขาวสนาน หลังจากตัดส่วนต่าง ๆ ของดอก บานออกร่วมกับการได้รับเอทิลีน (B) และไม่ได้รับเอทิลีน (A)	59
14	การร่วงของก้านดอกตูมกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีน หลังจากตัดดอก+รังไข่หรือ ตัดก้านดอกออก 2/3 ของก้านดอก ร่วมกับการได้รับเอทิลีนและไม่ได้รับเอทิลีน	61
15	ปริมาณ IAA ในส่วนเส้าเกสร+รังไข่ดอกบาน (column O) เส้าเกสร+รังไข่ดอก ตูม (column B) ก้านดอกบาน (pedicel O) และก้านดอกตูม (pedicel B) ดอก กล้วยไม้พันธุ์มัสทีน (ค่าเฉลี่ยจาก 6 ซ้ำ $\pm$ SE) ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละ แท่งกราฟไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %	63
16	ภาพตัดตามยาว abscission zone บริเวณก้านดอกตูม (A) และก้านดอกบาน (B) กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสทีน C : ภาพขยายบริเวณ abscission zone ของก้าน ดอกบาน AZ = Abscission zone S = ก้านช่อดอก P = ก้านดอก	65
17	การแยกตัวของ abscission zone ก่อนการหลุดร่วง เซลล์ขนาดเล็ก 1-2 ชั้นเริ่ม แยกจากกันบริเวณขอบของ abscission zone AZ = Abscission zone S = ก้าน ช่อดอก P = ก้านดอก	66
18	การแยกตัวของ abscission zone บริเวณก้านดอกบานของกล้วยไม้หวายพันธุ์มัส ทีน 7 วันหลังจากให้สาร ดอกที่ไม่ได้รับสาร (A) ดอกที่ไม่ได้รับสารแต่ได้รับ เอทิลีน (B) ดอกที่ได้รับ CMPA (C) และดอกที่ได้รับ TIBA (D)	67
19	Abscission zone ของก้านดอกบานกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีน ดอกบานที่ไม่ได้ รับสารเก็บเนื้อเยื่อหลังจากเก็บเกี่ยว (A) และก้านดอกบานที่ตัดดอกออกและให้ IAA เป็นเวลา 17 วัน (B)	68
20	กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase ในบริเวณ abscission zone ของดอกบาน กล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีน หลังจากได้รับสารต่าง ๆ เป็นเวลา 5 วัน	70

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase ในบริเวณ abscission zone ของดอกบานกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสทีน และอาการเสื่อมสภาพของดอกบาน หลังจากดอกบานได้รับ TIBA ร่วมกับเอทิลีนเป็นเวลา 5 วัน A: ดอกปกติ (day -2) B: กลีบดอกเกิดเส้นเวนและปากเริ่มมีสีเหลือง (day 0) C: กลีบดอกสีจางลงและปากมีสีเหลืองเข้ม (day 1) D: ดอกคุดและกลีบดอกนํ้า (day 3) E: กลีบดอกม้วนเข้าหากันและมีสีน้ำตาล (day 5)	71
22	กิจกรรมของเอนไซม์ polygalacturonase ในบริเวณ abscission zone ของดอกบานกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีน หลังจากได้รับสารต่าง ๆ เป็นเวลา 5 วัน	72
23	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ของยีน β -1,4-glucanase ขนาด 1028 bp โดยใช้ไพรเมอร์ Cel-Ok-F และไพรเมอร์ Cel-Ok-R; M, 1kb DNA marker (Fermantas, USA); 1, ตัวอย่างจาก abscission zone ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีน	77
24	ลำดับเบสของยีน β -1,4-glucanase ในกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีนขนาด 1028 bp (CELL MISS NO.2), อักษรในกรอบสี่เหลี่ยมเป็นส่วนของไพรเมอร์	78
25	ลำดับกรดอะมิโนของยีน β -1,4-glucanase ในกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีน (CELL MISS NO.2) จำนวน 342 เรสิดิวส์, อักษรในกรอบสี่เหลี่ยมเป็นส่วนของไพรเมอร์	78
26	การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของยีน β -1,4-glucanase ในกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีนกับ β -1,4-glucanase หรือ cellulase ในพืชอื่น ๆ	79
27	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ของยีน β -1,4-glucanase ขนาด 875 bp โดยใช้ specific primer: ไพรเมอร์ CELL-MISS-F และไพรเมอร์ CELL-MISS-R; M, 1kb DNA marker (Fermantas, USA); 1, ตัวอย่างจาก abscission zone ของดอกกล้วยไม้พันธุ์มัสทีน	82

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
28	การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase (<i>Den-Cel</i>) ด้วยวิธี RT-PCR (A) ใช้ไพรเมอร์เฉพาะเจาะจง CEL-MISS-F และ CEL-MISS-R ผลผลิตขนาด 875 bp และ southern blot hybridization (C) ใน AZ ของดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสตินหลังจากได้รับทริทเมนต์ 5 วัน; H, ดอกก่อนการให้ทริทเมนต์ต่างๆ; Control, ดอกที่ไม่ได้รับสาร; CMPA, ดอกที่ได้รับสาร CMPA; TIBA, ดอกที่ได้รับสาร TIBA; Cut, การตัดดอก; Cut + IAA, การตัดดอกและให้ IAA; ในสภาพได้รับเอทิลิน และไม่ได้รับเอทิลิน ใช้ยีน actin เป็น internal control (B, C)	83
29	การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase (<i>Den-Cel</i>) ด้วยวิธี RT-PCR (A) ใช้ไพรเมอร์เฉพาะเจาะจง CEL-MISS-F และ CEL-MISS-R ผลผลิตขนาด 875 bp และ southern blot hybridization (B) ใน AZ ของดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสตินที่ได้รับสาร TIBA + เอทิลิน ในช่วงวันหลังจากได้รับทริทเมนต์ (d0) ถึงวันที่ 5 หลังจากได้รับทริทเมนต์ (d5) และ ก้านดอกกล้วยไม้หลังจากเก็บเกี่ยว (Pedicel)	84
ภาพผนวกที่		
1	ปริมาณ IAA ในส่วนเส้าเกสรร่วมกับรังไข่ของดอกกล้วยไม้พันธุ์มัสติน หลังจากได้รับสารยับยั้งการทำงานและสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซินร่วมกับการได้รับเอทิลินและไม่ได้รับเอทิลินในช่วงเวลาต่างๆ	117
2	การแสดงความเหมือน (percent identity) ของลำดับอะมิโน β -1,4-glucanase ในกล้วยไม้หวายพันธุ์ มัสตินกับ β -1,4-glucanase หรือ cellulase ในพืชอื่น ๆ	118
3	แบบจำลองการไม่ร่วงของดอกบานกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสตินที่ได้รับเอทิลิน; ดอกบานปกติมีออกซินเคลื่อนที่มายัง AZ (A) การให้สารยับยั้งออกซินแก่ดอกบาน (B) การตัดดอกบานออก (C) การให้ออกซินหลังจากตัดดอกบานออก (D)	119

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

1-MCP	=	1- Methylcyclopropene
ACC	=	1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid
AOA	=	Aminooxyacetic acid
ARFs	=	Auxin responsive factors
AZ	=	Abscission zone
bp	=	Base pair
CDP star	=	Disodium-2-chloro-5-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricycle [3.3.1.1. ^{3,7}]-decan}-4-yl)-1-phenyl phosphate
CMPA	=	2-(4-chlorophenoxy)-2-methyl propionic acid
CTAB	=	Cethyl trimethyl ammonium bromide
DTT	=	Dithiothreitol
EDTA	=	Ethylene diamine tetraacetic acid
IAA	=	Indole-3-acetic acid
LB	=	Luria bertani broth
NAA	=	α -Naphthalene acetic acid
NPA	=	N-1-Naphthylphthalamic acid
PCR	=	Polymerase chain reaction
PE	=	Pectin esterases
PG	=	Polygalacturonase
pI	=	Isoelectric point
PL	=	Pectate lyase
RT-PCR	=	Reverse transcriptase - Polymerase chain reaction
SAM	=	S-Adenosyl methionine
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
STS	=	Silver thiosulfate
TIBA	=	2, 3, 5-Triiodobenzoic acid
X-gal	=	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside

บทบาทของออกซินและเอทิลีนต่อการร่วงของดอกกล้วยไม้สกุลหวายหลังการเก็บเกี่ยว

Role of Auxin and Ethylene in Abscission of *Dendrobium* Flowers after Harvest

คำนำ

กล้วยไม้เป็นไม้ตัดดอกที่สำคัญของประเทศไทย สามารถส่งออกคิดเป็นมูลค่ามากกว่า 1,000 ล้านบาทต่อปี การส่งออกมีแนวโน้มของมูลค่าสูงขึ้นทุกปี ในปี 2548 มีมูลค่าการส่งออกสูงถึง 2,538 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2549) กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.) เป็นสกุลสำคัญที่สุดในการส่งออกของประเทศไทย โดยมีสัดส่วนการส่งออกร้อยละ 80 และอีกร้อยละ 20 เป็นสกุลอื่นๆ (อภิสิทธิ์และคณะ, 2541) จากปริมาณการส่งออกที่มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไม้ดอกประเภทอื่น กล้วยไม้จึงถูกกำหนดให้เป็นพืชเร่งรัดการส่งออกและเป็นหนึ่งใน product champion ซึ่งรัฐบาลมีนโยบายส่งเสริมการส่งออก

ในการแข่งขันทางการตลาดของกล้วยไม้ตัดดอกปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญมาก คือคุณภาพของดอกกล้วยไม้ (โอพาร์และชัยรงค์, 2536) คุณภาพกล้วยไม้ตัดดอกที่ดี ต้องบานทน มีปริมาณดอกบานในช่อมาก (ไม่น้อยกว่า 3 ใน 4 ของจำนวนดอกในช่อกล้วยไม้สกุลหวาย) ไม่เหี่ยวหรือร่วงง่าย มีอายุการใช้งานยาว คุณภาพผลผลิตที่ดีนอกจากมีต้นพันธุ์ สายพันธุ์ วิธีการปลูก เลี้ยงและการจัดการที่ดีแล้ว การจัดการหลังการเก็บเกี่ยวก็มีความสำคัญมาก เนื่องจากดอกไม้ที่ถูกตัดจากต้นยังคงมีชีวิตและมีการเปลี่ยนแปลงภายในเกี่ยวกับสรีรวิทยาและชีวเคมีเช่นเดียวกับขณะที่ยังอยู่บนต้น เช่น การหายใจ การสร้างเอทิลีน การดูดน้ำ การเหี่ยว และการเปลี่ยนสีของกลีบดอก การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เกี่ยวข้องกับคุณภาพและอายุการใช้งานของดอกไม้ การขาดน้ำเป็นสาเหตุที่สำคัญทำให้เกิดการสร้างเอทิลีน (เสาวลักษณ์, 2549) การเสื่อมสภาพของดอกไม้ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับเอทิลีน ไม่ว่าเอทิลีนนั้นเกิดขึ้นเองจากดอกไม้หรือได้รับจากแหล่งอื่นมีผลทำให้ดอกไม้มีอายุการใช้งานสั้น กลีบดอกเหี่ยวและร่วงเร็ว (สายชล, 2531)

การร่วงของดอกไม้ยังมีปัจจัยควบคุมอื่นๆ เช่น สมดุลของฮอร์โมนในบริเวณ abscission zone (AZ) ความไวของเนื้อเยื่อบริเวณ AZ ต่อฮอร์โมน ซึ่งปัจจัยเหล่านี้นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์บริเวณ AZ และทำให้เกิดการร่วง (van Doorn and Stead, 1997; Sexton, 2002) เอทิลีนเป็นฮอร์โมนที่มีบทบาทส่งเสริมการร่วง ส่วนออกซินเป็นฮอร์โมนที่ชะลอหรือยับยั้งการร่วง

(Sexton, 2002) โดยปกติดอกกล้วยไม้สกุลต่างๆรวมทั้งสกุลหวายมีความไวในการตอบสนองต่อเอทิลีน แต่มีกล้วยไม้สกุลหวายบางพันธุ์ คือ พันธุ์มัสตินที่ดอกบานไม่ตอบสนองต่อเอทิลีน โดยการให้เอทิลีนจากภายนอกไม่สามารถทำให้ดอกบานร่วงได้ การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่ต้องการตรวจสอบปัจจัยที่ทำให้ดอกบานไม่ตอบสนองต่อเอทิลีน และได้ตั้งสมมติฐานว่าออกซินจากดอกบานทำให้เนื้อเยื่อ AZ บริเวณโคนก้านดอกลดความไวในการตอบสนองต่อเอทิลีน จึงทำให้ดอกบานกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสตินไม่ร่วงเมื่อได้รับเอทิลีน การวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาบทบาทของออกซิน โดยใช้สารยับยั้งการทำงานและสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซิน และการให้ออกซินจากภายนอก ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบริเวณ AZ ขณะเกิดการร่วงของดอกกล้วยไม้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของออกซินและเอทิลีนต่อการร่วงในดอกตูมและดอกบานของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสติน
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณออกซินและการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคในเนื้อเยื่อบริเวณ abscission zone (AZ) ระหว่างเกิดการร่วง
3. เพื่อศึกษาบทบาทของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ที่เกี่ยวข้องระหว่างการร่วงของดอกกล้วยไม้
4. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase ในขบวนการร่วงของดอกกล้วยไม้

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของกล้วยไม้สกุลหวาย (Dendrobium orchid)

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.) อยู่ในวงศ์ Orchidaceae มีการกระจายพันธุ์ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และบริเวณหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก ในประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลนี้มากกว่า 130 ชนิด (ระพี, 2516) กล้วยไม้สกุลหวายมีการเจริญเติบโตแบบซิมโพเดียม (sympodium) มีเหง้า (rhizome) ซึ่งเป็นลำต้นที่แท้จริงเจริญไปตามแนวนอน (ระพี, 2530) ลำลูกกล้วยหรือลำต้นเทียม (pseudobulb) เกิดจากตาหน่อที่เหง้าเจริญเติบโตขึ้นไปเป็นลำต้น มีใบบริเวณส่วนปลายลำลูกกล้วย เมื่อลำลูกกล้วยเจริญจนสุดลำแล้วก็พร้อมจะออกดอก ตาหน่อที่โคนลำซึ่งเป็นส่วนของเหง้าจะแทงหน่อใหม่ออกมาอีก (จิตรพรพรรณ, 2529) รากของกล้วยไม้สกุลหวายเป็นรากกิ่งอากาศ ชอบชอนไชเข้าไปในเครื่องปลูก แต่จะยึดแนบสนิทกับต้นไม้เมื่ออยู่ในสภาพธรรมชาติ ช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายมีลักษณะเป็นแบบ racemose คือดอกที่โคนช่อจะบานก่อนและบานไล่ไปที่ดอกอ่อนกว่าขึ้นไปยังปลายช่อของช่อที่มีดอกอ่อนที่สุดตามลำดับ ดอกเป็นแบบสมบูรณ์เพศ มีเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน (ระพี, 2530) ดอกประกอบด้วยกลีบดอกวงนอก (sepal) 3 กลีบ และกลีบดอกวงใน (petal) 3 กลีบ กลีบดอกวงนอกมีลักษณะคล้ายกันทั้ง 3 กลีบ กลีบดอกวงในมีลักษณะต่างกันโดยกลีบคู่หนึ่งมีลักษณะเหมือนกัน ส่วนกลีบในกลีบที่ 3 เปลี่ยนไปเป็นแผ่นปาก (lip or labellum) ปลายสุดของเส้าเกสร (column) เป็นที่อยู่ของอับเรณู (anther) อยู่เหนือส่วนที่เรียกว่า จะงอย (rostellum) ซึ่งกั้นอยู่ระหว่างอับเรณูและยอดเกสรตัวเมีย (stigma) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการผสมตัวเอง (ไพบุลย์, 2521)

2. แหล่งผลิตและการส่งออกกล้วยไม้

ประเทศไทยได้รับการยอมรับจากทั่วโลกว่าเป็นแหล่งผลิตต้นพันธุ์และดอกกล้วยไม้เมืองร้อนที่ใหญ่ที่สุดในโลก จากข้อมูลการสำรวจในปี 2533 มีพื้นที่ปลูกกล้วยไม้ 12,000 ไร่ พื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่ในเขต กรุงเทพมหานคร นครปฐม และสมุทรสาคร (โอฬารและชัยงค์, 2536) การขยายตัวของพื้นที่ปลูกเพิ่มขึ้นทุกปีโดยการขยายออกไปยังจังหวัดอื่นๆ การสำรวจในปี 2546 มีพื้นที่ปลูกกล้วยไม้ 19,399 ไร่ในพื้นที่ปลูกทั่วประเทศ 39 จังหวัด แต่มีการปลูกเป็นการค้ามากใน 6 จังหวัดได้แก่ นครปฐม สมุทรสาคร กรุงเทพมหานคร ราชบุรี นนทบุรี และพระนครศรีอยุธยา (จิตรพรพรรณ, 2536) ซึ่งเป็นพื้นที่เหมาะแก่การปลูกกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมเพื่อตัดดอกมากที่สุด

(กรมส่งเสริมการเกษตร, 2547) และการสำรวจในปี 2548 มีพื้นที่ปลูกทั้งหมด 20,226 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2549)

ประเทศไทยส่งออกดอกกล้วยไม้คิดเป็นมูลค่ามากเป็นอันดับ 2 ของโลกรองจากเนเธอร์แลนด์ ปี 2548 ประเทศไทยส่งออกดอกกล้วยไม้ปริมาณ 21,207 ตัน มูลค่า 2,538 ล้านบาท ปริมาณการส่งออกเพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 8.40 ต่อปี และมูลค่าเพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 16.74 ประเทศคู่ค้าที่สำคัญคือ ญี่ปุ่นนำเข้าร้อยละ 38 ของมูลค่าการส่งออกดอกกล้วยไม้ไทย รองลงมาคือ สหรัฐอเมริกา อิตาลี นำเข้าร้อยละ 21 และร้อยละ 11 ตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2549) สำหรับจีนและฮ่องกงมีการนำเข้าดอกกล้วยไม้เพียงร้อยละ 8.7 ของมูลค่าส่งออกดอกกล้วยไม้ไทย แต่มีอัตราการขยายตัวของตลาดสูงสุด โดยขยายตัวร้อยละ 44.28 ต่อปี (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2547)

3. สาเหตุการเสื่อมคุณภาพของดอกไม้

คุณภาพของไม้ตัดดอกขึ้นกับปัจจัยหรือสภาพแวดล้อมก่อนการตัดดอก และวิธีปฏิบัติหรือสภาพแวดล้อมหลังจากตัด ซึ่งจะส่งผลถึงอายุการใช้งานของดอกไม้ ดอกไม้ที่ถูกตัดจากต้นแล้วจะเสื่อมสภาพหรือมีอายุการใช้งานสั้นลงมีสาเหตุจากหลายประการคือ

3.1 การขาดน้ำ เมื่อปริมาณน้ำในดอกไม้สมดุลจึงเกิดการเหี่ยวและการขาดน้ำทำให้สภาพทางชีวเคมีในพืชเปลี่ยนแปลงไป การขาดน้ำมีผลทำให้เกิดอาการก้านดอกอ่อนในกุหลาบพันธุ์ Samantha ซึ่งถ้าให้ Co^{2+} จะเพิ่มการดูดน้ำและลดการคายน้ำโดยลดการเปิดของปากใบ (Venkatarayappa *et al.*, 1981)

3.2 การอุดตันของท่อน้ำในลำต้นหรือก้านดอก การอุดตันในท่อน้ำทำให้น้ำขึ้นไปตามก้านดอกไม้ไม่ได้ทำให้ดอกเหี่ยว การอุดตันในท่อน้ำเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น

3.2.1 การเกิดบาดแผลเนื่องจากการเก็บเกี่ยว การเกิดแผลที่ก้านดอกกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase และสารพวก polyphenol ทำปฏิกิริยากันได้เกลือ Ca และ Mg ของแทนนินสะสมบริเวณรอยตัด ทำให้ระบบท่อลำเลียงน้ำเกิดการอุดตัน (Marousky, 1972)

3.2.2 การลดอัตราการดูดน้ำและการสูญเสีย น้ำ เช่น การเกิดฟองอากาศในก้านดอกจะทำให้อัตราการดูดน้ำลดลง ถ้ามีการสูญเสีย น้ำหรือทำให้อัตราการดูดน้ำลดลงจะเกิดการอุดตันขึ้น

3.2.3 จุลินทรีย์ในน้ำที่ใช้ปักแจกันดอกไม้ จุลินทรีย์จะเข้าไปในท่อน้ำและมีการเจริญเติบโตจนเกิดการอุดตัน ทำให้ด้านทานการไหลของน้ำในก้านดอก นอกจากนั้นสิ่งที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นยังเป็นพิษต่อเซลล์พืชทำให้อายุการใช้งานของดอกไม้สั้นลง

3.3 การขาดสารอาหาร ดอกไม้ที่ตัดจากต้นแล้วยังมีการหายใจซึ่งต้องใช้สารอาหาร เมื่อไม่มีอาหารจากต้นส่งมาจึงต้องใช้สารอาหารที่สะสมอยู่ในกลีบดอก จึงมีการย่อยสลายแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้อยู่ในรูปของน้ำตาล และถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจ เมื่อน้ำตาลที่สะสมไว้ถูกใช้หมด เซลล์จะเริ่มตายและเสื่อมสภาพทำให้ดอกเหี่ยว

3.4 การสร้างเอทิลีน เอทิลีนเป็นฮอร์โมนพืชที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับอายุการใช้งานของดอกไม้หลังการตัดดอกมากที่สุด ไม่ว่าเอทิลีนจะเกิดขึ้นจากตัวดอกไม้เองหรือจากแหล่งอื่นๆ สามารถทำความเสียหายให้กับดอกไม้และทำให้ดอกไม้มีอายุการใช้งานสั้น ดอกไม้แต่ละชนิดสามารถผลิตเอทิลีนและทนต่ออันตรายจากเอทิลีนในปริมาณที่แตกต่างกัน เอทิลีนในบรรยากาศเพียง 0.002-0.05 ไมโครกรัมต่อลิตร (พีพีเอ็ม) สามารถทำความเสียหายให้กับดอกไม้ได้ คือทำให้ดอกไม้เสื่อมคุณภาพ สีและดอกผิดปกติ ดอกหรือกลีบดอกและใบร่วง เหี่ยวเฉาเร็ว (สายชล, 2531)

4. ระบบการสร้างเอทิลีนในดอกไม้

ดอกไม้หลายชนิด เช่น คาร์เนชั่น แกลดิยา แวนดาและฟาแลนนอปปซิส มีความสามารถในการสร้างเอทิลีนแบบ autocatalytic system เมื่อดอกไม้ได้รับอันตรายจากสิ่งต่างๆ เช่น บาดแผล ขอกำ และสารเคมีเป็นพิษ สามารถกระตุ้นให้ดอกไม้สร้างเอทิลีนได้ เอทิลีนที่ดอกไม้เริ่มสร้างเพียงเล็กน้อยหรือเอทิลีนจากแหล่งอื่น ๆ สามารถชักนำให้ดอกไม้สร้างเอทิลีนเพิ่มมากขึ้นได้ (สายชล, 2531)

เอทิลีนที่ดอกไม้สร้างขึ้นเริ่มจาก methionine ถูกเปลี่ยนไปเป็น S-adenosyl methionine (SAM) และเปลี่ยนจาก SAM เป็น 1-aminocyclopropane-1-carboxy acid (ACC) โดยเอนไซม์ ACC synthase จากนั้น ACC ถูก oxidize ด้วยเอนไซม์ ACC oxidase ได้เป็นเอทิลีน (Van Altvorst and

Bovy, 1995) จุดที่สำคัญในการสร้างเอทิลีนในดอกไม้ คือ ระหว่าง SAM และ ACC โดยการเพิ่มขึ้นของเอทิลีนสัมพันธ์กับการสะสม ACC และการเสื่อมสภาพของดอกไม้ (Nair and Fong, 1987) จากรายงานของ Goh *et al.* (1985) และ Ketsa and Thampitakorn (1995) พบว่าดอกกล้วยไม้ สกุล หวายหลายพันธุ์ ในวัยดอกตูมมีการสร้างเอทิลีนมากกว่าดอกบาน สอดคล้องกับรายงานของ Yip and Hew (1988) ที่พบว่าดอกกล้วยไม้ *Aranda Christine* ดอกตูมมีการสร้างเอทิลีนสูงมากและค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนกระทั่งดอกบาน หลังจากนั้นการสร้างเอทิลีนค่อย ๆ ลดลง และมีรายงานว่าดอกตูมมีปริมาณ ACC มากกว่าดอกแย้มและดอกบานตามลำดับ (Ketsa and Thampitakorn, 1995) อัตราการผลิตเอทิลีนของดอกไม้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ อายุ และอุณหภูมิ ดอกกล้วยไม้หวายปอมปาดัวร์ที่มีอายุน้อยจะผลิตเอทิลีนได้มากกว่าดอกที่มีอายุน้อย และเมื่อให้ ACC แก่ดอกกล้วยไม้ระยะต่าง ๆ พบว่าดอกบานได้รับความเสียหายมากกว่าดอกตูม (Nair, 1984) ดอกกล้วยไม้ที่นำเกสรตัวผู้หรือดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการผสมเกสร มีการผลิตเอทิลีนเพิ่มมากขึ้นกว่าดอกปกติ (Ketsa and Rugkong, 2000) กล้วยไม้ *Phalaenopsis* ที่ได้รับการผสมเกสรพบว่า มีการส่งถ่ายสัญญาณครั้งแรกกระตุ้นการแสดงออกของยีน *ACS2* และยีน *ACS3* และมีการส่งถ่ายสัญญาณครั้งที่สองกระตุ้นการแสดงออกของยีน *ACS1* (Bui and O'Neill, 1998) อาการเหี่ยวของช่อดอกหรือดอกตูมกล้วยไม้ *Cymbidium* ที่ถูกชักนำโดยการปลูกเลี้ยงต้นกล้วยไม้ในสภาพอุณหภูมิสูง มีความสัมพันธ์กับปริมาณเอทิลีนที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกยีน *ACS* และยีน *ACO* ที่เพิ่มมากขึ้นในเนื้อเยื่อที่แสดงอาการเหี่ยว (Mita *et al.*, 2006)

5. การร่วง (abscission)

การร่วงเป็นกระบวนการที่ส่วนใด ๆ ของต้นพืชหลุดร่วงออกจากต้น เช่น ใบ ผล ดอก กลีบดอก ส่วนต่าง ๆ ของดอก ตา กาบหุ้มตา เปลือก (Brown, 1997; Sexton, 2002) ซึ่งเป็นผลมาจากการอ่อนตัวหรือสลายตัวของเซลล์บริเวณ abscission zone (AZ) บริเวณใดก็ได้ในเซลล์ที่เรียงตัวกันเป็นแถวจาก 1-20 แถว การอ่อนตัวนี้เป็นการสลายตัวของผนังเซลล์ซึ่งสูญเสียองค์ประกอบที่สำคัญในการรักษาโครงสร้าง เช่น pectin และ hemicellulose (Sexton, 2002)

การเกิด abscission เป็นช่วงเวลาของการชักนำให้เกิดการร่วงจนถึงการแยกตัวของเซลล์ที่สมบูรณ์ จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับเนื้อเยื่อและระดับของอิทธิพลที่ส่งเสริมการร่วงหรือยับยั้งการร่วง ขบวนการร่วงแบ่งได้เป็น 2 ช่วง คือ lag phase และ separation phase โดยในช่วงเริ่มต้นหรือ lag phase ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หรือมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เล็กน้อยซึ่งไม่แตกต่างจากเนื้อเยื่อปกติ ระยะ separation phase เนื้อเยื่อบริเวณ abscission มีความอ่อนแออย่างรวดเร็วและแยก

ตัวจากกัน ในใบระยะเวลาทั้งสองช่วงใช้เวลา 9-24 ชั่วโมง ขณะที่ในดอกใช้เวลา 1-4 ชั่วโมง (Sexton and Roberts, 1982)

6. ลักษณะเซลล์และการพัฒนาของ abscission zone (AZ)

AZ มักอยู่บริเวณรอยต่อระหว่างส่วนของพืช เช่น ระหว่างก้านใบกับกิ่ง ระหว่างก้านดอกกับก้านช่อดอก ลักษณะพื้นฐานของเซลล์ใน AZ มีขนาดเล็ก รูปร่างเป็นสี่เหลี่ยม และเซลล์นั้นมีไซโตพลาสซึมที่หนาแน่น มีแวคิวโอลขนาดเล็ก พลังเซลล์ค่อนข้างบาง สูญเสียความสามารถในการขยายตัว แต่จะขยายตัวในขณะเกิดการร่วง เนื้อเยื่อ AZ อาจมี 3-50 ชั้นเซลล์แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของพืช เช่น AZ ในโคนก้านดอกของมะเขือเทศมี 5 ชั้นเซลล์ ส่วน AZ ที่ฐานของใบย่อย *Sambucus nigra* ประกอบด้วย 50 ชั้นเซลล์ (Taylor and Whitelaw, 2001) เซลล์เหล่านี้ตอบสนองต่อฮอร์โมนแตกต่างกันไปจากเซลล์ในบริเวณใกล้เคียง อาจแบ่งชนิดของเซลล์ในบริเวณนี้ได้เป็นสองส่วน คือ abscission layer หรือเรียกอีกอย่างว่า separation layer คือชั้นเซลล์ที่จะเกิดการแยกตัวออกจากกัน และ protective layer คือ ชั้นเซลล์ที่จะเกิดการแบ่งตัวเพื่อปกป้องเซลล์บริเวณที่ยังคงติดอยู่กับส่วนของต้นหรือกิ่ง สำหรับเนื้อเยื่อลำเลียงในบริเวณ AZ มักพบว่าไม่มีการสะสมของลิกนินที่ให้ความแข็งแรงจึงทำให้ง่ายต่อการฉีกขาดเมื่อเกิดการร่วง (จริงแท้, 2549)

เซลล์ในบริเวณ abscission layer เป็นเซลล์เป้าหมายของสัญญาณหรือปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ ที่จะตอบสนองให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น (จริงแท้, 2549) Osborne (1989) ได้แบ่งเซลล์เป้าหมายออกเป็น 3 ประเภท ประเภทที่ 1 เซลล์ไม่ตอบสนองต่อเอทิลิน แต่จะแบ่งตัวตามยาวเมื่อได้รับออกซิน ประเภทที่ 2 เซลล์ขยายขนาดเมื่อได้รับเอทิลินแต่ไม่ตอบสนองต่อออกซิน ประเภทที่ 3 เซลล์ขยายขนาดเมื่อได้รับทั้งเอทิลินและออกซิน ในเนื้อเยื่อ AZ ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ประเภทที่ 2 มากที่สุด (Taylor and Whitelaw, 2001)

AZ อาจเกิดขึ้นขณะที่ใบ ดอก และผล กำลังพัฒนาเจริญเติบโตหรือเกิดขึ้นในภายหลังก็ได้ ในเนื้อเยื่อบางส่วนของพืชซึ่งปกติจะไม่หลุดร่วงอาจถูกกระตุ้นให้มีการแบ่งเซลล์สร้าง AZ ขึ้นแล้วทำให้เกิดการร่วงขึ้นได้ในที่สุด เรียกลักษณะนี้ว่า secondary abscission (จริงแท้, 2549) มีรายงานการเกิด secondary abscission เช่น ใน *Impatiens sultani* การเกิด secondary abscission zone ถูกชักนำในส่วนของ internode และตำแหน่งของการเกิด abscission มีผลเนื่องจากการให้ออกซินที่ส่วนฐานของเนื้อเยื่อนั้นๆ ในการเกิด secondary abscission ของก้านใบถั่ว *Phaseolus vulgaris* มีการสื่อสาร (cross talk) ระหว่างเอทิลินและออกซินซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการกำหนดตำแหน่งของ

การแยกของเซลล์ เอทิลีนทำหน้าที่ชักนำการสร้าง AZ ขณะที่ออกซินมีหน้าที่บอกตำแหน่งที่ AZ จะเกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและชีวเคมีที่เกิดขึ้นใน secondary abscission คล้ายคลึงกับ ในเนื้อเยื่อ abscission ที่มีการร่ว่งเกิดขึ้นตามปกติ (Roberts *et al.*, 2002)

7. ขบวนการแยกตัวของเซลล์ (Cell separation process)

เซลล์พืชเชื่อมต่อกันด้วยองค์ประกอบหลักคือ เพกทิน (pectin) เพกทินทำให้เซลล์พืชมีความแข็งแรงและคงตัว (Roberts *et al.*, 2002) ในส่วน middle lamella ที่เชื่อมต่อยกหว่างเซลล์ซึ่งมีเพกทินเป็นองค์ประกอบมักถูกย่อยสลาย ทำให้แรงยึดเหนี่ยวระหว่างเซลล์ลดลง เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์มากขึ้น ก่อนเซลล์แยกตัวจะมีการขยายขนาดของ golgi vesicle มีการขยายตัวของเซลล์ซึ่งเกิดเนื่องจากผนังเซลล์มีแรงดันของโปรโตพลาสร่วมกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ และเซลล์รูปร่างกลมที่เกิดจากการขยายตัวนี้ทำให้เกิดแรงดันในบริเวณ AZ (Brown, 1997; Roberts *et al.*, 2002)

การรับสัญญาณกระตุ้นการร่ว่ง จุดเริ่มต้นของขบวนการร่ว่งเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อที่ไม่ใช่ AZ (อวัยวะต่าง ๆ เช่น ใบ ดอก ผล ที่อยู่ห่างถัดไป) ได้ส่งสัญญาณกระตุ้นให้เกิดการร่ว่ง เช่น การร่ว่งของก้านใบได้รับสัญญาณจากการเสื่อมสภาพของแผ่นใบ หรืออายุที่มากขึ้นตามธรรมชาติของใบ หรือสภาพสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนไป การตอบสนองต่อสัญญาณการร่ว่งใน AZ เริ่มจากขั้นแรกมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์บริเวณ separation layer ขั้นที่สองมีสัญญาณเข้ามากระตุ้นเซลล์บริเวณ AZ ทำให้เกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของผนังเซลล์ (Roberts *et al.*, 2000)

Patterson (2001) เสนอแบบจำลองการร่ว่ง ที่ศึกษาใน *Arabidopsis* มี 4 ขั้นตอนหลักคือ

1. การเกิด AZ ถ้าไม่มี AZ การร่ว่งจะไม่เกิดขึ้น
2. การตอบสนองต่อสัญญาณที่กระตุ้นให้หลุดร่ว่ง
3. เริ่มกระบวนการร่ว่งโดยการแยกของเซลล์บริเวณ AZ
4. การเปลี่ยนแปลงเซลล์บริเวณที่แยกตัว ด้านที่ติดอยู่กับส่วนของพืชพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อ

ป้องกันการสูญเสียน้ำและการเข้าทำลายของเชื้อโรค

ปัจจัยที่มีผลให้เกิดสัญญาณกระตุ้นการร่ว่ง

- การเสื่อมสภาพของพืช
- ปริมาณแสง

- สภาพขาดน้ำหรือน้ำท่วม
- อุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป
- การเกิดบาดแผลและการเข้าทำลายของเชื้อโรค
- โอโซน

ปัจจัยเหล่านี้ล้วนแต่มีความเกี่ยวข้องกับระดับการผลิตก๊าซเอทิลีนซึ่งนำไปสู่สมมติฐานว่าเอทิลีนควบคุมการร่วง และสมดุลของฮอร์โมนต่าง ๆ อาจจะเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมเวลาในการเกิดกระบวนการนี้ (Taylor and Whitelaw, 2001)

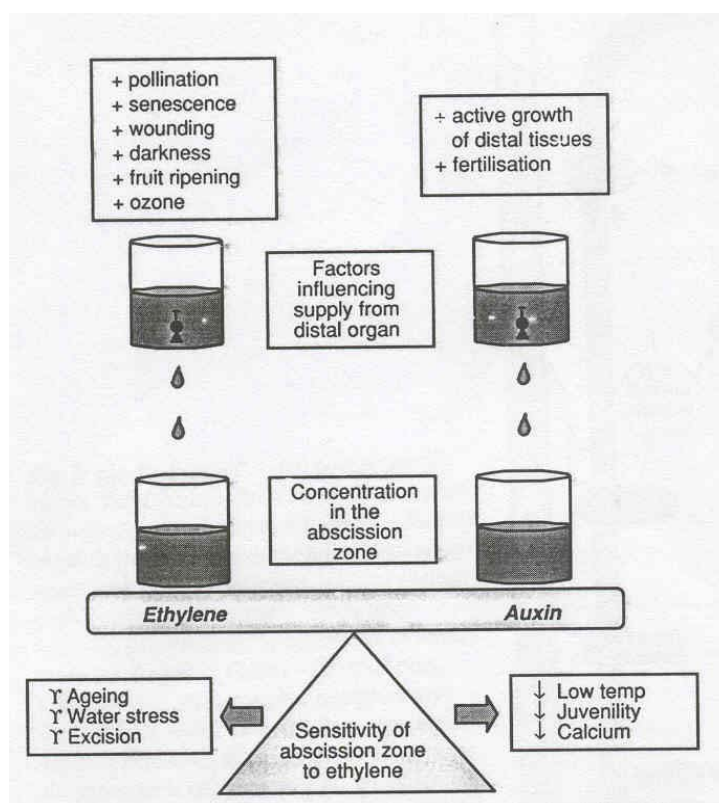
8. ฮอร์โมนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการร่วง

เอทิลีนเป็นฮอร์โมนพืชที่มีความสำคัญในการควบคุมการร่วง โดยเอทิลีนมีผลส่งเสริมกระบวนการร่วง (Sexton, 2002) ส่วนออกซินมีผลชะลอหรือยับยั้งการร่วง (Taylor and Whitelaw, 2001; Sexton, 2002) ออกซินและเอทิลีนสามารถควบคุมกิจกรรมและปริมาณซึ่งกันและกันได้ เช่น ออกซินลดความสามารถของเอทิลีนในการเร่งกระบวนการสุกและการร่วง และออกซินยังสามารถเพิ่มอัตราการผลิตเอทิลีน ส่วนเอทิลีนมีผลทำให้ปริมาณออกซินลดลง แต่บางรายงานพบว่า เอทิลีนไม่มีผลต่อปริมาณออกซินหรือเอทิลีนทำให้ปริมาณออกซินเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อ (Abeles *et al.*, 1992)

ในระหว่างการส่งถ่ายสัญญาณของเอทิลีนและออกซินพบว่าการสื่อสาร (crosstalk) ต่อกัน (Gazzarrini and McCourt, 2003; Etheridge *et al.*, 2006) ต้นกล้า *Arabidopsis* มียีน weak ethylene insensitive (*WEI2* และ *WEI7*) ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์ tryptophan (สารตั้งต้นของออกซิน) เมื่อได้รับเอทิลีนจะถูกชักนำให้มีการแสดงออกของยีน *WEI* มากขึ้นมีผลทำให้การสังเคราะห์ออกซินบริเวณปลายรากแก้วมากขึ้น ขณะที่ต้นกลายพันธุ์สูญเสียการทำงาน ยีน *wei2* และ *wei7* เอทิลีนไม่สามารถชักนำการสังเคราะห์ออกซินบริเวณปลายรากแก้ว (Stepanova *et al.*, 2005)

Sexton (2002) ได้เสนอทฤษฎีความสมดุลของปริมาณเอทิลีนและออกซิน กล่าวว่าในบริเวณ AZ ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทิลีนและออกซินเปรียบเสมือนสมดุลของน้ำหนักในแต่ละด้านของตาชั่ง ถ้าด้านซ้ายต่ำลง (เอทิลีนมีปริมาณมากกว่า) ก็จะชักนำให้เกิดการแยกของเซลล์ทำให้เกิดการร่วง น้ำหนักบนตาชั่งแต่ละด้านถูกควบคุมโดยปริมาณเอทิลีนและออกซินที่อยู่

ใน distal organ (อวัยวะห่างถัดไปจาก AZ) เช่น ใบ ดอก หรือ ผล และปริมาณเอทิลีนหรือออกซิน ใน distal organ ก็มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นหรือลดลงเนื่องจากปัจจัยอื่นๆเข้ามาเกี่ยวข้องดังแสดง ในภาพที่ 1 นอกจากนี้สัมมูลของเอทิลีนและออกซินเปลี่ยนแปลงได้เมื่อมีการเคลื่อนที่ของจุดสม ดุลไปทางซ้ายหรือขวา การเคลื่อนย้ายจุดสมดุลนี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความไวในการตอบ สนองต่อฮอร์โมน การเคลื่อนจุดสมดุลไปทางซ้ายมีผลทำให้เนื้อเยื่อ AZ มีความไวต่อเอทิลีนเพิ่ม ขึ้น ส่วนการเคลื่อนจุดสมดุลไปทางขวามีผลทำให้เนื้อเยื่อ AZ มีความไวต่อออกซินมากขึ้นและลด การตอบสนองต่อ เอทิลีน ส่วนปัจจัยที่ทำให้จุดสมดุลเคลื่อนที่ไปทางซ้ายหรือขวา เช่น ความชรา ความอ่อนเยาว์ ความเครียด ฯลฯ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แบบจำลองสมดุลของออกซินและเอทิลีนต่อการร่วง (Taylor and Whitelaw, 2001)

8.1 ออกซินและการควบคุมการร่วง

ออกซินสามารถยับยั้งการร่วงในใบ ดอกและผล (Jacobs, 1962; Brown, 1997) เมื่อทำการสกัดสารและวัดปริมาณการเคลื่อนที่ของออกซินพบว่า ออกซินลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อใบมีอาการเหลืองและใกล้ร่วง (Roberts and Osborne, 1981) ปริมาณออกซินใน AZ ที่เหลืออยู่ ถ้าอยู่

เหนือระดับวิกฤต การร่งก็จะถูกยับยั้ง อัตราการสร้างและการสลายตัวของออกซินเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อปริมาณออกซินใน AZ (Sexton, 2002) แต่อัตราการเคลื่อนย้ายของออกซินจากอวัยวะที่อยู่ถัดไปจาก AZ (distal zone) มีอิทธิพลต่อระดับออกซินใน AZ อย่างมาก (Davenport *et al.*, 1980) Addicott *et al.* (1955) รายงานว่าทิศทางการเคลื่อนที่ของออกซินสู่ AZ มีความสำคัญมากกว่าปริมาณออกซิน โดยออกซินเคลื่อนที่เข้าหาจุด AZ จากทิศทางที่ไกลจาก AZ จะยับยั้งการร่งขณะที่ออกซินเคลื่อนที่เข้าหาจุด AZ จากทิศทางที่ใกล้ AZ เร่งกระบวนการร่ง การให้ออกซินบริเวณใกล้ AZ สามารถเร่งการร่งได้โดยออกซินจะส่งเสริมการสังเคราะห์เอทิลีน โดยชักนำการสร้าง ACC ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอทิลีน ออกซินมีผลทำให้อัตราการผลิตเอทิลีนเพิ่มขึ้นโดยกระตุ้นการแสดงออกของยีน *ACS4* ใน *Arabidopsis* ขณะเดียวกันเอทิลีนที่สร้างขึ้นใหม่ขัดขวางการเคลื่อนที่ของออกซินไม่ให้ไปถึง AZ (Abeles and Rubinstein, 1964; Abel *et al.*, 1995) และการให้สารยับยั้งการสร้างเอทิลีน aminooxyacetic acid (AOA) จะช่วยยับยั้งการเร่งกระบวนการร่งซึ่งมีผลมาจากการให้ออกซินจากภายนอกบริเวณใกล้ AZ (Morris, 1993)

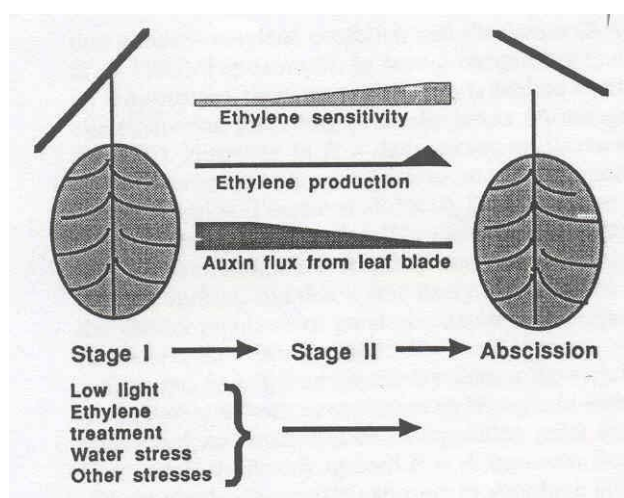
การตอบสนองต่อออกซินใน lag phase สามารถแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ระยะที่ 1 เซลล์ใน AZ มีความไวต่อออกซินแต่ไม่มีความไวต่อเอทิลีน การให้ออกซินจะยับยั้งการร่งและขยายช่วงเวลาระยะที่ 1 ออกไป เมื่อปริมาณออกซินลดลงต่ำกว่าจุดวิกฤตจึงเข้าสู่ระยะที่ 2 ในระยะที่ 2 เซลล์ใน AZ มีความไวต่อเอทิลีนแต่ไม่มีความไวต่อออกซิน ถ้าให้ออกซินในช่วงระยะนี้จะส่งเสริมการร่งมากกว่าที่จะป้องกันการร่ง (Sexton, 2002) Rubinstein and Leopold (1963) รายงานว่าการให้ออกซินหลังจากตัดแผ่นใบออกแล้วนานเกินกว่า 12 ชั่วโมงจะส่งเสริมการร่งมากกว่ายับยั้งการร่ง การสูญเสียคุณสมบัติการตอบสนองต่อออกซินในระยะที่ 2 เป็นผลเนื่องจากการสูญเสียตัวรับออกซิน ซึ่งสอดคล้องกับ Jaffe and Goren (1979) รายงานว่าในช่วงระยะที่ 2 ความสามารถในการยับยั้งการร่งลดลงและพลังงานในการปลดปล่อยประจุ H^+ ก็ลดลงด้วย ซึ่งคาดการณ์ว่าการเปลี่ยนแปลงสองขบวนการนี้เป็นผลมาจากประสิทธิภาพของการตอบสนองเสียไปเนื่องจากการสูญเสียองค์ประกอบพื้นฐานในการตอบสนอง เช่น ตัวรับ อีกเหตุผลหนึ่งอาจเป็นเพราะออกซินไม่สามารถเดินทางไปถึง AZ เนื่องจากการเคลื่อนที่ของออกซินลดลง

ช่วงเวลาระหว่างการให้ออกซินจากภายนอกจนสร้างเอทิลีน (lag phase) แตกต่างกันตั้งแต่ 30 นาทีในส่วนของรากถั่ว pea (Chadwick and Burg, 1967; 1970) 1 ชั่วโมงหรือมากกว่าในลำต้นถั่วเขียว (Arteca *et al.*, 1988) ช่วงเวลา lag phase ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ IAA ที่ให้กับพืช มีหลายงานวิจัยรายงานว่าออกซินระดับความเข้มข้น $1 \mu M$ สามารถชักนำการสร้างเอทิลีนได้ และอัตราการผลิตเอทิลีนยังสามารถประเมินปริมาณออกซินในเนื้อเยื่อพืชได้ (Abeles *et al.*, 1992)

8.2 เอทิลีนกับการร่วง

8.2.1 เอทิลีนกับการร่วงของใบ

Hall (1952) รายงานว่าเอทิลีนและออกซินร่วมกันควบคุมการร่วงของใบ โดยเสนอแบบจำลองระบบสรีรวิทยาและชีวเคมีเมื่อเกิดการร่วงในพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น ถั่ว ฝ้าย ดังในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แบบจำลองความสัมพันธ์ของเอทิลีนและออกซินที่ควบคุมการร่วงในใบ (Brown, 1997)

ในระยะที่ 1 (Stage I) AZ ของใบไม่ตอบสนองต่อเอทิลีนเพราะมีออกซินอยู่ ขณะที่ออกซินไหลออกจากแผ่นใบผ่านก้านใบลดลงเมื่ออายุใบเพิ่มขึ้น ความไวต่อเอทิลีนเพิ่มขึ้น เมื่อ AZ เข้าสู่ระยะที่ 2 (Stage II) จะเกิดการร่วงทันทีเพื่อตอบสนองต่อเอทิลีน การให้เอทิลีนจากภายนอกและการเกิด stress จะเร่งการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะที่ 2 และทำให้เนื้อเยื่อมีความไวต่อเอทิลีนมากขึ้น (Brown, 1997) การที่ AZ มีความไวต่อเอทิลีนน่าจะสัมพันธ์กับการเคลื่อนที่ของออกซินผ่าน AZ มากกว่าปริมาณของออกซินที่อยู่บริเวณ AZ และเอทิลีนทำให้ช่วงเวลาระยะที่ 1 สั้นลงโดยการยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซิน (Beyer, 1973) ในใบอ่อนของพืชพบว่า สามารถสร้างเอทิลีนได้มากกว่าใบที่มีอายุมากขึ้น แต่การร่วงไม่เกิดขึ้นในใบอ่อนเนื่องจากปริมาณออกซินที่มีมากในใบอ่อน (Abeles *et al.*, 1992; Morgan *et al.*, 1992)

8.2.2 เอทิลีนกับการร่วงของดอก

เอทิลีนเร่งการร่วงของดอกและกลีบดอกในพืชหลายชนิด ในการสำรวจชนิดของดอกไม้ที่มีความสำคัญทางพืชสวน พบว่าแนวโน้มของดอกไม้ที่จะเหี่ยวแห้งหรือหลุดร่วงขึ้นกับวงศ์ของพืชนั้นๆ (Woltering and van Doorn, 1988; van Doorn and Stead, 1997) และชนิดดอกไม้ที่หลุดร่วงมีแนวโน้มว่ามีความไวต่อเอทิลีนมากที่สุด (Brown, 1997) การใช้สารยับยั้งเอทิลีน เช่น silver thiosulfate (STS) ช่วยป้องกันการร่วงของกลีบดอกที่ชักนำโดยเอทิลีนในดอกไม้หลายชนิด เช่น delphinium, anemone, begonia, กุหลาบบางพันธุ์ (Woltering and van Doorn, 1988) และดอกสตรอเบอร์รี่ (Lannetta *et al.*, 2006) เอทิลีนที่เกิดขึ้นภายในระหว่างการพัฒนาของดอกหรือการผสมเกสรควบคุมการร่วงของดอก เช่น ในสกุล *Digitalis*, *Pelargonium* พืชเนย แอปเปิลและเชอร์รี่ (Whitehead *et al.*, 1984; Sexton *et al.*, 1985; Evensen, 1991) การร่วงของกลีบดอกในดอกไม้บางชนิดมักตอบสนองต่อเอทิลีนเนื่องจากเนื้อเยื่อมีความไวต่อเอทิลีน การเปลี่ยนแปลงของความไวต่อเอทิลีนระหว่างการพัฒนาของดอกมีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของเอทิลีนภายในที่ควบคุมให้เกิดการร่วงของกลีบดอก เช่น กลีบดอกที่เฟื่องบานของ geranium (*P. x domesticum*) ไม่หลุดร่วงหลังจากได้รับเอทิลีน ความเข้มข้นสูงถึง 100 ไมโครลิตร/ลิตร ขณะที่กลีบดอกของดอกที่บานแล้ว 2-3 วัน ร่วงเมื่อได้รับเอทิลีนความเข้มข้นต่ำระดับ 0.50 ไมโครลิตร/ลิตรในเวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง (Evensen, 1991) ดอกไม้บางชนิดที่ไม่ได้ผสมเกสรไม่มีความไวต่อเอทิลีนแม้ว่าจะสูญเสียทั้งความตึงและเหี่ยว ขณะที่ดอกที่ผสมเกสรแล้วมีความไวต่อเอทิลีนและกลีบดอกร่วง (Halevy *et al.*, 1984) ในบางกรณีการเปลี่ยนแปลงความไวของเอทิลีนเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของออกซิน เช่นในดอกไม้ที่ร่วงบริเวณก้านดอก การควบคุมของออกซินและเอทิลีนมีผลเหมือนกับบริเวณ AZ ของใบ (Oberholdster *et al.*, 1991) การให้ออกซินจากภายนอกสามารถชะลอการร่วงของ AZ บริเวณก้านดอกของดอกไม้หลายชนิด (Oberholdster *et al.*, 1991; del Campillo and Bennett, 1996) แต่กรณีของกลีบดอก ส่วนใหญ่ออกซินที่ได้รับทำให้มีการผลิตเอทิลีนมากขึ้น การร่วงหรือการเสื่อมสภาพของกลีบดอกเพิ่มขึ้น การร่วงของดอกเกิดขึ้นในเวลาอันรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับใบและผล อาจจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน ซึ่งพบว่าการให้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (ออกซิน) ชักนำให้มีการสะสมของ mRNA อย่างรวดเร็ว (Brown, 1997)

9. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการร่วง

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในผนังเซลล์ก่อนเกิดการร่วงในใบ พบว่า ระดับของเพกทินที่ไม่ละลายน้ำลดลงและระดับของเพกทินที่ละลายน้ำเพิ่มขึ้น (Sexton, 2002) แสดงว่ามีการทำให้โมเลกุลของเพกทินแตกลงและการตัดพันธะที่เชื่อมอยู่กับโมเลกุลอื่นโดยเอนไซม์ การสลายตัวของผนังเซลล์ยังเกี่ยวข้องกับการตัดเซลลูโลส (cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของผนังเซลล์ในขบวนการร่วงมีลักษณะเหมือนกับการสลายตัวของผนังเซลล์ในขบวนการสุกของผล เช่น pectin esterase (PE), endo-polygalacturonase (endo-PG), exo-polygalacturonase (exo-PG), rhamnogalacturonidase, α -galactosidase, β -galactosidase, hemicellulase และ cellulase หรือ endo-1,4- β -D-glucanase (van Doorn and Stead, 1997; Sexton, 2002)

9.1 Cellulase (β -1,4-glucanase)

Cellulase มีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเกี่ยวข้องกับการร่วงของใบ *Phaseolous vulgaris* (Lewis and Varner, 1970) การร่วงของดอกยาสูบ (Lieberman *et al.*, 1983) และดอกมะเขือเทศ (Tucker *et al.*, 1984) และยังพบกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในการสลายผนังเซลล์หลังจากชั้นเซลล์แยกจากกันแล้ว อาจเป็นไปได้ว่า cellulase มีส่วนเกี่ยวข้องกับการย่นคืนมาของเฮมิเซลลูโลส ทำให้เกิดการขยายตัวของเซลล์บริเวณชั้นเซลล์ที่แยกจากกัน (Sexton and Redshaw, 1981)

เอนไซม์ cellulase ที่พบในขบวนการร่วงของถั่วมี 2 isoforms คือ cellulase ที่มีค่า isoelectric point (pI) 4.5 และ 9.5 (Abeles *et al.*, 1992; van Doorn and Stead, 1997) cellulase ที่มีค่า pI 9.5 เป็น cellulase ทั่วไปที่ถูกชักนำระหว่างกระบวนการแยกตัวของเซลล์ และพบว่าการแสดงออกของยีน cellulase ที่มีค่า pI 9.5 ก่อนใบร่วง (Lewis and Varner, 1970; Tucker *et al.*, 1988; Tucker and Milligan, 1991) มีการแสดงออกของยีน cellulase ที่มีค่า pI 9.5 ก่อนการร่วงของดอกถั่วเหลืองและพบว่ามีเอนไซม์ cellulase ที่มีค่า pI 9.5 อยู่ใน AZ ของดอกเมื่อตรวจสอบโดยวิธี Immunoblotting (Kemmerer and Tucker, 1994) ในก้านดอกมะเขือเทศพบว่ามียีน 2 ยีนที่สร้าง endo-1, 4- β -D-glucanase ยีนหนึ่งแสดงออกในส่วน AZ และห่างจาก AZ ส่วนอีกยีนแสดงออกใน AZ ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่ายีนทั้งสองเกี่ยวข้องกับ cellulase ที่มีค่า pI 9.5 ที่พบในก้านดอกถั่วเหลืองอย่างไร (Lashbrook *et al.*, 1994) ต่อมาพบการแสดงออกของยีนในก้านดอกมะเขือเทศเพิ่ม

อีก 4 ยีน โดย 2 ยีนเหมือนกับที่พบในเนื้อเยื่อ pericarp ของผล ส่วนอีก 2 ยีน แสดงออกขณะที่ดอก หลุดร่วง เมื่อให้สาร IAA บริเวณก้านดอกพบว่าไม่มีการร่วงของดอก ตรวจสอบปริมาณ mRNA ของ cellulase บริเวณก้านดอก พบว่า 2 ใน 6 ยีนมีปริมาณ mRNA ลดลง ส่วนอีก 4 ยีนปริมาณ mRNA เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการควบคุมยีน cellulase ที่มีความจำเพาะต่อการร่วง สามารถควบคุมกระบวนการร่วง (del Campillo and Bennett, 1996)

การแสดงออกของยีน cellulase พบว่ามีการสะสมปริมาณ mRNA ของยีน cellulase มากขึ้นเมื่อพืชได้รับเอทิลีน (Tucker *et al.*, 1988; Abeles *et al.*, 1992; Brown, 1997) การได้รับเอทิลีนอย่างต่อเนื่องมีความจำเป็นต่ออัตราการร่วง ถ้านำ AZ ของใบกล้วยไม้ไปไว้ในสภาพความดันต่ำเพื่อลดความเข้มข้นของเอทิลีน จะไม่พบการแสดงออกของยีนที่ถูกชักนำด้วยเอทิลีน (Sexton *et al.*, 1985) แสดงว่าเอทิลีนอาจจะจำเป็นต่อการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์เกี่ยวข้องกับการร่วง นอกจากนี้เอทิลีนอาจจะควบคุมการร่วงในช่วงหลังการแปลรหัส ณ ตำแหน่งหนึ่งหรือหลายตำแหน่ง เช่น มีหลักฐานว่าเอทิลีนควบคุมการหลั่งเอนไซม์ cellulase ใน AZ ของถั่วเขียว (Abeles and Leather, 1971) เมื่อปริมาณเอทิลีนลดลงก่อนที่การแยกของเซลล์จะเกิดขึ้น นอกจากไม่มีการร่วงแล้วยังพบว่าเซลล์มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น (Abeles *et al.*, 1992) แสดงว่าสมดุลของการสลาย และการสร้างผนังเซลล์ผันแปรเป็นการสร้างผนังเซลล์เมื่อความเข้มข้นของเอทิลีนหรือความไวต่อเอทิลีนลดลง (Brown, 1997) Koehler *et al.* (1996) แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ 210 bp บริเวณ 5' promotor บนยีน cellulase ของถั่วมีความเพียงพอสำหรับเอทิลีนและออกซินที่ควบคุมการแสดงออกของยีน cellulase

9.2 Pectic enzymes

กิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยเพกทินใน AZ ศึกษาจากกายวิภาคในการสลายตัวของ middle lamella และการเพิ่มขึ้นของเพกทินที่ละลายน้ำได้ (soluble pectin) เมื่อเกิดการร่วงกิจกรรมของเอนไซม์ pectinase ตรวจสอบได้ยากมากใน AZ เมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase (Brown, 1997) ในส่วน AZ ของใบมะเขือเทศ ใบส้ม และผลส้ม กิจกรรมของเอนไซม์ polygalacturonase (PG) เกิดขึ้นพร้อมกับการร่วงที่ชักนำโดยเอทิลีน (Greenberg *et al.*, 1975; Taylor *et al.*, 1990) กิจกรรมของเอนไซม์ PG ในก้านดอกมะเขือเทศถูกชักนำโดยเอทิลีน แต่เพิ่มขึ้นหลังจากการแยกของเซลล์ได้เกิดขึ้นแล้ว (Tucker *et al.*, 1984) มีเอนไซม์ pectinase บนผนังเซลล์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการร่วง เช่น exo-PG ที่พบบน AZ ของถั่วไม่เกี่ยวข้องกับการร่วง (Brown, 1997) ยีน *TAPG1* ซึ่งแสดงออกระหว่างการร่วงของใบและดอกมะเขือเทศมีลักษณะการร่วงที่เกี่ยวข้อง

ข้องกับการย่อยสลายผนังเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อการร่วงเกี่ยวข้องกับเอทิลีน การย่อยสลายผนังเซลล์ถูกยับยั้งเมื่อได้รับออกซินหรือสารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน เช่น silver thiosulfate (STS) การแสดงออกของยีน *TAPG1* เกิดเฉพาะบริเวณ AZ (Kalaitzis *et al.*, 1995) ต่อมาพบยีน *TAPG2* และ *TAPG4* เป็นยีน PG ที่เกี่ยวข้องกับการร่วง ทั้ง 2 ยีนมีความเหมือนกันในระดับ nucleotide ประมาณ 80-95 % ยีน *TAPG1* *TAPG2* และ *TAPG4* มีการแสดงออกระหว่างการร่วงของใบและดอก โดยช่วงแรกมีการสะสม mRNA ใน AZ หลังจากนั้นมีการสะสม mRNA เล็กน้อยในเนื้อเยื่อส่วนใบหรือดอก อัตราการสะสม mRNA แตกต่างกันระหว่างยีนทั้งสามและมีการสะสมในบริเวณ AZ ของก้านดอกมากกว่าบริเวณ AZ จากใบ (Kalaitzis *et al.*, 1997)

Pectin esterases (PE) เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์และทำให้ผนังเซลล์ตอบสนองต่อเอนไซม์ PG ได้ดียิ่งขึ้น ในส้มพบยีน pectin esterase 2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการร่วง ยีนหนึ่งทำงานในเนื้อเยื่อหลายๆส่วนเมื่อได้รับเอทิลีน ส่วนอีกยีนหนึ่งแสดงออกใน AZ ของผลหลังจากได้รับเอทิลีน (Brown, 1997)

Pectate lyase (PL) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับสลายเพกทินชนิดหนึ่ง พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ pectate lyase และการแสดงออกของยีน PL เพิ่มขึ้นระหว่างการสุกของกล้วย (Marin-Rodriguez *et al.*, 2003; Payasi and Sanwal, 2003) ในระหว่างการสุกของผลสตเบอร์รี่ *Fragaria x ananassa* cv. Chandler พบว่ายีน PL 2 ยีน คือ *plA* และ *plB* มีการแสดงออกลดลงเมื่อเก็บผลสตเบอร์รี่ไว้ในสภาพบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูง (Benitez-Burraco *et al.*, 2003)

9.3 Expansin

Expansin เป็นโปรตีนเกี่ยวข้องกับการหลวมตัวของผนังเซลล์ระหว่างการขยายขนาดและการสุก มีรายงานว่าพบ expansin ระหว่างการร่วง มีการแสดงออกของยีน *AtExp10* ซึ่งอยู่ใน expansin family ของ *Arabidopsis* ที่ฐานก้านใบ แต่ยังไม่มีความชัดเจนว่ามีการแสดงออกของยีนที่จุดแยกของกลีบเลี้ยง กลีบดอก หรือดอก เมื่อให้เอทิลีนแก่ใบย่อยของ *Sambucus nigra* พบว่ามีกิจกรรมของ expansin เพิ่มขึ้นใน AZ (Roberts *et al.*, 2002) Expansin เป็นโปรตีนที่มีหลาย isoform ความแตกต่างของ isoform ในโปรตีนเหล่านี้ต่อการแยกตัวยังไม่ชัดเจนต้องทำการศึกษาต่อไป

9.4 เอนไซม์อื่น ๆ ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างเซลล์แตกตัว

เอนไซม์ hydrolase อื่น ๆ เช่น DNAase RNAase protease และ phosphatase ทุกเอนไซม์เพิ่มขึ้นระหว่างช่วงหลังจากแตกตัวเสร็จแล้ว การเปลี่ยนแปลงนี้ยังไม่สามารถอธิบายได้เนื่องจากเกิดขึ้นนอกบริเวณเนื้อเยื่อที่มีการแตกตัว (Sexton, 1982) เอนไซม์ peroxidase มีกิจกรรมสูงขึ้นในเนื้อเยื่อที่จะหลุดร่วงก่อนการร่วงจะถูกกระตุ้น และพบว่ามีกิจกรรมเพิ่มขึ้น 10-15 เท่าเมื่อถูกกระตุ้นให้หลุดร่วง (Henry *et al.*, 1974; Poovaiah and Rasmussen, 1973) การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ส่วนใหญ่จะสังเคราะห์ขึ้นเองและกิจกรรมถูกยับยั้งโดยการให้สาร cycloheximide (Valdovinos and Jensen, 1973; Valdovinos *et al.*, 1985) มีรายงานว่า peroxidase และ IAA oxidase มีผลต่อการทำลาย IAA ในเนื้อเยื่อ (Liu *et al.*, 1996) หน้าที่ของ peroxidase ใน AZ ที่มีต่อขบวนการร่วงยังไม่ทราบแน่นอน แต่โดยทั่วไป peroxidase มีหน้าที่ polymerize ลิกนินให้เป็นโมเลกุลใหญ่ขึ้น การที่ peroxidase เพิ่มขึ้นอาจเป็นเพราะผนังเซลล์ของเซลล์ที่ใกล้ AZ จะมีลิกนินและซูเบอร์ินจำนวนมาก และมีการสร้าง tylose ดังนั้น peroxidase จึงเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารเหล่านี้เพื่อสมานรอยบาดแผลหลังจากการร่วง (van Doorn and Stead, 1997)

10. ยีนอื่น ๆ และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการร่วง

ในการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทิลีน โดยสร้าง cDNA library จาก mRNA ที่สกัดได้จากบริเวณ AZ ของดอก *Arabidopsis* ที่ได้รับเอทิลีน สามารถจำแนกยีนต่างๆ ได้ดังนี้ คือ ยีนที่เกี่ยวข้องกับ ethylene receptor 2 ยีน ACC synthase 8 ยีน และ ACC oxidase 4 ยีน (Lashbrook and Klee, 1999) การทำ antisense ของยีน ACC synthase ถ่ายเข้าสู่ *Arabidopsis* สามารถลดการสังเคราะห์เอทิลีนและทำให้ลดการร่วง การสุกและการเสื่อมสภาพของผล (Patterson, 2001)

การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อต่อความไวของเอทิลีน คือ การเพิ่มขึ้นของตัวรับเอทิลีน (ethylene receptor) หรือองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ตอบสนองต่อเอทิลีน (response elements) (Trewavas, 1991) ในปัจจุบันมีการศึกษาความสัมพันธ์ของการร่วงและตัวรับเอทิลีนมากขึ้น เช่น การลดลงของ mRNA ของยีน *LeETR1* ในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม ทำให้การร่วงของใบและดอกช้าลง ความยาวปล้องลดลงและลดการเคลื่อนที่ของออกซิน (Whitelaw *et al.*, 2002) ในดอก *Delphinium* การร่วงของดอกมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน *ERS* โดยเปอร์เซ็นต์การร่วงมากขึ้นปริมาณ mRNA ของยีน *ERS* ก็มากขึ้นด้วย (Kuroda *et al.*, 2003) การแสดงออกของยีน *tETR* มีมากขึ้นในเนื้อเยื่อ AZ ของดอกมะเขือเทศและเนื้อเยื่ออื่นๆ ที่ตอบสนองต่อเอทิลีน (Payton

et al., 1996) การยับยั้งยีน *LeETR1* ในมะเขือเทศมีผลทำให้ชะลอการร่วงของดอก (Barry *et al.*, 2005) และใน *Arabidopsis* กลายพันธุ์ยีน *etr1-1* มีผลยับยั้งการร่วงของดอกและกลีบดอก (Bleecker and Patterson, 1997; Patterson and Bleecker, 2004)

การศึกษาที่ยีนที่ตอบสนองต่อออกซินใน *Arabidopsis* โดยหา ยีนที่มีความสำคัญต่อการส่งสัญญาณพบว่ายีน auxin resistant 1 (*AXR1*) เป็นยีนตัวหนึ่งที่เกี่ยวข้อง เนื่องจากถ้ายีนนี้ไม่ทำงานจะทำให้ความไวต่อออกซินลดลง (Lincoln *et al.*, 1990) ยีน *AXR1* สร้างโปรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับการเชื่อม ubiquitin เข้ากับโปรตีนเป้าหมาย (Leyser *et al.*, 1993) นอกจากยีน *AXR1* แล้วยังมียีน *TIR1* ที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างโปรตีนในขั้นตอนที่ต้องมีออกซินเข้ามาเกี่ยวข้อง ใน *Arabidopsis* มียีนที่สร้าง Aux/IAA protein อย่างน้อย 15 ยีนที่เป็นสมาชิกในกลุ่มเดียวกัน โปรตีนเหล่านี้มีครึ่งชีวิตสั้น ดังนั้นในช่วงการตอบสนองต่อออกซินจะมีการสร้าง mRNA ของยีนในกลุ่ม Aux/IAA อย่างรวดเร็วและเพิ่มขึ้นภายในเวลา 5-60 นาที (Abel and Theologis, 1996; Woodward and Bartel, 2005) auxin responsive factors (ARFs) โปรตีนกลุ่มนี้สามารถเชื่อมต่อกับ auxin response elements ในการกระตุ้น promoter ของออกซิน โดยโปรตีนกลุ่มนี้มีส่วนหนึ่งที่มีลักษณะของการเรียงตัวของกรดอะมิโนเหมือนกับกลุ่ม Aux/IAA protein ทำให้จับกันและเกิดปฏิกิริยาขึ้น (Ulmasov *et al.*, 1997) ความซับซ้อนของปฏิกิริยาระหว่าง ARFs และ Aux/IAA protein ทำให้เกิดความแตกต่างในการตอบสนองต่อออกซิน (Taylor and Whitelaw, 2001) มีรายงานว่า การสลายตัวของ Aux/IAA protein มีผลต่อการส่งสัญญาณของออกซินตามปกติ (Worley *et al.*, 2000) การที่พืชจะเจริญเติบโตได้ดี พืชต้องตอบสนองออกซินได้ดีด้วย พบว่ายีน *NPH4* ของ *Arabidopsis* ที่สร้าง ARF7 เมื่อมีสภาพเป็น mutant จะสูญเสียการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับออกซิน และเมื่อให้เอทิลีนกับ mutant เอทิลีนสามารถเพิ่มการตอบสนองของออกซินกลับคืนมา (Harper *et al.*, 2000) การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อส่วน AZ ก้านใบหรือลำต้นของ *Mirabilis jalapa* ที่มีการตัดใบและลำต้นส่วนหนึ่งทิ้งหลังจากนั้นให้ต้นพืชได้รับเอทิลีน พบว่ายีน *Mj-Aux/IAA1* และ *Mj-Aux/IAA2* ซึ่งสร้างโปรตีน Aux/IAA มีการแสดงออกลดลงใน AZ ของก้านใบหรือลำต้นที่ถูกตัด แต่มีการแสดงออกของยีน *Mj-Aux/IAA1* และ *Mj-Aux/IAA2* เพิ่มขึ้นเมื่อก้านใบหรือลำต้นที่ถูกตัดได้รับสาร NAA บริเวณรอยตัด การให้ IAA บริเวณรอยตัดของก้านใบและลำต้นมีผลทำให้ป้องกันการลดลงของระดับ mRNA ของยีนทั้งสองใน AZ (Meir *et al.*, 2006)

ยีน Inflorescence deficient abscission (*ida*) และ delayed abscission (*dab1*, *dab2*, *dab3*, *dab4* และ *dab5* เป็น mutant ที่พบใน *Arabidopsis* ซึ่ง mutant ทั้ง 2 ชนิดมีการตอบสนองต่อเอทิลีนเป็นปกติแต่การร่วงช้าลง ส่วนยีน *RLK5* หรือ *HAESA* ทำหน้าที่ควบคุมการร่วงในดอก

(Patterson, 2001) มีรายงานว่ายีน *MADS-box*, *SHATTERPROOF1* และ 2 (*SHP1* และ *SHP2*) *AGL-15* และ ยีน *JOINTLESS* ในมะเขือเทศมีส่วนเกี่ยวข้องในการแยกเซลล์จากกัน (Fernandez *et al.*, 2000; Liljegren *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 2000)

มีการศึกษาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในขบวนการร่วง เช่น tryptophan synthase β และ abscisic acid insensitive gene (*ABI3*) โดยใช้ยีน *GUS* ทดสอบการแสดงออกของยีน (Pruitt and Last, 1993; Rohde *et al.*, 1999) ในระหว่างการร่วงของดอกและก้านใบ *Arabidopsis* มีการทำงานของยีน leucine-rich repeat เพิ่มขึ้น (Jinn *et al.*, 2000) การลดลงของโปรตีน HAESA มีผลทำให้การร่วงของดอกลดลง (Roberts *et al.*, 2002)

11. ผลของสารยับยั้งออกซิน

สารยับยั้งออกซิน (auxin inhibitor) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ สารยับยั้งการทำงานของออกซิน (auxin action inhibitor) และสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซิน (auxin transport inhibitor) มีการใช้สารยับยั้งออกซินในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและขบวนการพัฒนาของพืชซึ่งเป็นผลมาจากออกซิน เช่น การยืดตัวของลำต้นและราก การเจริญของราก การเกิดรากขนอ่อน การโค้งงอของยอด การโค้งตามแรงโน้มถ่วง การพัฒนาของเนื้อเยื่อ การร่วง (Wien *et al.*, 1992; Fujita and Syono, 1996; Kaska *et al.*, 1999)

สารยับยั้งการทำงานของออกซิน เช่น α (*p*-chlorophenoxy) isobutyric acid (PCIB) [ปัจจุบันยกเลิกการผลิตสารนี้และเปลี่ยนมาใช้สาร 2-(4-chlorophenoxy)-2-methyl propionic acid (CMPA)] และ 2,4,6-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,6-T) สารยับยั้งการทำงานของออกซินมีลักษณะโครงสร้างเหมือนออกซินและมีการเคลื่อนที่จากปลายยอดสู่ฐานของพืชเหมือนออกซิน สารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซิน เช่น 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA), N-1-naphthylphthalamic acid (NPA), 1-(2'-carboxyphenyl)-3 phenylpropane-1,3-dione (CPD) และ 9-hydroxyfluorene-9-carboxylic acid (HFCA) สารยับยั้งการเคลื่อนที่ที่จับกับออกซินและยับยั้งการเคลื่อนที่ โดย TIBA มีลักษณะที่ไม่เป็น polarity ในการเคลื่อนที่ ขณะที่สารยับยั้งออกซิน เช่น PCIB และ 2,4,6-T มีลักษณะโครงสร้างเหมือนออกซินและมีการเคลื่อนที่จากปลายยอดสู่ฐานของพืชเหมือนออกซิน (Suttle, 1988)

การให้สารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซิน เช่น TIBA ทำให้การผลิตเอทิลีนลดลงโดยไปเปลี่ยนแปลงให้เนื้อเยื่อของถั่วเขียวให้มีความหนาแน่นมากขึ้นจากเดิม (Tsai and Arteca, 1984) TIBA มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ IAA ในรากและยอดของต้นกล้าแอปเปิ้ล (Grochowska *et al.*, 1994) การให้สาร TIBA ยับยั้ง apoptotic cell death ในยาสูบเมื่อได้รับอนุมูลอิสระสูงเกินไป โดยยับยั้งการเซลล์ตาย ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ DNA แตกสลายเป็นชิ้นส่วน (Yamada *et al.*, 2001) NPA และ TIBA มีผลยับยั้งการสร้างเอทิลีน การเคลื่อนย้ายออกซิน และมีผลต่อการขยายตัวของราก (Fujita and Syono, 1996) การให้ TIBA แก่ก้านดอกของพริก พบว่าสามารถชักนำการร่วงของดอกพริกได้ (Wien *et al.*, 1992) และการให้สารยับยั้งการจับและทำงานของออกซิน PCIB ยับยั้งผลของ IAA ที่ชักนำให้ผลิตเอทิลีนในเนื้อเยื่อถั่วเขียว (Trebitsh and Riov, 1987) การศึกษาในราก *Arabidopsis* พบว่าเมื่อให้ PCIB จะมีผลต่อการสร้างรากแขนง การเจริญของรากแก้ว และทำให้รากไม่ตอบสนองต่อแรงดึงดูด (Oono *et al.*, 2003) Hadfi *et al.* (1998) รายงานว่าการพัฒนาใน embryo ของ *Brassica juncea* ที่ชักนำโดยออกซิน ถูกยับยั้งโดยการให้ PCIB และ NPA การเจริญเติบโตของรังไข่ในดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการผสมเกสรถูกยับยั้งโดยการให้ PCIB และ TIBA บริเวณแองเทรตัวเมียของดอกกล้วยไม้ (Ketsa *et al.*, 2006)

อุปกรณ์และวิธีการ

ดอกกล้วยไม้สกุลหวายที่ใช้ในการทดลองคือ หวายมิสทีน (*Dendrobium* cv. Miss Teen) นำดอกกล้วยไม้จากสวนของบริษัทส่งออกดอกกล้วยไม้ของเอกชนในเขตกรุงเทพมหานครและสวนกล้วยไม้จังหวัดสุพรรณบุรี ซึ่งเก็บเกี่ยวในช่วงเช้าโดยมีจำนวนดอกบาน 4-6 ดอก และดอกตูม 4-5 ดอก เมื่อตัดและบรรจุแห้งลงในกล่องกระดาษ ขนส่งโดยรถยนต์ปรับอากาศมายังห้องทดลอง โดยใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมงหลังการตัด คัดเลือกช่อดอกที่มีความสม่ำเสมอ ตัดโคนก้านดอกเฉียงและให้เหลือความยาวของก้านช่อดอก 12 เซนติเมตรจากโคนก้านถึงดอกล่างสุด เช็โคนก้านช่อดอกลงในหลอดแก้วที่มีน้ำกลั่นบรรจุหลอดละ 10 มิลลิลิตร ทำการทดลองในสภาพแสงธรรมชาติ อุณหภูมิ 25°C และความชื้นสัมพัทธ์ 60-65 % โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 หัวข้อดังนี้

1. ศึกษาผลของออกซินและเอทิลีนต่อการร่วง

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาผลของสารยับยั้งการทำงานของออกซินต่อการร่วงของดอกบานหลังได้รับเอทิลีน

วางแผนการทดลองแบบ CRD มีจำนวน 12 ชั่วโมง ละ 1 ช่อและแบ่งเป็น 7 ทรีทเมนต์ คือ

ทรีทเมนต์ที่ 1 แอลกอฮอล์ 50 % (control)

ทรีทเมนต์ที่ 2 แอลกอฮอล์ 50 % + เอทิลีน

ทรีทเมนต์ที่ 3 CMPA 5 ไมโครกรัมต่อดอก + เอทิลีน

ทรีทเมนต์ที่ 4 CMPA 10 ไมโครกรัมต่อดอก + เอทิลีน

ทรีทเมนต์ที่ 5 CMPA 20 ไมโครกรัมต่อดอก + เอทิลีน

ทรีทเมนต์ที่ 6 CMPA 30 ไมโครกรัมต่อดอก + เอทิลีน

ทรีทเมนต์ที่ 7 CMPA 40 ไมโครกรัมต่อดอก + เอทิลีน

หยดสาร CMPA [2-(4-chlorophenoxy)-2-methyl propionic acid] ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 5 ไมโครลิตรลงบนแอ่งเกสรตัวเมียของดอกบานด้วย micropipette หลังจากให้สารเป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง จึงให้ดอกกล้วยไม้ที่อยู่ในตู้ปิดสนิท (close chamber) ได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0.4 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในทรีทเมนต์ต่าง ๆ บันทึกผลการร่วงของดอกบานและดอกตูม

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาผลของสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซินต่อการร่วงของดอกบาน
หลังได้รับเอทิลีน

วางแผนการทดลองแบบ CRD มีจำนวน 12 ซ้ำ ๆ ละ 1 ซ่อและแบ่งเป็น 7 ทรีทเมนต์คือ

ทรีทเมนต์ที่ 1 แอลกอฮอล์ 70 %

ทรีทเมนต์ที่ 2 แอลกอฮอล์ 70 % + เอทิลีน

ทรีทเมนต์ที่ 3 TIBA 2.5 ไมโครกรัมต่อดอก + เอทิลีน

ทรีทเมนต์ที่ 4 TIBA 5 ไมโครกรัมต่อดอก + เอทิลีน

ทรีทเมนต์ที่ 5 TIBA 10 ไมโครกรัมต่อดอก + เอทิลีน

ทรีทเมนต์ที่ 6 TIBA 25 ไมโครกรัมต่อดอก + เอทิลีน

ทรีทเมนต์ที่ 7 TIBA 50 ไมโครกรัมต่อดอก + เอทิลีน

วิธีการให้สาร TIBA (2,3,5-triiodobenzoic acid) และบันทึกผลการทดลองเหมือนการ
ทดลองที่ 1.1

การทดลองที่ 1.3 ศึกษาผลของสารยับยั้งการทำงานของออกซินและสารยับยั้งการเคลื่อนที่
ของออกซินต่อการร่วงของดอกบาน

วางแผนการทดลองแบบ CRD มีจำนวน 12 ซ้ำ ๆ ละ 1 ซ่อและแบ่งเป็น 8 ทรีทเมนต์คือ

ทรีทเมนต์ที่ 1 ไม่หยดสาร

ทรีทเมนต์ที่ 2 แอลกอฮอล์ 70 %

ทรีทเมนต์ที่ 3 CMPA 20 ไมโครกรัมต่อดอก

ทรีทเมนต์ที่ 4 TIBA 10 ไมโครกรัมต่อดอก

ทรีทเมนต์ที่ 5 ไม่หยดสาร+ เอทิลีน

ทรีทเมนต์ที่ 6 แอลกอฮอล์ 70 % + เอทิลีน

ทรีทเมนต์ที่ 7 CMPA 20 ไมโครกรัมต่อดอก + เอทิลีน

ทรีทเมนต์ที่ 8 TIBA 10 ไมโครกรัมต่อดอก + เอทิลีน

หยดสารปริมาตร 5 ไมโครลิตรลงในแอ่งเกสรตัวเมียของดอกบานด้วย micropipette หลัง
จากให้สารเป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมงจึงให้ดอกกล้วยไม้ที่อยู่ในตู้ปิดสนิทได้รับเอทิลีนความเข้มข้น
0.4 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในทรีทเมนต์ต่าง ๆ บันทึกผลการร่วงของดอกบานและดอกตูม

การทดลองที่ 1.4 ศึกษาผลของสารยับยั้งการทำงานของออกซินและสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซินร่วมกับสาร 1-MCP

วางแผนการทดลองแบบ CRD มีจำนวน 12 ซ้ำ ๆ ละ 1 ซ่อและแบ่งเป็น 6 ทรีทเมนต์คือ
 ทรีทเมนต์ที่ 1 แอลกอฮอล์ 70 %
 ทรีทเมนต์ที่ 2 TIBA 10 ไมโครกรัมต่อดอก
 ทรีทเมนต์ที่ 3 CMPA 20 ไมโครกรัมต่อดอก
 ทรีทเมนต์ที่ 4 แอลกอฮอล์ 70 % + 1-MCP
 ทรีทเมนต์ที่ 5 TIBA 10 ไมโครกรัมต่อดอก + 1-MCP
 ทรีทเมนต์ที่ 6 CMPA 20 ไมโครกรัมต่อดอก + 1-MCP

หยดสารปริมาตร 5 ไมโครลิตรลงในแอ่งเกอร์ตัวเมียของดอกบานด้วย micropipette หลังจากให้สารเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จึงให้ดอกกล้วยไม้ที่อยู่ในตู้ปิดสนิทได้รับ 1-MCP ความเข้มข้น 500 พีพีบี เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในทรีทเมนต์ต่าง ๆ บันทึกผลการร่วงของดอกบาน

การทดลองที่ 1.5 ศึกษาการสร้างเอทิลีนในดอกบานที่ได้รับสารยับยั้งการทำงานของและการเคลื่อนที่ของออกซินร่วมกับ 1-MCP

วางแผนการทดลองแบบ CRD มีจำนวน 5 ซ้ำ ๆ ละ 1 โหลและแบ่งเป็น 6 ทรีทเมนต์คือ
 ทรีทเมนต์ที่ 1 แอลกอฮอล์ 70 %
 ทรีทเมนต์ที่ 2 TIBA 10 ไมโครกรัมต่อดอก
 ทรีทเมนต์ที่ 3 CMPA 20 ไมโครกรัมต่อดอก
 ทรีทเมนต์ที่ 4 แอลกอฮอล์ 70 % + 1-MCP
 ทรีทเมนต์ที่ 5 TIBA 10 ไมโครกรัมต่อดอก + 1-MCP
 ทรีทเมนต์ที่ 6 CMPA 20 ไมโครกรัมต่อดอก + 1-MCP

ตัดก้านช่อดอกตูมเหนือดอกบานออก หยดสารปริมาตร 5 ไมโครลิตรลงในแอ่งเกอร์ตัวเมียของดอกบานด้วย micropipette หลังจากให้สารเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงจึงให้ดอกกล้วยไม้ที่อยู่ในตู้ปิดสนิทได้รับ 1-MCP ความเข้มข้น 500 พีพีบี เป็นเวลา 3 ชั่วโมงในทรีทเมนต์ต่างๆ นำช่อดอกบานจำนวน 4 ช่อ ชั่งน้ำหนักสดแล้วแช่โคนก้านดอกด้วยน้ำกลั่นและนำไปใส่ในโหลพลาสติกปริมาตร 7,870 มิลลิลิตรที่ปิดสนิทเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างก๊าซเอทิลีนด้วย

หลอดฉีดยาปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทิลีนด้วยเครื่อง gas chromatograph (Shimadzu GC-14A) เก็บตัวอย่างก๊าซทุกวันเป็นเวลา 15 วัน หลังจากเก็บตัวอย่างก๊าซแล้วเปิดไหลออกทุกครั้ง ปริมาณเอทิลีนที่วัดได้มีหน่วยเป็น พีพีเอ็มและนำไปคำนวณหาอัตราการผลิตเอทิลีนของดอกกล้วยไม้ซึ่งมีค่าเป็น นาโนลิตรเอทิลีนต่อกรัมต่อชั่วโมง

การทดลองที่ 1.6 ศึกษาอิทธิพลของดอกตูมต่อการร่วงของดอกบาน

วางแผนการทดลองแบบ CRD มีจำนวน 12 ซ้ำ ๆ ละ 1 ช่อและแบ่งเป็น 2 ทรีทเมนต์ คือ
 ทรีทเมนต์ที่ 1 ตัดดอกตูมออกเหลือดอกบาน
 ทรีทเมนต์ที่ 2 ตัดดอกตูมออกเหลือดอกบาน + เอทิลีน

ทำการตัดก้านช่อดอกตูมออกเหลือเพียงดอกบาน ให้ดอกกล้วยไม้อยู่ในตู้ปิดสนิทและได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0.4 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในทรีทเมนต์เอทิลีน บันทึกผลการร่วงของดอกบาน

การทดลองที่ 1.7 ศึกษาผลของ IAA ต่อการร่วงของก้านดอกตูมและก้านดอกบาน

วางแผนการทดลองแบบ CRD มีจำนวน 12 ซ้ำ ๆ ละ 1 ช่อและแบ่งเป็น 6 ทรีทเมนต์ คือ
 ทรีทเมนต์ที่ 1 ไม่ตัดดอก
 ทรีทเมนต์ที่ 2 ตัดดอกตูมและดอกบาน
 ทรีทเมนต์ที่ 3 ตัดดอกตูมและดอกบาน + IAA 0.5 %
 ทรีทเมนต์ที่ 4 ไม่ตัดดอก + เอทิลีน
 ทรีทเมนต์ที่ 5 ตัดดอกตูมและดอกบาน + เอทิลีน
 ทรีทเมนต์ที่ 6 ตัดดอกตูมและดอกบาน + IAA 0.5 % + เอทิลีน

ในทรีทเมนต์ที่ตัดดอกตูมและดอกบาน ตัดดอกออกในตำแหน่งก้านดอกได้รังไข่ ป้าย IAA บริเวณรอยตัด หลังจากได้รับสารเป็นเวลา 4 ชั่วโมงจึงให้ช่อดอกกล้วยไม้ที่อยู่ในตู้ปิดสนิทได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0.4 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในทรีทเมนต์ต่าง ๆ บันทึกผลการร่วงของก้านดอกตูมและก้านดอกบาน

การทดลองที่ 1.8 ศึกษาผลของเอทิลีนต่อการร่วงหลังจากตัดดอกบานออกด้วยการให้ 1-MCP

วางแผนการทดลองแบบ CRD มีจำนวน 12 ซ้ำ ๆ ละ 1 ซ่อและแบ่งเป็น 4 ทรีทเมนต์ คือ
 ทรีทเมนต์ที่ 1 ไม่ตัดดอกบาน
 ทรีทเมนต์ที่ 2 ตัดดอกบาน
 ทรีทเมนต์ที่ 3 ไม่ตัดดอกบาน + 1-MCP
 ทรีทเมนต์ที่ 4 ตัดดอกบาน + 1-MCP

ให้ดอกกล้วยไม้อยู่ในตู้ปิดสนิทและได้รับ 1-MCP ความเข้มข้น 500 พีพีบี เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในทรีทเมนต์ต่าง ๆ บันทึกผลการร่วงของก้านดอกบาน

การทดลองที่ 1.9 ศึกษาผลของการตัดส่วนต่างๆของดอกบานต่อการร่วงของดอก

วางแผนการทดลองแบบ CRD มีจำนวน 12 ซ้ำ ๆ ละ 1 ซ่อและแบ่งเป็น 12 ทรีทเมนต์ คือ
 ทรีทเมนต์ที่ 1 ไม่ตัด
 ทรีทเมนต์ที่ 2 นำเกสรตัวผู้ออก
 ทรีทเมนต์ที่ 3 ตัดกลีบดอก
 ทรีทเมนต์ที่ 4 ตัดกลีบดอกและเส้าเกสร
 ทรีทเมนต์ที่ 5 ตัดกลีบดอก เส้าเกสรและรังไข่
 ทรีทเมนต์ที่ 6 ตัดทั้งดอกและก้านดอกเหลือก้านดอกยาว 0.5 ซม.
 ทรีทเมนต์ที่ 7 ไม่ตัด + เอทิลีน
 ทรีทเมนต์ที่ 8 นำเกสรตัวผู้ออก + เอทิลีน
 ทรีทเมนต์ที่ 9 ตัดกลีบดอก + เอทิลีน
 ทรีทเมนต์ที่ 10 ตัดกลีบดอกและเส้าเกสร + เอทิลีน
 ทรีทเมนต์ที่ 11 ตัดกลีบดอก เส้าเกสรและรังไข่ + เอทิลีน
 ทรีทเมนต์ที่ 12 ตัดทั้งดอกและก้านดอกเหลือก้านดอกยาว 0.5 ซม. + เอทิลีน

ทำการตัดส่วนต่างๆของดอกบานด้วยใบมีดโกนใหม่ ป้าย AOA ความเข้มข้น 0.3 % ในลาโนลินบริเวณรอยตัดเพื่อป้องกันผลของเอทิลีนเนื่องจากบาดแผล หลังจากให้สารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

โมง จึงให้ช่อดอกกล้วยไม้ที่อยู่ในตู้ปิดสนิทได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0.4 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในทริทเมนต์ต่าง ๆ บันทึกผลการร่วงของดอกบาน

การทดลองที่ 1.10 ศึกษาการร่วงของก้านดอกตูมหลังจากตัดก้านดอกออก 2/3 ของก้านดอก

วางแผนการทดลองแบบ CRD มีจำนวน 12 ซ้ำ ๆ ละ 1 ช่อและแบ่งเป็น 6 ทริทเมนต์ คือ
 ทริทเมนต์ที่ 1 ไม่ตัดดอกตูม
 ทริทเมนต์ที่ 2 ตัดกลีบดอก เส้าเกสรและรังไข่
 ทริทเมนต์ที่ 3 ตัดกลีบดอก เส้าเกสร รังไข่ และ 2/3 ของก้านดอกตูม
 ทริทเมนต์ที่ 4 ไม่ตัดดอกตูม + เอทิลีน
 ทริทเมนต์ที่ 5 ตัดกลีบดอก เส้าเกสรและรังไข่ + เอทิลีน
 ทริทเมนต์ที่ 6 ตัดกลีบดอก เส้าเกสร รังไข่ และ 2/3 ของก้านดอกตูม + เอทิลีน

หลังจากตัดส่วนต่างๆเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงให้ช่อดอกกล้วยไม้ที่อยู่ในตู้ปิดสนิทได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0.4 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในทริทเมนต์ต่าง ๆ บันทึกผลการร่วงของก้านดอกตูม

2. ศึกษาปริมาณออกซินในส่วนของดอกกล้วยไม้

การทดลองที่ 2.1 ศึกษาปริมาณของ IAA ในตำแหน่งเส้าเกสรรวมก้านดอกและ abscission zone (AZ) ของดอกบานในทริทเมนต์ต่าง ๆ

ทำการทดลองแบ่งเป็น 6 ทริทเมนต์คือ
 ทริทเมนต์ที่ 1 ไม่หยดสาร
 ทริทเมนต์ที่ 2 CMPA 20 ไมโครกรัมต่อดอก
 ทริทเมนต์ที่ 3 TIBA 10 ไมโครกรัมต่อดอก
 ทริทเมนต์ที่ 4 ไม่หยดสาร+ เอทิลีน
 ทริทเมนต์ที่ 5 CMPA 20 ไมโครกรัมต่อดอก + เอทิลีน
 ทริทเมนต์ที่ 6 TIBA 10 ไมโครกรัมต่อดอก + เอทิลีน
 วิธีการให้สารเหมือนการทดลองที่ 1.3

เก็บตัวอย่างดอกกล้วยไม้ 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็น AZ บริเวณโคนก้านดอกบาน และส่วนเส้าเกสร รังไข่รวมก้านดอกจากดอกบาน ในช่วงเวลา 0 3 และ 5 วัน นำมาแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -72°C สกัด IAA จากตัวอย่างโดยวิธีของ Liu *et al.* (1996) และหาปริมาณ IAA โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatograph (HPLC)

2.1 การสกัดและการแยกส่วนออกซิน (extraction and partition)

ชั่งน้ำหนัก AZ บริเวณโคนก้านดอกหรือเส้าเกสร รังไข่รวมก้านดอก 10 กรัม เติม extraction solution (butylated hydroxytoluene 400 มก. sodium ascorbate 100 มก. ใน 80 % methanol) ปริมาตร 15 มล. บดให้ละเอียดด้วย homogenizer และบดด้วยโกร่งที่เย็นอีกครั้ง เติม extracted solution 85 มล. แก้วด้วยแท่งแม่เหล็กในที่มีด อุณหภูมิ 4°C นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมารองด้วยกระดาษกรอง Whatman # 1 โดยใช้ suction แยกเอาส่วนสารละลายและกากออกจากกัน ล้างกากอีกครั้งด้วย extracted solution 10 มล. นำสารละลายมารวมกันและระเหย extraction solution ด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35°C นำส่วนที่เหลือมาปรับพีเอชให้ได้ 8.0 ด้วย 0.2 N KOH เติม ethyl acetate ปริมาตรเท่ากับส่วนที่เหลือ แล้วนำไปแยกส่วนโดยกรวยแยก ทิ้งชั้น ethyl acetate นำชั้นที่เหลือมาระเหยด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35°C นำส่วนที่เหลือมาปรับ พีเอชให้ได้ 2.5 ด้วย 0.2 N HCl แล้วนำไปเขย้ารวมกับ ethyl acetate ปริมาตรเท่ากับส่วนที่เหลือในกรวยแยก แยกชั้นสารละลาย ethyl acetate ออกมาแล้วเติม anhydrous sodium sulfate นำส่วนใสระเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35°C ละลายด้วย methanol 1 มล. แล้วนำไปแยก IAA ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี thin layer chromatograph (TLC) หยดสารสกัดที่ละลายใน methanol ลงบนแผ่นกระดาษที่เคลือบซิลิกา (แผ่น TLC) นำไปใส่ใน tank ที่มีสาร benzene:acetone:acetic acid สัดส่วน 10:4:1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 1 ชม. หลังจากนั้นปล่อยให้แห้งและจุดซิลิกาบน TLC ตำแหน่งของ IAA ลงในหลอด centrifuge ละลายด้วย methanol แล้วนำไปปั่น 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสระเหยให้แห้งโดยเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน ละลายด้วย methanol 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง HPLC

2.2 วิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง HPLC โดยมีรายละเอียดดังนี้

Chromatography : Waters 2690 separation module

Column	:	Apollo C 18 5u, 250 mm x 4.6 mm
Detector	:	Waters 474 scanning fluorescence detector
Wavelength	:	excitation 280 nm, emission 360 nm
Flow rate	:	0.7 ml/min
Temperature	:	40 °C
Mobile phase	:	35 % methanol in 20 mM ammonium acetate (pH 3.5)

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาปริมาณของ IAA ในลำเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย และก้านดอกของดอกตูมและดอกบาน

เก็บตัวอย่างดอกตูมและดอกบานของกล้วยไม้ทันทีหลังการเก็บเกี่ยว ในแต่ละชนิดของดอกแบ่งแยกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนลำเกสรตัวผู้และส่วนก้านดอก สกัดและหาปริมาณ IAA เหมือนการทดลองที่ 2.1

3. ศึกษากายวิภาคของเซลล์บริเวณ AZ

การทดลองที่ 3.1 ศึกษากายวิภาคของเซลล์บริเวณ AZ ในดอกตูมและดอกบาน

ทำการทดลองแบ่งเป็น 2 ทริทเมนต์ คือ

ทริทเมนต์ที่ 1 ดอกตูม

ทริทเมนต์ที่ 2 ดอกบาน

ตัดเนื้อเยื่อบริเวณโคนก้านดอกตูมและดอกบานหลังการเก็บเกี่ยว

การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อและเตรียมสไลด์

- ตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อขนาดประมาณ 0.3 x 0.5 เซนติเมตร เตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีของ Brooks, *et al.* (1950)

- นำชิ้นตัวอย่างมาและคงสภาพเนื้อเยื่อ (killing and fixing) ในน้ำยา FAA

- ดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง suction pump โดยลดความดันลงเหลือประมาณ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

- ล้างน้ำยาออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 % 3 ครั้งเพื่อกำจัดน้ำยาฆ่าและคงสภาพเซลล์ออกจากเนื้อเยื่อให้หมด

- คั่งน้ำออกจากเซลล์โดยนำชิ้นตัวอย่างไปแช่ใน TBA (tertiary butyl alcohol) ที่มีระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 5 ระดับคือ 50, 70, 85, 95 และ 100 %

- แทนที่แอลกอฮอล์ด้วย pure TBA (infiltrate) และนำไปแช่ในส่วนผสมของ pure TBA กับ paraffin oil ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 นาน 12 ชั่วโมง แล้วย้ายเนื้อเยื่อไปในส่วนผสมของ pure TBA กับ paraffin oil นำเข้าตูบที่อุณหภูมิประมาณ 60 °ซ ทิ้งไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนใช้ paraffin บริสุทธิ์ที่ผ่านการหลอมตัวแล้ว เปลี่ยน paraffin บริสุทธิ์ประมาณ 3-4 ครั้ง แต่ละครั้งทิ้งไว้ในตูบประมาณ 12 ชั่วโมง

- การฝังเนื้อเยื่อใน paraffin (embedding paraffin) โดยเท paraffin ลงในบล็อกและนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการ infiltrate แล้วใส่ลงในบล็อก ใช้เข็มปลายแหลมที่ร้อนจัดเรียงชิ้นส่วนพืชให้อยู่ในแนวที่ต้องการและไล่ฟองอากาศออกจาก paraffin นำบล็อกไปลอยน้ำที่เย็นเพื่อป้องกัน paraffin ตกผลึก เมื่อ paraffin แข็งตัวดีแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น

- การตัดเนื้อเยื่อด้วย rotary microtome นำชิ้นตัวอย่างที่ฝังใน paraffin มาแต่งเป็นแท่งสี่เหลี่ยมเล็กๆ แล้วนำไปติดบนแท่งไม้ โดยใช้ paraffin เป็นตัวเชื่อม แล้วตัดด้วย rotay microtome ความหนาประมาณ 8-10 ไมครอน จะได้แถบ paraffin (ribbon) ที่มีชิ้นตัวอย่างติดอยู่

- การนำแถบ paraffin ติดบนกระจกสไลด์ (affixation) ใช้น้ำกลั่นหยดลงบนกระจกสไลด์ วางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) นำแถบ paraffin วางลอยบนน้ำกลั่นบนกระจกสไลด์ ปลดปล่อยทิ้งให้แห้งบนเครื่องอุ่น 12 ชั่วโมง

- ย้อมสี (staining) ด้วยสี Sekai's Backwards Toluidine Blue เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีด้วยน้ำไหล 10 นาที ปลดปล่อยทิ้งให้แห้ง 12-24 ชั่วโมง (Sekai, 1973)

- แช่ใน xylene 5 นาที 2 ครั้งเพื่อละลาย paraffin แล้วหยด permount ลงบนกระจกสไลด์ ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ ทิ้งไว้อย่างน้อย 12-24 ชั่วโมงก่อนนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

ศึกษาและถ่ายภาพเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ Axiostar plus (Zeiss, Germany)

การทดลองที่ 3.2 ศึกษากายวิภาคของเซลล์บริเวณ AZ ในดอกบานที่ได้รับสารยับยั้งการ ทำงานและสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซิน

ทำการทดลองแบ่งเป็น 4 ทริทเมนต์ คือ

ทริทเมนต์ที่ 1 ไม่หยดสาร

ทริทเมนต์ที่ 2 ไม่หยดสาร+ เอทิลีน

ทริทเมนต์ที่ 3 CMPA 20 ไมโครกรัมต่อดอก

ทริทเมนต์ที่ 4 TIBA 10 ไมโครกรัมต่อดอก

วิธีการให้สารเหมือนการทดลองที่ 1.3 ตัดเนื้อเยื่อบริเวณโคนก้านดอกบานในทริทเมนต์ ต่างๆ ในวันที่ 7 หลังจากให้ทริทเมนต์ เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ เตรียมสไลด์และถ่ายภาพเหมือนการ ทดลองที่ 3.1

การทดลองที่ 3.3 ศึกษากายวิภาคของเซลล์บริเวณ AZ ในก้านดอกบานที่ได้รับ IAA

ทำการทดลองแบ่งเป็น 2 ทริทเมนต์ คือ

ทริทเมนต์ที่ 1 ดอกบานหลังการเก็บเกี่ยว

ทริทเมนต์ที่ 2 ตัดดอกบาน + IAA 0.5 %

ตัดเนื้อเยื่อบริเวณโคนก้านดอกบานในวันที่เก็บเกี่ยวและตัดเนื้อเยื่อบริเวณโคนก้านดอกที่ ตัดดอกออกและได้รับ IAA หลังจากได้รับสารเป็นเวลา 17 วัน เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ เตรียมสไลด์ และถ่ายภาพเหมือนการทดลองที่ 3.1

4. ศึกษา cell wall hydrolyse activity ที่มีผลต่อการร่วง

การทดลองที่ 4.1 ศึกษากิจกรรมของ β -1,4-glucanase ในตำแหน่ง AZ บริเวณโคนก้านดอกบานในทริทเมนต์ต่าง ๆ

ทำการทดลองแบ่งเป็น 10 ทริทเมนต์ คือ

ทริทเมนต์ที่ 1 ไม่หยดสาร

ทริทเมนต์ที่ 2 CMPA 20 ไมโครกรัมต่อดอก

ทริทเมนต์ที่ 3 TIBA 10 ไมโครกรัมต่อดอก

ทริทเมนต์ที่ 4 ตั๊กกลีบดอก เส้เกสรและรังไข่

ทริทเมนต์ที่ 5 ตั๊กกลีบดอก เส้เกสรและรังไข่ + IAA

ทริทเมนต์ที่ 6 ไม่หยดสาร+ เอทิลีน

ทริทเมนต์ที่ 7 CMPA 20 ไมโครกรัมต่อดอก + เอทิลีน

ทริทเมนต์ที่ 8 TIBA 10 ไมโครกรัมต่อดอก + เอทิลีน

ทริทเมนต์ที่ 9 ตั๊กกลีบดอก เส้เกสรและรังไข่ + เอทิลีน

ทริทเมนต์ที่ 10 ตั๊กกลีบดอก เส้เกสรและรังไข่ + IAA + เอทิลีน

วิธีการให้สารในทริทเมนต์ที่ 1-3 และ 6-8 เหมือนการทดลองที่ 1.3 การให้สารในทริทเมนต์ที่ 4-5 และ 9-10 เหมือนการทดลองที่ 1.7 ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ AZ ในช่วงระยะเวลา 0 1 3 และ 5 วันหลังการให้สาร

การสกัดและการวัดกิจกรรมของเอนไซม์

การสกัดเอนไซม์ β -1,4-glucanase ตามวิธีของ Awad and Young (1979) ใช้ส่วนของก้านดอกที่ติดกับช่อดอก 1 กรัมใส่ลงในสารละลายโซเดียมอะซิเตด บัฟเฟอร์ (0.04 M pH 5.5) 8 มล. และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.2 M) 2 มล. บดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นละเอียด (homogenizer) ที่อุณหภูมิ 4 °C ภายหลังจากปั่นละเอียดแล้วทิ้งไว้ 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

วัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยฟิเตอร์เปเปอร์เอสเสย์ (Filter paper assay) ตามวิธีของ Mandel and Sternberg (1976) ใช้สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้เติมลงใน 1 มล. ของสารละลายอะซิเตด

บัฟเฟอร์ (0.05 M pH 4.8) ในหลอดทดลองขนาด 18 มล. ใส่กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่ตัดขนาด 0.5 x 3 เซนติเมตร (ประมาณ 25 มก.) ผสมด้วยเครื่องผสม (vortex) เพื่อให้กระดาษกรองม้วนเป็นขดในสารละลาย บ่มใน water bath ที่ 50 °C นาน 1 ชั่วโมง เติมน้ำตาลละลายกรดไโนโตรซาลิซิลิก (1 %) 3 มล. เพื่อหยุดปฏิกิริยา ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที เติมน้ำ 16 มล. นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร วิเคราะห์ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารละลายโดยเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นกับสีที่เกิดจากสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่มีปริมาณกลูโคสตั้งแต่ 0-5 ไมโครโมล จำนวนไมโครโมลกลูโคสที่วัดได้ นำมาคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase เป็นไมโครโมล/นาทีก/มก. โปรตีน วัดปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน

การทดลองที่ 4.2 ศึกษากิจกรรมของ polygalacturonase (PG) ในตำแหน่ง AZ บริเวณโคนก้านดอกบานในทริทเมนต์ต่าง ๆ

ทำการทดลองโดยใช้ทริทเมนต์และการให้สารเหมือนการทดลองที่ 4.1

การสกัดและการวัดกิจกรรมของเอนไซม์

การสกัดเอนไซม์ PG ตามวิธีของ Abu-Goukh and Bashir (2003) ใช้ส่วนของก้านดอกที่ติดกับช่อดอก 3 กรัม ใส่ลงในสารละลายโซเดียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ (0.1M pH 6.6) 20 มล. และ polyvinylpyrrolidone (PVP) เข้มข้น 0.5 % (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปั่นด้วย homogenizer จนละเอียดที่อุณหภูมิ 4 °C นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เติมน้ำตาลละลายไธม์ไป ตะกอนที่ได้นำมาเติมด้วย 6 % โซเดียมคลอไรด์ในสารละลายโซเดียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ (1M pH 6.0) 10 มล. และนำมาปรับ pH โดยโซเดียมไดโครอิกไซด์ จนได้ pH 8.2 ที่อุณหภูมิ 4 °C นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำสารละลายไธม์ที่ได้กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และนำไป dialyse ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่เหลือในถุง dialysis ไปใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของ PG

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PG โดยวิธี Anthon and Barrett (2002) นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้เติมลงในสารละลายที่มีส่วนผสมของสารละลายกรด Polygalacturonic เข้มข้น 0.1 % สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.4 M และสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 0.4 M

pH 4.5 อย่างละ 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 °ซ นาน 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติมโซเดียมไคโรรอกไซด์ (0.5 N) 100 ไมโครลิตร และสารละลายผสมของ 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazine (MBTH) ความเข้มข้น 3 มก.ต่อ มล.และ DDT ความเข้มข้น 1 มก.ต่อ มล. ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปต้มอุณหภูมิ 80 °ซ นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายผสมของ $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 0.5 % sulfamic acid ความเข้มข้น 0.5 % และ HCl ความเข้มข้น 0.25 N ปริมาตร 200 ไมโครลิตรเติมลงทันที ปั่นให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง สีนํ้าเงินจะพัฒนาขึ้น เติมนํ้ากลั่น 4 มล. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 620 นาโนเมตร นำค่า A620 ที่ได้มาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ PG โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ของกรด D-galacturonic ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-150 นาโนโมล ซึ่งผ่านปฏิกิริยาเคมีด้วยวิธีเดียวกัน

วัดปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ PG เป็นนาโนโมลของกรด D-galacturonic /นาที/มก. โปรตีน

5. ศึกษาการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ β -1,4-glucanase ในขบวนการร่วงของดอกกล้วยไม้

ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ AZ ในช่วงระยะเวลา 0 1 3 และ 5 วันหลังการให้ทริทเมนต์เหมือนการทดลองที่ 4.1 นำตัวอย่างพืชแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บตัวอย่างในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 °ซ จนกว่าจะทำการสกัด RNA

5.1 สกัด RNA จากเนื้อเยื่อพืช ตามวิธีของ Chang *et al.* (1993) ดังนี้

5.1.1 นำตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชที่แช่แข็งมาบดละเอียดในไนโตรเจนเหลวด้วยเครื่องบดเนื้อเยื่อ ซึ่งตัวอย่างปริมาณ 1 กรัม ใส่ในสารละลาย Pine Tree (Tris-HCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด 8.0, EDTA ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด 8.0, NaCl ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์, PVP ความเข้มข้น 2%, CTAB ความเข้มข้น 2%, spermidine ความเข้มข้น 0.5 กรัม/ลิตร) ปริมาตร 15 มล. (65 °ซ) + 2% β -mercaptoethanol ผสมเนื้อเยื่อพืชและสารละลายสำหรับสกัดให้เข้ากันโดยใช้ vortex และนำไปผสมอีกครั้งด้วย homogenizer จนสารละลายมีสีขาว นวล

5.1.2 เติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย ผสมจนสารละลายมีสีขาวนวล นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที ที่ 4 °C นาน 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนลงในหลอดใหม่ ทำซ้ำเดิมอีกครั้ง ดูดส่วนใสด้านบนลงในหลอดใหม่ เติม LiCl ความเข้มข้น 8 โมลาร์ ปริมาตร 1 ใน 3 ของปริมาตรส่วนใสที่เก็บได้ ปิดฝาให้สนิทและพลิกหลอดคว่ำไปมา 1-2 ครั้ง นำหลอดไปบ่มในอุณหภูมิ 4 °C ประมาณ 16 ชั่วโมงเพื่อตกตะกอน RNA แล้วจึงนำหลอดไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C นาน 30 นาที เก็บตะกอน RNA เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

5.1.3 นำตะกอนจากข้อ 5.1.2 มาละลายด้วยสารละลาย SSTE (NaCl ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์, SDS ความเข้มข้น 0.5 %, Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด 8.0, EDTA ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด 8.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (65 °C) ดูดสารละลายทั้งหมดลงในหลอด microcentrifuge tube ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex และเติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex จนสารละลายมีสีขาวนวล นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนลงในหลอดใหม่ แล้วเติมสารละลายเอทานอลเข้มข้น 100 % ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมา 2-3 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -70 °C นาน 30 นาที แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C นาน 20 นาที เก็บส่วนของตะกอนที่ได้ เติมสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70 % ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วและอุณหภูมิเท่าเดิม ใช้เวลานาน 5 นาที เก็บตะกอน RNA ทำให้แห้งโดย vacuum แล้วละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase (RNase free water) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบลักษณะของ RNA ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้ 0.8 % อะกาโรสใน 0.5X TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที เก็บ RNA ที่ตรวจสอบคุณภาพแล้วไว้ในตู้แช่แข็งที่ -70 °C จนกว่าจะใช้งาน

5.2 การออกแบบ degenerate primer ของยีน β -1,4-glucanase

สืบค้นข้อมูล amino acid sequence ของยีน β -1,4-glucanase หรือ cellulase ของพืชสกุลต่างๆคือ *Lycopersicon* (AAC62241), *Citrus* (AAB65155, AAB65156), *Oryza* (XP_479767), *Phaseolus* (P22503, T11783) และ *Capsicum* (CAA65826) จากฐานข้อมูล GenBank ของ National

Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) นำข้อมูลมา alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL-W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW/index.html>) วิเคราะห์หาส่วน amino acid sequencesที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) 2 ช่วงเพื่อออกแบบ primer ขนาดความยาว 18-30 เบส

5.3 การเพิ่มปริมาณของยีน β -1,4-glucanase ด้วย degenerate primer โดยวิธี RT-PCR

ทำการสังเคราะห์ cDNA เส้นแรกด้วยชุดสำเร็จรูป Omniscript Reverse Transcriptase (QIAGEN, Germany) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร โดยใช้ total RNA ที่สกัดได้จากข้อ 5.1 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (300 นาโนกรัม) เป็นแม่แบบและใช้ไพรเมอร์ Oligo dT₁₈ ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์, 1X buffer RT, dNTP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์ Omicript RT 4 ยูนิต ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยใช้ความร้อน 93 °C นาน 5 นาทีและวางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นทำการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณยีน β -1,4-glucanase โดยใช้ cDNA เส้นแรก ที่สังเคราะห์ได้เป็นแม่แบบสำหรับทำ PCR ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ใช้ cDNA 1 ไมโครลิตร,ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ในข้อ 5.2 ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์, dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์, MgCl₂ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.625 ยูนิต (QIAGEN, Germany) โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
แยกสาย DNA แม่แบบเริ่มต้น	94	3 นาที
แยกสาย DNA แม่แบบ	94	30 วินาที
เริ่มต้นจับคู่ primer กับ DNA ต้นแบบ	52	1 นาที
สังเคราะห์สาย DNA ต่อจาก DNA แม่แบบ	72	1 นาที
สังเคราะห์สาย DNA รอบสุดท้าย	72	10 นาที

ทำการตรวจวิเคราะห์ชิ้น DNA ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย 0.8% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอทidiumโบรไมด์ ตรวจดูแถบ DNA ภายใต้ UV transilluminator และถ่ายภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation (Syngene Bio Imaging System) ทำการแยกชิ้น DNA ของยีน β -1,4-glucanase ขนาดประมาณ 1 กิโลเบส โดยตัดเจลตำแหน่งที่มีผลิตภัณฑ์ตามต้องการภายใต้แสงยูวี นำเจลที่ตัดไว้สกัด DNA ให้บริสุทธิ์โดยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

5.4 การโคลนยีน

นำ DNA ของ β -1,4-glucanase ที่สกัดได้จากเจลมาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะเพื่อเข้าไปเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรีย

5.4.1 ทำการเชื่อมต่อ DNA ที่ได้จากการทำ PCR จากยีน β -1,4-glucanase เข้าสู่เวกเตอร์สำเร็จรูป pGEM[®]-T Easy vector (Promega, USA) ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X ligation buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, pGEM[®]-T easy vector (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, DNA ที่ได้จากการทำ PCR ปริมาตร 14 ไมโครลิตร, เอนไซม์ T4 DNA ligase (3 ยูนิต ต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16 °C นาน 16 ชั่วโมง

5.4.2 ทำการผสม ligation mixture ปริมาตร 20 ไมโครลิตรกับเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางบนน้ำแข็งนาน 20 นาที ชักนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยวิธี heat shock transformation ที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 1 นาที และวางบนน้ำแข็งทันที เติมน้ำอาหารเหลว SOC แล้วนำไปปั่นเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียและนำไปเลี้ยงบนอาหาร LB แข็งที่ผสมสารปฏิชีวนะ Ampicilin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม X-gal (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 40 ไมโครลิตรบนผิวอาหาร แข็ง เลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง คัดเลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวที่คาดว่าจะมี DNA สายผสม นำมาแยกเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และนำไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเก็บแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวไว้เป็น master plate นำโคโลนีที่มีสีขาวจาก master plate เพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB ผสมสารปฏิชีวนะ Ampicilin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงไว้ในที่อุณหภูมิ 37 °C บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียโดยชุดสำเร็จรูป QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

5.4.3 นำ DNA สายผสมที่สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรียมาตรวจสอบว่ามี DNA ของยีน β -1,4-glucanase โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not I* (Fermentas, USA) ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10X buffer O (Fermentas, USA) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร,

เอนไซม์ *Not I* (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, เติมน้ำ 12 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบผลการตัดของเอนไซม์ด้วย 0.8 % อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที จะได้ชิ้น DNA ขนาด 1028 bp ซึ่งเป็น DNA ของยีน β -1,4-glucanase และชิ้น DNA ของ pGEM[®]-T easy vector

5.4.4 ทำการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนของยีน β -1,4-glucanase ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้บริการของ DNA Technology ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาตรวจวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม MegAlign (Lasergene; DNASTar, USA) เปรียบเทียบ amino acid ของยีน β -1,4-glucanase ในกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสติน กับ β -1,4-glucanase หรือ cellulase ของพืชสกุลอื่น ๆ คือ *Capsicum* (X83711, X97188, X97189), *Citrus* (AF000135, AF000136), *Glycine* (U00730), *Oryza* (XM_479767), *Phaseolus* (M57400), *Sambucus* (X74290) และ Tomato (U13054, U78526, AF077339, AAB46829) ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

5.5 การออกแบบ specific primer สำหรับยีน β -1,4-glucanase ในดอกกล้วยไม้สกุลหวาย

นำลำดับเบสที่ได้ในข้อ 5.4.4 มาทำการวิเคราะห์เพื่อออกแบบ specific primer ยีน β -1,4-glucanase ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสตินโดยใช้ โปรแกรมสำเร็จรูป Primer 3 เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบการแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase ในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสตินโดยวิธี RT-PCR และสร้าง β -1,4-glucanase DNA probe สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase ด้วยวิธี northern blot hybridization ทดสอบ specific primer โดยทำ PCR ในปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตรประกอบด้วย cDNA 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์จำเพาะเจาะจงความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์, dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์, MgCl₂ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.625 ยูนิต (QIAGEN, Germany) โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
แยกสาย DNA แม่แบบเริ่มต้น	94	3 นาที
แยกสาย DNA แม่แบบ	94	30 วินาที
เริ่มต้นจับคู่ primer กับ DNA ต้นแบบ	55	1 นาที
} 35 รอบ		

สังเคราะห์สาย DNA ต่อจาก DNA แม่แบบ	72	1 นาที
สังเคราะห์สาย DNA รอบสุดท้าย	72	10 นาที

ทำการตรวจวิเคราะห์ชิ้น DNA ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย 0.8 % อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบ DNA ภายใต้อัลตราไวโอเลต และถ่ายภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation (Syngene Bio Imaging System) ทำการแยกชิ้น DNA ของยีน β -1,4-glucanase ขนาดประมาณ 875 bp โดยตัดเจลตำแหน่งที่มี DNA ขนาดที่ต้องการภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ทำการสกัด DNA ออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ทำการโคลนยีนและตรวจสอบลำดับเบสของยีน β -1,4-glucanase ขนาดประมาณ 875 bp ตามวิธีการในข้อ 5.4

5.6 การสร้าง probe ติดฉลากด้วย DIG

นำ DNA β -1,4-glucanase ขนาด 1028 bp เรียกชื่อยีน *Den-Cel* ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not I* ในข้อ 5.4.3 มาเป็นต้นแบบในการทำ PCR โดยใช้ชุดสำเร็จรูป DIG PCR probe labeling (Roche, Germany) ใช้ไพรเมอร์ CEL-MISS-F และไพรเมอร์ CEL-MISS-R (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นไพรเมอร์จำเพาะเจาะจงสำหรับ ยีน β -1,4-glucanase ในข้อ 5.5 ในการสร้าง probe ของยีน β -1,4-glucanase ในดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ส่วนการสร้าง probe สำหรับยีน Actin ในดอกกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อใช้เป็น internal control มีวิธีการคล้ายกับการสร้าง probe ของยีน β -1,4-glucanase โดยใช้ไพรเมอร์ Actin-O-F และไพรเมอร์ Actin-O-R (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นไพรเมอร์จำเพาะเจาะจงสำหรับยีน Actin ของกล้วยไม้

5.7 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase (*Den-Cel*) ระหว่างขบวนการร่วงของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย

5.7.1 Northern blot analysis

นำ total RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อ AZ บริเวณก้านดอกติดกับช่อดอกในทรีทเมนต์ต่าง ๆ จากปริมาณ 30-95 ไมโครกรัมมาทำ northern blot hybridization โดยเติม 1 เท่าของตัวอย่างด้วย RNA loading dye (50 % formamide, 6 % formaldehyde, 1X MOPS buffer, 0.05 %

bromophenol blue, 10 % glycerol) นำไปต้มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 15 นาที แช่น้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมเอธิลเดียมโบรไมด์ 1 ไมโครลิตร แยกขนาด RNA ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้เจล 1 % อะกาโรส, 1X MOPS, 6 % formaldehyde ใน 1X MOPS buffer (20 mM MOPS, 5 mM sodium citrate, 2 mM EDTA) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 60 โวลต์ นาน 100 นาที นำเจลมาปรับสภาพใน 20X SSC buffer นาน 15 นาที 2 ครั้ง ย้าย RNA จากเจลไปยัง positively charged nylon membrane (Roche, Germany) ด้วยเทคนิค capillary force ในสารละลาย 20X SSC buffer เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง นำแผ่น nylon membrane มาล้างด้วย 2X SSC buffer เป็นเวลา 10 นาที แล้วฟุ้งพหุมาดบนกระดาษกรอง นำแผ่น nylon membrane ไปอบที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตรึง RNA ไว้กับแผ่น nylon membrane นำไปทำปฏิกิริยา hybridization ด้วย *Den-Cel* DNA probe ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.6 ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง ตรวจสอบผลด้วย CDP Star (Roche, USA) ตามวิธีการที่ระบุในคู่มือ DIG Application Manual for Filter Hybridization และตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยา CDP Star บน X-Ray film (Kodak, USA)

5.7.2 Ribonuclease Protection Assay (RPA)

5.7.2.1 สังเคราะห์ *Den-Cel* RNA probe โดยใช้ชุดสำเร็จรูป DIG RNA labeling kit (Roche, Germany) ใช้พลาสมิดในข้อ 5.4.3 ที่เป็นเส้นตรงโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *NcoI* (Fermentas, USA) ด้าน T7 เป็นต้นแบบ สังเคราะห์ RNA probe ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

5.7.2.2 สังเคราะห์ *In vitro* transcription RNA โดยใช้ชุดสำเร็จรูป RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems (Promega, Germany) ใช้พลาสมิดในข้อ 5.4.3 ที่เป็นเส้นตรงโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *SalI* (Fermentas, USA) ด้าน SP6 เป็นต้นแบบ สังเคราะห์ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

5.7.2.3 ทดสอบประสิทธิภาพของ RNA probe ด้วยการใส่ RNA ที่สังเคราะห์ขึ้นในข้อ 5.7.2.2 ความเข้มข้น 10 – 1000 นาโนกรัม ทำการแยก RNA ด้วย 0.8 % อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที นำเจลมาปรับสภาพใน 20X SSC buffer นาน 15 นาที 2 ครั้ง ย้าย RNA จากเจลไปยัง nylon membrane, positively charged (Roche, Germany) ด้วยเทคนิค capillary force ในสารละลาย 20X SSC เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง นำแผ่น nylon membrane มาล้างด้วย 2X SSC buffer เป็นเวลา 10 นาที แล้วฟุ้งพหุมาดบน

กระดาษกรอง นำแผ่น nylon membrane ไปอบที่อุณหภูมิ 120 °ซ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตรึง RNA ไว้กับแผ่น nylon membrane นำไปทำปฏิกิริยา hybridization ด้วย *Den-Cel* RNA probe ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.7.2.1 ที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง ตรวจสอบผลด้วย CDP Star (Roche, USA) ตามวิธีการที่ระบุในคู่มือ DIG Application Manual for Filter Hybridization และตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยา CDP Star บน X-Ray film (Kodak, USA)

5.7.2.4 ทดสอบ Ribonuclease Protection Assay (RPA) โดยนำ 10-20

ไมโครกรัม total RNA และ RNA probe ความเข้มข้น 400 พิโคกรัม ทำปฏิกิริยากันในชุดสำเร็จรูป RPA III TM (Ambion, USA) วิธีการตามที่ระบุโดยผู้ผลิต นำผลผลิตที่ได้มาแยกบน denaturing polyacrylamide gel (5% acrylamide/8M urea) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 250 โวลต์ นาน 20 นาที แล้วถ่ายไปยัง nylon membrane ด้วยเทคนิค capillary force ในสารละลาย 1X TBE เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง นำแผ่น nylon membrane มาล้างด้วย 2X SSC buffer เป็นเวลา 10 นาที แล้วฟุ้งพอลิเมอร์บนกระดาษกรอง นำแผ่น nylon membrane ไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตนาน 2 นาที เพื่อตรึง RNA ที่ได้รับการ hybridize แล้วไว้กับแผ่น nylon membrane ตรวจสอบผลด้วย CDP Star (Roche, USA) ตามวิธีการที่ระบุในคู่มือ DIG Application Manual for Filter Hybridization และตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยา CDP Star บน X-Ray film (Kodak, USA)

5.7.3 Semi-quantitative RT-PCR และ Southern blot hybridization

5.7.3.1 นำ RNA ที่สกัดจาก AZ ของก้านดอกกล้วยไม้ในทริทเมนต์ต่าง ๆ มากำจัด DNA ด้วยเอนไซม์ DNase I (Fermentas, USA) ในปฏิกิริยาประกอบด้วย RNA 3 ไมโครกรัม, เอนไซม์ DNase I (1 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, 10X reaction buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร เติมน้ำจนครบ 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 ไมโครลิตรของ 25 mM EDTA ที่อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 10 นาที นำ RNA ที่กำจัด DNase แล้วมาสังเคราะห์ cDNA เส้นแรกด้วยชุดสำเร็จรูป Omniscript Reverse Transcriptase (QIAGEN, Germany) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 30 ไมโครลิตร ใช้ RNA 18 ไมโครลิตรเป็นแม่แบบและใช้ไพรเมอร์ Oligo dT₁₈ ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์, 1X buffer RT, dNTP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์ Omicript RT 4 ยูนิต ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 60 นาที หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 93 °ซ นาน 5 นาทีและวางบนน้ำแข็งทันที

5.7.3.2 ทดสอบปฏิกิริยา PCR เพื่อหากรอบที่เหมาะสมในการตรวจสอบยีน Actin ในปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตรประกอบด้วย cDNA ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ Actin-O-F และไพรมเมอร์ Actin-O-R (ตารางที่ 1) ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์, dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์, MgCl₂ ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.625 ยูนิต (QIAGEN, Germany) โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
แยกสาย DNA แม่แบบเริ่มต้น	94	3 นาที
แยกสาย DNA แม่แบบ	94	30 วินาที
เริ่มต้นจับคู่ primer กับ DNA ต้นแบบ	60	1 นาที
สังเคราะห์สาย DNA ต่อจาก DNA แม่แบบ	72	30 วินาที
สังเคราะห์สาย DNA รอบสุดท้าย	72	10 นาที

21-26 รอบ

ตรวจสอบผล PCR ด้วย 0.8 % อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที

5.7.3.3 ทดสอบความเข้มข้นของ cDNA ในแต่ละทริทเมนต์ให้เท่ากันโดยใช้การแสดงออกของยีน Actin ในปฏิกิริยา PCR จำนวน 23 รอบ เป็นตัวควบคุม โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในปฏิกิริยาดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
แยกสาย DNA แม่แบบเริ่มต้น	94	3 นาที
แยกสาย DNA แม่แบบ	94	30 วินาที
เริ่มต้นจับคู่ primer กับ DNA ต้นแบบ	60	1 นาที
สังเคราะห์สาย DNA ต่อจาก DNA แม่แบบ	72	30 วินาที
สังเคราะห์สาย DNA รอบสุดท้าย	72	10 นาที

23 รอบ

ทำการตรวจวิเคราะห์ชิ้น DNA ขนาด 250 bp ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย 0.8 % อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที

5.7.3.4 ทดสอบการแสดงออกของยีน *Den-Cel* โดยการทำปฏิกิริยา PCR 25 ไมโครลิตรประกอบด้วย ปริมาณ cDNA ที่ทดสอบว่าเท่ากันจากการทดสอบในข้อ 5.7.3.3 เป็นต้นแบบ, ไพรเมอร์ CEL-MISS-F และ ไพรเมอร์ CEL-MISS-R ความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์, dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.625 ยูนิต (QIAGEN, Germany) โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
แยกสาย DNA แม่แบบเริ่มต้น	94	3 นาที
แยกสาย DNA แม่แบบ	94	30 วินาที
เริ่มต้นจับคู่ primer กับ DNA ต้นแบบ	55	1 นาที
สังเคราะห์สาย DNA ต่อจาก DNA แม่แบบ	72	1 นาที
สังเคราะห์สาย DNA รอบสุดท้าย	72	10 นาที

ทำการตรวจวิเคราะห์ชิ้น DNA ขนาด 875 bp ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย 0.8 % อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจดูชิ้น DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

5.7.3.5 ตรวจสอบผลของ RT-PCR ด้วยเทคนิค southern blot hybridization ปรับสภาพเจลด้วย Denaturation Solution (0.5 N NaOH + 1.5 M NaCl) และ Neutralization Solution (0.5 N Tris pH 8.0 + 1.5 M NaCl) อย่างละ 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ย้าย DNA ที่อยู่บนเจลในข้อ 5.7.3.3 และ 5.7.3.4 ไปยัง positively charged nylon membrane (Roche, Germany) ด้วยเทคนิค capillary force ในสารละลาย 10X SSC (1.5M NaCl, 0.15M trisodium citrate) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แช่ nylon membrane ใน 2X SSC buffer เป็นเวลา 10 นาที ผึ่งให้แห้งพอหมาด ตรึง DNA บน membrane ด้วยการอบ membrane ที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบผลยีน Actin และยีน β -1,4-glucanase ที่ได้ด้วย probe ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.6 ตรวจสอบผลด้วย CDP Star (Roche, USA) ตามวิธีการ DIG System และตรวจสอบการทำปฏิกิริยาของ CDP Star บน X-Ray film (Kodak, USA)

ผล

1. ศึกษาผลของออกซินและเอทิลีนต่อการร่วง

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาผลของสารยับยั้งการทำงานของออกซินต่อการร่วงของดอกบานหลังที่ได้รับเอทิลีน

ดอกบานที่ได้รับ CMPA ความเข้มข้น 5-40 ไมโครกรัมต่อดอกพร้อมกับเอทิลีน ทำให้ดอกบานร่วง โดยช่วงวันที่ 5 ถึงวันที่ 9 มีการร่วงเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นการร่วงของดอกบานมีแนวโน้มคงที่จนถึงวันที่ 15 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 3 A) การให้ CMPA ความเข้มข้น 20-40 ไมโครกรัมต่อดอกพร้อมกับเอทิลีน มีผลต่อการร่วงของดอกบานแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ โดยทำให้ดอกบานร่วงสูงสุด 97-100 % การร่วงของดอกตูมบนก้านช่อดอกเดียวกับดอกบานที่ได้รับ CMPA ร่วมกับเอทิลีน พบว่าเอทิลีนทำให้ดอกตูมในทุกทริทเมนต์มีการร่วงในช่วง 53-68 % ส่วนดอกตูมในทริทเมนต์ที่ไม่ได้รับเอทิลีนมีการร่วงเพียง 7 % (ภาพที่ 3 B) จากการทดลองนี้จึงเลือกใช้ CMPA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อดอกสำหรับการใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาผลของสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซินต่อการร่วงของดอกบานหลังที่ได้รับเอทิลีน

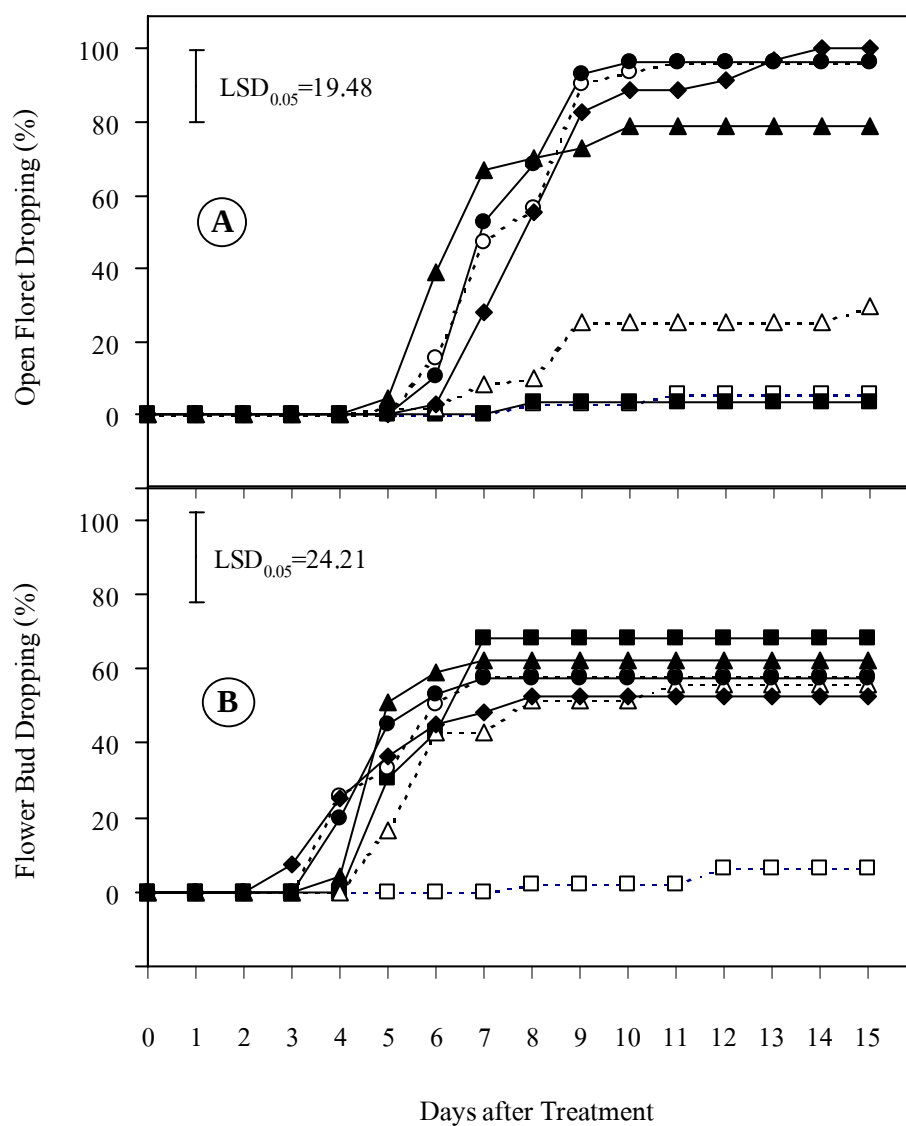
การให้ TIBA ความเข้มข้น 2.5-50 ไมโครกรัมต่อดอกพร้อมกับเอทิลีน พบว่าทำให้ดอกบานร่วงโดยในช่วงวันที่ 5 ถึงวันที่ 10 มีการร่วงเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นการร่วงของดอกบานมีแนวโน้มคงที่จนถึงวันที่ 15 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 4 A) การให้ TIBA ความเข้มข้น 5-50 ไมโครกรัมต่อดอกพร้อมกับเอทิลีน มีผลต่อการร่วงของดอกบานแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีค่าการร่วงของดอกบาน 95-100 % การร่วงของดอกตูมบนก้านช่อดอกเดียวกับดอกบานที่ได้รับ TIBA ร่วมกับเอทิลีน พบว่าทริทเมนต์ที่ไม่ได้รับเอทิลีนดอกตูมมีการร่วงเพียง 4 % แต่เมื่อดอกตูมได้รับเอทิลีนมีผลทำให้ดอกตูมร่วง 40-72 % (ภาพที่ 4 B) เมื่อพิจารณาการร่วงของดอกตูมที่ได้รับเอทิลีนร่วมกับการให้ TIBA ความเข้มข้นต่างๆในดอกบาน สามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่ม กลุ่มที่ดอกบานได้รับ TIBA 0-5 ไมโครกรัมต่อดอก ดอกตูมมีการร่วงมากกว่ากลุ่มที่ดอกบานได้รับ TIBA 10-50 ไมโครกรัมต่อดอก เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ TIBA ที่ให้กับดอกบานและการร่วงของดอกตูมที่ได้รับเอทิลีนมีแนวโน้มว่า เมื่อความเข้มข้นของ TIBA ที่ให้กับดอก

บานเพิ่มขึ้นทำให้ดอกตูมที่ได้รับเอทิลีนมีการร่วงลดลง จากการทดลองนี้จึงเลือกใช้ TIBA ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดอกสำหรับการทดลองต่อไป

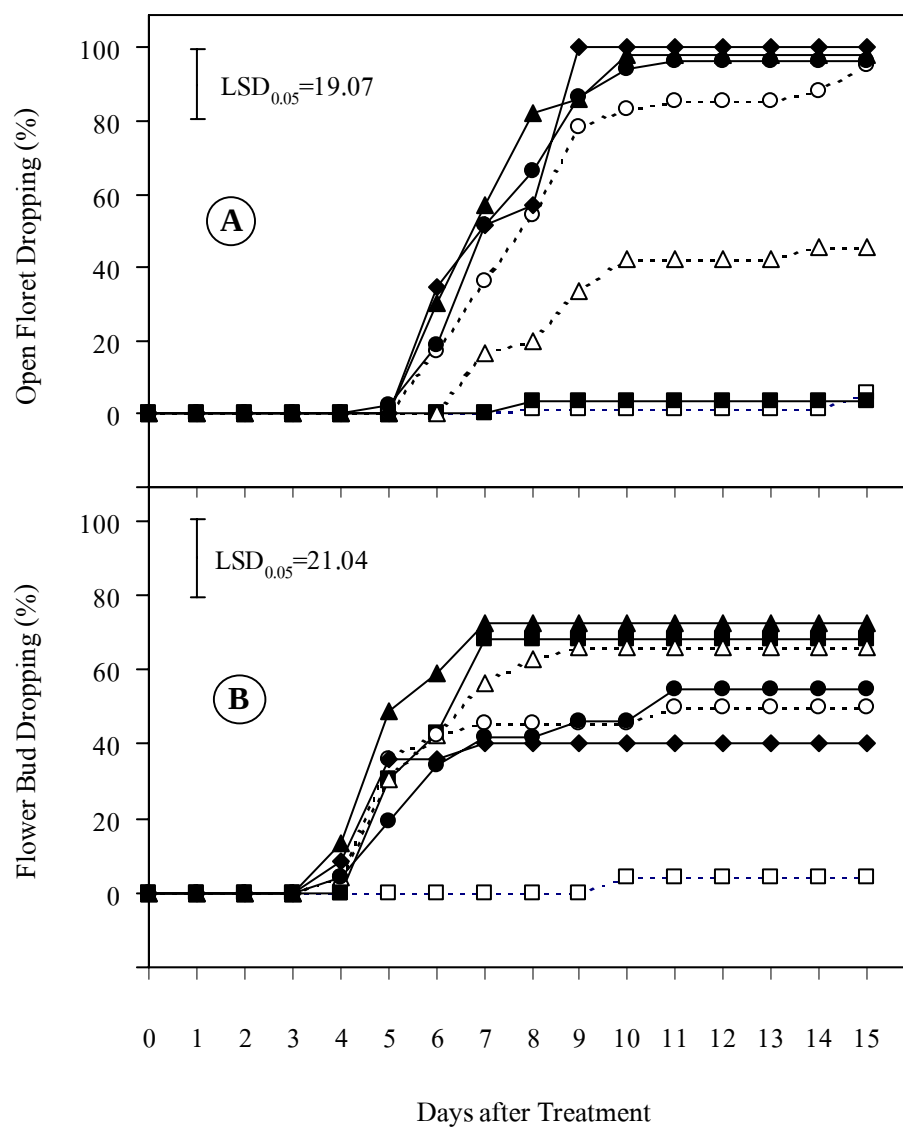
การทดลองที่ 1.3 ศึกษาผลของสารยับยั้งการทำงานของออกซินและสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซินต่อการร่วงของดอกบาน

การให้ CMPA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อดอกหรือ TIBA ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดอก ร่วมกับการได้รับเอทิลีนและไม่ได้รับเอทิลีน ทำให้ดอกบานร่วง 80-100 % (ภาพที่ 5 A) เอทิลีนจากภายนอกทำให้ดอกบานที่ได้รับ CMPA หรือ TIBA มีการร่วงเร็วขึ้นโดยพบการร่วงของดอกบานในวันที่ 5 และเอทิลีนยังส่งเสริมให้ดอกบานที่ได้รับสารยับยั้งออกซินมีการร่วง 100 % ส่วนดอกบานที่ได้รับ CMPA หรือ TIBA เพียงอย่างเดียว พบการร่วงของดอกบานในวันที่ 7 และทำให้ดอกบานร่วง 80 % และ 95 % ตามลำดับ ขณะที่ดอกบานที่ไม่ได้รับสารและดอกบานที่ได้รับเอทิลีนเพียงอย่างเดียวไม่มีการร่วง (ภาพที่ 5 A) เมื่อเปรียบเทียบดอกบานและดอกตูมพบว่า ดอกตูมของกล้วยไม้ตอบสนองต่อเอทิลีน โดยในทริทเมนต์ที่ดอกตูมไม่ได้รับเอทิลีน มีการร่วงที่น้อยกว่าดอกตูมในทริทเมนต์ที่ได้รับเอทิลีน (ภาพที่ 5 B)

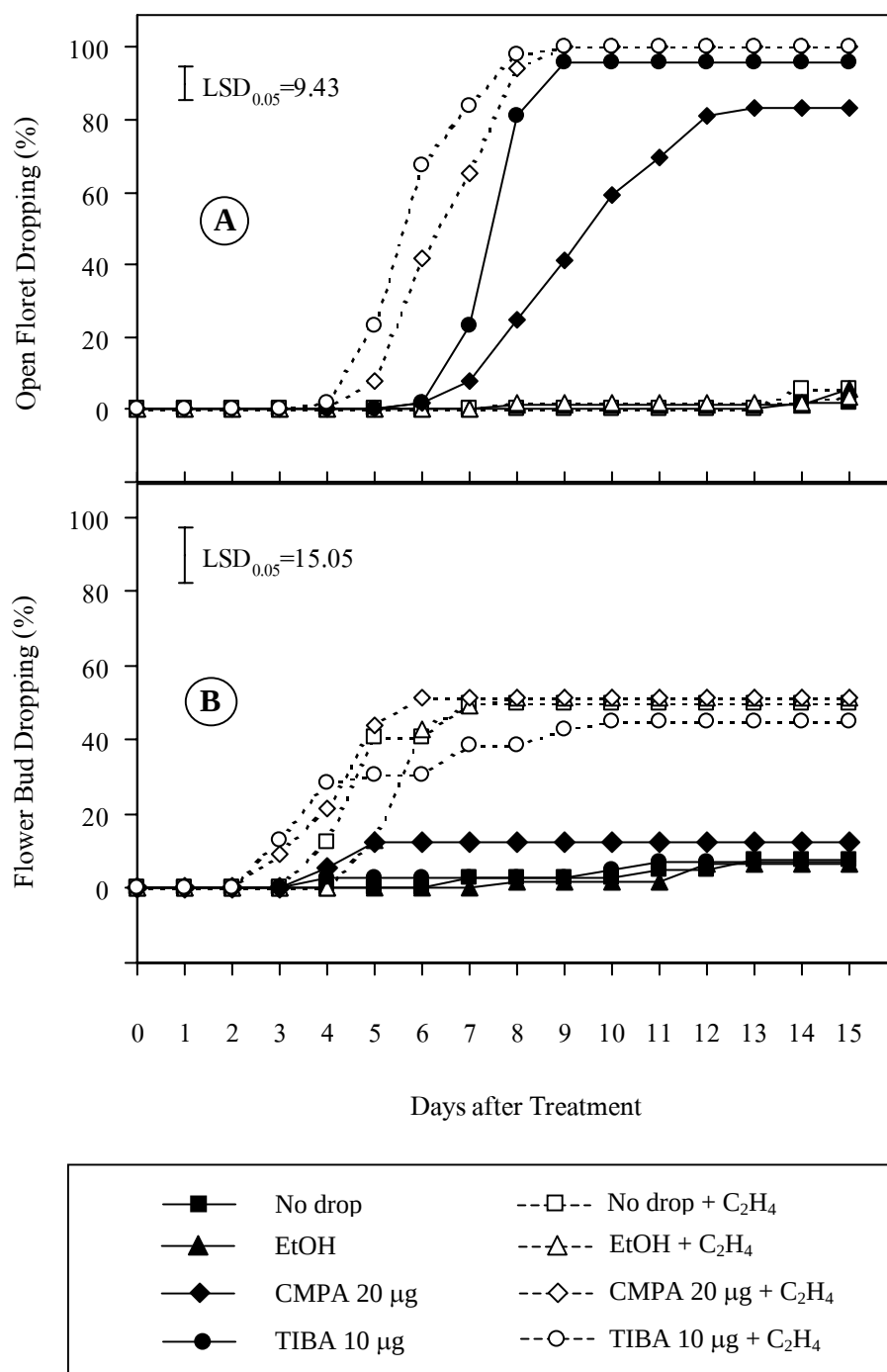
ประสิทธิภาพของ CMPA ลดลงเมื่อดอกกล้วยไม้มีความสมบูรณ์มากขึ้น โดยการทดลองครั้งนี้พบว่า ดอกกล้วยไม้จากบริษัทส่งออกซึ่งต้องผ่านการรวบรวมจากสวนหลายสวนและส่งเข้าบริษัท ดอกบานที่ได้รับสาร CMPA เพียงอย่างเดียวมีการร่วง 80 % (ภาพที่ 5 A) เมื่อเปรียบเทียบกับดอกกล้วยไม้จากสวนกล้วยไม้โดยตรง (ดอกกล้วยไม้ไม่มีความสมบูรณ์) การร่วงของดอกบานที่ได้รับ CMPA เพียงอย่างเดียวมีเพียง 24 % (ภาพที่ 6)



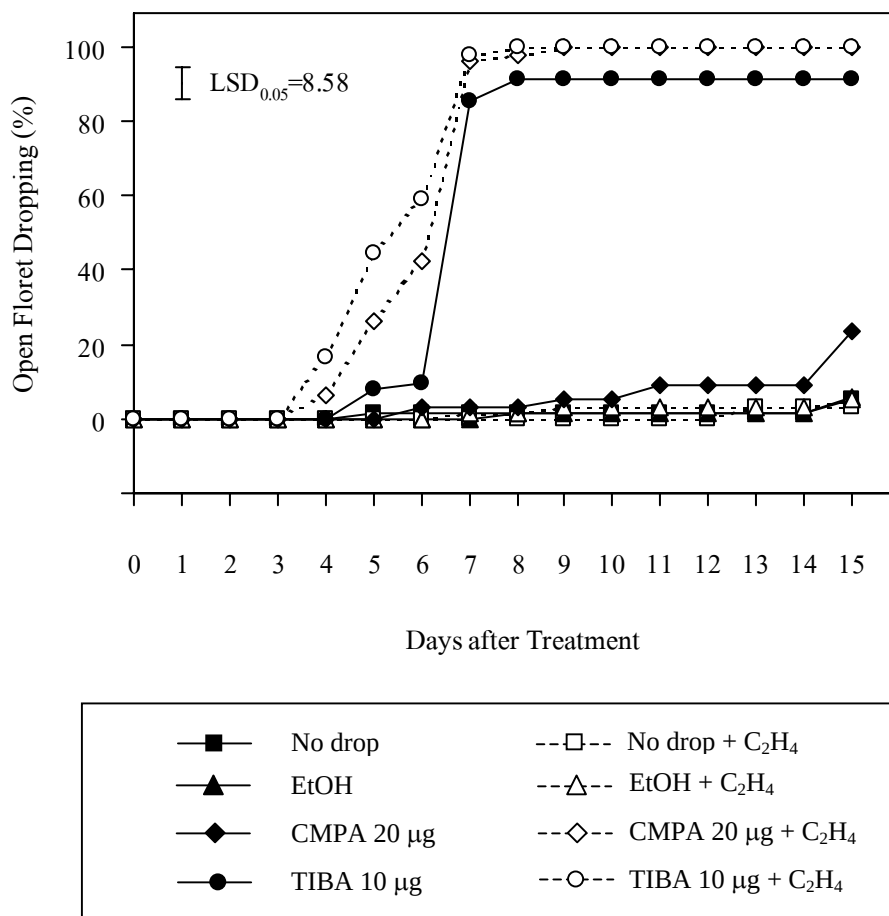
ภาพที่ 3 การร่วงของดอกบาน (A) และดอกตูม (B) กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสทีน หลังจากให้สารยับยั้งการทำงานของออกซิน (CMPA) ความเข้มข้น 0-40 ไมโครกรัมต่อดอกแก่ดอกบาน ร่วมกับเอทิลีนทริฟเม้นท์



ภาพที่ 4 การร่วงของดอกบาน (A) และดอกตูม (B) กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์สทิน หลังจากให้สารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซิน (TIBA) ความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อดอก แก่ดอกบาน ร่วมกับเอทิลีนทริทเม้นท์



ภาพที่ 5 การร่วงของดอกบาน (A) และดอกตูม (B) กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์สีหิน หลังจากดอกบานได้รับ TIBA หรือ CMPA ร่วมกับการได้รับเอทิลีนและไม่ได้รับเอทิลีน



ภาพที่ 6 การร่วงของดอกบานกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสตินที่เก็บเกี่ยวทันทีจากสวนกล้วยไม้และให้ดอกบานได้รับ TIBA หรือ CMPA ร่วมกับการได้รับเอทิลีนและไม่ได้รับเอทิลีน

การทดลองที่ 1.4 ศึกษาผลของสารยับยั้งการทำงานของออกซินและสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซินร่วมกับ 1-MCP

การให้ 1-MCP มีผลยับยั้งการร่วงของดอกบานที่ได้รับ CMPA หรือ TIBA การร่วงของดอกบานที่ได้รับ CMPA ลดลงจาก 80 % เป็น 16 % เมื่อได้รับ 1-MCP และการร่วงของดอกบานที่ได้รับ TIBA ลดลงจาก 100 % เป็น 52 % เมื่อได้รับ 1-MCP (ภาพที่ 7) 1-MCP สามารถชะลอการเสื่อมสภาพของดอก โดยปกติดอกบานที่ได้รับ CMPA หรือ TIBA มีอาการเสื่อมสภาพ คือ ดอกน้ำกลีบดูเส้นแวนชัดเจน ก่อนที่ดอกจะร่วง 1-2 วัน จากการทดลองพบว่า ดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ CMPA หรือ TIBA มีการเสื่อมสภาพของดอกในวันที่ 5 เมื่อให้ 1-MCP ร่วมกับการได้รับ CMPA หรือ TIBA อาการเสื่อมสภาพของดอกสามารถชะลอจนถึงวันที่ 10 จากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า การร่วงและการเสื่อมสภาพของดอกบานเป็นผลเนื่องมาจากเอทิลิน

การทดลองที่ 1.5 ศึกษาการสร้างเอทิลินในดอกบานที่ได้รับสารยับยั้งการทำงานของออกซินและการเคลื่อนที่ของออกซินร่วมกับ 1-MCP

ดอกบานที่ได้รับ TIBA มีการสร้างเอทิลินในช่วงแรกหลังจากได้รับสาร โดยมีอัตราการสร้างเอทิลินสูงสุด 6.5 นาโนลิตรต่อกรัมต่อชั่วโมง ในช่วงวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 (ภาพที่ 8) ซึ่งเป็นช่วงที่ดอกบานแสดงอาการน้ำเน่า ดอกกลีบและเกิดเส้นแวนบนกลีบดอก อัตราการสร้างเอทิลินเริ่มลดลงเมื่อดอกร่วง การให้ 1-MCP สามารถยับยั้งการสร้างเอทิลินได้ในช่วงแรก เมื่อเวลาผ่านไปดอกกล้วยไม้ไม่สามารถสร้างเอทิลินได้เป็นปกติ ดังในภาพที่ 8 ดอกบานที่ได้รับ TIBA ร่วมกับ 1-MCP มีอัตราการสร้างเอทิลินสูงในอัตราเดียวกับดอกบานที่ได้รับ TIBA เพียงอย่างเดียว จากการทดลองนี้ทำให้เห็นว่า สารยับยั้งการทำงานของออกซินหรือสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซินทำงานผ่านเอทิลินในการควบคุมการร่วงของดอกบาน

การทดลองที่ 1.6 ศึกษาอิทธิพลของดอกตูมต่อการร่วงของดอกบาน

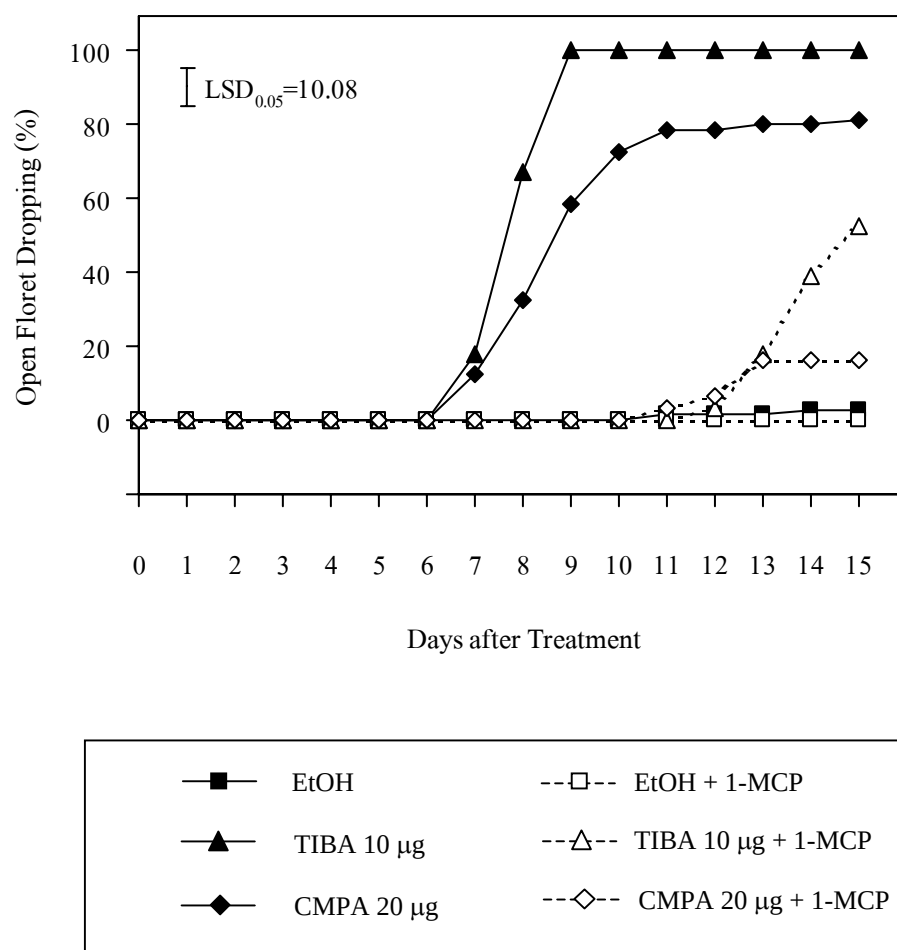
ดอกตูมของดอกกล้วยไม้บางชนิดสามารถควบคุมการตอบสนองต่อเอทิลินของดอกบาน การทดลองนี้ได้ตัดดอกตูมออกเหลือเพียงดอกบานและศึกษาการร่วงของดอกบานหลังจากได้รับเอทิลิน ผลการทดลองพบว่า การให้เอทิลินกับดอกบานที่ไม่มีดอกตูม มีการร่วงของดอกบานไม่แตกต่างจากทริทเมนต์ดอกบานที่ไม่มีดอกตูมและไม่ได้รับเอทิลิน (ภาพที่ 9) แสดงให้เห็นว่า ดอกตูมของกล้วยไม้พันธุ์มัสตินไม่มีผลให้ดอกบานมีความทนทานต่อเอทิลิน

การทดลองที่ 1.7 ศึกษาผลของ IAA ต่อการร่วงของก้านดอกตูมและก้านดอกบาน

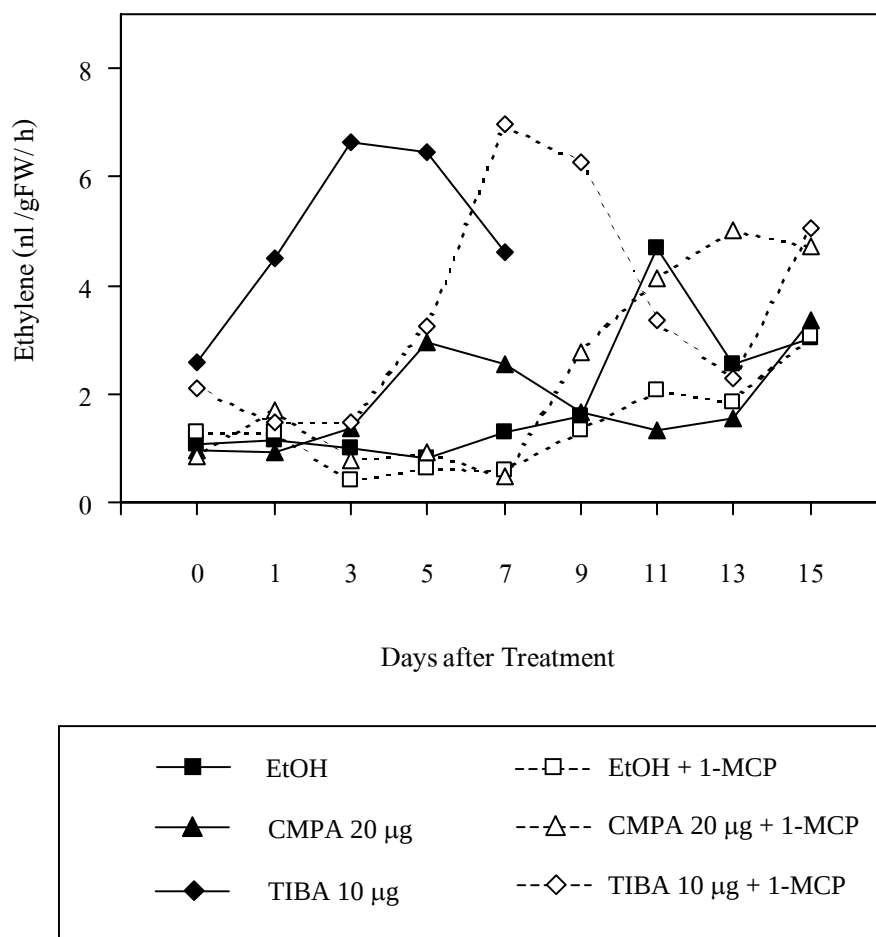
การตัดดอกบานและดอกตูมได้ตำแหน่งรังไข่เหลือไว้เพียงก้านดอก มีผลต่อการร่วงของก้านดอก การตัดดอกบานออกรวมกับการได้รับและไม่ได้รับเอทิลีนมีผลทำให้ก้านดอกหลุดร่วง 73-75 % เมื่อสิ้นสุดการทดลอง แต่การตัดดอกรวมกับการให้เอทิลีนทำให้ก้านดอกร่วงเร็วกว่าการตัดดอกและไม่ได้รับเอทิลีน การตัดดอกและให้ IAA บริเวณรอยตัดสามารถยับยั้งการร่วงได้ โดยการตัดดอก+IAA และการตัดดอก+IAA+เอทิลีน มีการร่วงของก้านดอก 23 % และ 4 % ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างจากการร่วงของดอกปกติที่ได้รับและไม่ได้รับเอทิลีน (ภาพที่ 10 A) การตัดดอกตูมทำให้ก้านดอกร่วง 85-91 % เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 10 B) และการตัดดอกตูมทำให้ก้านดอกตูมร่วงเร็วกว่าก้านดอกบาน โดยก้านดอกตูมที่ได้รับเอทิลีนเริ่มร่วงในวันที่ 4 ส่วนก้านดอกบานที่ได้รับเอทิลีนเริ่มร่วงในวันที่ 8 (ภาพที่ 10 A) เมื่อเปรียบเทียบการตัดดอกตูม+เอทิลีน ไม่ตัดดอกตูม+เอทิลีน และตัดดอกตูม+IAA+เอทิลีน พบว่า มีการร่วงของก้านดอก 85 %, 58 % และ 16 % ตามลำดับ ดังนั้นการให้ IAA แก่ก้านดอกตูมสามารถยับยั้งการร่วงของก้านดอกได้อย่างชัดเจนแม้ในสภาพที่ดอกตูมมีความไวต่อเอทิลีน

การทดลองที่ 1.8 ศึกษาผลของเอทิลีนต่อการร่วงหลังจากตัดดอกบานออก ด้วยการให้ 1-MCP

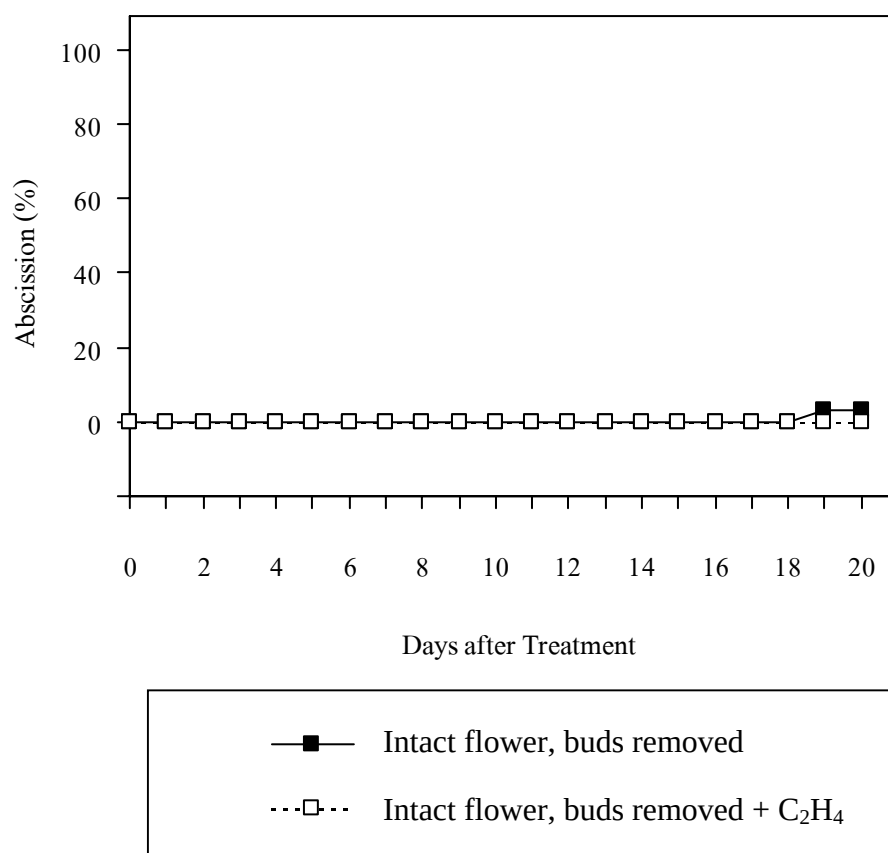
การร่วงของก้านดอกหลังจากตัดดอกออกอาจมีหลายปัจจัยที่เป็นสาเหตุ เช่น การขาดอาหาร เอทิลีน เพื่อทำการทดสอบว่าการร่วงของก้านดอกเกี่ยวข้องกับเอทิลีน จึงทำการทดลองโดยให้ 1-MCP แก่ก้านดอกที่ตัดดอกออก ผลการทดลองพบว่า การให้ 1-MCP สามารถชะลอการร่วงของก้านดอกและมีการร่วงลดลงจาก 86 % เป็น 55 % (ภาพที่ 11)



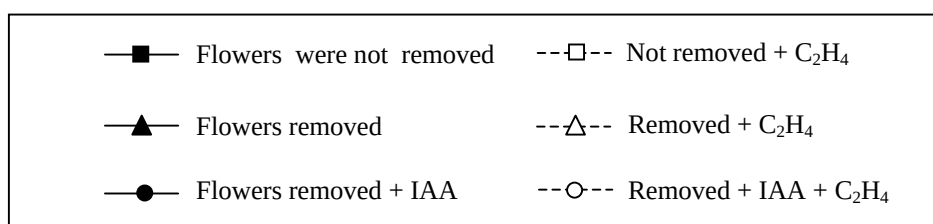
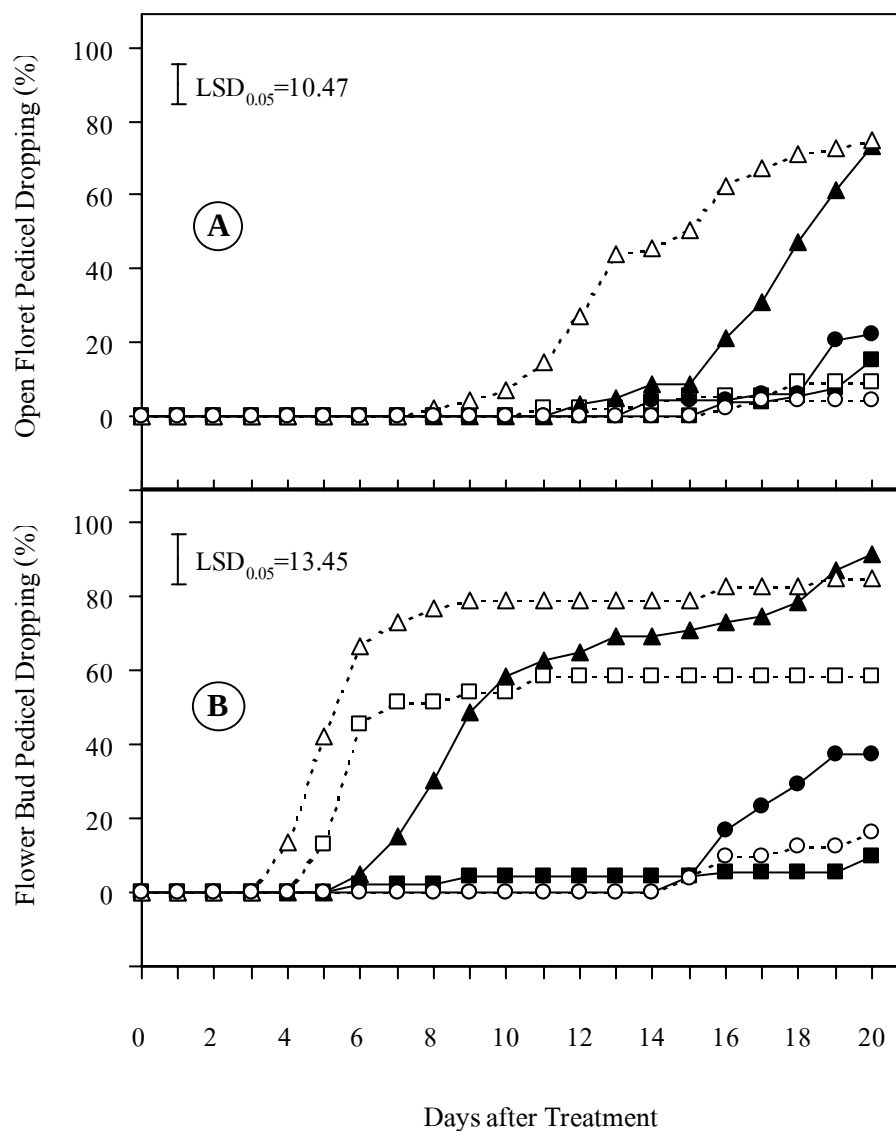
ภาพที่ 7 การร่วงของดอกบานกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มีสทิน ที่ได้รับ TIBA หรือ CMPA ร่วมกับการได้รับ 1-MCP และไม่ได้รับ 1-MCP



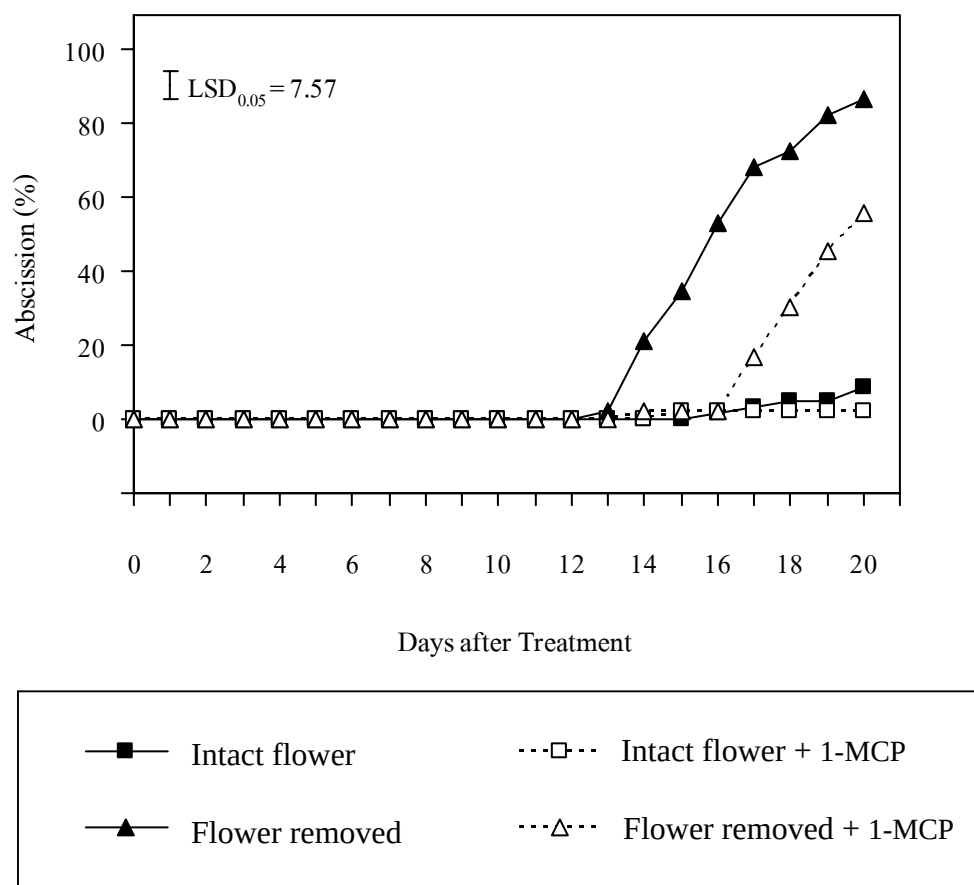
ภาพที่ 8 การสร้างเอทิลีนของดอกบานกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสทีน ที่ได้รับ TIBA หรือ CMPA ร่วมกับการได้รับ 1-MCP และไม่ได้รับ 1-MCP



ภาพที่ ๑ การร่วงของดอกบานกล้วยไม้พันธุ์มัสตินที่ตัดก้านดอกตูมทิ้ง ในสภาพที่ได้รับเอทิลีนและไม่ได้รับเอทิลีน



ภาพที่ 10 การร่วงของก้านดอกบาน (A) และก้านดอกตูม (B) กล้วยไม้พันธุ์มัสทีนที่ตัดดอกออกและได้รับ IAA ร่วมกับการได้รับเอทิลีนและไม่ได้รับเอทิลีน

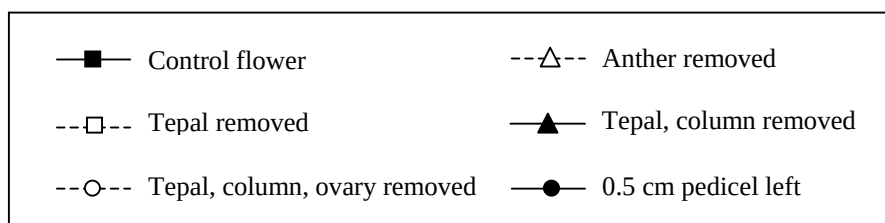
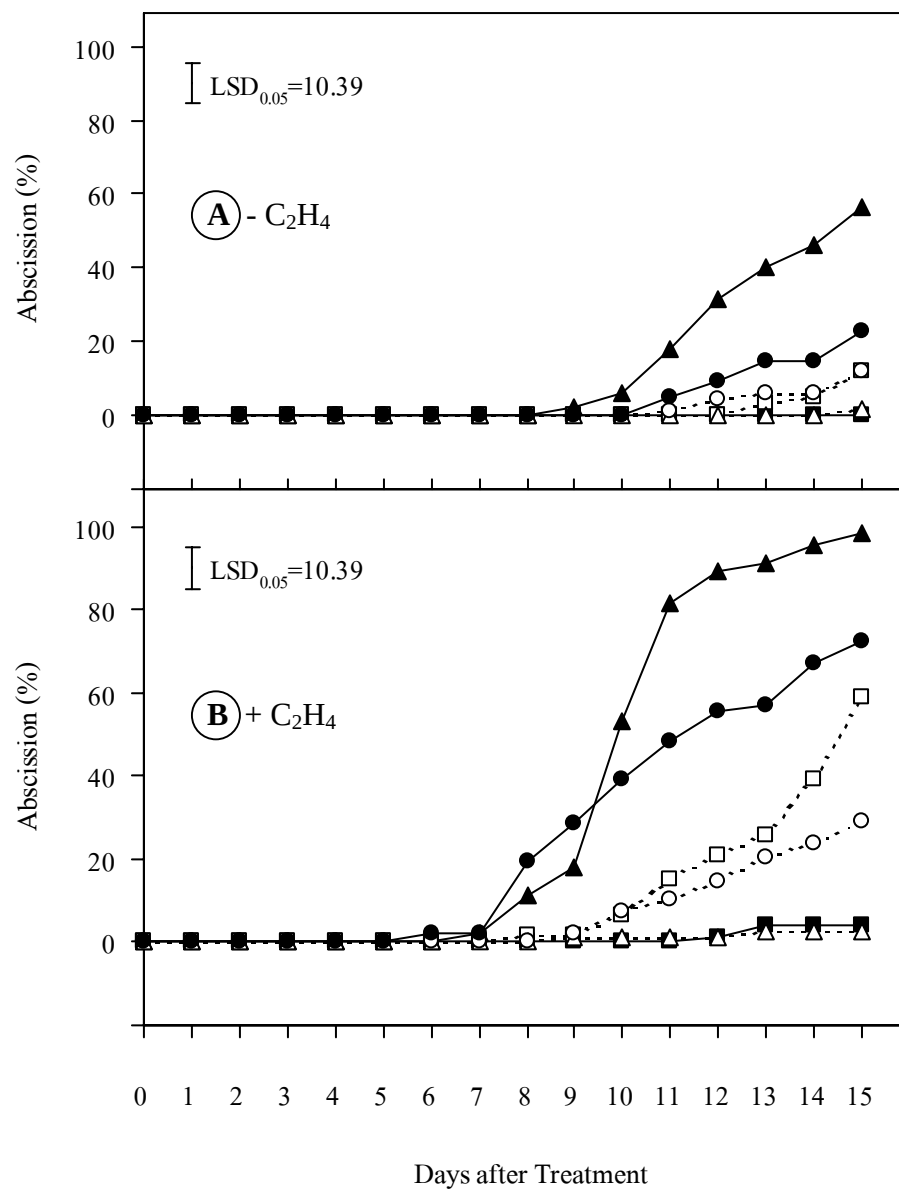


ภาพที่ 11 การร่วงของก้านดอกบานกล้วยไม้พันธุ์มัสทีน หลังจากตัดดอกออกรวมกับการได้รับ 1-MCP และไม่ได้รับ 1-MCP

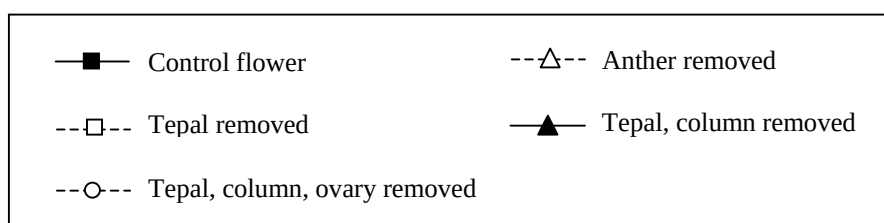
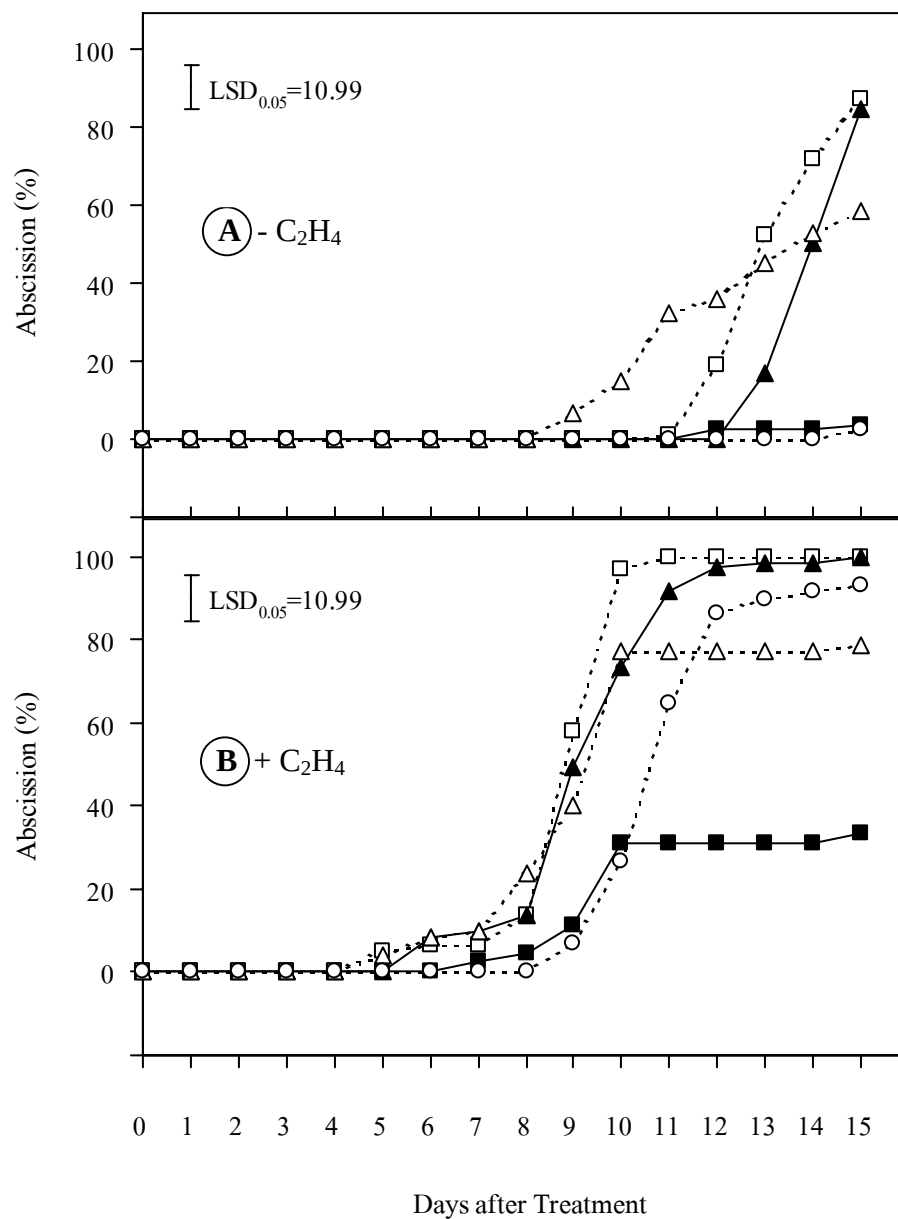
การทดลองที่ 1.9 ศึกษาผลของการตัดส่วนต่างๆของดอกบานต่อการร่วงของดอก

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่า ส่วนใดของดอกที่เป็นแหล่งของออกซิน จากการทดลองพบว่า ในทริทเมนต์ที่ได้รับเอทิลีนการตัดส่วนต่างๆของดอกบานทำให้ดอกร่วงมากกว่าในทริทเมนต์ที่ไม่ได้รับเอทิลีน (ภาพที่ 12) โดยการตัดส่วนกลีบดอกและเส้าเกสรออกทำให้ดอกร่วงสูงสุด 100 % รองลงมาคือ การตัดทั้งดอกเหลือก้านดอกยาว 0.5 ซม.ทำให้ดอกร่วง 75 % การตัดกลีบดอกออกทำให้ดอกร่วง 60 % การตัดทั้งดอกได้รังไข่เหลือก้านดอกยาว 2 ซม.ทำให้ดอกร่วง 30 % ส่วนดอกที่นำเกสรออกและดอกปกติมีการร่วงของดอกน้อยและไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 12 B) ในทริทเมนต์ที่ไม่ได้รับเอทิลีน การตัดส่วนต่างๆของดอกมีผลทำให้ดอกร่วงมีแนวโน้มเหมือนในทริทเมนต์ที่ได้รับเอทิลีน คือ การตัดส่วนกลีบดอกและเส้าเกสรออกมีผลทำให้ดอกร่วงมากที่สุด 55 % รองลงมาคือ การตัดทั้งดอกเหลือก้านดอกยาว 0.5 ซม.ทำให้ดอกร่วง 20 % การตัดกลีบดอกออกทำให้ดอกร่วง 10 % การตัดทั้งดอกได้รังไข่เหลือก้านดอกยาว 2 ซม.ทำให้ดอกร่วง 10 % ส่วนดอกที่นำเกสรออกและดอกปกติมีการร่วงของดอกน้อยและไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 12 A)

การทดลองนี้ถึงแม้ว่ามีการใช้สารยับยั้งการสร้างเอทิลีน (AOA) แต่ยังไม่สามารถยับยั้งผลของเอทิลีนที่เกิดขึ้นเนื่องจากขาดแคลนบริเวณรังไข่ได้ จึงทำให้ดอกที่ตัดส่วนกลีบดอกและเส้าเกสรออกมีการร่วงสูงสุด ในการทดลองนี้การเปรียบเทียบโดยการตัดส่วนต่างๆ เช่น กลีบดอก เส้าเกสรหรือรังไข่ จึงไม่สามารถบ่งบอกได้ว่า ออกซินจากส่วนใดมีผลทำให้ AZ ไม่ตอบสนองต่อเอทิลีนได้ทำการทดลองตัดส่วนต่างๆของดอกในกล้วยไม้พันธุ์ขาวสนาน (ดอกบานตอบสนองต่อเอทิลีน) ดังในภาพที่ 13 การร่วงของดอกบานกล้วยไม้พันธุ์ขาวสนานมีรูปแบบคล้ายคลึงกับการร่วงของดอกบานกล้วยไม้พันธุ์มัสติน โดยทริทเมนต์ที่ได้รับเอทิลีน (ภาพที่ 13 B) การตัดส่วนต่างๆของดอกบานมีผลทำให้ดอกร่วงมากกว่าในทริทเมนต์ที่ไม่ได้รับเอทิลีน (ภาพที่ 13 A) การตัดส่วนกลีบดอกและเส้าเกสรออก และการตัดกลีบดอกออกทำให้ดอกร่วงมากที่สุดในสภาพที่มีเอทิลีนและไม่ มีเอทิลีน (ภาพที่ 13 A และ 13 B) ส่วนการนำเกสรตัวผู้ของกล้วยไม้พันธุ์มัสติน ออกไม่มีผลต่อการร่วงของดอก (ภาพที่ 12) ซึ่งแตกต่างจากดอกกล้วยไม้พันธุ์ขาวสนานโดยมีการร่วงของดอกมากเมื่อนำเกสรตัวผู้ออก (ภาพที่ 13) ในดอกกล้วยไม้พันธุ์มัสตินเมื่อเปรียบเทียบการตัดทั้งดอก รวมก้านดอกเหลือก้านดอกยาว 0.5 ซม. และการตัดทั้งดอกได้รังไข่เหลือก้านดอกยาว 2 ซม. พบว่า การมีส่วนก้านดอกเหลืออยู่มากกว่าสามารถลดการร่วงของดอกบานได้ (ภาพที่ 12) จึงเป็นไปได้ว่ามีสารออกซินอยู่บริเวณก้านดอกบานที่เคลื่อนที่ไปยัง AZ ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณ AZ ไม่ตอบสนองต่อเอทิลีน



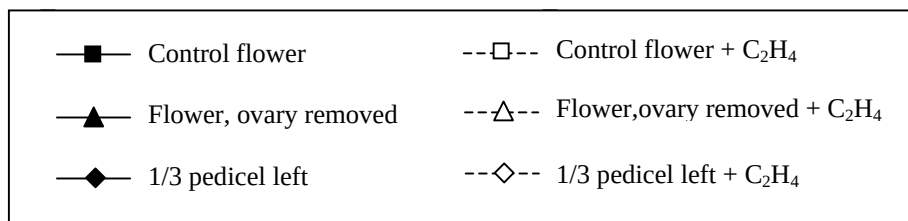
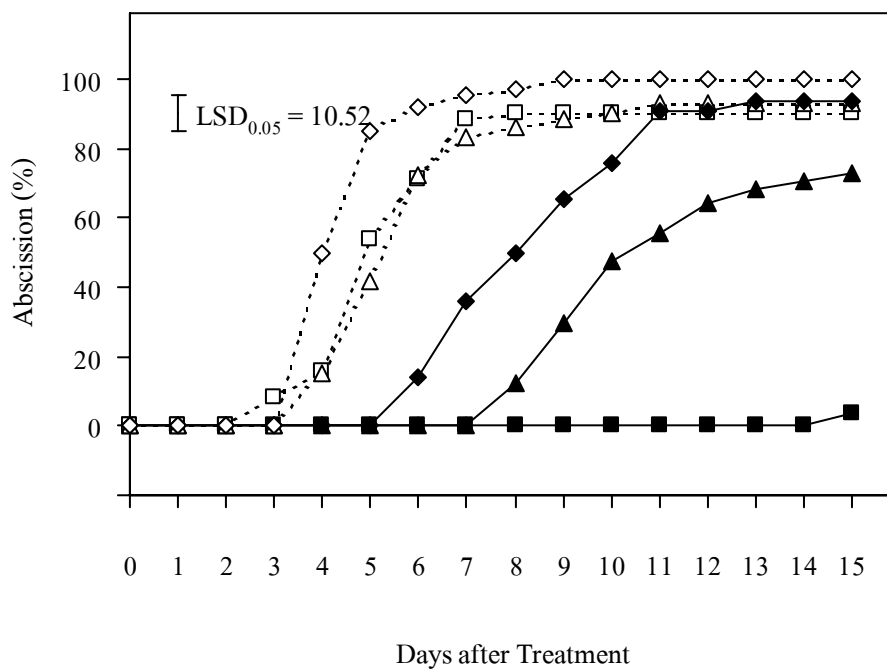
ภาพที่ 12 การร่วงของดอกบานกล้วยไม้พันธุ์มัสติน หลังจากตัดส่วนต่างๆ ของดอกบาน
ออก ร่วมกับการได้รับเอทิลีน (B) และไม่ได้รับเอทิลีน (A)



ภาพที่ 13 การร่วงของดอกบานกล้วยไม้พันธุ์ขาวสนาน หลังจากตัดส่วนต่าง ๆ ของดอกบาน ออกร่วมกับการได้รับเอทิลีน (B) และไม่ได้รับเอทิลีน (A)

การทดลองที่ 1.10 ศึกษาการร่วงของก้านดอกตูมหลังจากตัดก้านดอกออก 2/3 ของก้านดอก

การตัดก้านดอกตูมออก 2/3 ของก้านดอกทำให้ก้านดอกที่เหลืออยู่หลุดร่วงเร็วขึ้น โดยพบการร่วงในวันที่ 6 มีการร่วง 94 % เมื่อสิ้นสุดการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับการตัดดอก+รังไข่ออก มีการร่วง 73 % ดอกตูมปกติมีการร่วง 4 % (ภาพที่ 14) ในสภาพที่ให้เอทิลีนพบว่า เอทิลีนส่งเสริมการร่วงเร็วขึ้นโดยมีการร่วงของก้านดอกในวันที่ 3 และ 4 ทุกทริทเมนต์และมีการร่วงสูง 90-100 % โดยการตัดก้านดอกตูมออก 2/3 มีการร่วงมากที่สุด 100 %



ภาพที่ 14 การร่วงของก้านดอกตูมกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีน หลังจากตัดดอก+รังไข่หรือตัดก้านดอกออก 2/3 ของก้านดอก ร่วมกับการได้รับเอทิลีนและไม่ได้รับเอทิลีน

2. ศึกษาปริมาณออกซินในส่วนของดอกกล้วยไม้

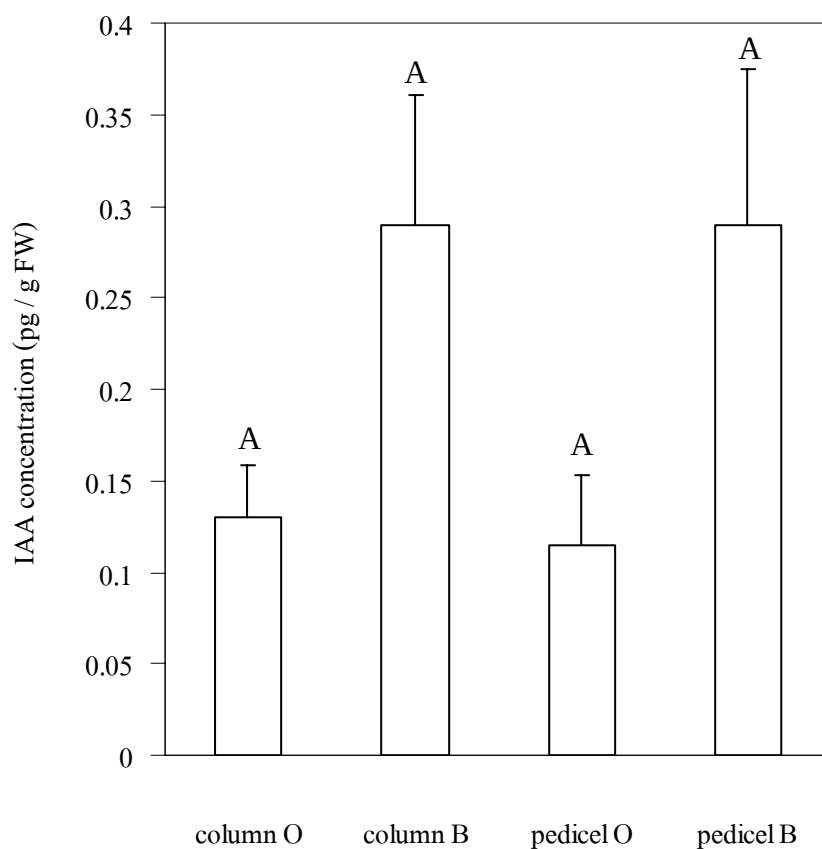
การทดลองที่ 2.1 ศึกษาปริมาณของ IAA ในตำแหน่งเส้าเกสรรวมก้านดอกและ abscission zone (AZ) ของดอกบานในทริทเมนต์ต่าง ๆ

จากการทดลองหาปริมาณ IAA ในส่วนเส้าเกสรรวมก้านดอกของดอกกล้วยไม้พันธุ์มัสตินในช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับสารยับยั้งการทำงานและสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซินร่วมกับการได้รับเอทิลินและไม่ได้รับเอทิลิน พบว่าปริมาณของ IAA แตกต่างกันหลังจากการให้สาร หลังจากให้สารเป็นเวลา 5 วัน ปริมาณของ IAA ไม่แตกต่างกันยกเว้นดอกที่ไม่ได้รับสาร (control) (ภาพผนวกที่ 1) จากการทดลองนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า ปริมาณของ IAA แตกต่างกันอย่างใดในทริทเมนต์ต่าง ๆ และเมื่อเวลาผ่านไปมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ IAA เป็นอย่างไรเนื่องจากกล้วยไม้พันธุ์มัสตินมีปริมาณ IAA น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ IAA ในกล้วยไม้หวายพันธุ์อื่น ๆ และวิธีการสกัด IAA จากเนื้อเยื่อของดอกไม้มีขั้นตอนที่ยุ่งยากอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนจากการสูญหายไปของปริมาณ IAA ก่อนข้างสูง

การทดลองหาปริมาณ IAA ในส่วนของ AZ ของดอกกล้วยไม้พันธุ์มัสตินหลังจากได้รับสารยับยั้งการทำงานและสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซินร่วมกับการได้รับเอทิลินและไม่ได้รับเอทิลิน ไม่สามารถตรวจสอบปริมาณของ IAA ได้เนื่องจาก condition สำหรับตรวจสอบปริมาณ IAA ในส่วน AZ โดยเครื่อง HPLC ยังไม่เหมาะสม ทำให้ peak ของ IAA ไม่สามารถแยกจากสารอื่นที่มี peak อยู่ใกล้เคียงกัน

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาปริมาณของ IAA ในเส้าเกสรรวมรังไข่ และก้านดอกของดอกตูมและดอกบาน

จากการหาปริมาณ IAA มีแนวโน้มว่าในดอกตูมปริมาณของ IAA ในส่วนเส้าเกสรรวมรังไข่และส่วนก้านดอกมีปริมาณมากกว่าส่วนเส้าเกสรรวมรังไข่และส่วนก้านดอกของดอกบาน (ภาพที่ 15) และเมื่อเปรียบเทียบส่วนเส้าเกสรรวมรังไข่กับส่วนก้านดอกมีค่าใกล้เคียงกันทั้งในดอกตูมและดอกบาน แต่ปริมาณ IAA จากทั้ง 4 ทริทเมนต์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



ภาพที่ 15 ปริมาณ IAA ในส่วนเส้าเกสร+รังไข่ดอกบาน (column O) เส้าเกสร+รังไข่ดอกตูม (column B) ก้านดอกบาน (pedicel O) และก้านดอกตูม (pedicel B) ดอกกล้วยไม้พันธุ์มัสทีน (ค่าเฉลี่ยจาก 6 ซ้ำ $\pm$ SE) ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละแท่งกราฟไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

3. ศึกษากายวิภาคของเซลล์บริเวณ abscission zone (AZ)

การทดลองที่ 3.1 ศึกษากายวิภาคของเซลล์บริเวณ AZ ในดอกตูมและดอกบาน

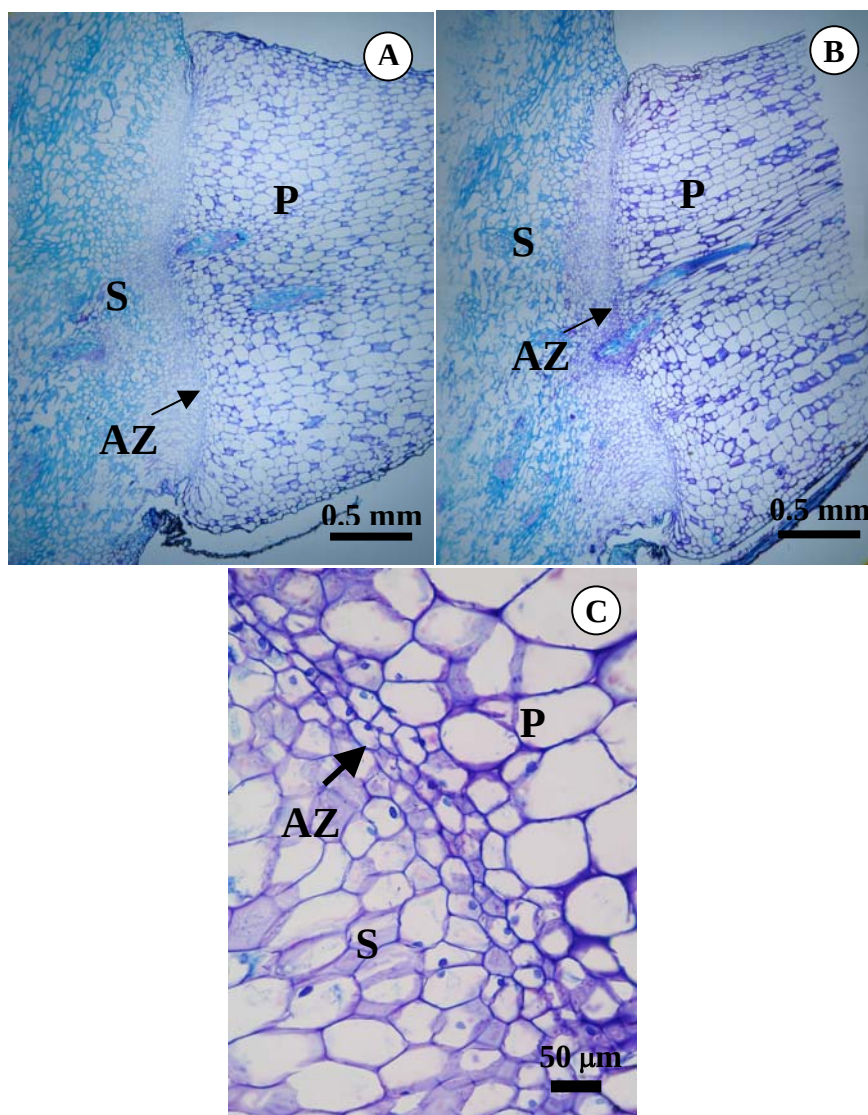
การศึกษากายวิภาคของเนื้อเยื่อ AZ บริเวณก้านดอกตูมและก้านดอกบานพบ AZ ปรากฏชัดเจนบริเวณรอยต่อระหว่างก้านดอกและก้านช่อดอก แต่ไม่พบความแตกต่างของลักษณะเซลล์บริเวณ AZ ของดอกตูมและดอกบาน (ภาพที่ 16 A และ 16 B) บริเวณ AZ ประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็กรูปร่างกลมหรือเหลี่ยม เรียงตัว 2-3 แถว เซลล์เหล่านี้มีขนาดแตกต่างจากเซลล์บริเวณก้านดอกและก้านช่อดอกอย่างชัดเจน (ภาพที่ 16 C) การแยกตัวของเซลล์ในกระบวนการร่วงเกิดขึ้นระหว่างชั้นเซลล์ขนาดเล็ก 2 ชั้นบริเวณ AZ เริ่มแยกจากกันบริเวณขอบของ AZ (ภาพที่ 17) การแยกตัวของเซลล์บริเวณ AZ ดำเนินต่อไปตลอดแนวความยาวของ AZ ก่อนการร่วง ส่วนของก้านดอกเคลื่อนตัวออกเล็กน้อยเห็นเป็นรอยแยกตลอดแนว AZ (ภาพที่ 18 C)

การทดลองที่ 3.2 ศึกษากายวิภาคของเซลล์บริเวณ AZ ในดอกบานที่ได้รับสารยับยั้งการทำงานและสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซิน

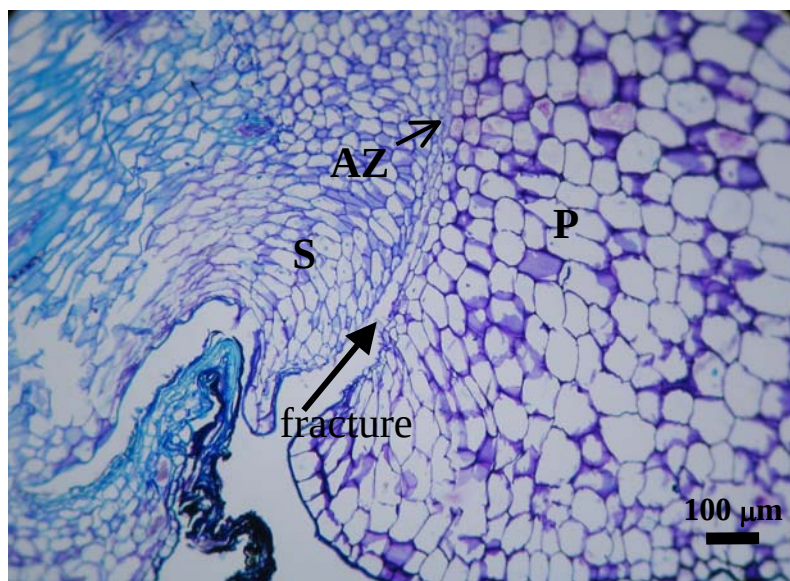
ความแตกต่างของ AZ บริเวณฐานก้านดอกบานสังเกตเห็นได้ในทริทเมนต์ต่าง ๆ หลังจากให้ทริทเมนต์เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับดอกบานที่ไม่ได้รับสาร (ภาพที่ 18 A) และดอกบานที่ได้รับเอทิลีน (ภาพที่ 18 B) เอทิลีนไม่สามารถเร่งกระบวนการแยกตัวของเซลล์บริเวณ AZ ส่วนดอกบานที่ได้รับสาร CMPA หรือ TIBA ลงบนเส้าเกสรทำให้เซลล์บริเวณ AZ แยกตัวออกจากกัน (ภาพที่ 18 C และ 18 D) นำไปสู่การร่วงของดอก

การทดลองที่ 3.3 ศึกษากายวิภาคของเซลล์บริเวณ AZ ในก้านดอกบานที่ได้รับ IAA

การให้ IAA บนรอยตัดที่ก้านดอกบานมีผลทำให้สามารถชะลอการร่วงของก้านดอกบานได้ เมื่อศึกษากายวิภาคของเซลล์บริเวณ AZ พบว่า ลักษณะของเซลล์บริเวณ AZ ในก้านดอกบานที่ได้รับ IAA เป็นเวลา 17 วัน (ภาพที่ 19 B) มีลักษณะไม่แตกต่างจากดอกบานปกติที่ทำการเก็บตัวอย่างหลังจากเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 19 A)

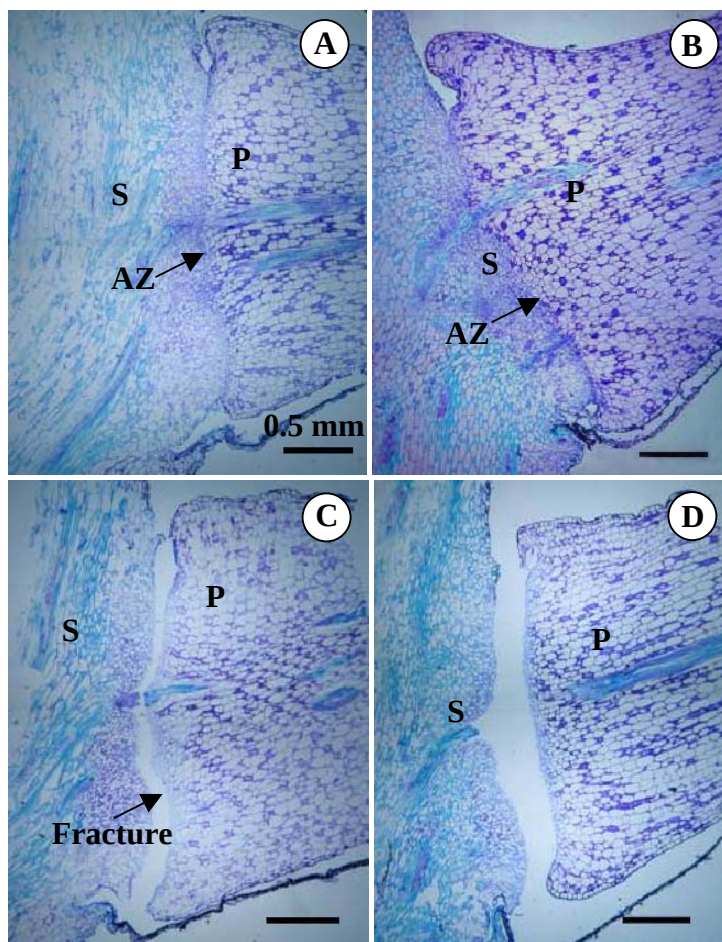


ภาพที่ 16 ภาพตัดตามยาว abscission zone บริเวณก้านดอกตูม (A) และก้านดอกบาน (B) กล้วยไม้
 สกลหาวยพันธุ์สีหิน C : ภาพขยายบริเวณ abscission zone ของก้านดอกบาน
 AZ = Abscission zone S = ก้านช่อดอก P = ก้านดอก

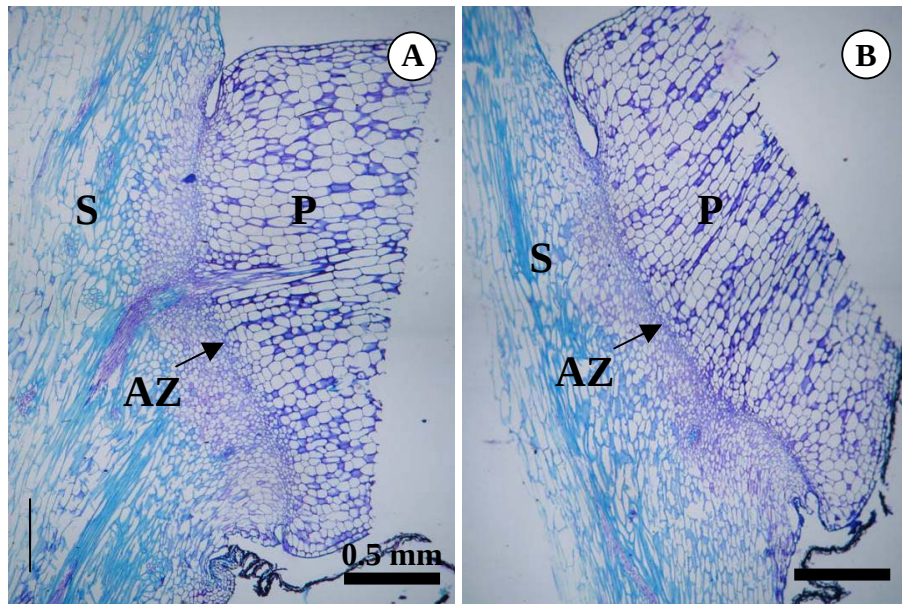


ภาพที่ 17 การแยกตัวของ abscission zone ก่อนการร่วง เซลล์ขนาดเล็ก 1-2 ชั้นเริ่มแยกจากกัน

บริเวณขอบของ abscission zone AZ = Abscission zone S = ก้านช่อดอก P = ก้านดอก



ภาพที่ 18 การแยกตัวของ abscission zone บริเวณก้านดอกบานของกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสติน 7 วัน หลังจากให้สาร ดอกที่ไม่ได้รับสาร (A) ดอกที่ไม่ได้รับสารแต่ได้รับเอทิลีน (B) ดอกที่ได้รับ CMPPA (C) และดอกที่ได้รับ TIBA (D)



ภาพที่ 19 Abscission zone ของก้านดอกบานกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีน ดอกบานที่ไม่ได้รับสาร
 เก็บเนื้อเยื่อหลังจากเก็บเกี่ยว (A) และก้านดอกบานที่ตัดดอกออกและให้ IAA เป็นเวลา
 17 วัน (B)

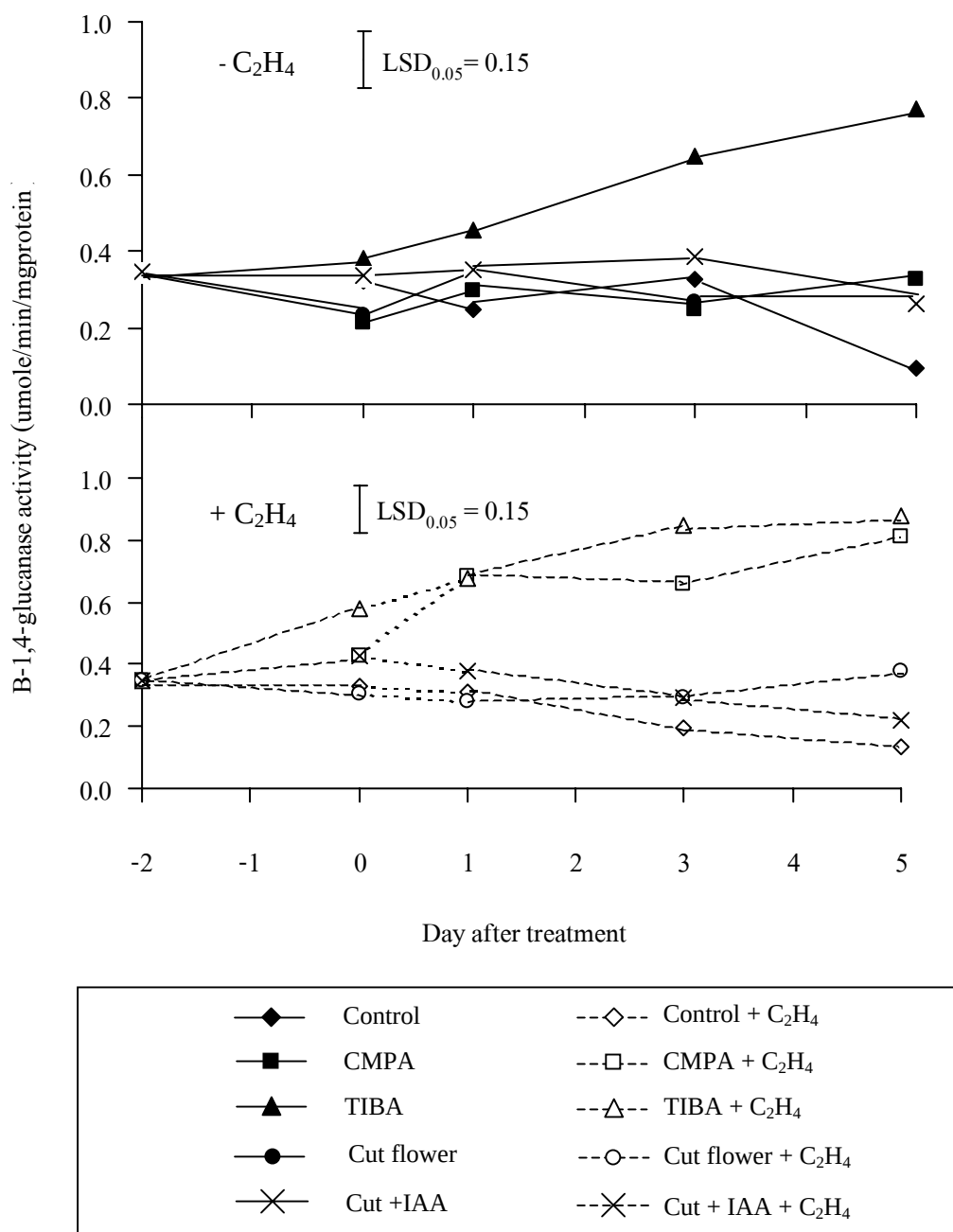
4. ศึกษา cell wall hydrolyse activity ที่มีผลต่อการร่วง

การทดลองที่ 4.1 ศึกษากิจกรรมของ β -1,4-glucanase ในตำแหน่ง AZ ของโคนก้านดอกบานในทริทเมนต์ต่าง ๆ

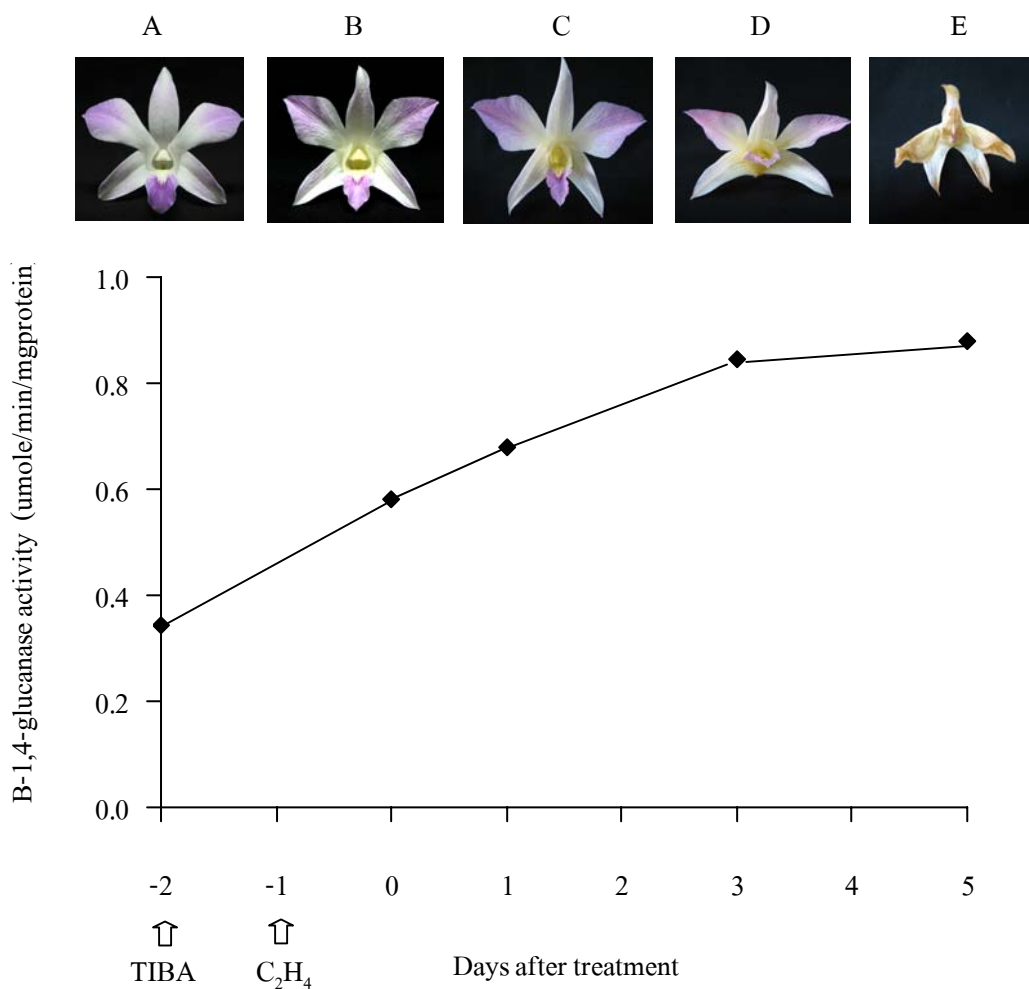
กิจกรรมของ β -1,4-glucanase ในตำแหน่งโคนก้านดอกของดอกกล้วยไม้มีแนวโน้มคงที่หรือลดลงเล็กน้อย (ภาพที่ 20) ในทุกทริทเมนต์ที่ไม่มีการร่วงของดอกในช่วง 5 วันหลังจากได้รับสาร (ภาพที่ 6 และ ภาพที่ 10 A) โดยทริทเมนต์ที่ไม่ได้รับสาร ทริทเมนต์ที่ไม่ได้รับสาร + เอทิลีน และทริทเมนต์ที่ตัดกลีบดอก เส้เกสรและรังไข่ + IAA + เอทิลีน กิจกรรมของ β -1,4-glucanase มีค่า 0.10 0.13 และ 0.22 ไมโครโมล/นาทีก/มก.โปรตีน ตามลำดับ ซึ่งมีการลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของ β -1,4-glucanase ก่อนทำการให้สาร (0.35 ไมโครโมล/นาทีก/มก.โปรตีน) ส่วนในทริทเมนต์ที่ได้รับ TIBA ทริทเมนต์ที่ได้รับ TIBA + เอทิลีน และทริทเมนต์ที่ได้รับ CMPA + เอทิลีน มีกิจกรรมของ β -1,4-glucanase เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆจนสูงสุดในวันที่ 5 หลังจากได้รับสาร (ภาพที่ 20) และมีค่า 0.77 0.88 และ 0.81 ไมโครโมล/นาทีก/มก.โปรตีน ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการร่วงของดอกดังในภาพที่ 6 กิจกรรมของ β -1,4-glucanase ใน AZ ของดอกบานที่ได้รับ TIBA + เอทิลีนเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับอาการเสื่อมสภาพของดอกดังในรูปที่ 21

การทดลองที่ 4.2 ศึกษากิจกรรมของ polygalacturonase (PG) ในตำแหน่ง AZ ของโคนก้านดอกบานในทริทเมนต์ต่าง ๆ

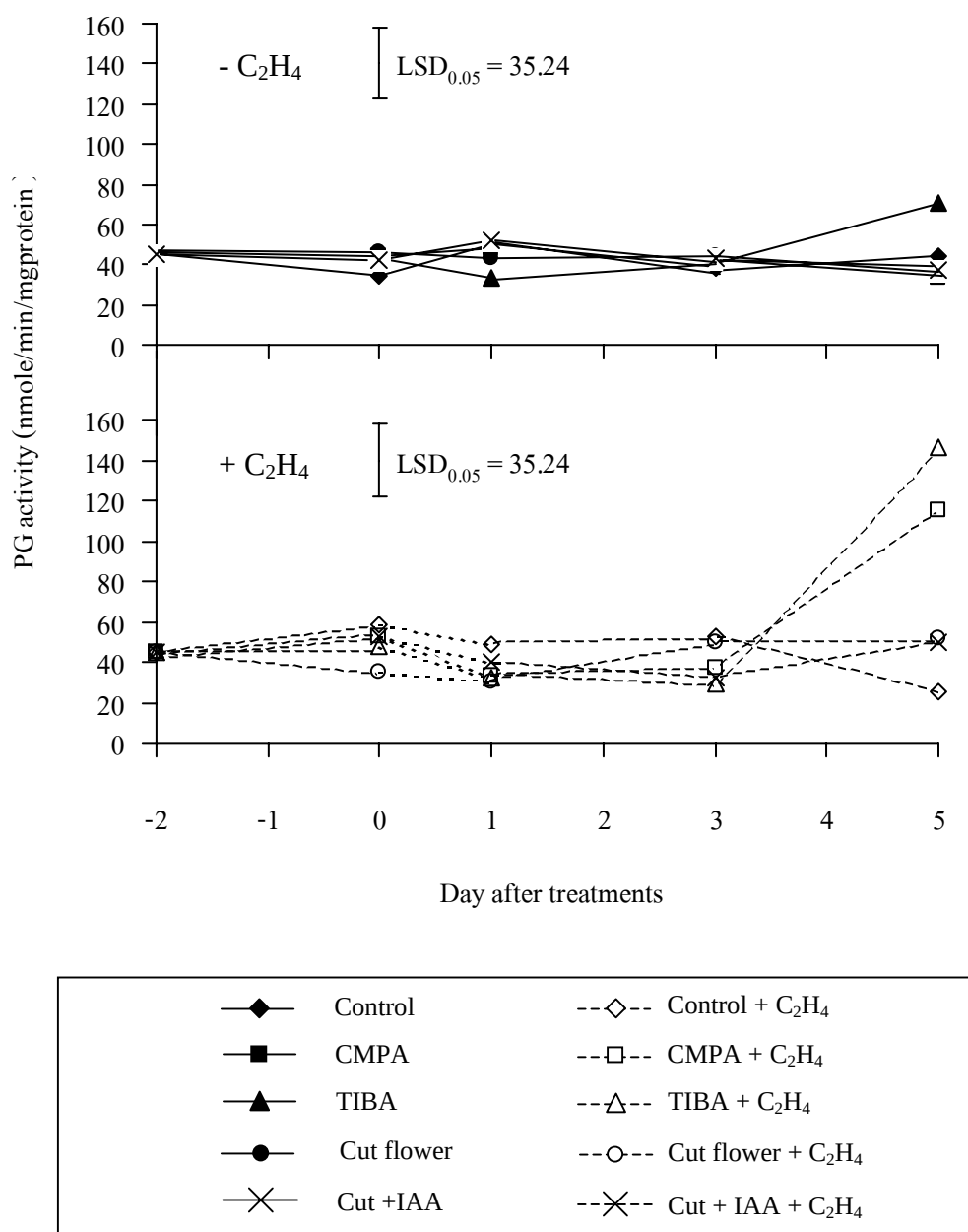
กิจกรรมของ PG ในตำแหน่ง AZ ของโคนก้านดอกกล้วยไม้มีแนวโน้มคงที่และไม่แตกต่างกันในทุกทริทเมนต์ในช่วง 3 วันหลังจากได้รับสาร (ภาพที่ 22) ในวันที่ 5 หลังจากได้รับสาร พบว่ากิจกรรมของ PG มีค่าสูงขึ้นในทริทเมนต์ที่ได้รับ TIBA ทริทเมนต์ที่ได้รับ CMPA + เอทิลีน และทริทเมนต์ที่ได้รับ TIBA + เอทิลีน ซึ่งกิจกรรมของ PG ในสามทริทเมนต์นี้มีค่าสอดคล้องกับการร่วงของดอกในวันที่ 5 หลังจากได้รับสาร ทริทเมนต์ที่ได้รับ TIBA มีค่ากิจกรรม PG 71 นาโนโมล/นาทีก/มก.โปรตีน มีดอกร่วง 8 % (ภาพที่ 6) ทริทเมนต์ที่ได้รับ CMPA + เอทิลีนมีค่ากิจกรรม PG 115 นาโนโมล/นาทีก/มก.โปรตีน มีดอกร่วง 26 % ทริทเมนต์ที่ได้รับ TIBA + เอทิลีนมีค่ากิจกรรม PG 146 นาโนโมล/นาทีก/มก.โปรตีน มีดอกร่วง 45 % จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ PG เกิดขึ้นขณะที่ดอกกำลังหลุดร่วงจึงไม่มีบทบาทสำคัญที่เป็นสาเหตุของการร่วงของดอกบานในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสติน



ภาพที่ 20 กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase ในบริเวณ abscission zone ของดอกบานกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสติน หลังจากได้รับสารต่าง ๆ เป็นเวลา 5 วัน



ภาพที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase ในบริเวณ abscission zone ของดอกบานกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสติน และอาการเสื่อมสภาพของดอกบาน หลังจากดอกบานได้รับ TIBA ร่วมกับเอทิลีนเป็นเวลา 5 วัน A: ดอกปกติ (day -2) B: กลีบดอกเกิดเส้นแวนและปากเริ่มมีสีเหลือง (day 0) C: กลีบดอกสีจางลงและปากมีสีเหลืองเข้ม (day 1) D: ดอกคุดและกลีบดอกฉ่ำน้ำ (day 3) E: กลีบดอกม้วนเข้าหากันและมีสีน้ำตาล (day 5)



ภาพที่ 22 กิจกรรมของเอนไซม์ polygalacturonase ในบริเวณ abscission zone ของดอกบานกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสติน หลังจากได้รับสารต่าง ๆ เป็นเวลา 5 วัน

5. ศึกษาการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ β -1,4-glucanase ในขบวนการ หลุดร่วงของดอกกล้วยไม้

การสกัด total RNA จาก AZ บริเวณก้านดอกและก้านช่อดอกของดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสตินโดยใช้สารละลาย Pine Tree พบว่า มีปริมาณ polysaccharide น้อย ปริมาณกรดนิวคลีอิกอยู่ในช่วง 70-150 ไมโครกรัมโดยใช้เนื้อเยื่อพืช 1 กรัม คุณภาพของกรดนิวคลีอิก (RNA) จากการคำนวณด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260} / A_{280} มีค่า 1.9-2.2 แสดงว่า RNA ที่สกัดได้เป็น RNA ที่มีคุณภาพดี สามารถนำไปใช้ในการทำ RT-PCR ได้

ทำการออกแบบ degenerate primer โดยใช้ฐานข้อมูล amino acid ของยีน β -1,4-glucanase จาก GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ดังนี้คือ *Lycopersicon* (AAC62241), *Citrus* (AAB65155, AAB65156), *Oryza* (XP_479767), *Phaseolus* (P22503, T11783) และ *Capsicum* (CAA65826) นำข้อมูลมา alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL-W เพื่อหาบริเวณส่วน highly conserved ของยีน β -1,4-glucanase จากการวิเคราะห์ได้ทำการออกแบบ degenerated primer ได้แก่ไพรเมอร์ Cel-Ok-F และ Cel-Ok-R (ตารางที่ 1) จากบริเวณส่วน highly conserved ของลำดับกรดอะมิโน YYDAGDN และ MSYMGVF ในส่วนของยีน β -1,4-glucanase ไพรเมอร์ Cel-Ok-F มีค่า $T_m = 52^\circ\text{C}$ และไพรเมอร์ Cel-Ok-R มีค่า $T_m = 52^\circ\text{C}$ เมื่อทำการทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับสาย DNA (annealing) ที่ 52°C พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณชิ้น DNA จาก cDNA ในตัวอย่างพืชได้ชิ้น DNA (DNA fragment) หลายขนาด โดยมีขนาดที่สนใจอยู่บริเวณ 1,028 bp ซึ่งเป็นขนาดของความยาวเบสระหว่างบริเวณส่วน highly conserved ของลำดับกรดอะมิโน YYDAGDN และ MSYMGVF (ภาพที่ 23)

เมื่อนำ DNA ของ β -1,4-glucanase ขนาด 1,028 bp ที่อยู่ในเซลล์แบคทีเรียและเรียกชื่อพลาสมิดว่า CELL MISS NO.2 มาหาลำดับเบส มีลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนดังในภาพที่ 24 และ 25 นำลำดับเบสของ CELL MISS NO.2 540 เบสแรกไปเทียบกับฐานข้อมูลทั้งหมดที่มีอยู่ใน GenBank โดยโปรแกรม BLASTN พบว่า มีความเหมือนกับ ยีน endo-glucanase 2 ของ *Ficus carica* (AY487307) 40 % นำลำดับกรดอะมิโนไปเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน β -1,4-glucanase ในพืชอื่น ๆ คือ *Capsicum* (X83711, X97188, X97189), *Citrus* (AF000135, AF000136), *Glycine* (U00730), *Oryza* (XM_479767), *Phaseolus* (M57400), *Sambucus* (X74290) และ tomato (U13054, U78526, AF077339, AAB46829) โดยโปรแกรม MegAlign (Lasergene; DNASTar, USA) พบว่ากรดอะมิโนมีส่วนที่เป็น highly conserved ของยีน β -1,4-glucanase เหมือน

กับในพืชอื่น ๆ ดังภาพที่ 26 จึงเป็นการยืนยันว่า ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ที่เกิดขึ้นขนาด 1028 bp เป็นยีน β -1,4-glucanase และเรียกชื่อยีน *Den-Cel* เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน β -1,4-glucanase ของกล้วยไม้พันธุ์มัสติน (342 เรสิดิวส์) กับพืชอื่นในช่วงเดียวกัน พบว่า ลำดับกรดอะมิโน β -1,4-glucanase ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสตินแตกต่างจากพืชอื่น ๆ มาก โดยมีความเหมือนกับยีน Cel 3 จากมะเขือเทศมากที่สุดคือ 58 %

การออกแบบ specific primer สำหรับยีน β -1,4-glucanase ในดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสตินเพื่อใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase ด้วยวิธี RT-PCR โดยออกแบบจากลำดับเบส CELL MISS NO.2 ในตำแหน่งลำดับเบส 31-51 และ 886-905 โดยโปรแกรม primer 3 ได้ไพรเมอร์ CEL-MISS-F และไพรเมอร์ CEL-MISS-R (ตารางที่ 1) ไพรเมอร์ CEL-MISS-F มีค่า $T_m = 60^{\circ}\text{C}$ และไพรเมอร์ CEL-MISS-R มีค่า $T_m = 62^{\circ}\text{C}$ ผลผลิต DNA จากปฏิกิริยา PCR ที่คาดว่าจะได้มีขนาด 875 bp เมื่อทำการทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับสาย DNA (annealing) ที่ 55°C พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณชิ้น DNA จาก cDNA ของตัวอย่างพืชได้ชิ้น DNA (DNA fragment) หลายขนาด แต่มีขนาดที่สนใจและ DNA ปรากฏเด่นชัดอยู่บริเวณ 875 bp (ภาพที่ 27) นำ DNA ขนาด 875 bp ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ไปหาลำดับเบสพบว่า มีลำดับเบสเหมือนกับ CELL MISS NO.2 จึงเป็นการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงขนาด 875 bp เป็นส่วนของยีน β -1,4-glucanase และไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase ในดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสติน

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase (*Den-Cel*) ระหว่างขบวนการร่วงของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ด้วยวิธี northern blot analysis โดยใช้ DNA probe ยีน *Den-Cel* และวิธี Ribonuclease Protection Assay (RPA) โดยใช้ RNA probe ยีน *Den-Cel* พบว่า ทั้งสองวิธีไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกยีน β -1,4-glucanase (*Den-Cel*) ระหว่างขบวนการร่วงของดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสติน

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase (*Den-Cel*) ระหว่างขบวนการร่วงของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจง CEL-MISS-F และ CEL-MISS-R และตรวจสอบผล RT-PCR ด้วยเทคนิค southern blot hybridization พบว่า สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิเคราะห์จากการสะสม mRNA ของยีน *Den-Cel* ใน AZ ดอกกล้วยไม้ที่ได้รับสารยับยั้งการทำงานและการเคลื่อนที่ของออกซินหรือก้านดอกที่ได้รับสารออกซินร่วมกับการได้รับและไม่ได้รับเอทิลีนมีความสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase

(ภาพที่ 28) โดยเนื้อเยื่อ AZ ของดอกกล้วยไม้ไม่มีการสะสมของ mRNA ในระยะเริ่มต้นก่อนการให้
 ทริทเมนต์ต่างๆ (H) และมีแนวโน้มลดลงในช่วง 5 วันหลังจากทำการทดลอง โดยเปรียบเทียบกับ
 ทริทเมนต์ที่ไม่หยดสาร (control, air) ส่วนการสะสมของ mRNA หลังจากได้รับทริทเมนต์อื่น ๆ
 พบว่า ทริทเมนต์ที่ไม่มีการการร่วงของดอก คือ ทริทเมนต์ที่ไม่หยดสาร (control, air) ทริทเมนต์ที่
 ตัดกลีบดอก เส้าเกสรและรังไข่ (cut, air) ทริทเมนต์ที่ตัดกลีบดอก เส้าเกสรและรังไข่ + IAA
 (cut+IAA, air) ทริทเมนต์ที่ไม่หยดสาร + เอทิลีน (control, C₂H₄) ทริทเมนต์ที่ตัดกลีบดอก เส้า
 เกสรและรังไข่ + เอทิลีน (cut, C₂H₄) และทริทเมนต์ที่ตัดกลีบดอก เส้าเกสรและรังไข่ + IAA + เอทิลีน
 (cut+IAA, C₂H₄) มีการแสดงออกของยีน *Den-Cel* ในระดับต่ำ ในทริทเมนต์ที่มีอาการร่วง
 และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase สูง คือ ทริทเมนต์ที่ได้รับสาร TIBA (TIBA, air)
 ทริทเมนต์ที่ได้รับสาร CMPA + เอทิลีน (CMPA, C₂H₄) และทริทเมนต์ที่ได้รับสาร TIBA + เอทิลีน
 (TIBA, C₂H₄) มีการแสดงออกของยีน *Den-Cel* อยู่ในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบกับทริทเมนต์ที่ไม่ม
 การร่วงและมีกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase ต่ำ ส่วนของทริทเมนต์ที่ได้รับสาร CMPA
 (CMPA, air) มีการแสดงออกของยีน *Den-Cel* ใกล้เคียงกับระยะเริ่มต้นก่อนให้ทริทเมนต์ต่างๆ (H)
 ที่เป็นเช่นนี้เพราะดอกเพียงบางส่วน (5-10 %) เริ่มมีอาการเสื่อมสภาพ จึงเกิดการกระตุ้นการแสดง
 ออกของยีน *Den-Cel* ขึ้น เมื่อพิจารณาเฉพาะในส่วนทริทเมนต์ที่ตัดกลีบดอก เส้าเกสรและรังไข่
 (cut, air) ทริทเมนต์ที่ตัดกลีบดอก เส้าเกสรและรังไข่ + IAA (cut+IAA, air) ทริทเมนต์ที่ตัดกลีบ
 ดอก เส้าเกสรและรังไข่ + เอทิลีน (cut, C₂H₄) และ ทริทเมนต์ที่ตัดกลีบดอก เส้าเกสรและรังไข่ +
 IAA + เอทิลีน (cut+IAA, C₂H₄) พบว่า ทริทเมนต์ที่ตัดกลีบดอก เส้าเกสรและรังไข่ + IAA + เอทิลีน
 (cut+IAA, C₂H₄) ไม่พบการแสดงออกของยีน *Den-Cel* ซึ่งสอดคล้องกับอาการร่วงของทริท
 เมนต์นี้ในภาพที่ 10 A มีการร่วงของดอกเพียง 5% เมื่อเวลาผ่านไป 20 วันหลังจากการให้ทริท
 เมนต์

ใน AZ ของดอกที่มีการร่วงโดยดอกได้รับสาร TIBA + เอทิลีน พบว่าการสะสม mRNA
 ของยีน *Den-Cel* มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันแรกหลังการได้รับทริทเมนต์ จนถึงวันที่ 5
 เมื่อมีการร่วง (ภาพที่ 29) และยังพบการสะสม mRNA ของยีน *Den-Cel* ในเนื้อเยื่อที่ไม่มีส่วนของ
 AZ คือส่วนของก้านดอก ซึ่งแสดงว่ายีน *Den-Cel* มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆของดอกที่
 เป็น non-abscission zone

ตารางที่ 1 ไพรมเมอร์ที่ได้รับการออกแบบและใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase และยีน Actin

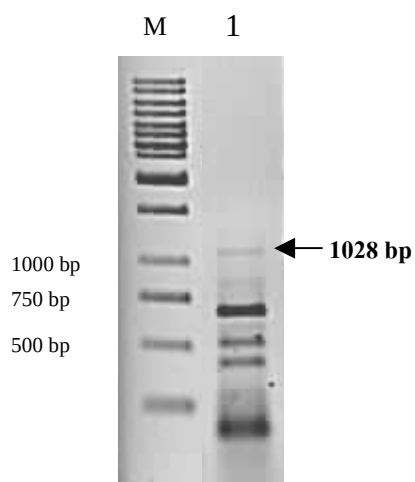
ไพรเมอร์ สำหรับยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	ขนาดของ PCR product
<u>ยีน β-1,4-glucanase</u>		
Cel-Ok-F	5'-TAY TAY GAY GCN GGN GAY AA-3'	1028 bp
Cel-Ok-R	5'-AAN CCN ACC ATR TAN CWC AT-3'	
CEL-MISS-F	5'-CAT TTT CCA TTG GCT TTC TCC-3'	875 bp
CEL-MISS-R	5'-GTG GCC TCC ATG TAA TCA GC-3'	
<u>ยีน Actin</u>		
Actin-O-F	5'AAGCTGTTCTTTCCCTATATGCTAGTGG 3'	250 bp
Actin-O-R	5'CTTCTCCTTGATGTCCCTGACAATTT 3'	

Y = C/T

R = A/G

W = A/T

N = A/C/G/T



ภาพที่ 23 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ของยีน β -1,4-glucanase ขนาด 1028 bp โดยใช้ไพรเมอร์ Cel-Ok-F และไพรเมอร์ Cel-Ok-R; M, 1kb DNA marker (Fermantas, USA); 1, ตัวอย่างจาก abscission zone ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทิน

1 TATTACGATGCGGGAGACAAATATCAAGTTTCATTTTCCATTGGCTTTCTCCACGTCTCTG
 61 TTGAGCTGGTCTGTAGTGGAGTACAGCAGCAAATACAAAGCTCTGGGCGAATATGATCAT
 121 ATCAGAGATATCATCAAATGGGGAACAGATTATCTGCTCCTCACCTTCAATTCTTCTGCC
 181 ACCAAGATTGATAAGATTTATGCACAGGTGGGCGTTGCGAAGAACGGATCCACCACCCCC
 241 GACGACCACTTCTGCTGGCAACGGCCCCGAAGACATGTCCTACCCCCGCCGATCATCTCC
 301 GTCACCTCCGCCCCGGACCTCGCCGGCGAAATCTCCGCGGCCCTCGCCTCCGCCTCCATC
 361 GTCTTCCGCGACAACCCCTTCTACTCTTCCCGCCTCCTCCGCGCCGCCGCCACCGCCTAC
 421 AACTTCGCACGCAGCAACTCCCGCCGCATCCCTTACTCGCGCTCTAACCCCGATATCGCC
 481 AACTTCTACAACCTCCACCGGTTACTGGGACGAGTACATGTGGAGCGCCGCCTGGATGTAC
 541 TACGCCACCGGGAATTCCAGCTTCGCGAACTTCGCCACGGATCCCCGGCTGCCGAAGAAC
 601 GCGAATGCGTTTTCGAGCGTGGCGGATCTCGGCGTGTGAGTTGGGATAATAAGCTGCCG
 661 GCGGCGATGCTGCTCTGGACGAGGCTGAGGGTGTCTTCTGAATCCGGGGTATCCGTACGAG
 721 GAGTCGCTGAGGGGATACTTTAACGCCACGGGGCTTACTATGTGCGCTAATCTTAGAAGG
 781 TTCAATGTCTTCAATTGGACAAAAGGTGGGATGTCTGAGCTGAATCACGGCCGTCCACAG
 841 CCGTTGCAGTACATAGTGAACGCGGCTTTTCTGGCTAATTTATACGCTGATTACATGGAG
 901 GCCACGAAGGTTCCGGGCTGGTACTGTGGCCCCCTTCTACTTTTCGATGGACGTTCTTCGA
 961 TCTTTCGCCACGTCGCAGATCAACTATGTCCTCGGCGATAATCCGCGGAAGATGAGCTAC
 1021 ATGGTCGG

ภาพที่ 24 ลำดับเบสของยีน β -1,4-glucanase ในกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีนขนาด 1028 bp (CELL MISS NO.2), อักษรในกรอบสี่เหลี่ยมเป็นส่วนของไพรเมอร์

YYDAGDN IKFHFPLAFSTSLLSWSVVEYSSKYKALGEYDHIRDI IKWGTDYLLLT FN
 SSATKIDKIYAQVGVAKNGSTTPDDHFCWQRPEDMSYPRPIISVTSAPDLAGEISAA
 LASASIVFRDNPSYSSRL LRAAATAYNFARSNSRRIPYSRSPNDIANFYNSTGYWDE
 YMWSAAWMYATGNSSFANFATDPRLPKNANAFASVADLGVLSDNKLPAAMLLWTR
 LRVFLNPGYPYEE SLRGYFNATGLTMCANLRRFNVFNWTKGGMSELNHGRPQPLQYI
 VNAAFLANLYADYMEATKVPGWYCGPFYFSMDVLRSFATSQIN YVLGDNPRKMSYMV

ภาพที่ 25 ลำดับกรดอะมิโนของยีน β -1,4 glucanase ในกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีน (CELL MISS NO.2) จำนวน 342 เรสิดิวส์, อักษรในกรอบสี่เหลี่ยมเป็นส่วนของไพรเมอร์

Y Y D A G D N V K F G F P M A F T L T L L S W S V I E Y K S K M G S - - E L G N Majority									
10		20		30		40			
1	Y Y D A G D N V K F G F P M A F T L T L L S W S V I E Y K S K M G S - - E L G N	Orchid-Missteen.pro							
1	Y Y D A G D N V K F G F P M A F T L T L L S W S V I E Y K S K M G S - - E L G N	Capsicum-CAA565826 .PRO							
1	Y Y D A G D N V K F G F P M A F T L T L L S W S V I E Y K S K M G S - - E L G N	Capsicum-CAA56866.pro							
1	Y Y D A G D N V K F G F P M A F T L T L L S W S V I E Y K S K M G S - - E L G N	Capsicum-CAA65827 .PRO							
1	Y Y D A G D N V K F G F P M A F T L T L L S W S V I E Y K S K M G S - - E L G N	Citrus AAB65155 .PRO							
1	Y Y D A G D N V K F G F P M A F T L T L L S W S V I E Y K S K M G S - - E L G N	Citrus AAB65156 .PRO							
1	Y Y D A G D N V K F G F P M A F T L T L L S W S V I E Y K S K M G S - - E L G N	Oryza-XP_479767 .PRO							
1	Y Y D A G D N V K F G F P M A F T L T L L S W S V I E Y K S K M G S - - E L G N	Phaseolus-AAA02563 .PRO							
1	Y Y D A G D N V K F G F P M A F T L T L L S W S V I E Y K S K M G S - - E L G N	Sambucus-CAA52343 .PRO							
1	Y Y D A G D N V K F G F P M A F T L T L L S W S V I E Y K S K M G S - - E L G N	Tomato Cell-AAA69908 .PRO							
1	Y Y D A G D A I K F N F P Q S F A L T M L S W S V I E Y K S K M G S - - E L G N	Tomato Cel13-AAC49704 .PRO							
1	Y Y D A G D N V K F G F P M A F T L T L L S W S V I E Y K S K M G S - - E L G N	Tomato Cel15-AAC62241 .PRO							
1	Y Y D A G D A I K F N F P Q S F A L T M L S W S V I E Y K S K M G S - - E L G N	Tomato Cel16-AAB46829 .PRO							
A Q A A I R W G T D Y L L K A - - - A T A T P G T L Y V Q V G D G N A - - - - Majority									
50		60		70		80			
41	I R D I I K W G T D Y L L K A - - - A T A T P G T L Y V Q V G D G N A - - - -	Orchid-Missteen.pro							
41	L Q R A I R W G T D Y L L K A - - - A T A T P G T L Y V Q V G D G N A - - - -	Capsicum-CAA565826 .PRO							
39	A V K A V K W A T D F L L K - - - A T A K E G V V Y V Q V G D P F S - - - -	Capsicum-CAA56866.pro							
39	A V K A V K W A T D F L L K - - - A T A K E G V V Y V Q V G D P F S - - - -	Capsicum-CAA65827 .PRO							
39	A V K A V K W A T D F L L K - - - A T A K E G V V Y V Q V G D P F S - - - -	Citrus AAB65155 .PRO							
39	A R A A I R W A T D Y L L K C - - - A T A T P G K L Y V G V G D P M A - - - -	Citrus AAB65156 .PRO							
39	A R A A V R W G A D Y L L K A - - - A T A T P G A L Y V Q V A D P M Q - - - -	Oryza-XP_479767 .PRO							
41	L Q S A I R W G A D F M L R A - - - H T S - T T T L Y T Q V G D G N A - - - -	Phaseolus-AAA02563 .PRO							
41	L Q T A I R W G T N Y I L R A - - - H T S - S T T L Y T Q V G D G N S - - - -	Sambucus-CAA52343 .PRO							
41	L Q N A I R W G T N F I R A - - - H T S - S T T L Y T Q V G D G N A - - - -	Tomato Cell-AAA69908 .PRO							
41	V K D T I K W G T D Y L L K T F N S S A D T I D R I A A Q V G K G D T T G G A T	Tomato Cel13-AAC49704 .PRO							
39	A K A A I R W S S D Y L L K A - - - A T A S E D T L Y V Q V G D P M Q - - - -	Tomato Cel15-AAC62241 .PRO							
41	I K D V I K W G T D Y L L K T F N S S A D T I D R L V S Q V G I G D T S G G P -	Tomato Cel16-AAB46829 .PRO							
- - - D H S C W E R P E D M D T P R T V Y K I T S N H P G S D V A A E I A A A L Majority									
90		100		110		120			
79	T P D D H F C W Q R P E D M S Y P P P - - - I I S V T S A P D L A G E I S A A L	Orchid-Missteen.pro							
72	- - - D H Q C W E R P E D M D T P R T L Y K I T S N S P G S E V A A E V A A A F	Capsicum-CAA565826 .PRO							
70	- - - D H S C W E R P E D M D T L R T V Y K I D Q N H P G S D V A G E I A A A L	Capsicum-CAA56866.pro							
70	- - - D H S C W E R P E D M D T L R T V Y K I D Q N H P G S D V A G E I A A A L	Capsicum-CAA65827 .PRO							
70	- - - D H S C W E R P E D M D T L R T V Y K I D Q N H P G S D V A G E I A A A L	Citrus AAB65155 .PRO							
71	- - - D H K C W E R P E D M D T V R S V Y S V S A S N P G S D V A G E T A A A L	Citrus AAB65156 .PRO							
71	- - - D H R C W E R P E D M D T P R S V Y R V T A D K P G S D V A G E T A A A L	Oryza-XP_479767 .PRO							
72	- - - D H N C W E R P E D M D T P R T V Y K I D A N S P G T E V A A E Y A A A L	Phaseolus-AAA02563 .PRO							
72	- - - D H Q C W E R P E D M D T P R T L Y K I T S T S P G T E V A A D N A A A L	Sambucus-CAA52343 .PRO							
72	- - - D H Q C W E R P E D M D T P R T L Y K I T S N S P G S E V A A D V A A A F	Tomato Cell-AAA69908 .PRO							
81	D P N D H Y C W V R P E D I D Y A R P - - - V T E C H G C S D L A A E M A A A L	Tomato Cel13-AAC49704 .PRO							
71	- - - D H R C W E R P E D M D T P R N Y Y K V S P Q N P G S D V A A E T A A A L	Tomato Cel15-AAC62241 .PRO							
80	D P N D H Y C W V R P E D I D Y R P - - - V T E C H S C S D L A A E M A A A L	Tomato Cel16-AAB46829 .PRO							
A A A S I V F K D L D A S Y S S K L L R R A V K V F A F A D K Y R G S Y S A S L Majority									
130		140		150		160			
116	A S A S I V F R D - N P S Y S S R L L R A A A T A Y N F A R S N S R R I P Y S R	Orchid-Missteen.pro							
109	A A A S I V F K N I D S N Y S A K L L R F S Q S L F A F A D K Y R G S Y Q A S -	Capsicum-CAA565826 .PRO							
107	A A A S I V F R S L D A S Y S N L L L D F A V K V F E F A N R H R G A Y S S S L	Capsicum-CAA56866.pro							
107	A A A S I V F R S L D A S Y S N L L L D F A V K V F E F A N R H R G A Y S S S L	Capsicum-CAA65827 .PRO							
107	A A A S I V F R S L D A S Y S N L L L D F A V K V F E F A N R H R G A Y S S S L	Citrus AAB65155 .PRO							
108	A A A S L V F R K G D P R Y A S L L L R T A K N V L Q F A M Q Y P G A Y S D S L	Citrus AAB65156 .PRO							
108	A A S S M V F R R A D P A Y S A R L L H A A T Q V F D F A D R H R G S Y S D S L	Oryza-XP_479767 .PRO							
109	S A A S I V F K I D A K Y S S T L L S H S K S L F D F A D K N R G S Y S G S -	Phaseolus-AAA02563 .PRO							
109	A A A S I V F Q E V D S N Y S A K L L R H S K L L F Q F A D Q Y P G S Y Q A S -	Sambucus-CAA52343 .PRO							
109	A A A S I V F K N I D S N Y S T K L L K F S R S L F A F A D K Y R G S Y Q A S -	Tomato Cell-AAA69908 .PRO							
118	A S A S I V F K D - N K A Y S Q K L V H G A R T L F K F S R D Q R G R - - Y S V	Tomato Cel13-AAC49704 .PRO							
108	A A A S I V F K D S D P S Y S S S L L R T A Q E V F A F A D K Y R G S Y S D S L	Tomato Cel15-AAC62241 .PRO							
117	A S A S I V F K D - N K V Y S Q K L V H G A R T L F K F A R E Q A G R - - Y S R	Tomato Cel16-AAB46829 .PRO							

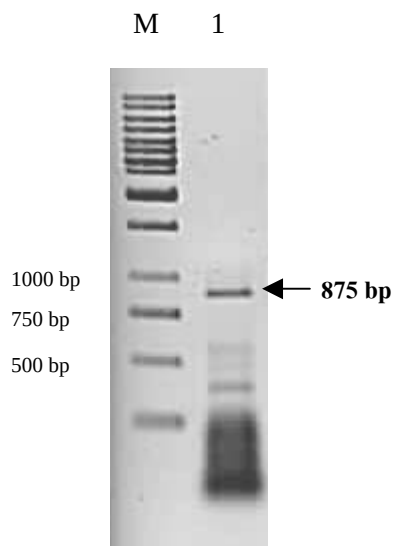
ภาพที่ 26 การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของยีน β -1,4-glucanase ในกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีนกับ β -1,4-glucanase หรือ cellulase ในพืชอื่น ๆ

	- S - V C P F Y C S Y S G Y Q D E L L W G A A M L Y K A T G D S S Y L N Y - - -	Majority
	170 180 190 200	
155	S N P D I A N F Y N S T G Y W D E Y M S A A M L Y Y A T G N S S F A N F A T D	Orchid-Missteen.pro
148	- - - C P F Y C S Y S G Y Q D E L L W G A A A M L Y K A C G N N Y L N Y - - -	Capsicum-CAA565826 .PRO
147	H S A V C P F Y C D F N G Y Q D E L L W G A A M L H K A T R R R Q Y R E Y - - -	Capsicum-CAA58686.pro
147	H S A V C P F Y C D F N G Y Q D E L L W G A A M L H K A T R R R Q Y R E Y - - -	Capsicum-CAA565827 .PRO
147	H S A V C P F Y C D F N G Y Q D E L L W G A A M L H K A T R R R Q Y R E Y - - -	Citrus AAB65155 .PRO
148	G S A V C P F Y C S Y S G Y K D E L L W G A A M L F R A T N D V T Y Y N F - - -	Citrus AAB65156 .PRO
148	A S S V C P F Y C S Y S G Y H D E L L W G A S M L H R A S R N A S F M S Y - - -	Oryza-XP_479767 .PRO
148	- - - C P F Y C S Y S G Y Q D E L L W G A A A M L Y K A S G E S K Y L S Y - - -	Phaseolus-AAA02563 .PRO
148	- - - C P F Y C S Y S G Y Q D E L L W G A A A M L Y K A S G D A T Y L N Y - - -	Sambucus-CAA52343 .PRO
148	- - - C P F Y C S Y S G Y K D E L L W G A A A M L Y K A C G G N N Y L N Y - - -	Tomato Cell-AAA69908 .PRO
155	G N - E A E T F Y N S T G Y W D E F I N G A A M L Y Y A T G N S S Y L Q L A T T	Tomato Cel3-AAC49704 .PRO
148	S S V Y C P F S C S Y S G Y N D E L L W G A S M L H R A S Q D S S Y L A Y - - -	Tomato Cel5-AAC62241 .PRO
154	R N - E A S I F Y N	Tomato Cel6-AAB46829 .PRO
	- - I V K N Q - - L G A G D T I S E F S W D N K F A G A Q V L L A K - E F L L G	Majority
	210 220 230 240	
195	P R L P K M A N A F A S V A D L G V L S W D N K L P A A M L L W T R L R V F L N	Orchid-Missteen.pro
181	- - A L N M Q - - - G U S Q C P S E F S W D N K F A G A Q V L L A K - E F L N G	Capsicum-CAA565826 .PRO
184	- - I V K M E V I L R A G D T I N E F G W D N K H A G I N V L I S K - E V L M G	Capsicum-CAA58686.pro
184	- - I V K M E V I L R A G D T I N E F G W D N K H A G I N V L I S K - E V L M G	Capsicum-CAA565827 .PRO
184	- - I V K M E V I L R A G D T I N E F G W D N K H A G I N V L I S K - E V L M G	Citrus AAB65155 .PRO
185	- - I K S V G D D G G T D - - - V F S W D N K F A G A H V L L A R - G A L L N	Citrus AAB65156 .PRO
185	- - V E A M G M Q L G A G D D Y S F S W D N D E R V G T K V L L A K - G T F L R N	Oryza-XP_479767 .PRO
181	- - I S M Q - - - G U S Q T V S E F S W D N K F V G A Q T L L T E - E F Y G G	Phaseolus-AAA02563 .PRO
181	- - V L G N Q - - - G U S H A V S E F S W D N K F A G A Q T L L A K - E F F G G	Sambucus-CAA52343 .PRO
181	- - A S I M Q - - - G U S Q V A S E F S W D D K F A G A Q T L L A K - E Y L N G	Tomato Cell-AAA69908 .PRO
194	P G I A K H A G A F W G G P D Y G V L S W D N K E L T G A Q V L L S R M R L F L S	Tomato Cel3-AAC49704 .PRO
185	- - I Q S M G Q T M G A N D D Y S F S W D D K R P G T K I I L S K - D T F L E K	Tomato Cel5-AAC62241 .PRO
162		Tomato Cel6-AAB46829 .PRO
	R A - - - - D L E K F K V D A D S F I C S L L P G S A S P Q I Q Y T P G G L -	Majority
	250 260 270 280	
235	P G Y P Y E E S I L R G Y F N A T G L T M E A N L R - - R F N V F N U T K G G M S	Orchid-Missteen.pro
215	K S - - - - N L E K F K K D A D S F I C L M P E S S I Q I K T T E G G L -	Capsicum-CAA565826 .PRO
221	R A - - - - P D L K S F Q V N A D A F I C S I L P G I A H P Q V Q Y S P G G L -	Capsicum-CAA58686.pro
221	R A - - - - P D L K S F Q V N A D A F I C S I L P G I A H P Q V Q Y S P G G L -	Capsicum-CAA565827 .PRO
221	R A - - - - P D L K S F Q V N A D A F I C S I L P G I A H P Q V Q Y S P G G L -	Citrus AAB65155 .PRO
218	R D - - - - K N F E P Y R Q E A E D F I C R I L F N S P F T T T Q Y T Q G G L -	Citrus AAB65156 .PRO
222	R L - - - - H G L E L Y K A H S D S Y I C S L V P G T A S F Q S R Y T P G G L -	Oryza-XP_479767 .PRO
215	K K - - - - D L A K I K T D A E S F I C A V M P G S N S R Q I K T T P G G L -	Phaseolus-AAA02563 .PRO
215	K T - - - - N L G K F K S D S E S F I C A L M P G S S V Q I Q T T P G G L -	Sambucus-CAA52343 .PRO
215	K S - - - - N L E K F K K D A D S F I C L M P E S S I Q I K T T E G G L -	Tomato Cell-AAA69908 .PRO
234	P G Y P Y E E I E R T F H N Q T S I I M C S Y L P - - I F T S F N R T K G G L I	Tomato Cel3-AAC49704 .PRO
222	S S - - - - Q E F Q A Y K Y H S D N Y I C S L I P G S P S F Q A Q Y T P G G L -	Tomato Cel5-AAC62241 .PRO
162		Tomato Cel6-AAB46829 .PRO
	- L Y K R G S S N L Q Y V T S A S F L L L A Y S K Y L S A A G - H G V T C G S M	Majority
	290 300 310 320	
273	E L N H G R P Q P L Q Y I V N A A F L A N L Y A D Y M E A T K V P G W Y C G P F	Orchid-Missteen.pro
249	- L F F D S S N L Q Y Y S G A T M V L F M Y S K V L D A A K E G I T C G S V	Capsicum-CAA565826 .PRO
256	- I V K P G V C N M Q H Y T S L S F L F L A Y S N Y L S H A N - H V Y P C G S M	Capsicum-CAA58686.pro
256	- I V K P G V C N M Q H Y T S L S F L F L A Y S N Y L S H A N - H V Y P C G S M	Capsicum-CAA565827 .PRO
256	- I V K P G V C N M Q H Y T S L S F L F L A Y S N Y L S H A N - H V Y P C G S M	Citrus AAB65155 .PRO
253	- M Y K M P E S N L Q Y Y T S I S F L L T T Y A K Y M R A T K - H Y F T C G N M	Citrus AAB65156 .PRO
257	- I T R E G S S N M Q Y T T A T E L M L A Y A K Y L R S S G - A T A S C G D G	Oryza-XP_479767 .PRO
249	- L Y T R D S S N L Q Y T T S T M V L F I F S R I L N R H I N I N C G S S	Phaseolus-AAA02563 .PRO
249	- L Y T R D S S N L Q Y Y T S A S M V F L I Y S K I L N A A N I K G V Q C G S V	Sambucus-CAA52343 .PRO
249	- L Y Y R D S S N L Q Y Y N G A T M V L F M H T T K V L E A A G I G V Y C G S V	Tomato Cell-AAA69908 .PRO
272	Q L N H G R P Q P L Q Y V N A A F A L T L F S D Y L A A A D T P G W Y C G P N	Tomato Cel3-AAC49704 .PRO
257	- L Y K G S G S N L Q Y Y T S S F L L L T Y A K Y L R S N G - G D Y S C G - -	Tomato Cel5-AAC62241 .PRO
162		Tomato Cel6-AAB46829

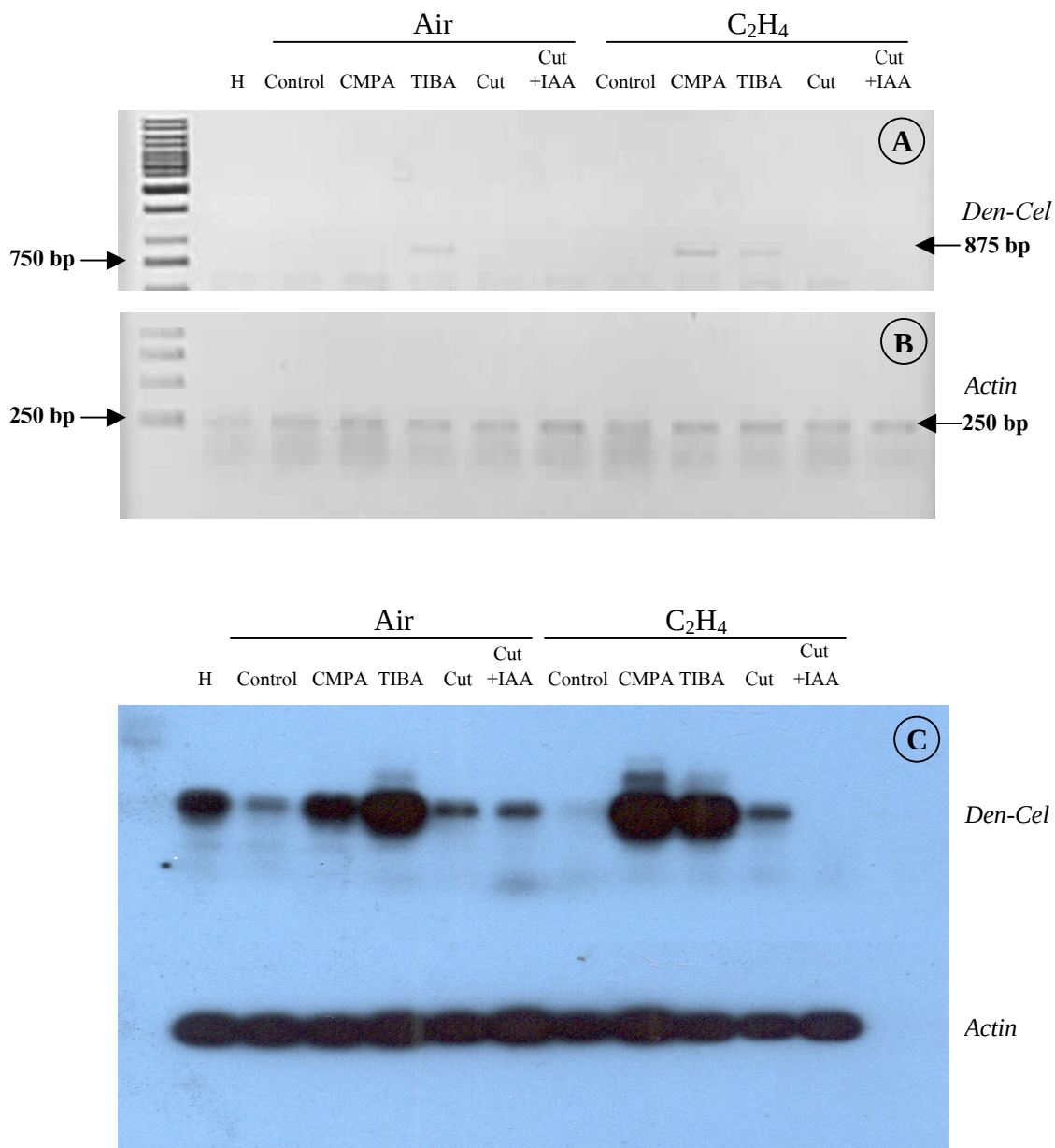
ภาพที่ 26 การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของยีน β -1,4-glucanase ในกล้วยไม้หวายพันธุ์
มัสทีนกับ β -1,4-glucanase หรือ cellulase ในพืชอื่น ๆ (ต่อ)

	- - - - - F S T A L L K A F A K R Q V D Y I L G D N P Q K M S Y M V	Majority
	330 340 350	
313	- - - - - Y F S M D V L R S F A T S Q I N Y V L G D N P R K M S Y M V	Orchid-Missteen.pro
288	- - - - - N F S T S K I K A F A K S Q V D Y I L G N N P L Q M S Y M V	Capsicum-CAA565826 .PRO
294	S A - - - - - T P A L L K H I A K R Q V D Y I L G D N P Q K M S Y M V	Capsicum-CAA58686.pro
294	S A - - - - - T P A L L K H I A K R Q V D Y I L G D N P Q R M S Y M V	Capsicum-CAA65827 .PRO
294	S A - - - - - T P A L L K H I A K R Q V D Y I L G D N P Q K M S Y M V	Citrus AAB65155 .PRO
291	V - - - - - V N P G L L T N L A K R Q V D Y I L G V N P I K M S Y M V	Citrus AAB65156 .PRO
295	G G G A R G E V S A A E L V A V A K R Q V D Y I L G K N P A G H S Y M V	Oryza-XP_479767 .PRO
288	- - - - - H E T A S Q I R G F A K T Q V E Y I L G K N P M K M S Y M V	Phaseolus-AAA02563 .PRO
288	- - - - - N F P T S Q I K A F A K S Q V D Y I L G N N P M K M S Y M V	Sambucus-CAA52343 .PRO
288	- - - - - N F S T S K I K A F A K L Q V D Y I L G N N P L K M S Y M V	Tomato Cell-AAA69908 .PRO
312	- - - - - F Y S T D V L R K F A E T Q I D Y I L G K N P R K M S Y V V	Tomato Cel3-AAC49704 .PRO
293	- - - - S S R F P A E R L V E L A K K Q V D Y I L G D N P A K I S Y M V	Tomato Cel5-AAC62241 .PRO
162		Tomato Cel6-AAB46829 .PRO

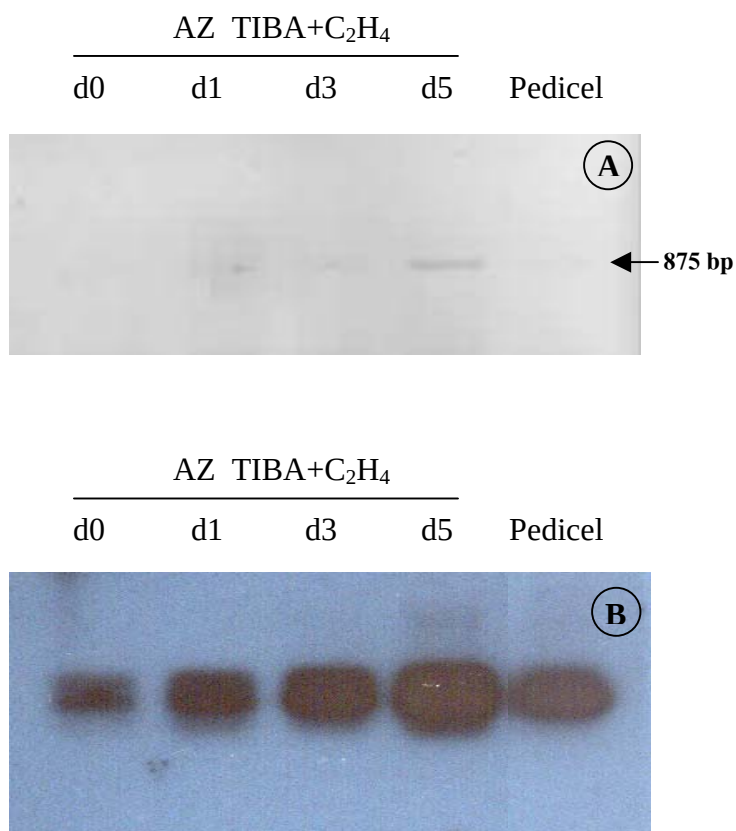
ภาพที่ 26 การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของยีน β -1,4-glucanase ในกล้วยไม้หวายพันธุ์มิตินกับ β -1,4-glucanase หรือ cellulase ในพืชอื่น ๆ (ต่อ)



ภาพที่ 27 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ของยีน β -1,4-glucanase ขนาด 875 bp โดยใช้ specific primer: ไพรเมอร์ CELL-MISS-F และไพรเมอร์ CELL-MISS-R; M, 1kb DNA marker (Fermantas, USA); 1, ตัวอย่างจาก abscission zone ของดอกกล้วยไม้พันธุ์มัสติน



ภาพที่ 28 การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase (*Den-Cel*) ด้วยวิธี RT-PCR (A) ใช้ไพรเมอร์เฉพาะเจาะจง CEL-MISS-F และ CEL-MISS-R ผลผลิตขนาด 875 bp และ southern blot hybridization (C) ใน AZ ของดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์สีทึบหลังจากรับทริทเมนต์ 5 วัน; H, ดอกก่อนการให้ทริทเมนต์ต่างๆ; Control, ดอกที่ไม่ได้รับสาร; CMPA, ดอกที่ได้รับสาร CMPA; TIBA, ดอกที่ได้รับสาร TIBA; Cut, การตัดดอก; Cut + IAA, การตัดดอกและให้ IAA; ในสภาพได้รับเอทิลีน และไม่ได้รับเอทิลีน ใช้ยีน *Actin* เป็น internal control (B, C)



ภาพที่ 29 การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase (*Den-Cel*) ด้วยวิธี RT-PCR (A) ใช้ไพรเมอร์เฉพาะเจาะจง CEL-MISS-F และ CEL-MISS-R ผลผลิตขนาด 875 bp และ southern blot hybridization (B) ใน AZ ของดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสทินที่ได้ รับสาร TIBA + เอทิลีน ในช่วงวันหลังจากได้รับทริทเมนต์ (d0) ถึงวันที่ 5 หลังจากได้ รับทริทเมนต์ (d5) และ ก้านดอกกล้วยไม้หลังจากเก็บเกี่ยว (pedicle)

วิจารณ์

ออกซินมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการร่วงส่วนต่าง ๆ ของพืช (Carns, 1966; Sexton, 1982; Roberts *et al.*, 1984; Sexton, 2002) จากข้อเท็จจริงนี้นำไปสู่การทดลองเพื่อทดสอบบทบาทของออกซินต่อการควบคุมการร่วงของดอกบานกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีน ซึ่งดอกบานไม่ตอบสนองต่อเอทิลีน โดยการใช้สารยับยั้งการทำงานและสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซินเพื่อลดปริมาณออกซินใน AZ การตัดดอกออกเพื่อกำจัดแหล่งของออกซิน การให้ออกซิน จากภายนอกทดแทนหลังจากตัดดอกออก การทดลองนี้ยังศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของเซลล์บริเวณ AZ ขณะหลุดร่วง บทบาทของเอนไซม์ β -1,4-glucanase และ PG ที่เกี่ยวข้องกับการร่วงและการแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase ในกระบวนการร่วงของดอกกล้วยไม้อีกด้วย

การให้สารยับยั้งการทำงานและสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซิน (CMPA และ TIBA) แก่ดอกบานบริเวณแองเกสตรัเมียในสภาพไม่ได้รับเอทิลีน ทำให้ดอกบานมีการร่วงมากเมื่อเปรียบเทียบกับดอกที่ไม่ได้รับสารยับยั้งออกซิน ดอกบานไม่มีการร่วง (ภาพที่ 5A) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าออกซินควบคุมการร่วงและระดับความเข้มข้นของออกซินที่ต่ำลงสามารถที่จะทำให้ก้านดอกหลุดร่วงได้ จากการทดลองยังพบว่า การให้สาร TIBA สามารถชักนำการร่วงของดอกบานได้มากกว่าและมีประสิทธิภาพในการทำงานคงที่มากกว่าการให้สาร CMPA (รูปที่ 5A และ รูปที่ 6) ความแตกต่างของสารทั้งสองชนิดน่าจะมีสาเหตุจากความสามารถในการเคลื่อนย้ายและการทำงานของสาร TIBA ทำงานโดยจับกับออกซินและยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซินทำให้ระดับของออกซินในเนื้อเยื่อลดลง (Sussman and Goldsmith, 1981; McKay *et al.*, 1994) ส่วน CMPA ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของออกซินจะเคลื่อนที่เหมือนออกซินและทำงานโดยการทำลายออกซินด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นสาเหตุให้ระดับของออกซินในเนื้อเยื่อลดน้อยลง (Frenkel and Haard, 1973; Oono *et al.*, 2003) จากรายงานการวิจัยพบว่า TIBA เป็นสารที่ใช้ในการกระตุ้นการร่วงได้ดีที่สุดในจำนวนสาร 600 ชนิดที่ทดสอบ (Jacobs, 1962)

การให้ TIBA หรือ CMPA ร่วมกับการให้เอทิลีนกับดอกบานทำให้ดอกบานร่วงเร็วขึ้นและมีการร่วงมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับดอกบานที่ได้รับ TIBA หรือ CMPA เพียงอย่างเดียว เอทิลีนส่งเสริมผลของสารยับยั้งออกซิน แต่การให้เอทิลีนเพียงอย่างเดียวไม่สามารถแสดงผลของเอทิลีนได้ (รูปที่ 5A) แสดงว่าระดับของออกซินที่ต่ำลงใน AZ อาจไปเพิ่มความไวของ AZ ในการตอบสนองต่อเอทิลีน มีการใช้สารยับยั้งออกซินเพื่อวิจัยหาผลของออกซินในการควบคุมการเปลี่ยนแปลง

ทางสรีรวิทยาและการพัฒนาของพืช เช่น การควบคุมความยาวปล้องใน *Pisum sativum* (McKay *et al.*, 1994) การเกิดแขนงของรากแขนงในสน (Kaska *et al.*, 1999) การพัฒนาของกัณหาใน *Brassica juncea* (Hadfi *et al.*, 1998) นอกจากนี้มีการใช้สารยับยั้งออกซินในการชักนำการร่วงของดอกและใบ เช่น การร่วงของก้านดอกพริก (Wien *et al.*, 1992) การร่วงของก้านใบ *Mirabilis jalapa* (Meir *et al.*, 2006) การร่วงของใบฝ้าย (Morgan and Durham, 1972)

เอทิลีนมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการร่วง (Lashbrook and Klee, 1999; Sexton, 2002) ดอกกล้วยไม้โดยทั่วไปจะตอบสนองต่อเอทิลีนทำให้เกิดการร่วง แต่ดอกบานของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสทีนไม่ตอบสนองต่อเอทิลีน (รูปที่ 5 A) ในขณะที่ดอกตูมตอบสนองต่อเอทิลีน (รูปที่ 5 B) มีรายงานเกี่ยวกับการร่วงของดอกไม่ตอบสนองต่อเอทิลีนในบางพืชเท่านั้น เช่น ดอกทิวลิป (Sexton *et al.*, 2000) ดอกโกโก้ (Aneja *et al.*, 1999) ดอกพริก (Wein, 1990) และดอกกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* 2 พันธุ์ (van Doorn, 2002) กรณีที่ดอกตูมมีการร่วงเมื่อได้รับเอทิลีน อาจเป็นเพราะดอกตูมมีอัตราการผลิตเอทิลีนสูง (Ketsa and Thampitakorn, 1995) เอทิลีนที่สร้างขึ้นทำให้ยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซิน (Suttle, 1988) ระดับ IAA ใน AZ ของดอกตูมจึงลดลงทำให้เนื้อเยื่อ AZ ของดอกตูมมีความไวในการตอบสนองต่อเอทิลีน (Michaeli *et al.*, 1999) การร่วงของดอกตูมที่ลดลงเมื่อดอกบานได้รับ TIBA ความเข้มข้นสูง (รูปที่ 4 B) อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากดอกบานที่ได้รับ TIBA ความเข้มข้นสูงจะทำให้ดอกบานเกิดการเสื่อมสภาพเร็วขึ้น ทำให้เกิดการส่งอาหารและน้ำไปยังดอกตูมมากขึ้น ดอกตูมในตำแหน่งใกล้ดอกบานจึงพัฒนาพร้อมที่จะบานซึ่งเป็นระยะที่ดอกกล้วยไม้พันธุ์มัสทีนไม่ตอบสนองต่อเอทิลีน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Bunya-Atichart *et al.* (2006) พบว่า ดอกตูมที่ตอบสนองต่อเอทิลีนมีการเปลี่ยนแปลงโดยไม่ตอบสนองต่อเอทิลีนอย่างรวดเร็วเมื่อดอกพร้อมบาน

การให้สาร 1-MCP ก่อนการให้สารยับยั้งออกซินสามารถชะลอการร่วงของดอกบานได้ (ภาพที่ 7) 1-MCP เป็นสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอทิลีนใน ผลไม้และดอกไม้ (Blankenship and Dole, 2003) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า มีการผลิตเอทิลีนและเอทิลีนมีความสัมพันธ์กับระดับออกซินที่ควบคุมการร่วงของดอกบานกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสทีน ความไวของเอทิลีนในการชักนำการร่วงของดอกบานมี 2 ประการคือ ประการแรกสารยับยั้งออกซินที่ให้แก่ดอกบานทำให้ออกซินไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยัง AZ เนื้อเยื่อ AZ จึงมีความไวต่อการตอบสนองต่อเอทิลีน เอทิลีนที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อ AZ จึงสามารถกระตุ้นการร่วง ประการที่สองสารยับยั้งออกซินที่ให้กับดอกบานชักนำให้เกิดเอทิลีนในปริมาณที่มากพอที่จะกระตุ้นการร่วง แต่จาก

การวัดการสร้างเอทิลีนในดอกบานที่ได้รับสารยับยั้งออกซินร่วมกับการให้ 1-MCP (ภาพที่ 8) พบว่า อัตราการสร้างเอทิลีนสูงสุดมีค่า 6.5 นาโนลิตรต่อกรัมต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นอัตราการสร้างเอทิลีนที่ต่ำเมื่อเทียบกับเอทิลีนจากภายนอก (0.4 ไมโครลิตรต่อลิตร) ที่ให้แก่ดอกบานและเอทิลีนนี้ไม่สามารถชักนำการร่วง ดังนั้นเอทิลีนที่เกิดขึ้นจากการให้สารยับยั้งออกซินไม่น่าจะเป็นสาเหตุหลักทำให้เกิดการร่วงของดอกบาน สาเหตุหลักที่สำคัญน่าจะเป็นระดับของออกซินที่ลดลงในเนื้อเยื่อ AZ เนื่องจากการให้สารยับยั้งออกซินทำให้เนื้อเยื่อ AZ มีความไวในการตอบสนองต่อเอทิลีน และเอทิลีนที่เกิดขึ้นจากการให้สารยับยั้งออกซินจึงมีผลทำให้ดอกหลุดร่วง

ดอกตูมและดอกบานเป็นแหล่งของออกซินที่ควบคุมสมดุลของฮอร์โมนบริเวณ AZ และทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งการร่วง (van Meeteren and van Gelder, 1995) ในดอกบานซึ่งตั้งสมมติฐานว่า ออกซินจากดอกบานทำให้เนื้อเยื่อ AZ ไม่ตอบสนองต่อเอทิลีน ดังนั้นการตัดดอกบานออกเหลือเพียงก้านดอกจึงเป็นการส่งเสริมการร่วงของก้านดอก (ภาพที่ 10 A) และการให้ 1-MCP สามารถยับยั้งการร่วงได้ (ภาพที่ 11) แสดงให้เห็นว่าการร่วงเป็นผลเนื่องจากเอทิลีน การร่วงของก้านดอกมีผลเหมือนการร่วงของก้านใบเมื่อตัดใบออก (Roberts *et al.*, 2002) เมื่อมีใบอยู่รอบๆ ออกซินจากใบเคลื่อนที่มายับยั้งผลของเอทิลีนบริเวณ AZ โดยทำให้เนื้อเยื่อ AZ ไม่ตอบสนองต่อเอทิลีน แต่เมื่อตัดใบออกการเคลื่อนที่ของออกซินลดลงทำให้เนื้อเยื่อ AZ มีความไวในการตอบสนองต่อเอทิลีน (Brown, 1997) การให้ออกซินจากภายนอกสามารถชดเชยออกซินจากดอกได้ โดยก้านดอกที่ได้รับออกซินบริเวณรอยตัดมีการร่วงของก้านดอกไม่แตกต่างจากก้านดอกที่มีดอกติดอยู่ (ภาพที่ 10 A) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองให้ออกซินกับก้านใบที่ตัดแผ่นใบออก พบว่าสามารถชะลอการร่วงของก้านใบได้ (Roberts *et al.*, 2002) การให้ออกซินจากภายนอกสามารถชะลอการร่วงของก้านดอกชั่วคราว (Oberholdstar *et al.*, 1991) และดอกมะเขือเทศ (del Campilo and Bennett, 1996) การตัดดอกบานออกทำให้เอทิลีนไปกระตุ้นการหลุดร่วงของก้านดอกขณะที่ดอกบานในสภาพปกติหรือดอกบานที่ได้รับเอทิลีนไม่มีการร่วง การทดลองนี้จึงสนับสนุนสมมติฐานที่ว่า การลดลงของระดับออกซินใน AZ ทำให้เนื้อเยื่อ AZ มีความไวในการตอบสนองต่อเอทิลีนเป็นสาเหตุให้ดอกหลุดร่วง ส่วนการให้ออกซินแก่ก้านดอกบริเวณรอยตัดสามารถชดเชยออกซินที่สูญเสียไปจากการตัดดอกได้ ทำให้ก้านดอกไม่ตอบสนองต่อเอทิลีนที่ได้รับจากภายนอก จึงเป็นการยืนยันว่าดอกบานสามารถผลิตออกซินปริมาณหนึ่งที่เพียงพอต่อการยับยั้งการตอบสนองต่อเอทิลีนจากภายนอกจึงยับยั้งการร่วงของดอกเมื่อดอกบานได้รับเอทิลีน

การตัดดอกตูมเหลือเพียงก้านดอกมีผลทำให้ก้านดอกตูมร่วงเร็วกว่าก้านดอกบาน การให้ออกซินกับก้านดอกตูมแสดงผลอย่างชัดเจนแม้ในสภาพที่ดอกตูมได้รับเอทิลีน (ภาพที่ 10 B) ดอกตูมของดอกกล้วยไม้พันธุ์มัสทีนมีความไวต่อเอทิลีนและแสดงอาการร่วงเมื่อได้รับเอทิลีน การให้ออกซินกับก้านดอกตูมร่วมกับการให้เอทิลีนสามารถยับยั้งการร่วงของก้านดอกอย่างเห็นได้ชัด ความแตกต่างของการร่วงในก้านดอกหลังจากตัดดอกบานและดอกตูมเกิดขึ้นอย่างชัดเจน (ภาพที่ 10 A และ 10 B) ความแตกต่างนี้ไม่ได้เกิดเพราะปริมาณออกซินในดอกบานมากกว่าในดอกตูม เพราะถ้าออกซินในดอกบานมากกว่าในดอกตูม การตัดดอกบานออกควรจะทำให้ก้านดอกบานหลุดร่วงได้คล้ายกับการร่วงของก้านดอกตูม ซึ่งสอดคล้องการทดลองหาปริมาณ IAA ในส่วนเส้าเกสร + รังไข่ของดอกบาน พบว่าแนวโน้มของปริมาณ IAA ในดอกบานมีค่าน้อยกว่าอวัยวะเดียวกันในดอกตูม (รูปที่ 15) จึงน่าจะมีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องด้วยนอกจากออกซินในส่วนของดอกที่ทำให้ก้านดอกบานหลุดร่วงได้ช้ากว่าก้านดอกตูม

การศึกษาว่าส่วนใดของดอกบานกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีนเป็นแหล่งของออกซินที่สำคัญ โดยทำการตัดส่วนต่างๆของดอกบานและศึกษาผลการร่วง ผลการทดลอง (ภาพที่ 12) ไม่สามารถสรุปได้ว่าออกซินจากส่วนใดของดอกเป็นแหล่งออกซินที่สำคัญเนื่องจากการเกิดบาดแผลบริเวณส่วนต่างๆมีผลต่อการเกิดเอทิลีนที่แตกต่างกัน โดยการเกิดบาดแผลบริเวณรังไข่ (ตัดส่วนกลีบดอกและเส้าเกสรออก) ทำให้เกิดการร่วงมากที่สุด เมื่อทำการทดลองตัดส่วนต่างๆของดอกบานกล้วยไม้พันธุ์ขาวสนาน (ดอกบานตอบสนองต่อเอทิลีน) ให้ผลการร่วงมีแนวโน้มเหมือนกับดอกบานกล้วยไม้พันธุ์มัสทีน (ภาพที่ 13 และ 12) เมื่อพิจารณาดอกบานกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีนเปรียบเทียบกับทริทเมนต์ตัดทั้งดอกรวมก้านดอกเหลือก้านดอกยาว 0.5 ซม. และการตัดทั้งดอกได้รังไข่เหลือก้านดอกยาว 2 ซม. พบว่าการที่มีก้านดอกขนาดสั้นลง กระตุ้นให้เกิดการร่วงของก้านดอกบานมากกว่าทั้งในสภาพที่ได้รับเอทิลีนและไม่ได้รับเอทิลีน (ภาพที่ 12) แสดงว่ามีปัจจัยบางอย่างในก้านดอกที่สามารถยับยั้งการร่วง การทดลองลักษณะเดียวกันได้ทดสอบกับดอกตูมซึ่งให้ผลการทดลองสอดคล้องกับดอกบาน (ภาพที่ 14) แต่การตัดก้านดอกตูมออก 2/3 ของก้านดอกทำให้ก้านดอกตูมร่วงเร็วกว่าก้านดอกบานที่มีความยาว 0.5 ซม. แสดงให้เห็นว่าน่าจะมีออกซินอยู่ในก้านดอกตูมมากกว่าก้านดอกบาน เมื่อออกซินในก้านดอกตูมถูกกำจัดออกจึงทำให้ปริมาณ IAA ใน AZ ของก้านดอกตูมลดลงและเนื้อเยื่อ AZ มีความไวในการตอบสนองต่อเอทิลีนที่ผลิตมากในส่วนต่างๆของดอกตูม ทำให้ก้านดอกตูมที่เหลืออยู่หลุดร่วงมากกว่าก้านดอกบาน จากการทดลองหาปริมาณ IAA ในก้านดอกตูมและก้านดอกบานสามารถยืนยันได้ว่าออกซินในก้านดอกตูมมีแนวโน้มของปริมาณ IAA มากกว่าในก้านดอกบาน (ภาพที่ 15) ดังนั้นปัจจัยที่ทำให้ก้านดอกบานมีการ

ร่วงได้น้อยกว่าก้านดอกตูมน่าจะมีปัจจัยอื่นๆเข้ามามีส่วนร่วมด้วย เช่น ยีนที่ตอบสนองต่อออกซิน ยีนตัวรับเอทิลีน

การศึกษาในยีนที่ตอบสนองต่อออกซิน เช่น ยีน auxin resistance (*AXR1*) ใน *Arabidopsis* มีความสำคัญในการส่งสัญญาณของออกซิน ถ้ายีนไม่ทำงานจะทำให้ความไวต่อออกซินลดลง (Lincoln *et al.*, 1990) ยีน *Aux/IAA* ทำหน้าที่สร้างโปรตีน Aux/IAA ซึ่งมีความสำคัญในการตอบสนองต่อออกซิน ในช่วงการตอบสนองต่อออกซินจะมีการสร้าง mRNA ของยีนในกลุ่ม Aux/IAA อย่างรวดเร็ว (Abel and Theologis, 1996) การสลายตัวของโปรตีน Aux/IAA มีผลต่อการส่งสัญญาณของออกซิน (Worley *et al.*, 2000) Meir *et al.* (2006) รายงานว่าการตัดใบและลำต้นเหนือบริเวณข้อ หรือการให้สารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซิน 1-naphthylphthalamic acid (NPA) แก่ใบหรือลำต้นของ *Mirabilis jalapa* หลังจากต้นพืชได้รับเอทิลีน ทำให้ก้านใบหรือลำต้นที่เหลืออยู่หลังจากการถูกตัด และก้านใบหรือลำต้นที่ได้รับสาร NPA เกิดการร่วง ในขณะที่ต้นพืชที่ได้รับเอทิลีนแต่ไม่มีการตัดใบและลำต้น หรือไม่มีการให้สารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซินไม่มีการร่วง เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อส่วน AZ พบว่า ยีน *Mj-Aux/IAA1* และ *Mj-Aux/IAA2* ซึ่งสร้างโปรตีน Aux/IAA มีการแสดงออกลดลงใน AZ ของก้านใบหรือลำต้นที่ถูกตัด แต่มีการแสดงออกของยีน *Mj-Aux/IAA1* และ *Mj-Aux/IAA2* เพิ่มขึ้นเมื่อก้านใบหรือลำต้นที่ถูกตัดได้รับสาร NAA บริเวณรอยตัด ส่วนการให้สาร IAA บริเวณรอยตัดของก้านใบและลำต้นมีผลทำให้ป้องกันการลดลงของระดับ mRNA ของยีนทั้งสองใน AZ ดังนั้นยีนที่ตอบสนองต่อออกซินจึงมีความเกี่ยวข้องกับการร่วงและมีส่วนในการควบคุมความไวของเนื้อเยื่อ AZ ในการตอบสนองต่อเอทิลีน

ตัวรับเอทิลีนควบคุม AZ ในการตอบสนองต่อเอทิลีนโดยการเพิ่มขึ้นของตัวรับเอทิลีนหรือองค์ประกอบอื่นๆที่ตอบสนองต่อเอทิลีน (Trewavas, 1991) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ AZ ให้มีความไวต่อเอทิลีน จากการศึกษากระบวนการร่วงของดอก *Delphinium* พบว่า มีการสะสม mRNA ของยีน *ERS1* เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าหลังจากการเก็บเกี่ยว และสะสม mRNA สูงสุดเมื่อดอกร่วง 50 % (Kuroda *et al.*, 2003) ยีน *ETR1* homolog (*tETR*) ในมะเขือเทศมีการแสดงออกมากขึ้นใน AZ ของดอกและอวัยวะอื่นๆที่ได้รับเอทิลีน (Payton *et al.*, 1996) การยับยั้งการแสดงออกของยีน *Le ETR1* ในมะเขือเทศทำให้ชะลอการร่วงของดอก (Barry *et al.*, 2005) ในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมลดการแสดงออกของยีน *LeETR1* พบว่า การลดลงของระดับ mRNA *LeETR1* ทำให้ชะลอการร่วงของก้านใบ (Whitelaw *et al.*, 2002) และใน *Arabidopsis* กลายพันธุ์ยีน *eter1-1* พบว่าสามารถลดการร่วงของกลีบดอก (Bleecker and Patterson, 1997; Patterson and Bleecker, 2004)

การแสดงออกของยีนในกลุ่ม ETR (*RhETR1-4*) ของกุหลาบหนูเพิ่มมากขึ้นเมื่อดอกเริ่มบาน (Müller *et al.*, 2000a, 2000b) สารออกซินอาจจะควบคุมเนื้อเยื่อ AZ ไม่ให้ตอบสนองต่อเอทิลีนโดยการลดลงของระดับตัวรับเอทิลีน (Sexton, 1997) จากรายงานการวิจัยเกี่ยวกับตัวรับเอทิลีน (ethylene receptor) พบว่า ตัวรับเอทิลีนมีความเกี่ยวข้องกับการร่วงของพืชและเป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมความสามารถของ AZ ในการตอบสนองต่อเอทิลีน

ผลจากการวิจัยนี้แสดงให้เห็นบทบาทของออกซินในการควบคุมการร่วงของดอกบานและดอกตูมโดยข้อพิสูจน์ 2 ประการคือ ประการแรกการให้สารยับยั้งออกซินกับดอกบานสามารถชักนำการร่วง ประการที่สอง การตัดส่วนดอกบานหรือดอกตูมส่งเสริมการร่วงและเมื่อให้สารออกซินบริเวณรอยตัดหลังจากตัดดอกออก สามารถทดแทนออกซินจากส่วนดอกที่ถูกตัดออกไปได้ และจากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า ออกซินในส่วนของดอกบานและดอกตูมมีความเกี่ยวข้องกับเอทิลีนเหมือนในส่วนใบ โดยการให้สารยับยั้งออกซินกับดอกบานทำให้เอทิลีนมีบทบาทมากขึ้น ขณะที่การให้สารออกซินที่รอยตัดหลังจากตัดดอกออก ทำให้ลดความไวต่อการตอบสนองเอทิลีน

ผลจากการทดลองครั้งนี้จึงสามารถเสนอแบบจำลองการไม่ร่วงของดอกบานในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสทีนที่ได้รับเอทิลีนดังนี้ คือ ดอกบานปกติมีออกซินเคลื่อนที่มายัง AZ ออกซินที่เคลื่อนที่มานี้ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณ AZ ลดความไวในการตอบสนองต่อเอทิลีน การที่ดอกบานได้รับเอทิลีนจากภายนอกจึงไม่มีผลทำให้ดอกบานร่วง (ภาพผนวกที่ 3 A) เมื่อมีการให้สารยับยั้งการทำงานหรือสารยับยั้งการเคลื่อนที่ออกซินบนแอ่งเกสรตัวเมียของดอกบาน ทำให้ออกซินไม่สามารถเคลื่อนที่มายัง AZ หรือทำให้ออกซินไม่สามารถทำงานได้ ดอกบานจึงร่วงเมื่อได้รับเอทิลีน (ภาพผนวกที่ 3 B) เมื่อมีการตัดดอกบานออกเป็นการกำจัดแหล่งของออกซิน การให้เอทิลีนจึงทำให้ก้านดอกร่วง (ภาพผนวกที่ 3 C) เมื่อตัดดอกบานออกและให้ IAA ที่ปลายก้านดอก ก้านดอกไม่ร่วงเมื่อได้รับเอทิลีนเพราะออกซินเคลื่อนที่มายัง AZ ทำให้ก้านดอกไม่ร่วงเมื่อได้รับเอทิลีน (ภาพผนวกที่ 3 D) ดังนั้นแบบจำลองนี้จึงสนับสนุนว่า ออกซินควบคุมการร่วงของดอกบาน กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสทีนโดยทำให้เนื้อเยื่อบริเวณ AZ ไม่ตอบสนองต่อเอทิลีน

การศึกษาทางวิภาคของเนื้อเยื่อบริเวณ AZ ของดอกตูมและดอกบานกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสทีนมีลักษณะไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 16 A และ 16 B) คือ มีลักษณะเป็นเซลล์ขนาดเล็ก รูปร่างกลมหรือยาวเรียงตัวกัน 2-3 ชั้น เนื้อเยื่อ AZ ของกล้วยไม้มีการพัฒนาเป็นเซลล์ลักษณะพิเศษตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดการพัฒนาของดอก AZ สามารถเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของการพัฒนาอวัยวะ

(Roberts *et al.*, 2000; Sexton, 2002) เช่น ก้านใบ *Ixora* (Michaeli *et al.*, 1999) ก้านใบ *Fraxinus* (Facey, 1950) ขณะที่บางพืช เช่น *Phaseolus* ใบแรกพัฒนาและขยายตัวเต็มที่ซึ่งไม่ปรากฏเซลล์ลักษณะพิเศษซึ่งแตกต่างจากเนื้อเยื่อปกติ จนกระทั่ง 2 สัปดาห์สุดท้ายก่อนใบเสื่อมสภาพจึงมีการพัฒนาของ AZ (Kozlowski, 1973) และพืชบางชนิดเช่น ถั่ว เนื้อเยื่อบริเวณ AZ มีลักษณะเป็น secondary abscission โดยในส่วนของพืชซึ่งปกติไม่มีการร่วงมีการพัฒนาของเซลล์ปกติเป็นเซลล์ AZ และเกิดการร่วง (McManus *et al.*, 1998) การแยกตัวของเซลล์บริเวณ AZ เกิดขึ้นบริเวณ 1-2 ชั้นเซลล์ใน AZ ก่อนการร่วงของดอกบานกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสตินเมื่อได้รับสารยับยั้งออกซิน (รูปที่ 17) ลักษณะการแยกตัวนี้เหมือนกับการแยกตัวของเซลล์บริเวณ AZ เมื่อเกิดการร่วงของดอกในพืชสกุลอื่นๆ เช่น *Pelargonium x hortorum*, *Lilium Pallyanna* (Evensen *et al.*, 1993; Tabuchi *et al.*, 2005) ออกซินที่ให้กับก้านดอกหลังจากตัดดอกออกสามารถชะลอการร่วงของก้านดอก โดยพบว่าเซลล์บริเวณ AZ ของก้านดอกที่ได้รับสาร IAA ในวันที่ 17 มีลักษณะไม่แตกต่างจากดอกบานปกติหลังจากเก็บเกี่ยว (รูปที่ 19) ออกซินเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช มีผลต่อเนื้อเยื่อแตกต่างกัน ออกซินกระตุ้นเซลล์ให้ยืดยาวในลำต้น ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ในส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดและปลายราก หรือกระตุ้นการพัฒนาของเนื้อเยื่อลำเลียง (Roberts *et al.*, 1988) การให้ออกซินกับก้านใบ *Phaseolus* ที่ตัดแผ่นใบออกสามารถชะลอการลดลงของแคลเซียมใน AZ ส่วนก้านใบที่ตัดใบออกพบว่าปริมาณแคลเซียมลดลง (Kozlowski, 1973) แคลเซียมมีความสำคัญต่อผนังเซลล์ ช่วยให้ผนังเซลล์มีความเสถียรคงอยู่ได้ (Poovaiah *et al.*, 1988) และเป็นตัวถ่ายทอดสัญญาณที่สำคัญภายในเซลล์พืช (Buchanan *et al.*, 2000) Osborne (1989) กล่าวว่า การลดลงของแคลเซียมทำให้เกิดการร่วงและการเพิ่มแคลเซียมทำให้ลดการร่วง ดังนั้นลักษณะเซลล์ AZ ของก้านดอกที่ได้รับ IAA เป็นเวลา 17 วันจึงมีลักษณะไม่แตกต่างจากเซลล์ AZ ของดอกบานปกติในวันเริ่มต้นการทดลอง เนื่องจากออกซินที่ให้กับก้านดอกควบคุมปริมาณแคลเซียมใน AZ ทำให้เซลล์ใน AZ มีความแข็งแรงและอยู่ในภาวะสมดุลเหมือนเซลล์ปกติ

การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของผนังเซลล์ในเนื้อเยื่อบริเวณ AZ เป็นปัจจัยสำคัญทำให้เกิดการร่วงของใบ ดอก และผล ระหว่างกระบวนการร่วงของชิ้นส่วนพืชมีการสร้างเอนไซม์ β -1,4-glucanase (cellulase), PG, PME เพิ่มขึ้นซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยผนังเซลล์ การทดลองครั้งนี้จึงได้ศึกษาบทบาทของเอนไซม์ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ β -1,4-glucanase และ PG กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase ใน AZ ของดอกกล้วยไม้ไม่มีแนวโน้มคงที่หรือลดลงเล็กน้อยในทุกทริทเมนต์ที่ไม่มีการร่วงในช่วงวันที่ 5 หลังจากได้รับทริทเมนต์ ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase ในทริทเมนต์ที่ได้รับ TIBA ทริทเมนต์ที่ได้รับ TIBA + เอทิลีน

และทริทเมนต์ที่ได้รับสาร CMPA + เอทิลีน สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องก่อนการร่วงของดอกกล้วยไม้สกุล หวายพันธุ์มัสทีน (ภาพที่ 20) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ β -1,4-glucanase ในดอกกล้วยไม้ มีลักษณะเช่นเดียวกับกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase ในใบ *Phaseolous vulgaris* ดอกยาสูบ และดอกมะเขือเทศ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ เพิ่มขึ้นเกี่ยวข้องกับการร่วง (Lewis and Varner, 1970; Lieberman *et al.*, 1983; Roberts *et al.*, 1984; Tucker *et al.*, 1984) กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase ที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในดอกบานที่ได้รับสาร TIBA มีความสัมพันธ์กับปริมาณเอทิลีนที่สูงขึ้นในดอกบานที่ได้รับสาร TIBA (รูปที่ 8) โดยเอทิลีนที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 1-3 และลดลงเล็กน้อยในวันที่ 5 มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase ที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องมีความจำเป็น ต่อขบวนการร่วงของดอกกล้วยไม้ที่อาศัยเอทิลีนเป็นตัวควบคุม ในการร่วงของ *Phaseolus* พบว่า เอทิลีนมีความจำเป็นในการเริ่มต้นกระบวนการร่วง การแสดงออกของยีน cellulase (β -1,4-glucanase) และจำเป็นอย่างต่อเนื่องในการสะสม mRNA ของยีน cellulase (β -1,4-glucanase) (Tucker *et al.*, 1988) สารออกซินที่ให้แก่ก้านดอกมีบทบาทในการลดกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase ซึ่งเห็นได้ชัดเจนในสภาพที่มีเอทิลีน (ภาพที่ 20) การให้สาร IAA สามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase (β -1,4-glucanase) ในกระบวนการสุกของกล้วยไม้ในสภาพที่ได้รับเอทิลีนและไม่ได้รับเอทิลีน (Lohani *et al.*, 2004) บทบาทของออกซินต่อการลดลงหรือควบคุมการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ β -1,4-glucanase นั้นยังไม่มีรายงานโดยตรง ออกซินน่าจะยับยั้งบทบาททางอ้อม โดยทำให้เนื้อเยื่อ AZ ไม่ตอบสนองต่อเอทิลีน เมื่อเนื้อเยื่อบริเวณ AZ ที่ได้รับเอทิลีนไม่สามารถตอบสนองต่อเอทิลีนจึงทำให้เซลล์ในเนื้อเยื่อ AZ ที่ได้รับเอทิลีนมีการสร้างเอนไซม์ β -1,4-glucanase ไม่แตกต่างจากดอกปกติที่ไม่ได้รับเอทิลีน มีรายงานในก้านดอก *Hibicus* ที่ถูกชักนำให้หลุดร่วงโดยการให้สาร ACC ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการเปลี่ยนเป็นเอทิลีน การให้สาร IAA สามารถลดผลของการร่วงเนื่องจากการให้สาร ACC (van Meeteren and van Gelder, 1995) การให้สารออกซินสามารถลดการร่วงของก้านดอกกุหลาบที่ปักก้านลงในสารละลาย ACC (Goszczyńska and Zieslin, 1993)

กิจกรรมของเอนไซม์ PG มีแนวโน้มคงที่ในทุกทริทเมนต์ในช่วง 3 วันแรกหลังจากได้รับสาร และกิจกรรมของ PG มีค่าสูงขึ้นในวันที่ 5 ในทริทเมนต์ที่ได้รับ TIBA และสูงมากในทริทเมนต์ที่ได้รับ TIBA + เอทิลีน หรือ CMPA + เอทิลีน (ภาพที่ 22) ซึ่งสอดคล้องกับการร่วงของดอกบานในวันที่ 5 หลังจากได้รับสาร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า กิจกรรมของเอนไซม์ PG เพิ่มขึ้นขณะที่ดอกกล้วยไม้หลุดร่วง กิจกรรมของเอนไซม์ PG ในดอกบานไม่มีความเกี่ยวข้อง

ปริมาณเอทิลีนที่เพิ่มขึ้น ซึ่งแตกต่างจากกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucanase ที่มีค่าสูงขึ้นเมื่อปริมาณเอทิลีนเพิ่มขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ PG ในระหว่างการร่วงของดอกบานกล้วยไม้หวายพันธุ์มัสตินมีลักษณะเหมือนกับการทดลองในใบมะเขือเทศและผลส้ม พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ PG ใน AZ เกิดขึ้นพร้อมกับการร่วงที่ชักนำโดยเอทิลีน (Greenberg *et al.*, 1975; Taylor *et al.*, 1990) และในก้านดอกมะเขือเทศที่ถูกชักนำโดยเอทิลีน กิจกรรมของเอนไซม์ PG เพิ่มขึ้นหลังจากการแยกของเซลล์ได้เกิดขึ้นแล้ว (Tucker *et al.*, 1984) จากข้อมูลแสดงว่าในกระบวนการร่วงของดอกบานกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสตินมีเอนไซม์ β -1,4-glucanase ทำหน้าที่ในการย่อยสลายพันธะ β -1,4 ของน้ำตาลกลูโคสใน primary cell wall ก่อน หลังจากนั้นเอนไซม์ PG จึงทำหน้าที่กระตุ้นการย่อยสลายโมเลกุลของเพกตินที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของ middle lamella ที่เชื่อมผนังเซลล์เข้าด้วยกันและใน primary และ secondary cell wall (Rose, 2003) ทำให้เกิดการแยกตัวของเซลล์ มีผลทำให้ดอกหลุดร่วง

การแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase (*Den-Cel*) ในระหว่างการร่วงของดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสติน มีการสะสม mRNA เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนสูงสุดเมื่อดอกมีการร่วง (วันที่ 5) (ภาพที่ 29) การสะสม mRNA ของยีน *Den-Cel* ในดอกกล้วยไม้มีมากขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณเอทิลีนที่เพิ่มขึ้นในดอกที่ได้รับ TIBA (ภาพที่ 8) Tucker *et al.* (1988) รายงานว่าเอทิลีนมีความจำเป็นต่อการสะสมของ mRNA ยีน cellulase (β -1,4-glucanase) ในก้านใบ *Phaseolus* การที่ปริมาณเอทิลีนลดลงมีผลทำให้ระดับ mRNA ยีน cellulase (β -1,4-glucanase) ลดลงด้วย การสะสม mRNA ของยีน β -1,4-glucanase ในใบย่อย *Sambucus nigra* ถูกชักนำโดยเอทิลีน (Taylor *et al.*, 1994) การแสดงออกของยีน β -1,4-glucanase (*Den-Cel*) ในทริทเมนต์ต่างๆที่ดอกบานกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสตินได้รับสารยับยั้งออกซินและมีการร่วงของดอกจะมีการสะสม mRNA ยีน *Den-Cel* ในปริมาณสูงสุด ส่วนในทริทเมนต์ที่ก้านดอกได้รับสาร IAA บริเวณรอยตัดร่วมกับเอทิลีน สามารถลดการแสดงออกของยีน *Den-Cel* ได้เท่ากับดอกในสภาพปกติที่ได้รับเอทิลีน (ไม่มีการร่วง) (ภาพที่ 28) ยีน *Cel1* ในมะเขือเทศสะสม mRNA สูงขึ้นในหลายส่วนของพืชขณะที่เกิดการแยกตัวของเซลล์ เช่น ในบริเวณ abscission zone ขณะที่ยีน *Cel2* ในมะเขือเทศมีการสะสม mRNA มากในช่วงผลสุก (Lashbrook *et al.*, 1994) การแสดงออกของยีน *Cel1* และ *Cel5* มีมากขึ้นในก้านผลมะเขือเทศสัมพันธ์กับอาการร่วงของผลระหว่างการเก็บรักษาผลมะเขือเทศที่ได้รับเอทิลีนและ methyl jasmonate (Benou-Moualem *et al.*, 2004) การสะสม mRNA ของยีน *Cel1* และ *Cel5* ในมะเขือเทศลดลงเมื่อได้รับ IAA ในสภาพที่ให้เอทิลีน (del Campillo and Bennett, 1996) ในผลสตรอเบอร์รี่พบว่า การแสดงออกของยีน *Egase* (endo-1, 4- β -glucanase) ถูกควบคุมโดยออกซินมีผลทำให้ยีนแสดง

ออกได้น้อยลง (Manning, 1994; Harpster *et al.*, 1998) การให้ IAA กับก้านใบของ *Phaseolus* ทำให้ลดการสะสม mRNA ของยีน cellulase (β -1,4-glucanase) ในบริเวณ AZ (Tucker *et al.*, 1988) เมื่อเปรียบเทียบการสะสม mRNA ของยีน *Den-Cel* ในทริทเมนต์ที่ตัดกลีบดอก เส้าแสรและรังไข่ + IAA (cut+IAA, air) และการสะสม mRNA ยีน *Den-Cel* ในทริทเมนต์ที่ตัดกลีบดอก เส้าแสรและรังไข่ + IAA + เอทิลีน (cut+IAA, C₂H₄) ไม่มีการสะสม mRNA ยีน *Den-Cel* ในทริทเมนต์ (cut+IAA, C₂H₄) (รูปที่ 28) อาจจะเป็นผลของสมดุลระหว่างฮอร์โมนออกซินและเอทิลีนในเนื้อเยื่อ AZ จึงทำให้เนื้อเยื่อ AZ ไม่ตอบสนองต่อเอทิลีนและทำให้ไม่มีการแสดงออกของยีน *Den-Cel* การแสดงออกของยีน *Den-Cel* นอกจากจะพบในบริเวณ AZ ของดอกกล้วยไม้แล้ว ยีนนี้ยังแสดงออกในเนื้อเยื่อที่เป็น non- abscission zone ด้วย เช่น ในก้านดอก (รูปที่ 29) มีรายงานในพืชอื่น เช่น ถั่ว พบว่ามีการสะสมของ mRNA ยีน β -1,4-glucanase ในเซลล์ระบบท่อลำเลียงที่อยู่ห่างจาก AZ (del Campillo *et al.*, 1990; Tucker *et al.*, 1991)

ยีน β -1,4-glucanase (*Den-Cel*) ที่แสดงออกในการทดลองครั้งนี้เป็นยีนในกลุ่มยีน β -1,4-glucanase ที่มีการแสดงออกในระหว่างการร่วงของดอกบานกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสทิน โดยมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นก่อนการร่วงและยังสามารถแสดงออกในเนื้อเยื่อของก้านดอกบานอีกด้วย ในมะเขือเทศมีรายงานว่ายีน endo-1, 4- β -glucanase มีลักษณะเป็นกลุ่มยีน (gene family) 8 ยีน คือ *Cel1* – *Cel8* มีการสะสม mRNA ที่แตกต่างกันในส่วนต่างๆของพืช ในระหว่างการพัฒนาของผล และการร่วงของส่วนต่างๆ (Benou-Moualem *et al.*, 2004) ในบางยีน เช่น *Cel1* และ *Cel2* มีการสะสม mRNA ในช่วงคาบเกี่ยวกันระหว่างกระบวนการสุกของผลและการร่วงของดอก เอนไซม์ที่ควบคุมการสร้างโดยยีน *Cel1* และ *Cel2* น่าจะมีหน้าที่เฉพาะในกระบวนการทางชีวเคมีต่างๆที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผนังเซลล์ (Lashbrook *et al.*, 1994) แต่มีรายงานเกี่ยวกับยีน β -1,4-glucanase ใน elder (*Sambucus nigra*) มีลักษณะเป็นกลุ่มยีน และมียีนหนึ่งที่มีชื่อ JET 1 ซึ่งมีขนาด near-full-length cDNA เท่ากับ 1768 bp เป็นยีนที่มีรายงานว่ามีการแสดงออกเฉพาะในส่วน of abscission zone ของใบย่อย elder หลังจากได้รับเอทิลีน (Taylor *et al.*, 1994) ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มยีน β -1,4-glucanase ของกล้วยไม้สกุลหวายที่เกี่ยวข้องกับการร่วงอย่างแท้จริงของดอกตูมและดอกบาน เพื่อให้เข้าใจบทบาทและหน้าที่ของยีนนั้นซึ่งจะทำให้สามารถควบคุมการร่วงของดอกกล้วยไม้สกุลหวายอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

สรุป

การทดลองหาความสัมพันธ์ของออกซินและเอทิลีนต่อการร่วงของดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสติน สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. การยับยั้งออกซินเคลื่อนที่จากดอกโดยใช้สารยับยั้งการทำงานของออกซิน (CMPA) และสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซิน (TIBA) ทำให้เกิดการร่วงของดอกบานกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสติน
2. การให้ 1-MCP สามารถยับยั้งการร่วงของดอกบานที่ได้รับ CMPA และชะลอการร่วงของดอกบานที่ได้รับ TIBA
3. การตัดดอกบานและดอกตูมออกทำให้เกิดการร่วงของก้านดอก และการให้ IAA จากภายนอกบริเวณรอยตัดสามารถยับยั้งการร่วงของก้านดอกที่ตัดดอกออก การให้ 1-MCP สามารถชะลอการร่วงของก้านดอกที่ตัดดอกออก
4. การตัดส่วนของดอกบานไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่า ออกซินจากส่วนใดมีบทบาทที่สำคัญในการควบคุมการร่วงของดอก
5. ความยาวของก้านดอกตูมและก้านดอกบานมีความสำคัญต่อการร่วงของก้านดอกที่เหลืออยู่ การมีส่วนของก้านดอกยาวสามารถชะลอการร่วงได้มากกว่าการมีส่วนของความยาวก้านดอกที่สั้น
6. การหาปริมาณของ IAA ในส่วนของเส้าเกสรรวมก้านดอกและ AZ บริเวณโคนก้านดอกของดอกบานหลังจากได้รับสารยับยั้งออกซิน ไม่สามารถทราบปริมาณที่แน่นอนเนื่องจากความคลาดเคลื่อนจากการสูญหายไป
7. ปริมาณ IAA ในส่วนของเส้าเกสร+รังไข่ หรือ ก้านดอกของดอกตูมมีแนวโน้มมากกว่าส่วนเดียวกันในดอกบาน

8. AZ ของดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสทีน ประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็กรูปร่างกลมหรือเป็นเหลี่ยมเรียงตัว 2-3 แถว มีการแยกตัวของเซลล์เกิดขึ้นระหว่างชั้นเซลล์ขนาดเล็ก 2 ชั้น บริเวณ AZ ก่อนการร่วง

9. กิจกรรมของ β -1, 4-glucanase ใน AZ ของโคนก้านดอกเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องก่อนการร่วง สัมพันธ์กับทริทเมนต์ที่มีการร่วงของดอก ส่วนกิจกรรมของ PG เกิดขึ้นขณะที่ดอกกล้วยไม้กำลังหลุดร่วง

10. จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน β -1, 4-glucanase (*Den-Cel*) ในเนื้อเยื่อ AZ ของดอกกล้วยไม้โดยวิธี semi-quantitative RT-PCR พบว่าการแสดงออกของยีน *Den-Cel* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกิจกรรมของ β -1, 4-glucanase โดยมีการสะสม mRNA ของยีน *Den-Cel* มากในดอกที่ได้รับสารยับยั้งออกซินและมีการร่วง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2547. **กล้วยไม้**. กรมส่งเสริมการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรุงเทพฯ. (เอกสารเผยแพร่)

จริงแท้ ศิริพานิช. 2549. **ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการวางของพืช**. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, นครปฐม.

จิตรพรรณ พิสิฐ. 2529. การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้เพื่อการส่งออก, น. 23-61. ใน กรมส่งเสริมการเกษตร (ผู้รวบรวม). **คู่มือการผลิตกล้วยไม้เพื่อการส่งออก**. กรมส่งเสริมการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

จิตรพรรณ พิสิฐ. 2536. การปลูกเลี้ยงดอกกล้วยไม้เพื่อการส่งออก, น. 16-32. ใน กรมส่งเสริมการเกษตร (ผู้รวบรวม). **คู่มือการผลิตกล้วยไม้เพื่อการส่งออก**. กรมส่งเสริมการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ไพฑูรย์ ไพริพ่ายฤทธิ. 2521. **ตำรากล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มต้น**. อาทรการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ระพี สาคริก. 2516. **การเพาะปลูกดอกกล้วยไม้ในสภาพแวดล้อมในประเทศไทย**. โรงพิมพ์ชวนพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ระพี สาคริก. 2530. **ดอกกล้วยไม้**. ชอนนทรี, กรุงเทพฯ.

สายชล เกตุษา. 2531. **เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวของดอกไม้**. บริษัทสารมวลชน จำกัด, กรุงเทพฯ. 291 น.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2549. **กล้วยไม้**. ส่วนวิจัยเศรษฐกิจพืชสวน สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. (เอกสารเผยแพร่)

เสาวลักษณ์ บันเทิงสุข. 2549. **ความสัมพันธ์ระหว่างความเครียดน้ำ การสร้างโปรตีนและการเสื่อมสภาพของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อภิสิทธิ์ อีสริยานุกูล, นภาพรณ์ พรหมชนะ และ จุฑาทิพย์ ภัทราวาท. 2541. **โครงการศึกษาลิน**
ค้ายุทธศาสตร์: ไม้ดอกไม้ประดับ. คณะเศรษฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
 กรุงเทพฯ.

โอพาร์ พัทธ์ และ ชัยยงค์ ชูจันทร์. 2536. สถานการณ์การผลิตและการค้ากล้วยไม้ไทย, น. 1-
 15. ใน , กรมส่งเสริมการเกษตร (ผู้รวบรวม). **คู่มือการผลิตกล้วยไม้เพื่อการส่งออก.** กรม
 ส่งเสริมการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

Abel, S. and A. Theologis. 1996. Early auxin genes and auxin action. **Plant Physiol.** 111: 9-17.

Abel, S., M.D. Nguyen, W. Chow and A. Theologis. 1995. *ASC4*, a primary indoleacetic acid-
 responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis*
thaliana. **J. Biol. Chem.** 270: 19093-19099.

Abeles, F.B. and B. Rubinstein. 1964. Regulation of ethylene evolution and leaf abscission by
 auxin. **Plant Physiol.** 39: 963-969.

Abeles, F.B. and G.R. Leather. 1971. Abscission: control of cellulase secretion by ethylene.
Plant Physiol. 97: 87-91.

Abeles, F.B., W.P. Morgan and M.E. Saltveit. 1992. **Ethylene in Plant Biology.** Academic
 Press, Inc., San Diego.

Abu-Goukh, A.A. and H.A. Bashir. 2003. Changes in pectic enzymes and cellulase activity
 during guava fruit ripening. **Food Chem.** 83: 213-218.

Addicott, F.T., R.S. Lynch and H.R. Carns. 1955. Auxin gradient theory of abscission
 regulation. **Science** 121: 644-645.

Aneja, M., T. Gianfana and E. Ng. 1999. The roles of abscissic acid and ethylene in the
 abscission and senescence of cocoa flowers. **Plant Growth Regul.** 27: 149-155.

- Anthon, G.E. and D.M. Barrett. 2002. Determination of reducing sugars with 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone. **Anal. Biochem.** 305: 287-289.
- Arteca, R.N., J.M. Bachman and N.B. Mandava. 1988. Effects of indole-3-acetic acid and brassinosteroid on ethylene biosynthesis in etiolated mungbean hypocotyl segments. **Plant Physiol.** 133: 430-435.
- Awad, M. and R.E. Young. 1979. Postharvest variation in cellulase, polygalacturonase and pectinmethylesterase in avocado (*Persca americana* Mill. cv. Fuerte) fruit in relation to respiration and ethylene production. **Plant Physiol.** 64: 306-308.
- Barry, C.S., R.P. McQuinn, A.J. Thompson, G.B. Seymour, D. Grierson and J.J. Giovannoni. 2005. Ethylene insensitivity conferred by the *green-ripe* and *never-ripe* 2 ripening mutants of tomato. **Plant Physiol.** 138: 267-275.
- Benitez-Burraco, A., R. Blanco-Potales, J. Redondo-Nevado, M.L. Bellido, E. Moyano, J. Caballero and J. Munoz-Blanco. 2003. Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria x ananass* cv. Chandler) pectate lyase genes. **J. Exp. Bot.** 54: 633-645.
- Beno-Moualem, D., L. Gusev, O. Dvir, E. Pesis, S. Meir and A. Lichter. 2004. The effects of ethylene, methyl jasmonate and 1-MCP on abscission of cherry tomatoes from the bunch and expression of endo-1,4- β -glucanases. **Plant Sci.** 167: 499-507.
- Beyer, E. 1973. Abscission: support for a role of ethylene modification of auxin transport. **Plant Physiol.** 52: 1-5.
- Blankenship, S.M. and J.M. Dole. 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. **Postharvest Biol. Technol.** 28: 1-25.

- Bleecker A.B. and S.E. Patterson. 1997. Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in Arabidopsis. **Plant Cell** 9: 1169-1179.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Brooks, R.M., M.V. Bradley and T.I. Anderson. 1950. **Plant Microtechnique Manual**. University of California, Davis.
- Brown, K.M. 1997. Ethylene and abscission. **Physiol. Plant.** 100: 567-576.
- Buchanan, B.B., W. Gruissem, R.L. Jones. 2000. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.
- Bui, A.Q. and S.D. O' Neill. 1998. Three 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes regulated by primary and secondary pollination signals in orchid flowers. **Plant Physiol.** 116: 419-428.
- Bunya-Atichart, K., S. Ketsa and W.G. van Doorn. 2006. High floral bud abscission and lack of open flower abscission in *Dendrobium* cv. Miss Teen: rapid reduction of ethylene sensitivity in the abscission zone. **Funct. Plant Biol.** 33: 539-546.
- Carns, R.H. 1966. Abscission and its control. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 17: 295-314.
- Chadwick, A.V. and S.P. Burg. 1967. An explanation of the inhibition of root growth caused by indole-3-acetic acid. **Plant Physiol.** 42: 415-420.
- _____. 1970. Regulation of root growth by auxin-ethylene interaction. **Plant Physiol.** 45: 192-200.

- Chang, S., J. Puryear and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pines trees. **Plant Molecular Biology Reporter** 11(2): 113-116.
- Davenport, T.L., P.W. Morgan and W.R. Jordan. 1980. Reduction of auxin transport capacity with age and internal water deficits in cotton petioles. **Plant Physiol.** 65: 1023-1025.
- del Campillo, E. and A.B. Bennett. 1996. Pedicel breakstrength and cellulase gene expression during tomato flower abscission. **Plant Physiol.** 111: 813-820.
- del Campillo, E., P.D. Reid, R. Sexton and L.N. Lewis. 1990. Occurrence and localization of 9.5 cellulase in abscising and non-abscising tissues. **Plant Cell** 2: 245-254.
- Etheridge, N., B.P. Hall and G.E. Schaller. 2006. Progress report: ethylene signaling and responses. **Planta** 223: 387-391.
- Evensen, K.B. 1991. Ethylene responsiveness changes in *Pelargonium x domesticum* florets. **Physiol. Plant.** 82: 409-412.
- Evensen, K.B., A.M. Page and A.D. Stead. 1993. Anatomy of ethylene-induced petal abscission in *Pelargonium x hortorum*. **Ann. Bot.** 71: 559-566.
- Facey, V. 1950. Abscission of leaves in *Fraxinus americana* L. **New Phytol.** 49: 103-116.
- Fernandez, D.E., G.R. Heck, S.E. Perry, S.E. Patterson, A.B. Bleecker and S.C. Fang. 2000. The embryo MADS domain factor AGL15 acts post-embryonically: inhibition of perianth senescence and abscission via constitutive expression. **Plant Cell** 12: 183-197.
- Frenkel, C. and N.F. Haard. 1973. Initiation of ripening in Bartlett pear with an antiauxin α (*p*-chlorophenoxy) isobutyric acid. **Plant Physiol.** 52:380-384.

- Fujita, H. and K. Syono. 1996. Genetic analysis of the effects of polar auxin transport inhibitors on root growth in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol.** 37: 1094-1101.
- Gazzarrini, S. and P. Mccourt. 2003. Cross-talk in plant hormone signalling: what *Arabidopsis* mutants are telling us. **Ann. Bot.** 91: 605-612.
- Goh, C.J., A.H. Halevy, R. Engel and A.M. Kofranek. 1985. Ethylene evolution and sensitivity in cut orchid flowers. **Scientia Hort.** 26: 57-67.
- Goszczynska, D. and N. Zieslin. 1993. Abscission of flower peduncles in rose (*Rosa x hybrida*) plants and evolution of ethylene. **J. Plant Physiol.** 142: 214-217.
- Greenberg, J., R. Goren and J. Riov. 1975. The role of cellulase and polygalacturonase in abscission of young and mature shamouti orange fruits. **Physiol. Plant.** 34: 1-7.
- Grochowska, M.J., U. Dziaeciol and A. Miszczak. 1994. Active participation of the root/shoot transition region treated with triiodobenzoic acid in basipetal transport of ¹⁴C-indole-3-acetic acid and ethylene evolution in the stem of apple seedling. **Scientia Hort.** 59: 207-215.
- Hadfi, K., V. Speth and G. Neuhaus. 1998. Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. **Development** 125: 879-887.
- Halevy, A.H., C.S. Whitehead and A.M. Kofranek. 1984. Does pollination induce corolla abscission of cyclamen flowers by promoting ethylene production?. **Plant Physiol.** 75: 1090-1093.
- Hall, W. 1952. Evidence on the auxin-ethylene balance hypothesis of foliar abscission. **Bot. Gaz.** 113: 310-322.

- Harpster, M.H., D.A. Brummell and P. Dunsmuir. 1998. Expression analysis of a ripening-specific, auxin-repressed endo-1,4- β -glucanase gene in strawberry. **Plant Physiol.** 118: 1307-1316.
- Harper, R.M., E.L. Stowe-Evans, D.R. Luesse, H. Muto, K. Tatematsu, M.K. Watahiki, K. Yamamoto and E. Liscum. 2000. The *NHP4* locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue. **Plant Cell** 12: 757-770.
- Henry, E.W., J.G. Valdovinos and T.E. Jensen. 1974. Peroxidase in tobacco abscission zone tissue. II. Time course studies of peroxidase activity during ethylene-induced abscission. **Plant Physiol.** 54: 192-196.
- Jacobs, W.P. 1962. Longevity of plant organs: internal factors controlling abscission. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 13: 403-436.
- Jaffe, M. T. and R. Goren. 1979. Auxin and early stage of the abscission process of citrus leaf explants. **Bot. Gaz.** 140: 378-379.
- Jinn, T.L., J.M. Stone and J.C. Walker. 2000. *HAESA*, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. **Genes Dev.** 14: 108-117.
- Kalaitzis, P., S.M. Koehler and M.L. Tucker. 1995. Cloning of a tomato polygalacturonase expressed in abscission. **Plant Mol. Biol.** 28: 647-656.
- Kalaitzis, P., T. Solomos and M. Tucker. 1997. Three different polygalacturonases are expressed in tomato leaf and flower abscission, each with a different expression pattern. **Plant Physiol.** 113: 1303-1308.

- Kaska, D.D., R. Myllyla and J.B. Cooper. 1999. Auxin transport inhibitors act through ethylene to regulate dichotomous branching of lateral root meristems in pine. **New Phytol.** 142: 49-58.
- Kemmerer, E.C. and M.L. Tucker. 1994. Comparative study of cellulases associated with adventitious root initiation, apical buds, and leaf, flower, and pod abscission zones in soybean. **Plant Physiol.** 104: 557-562.
- Ketsa, S. and A. Rugkong. 2000. Ethylene production, senescence and ethylene sensitivity of *Dendrobium* 'Pompadour' flowers following pollination. **J. Hortic. Sci. Biotechnol.** 75: 149-153.
- Ketsa, S., A. Wisutiamonkul and W.G. van Doorn. 2006. Auxin is required for pollination-induced ovary growth in *Dendrobium* orchids. **Functional Plant Biology** 33:887-892.
- Ketsa, S. and F. Thampitakorn. 1995. Characteristics of ethylene production of *Dendrobium* orchid flowers. **Acta Hortic.** 405: 253-263.
- Koehler, S.M., G.L. Matters, P. Nath, E.C. Kemmerer and M.L. Tucker. 1996. The gene promoter for a bean abscission cellulase is ethylene-induced in transgenic tomato and shows high sequence conservation with a soybean abscission cellulase. **Plant Mol. Biol.** 31: 595-606.
- Kozlowski, T.T. 1973. **Shedding of Plant Parts.** Academic Press, New York.
- Kuroda, S., M. Hakata, Y. Hirose, M. Shiraishi and S. Abe. 2003. Ethylene production and enhanced transcription of an ethylene receptor gene, *ERS1*, in *Delphinium* during abscission of florets. **Plant Physiol. Biochem.** 41: 812-820.

- Lannetta, P.P.M., L. Laarhoven, N. Medina-Escobar, E.K. James, M.T. McManus, H.V. Daviesa and F.J.M. Harren. 2006. Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. **Physiol. Plant.** 127: 247–259.
- Lashbrook, C.C., C. Gonzales-Bosch and A.B. Bennett. 1994. Two divergent endo-B-1,4-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers. **Plant Cell** 6: 1485-1493.
- Lashbrook, C.C. and H.J. Klee. 1999. Ethylene regulation of abscission competence. pp. 227-233. *In* A.K. Kenellis, C. Chang, H. Klee, A.B. Bleeker, J.C. Pech and D. Grierson, eds. **Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene II**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Lewis, L.N. and J.E. Varner. 1970. Synthesis of cellulase during abscission of *Phaseolous vulgaris* leaf explants. **Plant Physiol.** 46: 194-199.
- Leyser, H.M.O., C.A. Lincoln, C.S. Timpte, D. Lammer, J.C. Turner and M. Estelle. 1993. *Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. **Nature** 304: 161-164.
- Lieberman, S.J., J.G. Valdovinos and T.E. Jensen. 1983. A morphometric study on the effects of ethylene treatment in promoting abscission of tobacco flower pedicels. **Plant Physiol.** 72: 583-585.
- Liljegren, S.J., G.S. Ditta, Y. Eshed, B. Savidge, J.L. Bowman and M.F. Yanofsky. 2000. SHATTERPROOFMADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. **Nature** 404: 766-770.

- Lincoln, C., J. Britton and M. Estelle. 1990. Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. **Plant Cell** 2: 1071-1080.
- Liu, Z., H. Liu and H. Wang. 1996. Effect of light on endogenous indole-3-acetic acid, peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase in soybean hypocotyls. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 37: 113-119.
- Lohani, S., P.K. Trivedi and P. Nath. 2004. Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. **Postharvest Biol. Technol.** 31: 119-126.
- Mandels, M. and D. Sternberg. 1976. Recent advances in cellulase technology. **J. Ferment. Technol.** 54(4) : 267-286.
- Manning, K. 1994. Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. **Planta** 194: 62-68.
- Mao, L., D. Begum, H. Chuang, M.A. Budiman, E.J. Szymkowiak, E.E. Irish and R.A. Wing. 2000. JOINTLESS is a MADS-box gene controlling tomato flower zone development. **Nature** 406: 910-913.
- Marin-Rodriguez, M.C., D.L. Smith, K. Manning, J. Orchard and G.B. Seymour. 2003. Pectate lyase gene expression and enzyme activity in ripening banana fruit. **Plant Mol. Biol.** 51: 851-857.
- Marousky, F.J. 1972. Water relations, effects of floral preservatives on bud opening and keeping quality of cut flower. **HortScience** 7: 114-116.
- McKay, M.J., J.J. Ross, N.L. Lawrence, R.E. Cramp, C.A. Beveridge and J.B. Reid. 1994. Control of internode length in *Pisum sativum*. **Plant Physiol.** 106: 1521-1526.

- McManus, M.T., D.S. Thompson, C. Merriman, L. Lyne, D.J. Osborne. 1998. Transdifferentiation of mature cortical cells to functional abscission cells in bean. **Plant Physiol.** 116: 891-899.
- Meir, S., D.A. Hunter, J.C. Chen, V. Halaly and M.S. Reid. 2006. Molecular changes occurring during acquisition of abscission competence following auxin depletion in *Mirabilis jalapa*. **Plant Physiol.** 141:1604-1616.
- Michaeli, R., S. Philosoph-Hadas, J. Riov and S. Meir. 1999. Role of ethylene sensitivity in mediating the chilling-induced leaf abscission of *Ixora* plant, pp. 235-242. In A. K. Kenellis, C. Chang, H. Klee, A. B. Bleeker, J. C. Pech and D. Grierson, eds. **Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene II**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Mita S, R. Henmib and H. Ohno. 2006. Enhanced expression of genes for ACC synthase, ACC oxidase, and NAC protein during high-temperature-induced necrosis of young inflorescences of *Cymbidium*. **Physiol. Plant.** 128: 476-486.
- Morgan, P.W., C.J. He and M.C. Drew. 1992. Intact leaves exhibit a climacteric-like rise in ethylene production before abscission. **Plant Physiol.** 100: 1587-1590.
- Morgan, P.W. and J. I. Durham. 1972. Abscission : potentiating action of auxin transport inhibitors. **Plant Physiol.** 50: 313-318.
- Morris, D.A. 1993. The role of auxin in the apical regulation of leaf abscission in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **J. Exp. Bot.** 44: 807-814.
- Müller, R., B.M. Stummann, M. Serek. 2000a. Characterization of an ethylene receptor family with differential expression in rose (*Rosa hybrida* L.) flowers. **Plant Cell Rep.** 19: 1232-1239.

- Müller, R., S. Lind-Iversen, B.M. Stummann, M. Serek. 2000b. Expression of genes for ethylene biosynthetic enzymes and an ethylene receptor in senescing flowers of miniature roses. **J. Hortic. Sci. Biotechnol.** 75: 12-18.
- Nair, H. 1984. Postharvest physiology and handling of orchids. **Mal. Orchid Rev.** 18: 62-68.
- Nair, H. and T.H. Fong. 1987. Ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid levels in detached orchid flowers of *Dendrobium* "Pompadour". **Scientia Hort.** 32: 145-151.
- Oberholster, S.D., C.M. Peterson and R.R. Dute. 1991. Pedicel abscission of soybean - cytological and ultrastructural changes induced by auxin and ethephon. **Can. J. Bot.** 69: 2177-2186.
- Oono, Y., C. Ooura, A. Rahman, E.T. Aspuria, K. Hayashi, A. Tanaka and H. Uchimiya. 2003. *p*-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in *Arabidopsis* root. **Plant Physiol.** 133: 1135-1147.
- Osborne, D.J. 1989. Abscission. **Crit. Rev. Plant Sci.** 8 : 103-129.
- Patterson, S.E. 2001. Cutting loose: abscission and dehiscence in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 126: 494-500.
- Patterson, S.E. and A.B. Bleeker. 2004. Ethylene -dependent and independent processes associated with floral organ abscission in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 134: 194-203.
- Payasi, A. and G.G. Sanwal. 2003. Pectate lyase activity during ripening of banana fruit. **Phytochemistry** 63: 243-248.

- Payton, S., R.G. Fray, S. Brown and D. Grierson. 1996. Ethylene receptor expression is regulated during fruit ripening, flower senescence and abscission. **Plant Mol. Biol.** 31: 1227-1231.
- Poovaiah, B.W., G.M. Glenn and A.S.N. Reddy. 1988. Calcium and fruit softening : physiology and biochemistry. **Hort. Rev.** 10: 107-152.
- Poovaiah, B.W. and H.P. Rasmussen. 1973. Peroxidase activity in the abscission zone of bean leaves during abscission. **Plant Physiol.** 52: 263-267.
- Pruitt, K.D. and R.L. Last. 1993. Expression patterns of duplicate tryptophan synthase *B* genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.** 102: 1019-1026.
- Roberts, J.A., C.A. Whitelaw, Z.H. Gonzalez-Carranza and M.T. McManus. 2000. Cell separation process in plant-model, mechanisms and manipulation. **Ann. Bot.** 86: 223-235.
- Roberts, J.A., C.B. Schindler and G.A. Tucker. 1984. Ethylene-promoted tomato flower abscission and the possible involvement of an inhibitor. **Planta** 160:164-167.
- Roberts, J.A. and D.J. Osborne. 1981. Auxin and the control of ethylene production during the development and senescence of leaves and fruits. **J. Exp. Bot.** 32: 875-877.
- Roberts, J.A., K.A. Elliott and Z.H. Gonzalez-Carranza. 2002. Abscission, dehiscence and other cell separation processes. **Annu. Rev. Plant Biol.** 53: 131-158.
- Roberts, L.W., P.B. Gahan and R. Aloni. 1988. **Vascular Differentiation and Plant Growth Regulators**. Springer-Verlag, Berlin.

- Rohde, A., M.V. Vanmontagu and W. Boerian. 1999. The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE (ABI3)* gene is expressed during vegetative quiescence processes in *Arabidopsis*. **Plant Cell Environ.** 22: 261-270.
- Rose, J.K.C. 2003. **The Plant Cell Wall**. Blackwell Publishing, Oxford.
- Rubinstein, B. and A.C. Leopold. 1963. Analysis of the auxin control of bean leaf abscission. **Plant Physiol.** 38: 262-267.
- Sekai, W.S. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant materials using toluidine blue O. **Stain Technol.** 48: 247-249.
- Sexton, R. 1982. Cell biology of abscission. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 33: 133-162.
- Sexton, R. 1997. The role of ethylene and auxin in abscission. **Acta Hort.** 463: 435-444.
- Sexton, R. 2002. Abscission, pp. 205-227. In M. Pessarakis, ed. **Handbook of Plant and Crop Physiology**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Sexton, R. and A.J. Redshaw. 1981. The role of cell expansion in the abscission of *Impatiens sultani* leaves. **Ann. Bot.** 48: 745-756.
- Sexton, R., G. Laird and W.G. van Doorn. 2000. Lack of ethylene involvement in tulip tepal abscission. **Physiol. Plant.** 108: 321-329.
- Sexton, R. and J. A. Roberts. 1982. Cell biology of abscission. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 33: 133-162.

- Sexton, R., L.N. Lewis, A.J. Trewavas and P. Kelly. 1985. Ethylene and abscission, pp. 173-196. In J.A. Roberts and G.A. Tucker ,eds. **Ethylene and Plant Development**. Butterworths, London.
- Stepanova, A.N., J.M. Hoyt, A.A. Hamilton and J.M. Alonso. 2005. A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 17:2230-2242.
- Sussman, M.R., M.H.M. Goldsmith. 1981. The action of specific inhibitors of auxin transport on uptake of auxin and binding of N-1-naphthylphthalamic acid to membrane site in maize coleoptiles. **Planta** 152: 13-18.
- Suttle, J.C. 1988. Effect of ethylene treatment on polar IAA transport, net IAA uptake and specific binding of N-1-naphthylphthalamic acid in tissues and microsomes isolated from etiolated pea epicotyls. **Plant Physiol.** 88: 795-799.
- Tabuchi, T., A. Uesugi, A. Furukawa, M. Moriyama and K. Toba. 2005. Anatomical and histochemical studies of the abscission process in the juncture tissue between the perianth and receptacle tissue on *Lilum* 'Pollyanna'. **Acta Hort.** 673: 713-716.
- Taylor, J.E. and C.A. Whitelaw. 2001. Signals in abscission. **New Phytol.** 151: 323-329.
- Taylor, J.E., G.A. Tucker, Y. Lasslett, C.J.S. Smith, C.M. Arnold, C.F. Watson, W. Schuch, D. Grierson and J.A. Roberts. 1990. Polygalacturonase expression during leaf abscission of normal and transgenic tomato plants. **Planta** 183: 133-138.
- Taylor, J.E., S.A. Coupe, S. Picton and J.A. Roberts. 1994. Characterization and accumulation pattern of an mRNA encoding an abscission-related β -1,4-glucanase from leaflets of *Sambucus nigra*. **Plant Mol. Biol.** 24: 961-964.

- Trebitsh, T. and J. Riov. 1987. Inhibition of activity of the ethylene forming enzyme by α (*p*-chlorophenoxy) isobutyric acid. **Plant Growth Regul.** 5: 207-215.
- Trewavas, A. 1991. How do plant growth substances work? 2. Opinion. **Plant Cell Environ.** 14: 1-12.
- Tsai, D.S. and R.N. Arteca. 1984. Inhibition of IAA induced ethylene production in etiolated mung bean hypocotyl segments by 2,3,5-triiodobenzoic acid and 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methyl propionic acid. **Physiol. Plant.** 62: 448-452.
- Tucker, G.A., C.B. Schindler and J.A. Roberts. 1984. Flower abscission in mutant tomato plants. **Planta** 160: 164-167.
- Tucker, M.L., R. Sexton, E. del Campillo and L.N. Lewis. 1988. Bean abscission cellulase. Characterization of a cDNA clone and regulation of gene expression by ethylene and auxin. **Plant Physiol.** 88: 1257-1262.
- Tucker, M.L. and S.B. Milligan. 1991. Sequence analysis and comparison of avocado fruit and bean abscission cellulases. **Plant Physiol.** 95: 928-933.
- Tucker, M.L., S.L. Baird and R. Sexton. 1991. Bean leaf abscission: tissue specific accumulation of a cellulase mRNA. **Planta** 186: 52-57.
- Ulmasov, T., G. Hagen and T. Guilfoyle. 1997. ARF1, a transcription factor that binds to auxin responsive elements. **Science** 276: 1865-1868.
- Valdovinos, F.G. and T.E. Jensen. 1973. Abscission: modification of the endoplasmatic reticula of abscission cells by ethylene. **Plant Physiol.** 51: 29.

- Valdovinos, J.G., T.E. Jensen and S.J. Lieberman. 1985. An ultrastructural and physiological study of the effects of actinomycin D and cycloheximide on abscission of tobacco flower pedicels. **Bot. Gaz.** 146: 308-314.
- Van Altvorst, A.C. and A.G. Bovy. 1995. The role of ethylene in the senescence of carnation flowers, a review. **Plant Growth Regul.** 16: 43-53.
- van Doorn, W.G. 2002. Effect of ethylene on flower abscission: a survey. **Ann. Bot.** 89: 689-693.
- van Doorn, W.G. and A.D. Stead. 1997. Abscission of flowers and floral parts. **J. Exp. Bot.** 48: 821-837.
- van Meeteren, U. and H. van Gelder. 1995. Role of flower buds in flower bud abscission in *Hibiscus*. **Acta Hortic.** 405:284-289.
- Venkatarayappa, T., M.J. Tsujita and D.P. Murr. 1981. Influence of cobaltous ion (Co^{2+}) on the postharvest of "Samantha" roses. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** 105: 148-151.
- Whitehead, C.S., A.H. Halevy and M.S. Reid. 1984. Control of ethylene synthesis during development and senescence of carnation petals. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** 109: 473-475.
- Whitelaw, C.A., N.N. Lyssenko, L. Chen, D. Zhou and A.K. Mattoo. 2002. Delayed abscission and shorter internodes correlate with a reduction in the ethylene receptor *LeETR1* transcript in transgenic tomato. **Plant Physiol.** 128: 978-987.
- Wien, H.C. 1990. Screening pepper cultivars for resistance to flower abscission: a comparison of techniques. **HortScience** 25: 1634-1636.

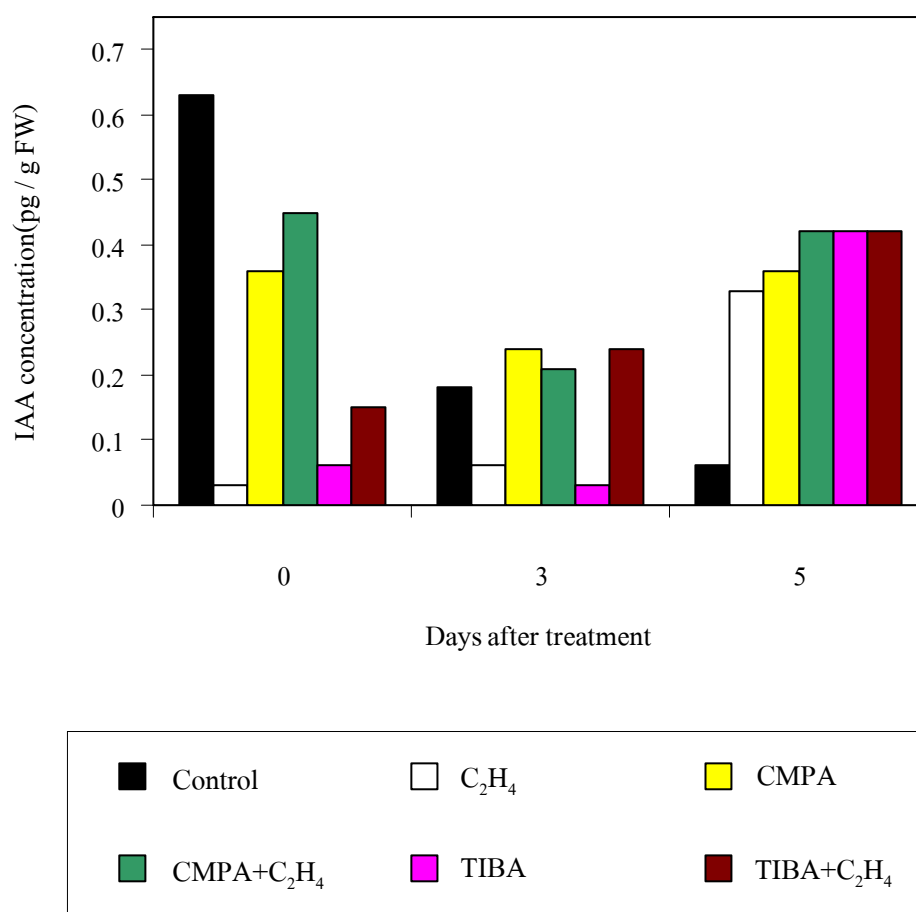
- Wien, H.C., A.D. Turner and C.J. Ho. 1992. The influence of auxin transport inhibitor placement on stress-induced flower abscission in *Capsicum*, pp. 446-452. In C.M. Karssen, L.C. van Loon and D. Vreugdenhil, eds. **Progress in Plant Growth Regulation**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Woltering, E.J. and W.G. van Doorn. 1988. Role of ethylene in senescence of petal - morphological and taxonomical relationships. **J. Exp. Bot.** 39: 1605-1616.
- Woodward, A.W. and B. Bartel. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. **Ann. Bot.** 95: 707-735.
- Worley, C.K., N. Zenser, J. Ramos, D. Rouse, O. Leyser, A. Theologis and J. Callis. 2000. Degradation of Aux/IAA proteins is essential for normal auxin signalling. **Plant J.** 21: 553-562.
- Yamada, T., W. Marubashi, T. Nakamura and M. Niwa. 2001. Possible involvement of auxin-induced ethylene in an apoptotic cell death during temperature-sensitive lethality expressed by hybrid between *Nicotiana glutinosa* and *N. repanda*. **Plant Cell Physiol.** 42: 923-930.
- Yip, K.C. and C.S. Hew. 1988. Ethylene production by young *Aranda* orchid flowers and buds. **Plant Growth Regul.** 7: 217-222.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ทางสถิติ (analysis of variance) ปริมาณ IAA ในส่วนเส้าเกสร+รังไข่ และปริมาณ IAA ในส่วนก้านดอก ทั้งในดอกตูมและดอกบานของดอกกล้วยไม้ สกุลหวายพันธุ์มัสทีน

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	<i>F</i> Value	Pr > <i>F</i>
Model	3	0.16901250	0.05633750	2.61	0.0794
Error	20	0.43095000	0.02154750		
Total	23	0.59996250			

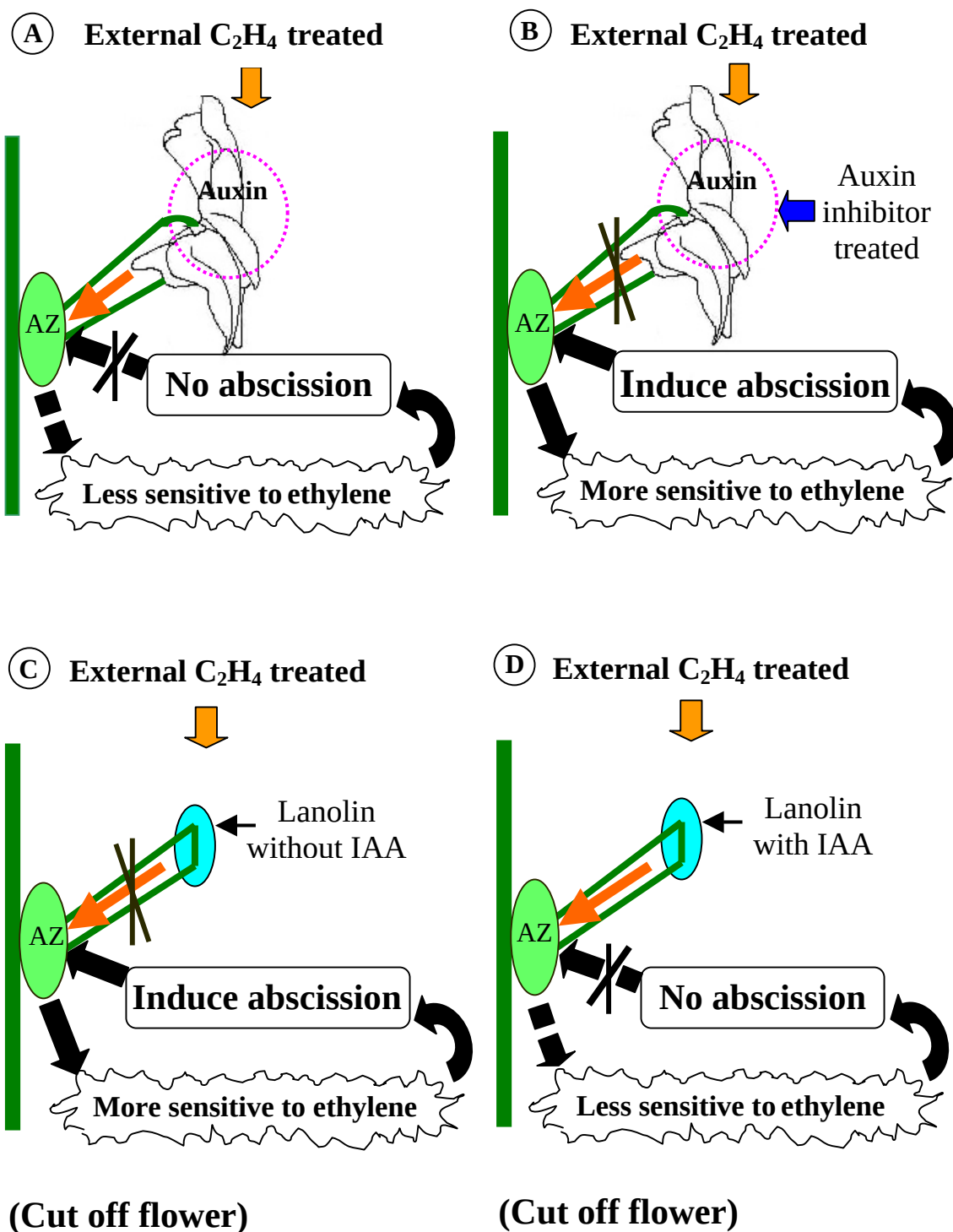
C.V. = 71.17 %



ภาพผนวกที่ 1 ปริมาณ IAA ในส่วนเส้าเกสรร่วมกับรังไข่ของดอกกล้วยไม้พันธุ์มัสทีน หลังจากได้รับสารยับยั้งการทำงานและสารยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซินร่วมกับการได้รับเอทิลีนและไม่ได้รับเอทิลีนในช่วงเวลาต่าง ๆ

		Percent Identity														
Divergence		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
	1		29.3	26.3	26.0	26.3	29.7	27.3	28.1	29.0	28.7	57.5	29.0	52.5	1	Orchid-Missteen.pro
	2	127.9		44.2	44.2	44.2	43.5	45.7	71.9	78.2	89.9	31.5	48.9	35.8	2	Capsicum-CAA565826.PRO
	3	133.0	80.3		99.7	100.0	53.8	53.6	43.8	45.1	43.2	30.0	53.9	32.7	3	Capsicum-CAA58686.pro
	4	134.5	80.3	0.3		99.7	53.4	53.6	43.5	44.8	42.9	29.7	53.6	32.7	4	Capsicum-CAA65827.PRO
	5	133.0	80.3	0.0	0.3		53.8	53.6	43.8	45.1	43.2	30.0	53.9	32.7	5	Citrus AAB65155.PRO
	6	112.9	81.2	65.2	65.9	65.2		57.2	42.9	44.8	42.9	31.9	59.4	32.7	6	Citrus AAB65156.PRO
	7	130.1	75.7	66.5	66.5	66.5	58.5		44.2	44.8	44.5	30.0	66.7	31.5	7	Oryza-XP_479767.PRO
	8	127.9	35.2	81.1	82.0	81.1	82.0	79.0		73.8	70.0	29.7	49.2	32.1	8	Phaseolus-AAA02563.PRO
	9	126.5	25.8	78.6	79.4	78.6	75.2	77.3	32.2		77.9	29.7	49.5	32.1	9	Sambucus-CAA52343.PRO
	10	133.9	10.9	82.9	83.8	82.9	81.2	78.2	38.2	26.2		31.2	48.6	34.6	10	Tomato Cel1-AAA69908.PRO
	11	55.6	108.6	116.2	117.5	116.2	106.7	117.7	119.9	116.0	112.2		31.2	85.2	11	Tomato Cel3-AAC49704.PRO
	12	124.8	67.9	67.0	67.8	67.0	54.8	42.3	67.9	67.9	68.6	114.2		35.8	12	Tomato Cel5-AAC62241.PRO
	13	59.2	90.4	103.2	103.2	103.2	99.7	101.9	111.0	108.4	96.8	14.3	91.2		13	Tomato Cel6-AAB46829.PRO
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		

ภาพผนวกที่ 2 การแสดงความเหมือน (percent identity) ของลำดับอะมิโนในกล้วยไม้หายพันธุ์
มัสทีนกับ β -1,4-glucanase หรือ cellulase ในพืชอื่น ๆ



ภาพผนวกที่ 3 แบบจำลองการไม่ร่วงของดอกบานกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มัสตินที่ได้รับเอทิลีน; ดอกบานปกติมีออกซินเคลื่อนที่มายัง AZ (A) การตัดดอกบานออก (B) การให้สารยับยั้งออกซินแก่ดอกบาน (C) การให้ออกซินหลังจากตัดดอกบานออก (D)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวกาญจนา รุ่งรัชกานนท์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	15 กันยายน 2506
สถานที่เกิด	กรุงเทพฯ
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เกษตรศาสตร์) วท.ม. (ชีววิทยาศาสตร์ภาวะแวดล้อม)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	อาจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ ม. อุบลราชธานี
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนพัฒนาอาจารย์ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา